



T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYAL ELEKTROKİMYASAL HÜCRELERDE
REAKTİF SARI 145 VE PONCEAU S BOYALARININ RENK
GİDERİMİ**

RÜMEYSA EMİNE CEBECİOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tunç ÇATAL

İSTANBUL-2020

T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYAL ELEKTROKİMYASAL HÜCRELERDE
REAKTİF SARI 145 VE PONCEAU S BOYALARININ RENK
GİDERİMİ**

RÜMEYSA EMİNE CEBECİOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tunç ÇATAL

İSTANBUL-2020

BEYAN FORMU

Bu çalışmanın kendi tez çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.



Tarih
Adı Soyadı
İmzası

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım andan, mezuniyet anıma kadar bana her daim kıymetli bilgileri, birikimleri, başarıları, hayata bakış açısı ve tecrübeleri ile yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Tunç Çatal'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca, özellikle yoğun çalıştığım tez dönemim boyunca bana maddi-manevi destek olan, her zaman bana güç veren, ilham olan ve her düştüğümde kaldıran değerli annem Kevser Cebecioğlu'na, kendine has bakış açısı ve açık fikirliliği ile akademik konuşmalar yapabildiğim, fikir alabildiğim kıymetli babam Yılmaz Cebecioğlu'na, eve her yorgun geldiğimde beni güldüren bana yardım eden ve akademik kariyerimde örnek biri olmam için beni motive eden kardeşim Melikşah Cebecioğlu'na, beni ve mesleğimi herkesten ve her şeyden üstün tutan, motive eden ve bilgilerimi taze tutmamı sağlayan canım abim Buğra Cebecioğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Üniversite hayatım boyunca hem akademik hem sosyal çalışmalarında yardımını esirgemeyen, bana hep destek olan, beraber hedefler belirleyip, onlara ulaşmak için benimle birlikte zor süreçlerden başarı ile geçen arkadaşım Yüksek Biyomühendis Dilan Akagündüz'e teşekkür ederim.

ÖZET

Sanayileşmenin artmasıyla birlikte küresel bir çevre kirliliği sorunu ortaya çıkmıştır. Özellikle son yıllarda, oldukça toksik organik bileşikler dolaylı veya doğrudan çevreye salınır. Boyalar, böcek ilaçları, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ilaç atıkları ve ağır metaller ana atıklar olarak gösterilmektedir. En çok kullanılan boya maddeleri, aromatik aminler içeren azo boyalarıdır. Ponceau S açık kırmızı bir diazo boyadır ve tekstil endüstrisinde doğal materyallerin boyanmasında kullanılır. Reaktif Sarı 145 boya, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve düşük biyodegradasyona sahip olan aromatik bir diğer azo boyadır. Mikrobiyal elektrokimyasal hücreler, elektrik ve hidrojen gibi yenilenebilir kaynaklardan enerji üretebilen alternatif sistemlerdir. Mikrobiyal elektrokimyasal hücrelerden olan, mikrobiyal yakıt hücreleri ve mikrobiyal elektroliz hücreleri, elektrojenik mikroorganizmalar kullanarak atık suyu işleyebilen küçük boyutlu yenilikçi teknolojilerdir. Mikrobiyal yakıt hücreleri ile azo boya varlığında eş zamanlı elektrik üretimi ve azo boya giderimi, çevre kirliliğinin önlenmesi noktasında yeni bir yaklaşım sağlayabilir. Bu nedenle, Reaktif Sarı 145 ve Ponceau S gibi azo boyaların tek odacıklı mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektrik üretimi üzerindeki etkileri renk giderim verimlilikleriyle birlikte incelenmiştir. Ayrıca, mikrobiyal elektrokimyasal hücrelerde operasyonlarında azo boyaların, elektrik ve hidrojen üretim verimlerine etkileri araştırılmıştır. pH değerlerindeki değişiklikler, kimyasal oksijen ihtiyacı analizi, saatlik renk giderim oranı, boya absorpsiyon taramaları ve memeli hücre kültüründe hücre canlılığı üzerine etkileri saptanmıştır. Mikrobiyal yakıt hücrelerinde sırasıyla 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyona sahip Reaktif Sarı 145 boyası ve 40 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyona sahip Ponceau S boyası test edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Ponceau S boyası (40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹) mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi için test edilmiştir. Test edilen azo boyaların varlığında elektrik üretimi gözlenmiş, ancak 40 mg L⁻¹ Reaktif Sarı 145 kullanılarak voltaj üretimini azalttığı saptanmıştır. Test edilen tüm konsantrasyonlarda Ponceau S varlığında, mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi başarılmıştır. Sonuç olarak, mikrobiyal elektrokimyasal hücreler kullanılarak, tekstil azo boya maddelerinin varlığında elektrik ve hidrojen üretiminin gerçekleştirilebileceği ve boya giderimlerinin sağlanabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Azo boya; Boya giderimi; Elektrik; Hidrojen; Mikrobiyal yakıt hücresi; Mikrobiyal elektroliz hücresi



ABSTRACT

A global environmental pollution problem has arisen due to the increase in industrialization. Especially in recent years, highly toxic organic compounds are released indirectly or directly into the environment. Dyes, pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, drug wastes and heavy metals are shown as main wastes. The most commonly used dyes are azo dyes containing aromatic amines. Ponceau S is a light red diazo dye and is used in the textile industry for dyeing natural materials. Reactive Yellow 145 dye is another aromatic azo dye which is widely used in textile industry and has low biodegradation. Microbial electrochemical cells are alternative systems that can generate energy from renewable sources such as electricity and hydrogen. Microbial fuel cells and microbial electrolysis cells, which are microbial electrochemical cells, are small-sized innovative technologies that can process wastewater using electrogenic microorganisms. Simultaneous electricity generation and azo dye removal in the presence of azo dye with microbial fuel cells can provide a new approach to preventing environmental pollution. Therefore, the effects of azo dyes such as Reactive Yellow 145 and Ponceau S on electricity production in single-chamber microbial fuel cells have been studied along with their color removal efficiencies. In addition, the effects of azo dyes on electricity and hydrogen production efficiencies were investigated in their operations in microbial electrochemical cells. Changes in pH values, chemical oxygen demand analysis, hourly color removal rate, dye absorbance scans, computational chemistry methods and effects on color removal mechanism and cell viability in mammalian cell culture were determined. Reactive Yellow 145 dye with a concentration of 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ and 20 mg L⁻¹ and Ponceau S dye with 40 mg L⁻¹ and 20 mg L⁻¹ concentration were tested in microbial fuel cells, respectively. Different concentrations of Ponceau S dye (40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ and 20 mg L⁻¹) were tested for hydrogen production in microbial electrolysis cells. Electricity generation was observed in the presence of the azo dyes tested, but it was found to reduce voltage production using 40 mg L⁻¹ of Reactive Yellow 145. Hydrogen production in microbial electrolysis cells was achieved in the presence of Ponceau S at all concentrations tested. As a result, it was concluded that by using microbial electrochemical cells, in the presence of textile azo dyes, electricity and hydrogen production can be realized and dye removal can be provided.

Keywords: Azo dyes; Dye removal; Electricity; Hydrogen; Microbial fuel cell;
Microbial electrolysis cell



İÇİNDEKİLER

BEYAN FORMU.....	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLO DİZİNİ.....	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Boyalar ve Genel Özellikleri.....	3
2.2. Sentetik Boyalar	5
2.3. Azo Boyalar.....	6
2.4. Azo Boyaların Sentezlenmesi	9
2.5. Azo Boyaların Çevreye Etkisi.....	10
2.6. Azo Boyaların Toksisitesi	11
2.7. Azo Boyaların Atık Sularda Renk Giderimi	12
2.8. Boyaların Renk Giderimi ve Etkileyen Faktörler.....	15
2.8.1. Oksijenin Etkileri.....	15
2.8.2. Sıcaklığın Etkileri	15
2.8.3. pH Değişiminin Etkileri.....	15
2.8.4. Konsantrasyonun Etkileri	16
2.8.5. Boya Yapısının Etkileri	16
2.9. Biyosorpsiyon.....	17
2.10. Biyodegradasyon	17
2.11. Bakteriyel Biyodegradasyon	18

2.11.1. Anaerobik Koşullar Altında Renk Giderimi.....	20
2.11.2. Azoredüktaz Enzimi	21
2.11.3. Lakkaz Enzimi	23
2.11.4. Aerobik Koşullar Altında Renk giderim.....	24
2.12. Mikrobiyal Yakıt Hücreleri	24
2.12.1. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin Bileşenleri	26
2.12.2. Anot Elektrot	27
2.12.3. Katot Elektrot.....	28
2.12.4. Proton İletken Zar	28
2.12.5. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinden Elektrik Enerjisinin Eldesi	29
2.13. Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri	31
2.13.1. Fototrofik ve Fermantatif Hidrojen Üretimi	34
2.13.2. Hidrojenaz Enzimi	36
2.13.3. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinin Bileşenleri	37
2.13.4. Anot Elektrot	38
2.13.5. Katot Elektrot.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Sentetik Atık Su.....	39
3.2. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin (MYH) Kurulumu	41
3.3. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin Aşılması ve Operasyonu.....	42
3.4. Spektrofotometre ile Absorbans Ölçümü (Renk giderim)	44
3.5. Spektrum Tarama	44
3.6. Saatlik Absorbans Ölçümü	44
3.7. Hücre Kültürü.....	45
3.7.1. Boya Ekstraktlarının Hazırlanması.....	45
3.7.2. Serumlu Medyum Hazırlanması	45

3.7.3. ECV 304 Hücrelerinin Stoktan Açılması ve Büyütülmesi	46
3.7.4. ECV 304 Hücre Sayımı	46
3.7.5. MTT Assay Uygulaması.....	47
3.8. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi ve pH ölçümü.....	47
3.9. Tek Odalı Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri Yapımı	48
3.10. Mikrobiyal Elektroliz Hücresi Aşılama ve Operasyonu	49
4.BULGULAR.....	50
4.1. Spektrofotometrik Absorbans Ölçümü.....	50
4.1.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Renk Giderimi	50
4.1.2. Ponceau S Boyasının Renk Giderimi	51
4.2. Saatlik Renk Giderim Oranları.....	52
4.2.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Saatlik Renk Giderim Oranının Hesaplanması.....	52
4.2.2. Ponceau S Boyasının Saatlik Renk Giderim Oranının Hesaplanması.....	53
4.3. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Elektrik Üretimi	53
4.3.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Elektrik Üretimi.....	54
4.3.2. Ponceau S Boyasının Elektrik Üretimi	54
4.4. Sitotoksite Analizi	55
4.4.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının ECV 304 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	55
4.4.2. Ponceau S Boyasının ECV 304 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	56
4.5. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde Hidrojen Üretimi.....	56
4.6. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde Renk Giderim.....	58
4.7. Kimyasal Oksijen İhtiyacı Analizi ve pH Ölçümü.....	59
4.7.1. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde KOİ Analizi.....	59

4.7.2. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde KOİ Analizi.....	60
4.8. Spektrum Tarama	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
7.KAYNAKLAR	76



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Aşılama solüsyonunun içeriği.....	43
Tablo 2: MTT uygulama dozlarının içeriği.....	45
Tablo 3: Serumlu medyum içeriği.....	46
Tablo 4: pH değerleri	61



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: Azo boyaların genel yapısı	7
Şekil 2.2: Azo boya yapısı doğrusal gösterimi	7
Şekil 2.3: Azo boya yapısı cis formu	7
Şekil 2.4: Azo boya yapısı trans formu	7
Şekil 2.5: Diazonyum iyonu sentezlenmesi	9
Şekil 2.6: Azoredüktaz enzimi ve reaksiyonları	23
Şekil 2.7: Tek bölmeli MYH	26
Şekil 2.8: Anotta elektron transfer mekanizmaları	27
Şekil 2.9: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde temel iyon transferi	31
Şekil 2.10: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi	33
Şekil 2.11: Mikrobiyal elektroliz hücresi ve bileşenleri	37
Şekil 3.1: Reaktif Sarı 145 konformer yapısı	39
Şekil 3.2: Reaktif Sarı 145 boyası ve NaPO_4 içinde çözünmüş formu	40
Şekil 3.3: Ponceau S konformer hali (Spartan programı ile çizildi)	40
Şekil 3.4: Ponceau S boyası ve NaPO_4 içinde çözünmüş formu	41
Şekil 3.5: Ponceau S boyası MTT uygulaması	42
Şekil 3.6: Mikrobiyal Elektroliz Hücresi	48
Şekil 4.1: Reaktif Sarı 145 boyası (%) renk giderim oranları	51
Şekil 4.2: Ponceau S boyası (%) renk giderim oranları	52
Şekil 4.3: Reaktif Sarı 145 boyasının saatlik renk giderim oranları	53
Şekil 4.4: Ponceau S boyasının saatlik renk giderim oranları	53
Şekil 4.5: Reaktif Sarı 145 boyasının MYH'de elektrik üretimi	54
Şekil 4.6: Ponceau S boyasının MYH de elektrik üretimi	55

Şekil 4.7: Reaktif Sarı boyası MTT analiz sonuçları	56
Şekil 4.8: Ponceau S boyası MTT analiz sonuçları	56
Şekil 4.9: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi	58
Şekil 4.10: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi (kontrol)	58
Şekil 4.11: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde Ponceau S boyasının renk giderimi	59
Şekil 4.12: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde Ponceau S boyasının renk giderimi	59
Şekil 4.13: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde Ponceau S boyasının % KOİ giderimi	60
Şekil 4.14: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde Ponceau S boyasının % KOİ giderimi	60
Şekil 4.15: Reaktif Sarı 145 boyasının spektrum taraması	62
Şekil 4.16: Ponceau S boyasının Spektrum taraması	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATPaz: Adenozin trifosfataz

BOİ: Biyokimyasal oksijen ihtiyacı

DMEM: Minimal temel besiyeri

e⁻: Elektron

ECV-304: Sağlıklı insan endotel hücre hattı

FBS: Fetal sığır serumu

GC: Gaz kromatografi

H⁺: Proton

KOI: Kimyasal oksijen ihtiyacı

MEH: Mikrobiyal elektroliz hücresi

MTT: (3- (4,5-dimetil tiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromür

MYH: Mikrobiyal yakıt hücresi

N=N: Nitrojen bağı

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit

PTFE: Politetrafloretilen

TCA: Trisiklik antidepresanlar

V: Volt

Ω: Ohm

1. GİRİŞ

Sanayileşme, gelişen teknoloji ve yoğun nüfus artışına bağlı olarak çevresel kirlilik hızlı bir şekilde artmaktadır ve aynı şekilde kullanılabilir enerji kaynakları ise azalmaktadır. Çevresel kirlilikten en çok etkilenen kaynaklar arasında su kaynakları bulunmaktadır. Önlenemeyen bir şekilde özellikle büyükşehirde yüksek miktarda atık su oluşumu gözlenmektedir ve bu atık sular yüksek oranda ağır metaller ve boyar maddeler içermektedir. Atık suların oluşumu ve içerikleri ise insanlar başta olmak üzere birçok canlıya zarar vermektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılında yayınladığı bildiride, dünya genelinde çeşitli salgın hastalıklara yol açan ve 2.1 milyondan fazla insanın ölümüne yol açan atık su kaynakları bulunduğunu belirtmiştir (UNICEF ve WHO, 2012). Buna bağlı olarak atık suların arıtılması dünya çapında önem kazanmaktadır.

Atık suların artmasıyla beraber dünya genelinde temiz su kaynaklarına duyulan ihtiyaç artmaktadır. Temiz su kaynaklarının bulunabilirliği azaldığı için; mevcut su kaynaklarının sürdürülebilirliği, ilave su kaynaklarının araştırılması veya atık suların biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemlerle geri dönüştürülmesi gibi çalışmalar önem kazanmaktadır. Kimyasal yöntemlerde, kirletici maddelerle reaksiyona girerek, sudan uzaklaştırılmaları için ilave kimyasallar kullanılır. Buna bağlı olarak atık sularda bulunan net kimyasal madde miktarını arttırdığı için diğer yöntemlere göre daha az tercih edilmektedir (Samer, 2015). Biyolojik yöntemlerle atık su arıtımındaki temel mantık ise, tam mineralizasyona ulaşmak için organik kirleticilerin aşamalı olarak oksitlenmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, birçok atık su bileşeni biyo-bozunmaya karşı dirençli yapıya sahiptir veya karbondioksit ve suya tam dönüşümlerini sağlamak yerine sadece küçük yapısal değişiklikler göstermektedirler (Smit ve Nasr, 1992). Biyolojik arıtmada, atık sudaki kirleticilerin biyolojik olarak parçalanması amacıyla mikroorganizmalar kullanır. Biyolojik arıtım sistemlerinde genellikle atık sudaki çözünmüş oksijenin miktarına göre aerobik, anaerobik veya fakültatif olarak sınıflandırılmaktadır. Araştırmacılar son yıllarda mikrobiyal yakıt hücrelerini (MYH) ve mikrobiyal elektrik hücrelerini (MEH), atık suların enerji verimli olacak şekilde arıtımı ve sürdürülebilir enerji üretimi için umut vadeci bir teknoloji olarak kullanmaya başlamıştır. MYH'ler, mikroorganizmaların katalitik aktivitesini kullanarak atık suda bulunan organik bileşiklerin sahip olduğu kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürebilen

biyoelektrokimyasal sistemlerdir. MYH'ler biyoelektrik üretimi yaparken herhangi bir elektrik kaynağına ihtiyaç duymamaktadır (Mathuriya ve Sharma, 2009).

Bu tez çalışmasında, atık su kaynaklarında mikrobiyal yakıt hücreleri (MYH) ve mikrobiyal elektrik hücreleri (MEH) ile renk giderimi üzerine çalışılmıştır. Oluşturulan besi ortamına tekstil sektörlerinde yaygın olarak kullanılan Ponceau S ve Reaktif Sarı 145 boyası ilave edilmiştir. Azo boyaların her ikisi de atık sularda tespit edilen dozlara uygun olacak şekilde ayrı ayrı araştırılmıştır. Renk gideriminin (renk giderim) yanı sıra, sağlıklı ökaryotik hücreler üzerinde sitotoksite analizi, voltaj üretimi, hidrojen gazı üretimi, saatlik renk giderimi, UV absorbans ölçümü, pH değişimi ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizi üzerine çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boyalar ve Genel Özellikleri

Boyalar tekstil, kâğıt, deri ve benzeri maddelere renk vermek için kullanılan; renklendirmenin ısı, ışık, yıkanma ve benzeri etmenlerle değişmesini önleyen maddelerdir. Boyaların birçoğu organik yapıda bileşiklerdir. Boyaların çoğu aromatik bileşiklerdir ve yapılarında benzen bulundurmaktadırlar. Benzen 200 nm dalga boyunda ışığı emebilme özelliği göstermektedir (Azzopardi, 2017) .

Boyar maddelerin temel yapısında üç grup bulunmaktadır. Bu gruplar; kromoforlar, oksokromlar ve matriks. Kromofor grupları boyalarda nitro ($-\text{NO}_2$), azo ($-\text{N}=\text{N}-$), nitroso ($-\text{N}=\text{O}$), tiyokarbonil ($-\text{C}=\text{S}$), karbonil ($-\text{C}=\text{O}$) ve alkenler ($-\text{C}=\text{C}-$) olarak yer almaktadırlar. Boyalardaki renklendirme özelliği kromofor ile ilişkilendirilmektedir. Boyalar aromatik bileşikler olduklarından dolayı aril halkaları içermektedirler. Aril halkaları farklı dalga boylarında elektromanyetik radyasyonu emerler ve boyaları renklendirmezler. Kromofor yapılarının farklı dalga boylarında yaptığı emilim, görünür aralıkta (400-700 nm) gerçekleştiği için boyalar ve cisimler renkli görülürler (Laurent ve ark., 2010; Temesgen ve ark., 2018). Kromoforlar, enerji değiştirebilen atomik yapılardır. Alternatif tek ve çift bağlar yapmış olan atomlardan oluşmaktadırlar (Temesgen ve ark., 2018). Bitişik olarak bulunan atomlar çift bağa sahip ise bu yapılara konjüge çift bağlar denmektedir ve yapıda bulunan bağlar birbirleri ile etkileşim halinde bulunmaktadır. Kromofor yapısında genellikle konjüge bağlar bulunur ve bu yapıya sahip olan kromofor yapıları daha etkili olarak çalışmaktadırlar. Yapılarında bulunan elektronları aromatik bileşiklerde bulunan aril halka yapılarına transfer ederek, enerji değişimine yol açmaktadırlar. Moleküllerde ki enerji değişimi de absorbe edilen radyasyonun dalga boyunda değişikliğe yol açmaktadır ve renklendirme işlemi gerçekleşmektedir (Fessenden., 1990; Xiaojun ve ark., 2000).

Kromojenik molekül yapısına oksokrom grubunun eklenmesiyle yapı, boyama özelliğine sahip hale gelmektedir. Oksokromik gruplar ile boya yapılarının sabitlenmesi gerçekleşir ve boyanın rengini değiştirebilmektedir. Oksokrom grupları asidik (COOH , SO_3 ve OH) veya bazik (NH_2 , NHR ve NR_2) özelliktedirler. Oksokromlar, boya yapılarında bulunan ve iyonize olmayan bileşiklere bağlanan ama iyonize özellik gösteren gruplardır.

Bağlandıkları bileşiklerin derinleşmesine ve yoğunlaşmasına sebep olurlar ve renk artırıcı olarak görev yaparlar. Boya moleküllerinin geri kalan grupları ise boyanın üçüncü kısmı olan matrisi oluşturmaktadırlar. Bunun yanı sıra bir çok endüstriyel boya bozulması oldukça güç olan karboksilik, amin ve azo grupları gibi fonksiyonel gruplar içermektedir. Boyalar, suda ve moleküler yapısına uygun olan organik çözücülerde çözünebilirler. Boyalar kendilerine karşı afinitesi olan substratları renklendirmek için kullanırlar (Raman ve ark., 2016; Rauf ve ark., 2011; Kiernan., 2001).

Azo grubu içeren boyalar yani azo boyalar, en büyük organik boya ailesidir (Chang ve ark., 2005). Azo boyalar arasında en yaygın kullanılan gruplar; poliamid (naylon, yün ve ipek) ve proteinleri boyamak için kullanılan asit boyalar; polyester ve asetat gibi hidrofobik grupları boyayan yayıcı boyalar ve pamuk, ipek, keten, kâğıt gibi selülozik substratları boyayan reaktif boyalardır. Genel olarak azo boyaların sentezi iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada; aromatik amin grubunun diazo bileşiğine dönüştürülmesi gerçekleşir. Bu aşamaya diazotizasyon denir. İkinci aşamasında ise; oluşan diazo bileşiği; fenol, naftol, hoş kokulu amin gibi bir bileşik ile birleştirilir ve azo boya üretimi gerçekleşir (Talarposhti ve ark., 2001).

Boyar maddelerin etkinliği ve renklendirme verimi sıklıkla boya ve substrat arasındaki afiniteye bağlı olarak değişmektedir. Substrat boyaya karşı uygulama ortamından daha fazla afinite göstermelidir ve boyada yüksek sıcaklığa karşı dirençli olmalıdır (Aspland., 1997). Pamuk, suni ipek, selofan, keten ve kâğıt gibi selülozik substratlar hidrofilik yapıdadır ve bu yüzden hidrofilik boyalar tarafından boyanır. Boya tasarlanırken substratın suya maruz kaldığında afiniteyi koruması göz önüne alınmalıdır. Özellikle tekstil için kullanılan boyalarda bu ayrıntı oldukça önemlidir. Selülozik polimerler için kullanılan boyalar genellikle azo boyalar, reaktif boyalar ve direkt boyalardır. Direkt boyalar, bir sabitleyici ajan gerektirmeden pamuk türevi substratlara afinite gösterebilen ilk boyalardır (Mann., 1902; Baker., 1958). Proteinleri ve poliamidleri boyamak için kullanılan boyalar, substrat ile bağlanmak için polimer matrisi içinde iyonik bağlar oluştururlar. poliamidler ve yün, ipek ve deri gibi proteinler boyama işlemi gerçekleştirirken pozitif yük taşırlar yani katyon özellik gösterirler buna bağlı olarak da boyalar ise negatif yük taşırlar yani anyonik özellik gösterirler. Örnek olarak laboratuvarlarda protein boyama için kullanılan Ponceau S boyası verilebilir (Horobin., 1982; Preto, 2001).

Boyalar 1856 tarihine kadar bitkilerden, ağaçlardan, likenlerden, sebzelerden hatta böceklerden yani doğal kaynaklardan elde edilmiştir. Boya yapımı için çeşitli renklerde bitkiler kullanılmış ve çeşitli yöntemler denenmiştir. Fakat günümüzde kullanılan doğal kaynaklı boya sayısı oldukça azdır. Sebebi ise boya yapılarının kararlı olmaması ve başarılı biçimde ayrılamamasıdır. Bunlara bağlı olarak ortaya sentetik boya ihtiyacı çıkmıştır ve çalışmalar bunun üzerine yoğunlaşmıştır (Perkin ve Catlow, 1984; Zollinger., 2003).

2.2. Sentetik Boyalar

Boyar maddeler yaklaşık 4000 yıla yakın süredir kullanılmaktadır. Boyalar ilk kullanımlarından günümüze kadar gelen sürede son 150 yıl harici doğal maddelerden üretilmekteydiler. Son yüzyılda ise sentetik boyanın keşfi ile birlikte boya endüstrisinde köklü değişiklikler yaşanmıştır. İlk sentetik boya leylak rengindedir ve 1856 da William Henry Perkin tarafından Sıtma hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Quinine'yi sentezleme çalışmaları sırasında keşfedilmiştir (Ponting ve ark., 1980;Perkin, 1984). Sentetik boyanın dünya boya pazarlarında ki hâkimiyetine paralel olarak doğal boyaların önemi azalmaya başlamıştır. Günümüzde ise ticari olarak doğal boyalar sadece odun, ipek, deri ve naylonları siyaha boyamak için kullanılmaktadır. Sentetik boyalar genelde petrol türevi ya da toprak minerallerinden yapılmaktadırlar. Hidro veya yağlı çözücülerde çözünürler. Endüstrilerde en çok kullanılan sentetik boyalar azo boyalar ve reaktif boyalardır. Sentetik boya çalışmaları kömür katranı ile yapılmaya başlamıştır. Leylak renginin üretim yönteminden yola çıkılarak deneme yolu ile kömür katranından 50 farklı yeni boya bulunmuştur (Barnett., 2007; Hunger., 2003). Sentetik boyaların artmaya başlamasıyla biyoloji biliminde de kendilerine yer bulmaya başlamışlardır. 1884 yılında Hans Christian Gram kristal menekşe boyasının geri dönüşümü olmayan şekilde bazı boyaları boyadığını fakat bazı boyalardan çıkabildiğini keşfetmiştir. Bununla birlikte Gram boyama tekniği ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde Paul Ehrlich, metilen mavisinin sinir hücrelerini boyayabildiğini fakat çevresindeki boyaları boyamadığını keşfetmiştir. Dünya genelinde bir yılda endüstriyel kullanım amaçlı 7.10^7 ton sentetik boya üretimi gerçekleşmektedir. Üretilen sentetik boyaların %10'u atık sularla birlikte doğaya atılmaktadır (Gurr., 1971).

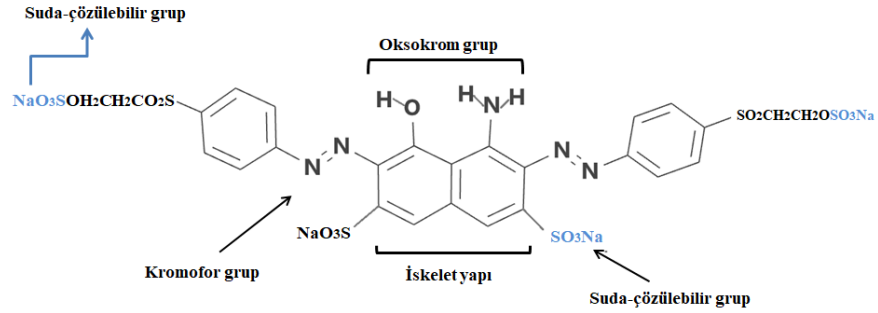
2.3. Azo Boyalar

Azo boyaları günümüzde boya endüstrisinin en fazla üretilen ve tüketilen boyaları olarak geçmektedir. Boya pazarının yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadırlar. Bu boyaların üretimi basit ve ucuzdur bu yüzden sıkça tercih edilirler. Azo boyaları tekstil, baskı ve kâğıt üretiminde kullanılan en önemli sentetik renklendiricilerdir (Shankarling ve ark., 2017). Renk indeksi (CI) azo boyaları için; Monoazolar 11000-19999, diazolar 20000-29999, triazolar 30000-34999, poliazolar 35000-36999 şeklinde sıralanmaktadır (Gürses ve ark., 2016).

İlk azo boya 1861'de Mene tarafından anilin sarısı ismi ile ve 1863'de ise Martius tarafından bismark kahverengisi olarak üretilmiştir. Ticarileştirilen ilk azo boya, 1875 yılında anilin ile m-fenilendiamin reaksiyonu sonucu oluşan chrysoidinedir. M-fenilendiamin yapısında bulunan iki amino grubunun diazotizasyonunu takiben diamin ile daha çok oranda birleşmesi sonucu ilk diazo boyasının yapısında önemli bir bileşen olarak kullanılan bismark kahverengisi yani iki azo grubuna sahip boya elde edilmiştir. Daha sonra ise 4-sülfo-1-naftilaminin ve bisdiazotize benzidin birleşmesiyle diazo boyası olan kongo kırmızısı bulundu. Kongo kırmızısının kumaşı direk olarak boyadığı görüldü ve bu yüzden ilk direk boya olarak tanımlandı. Günümüzde pH indikatörü olarak kullanılmaktadır. Azo boyalara dair ilk patent ise 1880 yılında alınmıştır. Azo boyaların yapısında bulunan nitröz asit, anilin kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ilk reaktiflerden bir tanesidir (Morris ve Travis., 1992). Nitröz asit ve arilaminler arasındaki reaksiyonlar sonucu ara ürün olarak oldukça önemli ürünler elde edilir. Oluşan ara ürünün fenoller ve arilaminler ile reaksiyonu günümüzde kullanılan ticari boyaların yarısından fazlasını oluşturmaktadır (Zhao ve ark., 2011).

Azo boyaları simetrik veya asimetrik alkil ya da aril radikallerinin birleştiği ($N=N$) nitro grubundan oluşmaktadır. Genel bir azo boya yapısı **Şekil 2.1'de** gösterilmiştir. Boyanın etkinliği, özellikleri ve rengi yapısında bulunan kromofor ve oksokromlar tarafından belirlenmektedir (Benkhaya ve ark., 2017; Rauf ve ark., 2011).

Şekil 2.1: Azo boyaların genel yapısı (Benkhaya ve ark., 2020)

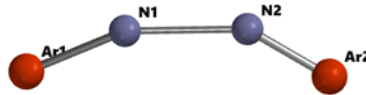


Azo boyalarında bulunan kromofor grubu *Şekil 2.2’de* gösterildiği gibi genellikle doğrusal olarak çizilir, fakat aslında azo boyaları sentezlendikten sonra, yapıda bulunan azot atomları ve aromatik halkalar arasındaki bağ açılır. Böylelikle *Şekil 2.3’de* görüldüğü gibi cis ve *Şekil 2.4’de* görüldüğü gibi trans izomerler oluşmuş olur (Merino ve Ribagorda., 2012). Ticari azo boyaları genelde trans formda bulunur. Azo grubunda bulunan azot atomu ile metal iyonlar bağ oluşturarak, boyanın renk ve benzeri özelliklerinde farklılık elde edilebilir. Azo boyalarında aromatik halka olarak genelde benzen ya da naftalin kullanılır. Bunun yanı sıra bir heterosiklik halkada bulunur. Boya yapısında bulunan aromatik halkalar, hem renk hem de boyama özelliklerini belirleyen çeşitli halkalar içerir (Kiernan, 2001).

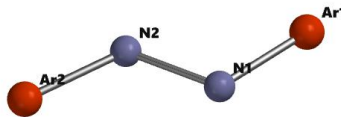
Şekil 2.2: Azo boya yapısı doğrusal gösterimi



Şekil 2.3: Azo boya yapısı cis formu



Şekil 2.4: Azo boya yapısı trans formu



Sentetik azo boyalar ($N = N$) grubuna sahiptirler ve bu gruptan dolayı kanserojen ve bozulmaya karşı dirençlidirler (Chang ve Kuo., 2000). Genellikle, azo boyaları bir, iki, üç veya daha fazla azo bağı içermektedirler. Bunun yanı sıra birçok kompleks aromatik yapıda içermektedirler. Azo boyalar kendi aralarında sahip oldukları nitrojen bağı ($N = N$) sayısına göre farklı isimlendirilmektedirler. Örneğin; monoazo boyalar bir azot nitrojen bağı içerir, diazo boyalar iki ($N = N$) içerir, triazo boyalar üç ($N = N$) bağı içerir ve poliazo boyalar üçten fazla ($N = N$) bağı içerir. Sentetik azo boyalarda bulunan azo grubu ($N = N$), aromatik ve hidroksiller (-OH), kloro (-Cl), metil (CH_3), nitro ($-NO_2$), amino ($-NH_2$) ile karboksil ($-COOH$) ve sülfonik gruplar ($-SO_3H$) ile birlikte kompleks bir yapı oluşturmaktadır (Zollinger., 1991; Chang ve ark., 2005). Azo boyalar sahip oldukları elektron çekici gruplar sebebi ile ksenobiyotik boyalar olarak da tanımlanabilmektedirler. Bunun yanı sıra doğada bozulmaya karşı dirençli olma sebepleri olarak da yine elektron çekici gruplar gösterilmektedir (Singh ve ark., 2015).

Azo boyalar günümüzde tekstil, biyolojik araştırmalar, gıda, endüstriyel, baskı, dövme, kozmetik ve klinik amaçlar için kullanılırlar (Ghodake ve ark., 2009). Hidrofobisitelerine göre, azo boyalar esas olarak iki tiptir. Bunlar; bakteriyel hücre tarafından alınan ve hücre içinde indirgenen hidrofobik azo boyalar ve bakteri hücresinin dışında indirgenen hidrofilik olanlardır (Singh ve ark., 2015).

Azo boyaların arıtımı için şimdiye dek ters ozmos, iyon değişimi, aktif karbon adsorpsiyon, elektrokimyasal oksidasyon ve filtrasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu işlemler çok pahalıdır ve bozulmadan sonra âmin kalıntıları üretimine yol açtığı için, karsinojenik özellik göstermektedir. Bu yüzden günümüzde daha çok biyolojik arıtma yöntemlerine odaklanılmaktadır (Chen ve ark., 2006).

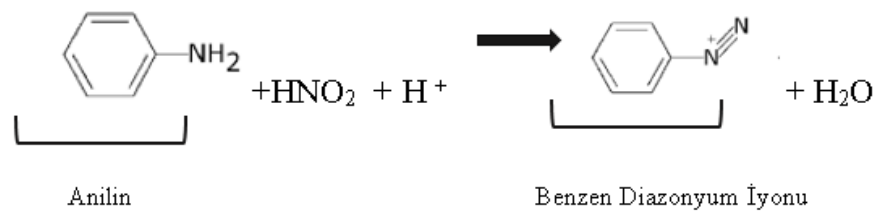
Mikrobiyal kökenli boya arıtma yöntemlerinden en eski olanlardan biride, boyanın diğer fiziksel adsorpsiyon mekanizmalarına benzer olan biyokütle üzerine absorbe edilmesidir. Adsorpsiyon sırasında boyanın biokütle üzerinde birikimi sonucunda zamanla doygunluğa erişmesi sebebi ile bu yöntem uzun süreli renk giderimi için uygun elverişli görülmemektedir. Bakteriler sentetik azo boyaları anaerobik ve aerobik koşullarda önemli bir düzeye kadar bozabilmektedir. Azoredüktaz, laktaz ve peroksidaz gibi bakteriyel enzimler azo boyaları önemli ölçüde bozabilmektedir (Bras ve ark., 2001).

Bakteriler Azo boya bozulmasını iki aşamalı olarak gerçekleştirirler. İlk aşamada, boyaların azo bağının (N = N) indirgenmesi yer almaktadır. Bu aşamada genellikle renksiz ve potansiyel olarak tehlikeli olan aromatik aminler ortaya çıkabilmektedir. İkinci aşamada, birinci basamakta ortaya çıkan ürünlerin yani aromatik aminlerin aerobik yada anaerobik koşullar altında bozulması gerçekleştirilir (Saratale ve ark., 2011). Anaerobik koşullarda gerçekleşen Azo boya bozulması Azoredüktaz enziminin yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Ortaya çıkan ara metabolitler ayrıca aerobik veya anaerobik olarak degrade edilir (Chang ve ark., 2000; Chang, 2004). Oksijen varlığı, genellikle azo bağı azaltma aktivitesini inhibe eder, çünkü aerobik solunum, NADH kullanımına baskın gelebilir; böylece NADH'den azo bağlarına elektron transferini engeller (Chang ve ark., 2004).

2.4. Azo Boyaların Sentezlenmesi

Azo boyalarını oluşturan temel yapılardan biri diazonyum iyonudur. Diazonyum iyonları, *Şekil 2.5'de* gösterildiği üzere azot asidi olarak bilinen NaNO_2 ve HCl 'den yaklaşık 0°C 'de üretilir. Diazonyum iyonu bir fenol grubu ile ya da amin grubu ile reaksiyona girerek azo grubunu oluşturur. Diazonyum iyonları, azot asidinin (NaNO_2 ve HCl 'den) aromatik primer aminler üzerindeki yaklaşık 0°C 'de etkisiyle üretilir (Zollinger., 1961; Kiernan., 2001).

Şekil 2.5: Diazonyum iyonu sentezlenmesi



Oluşan diazonyum iyonlarının birçoğu kararsız halde bulunur ve bundan dolayı sentezlendikten hemen sonra kullanılmaları gerekmektedir. Azo grup oluştururken, diazonyum iyonunda bulunan uç azot atomu hidrojeni fenol grubu ya da amin grubundan uzaklaştırır. Sonucunda da benzen diazonyum klorür, dimetil amino benzen ile p-dimetilamin azobenzen molekülleri elde edilir (Zollinger., 1991). Azo grubu oluşum reaksiyonunda eğer dimetilaminobenzen gibi aminler kullanılırsa, bu gruplar

protonlanmamış baz gibi davranırken fenoller anyonlar olarak reaksiyona girer. Ortam güçlü bir alkali ortamı haline gelirken diazonyum iyonu da diazotat anyonuna dönüşür. Oluşan yeni diazotat iyonu birleşmez bu yüzden azo boyasının sentezlenme reaksiyonu uygun alkalinite ve asitlik arasında bir pH değerinde gerçekleştirilmelidir. Bunlara ek olarak, renkli azo boyaları anlatılan mekanizmadan farklı mekanizmalarla da elde edilebilir fakat ticari olarak en yaygın kullanılan yöntem bu yöntemdir (Kiernan., 2001).

2.5. Azo Boyaların Çevreye Etkisi

Dünya genelinde farklı endüstrilerde renklendirme amacıyla kullanılmış yaklaşık 50.000 ton atık boya oluşmaktadır. Özellikle tekstil endüstrisinde boyama işlemleri sırasında kullanılan boyar maddenin yaklaşık %15'i serbestçe çevreye salınmaktadır. Yılda ortalama 2.8×10^5 ton boya atık sularardan tahliye edilmektedir Boyar maddeler suya karıştığı zaman 1 mg L^{-1} konsantrasyonda bile etkileri görülebilmektedir. Özellikle tekstil atık sularında $10\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ konsantrasyonlarında boya bulunabilmektedir. Boyar maddeler suya karıştıkları takdirde, öncelikle su rengine etki eder ve değiştirirler böylece su ortamında gerçekleşen fotosentez miktarını azaltırlar. Azalan fotosentezler beraber suda bulunan çözünmüş oksijen miktarı azalmaya başlar ve buna paralel olarak da, aerobik mikroorganizmaların yerini anaerobik mikroorganizmalar alır. Anaerobik mikroorganizmaların su ortamında artması da kötü koku oluşumuna yol açabilir (Aksu ve Çağatay., 2006; Kumar ve ark., 2006; Dixit ve Garg., 2018).

Azo boyalar doğada parçalanmaya karşı dirençli yapılara sahiplerdir. Su kaynakları vasıtası ile ekosisteme karışan boya atıkları ve yan ürünlerinin toksik/mutajenik olması sonucunda birçok canlı türü olumsuz etkilenmektedir. Tekstil endüstrisinden oluşan atık sularda çok farklı kimyasallar bulunmaktadır ve bu sebeple klasik arıtım yöntemleri yeterli gelmemektedir. Boyar madde içeren atık sularda yüksek konsantrasyonda boyar ve boya yan ürünleri, toplam organik karbon (TOK), biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve askıda katı madde (AKM) vardır (Saratale ve ark., 2011). Bunun yanı sıra atık sularında; biyolojik olarak zor ayrılan organik maddeler, inhibitör bileşikler, adsorplanabilir klorlu bileşikler ve tuzlar vardır (Şen ve Demirel., 2003; Kestioğlu ve Yalılı., 2006; Saratale ve ark., 2009b).

Azo boyaların atık sular ile tatlı sularla karıştığı zaman atıklarda bulunan koloidal maddeler suyun bulanıklık seviyesini değiştirmektedir. Bununla birlikte suyun tuz

seviyesi de değişir ve hem insanların içmesi için hem de tarımsal kullanım için uygun hale gelmektedir. Boyalarda yer alan krom (Cr) ve kükürt trioksit (SO₃) sularda yaşayan, arıtımda görev alan mikroorganizmalar için tehdit oluşturmaktadırlar (Kemker, 2014; Asamud ve ark., 2005). Nitrat, nitrit, nişasta ve slfitleerin atıklardan dolayı sudaki miktarlarının artması ile çözünmüş oksijen miktarı da aniden azalır ve pH değeri değişir. Buna bağlı olarak boyar madde içeren atık sular tam arıtılmadan sulama vb. kullanılırsa bitkilerin klorofil içeriği de azalabilmektedir (Singh ve ark., 2015; Sweeny., 2015). Yapılan alışmalar sonucunda elde edilen raporlara göre sentetik azo boyalarının toprağı erozyondan korumakta ve organik bitki örtüsünün devamlılığını sağlamada görev alan önemli bitki türleri içinde toksik, kanserojen ve mutajenik etkisi olduğu saptanmıştır. Tüm bahsedilen nedenlere bağlı olarak azo boyaları başta olmak üzere sentetik boya ve bileşiklerini içeren atık suların arıtılması gerekmektedir (Ghodake ve ark., 2009).

2.6. Azo Boyaların Toksisitesi

Azo boyalarının çevreye salınması evrebilimle ilgili düzen için büyük tehdit oluşturmaktadır. Boyar maddelerin yaklaşık %15 'inin boyama işlemi sırasında kaybolduğu ve bunun %50 - %75 kadarının reaktif boya grubu olduğu bildirilmiştir. Özellikle tekstil ve boya üretim fabrikalarının gideri suların renklenmesine ve su florasını/faunasını etkilemektedir. Boyar maddelerin insan sağlığı üzerinde de ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Boya retim ve kullanım alanlarında çalışan işçilerle yapılan araştırmalarda, saflaştırılan azo boyaların mutajenik ve kanserojen olduğu görülmüştür (Chen ve ark., 2002).

Tsuboy ve ark. (2007), bir azo boya çeşidi olan CI Dispers Blue 291 ile yaptıkları çalışmalar sonucunda boyanın çeşitli mutajenik, sitotoksik ve genotoksik etkileri olduğunu bildirdiler. Bu etkiler mikronükleus oluşumunu indüklemek, insan hepatom hücrelerinde DNAfragmentasyonu ve apoptotik indeksin arttırılması olarak gözlenmiştir.

Shaul ve arkadaşları. (1991), yaptıkları çalışmada 18 farklı azo boyası ile çalışmış ve 11 tanesinin nerdeyse hiç bozulmadan atık çamura geçtiğini bildirmişlerdir. Ayrıca dört tanesi ise çamur tarafından adsorbe edilirken,  tanesinin biyolojik olarak parçalandığını ve atık suya geçtiklerini bildirmişlerdir. 4'ünün aktif çamur tarafından adsorbe edildiğini ve sadece 3'ünün biyolojik olarak parçalandığını ve bu maddelerin su kütlelerine salınmasına neden olduğunu bulmuşlardır. Bazı azo boyaların yapılan testler sonucunda mutajenik olduğu bulunmuştur fakat bazıları normalde mutajenik değilken,

bağırsak florasında veya memeliler tarafından indirgendiğinde mutajenik özellik kazanabilmektedir (Chung, 1983). Azo boyaları direk ya da dolaylı olarak ağız yoluyla alındıktan sonra gastrointestinal sisteme aktarılır. Burada yer alan anaerobik mikroorganizmalar, bağırsak duvarında veya karaciğerde azoredüktaz enzimi ile metabolize edilirler. Yapılan çalışmalara göre, mutajenik özellik gösteren azo boyalarının çoğunun yapısal olarak p-fenilendiamin veya benzidin bileşiklerini içerdiği bildirilmiştir (Chung., 1978a; Chung., 1978b; Rosenkranz ve Giopmann., 1989). Benzidin bazlı azo boyalar oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. 1980 yıllarında deney hayvanları ile ve epidemiyolojik araştırmalar sonucunda benzidin bazlı boyaların mesane kanserine yol açtığı görülmüştür. Benzer şekilde benzidine maruz bırakılan sıçan, hamster ve köpeklerle yapılan bir başka çalışmada ise idrarlarında kanserojen aromatik aminler, n-asetilenmiş türevleri ve 1-amino- naftalin (1-AN)'e rastlanıldığı bildirilmiştir. Azo boyalarda bulunan polinükleer aromatik hidrokarbonların (PAH) oksidatif metabolizması yüksek miktarda elektrofilik oksidaz oluşturup, DNA, RNA ve proteinlerde mutasyonlara yol açabilirler. PAH'ların, balıkların karaciğer enzimlerinde kanser indükleyici metabolitleri arttırdığı gözlenmiştir. İnsanlar tarafından tüketilen balık ve kabuklu deniz ürünlerinde yüksek miktarda birikme yapabilmektedir (Tarpley ve ark., 1980; Chung., 1992).

Boyarmadde İmalat Sanayinin Ekolojik ve Toksikoloji Derneği (ETAD) tarafından yapılan bir araştırmaya göre 4000 boya içerisinde %90'dan daha fazla oranda boya toksik etki göstermiştir. Bu toksik etki $2 \times 10^3 \text{ mg kg}^{-1}$ üzerinde LD50 değerleri göstermeleri ile açıklanmıştır. Özellikle bazik ve direkt diazo boyaları bu grupta yer almaktadır (Myslak ve ark., 1988;).

2.7. Azo Boyaların Atık Sularda Renk Giderimi

Sucul ortamlarda 1 mg L^{-1} konsantrasyonda farklı boyalar görülebilmektedir. Tekstil atık sularında ise boya miktarı $10\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$ arasında değişebilmektedir. Bu miktarlara bağlı olarak da boyasal içerikli atık sularının toksisitesinin, diğer endüstriyel atık sulara göre daha toksin olduğunu anlaşılmaktadır. Boyar maddeler üretimlerinde kullanılan kimyasallar ısı, ışık, su ve yükseltgeyici ajanlara karşı boya özelliğini korumak için oldukça dirençlidir. Boya atıkları su yüzeylerinde estetik sorunlar oluşturmaktadır ve ışığın nüfuz etmesini ve oksijenin transferini engelleyerek sudaki canlı yaşamını engellemektedir (Levine., 1991; Ganesh ve ark., 1994; O'Neill., 1999).

Azo boyalarının ve bileşiklerin atık su kaynaklarından arıtımı için birçok fizikokimyasal ve biyolojik yöntemler denenmiştir. Fizikokimyasal yöntemlerin yüksek miktarda enerji ihtiyacı taşıması ve birçok kimyasal kullanımının yanı sıra boyaları tamamen ortadan kaldıramadığı için yeni bir kirlilik ortaya çıkarır ve karmaşık protokoller gerektirmektedir. Bunun yanı sıra mikrobiyal ve enzimatik renk giderimi ise çevre dostu ve daha az kalıntı oluşturan bir işlemdir (Forgacs ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004).

Renkli atık su tehlikesinin giderimi için şimdiye kadar birçok farklı yöntem uygulanmıştır. Pıhtılaşma/flokülasyon tekniği, ters ozmos, iyon değişimi, aktif karbon adsorpsiyon, elektrokimyasal oksidasyon ve filtrasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu işlemler çok pahalıdır ve ara ürünler olarak kanserojen aminlerin ortaya çıkmasına yol açarlar (Chen ve ark., 2005). Ayrıca arıtım sonucu olarak yüksek miktarda çamur veya ikincil atıklar ortaya çıkmaktadır ve bu atıklarında tekrardan güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmaları gerekmektedir. Kullanılan yöntemlerin sonuçları ve kısıtlı olmalarından dolayı boya içeren atık suların arıtımı için biyolojik yöntemler ve gelişmiş oksidasyon yöntemleri yeni seçenekler olarak kullanılmaya başlamıştır. Gelişmiş oksidasyon yönteminde, ortamda ısınlanma kaynağı var iken ya da yok iken, yüksek oksitleme gücüne sahip hidrojen peroksit (H_2O_2) veya fenton reaktifi gibi ajanlar kullanılarak arıtım yapılır. Bu yöntem çoğunlukla refrakter ve tehlikeli kirleticilerin giderimi için kullanılır ve OH radikali içerir (Vandevivere ve ark., 1998).

Boya üretim tesislerinin atık sularında $0.6-0.8 \text{ g L}^{-1}$ boya bulunur. Oransal olarak az olmasının sebebi boyar maddelerin suda çözünmeye karşı gösterdikleri dirençtir. Bu tarz boyaların arıtımı için kullanılan fizikokimyasal yöntemler olarak; adsorpsiyon, kimyasal çökeltme, fotoliz, kimyasal oksidasyon ve indirgeme, elektrokimyasal arıtma gösterilebilir. Fiziksel yöntemler olarak; filtrasyon, ters ozmos, pıhtılaşma/flokülasyon ve adsorpsiyon yaygın kullanılan yöntemlerdir. Pıhtılaşma-flokülasyon yöntemi genelde kükürt ve dispers boyaların arıtımında etkilidir. Yöntem sonucu olarak yüksek hacimde çamur oluşumu ve renk giderim kapasitesinin azlığı bu yöntemin verimini sınırlamaktadır. Adsorpsiyon yöntemi geniş yelpazede azo boya çeşitlerinin arıtımı için yüksek verim göstermektedir. Yöntemde kullanılacak olan adsorban seçimi yapılırken yüksek afinite, hedef bileşikler için kapasite ve yenilenme olasılığı gibi özellikler göz önünde bulundurulmaktadır (Joshni ve Subramania, 2011). Aktif karbon (AC) çoğu azo

boya için etkin bir adsorban olmasına rağmen yüksek maliyetinden ötürü yaygın olarak kullanılamamaktadırlar. Aktif karbon yerine maliyeti düşürmek amacıyla bentonit kili, uçucu kül, polimerik reçineler, iyon değiştiriciler ve mısır / mısır koçanı, mısır sapları ve buğday samanı gibi farklı biyolojik malzeme kullanılabilmektedir. Bununla birlikte bu malzemelerin kullanımı pratik uygulama ve yüksek çamur üretimi sebebi ile kısıtlanmaktadır (Robinson ve ark., 2001; Anjaneyulu ve ark . 2005).

Kimyasal arıtma yöntemlerinde ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve permanganat (MnO_4) gibi çeşitli oksitleyici ajanlar kullanılarak boya molekülleri ayrıştırılır. Ozonlama yönteminde O_3 ile boya arasındaki yüksek reaktivite, gaz halinden dolayı reaksiyon hacminde değişiklik olmaması ve iyi renk giderme verimleri sergilemektedir. Bununla birlikte kısa ömür, dağınık boyalara ve suda çözünmeyenlere karşı verimsizliği, düşük $KOİ$ giderme kapasitesi ve yüksek ozon maliyeti, bu tekniğin uygulamasını sınırlayıcı faktörlerdendir (Anjaneyulu ve ark., 2005). Elektrokimyasal oksidasyon yöntemin organik bileşiklerin parçalanması ve çevreye zarar vermeyen yan ürün oluşumu için çok etkili bir yöntemdir. Ancak yüksek elektrik maliyeti kullanımı sınırlandırmaktadır (Ogutveren ve Kaparal, 1994).

Biyolojik arıtma yöntemleri fiziksel/kimyasal yöntemlere göre daha avantajlı ve öne çıkan bir yöntemdir. Arıtım verimi, uygulanma alanının genişliği ve çevre dostu olması öne çıkmasına neden olan özellikleridir. Biyolojik arıtmada, diğer yöntemlerde ortaya çıkan çamur sorunu ve ikincil kirlilik oluşturmamaktadır. Biyolojik arıtımın en büyük sorunu uygulama sürecinin yavaş olmasıdır. Çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen parçalanma süreçlerine Biyodegradasyon denmektedir. Azo boyalarının renk giderimi farklı bakteri türleri tarafından anaerobik (metanojenik), aerobik veya anoksik koşullar altında gerçekleştirilir. Bakteriyel renk giderimi da ilk aşama olarak ($N=N$) bağı indirgeyici olarak yarılr (Al-Kdasi ve ark., 2004; Vandevivere ve ark., 1998). Yapılan araştırmalarda insan derisinde yaşayan bazı bakterilerin de azo boyalarını metabolize edebildikleri bildirilmiştir. Fakat insan derisi bakterilerinin boyaları renklendirme yeteneğini araştırılmamıştır (Stingley ve ark., 2010). Yöntemin uygulanmasında genelde mikroorganizmalar kullanılmaktadır fakat bitki ıslah çalışmaları da geliştirilmektedir. *Phragmites australis* bitkisi ile yapılan çalışmalar sonucunda turuncu 7 boyasının %68 oranında renk giderimi sağlanması bu konuda umut vadedit olmuştur (Davies ve ark., 2009; Kagalkar ve ark., 2009).

2.8. Boyaların Renk Giderimi ve Etkileyen Faktörler

Boyar madde içeren tekstil atık sularının biyolojik arıtımın verimi çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlere bağlıdır. Özellikle sıcaklık, pH, oksijen miktarı, boyanın kimyasal yapısı, boyanın konsantrasyonu, elektron donörleri ve mikrobiyal çeşitlilik renk giderimini etkileyen parametrelerin başında gelmektedir.

2.8.1. Oksijenin Etkileri

Tekstil atık sularının arıtımı için en önemli parametrelerden biri oksijendir. Bunun sebebi oksijenin hem mikroorganizmaların hücre büyümesine etki edebilmesi hem de boya miktarının azaltılması üzerine etkisi olabilmesidir (Chang ve ark., 2004). Biyolojik arıtmada görev alan mikroorganizmaların fizyolojik aktivitelerine etki ederek hücre büyümesinde rol alır. Boya miktarının azaltılmasında ise; sahip olduğu yüksek redoks potansiyelinden dolayı aerobik ortamda boya indirgenmesini engelleyebilir. Bunun sebebi, serbest kalan elektronların azo boyası yerine oksijeni tercih etmesidir. Dolayısıyla etkin bir biyolojik giderim için havalandırma işlemlerinin azaltılması gereklidir (Chang ve ark., 2005).

2.8.2. Sıcaklığın Etkileri

Biyolojik yöntemlerle renk giderimi sıcaklıktan direk etkilenen bir işlemdir çünkü arıtmada görev alan mikroorganizmaların aktiviteleri belirli sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Mikroorganizmaların verimli bir şekilde arıtım yapabilmesi için gereken uygun sıcaklık genellikle 30-45 °C arasındadır. Sıcaklığın değerinin ayarlanması kadar sıcaklık değerinin sabit tutulması da önemlidir. Sıcaklıkta gerçekleşecek olan değişiklikler direk olarak aktivasyon oranına etki eder. Buna bağlı olarak büyüme oranı, reaksiyon mekanizmaları ve biyokütle verimi değişebilir. Yüksek sıcaklık azo redüktaz enziminin denatürasyonuna yol açtığı için renk giderimi verimini düşürebilmektedir (Chang ve ark., 2001; Lade ve ark., 2012).

2.8.3. pH Değişiminin Etkileri

Atık suların renk giderimi için pH etkili parametrelerden biridir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, renk giderimi için ideal pH değerlerinin nötr ve hafif alkali pH değerleri olduğu bildirilmiştir. Renk giderim için uygun pH olarak 6.0 ile 10.0 değer aralığı belirtilmektedir. Azo boyalarının arıtımı sırasında ortamın pH değeri artabilir. Bunun sebebi; azo bağının kırılması sonrasında ortamda bazik aromatik aminlerin ortaya

çıkmasıdır. Arıtım için kullanılan mikroorganizma da uygun pH değerinin belirlenmesinde etkilidir. Örneğin; *Citrobacter sp.CK13* suşu için hem kuvvetli asidik ortamda (pH: 4.0) hem de kuvvetli bazik ortamda (pH: 12.0) reaktif kırmızı 190 boyasını yüksek verimle dekolarize edebilmektedir. Biyolojik arıtımda görev alan mikroorganizmanın geniş pH aralığında çalışabilmesi, arıtım verimini arttıracığı için oldukça önemlidir (Wang ve ark., 2008; Chen ve ark., 2002; Guo ve ark., 2015).

2.8.4. Konsantrasyonun Etkileri

Boyar maddelerin arıtım verimi, boya konsantrasyonunun artması ile orantılı olarak azalmaktadır. Ortamda ki boya miktarı / hücre oranının yetersiz olmasına bağlı olarak boyanın toksik etkisi artmaktadır. Buna ek olarak boya miktarı arttıkça, boyanın arıtım süreside artmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda 1-10 uM konsantrasyona sahip boyaların renk gideriminin, 30 uM konsantrasyona kıyasla daha verimli gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise tek bir bakteri türü yerine karışık bakteri kültürleri kullanıldığında sinerjistik etkiyle yoğunlaşma yüksek olsa da toksin etkinin azalabileceği bildirilmiştir (Jadhav ve ark.,2018; Sani ve Banerjee., 1999).

2.8.5. Boya Yapısının Etkileri

Atık sularda bulunan azo boyalarının moleküler yapıları ve sahip oldukları fonksiyonel gruplar hem renk giderim verimini hem de renk giderim yöntemini önemli oranda etkilemektedir. Moleküler yapısı basit olan ve düşük moleküler ağırlığı olan boyaların renk giderimi daha kolay gerçekleştirilmektedir. Yapısında hidroksil veya amino fonksiyonel grupları bulunan boyalar metil, metoksi, sülfato ya da nitro gruplarını bulunduranlara göre daha kolay bozulmaktadırlar. Benzer şekilde, yapısında SO_3H ve $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ gibi elektron çekici fonksiyonel grubu bulunduran boyalar bozulmaya karşı daha dirençlidirler. Buna bağlı olarak sülfatlanmış grup bulunduran azo boyalarının karboksillenmiş grup bulunduranlara göre bozulmaya daha dirençli olduğu görülmektedir. Monoazo boya grubu diazo ve triazo boya gruplarına karşı daha kolay bozuna bilmektedir. Asit yapıdaki azo boyalar içerdikleri sülfat gruplarına bağlı olarak düşük verimli renk giderim oranına sahiptir. Ayrıca reaktif azo boyalarda düşük verimli renk giderimi oranı sergiler (Hsueh ve ark., 2009).

2.9. Biyosorpsiyon

Boyar maddelerin atık suların arıtımında klasik yöntemlerin yanı sıra çevre ile dost olan biyoteknolojik yöntemler kullanılmaya başlamıştır. Renkli atık suların arıtımında adsorpsiyon sıkça kullanılan yöntemlerdendir. En etkin alternatif adsorpsiyon kaynağı olarak canlı hücreler (bakteri, alg, maya, fungus vb.) ile cansız mikrobiyal kütle kullanılmaktadır. Canlı hücreler kullanılarak boyaların biyolojik parçalanması yani biyodegradasyon denmektedir. Cansız yani ölü hücreler ile yapılan arıtım ise, mikrobiyal kütle üzerine boyanın adsorpsiyonu olarak gerçekleştirilen biyosorpsiyondur. Her iki yöntemde de mikroorganizmalar kullanılmasına rağmen, son yıllarda biyosorpsiyon daha ön plana çıkmaktadır. Bunun en büyük sebeplerinden biri; biyodegradasyonda arıtım performansı mikrobiyal topluluğun üreme sürekliliğine ve çevresel koşulların değişimine bağlı olmasından kaynaklanan istikrar problemidir. Ölü mikroorganizmalar, canlı mikroorganizmalara kıyasla daha yüksek ve daha kısa sürede biyosorpsiyon gerçekleştirebilmektedir. Üstelik sürdürülebilir ve depolanabilir özellik göstermektedirler. Boyar maddelerin ölü bakteri, maya ve alglerin mikrobiyal kütlesi tarafından arıtımında önemli olan nokta boyanın kimyasal yapısı ve biyokütlenin spesifik kimyası arasındaki etkileşimdir (Volensky ve Holan., 1995; Aryal ve Liakopoulou-Kyriakides, 2015 ; Crini ve Lichtfouse., 2019).

2.10. Biyodegradasyon

Biyodegradasyon, kimyasal bileşiklerin biyolojik olarak parçalanma sürecine denmektedir. Organik maddeler mikroorganizmalar tarafından daha küçük bileşiklere ayrılır. Bu sürece mineralizasyon da denmektedir. Biyodegradasyon metabolik ya da enzimatik mekanizmalarla gerçekleştirilir. Temelde iki süreç yer almaktadır; büyüme süreci ve metabolizma süreci. Büyüme sürecinde parçalanacak olan organik maddeler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır ve organik kirletici tamamen bozunur yani mineralizasyon gerçekleştirilir. Metabolizma sürecinde ise karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan büyüme substratın metabolize edilmesidir. Biyodegradasyon işlemi bakteri, mantar, mayalar, actinomycetes, alg ve bitkiler tarafından gerçekleştirilmektedir. Mikroorganizma ve organik maddeye göre değişse de genelde biyodegradasyon olayının son ürünü karbondioksit olarak bilinmektedir. Bozunma süreçleri aerobik veya anaerobik koşullar altında gözlenebilmektedir. .Biyodegradasyon ile boyaların bozunmasında en önemli başarı ölçütü, boya yapısına uygun mikroorganizmanın seçimidir (Machado ve

ark., 2006; Daneshvar ve ark., 2007; Kagalkar ve ark., 2009). Azo boya yapısında yer alan benzen vb. aromatik bileşikler yüksek bir negatif rezonans enerjisine sahiptir. Mikroorganizmalar, genellikle bakteriler, ise bu bileşikleri aerobik ya da anaerobik koşullarda bozabilen enzimleri üretebilme kabiliyetine sahiptir (Gibson ve Subramanian., 1984; Schink., 2008). Aerobik bozulmada başlangıçta aromatik halka diğer fonksiyonel grupta yer alan hidroksil grupları ile yer değiştirir ve daha sonra iki oksijen atomu dahil edilerek yarıma ile devam eder. Bu reaksiyonlar hidroksilazlar ve oksijenazlar tarafından yürütülür (Heider ve Fuchs., 1997).

2.11. Bakteriyel Biyodegradasyon

Çevresel atıkların bakteri metabolizması kullanılarak biyodegradasyonu son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir ve birçok çalışmaya konu olmuştur. Hidrokarbon yapıda ki atıkların arıtımında en çok kullanılan mikroorganizmalar bakterilerdir. Bazı bakterilerin sadece hidrokarbon ile beslendiği bildirilmiştir. Bakteriler hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında hidrokarbonları parçalayabilmektedir. ***Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Bacillus*** türleri Kafilzadeh ve ark. tarafından hidrokarbonları parçalayabilen en başarılı on cins bakteri olarak rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra aromatik hidrokarbonları en iyi şekilde parçalayabilen bakterilerin topraktan izole edilen ve gram negatif ***Pseudomonas*** cinsi olduğu belirtilmiştir (Hsu ve ark., 2012; Telke ve ark., 2015).

Bakterilerin birçoğu organik çevresel kirleticileri metabolize edip renk giderimi yapabilse de, tek tür bakteriler atıkların tamamını parçalayabilecek enzimatik sistemlere sahip olamayabilirler. Bundan dolayı birden fazla cinsten oluşan karma mikrobiyal koloniler oldukça güçlü bozunma potansiyeline sahip olabilmekte ve organik atıkları tamamen parçalayabilmektedir. Azo boyalarının bakteriyel degradasyonu ile arıtımı üzerine literatürde birçok çalışma bildirilmiştir. Bakteriler aerobik ve anaerobik koşullar altında azo boyalarını bozabilmektedir buna karşın en verimli bozunma koşulu olarak anaerobik şartların olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca anaerobik koşullarda biyodegradasyonda karsinogenik özelliğe sahip olan aromatik aminlerin ortaya çıkabildiği bunun giderimi içinde ilave aerobik yöntemler kullanılabileceği bildirilmiştir. Anaerobik ve aerobik yöntemlerin kombine kullanımına örnek olarak Chaube ve ark. tarafından ***Proteus sp.* , *Pseudomonas sp.* ve *Enterococcus sp.*** suşlarının beraber kullanımı

bildirilmiştir. (Chang ve ark., 2000; Chen ve ark., 1999; Kalyani ve ark., 2012; Lu ve Liu, 2010). Azo boyaların bozunmasında görev alan bakteri suşlarının birçoğunda boyama işlemi için kullanılan tuz konsantrasyonlarına karşı duyarlılık vardır. Duyarlılık sebebi ile bakteriyel büyüme ve aktivite sınırlanabilmektedir. Son yıllarda tuz toleransına karşı dayanıklı ve verimli bakterilerin keşfi ile bu problemin önüne geçmek için etkili bir strateji geliştirilmesine olanak sağlanmaktadır (Ozturk ve Abdullah., 2000; Pinheiro ve ark., 2004). Bazı bakteriyel türlerin ise, renk giderimi sırasında oluşan aktif çamurun çökeltme özelliklerini etkileyebilecek olan köpük oluşumuna yardımcı olarak veya belirli bir kirleticinin çıkarılmasından sorumlu mikroorganizma popülasyonlarını baskılayarak, arıtma sistemine zarar verebildiği bildirilmektedir. Arıtım proseslerinde köpük oluşumu genellikle ipliksi bakterilerin aşırı büyümesinden kaynaklanmaktadır (Nielsen ve ark., 2002; Fu ve ark., 2001).

Bakteriler azo boya bozulmasını iki aşamalı olarak gerçekleştirirler. Azo bağının ($N=N$) indirgeyici yarılması, azo boyalarının bakteriyel bozunmasının ilk adımıdır. Azo boyalarının renklerinin giderilmesi, farklı trotepe noktası bakteri grupları tarafından anaerobik (metanojenik), anoksik ve aerobik koşullar altında meydana gelir. Bu aşamada genellikle renksiz ve potansiyel olarak tehlikeli olan aromatik aminler ortaya çıkabilmektedir (Chang ve Kuo, 2000; Van der Zee ve Villaverde, 2005). İkinci aşamada, birinci basamakta ortaya çıkan ürünlerin yani aromatik aminlerin aerobik yada anaerobik koşullar altında bozulması gerçekleştirilir. Anaerobik koşullarda gerçekleşen azo boya bozulması azoredüktaz enziminin yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Oksijen varlığı, genellikle azo bağı azaltma aktivitesini inhibe eder, çünkü aerobik solunum, NADH kullanımına baskın gelebilir; böylece NADH'den azo bağlarına elektron transferini engeller (Singh ve ark., 2015). Bakteriyel boya arıtma yöntemlerinden biride, boyanın diğer fiziksel adsorpsiyon mekanizmalarına benzer olan biyokütle üzerine absorbe edilmesidir. Adsorpsiyon sırasında boyanın biyokütle üzerinde birikimi sonucunda zamanla doygunluğa erişmesi sebebi ile bu yöntem uzun süreli renk giderimi için uygun elverişli görülmemektedir. Azo boyalarının biyolojik renk giderimi sülfid gibi biyojenik indirgeyicilerle tamamen kimyasal reaksiyonlardan da kaynaklanabilir. Bu Azo boya indirgeme mekanizmalarının, antrakınon-sülfonat (AQS) ve antrakınon-disülfonat gibi birçok redoks aracılı bileşiğin eklenmesiyle büyük ölçüde hızlandığı gösterilmiştir (Saratale ve ark., 2011; Bras ve ark., 2001).

2.11.1. Anaerobik Koşullar Altında Renk Giderimi

Azo boyaların renk giderimi için anaerobik bakteri kültürlerinin kullanımı için çalışmalara 1970'lerde başlanmıştır. Walker ve Rayan. (1971), yaptıkları çalışmada bağırsakta bulunan anaerobik bakterileri kullanarak azo boyaların anaerobik koşullarda renk giderimini bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda da reaktif azo boyaların anaerobik bakterilerce bozulduğu bildirilmiştir. Anaerobik renki gideriminde boya yapısında bulunan kromojen yapısı etkin bir biçimde değiştirilerek renkleri giderilmesine rağmen tüm boyalar anaerobik renk giderimine karşı duyarlı değildir (Singh ve ark., 2007; Chinrelkitvanich ve ark., 2000; Walker ve Ryan., 1971). Anaerobik koşullar altında renk giderimi genellikle metanojenik ve asetojenik bakteri gruplarının birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir. Renk gideriminin gerçekleşmesi için enerji kaynağına yani karbon kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır. Karbon/enerji kaynağı olarak genellikle glukoz, asetat, nişasta ve etanol gibi basit yapılı substratlar tercih edilmektedir (Yoo ve ark., 2001). Azo boyalarının renk gideriminde görev alan bakterilerin çoğu anaerobik koşullar altında enzimler aracılığı ile boya yapısında bulunan ve yüksek elektrofilik özellikte olan azo bağlarını azaltır. Anaerobik koşullarda renk giderimi, nötr pH değerinde gerçekleşir ve düşük molekül ağırlıklı redoks mediatörleri kullanıldığı için son derece etkili ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu işlemlerde zorunlu ve fakültatif anaerobik bakteriler kullanılır. *Eubacterium sp.* , *Butyvidbio* veya *Bacteroides sp.* bakterileri anaerobik koşullarda azo boyaların renk gideriminde kullanılabilen suşlar olarak literatürde geçmektedirler. Anaerobik azo boya renk gideriminin en büyük dezavantajı ise redoks tepkimeleri sırasında oluşan aromatik aminlerin daha fazla anaerobik bozulmaya karşı inatçı olmasıdır (Hitz ve ark., 1978);(Vander ve ark., 2003);(Keck ve ark., 1997).

Anaerobik bakteriler tarafından azo boyaların indirgenmesi üç farklı mekanizma ile gerçekleşir. Doğrudan enzimatik indirgeme ve dolaylı/aracılı indirgeme mekanizmaları enzim kofaktörleri ve elektron taşıyıcıları tarafından katalizlenmektedir. Kimyasal indirgeme mekanizmasında ise sülfid gibi indirgeyiciler ile kimyasal reaksiyonla tarafından gerçekleştirilir. Sülfatlanmış azo boyalarının bakteriler tarafından anaerobik koşullarda renk giderimunda azoredüktaz enzimi kullanılmaktadır. Kullanılan azoredüktaz enzimi bakterilerin metabolizması tarafından üretilir, hücre dışına salgılanır. Bunun yanı sıra oksijene karşı duyarlıdır (Rafii ve Cerniglia., 1995; Kasper ve Wuhrmann., 1978). Flavın adenin dinükleotit dehidrojenaz enzimi de azo boyaların gideriminde kullanılan ve nitroaromatik bileşikler azaltan bir diğer bakteriyel enzimdir.

Hücre dışına salınan enzimlerin aktivitesi için NADH gerekli olduğu bildirilmiştir. .Azo boyalarının renk gideriminde görev alan bakterilerin çoğu anaerobik koşullar altında enzimler aracılığı ile boya yapısında bulunan ve yüksek elektrofilik özellikte olan azo bağlarını azaltır (Chinwetkitvanich ve ark., 2000; Willetts ve ark., 2000; Talarposhti ve ark., 2001; Yoo ve ark., 2001; Isik ve Sponza., 2005a; Van der Zee ve Villaverde., 2005).

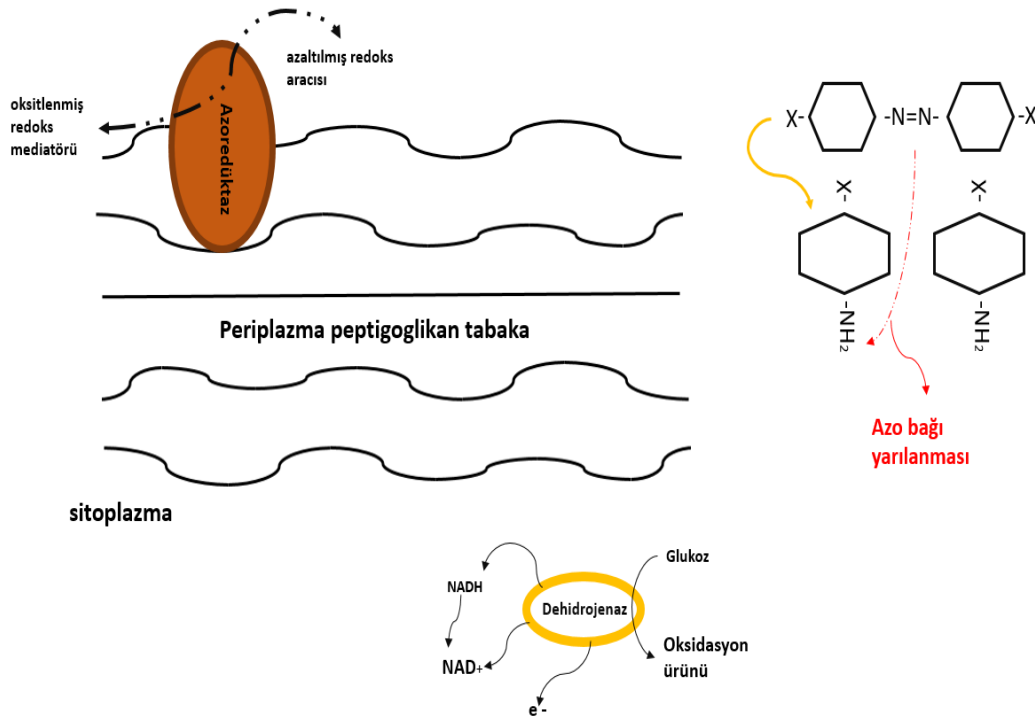
2.11.2. Azoredüktaz Enzimi

Azoredüktaz (EC 1.7.1.6), azo boyaların renklerinin giderilmesi ve boyaların bozulması için boya bozucu bakterilerde ve mantarlarda eksprese edilen başlıca enzim grubudur (Pandey ve ark., 2007). Bu grupta yer alan enzimler flavoproteinler yapı özelliğine sahiptirler. Flavoproteinler ise yapısında riboflavanin nükleik asitlerini yanı flavin adenin dinükleotidi (FAD) ya da flavin mono nükleotidi (FMN) içeren proteinlerdir. Bu protein ailesinin yaklaşık 90 tanesi insan genomunda kodlanabilmektedir. Flavoproteinler %90'ı redoks reaksiyonları gerçekleştirmektedir ve diğer %10'u ise transferazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır (Lienhart ve ark. ,2013). Son yıllarda azoredüktaz üreten bakteri suşları olarak; *Xenophilus azovorans* KF46F, *Pigmentiphaga bullae* K24, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. OY1-2 ve *Rhodobacter sphaeroides* bildirilmiştir (Nakanishi ve ark., 2001; Blumel ve ark., 2002; Blumel ve Stolz., 2003). Azoredüktazlar bakterilerde hücre zarının içinde sitoplazmik olarak veya hücre dışındaki bölgelerde membranda bulunmaktadırlar. Azoredüktaz enzimi, azo boyalarını degrede ederek renksiz aminlerin oluşumunda rol oynamaktadır. Oluşan renksiz aminlerin bazıları toksin özelliğe sahip olabilmektedir. Redoks reaksiyonları ile gerçekleştirilen azoredüktaz aracılı renk giderim işleminde enzim, elektron vericisi olarak NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) ve FADH gibi düşük molekül ağırlığına sahip molekülleri kullanmaktadır (Solís ve ark., 2012). Azoredüktazlar üç temel gruba ayrılır ve ayırım için kullandıkları koenzimlere bakılmaktadır. Yani sadece koenzim olarak sadece NADH kullananlar, sadece nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullananlar ve NADH ile NADPH kullananlar olarak ayrılırlar (Chen., 2006). Azoredüktaz enzimleri daha önce bahsedildiği gibi sitoplazmik enzimler ya da membranda bulunabilen enzimlerdir. Sitoplazmik azoredüktazlar hücre membranlarından difüzyonu zordur dolayısıyla karmaşık yapıya sahip olan bazı azo boyalarını verimli olarak dekolarize edemedikleri

bilinmektedir. Buna rağmen çoğu azo boyanın renk gideriminde başarılı olarak kullanılabilmektedirler. Enzim renk gideriminde başlarken azo bağı (N=N) ayırarak her aşamada iki elektronu azo boyasına aktarır. Böylece azo boyası elektron alıcısı gibi davranır ve renksiz bir çözelti elde edilir. Elde edilen çözeltide ise toksin ve aromatik özellikteki aminler bulunmaktadır (Gingell ve Walker., 1971; Kudlich ve ark., 1997).

Anaerobik koşullar altında membranlara bağlı olarak konumlanan azoredüktaz enzimleri, elektronların git-gel yapabilmesi için redoks aracıları kullanırlar. Bu aracı moleküller genelde antrakinonölfonatlar gibi kullanılan substratların metabolitleridir. Membranda bağlı redoks aracıları kullanan azoredüktaz enzimlerin çalışma mekanizması ile sitoplazmik azoredüktazların mekanizması birbirinden farklıdır. Sülfatlanmamış yapıda ki azo boyaları sitoplazmik azoredüktazlar tarafından bozunur. Bu azoredüktazlar hücre membranından içeri girebilmektedir. Buna ilave olarak azoredüktaz enzimi anaerobik koşullar altında daha verimli çalışmaktadır çünkü enzim oksijene duyarlıdır. Eğer ortamda oksijenle temas ederse azo boyası yerine redoks aracısına bağlanır ve ortamdaki azo boyanın bozunma oranı azalır (Lienhart ve ark., 2013; Singh ve ark., 2015). Azoredüktaz enzimleri çoğu azo boyayı parçalayabilse de, enzim aktivitesine karşı direnç gösteren boya çeşitleri de mevcuttur. Bundan dolayı etkili biyolojik arıtım için büyük substratlara karşı spesifikite gösteren azoredüktazlar üretebilen mikroorganizmaları tercih etmek gerekmektedir. Çoğu azo boya yapısında sülfonat grubu bulunmasından dolayı moleküler ağırlığı yüksektir ve mikroorganizmaların hücre zarından geçemezler. Dolayısıyla boyaların bozulma verimi hücre içi alım miktarından bağımsızdır. Azoredüktaz enzimleri hücre içi ya da hücre dışı faaliyet gösterebilen enzimlerdir. Boya yapısında sülfat varsa hücre içine giremeyeceği için hücre dışı enzim aktivitesi gözlenir. Redoks bileşiklerinin aracılığı ile membranda bağlı azoredüktaz yapısı ile sitoplazmik yani hücre içi azoredüktaz aktivitesi farklıdır. Hücre süpernatantında azo boyaların giderimi kimyasal redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyon **Şekil 2.6'da** hücre içinde sentezlenen ve sitoplazmaya salınan dehidrojenaz olarak çalışabilen azoredüktaz enzimi tarafından yürütülür (Russn ve ark., 2000; Chacko ve Subramaniam., 2011; Keck ve ark., 1997).

Şekil 2.6: Azoredüktaz enzimi ve reaksiyonları (Shrabana Sarkar ve ark., 2017)



2.11.3. Lakkaz Enzimi

Lakkaz enzimi, çok bakırlı oksidaz protein ailesindendir ve çok bakırlı oksidazlar (PPO) olarak adlandırılırlar (Kalyani ve ark., 2012). 2006 yılında yapılan bir çalışma ile tekstil atık sularında renk giderimi yaptıkları keşfedilmiştir. Substrata özgün olmayan oksidasyon kapasitesi ve kofaktörlere ihtiyaç duymaması önemli özellikleri barındırdığı için renk giderim işlemleri için sıkça tercih edilmektedir. Lakkaz enzimleri elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmazlar ve toksik etkisi bulunan hidrojen peroksit ihtiyacı duymazlar (Giardina ve ark., 2010; Telke ve ark., 2015; Kalyani ve ark., 2012). Lakkaz enzimi her boya için olmasa da bazı boyaların renk giderimi için 2,2-casino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) gibi molekülleri redoks aracısı olarak kullanabilirler ve elektron transfer aşamasında yardım alırlar (Wong ve Yu., 1999). Lakkaz enzimleri en çok mantar ve bitkilerden elde edilir. Bunun yanı sıra az da olsa lakkaz üretimi için kullanılan bakteriler de bulunmaktadır. Mantarlardan elde edilen lakkazların , yüksek sıcaklık ve alkali durumda kararsız olması önemli bir dezavantajdır ve bu nedenle endüstriyel kullanımlarla sınırlıdır (Guan ve ark., 2014).

Lakkaz enzimi izoenzimlerden oluşmaktadır. Enzimi oluşturan monomerler 50-100 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler. Enzim yapısında protein kısmı haricinde bir de protein kısmına kovalent bağlanmış olan karbonhidratlarda bulunmaktadır. Karbonhidratlar enzimin toplam kütesinin yaklaşık %45'ini oluşturabilmektedir ve enzim yapısına kararlılık sağlamaktadırlar. Lakkaz enzimlerinin katalitik aktiviteleri için bakır atomlarına ihtiyaçları vardır ve bir aktif lakkaz enzimi için dört bakır atomu gereklidir. Bakırlar enzim üzerinde bulunan özel bölgelere bağlanırlar ve enzimde yer alan bu bölgeler korunurlar (Demiralp ve ark., 2015). Lakkaz enzimleri substratlara karşı daha az spesifite gösterir ve atık sularda çeşitli ksenobiyotikleri ayrıştırmak için idealdir. Enzim, oksijen varlığında anilin ve fenol gibi aromatik molekülleri oksitler. Yapılan çalışmalarda azoredüktaz ve lakkaz aynı anda kullanıldığı takdirde maksimum renk giderim veriminin ve detoksifikasyonun elde edildiği bildirilmiştir (Wong ve ark., 2012).

2.11.4. Aerobik Koşullar Altında Renk giderim

Aerobik koşullar altında bakteriyel azo boya giderimi son yıllarda kullanılmaya başlamıştır. Bakteriler boyar maddeleri büyüme substratı olarak kullanamazlar bu yüzden dışarıdan karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. *P. Aeruginosa* suşu azo boyalarda bulunan (N=N) bağlarını indirgeyerek ayırır ve ortaya çıkan aminleri hem enerji hem de karbon kaynağı olarak kullanırlar (Nachiyar ve Rajkumar., 2003). Yine de bazı bakterilerin karbon kaynağı olarak azo bileşiklerini kullanıp üzerinde büyüebildikleri bildirilmiştir. Bu bakteriler (N=N) bağlarını indirgeyerek ayırır ve oluşan aminleri bakteriyel büyüme için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır (Zimmermann ve ark., 1982; Kulla ve ark., 1983).

2.12. Mikrobiyal Yakıt Hücreleri

Biyolojik sistemlerden elektrik üretimi konusunda ilk çalışmalar 18. yüzyılda Galvani'nin kurbağalarla yaptığı deneylerdir. Luigi Galvani kurbağanın kas ve sinir hücreleri ile elektrik üretimi başardı. Buna bağlı olarak Alessandro Volta tarafından ilkel pilin keşfedilmesine yol açtı ve ilk elektrik hücresi geliştirildi. MYH çalışma prensibi, 1839'da Christian F. Schönbein tarafından yayınlandı. Daha sonra Michael Potter 1911'de MYH'lerde mikroorganizmalar yani *Escherichia coli* ile elektrik üretimi gerçekleştirildi (Potter., 1912). Barnet Cohen ise MYH'de seri bağlı sistemlerle 35 volt üzerinde elektrik üretti (Cohen., 1931). Tüm bu gelişmelerden sonra MYH teknoloji daha

da geliştirildi ve atıksu arıtımı, biyosensör çalışmaları ve biyolojik oksijen ihtiyacının giderilmesi için önerildi (Trapero ve ark., 2017; Catal ve ark., 2008).

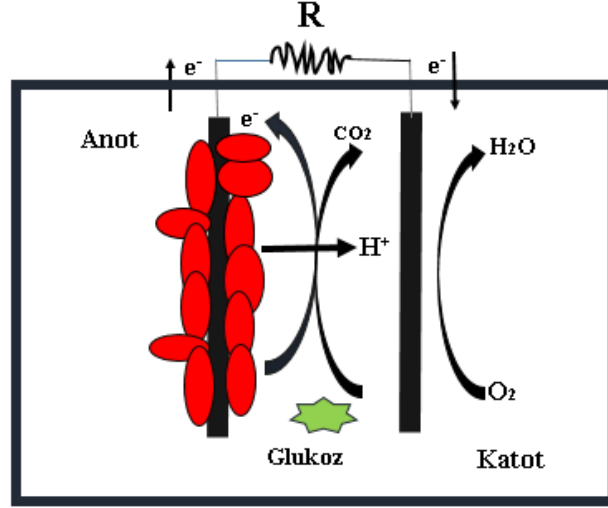
Mikrobiyal yakıt hücreleri (MYH), organik maddeleri kullanarak enerji üretebilen biyo-elektrokimyasal sistemlerdir. Organik maddeleri substrat olarak kullanarak kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çevirirler. Organik maddeleri oksitlerken ortaya çıkardıkları karbon, karbon-nötr özelliktedir yani tamamen çevre dostudur. MYH basit karbonhidratları yani glukoz, asetat ve bütirat gibi kullanarak mikroorganizmaların katalitik reaksiyonları ile çeşitli atık suların arıtımında kullanılabilecek ve sürdürülebilir enerjiye çevirirler (Nanchaiah ve ark., 2015; Atasever-Arslan ve ark., 2020). Asetat anotta elektrik üretimi için en çok tercih edilen substrattır ve yapılan çalışmaların sonucunda bütirat, propionat veya glikoza kıyasla daha verimli elektrik üretim performansı sergilediği bildirilmiştir (Pisciotta ve ark., 2012; Bond ve Lovley., 2003; Gajda ve ark., 2014; Catal ve ark., 2019). Glukoz ve laktat, MYH’lerde ilk olarak kullanılan substratlardır. Bunların yanı sıra endüstriyel kullanıma daha yakın sonuçların eldesi ve performans artışı için arabitol, sistein, etanol, propiyonat, fumarat, nişasta, yapay atık su gibi substratların anotta elektrik üretimi için kullanımı giderek artmıştır (Pant ve ark., 2010; Catal ve ark., 2011).

Mikrobiyal yakıt hücrelerinin atık arıtımında kullanılması ile hem çamur oluşumunu engelleyebilecek hem de sürdürülebilir enerji kullanımına olanak sağlayabilecek bir teknoloji olarak tanınmasına yol açmıştır (Yusoff ve ark., 2013). MYH sistemlerinde reaktörler proton değiştirici membran ile ayrılan ve elektrokimyasal olarak aktif mikroorganizmaları içeren anot bölgesi ile abiyotik özellikte olan katot bölgesinden oluşmaktadırlar (Rismani ve ark., 2008). Anot bölgesinde yer alan mikroorganizmalar organik substratları oksitler ve böylece elektron/hidrojen üretir. Üretilen elektronlar dış direnç üzerinden katot kısmına iletilir. Hidrojen ise proton değiştirici zardan geçerek katot bölgesine aktarılır. Katot bölgesine geçtikten sonra elektron alıcısı ile örneğin O₂ ile birleşerek su oluşturulur (Ghangrekar ve ark., 2007). Yüksek bir elektron alım gücü olan oksijen ve pozitif yüke sahip olan H⁺ elektronların katot doğru çekilmesini sağlar ve bu şekilde elektrik akımı oluşturulur. Elektrik oluşumu için anot bölgesi tamamen anaerobik olmalıdır (Du ve ark., 2007; Liu., 2010).

Şekil 2.7’de substratı glukoz olan tek bölmeli MYH sisteminin temel çalışması şematize edilmiştir. Görüldüğü gibi glukoz anot bölgesinde parçalanır ve ortama serbest

elektronlar (e^-) salınır. Katot bölmesinde ise oksijen elektron alıcılarını kullanılır. Anottan katoda elektron akışı dış bir direnç üzerinden gerçekleşir ve bir akım oluşturur. Mikroorganizmaların katalitik reaksiyonları, MYH'nin biyoelektrik üretiminde önemli rol oynar.

Şekil 2.7: Tek bölmeli MYH



2.12.1. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin Bileşenleri

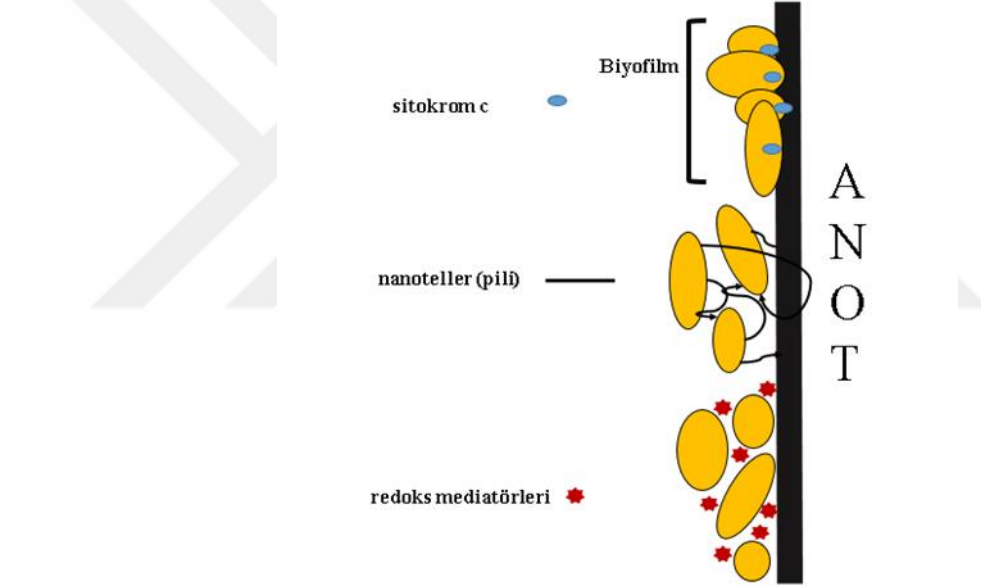
Mikrobiyal yakıt hücreleri temel olarak anot, katot ve varsa iletken zardan oluşmaktadır. MYH'lerde önemli olan bir diğer kısım ise anotta oluşan biyofilm tabakasıdır. Bu tabaka elektrokimyasal olarak aktif olan mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizmalar topraklar, sediment, deniz suyu veya tatlı su gibi çok çeşitli doğal ekosistemlerden; çok çeşitli mikrobiyal toplulukların bulunduğu kanalizasyon çamuru, aktif çamur, atık su gibi ortamlardan da toplanabilmektedirler. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bakteri, arke ve fungi gibi çeşitli mikroorganizmalar kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Logan., 2009; Hubenova ve Mitov., 2015). Biyofilm oluşumu için tek bir tür mikroorganizma kullanılabildiği gibi karışık kültürlerde kullanılabilmektedir. Karma kültürlerin kullanıldığı sinerjik topluluklarda bir tür bakteri tarafından substrat parçalanırken aynı zamanda başka bir türle de zararlı çevresel koşullara karşı dayanıklılık kazanılmaktadır (Costerton ve ark., 1995).

Mikrobiyal yakıt hücrelerinin temel çalışma prensibi olarak, substratın elektron vericisi olarak oksidasyonundan sonra biyofilmde yer alan bakteriler tarafından ortama salınan elektronların anoda aktarılması geçmektedir. Bakteriler ve anot elektrotu arasındaki

elektron transferleri doğrudan ya da dolaylı olarak gerçekleşebilmektedir. *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler kendi redoks mediatörlerinin üretebilirler (Rabaey ve ark., 2004). Mikroorganizmaların elektronları anotlara aktardığı elektron transferi mekanizmaları **Şekil 2.8’de** gösterildiği gibi temel olarak üç gruba ayrılmışlardır (Logan., 2009). Bunlar;

- C-tipi sitokromlar gibi mikroorganizmaların dış zarındaki redoks-aktif proteinler yoluyla doğrudan
- Doğrudan pili (nanoteller) yoluyla
- Ekzojen veya endojen elektron aracıları kullanan aracı tabanlı

Şekil 2.8: Anotta elektron transfer mekanizmaları (Li ve ark., 2018)



2.12.2. Anot Elektrot

Mikrobiyal yakıt hücrelerinde yer alan mikroorganizmaların substratları parçalama verimi ve parçalanma sonucu oluşan elektronların anot elektroda transfer edilmesi sonucu akım üretimi gerçekleşmektedir. Dolayısıyla kullanılacak olan anot materyali direk olarak MYH’nin çalışma performansını etkilemektedir. MYH’nin gücü anot elektrotunun birim alanı başına düşen akım olarak hesaplanır ve birimi (mA/cm²) olarak gösterilir. Mikrobiyal yakıt hücrelerinde anot olarak kullanılacak olan malzemelerin biyofilm ve MYH yüzeyleri arasındaki etkileşimi sağlaması için aşağıda belirtilen özelliklere sahip olması gerekmektedir (Guo ve ark., 2015; Mustakeem., 2015).

- Elektrik iletkenliği
- Korozyona karşı direnç
- biyouyumluluk
- Çevre dostu
- Düşük maliyet
- Yüksek mekanik mukavemet

Karbon ve metalik bazlı malzemeler belirtilen tüm özelliklere sahip olan ideal elektrot tipleridir. Karbonlu malzemeler arasından yaygın olarak karbon kumaş, karbon çubuk, karbon örgü, karbon kâğıdı, granül aktif karbon gibi malzemeler anot olarak kullanılmaktadır (Baudler., 2014). Bunların yanı sıra farklı çalışmalarda paslanmaz çelik plaka, nikel saç, altın levha ve titanyum levhada anot olarak kullanılmış ve bildirilmişlerdir (Zhou ve ark., 2016).

2.12.3. Katot Elektrot

Katot elektrot MYH'nin performansını sınırlayıcı reaksiyonların meydana geldiği bölümdür. Oksijen azaltma reaksiyonların başarılı olarak gerçekleşebilmesi için malzeme olarak abiyotik katalizörler seçilmelidir. Bunlara örnek olarak; platin bazlı malzemeler, karbonlu (metal içermeyen) malzemeler ve bir karbon destek üzerindeki platin grubu metal içermeyen (PGM içermeyen) malzemeler verilebilmektedir (Harnisch ve Schroeder., 2011; Wang ve ark., 2014). MYH'lerde yer alan katot bölümünde üç fazlı reaksiyon görölmektedir. Bu reaksiyonlar; Katı olarak katot elektrot, gaz olarak; elektronlar, proton ve oksijen, sıvı olarak ise katolittir. Elektron alıcısı olarak oksijen; sahip olduğu yüksek oksidasyon potansiyeli, düşük maliyet ve kimyasal atık oluşumu olmaması gibi özelliklerden dolayı uygun elektron alıcısıdır (Logan., 2008).

2.12.4. Proton İletken Zar

Proton iletken zarlar, elektrik akımını üretmek için protonların anottan katota geçişini sağlayan yapılardır. Ayrıca, katot ve anot sıvılarının karışmasını engeller. Bazı zar yapıları katyonlara karşı seçici özellik gösterirler dolayısıyla sadece pozitif yüklü tanecikler geçebilmektedirler. Böylelikle anaerobik özellikte olan anotta ki mikroorganizmaların organik maddeleri parçalaması sonucu oluşan elektronlar katotta seçici geçirgen özellikle aktarılmış olurlar. Zar seçici geçirgen olarak katyon geçişini sağlarken oksijeninde anot bölümüne geçmesini önlemektedir. Bunlara ek olarak her MYH'de zar bulunmak zorunda değildir. MYH'ler zarlı ve zarsız olarak iki türdür. Eğer bir MYH'de membran yok ise protonlar su ile taşınmaktadır. Literatürdeki çalışmalara

göre zarsız MYH'ler zarlılara göre daha fazla güç üretmektedir. En yaygın membran olarak ise yüksek proton seçici özelliğe sahip olduğundan dolayı nasyon kullanılmaktadır (Angioni ve ark., 2016; Kim ve ark., 2007; Liu ve Logan., 2004). MYH'de kullanılacak olan zarın sahip olması gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir.

- Protona karşı geçirgen olmalı
- Su, oksijen ve ortamdaki diğer gazlara karşı geçirgen olmamalı
- Mekanik mukavemeti yüksek olmalı
- Düşük maliyetli olmalı

Proton iletken zarlar, MYH'nin iç direncini, konsantrasyon polarizasyon kaybını ve MYH'deki güç üretimini direk olarak etkilemektedir. Proton iletken zararda MYH sistemine bağlı olarak, anot bölmesine oksijen kaçıışı olabilmektedir. Oksijen kaçıışı istenmeyen bir durumdur çünkü anaerobik şartların bozulması sonucunda anotta yer alan anaerobik mikroorganizmaların baskılanmasına yol açabilmektedir (Bond ve Lovley., 2004).

2.12.5. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinden Elektrik Enerjisinin Eldesi

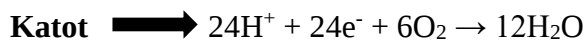
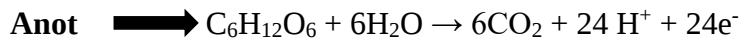
Mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektrik üretilebilmesi için, gerçekleşen reaksiyonun termodinamik olarak elverişli olması gerekmektedir. Reaksiyonun elverişli olması demek ise, reaksiyon toplam hücre elektromotor kuvvetini ifade eder. Yani anot ve katot arasında ki potansiyel fark ile ifade edilirler. MYH'de elektrik potansiyel oluşumu için, anot elektrotunun yüzeyinde bulunan elektroaktif özelliğe sahip olan ve biyofilm oluşturan mikroorganizmalarca karbon kaynağı kullanılarak kimyasal enerjiyi katalizlemeleri ve adenosin trifosfat (ATP) oluşturmaları daha sonra da ATP depolamaları gerekmektedir. Mikroorganizmalar tarafından bileşiklerin yükseltgenmesi ile nikotinamid adenin dinükleotidine (NAD) hidrojen bağlanır ve indirgenmiş olan formu olan NADH ile enzim yüzeyine aktarılır. Oluşan elektronlar ile proton gradyanı oluşur ve protonlar ATPaz ile hücre içine taşınarak ATP oluştururlar. ATP oluşumunda; her bir ATP için 3-4 proton harcanır. Elektronlar ise son elektron alıcısı olan nitrat, sülfat ya da oksijen ile birleşerek reaksiyonu tamamlarlar (Logan ve Regan., 2006; Barua ve Deka., 2010; Liu ve ark., 2004; Zhang ve Ge., 2013; Yang ve ark., 2015; Alberts ve Johnson., 2002).

Mikrobiyal yakıt hücreleri çalışma prensibi açısından pillere benzer yapıya sahiptir. MYH'lerde organik maddeleri okside ederek elektron üretir ve daha sonra bu elektronları anottan dış dirençlerle katota aktararak biyolojik pil gibi çalışırlar. Organik maddeleri

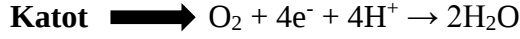
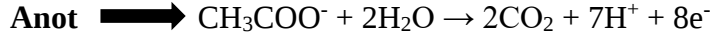
parçalayarak elektrik üreten bakterilere ekzoelektrojen ya da elektroaktif bakteri denir. Ekzoelektrojen bakteriler anaeroblar bakterilerle benzerdir fakat ekzoelektrojenler elektronları doğrudan hücre dışına transfer edebilirler (Catal ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan ekzoelektrik bakteriler *Shewanella putrefaciens*, *Geobacteraceae sulfurreducens* ve *Geobacter metallineducens*'dir (Logan, 2009); (Rabaey ve ark., 2004). MYH'lerin bazı türlerinde mikroorganizmalar substratlardan anoda elektron transferinde katalizör olarak görev alabilmektedirler. Bu yüzden MYH'de çalışılacak olan mikroorganizma seçimi oldukça önemlidir. Tek bir tür mikroorganizma kullanılabildiği gibi farklı türlerde mikroorganizmalarda kullanılabilmektedir. Karma kültürler kullanıldığı takdirde birden fazla karbon kaynağı da kullanılması gerekebilmektedir. MYH'lerin birçoğunda elektrokimyasal aktiviteye sahip olabilecek aktif sediment ve ya aktif çamurlar alınarak zenginleştirilmekte ve sistemde kullanılmaktadır. MYH'lerin anot bölümünde bulunan protonlar katot bölmesine ulaştıklarında elektronların katot üzerinde yoğunluklarının artışına sebep olurlar. Katot bölmesi oksijen içerir ve elektronlar oksijene doğru geçerek protonlarla birleşmesi sonucu H₂O oluştururlar. Su oluşumu ile azalan H⁺ ların devamlılığı için anottan katota H⁺ geçişi sağlanır. Devrenin devamlılığı ve katotta yer alan elektronların oksijene aktarılmasıyla katot elektrot pozitif yükle yüklenir. Pozitif yüklenen devreye direnç takılırsa üretilen elektrik enerjisi kullanılabılır hale gelir (Yusoff ve ark., 2013).

Mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektroaktif biyofilm oluşumu için kesikli, kesikli beslemeli ve sürekli beslemeli gibi farklı süreç uygulamaları kullanılmıştır (Wang ve ark., 2008; Pocaznoi ve ark., 2012). Beslemeli süreç uygulamasında, elektrik çıkışının tekrarlı ve kararlı olabilmesi için belirli bir değerin altına düştüğünde substrat tazelemesi yapılır. Substratın tamamı ya da bir kısmı alınarak yenisi eklenir. Yapılan çalışmalarda elektrik akımının belirli bir değerin üstünde tutulması sonucunda MYH'lerde daha yüksek performans görüldüğü rapor edilmiştir (Rousseau ve ark., 2013).

Mikrobiyal yakıt hücresinde karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığı takdirde gerçekleşmesi beklenen reaksiyonlar aşağıda belirtilmiştir.

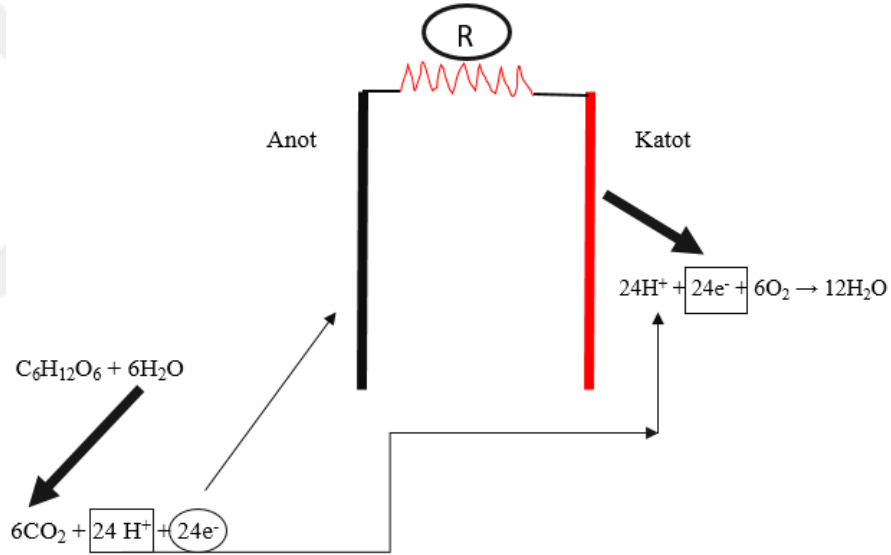


Mikrobiyal yakıt hücresinde karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığı takdirde gerçekleşmesi beklenen reaksiyonlar aşağıda belirtilmiştir.



Elektroaktif bakteriler ile elektrot arasında gerçekleşen elektron transferleri, bakterilerin hücre zarı ile MYH'nin anot yüzeyinin direk teması ile gerçekleşmektedir. Bu iki yüzey arasındaki elektron transferinin sitokrom c zar proteinleri gerçekleştirir (Schröder, 2007). MYH'de gerçekleşmesi beklenen reaksiyonlardan da görüleceği üzere substratlar anaerobik olan anotta parçalanır ve elektronlar katota aktarılır. Böylece elektronlar oksijen ve benzeri alıcılar tarafından harcanmazlar. **Şekil 2.9'da** MYH'lerde gerçekleşen temel iyon transferi şematize edilmiştir.

Şekil 2.9: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde temel iyon transferi



2.13. Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri

Dünya'da harcanan enerjinin yaklaşık %86'sı petrol, kömür ve doğalgaz gibi tükenen fosil yakıtlardan karşılanmaktadır. Bu yakıtların tükenmek üzere olmalarının dışında canlılar ve ekosistem üzerinde de oldukça ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı bilim insanları yeni, yenilenebilir ve çevre dostu enerji kaynağı arayışına girmişlerdir (Ritter., 2003). Hidrojen, hem yakıt olarak hem de enerji kaynağı olarak kullanılabilecek kaynakların başında gelmektedir. Hidrojen gazının yanması sonucu ortama sadece su buharının salınması ile sera gazı emisyonları, asit yağmurları ve

ozon kaynaklarının tükenmesi engellenmiş olur (Cheng ve Logan., 2003). Ayrıca hidrojen gaz yakıtla arasında ağırlık başına en yüksek enerjiye sahip olan gazdır. Hidrojen gazı 120 MJ kg⁻¹ enerji içerirken metan gazı 50 MJ kg⁻¹ içermektedir. Hidrojen evrende en bol bulunan elementtir ve dünya yüzeyinin yaklaşık %0.14'ünde bulunmaktadır. Hidrojen sahip olduğu 0.09 g ağırlık ile en hafif element olarak geçmektedir. Hidrojenin %90'ı birçok farklı kimyasal yöntemle üretilebilmektedir ve biyokütle, su, rüzgâr, güneş ve jeotermal gibi yenilenebilir enerji kaynaklarından da hidrojen üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Fakat bu yöntemlerin hepsi çevre dostu değildir ve yoğun enerji gerektirmektedir. Bu yüzden mevcut yöntemlere ek olarak biyolojik yöntemlerle de üretimi denenmektedir. Biyolojik üretim yapılırken genelde standart oda koşulları ve oda basınçları yeterli gelmektedir, çevre dostudur ve atıklardan üretilebildiği için aynı zamanda atık yönetimine de katkı sağlamaktadır (Suzuki., 1982; Bockris., 1981; Catal ve ark., 2017).

Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri olarak (Czuppon., 1996);

- Alg ve siyanobakteri ile suyun biyofotolizi
- Organik bileşiklerin foto-sentetik bakteri ile fotodepozisyonu
- Organik bileşiklerden fermentatif eldesi
- Fotosentetik ve fermentatif bakterilerle kurulan hibrit sistemle eldesi

Biyokütleden hidrojen üretim yöntemleri olarak (Ramachandran ve Menon., 1998)

- Piroliz veya gazlaştırma

Sudan hidrojen üretim yöntemleri (Ramachandran ve Menon, 1998);

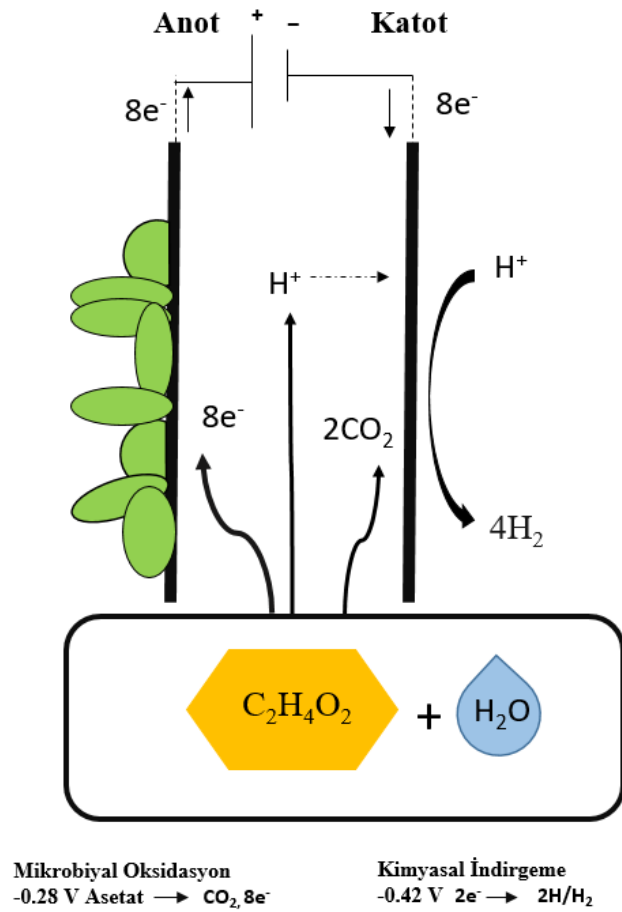
- Elektroliz
- Fotoliz
- Termokimyasal süreç
- Doğrudan termal bozunma veya termoliz
- Biyolojik üretim

Günümüzde hidrojen üretiminde kullanılan kaynakların %50'si doğal gaz, %30'u petrol türevlerinden, %18'i elektriktir (Mudhoo ve ark., 2018).

Mikrobiyal elektroliz hücresi (MEH), belirli bir elektrik akımı altında organik materyallerin oksidasyonu yoluyla H₂ üretiminin gerçekleştirilebildiği yeni bir

teknolojidir (Catal ve ark., 2018). MEH'ler, substrat oksidasyonu sonucu üretilen elektronların anoda serbest bırakılmasının, ekzoelektrojen bakteriler tarafından gerçekleştirilen MYH'lerin değiştirilmiş sürümü olarak geçmektedir. MYH'lerde oksijenin indirgenmesi sonucu elektrik akımı üretilebilirken, MEH'lerde katot tamamen anaerobik özelliktedir ve bundan dolayı kendiliğinden akım üretmesi mümkün değildir (Logan ve ark., 2008). Bundan dolayı katotta hidrojen üretimi için gerekli enerjinin çoğu anotta okside edilen substratların kimyasal enerjisinden karşılanırsa da düşük miktarda harici bir elektrik kaynağına da ihtiyaç duyulmaktadır . Teoride MEH'lere harici olarak 0.14 V uygulanmalıdır fakat kısmen katot aşırı potansiyeli nedeniyle 0.14 V'dan fazla uygulanması gereken durumlarda görülebilmektedir (Logan ve ark., 2008). **Şekil 2.10'da** bir MEH'in organik substrat olarak asetat kullanması sonucu reaktörde bulunan ekzoelektrojen mikroorganizmalar tarafından parçalanması ile hidrojen üretim mekanizmaları gösterilmiştir (Waşas ve ark., 2018).

Şekil 2.10:Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi (Waşas ve ark., 2018)



MEH'ler atık suların arıtılıp, ürüne dönüştürülebileceği atık biyorafineri tesisleri için umut vadeden biyoteknolojik sistemlerdir(Liu ve ark., 2005; Rozendal ve ark., 2006). MEH'lerde gerçekleşen reaksiyonlar endotermiklerdir yani pozitif Gibbs serbest enerjisine sahiplerdir bundan dolayı, hidrojen kısmi basınç çok düşük seviyeye ulaşmadığı takdirde kendiliğinden oluşmaz. Bu nedenle, H₂ üretebilmek için anot ve katot arasına yaklaşık 0.2 V akım uygulanması gerekir (Kadier ve ark., 2016). MEH'lerde H₂(g) harici CH₄, H₂O₂, CO₂ de üretilmektedir (Wang ve Ren., 2013; Zhang ve Angelidaki., 2014).

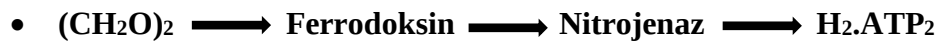
2.13.1. Fototrofik ve Fermantatif Hidrojen Üretimi

Fototrofik bakteriler, biyolojik hidrojen üretiminde en umut vadecici mikroorganizmalar olarak geçmektedir. Bunun sebebi sahip oldukları özelliklerdir ve aşağıda belirtilmiştir (Kim ve ark., 1989; Vincezini ve ark., 1982).

- Teorik olarak yüksek dönüşüm verimleri,
- Farklı biyolojik sistemlerin inaktivasyonu problemine neden olan gelişmekte olan aktivitenin olmaması,
- Geniş bir ışık spektrumu kullanabilme
- Atıklardan türetilen organik substratları kullanabilme

Mikroorganizmalar karanlık fermentasyon denilen aerobik reaksiyonlarla, biyofotolizle ve ışıklı fermantasyon olarak bilinen fotoheterotrofik reaksiyonlarla H₂ üretmektedirler. Bu reaksiyonlarda karbon kaynağı olarak substrat kullanılır ve aynı zamanda atıksularıda artırmaktadırlar. Fotofermantasyon (fotoheterotrofik reaksiyonlar) ile biyohidrojen üretiminde, fotosentetik bakteriler görev alır ve güneş ışığını kullanarak organik substratları (asetat, butirat, vb.) ya da inorganikleri (H₂S, Fe²⁺ vb.) hidrojen ve karbondioksit dönüştürürler. Reaksiyon anaerobik şartlarda gerçekleşmektedir ve azotun yeterli miktarda bulunmadığı durumlarda nitrojenaz enzimi ile katalizlenmektedir. Fotosentetik bakteriler genellikle elektron vericisi olarak basit yapılı organik asitleri kullanılır ve elektronları ferrodoksin gibi araçlarla nitrojenaz enzimine aktarılır. Böylece nitrojenaz enzimi azot yokluğunda protonu H₂'e indirgeyebilmektedir (Manish ve Banerjee., 2008). Substratlar TCA döngüsü ile oksitlenirler ve bunun sonucunda da H⁺, CO₂ ve elektron üretimi gerçekleşmektedir. Reaksiyonlar sırasında görev alan nitrojenaz enziminin aktivitesi için ATP gerekmektedir ve bu ihtiyaç Fotosistem 1'de elektron taşınması sırasında meydana gelen proton gradyanı ile karşılanmaktadır.

Hidrojenaz enzimi ise H_2 'i proton ve elektrona ayırıştırır (Koku ve ark., 2002; Honda ve ark., 2006). Fototrofik hidrojen eldesi için genel biyokimyasal yollar aşağıdaki gibi ifade edilebilir:



Karbon monoksit (CO) ayrıca fotosentetik bakteriler tarafından aşağıdaki reaksiyonla da üretilir:

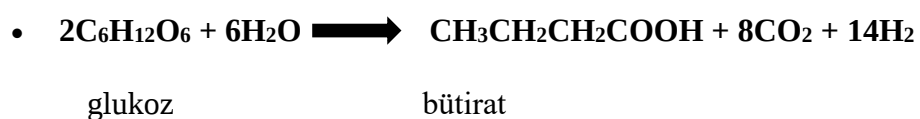
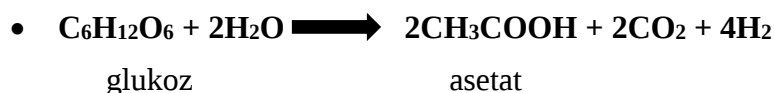


Hidrojen gazı, karbonhidratça zengin organik materyaller kullanılarak karanlık ortamda büyüeyebilen anaerobik bakteriler tarafından da gerçekleştirilebilmektedir. Karanlık fermentasyonda hidrojenaz aktivitesi ile glikolizle H_2 üretilmektedir. Glikoliz yani glukozun pürivata parçalanması sonucu 4 mol elektron elde edilir ve bu sırada 2 mol NAD^+ harcanır ve 2 mol $NADH$ oluşur. Daha sonra ise 4 mol Fd_2^+ , 4 mol Fd^+ 'ya indirgenir ve AsetilCoa üretilmiş olur. Asetil Coa, asetata dönüşür ve bu sırada 4 mol H_2 üretilir. Bir sonraki seviyede ise $NADH$ yeniden okside edilerek bütirat üretilirken, 2 mol H_2 üretilir (Bahl ve Durre., 2001; Jones ve Woods., 1986).

Fermentatif bakteriler ile hidrojen üretiminin de çeşitli avantajları vardır;

- Fermantatif bakterilerin hidrojen yayma oranları çok yüksektir.
- Organik substratlardan sürekli hidrojen üretebilirler.

Fermantatif bakterilerin hidrojen üretiminde kullanımı fotosentetik bakterilerin kullanımından daha avantajlıdır (Tanisho, 1983). Anaerobik fermantasyon basit bir mekanizma ile çeşitli substratlardan hidrojen üretime imkan sağlarlar. Ayrıca fermantatif hidrojen üretiminde dışarıdan ekstra ışık kaynağı ihtiyacı gözlenmez. Substrat olarak karbonhidratlar, karbon kaynağı olarak tercih edilirler. Hidrojen üretiminin yanı sıra organik asit (asetat, bütirat) ve ya alkol üretimi de gözlenebilmektedir. Substrat kaynağı olarak glukoz kullanıldığı takdirde olası reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Anaerobik hidrojen süreçlerinde birden fazla organik asit üretilmektedir, buna bağlı olarak da H₂ verimi düşmektedir. Bu durumun engellenmesi için ana reaksiyonlar asetat ve bütirat üzerinden yürütülür. H₂ üretim verimi de asetat/bütirat üzerinden hesaplanmaktadır (Miyake., 1990; Sasikala., 1991; Nath ve Das., 2004). Hidrojen üretimi için asetat kullanırken güneş enerjisi yerine harici elektrik enerjisi uygulanabilir. Bu yöntem için asetat anot bölmesinde yer alır ve bakterilerin metabolize ettiği protonlar ile elektronlar katotta toplanırlar. Katotta hidrojen üretimi gerçekleşir ve bunu için yaklaşık 100 mV akım uygulanması gereklidir. Yapılan çalışmalar sonucunda 1 mol asetat için 250 mV akım uygulanınca 2.9 mol H₂ üretildiği bildirilmiştir. Belirtilen süreç için olası reaksiyonlar aşağıda belirtilmiştir (Gen., 2009).

- Anot elektrot: $\text{CHCOOH} + 2\text{HO} \longrightarrow 2\text{CO} + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$
- Katot elektrot: $8\text{H} + 8\text{e}^- \longrightarrow 4\text{H}_2$

MEH'lerde metanojen hücreler tarafından substrat olarak asetat veya H₂/CO₂ kullanılarak H₂ gazının haricinde CH₄ üretimide gerçekleşmektedir. Bunun haricinde katot elektrotta yer alan metal katalizörler tarafından katalizlenen Sabatier işlemiyle üretilmesi de mümkündür (Brooks ve ark., 2007). Olası metan gazı üretimi aşağıda gösterilmiştir.

- $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

2.13.2. Hidrojenaz Enzimi

Hidrojenaz enzimi doğrudan veya dolaylı olarak H₂ oksidasyonunda ve H₂ indirgenmesinde görev almaktadır (Kleihues ve ark., 2000). Enzim mikroorganizmalarda, farklı boyutlarda, yapılarda ve işlevsellikte olabilmektedir ve temelde enzimin aktif bölgelerine bağlanan metal atomlarına göre üç ayrı gruba ayrılmışlardır. Bu metaller; [NiFe], [FeFe] ve [Fe]'dir (Meyer., 2007). Hidrojenaz enzimi aşağıdaki reaksiyona göre H₂ üretiminde rol oynamaktadır.

- $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ $\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{H}^-$

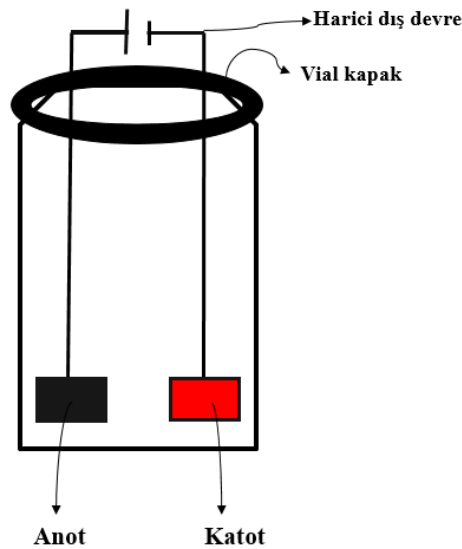
Hidrojen alımı oksijen, nitrat, sülfat, karbondioksit gibi elektron alıcısı ile tepkimeye girer, daha sonra ise proton indirgenmesi ferrodoksin vb. elektron vericilerine oksidasyon ile bağlanır. Böylece fazla elektronlar hücrelerden atılırlar. Ferrodoksin, sitokrom c3 ve sitokrom c6 gibi proteinler, hidrojenazlar için elektron donörleri/alıcısı gibi yardımcı olurlar (Fontecilla-Camps ve ark., 2007). Hidrojenaz enziminin temel

görevi enerji üretimi olmasının yanı sıra hücre zarına bağlı enerjinin korunmasında ve ağır metallerin arıtımında görev alabildikleride bildirilmiştir. MYH ve MEH’lerde hidrojenaz enzimleri anotta bulunur ve elektrokatalizör olarak H₂ oksidasyonunda görev alırlar (Salomone-Stagnia ve ark., 2010; Adams ve Stiefel., 1998).

2.13.3. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinin Bileşenleri

Bu güne kadar yapılan MEH çalışmalarında; tek bölmeli, şişe tipi tek odacıklı, üst tek odacıklı bir katot, konsantre boru şeklinde vb. bir çok farklı MEH kullanımı bildirilmiştir (Kadier ve ark., 2016). Tüm MEH’lerde bulunan ortak bileşenler ise **Şekil 2.11’de** görüldüğü üzere mikroorganizmalar, anot elektrot, katot elektrottur. MYH’lere kıyasla MEH’lerde yer alan mikroorganizmalar hakkında çok bilgi mevcut değildir. *Pseudomonas spp.* ve *Shewanella spp.* Türleri anotta tespit edilmiştir. Katot bölmesinde de yer alan mikroorganizmalar gözlemlenmiştir fakat görevleri ve işleyişleri net değildir. MEH’lerde ekzoelektrojen bakterilerin büyüdüğü bildirilmiştir. MYH’lerin aksine MEH’lerde çalışma koşulları tamamen anaerobiktir böylelikle ortamda oksijen olmaz (Liu ve ark., 2005; Rozendal ve ark., 2008). Metanojenik bakterilerin MEH ortamında baskın gelmesi sonucu artan metan üretimine paralel olarak hidrojen üretimi azalır. Ortamı oksijene maruz bırakma metanojenleri inhibe eden yöntemlerden biridir (Tartakovsky ve ark., 2008).

Şekil 2.11: Mikrobiyal elektroliz hücresi ve bileşenleri

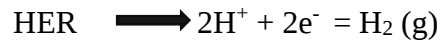


2.13.4. Anot Elektrot

Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde kullanılan anot malzemeleri arasında karbon kumaş, karbon kâğıt, grafit keçe, grafit granülleri ve grafit fırçaları bulunmaktadır. Anot bölümünde basit organik bileşikler (asetat, etanol, laktat, bütirat vb.) *Geobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Desulfuromonas*, *Escherichia* gibi bakteriler tarafından okside edilerek katota doğru elektron transferi yapılır (Lee ve ark., 2010). Anot performansının artırılması için karbon malzemelerin yüksek sıcaklıkta amonyak gazından geçirilmesi önerilmektedir. Bu işlemle mikroorganizmaların pozitif yükle yüklenmiş olan anotla daha iyi tutunması sağlanır (Cheng ve Logan., 2007).

2.13.5. Katot Elektrot

Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen evrim reaksiyonu (HER) ile H₂ üretimi katotta gerçekleşmektedir. Anotta oluşan serbest elektronlar harici bir elektrik devresi ile katot bölmesine geçer ve burada H₂O ile reaksiyona girerek hidrojen üretimi gerçekleşir. Hidrojen üretimi için H₂O'nun indirgenmesi gereklidir ve indirgenme için de harici bir akım uygulaması gerekmektedir. Böylelikle H₂O'nun hidrojene indirgenmesi için yeterli enerji elde edilmiş olur (Rozendal., 2008). MYH'lerin aksine MEH'ler de gerçekleşen HER yavaştır. Bu yüzden reaksiyonu hızlandırmak için ve H₂ üretimini arttırmak için katot materyalinde nikel (Ni), platin (Pt) veya paslanmaz çelik gibi çeşitli metal katalizörler kullanılır (Jeremiasse ve ark., 2010).

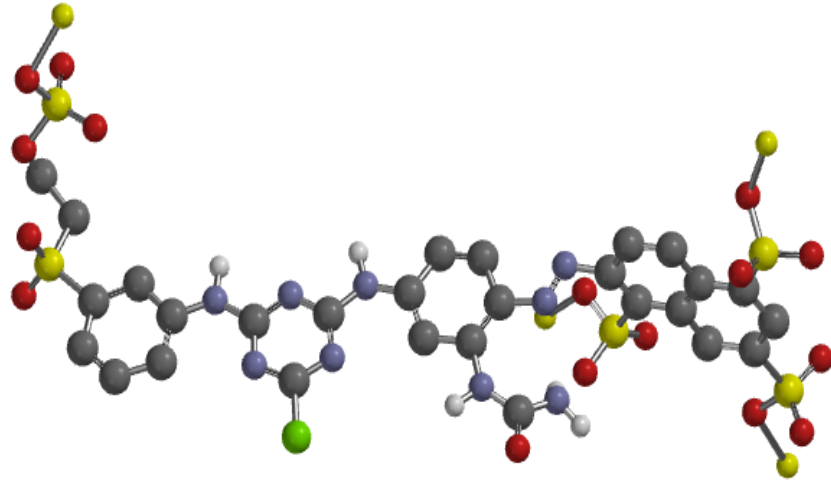


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Sentetik Atık Su

Reaktif Sarı 145 boyası [1,3,6-Naphthalenetrisulfonic acid, 7-((2-((aminocarbonyl)amino)-4-((4-chloro-6-((3-((2(sulfooxy)ethyl)sulfonyl)phenyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)phenyl)azo)-, tetrasodium salt] **Şekil 3.2' de** görüldüğü üzere Setaş Kimya'dan (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir. Molekül formülü $C_{28}H_{20}ClN_9Na_4O_{16}S_5$ 'dir ve konformer hali **Şekil 3.1' de** gösterilmiştir. Molekül ağırlığı 1026.25 g ve maksimum absorbans değeri 372 nm' dir. Boya sentetik atık su ortamı oluşturulmak üzere, 100 mM $NaPO_4$ tampon solüsyonunda literatüre ve atık sularda bulunan miktarlara uygun olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda 40 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} ve 10 mg L^{-1} hazırlanmıştır. Hazırlanan boya solüsyonlarına 1.2 g L^{-1} konsantrasyon da olacak şekilde glukoz (Alfa Aesar, Kat. no.: 10179748, Karlsruhe, Almanya) eklenerek MEH'lere aşılacak üzere hazır hale getirilmiştir. Deney sürecince her bir operasyon için taze boya solüsyonu hazırlandı ve solüsyonlar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ derece karanlık ortamda saklanmıştır.

Şekil 3.1: Reaktif Sarı 145 konformer yapısı (Spartan programı ile çizildi)

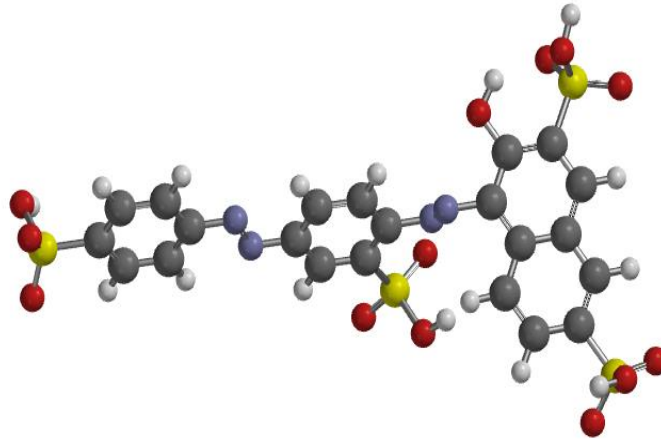


Şekil 3.2: Reaktif Sarı 145 boyası ve NaPO₄ içinde çözünmüş formu



Ponceau S boyası [3-hydroxy-4-[[2-sulfo-4-[(4-sulfophenyl) diazenyl] phenyl] diazenyl] naphthalene-2,7-disulfonic acid] **Şekil 3.4’de** görüldüğü üzere VWR (CAS No: 6226-79-5, Solon, ABD) ‘ dan temin edilmiştir. Molekül formülü C₂₂H₁₆N₄O₁₃S₄ ve konformer hali **Şekil 3.3’de** gösterilmiştir. Moleküler ağırlığı 760.57 g ve maksimum absorbands değeri 514 nm’ dir. Boya sentetik atık su oluşturulmk üzere, 100 mM NaPO₄ tampon solüsyonunda literatüre ve atık sularda bulunan miktarlarına uygun olacak şekilde iki farklı konsantrasyonda 40 mg L⁻¹ve 20 mg L⁻¹ olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan boya solüsyonlarına 1.2 g L⁻¹ konsantrasyon da olacak şekilde glukoz (Alfa Aesar, Kat. no.: 10179748, Karlsruhe, Almanya) eklenerek MEH’lere aşılacak üzere hazır hale getirilmiştir. Deney sürecince her bir operasyon için taze boya solüsyonu hazırlandı ve solüsyonlar +4 °C derece karanlık ortamda saklandı.

Şekil 3.3: Ponceau S konformer hali (Spartan programı ile çizildi)



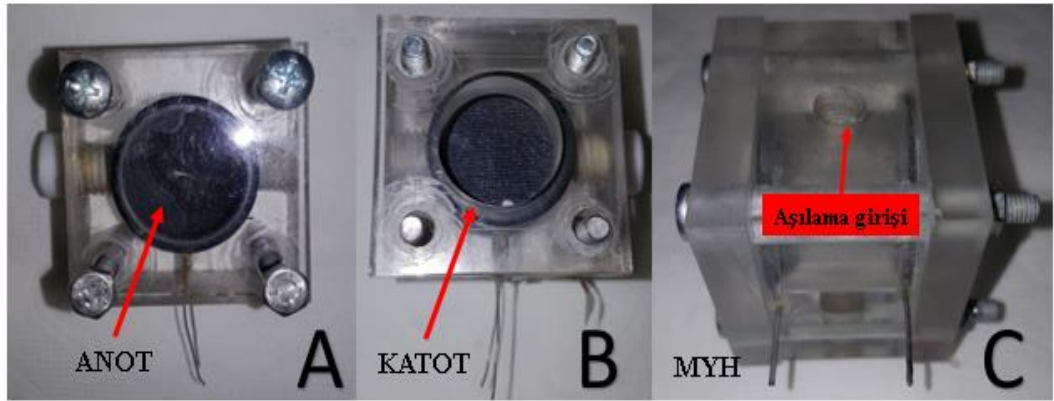
Şekil 3.4: Ponceau S boyası ve NaPO₄ içinde çözünmüş formu



3.2. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin (MYH) Kurulumu

Mikrobiyal yakıt hücreleri'nin (MYH) kurulumu Catal ve ark. (2008), çalışmasının protokolleri örnek alınarak gerçekleştirildi ve 12 mL iç hacime sahip olan ve pleksi cam malzemesinden elde edilmiş tek odacıklı biyoreaktörler daha önce tarif edildiği gibi inşa edildi (Catal ve ark., 2008). MYH'lerin inşasında eni ve boyu 5 cm olan pleksi camlar kullanıldı. Kullanılan pleksi camların çapı 7 cm kalınlığı ise 1 cm olarak ölçüldü. Katodu ve anodu oluşturacak yapıların her ikisi de kaba karbon kumaştan yapıldı ve 7 cm² yüzey alanına sahip olacak şekilde tasarlandı. Anot yüzeyi sadece (Kat. no.: 14032102, FuelCells, Teksas, ABD) karbon bezle kaplandı. Anot kısmının anaerobik olması gerektiğinden Şekil 3.5A'da görüldüğü üzere yapı tasarlanırken hava ile teması engellendi. Katot (CTO32414, FuelCells, Teksas, ABD) yüzeyi ise karbon / politetrafloroetilen (PTFE) ve platin (Pt) malzemesi ile kaplandı. Katot bölmesi havaya karşı geçirgen yapıda olup **Şekil 3.5B'de** görüldüğü üzere bir yüzü hava ile diğer yüzü ise sıvı bölme ile temas halindedir. Sıvı bölme ile temas halinde olan katodun yüzeyi nasyon ve platin ile kaplandı. MYH kurulumunda kullanılan parçalar; anot bezi, katot bezi, odacık oluşturmak üzere pleksi cam parçalar, parçaları tutturmak üzere civata vida ve somun, sabitleyici plastik halkalar, voltajı iletmek amacıyla kullanılan bakır tellerdir. MYH'leri oluşturmak üzere anot kumaşı, pleksi cam malzemede belirtilen alana yerleştirilir ve plastik sabitleyici ile sabitlenir. Anot kumaşı üzerinde artı şeklinde bir kesik atılır. Bunun sebebi anot ile aşılama solüsyonunun etkileşimini güçlendirmektir. Anot yerleştirildikten sonra katodun yerleştirilmesinin ardından somunlar sıkıştırılır ve **Şekil 3.5' de** belirtildiği gibi MYH'ler hazır hale gelir (Bermek ve ark., 2013).

Şekil 3.5A: MYH anot bölgesi; Şekil 3.5B: MYH katot bölgesi, Şekil 3.5C:MYH



3.3. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinin Aşılama ve Operasyonu

MYH'lerin kurulumu tamamlandıktan sonra aşılama aşamasına geçildi. Aşılama için 100 mM pH 7.0 olan NaPO_4 tampon, 1.2 g L^{-1} glukoz çözeltisi ve yerel evsel atık su arıtma tesisinden (Paşaköy, İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi, İstanbul, Türkiye) alınan aktif sulu çamur kullanıldı. *Tablo 1'de* belirtilen içeriklerin yanı sıra daha önceki çalışmalarda kullanılan ve içerisinde aktif bakteri kültürlerini içeren reaktörlerden çıkan solüsyondan ilave edilmiştir. Tampon solüsyonu hazırlandıktan sonra literatüre göre belirlenen konsantrasyonlara uygun olacak şekilde boya solüsyonları eklendi.

- 100 mM pH 7.0 olan NaPO_4 tamponunun 2 L için hazırlanma protokolü;

16.38 g Na_2HPO_4 (Calbiochem, Kat. no: D00156566, Dormstadt, Almanya) ve 13.202 g %99 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar, Kat. no: 10168263, Karlsruhe, Almanya) 800 mL distile su içerisinde çözüldü. Daha sonra 25 mL eser element solüsyonu (MgSO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 2.5 mL vitamin solüsyonu (biyotin, folik asit, pindoksin hidroklorür, riboflavin, tiyamin, nikotinik asit, pantotenik asit, b-12, p-aminobenzoik asit, tiyotik asit) eklendi ve toplam hacim 2 L 'e distile su ile tamamlandı. pH ölçümü ise pH metre cihazı ile yapıldı ve 7 olarak saptandı. Tampon solüsyon hazırlandıktan sonra boya maddeleri eklenene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan tampon solüsyonundan aşılama solüsyonu hazırlanmak için Ponceau S ve Reaktif Sarı 145 boya ları belirlenen konsantrasyonlar da ilave edildi. Boya maddelerinin eklenmesinden sonra ise 1.2 g L^{-1} konsantrasyon olacak şekilde glukoz eklendi.

Tablo 1: Aşılama solüsyonunun içeriği

Boya	Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Tampon miktarı (mL)	Boya Miktarı (mg)	Glukoz miktarı (g)
Ponceau S	40	100	4	0.12
Ponceau S	20	100	2	0.12
Reaktif Sarı 145	40	100	4	0.12
Reaktif Sarı 145	20	100	2	0.12
Reaktif Sarı 145	10	100	1	0.12

Aşılama solüsyonları hazır hale getirildikten sonra operasyona başlamak için biyoreaktörlerde bulunan bakır tellere, 1500 Ω 'luk dirençler tellerle tam temas edecek şekilde bağlandı. 1500 Ω 'luk dirençler; 1000 Ω 'luk iki direncin paralel bağlanması ile elde edilen 500 Ω 'luk dirence, 1000 Ω 'luk direncin seri bağlanması ile elde edildi. Dirençler daha sonra voltmetre (SONAX tt technic, Model:DT830D) ile ölçülerek doğrulandı ve biyoreaktörlere bağlandı. Daha sonra biyoreaktörler bilgisayar destekli bir veri toplama sistemi (Keithley 2700 Multimeter, Oregon, ABD), her 11 dakikada bir yapılan işlemler sırasında üretilen voltajı kaydetmek için bağlandı. MYH'ler ve sistem arası bağlantı sağlandıktan sonra hazırlanmış olan aşılama solüsyonları 30 °C-32 °C getirilerek bir şırınga filtresi (0.2 μ m, VWR, Katalog No: 28145-477, ABD) yardımıyla MYH'lerin içerisine giriş kısmından yavaş yavaş aktarıldı.

MYH'lerden elde edilen voltaj verileri bilgisayar destekli bir veri toplama sistemi (Keithley KickStart Software, Sürüm 1.9.8.21, Tektronix Company, Beaverton, Oregon, ABD) ile Excel programına aktarıldı ve bir veri grafiği oluşturuldu. Grafikte yer alan değerler günlük olarak kontrol edildi ve 0.1 V değerinin altına düşen MYH'lerin aşılama solüsyonları taze solüsyonlarla değiştirildi. Çıkan solüsyonlar kodlanarak -20 °C'de saklandı ve Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizine (American Public Health Association, 1992), absorbans ölçümüne, spektrum taramasına, pH değişim analizlerine tabi tutuldu. Güç yoğunluğu (mW/m²) hesaplamasında aşağıdaki formül kullanıldı; Hesaplama için kullanılan formülde I akım, V voltajı ve A elektrotun yüzey alanıdır (7cm²).

- $P = IV / A$

Koulombik etkinlik, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

- $CE = C_p / C_{Ti} \times \% 100$

Burada CP, akımın zamanla bütünleşmiş edilmesiyle hesaplanan toplam koulomblar ve CTi, karbon kaynağında taşınan teorik koulomb miktarıdır (Catal ve ark. 2008). Tüm deneyler iki kez yapıldı ve standart sapmalar bağımsız sonuçların ortalaması (n = 2) temel alınarak hesaplandı.

3.4. Spektrofotometre ile Absorbans Ölçümü (Renk giderim)

MYH'lerden çıkan solüsyonların her biri kodlandıktan sonra -20 °C ' e kaldırılmadan önce UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu Europe UV-2600, A116654,Japonya) ile absorbans ölçümü yapıldı. Aynı zamanda reaktöre yüklenen taze hazırlanmış örneklerde kodlanarak absorbans ölçümü yapıldı. Ponceau S boyası 511 λ'de ölçüldü. Reaktif Sarı 145 boyası ise 372 λ'de ölçüldü. Hazırlanan boya solüsyonlarında çözücü olarak NaPO₄ tamponu kullanıldığı için kör olarak da NaPO₄ tamponu kullanıldı. Absorbans ölçümü için belirtilen dalga boyları belirlenirken literatür taraması ve operasyona başlamadan önce yapılan spektrum ölçümleri baz alındı.

3.5. Spektrum Tarama

MYH'lerden çıkan solüsyonların absorbans ölçümü yapıldıktan sonra, spektrum taramaya geçildi. Operasyon öncesi ve sonrası solüsyonların her biri için UV-VIS Spektrofotometre ile spektral tarama yapıldı. Böylelikle MYH'lere verilen ve MYH'lerden toplanan solüsyonlar arasındaki tepe noktası farklılıkları saptanarak, boyaların renk giderim mekanizmaları araştırıldı.

3.6. Saatlik Absorbans Ölçümü

MYH'lerden Ponceau S boyası içeren MYH'lerden dokuz saat boyunca her saat başı örnek alındı ve 96 kuyucuklu plakaya 100 µL olacak şekilde konularak Spektrofotometre ile 511 λ'de absorbanları ölçüldü. Aynı şekilde Reaktif Sarı 145 boyası içeren MYH'lerden dokuz saat boyunca her saat başı örnek alındı ve 96 kuyucuklu plakaya 100 µL olacak şekilde konularak spektrofotometre ile 372 λ'de absorbanları ölçüldü ve saatlik renk giderim yüzdeleri hesaplandı.

3.7. Hücre Kültürü

3.7.1. Boya Ekstraktlarının Hazırlanması

Reaktif Sarı 145 ve Ponceau S boyasının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak için sağlıklı hücre hattı olan ECV 304 kullanıldı. ECV 304 insan endotel dokusuna ait bir hücre hattıdır. Boyaların hücreler üzerinde ki sitotoksik aktivitesini ölçmek için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Assay uygulandı. Reaktif Sarı 145 boyasından 8 mg tartıldı ve 100 mL NaPO₄ tamponu içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Böylelikle stok solüsyon konsantrasyonu 80 mg L⁻¹ olarak ayarlandı. Daha sonra stok solüsyondan serumlu medyum kullanılarak seri seyreltme yöntemi ile 40 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ olarak dozlar hazırlandı ve hücre hatlarına uygulandı. Ponceau S boyasından 8 mg tartıldı ve 100 mL NaPO₄ tamponu içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Böylelikle stok solüsyon konsantrasyonu 80 mg L⁻¹ olarak ayarlandı. Daha sonra **Tablo 2’de** görüldüğü üzere stok solüsyondan serumlu medyum kullanılarak seri seyreltme yöntemi ile 40 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ olarak dozlar hazırlandı ve hücre hatlarına uygulandı.

Tablo 2: MTT uygulama dozlarının içeriği

Uygulama Dozu	Doz İçerikleri
40 mg L ⁻¹	Stok solüsyonundan 500 µL + DMEM 500 µL
20 mg L ⁻¹	0.04 mg L ⁻¹ solüsyonundan 500 µL + DMEM 500 µL
10 mg L ⁻¹	0.02 mg L ⁻¹ solüsyonundan 500 µL + DMEM 500 µL
5 mg L ⁻¹	0.01 mg L ⁻¹ solüsyonundan 500 µL + DMEM 500 µL

3.7.2. Serumlu Medyum Hazırlanması

MYH çalışmasının hücre kültürü aşamasında ECV 304 hücre hattı incelendi. Hücreler 37.5 °C %5 CO₂ inkübatörde özel olarak hazırlanan serumlu medyum ile büyütüldü. DMEM (Gibco (1x) (4,5 g L⁻¹) D-glukoz Kat. no.:11960-044) hazır olarak alınmıştır. 45 mL serumsuz DMEM içerisine FBS (Gibco Kat. no.:10099133), L-glutamin (Gibco Kat. no.: 25030081), Penicillin-Streptomycin (Gibco, Kat. no.: 15070063), Non-Essential Amino Acid Solution (MEM (100X) Kat. no.: 11140035) ilave edilerek serumlu medyum hazırlandı. **Tablo 3’de** 50 mL serumlu medyum için gerekli malzemeler ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3: Serumlu medyum içeriği

Malzemeler	Miktarlar
DMEM	45mL
L-glutamine	0.5mL
Penicillin-Streptomycin	0.5mL
Non-Essential Amino Acid Solution	0.05mL
FBS	5mL

3.7.3. ECV 304 Hücreslerinin Stoktan Açılması ve Büyütülmesi

-80 °C’de saklanan ECV 304 hücreleri uygun koşullarda açılarak MTT Assay için hazır hale getirildi. Cryotube içerisinde bulunan 1.5 mL dondurulmuş ECV 304 hücresi 1 mL serumlu medyum ile pipetaj yapılarak çözüldü. 50 mL’lik falkona içerisine 4 mL serumlu medyum aktarıldı ve çözülmüş olan hücrelerin tamamı çekilerek falkona aktarıldı. Daha sonra 5 dakika 1000 rpm ’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant tamamı çekildi ve hücre pelleti üzerine 5 mL serumlu medyum ilave edildi. Serolojik pipet ile pipetaj yapılarak hücre-medyum homojen karışımı sağlandı ve hücre kültürü flaskı (Nest, Kat. no:707013) içerisine aseptik koşullarda aktarıldı. CO₂ inkübatörde de 37.5 °C de büyütüldü.

3.7.4. ECV 304 Hücre Sayımı

Hücre flaskında yer alan medyumun tamamı çekilerek atıldı. Flask duvarları 2 mL Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (Kat. no.: 10010023) ile yıkandı. PBS çekildikten sonra 1 mL Tripsin-EDTA (Gibco (0.25%), Phenol red (Kat. no.: 25200056, Kanada) ilave edildi ve 3 dk. 37.5 °C aşılama yapıldı. Aşılamadan sonra hücrelerin tamamı toplanarak steril falkona aktarıldı ve 5 dk. 1000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre pelleti üzerine 5 mL serumlu medyum eklendi ve pipetaj yapılarak hücre-medyum tamamen karıştırıldı. Sayım için; hücre-medyum karışımından 27 µL alındı ve steril ependorfa konuldu. Üzerine 3µL Triphan mavisi ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Ependorftan 30 µL alınarak Thoma lamına aktarıldı ve sayım yapıldı. Sayım sonucuna göre 10⁵ hücre / mL olacak şekilde medyum ile seyreltme yapıldı. Hücreler MTT Assay için hazır hale getirildi.

3.7.5. MTT Assay Uygulaması

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu tabaka kullanılarak MTT yapılmaya başlandı. MTT uygulamasından önce ECV 304 hücreleri morfolojik olarak ışık mikroskobu ile kontrol edildi ve MTT Assay için uygun olduğu saptandı. Her bir tabaka kuyusu içerisine 10^4 hücre olması için 90 μ L hücre-medyum karışımından konuldu. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C %5 CO₂ inkübatörde bekletildi ve 24 saat sonra her bir kuyuya uygun dozlarda hazırlanan boya solüsyonlarından 10 μ L ilave edildi. Hücreler boya solüsyonu ile muamele edilmesi için 24 saat 37 °C %5 CO₂ inkübatörde bekletildi. Süre doldurulduktan sonra stok konsantrasyonu 10 mg mL⁻¹ olan ve steril PBS içerisinde hazırlanan MTT (invitrogen MTT, Kat. no.: 1899778, USA) solüsyondan her bir kuyuya 30 μ L eklendi ve 4 saat 37 °C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi daha sonra ise 4 saat beklendikten sonra kuyulardan hücrelere dokunulmayacak şekilde tüm sıvılar çekildi ve 90 μ L %50 DMSO %50 isopropanol karışımından (VWR, dimethyl sulfoxide 4L, Kat. no.: BDH1115-4LP) eklendi. Alüminyum folyo ile 96 kuyucuklu tabaka yüzeyi kaplandı. 45 dk. oda sıcaklığında beklendikten sonra 570 nm’de spektrofotometre (Thermo Multi Scan Go) absorbans ölçümleri alındı (Cebecioglu ve ark., 2019).

3.8. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi ve pH ölçümü

Mikrobiyal yakıt hücrelerinden ve mikrobiyal elektroliz hücrelerinden operasyon öncesi ve sonrası toplanan örnekler KOİ analizi yapıldı (American Public Health Association, 1992). Analizde kullanılacak olan solüsyonlar hazırlandı. Cam tüplere sırasıyla, her bir örnekten 0.5 mL, parçalama solüsyonundan 0.3 mL son olarak 0.7 mL sülfürik asit reaktifi eklendi. Cam tüplerin ağzı parafilm ve alüminyum folyo ile kapatılarak 30 saniye vortekslendi. Manyetik ısıtıcı karıştırıcı (Stuart, SD162) ile 130 °C’de 2 saat kaynatıldı. Örneklerde renk değişimi gözlemlendi. Cam tüpler oda ısısında soğutulduktan sonra UV-VIS Spektrofotometre de (SHIMADZU, UV-2600) 600 nm’de absorbansı ölçüldü. Standart grafik oluşturuldu ve denklem yardımıyla %KOİ hesaplandı.

$$\% \text{ KOİ} = ((\text{Operasyon öncesi absorbans} - \text{Operasyon Sonrası absorbans}) / \text{Operasyon öncesi absorbans}) * 100$$

pH değerleri, MYH’lerden ve MEH’lerden operasyon öncesi ve sonrası 2 mL örnek alınarak pH metre (İnoLab, pH 7110) ile ölçüldü.

3.9. Tek Odalı Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri Yapımı

Ponceau S boyasının metanojenler, ekzoelektrojenler ve fermentatif bakteriler üzerindeki etkisini ve etki miktarını araştırmak için tek odalı Mikrobiyal elektroliz hücreleri (MEH) oluşturuldu. MEH'ler, bütül septum tepesinde kapaklar (VWR International, LLC) ile kapatılmış dar ağızlı ortam şişelerinden yapıldı. Toplam reaktör hacimleri, 50 mM 5 mL sodyum asetat ve MYH çalışmasında kullanılan reaktörlerden alınan 10 mL aktif solüsyon içerir.

Katot 50 cm²'lik bir yüzey alanına sahip paslanmaz çelik hasır (200 * 200 Mesh, 304 paslanmaz çelik dokuma tel kumaş, McMASTER-CARR) ve anot yüzey alanı 10cm² olan düz karbon kumaştan yapılmıştır (Tip-B, fuelcellearth.com) . İki elektrot bir kumaş tabakası (First Brands Corporation, ABD) ile ayrıldı ve boru şeklinde bir şekle sarıldı. MEH'lere aşılacak üzere boya solüsyonları ilave etmek için 50 mM sodyum asetat trihidrat çözeltisi hazırlandı. 50 mM sodyum asetat trihidrat solüsyonu için 0.675 g sodyum asetat trihidrat (NaOOCCH₃•3H₂O, Alfa Aesar, Cas No: 6131-90-4, Karlsruhe, Almanya) 80 mL sodyum fosfat (NaPO₄' (100 mM)) tamponunda çözöldü. Daha sonra 50 mM sodyum asetat trihidrat çözeltisine 10 mL Paşabahçe atık su ve (elektrik üretimi ile bilinen) 10 mL MYH çözeltisi ilave edildi. İki tanesi deney grubu iki tanesi ise kontrol grubu olmak üzere dört tane birbiri ile eş mikrobiyal elektroliz hücresi kullanıldı. Her birinin hacmi 15 mL'dir. İçlerindeki anotlar ve katotlar 2 cm² yüzey alanına sahiptir. Her MEH'lere aşılama solüsyonundan 12 mL ilave edildi. Daha sonra anaerobik durumu korumak için 1 dakika boyunca azot (N₂) gazından geçirildiler. MEH'lere 0.7 voltaj uygulandı ve 30 °C'de çalıştırıldı (Catal ve ark., 2015). MEH'lerde uygulanan Ponceau S dozları; 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹

Şekil 3.6: Mikrobiyal Elektroliz Hücresi



3.10. Mikrobiyal Elektroliz Hücresi Aşılama ve Operasyonu

MEH çalışması için gerekli olan biyoreaktörlerin kurulumu tamamlandıktan sonra aşılama aşamasına geçildi. Aşılama için 50 mM pH 7.0 olan sodyum asetat trihidrat tampon içerisinde Ponceau S boya çözeltisi daha önceden MEH için belirlenen konsantrasyonlarda hazırlandı. Sodyum asetat trihidrat tamponunun hazırlanması için belirtilen maddelerin yanı sıra daha önceki çalışmalarda kullanılan ve içerisinde aktif bakteri kültürlerini içeren reaktörlerden çıkan solüsyondan ilave edildi. Reaktörlerden iki tanesi (R16 ve R17) deney grubu olarak seçildi ve sisteme bağlandı. Diğer iki reaktör ise (R0 ve RC) kontrol grubu olarak kullanıldı ve sisteme bağlanmadı. Solüsyonlar ilave edildikten sonra her bir reaktör N₂ gazından geçirilerek içerideki hava temizlendi. Daha sonra reaktörler voltaj verilerinin takip edilmesi ve hidrojen üretimi için sisteme bağlandı. Sisteme bağlarken kısa devre olmaması için anot ve katot birbirleri ile temas etmeyecek şekilde yerleştirildi. MEH sisteminin kurulumu tamamlandıktan sonra operasyon için bir hafta boyunca 0.7 V ve 2.2 Ω dış direnç uygulandı. Sistem 30 °C'de çalıştırıldı. Kontrol gruplarına direnç uygulanmadı ve sisteme bağlanmadılar. Hidrojen üretimi gözlemlenene kadar MEH'lerin aşılama solüsyonları tazelenildi. Operasyondaki bekleme süresi tamamlandıktan sonra Hamilton iğnesi (Hamilton Company, HAM-81317, İsveç) ile reaktörlerin içerisinden 1 mL hacimde gaz örneği alınarak GC-MS ile gaz içerik analizi yapıldı. Gaz analizi için GC koşulları olarak, kolon akışı 2.8 mL/dk., ısıtıcı 185 °C' dir. Gaz örnekleri termal iletkenlik detektörü (AGT-64332A) ve taşıyıcı gaz olarak argonlu bir sütunu (113-3133 GS-CARBONPLOT, 30m, 0.32 mm, 3 mm, J&W Scientific, ABD) olan GC cihazı (Agilent Technologies, 7820A, J&W Scientific, ABD) ile analiz edildi.

4.BULGULAR

4.1. Spektrofotometrik Absorbans Ölçümü

4.1.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Renk Giderimi

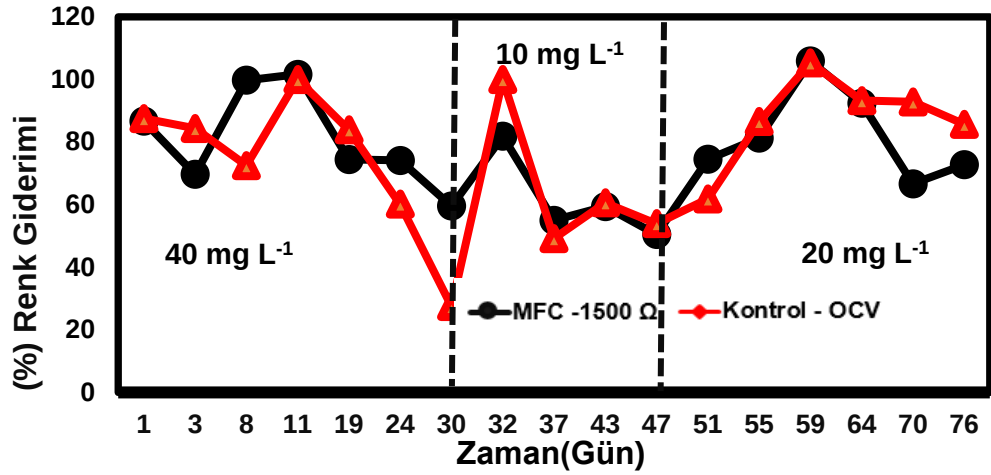
Reaktif Sarı 145 boyası için üç tane MYH reaktörü ile çalışıldı. İki reaktör aynı şartlar sağlanacak şekilde deney grupları olarak seçilmişlerdir. Üçüncü reaktör ise kontrol grubu olarak seçilmiştir ve deney grupları ile aynı şartlarda çalışılmıştır. Deney grubu olarak seçilen biyoreaktörlere dış direnç olarak 1500 Ω uygulanırken, kontrol grubuna dış direnç uygulanmadı. MYH için uygulanan solüsyon içerikleri tüm gruplarda aynıdır. MYH'lerin solüsyonları değiştirildikçe; reaktöre giren ve reaktörden çıkan solüsyonlardan örnekler alınarak absorbans ölçümleri yapıldı ve daha sonra ali kodlanarak -4 °C ' de saklandı. Reaktif Sarı 145 boyası için absorbans ölçümü literatüre bakılarak 372 nm'de gerçekleştirildi. Ölçüm yapılırken çıkan solüsyonlar hem bakteriler çöktürülmeden hem de 10.000 rpm 5 dk. santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldükten sonra ölçüldü. %Renk giderimi hesaplaması literatüre göre;

$$\% \text{ Renk Giderimi} = ((A1-A2) / A1 * 100)$$

Formülü ile hesaplanmıştır. A1 reaktöre giren solüsyonların absorbanı, A2 ise reaktörlerden çıkan solüsyonların absorbanıdır.

Reaktif Sarı 145 boyasının deney gruplarının absorban ölçümlerinin ortalamaları alınarak renk giderim oranları hesaplandı. Deney gruplarına aşıl原因an Reaktif Sarı 145 boyasına dair renk giderim oranları ***Şekil 4.1'de*** görüldüğü üzere %77 olarak hesaplandı. Kontrol grubuna aşıl原因an Reaktif Sarı 145 boyasının renk giderim oranı ise %76.6 olarak hesaplandı. Ayrıca, 40 mg L⁻¹ konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %85, 10 mg L⁻¹ konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %76 ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı ise %78 olarak hesaplandı.

Şekil 4.1: Reaktif Sarı 145 boyası (%) renk giderim oranları



4.1.2. Ponceau S Boyasının Renk Giderimi

Ponceau S boyası için üç tane MYH reaktörü ile çalışıldı. İki reaktör aynı şartlar sağlanacak şekilde deney grupları olarak seçilmişlerdir. Üçüncü reaktör ise kontrol grubu olarak seçilmiştir ve deney grupları ile aynı şartlarda çalışılmıştır. Deney grubu olarak seçilen biyoreaktörlere dış direnç olarak 1500 Ω uygulanırken, kontrol grubuna dış direnç uygulanmadı. MYH için uygulanan solüsyon içerikleri tüm gruplarda aynıdır. MYH'lerin solüsyonları değiştirildikçe; reaktöre giren ve reaktörden çıkan solüsyonlardan örnekler alınarak absorbans ölçümleri yapıldı ve daha sonra kodlanarak -4 °C' de saklandı. Ponceau S boyası için absorbans ölçümü literatüre bakılarak 512 nm 'de gerçekleştirildi. Ölçüm yapılırken çıkan solüsyonlar hem bakteriler çöktürülmeden hem de 10.000 rpm 5 dk. santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldükten sonra ölçüldü. %Renk giderimi hesaplaması literatüre göre;

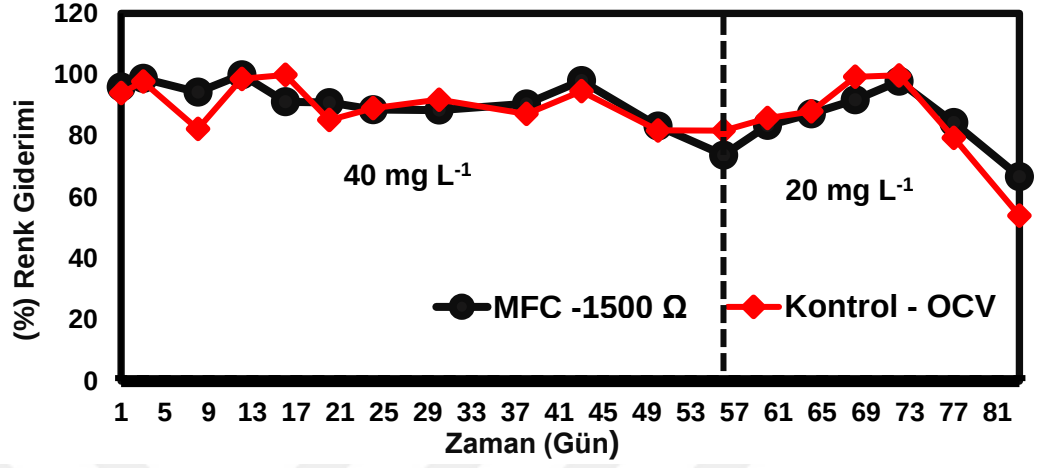
$$\% \text{Renk Giderimi} = ((A1 - A2) / A1 * 100)$$

Formülü ile hesaplanmıştır. A1 reaktöre giren solüsyonların absorbansı, A2 ise reaktörlerden çıkan solüsyonların absorbansıdır.

Ponceau S boyasının deney gruplarının absorbans ölçümlerinin ortalamaları alınarak % renk giderim oranları hesaplandı. Deney gruplarında Ponceau S boyasına ait renk giderim oranı *Şekil 4.2'de* görüldüğü üzere %89 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda ise renk giderim oranı %88 olarak hesaplandı. Ayrıca, 40 mg L⁻¹

konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %91 ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı ise %85 olarak hesaplandı.

Şekil 4.2: Ponceau S boyasının (%) renk giderim oranları



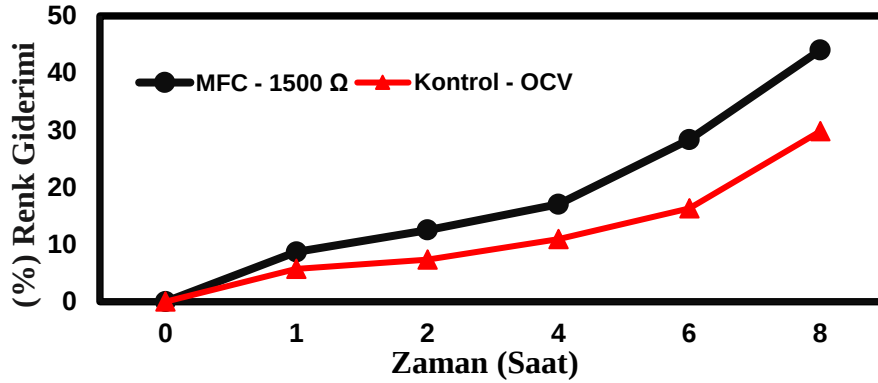
4.2. Saatlik Renk Giderim Oranları

Boyaların absorbans ölçümü ile saatlik giderim oranlarının analizi için, kontrol gruplarından ve deney gruplarından 9 saat boyunca, her saat başı 1 mL örnek alınarak ölçüm yapıldı.

4.2.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Saatlik Renk Giderim Oranının Hesaplanması

Reaktif Sarı 145 boyasının saatlik renk giderim oranının hesaplanması için dokuz saat boyunca her saat başı 1 mL örnek alınarak UV absorbans ölçümü yapıldı ve renk giderim oranı belirlendi. Reaktif Sarı 145 boyasının solüsyonu 40 mg L⁻¹ konsantrasyonunda NaPO₄ tamponu ile taze olarak hazırlandı ve MYH'lere aşılandı. 9 saat boyunca saatte MYH'lerden alınan numunelerin absorbansları ayrı ayrı ölçüldü ve % renk giderimi hesaplandı. Hesaplamaya göre, *Şekil 4.3'de* görüldüğü üzere dokuz saat sonra boyanın giderim oranı olarak %50 hesaplandı. Kontrol grubunda ise bu oran %30 olarak hesaplandı.

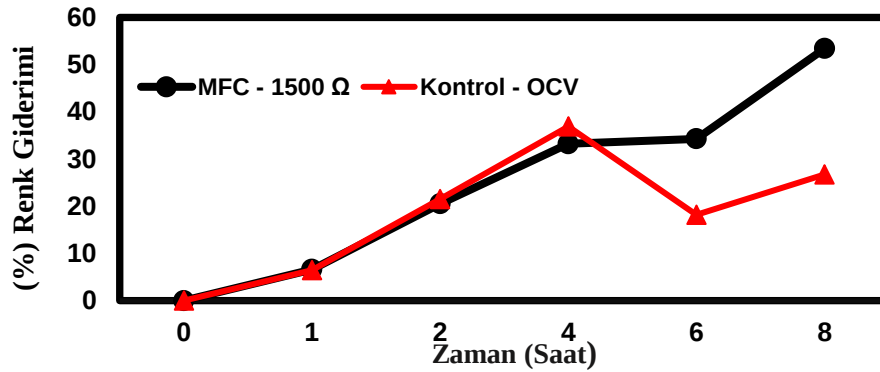
Şekil 4.3: Reaktif Sarı 145 boyasının saatlik renk giderim oranları



4.2.2. Ponceau S Boyasının Saatlik Renk Giderim Oranının Hesaplanması

Ponceau S boyasının saatlik renk giderim oranının hesaplanması için dokuz saat boyunca her saat başı 1 mL örnek alınarak UV absorbans ölçümü yapıldı ve renk giderim oranı belirlendi. Ponceau S boyasının solüsyonu 40 mg L⁻¹ konsantrasyonunda NaPO₄ tamponu ile taze olarak hazırlandı ve MYH'lere aşıldı. 9 saat boyunca saatte MYH'lerden alınan numunelerin absorbansları ayrı ayrı ölçüldü ve % renk giderimi hesaplandı. Hesaplamaya göre, *Şekil 4.4'de* görüldüğü üzere dokuz saat sonra boyanın giderim oranı %53'ü tespit edildi. Kontrol grubunda ise bu oran %42 olarak hesaplandı.

Şekil 4.4: Ponceau S boyasının saatlik renk giderim oranları



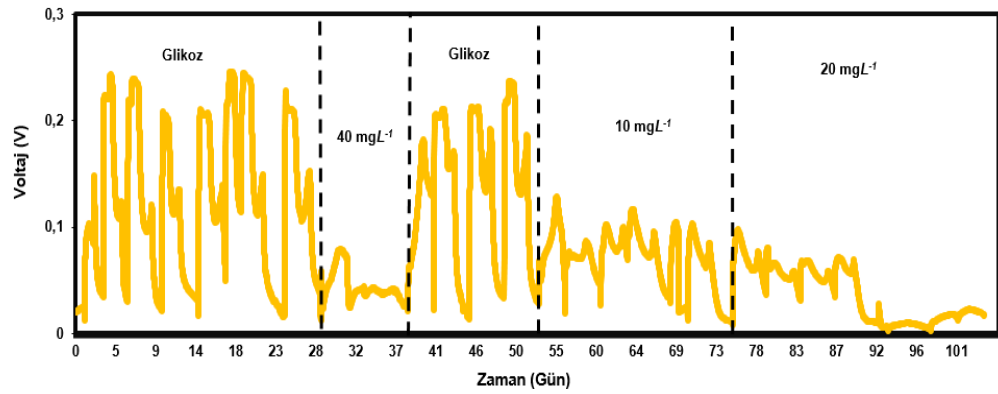
4.3. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Elektrik Üretimi

MYH'ler kullanılarak Reaktif Sarı 145 boyasında ve Ponceau S boyasında hem renk giderim yapılabileceği hem de elektrik üretiminin gerçekleştirilebileceği saptandı. Her iki boyada da maksimum voltaj üretimi en düşük konsantrasyonda elde edildi.

4.3.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının Elektrik Üretimi

Reaktif Sarı 145 boyasında MYH reaktörlerinde elektrik üretimi üç farklı konsantrasyonda 101 gün boyunca araştırıldı. İlk önce MYH’lerde bulunan mikroorganizmaların ortama adapte olabilmesi ve sistemin tekrarlı hale gelebilmesi için reaktörler sadece 1.2 g L⁻¹ konsantrasyonda glukoz ile beslendi. Elektrik üretimi başladıktan sonra MYH’ler sadece 1.2 g L⁻¹ glukoz ile aşılandığında maksimum elektrik üretim miktarı **Şekil 4.5’de** görüldüğü üzere 0.24 V olarak hesaplandı. Daha sonra 40 mg L⁻¹ Reaktif Sarı boyası MYH’lere aşılandığında elektrik üretiminde azalma görüldü ve 0.05 V olarak hesaplandı. Elektrik üretimi 0.1 V altına düştüğü için MYH reaktörleri tekrardan sadece 1.2 g L⁻¹ konsantrasyonda glukoz ile beslendi. Daha sonra MYH’lere sırası ile 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ Reaktif Sarı 145 boyası aşılandı. Elde edilen maksimum voltaj 10 mg L⁻¹ konsantrasyonda 0.11 V’dir. 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda ise 0.08 V elektrik üretimi olduğu saptandı.

Şekil 4.5: Reaktif Sarı 145 boyasının MYH’de elektrik üretimi

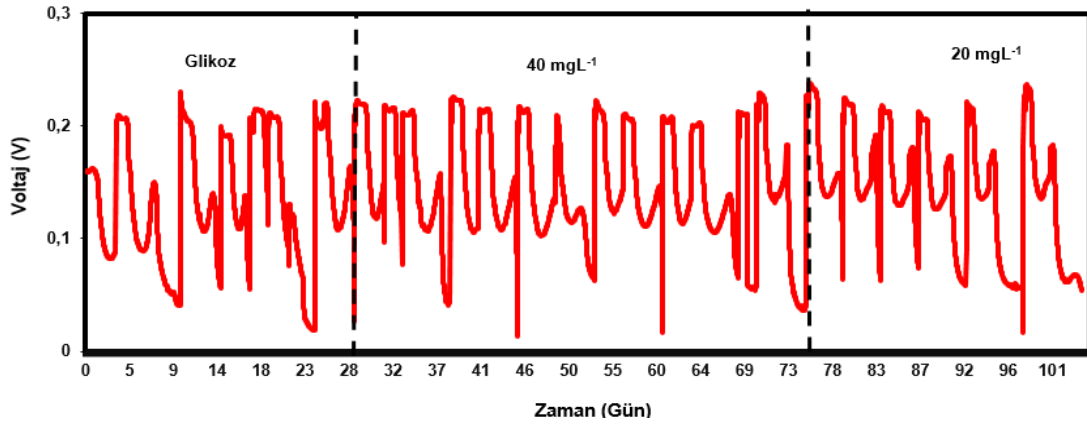


4.3.2. Ponceau S Boyasının Elektrik Üretimi

Ponceau S boyasında MYH reaktörlerinde elektrik üretimi iki farklı konsantrasyonda 101 gün boyunca araştırıldı. İlk önce MYH’lerde bulunan mikroorganizmaların ortama adapte olabilmesi ve sistemin tekrarlı hale gelebilmesi için reaktörler sadece 1.2 g L⁻¹ konsantrasyonda glukoz ile beslendi. Elektrik üretimi başladıktan sonra MYH’ler sadece 1.2 g L⁻¹ glukoz ile aşılandığında maksimum elektrik üretim miktarı **Şekil 4.6’da** görüldüğü üzere 0.24 V olarak hesaplandı. Daha sonra 40 mg L⁻¹ Ponceau S boyası MYH’lere aşılandığında elektrik üretiminde önemli bir değişiklik gözlenmedi maksimum 0.24 V olarak hesaplandı. Daha sonra 20 mg L⁻¹ Ponceau S boyası MYH’lere aşılandığında ise yine elektrik üretiminde önemli bir değişiklik gözlenmedi

fakat MYH'lere aşıl原因 boya solüsyonlarının süresinde değışim gözlendi ve daha kısa zaman aralığında taze solüsyon ile aşıl原因 yapıldı.

Şekil 4.6: Ponceau S boyasının MYH de elektrik üretimi



4.4. Sitotoksite Analizi

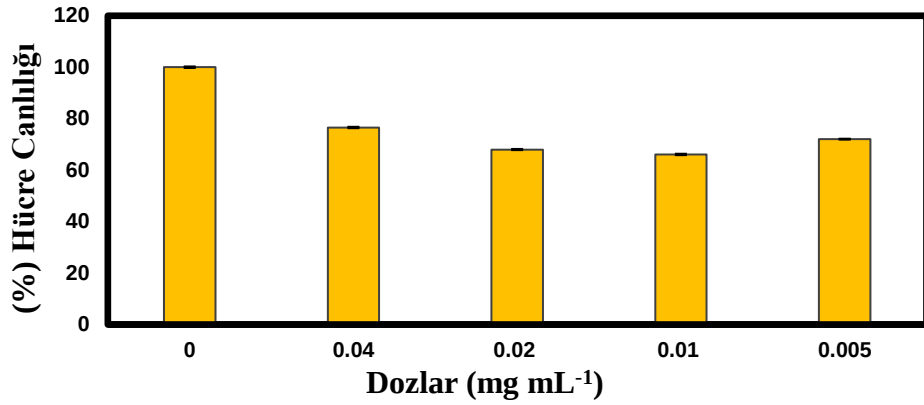
Reaktif Sarı 145 boyasının ve Ponceau S boyasının sağlıklı hücre hattı olan ECV 304 üzerinde ki sitotoksik etkisi MTT Assay uygulanarak incelendi. ECV 304 hücre hatları boyaların MYH'lere ve MEH'lere uygulanan dozların etkisi araştırıldı. Boyalar hücre hattı ile 24 saat muamele edildi. Daha sonra 570 nm 'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı ve aşağıdaki formüle göre % Hücre Canlılığı hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = ((\text{Deney grubu OD} / \text{Kontrol grubu OD}) - 1) \times 100$$

4.4.1. Reaktif Sarı 145 Boyasının ECV 304 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Reaktif Sarı 145 boyası ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dozları yani 40 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ konsantrasyonda boya solüsyonları 24 saat boyunca ECV 304 hücreleri ile muamele edildi. Yapılan MTT Assay sonuçları **Şekil 4.7'de** görüldüğü üzere, Reaktif Sarı 145 boyası ECV 304 boyası üzerinde toksik etki göstermemiştir. Kontrol gruba kıyasla 10 mg L⁻¹ luk dozu hücre canlılığı %66 ve 40 mg L⁻¹ luk dozu ise hücre canlılığı %77 olarak saptandı. Bunun yanı sıra diğer dozlarda yaklaşık %70 hücre canlılığı göstermiştir.

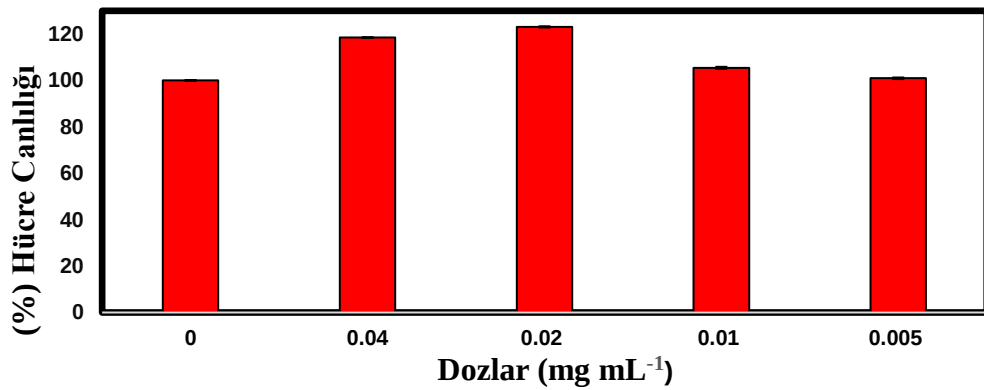
Şekil 4.7: Reaktif Sarı boyası MTT analiz sonuçları



4.4.2. Ponceau S Boyasının ECV 304 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Ponceau S boyası ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dozları yani 40 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ konsantrasyonda boya solüsyonları 24 saat boyunca ECV 304 hücreleri ile muamele edildi. Yapılan MTT Assay sonuçları **Şekil 4.8’de** görüldüğü üzere, Ponceau S boyası ECV 304 boyası üzerinde toksik etki göstermemiştir. Kontrol gruba kıyasla 10 mg L⁻¹’luk dozu hücre canlılığı %105 ve 40 mg L⁻¹’luk dozu ise hücre canlılığı %118 olarak saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığı ise 20 mg L⁻¹’luk dozda %124 olarak saptanmıştır. ECV 304 üzerine uygulanan tüm dozlar kontrol grubuna kıyasla aynı oranda proliferasyon göstermiştir.

Şekil 4.8: Ponceau S boyası MTT analiz sonuçları



4.5. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde Hidrojen Üretimi

Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde Ponceau S boyasının üç farklı konsantrasyonunun hidrojen üretimine etkisi araştırıldı. MEH’lere uygulanan

konsantrasyon sırası ile 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹'dir. MEH'ler boya solüsyonları ile aşılardan önce 50 mM sodyum asetat trihidrat muamele edildi. MEH reaktörlerinden iki tanesi deney grubu bir tanesi ise kontrol grubu olarak seçildi. Deney gruplarına 0.7 V akım uygulanırken, kontrol gruplarına uygulanmadı. Karbon kaynağı olarak sodyum asetat trihidrat kullanıldı. Mikrobiyal elektroliz hücreleri ile 35 gün boyunca boya solüsyonu aşılardan sodyum asetat trihidrat (50 mM) ile beslendi. Hidrojen (H₂) gazı üretimi gözlemlendikten sonra günlük olarak gaz üretimi ölçüldü. **Şekil 4.9'da** ve **Şekil 4.10'da** görüldüğü üzere harici bir gerilim (0.7 V) uygulanan deney grubunda H₂ gazı üretimi gözlemlenirken kontrol grubunda H₂ gazı gözlemlenmedi. H₂ ölçümleri için MEH'lerden 1 mL örnek alınarak GC-MS kullanıldı.

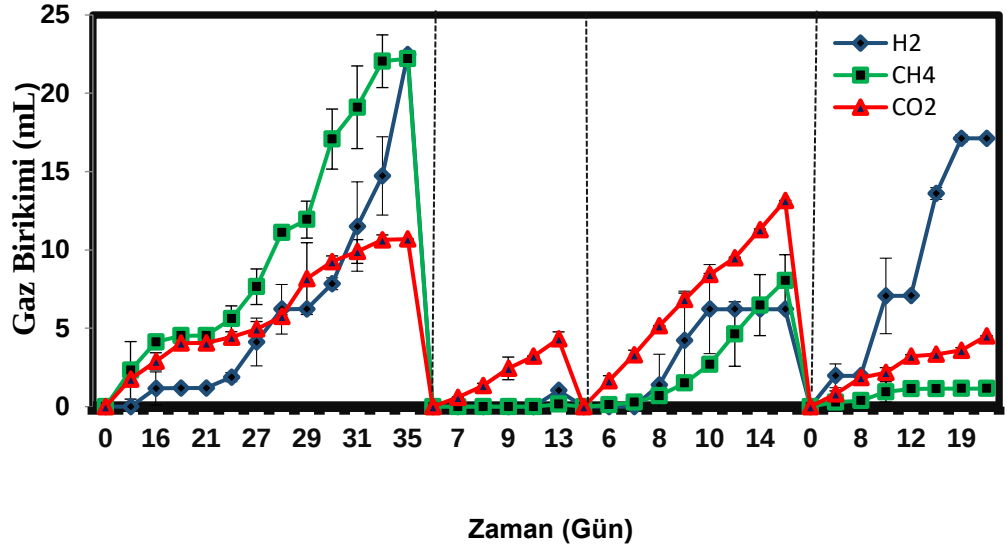
Sodyum asetat trihidrat (50 mM) ile 35 günde H₂ gazı toplam 25 mL'dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'ler, 25 mL metan (CH₄) gazı ve 10 mL karbon dioksit (CO₂) gazı üretti. Voltaj uygulanmayan kontrollerde hidrojen üretimi gözlenmedi ve sadece 9 mL CO₂ gazı birikti.

MEH'lerde hidrojen gazının üretimi gözlemlendikten sonra reaktörlere 13 gün boyunca 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda Ponceau S boyası aşılandı. Boya aşılmasından sonra 13. Gün sonunda üretilen toplam hidrojen gaz miktarı 1 mL dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'lerde metan (CH₄) gazı üretimi gözlenmedi ve metan baskılandı. Üretilen karbon dioksit (CO₂) gazı miktarı ise 4.5 mL dir. Voltaj uygulanmayan kontrollerde hidrojen gazı ile metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 4 mL CO₂ gazı birikti.

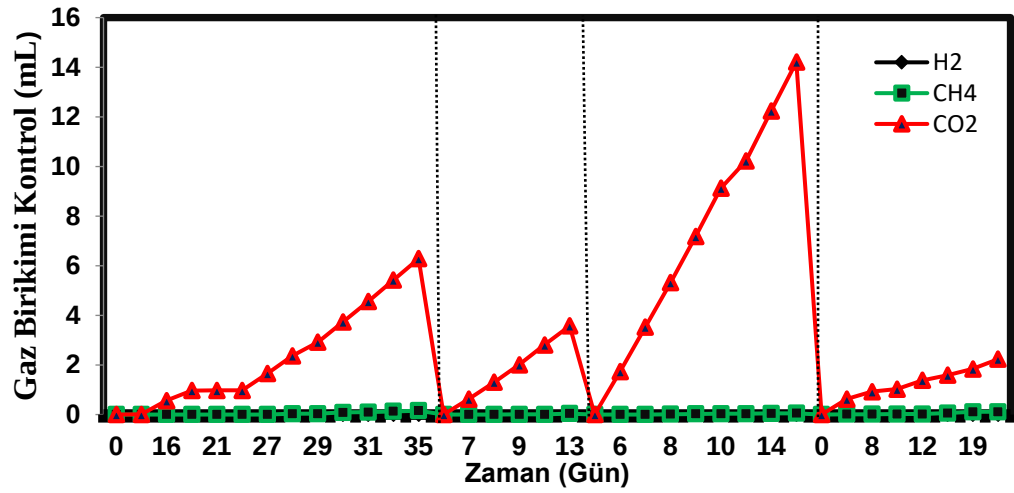
MEH'lere 15 gün boyunca 10 mg L⁻¹ konsantrasyonda Ponceau S boyası aşılandı. Boya aşılmasından sonra 15. Gün sonunda üretilen toplam hidrojen gaz miktarı 6 mL dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'ler, 8 mL metan (CH₄) gazı üretimi gözlenmedi ve metan baskılandı. Üretilen karbon dioksit (CO₂) gazı miktarı ise 12 mL dir. Voltaj uygulanmayan kontrollerde hidrojen gazı ile metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 14 mL CO₂ gazı birikti.

MEH'lere 22 gün boyunca 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda Ponceau S boyası aşılandı. Boya aşılmasından sonra 15. Gün sonunda üretilen toplam hidrojen gaz miktarı 18 mL dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'ler, 1 mL metan (CH₄) gazı ve 4 mL karbondioksit (CO₂) gazı üretti. Voltaj uygulanmayan kontrollerde hidrojen gazı ile metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 16 mL CO₂ gazı birikti.

Şekil 4.9: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi



Şekil 4.10: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde hidrojen üretimi (kontrol)

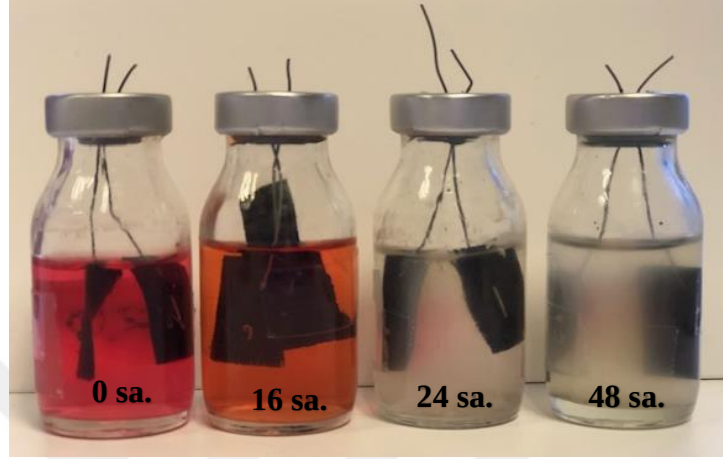


4.6. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde Renk Giderim

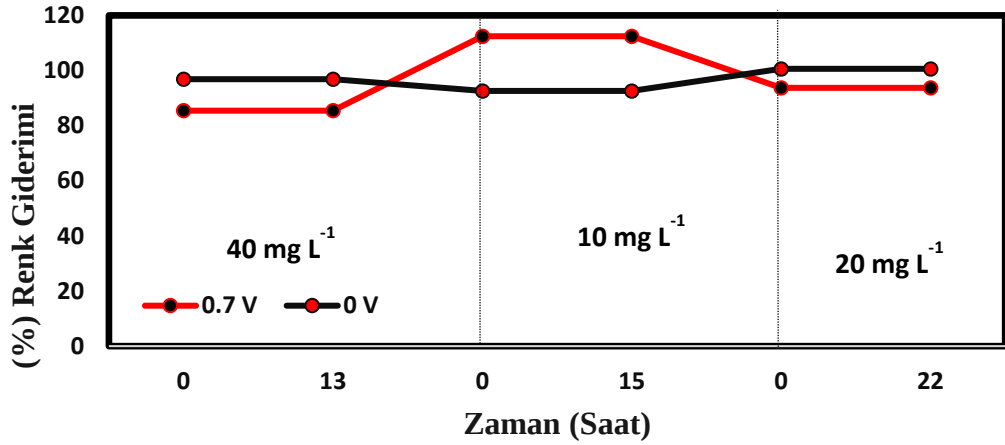
Mikrobiyal elektroliz hücrelerinden alınan örneklerin absorbans ölçümü yapıldı ve renk giderim oranları hesaplandı. MEH'lerdeki renk giderimi *Şekil 4.11'de* görüldüğü üzere 24 saat içerisinde gözle görülebilir şekilde gerçekleşti. MEH reaktörlerine aşıl原因 boya solüsyonlarından maksimum renk giderim *Şekil 4.12'de* görüldüğü üzere %112 ile

10 mg L⁻¹ konsantrasyonunda görüldü. Bu orana sahip olan MEH'lere 0.7 V elektrik uygulandı. 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda ise renk giderim oranı deney grupları için %85 kontrol grubu için ise %97 hesaplandı. 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda ise deney gruplarında %94 kontrol gruplarında ise %100 hesaplandı.

Şekil 4.11: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde Ponceau S boyasının renk giderimi



Şekil 4.12: Mikrobiyal elektroliz hücrelerinde Ponceau S boyasının renk giderim oranları



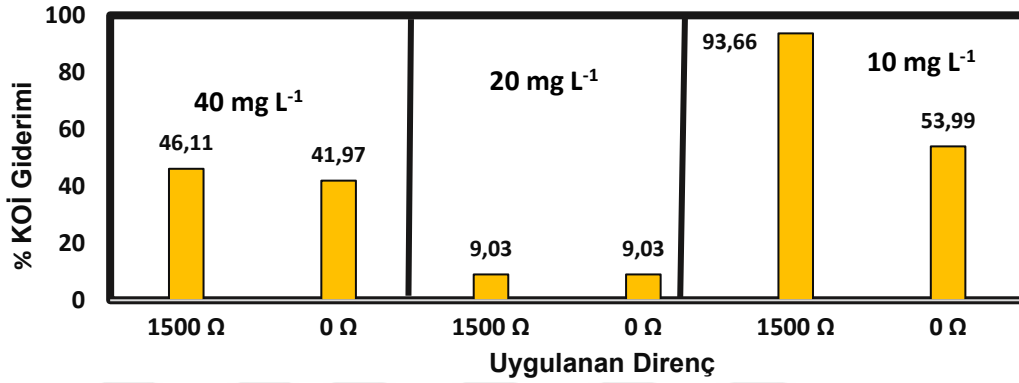
4.7. Kimyasal Oksijen İhtiyacı Analizi ve pH Ölçümü

4.7.1. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde KOİ Analizi

Mikrobiyal yakıt hücrelerinden toplanan örneklerle KOİ analizi yapıldı. Reaktif Sarı 145 boyasında 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda 1500 Ω dış direnç uygulanan deney grubunda KOİ oranı %46.11 ve 0 Ω dış direnç uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %41.97 bulundu. Reaktif Sarı 145 boyasında *Şekil 4.13'de* görüldüğü üzere 20 mg L⁻¹

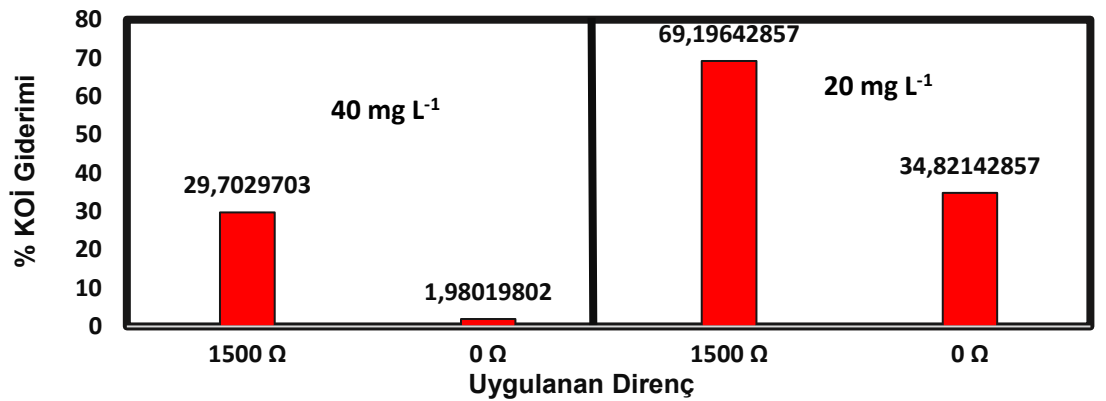
konsantrasyonda 1500 Ω dış direnç uygulanan deney grubunda KOİ oranı %9.03 ve 0 Ω dış direnç uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %9.03 bulundu. Reaktif Sarı 145 boyasında 10 mg L⁻¹ konsantrasyonda 1500 Ω dış direnç uygulanan deney grubunda KOİ oranı %93,66 ve 0 Ω dış direnç uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %53,99 bulundu.

Şekil 4.13: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde Reaktif Sarı 145 boyasının % KOİ giderimi



MYH reaktörlerinden toplanan örnekler KOİ analizi yapıldı. Ponceau S boyasında *Şekil 4.14'de* görüldüğü üzere 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda 1500 Ω dış direnç uygulanan deney grubunda KOİ oranı %29.7 ve 0 Ω dış direnç uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %1.98 bulundu. Ponceau S boyasında 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda 1500 Ω dış direnç uygulanan deney grubunda KOİ oranı %69.1 ve 0 Ω dış direnç uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %34.8 bulundu.

Şekil 4.14: Mikrobiyal yakıt hücrelerinde Ponceau S boyasının % KOİ giderimi



4.7.2. Mikrobiyal Elektroliz Hücrelerinde KOİ Analizi

MEH'lerden toplanan örnekler KOİ analizi yapıldı. Ponceau S boyasında 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda 0.7 V elektrik uygulanan deney grubunda KOİ oranı %94.78 ve 0 V elektrik uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %57.91 bulundu. MEH'lerden toplanan

örneklere KOİ analizi yapıldı. Ponceau S boyasında 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda 0.7 V elektrik uygulanan deney grubunda KOİ oranı %24.52 ve 0 V elektrik uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %9.35 bulundu. MEH'lerden toplanan örnekler KOİ analizi yapıldı. Ponceau S boyasında 10 mg L⁻¹ konsantrasyonda 0.7 V elektrik uygulanan deney grubunda KOİ oranı %39.31 ve 0 V elektrik uygulanan kontrol grubunda KOİ oranı %12.58 bulundu.

Mikrobiyal elektrokimyasal hücrelerde, operasyon öncesi ve sonrası pH değerlerindeki değişim **Tablo 4'de** belirtilmiştir.

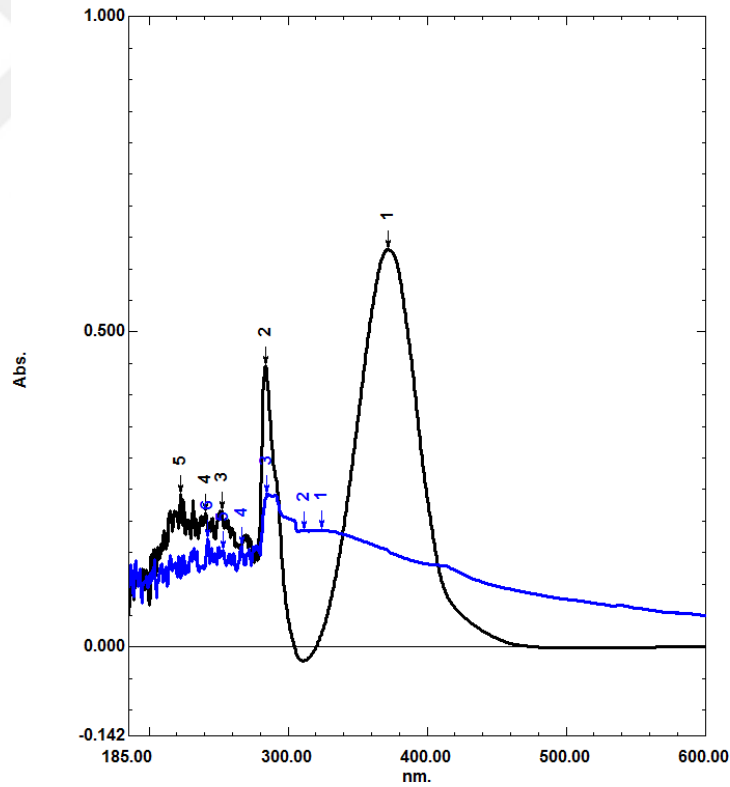
Tablo 4: pH değerleri

Reaktör	Konsantrasyon	Değer
MYH / Ponceau S	40 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	6.81
	40 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.90
MYH / Ponceau S	20 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	6.80
	20 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.90
MYH / Reaktif Sarı 145	40 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	6.85
	40 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.90
MYH / Reaktif Sarı 145	20 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	6.84
	20 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.90
MYH / Reaktif Sarı 145	10 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	6.81
	10 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.90
MEH / Ponceau S	40 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	7.5
	40 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.9
MEH / Ponceau S	10 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	7.5
	10 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.9
MEH / Ponceau S	20 mg L ⁻¹ / operasyon sonrası	7.5
	20 mg L ⁻¹ / operasyon öncesi	6.9

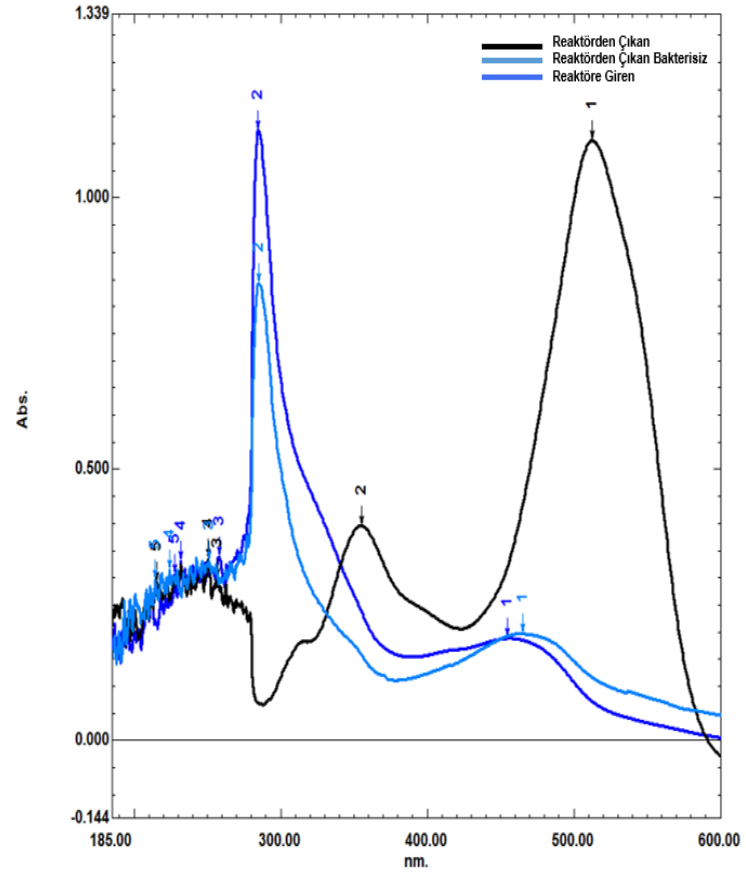
4.8. Spektrum Tarama

MYH'lerden operasyon öncesi ve sonrası alınan örneklerin UV-VIS spektrofotometre ile spektrum taraması yapıldı. **Şekil 4.16'da** görüldüğü üzere operasyon öncesinde 372 nm'de görülen ve Reaktif Sarı 145 boyasına ait olduğu düşünülen tepe noktası, operasyon sonrasında sönümlenmiştir. Buradan anlaşılabileceği üzere MYH'lerde boyanın renk giderimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve yeni yan ürünler oluşmuştur. **Şekil 4.15'de** görüldüğü üzere Ponceau S boyasında ise operasyon öncesinde maksimum tepe noktası 512 nm'de görülürken, operasyon sonrası örnekte bu nokta sönümlenmiş, yerine yeni tepe noktaları belirmiştir. Bu tepe noktalarının boyanın renk giderimi sonucu oluşan ara ürünlere ait olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.15: Reaktif Sarı 145 boyasının spektrum taraması



Şekil 4.16: Ponceau S boyasının Spektrum taraması



5. TARTIŞMA

Azo boyaları, simetrik veya asimetrik radikalleri bağlayan azo grubu ($-N = N-$) ile karakterize edilir. Bu moleküller, kromofobik gruplara, oksokrom yapılara ve ($-N = N-$) grubuna bağlı olan ve boyayı oluşturan ve renk ve çeşitli başka özellikler üreten fonksiyonel gruplara sahiptir. Kromofobik gruplara bağlı olarak, boyalar renk giderimine karşı farklı seviyelerde direnç gösterebilir. Bu nedenle, boyanın yapısı renk giderme yönteminin seçiminde önemli bir parametredir (Gurses ve ark., 2016). Çalışmamızda MYH’de Reaktif Sarı 145 (40 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} ve 10 mg L^{-1}) ve Ponceau S (40 mg L^{-1} ve 10 mg L^{-1}) boyalarının farklı konsantrasyonlarda renk giderim performansları araştırılmıştır. UV spektrofometre ile spektrum tarama ve absorbans ölçümleri yapılmıştır. Reaktif Sarı 145 ve Ponceau S boyalarının sırasıyla 372 ve 511 nm’de maksimum emilim gösterdikleri saptanmıştır. Buradan yola çıkılarak boya absorbanslarını ölçmek için mikrobiyal elektrokimyasal hücrelerden yaklaşık 96 saatte bir 1 mL numune alınmış ve analiz edilmiştir. Reaktif Sarı 145’in renk giderim oranı 96 saatlik operasyon sonunda %79 olarak hesaplandı. Kontrol grubuna aşıl原因 Reaktif Sarı 145 boyasının renk giderim oranı ise %77 olarak hesaplandı. Ayrıca, 40 mg L^{-1} konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %85, 10 mg L^{-1} konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %76 ve 20 mg L^{-1} konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı ise %78 olarak hesaplandı. Absorbans ölçümleri ve spektrum analizleri, Reaktif Sarı 145’in MYH’lerde renk gideriminin gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca elektrik üretimine kıyasla renk giderim oranları konsantrasyonla paralel olarak artmıştır. Ponceau S boyasının renk giderim oranı %89 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda ise renk giderim oranı %88 olarak hesaplandı. Ayrıca, 40 mg L^{-1} konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı %91 ve 20 mg L^{-1} konsantrasyonunda ki boyanın renk giderim oranı ise %85 olarak hesaplanmıştır. Konsantrasyonlar arasında iki kat yoğunluk farkı olmasına rağmen, renk giderme etkinliğinin, elektrik üretim performansı ile paralel olarak önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir.

Maksimum renk giderim oranının her iki boya içinde en yoğun konsantrasyon olan 40 mg L^{-1} ’de elde edilmesinin sebebi boya yapılarının sahip olduğu sülfonik gruplarla

ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu gruplar elektron çekme özelliklerine sahiptir ve azo bağından kopardıkları elektronlarla daha fazla renk kaybına yol açabilmektedirler (Onn ve ark., 2017). Benzer sonuçlar Onn ve arkadaşları (2017), tarafından mono ve diazo boyaları ile gerçekleştirilen renk giderim çalışmasında da elde edilmiştir. Bununla birlikte indirgenmiş yani renksizleştirilmiş boyanın bazı durumlarda anottaki biyofilme elektron taşımada redoks aracı olarak yardım ettiği ve ortaya çıkabilecek toksisiteye bağlı olarak elektrik üretimi üzerine olumsuz etki edebileceği de düşünülmektedir (Chen ve ark., 2011). Reaktif Sarı 145 monoazo boyası olmasına rağmen bir diazo boyası olan Ponceau S'e kıyasla elektrik üretiminde daha düşük performans sergilemiştir. Bunun sebebi olarak MYH'lerde bulunan elektrokimyasal hücrelerin Reaktif Sarı 145 boyasına karşı daha fazla hassasiyet göstermiş olabilecekleri düşünülmüştür. Mikrobiyal renk gideriminde azoredüktaz enzimi azo bağlarının yarılmasından sorumlu ana enzimdir. Bakteriler tarafından azoredüktaz maksimum üretimi, geç logaritmik fazdan orta durağan faza geçiş sırasında rapor edilmiştir. Bu nedenle, renksizleştirme süresi ve boyanın miktarı MYH ortamındaki mikrobiyal topluluğun yoğunluğuna ve enzim üretim aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Maier ve ark., 2004). Deney sonuçlarımıza göre MYH'lerde hem elektrik üretimi hem de azo boyalarının renk gideriminin başarılı bir şekilde eş zamanlı olarak yürütülebileceği sonucuna varılmıştır. Özellikle Ponceau S benzeri diazo boyaların MYH'lerde renk giderimi ve elektrik üretimi için umut vadetmektedir. Çalışma sonuçlarımız, literatürde diğer azo boyaları ile yapılan eş zamanlı olarak elektrik üretimi ve renk giderimi çalışmalarının sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Reaktif Sarı 145 boyasının MYH'lerde elektrik üretimi 101 gün boyunca üç farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Operasyon öncesinde mikrobiyal elektrokimyasal hücreleri ortama adapte etmek, kararlı ve tekrarlı sonuçlar elde edilmek için 28 gün boyunca 1.2 g L^{-1} konsantrasyonunda glikoz ile beslenmiştir. MYH'lerde $1 \text{ k}\Omega$ 'luk harici bir dış direnç uygulanarak yaklaşık 0.24 V 'luk bir kararlı ve tekrarlanabilir elektrik üretimi gözlenmiştir. Daha sonra, içerisinde 1.2 g L^{-1} glikoz ile 40 mg L^{-1} Reaktif Sarı 145 boyası olan solüsyon 10 gün boyunca MYH'e aşılandığında, elektrik üretim değerinde yaklaşık 0.05 V gibi ani bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün sebebi olarak, MYH ortamına aniden eklenen boyadan kaynaklanan organik şok ve şoka bağlı olarak da mikroorganizmaların büyümesinin sınırlanması veya bazı türleri ise baskılanmış olması görülmüştür. Konsantrasyonun MYH'de yer alan mikroorganizmalar için yüksek gelebilme ihtimali göz önünde bulundurularak (Liang ve ark., 2018) boya içeren solüsyon

MYH ortamından alınmıştır. Mikrobiyal elektrokimyasal hücrelerin tekrardan aktivitelerinin artması ve elektrik üretmesi için ortam yaklaşık 12 gün boyunca sadece 1.2 g L⁻¹ glukoz solüsyonu ile aşılanmıştır. Elektrik üretim değeri 0.1 V'un altına düştükçe glukoz solüsyonları alınarak, taze glukoz solüsyonu ile değiştirilmiştir (Catal ve ark., 2018). Daha sonra MYH'lere sırasıyla 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyonlarında Reaktif Sarı 145 boyası içeren solüsyonlar aşılanmıştır. Elde edilen maksimum voltaj, 10 mg L⁻¹ konsantrasyonunda boya içeren solüsyonda 0.11 V olarak bulunmuştur ve sadece glukoz aşılanmış MYH'lere kıyasla elektrik üretiminde %50 oranında azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde, 40 mg L⁻¹ konsantrasyonunda Reaktif Sarı 145 boya ile beslenen MYH'de kıyasla elektrik üretimi ise %57 oranında artmıştır (Chen, B.-Y., 2010). Diğer konsantrasyon olan 20 mg L⁻¹'da ise 0.08 V elektrik üretilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere 20 mg L⁻¹ ve 10 mg L⁻¹ konsantrasyonları fark olmasına rağmen, elektrik üretim performansı açısından önemli bir fark elde edilmemiştir. Kumru ve ark (2012), Reaktif Sarı 145 boyası ile yaptıkları çalışmada MYH'lerde boyanın 80 mg L⁻¹ ve 40 mg L⁻¹ konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Bizim çalışmamızla benzer şekilde konsantrasyonlar arasında yoğunluk farkı olmasına rağmen, elektrik üretim verimleri birbirine oldukça yakındır. Bu da çalışmamızda, MYH'lere farklı konsantrasyonların uygulanmasına rağmen benzer elektrik üretim veriminin alınmasını doğrulamaktadır (Kumru ve ark., 2012; Sen ve ark., 2019).

Reaktif Sarı 145 boyasının MYH'lere uygulanması sonucunda konsantrasyon arttıkça renk giderim oranı da aynı şekilde artarken, elektrik üretim oranı düşmüştür. Şimdiye kadar benzer sonuçlar elde edilen çalışmalarda bu durumun sebebi olarak çeşitli açıklamalar yapılmıştır. Temel sebep olarak boyaların yapısında azo grubunun yanı sıra reaktif gruplarında bulunmasından ötürü elektronlar için çekici hale gelip, kısa sürede bozulmaları gösterilmektedir. Yani MYH'lerde renk giderimi ve elektrik üretimi arasında elektronlar tarafından yaşanan rekabet bulunmaktadır. Dolayısıyla ortamdaki boyaların hızlı tükenmesine paralel olarak, mikroorganizmaların yeterli substrat bulamamasından dolayı elektrik üretimi de azalmış olabilir. Yani renk giderimi ve elektrik üretimi arasında bağlantı bulunduğu sonucuna varılabilmektedir. Onn ve arkadaşlarına göre de, MYH'lerde gözlenen önemli voltaj düşüşleri katotta bulunan azo boyaların eksikliğinden kaynaklanabilmektedir ve azo boyaların bozunma reaksiyonlarının hızları ile ilişkilidir. Bu da çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile paraleldir ve destekler niteliktedir (Oon ve ark., 2017).

Ponceau S boyasında, MYH reaktörlerinde elektrik üretimi 101 gün boyunca iki farklı konsantrasyonda incelenmiştir. MYH'lerde bulunan elektrokimyasal hücreleri ortama adapte etmek ve tekrarlı sonuçlar elde edilmek için 1.2 g L^{-1} konsantrasyonunda glikoz ile beslendi. Elektrik üretimi başladıktan sonra, MYH'ler sadece 1.2 g L^{-1} glikoz ile aşılandığında, maksimum elektrik üretimi 0.24 V olarak hesaplandı. Daha sonra MYH'lere 40 mg L^{-1} konsantrasyonda Ponceau S boyası içeren solüsyonlar aşılandı elektrik üretimi yine yaklaşık olarak 0.24 V olarak hesaplanmıştır. MYH'lere 20 mg L^{-1} konsantrasyonda Ponceau S boya solüsyonu aşılandığında, elektrik üretiminde önemli bir değişiklik olmamıştır. Ek olarak, 20 mg L^{-1} konsantrasyonunda boya ile aşıl原因 MYH'ler, 40 mg L^{-1} ile aşıl原因 MYH'lerden daha kısa sürede elektrik üretim değerini 0.1 V 'un altına düşürdüğü gözlemlenmiştir. Li ve arkadaşları. (2010), tarafından yapılan çalışmada, bir diazo boyası olan Kongo kırmızısının (CR), elektrik üretim performansı karbon kaynağı olarak 1 g L^{-1} glikozun kullanıldığı MYH'lerde araştırılmıştır. MYH'lere uygulanan dış direnç 500Ω 'dur. MYH'ler 100 mg L^{-1} konsantrasyonda hazırlanan CR solüsyonunda 0.36 V üretmiştir. Cao ve arkadaşları. (2010), tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, CR'nin MYH'lerde elektrik üretimi üzerindeki etkisi çeşitli karbon kaynaklarının varlığında araştırılmıştır. Glikoz ile desteklenmiş MYH'lere 300 mg L^{-1} CR uygulandığında, elde edilen maksimum voltaj 500Ω yük ile 0.42 V idi. CR'nin 300 mg L^{-1} 'e çıkarılması, elektrik üretimi 0.33 V 'e düşürmüştür. Glikoz, etanol ve sodyum asetat ile değiştirildiğinde ise yaklaşık 0.38 V elektrik üretilmiştir. Bu sonuçlarla birlikte bizim çalışmamızla paralel olarak Ponceau S gibi diazo boyaların makul bir sınır dâhilinde değişen konsantrasyonlarının elektrik üretimi üzerinde önemli bir etki yaratmadığı sonucuna varılmıştır.

Liang ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada bir monoazo boya çeşidi olan metil turuncusunun MYH'de renk giderimini araştırmışlardır. MYH'ler ilave olarak kullanılan havalandırılmış elektrokimyasal reaktör ile bağlanmıştır. MYH'de anot olarak karbon keçe katotta ise düz karbon kâğıt kullanılmıştır. Sistemde 1000Ω harici direnç uygulanmıştır. Sistem 25 mL anaerobik çamur ile beslenmiştir ve anolit olarak 50 mM fosfat tampon kullanılmıştır. Metil turuncu boyasının renk giderim analizi, için başlangıç konsantrasyonu olarak 50 mg L^{-1} kullanılmıştır ve pH değeri 3.0 olarak ölçülmüştür. Daha sonra sırasıyla $20, 50, 100, 150 \text{ mg L}^{-1}$ konsantrasyonlar ve $1.0, 3.0, 5.0, 7.0 \text{ pH}$ değerleri denenmiştir. Tüm operasyonlar oda sıcaklığında ($22 \text{ }^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilmiştir.

MYH sisteminde destekleyici olarak Fe-C mikro-elektrolizi kullanılmıştır. Renk giderimi maksimum olarak başlangıç konsantrasyonu olan 50 mg L⁻¹'de 180 dakika operasyondan sonra %97 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra 200 mg L⁻¹ 'lik başlangıç MO konsantrasyonunda 150 dakika sonunda renk giderim oranı maksimum %76'a ulaşmıştır. Kontrol grubu olarak sadece MYH'den (Fe-C mikro-elektrolizi kullanılmadan) oluşan sistemlerde ise metil turuncunun renk giderimi %82'e düşerken, sadece Fe-C mikro-elektrolizi ile renk giderimi ise %67 olarak bildirilmiştir. Chen ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada MYH'de *Proteus hauseri* tarafından çeşitli azo boyalarının renk giderimini ve biyoelektrik üretimini araştırmışlardır. Renk giderimi için on farklı boya seçilmiştir. Bunlar Asit Siyah 172 (ABk172), Reaktif Kırmızı 198 (RR198), (3) diazo-boyalar-asit sarı 42 (AY42), Reaktif Mavi 171 (RBu171), Reaktif Siyah 5 (RBk5), Reaktif Mavi 160 (Rbu160), Reaktif Yeşil 19 (RG19), Reaktif Kırmızı 141 (RR141) ve Reaktif Sarı (RY84) ve (4) tetra-azo boya Direkt Siyah 22 (Dbk22)'dir. Anot elektrotu için aktif karbon kumaş kullanılırken, katot olarak politetrafloroetilen (PTFE) kaplı kumaş kullanılmıştır. MYH'lere harici olarak 1 k Ω dış direnç uygulanmıştır. Renk giderim sonuçlarına göre azo içermeyen boya olan RBu198'un %14 oranında renk giderimi gözlemlendiği bildirilmiştir. Monoazo grubunda yer alan ABk172 boyasının ise renk giderimini başarısız olurken, RR198' de %99 oranında gözlenmiştir. Diazo boyalardan AY42 ve tetra azo boya olan DBk22'de renk giderimi gözlemlenememiştir. Bunun yanı sıra maksimum renk giderimi diazo boyaları olan RBk5 ve RBu160'de %97 olarak bildirilmiştir. Biyoelektrik üretimi için seçilen RB160'da 0, 450, 900, 1350, 560 mg L⁻¹ konsantrasyonları denenmiştir. MYH'lerde gözlemlenen sonuçlara göre bizim yaptığımız çalışmayı destekler nitelikte konsantrasyon arttıkça üretilen elektrik miktarı azalmıştır. Konsantrasyonlara göre sırasıyla (0, 450, 900 ve 1350 mg L⁻¹); 245, 197, 152 ve 109 mV elektrik üretimi gözlenmiştir. Sonuçlara göre; renk gideriminde azo boyaların kimyasal yapılarının önemli olduğu saptanmıştır. RBu160 diazo boyası muhtemelen sahip olduğu indirgeyici özelliğinden dolayı biyoelektrik üretim verimi açısından diğer boyaları bastırır. *Proteus hauseri* tarafından MYH'de hem renk giderimi hem de biyoelektrik üretimi gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Saba ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada bir azo boya çeşidi olan reaktif siyah 5 ve reaktif mavi 4 boyalarının MYH'de renk giderimi ve elektrik üretim performansını araştırmışlardır. MYH'ler 22 °C' de kesikli beslemeli olarak çalıştırılmıştır ve ortam besiyeri 24 saatte bir tazelenmiştir. Anot ve katot potansiyelleri 5 dakika da bir kaydedilmiştir. MYH'de üç farklı operasyon tasarlanmıştır.

Operasyonlarda karbon kaynakları, dış dirençler ve boya konsantrasyonları değiştirilmiş ve MYH performansına etkileri araştırılmıştır. Substrat olarak glikoz, maya ve triptonudur. Yapılan çalışmanın sonucuna göre RBL4 boyasının 200 mg L⁻¹ konsantrasyonunda farklı substratlar arasında maksimum renk giderimi 24 saatte %94 oranındadır ve maya ekstratında gözlenmiştir. Khan ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada bir azo boya olan asit lacivert ile aerobik reaktör ve tek odacıklı MYH kullanarak hem elektrik üretimi hem de renk giderimi üzerine çalışmışlardır. Boyanın konsantrasyonları 50, 100, 200 ve 400 ppm olarak belirlenmiştir. MYH ve reaktör, kanalizasyon arıtma tesisinden alınan aktif çamur ve glikoz ile beslenmiştir. Operasyon süresince sıcaklık 27 °C’ de ve pH seviyesi 7.8-8 arasında sabit tutulmuştur. Deney sonuçlarına göre maksimum elektrik üretimi 200 ppm’de 1350 mV olarak belirlenmiştir. Boyanın konsantrasyonlarına (50, 100, 200 ve 400 ppm) göre sırasıyla 900, 950, 1300 ve 800 mV elektrik üretimi gözlenmiştir.

MEH’lere uygulanacak olan boya solüsyonlarının memeli hücre kültüründe hücre canlılığına olan etkisinin araştırılması için insan endotel hücre hattı olan ECV 304 ile MTT analizi yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre Reaktif Sarı 145 boyası hücre canlılığını kontrol grubuna göre %70 oranına düşürmüştür. Ponceau S boyası ise hücre canlılığını kontrol grubuna göre % 120 oranına yükseltmiştir. Buradan yola çıkılarak Reaktif Sarı 145 boyasının memeli hücreleri için azda olsa proliferasyonu azaltıcı etkisi olduğu söylenebilmektedir.

MYH’lere operasyon başlangıcında aşıl原因an Reaktif Sarı 145 boyasının solüsyonuna yapılan spektrum analizinde, maksimum tepe noktası 372 nm ‘de görülmüştür. Bu tepe noktasının azo boyalarda bulunan azo bağlarına ait olduğu düşünülmektedir. Operasyon sonrasında alınan örneklerde ise 283 nm ve 250 nm’de tepe noktaları görülmüştür. Bu tepe noktalarının boyanın bozulması sonucu ortaya çıkan aminlere ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca operasyon öncesi alınan örnekte görülen 372 nm’de ki tepe noktasın, operasyon sonrası alınan örneklerde gözlenmemesine bakılarak boyanın renk gideriminin yapıldığı ve azo bağının mikroorganizmalar tarafından bozulduğu sonucuna varılabilmektedir. MYH’lere operasyon başlangıcında aşıl原因an Ponceau S boyasının solüsyonuna yapılan spektrum analizinde, maksimum tepe noktası 512 nm ‘de görülmüştür. Bu tepe noktasının diazo boyalarda bulunan azo bağlarına ait olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, 355 nm ve 244 nm ‘de tepe noktaları görülmüştür. Bu tepe noktalarının benzen halkasına, aromatik aminlere ve benzer fonksiyonel gruplara ait olduğuna düşünülmektedir. Operasyondan sonra MYH’den

alınan örneklerde, 512 nm'deki tepe noktasının kademeli olarak azaldığı ve 455 nm seviyesine düştüğü gözlenmiştir. Buna göre, Ponceau S boyasının renk değişikliğinin başarılı olduğu görülmüştür. Ayrıca, 285 nm 'de absorbans değeri yaklaşık 1.500 olan tepe noktaları gözlenmiştir. Bu tepe noktalarının, azo bağlarının yarılması nedeniyle ortaya çıkan aromatik aminlere yani 1-amino-2-naftol-6,8-disülfonat ve 1-naftilamin-4-sülfonat gibi yapılara ait olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak MYH'lerden çıkan örneklerin analizinde, boyanın nerdeyse tamamının bozulduğu ve ortaya yeni ara maddelerin çıktığı görülmektedir. Çünkü başlangıçta alınan solüsyonda gözlenen 511 nm 'de ki tepe noktası, çıkış solüsyonlarında nerdeyse tamamen sönümlenmiştir. Zou ve Wang. (2017), Metil Kırmızısı azo boyasının MYH ile renk giderimini araştırdıkları çalışmada, boya solüsyonunun UV spektrofotometre ve GC-MS ile analizini yapmışlardır. Bunun sonucunda elektrokimyasal hücreler tarafından boyanın renk giderimi gerçekleşirken zamana bağlı olarak ortaya çıkan 10 farklı ara madde saptamışlardır. Başlangıçta 432 nm'de saptadıkları maksimum pikin zamana bağlı olarak azaldığını, 228 nm'de ve 254 nm'de ise piklerin zamana bağlı olarak arttığını ve böylece boyanın MYH'de renk gideriminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlarda bizim çalışmamızda elde edilen spektrum tarama ve absorbans sonuçlarını doğrular niteliktedir (Cao., 2010; Oon ve ark., 2017).

Ponceau S boyasının üç farklı konsantrasyonu ile mikrobiyal elektroliz hücrelerinde (MEH) hidrojen üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Kullanılan MEH reaktörlerinin toplam hacmi 15 mL' dir. MEH'lere aşılana konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ 'dir. MEH'ler boya çözeltileri ile aşılana önce 50 mM sodyum asetat trihidrat ile aşılanaştır. MEH reaktörlerinden ikisi deney grubu ve ikisi kontrol grubu olarak seçildi. Deney gruplarına 0.7 V gerilim uygulanırken kontrol gruplarına uygulanmadı. Karbon kaynağı olarak sodyum asetat trihidrat kullanıldı. MEH'ler, boya çözeltisi ile aşılana önce 35 gün boyunca sodyum asetat trihidrat (50 mM) ile beslendi. Hidrojen (H₂) gazı üretimi gözlendikten sonra her gün gaz içerikleri GC-MS ile analiz edildi. Harici bir voltajın (0.7 V) uygulandığı deney grubunda H₂ gazı üretimi gözlenirken, kontrol grubunda H₂ gazı gözlenmemiştir. H₂ ölçümleri için MEH'lerden 1 mL numune alındı . **Sodyum asetat trihidrat (50 mM)** ile toplam H₂ gazı miktarı 35 gün içinde 25 mL olarak ölçülmüştür ve elektrokimyasal hücreler tarafından ilk hidrojen üretimi 1 l. günde gerçekleşmiştir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'ler 25 mL metan (CH₄) gazı ve 10 mL karbondioksit (CO₂) gazı üretmiştir. Kontrol gruplarında

hidrojen üretimi gözlenmemiştir ve sadece 9 mL CO₂ gazı birikmiştir. MEH'lerde hidrojen gazı üretimi gözlendikten sonra, Ponceau S boyası 13 gün boyunca **40 mg L⁻¹** konsantrasyonunda reaktörlere aşılandı. Hidrojen üretimi boya solüsyonunun aşılmasından sonra 13. günün sonunda gerçekleşmiştir ve üretilen toplam H₂ miktarı 1 mL' dir. Bununla birlikte MEH'lerde metan (CH₄) gazı üretimi gözlenmemiştir. Üretilen karbondioksit (CO₂) gazı miktarı ise 4.5 mL' dir. Kontrollerde hidrojen gazı ve metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 4 mL CO₂ gazı birikti.

Ponceau S boyasının **10 mg L⁻¹** konsantrasyonunda hazırlanan solüsyonu, MEH'lere 15 gün boyunca aşılandı. Boya aşılmasından sonra ilk H₂ gazı 7. günde gelmiştir ve 15. günün sonunda üretilen toplam H₂ miktarı 6 mL' dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'lerde, 8 mL metan (CH₄) gazı üretimi gözlendi. Üretilen karbondioksit (CO₂) gazı miktarı ise 12 mL'dir. Kontrol gruplarında hidrojen gazı ve metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 14 mL CO₂ gazı birikti. Ponceau S boyası, MEH'lere 22 gün boyunca **20 mg L⁻¹** konsantrasyonunda aşılandı. Boya aşılmasından sonraki ilk H₂ üretimi 7. günde gerçekleşmiştir ve 22. günün sonunda üretilen toplam H₂ miktarı 18 mL' dir. Hidrojen gazı ile birlikte MEH'ler de 1 mL metan (CH₄) gazı ve 4 mL karbondioksit (CO₂) gazı üretti. Kontrol gruplarında ise hidrojen gazı ve metan gazı üretimi gözlenmedi ve sadece 16 mL CO₂ gazı birikmiştir. MEH'lerde 50 mM sodyum asetat trihidrat ve 10 mg L konsantrasyonlarda H₂ üretimi ile birlikte CH₄ üretimi gözlenmiştir ve nerdeyse H₂ üretimi ile aynı oranlarda gerçekleşmiştir. Fakat 40 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyonlarında CH₄ üretimi baskılanmıştır. Hu ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada MEH'lerde substrat olarak asetat kullanıldığı zaman ortamda elektrokimyasal hücreler ve metanojen bakteriler arasında rekabetten dolayı katotta hidrojen üretiminin veya metan üretiminin baskılanabileceği sonucuna varmışlardır. 50 mM asetat varlığında önce CH₄ sonra H₂ gazları üretilmiştir. 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda ise sadece 1 mL H₂ üretilmiştir, CH₄ ise hiç üretilmemiştir. Buradan anlaşılabileceği üzere asetat MEH'lerde em elektrokimyasal hücreler hemde metanojen bakteriler için uygun bir substrattır ve rekabet olmasına rağmen iki tür hücrede başarılı bir şekilde üretim gerçekleştirebilmiştir. Fakat 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda Ponceau S boyasının varlığı ortamda bulunan hem elektrokimyasal hem de metanojenler için toksik gelmiştir ve her iki türde aktivite gösterememiş ve ürün üretememiştir. 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda ise H₂ üretim miktarı 18 mL iken CH₄ miktarı ise 1 mL'dir. Buradan yola çıkılarak 20 mg L⁻¹ 'de anotta yer alan elektrokimyasal hücrelerin metanojenlere baskın geldiği ve böylelikle H₂ üretimi

maksimum iken CH₄ üretimi ise baskılanmıştır. MEH'lerden operasyon öncesi ve sonrası alınan örneklerin pH analizi yapıldığında fermantasyon süreçlerine bağlı olarak pH değerinin 7'den 7.5'e çıktığı görülmüştür. Deneylerde metanın baskılanmasının bir diğer nedeni olarak da artan pH değeri olabileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalara göre metanojen bakterilerin üretim yapabilmeleri için ideal koşulların nötr pH değeri olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002; Van Hamme ve Lettinga., 1994).

MEH'lerde incelenen diğer konu ise Ponceau S boyasının hidrojen üretimi ile eş zamanlı olarak gerçekleştirdiği renk giderim verimidir. MEH'lerden operasyon öncesi ve sonrası alınan örneklerin absorban ölçümlerine göre yapılan hesaplama göre 40 mg L⁻¹ konsantrasyonda ki boyanın renk giderim oranı %85.43 ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda ki boyanın renk giderim oranı ise %96.80 olarak belirlenmiştir. Maksimum renk giderim oranı ise en düşük konsantrasyon olan 10 mg L⁻¹ de %118 olarak belirlenmiştir. MEH'lerde MYH'lerin aksine konsantrasyon azaldıkça renk giderim oranı artmıştır. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak uygun değerde hidrojen üretim miktarı 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda 18 mL olarak saptanırken, optimum dekarboxilasyon değeri olarak %118 ile 10 mg L⁻¹ konsantrasyonu saptanmıştır. Hidrojen üretiminin konsantrasyonla ilişkisine bakıldığı zaman MEH'de yer alan mikroorganizmaların ortama alışmasına paralel olarak maksimum üretimin en son uygulama dozu olan 20 mg L⁻¹ 'de görülmesine yol açmış olabilir. Bunun yanı sıra 40 mg L⁻¹ konsantrasyonu ise mikroorganizmalar için toksik etki oluşturmuş olabilir. Hou ve arkadaşları. (2017), tarafından yapılan bir çalışmada MEH'lerde farklı konsantrasyonlara sahip olan azo boyalardan metil turuncusunun hidrojen üretimi ile eş zamanlı olarak renk giderim verimi araştırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen veriler ile izim çalışmamızda elde edilen sonuçlar birbirlerini destekler niteliktedir. Bu çalışmada da konsantrasyon arttıkça MEH'lerde renk giderim oranı azalmıştır. Boya konsantrasyonu 50 mg L⁻¹ den 300 mg L⁻¹ 'e yükseltildiğinde 12 saat içinde renk giderim oranının %98'den %76'ya düştüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra hidrojen üretimi ise 50 mg L⁻¹ de 113 mL iken, 300 mg L⁻¹ de 68 mL olarak bildirilmiştir. Valdez-Vazquez ve ark. (2020), tarafından yapılan çalışmada fermentatif bakteriler kullanarak MEH'lerde denim boyası olan indigo boyasının renk giderimi ile eş zamanlı olarak hidrojen üretim verimliliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen hidrojen üretim miktarı ile bizim çalışmamızda elde edilen hidrojen üretimini birbirlerine yakın ve 23 mL olarak bildirilmiştir. Çalışmalarında Li ve ark. (2016), renklendirme performanslarının daha önce bildirildiği mikrobiyal yakıt hücrelerine

(MYH) ek olarak performansı arttırmak için MYH-MEH ile bütünleşmiş bir sistem oluşturmuş ve çeşitli faktörlerin reaktör performansı üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Sonuçlara göre, karbon kaynağı olarak asetat kullanan kombine MFC-MEC sistemlerinin renklenme oranının, tek MYH'e kıyasla bir iyileşme gösterdiği bildirilmektedir. Yalnız MYH kullanılan operasyonda %37 renk giderim oranı elde edilirken MEH ile birleştirilmiş sistemde %75'lik oran elde edilmiştir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sanayileşmenin, özellikle tekstil ürünlerinde tüketimlerin hızlı bir şekilde artmasıyla birlikte sanayi atıkları gibi küresel bir çevre kirliliği sorunu ortaya çıkmıştır. Tekstil endüstrisinde kullanılan boyar maddeler ve yan ürünleri kirleticilerin en başında gelmektedir. Son yıllarda, toksik/toksik olmayan organik bileşikler dolaylı veya doğrudan çevreye salınmaktadır. Sulak alanlar bu atıkların en fazla etkilendiği habitatlardır ve bizlere renk değişimi, kötü koku oluşumu gibi belirtiler vermektedirler. Tekstil atıklarında en çok bulunan boya maddeleri, aromatik aminler içeren azo boyalarıdır. Çalışmamızda kullanılan Reaktif Sarı 145 boyası, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve düşük biyodegradasyona sahip aromatik bir monoazo boyadır. Ponceau S ise açık kırmızı renkte bir diazo boyadır. Ponceau S, PVDF ve nitroselüloz membranlar üzerindeki proteinlerin saptanması için kullanılır. Boyar maddelerin yanı sıra, böcek ilaçları, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ilaç atıkları ve ağır metaller de çevresel kirlilikte rol alan ana atıklar olarak gösterilmektedir. Ülkemiz başta olmak üzere, Dünya genelinde azalan su kaynaklarını geri kazanmak ve ekolojik dengeyi korumak için acil olarak atık su arıtımı konusunda çalışmalar yapılması gerekmektedir. Günümüzde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere çeşitli arıtım yöntemleri denenmektedir. Fakat her birinde ekonomik, fiziksel ve çevresel olarak farklı farklı sorunlar yaşanmaktadır. Dolayısıyla alternatif olarak çevre dostu, ekonomik ve yenilenebilir bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Önerilen ve üzerine çalışılan alternatif yöntemlerin başında mikrobiyal yakıt hücreleri ve mikrobiyal elektroliz hücreleri gelmektedir.

MYH'ler ve MEH'ler aslında mikroorganizmalar yardımı ile biyolojik arıtım yapabilen aynı zamanda da elektrik, hidrojen ve metan gibi çeşitli enerji kaynakları üretebilen biyoteknolojik araçlardır. MYH'ler biyofilmleri ile azo boya renksizleştirmede yeni bir yaklaşım sağlayabilir, aynı zamanda elektrik ve hidrojen enerjisi üretimi de gerçekleştirebilirler. MEH'ler ise azo boylarının renk giderimini yaparken aynı zamanda hidrojen gazı üreterek, alternatif bir enerji kaynağı olabilirler. Buradan yola çıkılarak

alışmamamızda Reaktif Sarı 145 ve Ponceau S gibi azo boyaların tek odacıklı mikrobiyal yakıt hücrelerinde (MYH) elektrik üretimi üzerindeki etkileri renk giderim verimlilikleriyle birlikte incelenmiştir. Ayrıca, pH değęerlerindeki değışiklikler, KOİ analizi, saatlik renk giderim oranı, boya absorbans spektrumları, hesaplamalı kimya yöntemleri ile renk giderim mekanizması, sitotoksite etkileri ve mikrobiyal elektroliz hücrelerinde (MEH) hidrojen üretim verimleri araştırılmıştır.

MYH'lere sırasıyla 40 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyona sahip Reaktif Sarı 145 boyası ve 40 mg L⁻¹ ve 20 mg L⁻¹ konsantrasyona sahip Ponceau S boyası verildi. Test edilen azo boyaların varlığında elektrik üretimi ile eş zamanlı olarak renk giderimi de gerçekleştirildi. Ancak 40 mg L⁻¹ konsantrasyonunda Reaktif Sarı 145 kullanılarak MYH işlemlerinde voltaj üretimi hızla azaldı. Buradan yola çıkılarak MYH'lerin geliştirilerek yüksek konsantrasyonlarda atık boya için biyosensör olarak kullanılabilirliği araştırılabilir. Renk giderim işleminde %80 üzerinde bir oran elde edilmiştir. Dolayısıyla reaktörlerin hacimleri büyütölerek geniş ölçekte reaktif boyaların arıtımında kullanılabilirler. MEH'ler de ise Ponceau S boyası ile hidrojen üretimi başarı ile gerçekleştirildi. Özellikle 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda maksimum hidrojen üretimi gözlenirken metan üretimi ise baskılanmıştır. Sonuç olarak, mikrobiyal elektrokimyasal hücreler kullanılarak, tekstil azo boya maddelerinin varlığında elektrik ve hidrojen üretiminin gerçekleştirilebileceği ve boya giderimlerinin sağlanabileceği kanısına varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Abrahart, E. N., (1977). Dyes and their Intermediates (2nd ed.). New York: Chemical Publishing, 1–12.
2. Adams, M.W., Stiefel, E.I. (1998). Biological hydrogen production: Not so elementary. *American Association for the Advancement of Science*, 282 (5395), 1842–1843.
3. Aksu, Z. and Cagatay, S.S. (2006), Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch ve continuous systems, *Separation and Purification Technology*, (48), 24–35.
4. Aksu, Z., Çağatay, Ş. Ş. (2006). Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems, *Separation and Purification Technology*, (48), 24- 35.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, (Fourth Edition), *Garland Science*.
6. Al-Kdasi, A., Idris, A., Saed, K., Guan, C. T. (2004). Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes. *Global Nest Journal*, (6) , 222-230.
7. Angioni, S., Millia, L., Bruni, G., Tealdi, C., Mustarelli, P., Quartarone, E. (2016). Improving the performances of Nafion based membranes for microbial fuel cells with silica-based, organically-functionalized mesostructured fillers, *Journal of Power Sources*, (334), 120-127.
8. Anjaneyulu, Y., Sreedhara, N., Samuel S.R., D. (2005). Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging Technologies, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, (4), 245–273.
9. Antoniotti, S., Duñach, E. (2002). Direct and catalytic synthesis of quinoxaline derivatives from epoxides and ene-1, 2-diamines, *Tetrahedron Lett*, (22), 3971-3973.
10. Aryal, M., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2015). Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. *Environmental Monitoring and Assessment*.
11. Asamudo, N. U., Daba, A. S., Ezeronye, O. U. (2005). Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. *African Journal of Biotechnology*, 4(13), 1548-1553.
12. Asma, B. (2012). La faisabilité d ' élimination de certains coloEturants textiles par certains matériaux déchets d ' origine naturelle. Mémoire de Master.

13. Aspland JR (1997). *Textile Dyeing and Coloration*. Research Triangle Park: Association of Textile Chemists and Colorists. 3–310.
14. Aspland, J. R. (1997). *Textile Dyeing and Coloration*, (1st), American Association of Textile Chemists and Colorists, 151.
15. Atasever-Arslan, B., Akdoğan, E., Çakmak-Cebeci, F., Catal, T. (2020). Bioelectricity generation using human neuronal-like cells in single chamber biofuel cells. *Journal of Cleaner Production*, (271), 122505.
16. Azzopardi, B. (2017). *Sustainable Development in Energy Systems*, (1st.), Springer International Publishing.
17. Bahl, H., Durre, P. (2001). *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
18. Baker, J.R. (1958). *Principles of biological microtechnique; a study of fixation and dyeing*, Methuen, Wiley.
19. Barnett, J. C. (2007). Synthetic organic dyes, 1856–1901: an introductory literature review of their use and related issues in textile conservation. *Journal of Studies in Conservation*, (52), 67–77.
20. Barua, P.K., Deka, D. (2010). Electricity Generation from Biowaste Based Microbial Fuel Cells, *International Journal of Energy, Information and Communications*, 1;(1), 77–92.
21. Başer, İ. ve İnancı, Y. (1990), Boyarmadde Kimyası, *Marmara Üniversitesi Basımevi*, (482), 214–216.
22. Baudler, A., Riedl, S., Schröder, U. (2014). Long-term performance of primary and secondary electroactive biofilms using layered corrugated carbon electrodes. *Frontiers in Energy Research*.
23. Benkhaya, S. and El Harfi, A. (2017). Classifications, properties and applications of textile dyes: a review. *Applied Journal of Environmental Engineering Science*, (3), 311-320.
24. Benkhaya, S., Cherkaouib, O., Assouag, M., Mrabetd, C.S., Rafika, M., EL Harfi, A. (2016). Synthesis of a New Asymmetric Composite Membrane with Bi-Component Collodion: Application in the Ultra filtration of Baths of Reagent Dyes of Fabric Rinsing/Padding, *Journal of Materials and Environmental Science*, (12), 4556-4569.

25. Bermek, H., Catal, T., Akan., S. S., Ulutaş, M. S., Kumru, M., Özgüven, M., Liu, H., Özçelik, B., Akarsubaşı, A. T. (2013). Olive mill wastewater treatment in microbial fuel cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1177-1185.
26. Blumel, S., Knackmuss, H.J., Stolz, A. (2002). Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (68), 3948-3955.
27. Blumel, S., Stolz, A. (2003). Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (62), 186-190.
28. Bockris, J.O. (1981). The economics of hydrogen as a fuel, *International Journal of Hydrogen Energy*, (6), 223-241.
29. Bond, D. R. and Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes, *Applied and Environmental Microbiology*, 1548-1555.
30. Bras, R., Ferra, I.A., Pinheiro, H.M., Goncalves, I.C. (2001). Batch tests for assessing decolorization of azo dyes by methanogenic and mixed cultures, *Journal of Biotechnology*, (89), 155–162.
31. Broadbent, A.D. (2001). Basic principles of textile coloration, *Society of Dyers and Colourists*, 1-13.
32. Cao, Y., Hu, Y., Sun, J., Hou, B. (2010). Explore various co-substrates for simultaneous electricity generation and Congo red degradation in air-cathode single-chamber microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry*, 79;(1), 71–76.
33. Catal, T , Bermek, H , Liu, H. (2009). Removal of selenite from wastewater using microbial fuel cells. *İTÜ Dergisi*, (31), 1211–1216.
34. Catal, T , Fan, Y , Li, K , Bermek, H , Liu, H. (2011). Utilization of mixed monosaccharides for power generation in microbial fuel cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(4), 570-574.
35. Catal, T , Gover, T , Yaman, B , Droguetti, J , Yılancıoğlu, K. (2017). Hydrogen production profiles using furans in microbial electrolysis cells. *World J Microbiol Biotechnol*, 33(6), 115.
36. Catal, T , Lesnik, K. L , Liu, H. (2015). Suppression of methanogenesis for hydrogen production in single-chamber microbial electrolysis cells using various antibiotics. *Bioresource Technology*, (187), 77–83.

37. Catal, T , Liu, H , Fan, Y , Bermek, H. (2018b). A clean technology to convert sucrose and lignocellulose in microbial electrochemical cells into electricity and hydrogen. *Bioresource Technology*, (5), 331-334.
38. Catal, T., Kul, A., Atalay, V. E., Bermek, H., Ozilhan, S., Tarhan, N. (2019). Efficacy of microbial fuel cells for sensing of cocaine metabolites in urine-based wastewater. *Journal of Power Sources*, (414), 1–7.
39. Catal, T., Xu, S., Li, K., Bermek, H., Liu, H. (2008). Electricity generation from polyalcohols in single-chamber microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 849-854.
40. Cebecioglu, R., Yildirim, M., Akagunduz, D., Korkmaz, I., Tekin, H. O., Atasever-Arslan, B., Catal, T., (2019). Synergistic effects of quercetin and selenium on oxidative stress in endometrial adenocarcinoma cells. *Bratislava Medical Journal*, 120(06), 449–455.
41. Chacko J.T. and Subramaniam, K. (2011). Enzymatic degradation of azo dyes, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1(6):1250.
42. Chandanshive, V. V., Kadam, S. K., Khandare, R. V., Kurade, M. B., Jeon, B. H., Jadhav, J. P., Govindwar, S. P. (2018). In situ phytoremediation of dyes from textile wastewater using garden ornamental plants, effect on soil quality and plant growth, *Chemosphere*, (9), 968-976.
43. Chang, I. S., Moon, H., Jang, J. K., Kim, B. H. (2005). Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors, *Biosensors and Bioelectronics*, (20), 1856-1859.
44. Chang, J. S., Kuo, T. S. (2000). Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresource Technology*, (57), 107-111.
45. Chang, J. S., Chen, B. Y., & Lin, Y. S. (2004). Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3, *Bioresource Technology*, 1(3):243-248.
46. Chang, J. S., Kuo, T. S. (2000). Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresource Technology*, 75(2):107-111.
47. Chang, J. S., Kuo, T. S., Chao, Y. P., Ho, J. Y., Lin, P. J. (2000). Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnology Letters*, (22), 807-812.

48. Chen, B. Y. (2006). Toxicity Assessment of Aromatic Amines to *Pseudomonas luteola*: Chemostat Pulse Technique and Dose-response Analysis, *Process Biochem*, 7;(41), 1529 -1538.
49. Chen, B.Y. (2002). Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics, *Process Biochem* , (38), 437-446.
50. Chen, B.-Y., Zhang, M.-M., Chang, C.-T., Ding, Y., Lin, K.-L., Chiou, C.-S., Xu, H. (2010). Assessment upon azo dye decolorization and bioelectricity generation by *Proteus hauseri*. *Bioresource Technology*, 101(12), 4737–4741.
51. Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J., Hwang, S.C. (2003). Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains, *Journal of Biotechnolgy*, (1), 57-68.
52. Chen, C.C., Lin, C.Y., Lin, M.C. (2002). Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (2), 224-228.
53. Cheng, S. and Logan, B. E. (2007). Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells, *Electrochemistry Communications*, 3;(9), 492-496.
54. Cheng, S., Logan, B. E. (2011). High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. *Bioresource Technology*, (102), 3571-3574.
55. Chinrelkitvanich, S., Tuntoolvest M., Panswad, T. (2000). *Water Research*, (43), 2223–2232.
56. Chung, K.T. (1983). The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes, *Mutation Res*, (114), 269-281.
57. Chung, K.T. and Cerniglia, C. E. (1992). Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(3), 201–220.
58. Chung, K.T., Fulk, G.E., Andrews, A.W. (1978a). The mutagenicity of methyl orange and metabolite produced by intestinal anaerobes, *Mutation Res*, (58), 375-379.
59. Chung, K.-T., Fulk, G.E., Egan, M. (1978b). Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes, *Appl. Environ. Microbiol*, (35), 558-562.
60. Clark, M. (2011). Fundamental principles of dyeing, *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*, 1st Edition, *Woodhead Publishing*.

61. Cohen, B. (1931). The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell, *Journal of Bacteriology*, (21), 18-19.
62. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, (49), 711-745.
63. Crini, G., Lichtfouse, E. (2019). Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*.
64. Czuppon, T.A., Knez, S.A., Newsome, D.S. (1996). Othmer encyclopedia of chemical technology. New York: Wiley, 884.
65. Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A. R., Pourhassan, M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technology*, 98(6), 1176-82.
66. Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A. R., Pourhassan, M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technology*, 8(6):1176-1182.
67. Davies, L.C., Cabrita, G.J.M., Ferreira, R.A., Carias, C.C., Novais, J. M., and Martins-Dias, S. (2009). Integrated study of the role of *Phragmites australis* in azo-dye treatment in a constructed wetland: From pilot to molecular scale, *Ecol. Eng*, 35(6): 961–970.
68. Demiralp B, Büyük İ, Aras S, Cansaran-Duman D. (2015). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı, *Türk Hij Den Biyol Derg*, 72;(4), 351-68.
69. Dixit, S., Garg, S. (2018). Biodegradation of Environmentally Hazardous Azo Dyes and Aromatic Amines Using *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Environmental Engineering*.
70. Du, Z. ve Li, H., Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy, [*Biotechnology Advances*](#), (25), 464–482.
71. Du, Z., Li, H., Gu, T., (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnology Advances*, (25), 464-482.
72. El-Deab, M.S., El-Shakre, M.E., El-Anadouli, B.E., Ateya, B.G. (1996). Electrolytic generation of hydrogen on Pt-loaded porous graphite electrodes from flowing alkaline solutions, *Journal of Applied Electrochemistry*, (11), 1133-1137.

73. Elshaarawy, R.F., Sayed, T.M., Khalifa, H.M., El-Sawi, E.A. (2017). Mild and convenient protocol for the conversion of toxic acid red 37 into pharmacological (antibiotic and anticancer) nominees: organopalladium architectures, *Computational Rendus Chem*, (20), 934–941.
74. Fessenden, R. J. and Fessenden, J.S. (1990). Organic Chemistry, 4th ed. *Brooks/Cole Publishing Company*.
75. Fontecilla-Camps, J.C., Volbeda, A., Cavazza, C., Nicolet, Y. (2007). Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Reviews*, (10), 4273–4303.
76. Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G. (2004). Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: A Review, *Environ. Int.*, (30), 953.
77. Fu, L., Wen, X., Lu, Q., Qian, Y. (2001). Treatment of dyeing wastewater in two SBR systems. *Process Biochemistry*, (36):1111–1118.
78. Gajda, I., Greenman, J., Melhuish, C., Santoro, C., Li, B., Cristiani, P., Ieropoulos, I. (2014). Water formation at the cathode and sodium recovery using Microbial Fuel Cells (MFCs). *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, (7), 187-194.
79. Gajda, I., Greenman, J., Melhuish, C., Santoro, C., Li, B., Cristiani, P., Ieropoulos I. (1998). *Int J Hydrogen Energy*, (23), 593-598.
80. Ganesh, R., Boardman, G.D., Michelson, D. (1994). Fate of azo dyes in sludges, *Water Research*, (28), 1367-1376.
81. Gen, N. (2009). Biyolojik hidrojen üretim prosesleri. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(2), 17–36.
82. Ghangrekar, M.M., Shinde, V.B., (2007). Performance of membrane-less microbial fuel cell treating wastewater and effect of electrode distance and area on electricity production, *Bioresource Technology*, (98): 2879-2885.
83. Ghodake, G. S., Telke, ., A. A., Jadhav, J. P., Govindwar, S. P. (2009). Potential of Brssica juncea in Order to Treat Textile Effluent Contaminated Sites, *Int. J. Phytoreme*, (11), 1.
84. Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, P., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story, *Cellular and Molecular Life*, (67), 369–385.
85. Gibson, D.T., Subramanian, V. (1984) Microbial Degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, DT (Ed) Microbial Degradation of Organic Compounds, 361–369, *Marcel Dekker*.

86. Gingell, R., Walker, R. (1971). Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins, *Xenobiotica*, (1), 231-239.
87. Guan, .Z.B., Song, C.M., Zhang, N. (2014). Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (101):1–6.
88. Guo, K., Soeriyadi, A. H., Patil, S. A., PrévotEAU, A., Freguia, S., Gooding, J. J., Rabaey, K. (2015). Surfactant treatment of carbon felt enhances anodic microbial electrocatalysis in bioelectrochemical systems. *Electrochemistry Communications*, (33), 149-156
89. Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carre, H., Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, (19), 10660-10673.
90. Gurr E. (1971). Synthetic Dyes in Biology, Medicine And Chemistry, *Elsevier*.
91. Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K., Gürses, M. S., (2016). Classification of Dye and Pigments, *Springer*, Cham, 31–45.
92. Harnisch, F. and Schroeder, U. (2011). ChemInform Abstract: From MFC to MXC: Chemical and Biological Cathodes and Their Potential for Microbial Bioelectrochemical Systems, *ChemInform*, (39), 4433-4448.
93. Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 172-184.
94. Heider, J., Fuchs, G. (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*,
95. Hernández-Mendoza, C. E., Buitrón, G. (2014). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89;(1), 143-149.
96. Hitz, H.R., Huber, W., Reed, R.H. (1978). *JCDC*, (94), 71–76.
97. Honda, R., Fukushi, K., Yamamoto, K., (2006). Optimization of wastewater feeding for single-cell protein production in an anaerobic wastewater treatment process utilizing purple non-sulfur bacteria in mixed culture condition. *Journal of. Biotechnol*, (125), 565-573.

98. Horobin, R.W. (1982) *Histochemistry: an Explanatory Outline of Histochemistry and Biophysical Staining*. Gustav Fischer, Stuttgart.
99. Hou, B., Hu, Y., Sun, J. (2012). Performance and microbial diversity of microbial fuel cells coupled with different cathode types during simultaneous azo dye decolorization and electricity generation. *Bioresource Technology*, (111), 105–110.
100. Hsu, C. A., Wen, T. N., Su, Y. C., Jiang, Z. B., Chen, C. W., Shyur, L. F. (2012). Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp., *Environmental Science and Technology*.
101. Hsueh, C. C., Chen, B. Y., Yen, C. Y. (2009). Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Hazardous Materials*, (167), 995-1001.
102. Hu, H., Fan, Y., Liu, H. (2008). Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Water Research*, 42(15), 4172–4178.
103. Hubenova, Y., Mitov, M. (2015). Enhanced metabolic and redox activity of vascular aquatic plant *Lemna valdiviana* under polarization in Direct Photosynthetic Plant Fuel Cell. *Bioelectrochemistry*, (106), 177-85.
104. Hunger, K.(2003). *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*, Weinheim: Wiley-VCH.
105. Jeremiasse, A. W., Hamelers, H. V. M., Saakes, M., Buisman, C. J. N. (2010). Ni foam cathode enables high volumetric H₂ production in a microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, (35), 12716–12723.
106. Jones, D.T., Woods, D.R. (1986). Acetone–butanol fermentation revisited, *Microbiol Reviews*, 50 (4), 484-524.
107. Joshni, T., Subramaniam, K. (2011). Enzymatic Degradation of Azo Dyes -A Review. *International Journal of Environmental Sciences*,(1),6.
108. Kadier, A., Simayi, Y., Abdeslahian, P., Azman, N. F., Chandrasekhar, K., Kalil, M. S. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production, *Alexandria Engineering Journal*, 55(1), 427–443.
109. Kadier, A., Simayi, Y., Abdeslahian, P., Azman, N.F., Chandrasekhar, K., Kalil, M.S., 2016. A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production, *Alexandria Engineering Journal*,

110. Kagalkar, A. N., Jagtap, U. B., Jadhav, J. P., Bapat, V. A., Govindwar, S. P. (2009). Biotechnological strategies for phytoremediation of the sulfonated azo dye Direct Red 5B using *Blumea malcolmii* Hook. *Bioresource Technology*, (100), 4104.
111. Kalyani, D., Dhiman, S. S., Kim, H., Jeya, M., Kim, I. W., Lee, J. K. (2012). Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass, *Process Biochemistry*, 47(4), 671–678.
112. Kalyani, D., Dhiman, S. S., Kim, H., Jeya, M., Kim, I. W., Lee, J. K. (2012). Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass, *Process Biochemistry*, (47), 671-678.
113. Keck, A., Klein, J., Kundlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H.J., Mattes, R. (1997). Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6, *Applied and Environmental Microbiology*, (63), 3684–3690.
114. Kemker, C. (2014). Turbidity, total suspended solids and water clarity. Fundamentals of Environmental Measurements, *Fondriest Environmental*, Inc.13.
115. Khan, M. D., Abdulateif, H., Ismail, I. M., Sabir, S., Khan, M. Z. (2015). Bioelectricity Generation and Bioremediation of an Azo-Dye in a Microbial Fuel Cell Coupled Activated Sludge Process. *PLOS ONE*, 10(10), e0138448.
116. Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., Chimni, S.S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortia, *Dyes and Pigments*, (67), 55-61.
117. Kiernan, J. (2001). Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(5-6), 261–278.
118. Kim, J.R., Jung, S.H., Regan, J.M. and Logan, B.E. (2007~) Electricity generation and microbial community analysis of ethanol powered microbial fuel cells, *Bioresource Technol.* 98(13).
119. Kim, J.S., Ito, K., Takahashi, H. (1981). Production of molecular hydrogen by *Rhodospseudomonas* sp, *Journal Fermentation Technology*, (59), 185-190.
120. Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Friedrich B. (2000). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclasses of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J. Bacteriol*, (182), 2716-2724.

121. Koku, H., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, (27), 1315-1329.
122. Kudlich, M., Keck, A., Klein, J., Stolz, A. (1997). Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye Reduction, *Applied and Environmental Microbiology*.
123. Kulla, H.G., Klausener, F.O., Meyer, B., Ludeke, T. (1983). Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes orange I and orange II, *Archives of Microbiology*, (135), 1-7.
124. Kumar, K. V., Ramamurthi, V. and Sivanesan, S. (2006). Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora* sp., a fresh water algae, *Dyes Pigments*, (69), 102-107.
125. Kumar, K., Dastidar, M., G., Sreekrishnan, T., R., (2009). Effect of process parameters on aerobic decolourization of reactive azo dye using mixed culture, World Academy of Science, *Engineering and Technology*, (58), 962-965.
126. Lade, H. S., Waghmode, T. R., Kadam, A. A., Govindwar, S. P. (2012). Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, (100) 2493–2500.
127. Lade, H. S., Waghmode, T. R., Kadam, A. A., Govindwar, S. P. (2012). Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 100(9), 2493-500.
128. Laurent, A. D., Wathelet, V., Bouhy, M., Jacquemin, D., Perpète, E. (2010), Simulation de la perception des couleurs de colorants organiques, *Techniques de l'Ingénieur*, (6810), 3-4 .
129. Lee, D.Y., Ebie, Y., Xu, K.Q., Li, Y.Y., Inamori, Y., 2010a. Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge, *Bioresource Technology*, (101), 42-47.
130. Leriche G., Budin G., Brino L., Wagner A.(2010). Optimization of the azobenzene scaffold for reductive cleavage by dithionite; development of an azobenzene cleavable linker for proteomic applications, *European Journal of Organic Chemistry*, 4360–4364.

131. Levine, W. G. (1991). Metabolism of AZO dyes: Implication for detoxication and activation, *Drug Metabolism Reviews*, 23(3-4), 253-309.
132. Li, M., Zhou, M., Tian, X., Tan, C., McDaniel, C. T., Hassett, D. J., & Gu, T. (2018). Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity, *Biotechnology Advances*, 36(4), 1316–1327.
133. Liang, S., Zhang, B., Shi, J., Wang, T., Zhang, L., Wang, Z., Chen, C. (2018). Improved decolorization of dye wastewater in an electrochemical system powered by microbial fuel cells and intensified by micro-electrolysis, *Bioelectrochemistry*, (124), 112–118.
134. Lienhart, Wolf-Dieter; Gudipati, Venugopal; Macheroux, Peter (2013). The human flavoproteome, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (2), 150–162. .
135. Liu, H. and Logan, B.E. (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane, *Environmental Science & Technology*, (14), 4040-4046.
136. Liu, H. and Ramnarayanan, R. and Logan, B. E. (2014). Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, (7), 2281-2285.
137. Liu, H., Grot, S., Logan, B.E., (2005). Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate, *Environmental Science & Technology*, (39), 4317–4320.
138. Liu, M., Yuan, Y., Zhang, L., Zhuang, L., Zhou, S., Ni, J., (2010). Bioelectricity Generation by a Gram-Positive *Corynebacterium* sp. Strain MFCO3 under Alkaline Condition in Microbial Fuel Cells, *Bioresource Technology*, (101), 1807– 1811.
139. Logan, B. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nature Reviews Microbiology*, (7), 375–381.
140. Logan, B. E. ve Regan, J. M. (2006). Microbial Fuel Cells Challenges and Applications, *Environmental Science & Technology*, (40), 5172-5180.
141. Logan, B. E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H. V. M., Sleutels, T. H. J. A., Jeremiasse, A. W., Rozendal, R. A. (2008). Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, *Environmental Science and Technology*, (23), 8630–8640.
142. Logan, B.E., (2008). Microbial Fuel Cells, *John Wiley& Sons*, New York.

143. Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V., Sleutels, T.H., Jeremiasse, A.W., Rozendal, R.A. (2008). Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, *Environmental Science & Technology*, (42), 8630–8640.
144. Lu, X., Liu, R. (2010). Treatment of Azo Dye-Containing Wastewater Using Integrated Processes, (9), 133-155.
145. Machado, K.M.G., Compart, L.C.A., Morais, R.O., Rosa, L.H., Santos, M.H. (2006). Biodegradation of Reactive Textile Dyes by Basidiomycetous Fungi from Brazilian, *Journal of Microbiology*, (37), 481.
146. Manish, S., Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, (33), 279-286.
147. Mann, G. (1902) Physiological Histology. Methods and Theory, *Clarendon Press*.
148. Mathuriya, A. S., Sharma, V. N. (2009). Bioelectricity production by *saccharomyces cerevisiae* from sugar industry waste using microbial fuel cell technology. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 1(2),49-52.
149. Meerbergen, K., Willems, K. A., Dewil, R., Van Impe, J., Appels, L., Lievens, B. (2018). Isolation and screening of bacterial isolates from wastewater treatment plants to decolorize azo dyes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (20), 46-53.
150. Merino, E., Ribagorda, M. (2012). Control over molecular motion using the cis–trans photoisomerization of the azo group, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, (8), 1071–1090.
151. Meyer, J. (2007). [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Science*, (64), 1063-1084.
152. Miyake, J. (1990). Application of photosynthetic systems for energy conversion, *Hydrogen energy progress*, 8th, Pergamon Press, 755–64.
153. Morris, P. J.T., Travis, A. S. (1992). A History Of The International Dyestuff Industry, *Colour Index*, (81),11.
154. Mudhoo, A., Torres-Mayanga, P. C., Forster-Carneiro, T., Sivagurunathan, P., Kumar, G., Komilis, D., Sánchez, A. (2018). A review of research trends in the enhancement of biomass-to-hydrogen conversion. *Waste Management*, (79), 580-594.
155. Mustakeem. (2015). Electrode materials for microbial fuel cells: Nanomaterial approach. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*.
156. Myslak, Z.W., Bolt, H.M., Brockmann, W., (1991). *American Journal of Industrial Medicine*, (19), 705.

157. Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N., Kitade, Y. (2001). Putative ACP Phosphodiesterase Gene (acpD) Encodes an Azoreductase, *Journal of Biological Chemistry*.
158. Nancharaiah, Y., Venkata, V., Mohan, S., Lens, P.N.L., (2015). Metal Removal And Recovery In Bioelectrochemical Systems: A Review. *Bioreosuce Technology*, 195:102-114.
159. Nath, K., Das, D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5).
160. Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T.E., Nielson, J.L. (2002). *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants, *Wat Sci Technol*, (73), 80- 172.
161. Nony, C. R., Bowman, M. C. (1980). Trace analysis of potentially carcinogenic metabolites of an azo dye and pigment in hamster and human urine as determined by two chromatographic procedures, *Journal of Chromatographic Science*, (18), 64–74.
162. Nozet, H., Majault, J. (1976). Textiles chimiques: fibres modernes, *Eyrolles*.
163. O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., Delée, W. (1999). Colour in textile effluents Sources, measurement, discharge consents and simulation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74;(11), 1009-1018.
164. Ogutveren, U.B., Kaparal., S. (1994) .Colour removal from textile effluents by electrochemical destruction, *J. Environ. Sci. Health A*, (29), 1-16.
165. Oon, Y.-S. Ong, S.-A. Ho, L.-N. Wong, Y.-S. Oon, Y.-L. Lehl, H. K. Nordin, N. (2017). Microbial fuel cell operation using monoazo and diazo dyes as terminal electron acceptor for simultaneous decolourisation and bioelectricity generation. *Journal of Hazardous Materials*, (325), 170–177.
166. Ozturk, A., Abdullah, M.I. (2001). Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions, *Science Total Enviroment*, (358)137–142.
167. Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technology*, 6;(101), 1533-1543.
168. Perkin, R. M., Catlow, N. (1984). Dye Fixation Using Radio—frequency Heating, *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, (100), 274-280.

169. Pinheiro, H.M., Touraud, E., Thomas, O. (2004), Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dyes and Pigments*, (61), 121–139.
170. Pisciotto, J.M., Zaybak, Z., Call, D.F., Nam, J.-Y., Logan, B.E. (2012). *Applied and Environmental Microbiology*, (78), 5212-5219.
171. Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M. L., Bergel, A. (2012). Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells, *Physical Chemistry Chemical Physics* (14), 13332-13343.
172. Ponting, K.G. (1980). A Dictionary of Dyes and Dyeing, *Bell & Hyman*.
173. Potter, M.C. (1912). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Royal Society*, (84), 260-276.
174. Preto, P. (2001). A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules, *Biotechnic & Histochemistry*, (76), 137-161.
175. Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, N. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer, *Applied and Environmental Microbiology*, (70), 5373–5382.
176. Rafii, F., Cerniglia, C.E. (1995). Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract, *Environmental Health Perspectives*, (103), 17-19.
177. Ramachandran, R., Menon, R.K. (1971). An overview of industrial uses of hydrogen, *International Journal of Hydrogen Energy*, (23), 593-598.
178. Raman, C. D., and Kanmani, S. (2016). Textile dye degradation using nano zero valent iron, *Journal of Environmental Management*, (177), 341-355.
179. Rauf, M.A., Meetani, M.A., Hisaindee, S. (2011). An overview on the photocatalytic degradation of azo dyes in the presence of TiO₂ doped with selective transition metals, *Desalination*, (276), 13–27.
180. Reyes, P., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase, *Biotechnology Letters*, (21), 875–880.
181. Rismani-Yazdi, H., Carver, S. M., Christy, A. D., Tuovinen, O. H. (2008). Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. *Journal of Power Sources*.

182. Ritter, S. (2003). Green solutions to global problems, *Science Technology*, (12), 31-33.
183. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, (77), 247-255.
184. Rodríguez, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi, *Current Microbiology*, (38), 27-32.
185. Rosenkranz, H.S., Kiopman, G. (1989). Structural basis of the mutagenicity of phenylazoaniline dyes, *Mutation Res*, (221), 217-234.
186. Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Delia, M.-L., Bergel, A.. (2013). Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells, *Electrochemistry Communications*, (33), 1-4.
187. Rozendal, R. A., Jeremiasse, A. W., Hamelers, H. V. M., Buisman, C. J. N. (2008). Hydrogen production with a microbial biocathode, *Environment Science Technology*, (42), 629–634.
188. Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J., Buisman, C.J.N. (2006). Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis, *International Journal of Hydrogen Energy*, (31), 1632–1640.
189. Russ, R., Rau, J., Stolz, A. (2000). The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, (4), 1429–1434.
190. Saba, B., Christy, A. D., Park, T., Yu, Z., Li, K., Tuovinen, O. H. (2018). Decolorization of Reactive Black 5 and Reactive Blue 4 Dyes in Microbial Fuel Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 186 (4), 1017-1033.
191. Sabit, C., 2001, Tekstil endüstrisinde kullanılan boyarmaddeler ve boyama yöntemleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, 89 s.
192. Salomone-Stagnia, M., Stellato, F., Whaley, C.M., Vogt, S., Morante, S., Shimada, S., Rauchfuss, T.B., Meyer-Klaucke, W. (2010). The iron-site structure of [Fe]-hydrogenase and model systems: an X-ray absorption near edge spectroscopy study. *Dalton Transactions*. 39 (12), 3057–3064.
193. Samer, M. (2015). Wastewater Treatment Engineering, Biological and chemical wastewater treatment processes, *IntechOpen*.

194. Sani, R.K. and Banerjee, U.C. (1999). Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dyestuff effluent by *kurthia* sp. *Enzyme Microbiology*, (24), 433-437.
195. Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, (42), 138-157.
196. Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, (42), 138-157
197. Sarkar, S., Banerjee, A., Halder, U., Biswas, R., Bandopadhyay, R. (2017). Degradation of Synthetic Azo Dyes of Textile Industry: a Sustainable Approach Using Microbial Enzymes. *Water Conservation Science and Engineering*, (2), 121–131.
198. Sasikala, K., Ramana, V., Subrahmanyam, M. (1991). Photoproduction of hydrogen from wastewater of a lactic acid fermentation plant by a purple non-sulfur photosynthetic bacterium *Rhodobactersphaeroides* O.U.001, *Indian journal of experimental biology*, (29), 74-75.
199. Schink, B. (2008). Principles of Anaerobic Degradation of Organic Compounds. In *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, 169-192.
200. Schlapbach, L., Züttel, A. (2001). Hydrogen-storage materials for mobile applications. *Nature*, (414), 353-358.
201. Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency, *Physical Chemistry Chemical Physics*, (9), 2619-2629.
202. Selembo, P.A., Perez, J.M., Lloyd, W.A., Logan, B.E., (2009). High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells, *Int. J. Hydrogen Energy*, (34), 5373–5381.
203. Shankarling G.S., Deshmukh P.P., Joglekar A.R. (2017). Process intensification in azo dyes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, (5), 3302–3308.
204. Shaul, G.M., Holdsworth, T.J., Dempsey, C.R., Dostal, K.A. (1991). Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process, *Chemosphere*, (22), 107-119.
205. Singh, P., Saghi, R., Pandey, A., Iyengar, L. (2007). *Bioresource Technology*, (98), 2053–2056 .
206. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., and Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: an overview, *Indian Journal of Pharmacology*, (43), 243.

207. Singh, R.L., Singh, P.K., Singh, R.P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes, *International Biodeterioration & Biodegradation*, (104),1–31.
208. Sleutels, T. H. J. A., Lodder, R., Hamelers, H. V. M., Buisman, C. J. N. (2009). Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport, *International Journal of Hydrogen Energy*, (34), 9655-9661.
209. Smit, J., Nasr, J. (1992). Urban agriculture for sustainable cities: Using wastes and idle land and water bodies as resources, *Environment & Urbanization*, (4).
210. Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*, 7(12):1723–174
211. Solís, M., Solís,A., Pérez, H.I. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: a review, *Process Biochem*, (12), 1723–1748.
212. Stingley, R. L., Zou, W., Heinze, T. M., Chen, H., Cerniglia, C. E. (2010).Metabolism of azo dyes by human skin microbiota, *Journal of Medical Microbiology*, (59), 108-114.
213. Stingley, R. L., Zou, W., Heinze, T. M., Chen, H., Cerniglia, C. E. (2010). Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. *Journal of Medical Microbiology*, (1), 108-114.
214. Sun, J., Li, Y., Hu, Y., Hou, B., Xu, Q., Zhang, Y., Li, S. (2012). Enlargement of anode for enhanced simultaneous azo dye decolorization and power output in air-cathode microbial fuel cell, *Biotechnology Letters*, 34(11), 2023–2029.
215. Suzuki, Y. (1982). On hydrogen as fuel gas, *Int J Hydrogen Energy*, (7), 227-230.
216. Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., Sagiura, W. (2001). Molecular cloning and characterization of the gene encoding azoreductase from *Bacillus* sp. OY 1-2 isolated from soil, *Journal of Biological Chemistry*, (246), 9059-9065.
217. Sweeny, G. (2015). Fast fashion is the second dirtiest industry in the world, next to big oil. EcoWatch. Retrieved from.
218. Şen, S., Demirer, G.N., (2003), Anaerobic Treatment of Real Textile Wastewater With a Fluidized Bedreactor, *Water Research*, (37), 1868-187.
219. Talarposhti, A. M., Donnelly, T., & Anderson, G. K. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor, *Water Research*, (101), 7773-7779.
220. Tanisho, S.,Wakao, N. Y. (1983). Biological hydrogen production by enterobacter aerogenesj, *Journal Of Chemical Engineering Of Japan*, (16), 529-530.

221. Tarpley, W.G., Miller, J.A., Miller, E.C.(1980). Adducts from the reaction N-benzoyloxy-N-methyl-4-aminoazobenzene with deoxyguanosine or DNA in vitro and from hepatic DNA of mice treated with N-methyl- or N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene, *Cancer Research*, (40), 2493-2499.
222. Tartakovsky, B.,Manuel, M.-F., Neburchilov, V.,Wang, H.,Guiot, S. R.(2008). Biocatalyzed hydrogen production in a continuous flow microbial fuel cell with a gas phase cathode, *Journal of Power Sources*, (182), 291–297.
223. Telke, A. A., Kadam, A. A., Govindwar, S. P. (2015). Bacterial enzymes and their role in decolorization of azo dyes. *Environmental Science and Engineering*.
224. Temesgen, F., Gabbiye, N., Sahu, O. (2018). Biosorption of reactive red dye (RRD) on activated surface of banana and orange peels: Economical alternative for textile effluent, *Surfaces and Interfaces*, (12),151-159.
225. Towns, A.(1999). Developments in azo disperse dyes derived from heterocyclic diazo components, *Dyes Pigments*, (42),3–28.
226. Trapero, J.R., Horcajada, L., Linares J.J., Lobato, J. (2017). Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization, *Applied Energy*,(185), 698–707.
227. Valli Nachiyar, C., Suseela Rajkumar, G. (2003). Degradation of a tannery and textile dye, Navitan Fast Blue S5R by *Pseudomonas aeruginosa*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (19) , 609–614.
228. Van der Zee, F.P., Villaverde, S. (2005). Combined Anaerobic–Aerobic Treatment of Azo Dyes, A Short Review of Bioreactor Studies, *Water Res*, (39), 1425.
229. Van Hamndel, A.C., Lettinga, C. (1994). Anaerobic Sewage Treatment – a Practical Guide for Regions with a Hot Climate, *Chichester: Wiley*.
230. Vander Zee, F.P., Bisschops, I.A.E., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H.M., Lettinga, G., Field, J.A. (2003). *Water Research*, (37), 3098–3109.
231. Vandevivere, P. C., Bianchi, R., Verstraete, W. (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (72), 289-302.
232. Vandevivere, P. C., Bianchi, R., Verstraete, W. (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging Technologies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (72), 289-302.

233. Vincezini, M., Materassi, M., Tredici, M.R., Florenzano, G. (1982). Hydrogen production by immobilized cell-I. light dependent dissimilation of organic substances by *Rhodospseudomonas palustris*, *International Journal of Hydrogen Energy*, (7), 231-236.
234. Volesky, B., Holan, Z. R. (1995). Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology Progress*, (55), 427–443.
235. Walker, R., Ryan, A. J. (1971). Some molecular parameters influencing rate of reduction of azo compounds by intestinal microflora, *Xenobiotica*, (1), 483-486.
236. Wang, H., Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, (8):1796-807.
237. Wang, Y.-F., Masuda, M., Tsujimura, S., Kano, K. (2008). Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator, *Biotechnol. Bioeng*, (101), 579-586.
238. Waqas, M., Rehan, M., Aburiazaiza, A. S., Nizami, A.-S. (2018). Wastewater Biorefinery Based on the Microbial Electrolysis Cell: Opportunities and Challenges, *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*, 347–374.
239. Wong, K. S., Cheung, M. K., Au, C. H., Kwan, H. S. (2013). A Novel *Lentinula edodes* Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation, *PLoS ONE*, 8(6): e66426.
240. Wong, K. S., Huang, Q., Au, C. H., Wang, J., Kwan, H. S. (2012). Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*, *Bioresource Technology*.
241. Wong, Y., Yu, J. (1999). Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes, *Water Research*, (33), 3512-3520.
242. Xiao, H., Zhao, T., Li, C. H., & Li, M. Y. (2017). Eco-friendly approaches for dyeing multiple type of fabrics with cationic reactive dyes. *Journal of Cleaner Production*. (165), 1499-1507.
243. Xiaojun, Z., Zhen, W., Ying, Mu., Hanqi, Z., Qinhan, J. (2000). Simultaneous multiwavelength detection based on surface plasmon resonance technique, *Special Issue: Special Issue on Automation in China*, (12), 104-107.

244. Yang, F., Wang, K. C., Huang, Y., EnergyNeutral Communication Protocol for Very Low Power Microbial Fuel Cell Based Wireless Sensor Network, *IEEE Sensors Journal*, (15), 2306–2315.
245. Yoo, E. S., Libra, J., Adrian, L. (2001). Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic mixed culture, *Journal of Environmental Engineering*, 27 (9), 844 –849.
246. Yusoff, M., Hu, A., Feng, C., Maeda, T., Shirai, Y., Hassan, M.A., Yu, C.P. (2013). Influence Of Pretreated Activated SludgeFor Electricity Generation In MicrobialFuel Cell Application, *BioresourceTechnology*, (145), 90–96.
247. Zhang, F., Ge, Z. (2013). In situ investigation of tubular microbial fuel cells deployed in an aeration tank at a municipal wastewater treatment plant, *Bioresource Technology*, (136), 316–321.
248. Zhang, F., Yediler, A., Liang, X., Kettrup, A. (2004). Effects of Dye Additives on the Ozonation Process and Oxidation By-Products: A Comparative Study Using Hydrolyzed CI Reactive Red 120, *Dyes Pigments*, (60), 1.
249. Zhao, R., Tan, C., Xie, Y., Gao, C., Liu, H., Jiang, Y.(2011). One step synthesis of azo compounds from nitroaromatics and anilines, *Tetrahedron Lett*, (52)3805–3809.
250. Zheng-Bing, G., Chen-Meng, S., Ning, Z., Wen, Z., Cheng-Wen, X., Lin-Xi, Z., Xiang-Ru, L. (2014). ability of a thermostable , pH-stable , and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
251. Zhou, X., Chen, X., Li, H., Xiong, J., Li, X., Li, W. (2016). Surface oxygen-rich titanium as anode for high performance microbial fuel cell. *Electrochimica Acta*, 582-590.
252. Zimmermann, T., Kulla, H. G., Leisinger, T. (1982). Properties Of Purified Orange I Azoreductase, The Enzyme Initiating Azo Dye Degradation By *Pseudomonas* Kf46, *European Journal Of Biochemistry*, 129(1), 197-203.
253. Zollinger, H. (1961). Azo and Diazo Chemistry. Aliphatic and Aromatic Compounds (Transl. Nursten HE), *Interscience Publishers*.
254. Zollinger, H. (1991). Colour Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 5th Edition, 187, *VCH Publishers*.
255. Zollinger, H.(2003). Color chemistry. Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments, *Weinheim: Wiley-VCH*.

256. Zou, H., Wang, Y. (2017). Azo dyes wastewater treatment and simultaneous electricity generation in a novel process of electrolysis cell combined with microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, (235), 167–175.

