



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AZO TEKSTİL BOYALARININ RENK VE TOKSİSİTESİNİN
HALOFİLİK ARKELER TARAFINDAN GİDERİMİ**

EVİRİM YILDIZ

DOKTORA TEZİ

Antakya/HATAY

ŞUBAT – 2014



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AZO TEKSTİL BOYALARININ RENK VE TOKSİSİTESİNİN
HALOFİLİK ARKELER TARAFINDAN GİDERİMİ

EVİRİM YILDIZ

DOKTORA TEZİ

Antakya/HATAY

ŞUBAT – 2014

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AZO TEKSTİL BOYALARININ RENK VE TOKSİSİTESİNİN HALOFİLİK
ARKELER TARAFINDAN GİDERİMİ

EVİRİM YILDIZ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç.Dr. Birgül ÖZCAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 07.02.2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Birgül ÖZCAN
Başkan

Prof.Dr. Özfer YEŞİLADA
Üye

Prof.Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
Üye

Doç.Dr. Gül ÖZYILMAZ
Üye

Doç.Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 43

Doç. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 1105D0104

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirislerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılmayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Evrin YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Boyar Maddeler	4
2.2. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması.....	5
2.3. Tekstil Boyar Maddeler ve Atıklarının Çevre Üzerine Olumsuz Etkileri.....	8
2.4. Boyar Maddelerin Toksisitesi.....	8
2.5. Boyar Madde Giderim Teknikleri.....	10
2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler	10
2.5.2. Mikrobiyal Teknikler.....	12
2.5.2.1. Biyosorpsiyon.....	12
2.5.2.2. Enzimatik Boyar Madde Giderimi.....	13
2.6. Mikrobiyal Boya Giderim Mekanizmaları	15
2.6.1. Anaerobik Giderim	15
2.6.2. Aerobik Giderim	16
2.6.3. Anaerobik-Aerobik Giderim.....	17
2.7. Boya Gideriminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	18
2.7.1. Algler.....	18
2.7.2. Mayalar.....	19
2.7.3. Funguslar.....	20
2.7.4. Bakteriler.....	21
2.8. Halofilik Arkeler.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	27

3.1.2. Halofilik Arkeler.....	28
3.1.3. Besiyerleri.....	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Aktifleştirilmesi.....	29
3.2.2. Renk Giderim Yeteneğine Sahip İzolatların Taranması.....	29
3.2.3. Renk Giderim Ortamının Belirlenmesi.....	30
3.2.4. Renk Gideriminin Enzimatik Olduğunun Belirlenmesi.....	30
3.2.5. Farklı Azo Boyalarının Renklerinin Halofilik Arkelerle Giderimi	31
3.2.6. Optimum Renk Giderimi İçin Kültür Koşullarının Optimizasyonu.....	31
3.2.6.1. Renk Giderimi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	31
3.2.6.2. Renk Giderimi Üzerine pH'nın Etkisi.....	32
3.2.6.3. Renk Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Etkisi.....	32
3.2.6.4. Renk Giderimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi.....	32
3.2.6.5. Renk Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi.....	32
3.2.6.6. Renk Giderimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi.....	32
3.2.6.7. Renk Giderimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	33
3.2.6.8. Renk Giderimi Üzerine İz Element Etkisi.....	33
3.2.7. Azoredüktaz Enzim Tayini ve Optimizasyonu.....	33
3.2.7.1. Optimum KCl Konsantrasyonunun Saptanması	34
3.2.7.2. Optimum pH Değerinin Saptanması	34
3.2.7.3. Optimum Sıcaklık Derecesinin Saptanması.....	34
3.2.8. Toksisitenin Belirlenmesi.....	34
3.2.9. Boya Yıkım Metabolit Profilinin Belirlenmesi.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36
4.1. İzolatların Renk Giderim Yeteneklerinin Tarama Sonuçları.....	36
4.2. Renk Giderim Ortamının Belirlenmesi.....	37
4.3. Halofilik Arke İzolatlarıyla Farklı Tekstil Boyalarının Renk Giderimi Sonuçları.....	38
4.4. Boya Renk Gideriminin Enzimatik Olduğunun Belirlenmesi.....	41

III

4.5. Renk Giderimi Koşullarının Optimizasyonu Sonuçları.....	45
4.5.1. Renk Gideriminin NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	45
4.5.2. Renk Gideriminin pH'a Bağlı Değişimi.....	48
4.5.3. Renk Gideriminin Sıcaklığa Bağlı Değişimi.....	52
4.5.4. Renk Gideriminin Çalkalama Hızına Bağlı Değişimi.....	55
4.5.5. Renk Gideriminin Boya Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	57
4.5.6. Renk Gideriminin İnokulum Miktarına Bağlı Değişimi.....	61
4.5.7. Renk Gideriminin Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarına Bağlı Değişimi.....	65
4.5.8. İz Element Kullanımının Renk Giderimi Üzerine Etkisi.....	69
4.6. Azoredüktaz Enzim Tayini ve Optimizasyonu.....	73
4.6.1. Azoredüktaz Aktivitesinin [KCl] Optimizasyon Sonuçları.....	73
4.6.2. Azoredüktaz Aktivitesinin pH Optimizasyon Sonuçları.....	74
4.6.3. Azoredüktaz Aktivitesinin Sıcaklık Optimizasyon Sonuçları..	75
4.7. Boyar Maddelerin Toksisitesi ve Renk Giderimine Bağlı Toksisite Sonuçları.....	76
4.8. Boya Yıkım Metabolit Profiline Değerlendirme Sonuçları.....	78
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR.....	87
TEŞEKKÜR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÖZET

AZO TEKSTİL BOYALARININ RENK VE TOKSİSİTESİNİN HALOFİLİK ARKELER TARAFINDAN GİDERİMİ

Ksenobiyotik yapılarından dolayı biyolojik yıkıma dirençli azo bileşikleri en büyük ve en fazla çeşit içeren sentetik boya grubunu oluşturmaktadır. Genellikle yüksek tuz içeren tekstil atık sularıyla dışarıya bırakılmaları nedeniyle çevre güvenliği için önemli bir tehdit oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla kaynaklarımızın korunması için bu kirleticilerin giderilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, halofilik arke izolatları kullanılarak azo boyalarının renk giderimi araştırılmıştır. %20 NaCl ve RS5 içeren katı/sıvı ortamda 121 arkeal izolatın renk giderim yetenekleri taranmış ve en yüksek renk gideriminin F89A1, B44B ve CH7 izolatlarına ait olduğu belirlenmiştir. Üç arkeal izolatın maksimum renk giderimini statik koşullarda, %20 NaCl, pH 7.5 ve 45°C'de gerçekleştirdiği belirlenmiştir. F89A1 ve B44B izolatlarının 1000 ppm boya konsantrasyonuna kadar renk giderimi gerçekleştirdiği, CH7 izolatının ise 500 ppm ve üzerindeki boya konsantrasyonlarının rengini gideremediği saptanmıştır. İnokulum miktarının artışı ile renk giderim süresinin kısaldığı ancak renk giderim oranında değişim olmadığı ve iz elementlerin renk giderimini etkilemediği belirlenmiştir. Organik azot kaynaklarının ve özellikle maya özütü renk giderimini arttırdığı tespit edilmiştir. Boyaların renk gideriminde azoredüktaz enziminin rol oynadığı belirlenmiş olup, F89A1 suşunda en yüksek enzim aktivitesi 2.5 M KCl, 45°C sıcaklık ve pH 7.0'de 12.8 U/ml olarak, B44B ve CH7 için 2.5 M KCl, 35°C sıcaklık ve pH 7.5'da sırası ile 11.63 U/ml ve 11.07 U/ml olarak hesaplanmıştır. RS5 ve RK180 boyalarının ve renk giderimi sonrası boya giderim ortamının agar difüzyon yöntemi ile arkeal test organizmaları üzerinde toksik etkiye rastlanmamış, Mikrotoks analizi sonucunda ise düşük seviyelerde toksik etki gözlenmiştir. GC-MS analizi sonucunda aromatik aminli bileşiklerin varlığı gösterilmiş olup artan inkübasyon periyoduyla birlikte yıkım ürünlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ilk kez halofilik arke suşları kullanılarak yüksek tuz konsantrasyonunda azo tekstil boyalarının renk giderimi ve arkeal azoredüktaz aktivitesi çalışılmıştır.

2014, 99 Sayfa

Anahtar kelimeler: Halofilik arke, Tekstil azo boyaları, Azoredüktaz, Renk Giderimi, Toksikite giderimi

ABSTRACT**DECOLORIZATION AND DETOXIFICATION OF TEXTILE AZO DYES BY HALOPHILIC ARCHAEA**

Azo compounds, which are resistant to biological degradation due to their xenobiotic structure, build up the most numerous and the most diverse group of synthetic dyes. They pose serious ecological threat because of their disposal together to textile wastewater containing rather high salt ratio. Hence removal of these contaminants is of importance in view of protecting our resources. To this end, decolorization of azo dyes by halophilic archaea was investigated. 121 Archaeal isolates were experimented for their decolorization capacity in solid/liquid medium with 20% NaCl and RB5, and the highest decolorization rate was determined to belong to F89A1, B44B and CH7 isolates. It was observed that these three archaeal isolates brought about the maximum decolorization rate under static conditions with 20% NaCl, pH 7.5, at 45°C. It was established that F89A1 and B44B isolates provided decolorization up to 1000 concentration, while CH7 isolate failed to decolorize 500ppm or more concentrations. It was found out that higher inoculation amount resulted in shorter time needed for decolorization. On the other hand, decolorization rate remained unchanged and the trace elements didn't have any effect on the process. Organic nitrogen sources, particularly that of yeast extract was observed to enhance decolorization rate. Azoreductases were determined to have an impact on decolorization of dyes; the highest decolorization activity with F89A1 strain at 2.5 M KCl, 45°C, pH 7.0 was estimated as 12.8 U/ml, while it was found as 11.63 U/ml and 11.07 U/ml respectively for B44B and CH7 at 2.5 M KCl, 35°C, pH 7.5. No toxic effect was observed on archaeal test organisms with agar diffusion method caused by decolorization practice or by RB5 and RR180 dyes, however, some toxic effect was detected at lower levels after Microtox analysis. GC-MS analyses revealed presence of aromatic amine compounds, degradation products increased in parallel with longer incubation period. It is the first time that halophilic strains have been used for studying decolorization of azo textile dyes and archaeal azoreductases activity higher salt concentrations.

2014, 99 Pages

Key words: Halophilic archaea, Textile azo dyes, Azoreductase, Decolorization, Detoxification.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MTO	Mineral Tuz Ortamı
M.Ö	Maya özütü
HMSA	Hidroksimukonik semialdehid
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
PHA	Poli- β - hidroksialkonat
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RNA	Ribonükleik Asit
SG	Shengal-Gibson besiyeri
U	Unite
V	Hacim
λ_{max}	Maksimum dalga boyu
RS5	Reaktif Siyah 5 (Reactive Black 5)
RK180	Reaktif Kırmızı 180 (Reactive Red 180)

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan tekstil azo boya ları.....	27
-------------------------------------------------------------------	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Bazı boyaların kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.2. Bakteriler tarafından azo boyaların renginin giderimi için öngörülen mekanizma.....	9
Şekil 3.1.Reaktif Siyah 5 (a) ve Reaktif Kırmızı 180 (b) boyalarının kimyasal yapısı.....	28
Şekil 4.1. 50 ppm Reaktif Siyah 5 içeren MTO agarda halofilik arke izolatlarının renk giderimi tarama sonuçları.....	36
Şekil 4.2. Halofilik arke izolatlarının 50 ppm Reaktif Siyah 5 içeren sıvı MTO'daki % renk giderimi oranları (a) ve sonuçları (b).....	37
Şekil 4.3. F89A1 suşunun üç farklı boya giderim ortamındaki % renk giderimi oranları.....	38
Şekil 4.4. F89A1 izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi.....	39
Şekil 4.5. B44B izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi.....	39
Şekil 4.6. CH7 izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi.....	40
Şekil 4.7. F89A1 izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları.	41
Şekil 4.8. B44B izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları..	42
Şekil 4.9. CH7 izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları.....	43
Şekil 4.10. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında ortamdan adsorbe edilen boya miktarının zamana göre değişimi.....	44
Şekil 4.11. F89A1 izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	45
Şekil 4.12. B44B izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	46
Şekil 4.13. CH7 izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	47

Şekil 4.14. F89A1 izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	49
Şekil 4.15. B44B izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	50
Şekil 4.16. CH7 izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	51
Şekil 4.17. F89A1 izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	52
Şekil 4.18. B44B izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	53
Şekil 4.19. CH7 izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	54
Şekil 4.20. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarının bir günlük inkübasyon süresi sonucunda statik (a) ve farklı çalkalama hızlarına bağlı renk giderim oranları (b).....	56
Şekil 4.21. F89A1 izolatının 11 farklı boya konsantrasyonu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	58
Şekil 4.22. B44B izolatının 11 farklı boya konsantrasyonu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	59
Şekil 4.23. CH7 izolatının 11 farklı boya konsantrasyonu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	60
Şekil 4.24. F89A1 izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	62
Şekil 4.25. B44B izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	63
Şekil 4.26. CH7 izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b).....	64
Şekil 4.27. F89A1 izolatının 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	66

Şekil 4.28. B44B izolatinin 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	67
Şekil 4.29. CH7 izolatinin 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	68
Şekil 4.30. F89A1 izolatinin iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	70
Şekil 4.31. B44B izolatinin iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	71
Şekil 4.32. CH7 izolatinin iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b).....	72
Şekil 4.33. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin KCl konsantrasyonuna bağlı değişimi.....	74
Şekil 4.34. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin pH'a bağlı değişimi.....	75
Şekil 4.35. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.....	76
Şekil 4.36. B44B izolatu (a) ve <i>Natrialba asiatica</i> standart suşunun (b) üzerine Reaktif Kırmızı 180 boyası ve yıkım ürünlerinin toksisitesi.....	77
Şekil 4.37. F89A1 ile RS5 boyasının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı.....	80
Şekil 4.38 B44B ile RK180 boyasının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı.....	81
Şekil 4.39. CH7 ile RK180 boyasının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı.....	82

1. GİRİŞ

Dünya nüfusuna paralel olarak artan endüstrileşme, kimyasal yükü fazla atıkları da beraberinde getirmiştir. Hızla gelişen endüstrileşmenin yaratmış olduğu kirliliği doğa belirli ölçüde tolere edebilse de gerekli önlemlerin alınmaması ekolojik dengenin bozulmasına neden olacaktır. Bu nedenle, kirleticinin çeşidi ve miktarı başta olmak üzere önlem alınması gereken birçok noktanın dikkatli bir şekilde incelenmesi ve ilgili endüstri kuruluşlarının gerekli olan arıtım tesis ve sistemlerini kurmalarının yasal bir zorunluluk haline getirilmesi giderek kaçınılmaz bir durum haline gelmektedir (Arceivala, 2002).

Çevre kirliliğine neden olan, en önemli endüstriyel kimyasal maddelerden biri boyar maddelerdir. Boyar maddeler yüksek toksisiteleri ve çevrede uzun süre kalıcı olmaları nedeni ile, fenolik maddeler ve pestisitlerden sonra çevreden mutlak olarak uzaklaştırılması veya zararsız hale getirilmesi gereken kirleticiler arasında yer almaya başlamıştır. Boyar maddeler, başta tekstil ve boya üretim imalathaneleri olmak üzere, kozmetik, gıda, deri, ilaç, matbaa ve kağıt endüstrilerinde kullanılmakta ve işlemler sırasında ortaya çıkan boyar madde atıkları, renkleri ve toksik etkileri nedeniyle çevrede kirlilik oluşturmaktadır.

1856 Yılında ilk sentetik boya olan Mauevin'in üretiminden günümüze kadar 100.000 den fazla sentetik boya üretilmiştir. Bu boyaların yıllık tüketimi yaklaşık 0.7 milyon ton olup 2/3'si tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (Asad ve ark., 2007). Ucuz, kolay uygulanabilir olması ve doğal boyalara kıyasla 3000 den fazla farklı renk çeşidine sahip olması nedeniyle azo boyalar tekstil boyalarının %70'ni oluşturmaktadır. Azo boyalar yapılarında bir veya daha fazla azo bağı (N=N) bulunduran aromatik bileşiklerdir (Tony ve ark., 2009).

Boyaların üretimi esnasında ve kullanım süreci sonrasında toplam boyanın %10-15'inin çevreye bırakıldığı tahmin edilmektedir. Bu olay da çevre ve sağlık açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Çünkü birçok sentetik azo boyası ve metabolitleri toksik, kanserojenik ve mutajenik özellik göstermektedir. Sucul ekosistemlerde boya bulunması, suyun derinliklerine ışık girişini engelleyerek fotosentezin azalmasıyla birlikte gaz çözünürlüğünün azalmasına da yol açarak su kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca boya ve/veya boya parçalanma ürünlerinin flora ve fauna üzerine

toksik etkileri olabildiği için tekstil atık sularının renginin giderimi büyük bir çevresel sorun oluşturmaktadır (Asad ve ark., 2007; Moosvi ve ark., 2007).

Günümüzde çevre kirliliğinin engellenmesi ve boyalı atık suların arıtımında fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif olarak biyolojik süreçler önem kazanmıştır. Biyolojik boya giderim teknikleri, boyaların mikrobiyal biyotransformasyonuna dayanmaktadır. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kullanımının aşırı miktarda kimyasal gerektirmesi ve maliyetlerinin yüksek olması gibi dezavantajlarının yanı sıra etkili renk giderimi sağlanılamaması alternatif yöntemlerin araştırılmasına neden olmuştur. Mikrobiyal veya enzimatik renk giderimi ve yıkımının, çevre dostu olması başta olmak üzere düşük maliyeti ve aynı zamanda toksik metabolitleri tamamen mineralize edebilmesi gibi avantajlara sahip olması tekstil atık sularının biyolojik yöntemlerle arıtılması üzerine olan ilginin dikkate değer şekilde artmasının en önemli nedenidir.

Biyolojik renk giderimi ve yıkım üzerine artan ilgiyle birlikte başta fungus ve bakteriler olmak üzere farklı taksonomik gruplara ait organizmalarla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca boyar maddeler ile kontamine habitatların ekstrem koşullara sahip olması nedeniyle remediasyon çalışmalarında bu koşullarda yaşamlarını sürdürebilecek organizmalardan yararlanma fikri ortaya çıkarmıştır.

Halofilik bakteri ve arkeler, düşük su aktivitesine sahip enzimleri, yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı uyum stratejileri, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve kendilerine has olan özellikleriyle ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Bu nedenle halofilik arke ve bakterilerin birçok biyoteknolojik çalışmada ve çevre biyoteknolojisi kapsamında biyolojik iyileştirme çalışmalarında kullanılması büyük avantaj sağlayacaktır. Bu avantajlarına rağmen halofilik bakterilerin tekstil boyalarının renk giderimi üzerine az sayıda çalışmaya rastlanırken, halofilik arkelerin tekstil boyalarının renklerinin giderimi ile ilgili henüz bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile yüksek tuz konsantrasyonunda yaşayan halofilik arkelerin, çeşitli tekstil boyalarının rengini giderme yetenekleri belirlenerek biyoteknolojik uygulamalardaki kullanılabilirliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında;

- ✓ Türkiye'nin çeşitli tuzlu bölgelerinden izole edilmiş 121 halofilik arke izolatının katı ve sıvı ortamda boya rengi giderim yetenekleri taranmıştır,
- ✓ seçilen izolatların sıvı ortamda, çeşitli azo tekstil boyalarının renk giderim oranları belirlenmiştir,
- ✓ renk gideriminin enzimatik olup olmadığı farklı yöntemlerle belirlenmiştir,
- ✓ seçilen her bir organizmanın en yüksek boya giderim oranını gösterdiği azo boyası ile, optimum boya gideriminin sağlandığı ortam koşulları belirlenmiştir,
- ✓ boya yıkımına karışan enzimin optimum aktivite gösterdiği tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH belirlenerek kısmi karakterizasyon yapılmıştır,
- ✓ boyaların ve renk giderim ürünlerinin toksisite testleri yapılmıştır,
- ✓ kromatografik yöntemle boya renk giderimi sonrası açığa çıkan metabolit profilindeki değişim belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Boyar Maddeler

Sentetik boya üretimi 1856 yılında İngiliz kimyacı William H. Perkin'in çok iyi boyama özelliğine sahip olan, daha sonraları anilin moru olarak bilinen sentetik boyayı sentezlemesi ve patentini almasıyla başlamıştır. Devam eden araştırma ve geliştirme çalışmaları sonrasında yeni boyalar üretilmiştir. Aynı yılda A. Kekule tarafından benzenin moleküler yapısının keşfiyle bu süreç hızlanmış ve 20. yüzyılın başlarında sentetik boyar maddeler neredeyse tamamen doğal boyaların yerini almıştır (Welham, 2000). Günümüzde boyar maddeler çok değişik kimyasal yapı ve değişik miktarlarda üretilerek çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar.

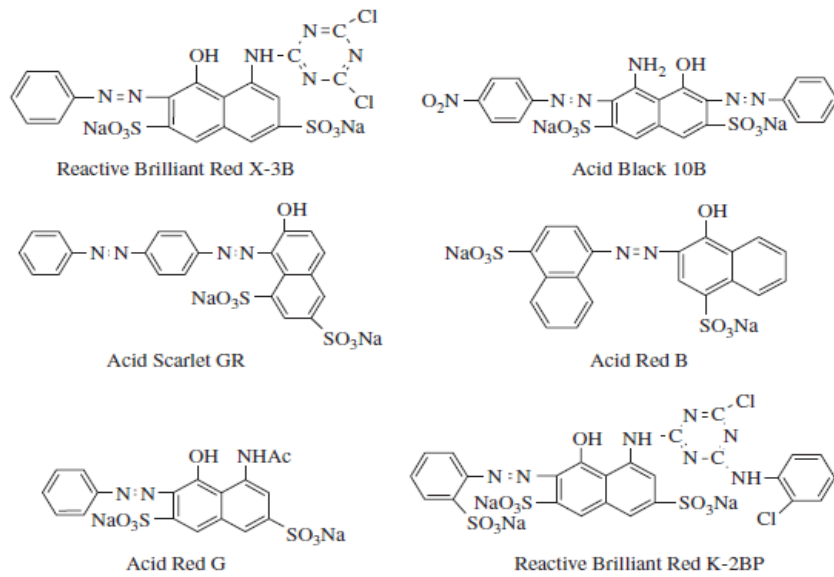
İlk sentetik boya Mauevin'in üretiminden sonra günümüze kadar 100.000 den fazla sentetik boya üretilmiştir. Boyalar başta tekstil olmak üzere, kozmetik, kağıt, deri, ilaç ve gıda gibi farklı endüstrilerde kullanılmaktadır (Craliell ve ark., 1995; Chen ve ark., 2003; Asad ve ark., 2007). Tekstil sanayiinde kullanılan boyaların %70 gibi büyük bir kısmını ise azo boyaları oluşturmaktadır. Tekstil sanayiinde kullanılan boyar maddeler, boyama ünitelerinden sonra tekstil fabrikası çıkış sularına verilmektedir. Renkli çıkış suyunun, boyama, baskı ve yıkama işlemlerinden kaynaklandığı, renk derecesinin ise boyar madde derişimine ve kullanılan maddenin yapısına bağlı olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Carliell ve ark., 1996).

Tekstil endüstrisinde, kumaşa renk vermek amacı ile yapılan boyama prosesinde kullanılan maddeler genellikle moleküle rengi veren kromofor grup ve boyayı ipliğe bağlayan fonksiyonel grup olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Boyar maddeler yapılarında çift bağın yanısıra kromofor ve oksokrom grupları taşırlar. Kromofor, rengin oluşumunu sağlayan gruptur. En önemli kromoforlar $-C=C-$, $-C=N-$, $-C=O$, $-N=N-$, $-NO_2$ ve $-NO$ gruplarıdır (Zille, 2005). Oksokromlar ise, elektron verici grup olup, kromofor tarafından oluşturulan rengin çözünebilirliğini ve boyanın ipliğe bağlanmasını sağlar. En önemli oksokromlar, NH_2 , $-NR_2$, $-NHR$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-OH$ ve $-OCH_3$ ve $-OCH_3$ gruplarıdır (Gomes, 2002). Kimyasal yapıları ya da kromoforları temel alındığında, 20-30 farklı boya grubu tanımlanabilmektedir. Azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antrakinin, fitalosiyenin ve triarilmetan boyaların yapımında kullanılan başlıca kromoforlardır (Zille, 2005; Wang ve ark., 2009a).

2.2. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması

Tüm aromatik bileşikler elektromanyetik spektrumun görünür bölgesindeki (350-700 nm) ışığı kısmen ya da tamamen soğurma yeteneği olan maddelerdir. Aromatik maddelerden renklendiriciler, boyar maddeler ve pigmentler olarak sınıflandırılırlar. Bu terimler arasındaki fark çok kesin olmayıp, pigmentler bazen boyar maddelerin bir grubu olarak da kabul edilmektedir. İdeal pigmentler, uygulandıkları ortamda hiç çözünmeyen bileşikler olup substratına, polimer veya plastik gibi bir katkı maddesiyle bağlanır. Boyar maddeler ise tekstil, deri, kağıt, saç gibi çeşitli substratlara tamamen ya da kısmen çözündüğü bir sıvı içinde uygulanır. Pigmentlerin aksine, boyar maddelerin kullanıldığı substrata karşı özel bir ilgisinin olması gerekmektedir.

Ticari olarak kullanılan boyalar 1924'ten itibaren "Society of Dyers and Colourists" ve "American Association of Textile Chemists and Colourists" tarafından her üç ayda bir yayınlanan renk indeksinde (C.I), renklerine, yapılarına ya da uygulama yöntemlerine göre sınıflandırılmaktadır. Son yayınlanmış bir renk indeksinde 13.000 civarında farklı boya belirtilmiştir (Zille, 2005; <http://www.colour-index.com>). Renk indeksinde boyalar uygulama tiplerine göre asit, reaktif, direk, bazik, mordant, dispers, pigment, vat, ingrain, kükürt, solvent boyalar şeklinde sınıflandırılmaktadır (Christie, 2001). Şekil 2.1.'de bazı boyaların kimyasal yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Bazı boyaların kimyasal yapıları (Guo ve ark., 2007)

Asit boyalar

Yapılarındaki sülfonik asit nedeniyle suda yüksek oranda çözünürler. İyonik formda, ipliğin pozitif grubu ($-NH_3^+$) ve boyanın negatif yükü arasında reaksiyon gerçekleşerek van der Waals, bipolar ve hidrojen bağları oluşur. Bu boyalar anyonik bileşikler olduğundan azot içeren yün, poliamid, ipek ve modifiye akrilik kumaşların boyanmasında kullanılırlar. En yaygın olan yapıları azo, antrakinon ve triarilmetandır (Kiernan, 2001).

Reaktif boyalar

Pamuk, yün, ipek ve naylondaki $-OH$, $-N$ ya da $-SH$ gruplarıyla kovalent bağ yaparlar. Bu boyaların kullanıldığı boyama işlemi sırasında, reaktif grupların hidroliz olması nedeniyle, boyanın %10-50'si kumaşla reaksiyona giremez ve boyama tanklarında kalır. Bu nedenle renkli atık su problemi özellikle reaktif boya kaynaklı olmaktadır. En yaygın yapıları, azo, metal bileşikli azo, antrokinon ve fitalosiyandır (Zee, 2002).

Direkt boyalar

En yaygın olanları sülfonatlı azo boyalardır ve yıkama sırasında renk kaybedildiğinden dolayı, 1600 direkt boyadan sadece %30'u üretilmektedir (Zille, 2005; Zee, 2002).

Bazik boyalar

Bu boyaların $-NR_3^+$ ya da $=NR_2^+$ gibi fonksiyonel grupları ile akriliklerin negatif yükleri arasındaki güçlü etkileşim sonucunda boyanma gerçekleşir. Renk indeksindeki boyaların %5'ini oluştururlar. En fazla bulunan yapıları azo, diarilmetan, triarilmetan ve antrakinondur (Zille, 2005; Zee, 2002).

Mordant boyalar

Bunlar genellikle sodyum ya da potasyumdikromat tuzlarıdır. Kumaştan renklerinin solması zordur, renk sabitleyici ajan olarak etkilidirler. Yün, deri, ipek ve modifiye selüloz liflerini boyamak için kullanılır. Mordant boyalarda en fazla bulunan yapılar azo, okzazin ya da triarilmetandır (Zille, 2005; Zee, 2002; Kiernan, 2001).

Dispers boyalar

-NO₂ ve -CN gibi fonksiyonel grupları nedeniyle noniyonik yapıda olup, suda zor çözünürler. Daha çok polyester boyanmasında kullanılırlar. Dispers boyalarda genellikle azo, nitro, antrokinonlar, ya da metal kompleksi yapıları bulunmaktadır. (Zille, 2005; Kiernan, 2001).

Pigment boyalar

Bunlar suda çözünmeyen non iyonik bileşikler ya da tuzlardır. Renk indeksinde (C.I) yer alan ticari boyaların %25'ini oluştururlar. Uygulama sırasında kristal ya da partiküllü yapılarını korurlar. Çoğu azo ya da metal kompleks fitalosiyanınleridir. (Zille, 2005; Kiernan, 2001).

Vat boyalar

Suda çözünmeyen ancak alkali indirgenmeyle (sodyum hidroksit varlığında) çözünür hale gelebilen boyalardır. Selüloz liflere van der Waals bağlarıyla bağlanır ve hidrojen peroksitle oksitlenerek çözünmeyen forma dönüşürler. Plastiklerin renklendirilmesinde kullanılırlar. Antrakoninler ve indigolar en yaygın olanlardır (Zille, 2005; Kiernan, 2001).

İngrain boyalar

İngrain, in situ oluşan bütün boyalar için kullanılan bir terimdir. Azo grubu boyalardır. Kimyasal öncüller halinde uygulanırlar ve irreversibil kimyasal değişimle birlikte selüloz liflerine tutunarak soldurmazlık özelliği kazandırılırlar. Boya molekülleri lif yapısındaki hidroksil veya amino gruplarına bağlanır. (Zille, 2005; Zee, 2002).

Kükürt boyalar

Aromatik aminlerle sülfür ya da sodyum polisülfürlü fenollerin ısıtılmasıyla oluşan kompleks polimerik aromatiklerdir. Tüm dünyada üretilen boyaların %15'ini oluştururlar. Kükürtlü boyama da vat boyama gibi redüksiyon ve oksidasyon işlemleri gerektirir. Genel olarak pamuk boyamasında kullanılır (Zille, 2005; Kiernan, 2001).

Solvent boyalar

Plastik, cila, mürekkep gibi katı ve sıvı maddelerin renklendirilmesinde kullanılan noniyonik boyalardır. Tekstil boyamalarında fazla kullanılmazlar. Yapılarında en fazla diazo, triarilmetan, antrakonin ve fitalosiyanın bileşikleri bulunmaktadır (Zille, 2005).

2.3. Tekstil Boyar Maddeler ve Atıklarının Çevre Üzerine Olumsuz Etkileri

Tekstil endüstrisi, boyama işlemlerinde kullanılan yüksek miktarda su nedeniyle en büyük sıvı atık üreticilerinden biridir. Dünyada her yıl 280.000 ton tekstil boyasının endüstriyel atık su olarak çevreye boşaltıldığı tahmin edilmektedir (Jin ve ark., 2007). Boyar maddelerin çoğu, suda 1 mg/L konsantrasyonda bile kendini göstermektedir. Tekstil endüstrisi atık suyunda en az 10-200 mg/L oranında boyar madde bulunur (O'Neill ve ark., 1999). Yüksek seviyede renkli olan tekstil atık suları, çevreye boşaltıldığında özellikle sucul ekosistemlerde görüntü problemi yaratmasının yanı sıra derin seviyelere ışık penetrasyonunun engelleyerek fotosentezin azalmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla oksijen çözünürlüğünün ve su kalitesinin azalmasına neden olur (Asad ve ark., 2007; Moosvi ve ark., 2007). Ayrıca, tekstil boyaları ve atıklarının, yaban hayatı için bir yaşam ortamı sağlayan toprak erozyonuna engel olan ve toprak verimliliği açısından organik madde sağlamak gibi çok önemli ekolojik işlevleri olan çeşitli bitki türleri üzerine toksik etki göstererek çimlenme oranları ve biyokütle üzerine negatif etkileri olduğu rapor edilmiştir (Ghodake ve ark., 2009; Kapustka ve Reporter, 1993).

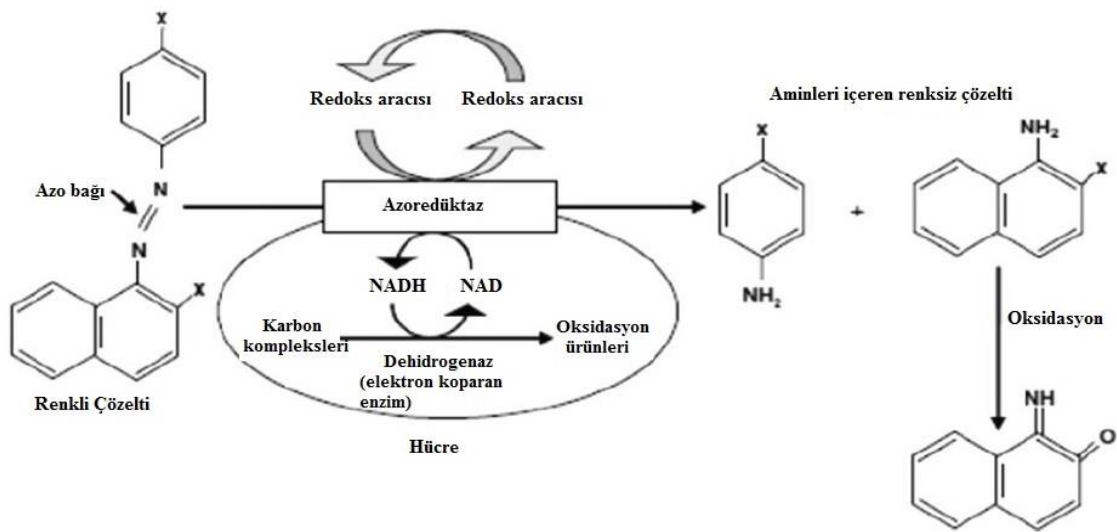
2.4. Boyar Maddelerin Toksisitesi

Boyar maddelerin toksisitesi çok sayıda araştırmada incelenmiştir. Boyaların toksik etkileri (öldürücü etki, genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite) balık, alg gibi akuatik organizmalardan memelilere kadar farklılık göstermektedir ve akut toksisiteleri genellikle düşüktür. Alglerin gelişim testinde, 1mg/L den daha düşük konsantrasyondaki boyaların, gelişimi etkilemediği bildirilmiştir (Zee, 2002). *Salmonella typhimurium* ile yapılan testlerde boyaların %28'inin mutajenik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Schneider ve ark., 2004). Balık deneylerinde 3000 ticari boyar maddenin %2'sinin, farelerde yapılan toksisite çalışmalarında ise boyar

maddelerin %1'inin ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Bu nedenle insanda da akut boyar madde toksisitesine bağlı ölümlerin çok düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir (Zee, 2002). Fakat insanlarda boyalara karşı akut duyarlılığın sık görüldüğü ve özellikle dispers boyaların egzema, kontakt dermatit gibi allerjik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Seidenari ve ark., 2002).

Boyar maddelerin kronik etkisi uzun yıllardır araştırılmaktadır. Araştırmacılar geleneksel olarak çoğunlukla gıda boyalarının ve azo bileşiklerinin etkileri üzerinde durmuşlardır.

Azo boyalarının indirgenmesi ile azo bağ veya bağlarının kırılması aromatik aminlerin oluşumuna neden olduğu ve oluşan çeşitli aromatik aminlerin ise mutajenik ve karsinojenik etkiye sebep olduğu bildirilmiştir. Azoredüktaz enziminin aktivitesi sonucu azo bağlarının kırılması ile toksik aromatik aminlerin oluşumu Şekil 2.2 de gösterilmiştir. Memelilerde azo boyaların metabolik aktivasyonu (indirgenme) bağırsak florasındaki anaerobik bakteriler aracılığıyla veya karaciğer ve böbreklerde gerçekleşmektedir. İndirgenme sonucu oluşan aromatik aminlerin özellikle idrar kesesinde kansere yol açtığı bildirilmiştir. Kansereleşme metabolizmasının ise muhtemelen aromatik aminlerin N-asetilasyonu ve N-hidroksilasyonu sonucu oluşan açiloksi nedeniyle başladığı ve oluşan aminlerin DNA ve RNA'daki N ve C gruplarını değiştirerek, mutasyona ve tümör oluşumuna yol açabileceği belirtilmiştir (Brown ve DeVito, 1993).



Şekil 2.2. Bakteriler tarafından azo boyaların renginin giderimi için öngörülen mekanizma (Khan ve ark., 2012)

2.5. Boyar Madde Giderim Teknikleri

2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler

Boya imalathanelerinden çıkan atık sudaki boya miktarının 0.6-0.8 g/L gibi düşük seviyelerde bulunması nedeniyle asıl kirliliğin atık su içerisindeki boya miktarı olmayıp boyanın kendisinin kalıcı olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Jadhav ve ark., 2007). Bu durum, atık su içerisindeki boyaların renk giderimi için etkili boya giderim teknolojilerinin araştırılıp geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Boya içeren atıktan boyanın giderimi için fizikokimyasal yöntemlerin kullanımıyla ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup adsorbsiyon, kimyasal presipitasyon, filtrasyon, fotoliziz, kimyasal oksidasyon ve redüksiyon, elektrokimyasal uygulama gibi çeşitli fiziksel/kimyasal yöntemler kullanılarak atık sulardaki boyanın giderimi gerçekleştirilebilmektedir (Dos Santos ve ark., 2007).

Koagülasyon/çöktürme temeline dayalı fiziksel metodların, özellikle kükürtlü ve dispers boyaların gideriminde etkili olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık direkt, asit, reaktif ve vat boyaların çok düşük koagülasyon/çöktürme gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, düşük renk giderme etkinliği ve yüksek miktarda çamur oluşumunun da bu tekniğin uygulanmasını sınırladığı belirtilmiştir (Vandevivere ve ark., 1998).

Adsorbsiyon metodları, çok çeşitli boyaların gideriminde yüksek verimlilikleri nedeniyle büyük ilgi çekmiştir. Hedef bileşiklere afinitesi yüksek ve yenilenebilen adsorbanlar tercih edilerek kullanılmaktadır (Subramaniam ve ark., 2009). Aktif karbon çeşitli boya tipleri için çok etkili bir adsorban olmasına rağmen yüksek maliyet nedeniyle çok sık kullanılmamaktadır (Robinson ve ark., 2001). Yöntemi daha ekonomik yapmak için, bazı araştırmacılar turba, bentonit kil, uçucu kül, polimerik reçineler, iyon değiştiricilerin yanı sıra mısır/mısır koçanı, mısır sapı, buğday samanı gibi biyolojik düşük maliyetli adsorban malzemelerini kullanmıştır (Ramakrishna ve Viraraghavan, 1997). Ancak bu adsorbanların, yenilenme ya da yok edilmesi ve işlem sonrası yüksek çamur üretimi ile ilgili sorunlar yaşanmasından, boyaların büyük bölümünde düşük etkinlik sağlanmasından ve yüksek maliyetinden dolayı pratikte kullanımı sınırlı olmuştur (Anjaneyulu ve ark., 2005).

Ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters osmoz gibi filtrasyon yöntemleri suyun yeniden geri kazanımı için kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde verim, filtre seçimine, atık suyun kimyasal kompozisyonuna ve işlem için gerekli spesifik sıcaklığa bağlı

olmaktadır (Dos Santos ve ark., 2007). Ancak, membranların maliyetinin yüksek olması, potansiyel membran kirliliği kaynaklı ikincil atık üretimi oluşması gibi bazı önemli dezavantajlara sahiptir (Dos Santos ve ark., 2007; Robinson ve ark., 2001).

Kimyasal oksidasyon yöntemleri ile boya moleküllerinin yıkımı ya da bozunması sağlanmaktadır. Bu yöntemde ozon (O_3), hidrojenperoksit (H_2O_2) ve permanganat (MnO_4^-) gibi oksitleyici ajanlar kullanılmaktadır. Bu oksitleyici ajanların varlığında bir bileşik veya bileşik grubunun kimyasal kompozisyonunda modifikasyon gerçekleştirilerek boya moleküllerinin bozulmaya karşı hassas hale getirilmesi sağlanır (Metcalf, 2003). Ozonlama yönteminin pek çok reaktif boyada etkili olduğu ve gazdan dolayı reaksiyon hacmi değişmediği için renk giderim veriminin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunların yanı sıra kısa süreli uygulanabilmesi, düşük kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) giderim kapasitesine sahip olması ve ozon maliyetinin yüksek olması bu tekniğin pratikte kullanılmasını sınırlandırmaktadır (Anjaneyulu ve ark., 2005).

Fenton reaksiyon metodu, nispeten ucuz olmasının yanı sıra yüksek KOİ giderim kapasitesine sahiptir ve çözünür boyaların yanı sıra çözünmeyen boyaların da renk gideriminde etkili olabilmektedir. Ancak yüksek çamur üretimi, yöntemin kullanımını sınırlamaktadır (Robinson ve ark., 2001).

H_2O_2/UV yöntemi, en etkili İleri Oksidasyon Prosesi (AOP) teknolojisidir. Özellikle yüksek renk giderimi sağlaması (%95'in üzerinde), çamur oluşturmaması, kısa bekleme süresi ve yüksek KOİ giderim kapasitesi nedeniyle etkili bir yöntemdir (Alaton ve ark., 2002). Fakat ileri derecede renkli atık sularda dispers ve vat boyalara etkisinin daha az olması, istenmeyen yan ürünler meydana getirmesi, UV ışınlarının verimsiz kullanılmasıyla işlem maliyetinin artması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Pearce ve ark., 2003).

Elektrokimyasal oksidasyon, organik bileşikleri yok etmesi ve zararsız ürünler oluşturması gibi özellikleriyle çok etkili bir yöntemdir. Fakat elektrik gereksiniminden dolayı maliyetinin yüksek olması bu yöntemin kullanılmasını sınırlamaktadır (Morawski ve ark., 2000).

Renk giderim tekniklerinin büyük bir kısmı, çamur içine rengin yoğunlaştırılmasını veya renkli moleküllerin tamamen yok edilmesini kapsamaktadır. Sonuç olarak, boya atık suyu ile başa çıkmak için kullanılan tüm fiziksel/kimyasal yöntemlerin, ekonomik olmaması, boyanın yapısından dolayı dirençli azo boyaları

ve/veya boyaların organik metabolitlerinin tamamen giderilememesi, çamur oluşumu, istenmeyen ara metabolitlerin ortaya çıkması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle yüksek miktarda çamur oluşumu ise ikincil bir kirlilik problemine neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2004).

2.5.2. Mikrobiyal Teknikler

Tekstil atık suları kaynaklı endüstriyel boyaların yıkım ve renk gideriminde kimyasal/fiziksel yöntemlere göre mikrobiyal arıtım yöntemlerinin kullanılması bazı önemli avantajları beraberinde getirmektedir; çevre dostu olması, maliyetin düşük olması, az çamur oluşturma özelliği, tam mineralizasyon ya da non-toksik son ürünün oluşması, fizikokimyasal yöntemlere göre yüksek miktarda su kullanılmaması (Saratale ve ark., 2009a; Rai ve ark., 2005). Mikrobiyal boya giderimi başlıca iki mekanizma ile meydana gelebilir. Bu mekanizmalar biyosorpsiyon ve enzimatik degradasyon veya her iki mekanizmanın kombinasyonu şeklinde olabilmektedir (Wu ve ark., 2012).

2.5.2.1. Biyosorpsiyon

Alg, maya, filamentli fungus ve bakteri biyokütlesi, biyosorpsiyon ile çeşitli boyaların renk gideriminde kullanılmıştır. Mikroorganizmaların biyosorpsiyon kapasitesi hücre duvarının heteropolisakkarit ve lipit bileşenlerine bağlıdır. Amino, karboksil, hidroksil, fosfat ve diğer yüklü gruplar gibi farklı fonksiyonel grupları içeren bileşenler, hücre duvarı ve azo boya arasında güçlü çekim kuvvetinin oluşmasını sağlamaktadır (Vitor ve Corso, 2008; Aksu ve Dönmez, 2003). Örneğin *Aspergillus foetidus* suşunun karbon kaynağı varlığında eksponansiyel fazda çeşitli azo boyalarında biyosorpsiyonla %98'in üzerinde renk giderimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Sumathi ve Phatak, 1999). Ayrıca otoklavlama ya da bazı ön işlemler uygulanarak ölü veya bu işlemler uygulanmadan canlı hücrelerle adsorpsiyon yöntemi ile boya giderimi yapılabilmektedir. Yüksek sıcaklık uygulanması ile hücrenin yüzeyindeki genişleme hücrenin parçalanması ile sonuçlanırken asit, formaldehit, NaOH, NaHCO₃ veya CaCl₂ gibi kimyasallarla muamele ise mikroorganizmaların yüzeyinde değişime ve bağlanma bölgelerinin kapasitelerinde artmaya veya azalmaya neden olmaktadır. Bu bağlanma bölgelerinin artması veya azalması organizmanın adsorpsiyon kapasitesini doğrudan etkilemektedir. Ölü ve canlı hücrelerle biyosorpsiyon yöntemleri karşılaştırıldığında,

ölü hücrelerin canlı hücrelere göre besin gerektirmeme, uzun süre saklanabilme ve kullanılabilme, organik çözücüler ve sürfektanlar kullanılarak rejenere edilebilme gibi avantajları bulunmaktadır (Fu ve Viraraghavan, 2001). Ayrıca biyosorpsiyon etkinliği, pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, temas süresi, boya konsantrasyonu, boya yapısı ve mikroorganizmanın tipi gibi koşullara da bağlı olabilmektedir (Latif ve ark., 2010).

2.5.2.2. Enzimatik degradasyon

Azo boyaları, azo bağları ihtiva ettiğinden dolayı eksik elektrona sahip ksenobiyotik bileşikleridir. Bu bileşikler genellikle, sülfanik asit (SO_3^-) veya diğer elektron çekici ve elektron eksikliği meydana getiren gruplara sahip olduklarından dolayı mikroorganizmalar tarafından zor yıkılmaktadır. Ancak uygun koşullar sağlandığı zaman azo boyaların, redüktazlar tarafından degradasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Saratale ve ark., 2011; Kuberan ve ark., 2011). Azo boyalarının anaerobik mikrobiyal yıkım mekanizmasında, anaerobik azoredüktaz yardımıyla azo bağı kırılmakta ve aromatik aminler oluşmaktadır. Azo redüksiyonunun hücre dışında bulunan boya ve hücre içindeki azoredüktaz arasında bir elektron mekiği gibi rol oynayan redoks araçlarının katılımıyla gerçekleştiği kabul edilmektedir (Şekil 2.2). İndirgenen araçlar, elektron eksikliği bulunan azo boyalara elektron transferini gerçekleştirirler. Azoredüktaz ile redüktif kataliz sadece FADH, NADH ve NADPH varlığında gerçekleşmektedir (Ramalho ve ark., 2002). Azo boyalarının büyük bir kısmı, yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve hücre zarından geçişini engelleyen sülfonat grupları içermektedir. Bu nedenle indirgenme aktivitesi hücre içine boyanın transferi temeline dayanmamaktadır. Azoredüktaz enzimi ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, azoredüktaz aktivitesinin, farklı gen tipleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle azoredüktaz aktivitesinin, farklı mikroorganizmalarda ve farklı kültür koşullarına bağlı olarak birden fazla redüktaz ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Solis ve ark., 2012).

Azo bağlarını indirgeyen çeşitli azoredüktazlar tanımlanmıştır; FMN-bağımlı redüktazlar (Dos Santos ve ark., 2007), FMN-bağımsız redüktazlar (Bürger ve Stolz, 2010), NADH-bağımlı redüktazlar (Misal ve ark., 2011), NADPH-bağımlı redüktazlar (Misal ve ark., 2011) ve NADH-DCIP redüktazlar (Saratale ve ark., 2011).

Azoredüktazlar, bakteri, alg ve maya gibi farklı mikroorganizmalarda bulunabilmektedir (Solis ve ark., 2012).

Azo boyaların oksidatif degradasyonu, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz, lakkaz, tirozinaz, N-demetilaz, boya giderim peroksidazları, sellobiyoz dehidrogenaz gibi peroksidazlar ve fenoloksidazlar tarafından katalizlenmektedir. Bu oksidazlar filamentli funguslar, bakteri ve mayalarda bulunmaktadır (Solis ve ark., 2012). Lakkazlar, spesifik olmayan oksidasyon özelliği nedeniyle yüksek biyolojik iyileştirme kapasitesine sahiptir. Ayrıca kofaktöre gereksinim duymama ve elektron alıcısı olarak hazır oksijeni kullanma özelliğine de sahiptirler (Telke ve ark., 2011).

Lignin peroksidaz aracılığıyla sülfonatlı azo boyalarının degradasyonu gerçekleşmektedir. Enzim, fenolik halkada iki adet ardışık tek elektron oksidasyonu gerçekleştirerek azo bağı taşıyan karbonyum iyonu, kinon ve fenildiazin oluşumuna yol açar. Oluşan bu ürünler daha sonra oksijen ile fenil radikaline oksitlenirken beraberinde azo bağı da N₂ formunda elimine olur (Chivukula ve ark., 1995).

Mangan peroksidaz'ın katalitik döngüsü, H₂O₂ aracılığı ile Mn³⁺'nin Mn²⁺'a oksidasyonu ile başlar ve organik asitler aracılığıyla stabilize edilir. Mn³⁺ organik asit kompleksi aktif bir oksidan olarak işlev görür. Bu şekilde, mangan peroksidaz ligninin yanı sıra tekstil boyalarının da okside edilmesini sağlar (Husain, 2010).

Yukarıda bahsedilen farklı enzim aktiviteleri ile çeşitli koşullara adapte olmuş mikroorganizmalar, boyaların rengini giderebilme yeteneğindedir.

Enzimatik yolla boya renk giderimi ayrıca, kademeli olarak boya konsantrasyonu yükseltip enzimatik aktivite indüklenerek adaptasyon sağlanmasıyla da gerçekleştirilebilir. Söz konusu enzim indüksiyonu boya spesifiktir. Enzim indüksiyonu ile biyolojik iyileştirmenin genel amacı, izole mikroorganizmaların çeşitli yöntemlerle doğal degradasyon kapasitesini arttırmaktır (Kodam ve ark., 2005).

Son çalışmalar, boyanın varlığı ile enzimatik aktivitenin görüldüğünü ortaya koymuştur. Bir bakıma bu aktivite, renk giderim sürecinin sonunda daha yüksek bir değere ulaşacaktır. Örneğin, Reaktif Siyah 5 boyası *Debaryomyces polymorphus*'ta mangan peroksidaz aktivitesini indükler. Aynı zamanda, bir değil birkaç enzimin renk giderim işlemi sırasında indüklenebilir olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin *Trametes pubescence*' de Reaktif Mavi 49 boyasının varlığında indüklendiği bildirilmiştir (Martorell ve ark., 2012).

Farklı bir çalışmada, *Brevibacterium* sp. strain VN-15 suşu ile yapılan çalışmada çeşitli azo boyalarının renk gideriminin tirozinaz enzim aktivitesi ile gerçekleştiği, lakkaz ya da peroksidaz aktivitesinin gözlemlenemediği rapor edilmiştir (Franciscon ve ark., 2012).

2.6. Mikrobiyal Boya Giderim Mekanizmaları

2.6.1. Anaerobik Giderim

Genel olarak azo boyalarının mikrobiyal degradasyonu, bir azoredüktaz enzimi yardımı ile anaerobik koşullar altında azo bağlarının (N=N) dört elektron transferiyle kırılması sonucu gerçekleşir (Saratale ve ark., 2011). Özellikle azo bağları başta olmak üzere sentetik boyaların anaerobik koşullar altında yıkımı ve renk giderimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas stutzeri* ve *Aeromonas hydrophilia* türleriyle anaerobik koşullarda azo boyalarında renk gideriminin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Carliell ve ark.,1995). Razo-Flores ve ark. (1997) metanojenik organizmaların mordant orange 1 ve azodisalisilat olmak üzere 2 farklı azo boyar maddesinde bazı aromatik amin yapılarını CO₂, CH₄, NH₃ vb. son ürünlerine kadar parçalayabildiğini göstermiştir. Mordant orange 1 boyasında azo bağının kopması sonucunda, 5-aminosalisilikasit (5-ASA) ve 1-4, fenilendiaminin oluştuğu ve uzun adaptasyon periyodundan sonra, 5-ASA derişiminin oldukça azaldığı ve bu durumun boyar maddenin daha ileri parçalanmaya uğrayarak son ürünlere (metan ve amonyak) dönüştüğü, hatta kosubstrat ilavesinin durdurulduğu ve boyar madde ilavesinin artırıldığı koşullarda dahi boyar maddenin parçalandığı belirtilmiştir. Azodisalisilatın, yapısında bulunan azo grubunun, ortamda bir kosubstrat (yani azo bağın indirgenmesi için gerekli olan elektronları sağlayan bir elektron verici) olmadan da yıkıldığı ve 5-ASA'nın son ürünlerine kadar parçalanması azo bağının indirgenmesi için gerekli olan elektronları sağladığı rapor edilmiştir. Bu çalışma ile, doğada tamamen parçalanabilen azo boyar madde üretiminin yapılabileceği ve böylece boyar maddelerin parçalanması sırasında oluşan toksik ara ürünlerin birikiminin önlenebileceği gösterilmiştir.

Kudlich ve ark. (1997), *Sphingomonas* sp. BN6 suşunda azo boyar maddelerin anaerobik ortamda parçalanmasında rol oynayan enzimatik olayları ve yapay redoks ara maddelerinin azo boyalarının indirgenme hızlarına etkilerini araştırmışlardır. BN6

suşunda sitoplazmik ve membrana bağlı azoredüktaz aktivitesi saptandığı ve azo boyalarındaki indirgenme hızının sülfonatlı antrakinon boylarıyla arttığı rapor edilmiştir. *Alcaligenes faecalis* ve *Commamonas acidovarans*'ın dahil olduğu karışık kültür kullanılarak yapılan çalışmada, anaerobik koşullarda tekstil boyar maddelerinin renklerinin giderim hızlarının yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca renk giderim hızının ortama ilave edilen karbon ve enerji kaynağına bağlı olduğu, laktoz ve nişasta gibi ucuz ve kolay elde edilebilen karbon kaynakları kullanıldığı zaman, bir tekstil fabrikasından alınan çıkış suyunun renginin üç gün sonra %76 sının giderildiği belirtilmiştir (Nigam ve ark., 1996).

2.6.2. Aerobik Giderim

Son yıllarda, azo boyalarının aerobik olarak rengini giderebilen çeşitli bakteri türlerinin izolasyonu yapılmıştır. Aerobik koşullar altında mono- ve dioksijenaz enzimlerinin, aromatik organik bileşiklerine oksijen eklenmesini ve halka açılmasını katalizlediği rapor edilmiştir. Ayrıca bazı aerobik bakterilerin oksijen varlığında azoredüktaz aktivitesi ile azo bileşiklerini indirgeyerek aromatik aminleri meydana getirebildiği bildirilmiştir (Saratale ve ark., 2011).

Aerobik koşullar altında farklı taksonların kullanılmasıyla boyaların renklerinin giderimi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Aerobik ve toprakta yaşayan *Flavobacterium* türünün aerobik şartlarda 4,4-dikarboksi azobenzeni aminbenzoik aside indirgendiği saptanmıştır. Bakterinin aynı zamanda 4,4-dikarboksi azobenzeni karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullandığı belirtilmiştir (Kulla ve ark., 1981). Kodam ve ark. (2005) KMK48 bakteri suşuyla yapmış oldukları çalışmada sülfonatlı azo boyalardan Reaktif Kırmızı 2, Reaktif Kırmızı 141, Reaktif Turuncu 4, Reaktif Turuncu 7 ve Reaktif Violet 5'in aerobik koşullarda %100 renk gideriminin gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Mikrobial biyofilmle yapılan diğer bir çalışmada ise acide orange 7 boyasının aerobik koşullarda tamamen mineralize edildiği belirtilmiştir (Coughlin ve ark., 2002).

Beyaz bir çürükçül fungus olan *Phanerochate chrysosporium*'un Orange 2, Tropaeolin O ve Congo Red azo boyar maddelerini aerobik koşullar altında parçaladığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada Boyar maddenin çoğunun, fungus miseli tarafından adsorplandığı ve az miktarının da parçalanmaya uğradığı rapor edilmiştir. Fungusun

bulunduğu ortama lignin ve azo boyar maddesi kullanılarak azo boyar maddesini biyolojik parçalanmasında lignin peroksidaz enziminin rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır. Lignin peroksidaz enzimi saflaştırılıp, boyar maddenin bulunduğu ortama eklendiğinde Orange 2 ve Tropaeolin O'nun parçalandığı, Congo Red'in parçalanmadığı gözlenmiştir. Lignin peroksidaz enziminin, Congo Red'in parçalanmasının başlangıç basamağında rol oynamadığı sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar, azo boyar maddesinin enzimatik parçalanmasında veya parçalanmanın başlangıç basamağında lignin peroksidaz enziminden başka enzim sistemlerinin rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır (Chung ve Stevens, 1993).

2.6.3. Anaerobik-Aerobik Giderim

Anaerobik koşullarda, azo boyar maddelerdeki, azo bağı 4 elektron alarak indirgenip kopmakta ve ilk basamakta azo boyar maddeler aromatik aminlere dönüşmektedir. Aromatik aminlerin, mutajenik ve karsinojenik maddeler oldukları ve insanlarda mesane kanseri, farelerde ise sindirim kanalındaki epitel hücre çekirdeklerinde yapı bozukluklarına yol açtıkları bildirilmiştir (Rafii ve ark., 1990).

Azo boyar maddelerin anaerobik parçalanma ürünleri olan aromatik ürünlerin anaerobik koşullarda daha ileri parçalanmaya uğramadığı ve azo boyar maddelerin biyolojik parçalanmalarında anaerobik-aerobik kombine sistemlerin gerektiği, böylece azo boyar maddelerin biyolojik olarak tamamının en son ürünlere dönüşerek giderilebileceği belirtilmiştir (Haug ve ark., 1991). Azo boyar maddelerin anaerobik-aerobik kombine yıkım sistemlerinin boyar madde mineralizasyonu için öneminin ortaya çıkması sonucunda söz konusu sistem ile boya renk giderimi ve yıkımı üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Haug ve ark. (1991) sülfonatlı bir azo boyar maddesi olan Mordant Yellow 3'ün anaerobik koşullarda redüklendiği ve daha sonraki aerobik koşullarda mineralizasyonunun gerçekleştiğini bildirmiştir. Mordant Yellow 3'ün azo bağındaki redüksiyon sonucu 6-aminonaftalen-2 sülfonat ve 5 aminosalisilatın dahil olduğu aromatik aminlere dönüştüğü ve daha sonra bu aromatik aminlerin bakteriyel karışım ile aerobik şartlarda gerçekleştirilen hidroksilasyon ve halka açılması ile mineralize edildikleri rapor edilmiştir.

Franciscon ve ark. (2012), tekstil fabrikası atıksuyu arıtım tesisi aktif

çamurundan izole ettikleri *Brevibacterium* VN-15 suşu ile statik/aerobik koşullarda Reaktif Sarı 107, Reaktif Siyah 5, Reaktif Kırmızı 198 ve Direct Mavi 71 azo boyar maddelerinde renk gideriminin gerçekleştiğini bildirmiştir.

Azo boyası içeren tekstil fabrikası atık suyunun kombine anaerobik-aerobik sistemle arıtımı gerçekleştirilmiş ve anaerobik arıtım sonucunda renk gideriminin sağlandığı ve solunum inhibisyon testiyle boyar madde parçalanmasına bağlı olarak toksisitenin arttığı belirlenmiştir. HPLC analizleri sonucunda, aerobik koşullarda bu bileşiklerin giderilebildiği ya da polaritesi daha yüksek bileşiklere dönüştüğü rapor edilmiştir. Aerobik koşullarda, organik azot içeren bileşiklerin mineralizasyonu ile toplam organik azot derişiminin, aromatik aminlerin parçalanması ile azaldığı belirtilmiştir (O'Neill ve ark., 2000).

2.7. Boya Gideriminde Kullanılan Mikroorganizmalar

2.7.1. Algler

Azo boyalarının sucul ekosistem için yüksek toksisite riski oluşturmalarına rağmen alg gelişimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Acuner ve Dilek, 2004). Endüstriyel atıklar içerisinde de geliştiği gözlenen mikroalgler, renkli atık su biyoremediasyonu için iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Bakteri ve fungusların aksine güneş ışığı, havanın karbondioksit ve azotunu kullanabilmeleri ve karbon kaynağı gerektirmemeleri nedeniyle kültürasyonlarının daha ucuz olması gibi avantajları bulunmaktadır (Omar, 2008; Saha ve ark., 2010). Alglerin renk giderim mekanizmaları, enzimatik yıkım, adsorbsiyon veya her ikisini birden içerebilmektedir. Algler, bakteriler gibi azo bağlarını azoredüktaz aktivitesi ile indirgeyerek kırabilmektedir (Omar, 2008). Ayrıca alglerin, oksidatif enzimleri ile de renk giderimi sürecinde rol oynadıkları bildirilmiştir (Priya ve ark., 2011). Bazı *Chlorella* ve *Oscillatoria* türlerinin azo boyalarını aromatik aminlere ve sonrasında da CO₂ ya da daha basit organik bileşiklere parçaladıkları rapor edilmiştir (Acuner ve Dilek, 2004; Jinqi ve Houtian, 1992).

Algler enzimatik yıkımın yanı sıra biyosorpsiyon yoluyla boya gideriminde kullanılmışlardır. Alglerin adsorbsiyon etkinliğinin, boya yapısı, organizmanın türü ve pH değerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Mohan ve ark., 2008). Hem canlı hem de ölü algler, atık sudan renk gideriminde düşük pH değerlerinde kullanılmıştır. pH 2

Değerlerinde *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* ve ölü *Spirogyra*'da yüksek adsorbsiyon kapasitesi gözlemlenmiştir (Ergene ve ark., 2009; Aksu ve Tezer, 2005; Sivrajasekar ve ark., 2009). Renk giderimi için diğer bir alternatif immobilize mikroalglerdir. Örneğin, *C.vulgaris* ve *S.quadricauda* türlerinin aljinat ile immobilize edilmesi ile tekstil boyalarının rengini yüksek oranda giderebildikleri belirlenmiştir (Chu ve ark., 2009; Ergene ve ark., 2009). *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* ve *Oscillatoria tenui* türleri ile 30 dan fazla azo bileşiğinin daha basit aromatik bileşiklere yıkılarak renk giderimlerinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Yan ve Pan, 2004).

2.7.2. Mayalar

Maya suşları, boyar maddelerin biyoremediasyon uygulamalarında kullanılmıştır. Mayalar yüksek oranda boya akümülyasyon kapasitesine sahip olma, çabuk gelişme, filamentli funguslardan daha hızlı renk giderimi sağlama, elverişsiz koşullarda canlılıklarını sürdürebilme gibi çeşitli avantajlara sahip oldukları için farklı azo boyalarının renk giderimi çalışmalarında kullanılmıştır (Martorell ve ark., 2012). Mikroalgler gibi mayalarda da renk giderimi adsorbsiyon, enzimatik yıkım veya her iki mekanizmayla gerçekleştirilmektedir. Mayalarla adsorbsiyon şeklinde boya gideriminin düşük pH değerlerinde daha etkili gerçekleştiği belirtilmiştir. Direct violet 51 boyasının *Candida albicans* tarafından maksimum akümülyasyonunun pH 2.5 değerinde gerçekleştiği belirtilmiştir (Vitor ve Corso, 2008).

Maya hücreleri, glukoz veya daha kolay metabolize olabilen karbon ve enerji kaynakları olmadan gelişemedikleri için enzimatik renk giderimi süreçleri karbon kaynağı gerektirmektedir. Azo boyalarının varlığında, maya hücrelerinde mangan perosidaz, tirozinaz gibi oksidazların ve NADH-DCIP redüktaz gibi redüktazların üretiminin indüklendiği rapor edilmiştir (Waghmode ve ark., 2011; Martorell ve ark., 2012).

Askomiset maya türlerinden *Candida tropicalis*, *Debaryomyces polymorphus*, *Candida zeylanoides*, *Issatchenkia occidentalis*'in farklı azo boyalarının yıkımı ile renk giderimi gerçekleştirdikleri belirtilmiştir (Yang ve ark., 2003; Martins ve ark., 1999; Ramalho ve ark., 2002; Ramalho ve ark., 2004). *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-463 suşunun malaşit yeşili ve metil red boyalarının rengini giderdiği bildirilmiştir (Jadhav ve ark., 2007). Ayrıca *S. cerevisiae* hücrelerinin melas ortamında reaktif tekstil

boyalarından Remazol Blue, Remazol Black B and Remazol Red RB'nin biyoakümülyasyonunu gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Aksu, 2003). Kurutulmuş farklı maya suşları ile yapılan biyosorpsiyon çalışmasında ise, *Candida lipolytica*'nın Remazol Blue boyasını hücre gramı başına 250 mg'a kadar adsorbe edebildiği rapor edilmiştir (Donmez, 2002; Aksu ve Donmez, 2003).

2.7.3. Funguslar

Flamentli funguslar, hemen hemen her ortamda bulunabilen ve farklı karbon ve azot kaynaklarına bağlı olarak metabolizmalarını hızla adapte ederek hayatta kalabilen organizmalardır. Fungal sistemlerin lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlerinin non-spesifik özelliklerinden dolayı renkli atıkların giderimi için oldukça uygun oldukları kabul edilmektedir (Ezeronye ve Okerentugba, 1999). Flamentli fungusların boya renk giderimi sürecinde kullanımının, kltrasyonunun düşük maliyetli olması ve hızlı adaptasyon kabiliyetinden dolayı boyanın tamamen mineralize olma olasılığının yüksek olması gibi avantajları vardır (Asgher ve ark., 2008). Boya renk giderimi çalışmalarında en fazla kullanılan *Phanerochaete* türlerinin yanısıra *Trametes*, *Bjerkandera*, *Aspergillus*, *Pleurotus* ve *Phlebia* cinslerine ait türler de çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Fungusların kullanımı ile boya renk giderimi, adsorbsiyon veya enzimatik yıkım ile gerçekleştirilebilmektedir. Fungusların adsorbsiyon ile boya renk giderimi çalışmalarında, renk gideriminin boya konsantrasyonuna bağlı olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda boya adsorbsiyonunun azaldığı belirlenmiştir. Örneğin; Acid red 18 ve Reaktif Siyah 5 boyalarının *Schizophyllum commune* suşu tarafından adsorbsiyonu 10 ppm ve 100 ppm boya konsantrasyonlarında denenmiş ve sırasıyla adsorbsiyon oranlarının %92 ve %40 olduğu rapor edilmiştir (Renganathan ve ark., 2006).

Flamentli fungusların enzimatik yöntemle boya renk gideriminde, fenoloksidaz ve peroksidaz enzimlerinin rol oynadığı ve bu enzimlerin aktivitesi ile azo boya ları okside ettikleri belirtilmiştir (Baldrian, 2006). Ayrıca flamentli fungusların gelişimi, enzim üretimi ve sonrasında boya degradasyonu etkinliğinin, kültür koşulları, besin maddesi, çalkalama, zaman, pH, sıcaklık, karbon kaynağı, oksijen kaynağı gibi koşullardan etkilendiği rapor edilmiştir (Asgher ve ark., 2008). Beyaz rkl funguslarla ilgili yapılan farklı bir çalışmada, *Funalia trogii* hücre peleti kullanılarak 24

saat inkübasyon sürecinde %99 gibi yüksek renk giderim oranlarına ulaşıldığı rapor edilmiştir (Yesilada ve ark., 2002).

2.7.4. Bakteriler

Tekstil atık sularının biyoremediasyonu için en sık kullanılan mikroorganizma grubu bakterilerdir. Kültürasyonlarının kolay olması ve aerobik, anaerobik veya fakültatif koşullar altında hızlı gelişmeleri nedeniyle boya renk giderimi çalışmalarında sıklıkla kullanılmışlardır. Ayrıca bakteriler, tuzluluk, sıcaklık gibi ekstrem koşullarda hayatta kalmaya adapte olmuşlardır. Azo boyaları genellikle, aerobik koşullarda bakteriyel saldırıya dirençlidirler çünkü oksijen varlığı azo bağlarının indirgenme aktivitesini engellemektedir (Kodam ve ark., 2005). Fakat bazı aerobik bakteriyel türler oksijenden etkilenmeden veya aerobik azoredüktazları ile azo bağlarını indirgeyebilmektedirler. Bu renk gideriminin oksijence zengin ortamlara bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (Kodam ve ark., 2005). *Micrococcus sp.* organizması üzerine yapılan bir çalışmada, organizma reaktif boyaları anaerobik koşullarda 24 saat içinde dekolorize ederken, aerobik koşullar altında bu sürecin 6 saate düştüğü tespit edilmiştir (Olukanni ve ark., 2009). Mikroaerofilik koşullarda renk giderimi sonrasında aromatik aminlerin varlığı gözlenirken, aerobik koşullar altında gözlenememiştir. Aerobik sistemlerde, ilk olarak azo bağı bir azoredüktaz ile kırılmakta ve meydana gelen aromatik aminler oksidatif yollarla daha az toksik ürünlere mineralize olabilmektedir (Pandey ve ark., 2007). Lakkaz, tirozinaz ve veratril alkol, peroksidaz gibi oksidatif enzimler bakterilerde bulunmaktadır. Tirozinazın, *B.laterosporus* ve *Bacillus lentus* B1377 gibi bazı bakterilerde azo boyaların degradasyonunda rol oynadığı belirtilmiştir (Kurade ve ark., 2011; Oturkar ve ark., 2011).

Boyama süreci, yüksek sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonu gerektirdiğinden dolayı bu atıklar mikroorganizmaların yaşamı için uygun değildir. Bu nedenle, tekstil atık sularının renginin giderimi için ekstremofillerin kullanımı ilgi çekmektedir (Amoozegar ve ark., 2011).

2.8. Halofilik Arkeler

Halofilik arkeler, *Archaea* domaini *Euryarchaeota* filumu, *Halobacteria* sınıfına dahil *Halobacteriales* ordosunun tek familyası olan *Halobacteriaceae* altında

toplanmıştır. *Halobacteriaceae* ilk olarak 1974 yılında Gibbons tarafından, gelişebilmeleri için minimum 2 M NaCl gerektiren obligat halofilik mikroorganizmaları içeren familya olarak tanımlanmıştır (Savage ve ark., 2007). Günümüze kadar familya üyesi 42 cinsin identifikasyonu yapılmıştır (Euzéby, 2013).

Halofilik arkeler genel olarak; aerobik ya da fakültatif anaerobik, içerdikleri karotenoid pigmentlerinden dolayı pembe-kırmızı renk tonlarında ve çok çeşitli hücre şekillerinde bulunabilen (çubuk, kok, üçgen, kare, yamuk), katalaz ve oksidaz aktivitelerine sahip, Gram (-), kemoorganotrofik ve üremeleri için minimum 1.5 M NaCl'e ihtiyaç duyan organizmalardır (Castillo ve ark., 2007). Üremeleri için 1.5 M NaCl gereksinimleri olmasına rağmen bazı familya üyeleri deniz suyu ve kükürtçe zengin kaynak suyu gibi düşük tuzlu çevrelerden de izole edilmiştir (Rodriguez- Valera, 1979; Elshahed ve ark., 2004).

Halobacteriaceae familyası üyeleri, tuz gölleri, sodalı göller, tuzlalar ve tuzlu topraklar gibi toplam tuz konsantrasyonu, iyonik kompozisyon ve pH bakımından çeşitlilik gösteren yüksek tuzlu ortamlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Halofilik arke türlerinin büyük bir kısmı, 2.5-3 M'ın altındaki tuz konsantrasyonlarında gelişmemektedirler. 1-2 M tuzlu su içerisinde dahi hücreleri zarar görmekte ve lizize uğramaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda tuz konsantrasyonunun bulunması halofilik arkelerin gelişebilmeleri için zorunlu olmaktadır. Halofilik arkeler ayrıca yüksek pH değerlerine sahip tuzlu sularda da (Magadi gölü-Kenya ve Wadi Natürn gölü-Mısır) yoğun olarak bulunmaktadır. Tuzlu su ortamları dışında deniz kıyıları veya yüksek dağ ve düzlüklerin çorak alanları da bulunan tuzlu topraklardan da halofilik arkeler izole edilmiştir (Quesada ve ark., 1982; Kulichevskaya ve ark., 1992; Zvyagintseva ve Tarasov 1988). Halofilik arkeler doğal ortamların yanı sıra yüksek tuz içeren tuzlanmış et, deri, sos gibi yapay ortamlardan da izole edilmişlerdir (Oren, 2001).

Halofilik arkelerin büyük bir kısmı nötral pH derecelerinde üreme özelliğine sahipken, asidofilik karakterde halofilik arkeler henüz rapor edilmemiştir. pH değeri 6.0 civarında olan Ölü Deniz halofilik arkelerin yoğun olarak gelişebildikleri en asidik ortam olmasıyla dikkat çekmektedir (Oren ve Gurevich, 1993). Ancak, *Halobacteriaceae* familyasına ait olduğu tespit edilen MHI-52-I suşunun pH değeri 4.4 olan ortamlarda üreyebildiği rapor edilmiştir (Minegishi ve ark., 2008).

Halofilik arkelerin çoğu genellikle 35°C ile 50°C aralığındaki yüksek

sıcaklıkları tercih ederler (Shand ve Perez, 1999). Tüm ekstrem halofilik arkelerde en yüksek optimum sıcaklık değerine sahip olan organizma *Natronolimnobius aegyptiacus*'dur. Bu organizma optimum olarak 55°C sıcaklığında üreyebilmektedir (Allen ve ark., 2008). Bunun dışında, *Haloferax elongans*, *Haloarcula quadrata*, ve *Haloferax mediterranei*'nin optimum üreme sıcaklığı 51-53°C arasında değişmektedir. Fakat bu sıcaklıklardan çok daha soğuk ortamlara adapte olmuş türler de bulunmaktadır. Antartika'daki Deep Lake, sıcaklığı 0°C'nin altındaki sıcaklıklarla 11,5°C arasında değişen su sıcaklığına sahip bir göldür. Bu gölden *Halorubrum lacusprofundi* halofilik arke türü izole edilmiştir. Bu türün optimum üreme sıcaklığı 31°C ile 37°C arasında olmasına rağmen 4°C gibi düşük sıcaklıklarda da yavaş gelişebilmektedir (Franzmann ve ark., 1988).

Halofilik arkeler hücresel yapıları bakımından diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında önemli farklılıklara sahiptirler ve bu farklılıklar filogenetik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin aksine arkelerde peptidoglikan yapısında bir hücre duvarı bulunmamaktadır. Bakteri ve ökaryotların hücre zarında gliserole ester bağı ile bağlanan yağ asitleri bulunurken, arkelerin hücre zarında ise gliserole eter bağları ile bağlanmış uzun hidrokarbon zincirleri olan fitaniller (C₂₀₋₂₅) bulunmaktadır (Kates, 1992). Halofilik bakterilerde C₄₀, C₄₀ difitanildigliserol tetraeter yapısı yoktur. Tetraeterler termofilik arkelerde baskın lipidlerdir ve bazı metanojenlerde de bulunmaktadır. Halofilik arkelerde tetraeter yapısının bulunmayışı, yüksek tuz varlığında halobakteriyal membran yapısını akışkan tutma ihtiyacından kaynaklanmış olacağı düşünülmektedir. Hücre zarındaki gliserol eter yapısı fosfolipit, sülfolipit ve glikolipit tipinde olabilmektedir (Russel, 1989).

Halofilik arkelerin çok büyük bir bölümü hücre zarlarında çok yüksek miktarda α -bakterioruberin'in C₅₀ düz zincir türevli karotenoid pigmentlerinden ve daha az miktarda içerdikleri C₄₀ tipi karotenoidlerden (likopen ve β -karoten) dolayı parlak kırmızıdan turuncuya kadar değişen renk tonlarında görülürler. Karotenoid pigmentleri sayesinde hücreyi iyonize radyasyona karşı korumaktadırlar ve fotoreaktivasyona yardım etmektedirler (Wu ve ark., 1983). Ayrıca halofilik arkelerde retinal pigment içeren 4 farklı protein tanımlanmıştır; bakteriyorodopsin (ışıkla çalışan dış proton pompası), halorodopsin (ışıkla çalışan iç Cl⁻ pompası) ve 2 adet alıcı rodopsin (ışığa duyarlı fototaksis olayına katılırlar). Mor pigmentli bakteriyodopsin, *Halobacterium*

salinarum ve *Halorubrum sodomense*'de bulunmuştur (Oesterhelt, 1998; Oren, 2001). *H.salinarium*'daki bakteriyorodopsin retinal içeren sadece bir polipeptid zincirinden meydana gelmiş bir integral zar proteinidir. Bu protein hücre dışına protonların ışık ile transferini sağlayarak transmembran elektrokimyasal gradiyenti ile ATP sentezlenmesini sağlar (Yatsunami ve ark., 2000).

Halofilik arkelerin büyük bir bölümü, çözünür oksijen miktarı düşük olan tuzlu sularda oksijen ve ışık alınımını arttıran ve yüzmeye olanak sağlayan gaz vezikülleri içermektedirler. Ayrıca bu gaz veziküllerinin UV ışınlarına karşı da koruyucu kalkan görevi gördüğü belirtilmiştir (DasSarma, 1993; Beard ve ark., 1997).

Aerobik ve heterotrofik karakterdeki halofilik arkeler, karbon kaynaklarını aerobik olarak glioksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi ile trikarboksilikasit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO), dimetilsülfoksit (DMSO), arjinin varlığında veya ışık varlığında bakteriyorodopsin aracılığıyla anaerobik olarak üreme yeteneğine sahiptirler (Hartmann ve ark., 1980; Mancinelli ve Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren ve Litchfield, 1999).

Halofilik arkeler hücre çeperlerindeki asidik polisakkaritleri sayesinde dış ortamın yüksek tuz konsantrasyonu olan 5M NaCl'de yaşayabilmekte ve tuza gereksinim duymaktadır. Çeperde asidik polisakkaritlerin bulunması asidik olan ve eksi yüklü olan bu yapının pozitif bir yükü nötrleştirilmesi gerektirmektedir. Bu nötrleştirme olayı dışarıdaki habitatın tuz içeriği sayesinde gerçekleşmektedir. Optimum olarak yüksek tuzda yaşadıkları için ortamda tuzların yokluğunda hücreler ölmektedir. Çünkü çeperde bulunan asidik polisakkaritler nötrleşemediği zaman kimyasal bir olay olan iki negatif yükün birbirini itmesinden dolayı çeperde porlar oluşmakta ve hücre çeperi lizis olmaktadır. Bu nedenle yüksek tuz ekstrem halofilik Arke'ler için hayati önem taşımaktadır (Grand ve ark., 2001).

Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamaları nedeniyle ortamda düşük su aktivitesi bulunmaktadır. Biyolojik membranlar suya geçirimli olduğu için hücre içi katı madde konsantrasyonu ortamdaki tuz konsantrasyonuna ozmotik olarak en az eşit olacak şekilde ayarlanmaktadır. Aksi takdirde hücre su kaybedecektir. Bunun dışında hücrenin genişlemesine ve büyümesine

izin vermek için minimal turgor basıncının en az düzeyde var olması gerekmektedir. Mikrobiyal yaşam gerekli ozmotik ayarlamayı sağlamak için iki farklı strateji geliştirmiştir. Uyumlu çözünür moleküller biriktirmek ve hücre sitoplazmasında yüksek konsantrasyonlarda K^+ ve Cl^- iyonu biriktirmektir. Halofilik arkeler doymuş tuz konsantrasyonlarında (5,2 M NaCl) yaşayabilmek için “salt-in” stratejisi ile ozmotik dengeyi sağlamak zorundadırlar. Bu amaçla yüksek osmotik basınca karşı koyabilmek için sitoplazmalarında başta K^+ ve Cl^- olmak üzere yüksek oranlarda iyonlar biriktirmektedirler. Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun, büyük kısmını KCl ve daha az olmak üzere NaCl oluşturmaktadır (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989). Halofilik arkeler, iç ortamlarında ozmolit çözünür madde olarak, dış ortamdakinin 100 katı oranında KCl biriktirdikleri için, hücresel bileşenleri de bu tuz konsantrasyonuna adapte olmuştur. Proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için bu tuz oranı gereklidir. Halofilik arkeler protein yapısında diğer canlılara göre negatif yüklü amino asit sıklığını arttırmış ve ortamın “salting out” etkisini dengelemek için polar olmayan amino asit miktarını azaltarak adapte olmuşlardır (Hough ve Danson, 1989; Sellek ve Chaudhuri, 1999; Hough ve Danson, 1999; Kunte ve ark., 2001).

Halobacteriales ordosunda bulunan halofilik arkeler önemli biyoteknolojik potansiyel ve uygulamalara sahiptirler. Halofilik arkelerin eter lipitleri esterazlara karşı dirençli oldukları için lipozom yapımında kullanılması ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren ekzoenzimleri, yüksek tuz içeriğine sahip ortamlardaki makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Chaga ve ark., 1993; Margesin ve Scihinner, 2001). *Halobacterium salinarum*'dan elde edilen ışığa bağımlı proton pompası bakteriorodopsin önemli biyoteknolojik potansiyele sahip olup bilgi depolamada kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Oesterhelt ve ark., 1998). Bakteriorodopsin'in protein tabanlı güçlü bilgisayarlar da işlemci ve hafıza olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Birge, 1995). Ayrıca bakteriorodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması gibi alanlarda da biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Margesin ve Scihinner, 2001). Bazı halofilik arke türleri hücrelerinde biyoplastik yapımında kullanılan poli- β -

hidroksialkonat (PHA) biriktirmektedirler (Rodriguez-Valera ve ark., 1991; Hezayen ve ark., 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

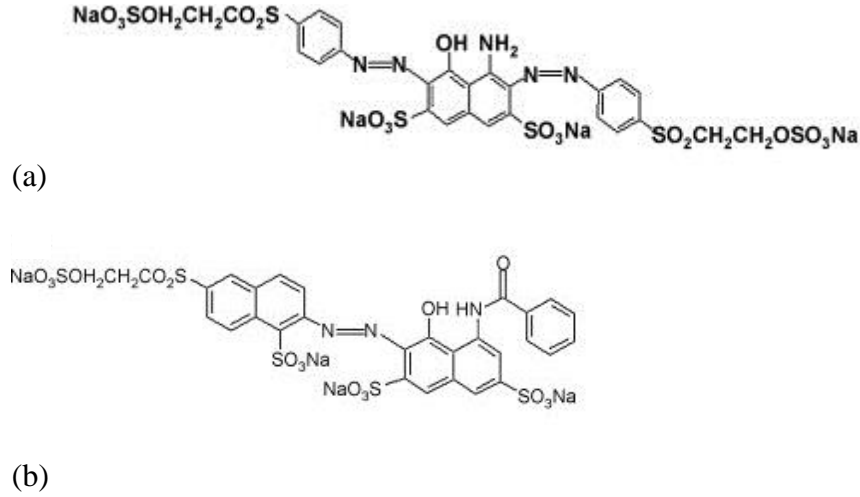
3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Sodyum klorür (NaCl), Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Demir (III) klorür ($FeCl_3$), Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Borik asit (H_3BO_4), Amonyum nitrat (NH_4NO_3), Sodyum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), Potasyum klorür (KCl), Sodyum sitrat, Kalsiyum klorür ($CaCl_2$), Amonyum klorür (NH_4Cl), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Dipotasyum mono hidrojen fosfat (K_2HPO_4), Nikotinamid adenin dinükleotit disodium (NADH), Metanol (CH_3OH), Yeast ekstrakt (Maya Özütü), Beef ekstrakt (Sığır Eti Özütü), Pepton, Tripton, Sodyum glutamat, Etanol, Metanol, Trizma, Agar, Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Tez kapsamında kullanılan azo grubu tekstil boyalarından Astrazon Kırmızı FBL ve Astrazon Mavi Prof.Dr. Özfer Yeşilada'dan (İnönü Üniv.), Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Kırmızı 180 Sırma Kimya'dan, Mordant Turuncu 1 boyası Sigma firmasından temin edilmiştir. Boyaların özellikleri ve kimyasal yapıları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Çalışma boyunca kullanılan Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Kırmızı 180 boyalarının kimyasal yapıları Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan azo boyaları

Boya adı	Boya Tipi	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Maksimum Absorbans (λ_{max})
Reaktif Siyah 5	diazo	991	588.0
Reaktif Kırmızı 180	monoazo	756	515.0
Mordant Turuncu 1	monoazo	287	385.0
Astrazon Kırmızı FBL	monoazo	403	535.0
Astrazon Mavi	monoazo	399	604.0



Şekil 3.1. Reaktif Siyah 5 (a) ve Reaktif Kırmızı 180 (b) boyaalarının kimyasal yapısı (Wang ve ark., 2009b)

Çalışma kapsamında hassas terazi (Ohaus EP 214C), otoklav (Alp CL32S), manyetik karıştırıcı (Are), sıcaklık ayarlı statik inkübatör (Nüve EN 500), sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatör (Edmund Bühler GmbH), soğutmalı santrifüj (Hettich zentrifugen EBA 12R), spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), laminar kabin (Kojair KR-130 Golden Line), su banyosu (Nüve BM 402), vorteks (Mhisheler IKA), pasteur fırını (Heraeus), pH metre (Inolab wtw series), sonikatör (Bandelin) kullanılmıştır.

3.1.2. Halofilik Arkeler

Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında bulunan, Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden izole edilmiş 121 adet halofilik arke izolatu kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

Halofilik arke izolatlarının aktiveleştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla Sehgal-Gibbons (SG) besiyeri kullanılmıştır; NaCl:250g/L, MgSO₄.7H₂O:20 g/L, KCl:2g/L, Sodyum sitrat:3g/L, FeSO₄.7H₂O: 0.023g/L, casamino asit:7.5g/L, maya özütü:1g/L,

pH:7.35 (Ozcan ve ark., 2007). Tekstil boyalarının biyodegradasyonu çalışmalarında Oren ve Porter (2009)'den modifiye edilen Mineral Tuz Ortamı (MTO) NaCl:200 g/L, MgSO₄.7H₂O:25 g/L, MgCl₂.6H₂O:10 g/L, CaCl₂.2H₂O:1.25 g/L, KCl: 5g/L, Trisma base, NH₄Cl (1M), Potasyum fosfat tamponu (0.5 M, pH 7.5), iz element çözeltisi MnCl₂.4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, FeCl₃, CuSO₄.5H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, H₃BO₄, NH₄NO₃ kullanılmıştır. Boyalar ve iz element çözeltisi membran filtre ile steril edildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Aktifleştirilmesi

Halofilik arke koleksiyonuna ait izolatlar, gliserol stoklarından ardışık pasajlar yapılarak aktifleştirilmiştir. İzolatlar katı ve sıvı SG besiyerlerine ekilerek 38 °C'de üretilmiştir. Halofilik izolatların sıvı ortamdaki üretimleri çalkalamalı yapılmıştır.

3.2.2. Renk Giderim Yeteneğine Sahip İzolatların Taranması

Aktifleştirilen halofilik arke izolatlarının boya renk giderim yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan tarama çalışmalarında Reaktif Siyah 5 boyası kullanılmıştır. Tarama çalışmaları, karbon kaynağı olarak 50 ppm boya ve 50 ppm boya+ % 0.1 maya özütü içeren iki farklı mineral tuz ortamında (MTO) yapılmıştır. İnokulum olarak, sıvı ortamda üretildikten sonra steril koşullarda santrifüj edilerek toplanmış ve 2 kez tamponla yıkanmış hücre peleti süspansiyonu kullanılmıştır. Besiyerlerine hücre süspansiyonundan nokta ekim (4µl) yapıldıktan sonra 38 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde üreme bölgelerinin çevresindeki renk açılımına göre izolatların renk giderim yetenekleri değerlendirilmiştir.

Boya rengini giderdiği belirlenen suşların renk giderim oranlarının belirlenmesi amacıyla, 50 ppm Reaktif Siyah 5 ve %0.1 maya özütü içeren sıvı ortama ekimi yapılmış ve 38 °C'de çalkalamalı olarak (120 rpm) inkübe edilmiştir. Periyodik olarak (3 gün) kültür ortamından alınan örneğin santrifüj (5000 rpm, 15 dk.) sonrası üst fazındaki boyanın optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrik ölçümle ($\lambda_{max}=588.0$) belirlenmiştir. Optik yoğunluk üzerinden % renk giderimi oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Renk giderim oranı (\%)} = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

A_0 : başlangıç absorbans değeri

A: Renk gideriminden sonraki absorbans değeri

3.2.3. Renk Giderim Ortamının Belirlenmesi

Tarama çalışmaları sonrasında optimum renk gideriminin gerçekleştiği ortamın belirlenmesi için, renk giderim aktivitesi gösteren suşlardan biri seçilerek 50 ppm Reaktif Siyah 5 boyası içeren MTO, %0.5 maya özütü+MTO ve %0.5 sodyum sitrat+MTO'ya ekim yapılmıştır. İnokulum olarak, sıvı besiyerlerinde üretildikten sonra steril koşullarda 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanıp 2 kez yıkanmış hücre peleti kullanılmıştır. 10 ml'lik kültürden elde edilen hücre peleti 2 ml tampon ile süspansiyon edilerek her bir ortama inoküle edilmiştir. İnokülasyon öncesi ve sonrasında 2'şer gün aralıkla ortamlardan örnek alınarak spektrofotometrik ölçümler ile renk giderim yüzdeleri hesaplanmıştır. En yüksek renk giderim oranının tespit edildiği ortam sonraki çalışmalarda, renk giderim ortamı olarak kullanılmıştır.

3.2.4. Renk Gideriminin Enzimatik Olduğunun Belirlenmesi

Halofilik arke suşlarının renk giderim yeteneklerinin enzimatik olup olmadığı iki yöntemle belirlenmiştir. Birinci yöntem, içerisinde 50 ppm boya ve %0.5 maya özütü bulunan MTO kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan her bir renk giderim ortamına aynı miktarda canlı ve otoklavlanarak öldürülmüş hücre peleti eklenmiştir. Bir ortam için 10 ml kültürden santrifüjle elde edilen ve iki kere tampon ile yıkanan hücre peleti kullanılmıştır. İkinci yöntem hücrelerin adsorbe ettiği boya miktarı tespit edilerek yapılmıştır. İçerisinde 50 ppm boya ve %0.5 maya özütü içeren MTO'ya hücre peleti daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak inoküle edilmiştir. Bu renk giderim ortamından 6 saat aralıkla 1'er ml örnek alınarak 5000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Üst fazda spektrofotometrik ölçüm yapılarak renk giderim oranı belirlenmiştir. Çöken hücre peleti metanolle ekstrakte edilip tekrar aynı koşullarda santrifüjlendikten sonra üst fazda spektrofotometre ile adsorbe edilen boyanın optik yoğunluğu belirlenmiştir. Adsorbe edilen boyanın periyodik ölçümler sürecinde azalması enzimatik renk gideriminin gerçekleştiği şeklinde değerlendirilmiştir.

3.2.5. Farklı Azo Boyaların Renklerinin Halofilik Arkelerle Giderimi

Renk giderim tarama çalışması sonrasında seçilen her bir halofilik arke suşu ile 5 farklı azo grubu boyanın (Reaktif Siyah 5, Reaktif Kırmızı 180, Astrazon Kırmızı FBL, Mordant Turuncu ve Astrazon Mavi) renk giderimi çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 50 ppm boya, %0.5 maya özütü ve %0.1 iz element çözeltisi içeren MTO kullanılmıştır. Boyalı ortama, optik yoğunluğu 1.4-1.6 (λ_{600}) olan hücre süspansiyonundan (10 ml) santrifüjle elde edilerek iki kez yıkanmış hücre peleti inoküle edilmiştir. Kültürler, 38 °C sıcaklıkta çalkalamalı olarak (120 rpm) inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir kültürlerden 1'er ml alınarak santrifüj sonrası spektrofotometrik ölçüm yapılarak, izolatların 5 farklı azo boyası için renk giderim oranları belirlenmiştir.

3.2.6. Optimum Renk Giderimi İçin Kültür Koşullarının Optimizasyonu

Maksimum boya giderim oranlarına ulaşılması amacıyla boya renk giderimi üzerine, NaCl konsantrasyonu, pH değeri, sıcaklık derecesi, çalkalama hızı, boya konsantrasyonu, farklı azot ve karbon kaynakları, inokulum miktarı ve iz element çözeltisi gibi kültür koşullarının etkisi belirlenmiştir. Optimum renk giderim koşullarının belirlenmesi aşamasında her bir halofilik arke suşu için renk giderim oranlarının yüksek olduğu azo boyası kullanılmıştır; F89A1 izolatı için Reaktif Siyah 5, CH7 ve B44B izolatları için Reaktif Kırmızı 180. Renk gideriminde kültür koşullarının optimizasyonu çalışmaları 50 ppm boya, %0.5 maya özütü ve %0.1 iz element çözeltisi içeren standart MTO kullanılarak yapılmıştır. İnokülasyon ve kültürasyon kısım 3.2.5'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Kültür ortamlarından 3 günlük periyotlarla 1'er ml alınarak 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant içerisindeki boya yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans sonuçlarından renk giderim oranları hesaplanmıştır.

3.2.6.1. Renk Giderimi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Halofilik arkelerde renk giderimi üzerine NaCl konsantrasyon etkisinin belirlenebilmesi amacıyla %5, 10, 15, 20 NaCl içeren boya ilaveli standart MTO kullanılmıştır. İnkübasyon 38 °C sıcaklıkta çalkalamalı olarak (120 rpm) gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2. Renk Giderimi Üzerine pH'nın Etkisi

Renk giderimi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi amacıyla her bir izolat için belirlenen optimum NaCl konsantrasyonlarına ve 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 8.5 pH değerlerine sahip standart MTO kullanılmıştır. Çalkalamalı olarak (120 rpm) 38 °C'de inkübasyon yapılmıştır.

3.2.6.3. Renk Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Her bir halofilik arke izolatının maksimum düzeyde renk giderimi gerçekleştirdiği belirlenen optimum NaCl konsantrasyonu ve pH değerine sahip MTO kullanılarak 25, 30, 38, 45 ve 50 °C'de 120 rpm'de çalkalamalı inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.4. Renk Giderimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Boya renk giderimi üzerine çalkalama hızının etkisinin belirlenebilmesi için, optimum NaCl konsantrasyonu ve pH'a sahip MTO kullanılarak optimum sıcaklık derecelerinde statik, 50, 100, 150, 200 rpm çalkalama hızlarında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5. Renk Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi

Renk gideriminin gerçekleştirilebildiği maksimum boya konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla optimum NaCl konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve çalkalama koşullarında farklı (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 800, 900, 1000 ppm) konsantrasyonlarda boya içeren MTO kullanılmıştır.

3.2.6.6. Renk Giderimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

Halofilik arkelerle boyaların optimum renk giderimi üzerine inokulum miktarının belirlenmesi aşamasında boya gideriminin gerçekleştirildiği minimum değer esas alınmıştır. Boya giderimini sağlayan minimum inokulum miktarının belirlenmesi amacıyla 2.5 – 5 – 10 ml hücre süspansiyonlarından santrifüj ve yıkama sonucunda elde edilen hücre peletleri kullanılmıştır.

3.2.6.7. Renk Giderimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Maksimum renk gideriminin gerçekleştiği karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi amacıyla, optimum NaCl konsantrasyonu, pH, boya konsantrasyonu ve inokulum miktarına sahip karbon kaynağı içermeyen MTO ortamına %0.5 oranında farklı karbon ve azot kaynakları (sodyum glutamat, beef ekstrakt, tripton ve pepton) eklenmiştir. Her bir azot ve karbon kaynağını içeren kültür ortamı optimum sıcaklık ve çalkalama koşullarında inkübe edilmiştir.

3.2.6.8. Renk Giderimi Üzerine İz Element Etkisi

Daha önce belirlenen optimum koşullar varlığında iz element çözeltisi içeren (%0.1) ve içermeyen ortamlar kullanılarak iz element çözeltisinin renk giderim üzerine etkisi belirlenmiştir.

3.2.7. Azoredüktaz Enzim Tayini ve Optimizasyonu

Azoredüktaz enzim aktivitesi Kalyani ve ark. (2009)'dan modifiye edilerek belirlenmiştir. Ekspansiyon fazdaki kültür +4 °C'de, 15000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan hücre peleti tamponla iki defa yıkandıktan sonra KCl içeren tampon ilave edilerek süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon içerisindeki arke hücreleri sonikatör yardımıyla +4 °C'de buz içerisinde parçalanmıştır. Süspansiyondan hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için +4°C, 15000 rpm'de, 45 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, enzim kaynağı ve Reaktif Siyah 5 substrat olarak kullanılmıştır. Tris-HCl (pH 7.4, 50 mM), NADH (2mM), boya (50 mM) ve enzim içeren reaksiyon karışımı 38°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika içerisindeki renk giderimi spektrofotometre ile ölçülerek ($\lambda_{max}=588.0$) belirlenmiştir. Bir ünite enzim, NADH varlığında dakikada bir μ mol boyayı yıkan enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \Delta \text{Abs} / \epsilon \times V_T \text{ (ml)} / V_{\text{enzim}} \text{ (ml)} \times \text{zaman (dk)}$$

$$\text{Reaktif Siyah 5 } \epsilon: 35.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

3.2.7.1. Optimum KCl Konsantrasyonunun Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gerçekleştiği KCl konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 ve 3.5 M KCl içeren tampon çözeltileri kullanılmıştır.

3.2.7.2. Optimum pH Değerinin Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gerçekleştiği pH değerinin belirlenmesi amacıyla ile pH'ı 6.0, 6.5, 7, 7.5, 8.0 ve 8.5 olan ve optimum KCl konsantrasyonuna sahip tampon çözeltileri kullanılmıştır.

3.2.7.3. Optimum Sıcaklık Derecesinin Saptanması

En yüksek enzim aktivitesinin gerçekleştiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, optimum KCl konsantrasyonuna ve pH değerine sahip tampon çözelti ortamında 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C olmak üzere yedi farklı sıcaklık derecesinde inkübasyon yapılmıştır.

3.2.8. Toksisitenin Belirlenmesi

Boyar madde ve boya giderim sonrası ekstraselüler ortamın toksisitesi agar difüzyon ve Microtox[®] sistemi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Halofilik arke izolatlarının boya içeren besiyerinde önce 2 gün statik devamında 5 gün boyunca çalkalamalı olarak inkübe edilmesinden sonra santrifüj ve filtrasyon yapılarak ekstraselüler ortam hazırlanmıştır. Her iki yöntemle kültür filtratları ve boyar maddelerin (50 ppm) toksisite analizleri yapılmıştır.

Agar difüzyon yöntemi, test organizması olarak her bir arke izolatının kendisi ve bir halofilik arke standart suşu (*Natrialba asiatica* DSM 12278) kullanılarak yapılmıştır (Apohan ve Yeşilada, 2005). Sehgal-Gibbons (SG) besiyerine Macfarland 3 standardına göre hücre yoğunluğu ayarlanmış kültürlerden yayma ekim yapıldıktan sonra 10 dakika kuruması sağlanmıştır (Yıldız ve ark. 2012). Ekim yapılan petrilere steril koşullarda kuyular açılmış ve açılan kuyulara kültür filtratları (2.gün ve 7.gün) ve boyar maddeler 50 µl olacak şekilde eklenmiştir. Petrilere 38°C'de 7 gün inkübe edildikten sonra kuyuların çevresindeki mikroorganizma gelişmesine bağlı olarak değerlendirme yapılmıştır.

İkinci yöntem olan Mikrotoks sistemi ile, *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 bakterisinde 5. dakikadaki ışık salınım inhibisyon oranları üzerinden toksik ünite (TU) değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla Mikrotoks analyser 500 (SDI, ABD) cihazında 1:10 ön sulandırılmalı ve ASTM (9 Dilusyon) Basic Test protokolü kullanılmıştır.

3.2.9. Boya Yıkım Metabolit Profiline Belirlenmesi

Renk giderimi aşamasında arkeal izolatların ürettiği boya yıkım metabolit profiline belirlenmesi amacıyla gaz kromatografi-kütle spektrometre analizleri TÜBİTAK MAM laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu amaçla 2 gün (statik) ve takip eden 5 gün (çalkalamalı) inkübasyon periyodu sonrasında elde edilen kültür ortamı kullanılmıştır. Her bir ekstraselüler kültür ortamı santrifüjle (+4C, 5000 rpm) toplandıktan sonra membran filtreden geçirilmiştir.

Ekstraksiyon ve deriştirme

Ekstraselüler ortamdaki 3 kez 15 ml diklorometan kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrası elde edilen diklorometan fazları birleştirilerek son hacim 0.5 ml olacak şekilde Zymark TurboVap® II Evaporator sisteminde yüksek saflıkta azot gazına maruz bırakılmıştır. Diklorometan buharlaştırılması sonrası deriştirilen örnekler 2ml'lik viallere transfer edilmiştir.

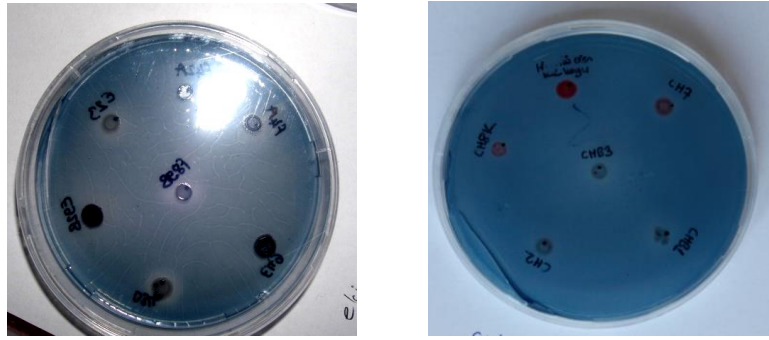
GC analizi ve MS kütüphane taraması

GC-MS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılarak yapılmıştır. DB-5MS kolonu (60m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığı) ve taşıyıcı gaz olarak helyum (1ml/dak sabit akış hızı) kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı başlangıçta 60 °C ve bekleme olmaksızın sonrasında 10 °C/dak artırılarak 300 °C ve 300 °C'de 5 dakika bekleme olacak şekilde programlanmıştır. Enjeksiyon split oranı 5/1, enjeksiyon sıcaklığı 300°C'ye ve GC/MS arayüzey sıcaklığı 300°C'ye ayarlanmıştır. Kütle spektrum 70 eV'de kaydedilmiştir. Kütle tarama aralığı 50-500 m/z 'dir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

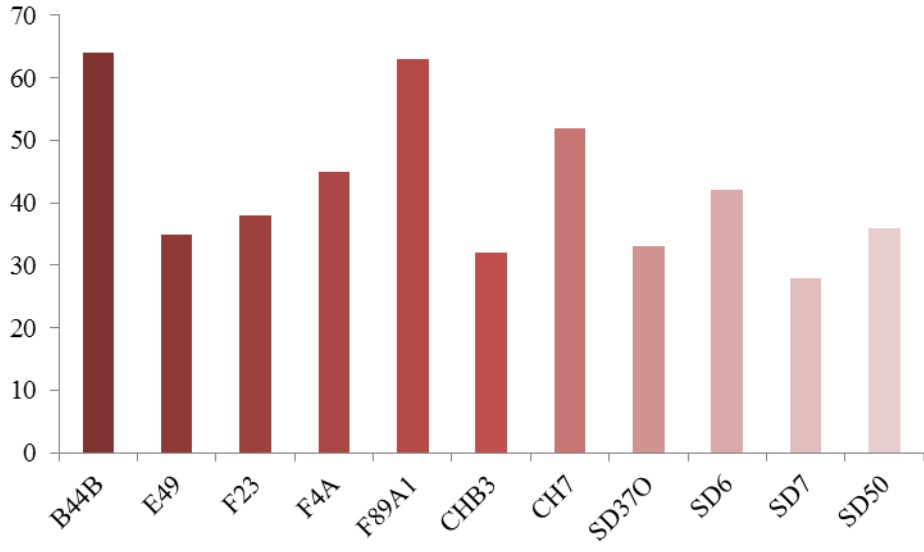
4.1. İzolatların Renk Giderim Yeteneklerinin Tarama Sonuçları

Halofilik mikroorganizma koleksiyonuna ait halofilik arke izolatları gliserol stoklarından aktiveleştirildikten sonra, 50 ppm Reaktif Siyah 5 (RS5) ve 50 ppm RS5+% 0.1 maya özütü içeren iki farklı mineral tuz agar ortamına (MTOA) ekilerek renk giderim yetenekleri yönünden taranmıştır (Şekil 4.1). Sadece maya özütü

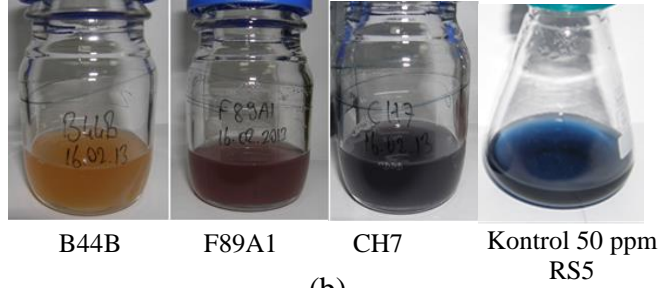


Şekil 4.1. 50 ppm Reaktif Siyah 5 içeren MTO agarda halofilik arke izolatlarının renk giderimi tarama sonuçları

içeren MTOA'da üreme bölgesi çevresinde boya renginin giderildiği zonlar gözlenmiştir. Belirgin derecede boya rengini giderdiği belirlenen B44B, E49, F23, F4A, F89A1, CHB3, CH7, SD370, SD6, SD7, SD50 izolatları ile %0.1 maya özütü içeren boyalı sıvı ortamda (MTO) renk giderim çalışmalarına devam edilmiş ve izolatların 50 ppm RS5 içeren sıvı besiyerinde yapılan renk giderim oranları ve sonuçları Şekil 4.2'te verilmiştir. Onbir izolat arasından boya rengini %50 ve üzerinde giderdiği belirlenen B44B, F89A1 ve CH7 suşlarıyla çalışmaya devam edilmiştir. B44B izolatının %64, F89A1 izolatının %63 ve CH7 izolatının %52 oranında boya rengini giderdiği belirlenmiştir.



(a)



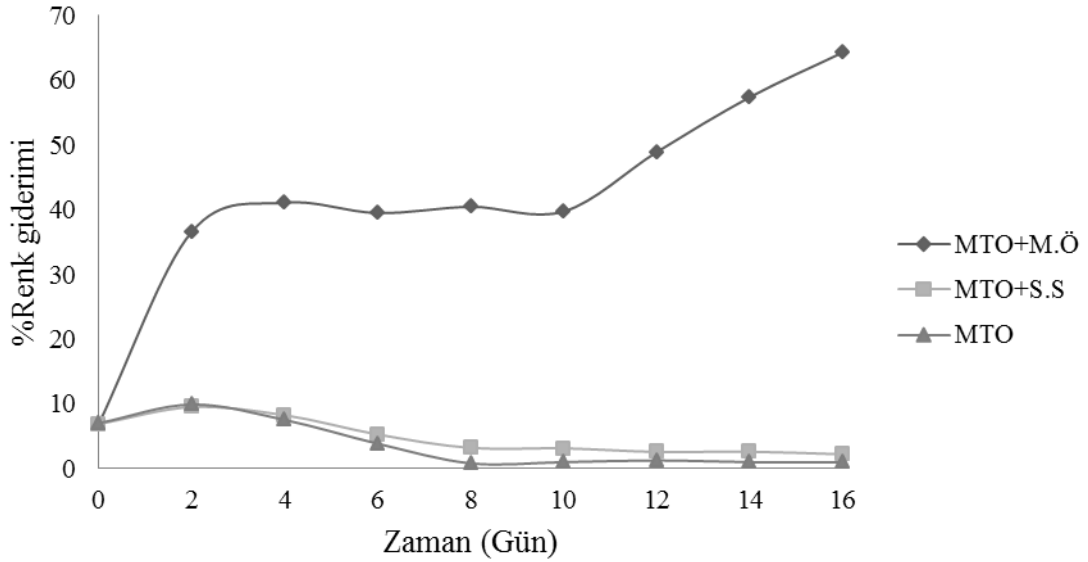
(b)

Şekil 4.2. Halafilik arke izolatlarının 50 ppm Reaktif Siyah 5 içeren sıvı MTO'daki % renk giderim oranları (a) ve sonuçları (b)

4.2. Renk Giderim Ortamının Belirlenmesi

Çalışmanın devamında kullanılacak genel renk giderim ortamını belirlemek amacıyla F89A1 izolatı kullanılmış ve izolatın %0.5 sodyum sitrat+MTO+boya, %0.5 maya özütü+MTO+boya ve MTO+boya koşullarındaki renk giderim oranları belirlenmiştir. İnkübasyon periyoduna bağlı olarak tespit edilen renk giderim oranları Şekil 4.3'te verilmiştir. F89A1 izolatının maya özütü içeren ortamda diğerlerine göre çok daha etkili boya giderimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Bakteri konsorsiyumu kullanılarak yapılan tekstil azo boyası yıkım çalışmasında da ek karbon ve azot kaynağı içermeyen sentetik ortamda renk gideriminin gerçekleşmediği ancak, pepton ve beef ekstrakt gibi organik azot kaynaklarının bulunduğu ortamda maksimum düzeyde renk

gideriminin gerçekleştiği bildirilmiştir (Saratale ve ark., 2009a). Ayrıca, boya haricindeki ek karbon kaynaklarının hücreler tarafından tercih edilip kullanılması nedeniyle renk giderim oranının azaldığı bildirilmiştir (Knapp ve Newby, 1995; Saratale ve ark., 2009b).

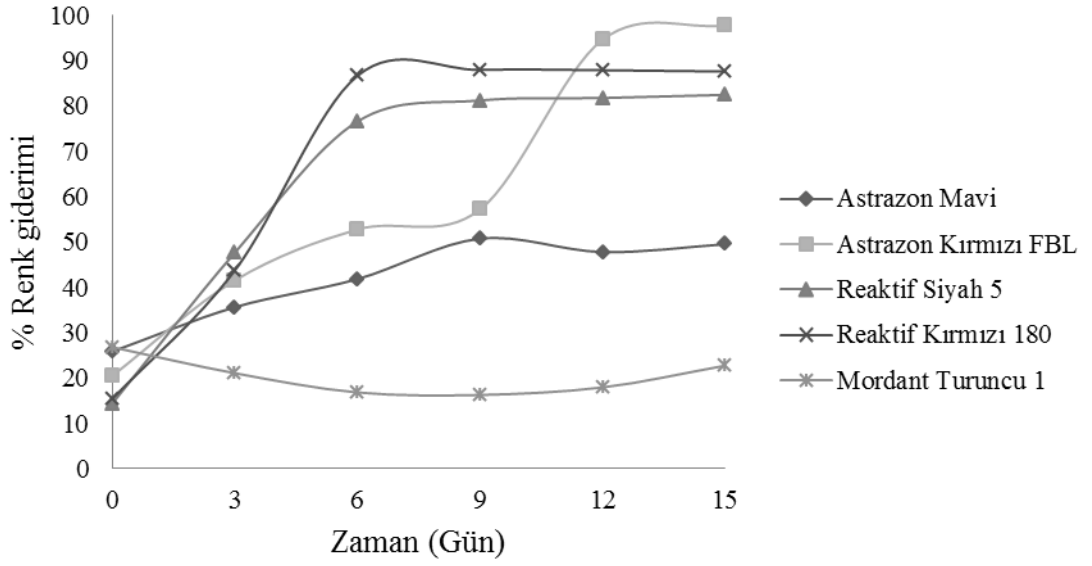


Şekil 4.3. F89A1 suşunun üç farklı boya giderim ortamındaki % renk giderimi oranları (MTO:Mineral Tuz Ortamı, M.Ö.: Maya Özütü, S.S: Sodyum Sitrat)

Halofilik mikroorganizmaların boya giderim yeteneklerinin belirlendiği hem katı hem de sıvı tarama çalışmaları sonucunda maya özütü ile desteklenen MTO'da boya giderimi sonuçları alındığı için çalışmaya organik azot kaynağı olarak maya özütü içeren besiyeri ile devam edilmiştir.

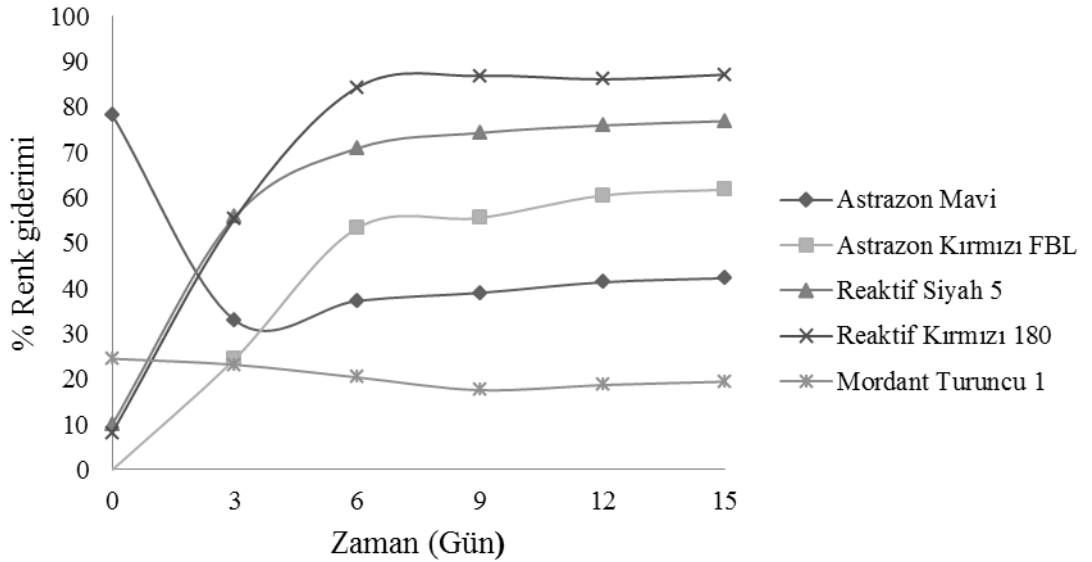
4.3. Halofilik Arke İzolatlarıyla Farklı Tekstil Boyalarının Renk Giderim Sonuçları

Arkeal izolatların Astrazon Mavi, Astrazon Kırmızı FBL, Reaktif Siyah 5, Reaktif Kırmızı 180 ve Mordant Turuncu 1 olmak üzere 5 farklı azo boyasında 15 günlük inkübasyon periyodu boyunca belirlenen renk giderim oranları Şekil 4.4-4.6'da verilmiştir. F89A1 izolatının Astrazon Mavi boyasını %54, Astrazon Kırmızı FBL boyasını %98, Reaktif Siyah 5 boyasını, %85, Reaktif Kırmızı 180 boyasını %87 ve Mordant Turuncu 1 boyasının rengini %25 oranında giderdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4).



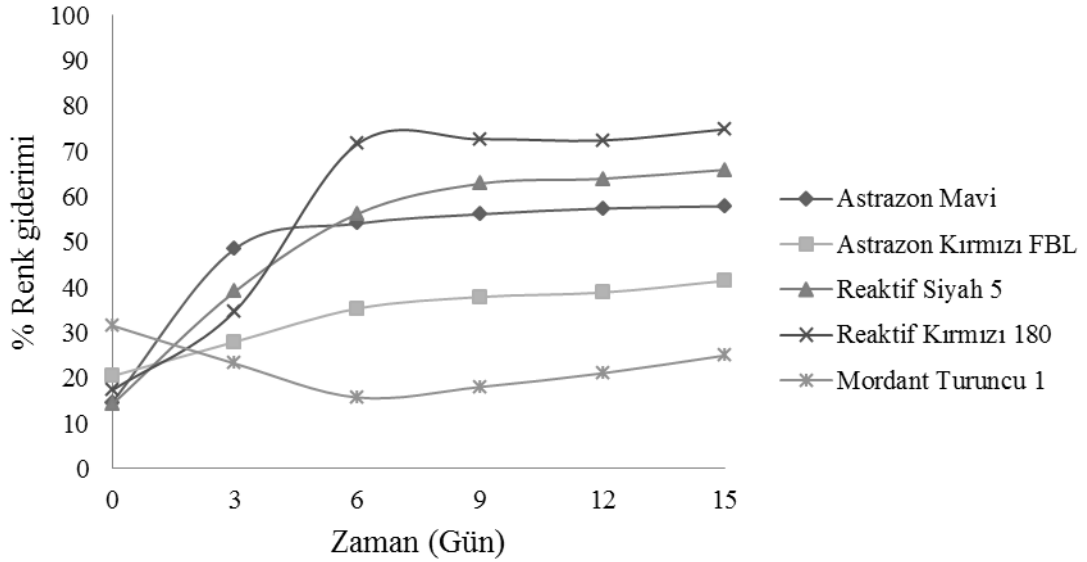
Şekil 4.4. F89A1 izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi

B44B izolatının, Astrazon Mavi boyasını %47, Astrazon Kırmızı FBL boyasını %65, Reaktif Siyah 5 boyasını, %79, Reaktif Kırmızı 180 boyasını %87 ve Mordant Turuncu 1 boyasının rengini %25 oranında giderdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. B44B izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi

CH7 izolatının, Astrazon Mavi boyasını %60, Astrazon Kırmızı FBL boyasını %45, Reaktif Siyah 5 boyasını, %71, Reaktif Kırmızı 180 boyasını %75 ve Mordant Turuncu 1 boyasının rengini %31 oranında giderdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



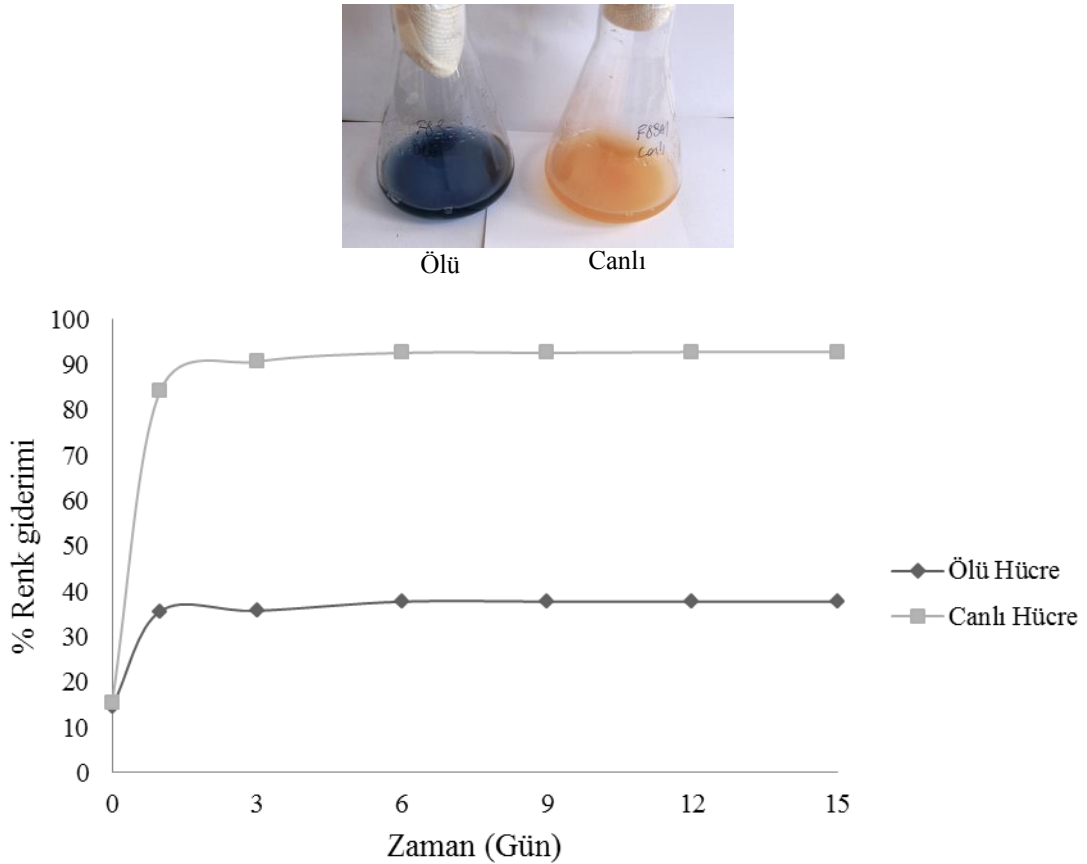
Şekil 4.6. CH7 izolatında farklı azo boyası renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi

Genel olarak aynı arkeal izolatın farklı boyalar üzerindeki renk giderim yeteneğinin çok farklı olabildiği ve her üç izolatın Mordant Turuncu 1 boyasını yaklaşık olarak %30 oranında, Reaktif Kırmızı 180 ve Reaktif Siyah 5 boyaalarının rengini %70'in üzerinde giderebildiği belirlenmiştir. Çeşitli sentetik azo boyalarının kimyasal yapılarında farklılıklar bulunduğu, izomerleri veya farklı fonksiyonel gruplarının olabildiği ve bu özelliğin biyodegradasyon ve renk giderimini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (Hu, 2001). Basit yapılı ve düşük moleküler ağırlıklı boyaların yüksek oranda renk giderimi gösterdiği fakat azo ve yüksek molekül ağırlığına sahip boyalarda ise fenil halkasının para pozisyonundaki $-SO_3H$ ve $-SO_2NH_2$ gibi elektron çeken grupların değişimi ile boyanın renk giderim oranının düştüğü rapor edilmiştir (Hu, 2001). Ayrıca Kulla ve ark. (1983) azo boyaların gideriminde önemli bir rolü olan azoredüktaz üretiminin özellikle boya yapıları ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Azo bağı çevresindeki elektron yoğunluğunun da indirgenme üzerine önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Beydilli ve ark. 2000).

Çalışma kapsamındaki bazı boyalarda düşük renk giderim oranının gözlenmesinde sıcaklık derecesi, pH değeri, NaCl konsantrasyonu, çalkalama hızı, inokulum miktarı gibi kültür koşullarının her boyaya göre optimize edilmemiş olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, her bir izolatın %75 üzerinde renk giderimi gösterdiği belirlenen boyalardan biri seçilerek çalışmaya devam edilmiştir. F89A1 için Reaktif Siyah 5, B44B ve CH7 izolatları ile Reaktif Kırmızı 180 azo boyları seçilmiştir.

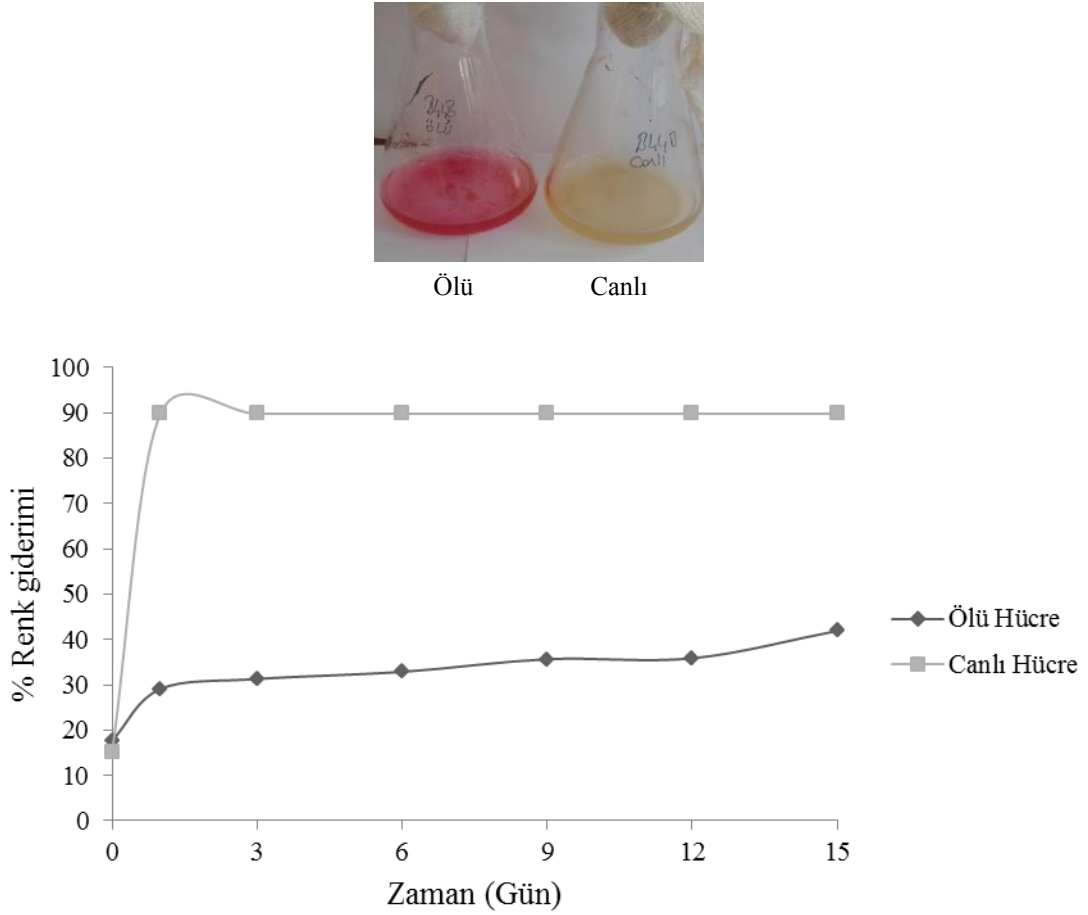
4.4. Boya Renk Gideriminin Enzimatik Olduğunun Belirlenmesi

Halofilik arke izolatlarının renk giderimi yeteneklerinin enzimatik ya da adsorpsiyonla gerçekleşip gerçekleşmediği 2 farklı yöntemle belirlenmiştir. Ölü ve canlı hücrelerin kullanıldığı birinci yöntemde 15 günlük inkübasyon periyodu boyunca renk giderim oranları belirlenmiştir (Şekil 4.7- 4.9). F89A1 izolatının ölü hücrelerinde boya gideriminin 15 günlük inkübasyon sonunda %38' de kaldığı, canlı F89A1 hücrelerinin ise henüz inkübasyonun 3. gününde %91 oranında boya giderimine ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.7).



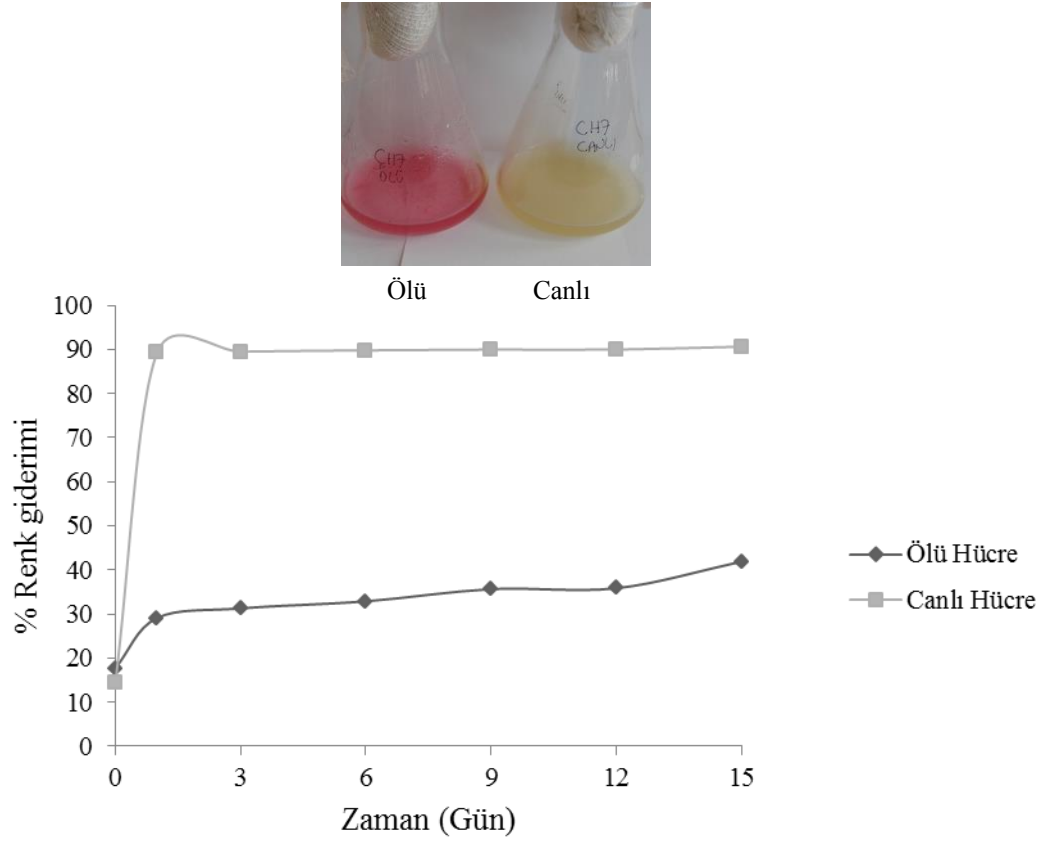
Şekil 4.7. F89A1 izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları

B44B izolatu ölü hücrelerinin, Reaktif Kırmızı 180 boyasını 15 günlük inkübasyon sonunda %42 oranında adsorbe ettiği gözlemlenirken, canlı hücrelerde renk giderim oranının 3. günde %90'a ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. B44B izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları

CH7 izolatında da diğer izolatlardakine benzer sonuçlar alınmış ve ölü hücrelerinin Reaktif Kırmızı 180 boyasını 15 günlük inkübasyon sonunda %49 oranında adsorbe ettiği, canlı hücrelerinin ise 2. günde %90 renk giderimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

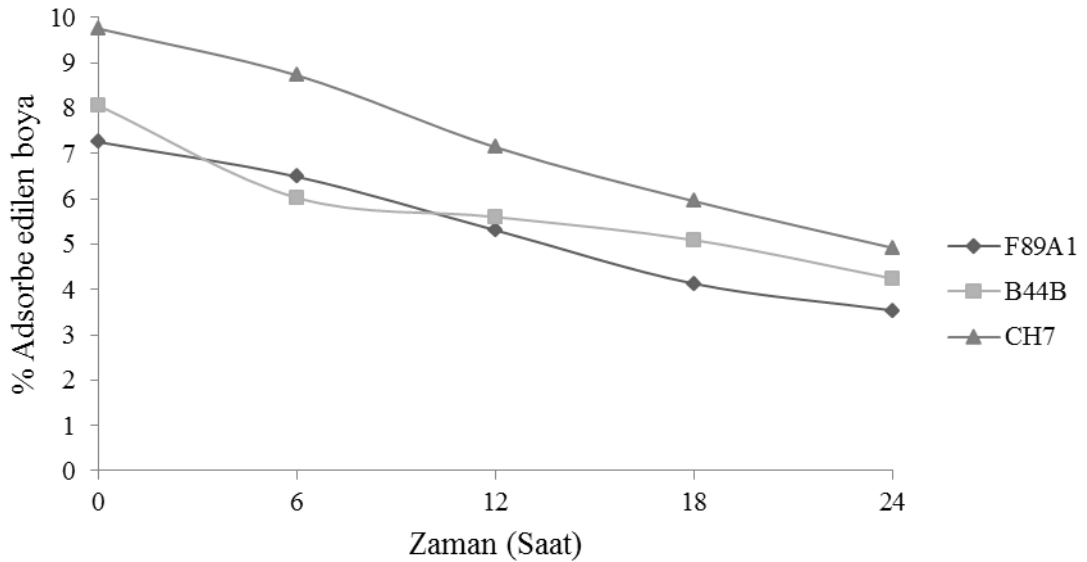


Şekil 4.9. CH7 izolatının ölü ve canlı hücrelerindeki boya giderimi ve oranları

Ölü ve canlı izolat hücreleriyle yapılan renk giderimi sonucunda her üç izolatın ölü hücrelerinde %50'nin altında renk giderimini sağlayacak kadar boyayı adsorbe ettiği, canlı hücrelerinde ise zamana bağlı olarak renk giderim aktivitesinin devam ettiği belirlenmiştir. Halofilik ve halotolerant bakterilerin boya renk giderimi ile ilgili yapılan çalışmada aktif ve inaktif hücrelerin boya renk giderim yetenekleri karşılaştırılmış ve canlı hücrelerin boya giderimini gerçekleştirebildiği fakat inaktif hale getirilmiş hücrelerin renk giderim yeteneklerini kayb ettikleri belirtilmiştir (Asad ve ark., 2007).

Renk giderim ortamında inkübasyon periyoduna bağlı olarak hücrelerin adsorbe ettiği boya miktarı değişiminin metanol ekstraksiyonu ile belirlendiği ikinci yöntemde de izolatlarda kayda değer bir boya adsorbsiyonu saptanmamıştır. İnokülasyondan hemen sonra %7 - %10 arasında değişen boya adsorbsiyonu ile birlikte renk açılımının

gerçekleştiği, 24 saatlik inkübasyon periyodu sonrasında ise boya adsorpsiyonunun oranının %4-6'ya düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Dolayısıyla hücrelerin ilk olarak inokülasyon sonrasında belli miktarda boyayı adsorbe ettiği ve daha sonra enzimatik boya giderimine başladığı düşünülmektedir. Beyaz çürükçül fungus *Funalia trogii* ile tekstil boyalarının renk giderimi üzerine yapılan çalışmada metanol ekstraksiyonu yapılmış ve 24 saat sonunda hücre tarafından adsorbe edilen boya miktarının önemsiz olduğu bildirilmiştir (Apohan ve Yesilada, 2005). Acid Red 88 azo boyası ve dört farklı bakteri türünün yer aldığı konsorsiyum ile yapılan renk giderim çalışmasında da metanol ekstraksiyonu ile boyanın renginin biyolojik mekanizma ile giderilebildiği belirtilmiştir (Khehra ve ark., 2005).



Şekil 4.10. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında ortamdan adsorbe edilen boya miktarının zamana göre değişimi

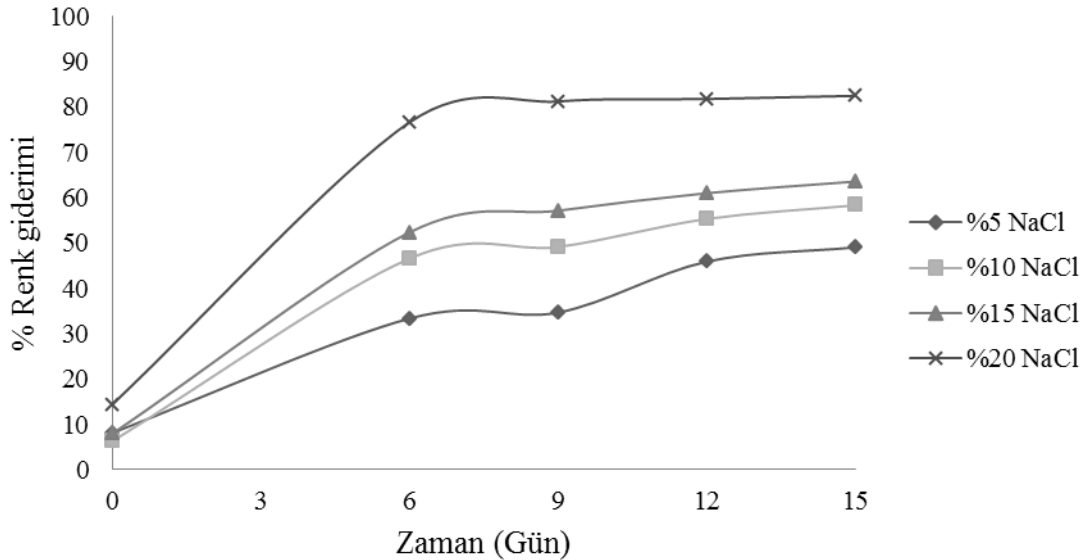
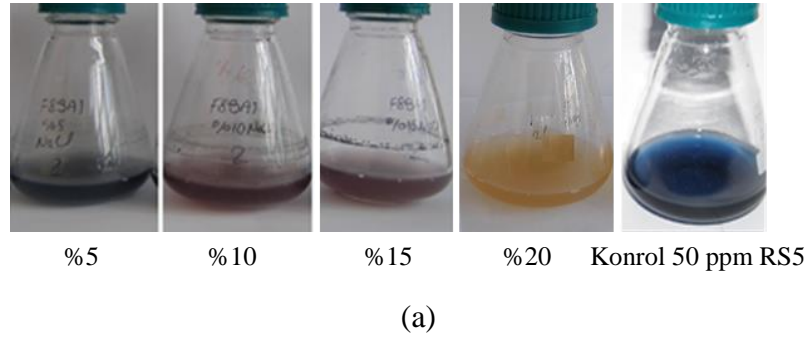
Sonuç olarak her iki yöntemden elde edilen sonuçlar, F89A1, B44B ve CH7 halofilik arke izolatlarında renk gideriminin enzimatik olduğunu göstermiştir.

4.5. Renk Giderim Koşullarının Optimizasyonu Sonuçları

F89A1, B44B ve CH7 izolatları, içerisinde 50 ppm boya bulunan renk giderim koşullarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En yüksek renk giderim oranının gerçekleştiği kültür koşulları tespit edilmiştir.

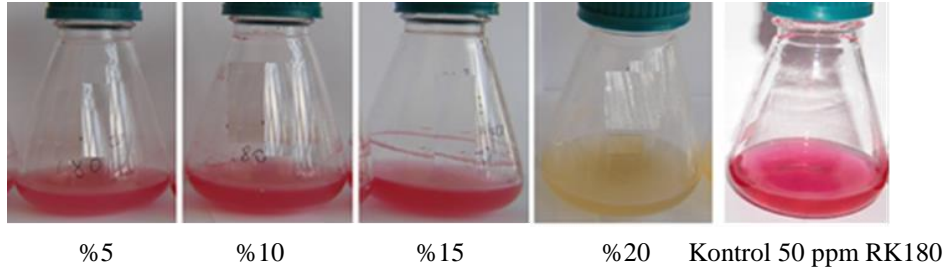
4.5.1. Renk Gideriminin NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

İzolatların %5-10-15-20 NaCl içeren ortamdaki renk giderim oranları belirlenmiştir (Şekil 4.11-4.13). F89A1 izolatında artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak renk gideriminin de arttığı tespit edilmiştir. %5, %10, %15 ve %20 NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla %49, %58, %64 ve %83 oranında renk giderimi belirlenmiştir (Şekil 4.11).

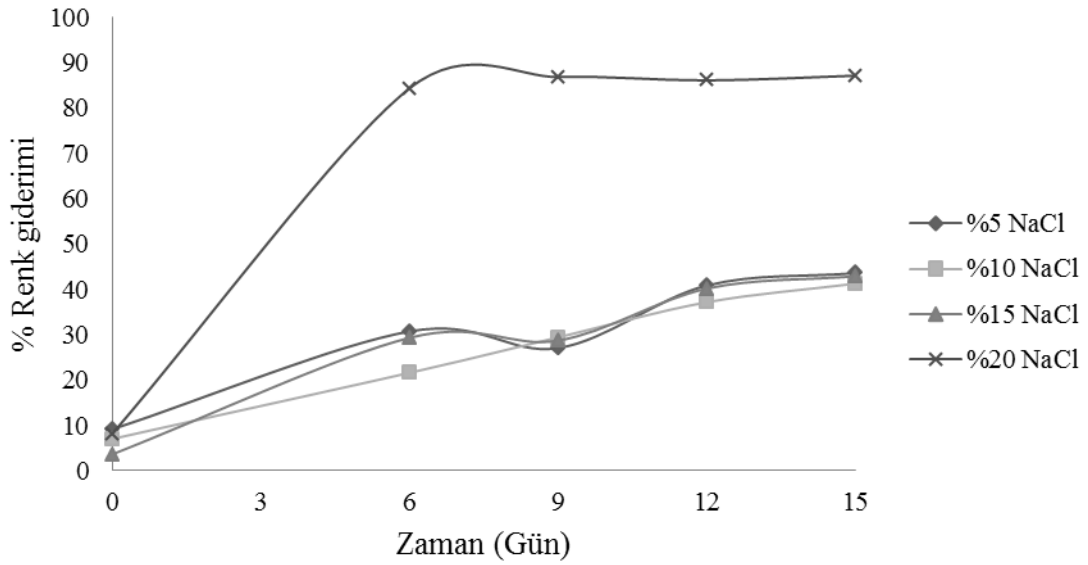


Şekil 4.11. F89A1 izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [7.35 pH, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

B44B suşunun, %5-15 tuz konsantrasyonunda renk gideriminin düşük ve benzer seviyede olduğu ve en yüksek giderimin %20 NaCl varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). Farklı NaCl konsantrasyonlarına sahip boya giderim ortamlarındaki renk giderim yüzdeleri %5 NaCl'den %20'ye sırasıyla %44, % 41, % 43 ve %87 olarak belirlenmiştir.



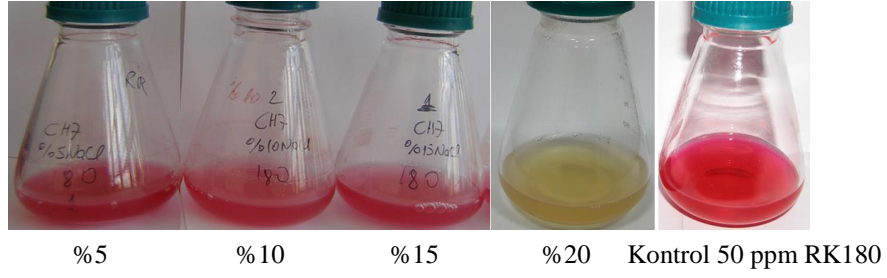
(a)



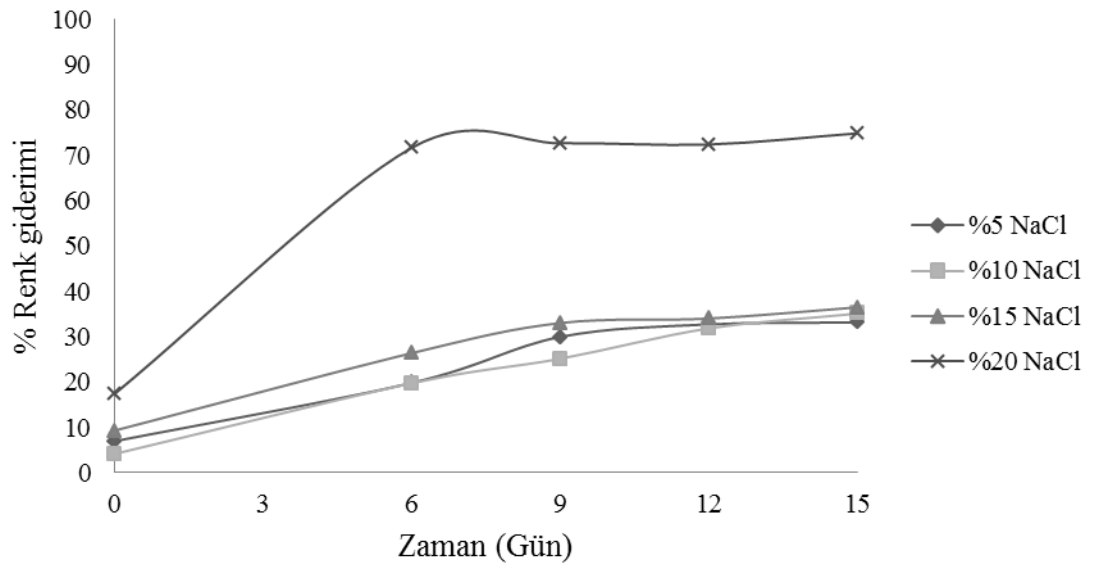
(b)

Şekil 4.12. B44B izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderimi oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [7.35 pH, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatının, farklı tuz konsantrasyonlarına sahip boya giderim ortamlarındaki renk giderim oranları benzer şekilde %5, %10 ve %15 NaCl konsantrasyonlarında %30'larda kalırken, %20 NaCl içeren ortamda %75'e ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13.).



(a)



(b)

Şekil 4.13. CH7 izolatının 4 farklı NaCl konsantrasyonundaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [7.35 pH, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

Tekstil endüstrisinde boya fiksasyonu amacı ile tuz kullanılması tekstil atık suyunun NaCl konsantrasyonunu arttırmaktadır bu nedenle boya giderim ortamındaki NaCl konsantrasyonu önemli bir parametre olarak çeşitli çalışmalarda da araştırılmıştır. Örneğin, Halofilik ve halotolerant bakterilerle yapılan tekstil azo boyalarının renk giderimi çalışmasında 2 farklı suşun %20 NaCl konsantrasyonunun üzerinde renk giderimi gösterdiği ve tuz konsantrasyonu yüksek ekosistemlerde renk giderim aktivitesi gösterebileceği belirtilmiştir (Asad ve ark., 2007). Diğer bir çalışmada, ılımlı halofilik bakterilerin, azo boyalarının rengini yüksek tuz konsantrasyonunda giderim

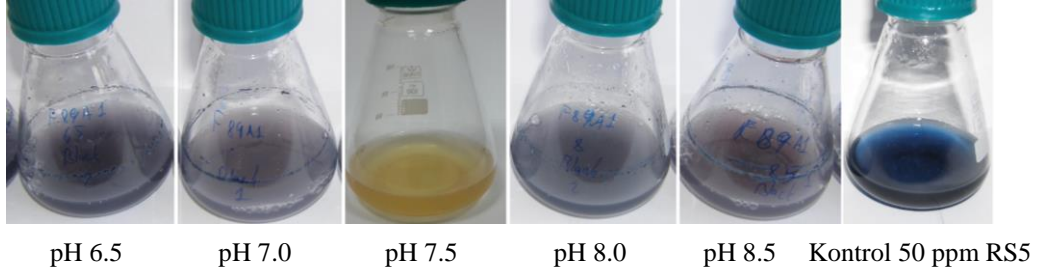
yeteneklerini belirlemek amacıyla *Halomonas* GTW suşu kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise, en iyi gelişim ve boya gideriminin %15 NaCl konsantrasyonunda belirlendiği rapor edilmiştir (Guo ve ark., 2008). Farklı bir yöntem olan bakteri konsorsiyumu kullanılarak yapılan renk giderimi çalışmalarında farklı tuz konsantrasyonlarındaki boya giderimi belirlenmiş olup yüksek tuz konsantrasyonunun hücreleri plazmolize uğrattığı veya enzim aktivitesi kaybına neden olarak mikroorganizmaları inhibe ettiği rapor edilmiştir (Guo ve ark., 2005). Tekstil atık sularının yüksek konsantrasyonda tuz içermesi nedeniyle, biyolojik boya gideriminde halofilik ve halotolerant bakterilerin kullanımının kaçınılmaz olduğu belirtilmiştir (Asad ve ark., 2007).

Sonuç olarak her üç izolatta da optimum renk gideriminin %20 NaCl konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Düşük NaCl konsantrasyonlarında boya renk gideriminde rol oynayabilecek enzimlerinin aktivite gösterememesi ya da az aktivite göstermesi nedeniyle boya giderim oranlarının yüksek olmadığı düşünülmektedir. Çünkü düşük su aktivitesine sahip haloarkaeal enzimler yüksek tuz konsantrasyonlarında aktif kalabilmektedirler (Asad ve ark., 2007).

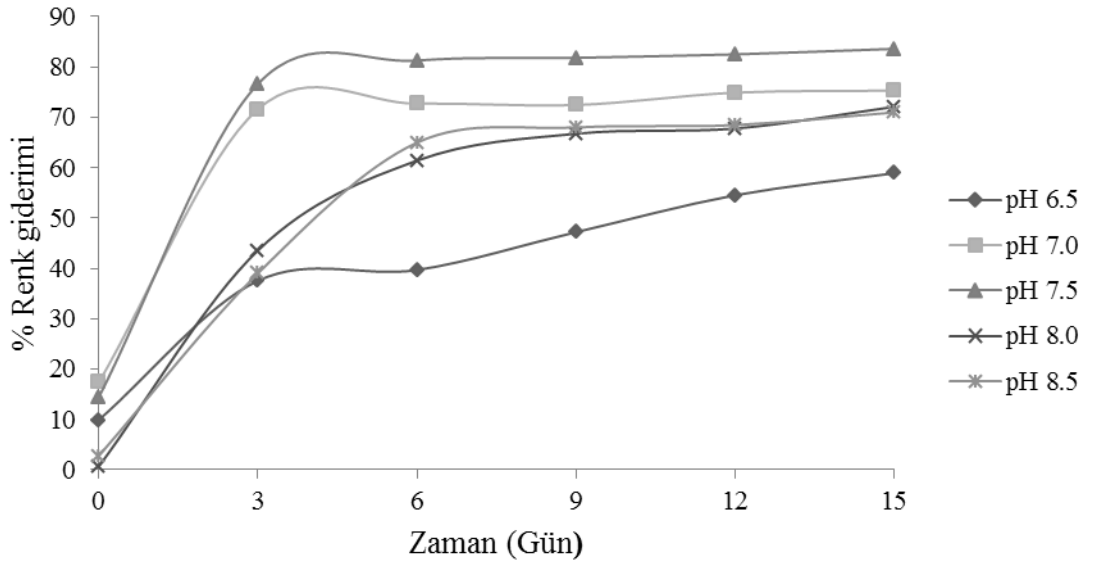
4.5.2. Renk Gideriminin pH'a Bağlı Değişimi

Optimum NaCl konsantrasyonu ve 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 olmak üzere 5 farklı pH'ya sahip ortamdaki renk gideriminin kültür inkübasyon periyoduna bağlı değişimi Şekil 14, 15 ve 16'da verilmiştir. F89A1, B44B ve CH7 halofilik arke izolatlarının, optimum boya giderim oranına ulaştıkları pH değeri 7.5 olarak tespit edilmiştir.

F89A1 izolatının 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 pH değerlerine sahip boya giderim ortamında boya renk giderimi oranları sırasıyla, %59, %75, %84, %72 ve %71 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



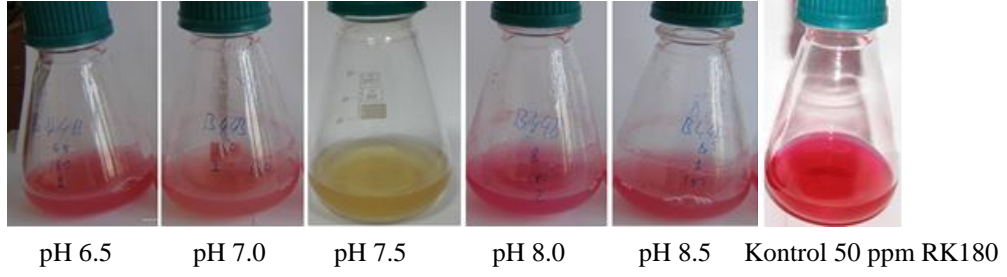
(a)



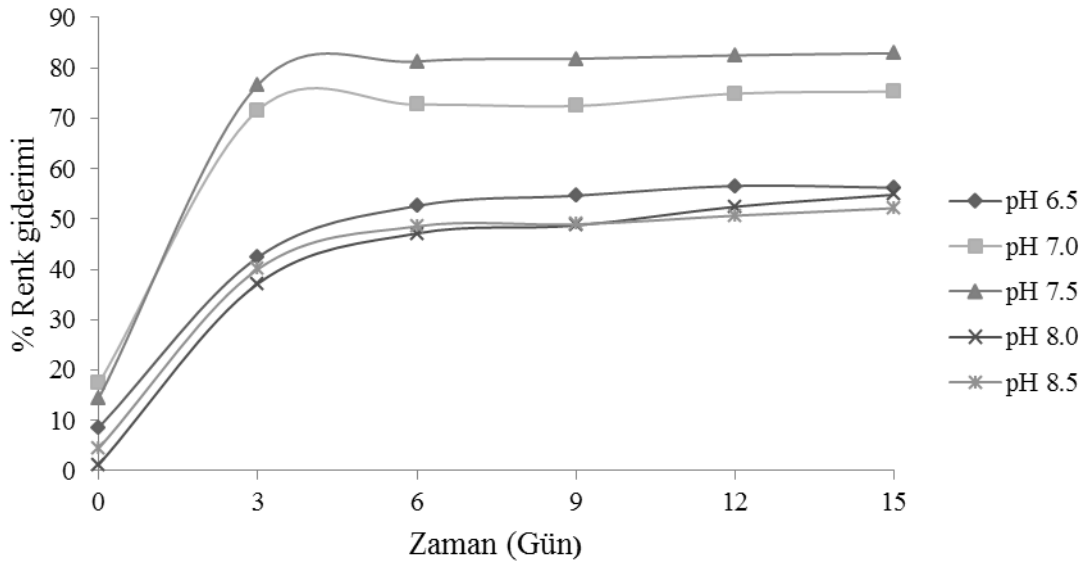
(b)

Şekil 4.14. F89A1 izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

B44B izolatının farklı pH'daki renk giderim oranları pH 6.5'ta %56, 7.0'de %75, 7.5'de %83, 8.0'de %55, 8.5'de %52 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).



(a)

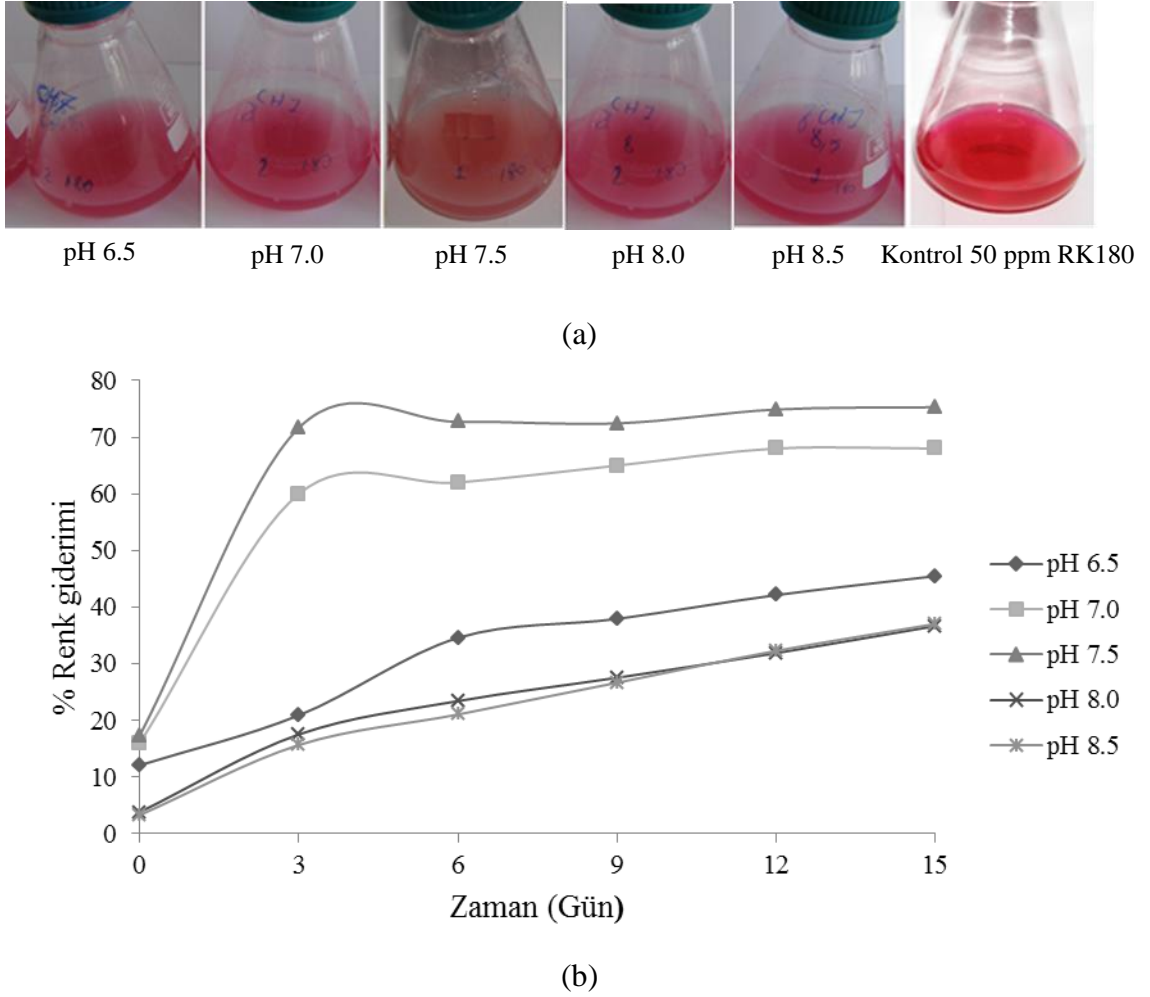


(b)

Şekil 4.15. B44B izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatının farklı pH'a sahip boya giderim ortamlarındaki, renk giderim oranları Şekil 4.16'da verildiği gibi pH 6.5'ta %45, 7.0'de %68, 7.5'ta %75, 8.0'de %37 ve 8.5 değerinde ise %37 olarak tespit edilmiştir.

Çalışma sonucumuza göre, kültür ortamı pH'sının boya renk giderimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve nötr pH'da maksimum renk gideriminin gerçekleştiği görülmektedir. Asidik ve bazik pH'nın boya moleküllerinin hücre membranına taşınmasını etkilediği ve renk giderim hızını sınırladığı belirtilmiştir (Chang ve ark., 2001b).



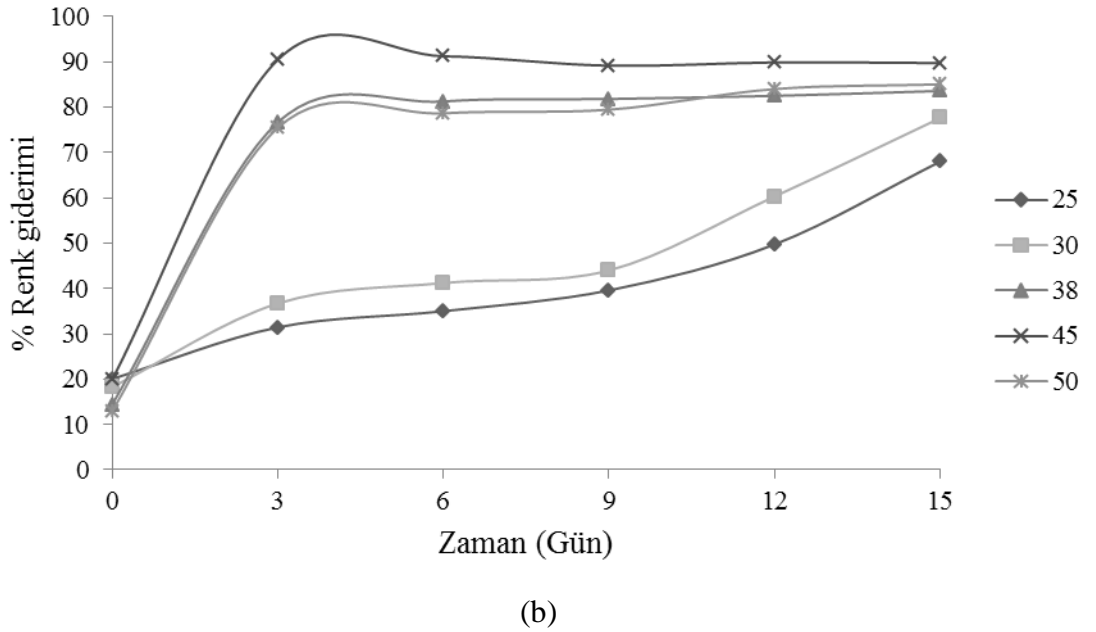
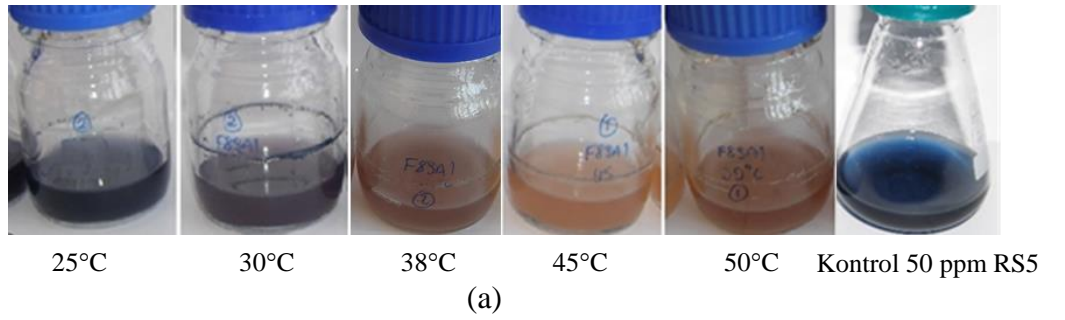
Şekil 4.16. CH7 izolatının 5 farklı pH değerindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 38°C, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

Genellikle mikrobiyal enzimatik boya renk gideriminin pH 6 -10 arasında optimum düzeyde gerçekleştiği, kuvvetli asidik ve bazik pH'larda ise hızla azalma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2003; Guo ve ark., 2007; Saratale ve ark., 2011). Halofilik ve halotolerant bakteri izolatları kullanılarak yapılan Reaktif Siyah 5 boyası renk giderim çalışmasında pH 5'ten 11'e doğru renk giderim oranının arttığı rapor edilmiştir (Asad ve ark., 2007). Guo ve ark. (2008) yüksek tuz konsantrasyonunda, ılımlı halofilik bakteri GTW izolatı ile Reaktif Brilliant Kırmızı azo boyasının maksimum renk gideriminin pH 7.5'te gerçekleştiğini bildirmiştir. Halofilik arkelere elde ettiğimiz sonuçlar da halofilik/halotolerant bakterilerle yapılan çalışmalara paralellik göstermiştir.

4.5.3. Renk Gideriminin Sıcaklığa Bağlı Değişimi

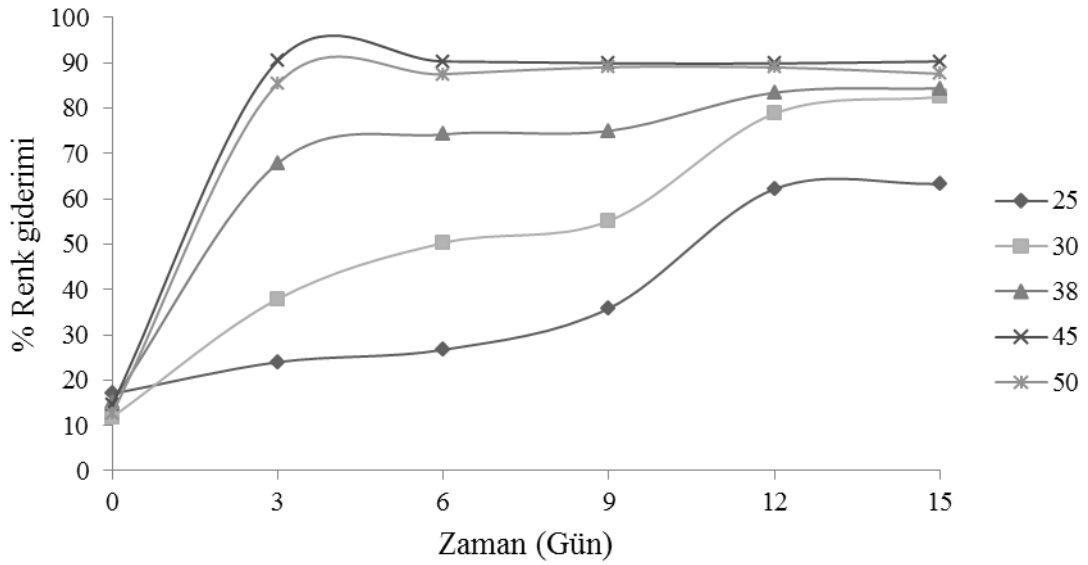
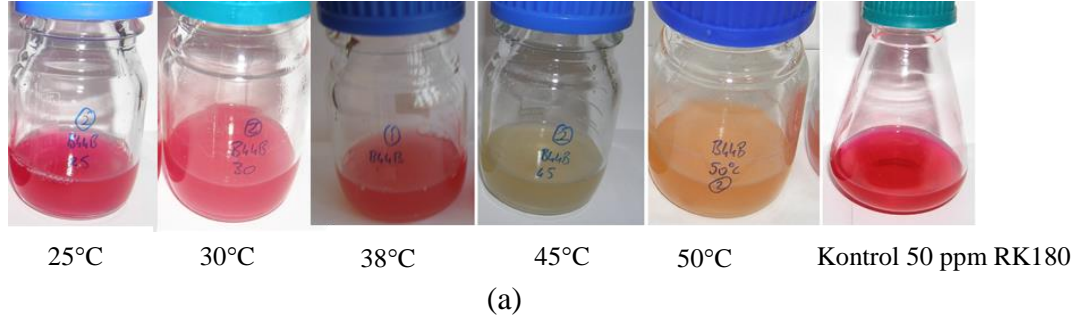
Optimum NaCl konsantrasyonu ve pH'ya sahip kültür ortamının 5 farklı sıcaklık derecesinde (25-30-38-45-50) inkübasyonu sonucunda boya renk gideriminin zamana bağlı değişimi Şekil 4.17-4.19'da verilmiştir. Üç izolat için en yüksek renk giderim oranına 45°C'de ve inkübasyon periyodunun 3. gününde ulaşılmıştır. Ayrıca 45 °C'ye kadarki sıcaklık artışına paralel olarak renk giderim oranının arttığı ve maksimum renk giderimine ulaşma süresinin kısaldığı belirlenmiştir.

F89A1 izolatında 15 günlük inkübasyon periyodu sonrasında artan sıcaklığa bağlı olarak sırasıyla %68, %78, %84, %90 ve %85 oranında renk giderimi belirlenmiştir (Şekil 4.17).



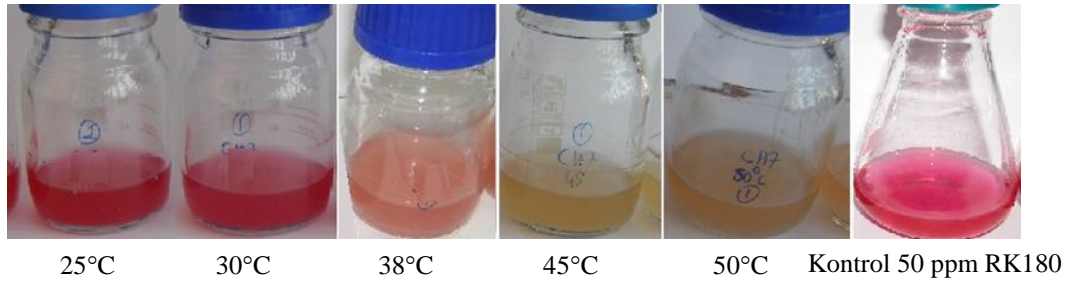
Şekil 4.17. F89A1 izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

B44B izolatının maksimum boya giderimini gerçekleştirdiği kültür ortamı sıcaklığı 45°C olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon periyodunun 15. Gününde sıcaklıklara bağlı renk giderim oranları sırasıyla %63, %82, %84, %90 ve %88 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).

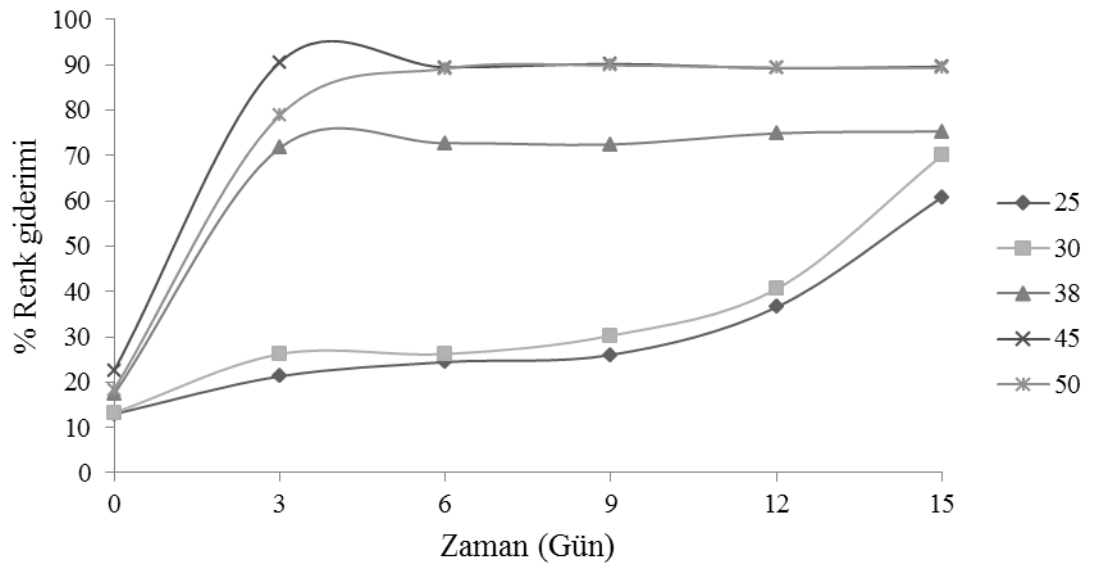


Şekil 4.18. B44B izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatında 15 günlük inkübasyon süresi sonunda 25, 30, 38, 45, 50 °C'deki renk giderim oranları sırasıyla %61, %70, %75, %91, %89 olarak bulunmuştur (Şekil 4.19).



(a)



(b)

Şekil 4.19. CH7 izolatının 5 farklı sıcaklık derecesindeki renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 120 rpm, %0.5 M.Ö]

Bakteriyal azo boya renk giderim oranının artan sıcaklıkla birlikte belirli bir seviyeye kadar arttığı ve daha sonra düşüşe geçtiği, bunun hücre canlılığı kaybı veya azoredüktaz enzimi denatürasyonundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Chang ve ark.,2001a). Ancak bazı bakterilerin azoredüktaz enziminin termostabil olduğu ve 60°C’de kısa süre aktif kalabildiği de belirtilmiştir (Pearce ve ark., 2003).

Yüksek tuz konsantrasyonunda (%15) halofilik GTW suşunun azo boyalarında optimum renk giderimini en fazla 30°C’ye kadar gerçekleştirebildiği rapor edilmiştir (Guo ve ark., 2008). Halofilik bakteri D2 suşu ve Remazol Black B boyası ile yapılan yapılan diğer bir renk giderim çalışmasında sıcaklık artışıyla (25-40°C) renk giderim oranının değişmediği, Gb ve A3 izolatlarında ise sıcaklık artışıyla birlikte renk giderim

oranının arttığı ve 40°C’de maksimum düzeye ulaştığı rapor edilmiştir (Asad ve ark. 2007).

Halofilik arkelerin optimum gelişme sıcaklıklarının genel olarak 35-50°C aralığında olması ve ekstrem enzim kaynağı olarak halofilik arke enzimlerinin sadece halofilik karakterde olmadığı aynı zamanda büyük bir kısmının termostabil olduğu bildirilmiştir (Shand ve Perez, 1999; Ozcan ve ark., 2009). Maksimum boya renk giderimi için optimum sıcaklık derecesi 45°C olarak bulunsa da 50°C sıcaklıkta boya giderim oranlarında önemli bir düşüş gözlenememiş olması boya gideriminde rol oynayan enzimin termostabil özellik gösteren azoredüktaz enzimi olabileceğini düşündürmektedir.

4.5.4. Renk Gideriminin Çalkalama Hızına Bağlı Değişimi

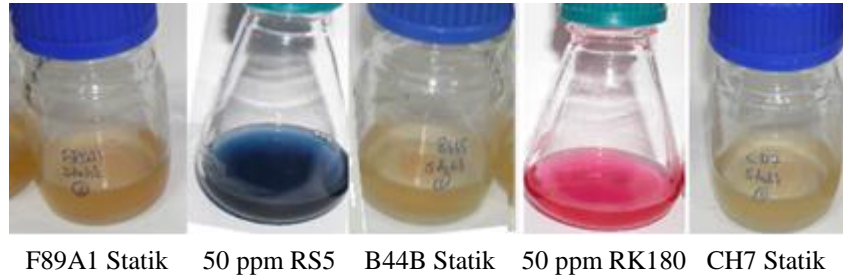
Maksimum boya giderimi için optimum NaCl konsantrasyonu, pH ve sıcaklık derecesine sahip kültür koşulları üzerine, çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla 4 farklı çalkalama hızı ve statik inkübasyon sonucunda belirlenen renk gideriminin zamana bağlı değişimi Şekil 4.20’de verilmiştir.

En yüksek renk gideriminin her üç izolat için statik koşullarda gerçekleştiği belirlenmiştir. Statik koşulların maksimum renk giderim süresini kısalttığı ve artan çalkalama hızına bağlı olarak renk gideriminin yüksek oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bir günlük inkübasyon süresi sonunda F89A1 izolatında %91, B44B izolatında %90 ve CH7 izolatında ise %82 oranında boya giderimine ulaşılmıştır (Şekil 4.20). Çalkalama hızının kültür ortamındaki oksijenlenmeyi ve azo bağındaki redüksiyonu etkilediği düşünülmektedir. Yarı anaerobik koşullara göre zorunlu anaerobik koşulların azo boyalarının renk gideriminde çok daha üstün olduğu ve azo redüksiyonu üzerine oksijenin geri dönüşümsüz etkisinin olduğu bildirilmiştir (Knapp and Newby, 1995; Pearce ve ark., 2003). *Pseudomonas luteola*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas sp. SK1*, *Micrococcus glutamicus NCIM-2168* türleriyle yapılan yapılan çalışmalarda da anaerobik koşulların renk giderim oranını arttırdığı rapor edilmiştir (Chang ve ark., 2001b; Chen ve ark., 1999; Kalyani ve ark., 2009; Saratale ve ark., 2009b).

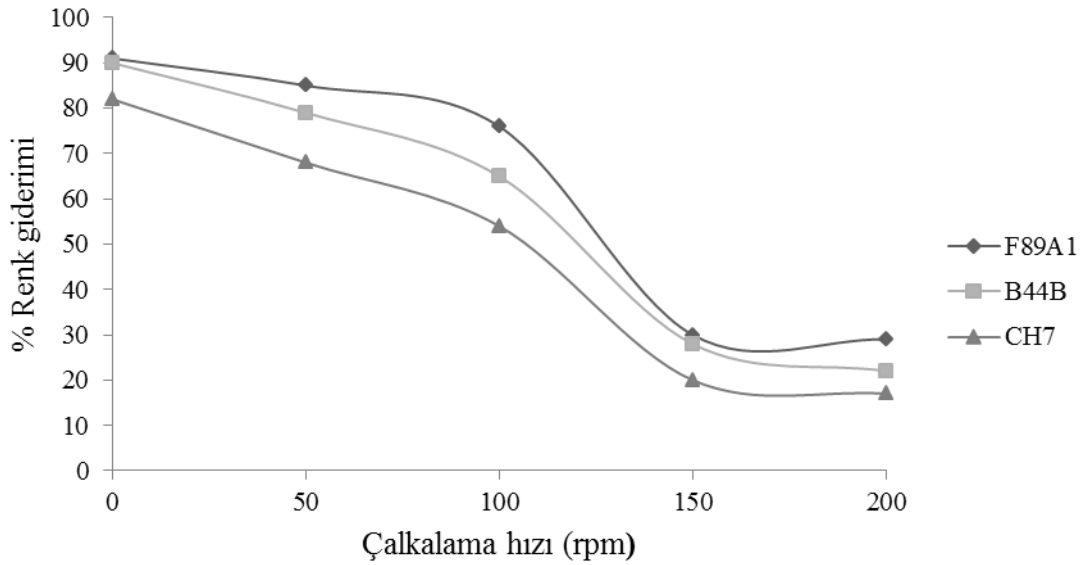
Biyolojik boya gideriminde anaerobik koşulların redüktaz enzim aktivitesini arttırdığı ancak, azo boyalarının biyodegradasyonunda rol oynadığı bilinen oksidatif enzim aktivitesi için düşük miktarda oksijenin de gerekli olduğu bildirilmiştir (Saratale

ve ark., 2011). Franciscon ve ark. (2012) tarafından *Brevibacterium sp. VN15* suşu kullanılarak öncelikle düşük oksijende ve anaerobik koşullarda aromatik aminlerin oluştuğu takip eden oksijenli koşullarda inkübasyon sonrasında ise tirozinaz aktivitesinin gözlemlendiği rapor edilmiştir. Son yıllarda yapılan anaerobik-aerobik sıralı inkübasyon çalışmalarıyla boya gideriminde daha etkili sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Saratale ve ark., 2011, Franciscon ve ark., 2012).

Boya giderimi çalışmalarından elde edilen bilgiler doğrultusunda maksimum boya giderimi için belirlenen yüksek sıcaklık derecesinin yanı sıra statik koşullarda da etkili renk giderimi gözlenmesi, yüksek sıcaklıklarda ve düşük oksijen konsantrasyonlarında aktivite gösteren azoredüktaz enziminin renk gideriminde rol oynadığını düşündürmektedir.



(a)



(b)

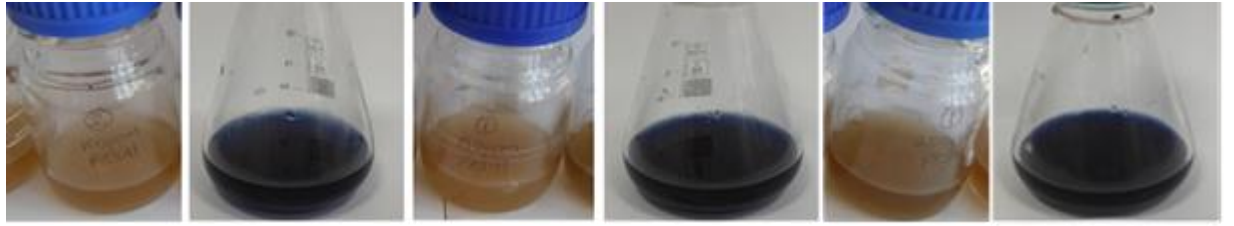
Şekil 4.20. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarının bir günlük inkübasyon süresi sonucunda statik (a) ve farklı çalkalama hızlarına bağlı renk giderim oranları (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, %0.5 M.Ö]

4.5.5. Renk Gideriminin Boya Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Halofilik arke izolatlarının rengini giderebileceği maksimum boya konsantrasyonu, bu aşamaya kadar belirlenen optimum koşullar uygulanarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21-4.23). F89A1 ve B44B izolatlarının 100-1000 ppm aralığındaki boya konsantrasyonlarında renk giderimi gerçekleştirdiği saptanırken, CH7 izolatında 500 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda renk giderimi saptanmamıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda boyaya maruz kalan izolatların renk giderim sürelerinin uzadığı da belirlenmiştir. B44B ve F89A1'in 600 ppm'e kadar olan boya konsantrasyonunda sırasıyla 9. ve 12. günde maksimum renk giderimine ulaştıkları belirlenirken, B44B izolatının 800 ppm ve üzerindeki boya konsantrasyonlarında da yüksek renk giderimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. F89A1 izolatında ise 800 ppm ve daha yüksek boya konsantrasyonlarındaki boya giderim oranında belirgin bir düşüş tespit edilmiştir.

F89A1 izolatının 100 ppm boya konsantrasyonunda 3. günde %91, 150 ve 200 ppm'de 6. gün sonunda %90 ve üzerinde, 250 ve 300 ppm'de 6. günde %80 ve üzerinde, 400, 500 ve 600 ppm'de ise ancak 9. ve 12. günlerde %80 ve üzerinde renk giderim oranına ulaşıldığı tespit edilmiştir. 800, 900 ve 1000 ppm'de ancak 15. Günde sırası ile %70, %57 ve %44 oranında boya giderimi saptanmıştır (Şekil 4.21)

B44B izolatının 100, 150 ve 200 ppm'de 1. gününde sırasıyla %93, 250, 300 ve 400 ppm'de 3. günde sırasıyla %94, %93 ve %91, 500 ppm'de 9 günde %91 ve 600 ppm'de 12. günde %90, 800, 900 ve 1000 ppm boya konsantrasyonlarında ise 15. günde sırası ile %90, %81 ve %75 oranlarında renk giderimi tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



100 ppm

Kontrol 100
ppm RS5

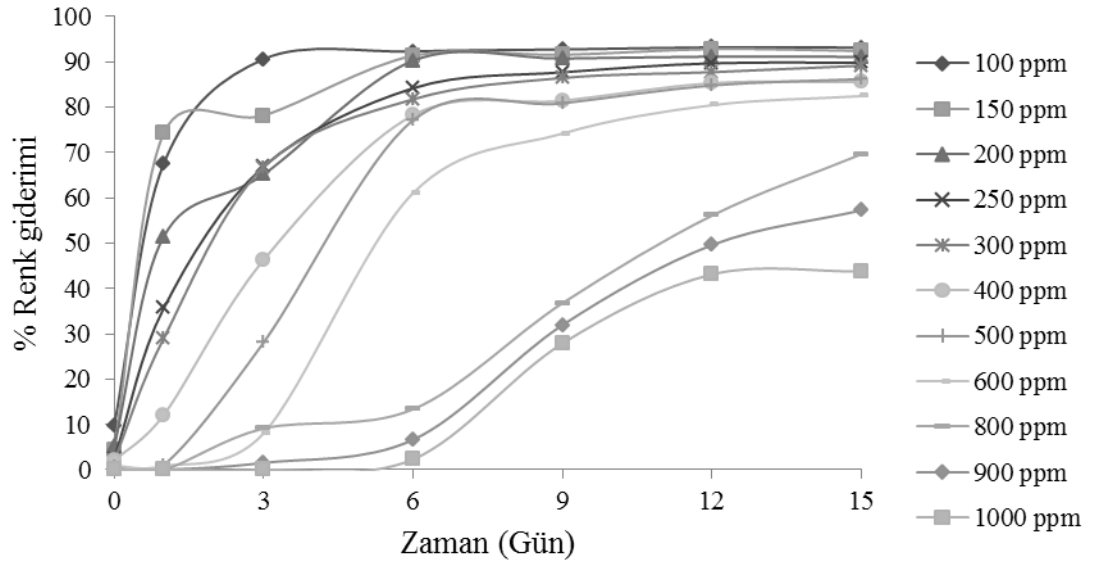
150 ppm

Kontrol 150
ppm RS5

200 ppm

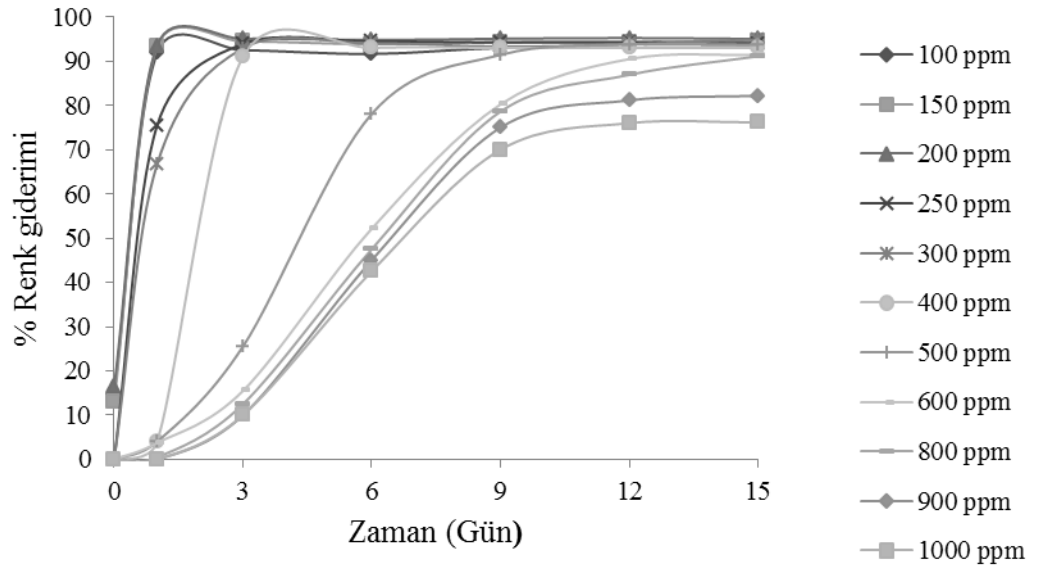
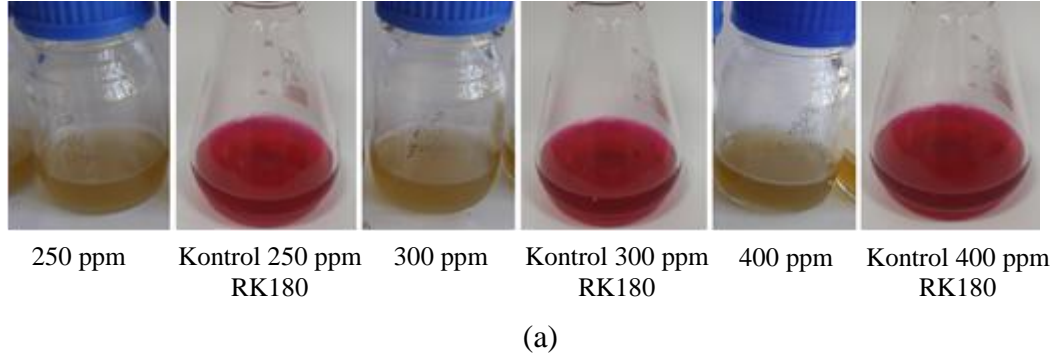
Kontrol 200
ppm RS5

(a)



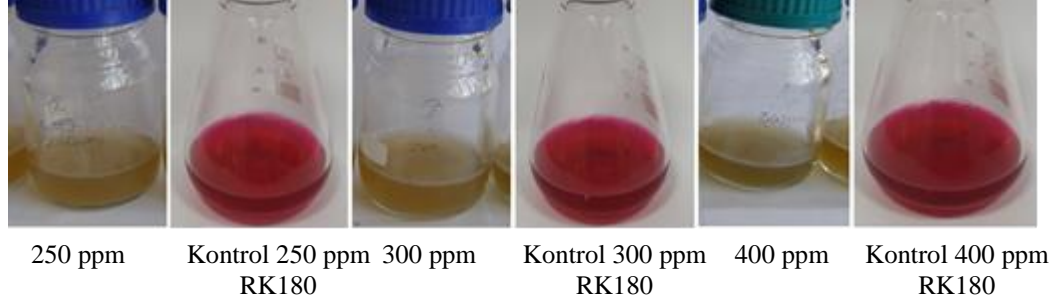
(b)

Şekil 4.21. F89A1 izolatının 11 farklı boya konsantrasyonunu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

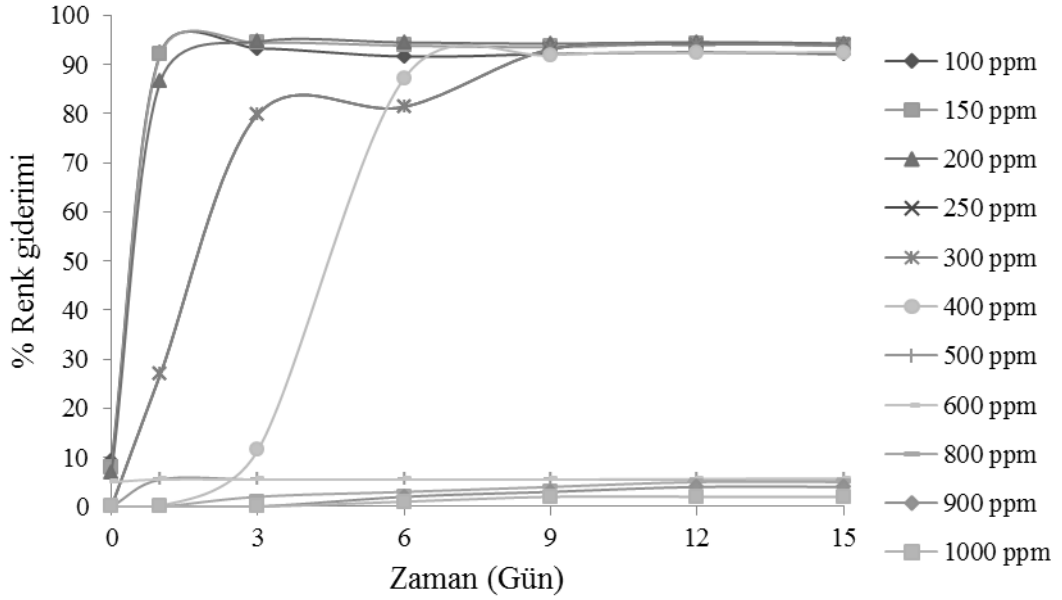


Şekil 4.22. B44B izolatının 11 farklı boya konsantrasyonunu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatının 100, 150 ve 200 ppm boya konsantrasyonunda 1. günde sırasıyla %92, %92 ve %87, 250, 300 ve 400 ppm'de 9 günde sırasıyla %93, %93 ve %92 oranında renk giderimi saptanmış olup, 500 ppm ve üzerindeki boya konsantrasyonlarında ise renk giderimi saptanmamıştır (Şekil 4.23).



(a)



(b)

Şekil 4.23. CH7 izolatının 11 farklı boya konsantrasyonunu renk giderimi (a) ve renk giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

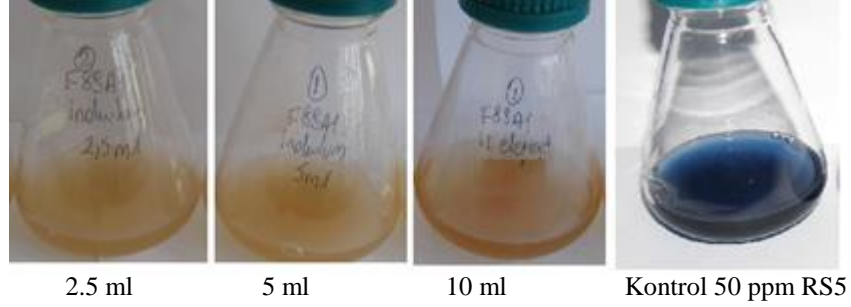
Tekstil endüstrisi atık suyunda yüksek konsantrasyonlarda boya bulunabileceğinden dolayı, artan boya miktarı varlığında renk giderimi gerçekleştiren organizmalar önem kazanmaktadır. Asad ve ark. (2007) halofilik ve halotolerant bakterilerle yapmış oldukları çalışmada 1000 ppm boya konsantrasyonunda renk gideriminin gerçekleştiğini ve izolatların 5000 ppm ve üzerindeki boyayı tolere edebildiğini bildirmişlerdir. Bakteriyel renk giderimi çalışmalarında artan boya

konsantrasyonuna bağlı olarak renk giderim aktivitesindeki azalmanın farklı yapılarıdaki boya moleküleriyle azoredüktaz aktif bölgesinin tıkasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Kalyani ve ark., 2009; Saratale ve ark., 2009b). Ayrıca sulfonik asit içeren reaktif azo boyalarındaki aromatik halkaların mikroorganizma gelişimini negatif yönde etkilediği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2003; Kalyani ve ark., 2009). Çalışmamızda kullanılan Reaktif Kırmızı 180 boyası sülfonik asit grubu içeren bir tekstil boyasıdır ve yüksek konsantrasyonlardaki boyanın CH7 izolatının gelişimini inhibe ederek renk giderimini engellediği düşünülmektedir.

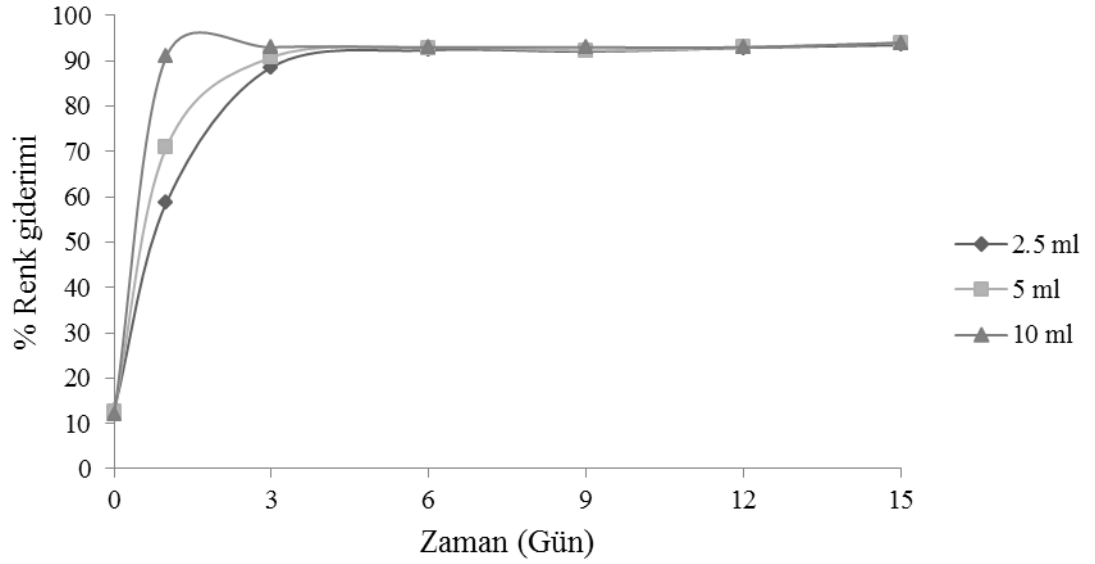
4.5.6. Renk Gideriminin İnokulum Miktarına Bağlı Değişimi

Optimum NaCl konsantrasyonu, pH ve sıcaklık derecesine sahip statik koşullarda inkübe edilen kültür ortamındaki renk giderimi üzerine 3 farklı inokulum miktarının etkisi Şekil 4.24-4.26'da verilmiştir. Her üç izolatta 15 günlük inkübasyon periyodu boyunca inokulum miktarına bağlı boya giderim belirgin bir değişiklik olmadığı ve yüksek inokulum miktarının sadece maksimum renk giderim süresini kısalttığı saptanmıştır.

F89A1 izolatının artan inokulum miktarına bağlı olarak 1. günde sırasıyla ile %59, %71 ve %91 oranında renk giderimi sağlanmıştır. 2.5 ve 5 ml'lik inokulum miktarlarında ise 3. günden sonra sırasıyla %89 ve %91 oranlarında boya giderimi sağlandığı, belirlenmiştir (Şekil 4.24).



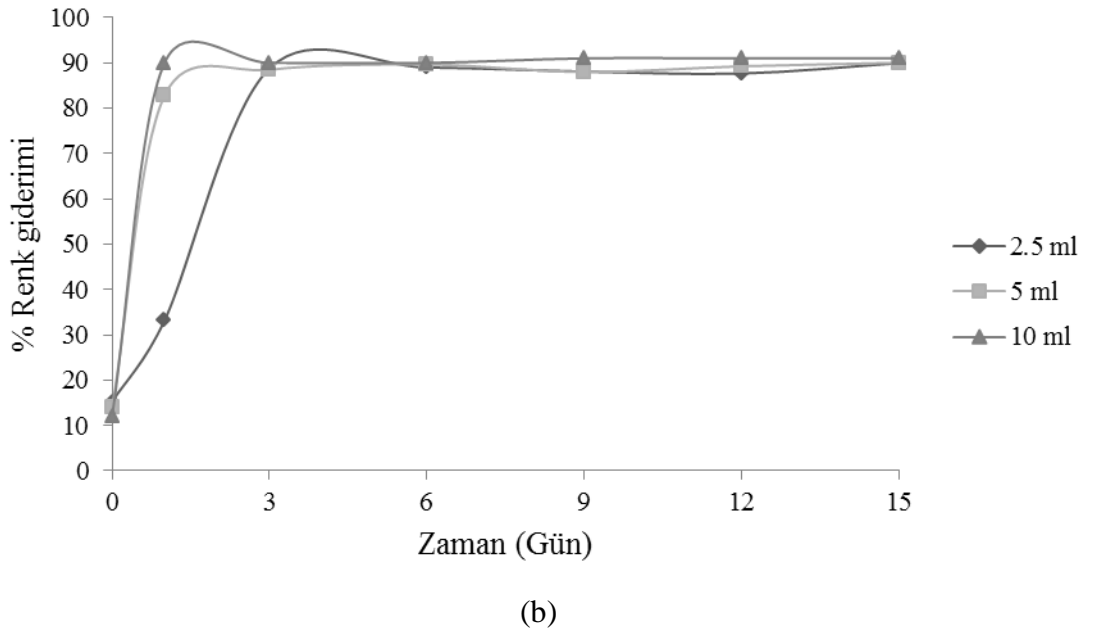
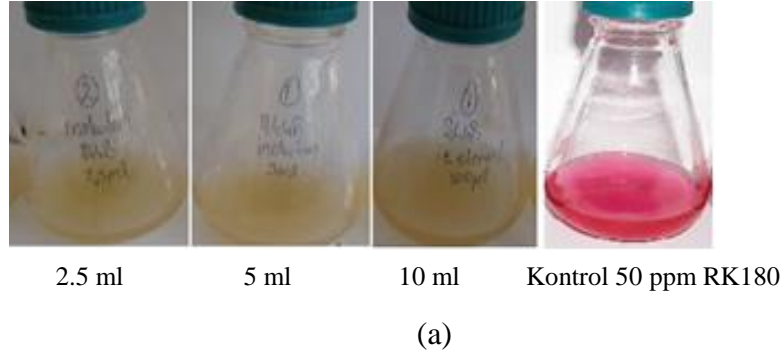
(a)



(b)

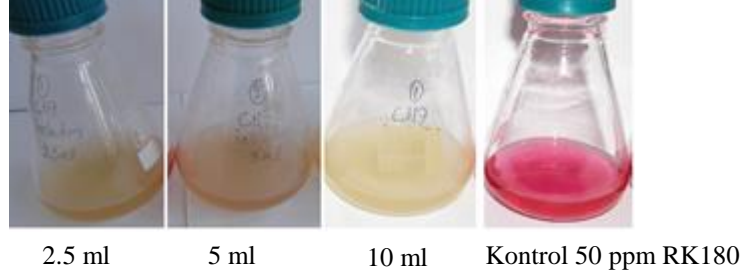
Şekil 4.24. F89A1 izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

B44B izolatının artan inokulum miktarına bağlı olarak 1. günde sırasıyla ile %33, %83 ve %90 oranında renk giderimi sağlanmıştır. 2.5 ve 5 ml'lik inokulum miktarlarında ise 3. günden sonra sırasıyla %89 ve %90 oranlarında boya giderimi sağlandığı, belirlenmiştir (Şekil 4.25).

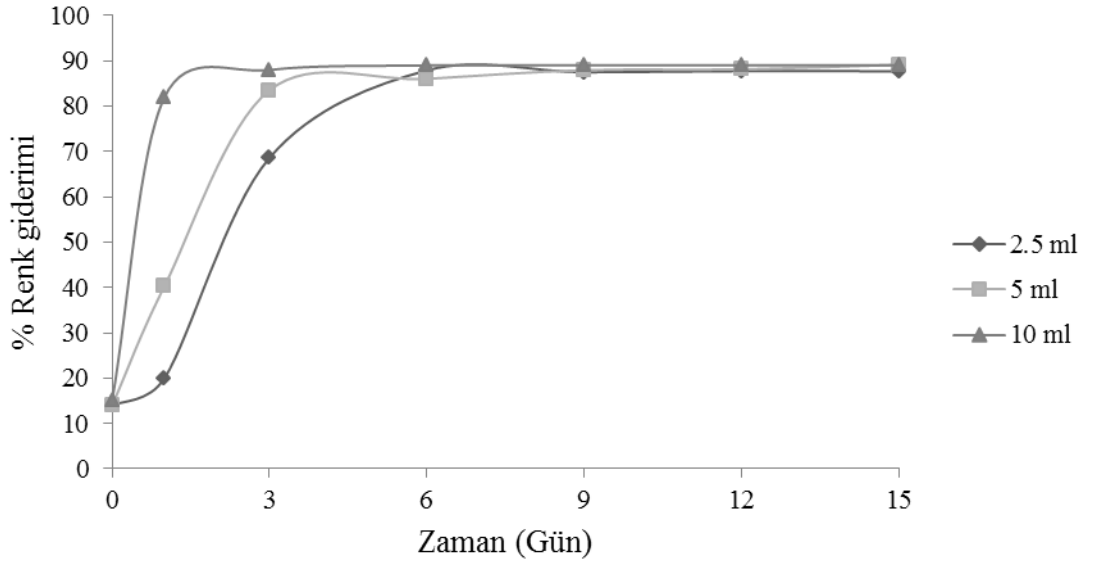


Şekil 4.25. B44B izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatının artan inokulum miktarına bağlı olarak 1. günde sırasıyla ile %20, %40 ve %82 oranında renk giderimi sağlanmıştır. 2.5 ve 5 ml'lik inokulum miktarlarında ise ancak 3. günde sonra sırasıyla %69 ve %84 oranlarında boya giderimi sağlandığı, belirlenmiştir (Şekil 4.26).



(a)



(b)

Şekil 4.26. CH7 izolatının farklı inokulum miktarlarındaki boya giderimi (a) ve boya giderim oranlarının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

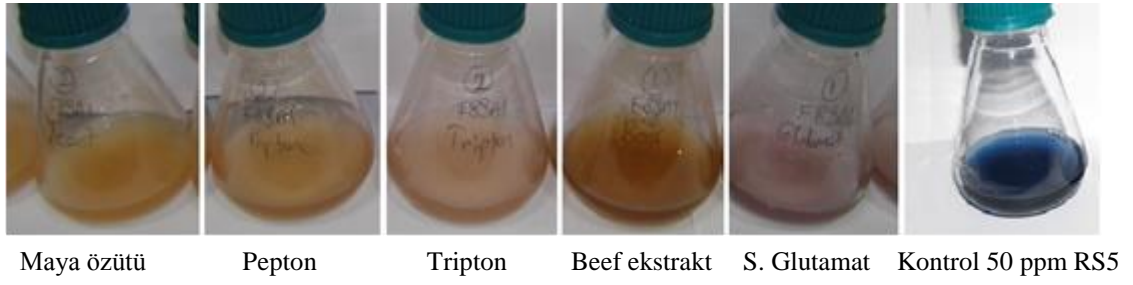
Bacillus sp. cinsine ait iki tür ile yapılan azo boya renk giderim çalışmasında maksimum boya dekolorizasyonu için optimum inokulum miktarının %8 olduğu bildirilmiştir (Kumar ve Sumangala, 2012). Aynı çalışmada farklı inokulum miktarlarından elde edilen renk giderim oranlarının optimum inokulumdan elde

edilene göre belirgin bir fark göstermemiş olması çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Ayrıca bakteri konsorsiyumu ile yapılan boya giderim çalışmasında da, %5, 10, 15 ve 20 inokulum miktarları ile 36 saatlik inkübasyon sonunda sırası ile %71, 90, 94 ve 96 oranında boya giderimine ulaşıldığı ve artan inokulum miktarına bağlı olarak maksimum renk giderim süresinin kısaldığı rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2009).

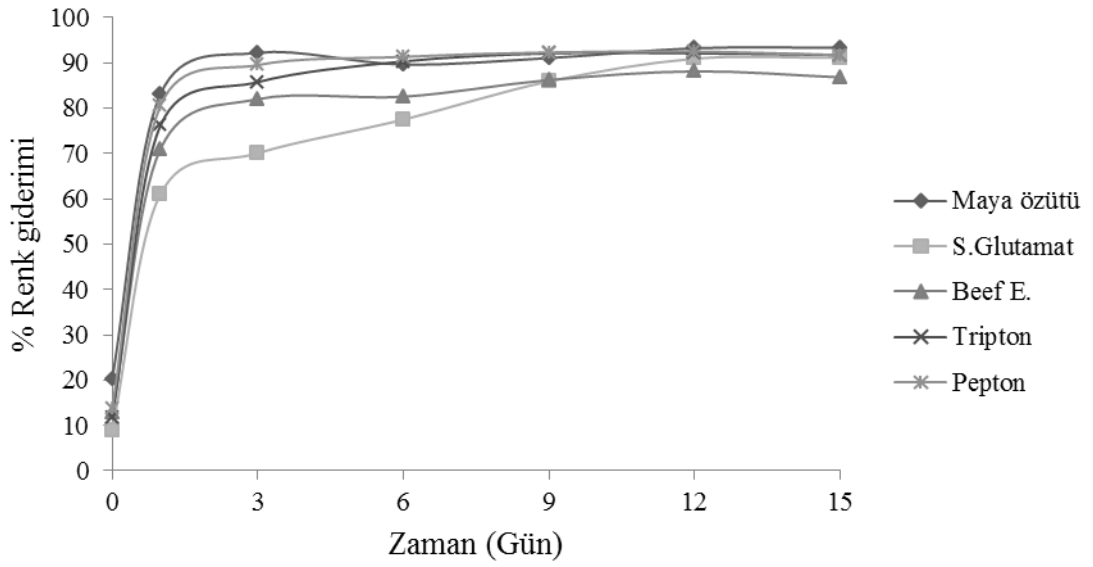
4.5.7. Renk Gideriminin Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarına Bağlı Değişimi

Boya renk giderimi ortamına (MTO) %0.5 oranında eklenen farklı karbon ve azot kaynaklarının (maya özütü, beef ekstrakt (Sığır Eti Özütü), pepton, tripton, sodyum glutamat) boya renk giderim oranına etkileri belirlenmiştir (Şekil 4.27-4.29). Her üç arkeal izolatta da beef ekstrakt ve sodyum glutamat hariç diğer karbon ve azot kaynakları ile elde edilen renk giderim oranlarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

F89A1 izolatının maya özütü, sodyum glutamat, beef ekstrakt, tripton ve pepton varlığında boya giderim oranı 15. günde sırasıyla %93, %91,%87,%92 ve %92 olarak tespit edilmiştir. Sodyum glutamat varlığında boya gideriminin ancak 9 günlük inkübasyon periyodu sonunda belirgin şekilde artış gösterdiği ve önceki günlerde diğer besin kaynaklarına göre daha düşük renk giderim oranına ulaştığı tespit edilmiştir. En kısa sürede maksimum renk gideriminin maya özütü varlığında gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 4.27).



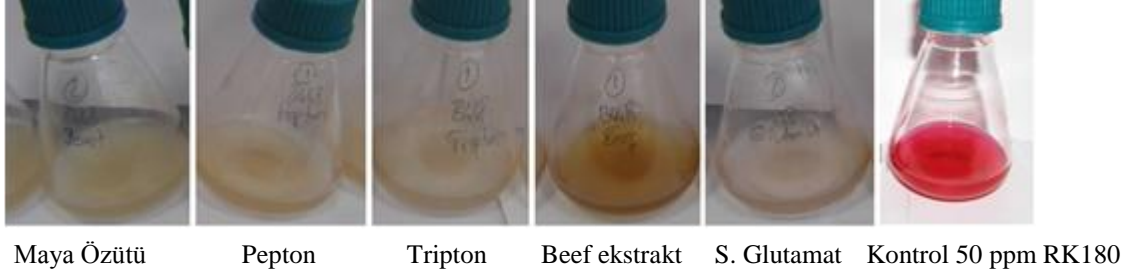
(a)



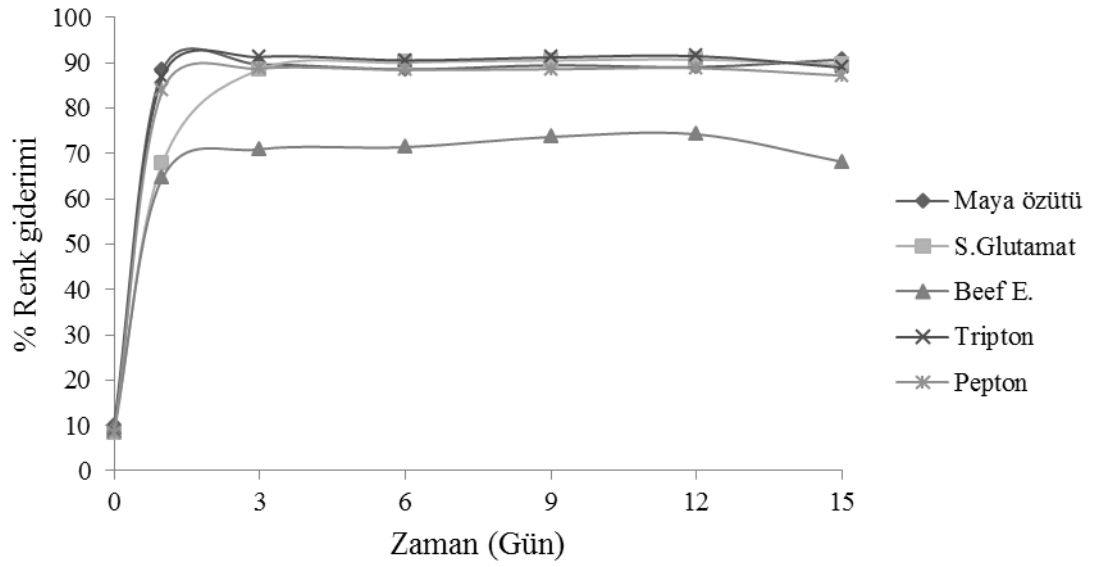
(b)

Şekil 4.27. F89A1 izolatının 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik]

B44B izolatında, beef ekstrakt dışında diğer besin kaynakları varlığında birbirine çok yakın renk giderim oranları elde edilmiştir (Şekil 4.28). 15 günlük inkübasyon süresi sonunda, maya özütü ile %91, sodyum glutamat ile %90, beef ekstrakt ile %68, tripton ile %89 ve pepton ile %87 oranında boya giderimi sağlandığı tespit edilmiştir.



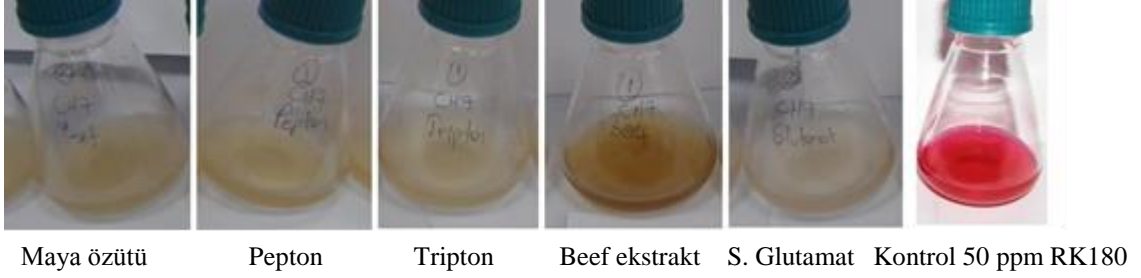
(a)



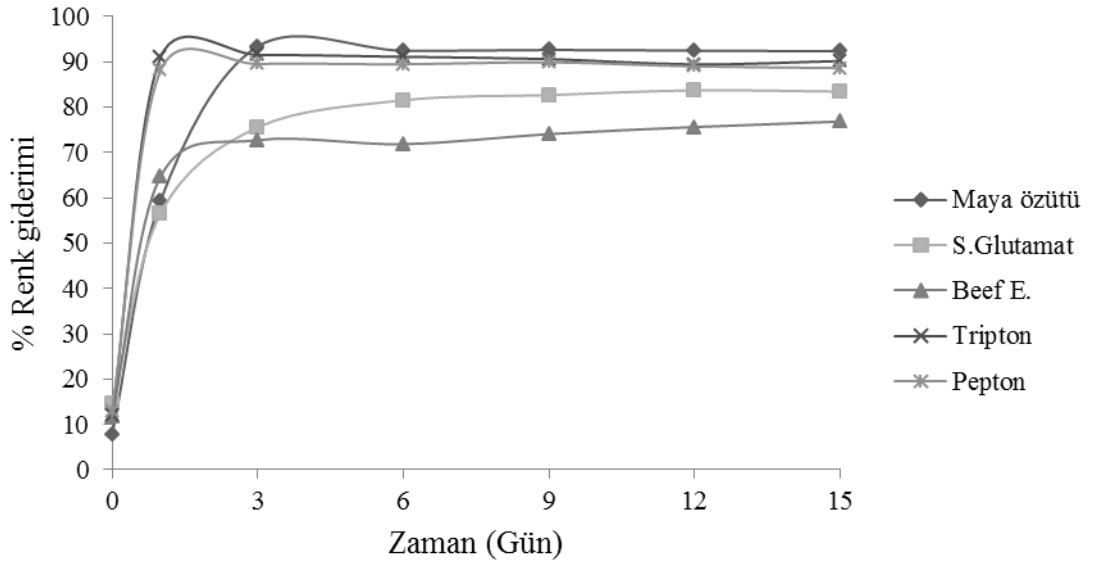
(b)

Şekil 4.28. B44B izolatının 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik]

CH7 izolatında 15 günlük inkübasyon süresi sonunda, maya özütü, tripton ve pepton besin kaynaklarının etkisiyle birbirine yakın yüksek renk giderim oranları elde edilirken (sırasıyla %92, %90, %89), beef ekstrakt ve sodyum glutamat ile elde edilen boya giderim oranlarının düşük seviyelerde kaldığı (sırasıyla %77, %83) tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



(a)



(b)

Şekil 4.29. CH7 izolatının 5 farklı karbon ve azot ortamlarındaki renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik]

Çeşitli taksonlara ait organizmalar kullanılarak yapılan boya renk giderimi üzerine farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. Örneğin, yüksek tuzlu ortamda *Shewanella sp.* ile yapılan renk giderim çalışmasında, maya özütü ile yüzde yüze yakın oranlarda renk giderimi saptandığı, inorganik azot kaynağı amonyum nitrat ile renk gideriminin çok düşük seviyelerde kaldığı bildirilmiştir

(Khalid ve ark., 2008). Asad ve ark. (2007) üç farklı halofilik ve halotolerant bakteri suşu ile yapmış oldukları boya giderimi çalışmasında, üre, amonyum sülfat, maya özütü, tripton ve soyanın renk giderimi üzerine etkisini araştırmış ve her üç izolatta da maya özütü varlığında en yüksek renk giderim oranına ulaşıldığını bildirmiştir. *Klebsiella sp.* ve *Acinetobacter sp.* cinslerine ait bakteri izolatları ile Reaktif Siyah 5 renk gideriminin optimize edildiği çalışmada, maya özütü, mannitol, glukoz ve maltozun kullanıldığı, en yüksek boya giderim oranına maya özütü ile ulaşıldığı rapor edilmiştir (Bibi ve ark., 2012).

Khehra ve ark., (2005) saf kültür ve konsorsiyum kullanarak yapmış oldukları azo boyalarının renk giderimi çalışmasında, ortamda maya özütü, pepton veya kompleks organik kaynak ve karbonhidratların bulunması gerektiğini bildirilmiştir. Karbon ve azot kaynağının azo boyalarının renk giderimini desteklediği, sadece karbon kaynağının ise renk giderimini etkili şekilde desteklemediği bildirilmiştir. (Saratale ve ark., 2009b). Pepton, beef ekstrakt, üre, maya özütü gibi organik azot kaynaklarının mikroorganizmalar tarafından azo boyalarının indirgenmesi için gerekli olan elektron vericisi kaynağı olarak (NADH) kullanıldığı ve bu nedenle etkili renk giderimi sağlanabildiği belirtilmiştir (Chang ve ark., 2000). İzolatlarımızda da maya özütü başta olmak üzere organik azot kaynaklarında yüksek renk gideriminin sağlanması NADH üretimine bağlı azo redüktaz aktivitesi artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

4.5.8. İz Element Kullanımının Renk Giderimi Üzerine Etkisi

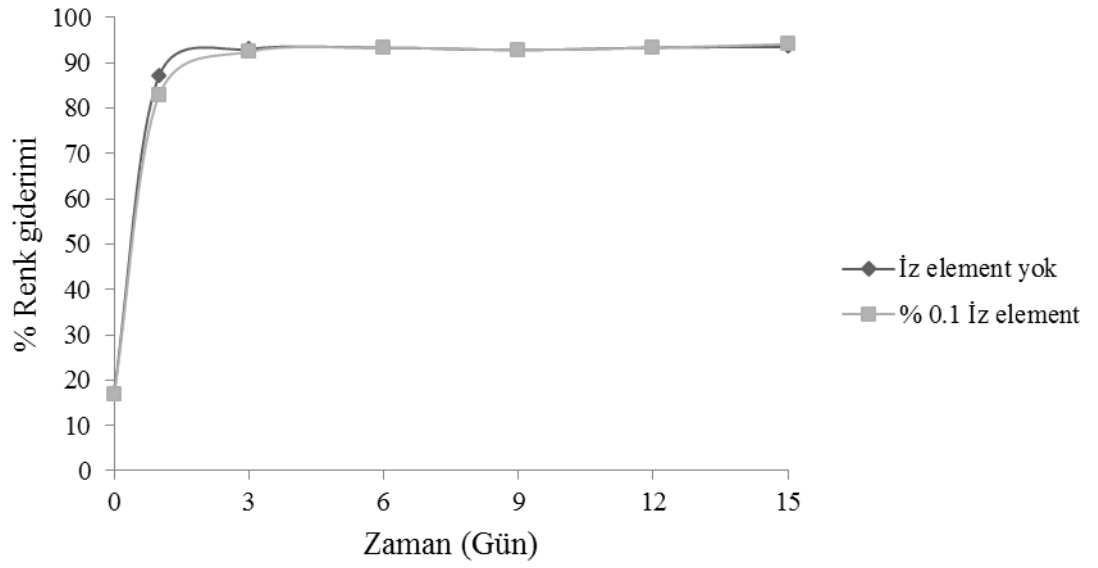
Halofilik arke izolatları ile renk giderim çalışmalarında kullanılan iz element karışımının izolatların boya rengi giderimi üzerine bariz bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.30-4.32).

F89A1 izolatında her iki ortamda da ilk 3 günlük inkübasyon sonucunda renk giderim oranlarının %90'ın üzerinde olduğu belirlenmiş olup 15 günlük inkübasyon sonucunda her iki durumda da %94 oranında renk giderimi sağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.30).



İz elementsiz %0.1 İz elementli Kontrol 50 ppm RS5

(a)



(b)

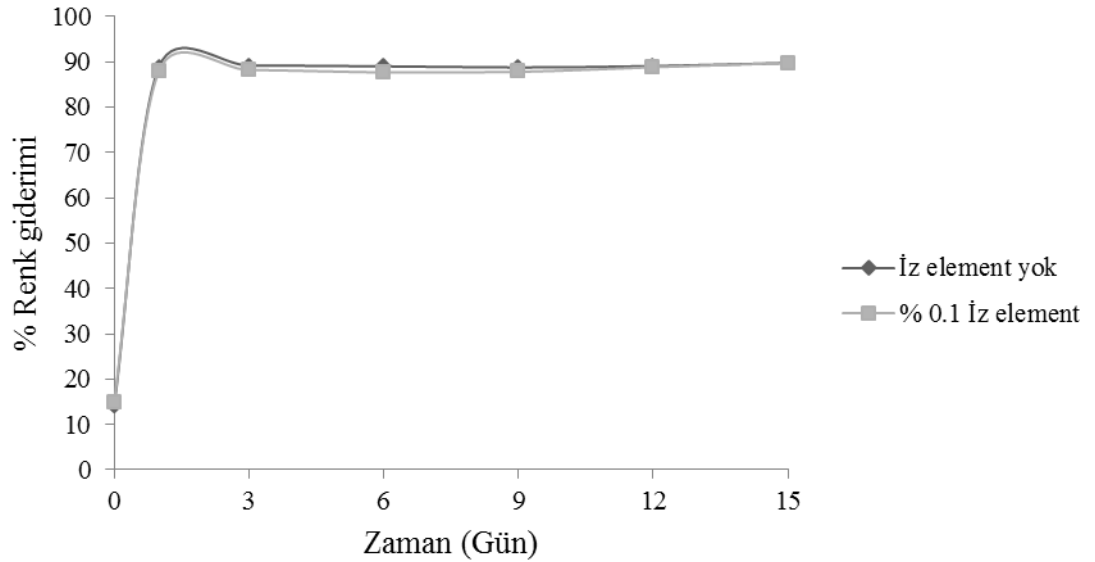
Şekil 4.30. F89A1 izolatının iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

B44B izolatında 15 günlük inkübasyon sonucunda iz element bulunan ve bulunmayan boya giderim ortamlarında %90 oranında renk giderimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.31).



İz elementsiz %0.1 İz elementli Kontrol 50 ppm RK180

(a)



(b)

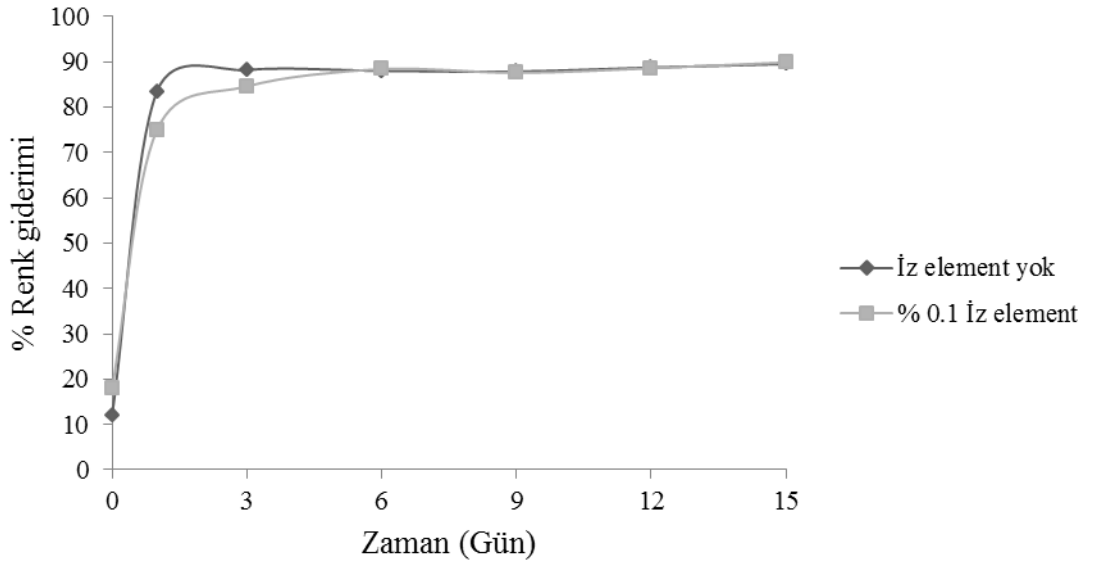
Şekil 4.31. B44B izolatının iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

CH7 izolatında, ilk üç günlük inkübasyon periyodunda iz element bulunan ortamda renk gideriminin az da olsa düşük olduğu fakat 6. günden itibaren her iki ortamdaki renk giderim oranının eşitlendiği tespit edilmiştir. 15 gün sonunda iz element içeren ve içermeyen her iki ortamda da %90 oranında boya giderimi tespit edilmiştir (Şekil 4.32).



İz elementsiz %0.1 İz elementli Kontrol 50 ppm RK180

(a)



(b)

Şekil 4.32. CH7 izolatının iz element bulunmayan ve %0.1 iz element bulunan ortamlarda renk giderimi (a) ve renk giderim oranının zamana bağlı değişimi (b) [% 20NaCl, 7.5 pH, 45°C, Statik, %0.5 M.Ö]

Bakteri ve funguslarla yapılan azo boyalarının renk giderimi çalışmalarında tirozinaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi ekstraselüler enzimlerin ve bakteriyel intraselüler azoredüktazın rol oynadığı belirtilmiştir (Franciscon ve ark., 2012; Telke ve ark., 2011, Maier ve ark., 2004). Renk giderimi ön çalışmalarında boya giderimine karışan muhtemel enzimlerin kofaktörlerinden yola çıkılarak hazırlanan iz element çözeltisinin renk giderimi üzerine herhangi bir etkisinin görülmemesi oksidaz ve peroksidazların renk gideriminde rol oynamadığını düşündürmektedir. Dolayısıyla boya rengi gideriminin NADH/NADPH bağımlı azo redüktaz enzimiyle gerçekleştiği (Chang ve ark., 2000) kabul edilmiştir.

4.6. Azoredüktaz Enzim Tayini ve Optimizasyonu

Azoredüktaz , azo bağı (-N=N-) indirgenmesini katalizleyerek renksiz aromatik boya ürünlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Chang ve ark., 2001b). Dolayısıyla bakteriyel intraselüler azoredüktazlar çevre biyoteknolojisi açısından önem arz etmektedir (Maier ve ark., 2004). Fonksiyonlarına göre azoredüktazlar flavin bağımlı veya bağımsız olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Flavın bağımlı azoredüktazlar da kendi içlerinde kofaktörlerine bağılı olarak, sadece NADH, sadece NADPH veya herikisini birlikte kullanmalarına göre sınıflandırılmıştır (Chen ve ark., 2005a,b ; Wang ve ark., 2007; Maier ve ark., 2004). Genel olarak arkelerin ya da halofilik arkelerin azoredüktazı ile yapılmış herhangi bir çalışma mevcut olmamakla birlikte bakteri, fungus, mikroalgler gibi organizmalarda yapılmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Pandey ve ark., 2007; Saratale ve ark., 2011).

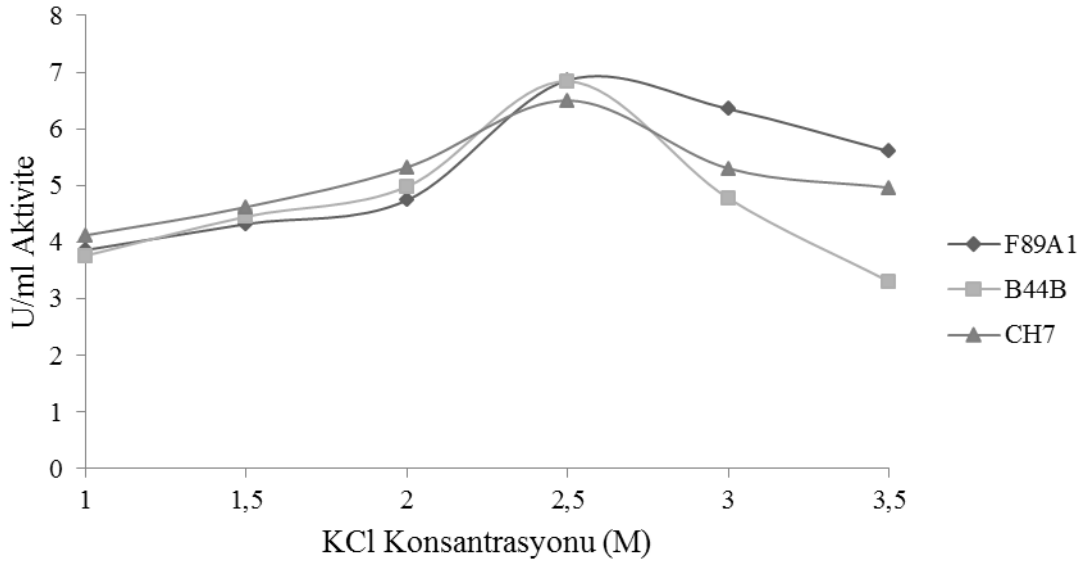
Optimum boya renk giderimi koşullarında geliştirilen F89A1, B44B ve CH7 izolatlarının hazırlanan hücre ekstraktlarından azo redüktaz enziminin NADH ve NADPH varlığında aktivite çalışmaları yapılmış olup, enzimin NADH bağımlı olduğu belirlenmiştir. Arkeal izolatlardan elde edilen ham hücre ekstraktından azoredüktaz enziminin optimum aktivite gösterdiği KCl konsantrasyonu, sıcaklık derecesi ve pH'sı belirlenerek kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

4.6.1. Azoredüktaz Aktivitesinin [KCl] Optimizasyonu Sonuçları

F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesi üzerine KCl konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla 6 farklı tuz derişiminde alınan sonuçlara göre en yüksek aktivite her üç organizma için 2.5M KCl konsantrasyonunda sırasıyla, 6.86, 6.84 ve 6.5 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.33).

Halofilik arkeler, ortamlarındaki yüksek miktarda bulunan NaCl ve diğer tuzlara karşı ozmotik dengeyi sağlamak amacıyla hücre içerisinde yüksek miktarda KCl biriktirirler. Bu nedenle intraselüler enzimleri 4 M kadar yüksek KCl konsantrasyonlarında aktif ve stabil kalmaktadır (Danson ve Hough 1997; Oren ve Mana, 2002). *Haloferax* sp. D1227A suşundan saflaştırılan gentisat 1,2-dioksigenaz enziminin maksimum aktivitesini 2 M KCl ya da NaCl'de gösterdiği bildirilmiştir (Fu ve Oriol, 1998). Diğer haloarkeal kaynaklı intraselüler enzimlerden, *Haloferax volcanii* ligazının (Hv LigN) 3.2 M KCl'de maksimum aktivite gösterdiği, NaCl'nin ise aktivite

üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Ortega ve ark., 2011). *Haloferax mediterranei* aldolazı ile yapılan diğer bir çalışmada ise maksimum aktivitenin 0.5 M KCl varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir (D'Souza ve ark., 1997). Halotolerant *Shewanella algae* ve *S. marisflavi* ile yapılan azo boya renk giderimi çalışmasında kültür ortamındaki NaCl konsantrasyonunun azoredüktaz aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiş ve maksimum enzim aktivitesinin %2 tuz konsantrasyonunda saptandığı artan tuz konsantrasyonu ile birlikte belirgin şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2012).

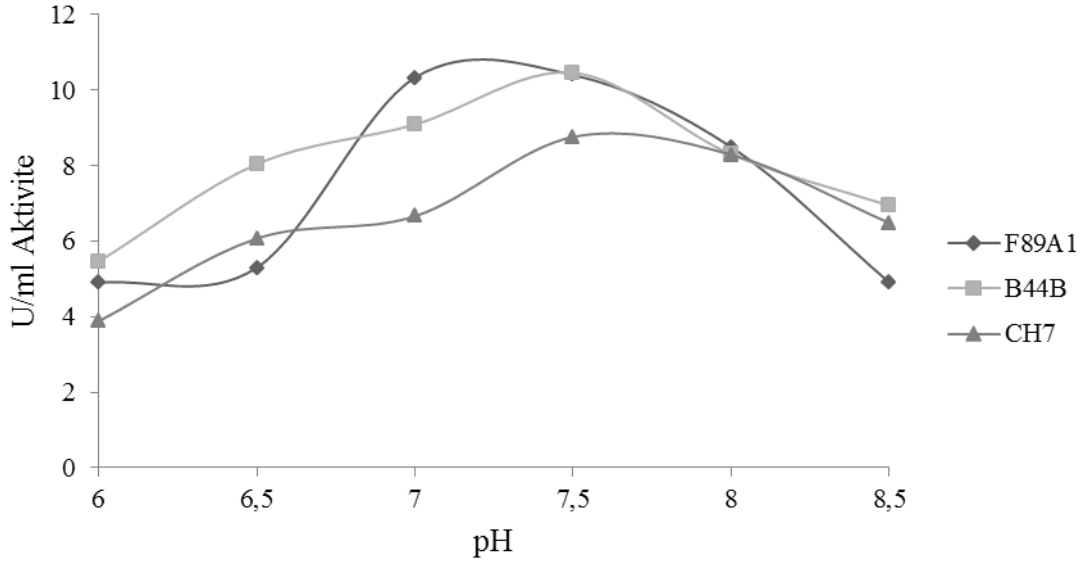


Şekil 4.33. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin KCl konsantrasyonuna bağlı değişimi

4.6.2. Azoredüktaz Aktivitesinin pH Optimizasyon Sonuçları

Üç halofilik arke izolatının, 6 farklı pH'da yapılan azoredüktaz aktivite çalışmaları sonucunda F89A1 izolatı için en yüksek aktivite pH 7.0'da 10.33 U/ml, B44B ve CH7 izolatları için en yüksek aktivite pH 7.5'te sırasıyla 10.46 ve 8.76 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.34).

Halotolerant *Bacillus megaterium* azoredüktazının optimum pH 7’de aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Khan, 2011). *Bacillus sp.* SF suşu alkali termostabil azoredüktazının substrata bağlı olarak pH 8-9’da optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Maier ve ark., 2004). *E.coli*’de klonlanarak karakterize edilen *Staphylococcus aureus* FMN bağımlı azoredüktaz (Azo 1)aktivitesi için optimum pH’nın 6-6.6 olduğu belirtilmiştir (Chen ve ark., 2005b)

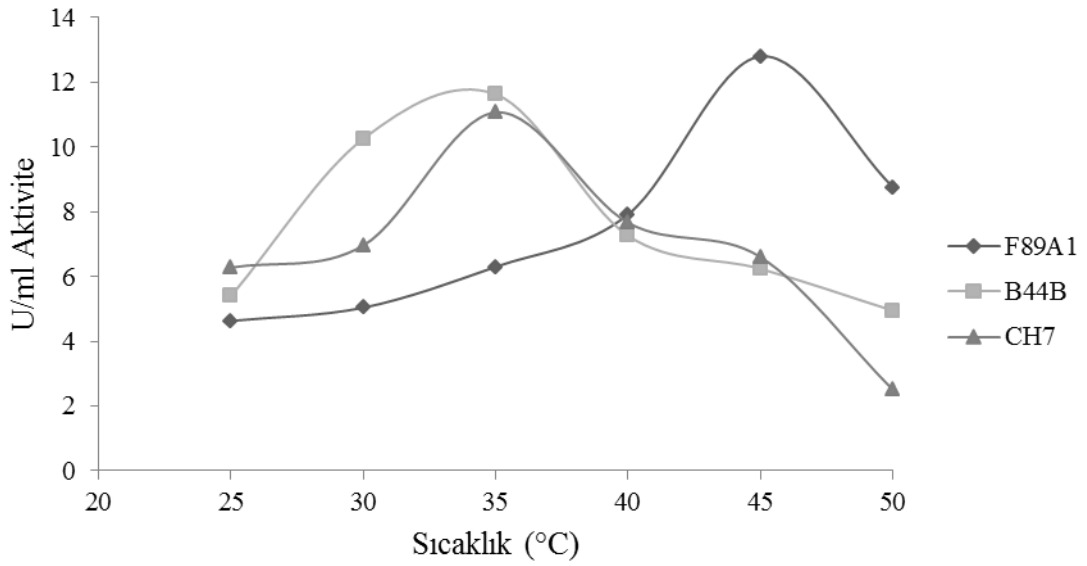


Şekil 4.34. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin pH’ya bağlı değişimi

4.6.3. Azoredüktaz Aktivitesinin Sıcaklık Optimizasyon Sonuçları

F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında, azoredüktaz enziminin optimum sıcaklık derecesinin belirlenmesi amacı ile optimum KCl konsantrasyonu ve pH’da 6 farklı sıcaklık derecesinde yapılan azoredüktaz enzim çalışmaları sonucunda, F89A1 suşunun, optimum azoredüktaz aktivitesi için sıcaklık derecesi 45°C olarak tespit edilmiş olup bu sıcaklık derecesinde enzim aktivitesinin 12.8 U/ml olduğu belirlenmiştir. B44B ve CH7 izolatlarının, optimum azoredüktaz aktiviteleri için gerekli sıcaklık ise 35°C olarak belirlenmiş olup bu sıcaklıktaki enzim aktiviteleri sırası ile 11.63 ve 11.07 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.35).

Halotolerant *Bacillus megaterium* azoredüktazının optimum 30-45°C’de aktivite gösterdiği (Khan, 2011). *Bacillus sp.* SF suşunda alkali termostabil azoredüktaz aktivitesinin 80°C’de maksimum düzeye ulaştığı rapor edilmiştir (Maier ve ark., 2004). Bazı bakteri hücre preparatlarındaki azoredüktaz enziminin termostabil olduğu ve 60 °C sıcaklıkta kısa süre aktif kalabildiği belirtilmiştir (Pearce ve ark., 2003). *S. aureus* Azo 1 enziminin maksimum 35-40 °C’de aktivite gösterdiği ve 55 C’ye kadar stabil kaldığı, 60°C’de inaktive olduğu belirtilmiştir (Chen ve ark., 2005b).



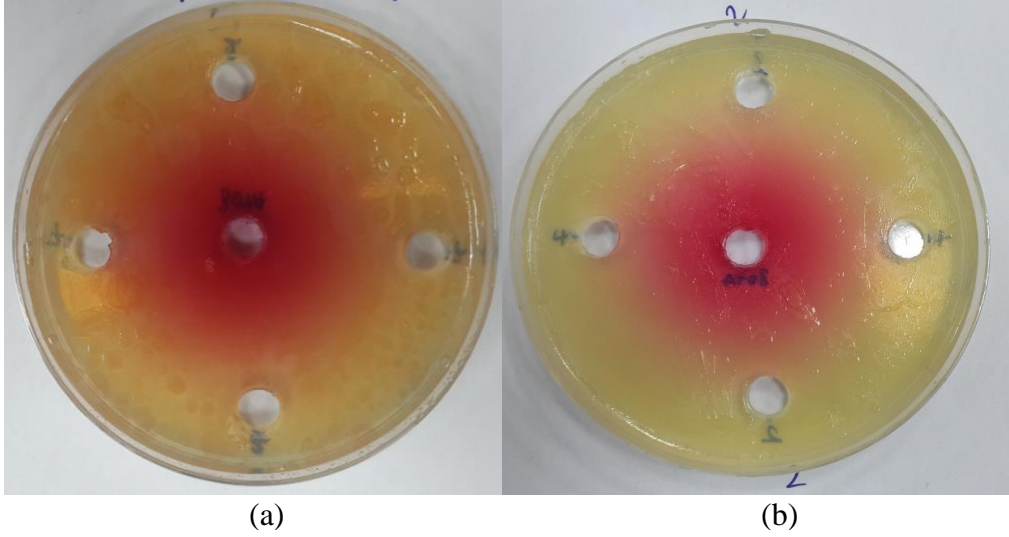
Şekil 4.35. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında azoredüktaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

4.7. Boyar Maddelerin Toksisitesi ve Renk Giderimine Bağlı Toksisite Sonuçları

Arkeal izolatların boya renk giderimi ürünlerinin ve boyaların toksik etkisi agar difüzyon yöntemi (Şekil 4.36) ve Mikrotoks sistemi ile belirlenmiştir. Her iki toksisite analiz yönteminde de öncelikle boyaların toksik etkisinin araştırılması, ayrıca renk giderimi sürecinde farklı inkübasyon koşullarında ve süresinde meydana gelebilecek ürünlerin toksik olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Agar difüzyon sonuçlarına göre, her iki boyanın izolatlar ve *Natrialba asiatica* DSM12278 standart suşu üzerine toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. İnkübasyon

periyodunun 2. günü (statik) ve takip eden 7. günü (çalkalamalı) kültürlerden elde edilen filtratların da arkeal suşların gelişimini inhibe etmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.36. B44B izolatı (a) ve *Natrialba asiatica* standart suşunun (b) üzerine Reaktif Kırmızı 180 boyası ve yıkım ürünlerinin toksisitesi

Beyaz çürükçül fungus *Funalia trogii* ile azo boyalarının renk giderimi sonrası elde edilen kültür filtratının *S. aureus* ve *F. trogii* üzerindeki toksik etkisinin önemli ölçüde giderildiği rapor edilmiştir (Apohan ve Yesilada, 2005). Endüstriyel atık sularından izole edilen *Corynebacterium sp.* suşu ile yapılan renk giderim sonrasındaki kültür ortamının aynı organizma üzerinde toksik etki göstermediği belirtilmiştir (Chang ve Kuo, 2000). Toksikite gösterdiği belirlenen dört farklı azo boyasının bakteri suşu kullanılarak yapılan anaerobik/aerobik sıralı renk giderimi sonrası açığa çıkan boya yıkım ürünlerinin toksisitesinde azalma meydana geldiği ve aerobik inkübasyon sonrasında toksisitenin tamamen giderildiği bildirilmiştir (Franciscon ve ark., 2012). Azo boyalarının anaerobik koşullarda mikrobiyal azoredüktaz aracılığıyla azo bağlarının kırılarak potansiyel tehlikeye sahip renksiz aromatik aminlere dönüştüğü, devam eden oksidatif metabolizma sonrasında ise aromatik aminlerin yıkılarak daha az toksik ürünlere dönüştüğü bildirilmiştir (Khan ve ark., 2012).

Mikrotoks analizi sonucunda Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Kırmızı 180 boyasını içeren (50 ppm) MTO ortamlarında hormesis etkisi gözlemlenmiştir. Potansiyel toksik maddelerin düşük konsantrasyonlarının uyarıcı etkiye neden olabilmesi ve kontrol

grubuna göre daha yüksek ışık salınımı yapması olgusu hormesis olarak ifade edilmektedir (Ma ve ark., 2014). Ferraz ve ark. (2011) Disperse Orange 1 boyasının Mikrotoks analiz sisteminde *V. fischeri* üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığını belirtmiştir. Onbir farklı reaktif boyanın Mikrotoks sistemiyle yapılan diğer bir toksisite çalışmasında ise Ambifix yellow VRNL azo boyasının en toksik ve Procion blue HERD'in ise en düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2007). Ayrıca inorganik besinlerden Na^+ , K^+ and Ca^{+2} iyonlarının *V. Fischeri*'de ışık salınımını indüklediği bildirilmiştir (Ma ve ark., 2014). Halofilik arke kültür ortamında boyalarla birlikte her üç inorganik maddenin mevcut olmasının da ışık salınımını arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

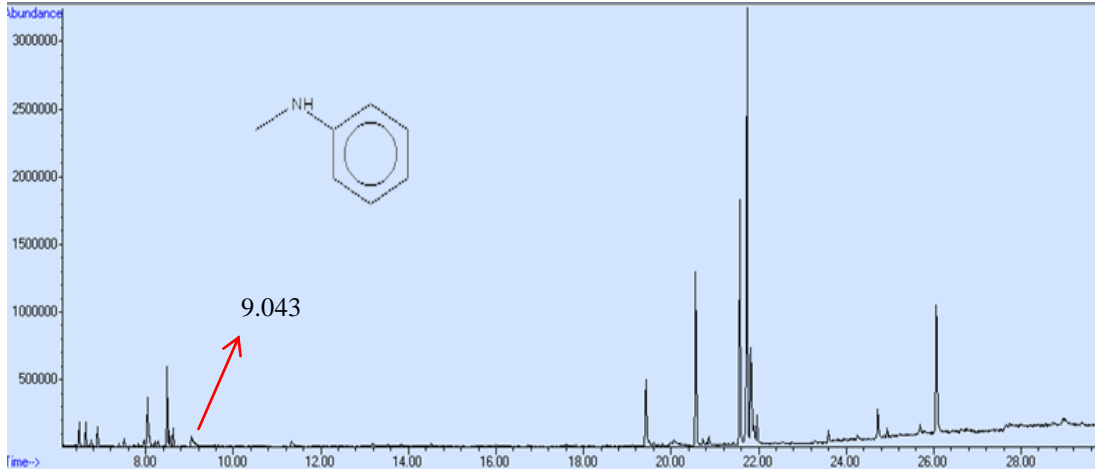
F89A1 izolatının RS5 boyasının rengini giderdiği 2 günlük statik kültür filtratındaki toksisite biriminin (TU) 5 ve 7. gün çalkalamalı kültür filtratındaki TU değerinin ise 4 olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla çalkalamalı koşullarda artan 7 günlük kültür periyodu içerisinde boya yıkımı sonucunda oluşan ürünlerin toksisitesinde az da olsa bir düşüş olduğu düşünülmektedir. Aynı koşullarda B44B ve CH7 izolatlarının RK180 boyasının renk gideriminde kullanılmasıyla elde edilen 2 günlük ve 7 günlük kültür filtratlarında TU değerlerinin 4 olduğu belirlenmiştir. Her iki izolatın boya yıkımı sonucu oluşturduğu ürünlerin düşük bir toksisite değerine sahip olduğu ve bu değerinkübasyon periyoduna bağlı olarak değişmediği tespit edilmiştir. Farklı boyar madde giderim çalışmalarında, boyar maddelere maruz kalma sonucunda organizmalarda çeşitli düzeylerde toksik etkiler meydana gelebileceği belirtilmiştir. Cibacron Brilliant sarı 3B-A ve Kongo kırmızısı boyalarının düşük derecede toksik boyalar olduğu renk giderimi çalışmaları sonrasında mikrotoks yöntemi ile elde edilen verilere göre toksisitenin önemli derecede arttığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada başlangıçta belirli seviyelerde toksik özellik gösteren Reaktif Mavi 15, Remazol Brilliant Blue R ve Cibacron Brilliant Red 3G-P boyalarının renk giderimi sonrası toksik etkilerinin kaybolduğu belirtilmiştir (Ramsay ve Nguyen, 2002).

4.8. Boya Yıkım Metabolit Profilinin Değerlendirme Sonuçları

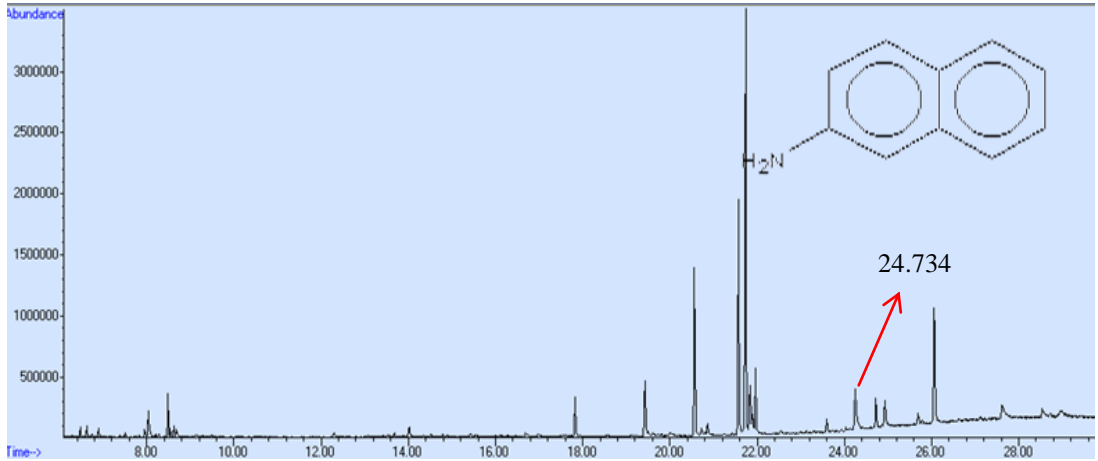
Boya yıkım metabolit profilleri, toksisite çalışmalarında kullanılan filtratların GC-MS ile analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Metabolit profili için 2. ve 7. gün sonuçları değerlendirilirken, boyanın kimyasal yapısı ve yıkım mekanizması göz önüne alınıp

oluşabilecek ara metabolitlerden yola çıkılarak (Şekil 2.2. Kısım 2.4) GC-MS analizlerinden elde edilen kromatogramlar ve kütüphane verisi sonuçlarına göre belirlenen her bir pik için verilen kimyasal madde ihtimalleri taranmıştır. CAS numaralarından yararlanılarak maddelerin kimyasal yapısı incelenmiştir.

İzolatlardan ve boya uygulamalarının 2. ve 7. gün kültür periyoduna ait GC-MS kromatogramları (Şekil 4.37-4.39) değerlendirildiğinde, boya yıkım ürünü olabileceği tahmin edilen amin gruplarına sahip aromatik bileşikler belirlenmiştir. Boya yıkım çalışmalarında açığa çıkan aromatik aminlerin, azo bağlarının kırılmasından ve boyaya bağlı amin gruplarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Junnakar ve ark., 2006). F89A1+RS5 uygulamasında toplam 5 adet pik belirlenmiştir. İkinci inkübasyon gününde alıkonma zamanı (RT) 9.043 olan pikin anilinden kaynaklandığı, 7. gün kromatogramında ise ilgili pikin kaybolduğu tespit edilmiştir. Sadece 7. gün kromatogramında açığa çıktığı belirlenen 2-Naftalenamin (24.734 dak.) pikinin ise ilerleyen degradasyon aşamasında oluştuğu anlaşılmaktadır. 24.941 ve 25.695. dakikalarda açığa çıkan piklerin ise her iki inkübasyon gününde mevcut olduğu tespit edilmiştir. Kromatogramlardaki yüksek alana sahip olan diğer piklerin ve 8.679 pikinin halkasal yapı göstermemesi nedeniyle boya yıkımı kaynaklı metabolitler olmadığı düşünülmektedir. Genel olarak, aerobik koşullarda inkübasyon sonucunda metabolit sayısının arttığı, 2. günde tespit edilemeyen bazı ara metabolitlerin 7. günde oluştuğu belirlenmiş olup, yeni piklerin oluşması nedeniyle boya yıkımının devam ettiği düşünülmektedir. Reaktif Siyah 5 diazo boyasının yıkım ürünlerinin belirlenebilmesi için yapılan GC-MS analizleri sonucunda, Fenton oksidasyonu ile birlikte gerçekleştirilen degradasyonda anilin yapısının oluştuğu ve biyolojik yıkım ile 1-Aminonaftalen bileşiklerinin oluştuğu belirtilmiştir (Bahmani ve ark., 2013).



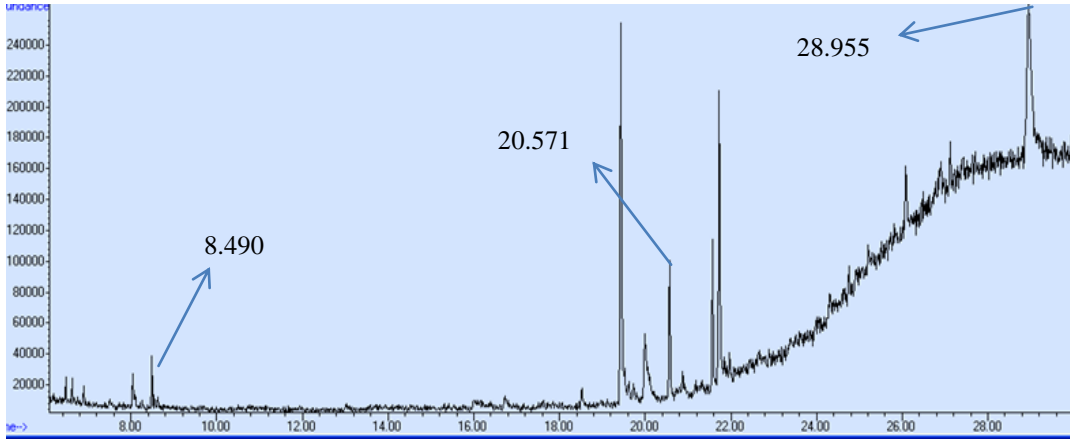
(a)



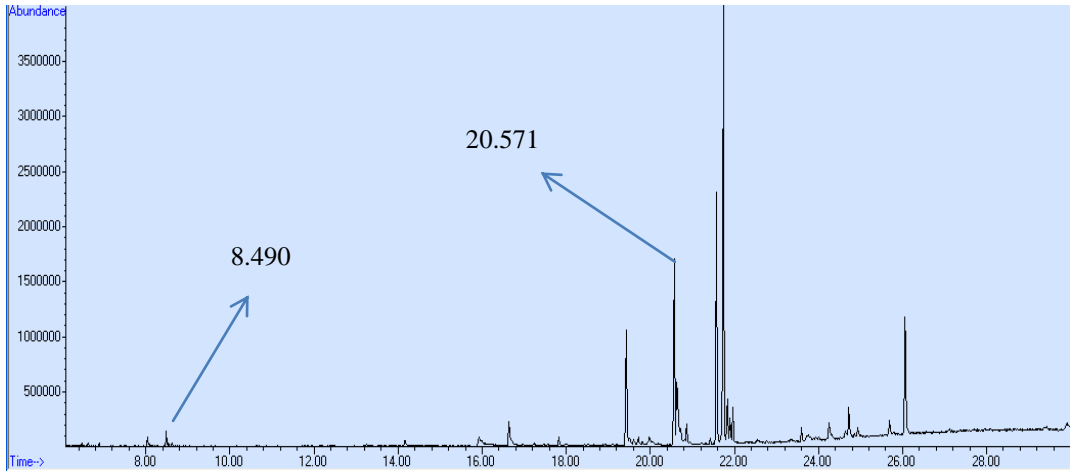
(b)

Şekil 4.37. F89A1 ile RS5 boyasınının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı

B44B ve RK180 uygulanmasının 2. gün kültür filtratına ait kromatogramında (Şekil 4.38) alıkonma zamanları 8.490, 20.571 ve 28.955 olarak belirlenmiş piklerin aminli aromatik bileşiklere ait olmasından dolayı muhtemel boya yıkım ürünleri olduğu düşünülmüştür. 7.günde, 28.955 pikinin tamamen yok olduğu, 8.490 pikinde azalma olduğu, 20.571 pikinde ise artış meydana geldiği tespit edilmiştir. 2 ve 7 günlere ait pikler karşılaştırıldığında 7. günde çok daha fazla boya yıkım ürününün ortaya çıktığı ve bunlar arasından 8 tanesinin aromatik amin grubu içerdiği tespit edilmiştir.



(a)

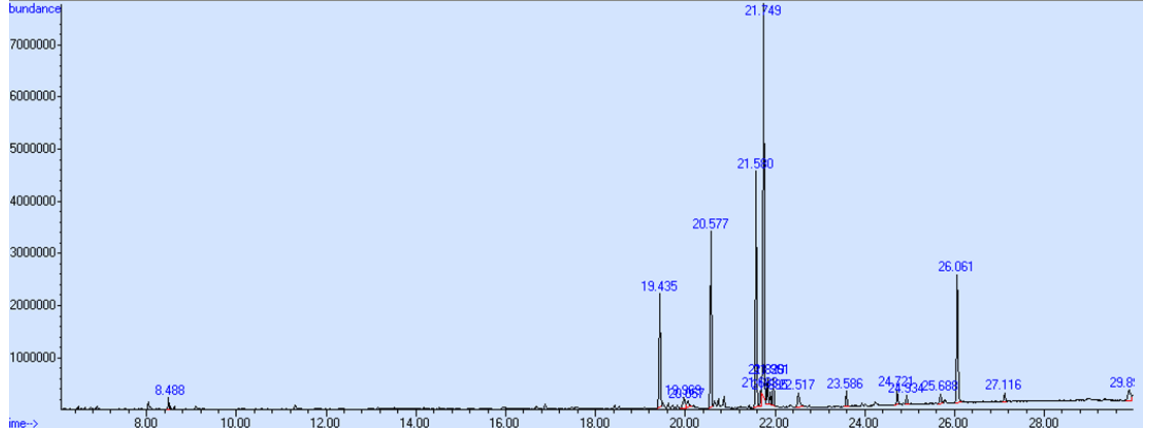


(b)

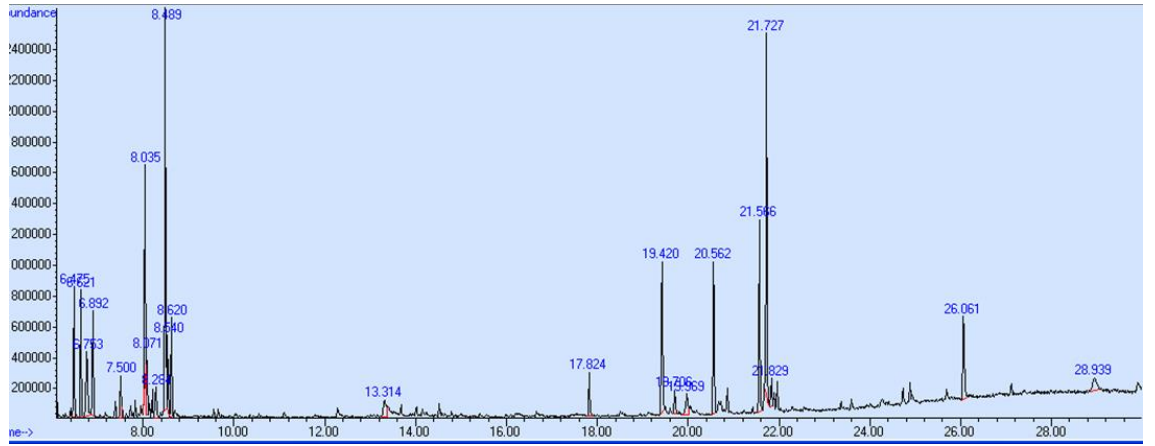
Şekil 4.38 B44B ile RK180 boyasının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı

CH7 ile RK180 boyasının 2. gün degradasyonu sonrasında amin grubu içeren 8 adet olası bileşik tespit edilmiştir (Şekil 4.39). Bu piklerden bazılarının 7.gün sonunda yok olduğu belirlenmiş ve 7. gün sonunda diğer iki izolatta olduğu gibi yıkım ürünü olduğu düşünülen piklerde önemli miktarda artış olduğu gözlemlenmiştir. *Halomonas* suşu ile Reaktif Siyah 5'in renk gideriminin gerçekleştirildiği çalışmada, HPLC analiziyle boya yıkım ürünlerinin genel profili değerlendirilmiş ve yıkım sonrası ortamda mevcut olan ancak boya içermeyen kontrol ortamında mevcut olmayan 2 adet

pikin belirlendiği ve bu piklerin boya degradasyonu sonrası açığa çıkan aromatik aminli ürünler olabileceği rapor edilmiştir (Asad ve ark., 2007) .



(a)



(b)

Şekil 4.39. CH7 ile RK180 boyasının statik (a) ve aerobik renk giderim (b) ürünlerinin GC-MS kromatogramı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nüfus artışıyla birlikte insan ihtiyaçlarının artması, endüstriyel alanda özellikle 20. yüzyılın ortalarından itibaren önemli gelişmelere yol açmıştır. Hızlı şehirleşme ve endüstriyel gelişme, bir çok kimyasal maddenin günlük yaşantımızda kullanılmasını kaçınılmaz kılmıştır. Endüstriyel prosesler sonucunda çevreye bırakılan organik kirleticilerden boyar maddeler, en toksik ve tehlikeli organik atıklar arasında yer almaktadır. Boyar maddeler, tekstilden kozmetiğe, farmasötikten deri ve boya sanayine kadar farklı endüstrilerde kullanılmaktadır. Endüstriyel atıklarla çevreye bırakılan boyaların büyük çoğunluğu, boyar maddenin fibril yapıya %100 affiniteyle bağlanamamasından dolayı, tekstil sanayinden kaynaklanmaktadır. Tekstil endüstrisinde kullanılan boyaların büyük bir kısmını bir veya daha fazla sayıda azo bağı (N=N) içeren azo boyaları oluşturmaktadır. Azo boyaları, ucuz, fazla renk çeşidi ve kolay uygulanabilirlik gibi avantajlara sahip olmasından dolayı sıklıkla kullanılmaktadırlar. Ancak zor yıkıldığı ve toksik oldukları için önemli çevresel tehdit oluşturmaktadırlar.

Atık kaynaklı tekstil boyar maddeleri çevrede farklı zararlı etkilere yol açabilmektedir. Bu tip atıklar fotosentetik aktivitenin, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun ve su kalitesinin azalmasına neden olduğu gibi flora ve fauna üzerinde akut toksik etkilere de yol açmaktadır. Çeşitli canlılar için yaşam ortamı sağlayan toprağın erozyonunu engelleyen ve verimliliği için organik madde sağlayan bitkilerin çimlenme oranları üzerine de toksik etki göstermektedir. Ayrıca azo boyalarındaki azo bağlarının indirgenmesi sonucu oluşan aromatik aminler mutajenik, kanserojenik ve toksik etkiye neden olmaktadır.

Ekosistemler üzerine önemli zararları olan boyar maddelerin gideriminde fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanabilmektedir. Boyaların kimyasal stabilitesinden dolayı fizikokimyasal arıtım teknolojilerinin, sentetik tekstil boyası atıksularının arıtımında çok etkili olmadığı belirlenmiştir. Fizikokimyasal yöntemlere göre çevre dostu olan, düşük maliyet ve mineralizasyon avantajları bulunan biyolojik süreçler önem kazanmıştır. Bu nedenle bakteri, maya, fungus ve alg gibi farklı taksonomik gruplara ait mikroorganizmaların, çeşitli boyaların renginin giderimi ve mineralizasyon yetenekleri araştırılmıştır. Özellikle yüksek miktarda tuz içeren tekstil atık sularının renklerinin gideriminde halofilik mikroorganizma ya da enzimlerinin kullanılması kaçınılmazdır. Tuzlu tekstil atık sularından boya giderimi amacı ile halotolerant ve

halofilik bakterilerin kullanıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, bu organizmalarla yüksek tuz konsantrasyonlarında verim alınamaması, halofilik arkeleri ön plana çıkarmaktadır. Halofilik arkeler, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişmelerine ve düşük su aktivitesine sahip enzimlerine rağmen yüksek tuzlu ortamlardaki tekstil boyalarının biyolojik yıkımı, renk giderimi veya detoksifikasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla halofilik arkelerin ilk kez boya gideriminde kullanılarak renk giderim potansiyellerinin belirlenmesi ve arkeal azoredüktaz aktivitesinin belirlenerek kısmen karakterize edilmesi çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Çalışma kapsamında Türkiye'nin çeşitli tuzlu bölgelerinden izole edilmiş 121 halofilik arke izolatının 50 ppm boya (RS5) ve % 0.1 maya özütü içeren katı ortamda boya renk giderimi taramaları yapılmıştır. Katı ortamda boya giderim yeteneğine sahip olduğu belirlenen 11 izolatın sıvı ortamda boya renk giderim oranları belirlenmiş ve en yüksek renk giderimi gösterdiği saptanan 3 izolat (F89A1, B44B, CH7) ile çalışmalara devam edilmiştir. maya özütü boya gideriminde diğer karbon kaynaklarına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Boya renk gideriminin enzimatik olduğu, gerek ölü ve canlı hücrelerle boya gideriminin karşılaştırılması gerekse metanol ekstraksiyonu ile adsorbe edilen boya miktarındaki azalma ile gösterilmiştir.

İzolatlar ile farklı azo boyaalarının (Astrazon Mavi, Astrazon Kırmızı FBL, Reaktif Siyah 5, Reaktif Kırmızı 180) renk giderimi oranlarına göre F89A1 ile RS5, B44B ve CH7 ile RK180 boyaalarının kullanılması belirlenerek renk giderimi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Boya renk giderim koşullarının optimizasyonu sonucunda, her üç izolat için maksimum boya renk gideriminin, %20 NaCl, pH 7.5 ve 45°C'de gerçekleştiği belirlenmiştir. Arkeal izolatlarda en yüksek renk giderim oranına statik koşullarda ulaşılmış olup, F89A1, B44B ve CH7'de sırasıyla %91, %90 ve %82 boya giderimi tespit edilmiştir. Ayrıca çalkalama hızındaki artışa bağlı olarak renk giderim oranlarının kademeli olarak azaldığı da belirlenmiştir.

İzolatların, 100 - 1000 ppm aralığındaki boya konsantrasyonlarında renk giderim kapasitesi araştırılmış olup F89A1 ve B44B'nin tüm konsantrasyonlarda %75 ve üzerinde renk giderimi gerçekleştirdiği, CH7'nin ise 500 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda renk giderimi gerçekleştirmediği tespit edilmiştir. Ayrıca artan boya

konsantrasyonunda boya giderimi için gereken inkübasyon süresinin arttığı tespit edilmiştir.

İkişer kat arttırılarak uygulanan 3 farklı inokulum miktarının her üç izolatta 15 günlük inkübasyon periyodu sonrasında %90 civarında boya giderimi sağladığı, ancak düşük inokulum miktarında inkübasyon süresinin uzadığı belirlenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan maya özütü, pepton, tripton ve sodyum glutamat varlığında her üç izolatta benzer renk giderim oranları saptanmıştır. Beef ekstrakt'ın renk giderimini düşük seviyelerde desteklediği, maya özütünün ise maksimum renk giderimine en kısa sürede ulaşılmasını sağladığı bulunmuştur. İz element çözeltilisinin her üç izolatın renk giderimi oranına belirgin bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Arkeal izolatların, azo boya giderimine karıştığı bilinen intraselüler azoredüktaz aktivitesi belirlenerek kısmi karakterizasyonu yapılmış ve optimum aktivite koşulları belirlenmiştir. F89A1 azoredüktazının maksimum aktivitesi 2.5 M KCl, pH 7.0 ve 45°C'de 12.8 U/ml, B44B ve CH7 azoredüktazlarının maksimum aktivitesi 2.5 M KCl, pH 7.5 ve 35°C'de 11.63 U/ml ve 11.07 U/ml olarak bulunmuştur.

Statik ve çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilen renk giderimi sonrası boya yıkım ürünleri ve boyların agar difüzyon ve Mikrotoks yöntemleri ile toksisite analizleri yapılmıştır. Agar difüzyon yöntemiyle test organizmaları üzerinde herhangi bir toksik etki gözlenmezken, Mikrotoks yönteminde boyalarda hormesis etkisi, renk giderimi sağlanmış ortamlarda ise düşük toksisite tespit edilmiştir.

F89A1 ile RS5 boyasının statik/çalkalamalı sıralı inkübasyon koşullarında renk giderimi sonucunda 2-Naftalenamin ve anilin yapılarının açığa çıktığı GC-MS analiziyle tespit edilmiştir. Her iki boyanın da yıkım ürünleri arasında çeşitli aromatik aminlerin meydana geldiği ve izolatların çalkalamalı koşullarda inkübasyonu sonucunda statik koşullardaki renk giderimi sonrasına göre daha fazla boya yıkım ürününün oluştuğu tespit edilmiştir.

Günümüzde biyolojik iyileştirmenin kapsamında uygulanan biyolojik yıkım ve renk giderim çalışmaları boyar maddeleri ve toksik etkilerini gidermek için mükemmel bir strateji olarak kabul edilmektedir. Halofilik organizmalar ve özellikle arkeler yüksek oranda tuz içeren boyalı endüstriyel atıkların renk giderimi için elverişli organizmalardır. Boya yıkım ürünlerinin daha net olarak belirlenebilmesi için GC-MS sonuçlarının HPLC gibi farklı analitik yöntemlerle desteklenmesinin yararlı olabileceği,

azo redüksiyonu sonrasındaki oksidatif yıkımda rol oynadığı düşünölen oksidaz/peroksidaz aktivitelerinin araştırılmasının arkeal boya yıkım yollarının aydınlatılmasında etkili olabileceğı düşünölmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, ilk kez halofilik arkelerin, azo boya renk giderimi ve detoksifikasyonunda kullanılabileceğı ve %20 tuz konsantrasyonu gibi yüksek tuzlu bir ortamda sentetik orjinli boyaların renginin giderilebildiğı gösterilmiştir. Ayrıca, yine ilk kez bu çalışma ile arkeal halofilik azoredüktaz aktivitesi belirlenmiştir. F89A1, B44B ve CH7 izolatlarında sırasıyla %63, %64 ve %52 olarak belirlenen renk giderim oranlarının %90 ve üzerine çıkarılması, optimum koşulların sağlanması renk giderim çalışmalarındaki önemini göstermiştir. Tüm bu sonuçlar halofilik arkelerin, aşırı tuzlu ve yüksek sıcaklıktaki endüstriyel koşullarda, boyaların renginin giderimi, yıkımı ve detoksifikasyonundaki potansiyellerini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- Acuner, A., Dilek, F.B., 2004. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process. Biochem.**, 39: 623-631.
- Aksu, Z., Donmez, G., 2003. Acomparative study on the biosorption characteristics of some yeast for remazol blue reactive dye. **Chemosphere**, 50: 1075-1083.
- Aksu, Z., 2003. reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process. Biochem.**, 38: 1437-1444.
- Aksu, Z., Tezer, S., 2005. Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. **Process Biochem.**, 40: 1347-1361.
- Alaton, A., Balcioglu, I.A., and Bahnemann, D.W., 2002. Advanced oxidation of a reactive dyebath effluent: comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. **Water Res.**, 36: 1143-1154.
- Allen, A. M., Goh, F., Leuko, S., Echigo, A., Mizuki, T., Usami, R., Kamekura, M., Neilan, B. A. and Burns, P., 2008. *Haloferax elongans* sp. Nov. And *Haloferax mucosum* sp. Nov., isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 58:798-802.
- Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Hamedi, J., Asad, S., Ventosa, A., 2011. Azo dye decolorization by halophilic and halotolerant microorganisms. **Ann. Microbiol.**, 61:217-230.
- Anjaneyulu, Y., Sreedhara Chary, N., Raj, S.S.D., 2005. Decolourazion of industrial effluents-available methods and emerging technologies a review. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, 4:245-273
- Apohan, E., and Yesilada, O., 2005. Role of white rot fungus *Funalia trogii* in detoxification of textile dyes. **J. Basic Microbiol.**, 45:99-105.
- Arceivala, S.J., 2002. **Wastewater treatment for pollution control**. New Delhi : Tata McGraw-Hill Pub. Co., 464739300, 362, Hindistan.
- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Sarbolouki, M.N., Dastgheib, S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. **Bioresour. Technol.**, 98:2082–2088.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L, 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, 19: 771-783.
- Bahmani, P., Maleki, A., Ghahramani, E. and Rashidi, A., 2013. Decolorization of the dye reactive balck 5 using fenton oxidation. **African J. of Biotechnol.**, 12(26): 4115-4122.
- Baldiran, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev.**, 30:215-242.
- Beard, S.J., Hayes, P.K., Walsby, A.E., 1997. Growth competetion between *Halobacterium salinarium* strain PHH1 and mutants affected in gas vesicle synthesis. **Microbiol. UK**, 143: 467-473.

- Beydilli, M. I., Pavlostathis, S.G. and Tincher, W.C., 2000. Biological decolorization of the azo dye reactive Red 2 under various oxidation-reduction conditions. **Water Environ.Res.**, 72:698-705.
- Bibi, R., Arshad, M., and Asghar, H. N., 2012. Optimization of factors for accelerated biodegradation of reactive black-5 azo dye. **Int. J. of agr. & bio.**, 3: 353-359.
- Birge, R. R., 1995. Protein-based computers. **Sci. Am.**, 272: 90-95.
- Brown, M.A. and DeVito, S.C., 1993. Predicting azo dye toxicity. **Crit. Rev. Env. Sci. Tec.**, 23: 249-324.
- Bürger, S., Stolz, A., 2010. Characterisation of the flavin- free oxygen-tolerant azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF 46F in comparison to flavin-containing azoreductases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 87: 2067-2076.
- Carliell, C.M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mullholland, D.A., Senior, E., 1995. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA.**, 21(1):61-69.
- Carliell, C.M., Barclay, N., Buckley, C.A., 1996. Treatment of exhausted reactive dye bath effluent using anaerobic digestion laboratory and full-scale trials. **Water SA.**, 22: 225-233.
- Castillo, A. M., Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A., 2007. *Halorubrum ejinorensis* sp. Nov., isolated from lake Ejinor, inner Mongolia, China. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 57: 2538-2542.
- Chaga, G., Porath, J., Illéni, T., 1993. Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. **Biomed. Chrom.**, 7: 256-261.
- Chang, J.S., Kuo, Y.P., Chao, J.Y., Ho, and Lin, P.J., 2000. Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. **Biotechnol. Lett.**, 22:807-812.
- Chang, J.S. and Kuo T.S., 2000. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO₃. **Bioresour. Technol.**, 75: 107-111.
- Chang, J. S., Chou, Y.P., and Chen, S.Y., 2001a. Decolorization of Azo Dyes with Immobilized *Pseudomonas luteola*. **Process. Biochem.**, 36:757-763
- Chang, J. S., Chou, C., Lin Y., Ho J., and Hu T.L., 2001b. Kinetic characteristics of bacterial azo- dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Res.**, 35:2841-2850.
- Chen, K. C., Huang, W.T., Wu, J.Y., and Hwang, J.Y. 1999. Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 23:686-690.
- Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J., Hwang, S.C.J., 2003. Decolorization of the textile azo dyes by newly isolated bacterial strains. **J. Biotechnol.**, 101: 57-68.
- Chen, B.Y., Chen, S.Y., and Chang, J.S., 2005a. Immobilized cell fixed-bed bioreactor for wastewater decolorization. **Process. Biochem.**, 40: 3434-3440.
- Chen, H., Hopper, S.L., and Cemiglia, C.E., 2005b. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus* a tetrameric NADPH-Dependent flavoprotein. **Microbiology**, 151: 1433-1441.
- Chivukula, M., Spadaro, J.T., Renganathan, V., 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**, 34: 7765- 7772.

- Christie, R.M., 2001. **Colour chemistry**. Royal society of chemistry, Great Britain, ISBN: 0-85404-503-2, 205, UK.
- Chu, W.L., See, Y.C.H., Phang, S.M., 2009. Use of *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. **J. Appl. Phycol.**, 21: 641-648.
- Chung, K. T., Stevens, S. E., 1993. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environ. Toxicol. and Chem.**, 12: 2121- 2132.
- Coughlin, M.F., Kinkle, B.K. and Bishop, P.L., 2002. Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. **Chemosphere**, 46: 11-19.
- Danson, M., Hough, D.W., 1997. The structural basis of protein halophilicity. **Comp. Biochem. Physiol.**, 117A (3): 307-312.
- DasSarma, S., 1993. Identification and analysis of the gas vesicle gene cluster on an unstable plasmid of *Halobacterium halobium*. **Experientia**, 49: 482-486.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresour. Technol.**, 98: 2369-2385.
- Dönmez, G., 2002. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 30: 363-366.
- D'Souza, S.E., Altekar, W., D'Souza, S.F., 1997. Immobilization of *Haloferax mediterranei* aldolase by cross-linking in a proteinic matrix: stability and halophilic characteristics. **World J. Microbiol. biotechnol.**, 13: 56-564.
- Elshahed, M.S., Savage, K.N., Oren, A., Gutierrez, M.C., Ventosa, A., Krumholz, L.R., 2004. *Haloferax sulfurifontis* sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 54: 2275-2279.
- Ergene, A., Ada, K., Tan, S., Katircioglu, H., 2009. Removal of remazol brilliant blue r dye from aqueous solutions by adsorption onto immobilized *Scenedesmus quadricauda*: equilibrium and kinetic modeling studies. **Desalination**, 249: 1308-1314.
- Euzeby, J.P., 2013. <http://www.bacterio.cict.fr>
- Ezeronye, O., U. and Okerentugba, P.O., 1999. Performance and efficiency a yeast biofilter for the treatment of a Nigerian fertilizer plant effluent. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 15: 515-516.
- Ferraz, E.R.A, Grando, M.D., Oliveira, D.P., 2011. The azo dye diperse orange 1 induces DNA damage and cytotoxicity effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fisheri*. **J. Hazard. Mat.**, 192: 628-633.
- Franciscon, E., Grossman, M.J., Pascual, A.R., Reyes, F.G., Durrant, L.R., 2012. Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. strain VN-15. **Advanced Biotech.**, 10: 1-37.
- Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T.A., Burton, H. R., 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. **System. Appl. Microbiol.**, 11:20-27.

- Fu, W., Oriel P., 1998. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax sp.* D1227. **Extremophiles**, 2: 439–436.
- Fu, F., Viraraghavan, T., 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresour. Technol.**, 79: 251-262.
- Ghodake, G. S., Telke, A. A., Jadhav J.P., and Govindwar, S.P., 2009. Potential of *Brssica juncea* in order to treat textile effluent contaminated sites. **Int. J. Phytoreme**, 11: 1-4.
- Gomes R.J., 2002. Estrutura e propriedades dos corantes. Barbosa e Xavier Lda., **Braga portugal**, 12-16.
- Grand, W. D., Kamekura, M., McGenitty, T. J. and Ventosa, A., 2001. Order I. Halobacteriales In: Bergey's manuel of systematic bacteriology V.I, the Archaea and deeply branching and phototrophic bacteria, (man.Ed.) 2nd Ed. **New York**.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Wang., J., Yu, H., Song, Z., 2005. Decolorization of azo dyes with high salt concentration by salt-tolerant mixed cultures under anaerobic conditions. **J. Environ.Sci.**, 17:984-988.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Uddin, M.S., Yu, H., 2007. Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobik reduction of azo dyes by the salt tolerant bacteria. **Water Res.**, 41: 426-432.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Salah Uddin, M., 2008. Anovel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. **Biodegradation**, 19: 15-19.
- Hartmann, R., Sickinger, H., D., Oesterhelt, D., 1980. Anaerobic growth of halobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77 (6): 3821-3825.
- Haug, W., Schmidt, A., Nörtemann, Hampell, D.C., Stolz, A., Knackmuss, H.J., 1991. Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6 Aminonaphthalene-2 Sulfonate-Degrading Bacterial Consortium. **App. Environ. Microbiol.**, 57(11):3144-3149.
- Hezayen, F. F., Tindall, B. J., Steinbüchel and Rehm, B. H. A., 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis gen. nov., sp. nov.*, and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobioforma nitratireducens comb. nov.* **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 52: 2271-2280.
- Hough, D. W., Danson, M. J., 1989. Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. **Let. App.Microbiol.**, 9: 33-39.
- Hough, D.W., M.J. Danson., 1999. Extremozymes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 3: 39-46.
- Hu, T. L., 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. **Water Sci. Technol.**, 43:261-269.
- Husain, Q., 2010. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes a reiew. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** 9:117-140.
- Jadhav, J.P., Parshetti, G.K., Kalme, S.D, and Govindwar, S.P., 2007. Decolorization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC463. **Chemosphere**, 68: 394-397.
- Jin, X., Liu, G., Xu, Z., and Tao, W., 2007. Decolourisation of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 74: 239-245.
- Jinqi, L. and Houtian, L., 1992. Degradation of azo dyes by algae. **Environ. Pollut.**, 75: 273-278.

- Junnakar, N., Murty, D., Bhat, N., Madamwar, D., 2006. Decolorization of diazo dye direct red 81 by a novel bacterial consortium. **World J. Microbiol. biotechnol.**, 22(2): 163-168.
- Kates, M., Kushwaha, S.C., Sprott, G.D., 1992. Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. **Methods in Enzym.**, 88:98-111.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S. and Jadhav, J.P., 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas sp.* SUK1. **J. Hazard. Mater.**, 163: 735-742.
- Kapustka, L. A. and Reporter, M., 1993. Terrestrial primary producers. handbook of ecotoxicology, p. 278, P. Calow, Ed., **Blackwell Scientific Publications**, Oxford.
- Khalid, A., Arshad, M., Crowley, D. E., 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella sp.* under saline conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 79:1053-1059.
- Khan, J.A., 2011. Azo dye biodegradation by azoreductase from *Bacillus megaterium*. **Advanced. Biotech.**, 10: 21-27.
- Khan, R., Bhawana, P., Fulekar, M.H., 2012. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. **Ren. Environ. Sci. Biotechnol.**, 12: 77-95.
- Khehra, M. S., Saini H.S., Sharma D.K., Chadha B.S., and Chimni S.S., 2005. Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. **Water Res.** 39:5135-5141.
- Kiernan, J.A., 2001. Classification and naming of dyes, stain and fluorochromes, **Biotech. Histochem.**, 76 (5): 261-278.
- Knapp, J., and Newby, P.S., 1995. The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo- linked chromophore. **Water Res.**, 29:1807-1809.
- Kodam, K.M., Soonjhawon, I., Lokhande, P.D., Gawai, K.R., 2005. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. **World J. Microbiol. biotechnol.**, 21:367-370.
- Kuberan, T., Anburaj, J., Sundaravadivelan, C., Kumar, P., 2011. Biodegradation of azo dye by *Listeria sp.*. **Int. J. Environ.**, 1:1760-1770.
- 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63(9):3691-3694.
- Kulichevskaya, I. S., Zvyagintseva, I. S., Tarasov, A. L. And Plakunov, V. K., 1992. The extremely halophilic archaeobacteria from some hypersaline ecotops. **Microbiology**, 46: 51-56.
- Kulla, H.G., 1981. Aerobic bacterial degradation of azo dyes in microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant molecules, **FEMS Sym.**, 12, **Academic Press**, London.
- Kulla, H. G., Klausener, F., Meyer, U., Ludeke, B., and Leisinger, T., 1983. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes orange I and orange II. **Arch. Microbiol.**, 135:1-7.

- Kumar, K., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2009. Effect of process parameters on aerobic decolorization of reactive azo dye using mixed culture. **World Academy of Sci. Eng. Technol.**, 58:962-964.
- Kumar, P.G.N. and Sumangala, B.K., 2012. Decolorization of azo dye red 3BN by bacteria. **I. Res. J. Biological Sci.**, 1(5):46-52.
- Kunte, H. J., Trüper, G., Stan-Lotter, H., 2001. Halophilic microorganisms. Astrobiology. (G. Horneck, C. Baumstark-Khan, Editor) In: **The quest for the conditions of life**. Heidelberg: Springer-verlag, ISBN: 3-540-42101-7.
- Kurade, M.B., Waghmode, T.R., Govindwar, S.P., 2011. Preferential biodegradation of structurally dissimilar dyes from a mixture by *Brevibacillus laterosporus*. **J. Hazard Mat.**, 192: 1746-1755.
- Kushner, D.J., 1985. The bacteria, in *the Halobacteriaceae*, **Academic Press, Inc.**, 8 (3):171-213.
- Latif, A., Noor, S., Sharif, Q.M., Najeebullah, M., 2010. Different techniques recently used for the treatment of textile dyeing effluents: areview. **J. Chem. Soc. Pak.**, 32: 115-124.
- Liu, G., Zhou, J., Meng, X., Fu, S.Q., Wang, J., Jin, R., Lv, H., 2012. Decolorization of azo dyes by marine *Shewanella* strains under saline conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97(9): 4187-4197.
- Ma, X.Y., Wang, X.C., Ngo, H.H., Guo, W., Wu, M.N., Wang, N., 2014. Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements and applications. **Sci. Total Environ.**, 11:468-469.
- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaca-Paulo, A., and Gübitz, M.G., 2004. A new alkali thermostabil azoreductase from *Bacillus sp.* strain SF. **App. Environ. Microbiol.**, 70: 837-844.
- Mancinelli, R. L., Hochstein L. I., 1986. The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, 35: 55-58.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56: 650–663.
- Martorell, M.M, Pajot, H.F., de Figuerca, L.I.C., 2012. Dye-decolourizing yeasts isolated from las yungas rainforests dye assimilation and removal used as selection criteria. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 66: 25-32.
- Martins, M.A.M., Cardoso, M.H., Queiroz, M.J., Ramalho, M.T., Campos, A.M.O., 1999. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanodies* in batch aerated cultures. **Chemosphere**, 38: 2455-2460.
- Metcalf, E., 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse 4th ed., McGraw-Hill, ISBN: 0071122508, 1819, **Newyork, USA**.
- Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Fukushima, T., Kamekura, M., Usami, R., 2008. Acidophilic haloarchaeal strains are isolated from various solar salts. **Saline Syst.**, 4:16-19.
- Misal, S.A., Lingojar, D.P., Shinde, R.M., Gawai, K.R., 2011. Purification and characterization of azoreductase from alkaliphilic strain *Bacillus badius*. **Process. Biochem.**, 46: 1264-1269.

- Mohan, S.V., Ramananiah, S.V., Sarma, P.N., 2008. Biosorption of direct azo dye from aqueous phase onto *Spirogyra sp.*102: evaluation of kinetics and mechanistic aspects. **Biochem. Eng. J.**, 38: 61-69.
- Moosvi, S., X. Kher, and D. Madamwar, 2007. "Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2," **Dyes Pigments**, 74, 723-729.
- Morawski, B., Quan, S., and Arnold, H., 2000. Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, 76:99-107.
- Nigam, P., MC.Mullan, G., Banat, I.M., Marchant, R., 1996. Decolourisation of effluent from the textile industry by a microbial consortium. **Biotechnol. Let.**, 18(1):117-120.
- Oesterhelt, D., 1998. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. **Curr. Opin. Struc. Biol.**, 8: 489- 500.
- Olukanni, O.D., Osuntoki, A.A., Gbenle, G.O., 2009. Decolourazion of azo dyes by a strain of micrococcus isolated from a refusedump soil. **Biotechnol.**, 8:442-448.
- Omar, H.H., 2008., Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. **Pak. J. Biol. Sci.**, 11: 1310-1316.
- O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Delee, W., 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a rewiew. **J. Chem Technol. Biotech.**, 74: 1009-1018.
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, F.R., Hawkes, D.L., Hawkes S., W., 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. **App. Microbiol. Biotechnol.**, 58: 249-254.
- Oren, A., Trüper, H. G., 1990. Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine *N*-oxide. **FEMS Microbiol. Letters**, 70: 33-36.
- Oren, A., Gurevich, P., 1993. Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the Dead Sea. **FEMS microbiology Ecology**, 12: 249- 256.
- Oren, A., Litchfield, D. C., 1999. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 173: 353-358.
- Oren, A., 2001. The order halobacteriales. (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. And Stackebrandt, E., Editör). **In: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identifications, applications.** 3rd. Edition. Springer-Verlag, New york.
- Oren, A., Mana, L., 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. **Extremophiles**, 6: 217–223.
- Ortega, G., Láin, A., Tadeo, X., López-Méndezi, B., Castaño, D., Millet, O., 2011. Halophilix enzyme activation induced by salts. **Sci. Rep.**, 1: 6.
- Oturkar, C.C., Nemade, H.N., Mulik, P.M., Hawaldar, R.R., Gawai K.R., 2011. Mechanistic investigation of decolorization and degradation of reactive red 120 by *Bacillus lentus* BI377. **Bioresour. Technol.**, 102:758-764.

- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., Cokmus, C., 2007. Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17(6): 985-992.
- Ozcan, B., Özyılmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 36: 105-110.
- Pandey, A., Singh, P., Lyengar, L., 2007. Review bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 59:73-84.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R., Guthriena, J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes Pigments**, 58:179.
- Priya, B., Uma, L., Ahamed, A.K., Subramanian, G., Prabakaran, D., 2011. Ability to use the diazo dye C.I. acid black 1 as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *oscillatoria curviceps* BDU92191. **Bioresour. Technol.**, 102: 7218-7223.
- Queseda, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F. and Ramos-Cormenzana., 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. **J. Appl. Bacteriol.**, 53: 155-161.
- Rafii, F., Franklin, W., Cerniglia, C. E., 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(7): 2146-2151.
- Rai, H.M., Bhattacharya, J., Singh, T.K., Bansal, P.V., Banerjee, C., 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry areview of emerging techniques with reference to biological treatment. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, 35: 219-238.
- Ramakrishna, K.R., and Viraraghavan, T., 1997. Dye removal using low cost adsorbents. **Water Sci. Technol.**, 36:189-195.
- Ramalho, P.A., Scholze, H., Cardoso, M.H., Ramalho, M.T., Oliveria-Campos, A.M., 2002. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme Microb. Technol.**, 31: 848-854.
- Ramalho, P. A., Cardoso, M.H., Cavaco-Paulo, A. and Ramalho, T., 2004. Characterization of azo reduction activity in a novel *ascomycete* yeast strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70: 2279-2288.
- Ramsay, J.A., Nguyen, T., 2002. Decolorization of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. **Biotechnol. Lett.**, 24:1757-1761.
- Razoflores, E. Luijten, M., Donlon, B., Lettinga, G., Field, J., 1997 Biodegradation of S selected azo dyes under methanogenic conditions. **Wat. Sci. Tech.**, 36: 65-72.
- Renganathan, S., Thilagaraj, W.R., Miranda, L.R., Gautam, P., Velan, M., 2006. Accumulation of acid orange 7 acid red 18 and reactive black 5 by growing *Schizophyllum commune*. **Bioresour. Technol.**, 97: 2189-2193.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., and Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresour. Technol.**, 77: 247-255.

- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A., 1979. Isolation of extreme halophiles from seawater. **Appl. Environ. Microbiol.**, 38 (1):164-165.
- Rodriguez-Valera, F., Lillo, J. A. G., Anton, J., Meseguer, I., 1991. Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. (Rodriguez-Valera, Editor). In: General and applied aspects of halophilic microorganisms Plenum. Pres **New York**, 373-380, New York.
- Russell, N. J., 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. **J. Bioen. Biomem.**, 2(1): 87-98.
- Saha, S.K., Swaminathan, P., Raghavan, C., Uma, L., Subramanian, G., 2010. Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511 during poly R-478 decolourization. **Bioresour. Technol.**, 101: 3076-3084.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Kalyani, D.C., Chang, J.S., and Govindwar, P., 2009a. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye scarlet R by using developed microbial consortium-GR. **Bioresour. Technol.**, 100:2493-2500.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S. and Govindwar, S.P., 2009b. Ecofriendly decolorization and degradation of reactive green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. **Bioresour. Technol.**, 110: 3897-3905.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Gowindwar, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: review. **J. Taiwan Inst. Eng.**, 42:138-157.
- Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A., Elshahed, M. S., 2007. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. Nov., sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a low salt, sulfide-rich spring. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 57: 19-24.
- Schneider, K., Hafner, C., Jager, I., 2004. Mutagenicity of textile dye products. **J. Appl. Toxicol.**, 24: 83-91.
- Seidenari, S., Giusti, F., Massone, F., Mantovani, L., 2002. Sensitization to disperse dyes in a patch test population over a five-year period. **Am. J. Contact. Dermat.**, 13: 101-107.
- Sellek, G. A., Chaudhuri, J. B., 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme and Microbial Biotech.**, 25: 471-482.
- Shand, R. F., Perez, A. M., 1999. Haloarchaeal growth physiology. (J. Seckbah, Editor). In: **Enigmatic microorganisms and life in extreme environment**. Kluwer Academic Publisher, 414-424, Dordrecht.
- Sivarajasekar, N., Baskar, R., Balakrishnan, V., 2009. Biosorption of an azo dye from aqueous solutions onto *Spirogyra*. **J. Univ. Chem. Technol. Metall.**, 44:157-164.
- Solis, M., Solis, A., Pérez, H.I., Manjarrez, N., Flores, M., 2012. Microbial decoloration of azo dyes: A review. **Process. Biochemistry.**, 47: 1723-1748.
- Subramaniam, S., Sivasubramanian, Swaminathan, K., and Lin, F.H., 2009. Metabolically inactive *Trichoderma harzianum* mediated adsorption of synthetic dyes: equilibrium and kinetic studies. **J. Taiwan Inst. Chem. Engrs.**, 40:394-401.

- Sumathi, S., Phatak, V., 1999. Fungal treatment of bagasse based pulp and paper mill wastes. **Environ. Technol.**, 19: 93-98.
- Telke, A.A., Ghodake G.S., Kalyani D.C., Dhanve R.S., Govindwar S.P., 2011. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. **Bioresour. Technol.**, 102:1752–1756.
- Tony, B.D., Goyal, D., Khanna S., 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 63: 462-469.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R., and Verstraete, W., 1998. Treatment and reuse of wastewater from the textile Wet processing industry: review of emerging technologies. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 72:289-302.
- Vitor, V., Corso, C.R., 2008. Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 35: 1353-1357.
- Wang, C.J., Hagemeyer, C., Rahman, N., Lowe, E., Noble, M., Coughtrie, M., Sim, E., and Westwood, I., 2007. Molecular cloning characterisation and ligand-bound structure of an azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J.Mol.Biol.**, 373: 1213-1228.
- Wang, H., Su, J.Q., Zheng, X.W., Tian, Y., Xiong, X.J., Zheng, T.L., 2009a. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye reactive red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 63: 395-399.
- Wang, H., Su, J.Q., Zheng, X.W., Tian, Y., Xiong, X.J., Zheng, T.L., 2009b. Biological decolorization of the reactive dyes reactive black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. **J.Hazard. Mater.**, 171: 654-679.
- Waghmode, T.R., Kurade, M.B., Khandare, R.V., Govindwar, S.P., 2011. A sequential aerobic/microaerophilic decolorization of sulfonated monoazo dye golden yellow HER by microbial consortium GG-BL. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 65: 1024-1034.
- Welham, A., 2000. The theory of dyeing (and the secret of life). **J. Soc. Dyers Colour.**, 116: 140-143.
- Wu, I., Chow, K., Mark, K., 1983. The role of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against uv irradiation. **Microbiol. letter**, 24: 85-90.
- Wu, Y., Li, T., Yang, L., 2012. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. **Bioresour. Technol.** 107:10–18.
- Yan, H. and Pan, G., 2004. Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Clostridium lunula* using inorganic carbon. **Chemosphere**, 55: 1281-1285.
- Yang, Q.M., Yang, K., Pritsch, A., Yediler, A., Hang, M., Schlöter, A. and Kettrup, S., 2003. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnol. Lett.**, 25:709-713.
- Yatsunami, R., Kawakami, T., Ohtani, H., 2000. A novel bacteriorhodopsin like protein from *Haloarcula japonica* strain TR-1: gene cloning, sequencing, and transcript analysis. **Extremophiles**, 4: 109-114.
- Yesilada, O., Cing, S., Asma, D., 2002. Decolorization of the textile dye astrazon red fbl by *Funalia trogii* pellets. **Biores. Technol.**, 81: 155-157.

- Yildiz, E., Ozcan, B. and Caliskan, M., 2012. Isolation, characterization and phylogenetic analyses of halophilic archaea from a salt mine in central anatolia (Turkey). **Pol. J. Microbiol.**, 2:111-117.
- Zee, F.P. 2002. Anaerobic azo dye reduction. Doctoral Thesis, Wageningen University, 142, Wageningen, Netherlands.
- Zhang, F., Yediler, A., Liang, X., and Kettrup, A., 2004. Effect of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products a comparative study using hydrolysed CI reactive red 120. **Dyes pigments**, 60:1-7.
- Zille, A., 2005. Laccase reactions for textile applications, **Tese de Doutorado em Engenharia Têxtil**, Universidade do Minho.
- Zvyagintseva, I. S., Tarasov, A. L., 1988. Extreme halophilic bacteria from saline soils. **Microbiology**, 56: 664-668.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikirlerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Birgül ÖZCAN'a ayrıca tezimin başlangıcından sonuna kadar her konuda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen sorularımı sabırla cevaplayan değerli hocam Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN ve Prof.Dr. Özfer YEŞİLADA'ya, toksisite çalışmalarında yardımcı olan Dr. Nesrin ÖZMEN'e, deneysel aşamalarda yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Eda AÇIKGÖZ, Ümit TOR, Mehmet Ali LEYLA, Eaylettin ÖZTÜRK ve Yağmur AL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneylemim esnasında ve sonrasında manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Ersin ve İlknur ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem Vidat YILDIZ, babam Zeki YILDIZ, ablam Eylem YILDIZ ve kardeşim Ela YILDIZ AKSOY'a teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İskenderun'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi İskenderun'da tamamladım. 1996 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi Antakya M.Y.O Bilgisayar programcılığı bölümünü kazandım ve 1998 yılında 88.52 ortalama ile bölüm ikincisi olarak mezun oldum. 1998-2000 yılları arasında bilişim sektöründe farklı pozisyonlarda görev aldım. 2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım, 2005 yılında 91.44 ortalama ile fakülte birincisi olarak lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladım, yüksek lisansı "Çankırı Çankaya Tuz Madeni'nden Halofilik Arke İzolasyonu ve Karakterizasyonu" isimli tez çalışmamla 2008 yılında 93.70 ortalama ile tamamladım. 2008 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bölümü'nde doktora eğitimime başladım. Halen doktora eğitimime devam etmekteyim.