



Decolorization and detoxification of some reactive textile dyes by *Phanerochaete chrysosporium*

Sevil PİLATİN^{*1}, Buket KUNDUHOĞLU¹

¹ Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, 26480 Meşelik, Eskişehir, Turkey

Abstract

The textile industry, raw materials and chemicals used in the operations performed and due to the variety of technology applied to each process has a structure variable. Many auxiliary chemical substances in the textile industry as well as numerous types of colors and dyes are used both in production and as a result a lot of colored wastewater is released during use. In this study, the biological purification of dyes intended to lower the cost and as soon as possible. For this purpose, was used by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In this study, some of the reactive textile dyes (Blue 49, Orange 12, Orange 13, Red 31, Black 5, RBBR) *Phanerochaete chrysosporium* has been optimized for parameters that affect the color removal. At different pH (3.5, 4.5, 5.5, and 6.5) dye concentration (25, 50 and 100 mg / l), shaking speed (100, 150 and 200 rpm) and temperature (25, 30, 35, and 40 ° C) investigated the effect of decolorization. Optimum conditions, the degradation of dyes percentages ranged from 74% to 95%. The most resistant to degradation dye of the Orange 12 and Orange was 13. Blue 49 and RBBR is the fastest degradable. pH 4.5 optimum conditions for decolorization of dye concentration of 50 mg / l, shaking speed of 200 rpm and a temperature of 30 ° C were determined.

Key words: white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium*, decolorization, textile dyes.

----- * -----

Phanerochaete chrysosporium tarafından bazı reaktif tekstil boyaalarının renk giderimi ve detoksifikasyonu

Özet

Tekstil endüstrisi, kullanılan hammaddelerin ve kimyasal maddelerin, gerçekleştirilen işlemlerin ve her işlem için uygulanan teknolojinin çeşitliliği nedeniyle değişken bir yapıya sahiptir. Tekstil sektöründe birçok yardımcı kimyasal maddenin yanında, sayısız renk ve türde boyarmadde kullanılmakta ve buna bağlı olarak gerek üretim gerekse kullanım sırasında çok miktarda renkli atık su açığa çıkmaktadır. Çalışmamızda boyarmaddelerin maliyeti düşük ve kısa sürede biyolojik olarak arıtılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla beyaz çürükçül mantar olan *Phanerochaete chrysosporium* kullanılmıştır. Bu çalışmada bazı reaktif tekstil boyaalarının (Blue 49, Orange 12, Orange 13, Red 31, Black 5, RBBR) renk giderimini etkileyen parametreler *Phanerochaete chrysosporium* için optimize edilmiştir. Farklı pH (3.5, 4.5, 5.5 ve 6.5), boya konsantrasyonu (25, 50 ve 100 mg/l) çalkalama hızı (100, 150 ve 200 rpm) ve sıcaklığın (25, 30, 35 ve 40°C) renk giderimi etkisi araştırılmıştır. Boyaların optimum koşullardaki degradasyon yüzdeleri % 74 ile % 95 arasında değişmiştir. Parçalanmaya en dirençli boya Orange 12 ve Orange 13'dür. En hızlı parçalanabilen ise Blue 49 ve RBBR'dir. Renk giderimi için en uygun koşulların pH 4,5 boya konsantrasyonu 50 mg/l, çalkalama hızı 200 rpm ve sıcaklığın 30°C'de olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: beyaz çürükçül mantarlar, *Phanerochaete chrysosporium*, renk giderimi ve tekstil boyaaları.

1. Giriş

Hızla artan endüstriyel gelişme günümüzde tüm canlıları olumsuz yönde etkileyen çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Özellikle endüstrilerden kaynaklanan atık sular bu sorunları oluşturan en büyük etkindir.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222393578; E-mail: spilatin@ogu.edu.tr

Türkiye’de önemli endüstri kollarından biri olan tekstil endüstrisi, kullanılan hammaddelerin, kimyasal maddelerin, gerçekleştirilen işlemlerin ve her işlem için uygulanan teknolojinin çeşitliliği nedeniyle değişken bir yapıya sahiptir. Bu değişken yapı, tekstil atık sularına uygulanan arıtma teknolojilerine de yansımakta ve bundan dolayı standart bir arıtma yönteminin uygulanması güçleşmektedir (Kapdan et al., 2000). Tekstil sektöründen kaynaklanan atık sular ciddi problemler yaratmaktadır (Gülnaz vd., 2006). Bu renkli atıklar akarsu, göl ve denizlere özellikle de yüzey ve yeraltı sularına karışarak içme sularını kirletebilirler (Aksu ve Çağatay, 2006, Kumar vd., 2006). Ayrıca bazı boyarmaddeler kanserojenik ve mutajenik etkilere sahiptir, temas edilmesi halinde deride tahriş, kanser ve bazı alerjik durumların meydana gelmesine neden olabilirler (Robinson et al., 2001). Boyarmaddelerin kimyasal yapıları değiştirilerek renklerinde solmaya ve diğer çevresel faktörlere dayanıklı boyar maddeler elde edilmekte ve tekstil sektörü ürünlerinin renklendirilmesinde bu vb. boyar maddeler kullanılmaktadır. Boya moleküllerine, boyanacak elyafın veya kumaşın türüne göre ve boyama işleminin özelliğine göre yardımcı maddelerin ilave edilmesi arıtma işlemini zorlaştırmaktadır. Bu maddeler, birden fazla aromatik halka ve çift bağ taşıması sebebiyle biyolojik ayrışabilirlikleri az, dayanıklı ve kalıcı kimyasal maddelerdir (Kocaer ve Alkan, 2002).

Dünyada 100.000’in üzerinde ticari boya vardır ve yılda ortalama 7×10^5 tonun üzerinde yaklaşık 10.000 farklı boya üretilmekte olup, bu boyaların % 10’u endüstriyel arıtma tesisi çıkış suları ile alıcı su ortamlarına verilmektedir (Kaykıoğlu, 2006). Tekstil sektöründe birçok çeşit boya madde kullanılmakta olup, asidik boya, bazik boya, reaktif boya, dispers boya bunlardan bazılarıdır. Dünya genelinde bunlardan en çok kullanılanı reaktif boya maddelerdir (Işık ve Sponza, 2001). Azo, antraquinon ve indigo çekirdeğine sahip sentetik boyalar doğada hidrofilik olmaları nedeniyle mikrobiyal parçalanmaya dirençli olduklarından konvansiyonel aerobik yöntemlerle ayrıştırılamamaktadırlar (Manu et al., 2002). Reaktif boya maddeler uygun koşullar altında lif ile kimyasal reaksiyona girerek, kovalent bağ yapma özelliğine sahip tek boyarmadde sınıfıdır. Küçük ve basit molekül yapısına sahiptirler. Reaktif boyarmaddeler; suda kolay çözünürler (Başer ve İnanıcı, 1990). İçerdikleri kompleks aromatik moleküler yapıdaki boya maddelerden dolayı sektör için arıtılması pahalı ve zor olan tekstil atık suları için farklı fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Renk giderimi için kullanılabilen fiziksel ve kimyasal metotlar adsorbsiyon, koagülasyon-flokülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve elektrokimyasal yöntemleri kapsamaktadır (Demir, 2007). Ancak bu yöntemlerin uygulanmasında ki dezavantajlar ve maliyetlerinin yüksek oluşu, çevreye daha az zarar verecek yeni arıtma tekniklerinin araştırılmasına neden olmuştur. Tekstil atık sularının biyolojik arıtma sistemleri kimyasal ve fiziksel arıtma yöntemlerine göre daha az çamur oluşturma, daha düşük maliyet ve alıcı ortama zarar verebilecek tehlikeli yan ürünlerin meydana gelmemesi gibi avantajlarından dolayı tekstil atık sularının arıtımı için ideal bir çözüm olarak kabul edilmektedir (Van der Zee and Villaverde, 2005). Ancak yapılan çalışmalar biyolojik arıtma yöntemlerinin sadece bazı boyaları ayrıştırılabileceğini göstermiştir. Yine yapılan araştırmalar bazı boyaların biyolojik ayrışmaya karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Boyaların iyi kalite olması onların yıkamaya, çevresel faktörlere ve biyolojik ayrışmaya karşı dayanıklı olmasını gerektirdiğinden bu husus beklenen bir olaydır (Şengül, 1983).

Atık ve çevre biyoteknolojisi alanında yapılan biyolojik arıtım çalışmalarında en çok kullanılan organizmalar beyaz çürükçül mantarlardır (Yeşilada, 1995). Sahip oldukları özellikleri ile önemli ve ayrıcalıklı bir yere sahiptir. Basidiomycetes grubuna giren beyaz çürükçül mantarlar, yoğun endüstriyel aktiviteye bağlı olarak ortaya çıkan ve çevre kirliliğinin giderilmesinde, lakkaz enzimi başta olmak üzere sentezledikleri çeşitli enzimleri ile çok farklı moleküler yapıdaki organik bileşiklerin oksidasyonunda rol oynadıkları bilinmektedir (Kunamneni et al., 2008). Beyaz çürükçül mantarların sentezledikleri laktaz, Mn-peroksidaz, ligniz peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) ekstrasellüler enzimleri biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan bu mantarlara da *Trametes versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju* ve *P. eryngii*’yi örnek olarak verebiliriz (Wesenberg et al., 2002). En yaygın kullanılan beyaz çürükçül mantar türleri, *P. chrysosporium*’un yanında *Coriolus versicolor* ve *T. versicolor*’dır (Stainer et al., 1976).

Beyaz çürükçül mantarlar tüm dünyada tekstil atıksularının renklerinin giderilmesi çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanıldığı yapılan literatür çalışmalarından tespit edilmiştir (Seker ve vd., 2000; Kapdan ve vd., 2000; Jaspers and Penninckx, 1996; Couto et al., 2000; Wang and Yu, 1998). Diğer yandan *Phanerochaete chrysosporium*’un çevredeki dayanıklı organik kirleticilerin geniş bir bölümü üzerinde etkili olduğu da çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş bulunmaktadır (Eaton 1985; Bumpus et al., 1985; Bayat ve vd., 1995).

Çalışmamızda, Türkiye’de tekstil endüstrisi işletmeleri tarafından sıklıkla kullanılan ve alıcı ortamlar için önemli bir kirlilik faktörü olan bazı boya maddelerin biyolojik renk giderimi araştırılmıştır. Blue 49, Orange 12, Orange13, Red 31, Black 5, RBBR gibi bazı reaktif boyaların renk giderimi için *P. chrysosporium* kullanılmıştır. Ayrıca boya renk giderimi için optimum koşulları belirlemek üzere pH, boya konsantrasyonu, çalkalama hızı ve sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Buna ek olarak renk giderimi çalışmaları süresince alınan örneklerin toksisite testleri *artemia salina* toksisite testi ile tespit edilmiştir. Böylece degradasyon sırasında ve sonunda oluşan metabolitlerin doğal yaşama muhtemel etkileri belirlenmiştir.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Boyalar

Renk giderimi çalışmalarında kullanılan reaktif boyaların ticari isimleri ve Color Index (C.I.) numaraları şunlardır; Cibacron Blue 3R (C.I. Reactive Blue 49), Reactive Golden Yellow HR (C.I. Reactive Orange 12), Reddish

Orange (C.I. Reactive Orange 13), Reactive Red H8B (C.I. Reactive Red 31), Remazol Black (C.I. Reactive Black 5), Remazol Brillant Blue R (C.I. Reactive Blue19). Boyaların 1%' lik stok çözeltileri distile su ile hazırlanmış ve 121 °C de, 15 dakika steril edilmiştir. Stok boya çözeltileri koyu renkli şişelerde, +4 °C de muhafaza edilmiştir. Boyarmadde çözeltileri; otoklavda sterilize edilip oda sıcaklığına kadar soğutulan besiyerlerine, steril şartlarda gerekli konsantrasyonu elde edecek oranda ilave edilerek kullanılmıştır.

2.2. Renk giderimi çalışmalarında kullanılan mikroorganizma ve kültür ortamı

Çalışmalarda, Basidiomycetes sınıfına ait bir fungus olan *P. chrysosporium* ME 446 kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Çalışma süresince ve sonrasında kültürler potato dekstroz agarda (PDA) +4 °C'de muhafaza edilmiştir. *P. chrysosporium* ME 446, potato dextrose agar plaklarına ekilmiş ve 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bu plaklardan misel ve spor içeren 1 cm çapında diskler çıkarılmış (10 disk) ve içinde Kirk Medium bulunan erlenlere transfer edilmiştir (Kirk, 1988). 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda biomas steril koşullarda süzülerek homojenizatör ile (Heidolph) homojenize edilmiş ve yaş mikroorganizma ağırlığı olarak ürün elde edilmiştir. Çalışmalarda 1 gr. yaş ağırlık olarak mikroorganizma eklenmiştir. Besiyeri içindeki boyanın renk giderimi yüzdesi (%) şeklinde ifade edilmiştir. Renk giderimi yüzdesini hesaplamada kullanılan formül aşağıda verilmiştir. Boya renk giderimi için optimum koşulların belirlenmesinde her çalışma iki paralelli olarak yürütülmüştür.

Boya giderim verimleri: Renk giderimi yüzdesi (%) = $(C_0 - C_1) / C_0 \times 100$

C_0 ve C_1 ise sırasıyla başlangıç ve son boya konsantrasyonlarını (mg/lt) bildirmektedir.

Tüm renk giderimi deneylerinde kültür ortamı belli yaş ağırlıktaki pelletler ile inokule edilmiştir. Bu yaş ağırlık miktarına karşılık gelen kuru ağırlık miktarını belirlemek amacıyla pelletler 80°C'de 12 saat kurutulduktan sonra kurutma kağıdı ile birlikte tartılmıştır. Bu yöntem kullanılarak, başlangıçta kullanılan yaş inokulum miktarına karşılık gelen kuru ağırlık miktarına ilaveten, inkübasyon süresi sonunda boyalı ve boyasız besiyerlerindeki biyomas miktarları da tespit edilmiştir.

2.3. Boyarmaddelerin standart eğrilerinin oluşturulması

Boyar maddelerin 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/l lik konsantrasyon serileri saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Her bir boyanın maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenmiştir. Bunun için UV visible spektrofotometre (JascoV-530 UV/VIS Spektrofotometre) kullanılmıştır. Spektrum taraması 300-700 nm arasında yapılmıştır. Boyaların maksimum absorbans verdiği dalga boyları şunlardır; Blue 49 (600 nm), Orange 12 (430 nm), Orange 13 (490 nm), Red 31 (545 nm), Black 5 (600 nm), RBBR (600 nm). Farklı konsantrasyona sahip boya çözeltilerinin absorbansları belirtilen dalga boylarında okunmuştur. Böylece, kullandığımız boyaların, belirli bir konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu değerler kullanılarak her bir boya için standart eğri grafiği hazırlanmıştır. Renk giderimi çalışmaları sırasında alınan örneklerdeki boya konsantrasyonlarını belirlemede bu grafikler kullanılmıştır.

2.4. *P. chrysosporium*'un tekstil boyalarını dekolorize etme yeteneğinin belirlenmesi

Yapılan ön çalışmalar ile renk giderimi yeteneği test edilen *P. chrysosporium*'un, kullanılan tekstil boyalarının dekolorize etme yetenekleri pH 4.5, boya konsantrasyonu 25 mg/l, çalkalama hızı 100 rpm ve sıcaklık 30 °C olarak denenmiştir (Tatarko et al., 1998; Yeşilda vd., 2002; Chagas et al., 2001). Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, en kısa sürede ve en yüksek renk giderimi yüzdesi sağlayan *P. chrysosporium*'un renk giderimindeki başarısını artırmak amacıyla; pH, boya konsantrasyonu, çalkalama hızı ve sıcaklık gibi parametreleri değiştirerek daha hızlı ve yüksek oranda renk giderimi gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği araştırılmıştır.

2.5. Renk giderimi için optimum koşulların belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, *P. chrysosporium*'un tekstil boyalarının renk giderimi için optimum ortam koşulları belirlenmiştir. Bunun için pH 3.5, 4.5, 5.5 ve 6.5, boya konsantrasyonu 25, 50 ve 100mg/l, çalkalama hızı 100, 150 ve 200 rpm ve sıcaklık 25, 30, 35 ve 40 °C olarak denenmiştir.

2.6. Boyaların ve renk giderimi ortamlarının "brine-shrimp toxicity" testiyle akut toksisitelerinin belirlenmesi

Optimum koşullarda gerçekleştirilen boya renk giderimi çalışmaları sonunda kültür ortamları santrifüjlenmiş ve kültür süpernatantlarının toksisitesi artemia salina toksisite testi ile bulunmuştur. Ayrıca işlem görmemiş boya çözeltilerinin de toksisiteleri belirlenmiştir.

Kaya tuzu su içinde çözdürülmüştür. Kaya tuzu *Artemia salina* larvalarının gelişebildiği ortamdır. Her bir boyanın 25–1000 ppm arasında değişen farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve bunlar içinde 5 ml. çözücü bulunan tüplere aktarılmıştır.

İşğe göçü sağlanan larvaların yoğun olarak bulunduğu bölgelerden, 10 µl'ye ayarlanmış mikropipetör yardımıyla suyla birlikte alınan larvalar, steromikroskop altında boş bir petri kabına damlatılmış ve 10 adet *Artemia salina* sayılmıştır. Daha sonra içinde 5 ml tuzlu su ile birlikte farklı konsantrasyonlarda boya bulunan tüplere ve içinde sadece 5 ml. tuzlu su bulunan kontrol tüpüne 10 adet larva aktarılmıştır. 24 saat sonunda, yine steromikroskop yardımıyla, ölmüş olan larvalar hareketsiz olmalarına göre ayırt edilerek sayılmış ve kaydedilmiştir. Veriler Probit Analiz Bilgisayar programıyla değerlendirilmiş ve LD₅₀ değerleri ile % 95 güvenilirlik sınırları hesaplanmıştır. Çalışmalar çift paralel olarak yapılmıştır.

2.7. İstatistik analizleri

Farklı ortam koşullarının renk giderimi oranları üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Değiştirilen ortam koşullarının (pH, boya konsantrasyonu, çalkalama hızı ve sıcaklık) renk giderimi üzerinde yarattığı farklar SPSS programı kullanılarak sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3. Bulgular

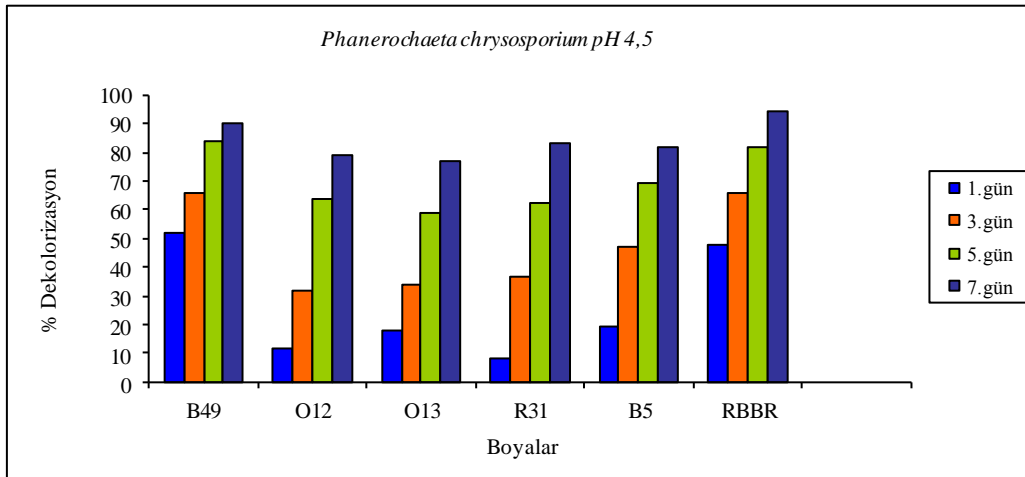
Bu çalışmada, tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılan reaktif boyaların, *P. chrysosporium* ile parçalanması için en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla; pH, boya konsantrasyonu, çalkalama hızı ve sıcaklık gibi parametrelerin renk giderimi üzerine etkisi belirlenmiştir.

3.1. Renk giderimi için optimum koşulların belirlenmesi

3.1.1. pH

pH'ları 3.5-6.5'a ayarlanmış ve boyarmadde ilave edilmiş besiyerlerinin *P. chrysosporium* tarafından zamana bağlı olarak dekolorize edilme oranlarına bakılmıştır. *P. chrysosporium* mantarı ile yapılan çalışmalar sonucunda renk giderimi yüzdesi'nin pH 4.5 olduğu ortamlarda daha fazla olmuştur. Yine pH 4.5'ta boyaları dekolorize etme hızları da pH 3.5, 5.5 ve 6.5'a oranla daha yüksektir.

P. chrysosporium mantarının besiyerinin pH'ı 4.5'a ayarlandığı durumda ilk 24 saat içinde %50 oranında dekolorize olurken, pH 3.5'ta ise, 7. günün sonunda dahi %50 renk giderimi elde edilememiştir. pH 5.5'da renk giderimi gerçekleşmiş, ancak renk giderimi yüzdesi pH 4.5'a göre daha düşük olmuştur. pH 5.5'da, 7. günün sonunda % 63 oranında renk giderimi ulaşılmıştır. Son olarak pH 6.5'da ise 7. günün sonunda boyaları dekolorize etme oranı en fazla % 26'da kalmıştır. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan tüm boyalar için optimum pH'ın 4.5 olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Şekil 1).



Şekil 1. *P. chrysosporium*'un pH 4,5'ta zamana bağlı renk giderimi

3.1.2. Boya konsantrasyonu

P. chrysosporium mantarı'nın 25, 50 ve 100 mg/l boyarmadde içeren besiyerlerini zamana bağlı olarak renk giderimi sonucunda tekstil boyalarında boyarmadde konsantrasyonu arttıkça renk giderimi oranı düşmüştür.

25 mg/l Blue 49 içeren besiyerinde boyanın 24 saat içinde % 88'i giderilmiştir. Aynı şekilde RBBR tekstil boyası da 24 saat içinde % 68 dekolorize olmuştur. 50 mg/l boya içeren besiyerinde Blue 49 % 65, RBBR % 59

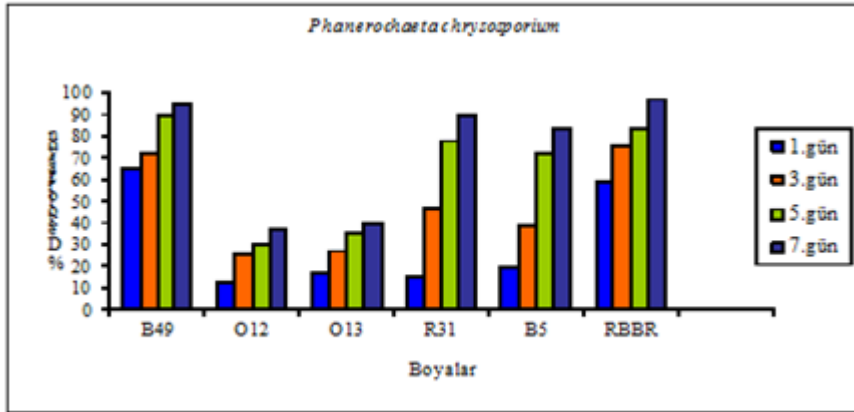
oranında renk giderimi gözlenmiştir. Dolayısıyla ilk 24 saatlik inkübasyon sonunda boyarmadde konsantrasyonu arttıkça renk giderimi oranı düşmüştür. Ancak inkübasyonun yedi günlük süresi sonundaki değerlere bakıldığında 25 mg/l ve 50 mg/l Blue 49 sırasıyla % 99 ve % 95 oranında giderilmiştir. RBBR'nin ise 25 mg/l ve 50 mg/l'lik çözeltileri % 97 renk giderimi göstererek renk giderimi oranlarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Yedi gün sonunda 100 mg/l'lik boya konsantrasyonunda Blue 49 % 77, RBBR % 85 oranında giderilmiştir.

25 mg/l Orange 12 içeren besiyerinde 5. gün % 70, 50 mg/l'de % 30 ve 100 mg/l'de % 17 dekolorezasyona ulaşılmıştır. Aynı şekilde 25 mg/l Orange 13 içeren besiyerinde 5. gün sonunda % 78, 50 mg/l'de % 35 ve 100 mg/l'de % 17 renk giderimi izlenmiştir. Orange 12 ve Orange 13 boya konsantrasyonları arttıkça renk giderimi hızı ve yüzdesi inkübasyon sonunda oldukça düşmüştür.

Red 31 tekstil boyası 25 mg/l boya konsantrasyonu içeren besiyerinde 3. günü % 63, 7. günü % 92, 50 mg/l boya konsantrasyonunda 3. günü % 47, 7. günü % 89 100 mg/l boya konsantrasyonunda 3. günü % 35, 7. günü % 65 renk giderimi izlenmiştir.

Black 5 tekstil boyası 25 mg/l boya konsantrasyonu içeren besiyerinde 5. günü % 78, 50 mg/l boya konsantrasyonunda % 72, 100 mg/l boya konsantrasyonunda % 67 renk giderimi göstermiştir. İnkübasyon sonucunda renk giderimi oranları birbirine oldukça yakındır.

Boya konsantrasyonu 50 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkınca renk giderimi hızında yavaşlama olmuştur. Denemeler sonucunda 25 ve 50 mg/l boya konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark ($p < 0.05$) görülmemiştir. 100 mg/l boya konsantrasyonunda diğerlerine göre anlamlı bir fark belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *P. chrysosporium* 'un boya konsantrasyonu 50 mg/l

3.1.3. Çalkalama hızı

Renk giderimi için farklı çalkalama hızları kullanılarak, çalkalama hızının artmasıyla renk giderimi de daha yüksek verim elde edilip edilemeyeceği araştırılmıştır. Bunun için 3 farklı çalkalama hızı denenmiştir.

P. chrysosporium mantarı ile 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızlarında boya çözeltileri ile yapılan renk giderimi çalışmalarında; Blue 49 tekstil boyası 50 mg/l boya konsantrasyonu ile 100 rpm hızda 7 günlük inkübasyon sonucunda % 55 renk giderimi elde edilirken, 150 rpm'de ilk 24 saat içinde % 63'ü, 200 rpm'de ise % 65'si dekolore edilmiştir.

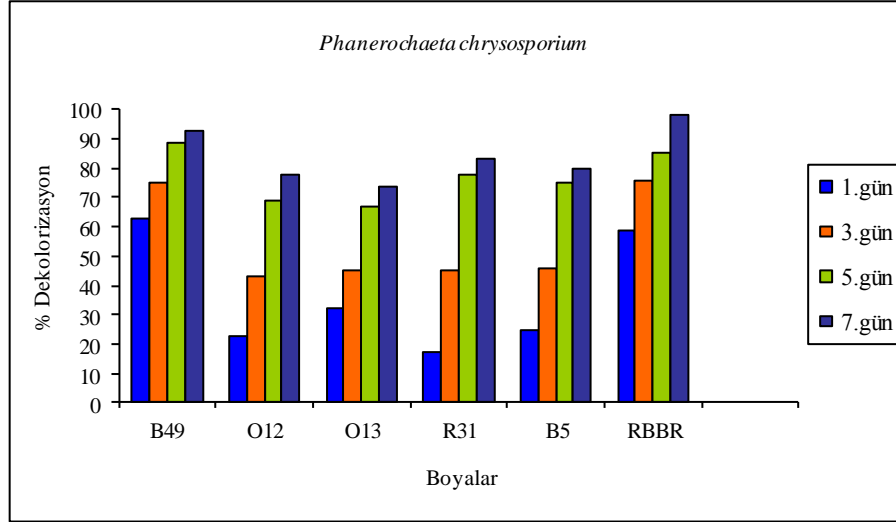
25 mg/l boya konsantrasyonunda Orange 12 tekstil boyası 100 rpm hızda 7 günlük inkübasyon sonucunda % 39, 150 rpm'de 3. günü % 43, 200 rpm'de % 45 renk giderimi ulaşılmıştır. Çalkalama hızı arttıkça renk giderimi hızı artmıştır. Fakat 150 rpm'den 200 rpm'e çıkınca çok fazla olmasa da renk giderimi daha hızlı olmuştur.

25 mg/l boya konsantrasyonunda Orange 13 tekstil boyası 100 rpm hızda 7. günü % 41, 150 rpm'de 3. günü % 45 ve 200 rpm'de 3.günü % 47'ye yükselmiştir.

50 mg/l boya konsantrasyonunda Red 31 ve Black 5 tekstil boya ları 100 rpm'de 7 günlük inkübasyon sonucunda % 45 ve % 47, 150 rpm'de ise % 83 ve %80, 200 rpm'de ise her iki boyada % 88 renk giderimi izlenmiştir.

50 mg/l boya konsantrasyonunda RBBR tekstil boyası 100 rpm çalkalama hızında 5. günü % 45'i renk giderimine uğramıştır. 150 rpm'de 24 saat içinde % 59'u, 200 rpm ise % 63 renk giderimi görülmüştür. İnkübasyon sonucunda her iki çalkalama hızında da % 98 oranında gerçekleşmiştir.

P. chrysosporium mantarı denenilen çalkalama hızlarında 100 rpm'de diğer çalkalama hızlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiş. 150 rpm ve 200 rpm'de ise çalkalama hızları arasında ise anlamlı bir fark ($p < 0.05$) belirlenmemiştir (Şekil 3).

Şekil 3. *P. chrysosporium*'un çalkalama hızı 200 rpm

3.1.4. Sıcaklık

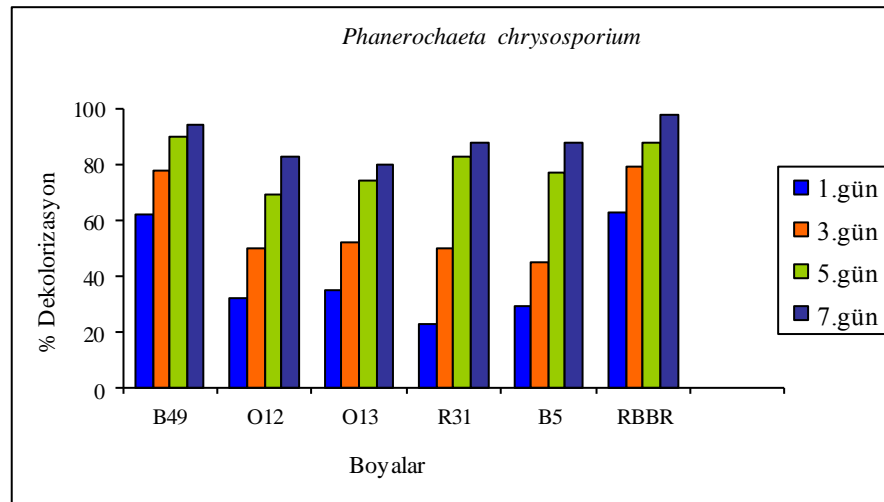
Renk giderimi için farklı sıcaklık dereceleri (25, 30, 35 ve 40 °C) kullanılarak, sıcaklığın yükselmesiyle renk giderimi de daha yüksek verim elde edilip edilemeyeceği çalışmaları sonucunda *P. chrysosporium* mantarı en iyi renk giderimi 30 °C sıcaklıkta göstermiştir (Şekil 4).

P. chrysosporium'un boya renk giderimi için optimum sıcaklığın belirlendiği çalışmalar sonucunda, 30 °C'de renk giderimi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir.

25°C'de Blue 49 ve RBBR tekstil boya ları 7 günlük inkübasyon sonucunda Blue 49 % 49 RBBR ise % 52 renk giderimi göstermiştir. 30 °C sıcaklıkta ise Blue 49 24 saat sonunda % 62 oranında renk giderimi elde edilmiştir. 7. gün sonunda % 94 renk giderimine ulaşılmıştır. RBBR tekstil boyası ise 24 saat sonunda % 63 renk giderimi olmuştur. Bir haftalık inkübasyon sonucunda ise % 98 renk giderimi izlenmiştir. Orange 12 tekstil boyası 25°C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda % 33 renk giderimi izlenmiştir. 30 °C sıcaklıkta ise 25 °C sıcaklıkta ki renk giderimi göre daha hızlı renk giderimi olmuş, inkübasyonun 3. günü % 50 renk giderimi 7. günü ise % 83 renk giderimi ulaşılmıştır. Orange 13 tekstil boyası 7 günlük inkübasyon sonucunda 25 °C sıcaklıkta % 40 renk giderimi, 30 °C sıcaklıkta ise 3. günü % 52 renk giderimi göstermiştir. 25 °C sıcaklığa göre 30 °C sıcaklıkta daha hızlı renk giderimi olmuştur. Red 31 tekstil boyası 25 °C sıcaklıkta 7 günlük inkübasyon sonucunda % 39 gibi düşük bir renk giderimi fakat 30 °C sıcaklıkta 3. günü boyanın % 50' si giderilmiştir. Black 5 tekstil boyası Red 31 tekstil boyası gibi bir haftalık inkübasyon sonucunda % 39 fakat 30 °C sıcaklıkta % 72 renk giderilmiştir.

35 °C sıcaklıkta ise tüm tekstil boya ları 30 °C sıcaklıkta ki gibi renk giderimi oranına yakın renk giderimi göstermiş fakat renk giderimi hızı daha yavaş olmuştur.

40 °C sıcaklıkta *P. chrysosporium* mantarı tekstil boya larının rengini giderme hızı yavaş olmuştur. Blue 49 7 günlük inkübasyon sonucunda % 69, Orange 12 % 49, Orange 13 % 44, Red 31 % 48, Black 5 % 51, RBBR % 60 renk giderimi oranı elde edilmiştir.

Şekil 4. *P. chrysosporium*'un 30 °C deki dekolozasyon yüzdeleri

3.2. Renk giderimi ürünlerinin toksisitesi

Çalışmada kullanılan reaktif boyaların ve bunların degradasyonu sonucunda meydana gelen ürünlerin toksisitesini belirlemek amacıyla *Artemia salina* akut toksisite testi yapılmıştır. Buna göre boyaların tümünün “zararlı” olarak nitelendirilmiştir. Optimum koşullarda yapılan renk giderimi çalışmalarından elde edilen ürünlerinin toksik olup olmadığı da belirlenmiştir.

Toksosite testinden elde edilen veriler Probit Analiz adlı bilgisayar programıyla hesaplanmış ve LD₅₀ değerleri ile birlikte üst ve alt % 95 güvenilirlik sınırları ortaya konulmuştur. Toksikite testi sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir. Sonuçların toksisite değerlendirilmeleri ise Tablo 1’de ki referans değerlerine göre yapılmıştır.

Tablo 1. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler (Bryan et. al., 1997)

Toksosite Derecesi	LD ₅₀ Limitleri
Oldukça Toksik	<10 µg/ml
Toksik	>10 µg/ml
Zararlı	>100 µg/ml
Toksik Değil	>1000µg/ml

Tablo 2. Boyaların Brine-Shrimp Toxicity Assay Testi Sonuçları ve LD₅₀ değerleri

Boyalar	LD ₅₀ (µg/ml)	Üst % 95 Güv. Lim.(µg/ml)	Alt % 95 Güv. Lim.(µg/ml)	Boyaların Toksosite Derecesi	Renk giderimi ortamlarının Toksosite Derecesi
Blue 49	578.15	472.88	774.08	Zararlı	Toksik değil
Orange12	280.81	214.33	387.86	Zararlı	Toksik değil
Orange13	298.59	243.12	376.04	Zararlı	Toksik değil
Red 31	425.67	351.86	551.04	Zararlı	Toksik değil
Black 5	484.20	390.61	660.54	Zararlı	Toksik değil
RBBR	527.26	432.36	699.54	Zararlı	Toksik değil

4. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada, reaktif boyarmadde sınıfından olan Reactive Blue 49, Reactive Orange 12, Reactive Orange 13, Reactive Red 31, Reactive Black 5, Reactive Blue 19 beyaz çürükçül mantar olan *P. chrysosporium* ile pH, boya konsantrasyonu, çalkalama hızı ve sıcaklığın renk giderimi üzerine verimi incelenmiştir.

pH ile ilgili tüm bu çalışmalar, renk giderimi açısından pH’ ın önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Maksimum renk giderimi genellikle mikroorganizmanın optimum gelişim gösterdiği veya renk gideriminde rol oynayan enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinde gerçekleştiği görülmektedir. Bu çalışmada da, *P. chrysosporium*, maksimum renk giderimi pH 4.5’ da olmuştur. pH 5.5’ da da bir miktar renk giderimi olmuştur. Ancak pH 3.5 ve 6.5’ da renk giderimi çok düşük olmuştur.

Shahvali ve arkadaşlarının (2000) ve Shin ve arkadaşlarının (1997) tekstil boyalarının beyaz çürükçül mantarlar ile renk gideriminde etkili olan çevresel faktörleri araştırdıkları bir çalışmada, maksimum renk gideriminin pH 3’de gerçekleştiği tespit edilmiştir. pH 5’den yukarıya çıkıldıkça renk giderimi oranının düştüğü görülmüştür. Shahvali ve arkadaşları bunun nedeninin ozmotik değişiklikler ve hidrolize edici etki olabileceğini ileri sürmektedirler.

Yaptığımız çalışma sonucunda pH 4.5’da en iyi renk giderimi yeteneği Swamy ve arkadaşları (1999) tarafından tekstil boyalarından Amarath, Remazol Black B, Remazol Orange, Remazol Brilliant Blue, Reactive Blue ve Tropaeolin O boyaları ve beyaz çürükçül mantarlarla yaptığı renk giderim deneylerinde pH 4.5’da en iyi sonuç vermesi ile benzerlik göstermektedir.

Boyarmadde konsantrasyonu miktarında her boya farklı sonuç vermiştir. Boya konsantrasyonu miktarları 25, 50 ve 100 mg/l olarak seçilmiştir. Boya konsantrasyonu oranı arttıkça renk giderimi hızında düşüş olmuştur.

Yeşilada ve arkadaşlarının (2002) Astrazon Red FBL ilave edilen besiyerinin *Funalia trogii* pelletleri ile renk giderimi yeteneğini araştırdıkları çalışma sonucunda, renk giderimi yüzdesinin, boyarmadde konsantrasyonu 66mg/lit oluncaya kadar arttığını, boyarmadde konsantrasyonu 66 mg/lit’ nin üzerine çıktıktan sonra ise azaldığını göstermektedir.

Kapdan ve arkadaşları (2000), beyaz çürükçül mantarlarla yaptığı renk giderimi çalışmasında da boya konsantrasyonu miktarı arttıkça mantar için toksik etki gösterebileceği belirlenmiştir. Kullandığımız tüm tekstil boyalarında boya konsantrasyonu miktarı arttıkça renk giderimi için gerekli süre uzamıştır.

P. chrysosporium’ un farklı çalkalama hızlarındaki renk giderimi yüzdesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada da 200 rpm’ de diğerlerine oranla daha yüksek bir renk giderimi yüzdesi belirlenmiştir.

Aynı şekilde Shahvali ve arkadaşları (2000), Chagas ve arkadaşları (2001), Assadi ve arkadaşları (2001) ve Yeşilada ve arkadaşları (2003) tarafından da 200 rpm çalkalama hızında renk gideriminin iyi sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmalar çalkalama hızı arttıkça hücreler ile besiyeri arasında daha fazla kütle ve oksijen transferi olduğu için, renk giderimi daha hızlı olmaktadır. Aynı şekilde mikroorganizma ile boya moleküllerinin temas etme olanağının daha hızlı ve daha fazla olmaktadır.

P. chrysosporium mantarıyla tekstil boyalarının renk giderimiyle ilgili yapılan çalışmalarda Toh ve arkadaşları (2003) 30 °C sıcaklık optimumu olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlarda bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilere uygunluk göstermektedir.

Renk giderimi ortamlarından elde edilen supernatantların hiçbirinin toksik olmadığı belirlenmiştir. 100-1000 µl/ml. arasında bulunan LD₅₀ değerleri, alt ve üst güvenlik sınırları itibariyle toksisite sınırları içerisinde yer alırken 1000 µl/ml'nin üzerinde olan LD₅₀ değerleri ile toksisite sınırları dışında yer aldığı gözlenmiştir (Brayn, et al., 1997).

Sonuç olarak; tekstil sektörü Türkiye ekonomisi açısından gıda sektöründen sonra önde gelen sanayi dalıdır. Dolayısıyla ülke ekonomisine göz ardı edilemeyecek kadar katkı sağlamaktadır. Tekstil ve boya sanayilerinin de çevresel sorunlarda büyük payları vardır. Her yıl milyonlarca galon boya üretilirken, çevrecede bu sanayilerin büyük miktarlarda boya içeren çıktısı suları bırakılmaktadır. Bu tip sanayi kuruluşlarının çevresindeki su kaynaklarına bu atık suları vermelerinden dolayı renk kirliliği oluşmaktadır.

Bu nedenle büyük hacimli atık sulardaki boyarmaddelerin etkili ve ekonomik bir şekilde giderilebilmesi için biyolojik sistemler gibi alternatif yöntemlere gereksinim vardır. Boyalar genelde kompleks aromatik yapıda olduklarından arıtımı zordur. Bu yüzden araştırmacılar renk giderimi için alternatif yöntem üzerine çalışmaktadırlar. Biyoteknolojik çalışmalar bu açıdan ümit vericidir.

Yapılan araştırma sonucunda özellikle tekstil endüstrisi atık sularının beyaz çürükçül mantarları kullanılarak çok kısa sürelerde ve yüksek verimlerde arıtılabileceği gözlenmiştir. Arıtımın 25-30 °C sıcaklıklarda gerçekleşmesi özellikle sıcaklığın yüksek olduğu yerlerde büyük bir avantaj sağlayabilir. Ayrıca mantar gelişimi için kullanılan pH'nın nötre yakın değerler olmasından dolayı alıcı ortama direkt verildiğinde herhangi bir pH sorununa neden olmayacağı gibi nötralizasyon için ilave kimyasal maddelere gereksinim olmayacaktır. Buda işletme maliyetlerinin azalmasına neden olacaktır.

Kaynaklar

- Aksu, Z., Çağatay, Ş.Ş., 2006. Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Sep. Purif. Technol.* 48(1), 24-35.
- Assadi, M. M., Rostami, K., Shahvali, M., Azin, M. 2001. Decolorization of textile wastewater by *Phanerochaete chrysosporium* Desalination 141 pp. 331-336
- Bayat, C., Caner, O., Demir, G., Korucuoğlu, H. 1995. Beyaz Çürükçül Funguslarla Poliflorlu Organik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı, Atatürk Üni. Müh. Fak. Çevre Müh. Bölümü, Çevre Sempozyumu, 241-251
- Başer, İ., İnanıcı, Y. 1990. Boyarmadde Kimyası, Marmara Üniversitesi Yayın No: 482, İstanbul, 216 s.
- Bryan, B., Timothy, M., Tore, S. 1997. General and Applied Toxicology, 2nd. Edition, 1, 52.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D. 1985. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus, *Science*, (228): 1434-1436
- Chagas, E.P., Durrant, L.R., 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju* Enzyme and Microbial Technology Volume 29, Issues 8-9, pp. 473-477.
- Couto, S.R., Rivela, I., Munos, M.R., Sanroman, A., 2000. Ligninolytic Enzyme Production and The Ability of Decolourisation of Poly R-478 in Packed Bed Bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioprocess Engineering*, (23): 287-293
- Demir, G., Özcan, H. K., Borat M., 2007. Bir Beyaz Çürükçül Mantar Türü Olan *Phanerochaete chrysosporium* ile Remazol Blue RR Gran'ın Renk Giderimi" *KSU Journal of Science and Engineering*, 42 10(1)
- Eaton, D.C., 1985. Mineralization of Polychlorinated by *Phanerochaete chrysosporium* a Lignolytic Fungus, *Enzyme and Microbial Technology* (7): 194-196.
- Gulnaz, O., Kaya, A., ve Dincer, S., 2006. The Reused of Dried Activated Sludge for Adsorption of Reactive Dye, *J. of Hazardous Materials*, B134: 190-196.
- Işık, M., Sponza, D., 2001. Tekstil Atıksularının Oluşumu, Karakterizasyonu ve Arıtım Yöntemleri. IV. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 5-8 Ekim, Bodrum.
- Jaspers, C.J., Penninckx, M.J., 1996. Adsorption Effects On the Decolorization of a Craftblach Plant Effluent by *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnology Letters*, (18)11: 1257-1260.
- Kapdan, I., Kargı, F., McMullan, G. et al., 2000. "Comparison of White Rot Fungi Cultures for Decolorization of Textile Dyestuffs", *Bioprocess Engineering*, 22, 347-351.
- Kapdan, İ. A., Kargı, F., 2000. Atıksulardan tekstil boyar maddesinin *Coriolous versicolor* ile dolgulu kolon reaktörde giderimi, İTÜ. 7. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, İstanbul, 1-7.
- Kaykioğlu, G., Debik, E., 2006 . Color Removal From Textile Wastewater With Anaerobic Treatment Processes, *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*
- Kirk, T. K., Tien, M., 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*', *Methods in Enzymology*. 161, 239-247.

- Kocaer, F.O., Alkan, U., 2002. Boyar Madde İçeren Tekstil Atık Sularının Arıtım Alternatifleri. Uludağ Üniversitesi Mühendislik – Mimarlık Fakültesi Dergisi, 1: 47-55.
- Kunamneni, A., Ghazi I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxyactivatedcarriers. *Process Biochemistry* 43(2), 169-178.
- Kumar, K.V., Ramamurthi, V., Sivanesan, S., 2006. Biosorption of malachite green, acationic dye on to *Pithophora sp.*, a freshwater algae. *Dyes and Pigments* 69, 74-79.
- Manu, B., Chaudhari, S., 2002. "Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes", *Bioresource Technology*, 82, 225-231.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluents: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77, 247-255.
- Shahvali, M., Assadi, M.M., Rostami, K., 2000. Effect of Environmental Parameters on Decolorization of Textile wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bioprocess Engineering*. Dec.Issue.
- Shin, K. S., Oh Ik., Kim CJ., 1997. Production and purification of remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1744–1748.
- Stainer, R.Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J., 1976. "The Microbial World", Prentic Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 105-118.
- Swamy, J., Ramsay, J.A., 1999. The Evaluation of White – Rot Fungi in The Decolorization of Textile Dyes. *Enzyme. Microb. Technol.*, 24: 130-137.
- Sengül, F., 1983. Pamuklu Tekstil Sanayi Atık Sularına Organik Madde ve Renk Giderme ile İlgili Laboratuar Model Çalışmaları Çevre 83 II. Ulusal çevre müh. Sempozyumu 1-5 haziran 1983, İzmir
- Seker, S., İleri, R., Öztürk, M., 2000. Tekstil Endüstrisi Atıksularındaki Renk Sorununun Biyoteknolojik Metod ile Giderilmesi, 2000 GAP Çevre Kongresi, 655-662.
- Yeşilada, Ö., 1995. Decolorization of Crystal Violet by Fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 601-602.
- Yesilada, O., Cing, S., Asma D., 2002. Decolorisation of the Textile Dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* Pellet *Bioresource Technology*, 81, 155-157.
- Yeşilada, Ö., Asma, D., Cing, S., 2003. Decolorization of Textile Dyes by Fungal Pellets. *Process Biochemistry*, 38, 933-938.
- Tatarko, M., Bumbus, J. A., 1998. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium* *Water Research* 32/5 pp. 1713-1717.
- Toh, Y., Jia, J., Yen, L., Obbard, JP., Ting, Y., 2003. Decolorization of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme Microb Technol* 33:569–575.
- Van der Zee, F. P., Villaverde, S., 2005. Combined anaerobic- aerobic treatment of azo dyes- A short review of bioreactor studies. *Water Research* 39: 1425-1440.
- Wang, Y., Yu. J., 1998. Adsorption and Degradation of Synthetic Dyes on the Mycelium of *Trametes versicolor*, *Water Science Technology*, (38)4-5: 233-238.
- Wesenberg, D., Buchon, F. Agathos, S.N., 2002. Degradation of Dye Containing Textile Effluent by Agaric White - Rot Fungus *Clitocybula dussenii*. *Biotechnology Letters*, 24: 989-993.

(Received for publication 27 November 2012; The date of publication 15 December 2013)