



SERBEST VE İMMOBİLİZE BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL
FUNGUSLAR İLE FLUOREN'İN BİYODEGRADASYONU

DOKTORA TEZİ
Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

AĞUSTOS 2010

DENİZLİ

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERBEST VE İMMOBİLİZE BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL
FUNGUSLAR İLE FLUOREN'İN BİYODEGRADASYONU**

**DOKTORA TEZİ
Hatice ARDAĞ AKDOĞAN**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Doktora

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU
II. Danışman: Doç. Dr. Ümit DİVRİKLİ**

AĞUSTOS 2010

DOKTORA TEZ ONAY FORMU

Hatice ARDAĞ AKDOĞAN tarafından Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU ve Doç. Dr. Ümit DİVRİKLİ yönetiminde hazırlanan “Serbest ve İmmobilize Beyaz Çürükçül Funguslar ile Fluoren’in Biyodegradasyonu” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



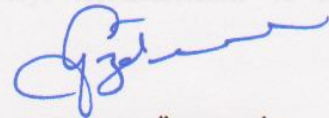
Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Jüri Başkanı (Danışman)



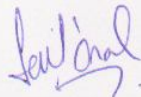
Doç. Dr. Ümit DİVRİKLİ

Jüri Üyesi (II. Danışman)



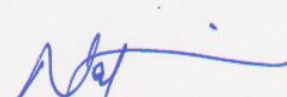
Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Seçil ÖNAL

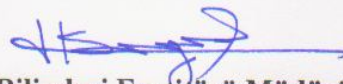
Jüri Üyesi (II. Danışman)



Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.09.2010 tarih ve 24/12.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca büyük ilgi ve anlayışını gördüğüm, değerli bilgi ve desteği ile beni bu çalışmaya yönlendiren tez danışmanım, Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Hocam Sayın Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU'na minnettarlığımı belirtir, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm, Tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR, Doç. Dr. Ümit DİVRİKLİ, Doç. Dr. Seçil ÖNAL ve Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN hocalarıma katkılarından dolayı teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.



İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : **Hatice ARDAĞ AKDOĞAN**

ÖZET

SERBEST VE İMMOBİLİZE BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLAR İLE FLUOREN'İN BİYODEGRADASYONU

Akdoğan Ardağ, Hatice
Doktora Tezi, Kimya ABD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU
Ağustos 2010, 117 Sayfa

Bu çalışmada, beyaz çürükçül funguslardan, *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus ostreatus*(1), *Pleurotus ostreatus* (2), *Ganoderma carnosum*'un glukoz içeren çalkalamalı ortamlarda, fluoreni yıkabilme yetenekleri araştırıldı. Kültür ortamındaki fluoren konsantrasyonu değişimi HPLC ile izlendi. Yıkımı en iyi gerçekleştiren organizmanın *Pleurotus ostreatus* (2) olduğu saptandı. Daha sonra biyodegradasyon şartları optimize edildi. *Pleurotus ostreatus* (2) farklı taşıyıcılar üzerine (politiren foam, Amberlite XAD-7, Amberlite XAD-2000, ponza, kum) immobilize edilerek, fluoren degradasyonu için en iyi taşıyıcı seçildi ve immobilizasyon şartları optimize edildi.

Fluoren, immobilize *Pleurotus ostreatus* (2) tarafından kesikli çalkalamalı reaktörde yıkıma uğratıldı. Maksimum fluoren degradasyon seviyesi 89,16% olarak belirlendi. Fluorenin dolgu yatak reaktöründeki kesikli yıkımı çalışıldı. Maksimum fluoren yıkım seviyesi 82,46 % olarak tespit edildi. Hazırlanan kesikli dolgu yatak reaktöründe iki farklı sentetik atık su kullanılarak fluoren degradasyonu çalışıldı. Bu çalışmalar sırasında, tüm örneklerde Lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri izlendi. Biyodegradasyonun sonuncu günündeki tüm örnekler GC-MS ve FT-IR'de analiz edildi, herhangi bir yıkım ürününe rastlanmadı. Sonuç olarak immobilize *Pleurotus ostreatus* (2) ile fluoren başarılı bir şekilde biyolojik giderime uğratılabildi.

Anahtar Kelimeler: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAHs), Fluoren, Biyodegradasyon, Beyaz Çürükçül Fungus, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma carnosum* ve *Trametes trogii*, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC)

SUMMARY

BIODEGRADATION OF FLUORENE BY FREE AND IMMOBILIZED WHITE ROT FUNGI

Akdoğan Ardağ, Hatice

PhD. Thesis in Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

August 2010, 117 Pages

In this present work; sub-tropical white rot fungi, *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus ostreatus* (1), *Pleurotus ostreatus* (2), *Ganoderma carnosum* were investigated for their ability to degrade fluorene in the mediums containing glucose in batch systems and determined very good degrader (*Pleurotus ostreatus* (2)). Biodegradation conditions were optimized. The fungus *Pleurotus ostreatus* (2) was immobilized in several carrier matrices: polystyrene foam, Amberlite XAD-7, Amberlite XAD-2000, pumice particles, sand and then selected matrix was used as a biosorbent for degrading fluorene. And, immobilization conditions were optimized.

Fluorene was degraded by immobilized *Pleurotus ostreatus* (2) in Stirred batch and Packed bed bioreactor. The maximum fluorene degradation level was 89.16%. Degradation of fluorene in a packed bed bioreactor was also studied in a recycled batch system. Eventually, the maximum fluorene degradation level was 82.46%. Then still in this system, two different synthetically concocted waste waters containing fluorene were also used. Laccase and MnP enzyme activities were measured in this study for all samples. Metabolites were analysed GC-MS and FT-IR at the end of the biodegradation. It was concluded that immobilized *Pleurotus ostreatus* in a packed bed bioreactor could potentially be used for the biodegradation of fluorene in wastewater.

It was concluded that immobilized *Pleurotus ostreatus* (2) achieved the biodegradation of fluorene.

Key Words: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Fluorene, Biodegradation, White Rot Fungi, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma carnosum* ve *Trametes trogii*, High performance liquid chromatography (HPLC)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 PAH'lar ve Fluoren.....	3
1.1.1 Fluoren kaynakları	4
1.1.2 Fluoren'in toksisitesi.....	5
1.1.3 Fluoren giderim yöntemleri.....	6
1.1.3.1 Fiziksel/Kimyasal Yöntemler.....	6
1.1.3.2 Biyolojik yöntemler.....	6
1.2 Beyaz çürükçül funguslar (BÇF).....	8
1.2.1 BÇF lerin biyoyıkımlardaki rolleri.....	8
1.2.2 BÇF ile fluoren yıkımı.....	10
1.2.3 <i>Pleurotus ostreatus</i> ve PAH yıkımı.....	11
1.2.4 Endüstriyel atıksuların arıtımında kullanılan fungal kaynaklı enzimler.....	12
1.2.4.1 Polifenol oksidazlar.....	12

1.2.4.2 Lakkaz.....	13
1.2.4.3 Tirozinaz.....	13
1.2.4.4 Peroksidazlar.....	14
1.2.4.5 Horseradish peroksidaz.....	14
1.2.4.6 Lignin peroksidaz.....	15
1.2.4.7 Mangan peroksidaz.....	15
1.3 Serbest Hücreler İle Fluoren Yıkımı.....	15
1.4 İmmobilize Hücreler ile fluoren Yıkımı.....	16
1.4.1 İmmobilizasyon yöntemleri.....	16
1.4.1.1 Tutuklama (İmmobilizasyon).....	16
1.4.1.2 Tutuklama Yöntemleri.....	17
1.4.1.3 Yüzeğe tutunma.....	17
1.4.1.4 Kovalent bağlama.....	18
1.4.1.5 Çapraz bağlama.....	18
1.4.1.6 Mikrokapsülleme.....	18
1.4.1.7 İnert bir desteğe tutuklama (immobilizasyon).....	18
1.4.2 İmmobilize hücrelerin serbest hücre sistemlerine avantajları.....	19
2. MATERYAL METOD.....	20
2.1 Materyaller.....	20
2.1.1 Cihazlar.....	20

2.1.2 Kimyasallar.....	20
2.1.3 Taşıyıcılar.....	21
2.1.4 Mikroorganizmalar.....	21
2.2 Ortamlar ve Analitik Yöntemler.....	21
2.2.1 Kültür ortamları.....	21
2.2.1.1 Tanımlanmış ortamlar.....	21
2.2.1.2 Sentetik atık su ortamları.....	21
2.2.2 İndirgen Şeker Tayini.....	23
2.2.3 Biyokütle Tayini.....	23
2.2.4 Enzim aktivite tayinleri.....	23
2.2.5 Fluoren tayini.....	24
2.2.5.1 Örnek alma.....	24
2.2.5.2 Ekstraksiyon prosedürü.....	24
2.2.5.3 HPLC analizi.....	24
2.2.6 GC-MS analizi.....	24
2.2.7 FTIR analizi.....	25
2.3 Serbest Hücreler ile Fluoren Yıkımı.....	25
2.4 Hücre İmmobilizasyonu.....	25
2.4.1 Taşıyıcı materyalin hazırlanması.....	25
2.4.2 Hücre süspansiyonunun hazırlanması.....	26
2.4.3 Taşıyıcı yüzeyinde hücrelerin immobilizasyon	

koşullarının optimizasyonu.....	26
2.4.4 Hücre adsorpsiyonunun zamanla değişimi.....	26
2.4.5 Başlangıç hücre miktarının etkisi.....	26
2.4.6 Hücre yaşının etkisi.....	27
2.5 İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Yıkımı.....	27
2.5.1 İmmobilize Hücrelerle Tanımlanmış Ortamlarda Fluoren Yıkımı.....	28
2.5.2 İmmobilize Hücrelerle Sentetik Atık Suda Fluoren Yıkımı.....	28
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
3.1 Fluoren Yıkımı için Uygun Organizmanın Belirlenmesi.....	30
3.1.1 <i>Trametes versicolor</i> ile Fluoren Biyodegradasyonu.....	30
3.1.2 <i>Ganoderma carnasum</i> ile Fluoren Biyodegradasyonu.....	31
3.1.3 <i>Trametes trogii</i> ile Fluoren Biyodegradasyonu.....	33
3.1.4 <i>Pleurotus ostreatus</i> (1) ile Fluoren Biyodegradasyonu.....	34
3.1.5 <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) ile Fluoren Biyodegradasyonu.....	36
3.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) ile Farklı Fluoren Konsantrasyonlarında Yıkım.....	38
3.3 <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) Üzerine Fluoren'in Biyosorpsiyonunu....	43
3.4 <i>Pleurotus ostreatus</i> (2)'un Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu	44
3.4.1 Ponza ile <i>P. ostreatus</i> 'un immobilizasyonu.....	44
3.4.2 Amberlite XAD-2000 ile <i>P. ostreatus</i> 'un immobilizasyonu.....	49
3.4.3 Polistiren köpük ile <i>P. ostreatus</i> 'un immobilizasyonu.....	53

3.4.4 Kum ile <i>P. ostreatus</i> 'un immobilizasyonu.....	58
3.4.5 Amberlite XAD-7 ile <i>P. ostreatus</i> 'un immobilizasyonu...	62
3.5 İmmobilize Hücrelerle Fluoren Yıkımı.....	68
3.5.1 Çalkalamalı kültürlerde yıkım.....	68
3.5.2 Kesikli Dolgu Yatak Reaktöründe Yıkımı.....	72
3.5.2.1 İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Sentetik Atık Su (1)'deki Yıkımı.....	73
3.5.2.2 İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Sentetik Atık Su (2)'deki Yıkımı.....	75
3.5.3 İmmobilize <i>Pleurotus ostreatus</i> ile Ardışık Fluoren Yıkımı.....	77
3.5.4 Fluoren'in Yıkımı Sonrası Alınan Örneklerin Analiz Sonuçları.....	78
4. SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	83
EKLER.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	113

TABLO LİSTESİ

Tablo

2.1	: Sentetik atık su (1) için kullanılan mineral ortamın bileşimi	22
2.2	: Sentetik atık su (2) için kullanılan mineral ortamın bileşimi	23
2.3	: Sistem parçalarının özellikleri	28
3.1	: Farklı funguslarla fluorenin yıkım yüzdeleri	37
3.2	: <i>Pleuratus osteratus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in %Biyodegradasyonları	40
3.3	: <i>Pleuratus osteratus</i> (2) biyokütlesi ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyosorpsiyon çalışması	43
3.4	: 3 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin ponza üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorplanan hücre miktarının değişimi	45
3.5	: 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin ponza üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorpsiyonun değişimi	47
3.6	: 3 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin Amberlite XAD-2000 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	49
3.7	: 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin Amberlite XAD-2000 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	51
3.8	: 3 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin polistiren köpük üzerine	54

immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	
3.9 : 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	57
3.10 : 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin kum üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	59
3.11 : 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin kum üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	61
3.12 : 3 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	64
3.13 : 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	65
3.14 : 3 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonunda % Adsorplanan hücre miktarının değişimi	67
3.15 : 4 günlük <i>P. osteratus</i> hücrelerinin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonunda %Adsorplanan hücre miktarının değişimi	68
3.16 : İmmobilize <i>P.osteratus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyodegradasyon değerleri	70
3.17 : İmmobilize <i>P.osteratus</i> ile fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktörde ardışık yıkımında % biyodegradasyon değerleri	78

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil

1.1	: Fluoren'in Kimyasal Yapısı.....	4
1.2	: Fluoren'in fungal yıkım metabolizması.....	11
2.1	: Kesikli dolgu yatak reaktörü.....	27
3.1	: <i>T. versicolor</i> ile fluoren'in biyodegradasyonu.....	29
3.2	: <i>T. versicolor</i> lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi.....	30
3.3	: <i>G. carnasum</i> ile fluoren'in biyodegradasyonu.....	31
3.4	: <i>G. carnasum</i> lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi.....	31
3.5	: <i>T. trogii</i> ile fluoren'in biyodegradasyonu.....	32
3.6	: <i>T. trogii</i> lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi	33
3.7	: <i>P. ostreatus(1)</i> ile fluoren'in biyodegradasyonu.....	34
3.8	: <i>P. ostreatus(1)</i> Lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi.....	34
3.9	: <i>P. ostreatus(2)</i> ile fluoren'in biyodegradasyonu.....	35
3.10	: <i>P. ostreatus(2)</i> Lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi	36
3.11	: <i>Pleurotus ostreatus (2)</i> ile farklı konsantrasyonlardaki	

fluoren'in yıkım çalışması	37
3.12 : <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in kontrol çalışması	38
3.13 : <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) Lakkaz enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi	38
3.14 : <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) MnP enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi	39
3.15 : <i>Pleurotus ostreatus</i> (2) ile Fluoren'in biyodegradasyonunda yıkım hızları	40
3.16 : Farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki glukoz düzeyi	41
3.17 : Farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki biyokütle miktarı	42
3.18 : Farklı miktardaki <i>Pleurotus osteratus</i> (2) hücrelerinin absorbans değişimleri	43
3.19 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının (gr) zamana bağlı olarak değişimi	44
3.20 : <i>P. ostreatus</i> ' un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	45
3.21 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda adsorpsiyonun pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	45
3.22 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	46

3.23 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) ponzaya immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	47
3.24 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) ponzaya immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	47
3.25 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	49
3.26 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	49
3.27 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda %adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	50
3.28 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	51
3.29 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	51
3.30 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	52
3.31 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	53
3.32 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda	

adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	54
3.33 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	54
3.34 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	55
3.35 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	55
3.36 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	56
3.37 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	57
3.38 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	58
3.39 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	59
3.40 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	59
3.41 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	60
3.42 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	61
3.43 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının	

zamana bağlı olarak değişimi	62
3.44 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 zerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	62
3.45 : <i>P. ostreatus</i> 'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 zerine immobilizasyonda % adsorpsiyonun pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	63
3.46 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) Amberlite XAD-7 zerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	64
3.47 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) Amberlite XAD-7 zerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi	65
3.48 : <i>P. ostreatus</i> 'un (4 günlük) amberlite XAD-7 zerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi	65
3.49 : İmmobilize <i>P. osteratus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyodegradasyonu	68
3.50 : İmmobilize <i>P. osteratus</i> (2) Lakkaz enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi	68
3.51 : İmmobilize <i>P. osrteatus</i> (2) MnP enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi	69
3.52 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki	

fluorene karşı yıkım hızının değişimi	70
3.53 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluorene karşı biyodegradasyon etkinliğinin değişimi	70
3.54 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi	71
3.55 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	72
3.56 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi	73
3.57 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak biyodegradasyon etkinliğinin değişimi	73
3.58 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	74
3.59 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi	75
3.60 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak biyodegradasyon etkinliğinin değişimi	75

3.61 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	
3.62 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> ile Ardışık Fluoren Yıkımı	76
3.63 : Saf Fluoren'in GC kromatogramı	77
3.64 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> ile kesikli dolgu yatak reaktörde fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin GC kromatogramı	78
3.65 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> ile kesikli dolgu yatak reaktörde sentetik atık su (1)'deki fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin kromatogramı	78
3.66 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> ile kesikli dolgu yatak reaktörde sentetik atık su (2)'deki fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin kromatogramı	79
3.67 : Saf Fluoren'in FT-IR spektrumu	79
3.68 : İmmobilize <i>P. ostreatus</i> ile kesikli dolgu yatak reaktörde fluoren yıkımı sonrası alınan örneğin FT-IR spektrumu	80

EK LİSTESİ

Sayfa

- Ek-1:** *T. versicolor* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar;
 A: Standart fluoren, B:yıkımın 5. günü, C: yıkımın 10. günü,
 D: yıkımın 15. günü,
 E: yıkımın 20. gününe
 ait kromatogramlar.....93
- Ek-2:** *G. carnasum* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe
 ait kromatogramlar.....94
- Ek-3:** *Trametes trogii* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü, C: yıkımın
 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. gününe
 ait kromatogramlar.....95
- Ek-4:** *P osteratus(1)* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe
 ait kromatogramlar.....96
- Ek-5:** *P. osteratus(2)* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe
 ait kromatogramlar.....97
- Ek-6:** *Pleuratus osteratus (2)* ile 50 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
 ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....98
- Ek-7:** *Pleuratus osteratus (2)* ile 40 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
 ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,

- C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....99
- Ek-8:** *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....100
- Ek-9:** *Pleuratus osteratus* (2) ile 20 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....101
- Ek-10:** *Pleuratus osteratus* (2) ile 10 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü,
C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....102
- Ek-11:** *Pleuratus osteratus* (2) ile 5 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna
ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....103
- Ek-12:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 50 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
ait kromatogramlar.....104
- Ek-13:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 40 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,

- C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....105
- Ek-14:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....106
- Ek-15:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 20 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....107
- Ek-16:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 10 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....108
- Ek-17:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 5 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe
 ait kromatogramlar.....109
- Ek-18:** İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in
 kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu;
 A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,
 C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,
 E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe

ait kromatogramlar.....110

Ek-19: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile Sentetik atık su (1)'deki

30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu;

A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,

C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,

E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe

ait kromatogramlar.....111

Ek-20: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki

30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu;

A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü,

C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü,

E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe

ait kromatogramlar.....112

SİMGE LİSTESİ

<i>T. versicolor</i>	: <i>Trametes versicolor</i>
<i>G. carnosum</i>	: <i>Ganoderma carnosum</i>
<i>T. trogii</i>	: <i>Trametes trogii</i>
<i>P. osteratus</i>	: <i>Pleurotus ostreatus</i>
MnP	: Mangan peroksidaz
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3)-etilbenzotiazolin-6-sülfat
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
HrP	: Horseradish peroksidaz
LiP	: Lignin peroksidaz
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC	: Gaz kromatografisi
MS	: Kütle spektrometresi
FL	: Fluoren

1.GİRİŞ

Günümüzde insan aktiviteleri nedeniyle oldukça fazla miktarda organik kirletici çevreye bırakılmaktadır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) bu organik kirletici sınıflarından biridir ve çevrede yaygın olarak bulunurlar. Polisiklik aromatik hidrokarbonlara; hayvan ve bitki dokularında, sedimentte, toprakta, havada ve çeşitli su kaynaklarında rastlamak mümkündür. Bu bileşikler sudaki çözünürlükleri oldukça düşük olduklarından partiküllere ve sedimentlere oldukça kuvvetli bir şekilde absorbe olmaktadır. Su ortamına çeşitli yollarla karışabilen PAH bileşikleri hem doğal hem de antropojenik kaynaklardan oluşabilmektedir. PAH bileşikleri fosil yakıtların su ortamına dökülmesi ve sızıntısı, evsel ve endüstriyel atıkların deşarjı, atmosferik partiküllerin çökmesi ve yüzey akışıyla su ortamına girebilirler. Özellikle de evsel ve endüstriyel atık sularda oldukça fazla miktarda bulunabilirler (Gary vd.1985; Haritash vd 2009).

Çevre sorunu dünyanın pek çok yerinde özellikle son 20 yılda güncel hayata girmiş, acilen çözüm bekleyen bir problemdir. Ormanların tahribi ve erozyon, düzensiz şehirleşme ve yeşil alan azalması, kıyıların bozulması, sanayide kullanılan kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, nükleer enerjili termik santraller ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ların ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat sadece Türkiye'de değil, dünyada da çözümleri aranan sorunlar haline gelmiştir. Petrol ve petrol türevi olan PAH'lar, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bulaşan ve sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar. Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda, 1.7- 8.8 milyon ton petrol üretildiği ve bunun önemli bir miktarın da zararlı olarak ya kullanım sonucu ya da kullanılmadan çevreye döndüğü bilinmektedir. Çevreye dökülen PAH kirliliğinin etkisi uzun ve kısa süreli olabilir. Uzun süreli etki henüz iyi

bilinmezken, kısa süreli etki oldukça iyi aydınlatılmıştır ve bu etki de kaplama veya havasız bırakma ve zehirlenme şeklindedir. Bunlardan kaplama veya havasız bırakma ışığın geçişini azaltma, çözülmüş oksijeni azaltma, deniz kuşlarına zarar verme ve havasız bırakma şeklinde zararlı olur. Ayrıca, PAH'ların toksik, mutajen ve kanserojen özelliklerinin de olduğu bilinmektedir (Baker, J.M. 1976, Wolfe, D.E. 1977). Çeşitli kaynaklardan doğaya verilen ve sonunda okyanus ve denizlere ulaşan PAH'ların bir kısmı, çeşitli olaylar sonucu zamanla gözden kaybolur. Bu, kirlenmenin sona erdiğini göstermez. Hidrofobik özelliklere sahip olan PAH'lar suda çözünmeyip sadece dağılır ve süspansiyon olmuş partikülleriyle suyu sararlar (Means vd 1980). Su ortamlarında çökmelerinin bir sonucu olarak göl, nehir, nehir ağzı ve okyanuslarda büyük PAH sedimentlerini oluştururlar. Deniz sedimentlerindeki PAH konsantrasyonları 100 ng/g'dan 100.000 ng/g sediment'e kadar değişebilir (Shiaris, M.P. ve Jambard-Sweet 1986). Sahil ekosistemlerinde yağların varlığının anlaşılması oldukça önemlidir. Bu ekosistemlerdeki yüksek PAH seviyeleri insan sağlığını bozar ve deniz ortamındaki kurulu dengeyi de tahrip eder. Deniz yüzeyine düşen PAH'ların yaklaşık %25'i bir gün içinde buharlaşır. Kalanının büyük bir kısmı emülsiyon haline dönüşür ve küçük tanecikler halinde suya karışır. Taneciklerin ağır metal ihtiva edenleri de dibe çökerek sedimentleri oluştururlar ve böylece, yeni bir problemin doğmasına sebep olurlar. Petrolün bir kısmı emülsiyon haline gelmeden fotolitik olarak, bir kısmı da mikroorganizmalar tarafından parçalanır. Denizlerdeki mikroorganizmalar kuvvetli PAH parçalayıcılardır. PAH'lar fotooksidasyon ve kimyasal oksidasyon yollarıyla parçalanırlar. Ancak, biyolojik transformasyon PAH'ların doğadan temizlenmesinde hakim duruma gelişmiştir. PAH'ların doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, çevrenin petrol ve diğer hidrokarbon kirliliklerinden eliminasyonunda primer mekanizmadır. Hem prokaryotik hem de ökaryotik biyolojik parçalama mekanizmaları, PAH halkalarına enzimatik tutunmanın başlaması için bimoleküler oksijenin varlığına ihtiyaç duyar (Gibson 1968). Bununla beraber, birçok bakteri ve fungus, düşük moleküler ağırlığa sahip PAH'ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler (Cerniglia 1981, Cerniglia 1984).

Bu çalışmada, subtropikal beyaz çürükçül funguslardan, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (1), *Pleurotus ostreatus* (2), *Ganoderma carnosum* ve *Trametes trogii*'nin glukoz içeren ortamlarda, farklı konsantrasyonlardaki (5-50 mg/L) fluoreni degrades edebilme yetenekleri araştırıldı. Fluoren'in biyodegradasyonu için en uygun

fungus türü belirlenip, bu bileşiğin biyolojik yıkım koşulları optimize edildi. Serbest ve immobilize hücreler ile sentetik atık sularda fluoren yıkımı incelendi.

1.1.1. PAH'lar ve Fluoren

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) yaygın çevre kirleticilerindedir. Doğal (Orman ve otların yanması) ve antropojenik kaynaklarda karbon ve hidrojen içeren organik materyallerin yanması sonucu oluşurlar (Menichini 1992). Motorlu taşıtların yaklaşık olarak yıllık toplam %36'lık miktar ile Amerika Birleşik Devletleri'ndeki atmosferik PAH'ların önemli bir kaynağını oluşturduğu düşünülmektedir (Benner vd 1989, Bjorseth vd 1985). Çeşitli çalışmalarda trafiğin şehir havasında PAH konsantrasyonları için önemli bir belirleyici olduğu tespit edilmiştir (Westerholm vd 1988, Pyysalo vd 1987, Henderson vd 1984). Yoğun trafiğin olduğu cadde tozlarındaki PAH içerikleri otomobil eksozlarından büyük oranda etkilenirken bunlara asfaltın katkısının küçük olduğu düşünülmektedir (Lee vd 1995, Castellano vd 2003).

Atmosferik PAH'ların gaz/partikül faz arasındaki dağılımları sıcaklık, havanın nemi, adsorpsiyon yüzeyinin özelliği, PAH'ın moleküler ağırlığı ve buhar basıncına bağlıdır (Masclat vd 1986). Benzinli araçların emisyonları küçük partiküllerin büyük bir kısmını, çoğunlukla kurşun tuzlarını içerir ki bunların adsorpsiyon özellikleri dizel yakıttan kaynaklanan partiküllerinden daha zayıftır (Westerholm vd 1988). Trafik kaynaklı dış havada toplam PAH'ların partikül fazındaki oranları % 28,3-67,3 arasında (ortalama %46) iken toplam PAH'ların ortalama olarak partikül fazındaki değerleri şehir ve kırsal kesim atmosferinde sırasıyla %18,7 ve %20,6'dır. Otomobil eksozlarından yeni yayılan küçük aerosoller yüksek karbon içeriğine ve daha çok PAH adsorplama özelliğine sahiptir. Taşınım süreci süresince PAH'lar partikül fazdan gaz faza geçerler ve sonuç olarak hem şehir hem de kırsal kesimde gaz faz konsantrasyonunun artışına sebep olur (Lee vd 1995).

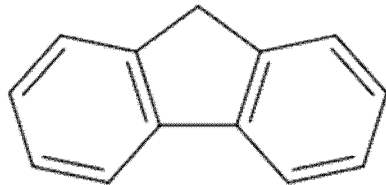
PAH'ların düşük seviyeleri ve ortam havasında bulunan diğer mutajeniklerin (zor bozunan organik bileşikler) solunumla çekilmesinden dolayı önemli sağlık etkileri ile akciğer kanserinin artmasının mümkün olacağı düşünülmektedir (Nielsen 1996).

Trafik kaynaklı emisyonların incelenmesinde zaman ve mesafe farkı şehir hava kalitesi üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Yoğun trafik yüküne sahip cadde boyunca oturan insanlar PAH'ların yüksek seviyelerine maruz kalmakta ve akciğer kanseri riski ile yüz yüze olmaktadır (Lee vd 1995).

Çoğu PAH'lar deney hayvanlarında tümör oluşturmuşlardır. BaP en çok çalışılan PAH'tır ve çeşitli yöntemlerle deneysel hayvanlara bu PAH'lar verildiği zaman kanserojen olduğu tespit edilmiştir (IARC 1983).

PAH'ların tehlike potansiyelleri kanserojenliğin indikatörü olan BaP ile belirlenebilir (Menichini 1999). Bu nedenle bazı Avrupa ülkeleri BaP'in yıllık ortalama değerini 0,7-1,3 ng/m³ olarak hedef belirlemişlerdir (Perez vd 1999). Kanserojenik PAH'ların ana kaynakları olarak fosil yakıtların motorlu taşıtlarda yakılması önceki çalışmalar tarafından da desteklenmektedir. Örneğin Harrison ve arkadaşları İngiltere'nin Birmingham kentinde toplanan hava örneklerinde BaP'in %88 oranıyla trafik emisyonlarından kaynaklandığını belirlemişlerdir(Harrison vd 1996) .

Difenil metan, 2,3-benzindin, o-bifenilmetan olarak da adlandırılan fluoren; C₁₃H₁₀ molekül formülüne sahip olup, erime noktası 116-117 °C olan beyaz kristallerden oluşmaktadır (Şekil 1.1). Fluoren boya, plastik ve pestisit endüstrisinde kullanılmaktadır.



Şekil 1.1 Fluoren'in Kimyasal Yapısı

1.1.1. Fluoren kaynakları

Fluoren; orman yangınları, volkanik püskürmeler, biyolojik materyallerin bozulması, mikroorganizmaların biyosentezi, insan aktiviteleri (yakıtların (petrol vb.), hidrokarbonların ve tütünün yanması) ve besinlerin dumanlanması sonucu oluşur.

Ham petrolün deniz canlılarına etkisi son zamanlarda yapılan çok sayıdaki araştırma ve bunları içeren yayınlara insanoğlu tarafından ortama bırakılan petrol hidrokarbonları deniz canlılarının besin zincirinde önemli etkiler yaratmaktadır. Canlılardaki bu kadar düşük yoğunlukların canlı yaşamına ne şekilde etki yaptıkları henüz kesinleşmemiştir.

Organizmanın fiziksel ve kimyasal, örneğin sıcaklık ve oksijen içeriği gibi faktörlere de bağlıdır. Bu nedenle yapılan laboratuvar deney sonuçlarının ortamdaki koşullara uygulama olanağı kısıtlanmaktadır. Petrol hidrokarbonlarının bir organizmanın metabolizması üzerine direkt etkinin yanı sıra ortamda bulunan diğer maddelerle karşılıklı ilişkisi de göz önünde tutulmalıdır. Örneğin bazı petrol organlarında yer alan kemoreseptörleri (kimyasal algılayıcıları) kapatarak organizmanın besin alma açısından yeteneksiz duruma geçmesine yol açmaktadır. Diğer taraftan balıklar ise kütle halindeki petrol yığılımından kaçarak temiz sulara göçmektedirler. Buna karşılık deniz dibinde yaşayanlar hareketsiz veya sınırlı hareket edebilen midye, istiridye, karides ve bazı dip balığı türleri, aşağı doğru çöken petrolden etkilenerek kütle halinde ölmektedirler. Bilinen ve şüphelenilen kanser yapıcı polisiklik aromatik hidrokarbonların ham ve rafine petroldeki konsantrasyonları için yeterli bilgi yoktur.

1.1.2. Fluoren'in toksisitesi

Kimyasal maddelerin kanser yapıcı özelliklerinin herkes tarafından bilinmesi günümüzde bir zorunluluktur. Kimyasal karsinojenler, doğrudan etkiyenler (etkin karsinojenler) ve etkinleştirilmesi gerekenler olmak üzere iki grupta toplanır. Doğrudan etkiyenler elektrofillerdir ve proteinler, nükleik asitler gibi nükleofilik moleküllere etkiler. İkinci grupta bulunan karsinojenler, (karaciğer enzimleri gibi) elektrofillere dönüştürülür. Bütün elektrofiller de aynı etkinlikte kanser yapıcı değildir. Elektrofilde, atomların uzayda dizilişleri, hücre yapısına uymasında ve çözünürlüğü, hücre zarından geçmesinde önemlidir; reaktifliği ise hücre suyu yerine hücreyle reaksiyona girmesini sağlar. Bir karsinojen etkisi tersinmez olduğundan, tek bir doz, kansere yakalanmak için yeteceği gibi zararsız dozda, fakat uzun süre karsinojen etkisinde kalma da vücut tarafından karşılanamaz. Dolayısıyla karsinojenler için bir güvence sınırı yoktur. Kanser için daha iyi iyileştirme yöntemleri bulunmadığı sürece karsinojenlerle en az temas etmeye dikkat etmek mecburiyetindeyiz. Kanserojen etkisi saptanmış olan karsinojen polisiklik arenler başta fluoren olmak üzere, benzen, antrasen, fenantren, naftasen, piren, perilen, koronen, benzantrasen, dibenzantrasen, benzfluoroanten, benzopiren, dibenzopiren olarak belirlenmiştir. Yapı olarak küçük olup, 3 halka içeren fluorenin karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilip oluşan metaboliti, DNA' ya bağlanarak karsinojenik ve mutajenik etki göstermektedir.

Bu bileşik; deri, göz ve solunum sistemine zarar vermektedir. Ayrıca, hayvanlarla yapılan laboratuvar çalışmalarında fluoren'in mutajenik özellikler gösterdiği

kanıtlanmıştır. Literatürde *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces spp.*, *Trametes versicolor*, *Trametes cingulata* ile fluoren'in biyolojik yıkımına ilişkin çalışmalar mevcut olup, dikkate değer derecede başarılı bir yıkım gerçekleştirilememiştir (Chang vd 2002).

1.1.3. Fluoren giderim yöntemleri

1.1.3.1. Fiziksel / Kimyasal yöntemler

Fiziksel adsorpsiyonla Fluoren uzaklaştırılabilmektedir. Granül veya toz halde bulunabilen aktif karbon yüzeyinde adsorpsiyonla uzaklaştırma işlemi, endüstriyel atık suların işlenmesi ve PAH'larla kontamine olmuş içme suyu uygulamaları için kullanılmaktadır. Aktif karbon; gözenekli oluşu, yüzey alanının yapısı ve kimyası nedeniyle atık arıtımda kullanılabilir ideal taşıyıcılardan biridir. Van der Waals, H bağları, yük-yük etkileşimi, iyon değişimi, kation köprüleri ve su köprüleri gibi birçok fizikokimyasal mekanizmalar/güçler organik bileşiklerin aktif karbon üzerinde tutunmasından sorumlu olabilmektedir (Aksu ve Kabasakal, 2005). Tipik çevresel koşullar altında kimyasal ve/veya fotokimyasal prosesler PAH'ların çoğunu yıkıma uğratamaz. Zira kimyasalların yıkımı için çeşitli kimyasal işlemler önerilmekte ve pestisit/herbisit yıkımı için kullanılmaktadır (Kundu vd. 2005).

1.1.3.2. Biyolojik yöntemler

Fluoren'in yıkımında bakteri, fungus, böcek, solucan ve diğer organizmalar rol oynamaktadır. Günümüzde bakteri ve funguslarla ilgili olarak çalışmalar yapılmakla birlikte, beyaz çürükçül funguslardaki ekstraselüler lignolitik enzimlerin varlığı biyodegradasyon çalışmalarını funguslar üzerinde yoğunlaştırmıştır.

Bakteriyel Yıkım: 2006 yılında Luan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fluoren, fenantren ve pirenin tropikal bölgedeki bataklık sedimentinden izole edilen bakteri karışımı ile biyodegradasyonu sonucunda oluşan yıkım ürünleri SPME-GC-MS ile analiz edilmiş ve yıkım ürünleri tespit edilmiştir (Luan vd 2006).

Rodrigo ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 14 yıllık petrokimya endüstri bölgesinden izole edilen *Pseudomonas sp.* ile antrasenin bakteriyel biyodegrade edilebilirliğini 48 gün süre ile takip ederek araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda; *Pseudomonas aeruginosa* 312A % 71, *Pseudomonas aeruginosa*

332C %51 ve *Pseudomanas aeruginosa* 222A % 24,4 yıkıma uğratmıştır (Rodrigo vd 2005).

2005 yılında yapılan başka bir çalışmada tropikal bölgedeki bataklık sedimentinden izole edilen bakteri karışımının, fluoren, fenantren ve pirenenden oluşan PAH karışımını degrede edilebilirliği araştırılmış. Çalışma dört haftada *Rhodococcus sp*, *Acinetobacter sp*. ve *Pseudomanas sp*. içeren bakteriyel karışım ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle PAH karışımı sedimente adsorbe edilmiş daha sonra yıkımları incelenmiş olup, fluoren ve fenantren % 99, piren % 30 degrede edilebilmiştir (Yu vd 2005).

Hong Kong'da 7 bölgeden toplanan bataklık yüzey sedimentlerinde PAH kirliliği tespit edilmiş, bunlardan fenantren, fluorantren ve pirenin; *Rhodococcus(HCCS)*, *Sphingomonas (MWF6)* ve *Paracoccus (SPNT)* içeren bakteri karışımı yardımı ile biyodegrede edilebilirlikleri araştırılmış, fenantren ve fluorantren % 90 oranında 7 gün içinde degrede edilebilmiştir (Guo vd 2005).

Hwang ve Cutright 2002 yılında fenantren ve pirenin temiz bir toprak üzerine muameleleri sonrası, bu maddeleri degrede eden bakteri karışımı ile yıkımlarını 32 günlük periyod içinde incelemişlerdir. Piren % 72 ve fenantren % 95 yıkıma uğratılmıştır (Hwang ve Cutright 2002).

2000 yılında yapılan bir diğer çalışmada, karışık kültürlerle, 5 mg/L konsantrasyonlarındaki 5 farklı PAH'ın biyodegradasyonu araştırılmış, bunlardan fenantren 28 saat içinde tamamen degrede olmuştur. Pirüvat, glukoz, asetat ve maya özütü ilavesi ile fenantren yıkımı artmıştır. Bakteri karışımı, piren ve asenafteni de degrede edebilmiş fakat anrasen ve fluoren yıkımında başarısız olmuştur. Brij 30, brij 35 ve triton x 100 ile fenantren yıkımı inhibe edilmiştir.

Fungal Yıkım: Valentin ve arkadaşları, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* ve *Lentinus tigrinus* beyaz çürükçül fungusları kullanılarak tuzlu ve tuzsuz şartlarda fenantren, fluorantren, piren ve krisen PAH'larını degrede edebilirlikleri 30 gün boyunca araştırılmış, % 3,2 tuzluluk seviyesinde, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* ve *lentinus tigrinus*'un inhibe olduğu tespit edilmiştir. Tuzlu toprakta; fenantren % 48, fluorantren % 51, piren % 51 ve krisen % 49; tuzsuz toprakta; fenantren % 44, fluorantren % 50, piren % 76 ve krisen % 30 yıkıma uğratılmıştır (Valentin vd 2006).

2005 yılında yapılan bir çalışmada; *Irpex lacteus*'un içerdiği ekstraselüler lignolitik enzimlerden olan Mangan peroksidaz enzimi saflaştırılmış; fenantren, antrasen fluorantren ve pireni yıkımı sonucu geri kazanım değerleri belirlenmiştir. Bulunan sonuçlar, fenantren için % 56, antrasen için % 0, fluorantren için % 58,1 ve piren için % 8,3 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda antrasenin biyodegradasyonu % 100 olarak gerçekleştirilmiştir (Baborová vd 2006).

Beyaz çürükçül fungusların PAH yıkımı ile ilgili Tekere ve arkadaşları *Trametes versicolor*, *Trametes pocas*, *Trametes cingulata*, *DSPM95 izolatu* ve *Phanerochaete chrysosporium*'un 20 mg/L fluoren, fenantren, antrasen, piren ve benzo(a) antraseni içeren PAH karışımının 31 gün içinde degrede edilebilirliklerini incelenmiş; fluoren % 60, fenantren % 40, antrasen % 42, piren % 15,2 ve benzo(a) antrasen % 15,8 yıkıma uğratılmıştır (Tekere vd 2005).

Verdin ve arkadaşları topraktan izole edilen ve lakkaz, MnP ve lignin peroksidaz gibi ekstraselüler enzimleri içeren, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani* ve *Fusarium oxysporum*'un benzo(a) pireni yıkımı araştırılmış, yıkım sırasında bu enzimlerdeki aktivite değişimleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda; benzo(a) pireni, *Trichoderma viride* % 58, *Fusarium solani* % 50 ve *Fusarium oxysporum* % 30 degrede edebilmiştir (Verdin vd 2004).

1996 yılında Bezalel ve arkadaşlarının yaptı bir çalışmada; *Pleurotus ostreatus* beyaz çürükçül fungusunun fenantren yıkım metabolizması araştırılmıştır. Fenantrenin yaklaşık % 52 oranında metabolize edildiği ve metabolitlerin *trans*-9,10-dihidroksi-9,10 dihidroksifenantren (fenantren *trans*-9,10-dihidrodiol) (28%), 2,2-difenik acid (17%) olduğu GC-MS ile tespit edilmiş olup % 7'lik ürün tanımlanamamıştır (Bezalel vd 1996).

1.2. Beyaz Çürükçül Funguslar (BÇF)

1.2.1. BÇF lerin biyoyıkımlardaki rolleri

Beyaz çürükçül funguslar kirletici birçok bileşiğin yıkımında bazı avantajlar sağlamaktadır. Beyaz çürükçül funguslardan sentezlenen lignolitik enzimlerin çeşitli kirleticilerin CO₂'e kadar yıkımında rol oynadığı saptanmıştır. Bakterilerde hücre içine alınarak yıkılan bileşikler, funguslarda hücre dışına sentezlenen enzimlerle yıkıldığı

rapor edilmiştir. Beyaz çürükçül funguslarla kirleticilerin gideriminde ön işleme gerek olmadığı ve kirleticilerin derişiminden çok, ortamın besin (karbon, azot) açısından sınırlandırılmasının önemli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre dışı enzim sisteminin yüksek derişimdeki kirleticileri tolere edebildiği saptanmıştır (Kapdan vd 2000).

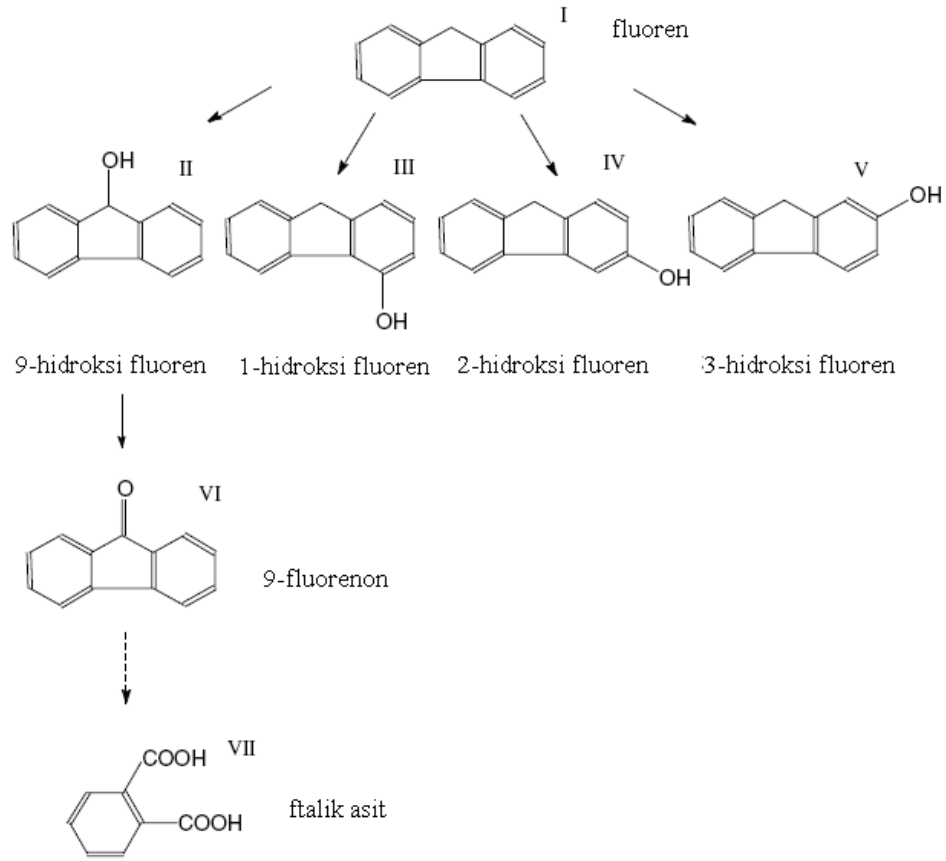
Beyaz çürükçül funguslar; çok çeşitli ekstraselüler proteinler, organik asitler ve diğer metabolitlerin üretimi yanında farklı çevresel koşullara kendilerini üstün bir şekilde adapte edebilme yeteneğine sahiplerdir. Üretilen çeşitli metabolitlerin yanında fungusların, metal, inorganik veya organik içeriğe sahip atık suların arıtımında kullanımı giderek artmaktadır (Coulibaly vd 2003; Haritash ve Kaushik 2009). Çevreye bulaşmış PAH'lar primer olarak bakteri ve funguslar tarafından parçalanırlar (Cerniglia 1981, Cerniglia 1984). Mikroorganizmalar, hidrokarbonları yalnız başlarına, sadece sınırlı oranlarda metabolize ederler. Bu nedenle toprak, su ve deniz ortamlarında kompleks hidrokarbonları parçalayabilmek için geniş enzimatik kapasitelerinden dolayı karışık kültürlerle ihtiyaç duyulur. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, (Floodgate 1984), denizde 25 hidrokarbon-parçalayan bakteri ve 27 fungus cinsini listelemiştir. Yapılan benzer bir derlemede de toprak izolatlarının 22'sinin bakteriyal, 31'inin fungal cinslere dahi olduğu belirlenmiştir (Bossert ve Bartha 1984). Yayınlanmış çalışmalardan hareketle, hem toprak hem de deniz ortamlarında en önemli hidrokarbon-parçalayan bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* ve *korineformlar* oldukları tespit edilmiştir. Chesapeake Körfez'i suyu ve sedimentinden alınan örneklerdeki petrol parçalayan bakterilerin nümerik sınıflandırılmasında *Pseudomona*, *Micrococcus* ve *Nocardia* *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri, aktinomisetler ve korineformların fazla miktarda oldukları bulunmuştur (Austin vd 1977). Funguslar arasında *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces spp.* genel deniz izolatları ve *Trichoderma* ve *Mortierella spp.* de genel toprak izolatlarıdır. Hidrokarbon-parçalayan *Aspergillus* ve *Penicillium spp.* her iki ortamdan da sıkça izole edilmiştir. Kirk ve Gordon'un çalışmalarına dayanarak, kumsal-adapta cinsler olarak *Corollospora*, *Dentryphiella*, *Lulworthia* ve *Varicosporina* da listeye ilave edilmiştir. Bakterilerin, deniz ortamında mikrobiyal toplulukların predominant hidrokarbon parçalama özelliği gösteren elementleri oldukları düşünülmektedir. Diğer yandan, sahile yakın bölgelerde, gel-git olayı sahalarında, tuz bataklıkları ve tropik kıyılarda fungusların da sayılarında artış olduğu belirlenmiş ve bu fungusların da mikrofloranın bir bileşeni oldukları gösterilmiştir (Floodgate 1984, Kirk ve Gordon 1988).

Evsel atıklar ve petrol atıklarının fungal biyokütle tarafından uzaklaştırılabilecek karbon ve besin kaynaklarına sahiptir (Coulibaly vd 2003). *Aspergillus niger* ile yapılan bir çalışmada fungal biyokütlenin toplam proteini % 65 azalttığı bulunmuştur. Azot ve karbon kaynaklarının kültür ortamına eklenmesi ve biyokütle kalitesinin arttırılması gibi optimizasyon çalışmaları ile arıtım kapasitesinde artışların olduğu gözlenmiştir (Coulibaly vd 2003).

1.2.2. BCF ile fluoren yıkımı

Fluorenin bakteriyal yıkımı üzerine literatürde birçok yayın bulunmakla birlikte, fungal yıkımına ilişkin yıkım ve metabolizmasının aydınlatılmasına ilişkin çok az çalışma mevcuttur. Beyaz çürükçül fungusların PAH yıkımı ile ilgili Tekere ve arkadaşları *Trametes versicolor*, *Trametes pocas*, *Trametes cingulata*, *DSPM95 izolatu* ve *Phanerochaete chrysosporium*'u içeren organizma karışımının, 20 mg/L fluoreni 31 gün içinde degrede edilebilirliği incelenmiş; fluorenin % 60 yıkıma uğratıldığı tespit edilmiştir (Tekere vd 2005).

Luan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yıkım sonucu oluşan muhtemel ürünler Şekil 1.2'de verilmiştir (Luan vd 2006). Bu gün fluoren'i ve kendisinin de içinde bulunduğu, polisiklik aromatik hidrokarbonları iyi derecede yıkıma uğratan fungus türü ile karşılaşılmalıdır. Bu da bu toksik ve mutajen bileşiğin çevreden temizlenmesine ilişkin yeni organizma arayışlarına yönlendirmiştir.



Şekil 1.2 Fluoren'in fungal yıkım metabolizması (Luan vd 2006)

1.2.3. *Pleurotus ostreatus* ve PAH yıkımı

Egen ve Majcherczykb tarafından PAH kirliliği içeren toprağın *Pleurotus ostreatus* beyaz çürükçül fungusu tarafından iyileştirilmesi çalışılmıştır. İlk bir ay içinde topraktaki benzo(a)pirenin % 40'ı, üç ay sonunda da % 49'u yıkıma uğratılmıştır. Çalışma sırasında benzo(a)piren radyoaktif olarak ^{14}C ile işaretlenmiştir (Eggen ve Majcherczykb 1997).

2006 yılında yapılan bir diğer çalışmada *P. ostreatus* D1 lakaz enzimi kullanılarak, polisiklik aromatik hidrocarbonların ve onların türevlerinin yıkımları incelenmiştir. Çalışma sırasında antrasen % 91, piren % 40, fluoren % 95, flurantren % 47, fenantren % 82 ve perlen % 100 yıkılmıştır. UV 100 detector içeren (Thermo Separation Products, USA) HPLC kullanılarak PAH'lar izlenmiştir (Pozdnyakova vd 2006).

Günümüzde halen polisiklik aromatik hidrokarbonları daha iyi derecede yıkıma uğratan organizma arayışı ve bunların yıkım ürünlerinin tanımlanmasına ilişkin çalışmalar sürmektedir.

1.2.4. Endüstriyel atıksuların arıtımında kullanılan fungal kaynaklı enzimler

İyileştirme işlemlerinin büyük bir kısmı fizikokimyasal veya biyolojik işlemler olarak karakterize edilirler. Enzimatik iyileştirme; bu iki geleneksel kategorinin arasında yer almaktadır. Çünkü biyolojik katalizörlerin etkisi nedeni ile kimyasal işlemleri de içermektedir.

Enzimatik iyileştirmenin geleneksel iyileştirme sistemlerine göre avantajları:

- Biyolojik parçalanmaya dirençli bileşiklere uygulanabilmesi,
- Yüksek ve düşük kirletici derişimlerin de çalışabilmesi,
- Geniş bir pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarında çalışabilmesi,
- Mikroorganizmalar için adaptasyon süresi gerekirken enzimler için gerekmemesi,
- Çamur hacminde azalma olması (biyokütle üretimi yok),
- Proses kontrolünün kolay ve basit olması (Karam ve Nicell 1997).

Beyaz çürükçül funguslar; odunun lignin, selüloz ve hemiselüloz dahil bütün bileşenlerini parçalayabilir (Johannes ve Majcherczyk 2000). Beyaz çürükçül fungusların ligninolitik enzimleri çevre biyoteknolojisinde birçok araştırma konusu olarak kullanılmaktadır. Funguslardan elde edilen ligninolitik enzimler fenolik bileşiklerin, klorlu fenolik bileşiklerin, poliaromatik hidrokarbonların, nişastalı atıkların, proteinli atıkların, yağ miktarı yüksek atıkların, pestisitlerin, kağıt atıklarındaki klorun ve rengin, ağır metal kirliliğinin, yüzey kirletici maddelerin, aromatik aminlerin gideriminde, siyanür hidrolizinde ve toprak dekontaminasyonunda ve boyar maddelerin rengin gideriminde kullanılmaktadır (Olika vd 1993; Kim ve Shoda 1999; Abadulla vd 2000).

1.2.4.1. Polifenol oksidazlar

Polifenol oksidazlar, oksidoredüktazların diğer bir ailesini oluşturmaktadırlar ve fenolik bileşiklerin oksidasyon reaksiyonlarını katalizledikleri saptanmıştır (Krastanov 2000). Bu enzimler Tirosinazlar ve Lakkazlar olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmışlardır. Her iki enzim sınıfı da aktivite için moleküler oksijene ihtiyaç duyarken koenzime ihtiyaçları yoktur. Polifenol oksidaz enzimleri uygulamalarda ayrı veya birlikte kullanılmaktadır. Çevreye toksik etki yaratan zeytinyağı fabrikalarının atıklarında bulunan fenol bileşiklerinin gideriminde beyaz çürükçül funguslardan elde edilen fenol oksidaz enzimler kullanılmaktadır (Karam ve Nicell 1997).

1.2.4.2. Lakkaz

Lakkaz (E.C. 1.10.3.2) birçok fungus tarafından üretilmektedir. Lakkaz enziminin optimum çalıştığı pH aralığı 3-7,5 sıcaklık aralığı ise 40-80 °C arasında değişiklik göstermektedir. Maksimum enzim aktivitesinin sağlayacağı fiziksel koşullar ise enzimin üretildiği fungus türüne göre değişmektedir. Lakkaz enziminin optimum çalışma pH'ı kullanılan substrata göre de değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Call ve Mücke 1997). Lakkazın katalizlediği reaksiyonlar mediatörlü veya mediatörsüz gerçekleştiği rapor edilmiştir. Mediatörler, difüze olabilen, lignin oksitleyici kosubstratlar olarak tanımlanır. Bilimsel çalışmalarda en sık kullanılan mediatör 2,2'-azinobis-(3)-etilbenzotiazolin-6-sülfat (ABTS)'dir (Breen ve Singleton 1999). Lakkaz fenolik bileşikler oldukça reaktif anyonik serbest radikallere okside etmektedir. Ancak araştırmacılar reaksiyon ürünlerinin neler olduğunu tespit edememişlerdir. Lakkaz gibi enzimlerin kirlenmiş toprağa verilmesi ile ksenobiyotiklerin humusa bağlanmasının sağlanacağı belirtilmiştir. *Trametes versicolor*, *Rhizoctonia praticola* ve diğer fungusların lakkaz enzimleri kullanılarak çeşitli klorlu fenollerin ve aromatik aminlerin fenolik hümitik yapıtaşlarına oksitlenerek bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bu proses tehlikeli bileşiklerin detoksifiye olmasına imkan sağlamaktadır (Karam ve Nicell 1997). Pickard ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada beyaz çürükçül fungus *Coriolopsis gallica*'dan elde edilen lakkaz enziminin, 6 farklı poli aromatik hidrokarbon (PAH) bileşimini (Benzo[a]pirene, 9-metilantresen, antresen, bifenilin, asenaftien ve pentatren) oksitlendiği rapor edilmiştir (Pickard vd 1999).

1.2.4.3. Tirozinaz

Tirozinaz (E.C. 1.14.18.1) polifenol oksidaz ve fenolaz olarak da bilinmektedir. Birbirini izleyen iki reaksiyonu katalizlemektedirler;

- o-difenollerin oluşması ile sonuçlanan monofenollerin moleküler oksijene hidroksilasyonu,
- o-difenollerin oksijenle dehidrasyona uğraması ile o-kinonların oluşması.

Kinonlar daha çok kararsız haldedirler ve enzimatik olmayan polimerizasyonla su da çözünmeyen maddeler oluştururlar ve basit filtrasyonla kolaylıkla uzaklaştırılmaktadır. Tutuklanmış halde kullanılan tirozinaz ile 2 saatte % 100 fenol giderimi sağlanmıştır. Tirozinaz enzimini tutuklanmış şekilde kullanmanın avantajı; tirozinaz enzimlerini tekrar kullanabilmek ve reaksiyon sonucu oluşan kinonların inaktivasyon etkisinden korumaktır (Karam ve Nicell 1997).

1.2.4.4. Peroksidazlar

Peroksidazlar birçok mikroorganizma ve bitki tarafından üretilen oksidoredüktazlardır. Birçok reaksiyonu katalizlemektedirler. Fakat bunların aktifleşmeleri için H_2O_2 (Hidrojen peroksit) gerekmektedir (Duran ve Esposito 2000). Sudaki aromatik kirleticilerin laboratuvar ölçeğinde gideriminde Horseradish peroksidaz (At turpu peroksidazı, HrP), Lignin peroksidaz (LiP) ve farklı kaynaklardan elde edilen diğer peroksidazlar kullanılmaktadır (Karam ve Nicell 1997).

1.2.4.5. Horseradish Peroksidaz

Horseradish peroksidaz (HrP, E.C. 1.11.1.7) enzimatik atık iyileştirme, alanında çok çalışılan yeni bir alandır. H_2O_2 ile aktifleşen enzim, fenol, bifenol, anilin, benzidin ve ilgili hetero aromatik bileşikleri içeren toksik aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilmektedir (Zhang ve Nicell 2000). Reaksiyon ürünleri, enzimatik olmayan işlemlerle polimerleşerek suda çözünmeyen çökeleklerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu çökeleklerde atık sudan kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. HrP özellikle atık su iyileştirilmesinde çok uygundur, çünkü bu enzim geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivitesini korumaktadır. Uygulamaların büyük bir kısmı fenolik kirleticilerin iyileştirilmesi üzerine odaklanmıştır. HrP kullanılarak anilin, hidroksiquinolin, benzidin ve naftalin amin gibi aril amin karsinojenlerini içeren kirleticilerin iyileştirilmesi laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca HrP'in uzaklaştırılması zor kirleticileri ve kolaylıkla uzaklaştırılabilen polimerik bileşikleri ön çökeltme yeteneği vardır. Bu kirleticiler HrP'in substratı olmasa da HrP kolaylıkla uzaklaştırılabilen bileşiklerle karışık polimer oluşumunu indükleyerek kolaylıkla uzaklaştırılabilen bileşiklerin polimerik ürünleri gibi bileşikleri meydana getirmektedir. Bu düşünce atık sular için önemli pratik bir uygulamadır, çünkü atık sular genellikle farklı kirleticiler içermektedir. Bu prensip tehlikeli atıklara uygulanmıştır (Karam ve Nicell 1997).

1.2.4.6. Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz (LiP, E.C. 1.11.1.14) ligninaz veya diarilpropen oksijenaz olarak bilinmektedir. İlk olarak 1983 yılında rapor edilmiştir. LiP'in aromatik bileşiklerin büyük bir kısmını mineralize, polisiklik aromatik ve fenolik bileşiklerin bir kısmını okside edebildiği gösterilebilmiştir. Ligninin depolimerizasyonunda LiP'in bir rolü olduğu saptanmıştır. LiP'in etki mekanizması HrP'nin etki mekanizmasına

benzemektedir. LiP'in kararlılığı atık iyileştirilmesinde enzim uygulamalarının ekonomik ve teknik uygunluğunu etkilemektedir. Düşük pH'da LiP kolaylıkla inaktif hale gelmektedir. Enzimin kararlılığı; pH'ın yükseltilmesi, enzim derişiminin yükseltilmesi veya enzimin substratı veriatil alkolle birlikte inkübe edilmesi ile sağlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için gerekli optimum koşullar yüksek enzim derişimi, pH'ın 3'ün üzerinde olması ve H₂O₂'in kontrollü olarak eklenmesidir. Gözenekli yapıdaki seramik desteklere LiP'in immobilizasyonu LiP'in kararlılığını iyi bir şekilde etkilediği ve çevrede kalıcı olan aromatiklerin parçalanmasında iyi bir potansiyel oluşturduğu gösterilmiştir (Karam ve Nicell 1997).

1.2.4.7. Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz (MnP E.C.1.11.1.13) hidrojen peroksida ve mangana bağımlı olarak çalışan bir enzim sistemidir (Bren ve Singleton 1999). Zeytinyağı atık suyunun renginin giderilmesinde, *Phanerochaete flavidoalba* fungusundan saflaştırılarak elde edilen, lignin yıkımından sorumlu olan enzimler kullanılmıştır. Kullanılan enzimler arasında renk gideriminde baskın olan enzimin mangan peroksidaz enzimi olduğu rapor edilmiştir (Perez vd 1998).

1.3. Serbest Hücreler ile Fluoren Yıkımı

Serbest hücrelerle fluorenin giderimine ilişkin yayın sayısı her geçen gün artmaktadır. Beyaz çürükçül funguslar; çok çeşitli ekstraselüler proteinler, organik asitler ve diğer bileşenlerinin yanısıra farklı çevresel koşullara adapte edebilme yeteneğine sahiplerdir. Üretikleri farklı bileşenlerin yanında fungusların, metal, inorganik veya organik içeriğe sahip atık suların arıtımında kullanımı giderek artmaktadır (Coulibaly vd 2003; Haritash vd 2009)). Çevreye bulaşmış PAH'lar primer olarak bakteri ve funguslar tarafından parçalanırlar Başlangıçta serbest fungal izolatlarla yaygın bir şekilde çalışılırken, serbest hücrelerin ölümlerinin hızlı oluşu ve ekstraselüler enzim aktivitelerinin zamanla azalışı çalışmaları immobilize hücrelerle çalışma yoluna itmiştir. Örneğin, Tekere ve arkadaşları Serbest *Trametes versicolor*, *Trametes pocas*, *Trametes cingulata*, *DSPM95 izolatu* ve *Phanerochaete chrysosporium* ile 20 mg/L fluoreni, 31 gün içinde degrede edilebilme yetenekleri incelenmiş fluoren % 60 oranında yıkıma uğratılmıştır (Tekere vd 2005).

1.4. İmmobilize Hücreler ile Fluoren Yıkımı

İmmobilizasyon terimi, bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eder. Biyokatalizör ister tek bir enzim olsun isterse enzim karışımı veya canlı hücre olsun, taşıyıcı materyal üzerinde veya içinde tutuklanmıştır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. Son otuz yıldan beri de hücrelerin immobilizasyonu teorik ve pratik olarak önem kazanmıştır. İmmobilize hücrelerin endüstriyel alanlarda toksik ürünlerin biyodegradasyonunda kullanımı ile günümüzde çok ilgi çekmektedir. Bu durum; hücre immobilizasyonunun fermentasyon üretkenliğini arttırması, sürekli işlemlerde uygulanabiliyor olması, hücre kararlılığı, geri kazanımın kolay olması ve tekrar kullanılabilirliği gibi çeşitli avantajlara sahip olmasından kaynaklanır. Hücre immobilizasyonu aynı zamanda kayma hareketlerine karşı hücreleri korur. Kayma hareketleri, farklı tabakalardaki sıvıların hızlarındaki farklılıktan ileri gelen deformasyondur. İmmobilize hücrelerin endüstride kullanımı halen sınırlıdır ve gelecekteki uygulamalar immobilizasyon prosedürünün geliştirilmesine bağlıdır (Kourkoutas vd 2004).

Raghukumar ve arkadaşları 2004 yılında yayınladıkları bir çalışmada, bataklık bölgeden izole edilen beyaz çürükçül funguslardan *Flavodon flavus*'u polyurethane foam taşıyıcı üzerine immobilize edip, immobilize hücre ile polisiklik aromatik hidrokarbon ailesi üyelerinden olan benzo(a) pyrene'i beş gün içinde %68 biyodegradasyona uğrattığını tespit etmişlerdir (Raghukumar vd 2004).

İmmobilizasyonla ilgili bir diğer çalışmada, en iyi lakkaz üretimi amacıyla, *Trametes hirsuta*'nın için aljinat boncukları, poli üretan köpük, naylon sünger ve paslanmaz çelik sünger üzerlerine immobilizasyonu test edilmiştir. İnkübasyonun sekizinci gününden sonra paslanmaz çelik sünger üzerine immobilize olmuş, *Trametes hirsuta*'nın en yüksek lakkaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Couto vd 2004).

Wu ve Yu 2007 yılında *Phanerochaete chrysosporium*'un farklı taşıyıcı matriksler (Ca-aljinat, Ca-aljinat polivinil alkol ve Pektin) üzerine immobilizasyonunu araştırıp, Pektin'in çok düşük mekanik dayanıklığa sahip olmasına karşın, Ca-aljinat'ın oldukça yüksek mekanik dayanıklığa sahip olduğu bulunmuştur (Wu ve Yu 2007). İmmobilize beyaz çürükçül funguslar ile PAH'ların yıkımına ilişkin literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

1.4.1.1. Tutuklama (İmmobilizasyon)

Katalizör özelliği taşıyan aktif enzimlerin ve mikroorganizmaların, özelliklerini geliştirme ve endüstride kullanabilme olanaklarını artırmak amacıyla inorganik ya da organik taşıyıcılarda çeşitli yöntemlerle hapsedilmesi ve bağlanması işlemine tutuklama (immobilizasyon) denir.

1.4.1.2. Tutuklama yöntemleri

Tutuklama yöntemleri beş grupta incelenir.

- Yüzeğe tutunma
- Kovalent bağlama
- Çapraz bağlama
- Mikrokapsülleme
- İnert bir desteğe tutuklama

1.4.1.3. Yüzeğe tutunma

Destek maddesi olarak sentetik veya biyolojik kökenli organik maddeler kullanılır. Bağlanma zayıf ve birim hacimdeki katalitik kapasite ile sınırlıdır. Fakat biyokatalizleyici hazırlamadaki kolaylık ve zehirleyici kimyasal maddelerin olmaması yöntemin avantajlı yönleridir. Yüzeğe tutunmayı etkileyen başlıca faktörler; tutucu özellikleri, mikroorganizmanın özellikleri, çevre özellikleridir.

1.4.1.4. Kovalent bağlama

Hücreler ile destek maddeleri arasında tersinmez kovalent bağ oluşur. Daha çok enzimlerin tutuklanmasında kullanılan bir yöntemdir. Kovalent bağlar, adsorbsiyon kuvvetlerinden daha güçlü ve daha karardır. Hücre yüzeyindeki karboksil gruplarını aktifleştirmek için ortama karboimit gibi bazı kimyasal maddeler eklenir. Bu reaktif grup içeren maddeler zehirli maddedir ve enzim aktivitesinin azalmasına neden olur.

1.4.1.5. Çapraz bağlama

Bağlanma tepkimesi tersinmezdir. Fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki tür çapraz bağlama vardır. Kimyasal çapraz bağlamada hücreler birbirine aldehit ve amin gibi çok fonksiyonlu maddeler ile bağlanırlar. Bu maddelerin zehirli olmaları yöntemin kararlılığını sınırlar. Fiziksel çapraz bağlama ise çöktürme ve küçük boyutlarda tabakalaşma ile yapılır.

1.4.1.6. Mikrokapsülleme

Bu yöntemde hücreler yarı geçirgen bir zardan oluşan mikrokapsüller içine tutuklanır. Sistemin temeli zarın seçiciliğine dayanır. Zarın gözenek çapından büyük olan hücre molekülleri zar dışına yayılamazlar. Bu yöntem ancak küçük molekül ağırlıklı ürün eldesinde kullanılabilir. Mikrokapsüller genellikle küreseldir.

1.4.1.7. İnert bir desteğe tutuklama (immobilizasyon)

En çok kullanılan tutuklama yöntemlerinden biridir. Hücreler bir jel içine çeşitli yöntemlerle hapsedilirler Poliakrilamid, metal hidroksitler, agar, kollajen, aljinat, karregen gibi maddeler ile jel oluşturulur. Jel oluşumu iyonik yük değişimi, çöktürme, kovalent veya çapraz bağlama ile sağlanır.

Eşit miktarda tutuklanmış ve serbest mikroorganizmanın aktiviteleri karşılaştırıldığında, hücre aktivitesinin serbest hücreden daha büyük veya daha küçük olabileceği görülmüştür. Aktivite azalmasının nedeni; tutuklamada kullanılan bazı maddelerin zehir etkisi ve heterojen sistemlerdeki difizyon kısıtlamalarıdır. Aktivite artışının nedeni ise; tek enzim içeren sistemlerde geçirgenliğin artışı, çok enzim içeren sistemlerde ise protein sentezi veya hücre büyümesidir. Bazı araştırmacılar ise aktivitenin ısı muamelesi, özel iyonlar, yüzey aktif maddeler ve bazı organik çözücüler ile artırılabilirliğini tespit etmiştir. Bu artış hücre duvarlarının kısmen veya tamamen kırılmasıyla açıklanabilir. Tutuklama sonrası yarı ömrün 10-20 kat artması mümkündür. Tutuklandıktan sonra hücrelerin canlılıklarını korudukları da saptanmıştır. Tutuklanmış *E.coli* hücrelerinin oksijen kullanımı ve agarlı besi yerinde üremesi, canlılığını kanıtlayan bulgulardır. Deaktive olmuş tutuklanmış hücrelerin zengin besi ortamında bekletilmekle tekrar aktifleştikleri gözlenmiştir. Tutuklanıp depo edilmiş hücrelerinde tutuklandıktan sonra bozulmadıkları elektron mikroskobu ile yapılan araştırmalar sonucu bulunmuştur (Telefoncu 1997; Arica vd. 2003).

1.4.2. İmmobilize Hücrelerin Serbest Hücre Sistemlerine Avantajları

İmmobilize hücre sistemlerinin, serbest hücrelere göre bazı avantajları vardır (Kourkoutas vd 2004). Bunlar;

- Biyokatalizörün (enzim) aktivitesinin ve stabilitesinin artması. İmmobilizasyon için kullanılan desteğin pH, sıcaklık, çözücü veya ağır metallerin fizikokimyasal etkilerine karşı koruyucu etki göstermesi,
- Birim biyoreaktör hacmi başına düşen yüksek hücre yoğunluğu sonucu yüksek hacimsel üretkenlik ve fermentasyon süresi,
- Artan substrat alımı ve verim yükselmesi,
- Sürekli işlemlere uygunluk,
- Yüksek substrat derişimlerine karşı artan tolerans ve son ürün inhibisyonunda azalma,
- Ürün kalitesini arttıran düşük sıcaklık fermentasyonuna uygunluk,
- Ayırma ve filtrasyon gereksiniminin azalması sonucu enerji ve ekipman giderlerinin düşmesi,
- Biyokatalizörün kesikli operasyonlarda biyoreaktörden çıkarılmadan uzun periyotlarda yeniden kullanımı,
- Fermentasyon aktivitesi ve yüksek hücre yoğunluğundan kaynaklanan mikrobiyal kontaminasyon riskinin azalması,
- Basitleştirilmiş işlem düzenlemeleri ile küçük biyoreaktörlerin kullanılabilmesi sonucu daha düşük maliyet.

2. MATERYAL METOD

2.1. Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Deneysel çalışmalarda; -

- Shimadzu UV-1600A spektrofotometre
- Shimadzu HPLC; (Diode array detektör, Ayırma kolonu olarak; Supelcosil™ LC-18, 4.6 mm x 250 mm (Supelco, Bellefonte, PA)
- Shimadzu GC-2010, gaz kromatografisi (MS-QP2010 plus mass spektrometre, AOC-20s otomatik örnekleyici, AOC-20i oto injektör, Kolon olarak 30 m x 0.25 mm teknokroma 5MS fused silica kapiler kolon)
- Perkin Elmer spektrometre BX FT-IR sistem
- Zhwy-200B soğutmalı inkübatör
- Santrifüj (Hettich Universal 30RF)
- Otoklav (Hirayama HVE 50)
- pH metre (Inolab)
- Etüv (Genlab)
- Peristaltik Pompa (Cole Parmer)
- Isıtmalı Karıştırıcı (Janke Kunkel) kullanılmıştır.

2.1.2. Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar ve substratlar Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA) ve Sigma (St.Loui, MO, USA)'dan sağlandı. Büyüme ortamı kimyasalları ve HPLC çözücülerini tamamı HPLC saflıktadır. (Merck Darmstadt, Almanya)

2.1.3. Taşıyıcılar

Kum olarak Denizli Bölgesinden temin edilen dere kumu kullanıldı. Kullanım öncesinde modifikasyona (bkz. 2.4.1.) uğratıldı.

Ponza ve polistiren köpük kullanılacak boyutlara getirildi. Amberlite XAD-7 ve Amberlite XAD-2000 Sigma kalitede kullanıldı (St.Loui, MO, USA).

2.1.4. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan beyaz çürükçül funguslar; *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (1), *Pleurotus ostreatus* (2) *Trametes trogii* ve *Ganoderma carnasum* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünden temin edildi. Fungusların makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre tür tanımlaması Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Y. Mikrobiyolog Tekin Gezer tarafından yapıldı.

2.2. Ortamlar ve Analitik Yöntemler

2.2.1. Kültür Ortamları

2.2.1.1 Tanımlanmış ortamlar

Subtropikal beyaz çürükçül funguslardan, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (1), *Pleurotus ostreatus* (2) ve *Ganoderma carnasum* % 2 (w/v) malt ekstrakt içeren ortamlarda 4 °C'de saklandı ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril % 0,9 NaCl ile 100 mL % 2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Oluşan pelletler, 10 g/L glukoz, 1,0 g/L NH₄H₂PO₄, 0,05g/L MgSO₄.7H₂O, 0,01 g/L CaCl₂, 0,025 g/L maya özütü içeren lakkaz üretim ortamına aktarıldı (Pazarlıoğlu 2005). Subtropikal beyaz çürükçül funguslardan *Trametes trogii* için % 2 (w/v) Patates dekstroz agar (PDA) ortamı kullanıldı.

2.2.1.2 Sentetik atık su ortamları

Çalışmanın endüstride uygulanabilirliğini test edebilme açısından organik ve inorganik kirlilik ağırlıklı iki farklı sentetik atık su ortamı ile çalışıldı (Tablo 2.1-Tablo 2.2). Sentetik atık sı (1) ortamı için Güven ve Sözen tarafından kullanılan atık su ortamı

modifiye edildi (Güven Sözen 2003). Sentetik atık su (2) ortamı içinde, Shuxin ve arkadaşları tarafından kullanılan ortam modifiye edildi (Shuxin vd 2009).

Tablo 2.1 Sentetik atık su (1) için kullanılan mineral ortamın bileşimi

Bileşen	Konsantrasyon(g/L)
KHCO ₃	1.25
KH ₂ PO ₄	0.025
CaC ₁₂ .2H ₂ O	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
FeSO ₄	0.00625
EDTA	0.00625
1M HCL	1.25 mL/L
<u>İz element çözeltisi</u>	1.25 mL/L
EDTA	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.43
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.24
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.99
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.22
NiC ₁₂ .6H ₂ O	0.19
NaSeO ₄ .10H ₂ O	0.21
H ₃ BO ₄	0.014
NaWO ₄ .2H ₂ O	0.050
Fluoren	30 mg/L

Tablo 2.2 Sentetik atık su (2) için kullanılan mineral ortamın bileşimi

Bileşen	Konsantrasyon
Glukoz	103 mg/L
Nişasta	117 mg/L
CH ₃ COONa .3H ₂ O	187 mg/L
NH ₄ H ₂ PO ₄	114 mg/L
Pepton	33.7 mg/L
KH ₂ PO ₄	18.4 mg/L
Fluoren	30 mg/L

2.2.2. İndirgen Şeker Tayini

30 gün süresince aseptik koşullarda, 5 günlük periyotlarla alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenip, ortamdaki bu karbon kaynaklarının düzeyi inkübasyon süresi boyunca beşer günlük periyotlarda, 30 gün boyunca 3,5- DNS (3,5-Dinitro salisilik asit) yöntemi (DNS reaktifi;100 mL distile su'da; 1g 3,5-Dinitro salisilik asit, 20mL 2N NaOH, 30 g Sodyum potasyum tartarat) ile takip edildi (Miller 1959). 1 mL örneğe, 1mL DNS reaktifi ve 10 mL distile su ilave edilip, 10 dakika kaynatıldı ve soğutularak 546 nm'de spektrofotometrede okundu.

2.2.3. Biyokütle Tayini

İnkübasyon sırasında beşer günlük periyotlarda erlendeki biyokütleler süzülüp 30°C'de kurutuldu ve tartılarak her bir fluoren konsantrasyonu için biyokütleler 30 gün boyunca belirlendi.

2.2.4. Enzim aktivite tayinleri

Lakkaz aktivitesi 2,2'-azinobis-(3 etilbenzotiyazolin- 6-sülfonik asit) (ABTS)'in 420 nm'deki enzimatik oksidasyonunun ölçülmesi ile belirlendi ($\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). (Eggert vd 1996). Reaksiyon karışımı 300 μL ekstraselüler akışkan, 300 μL 1 mM ABTS ve 0,1 M Na Asetat tamponu (pH 4,5) içerir.

Mn peroksidaz (MnP) (EC 1.11.1.13) aktivitesi pH 4,5'de H₂O₂'in malonik asiti oksidasyonundaki artışın 270 nm'deki ölçülmesi ile belirlenir($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Wariishi 1992).

2.2.5. Fluoren tayini

HPLC’de hareketli faz olarak asetonitril:su (70:30, V/V) kullanılıp, 0,5 mL/dakika akış hızında çalışıldı. Analiz 254 nm’de gerçekleştirildi. Her bir örnek üç kez enjekte edildi ve ortalaması alındı.

2.2.5.1. Örnek alma

30 günlük periyotlarda beşer gün arayla steril ortamlarda 1 mL örnek alınarak HPLC’de fluoren tayini ve enzim aktivite tayinleri için kullanıldı.

2.2.5.2. Ekstraksiyon prosedürü

Fluoren ekstraksiyonu Yuan ve arkadaşları (Yuan vd 2000) ve Chang ve arkadaşları (Chang vd 2001a) tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı. Bu yöntemde göre, 1 mL örneğe 1 mL n-hekzan ilave edilerek ekstraksiyon üç kez tekrarlandı. Toplanan organik fazlar oda sıcaklığında uzaklaştırıldı. Kalıntı, asetonitrilde (1,5 mL) çözülüp 0,45 µm membrane filtreden geçirildikten sonra 5µL’si HPLC’de analiz için kullanıldı.

2.2.5.3. HPLC analizi

Örneklerdeki fluorenin ölçüldüğü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Diode array dedektör içermektedir. Analiz kolonu; Supelcosil™ LC-18, 4.6 mm x 250 mm (Supelco, Bellefonte, PA)’dir.

2.2.6. GC-MS analizi

Analiz için kullanılan Shimadzu GC-2010, gaz kromatografisi MS-QP2010 plus kütle spektrometresi, AOC-20s otomatik örnekleyici ve AOC-20i otomatik injektör içermektedir. 30m x 0.25mm boyutlarında teknokroma 5MS fused silica kapiller kolon (Teknokroma, Barcelona, Spain) kullanılmıştır. Kolon sıcaklık programı; ilk 1 dakika 60°C’de, daha sonra dakikada 10 °C artacak şekilde 200 °C’ye çıkarılıp bu sıcaklıkta 15 dakika kalacak şekilde programlanmıştır. Çalışma sırasında helyum taşıyıcı gazı (10 ml/dakika) kullanılarak, splitless modunda 1 µL örnek injeksiyon hacminde çalışılmıştır. GC-MS interfaz sıcaklığı 250 °C’dir.

2.2.7. FT-IR analizi

Ekstrakte edilen örnekler Perkin Elmer spektrometre BX FT-IR sistemi kullanılarak FT-IR spektrumları alındı.

2.3. Serbest Hücreler ile Fluoren Yıkımı

Tanımlanmış ortamlar kullanılarak fluorenin biyolojik giderimi çalışıldı. Enzim üretim (50 mL) ortamına 30 mg/L fluoren ilave edilip (Pazarlioglu vd 2005), 26°C'de 175 rpm'de inkübe edildi. 30 gün süre ile beşer günlük periyotlarda ortamlardan örnekler alındı.

2.4. Hücre İmmobilizasyonu

0,5 gr olarak tartılan taşıyıcılar erlende sterilize edilerek üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. İmmobilizasyon, sabit miktardaki taşıyıcılar üzerinde 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında 26 °C'de orbital çalkalayıcıda gerçekleştirildi. Hücrelerin taşıyıcılar üzerinde adsorpsiyonları için optimum koşullar belirlendi (bkz Bölüm 2.3.3). İmmobilizasyonun başlangıcından itibaren belirli aralıklarla ortamdan alınan örneklerin OD₅₆₀ (560 nm'deki optik yoğunluk) değerleri okunarak tutunmayan hücre yoğunluğu belirlendi.

2.4.1. Taşıyıcı materyalin hazırlanması

Polistiren köpük, Amberlite XAD-7 (20-60 Mesh) ve Amberlite XAD-2000 (20-60 Mesh) taşıyıcıları otoklavlanarak kullanıldı. Ponza (16-20 Mesh) ve kum 3 N HCl ile yıkandı. Ardından sulu fazda Cl⁻ iyonları kalmayınca kadar saf su ile yıkandı. İkinci adımda taşıyıcı 0,5 M NaOH ile muamele edildi, saf su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu. Kurutulan kum 900 °C'lik fırında 1 saat bekletildi.

2.4.2. Hücre süspansiyonunun hazırlanması

Pleurotus ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4 °C'de buzdolabında saklandı ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril % 0,9 NaCl ile 100 mL % 2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınarak ağırlıkları ölçüldü ve 20 mL tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi.

2.4.3. Taşıyıcı Yüzeyinde Hücrelerin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Başlangıç hücre miktarı ve hücre yaşının immobilizasyona etkileri araştırılarak optimum immobilizasyon koşulları optimize edildi.

2.4.4. Hücre Adsorpsiyonunun Zamanla Değişimi

Adsorplanan hücre miktarını belirlemek için, farklı miktardaki hücrelerin OD₅₆₀ değerleri ölçüldü ve g/L hücre miktarına karşılık grafiğe geçirildi.

Taşıyıcılar üzerinde adsorplanan hücrelerin zamanla değişimi izlendi. Taşıyıcı materyallerden 0,5'er g aynı boyutlardaki erlenlerde tartıldı ve üzerlerine 20 mL hücre süspansiyonları ilave edildi. Başlangıçta ilave edilen süspansiyonun OD₅₆₀ değeri okunarak hücre miktarları hesaplandı. Erlenler 26 °C'de 60 rpm hızında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bir saat aralıklarla (toplam 12 saat) erlenler çalkalayıcıdan alındı taşıyıcı materyallerin çökmesi için belli süre beklendi ve sıvı ortamda kalan serbest hücrelerin miktarı, OD₅₆₀ değeri okunarak belirlendi.

2.4.5. Başlangıç Hücre Miktarının Etkisi

Başlangıç hücre miktarının immobilizasyona etkisi araştırıldı. Taşıyıcı materyallerden 0,5 g alınarak üzerlerine 20 mL başlangıç OD₅₆₀ değeri belirlenen hücre süspansiyonu (2-4-6-8-10-12-14 pellet içeren) ilave edildi. 26 °C'de 60 rpm' lik çalkalama hızında 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda süspansiyondan alınan örneklerin OD₅₆₀ değerleri okunarak bağlanan hücre miktarı tayin edildi.

2.4.6. Hücre Yaşının Etkisi

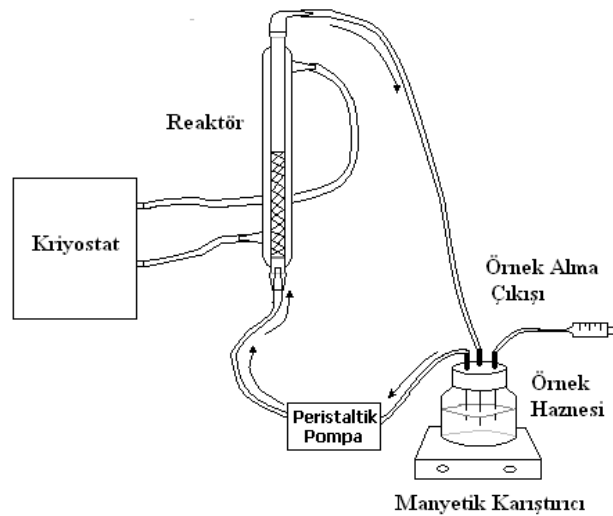
İmmobilizasyona hücre yaşının etkisi araştırıldı. Bu amaçla 3 ve 4 günlük *Pleuratus osteratus* (2) hücre pelletleri ile çalışıldı. 12 saatlik süre diliminde her saat başı örnek alınarak OD₅₆₀ değerleri okunup ortamda kalan serbest hücre miktarı belirlendi.

2.5. İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Yıkımı

Serbest hücrelerle yapılan çalışma seçilen immobilize fungus ile de gerçekleştirildi. Fluoren'in yıkımının incelenmesi için kesikli çalkalamalı ve kesikli dolgu yatak reaktörü kuruldu.

Kesikli çalkalamalı reaktör içerisinde 1,0 g hücre aşılması yapılmış, 1,5 g ponza üzerine 50 mL fluoren (5-10-20-30-40-50 mg/L) çözeltisi ilave edilerek reaktör çalıştırıldı. Farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde fluoren tayini yapılarak fluoren'in yıkımı zamana karşı izlendi.

Kesikli dolgu yatak reaktörü Şekil 2.1'de görüldüğü gibi kuruldu. Sistem havalandırmalı örnek haznesiyle birleştirildi. Kesikli dolgu yatak reaktör içerisinde 1,0 g hücre doldurulup, 1,5 g ponza üzerine 50 mL fluoren (30 mg/L) çözeltisi ilave edilerek reaktör çalıştırıldı. Farklı zamanlarda örnek haznesinden alınan çözeltilerde fluoren içeriği tayin edildi. Kurulan reaktör sisteminin bazı özellikleri Tablo 2.1'de verildi.



Şekil 2.1 Kesikli dolgu yatak reaktörü

Kurulan reaktör sisteminin bazı özellikleri Tablo 2.3'de verildi. Toplam 50 mL örnek hacmi baz alınarak, yıkım yüzdesinin limit değeri olan 30 mg/mL konsantrasyonundaki fluorenin 2 mL/dakika akış hızında immobilize hücreler tarafından yıkılabilirliği araştırıldı.

Tablo 2.3 Sistem parçalarının özellikleri

Reaktör çapı	1,2 cm
Reaktör boyu	10,0 cm
Örnek haznesi hacmi (boş)	50 ml
Örnek haznesi hacmi (dolmuş)	46,5 ml
Ponza hacmi	3.5 mL
Ponza miktarı	1.5 g
Akış Hızı	2 ml/dakika
Fluorene Konsantrasyonu	30 mg/L

2.5.1. İmmobilize Hücrelerle Tanımlanmış Ortamlarda Fluoren Yıkımı

İmmobilize hücrelerle kesikli çalkalamalı sistemde farklı konsantrasyonlardaki fluorenin(5-50 mg/L) yıkımı çalışıldı ve kesikli dolgu yatak reaktörü için çalışılacak fluoren konsantrasyonu belirlendi. Daha sonra Kesikli dolgu yatak reaktörü kurulup kolon sisteminde tanımlanmış ortamlarda 30 mg/L fluorenin giderimi çalışıldı.

2.5.2. İmmobilize Hücrelerle Sentetik Atık Suda Fluoren Yıkımı

Kesikli dolgu yatak reaktöründe 30 mg/L fluoren içeren inorganik ve organik bileşen ağırlıklı sentetik atık su 1 ve 2 ortamları ile çalışıldı (Tablo 2.2). Yapılan çalışmada 30 gün içinde periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı, ekstraksiyon sonrasında HPLC’de analiz edilerek hesaplandı. Bunun yanında, fluoren’in yıkımı, ardışık kullanımlar ile reaktörün performansı test edildi. Bu amaca yönelik olarak, 24 gün içinde periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı, ekstraksiyon sonrasında HPLC’de analiz edilerek hesaplandı. 24. günün sonunda ortama tekrar 30 mg/L fluoren içeren ortam ilave edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve yıkım 72 gün sonra sonlandırıldı.

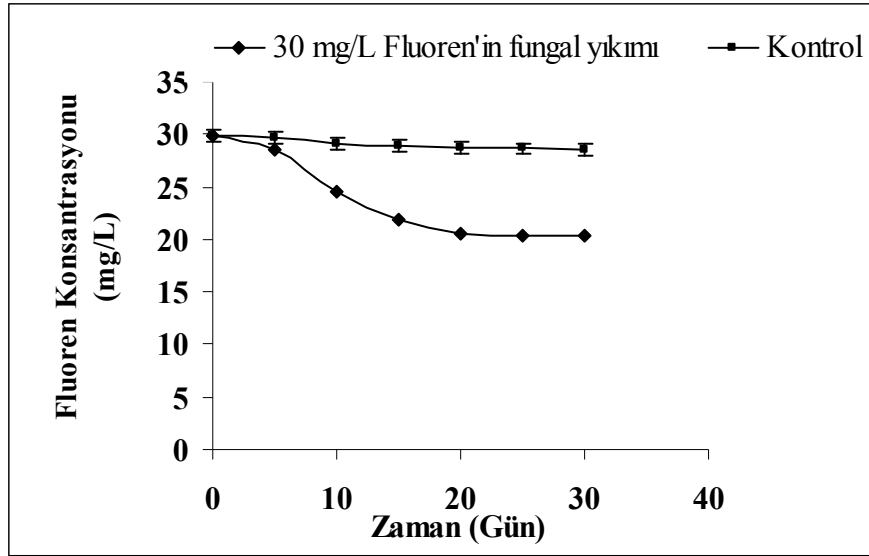
Çalışmada çevrenin organik kirleticiler tarafından yoğun olarak kirletildiği göz önüne alınarak, organik bileşen içerikli sentetik atık su ortamında da fluorenin yıkımı çalışıldı.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Fluoren Yıkımı için Uygun Organizmanın Belirlenmesi

3.1.1. *Trametes versicolor* ile Fluoren Biyodegradasyonu

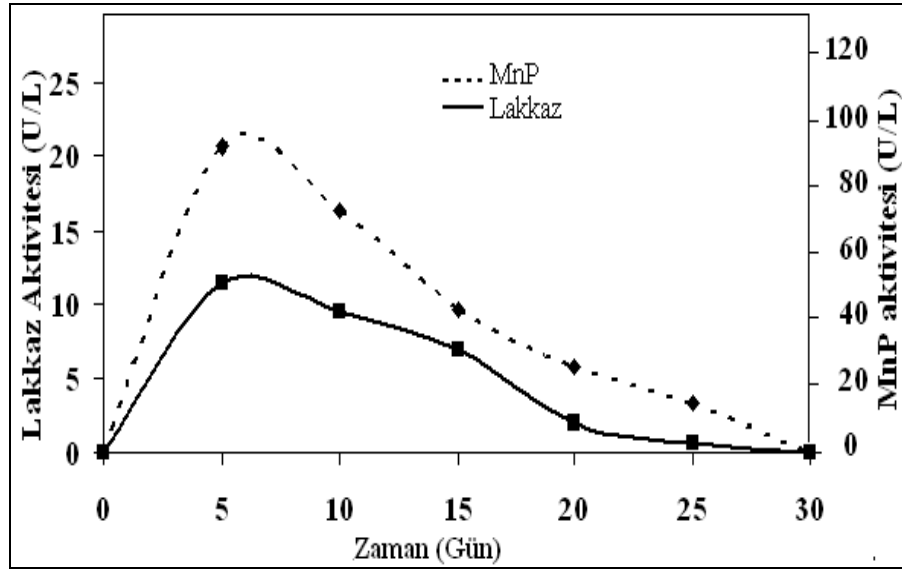
T. versicolor'in glukoz içeren ortamlarda 30 mg/L fluoren'i degrades edebilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenerek araştırıldı. 100 mg/L konsantrasyonundaki fluoren standardının alıkonma zamanı 14,355 dakika olarak belirlendi. Elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-1) verilmektedir. Fluoren yıkımın da kontrol amaçlı olarak, hücre içermeyen ortamda fluorenin ortamdaki uzaklaşma miktarını belirlemek için yıkım süresi boyunca kontrol deneyleri yapıldı. Hesaplamalar yapılırken bu deneylerde esas alınarak biyolojik giderim yüzdeleri hesaplandı.



Şekil 3.1 *T. versicolor* ile fluoren'in biyodegradasyonu

30 mg/L fluoren'in *T. versicolor* ile biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri de izlendi. Ölçümler sonucunda, 20. gün ve sonrasında her iki enzimin de aktivite göstermediği saptandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de verildi. *T. versicolor* ile fluoren'in biyolojik yıkımı sırasında 15. günden sonra

ekstraselüler lignolitik lakkaz ve MnP enzimleri inhibe olmuş ve aktivite gözlenmemiş olup, bu süreye kadar 30 mg/L fluoren %27,82 değerinde biyolojik yıkıma uğramıştır.

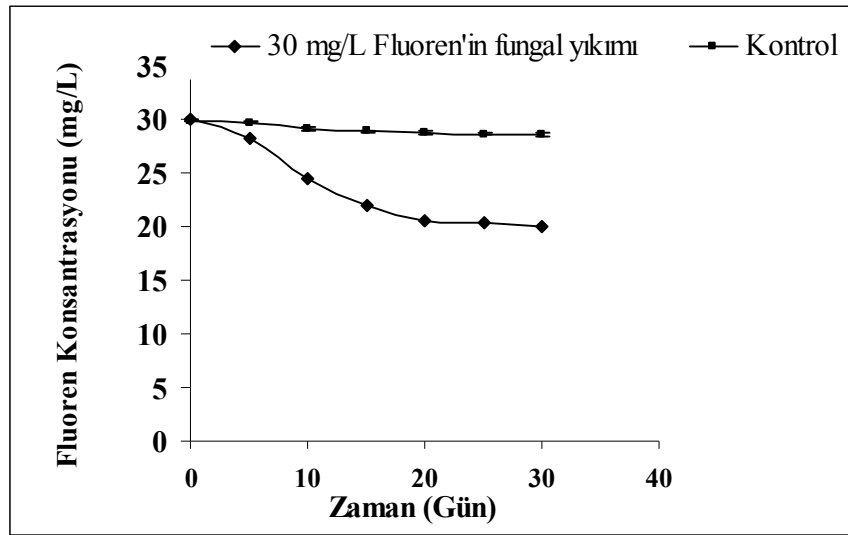


Şekil 3.2 *T. versicolor* lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi

3.1.2. *Ganoderma carnasum* ile Fluoren Biyodegradasyonu

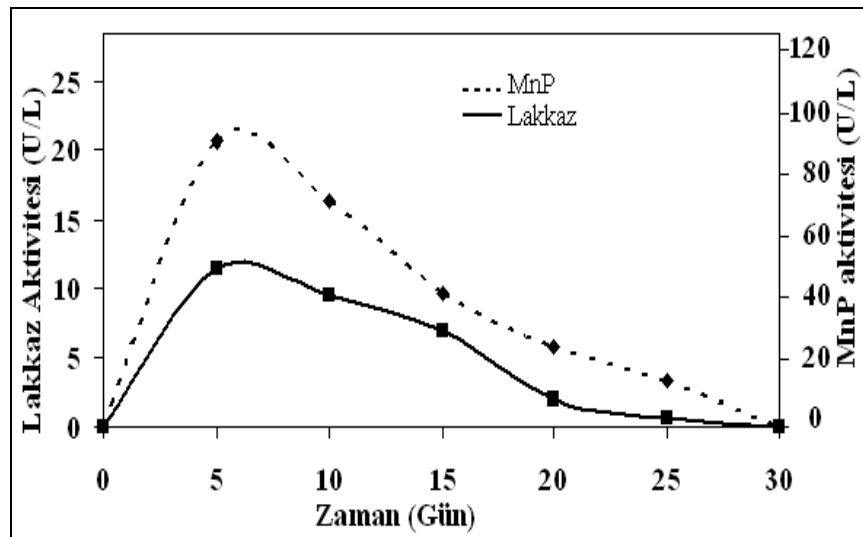
Ganoderma carnasum'un glukoz içeren ortamlarda 30 mg/L fluoren'i degrades edebilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlendi. Fluoren standardı temel alınarak örneklerdeki fluoren miktarı hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-2) verildi. Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre 25. güne kadar fluoren konsantrasyonunda azalma tespit edilmiş olup, 25. günden sonra fluoren miktarında değişim gözlenmemiştir. Yıkım sırasında lakkaz ve Mn-peroksidaz enzim aktivitelerinde izlendi ve 7. günde de maksimum aktiviteler tespit edilirken, 25. günden sonra inhibisyon olduğu görülmüştür. Bu da 25. günden sonra fluoren miktarında değişimin olmayışını açıklamaktadır.

Örneklerin tamamı 3 kez enjekte edildi. Toplam 30 günde elde edilen veriler Şekil 3.3' de verildi. *G. carnasum* içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak 30 mg/L fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda bu fungus tarafından %28,65 oranında biyolojik yıkımın gerçekleştiği tespit edildi.



Şekil 3.3 *G. carnasum* ile fluoren'in biyodegradasyonu

G. carnasum ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimin de aktivite göstermediği saptandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'de verildi. Fluoren'in *G. carnasum* ile biyolojik yıkımı esnasında 30. gün lakkaz ve MnP enzimleri tayin edilemeyişi her iki enzimin de 25. günden sonra inhibe olduğunu göstermektedir. Buna paralel olarak fungal yıkım da tespit edilememiştir.

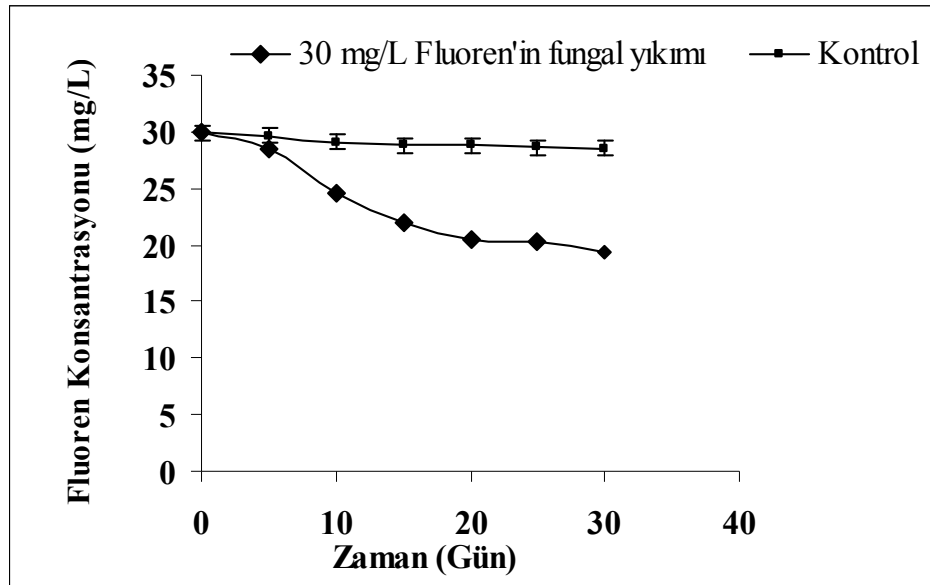


Şekil 3.4 *G. carnasum* lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi

3.1.3. *Trametes trogii* ile Fluoren Biyodegradasyonu

Trametes trogii'nin glukoz içeren ortamlarda 30 mg/L fluoren'i biyolojik yıkıma uğratabilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki kalan fluoren miktarı HPLC ile izlendi. Fluoren standardı yardımıyla örneklerdeki fluoren miktarı hesaplandı. Enjeksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-3) verildi. Alınan örneklerin HPLC ile analizi sonucunda elde edilen kromatogram sonuçlarına göre 25. güne kadar fluoren konsantrasyonunda azalma görüldü, 25. günden sonra fluoren miktarında değişim tespit edilmedi.

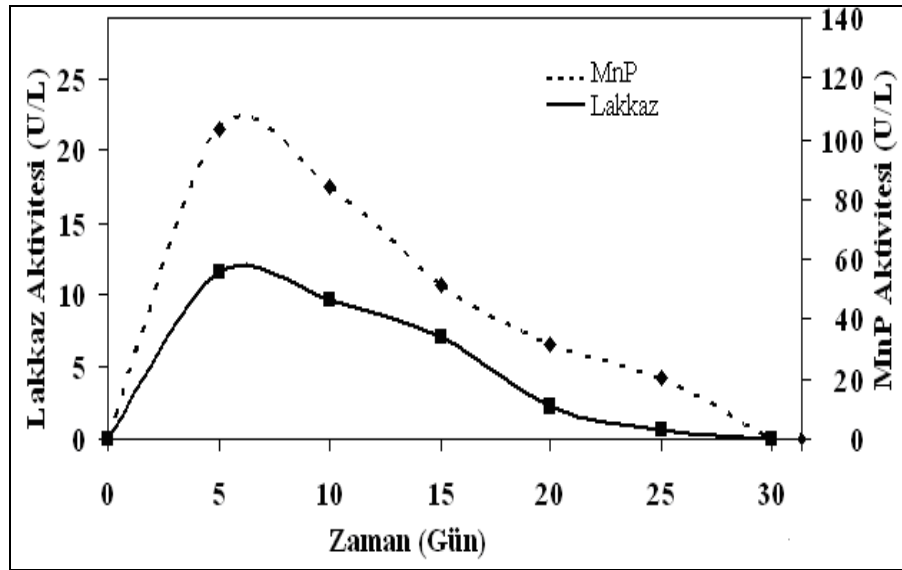
Örneklerin tamamı 3 kez enjekte edildi. Toplam 30 günde elde edilen veriler Şekil 3.5'de verildi. Fluorenin uçucu özelliği nedeniyle, *T. trogii* içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak 30 mg/L fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi. Uzaklaşan fluoren miktarında dikkate alınarak, hesaplamalar sonucunda % 30,72 oranında biyolojik yıkım gözlemlendi..



Şekil 3.5 *T. trogii* ile fluoren'in biyodegradasyonu

30 mg/L fluoren'in *T. trogii* ile biyodegradasyonu esnasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. 30 gün içinde periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimde aktivite tespit edilmedi. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler Şekil 3.6'da verildi. *T. trogii* ile fluoren'in biyolojik yıkımı sırasında 25. günden sonra ekstraselüler lignolitik lakkaz ve MnP enzimlerine ilişkin aktivite gözlemlenmedi. Her iki enzimin aktivite göstermemesi sonucunda fungal yıkım gözlemlenmedi. Bu süreye kadar 30 mg/L fluorenin %30,72

oranında biyolojik giderime uğradığı kromatogramlardan elde edilen veriler doğrultusunda saptandı.

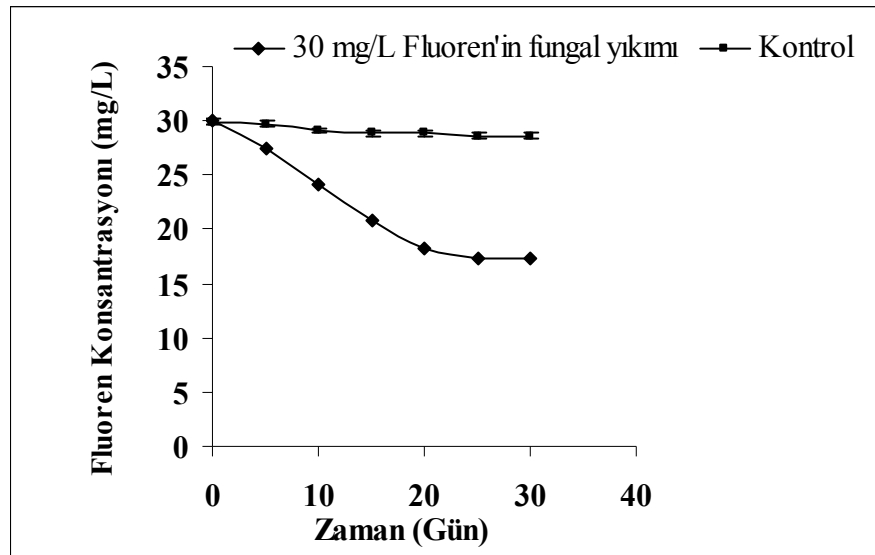


Şekil 3.6 *T. trogii* lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi

3.1.4. *Pleuratus osteratus(1)* ile Fluoren Biyodegradasyonu

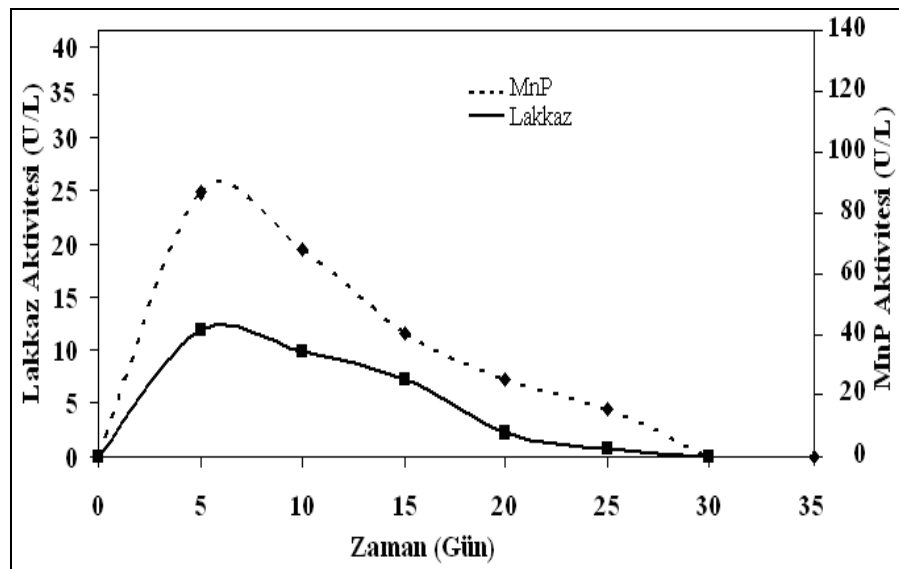
Pleuratus osteratus(1)'un glukoz içeren ortamlarda fluoren'i (30 mg/L) degrades edebilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenip, fluoren standardı temel alınarak örneklerdeki fluoren miktarı hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ekler (Ek-4) bölümünde verildi.

Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre 25. güne kadar fluoren konsantrasyonunda azalma tespit edildi fakat 25. günden sonra fluoren miktarında değişim gözlenmedi. Örneklerin tamamı 3 kez enjekte edildi. Toplam 30 günde elde edilen veriler Şekil 3.7'de verildi. *P.osteratus(1)* içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak 30 mg/L fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda % 37,96 oranında biyolojik yıkım saptandı.



Şekil 3.7 *P. ostreatus(1)* ile fluoren'in biyodegradasyonu

P.ostreatus(1) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimde aktivite göstermedi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de verilmektedir. *Pleurotus ostreatus (1)* ile fluoren'in biyolojik yıkımı sırasında 25. günden sonra ekstraselüler lignolitik lakkaz ve MnP aktiviteleri inhibe olduğu için bu süreye kadar 30 mg/L fluorenin %37,96 biyolojik giderime uğradığı belirlendi.

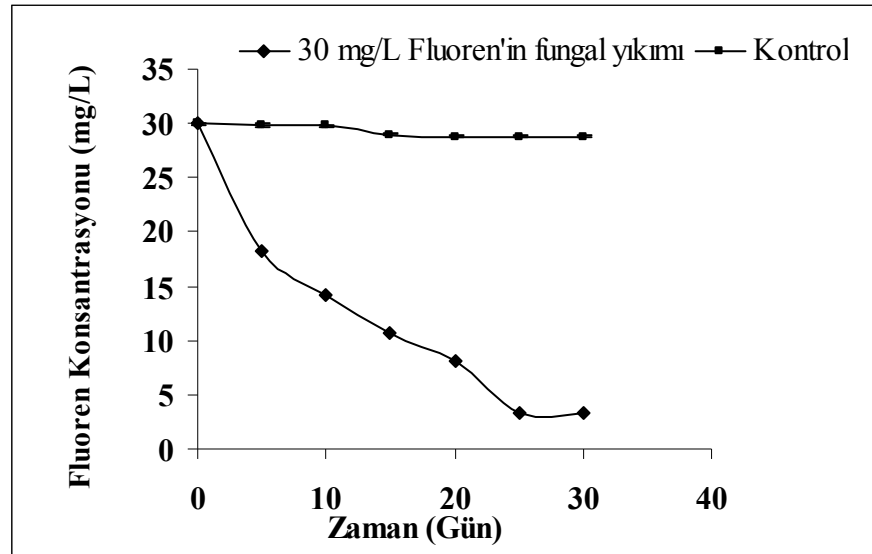


Şekil 3.8 *P. ostreatus(1)* Lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi

3.1.5. *Pleurotus ostreatus (2)* ile Fluoren Biyodegradasyonu

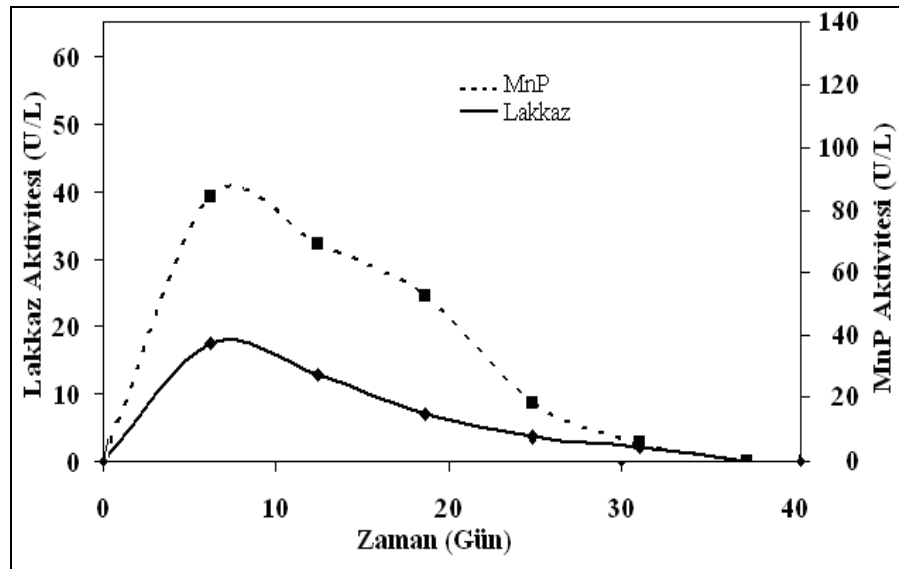
Pleurotus ostreatus (2)'un glukoz içeren ortamlarda fluoreni (30 mg/L) biyolojik yıkıma uğratabilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenip, fluoren standardı temel alınarak örneklerdeki fluoren miktarları hesaplandı. Kromatografik analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-5) verildi.

Alınan örneklerin HPLC ile analizi sonucunda elde edilen kromatogram sonuçlarına göre 25. güne kadar fluoren konsantrasyonunda azalma görülmeyle beraber, 25. günden sonra fluoren miktarında değişim tespit edilmedi. Örneklerin tamamı 3 kez enjekte edildi. Toplam 30 günde elde edilen veriler Şekil 3.9'da verildi. *P. ostreatus*(2) içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak 30 mg/L fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda %85,21 oranında biyolojik yıkım olduğu tespit edildi.



Şekil 3.9 *P. ostreatus*(2) ile fluoren'in biyodegradasyonu

30 mg/L fluoren'in *P. ostreatus*(2) ile biyodegradasyonu esnasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. 30 gün içinde periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimde aktivite gözlemlendi. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler Şekil 3.10'de verildi. *P. ostreatus*(2) ile fluoren'in biyolojik yıkımı esnasında 25. günden sonra ekstraselüler lignolitik lakkaz ve MnP aktiviteleri tespit edilemedi. Bu süreye kadar 30 mg/L fluoren %85,21 biyolojik yıkım saptandı. Yapılan çalışmada fluoreni en iyi yıkıma uğratan, fungus türü *P. ostreatus*(2) olarak belirlendi. Seçilen bu fungus ile yıkım şartları optimize edilerek ve planlanan diğer çalışmalar gerçekleştirildi.



Şekil 3.10 *P. ostreatus(2)* Lakkaz ve MnP enzimi aktivitesinin 30 gün içindeki değişimi

Farklı funguslara ilişkin yıkım yüzdeleri Tablo 3.1’de verildi. En iyi biyolojik giderim *P. ostreatus(2)* suşunda gözlemlendi. Kullanılan diğer *P. ostreatus(1)* suşu ile karşılaştırıldığında, *P. ostreatus(2)*’nin diğer suşa göre yıkımdaki üstünlüğü muhtemelen daha genç olması ile açıklanabilir. Diğer organizmalar içerdikleri ekstraselüler enzimlerin aktiviteleri açısından farklılık göstermektedirler bu nedenle *P. osteratus(2)* organizması, yüksek izlenebilir Lakkaz ve Mn-peroksidaz enzim aktiviteleri göstermesi bakımından üstündür. Bu özelliği sayesinde fluoreni daha iyi bir şekilde yıkıma uğratmıştır.

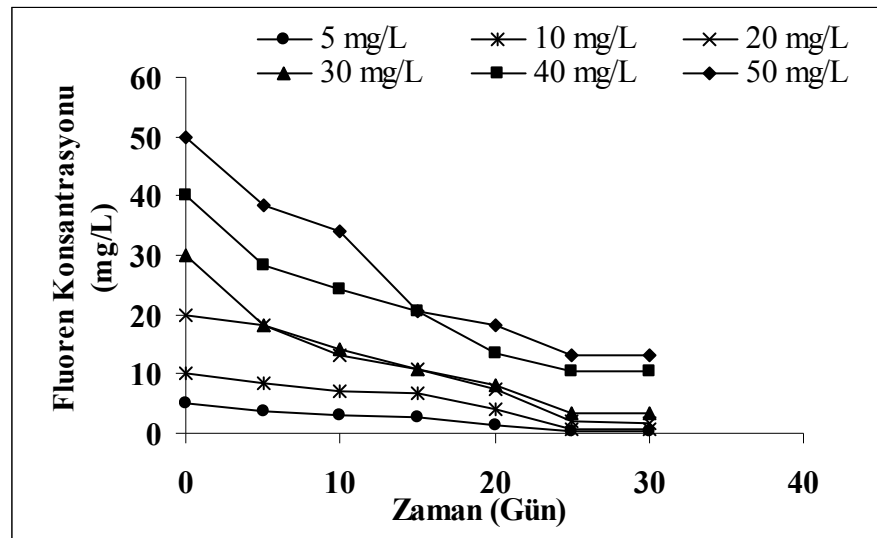
Tablo 3.1 Farklı funguslarla fluorenin yıkım yüzdeleri

	% Biyodegradasyon
<i>Trametes versicolor</i>	27,82
<i>Ganoderma carnosum</i>	28,65
<i>Trametes trogii</i>	30,72
<i>Pleurotus ostreatus (1)</i>	37,96
<i>Pleurotus ostreatus (2)</i>	85,21

3.2. *Pleurotus ostreatus (2)* ile Farklı Fluoren Konsantrasyonlarında Yıkım

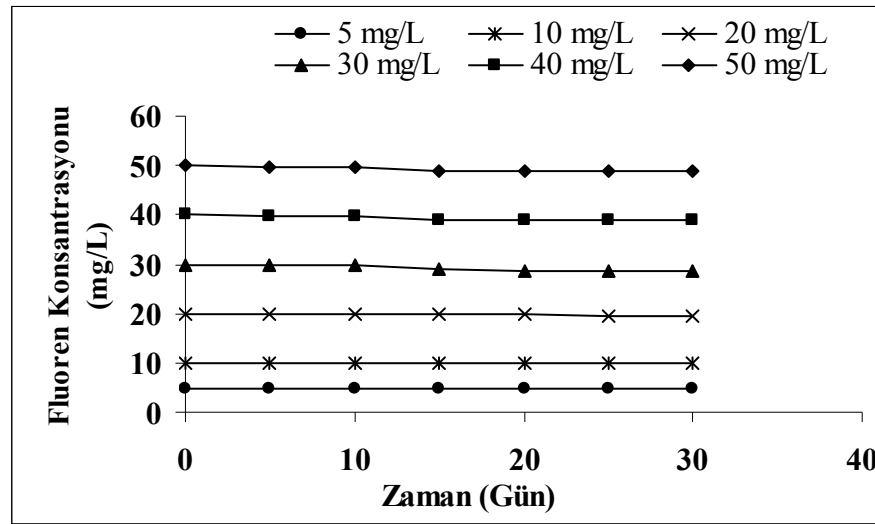
Pleurotus ostreatus (2)'un fluoreni degrades edebilme yeteneği 5-10-20-30-40-50 mg/L fluoren içeren ortamlarda araştırıldı. 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenerek hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-6, Ek-7, Ek-8, Ek-9, Ek-10, Ek-11) verilmektedir.

Kromatogramlardan elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde, en iyi yıkımın 5 mg/L fluoren içeren ortamlarda olduğu belirlendi (şekil 3.11). *Pleurotus ostreatus* (2) içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak farklı konsantrasyonlarda fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi (şekil 3.12).



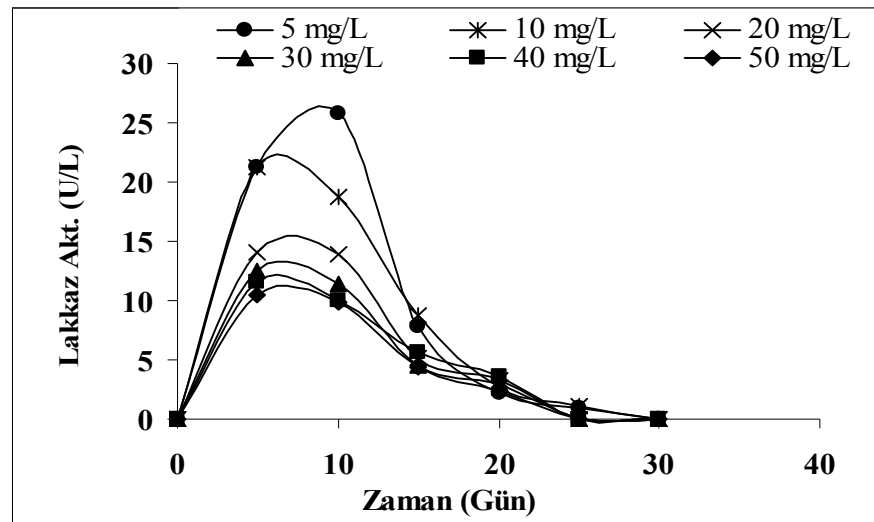
şekil 3.11 *Pleurotus ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in yıkım alışması

Farklı konsantrasyonlarda gerçekleştirilen biyoloğık giderim sırasında aynı konsantrasyonlarda fluorenin ortamdaki uzaklaşma miktarını belirlemek için hücre emreyen ortamlardaki fluoren miktarları yıkım süresi boyunca izlendi. Elde edilen değerlerde dikkate alınarak biyoloğık giderim yüzdeleri hesaplandı.

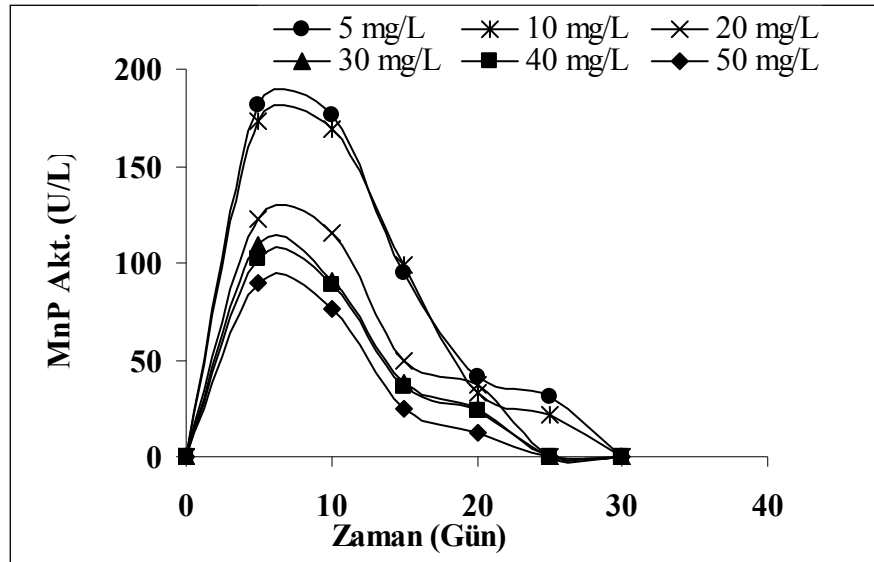


Şekil 3.12 *Pleurotus ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in kontrol çalışması

Pleurotus ostreatus (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimde aktivite göstermediği belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.13-3.14' de verildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 10. günden sonra her iki enziminde aktiviteleri azalmaya başladı ve 25. günden sonra aktivite tespit edilemedi. Bu verilerden yola çıkılarak fluoren yıkımının ağırlıklı olarak ligninolitik enzimlerin üretiminin etkin olduğu inkübasyonun ilk 10 günü içerisinde gerçekleştiğini söylemek mümkündür.



Şekil 3.13 *Pleurotus ostreatus* (2) Lakkaz enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi



Şekil 3.14 *Pleurotus ostreatus* (2) MnP enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi

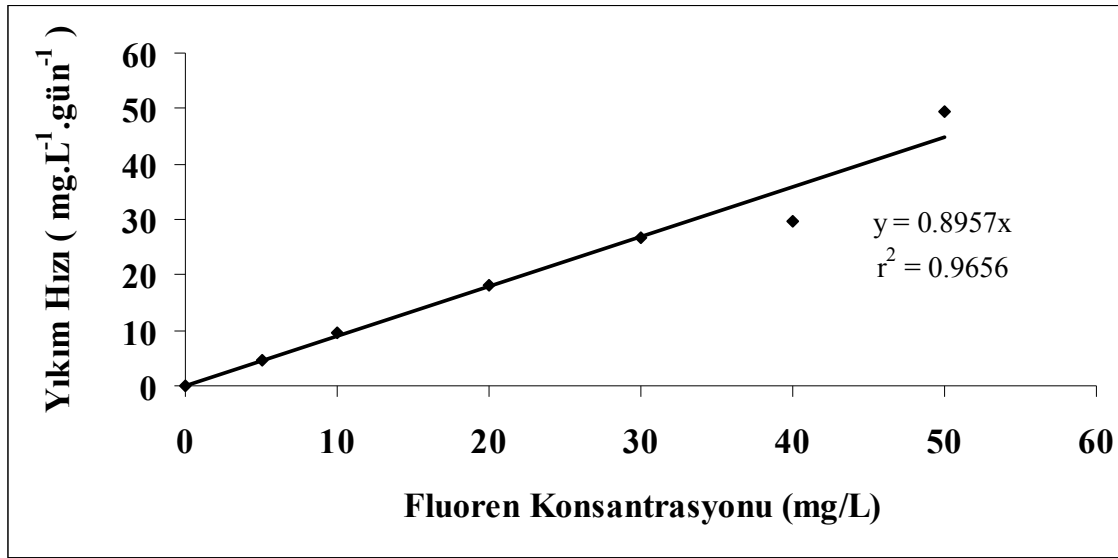
Kromatogramlardan elde edilen veriler doğrultusunda biyolojik giderim yüzdeleri hesaplandı ve Tablo 3.2’de verildi. Hesaplanan giderim yüzdelerine bakıldığında en iyi giderimin %92,95 olup (5 mg/L fluoren) olduğu görülmektedir. 30 mg/L fluorenin de %85,21 giderime uğradığı hesaplandı. 30 mg/L’nin üstündeki fluoren konsantrasyonlarında biyolojik giderim azaldı. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda 30 mg/L fluoren konsantrasyonu temel alındı.

Tablo 3.2 *Pleurotus ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren’in % biyolojik giderimleri

Fluoren(mg/L)	% Biyolojik giderim
5	92,95
10	92,95
20	89,35
30	85,21
40	71,42
50	71,11

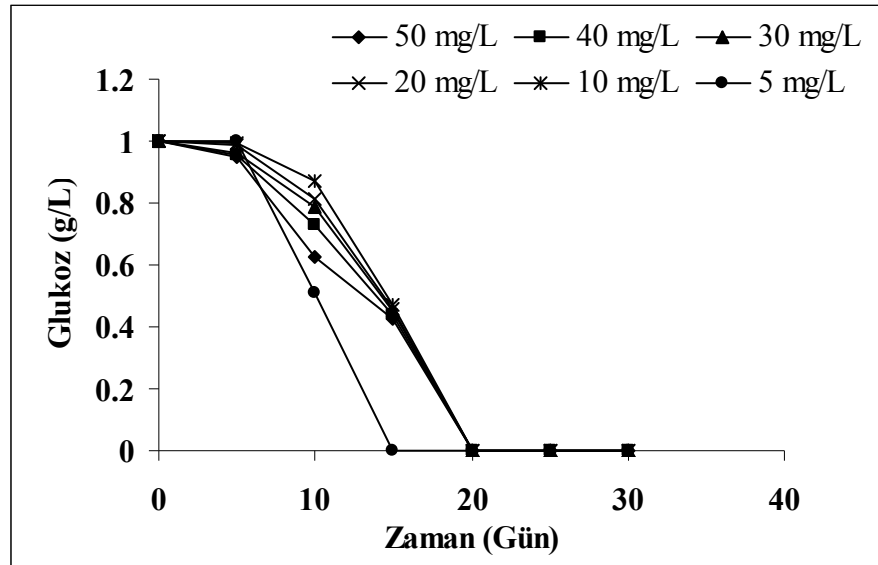
Fluoren konsantrasyonuna bağlı yıkım hızları hesaplanıp Şekil 3.15’de verildi. Biyolojik giderim sırasında farklı konsantrasyonlardaki fluorenin giderim miktarları

esas alınarak yıkım hızları incelendiğinde konsantrasyon arttıkça yıkım hızında arttığı tespit edildi.



Şekil 3.15 *Pleurotus ostreatus* (2) ile Fluoren'in biyodegradasyonunda yıkım hızları

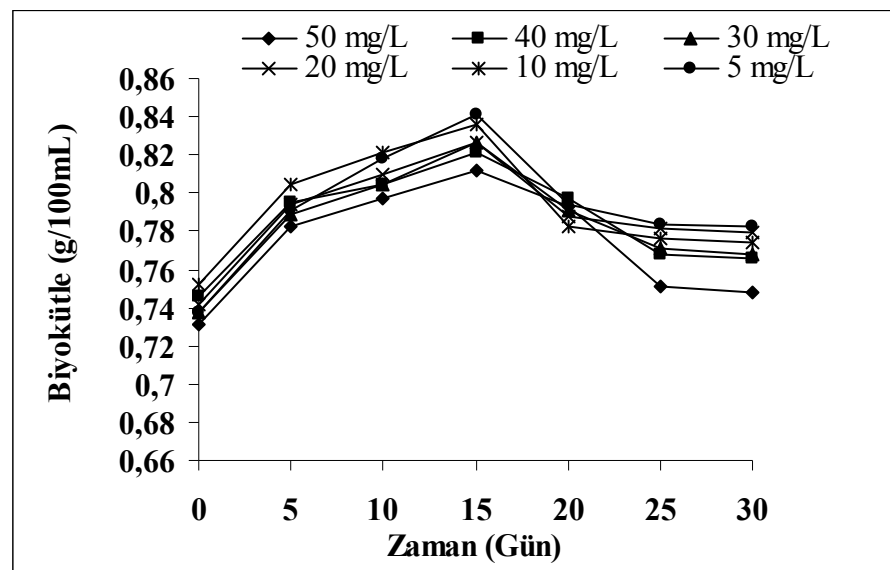
İnkübasyon sırasında beşer günlük periyotlarda 30 gün süresince alınan örneklerde 3,5-DNS (3,5-Dinitro salisilik asit) metodu ile indirgen şeker takibi yapılarak, ortamdaki karbon kaynağının düzeyi araştırıldı. 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L ve 50 mg/L fluoren içeren ortamlarda 20. günden sonra, 5 mg/L fluoren içeren ortamda ise 15. günden sonra glukoz gözlenmedi (Şekil 3.16). Şekil 3.16'da görüldüğü gibi fluorenin 10-50 mg/L konsantrasyon aralıklarında 20.günden sonra, 5 mg/L konsantrasyonunda 15.günden sonra ortamdaki glukoz miktarı tükenmiştir. Karbon kaynağı glukozun, fluoren yıkımında kosubstrat olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.16 Farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki glukoz düzeyi

İnkübasyon sırasında beşer günlük periyotlarda erlerdeki biyokütleler süzülüp 30°C'de kurutuldu ve tartılarak her bir fluoren konsantrasyonu için biyokütleler 30 gün boyunca belirlendi. İnkübasyonun 15. gününden sonra biyokütle miktarı azaldı dolayısıyla 15. günden sonrada fluoren yıkımında çok fazla değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.17).

İnkübasyonun 10. gününden sonra ortamdaki glukozun hızlı bir şekilde azalışı aynı zamanda biyokütlenin azalışında açıklamaktadır. Lakkaz ve Mn-peroksidaz enzim aktiviteleride 15. günden sonra belirgin şekilde azalmaktadır.



Şekil 3.17 Farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki biyokütle miktarı

3.3. *Pleurotus osteratus* (2) Üzerine Fluoren'in Biyosorpsiyonunu

30 gün içinde beşer günlük periyotlarda alınan örneklerdeki ekstraksiyon sonrası fluoren miktarı HPLC yardımı ile izlendi. Ortamdan uzaklaşan fluorenin belirlenmesi için kontrol çalışması yapılarak uzaklaşan fluoren miktarları hesaplandı.

Tablo 3.3 *Pleurotus ostreatus* (2) biyokütlesi ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyosorpsiyon çalışması

Gün	50 mg/L FL	40 mg/L FL	30 mg/L FL	20 mg/L FL	10 mg/L FL	5 mg/L FL
0	49,95	39,96	29,97	19,98	9,97	4,97
5	49,85	39,86	29,85	19,86	9,85	4,94
10	49,75	39,77	29,78	19,77	9,88	4,89
15	48,98	38,98	28,99	19,78	9,88	4,88
20	48,81	38,81	28,82	19,69	9,81	4,87
25	48,81	38,80	28,80	19,64	9,81	4,86
30	48,81	38,81	28,82	19,62	9,81	4,86
%Dönüş.	2,30	2,86	3,84	1,78	1,55	2,06
% uzak.	2,33	2,86	3,87	1,77	1,61	2,04
%Biosorp.	-0,03	0,0	-0,03	0,01	-0,07	0,0

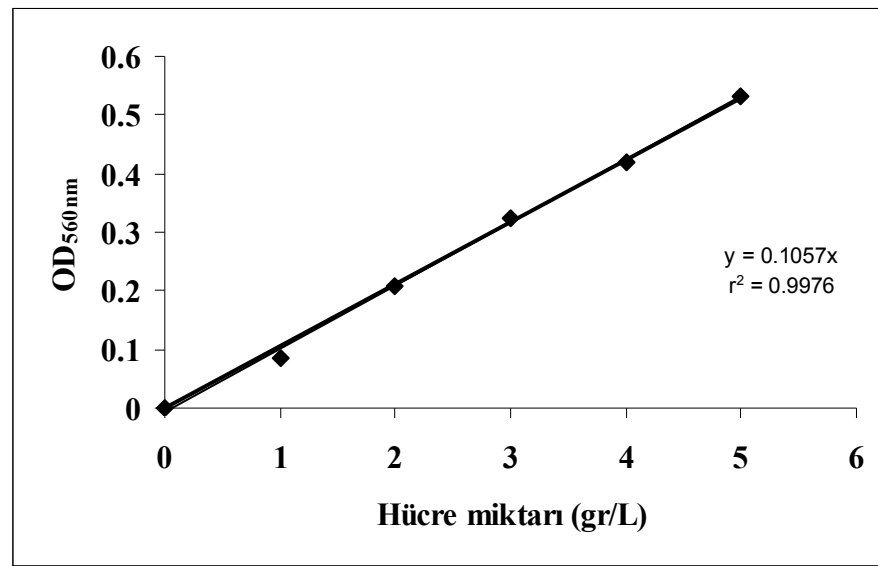
Elde edilen veriler incelendiğinde, fluorenin ölü fungal biyokütle tarafından sorplanmadığı görüldü (Tablo 3.3). Bu durumda fluorenin; biyosorpsiyona uğramadığı, *Pleurotus ostreatus* (2) tarafından degrade edildiği söylenebilir.

3.4. *Pleurotus ostreatus* (2)'un Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu

Ponza (16-20 Mesh), polistiren köpük, kum (200 ile 500 mikron), Amberlite XAD-7 (20-60 Mesh) ve Amberlite XAD-2000 (20-60 Mesh) taşıyıcıları kullanıldı. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu sırasında zaman, hücre miktarı ve hücre yaşının etkileri araştırıldı.

3.4.1. Ponza ile *P. ostreatus*'un immobilizasyonu

P. ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4°C'de buzdolabında saklandı ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril 0.9% NaCl ile 100 mL %2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. 3 ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Her iki (3 ve 4 günlük) oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınıp ağırlıkları ölçülüp, 20 ml tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi. 0,5 gr olarak tartılan ponza erleninde sterilize edilip, üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. İmmobilizasyon, 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirildi.



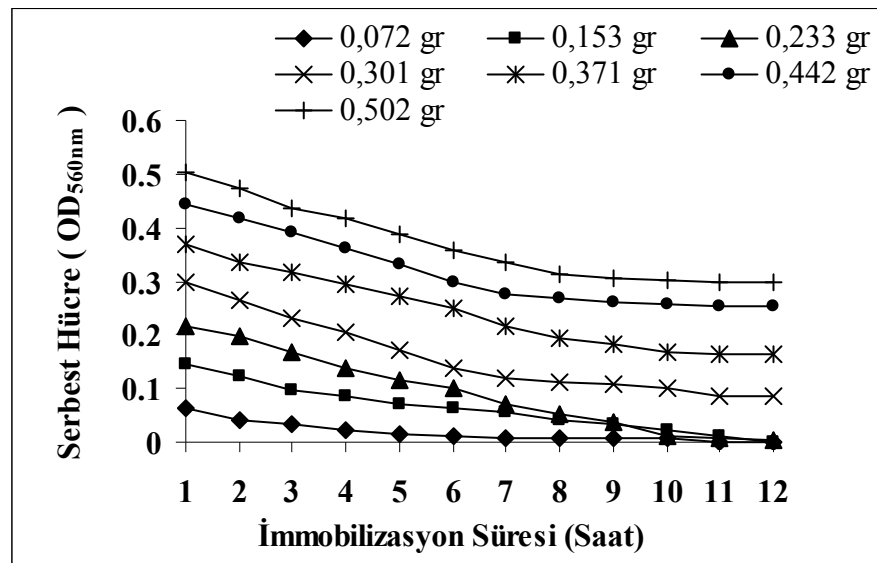
Şekil 3.18 Farklı miktardaki *Pleurotus ostreatus* (2) hücrelerinin absorbans değişimleri

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.4'de verilmektedir. 2 ve 4 günlük pelletler 10 saat içinde tamamen ponza üzerine tutundu ancak ponzanın yüzey porozitesi düşünüldüğünde 6 pellet ile adsorpsiyonun daha iyi olduğu görülmektedir.

Tablo 3.4 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin ponza üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

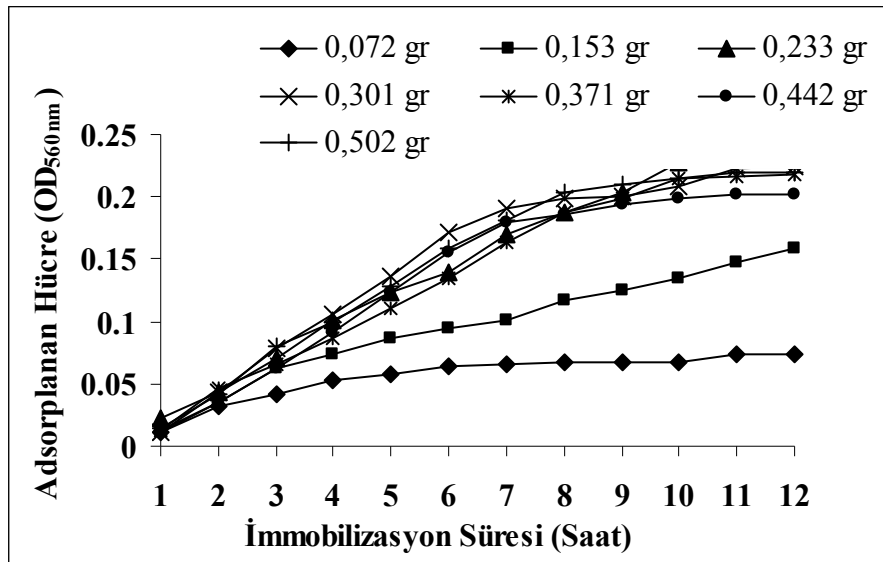
Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr) (3 Günlük)	0,072	0,153	0,233	0,301	0,371	0,442	0,502
% Adsorplanan Hücre/0,5 g Ponza	100	100	97,91	72,49	57,07	44,39	42,36

P. ostreatus'un ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 6 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir.



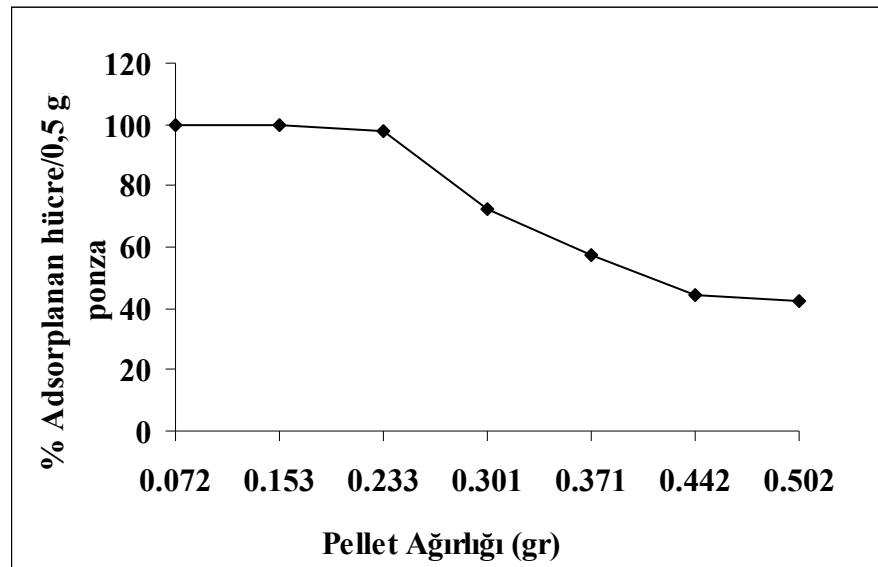
Şekil 3.19 *P. ostreatus*'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının (gr) zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonunda 0,5 gram taşıyıcı başına en iyi adsorpsiyonun 0,233 gr hücre içeren ortamda olduğu belirlendi (Şekil 3.20). İmmobilizasyon işlemi 10 saatte tamamlanmıştır.



Şekil 3.20 *P. ostreatus*'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı grafiğe geçirildiğinde, 0,5 gr taşıyıcı başına 0,233 gr (6 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun çok iyi olduğu Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonunda 10 saatte ponza üzerine yaklaşık 0,46 gr hücre/ gr taşıyıcı adsorplanabildiği söylenebilir (Şekil 3.21).



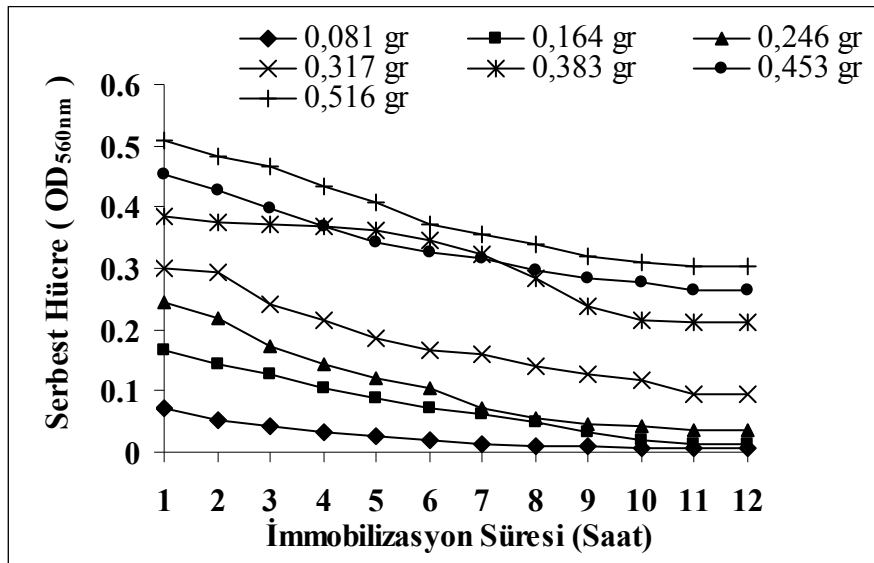
Şekil 3.21 *P. ostreatus*'un (3 günlük) ponzaya immobilizasyonda adsorpsiyonunun pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (4 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda, hücre miktarına bağlı olarak %Adsorpsiyonun değişimi Tablo 3.5’de verilmektedir.

Tablo 3.5 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin ponza üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorpsiyonun değişimi

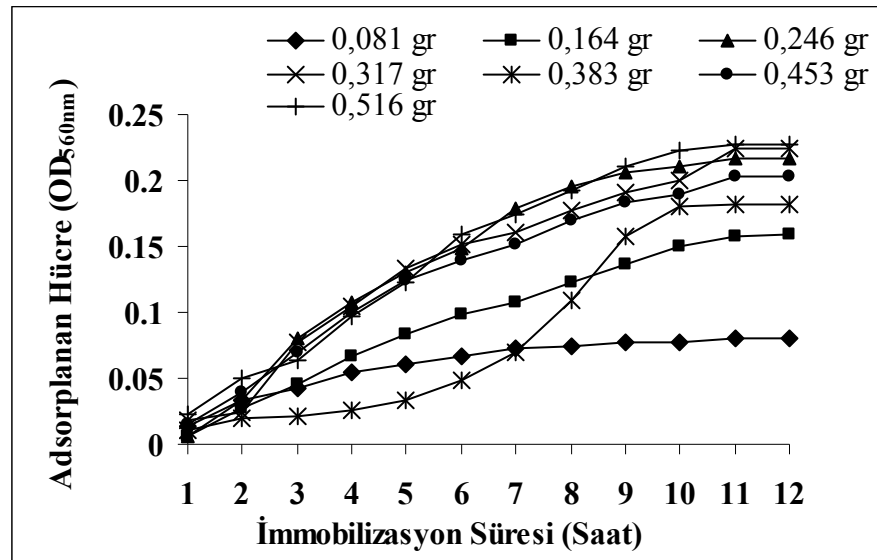
Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr) (4 Günlük)	0,081	0,164	0,246	0,317	0,383	0,453	0,516
% Adsorplanan Hücre/0,5 g Ponza	93,02	92,98	86,11	70,22	46,19	43,47	42,94

Tablo 3.5’den, 2 ve 4 adet pelletin 10 saat içinde %90’dan fazla miktarda ponza üzerine tutunduğu görülmektedir. *P. ostreatus*’un ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 22 ve Şekil 3.23’de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir fakat ponzanın yüzeyindeki gözeneklerin tamamen dolduğu söylenemez.



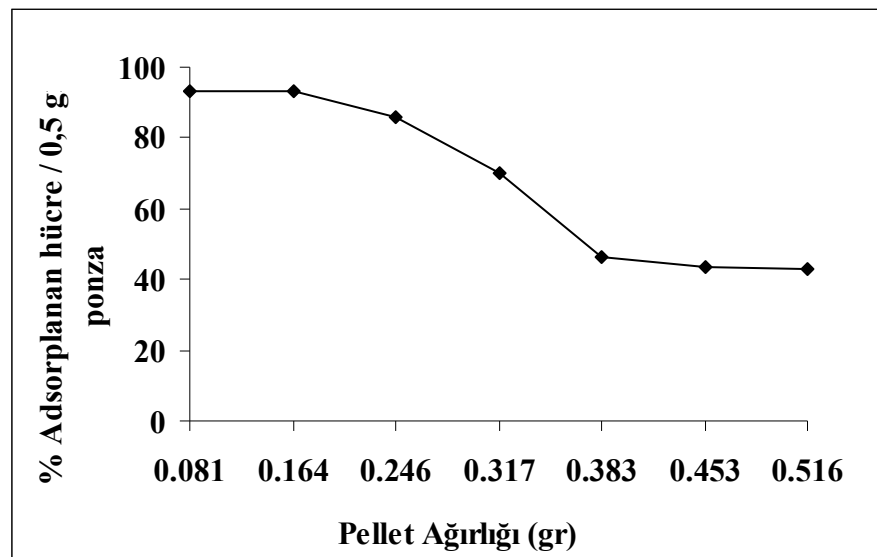
Şekil 3.22 *P. ostreatus*’un (4 günlük) ponzaya immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Adsorplanan hücre miktarı hesaplandığında 0,5 gr taşıyıcı başına 0,081 gr ve 0,164 gr hücrenin en iyi şekilde adsorplanıldığı Şekil 3.23’de görülmektedir.



Şekil 3.23 *P. ostreatus*'un (4 günlük) ponza immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (4 günlük) ponza immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı, grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,081 gr (2 pellet) ve 0,164 gr (4 Pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.24'de görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük) ponza immobilizasyonunda 10 saatte 0,5 gr ponza üzerine 0,233 gr hücrenin adsorplandığı ve % adsorpsiyonun çok daha iyi olduğu belirlenir.



Şekil 3.24 *P. ostreatus*'un (4 günlük) ponza immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

3.4.2. Amberlite XAD-2000 ile *P. ostreatus*'un immobilizasyonu

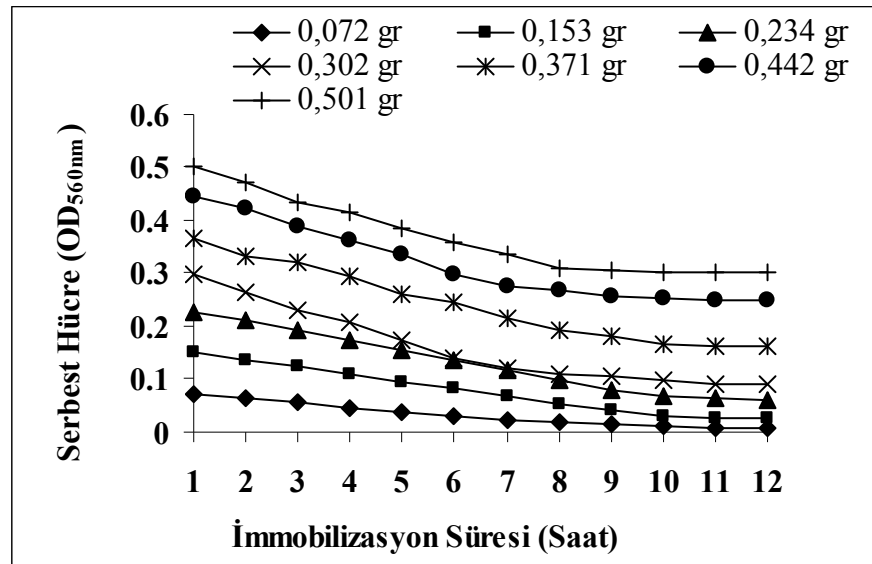
P. ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4 °C'de buzdolabında geliştirildi ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril 0.9% NaCl ile 100 mL %2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. 3 ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Her iki (3 ve 4 günlük) oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınıp ağırlıkları ölçülüp, 20 ml tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi. 0,5 gr olarak tartılan Amberlite XAD-2000 erlende sterilize edilip, üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. İmmobilizasyon, 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirildi.

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorpsiyonun değişimi Tablo 3.5'de verilmektedir. 2 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 91,14 Amberlite XAD-2000 üzerine tutunduğu hesaplanmıştır.

Tablo 3.6 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin Amberlite XAD-2000 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

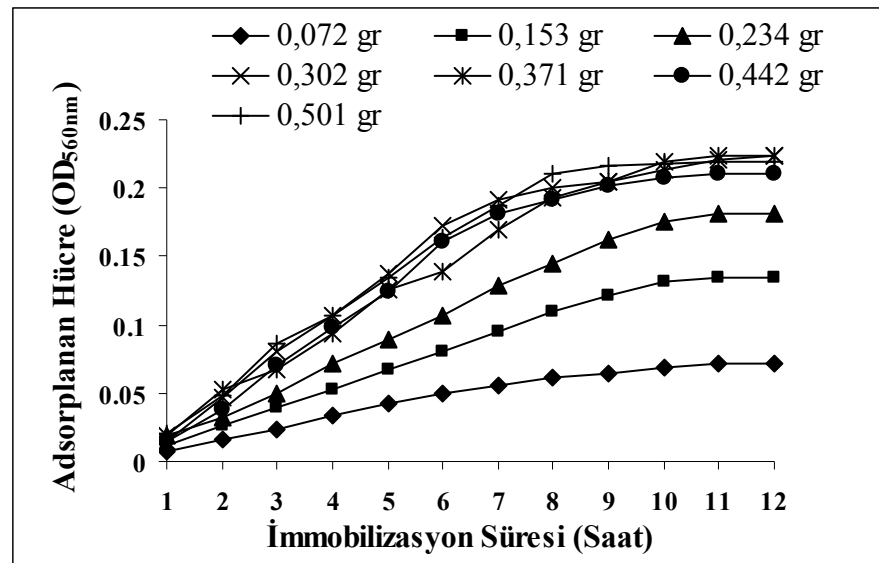
Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet ağırlığı (gr)	0,072	0,153	0,234	0,302	0,371	0,442	0,501
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-2000	91,14	82,82	74,59	71,47	58,03	45,97	42,23

P. ostreatus'un Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.24 ve Şekil 3.35'de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir.



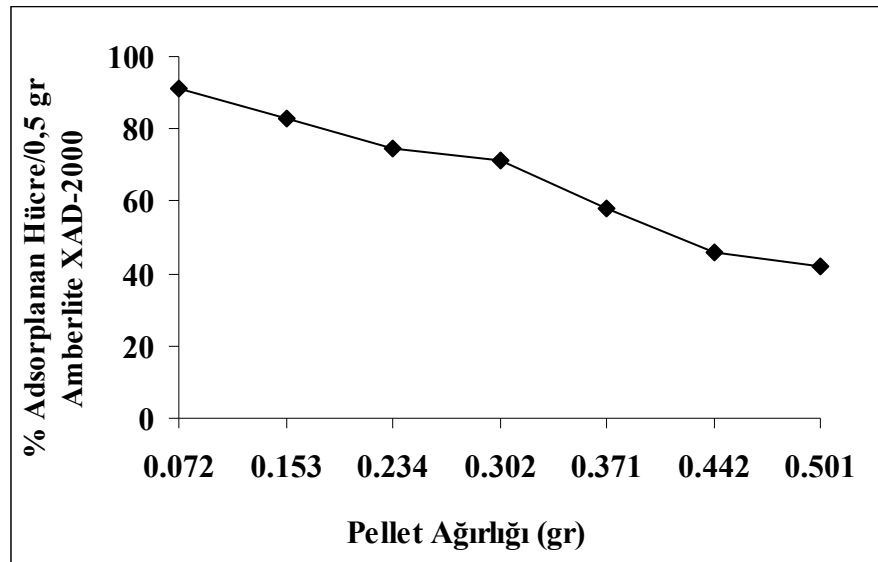
Şekil 3.25 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Şekil 3.26'ya bakıldığında 0,5 taşıyıcı üzerine en iyi adsorpsiyonun 0,072 gr hücre içeren ortamda olduğu görülmektedir. Hücre miktarı arttıkça adsorpsiyonun da azaldığı görüldü.



Şekil 3.26 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,072 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de görülmektedir.

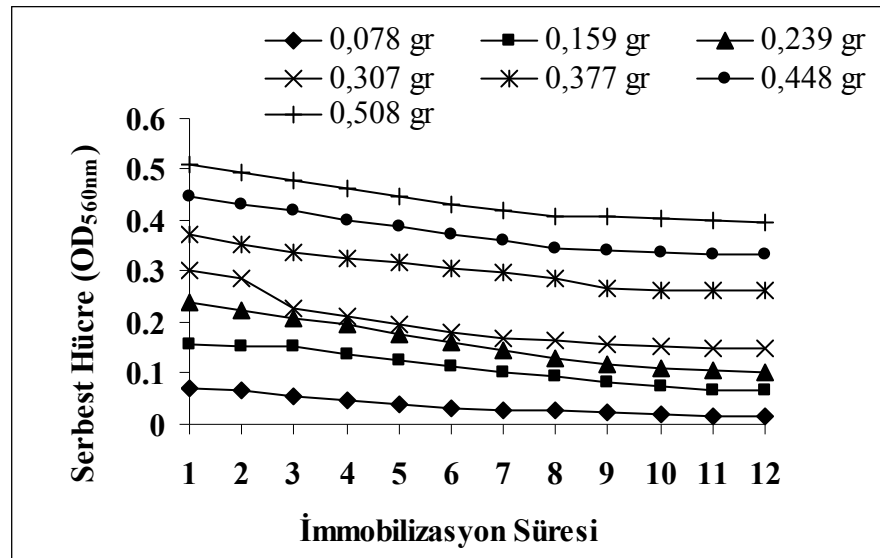


Şekil 3.27 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda %adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (4 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorpsiyonun değişimi Tablo 3.7'de verilmektedir. 2 pellet 10 saat içinde %90'dan fazla miktarda ponza üzerine tutunduğu görülmektedir. *P. osteratus*'un Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'da gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir.

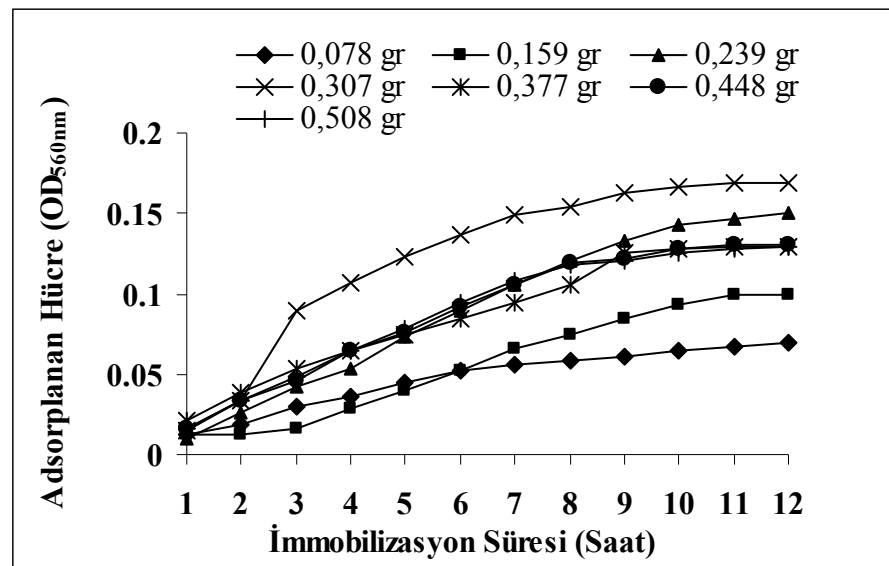
Tablo 3.7 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin Amberlite XAD-2000 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet ağırlığı (gr)	0,078	0,159	0,239	0,307	0,377	0,448	0,508
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-2000	82,14	59,88	59,76	53,14	32,91	28,17	24,48



Şekil 3.28 *P. osrteatus*'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

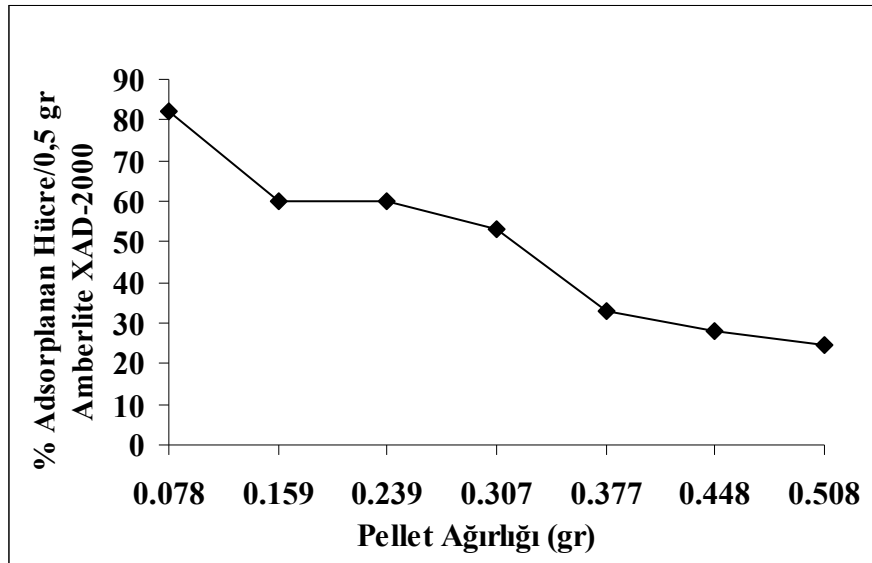
Şekil 3.29'da görüldüğü gibi adsorplanan hücre miktarı ortamda bulunan hücre miktarı arttıkça azalmaktadır. Adsorpsiyon en iyi 0,5 gr ponza üzerine 0,078 gr hücre içeren ortamda gerçekleşti.



Şekil 3.29 *P. ostreatus*'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,078 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.30'da görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük)

Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonunda 10 saatte 0,5 gr Amberlite XAD-2000 üzerine 0,072 gr hücrenin adsorplandığı ve % adsorpsiyonun çok daha iyi olduğu görülür.



Şekil 3.30 *P. ostreatus*'un (4 günlük) Amberlite XAD-2000'e immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

3.4.3. Polistiren köpük ile *P. osteratus*'un immobilizasyonu

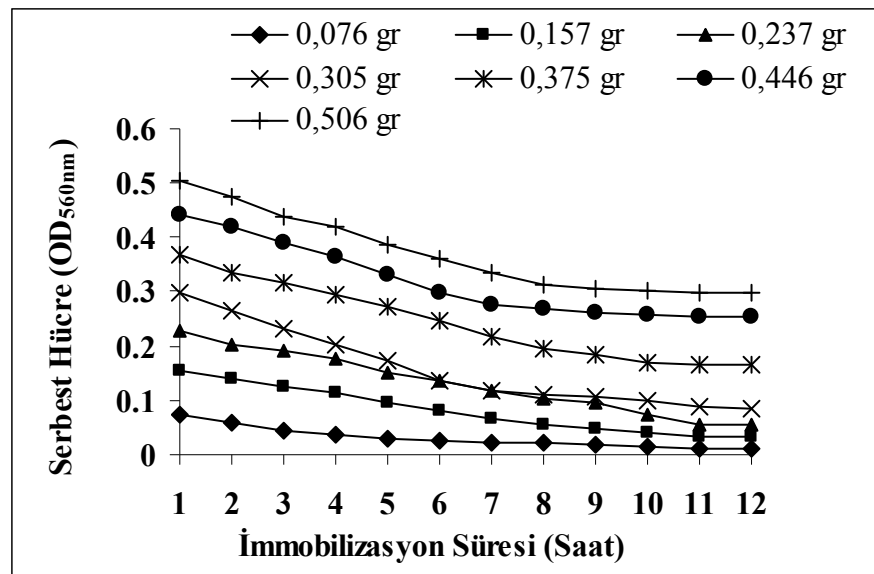
P. ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4°C'de buzdolabında geliştirildi ve 26°C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril 0.9% NaCl ile 100 mL %2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. 3 ve 4 gün 26°C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Her iki (3 ve 4 günlük) oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınıp ağırlıkları ölçülüp, 20 ml tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi. 0,5 gr olarak tartılan polistiren köpük erleninde sterilize edilip, üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. Immobilizasyon, 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirildi.

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.8'de verilmektedir. 2 ve 4 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 80 polistiren köpük üzerine tutunduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.8 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorplanan hücre miktarının değişimi

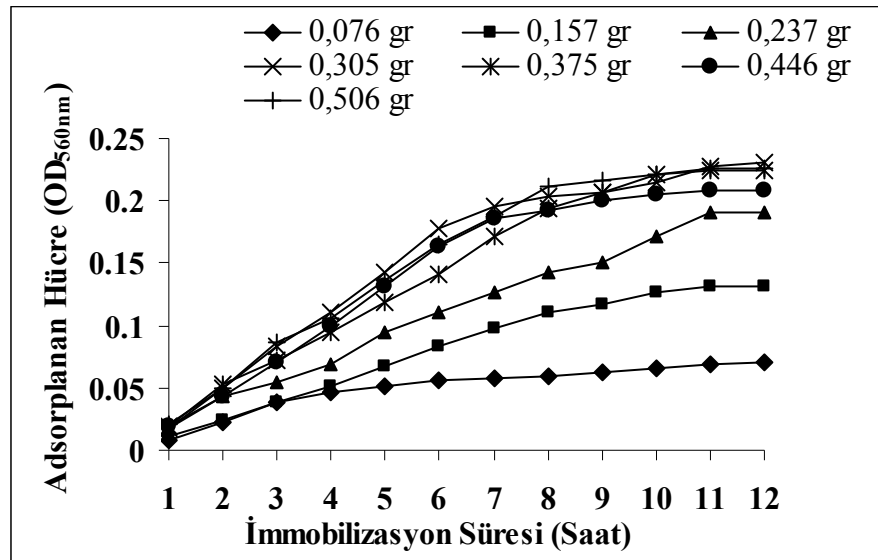
Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet ağırlığı (gr)	0,076	0,157	0,237	0,305	0,375	0,446	0,506
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Polistiren Köpük	86,42	80	77,64	73,02	57,84	45,23	43,13

P. ostreatus'un polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.31 ve Şekil 3.32'de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 ve 4 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir.



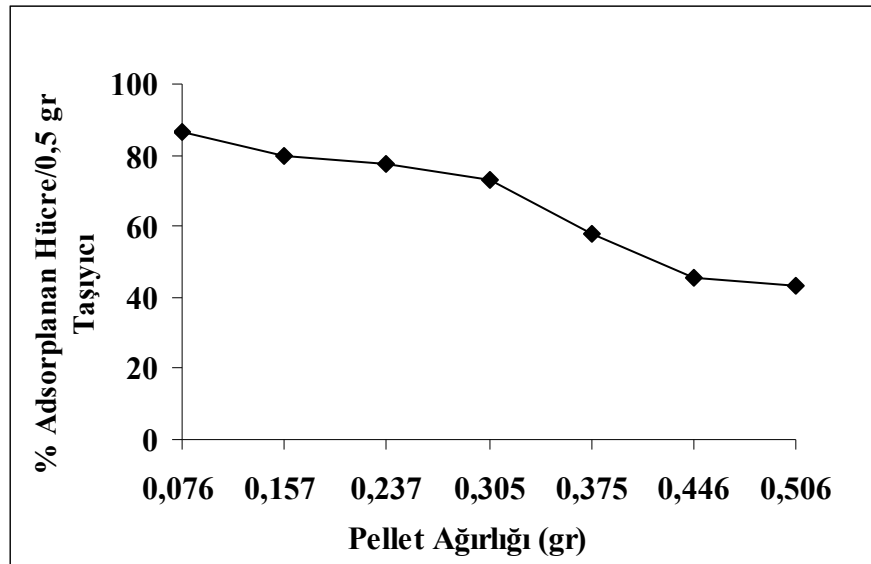
Şekil 3.31 *P. ostreatus*'un (3 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Şekil 3.26'ya bakıldığında 0,5 taşıyıcı üzerine en iyi adsorpsiyonun 0,072 gr hücre içeren ortamda olduğu görülmektedir. Hücre miktarı arttıkça adsorpsiyonun da azaldığı görüldü.



Şekil 3.32 *P. ostreatus*'un (3 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

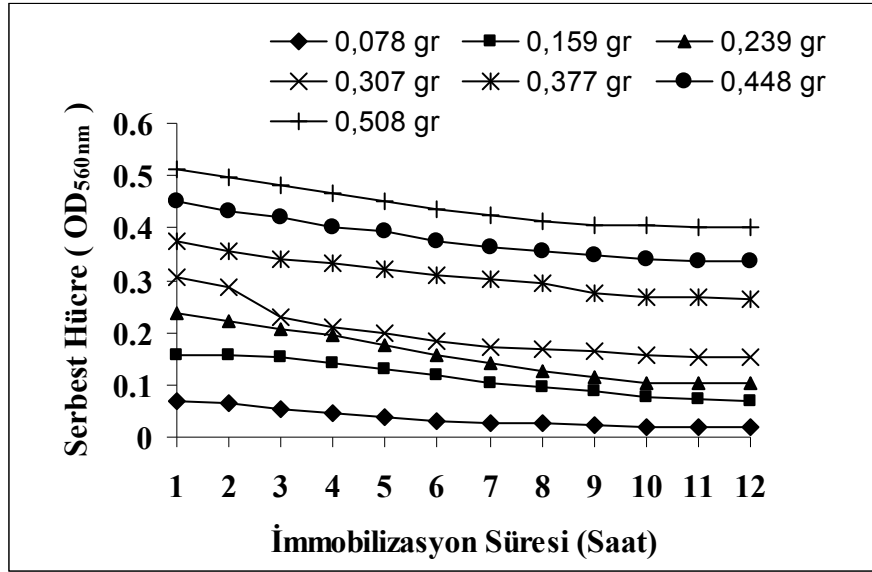
P. ostreatus'un (3 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,076 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.33'de görülmektedir.



Şekil 3.33 *P. ostreatus*'un (3 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

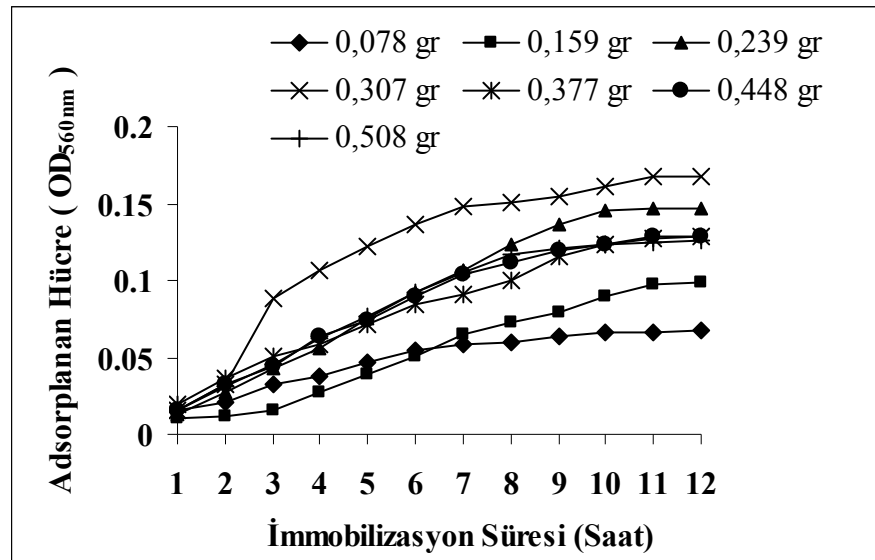
P. ostreatus (4 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.9'de

verilmektedir. 2 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 78,82 polistiren köpük üzerine tutunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.34 *P. ostreatus*'un (4 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

0,5 gr taşıyıcı üzerine en iyi adsorpsiyon Şekil 3.35'e bakıldığında 0,078 gr hücre içeren ortamda olduğu görülmektedir. Ortamdaki hücre miktarı arttıkça adsorpsiyon azalmaktadır.

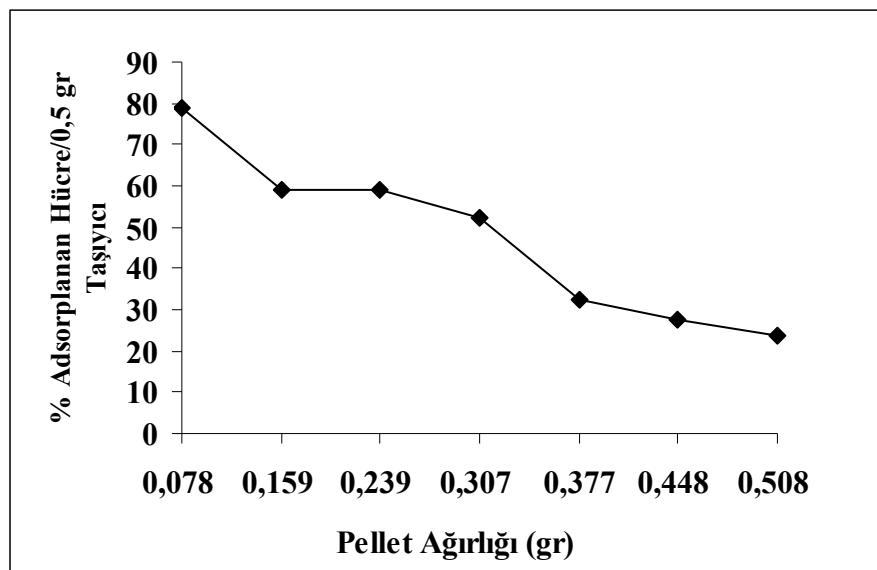


Şekil 3.35 *P. ostreatus*'un (4 günlük) polistiren köpüğe immobilizasyonda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Tablo 3.9 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet ağırlığı (gr)	0,078	0,159	0,239	0,307	0,377	0,448	0,508
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Polistiren Köpük	78,82	58,93	58,8	52,35	32,57	27,47	23,86

P. ostreatus'un polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.43 ve Şekil 3.44'de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 pellet ile 3 günlük *P. ostreatus* immobilizasyonun daha başarılı olduğu söylenebilir. Bu da hücre yaşının yıkımda önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir.



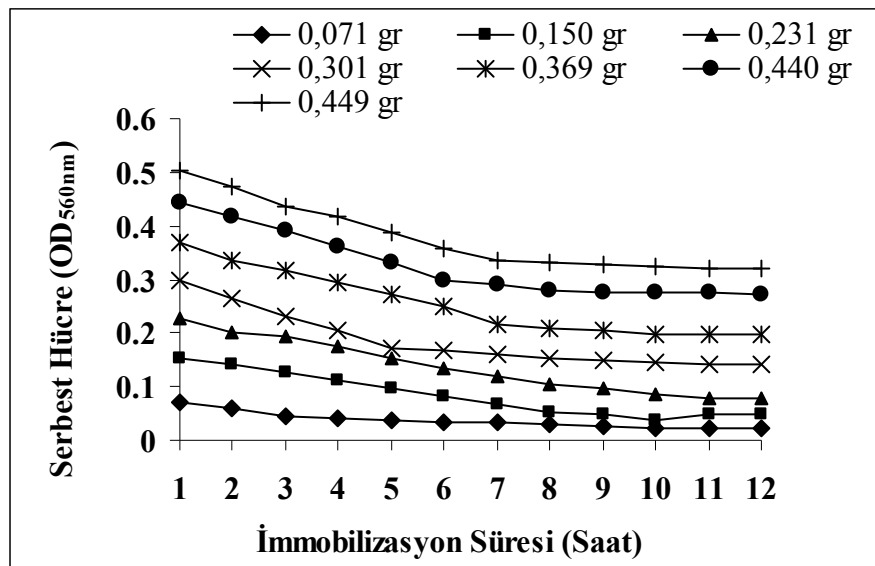
Şekil 3.36. *P. ostreatus*'un (4 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonda %Adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (4 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,078 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.36'de görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda 10 saatte 0,5 gr polistiren köpük üzerine 0,076 gr hücrenin adsorplandığı ve % adsorpsiyonun çok daha iyi olduğu görülür.

3.4.4. Kum ile *P. ostreatus*'un immobilizasyonu

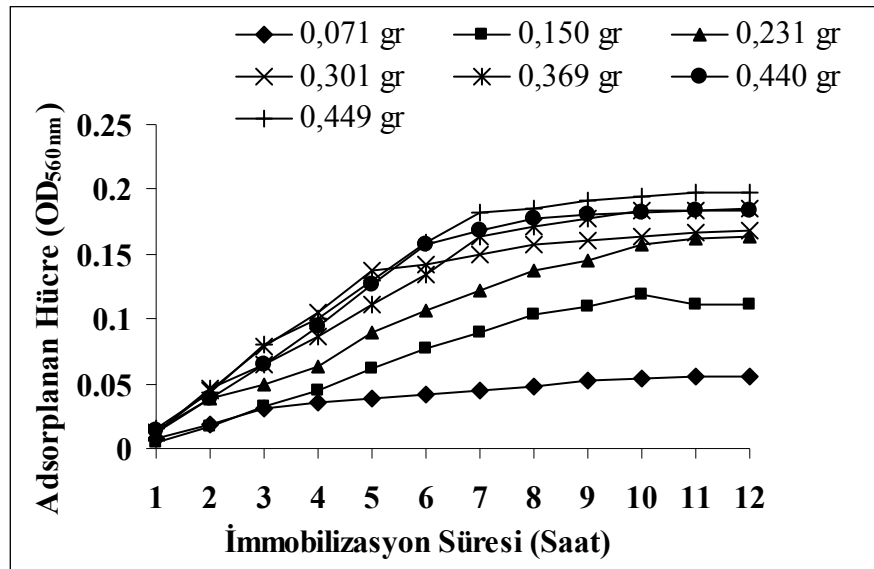
P. ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4 °C'de buzdolabında geliştirildi ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril 0.9% NaCl ile 100 mL %2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. 3 ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Her iki (3 ve 4 günlük) oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınıp ağırlıkları ölçülüp, 20 ml tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi. 0,5 gr olarak tartılan kum erlende sterilize edilip, üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. İmmobilizasyon, 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirildi.

P. ostreatus'un kuma immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.37-3.38'de gösterilmektedir.



Şekil 3.37 *P. ostreatus*'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmasında 0,5 gr taşıyıcı başına 0,071 gr hücre bulunan ortamda en iyi adsorpsiyon gerçekleşmiştir (Şekil 3.38).



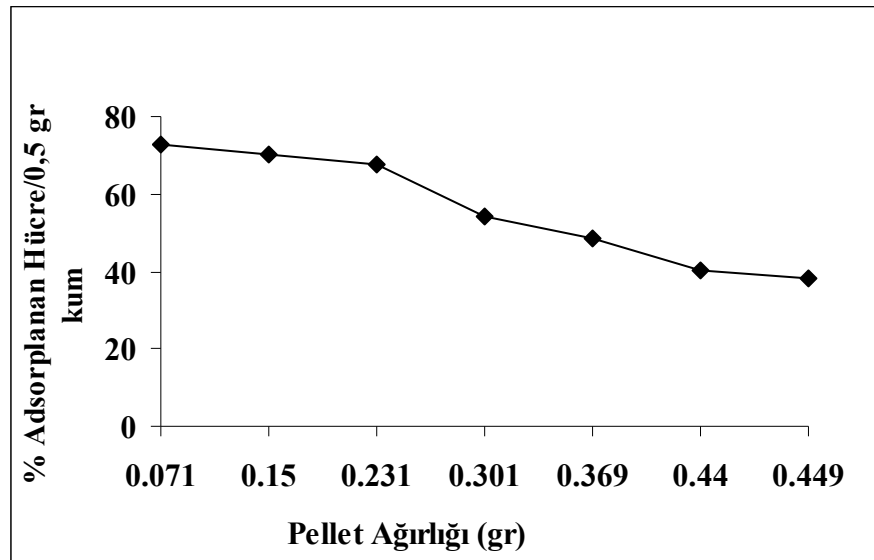
Şekil 3.38 *P. ostreatus*'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.10'da verilmektedir.

Tablo 3.10 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin kum üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

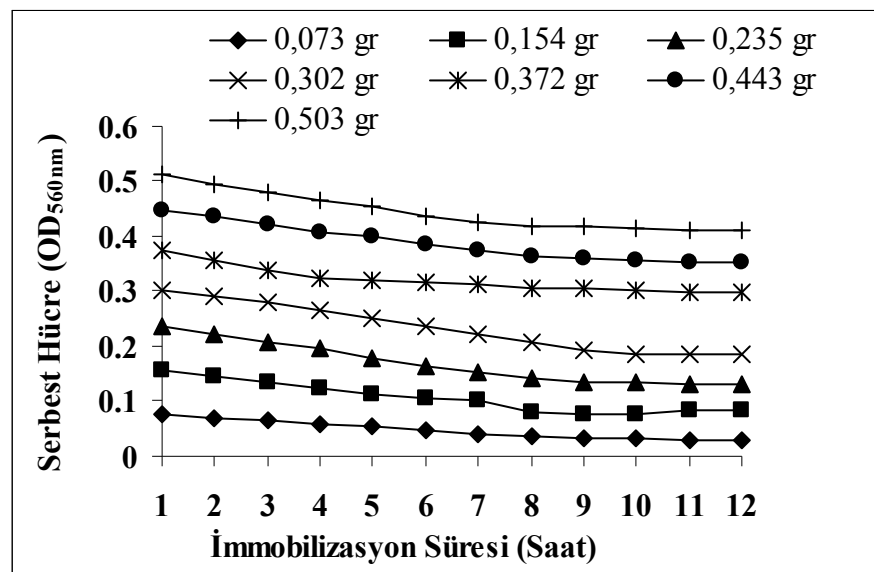
Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr)	0,071	0,150	0,231	0,301	0,369	0,440	0,449
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Kum	72,73	70,25	67,63	54,37	48,43	40,26	38,03

2 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 72,73 kum üzerine tutunduğu belirlenmiştir. *P. ostreatus*'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,071 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.39'de görülmektedir.



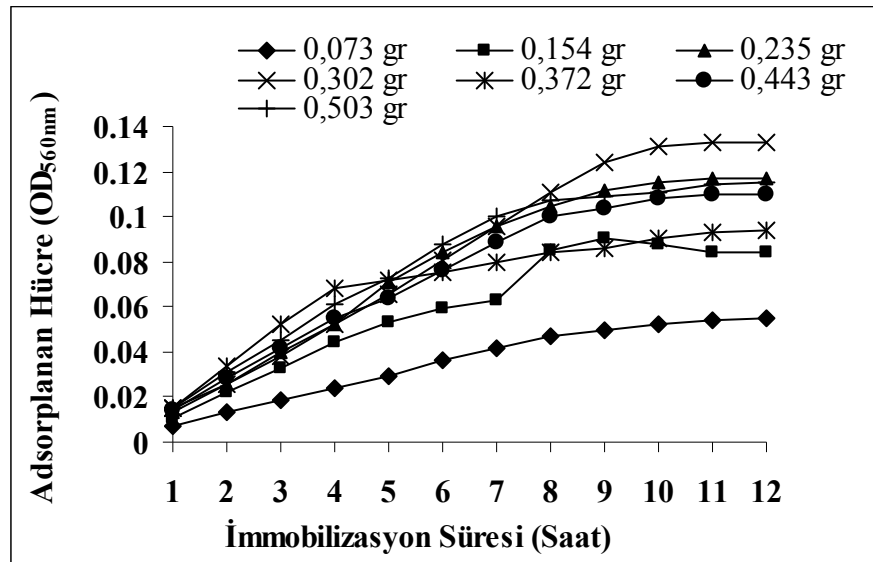
Şekil 3.39 *P. ostreatus*'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (4 günlük) kuma immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.40-3.41'de gösterilmektedir.



Şekil 3.40 *P. ostreatus*'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Şekil 3.41'de 0,5 gr taşıyıcı başına 0,073 gr hücre bulunan ortamda adsorpsiyonun en iyi olduğu görülmektedir. Ortamdaki hücre miktarı attıkça kumun yüzey özelliklerinden dolayı adsorpsiyon azalmaktadır.



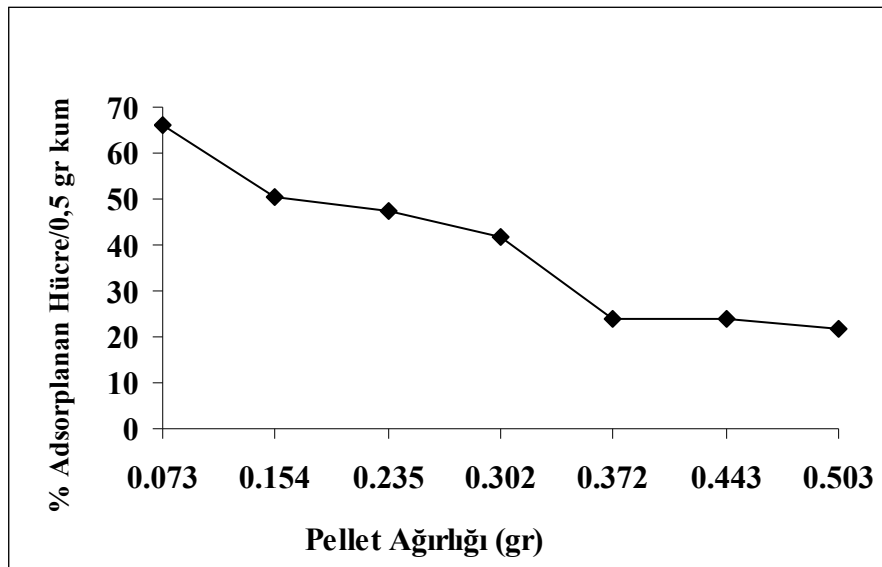
Şekil 3.41 *P. ostreatus*'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (4 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.11'de verilmektedir.

Tablo 3.11 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin kum üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr)	0,073	0,154	0,235	0,302	0,372	0,443	0,503
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Kum	66,26	50,60	47,18	41,96	24,04	23,76	21,86

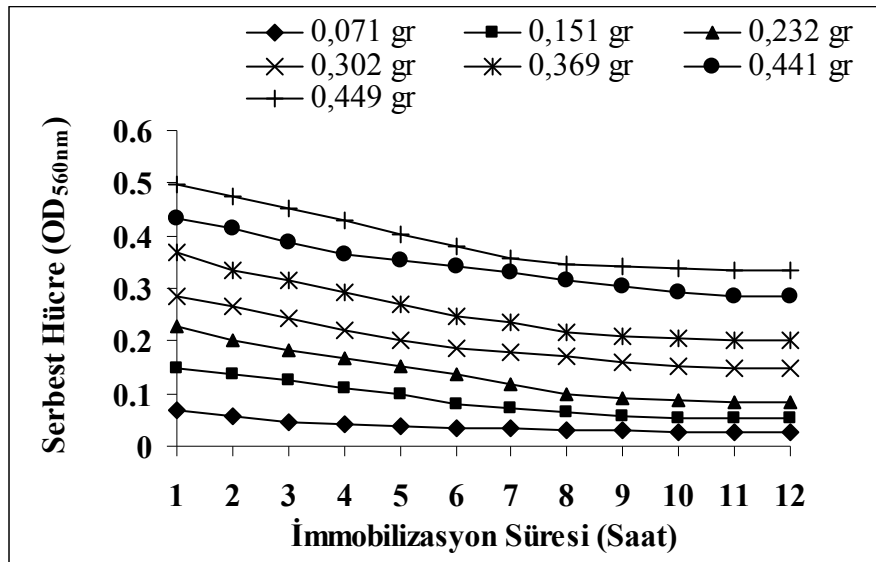
Kum üzerine immobilizasyon işlemi, 2 Pellet (0,073 gr) ile yaklaşık 10 saat içinde tamamlanmış olup % 66,26 adsorpsiyon oranında tutunduğu hesaplanmıştır. *P. ostreatus*'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,073 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.42'de görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük) kum üzerine immobilizasyonunda 10 saatte 0,5 gr kum üzerine 0,071 gr hücrenin adsorplandığı ve % adsorpsiyonun çok daha iyi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.42 *P. ostreatus*'un (4 günlük) kum üzerine immobilizasyonda % adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

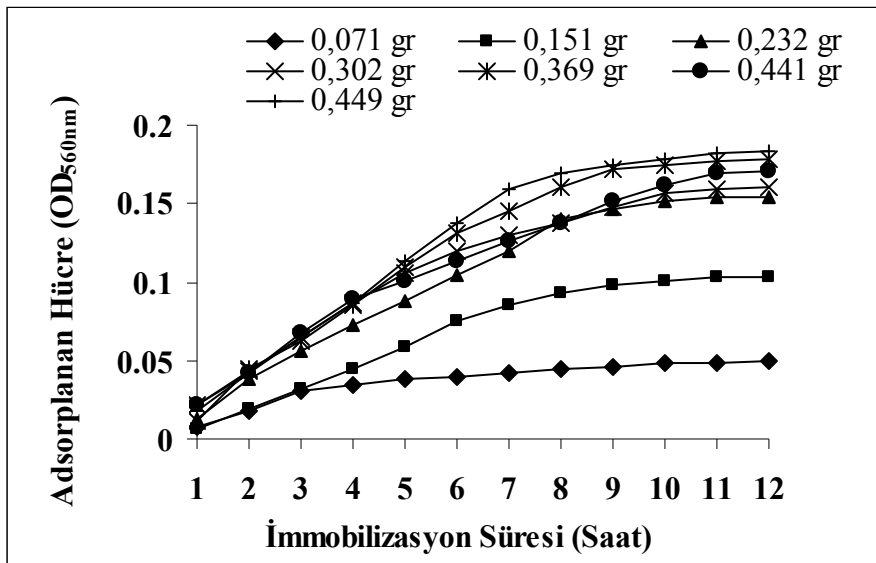
3.4.5. Amberlite XAD-7 ile *P. osteratus*'un immobilizasyonu

P. ostreatus (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt ve 2,5 mg/L fluoren içeren ortamlarda 4 °C'de buzdolabında geliştirildi ve 26 °C'de 3 gün aktive edildi. Miseller steril 0.9 % NaCl ile 100 mL % 2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. 3 ve 4 gün 26 °C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inoküle edildi. Her iki (3 ve 4 günlük) oluşan pelletlerden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 adet alınıp ağırlıkları ölçülüp, 20 mL tampon (Asetik asit/Sodyum asetat pH 4,5) ilave edilerek homojenize edildi. 0,5 gr olarak tartılan Amberlite XAD-7 erlende sterilize edilip, üzerlerine homojenize edilmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. İmmobilizasyon, 12 saat boyunca 60 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirildi.



Şekil 3.43 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Şekil 3.44'de 0,5 gr taşıyıcı üzerine 0,071 gr hücre içeren ortamda adsorpsiyon en iyidir. Ortamdaki hücre miktarı arttıkça adsorpsiyon Amberlite XAD-7'nin yüzey özelliklerinden dolayı azaldı.



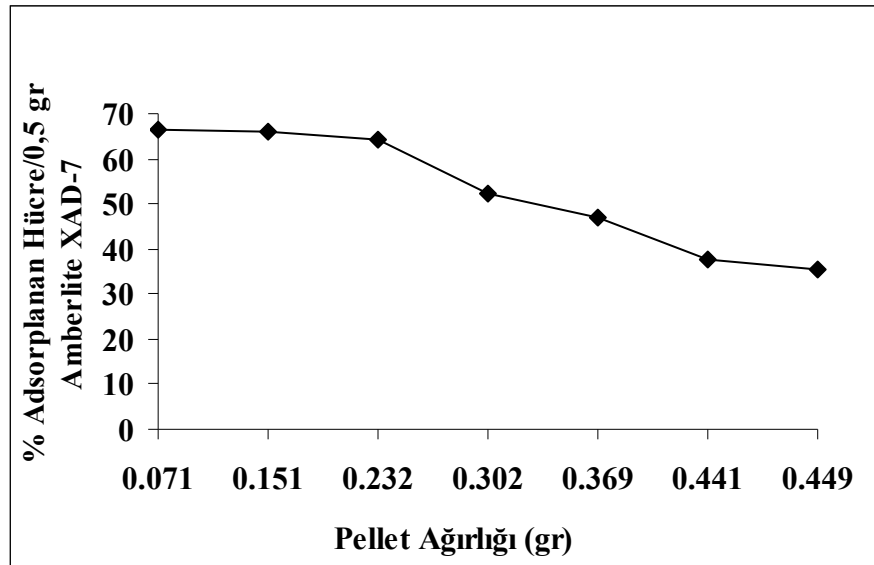
Şekil 3.44 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus (3 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak %Adsorplanan hücre miktarının değişimi Tablo 3.12'de verilmektedir. 2 ve 4 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 66 Amberlite XAD-7 üzerine tutunduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.12 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr)	0,071	0,151	0,232	0,302	0,369	0,441	0,449
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-7	66,67	66,02	64,44	52,12	46,97	37,58	35,46

P. ostreatus'un polistiren köpüğe immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.43-3.44'de gösterilmektedir. Grafikler incelendiğinde 2 ve 4 pellet ile immobilizasyonun 10 saatte tamamlandığı söylenebilir.



Şekil 3.45 *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonda % adsorpsiyonun pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

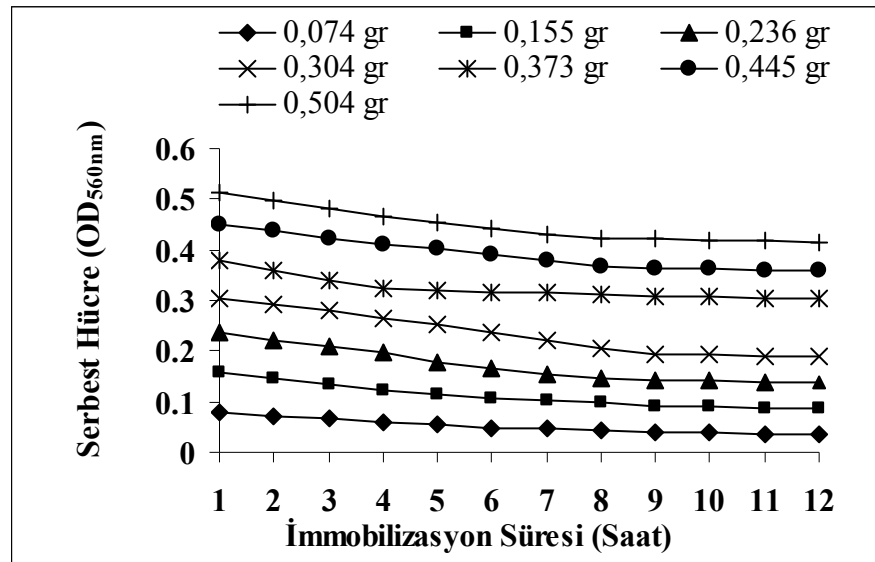
P. ostreatus'un (3 günlük) polistiren köpük üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı, grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,071 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu Şekil 3.45'de görülmektedir.

Tablo 3.13 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
Pellet Ağırlığı (gr)	0,074	0,155	0,236	0,304	0,373	0,445	0,504
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-7	59,52	48,50	44,98	40,88	22,70	22,84	21,06

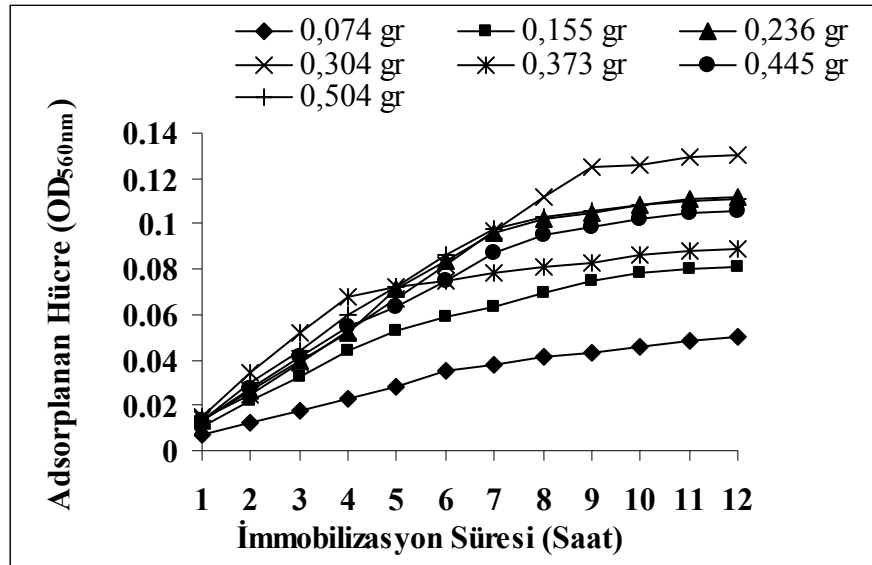
P. ostreatus (4 günlük) hücreleriyle gerçekleştirilen immobilizasyonda hücre miktarına bağlı olarak % Adsorpsiyonun değişimi Tablo 3.13’da verilmektedir. 2 Pellet ile yaklaşık 10 saat içinde % 59,52 Amberlite XAD-7 üzerine tutunduğu belirlenmiştir.

P. ostreatus’un Amberlite XAD-7 immobilizasyonda ortamdaki serbest ve adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.46 ve Şekil 3.47’de gösterilmektedir.



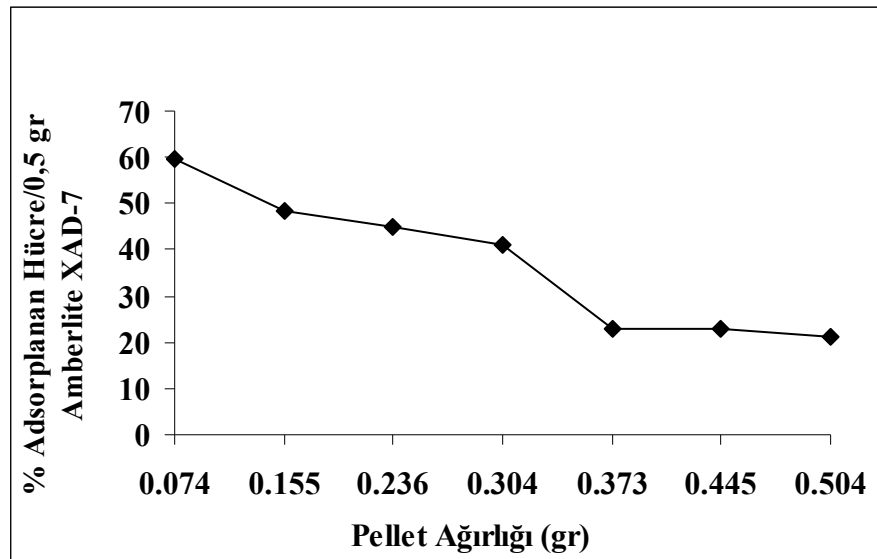
Şekil 3.46 *P. ostreatus*’un (4 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda ortamdaki serbest hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

Şekil 3.47’de görüldüğü gibi 0,5 gr taşıyıcı başına 0,074 gr hücre içeren ortamda adsorpsiyon en iyi dir. 3 günlük *P. ostreatus*’un kullanıldığı immobilizasyon işlemlerinde adsorpsiyonun daha iyi olduğu görülmüştür.



Şekil 3.47 *P. ostreatus*'un (4 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda adsorplanan hücre miktarının zamana bağlı olarak değişimi

P. ostreatus'un (4 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda pellet ağırlığına karşı % adsorplanan hücre miktarı grafiğe geçirildiğinde 0,5 gr taşıyıcı başına 0,074 gr (2 pellet) hücrenin adsorpsiyonunun en iyi olduğu olduğu Şekil 3.48'de görülmektedir. Bütün elde edilen veriler değerlendirildiğinde *P. ostreatus*'un (3 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonunda 10 saatte 0,5 gr Amberlite XAD-7 üzerine 0,076 gr hücrenin adsorplandığı ve % adsorpsiyonun çok daha iyi olduğu görülmektedir.



Şekil 3.48 *P. ostreatus*'un (4 günlük) Amberlite XAD-7 üzerine immobilizasyonda %Adsorplanan hücre miktarının, pellet ağırlığına bağlı olarak değişimi

Tablo 3.14'de farklı taşıyıcılar üzerine 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin % adsorpsiyon değerleri görülmektedir. Burada 0,5 gr ponza başına en iyi immobilizasyon 0,233 gr (6 Pellet) hücre ile 10 saatte gerçekleşmiştir. % 100 adsorpsiyonun olduğu 0,072 gr (2 Pellet) ve 0,153 gr (4 Pellet) hücre immobilizasyonlarında ponza yüzeyinin porozitesi ve bu porların tamamen dolmadığı da düşünüldüğünde en iyi adsorpsiyonun 0,5 gr ponza başına 0,233 gr (6 Pellet) hücre olduğu söylenebilir. Ponza, Amberlite XAD-2000 ile karşılaştırıldığında; daha fazla hücre adsorpladığı için immobilizasyonun daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.14 3 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonunda %Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (3 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Ponza	100	100	97,91	72,49	57,07	44,39	42,36
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-2000	91,14	82,82	74,59	71,47	58,03	45,97	42,23
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Polistiren Köpük	86,42	80	77,64	73,01	57,84	45,24	43,13
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Kum	72,73	70,25	67,63	54,37	48,43	40,26	38,03
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-7	66,67	66,02	64,44	52,12	46,97	37,58	35,46

P. ostreatus'un 4 günlük hücreler ile yapılan immobilizasyon çalışmalarının, 3 günlük hücrelerle yapılan çalışmalarına göre, taşıyıcı yüzeyine daha az tutunmanın olduğu hesaplandı. Bu da immobilizasyonda hücre yaşı faktöründe önemli olduğunu göstermektedir. 3 ve 4 günlük hücrelerin taşıyıcı yüzeylerine adsorpsiyonu kendi içlerinde karşılaştırılırsa en iyi adsorpsiyon ponza yüzeyine gerçekleşmiştir (Tablo 3.15).

Tablo 3.15 4 günlük *P. ostreatus* hücrelerinin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonunda % Adsorplanan hücre miktarının değişimi

Pellet Sayısı (4 Günlük)	2	4	6	8	10	12	14
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Ponza	93,02	92,98	86,11	70,22	46,19	43,47	42,94
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-2000	82,14	59,88	59,76	53,14	32,91	28,17	24,48
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Polistiren Köpük	78,82	58,93	58,8	52,35	32,57	27,47	23,86
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Kum	66,26	50,60	47,18	41,96	24,04	23,76	21,86
% Adsorplanan Hücre/ 0,5 g Amberlite XAD-7	59,52	48,50	44,98	40,88	22,70	22,84	21,06

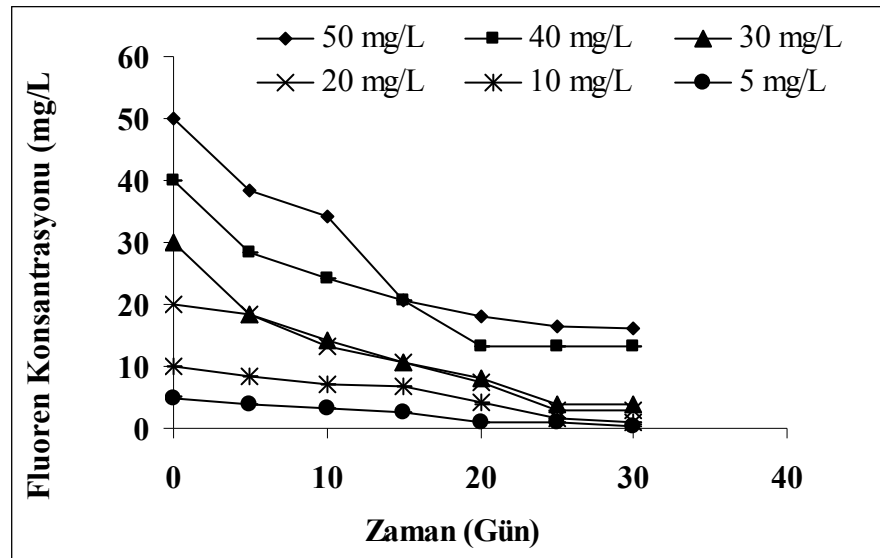
Sonuç olarak şu söylenebilir ki; *P. ostreatus*'un 3 günlük hücreleri ile 0,5 gr ponza üzerine 0,233 gr hücre (6 pellet) içeren ortamlarda adsorpsiyonun 10 saat içinde oldukça iyi bir şekilde tamamlandığı söylenebilir.

3.5. İmmobilize Hücrelerle Fluoren Yıkımı

3.5.1 Çalkalamalı kültürlerde yıkım

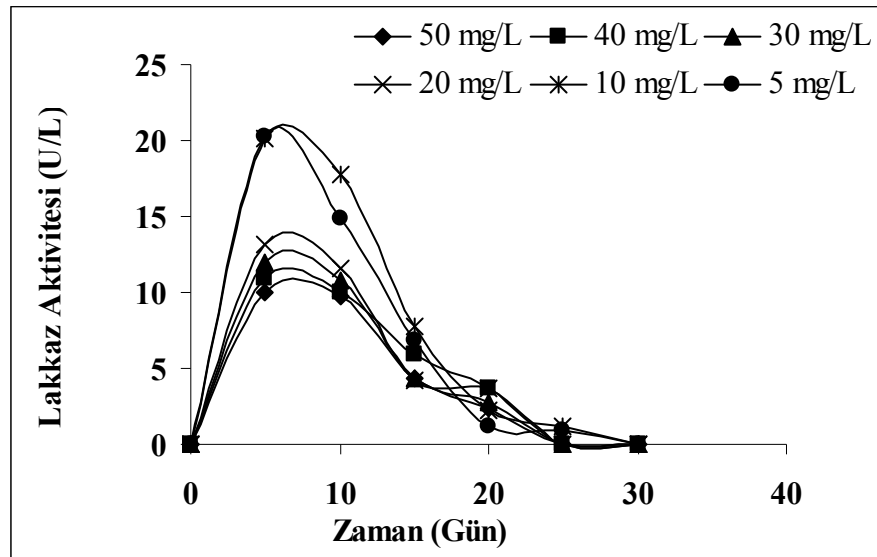
Serbest hücrelerle yapılan çalışma seçilen immobilize fungus ile de gerçekleştirildi. Kesikli çalkalamalı sistemde fluoren'in yıkımı incelendi. Kesikli çalkalamalı reaktör içerisinde 1,0 g hücre aşılması yapılarak, 1,5 g ponza üzerine 50 mL fluoren (50-40-30-20-10-5 mg/L) çözeltisi ilave edildi ve erlenler 26°C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. fluoren'i degrades edebilme yeteneği 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenerek hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-12, Ek-13, Ek-14, Ek-15, Ek-16, Ek-17) verilmektedir.

Kromatogramlardan elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde, en iyi yıkımın 5 mg/L fluoren içeren ortamlarda olduğu belirlendi (Şekil 3.49). *Pleurotus ostreatus* (2) içermeyen ortamlara kontrol amaçlı olarak farklı konsantrasyonlarda fluoren ilave edilip, 30 gün süre ile izlendi.

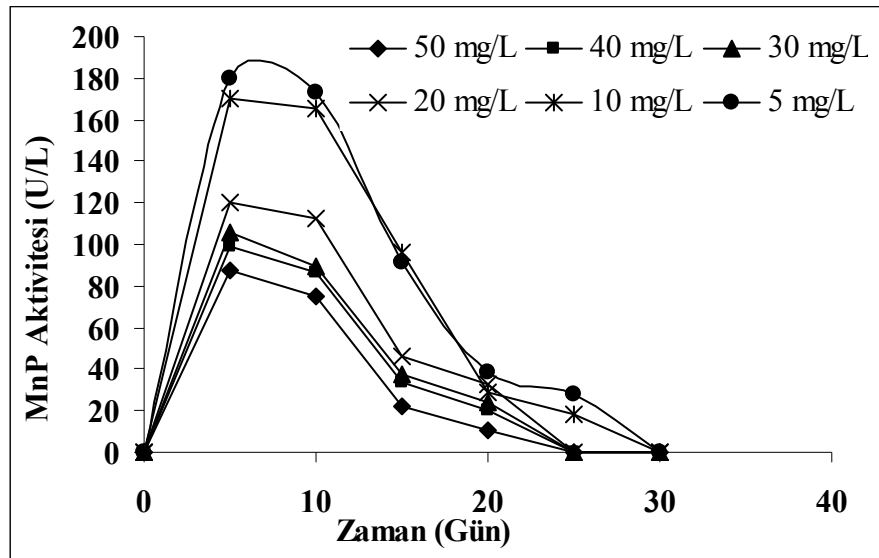


Şekil 3.49 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyodegradasyonu

P. ostreatus (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 30. gün her iki enzimde aktivite göstermedi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.50-3.51'de verildi.



Şekil 3.50 İmmobilize *P. ostreatus* (2) Lakkaz enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi



Şekil 3.51 İmmobilize *P. ostreatus* (2) MnP enzim aktivitesinin farklı konsantrasyonlardaki fluoren içeren ortamlardaki değişimi

İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlarda fluoren yıkımı sonucunda elde edilen veriler yardımıyla yıkım hızına karşı konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.67). Elde edilen % Biyodegradasyon değerleri Tablo 3.16’de verildi. En iyi yıkım 5 mg/L fluoren konsantrasyonunda %89,16 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.16 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluoren’in biyodegradasyon değerleri

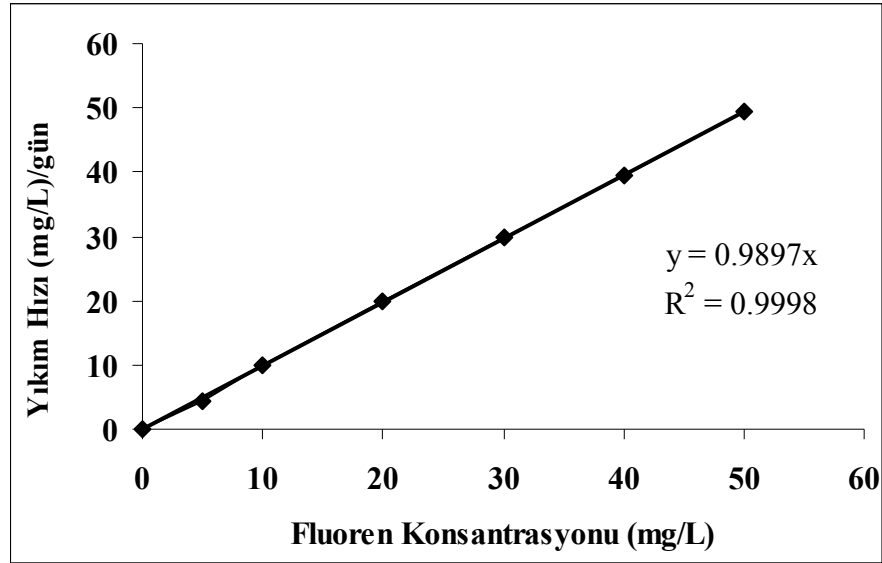
Fluoren(mg/L)	% Biyodegradasyon
50	65,15
40	64,04
30	83,16
20	84,30
10	88,71
5	89,16

Fluorenin yıkımı sırasındaki biyodegradasyon hızı (Şekil 3.52) ve biyodegradasyon etkinliği (Şekil 3.53) şu eşitliklerle hesaplanmıştır.

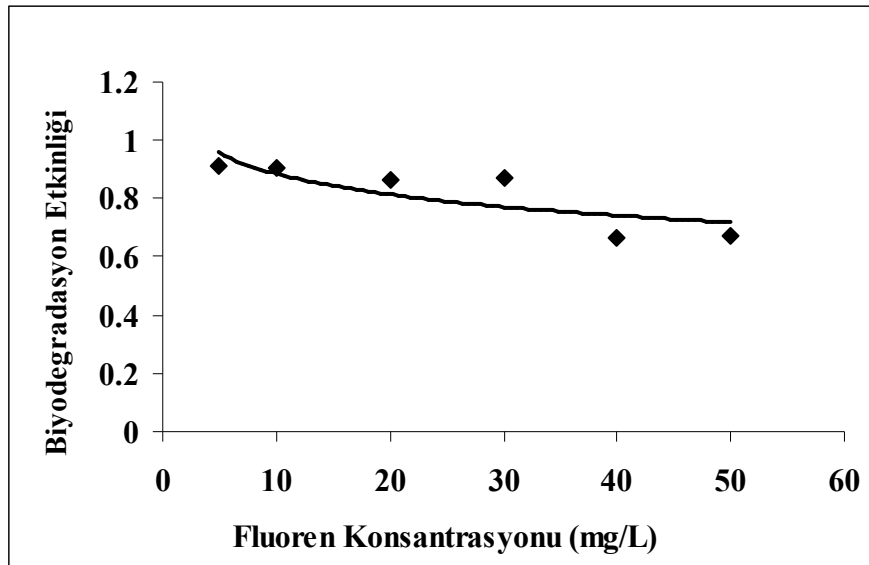
Biyodegradasyon etkinliği, $\eta = 1 - (C/C_0)$

Biyodegradasyon hızı = $(C_0 - C) / \text{İnkübasyon zamanı}$

C_0 : Başlangıç konsantrasyonu, C: Son konsantrasyonu



Şekil 3.52 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluorene karşı yıkım hızının değişimi



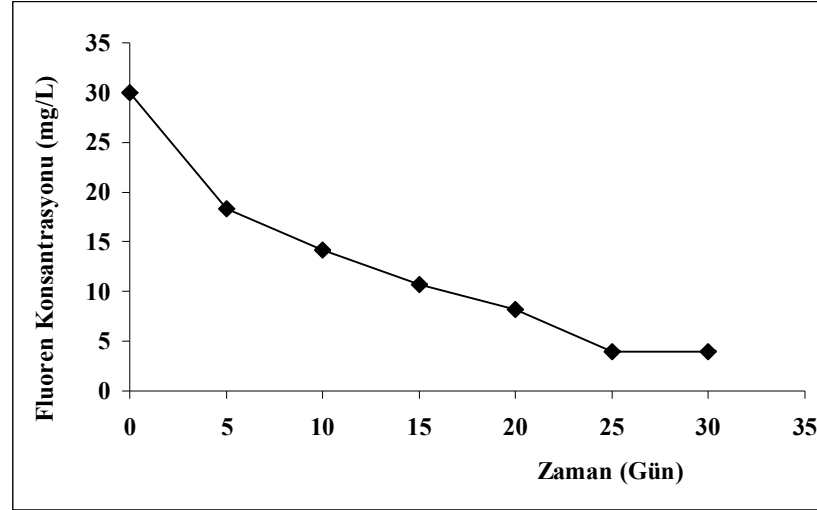
Şekil 3.53 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile farklı konsantrasyonlardaki fluorene karşı biyodegradasyon etkinliğinin değişimi

Kesikli çalkalamalı reaktörde, farklı konsantrasyonlardaki fluorenin yıkımına ilişkin, biyodegradasyon etkinliğini belirlemek amacı ile hesaplamalar yapıp grafik çizildi (Şekil 3.53). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; ortamdaki fluoren konsantrasyonu arttıkça, biyodegradasyon etkinliğide azalmaktadır. Bu da düşük fluoren konsantrasyonlarında yıkımın daha hızlı (Şekil 3.52) olduğunun bir diğer göstergesidir.

3.5.2. Kesikli Dolgu Yatak Reaktöründe Yıkımı

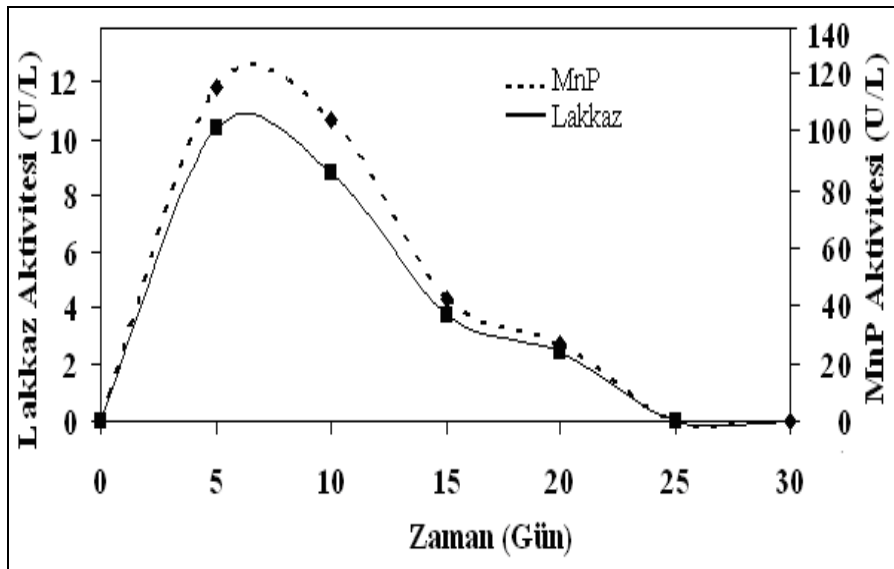
Fluoren'in (30 mg/L) kesikli dolgu yatak reaktöründe immobilize hücrelerle yıkımı 30 gün periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı HPLC ile izlenerek hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-18) verilmektedir.

Kromatogramlardan elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde (Şekil 3.54) 30 mg/L fluoren'in kesikli çalkalamalı sistemde immobilize *P. ostreatus* (2) hücreleri tarafından %82,46 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.54 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi

Kesikli dolgu yatak reaktöründe immobilize *P. ostreatus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 25. ve 30. gün her iki enzimde aktivite göstermemiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.55' de verildi.

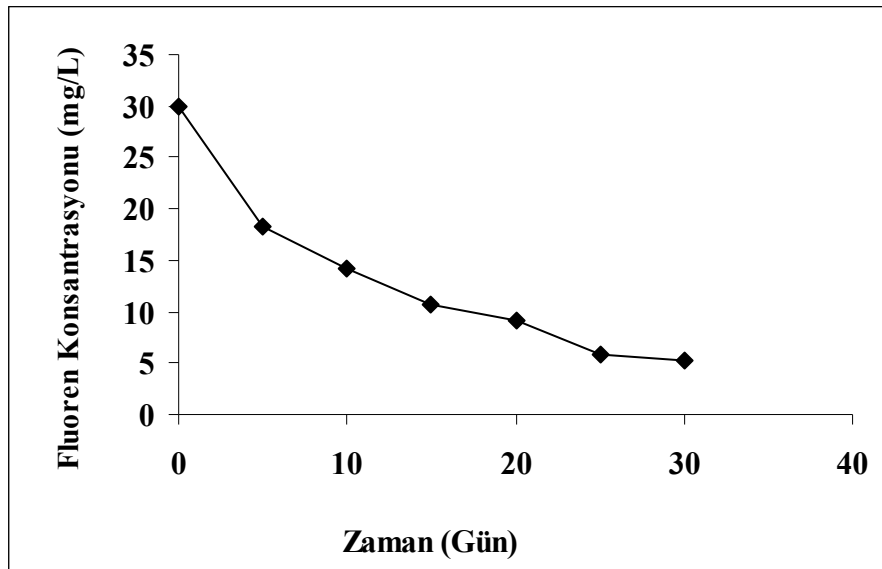


Şekil 3.55 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi

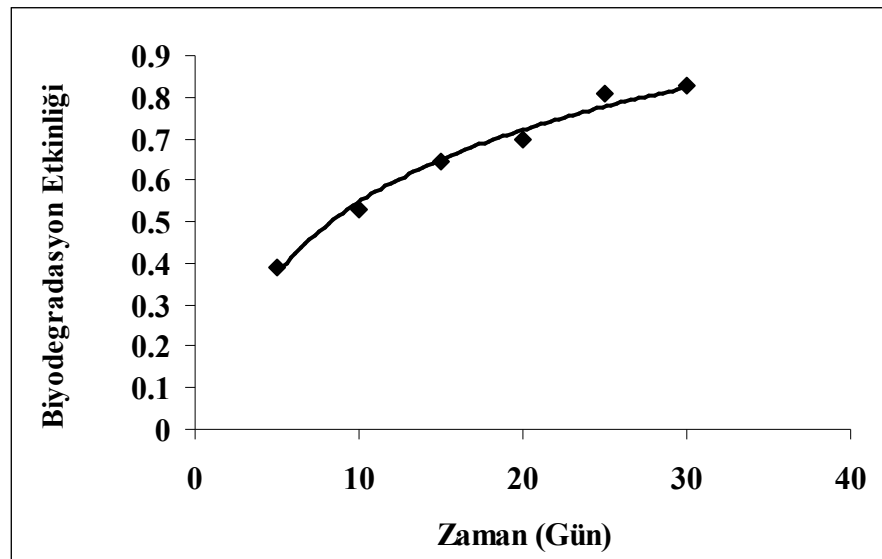
3.5.2.1. İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Sentetik Atık Su (1)'deki Yıkımının İzlenmesi

Kesikli dolgu yatak reaktöründe 30 mg/L fluoren içeren inorganik kirlilik oranı yüksek sentetik atık su (1) ile çalışıldı. Yapılan çalışmada 30 gün içinde periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı, HPLC'de analiz edilerek hesaplandı. Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-19) verilmiştir.

Kromatogramlardan elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde (Şekil 3.56) sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in biyolojik yıkımı, immobilize *P. ostreatus* (2) hücreleri tarafından kesikli dolgu yatak reaktöründe % 78,96 olarak gerçekleştirildi. Biyodegradasyon etkinlikleri hesaplanarak, inkübasyon süresi boyunca arttığı ve 25. ve 30. günlerde çok fazla değişmediği belirlendi (Şekil 3.57). Buradan yola çıkılarak immobilize *P. ostreatus* (2)'nin biyodegradasyon etkinliğinin oldukça iyi olduğu söylenebilir.

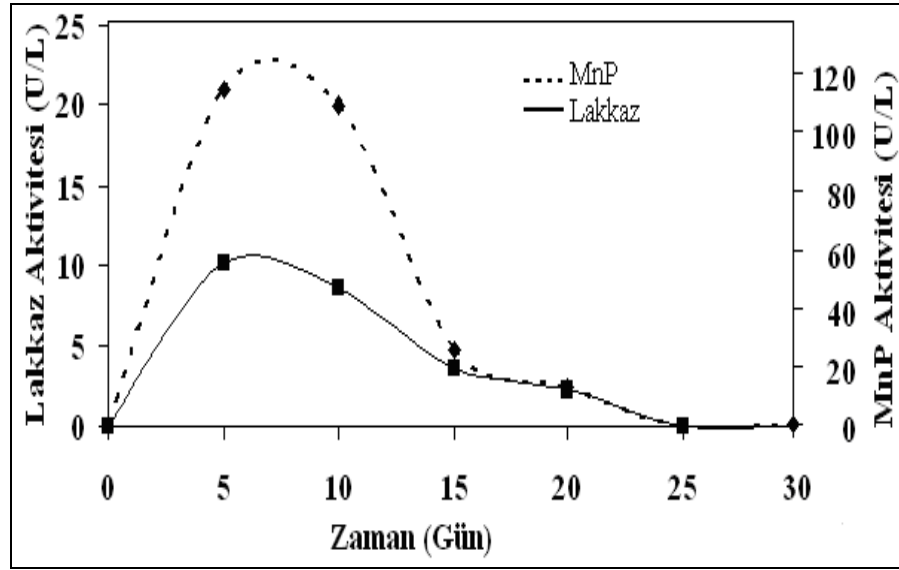


Şekil 3.56 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluorene'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 3.57 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluorene'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak biyodegradasyon etkinliğinin değişimi

Kesikli dolgu yatak reaktöründe immobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık sudaki 30 mg/L fluorene'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 25. ve 30. gün her iki enzimde aktivite göstermemiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.58' de verildi.

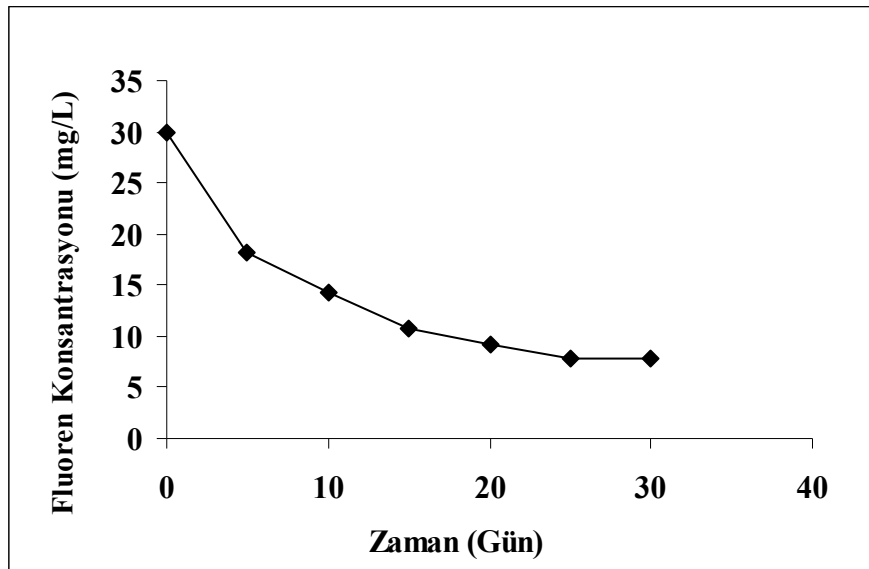


Şekil 3.58 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi

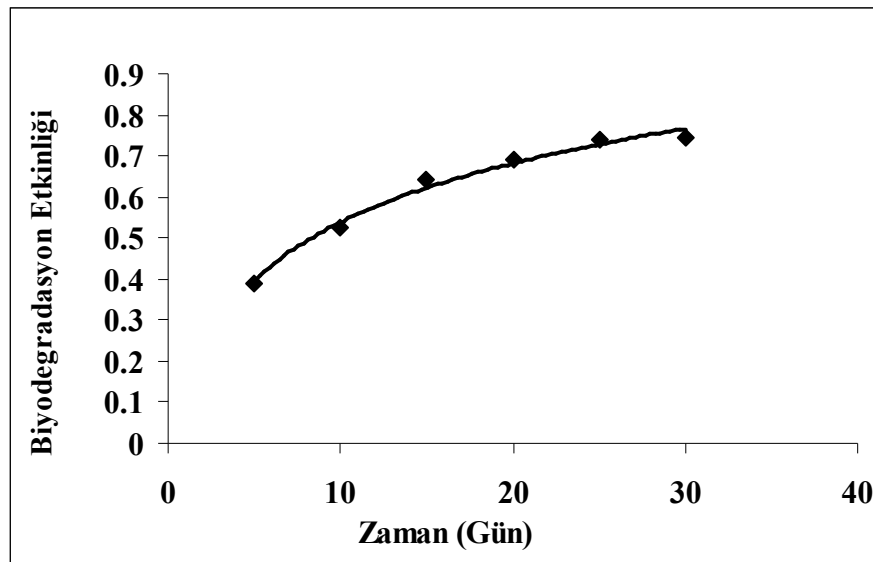
3.5.2.2. İmmobilize Hücrelerle Fluoren'in Sentetik Atık Su (2)'deki Yıkımının İzlenmesi

Kesikli dolgu yatak reaktöründe 30 mg/L fluoren içeren organik kirlilik oranı yüksek sentetik atık su (2) ile çalışıldı. Yapılan çalışmada 30 gün içinde periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı, HPLC'de analiz edilerek hesaplandı. Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-20) verilmektedir.

Kromatogramlardan elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde (Şekil 3.59) sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in biyolojik yıkımı, immobilize *P. ostreatus* (2) hücreleri tarafından kesikli dolgu yatak reaktöründe %70,48 olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler yardımı ile biyodegradasyon etkinlikleri hesaplandı. Bunların inkübasyon süresi boyunca arttığı ve 25. ve 30. günlerde çok fazla değişmediği belirlendi (Şekil 3.60). Elde edilen verilere göre immobilize *P. ostreatus* (2)'nin biyodegradasyon etkinliğinin oldukça iyi olduğu tespit edilmiştir.

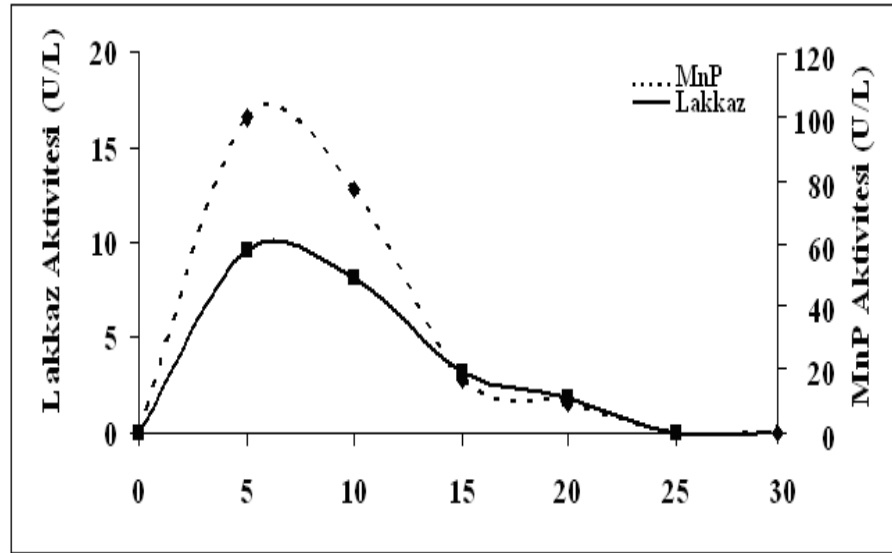


Şekil 3.59 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 3.60 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonun zamana bağlı olarak biyodegradasyon etkinliğinin değişimi

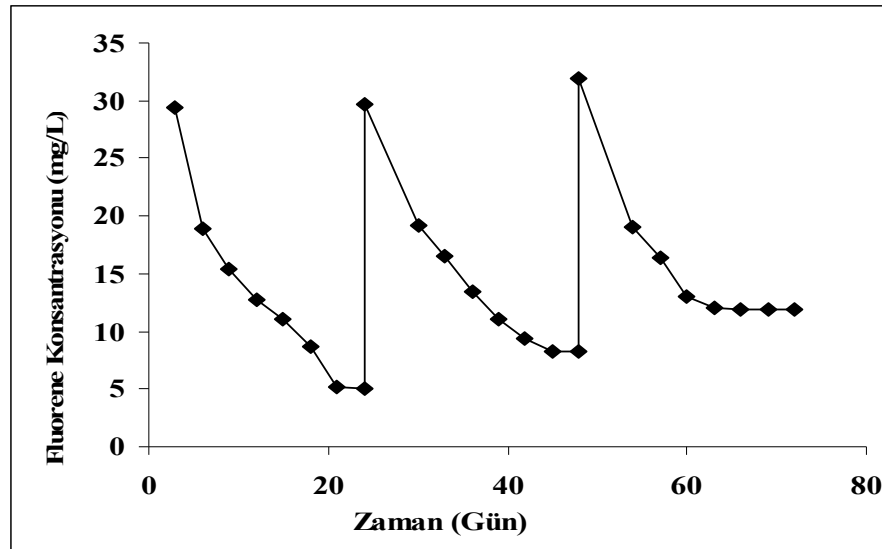
Kesikli dolgu yatak reaktöründe immobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu sırasında lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin değişimleri izlenip bunların yıkımdaki rolleri araştırıldı. Periyodik olarak ölçülen enzim aktiviteleri sonucunda 25. ve 30. gün her iki enzimde aktivite göstermemiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.61'de verildi.



Şekil 3.61 İmmobilize *P. ostreatus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründeki biyodegradasyonunda Lakkaz ve MnP enzim aktivitelerinin zamanla değişimi

3.5.3. İmmobilize *Pleurotus ostreatus* ile Ardışık Fluoren Yıkımı

İmmobilize *P. ostreatus* ile kesikli dolgu yatak reaktörde 30 mg/L fluoren'in yıkımı ardışık olarak yapıldı. Yapılan çalışmada örnekler 3'er gün aralıklarla alındı. 24. günün sonunda sisteme tekrar 30 mg/L fluoren içeren ortam ilave edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Fluoren konsantrasyonu zamana karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.62 elde edildi.



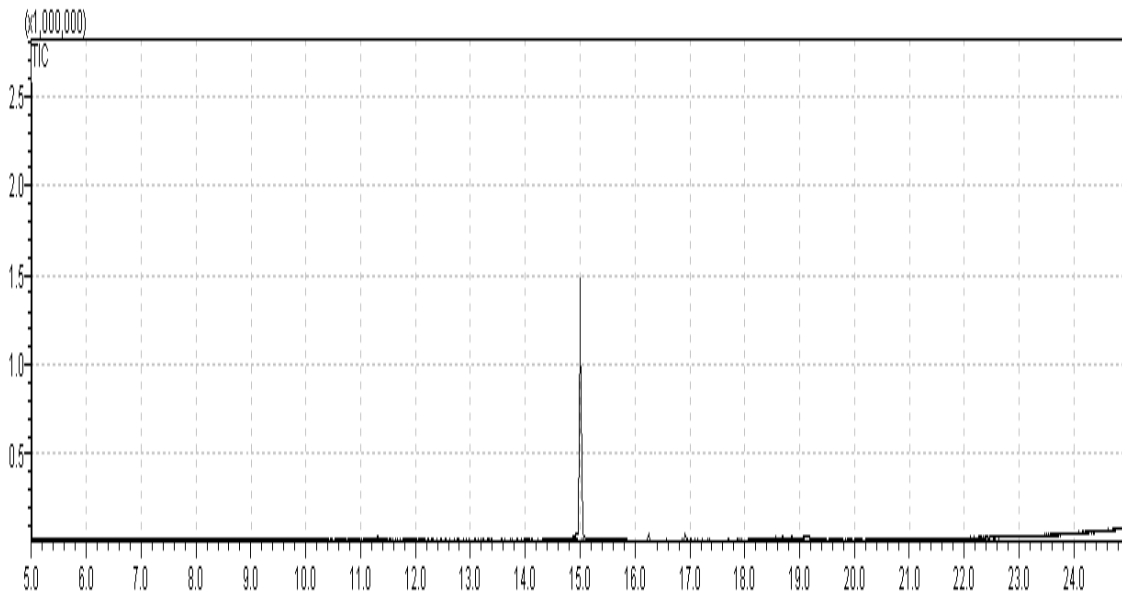
Şekil 3.62 İmmobilize *P. ostreatus* ile Ardışık Fluoren Yıkımı

Tablo 3.17 İmmobilize *P. ostreatus* ile fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktörde ardışık yıkımında % biyodegradasyon değerleri

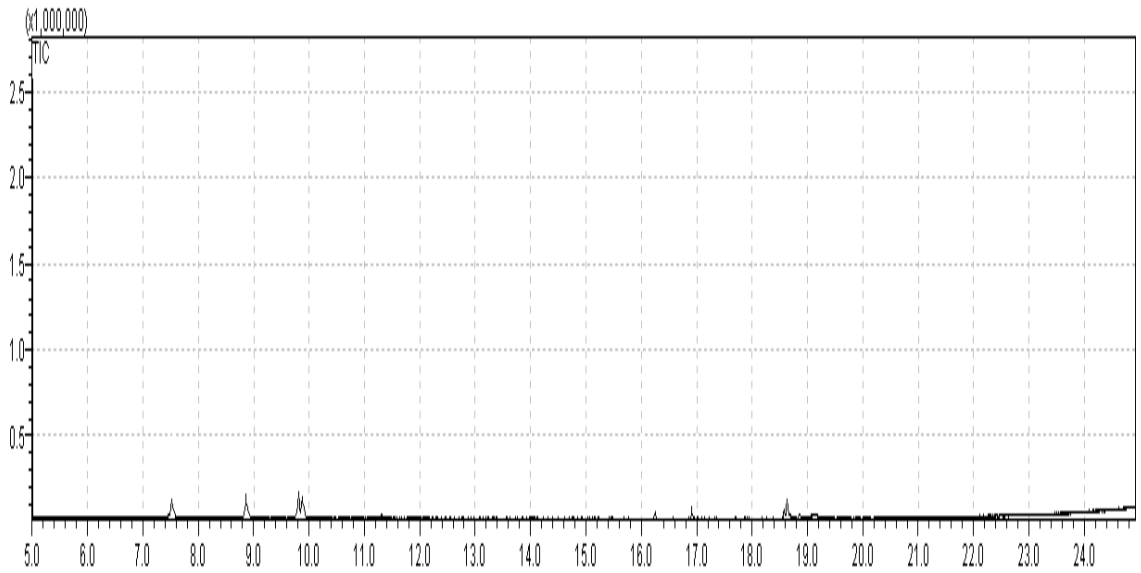
Gün	% Biyolojik giderim
24	82,87
48	72,39
72	62,89

3.5.4. Fluoren'in Yıkımı Sonrası Alınan Örneklerin Analiz Sonuçları

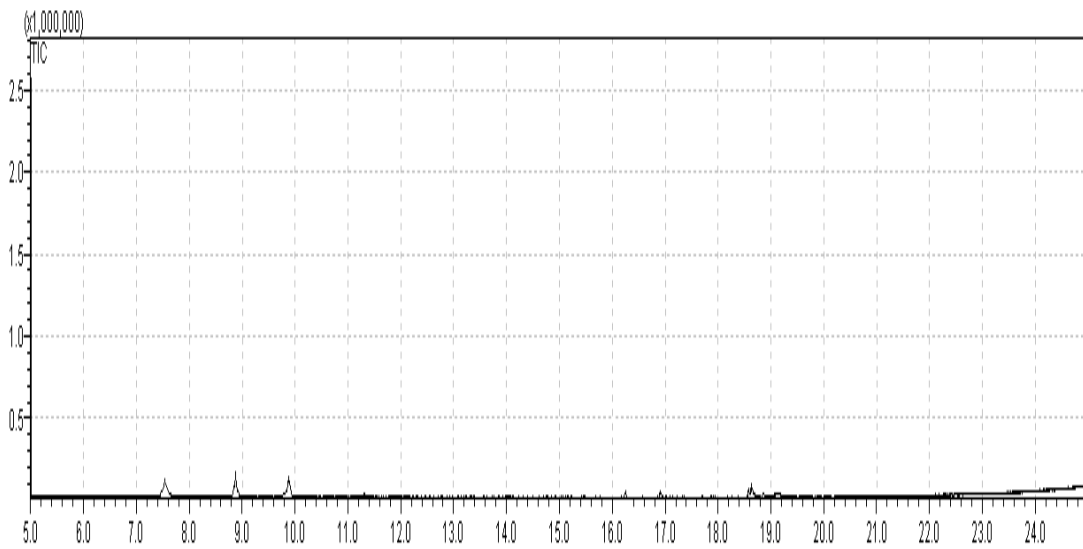
Kesikli dolgu yatak reaktörde gerçekleştirilen yıkım sonrasında analizin yıkımın son gününde alınan örnekler ekstrakte edildikten sonra GC-MS'leri alındı. Analiz sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde yıkım sonrası ortamda herhangi bir metabolit gözlenmedi. Fluoren'in saf halde ve yıkım sonrası alınan örnekteki FT-IR spektrumları alınıp, sonuçlar karşılaştırıldığında; saf fluoren spektrumunda 1600 cm^{-1} değerlerindeki aromatiklik piki görülmektedir. Yıkım sonrası alınan örneğin FT-IR spektrumunda 1600 cm^{-1} piki kaybolmakta ve $2300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ değerleri arasında çıkan ve spektrumda da 2360 cm^{-1} 'de görülen CO_2 piki tespit edilmiştir. Elde edilen GC kromatogramları ve FT-IR spektrumları aşağıda verilmiştir.



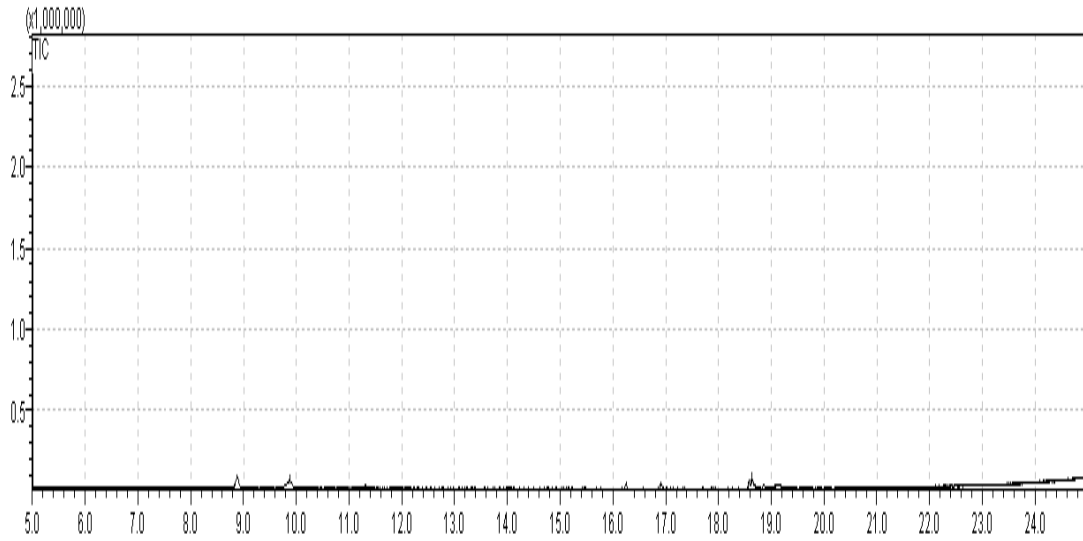
Şekil 3.63 Saf Fluoren'in GC kromatogramı



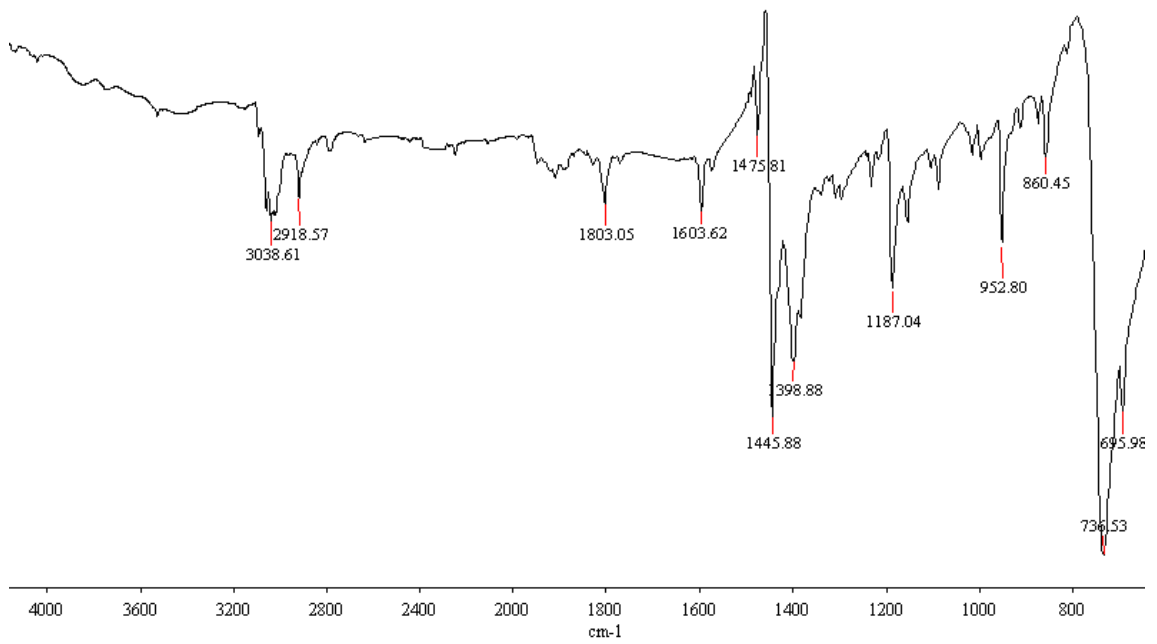
Şekil 3.64 İmmobilize *P. ostreatus* ile kesikli dolgu yatak reaktörde fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin GC kromatogramı



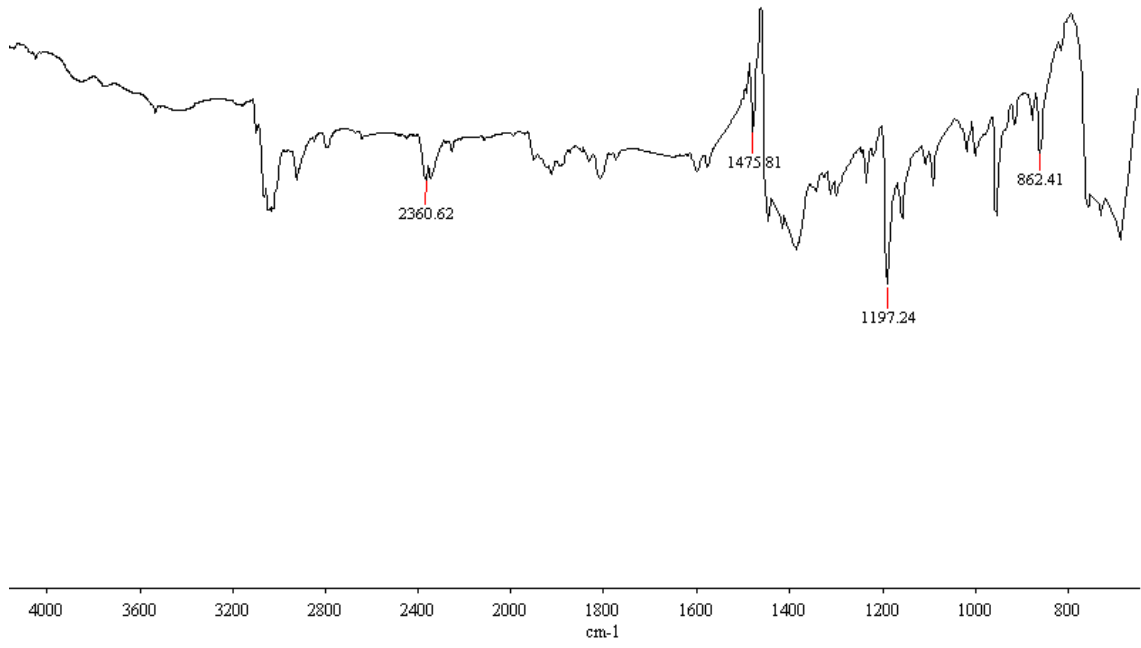
Şekil 3.65 İmmobilize *P. ostreatus* ile kesikli dolgu yatak reaktörde sentetik atık su (1)'deki fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin kromatogramı



Şekil 3.66 İmmobilize *P. ostreatus* ile kesikli dolgu yatak reaktörde sentetik atık su (2)'deki fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneğin kromatogramı



Şekil 3.67 Saf Fluoren'in FT-IR spektrumu



Şekil 3.68 İmmobilize *P. ostreatus* ile kesikli dolgu yatak reaktörde fluoren yıkımı sonrası alınan örneğin FT-IR spektrumu

4. SONUÇ

İnsan ve çevre sağlığını tehdit eden fluorenin hali hazırda biyo-yıkımının başarılı bir şekilde gerçekleştirilememiş olması bu çalışmanın çıkış noktasını oluşturmuştur. Bu noktadan hareketle bu çalışmada, oldukça toksik PAH ailesi üyelerinden olan fluoren'in beş farklı beyaz çürükçül fungus (*Trametes versicolor*, *Trametes trogii* *Pleurotus ostreatus*(1), *Pleurotus ostreatus* (2) ve *Ganoderma carnasum*) ile yıkımı araştırıldı ve en uygun fungus türü *Pleurotus osteratus* (2) olarak belirlendi. Belirlenen bu fungus türü tarafından fluoren yıkım koşulları optimize edildi ve 5 mg/L konsantrasyonundaki fluoreni % 90'ın üzerinde yıkıma uğrattığı bulundu. Sanayideki PAH kirliliği de esas alınarak bu organizmanın farklı destek materyallerine (polistiren köpük, Amberlite XAD-7, Amberlite XAD-2000, ponza ve kum) immobilizasyonunda hücre yaşının, hücre miktarının ve inkübasyon zamanının etkisi araştırıldı, *P. ostreatus*'un 3 günlük hücreleri ile 0,5 gr ponza üzerine 0,233 gr hücre (6 pellet) içeren ortamlarda adsorpsiyonun 10 saat içinde oldukça iyi bir şekilde tamamlandığı tespit edildi. İmmobilize *P. ostreatus* ile de kesikli çalkalamalı sistemde fluoren'in yıkım şartları optimize edilip, 5 mg/L fluoreni % 89,15 ve 30 mg/L fluoreni % 83,13 oranında yıkıma uğrattığı belirlendi ve 30 mg/L konsantrasyonunun üzerinde yıkımın azaldığı gözlemlendi. Bundan sonraki çalışmalarda 30 mg/L konsantrasyonundaki fluoren ile çalışıldı. Kesikli dolgu yatak reaktör sistemi kurularak, 30 mg/L fluoren'in yıkımı incelenip, %82,46 yıkım tespit edildi. Bu değerler literatür verileri ile karşılaştırıldığında, mevcut bilgiler çerçevesinde fluorenin immobilize *P. ostreatus* tarafından oldukça iyi oranda yıkıma uğratıldığını , ortaya konuldu.

Yapılan çalışmanın sanayi ortamındaki atık sistemlerine uygulanabilirliğini test etmek için, organik kirlilik ve inorganik kirlilik açısından zengin iki farklı sentetik atık su ortamları ile kesikli dolgu yatak reaktöründe çalışıldı. İnorganik kirlilikçe zengin, 30 mg/L fluoren içeren sentetik atık su (1) ortamı ile yapılan çalışmada %78,96, aynı miktar fluoren içeren inorganik kirlilikçe zengin sentetik atık su (2) ortamı ile yapılan çalışma sonucunda ise yıkımın %70,48 oranında gerçekleştiği görüldü. Analizler sırasında Lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri de izlendi ve 30. günün sonunda da

ortamlarda ligninolitik aktivite tespit edilmedi. Fluoren yıkımında lakkaz ve MnP enzimlerinin etkin olduğu aktiviteler azalmasına bağlı olarak yıkımın da azaldığı saptandı. Kesikli dolgu yatak reaktörünün fluoren yıkım performansını test etmek amacıyla sistem ardışık olarak fluoren yıkımı için çalıştırıldı. Bu amaçla, toplam 72 gün içinde 24. ve 48. günün sonunda sisteme 30 mg/L fluoren içeren ortam ilavesi yapıldı ve periyodik olarak alınan örneklerdeki fluoren miktarı tespit edildi. Analiz sonuçlarına göre 24., 48. ve 72. günün sonunda sırasıyla %82,87, %72,39 ve %62,89 düzeylerinde yıkım tespit edildi. Kesikli dolgu yatak reaktöründe herhangi bir ekstra toksik atık içermeyen ortamda, sentetik atık su (1) ve sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in yıkımının son gününde alınan örneklerin GC-MS analizleri yapıp elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda yıkım sonucunda ortamlarda herhangi bir metabolit tespit edilmedi. Yıkım sonrası alınan örneğin FT-IR spektrumu, saf fluoren'in FT-IR spektrumu ile karşılaştırıldığında saf fluoren de 1600 cm⁻¹'de aromatiklik piki, 695 cm⁻¹'de aromatik eğilme piki, 2018 cm⁻¹'de alifatik -CH piki ve 3038 cm⁻¹'de aromatik halkadaki -CH pikleri tespit edildi. Yıkım sonrası alınan örneğin FT-IR spektrumunda 1600 cm⁻¹, 2018 cm⁻¹, 3038 cm⁻¹'deki pikleri kaybolduğu ve 2300-2400 cm⁻¹ değerleri arasında çıkan ve spektrumda da 2360 cm⁻¹ de CO₂ piki tespit edildi. Burada görülen CO₂ piki fluoren'in biyodegrede olduğunu kanıtlamaktadır.

Bu çalışmanın sonucunda kesikli dolgu yatak reaktöründe immobilize *P. ostreatus* ile fluoren içeren atık suların oldukça iyi bir şekilde yıkıma uğratıldığı kanıtlandı.

Sonuç olarak, literatür çalışmaları ile de karşılaştırıldığında, fluorenin kesikli dolgu yatak reaktörde yıkımına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca fluoren içeren sentetik atık su örneklerinin, bu reaktör sistemine verilmesi ve sanayide kullanımına yönelik olarakta ardışık yıkım çalışmasının yapılması bu çalışmanın uygulanabilirliğini göstermektedir. Günümüzde çevre kirleticilerinin oranı her geçen gün artmakta ve canlı sağlığını tehdit eder boyuta gelmektedir. Çevresel kirliliklerin giderilmesi ve özellikle endüstriyel atık suların arıtmasız deşarjı düşünüldüğünde geliştirilen fluoren giderim sistemi literatüre, temiz kimyaya büyük katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abadulla, E. Tzanov, T. Costa, S. Robra, K. H. Paulo, A. C. and Gübitiz, G.M. (2000). Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microb.*, 66(8): 3357-3362.
- Aksu, Z. Kabasakal, E. (2005). Adsorption characteristics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) from aqueous solution on powdered activated carbon. *J. Environ. Sci. Heal. B.*, 40: 545-570.
- Austin, B. Calomiris, J.J. Walker, J.D. ve Colwell, R.R. (1977). Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 60-68.
- Arıca, M.Y. Arpa, Ç. Ergene, A. Bayramoglu ve G. Genç, Ö. (2003). Ca-alginate as a supporter for Pb(II) and Zn(II) biosorption with immobilized Phanerochaete chrysosporium. *Carbohydr. Polym.*, 52: 167-174.
- Baker, J.M. (1976). Marine Ecology and Oil Pollution. *John Wiley and Sons, Inc.*, New York.
- Baborová, P. Möder, M. Baldrian, P. Cajthamlová, K. Cajthaml T. (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.*, 157: 248-253.
- Bezalel, L. Hadar, Y. Fu, P. P. Freeman, J.P. Cerniglia, C. E. (1996). Metabolism of Phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7): 2547-2553.
- Breen, A. and Singleton, F. L. (1999). Fungi in Lignocellulose Breakdown and Biopulping. *Curr. Opin. Biotech.*, 10: 252-258.
- Benner, B. A. Jr. Gordon, G. E. and Wise, S. A. (1989). Mobile source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: A roadway tunnel study. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 1269-1278.
- Bossert, I. ve Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Co., New York.
- Call, H. P. and Mücke I. (1997). History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems Especially Laccase-Mediator-Systemes (Lignozym Process). *J. Biotechnol.*, 53:163-202.
- Castellano, A.V. Cancio, J.L. Aleman, P.S. Rodriguez, J.S. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particle in the city of Las Palmas de Gran Canaria. *Environ Int.*, 29: 475-480.
- Chang, B. V. Chang, J. S. Yuan, S. Y. (2001a). Anaerobic degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate-reducing conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 898-905.
- Chang, B.V. Shiung, L.C. Yuan, S.Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil (2002). *Chemosphere*, 48: 717-724.
- Cerniglia, C.E. (1984). Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York, pp: 99-128.
- Cerniglia, C. E. (1981). Aromatic hydrocarbons: Metabolism by bacteria, fungi, and algae. In: Hodgson, E., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (ed.), *Reviews in Biochemical Toxicology*, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York.
- Coulibaly, L. Goureene, G. Spiros, A. (2003). Utilization of fungi for Biotreatment of Raw Wastewaters. *African J. Biotechnology.*, 2(12):620-630.

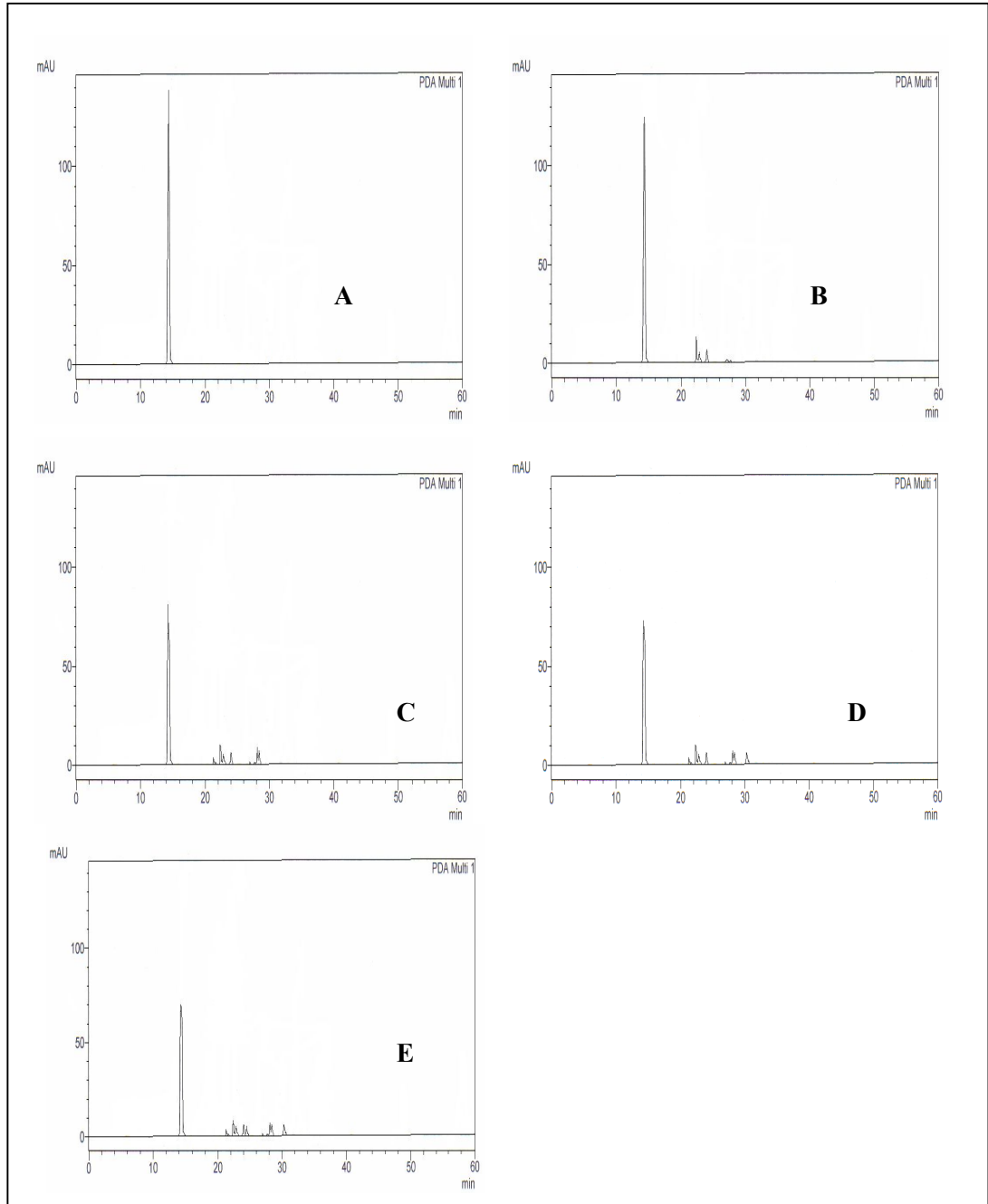
- Couto, S. R. Sanroman, M. A. Hofer, D. Gubitz, G. M. (2004). Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technol.*, 95: 67-72.
- Duran, N. and Esposito, E. (2000). Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review. *Appl. Catal. B-Environ.*, 28: 83-99.
- Eggert, C. Temp, U. Dean, J. F. and Eriksson, K. E. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391: 144-148.
- Eggen, T. and Majcherczyk A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 41: 111-117
- Floodgate, G. (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmilan Publishing Co., New York.
- Gary, M.R. Sam, P.D.R. ve Petrocelli, P.D. (1985). *Fund. Aquat. Toxicol. Method. Appl.*, 416-443.
- Gibson, D.T. (1968). Microbial degradation of aromatic compounds. *Science*, 161: 1093-1097.
- Guo, C. L. Zhou, H. W. Wong, Y. S. Tam N. F. Y. (2005). Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.*, 51: 1054-1061.
- Güven, D. Sözen, S. (2003). Anammox prosesi ile amonyum giderimi ve Anammox popülasyonunun karakterizasyonu. *İtü dergisi/ mühendislik* Cilt:2, Sayı:5: 27-34.
- Harrison, R. M. Smith, D. J. T. Luhana, L. (1996). Source apportionment of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons collected an urban location in Birmingham, UK. *Environ. Sci. Technol.*, 30(3): 825-830.
- Haritash, A. K. Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *A review J. Hazard. Mater.*, 169: 1-15.
- Henderson, T.R. Sun, J.D. Hanson, Li, A.P. Becmold, R.L. Harvey, W.E. Shabanowitz, T. M. and Hunr, D. F. (1984). GC/MS and MS/MS Studies of Diesel Exhaust Mutagenicity and Emissions From Chemically Defined Fuels. *Environ. Sci. Technol.*, 18: 428-434.
- Hwang, S. Cutright, T.J. (2002). Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47: 891-899.
- IARC. (1983). Polynuclear aromatic compounds, Part 1. Chemical, environmental and environmental data. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *International Agency for Research on Cancer Lyon*. 32: 33-91.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000). Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Appl. Environ. Microb.*, 66(2): 544-528.
- Kapdan, I. Kargi, F. McMullan, G. and Marchant, R. (2000). Comparison of White-Rot Fungi Cultures for Decolorization of Textile Dye Stuffs. *Bioproc. Eng.*, 22: 347-351.
- Karam, J. and Nicell, A. J. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J. Chem. Technol. Biot.*, 69:141-153.
- Kirk, P. W. ve Gordon, A. S. (1988). Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. *Mycology* 80: 776-782.
- Krastanov, A. (2000). Removal of Phenols from Mixtures by Co-Immobilized Laccase/tyrosinase and Polyclar Adsorption. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 24: 383-388.
- Kourkoutas, Y. Bekatorou, A. Banat, I. M. Marchant, R. Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and Support Materials Suitabla in Alcohol Beverages Production: A Review. *Food Microbiol.*, 21: 377-397.

- Kundu, S. Pal, A. Dikshit, A. K. (2005). UV induced degradation of herbicide 2,4-D: kinetics, mechanism and effect of various conditions on the degradation. *Sep. Purif. Technol.*, 44: 121-129.
- Lee, W-J. Wang, Y-F. Ling, T-C. Che, Y-Y. Lin, W-C. Ku, C-C. Cheng, I- T. (1995). PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Sci. Total Environ.*, 159: 185–200.
- Luan, T. G. Keith, S. H. Zhong, Yu, Y. Zhou, H. W. Lan, Nora C. Y Tam, F. Y. (2006). Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere* 65: 2289-2296.
- Luan, T. G. Yu, K. S. H. Zhong, Y. Zhou, H. W. Lan, C. Y. Tam, N. F. Y. (2006). Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere* 65: 2289–2296.
- Masclat, P. Mouvier, G. and Nikolaou, K. (1986). Relative decay index and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment* 20: 439-446.
- Means, J. C. Hasett, J. J. Wood, S. G. ve Banwart, W. L. (1980). Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. sci. Technol.*, 14: 1524-1528.
- Menichini, E. (1999). Current legislation and guidelines on PAHs in ambient air: the Italian experience. *Fresenius Environ. Bull.* 8: 512 -517.
- Menichini, E. (1992). Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *The Sci. the Total Environ.*, 116: 109-135.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Nielsen, T. (1996). Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city. *Atmos. Environ.*, 30: 3481-3490.
- Olika, P. Alhonmaki, K. Leppanen, V. M. Glumof, T. Rajjola, T. and Suominen, I. (1993). Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.*, 59(12): 4010-4016.
- Pazarlıoğlu, N. K. Sarişik, M. Telefoncu, A. (2005). [Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing](#). *Process Biochem.*, 40: 1673-1678.
- Perez, J. Rubai, T. D. Hamman, O. B. and Martinez J. (1998). *Phanerochaete flavidoalba* Laccase Induction and Modification of Manganese Peroxidase Isoenzyme Pattern in Decolorized Olive Oil Mill Wastewaters. *Appl. Environ. Microb.*, 64(7): 272-2729.
- Perez Ballesta, P. De Salgar, E. Kotzias, D. (1999). State of the art of the PAH's analysis in ambient air. *Fresenius Environ. Bull.*, 8: 499–505.
- Pickard, M. A. Roman, R. Tinoco, R. and Vanzquez-Duhalt R. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl. Environ. Microb.*, 6 (9): 3805-3809.
- Pyysalo, H. Tuominen, J. Wickstorm, K. Skytta, E. Tikkanen, L. Salomaa, S. Sorsa, M. Nurmela, T. Mattila, T. and Pohjola V. (1987). Polycyclic Organic Material (POM) in Urban Air: Fractionation, Chemical Analysis and Genotoxicity of Particulate and Vapour Phases in an Industrial Town in Finland. *Atmos. Environ.*, 21: 1167-1180.
- Pozdnyakova, N. N. Rodakiewicz-Nowak, J. Turkovskaya, O. V. Haber, J. (2006). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 41: 8-15
- Raghukumar, C. Mohandass C. Kamat, S. Shailaja, M. S. (2004). Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot

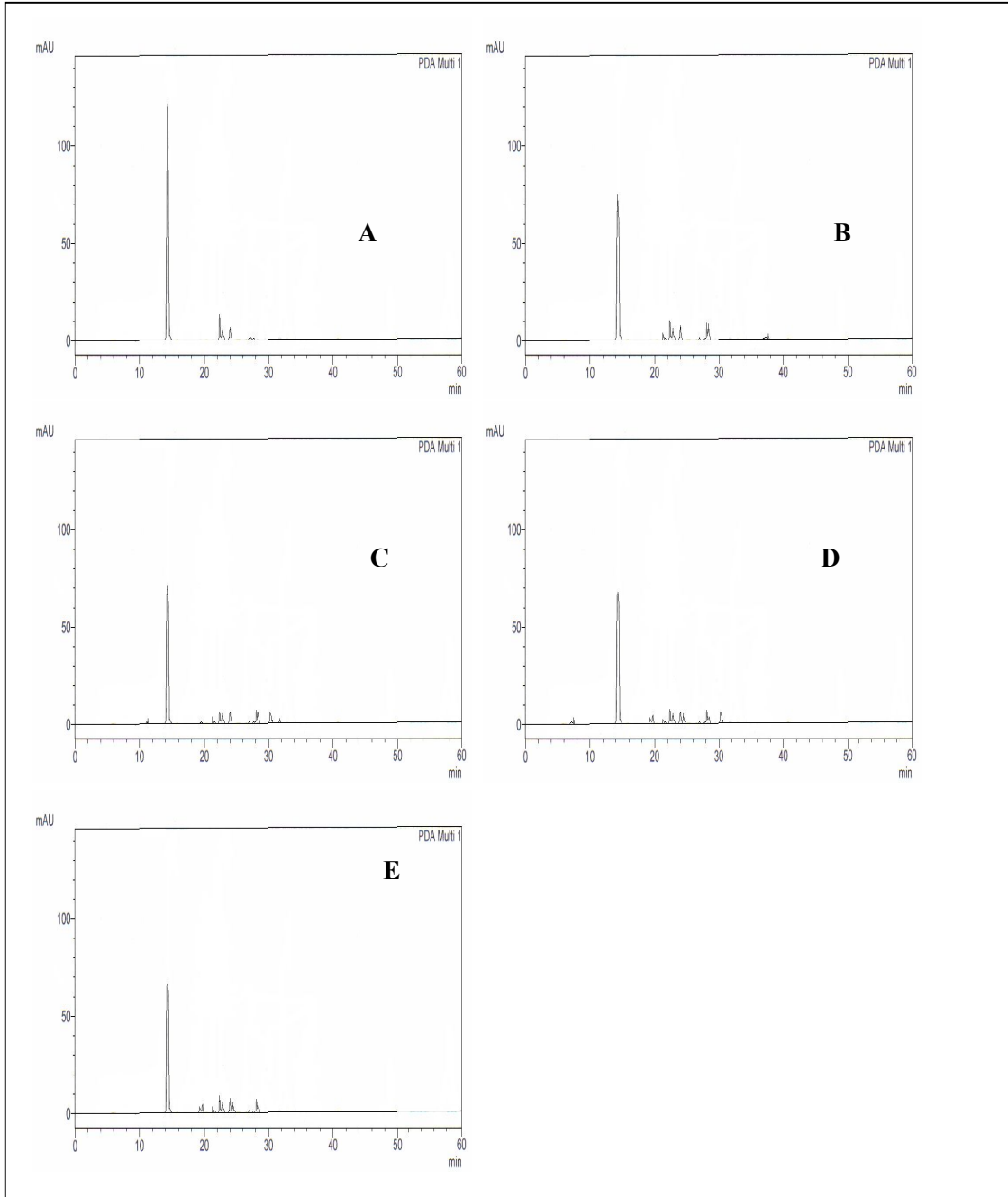
- fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. *Enzyme Microb Tech.*, 35: 197–202.
- Shiaris, M.P. ve Jambard-Sweet, D. (1986). Polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbour, Massachusetts, U.S.A. *Mar. Pollut. Bull.* 17: 469-472.
- Shuxin, H. Qinyan, Y. Min, Y. Baoyu, G. Yaqin, Z. Wenjing, C. (2009). Effect of sludge-fly ash ceramic particles (SFCP) on synthetic wastewater treatment in an A/O combined biological aerated filter. *Bioresource Technol.*, 100: 1149–1155.
- Tekere, M. Read, J.S. Mattiasson, B. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *J. Biotechnol.*, 115: 367–377.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji Lisans Üstü Yaz Okulu Notları. Ege Üniversitesi İzmir.
- Verdin, A. Sahraoui, A. L. H. Durand, R. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 53: 65–70.
- Wolfe, D. E. (1977) Fates and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organism and Ecosystems. *Pergamon Press*, Inc., Elmsford, New York.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.*, 267: 23688-23695.
- Westerholm, R. Stenberg, U. and Alsberg, T. (1988). Some aspects of the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) between particle and gas phase from diluted gasoline exhausts generated with the use of a dilution tunnel, and its validity for measurement in ambient air. *Atmos. Environ.*, 22: 1005-1010.
- Wu, J. and Yu, H. Q. (2007). Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technology* 98: 253–259.
- Valentin, L. Feijoo, G. Moreira, M. T. Lema, J. M. (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 58: 15–21.
- Yuan, S. Y. Wei, S. H. Chang, B. V. (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41: 1463–1468.
- Yuan, S. Y. Wei, S. H. Chang, B. V. (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere*, 41: 1463-1468.
- Zhang, G. and Nicell A. J. (2000). Treatment of Aqueous Pentachlorophenol by Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Water Res.*, 34(5): 1629-1637.

EKLER

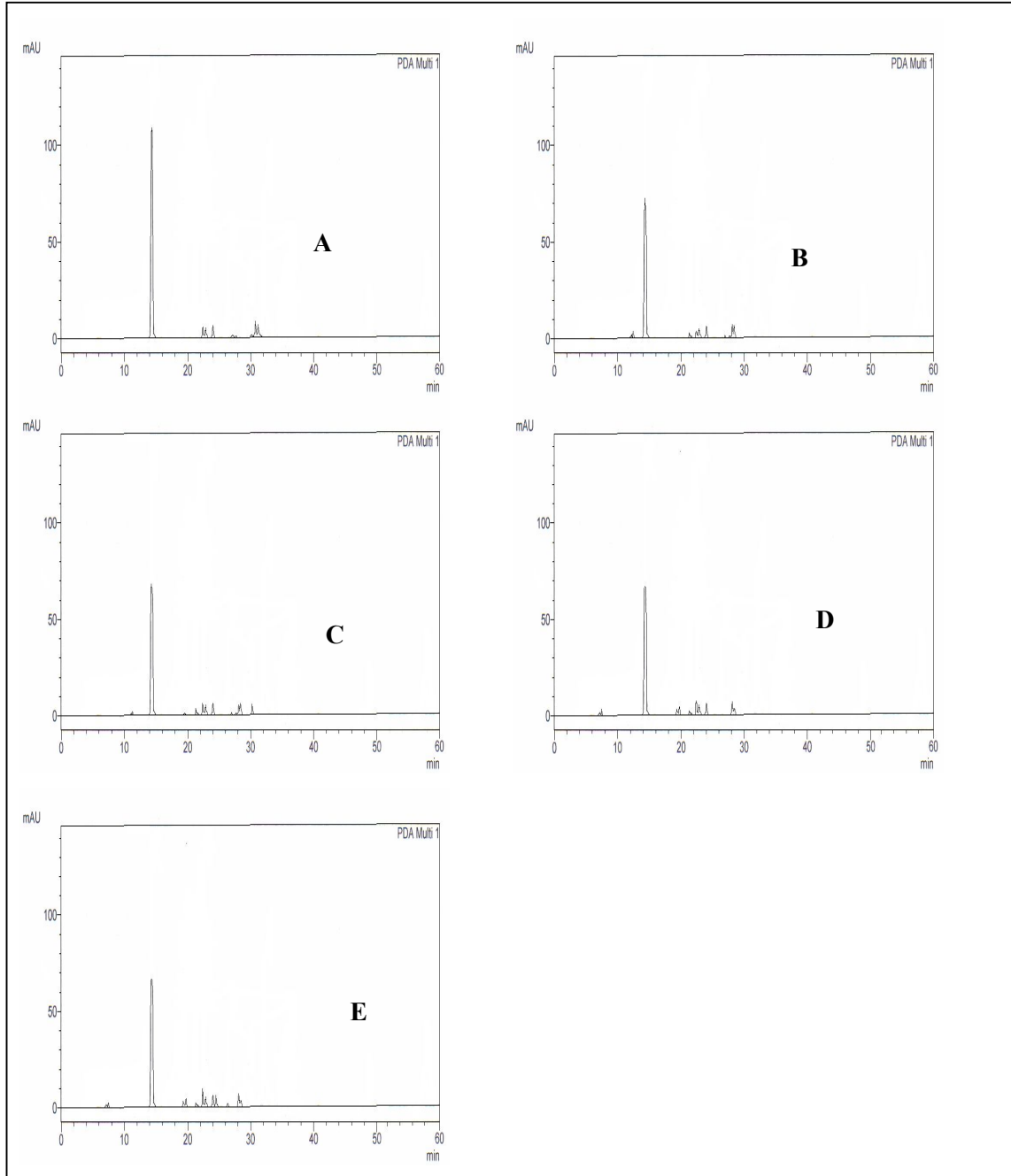
Ek-1: *T. versicolor* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: Standart fluoren, B: yıkımın 5. günü, C: yıkımın 10. günü, D: yıkımın 15. günü, E: yıkımın 20. gününe ait kromatogramlar



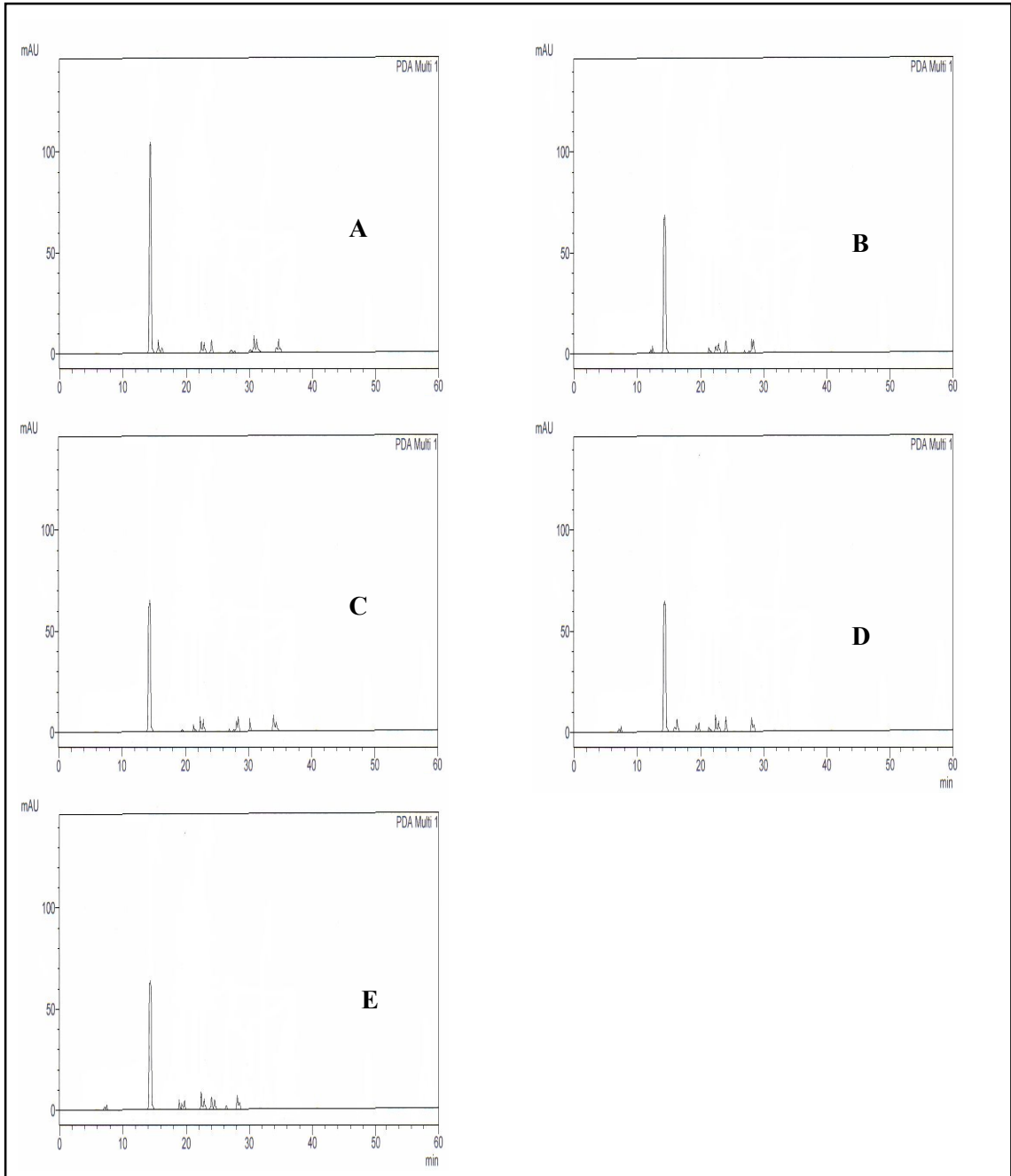
Ek-2: *G. carnasum* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe ait kromatogramlar



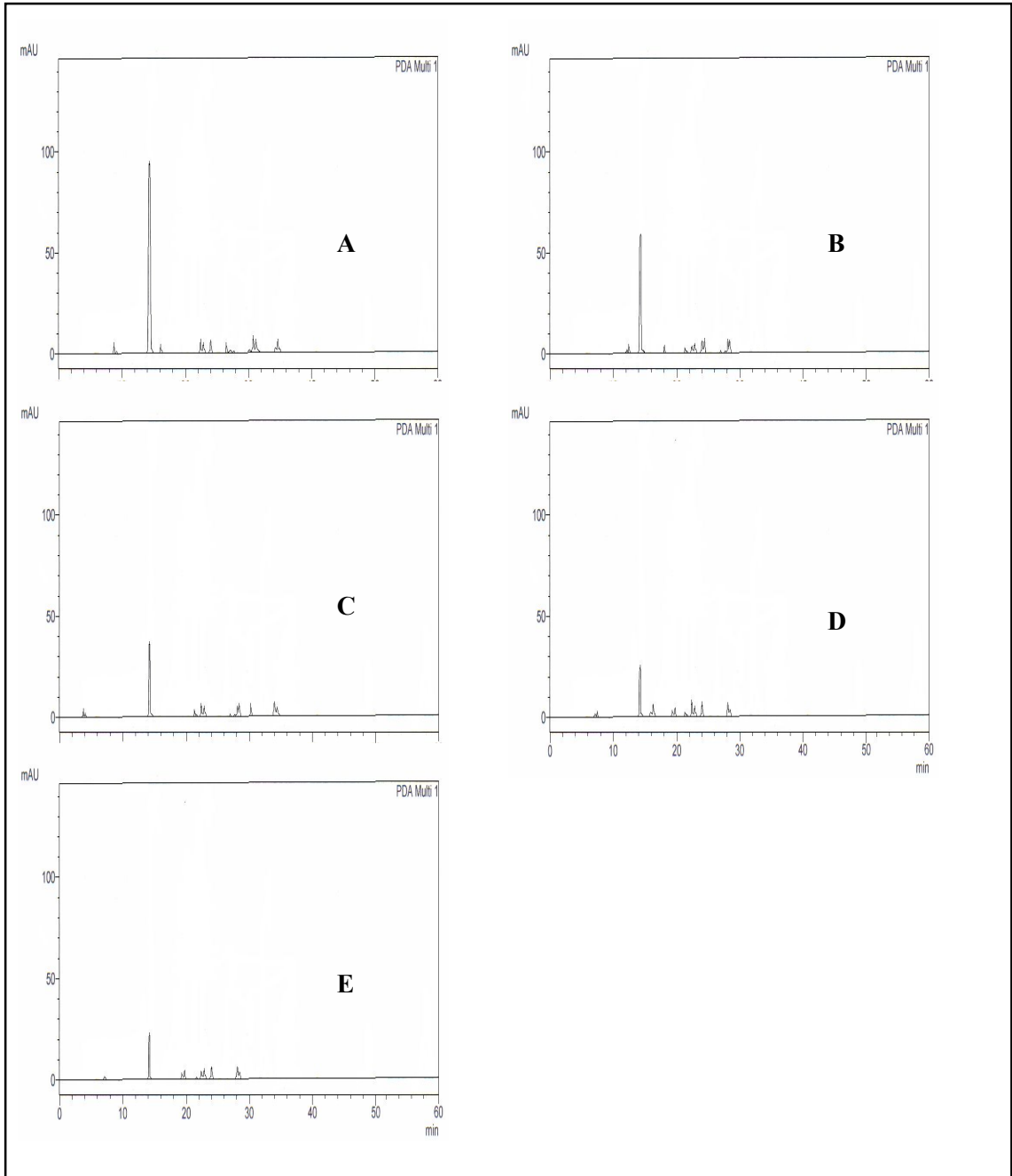
Ek-3: *Trametes trogii* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe ait kromatogramlar



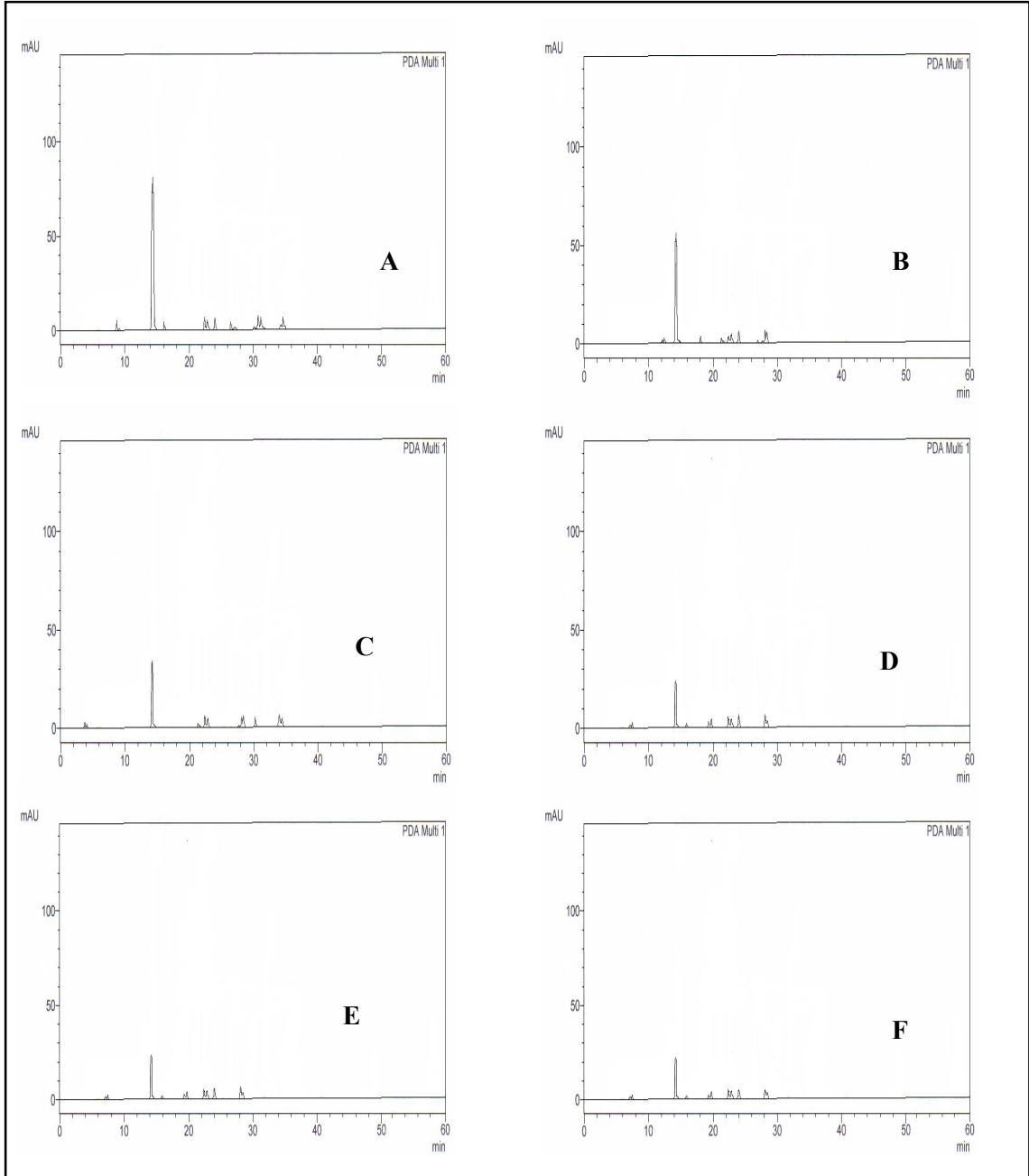
Ek-4: *P. osteratus(1)* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe ait kromatogramlar



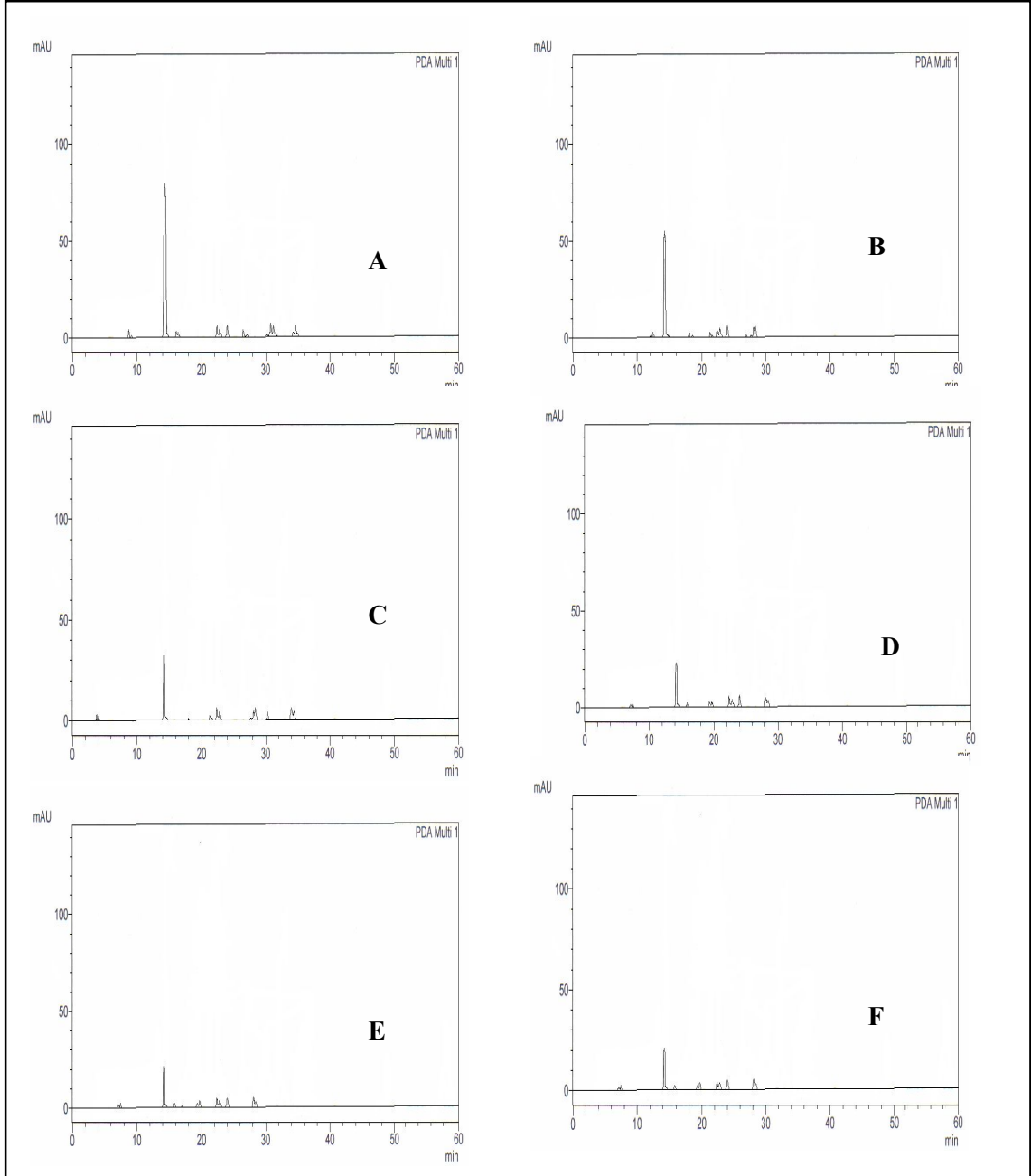
Ek-5: *P. osteratus(2)* ile fluoren biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. gününe ait kromatogramlar



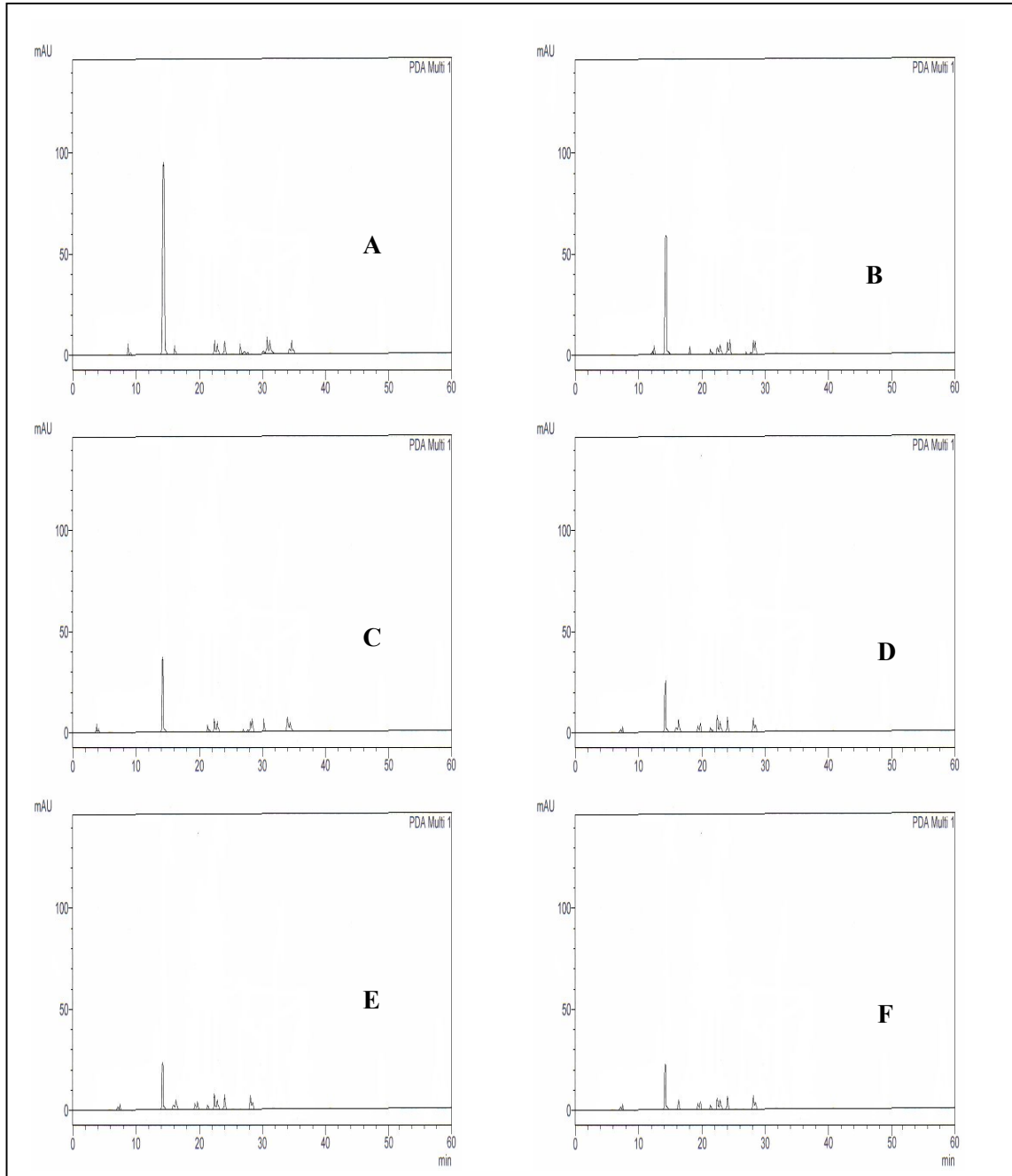
Ek-6: *Pleuratus osteratus* (2) ile 50 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



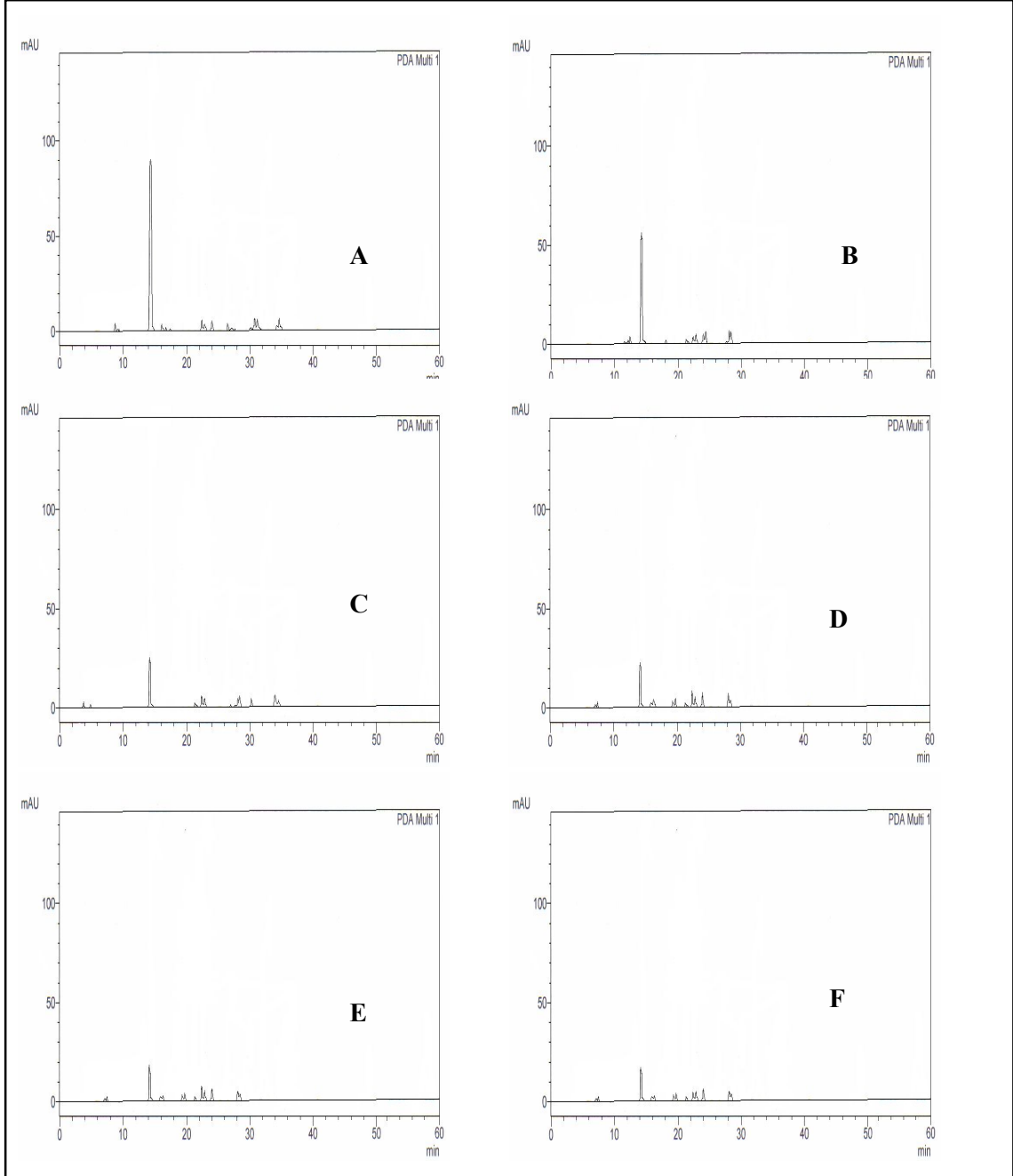
Ek-7: *Pleuratus osteratus* (2) ile 40 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



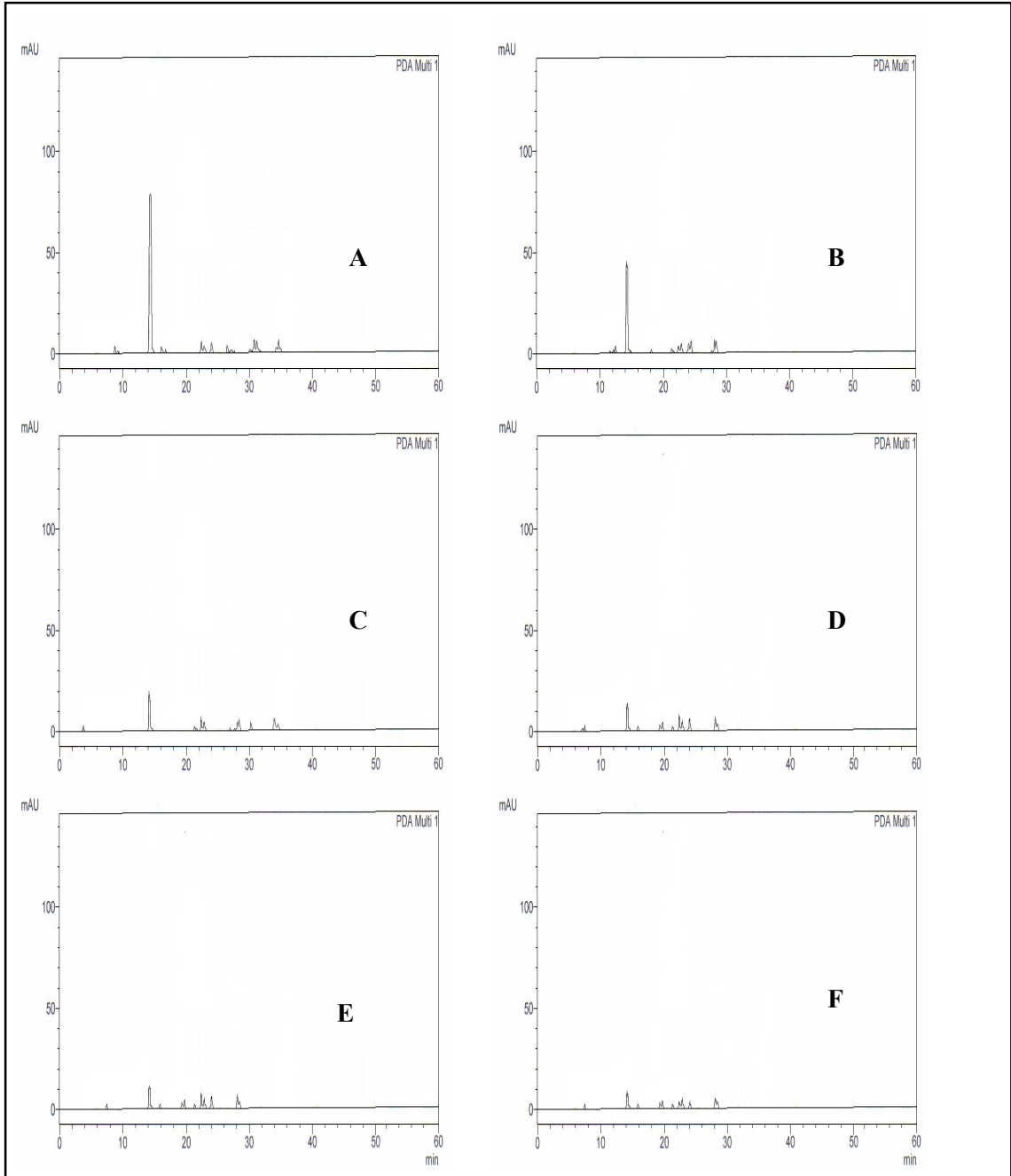
Ek-8: *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



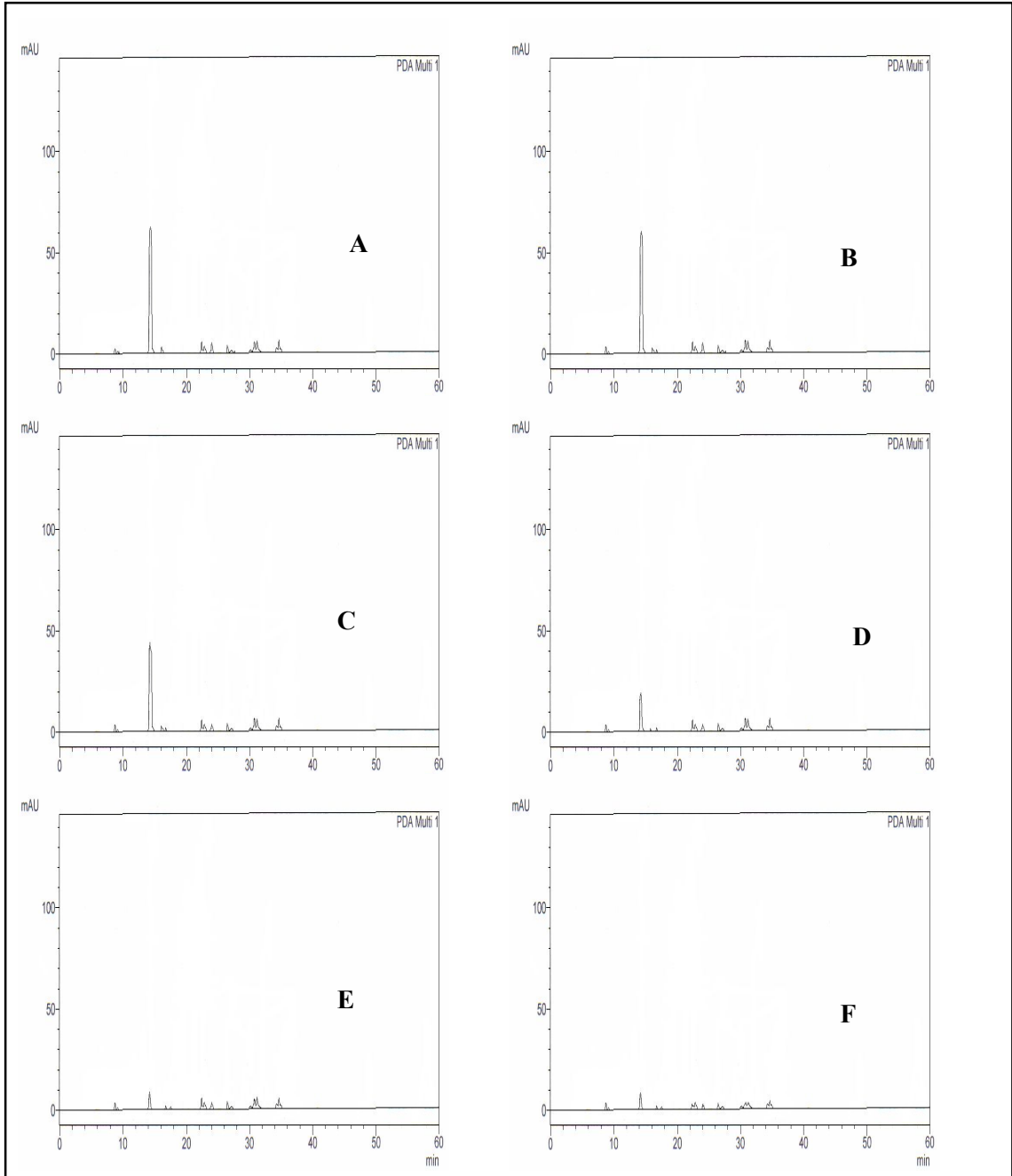
Ek-9: *Pleuratus osteratus* (2) ile 20 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



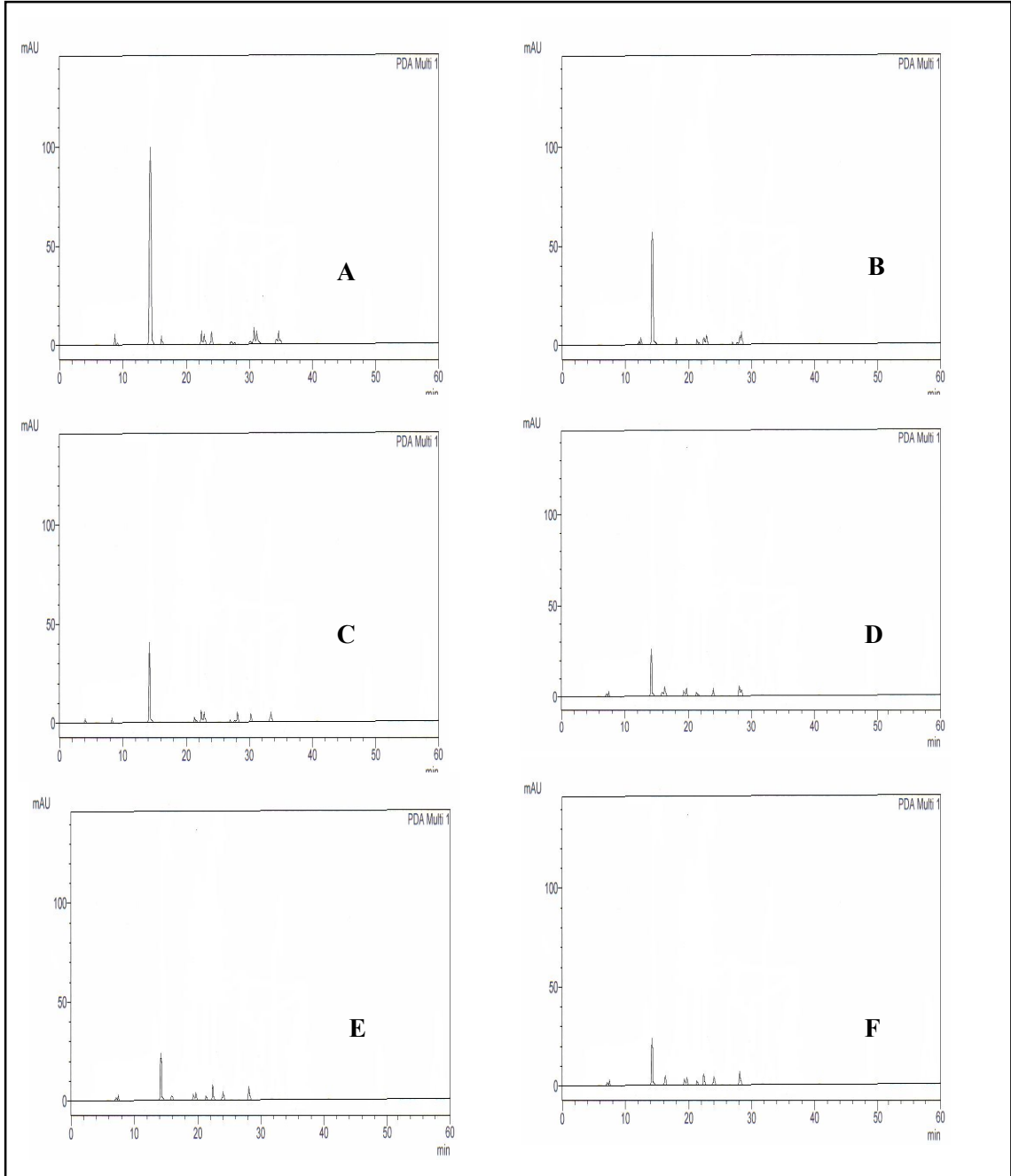
Ek-10: *Pleuratus osteratus* (2) ile 10 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



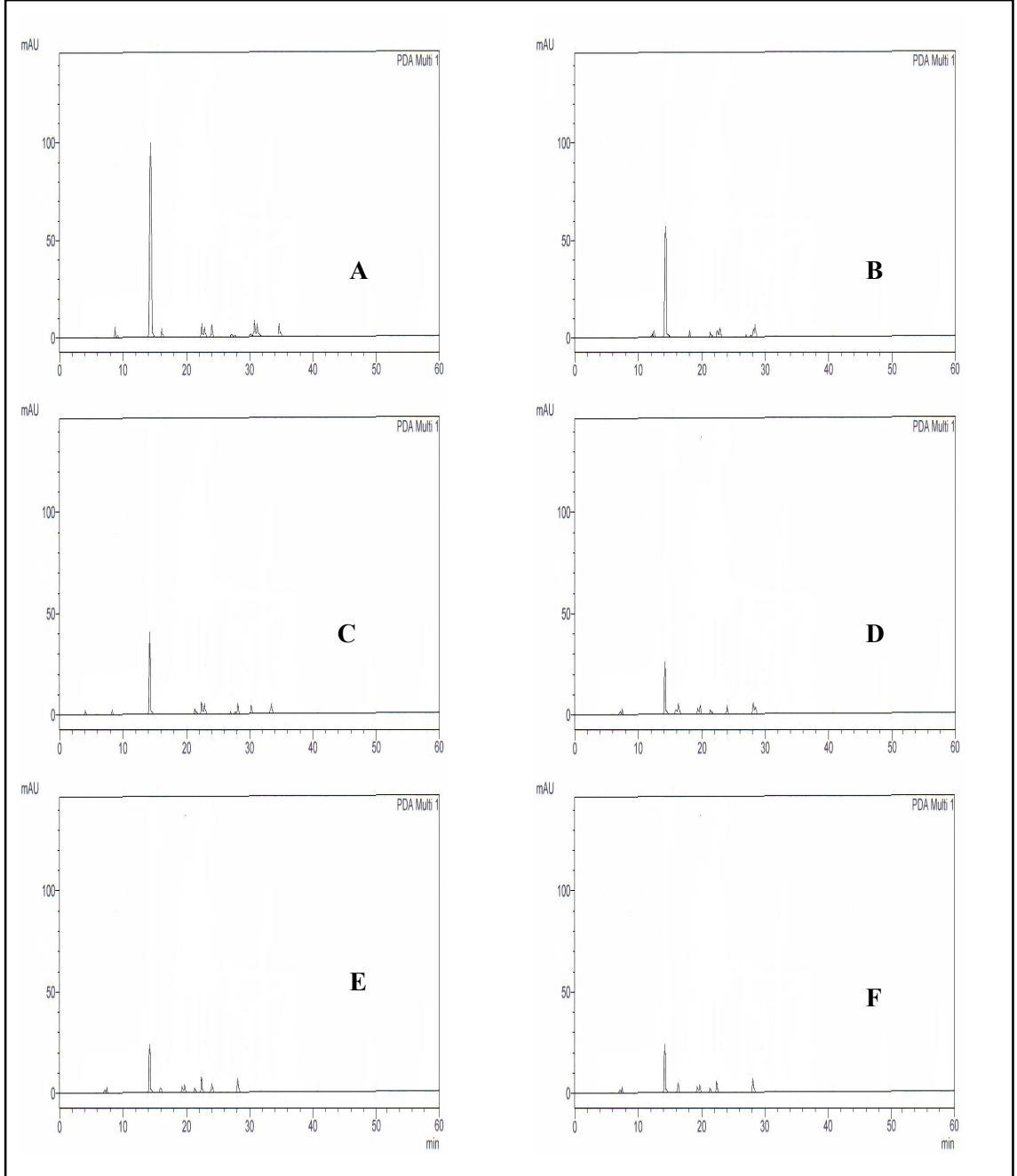
Ek-11: *Pleuratus osteratus* (2) ile 5 mg/L fluoren'in biyodegradasyonuna ait kromatogramlar; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



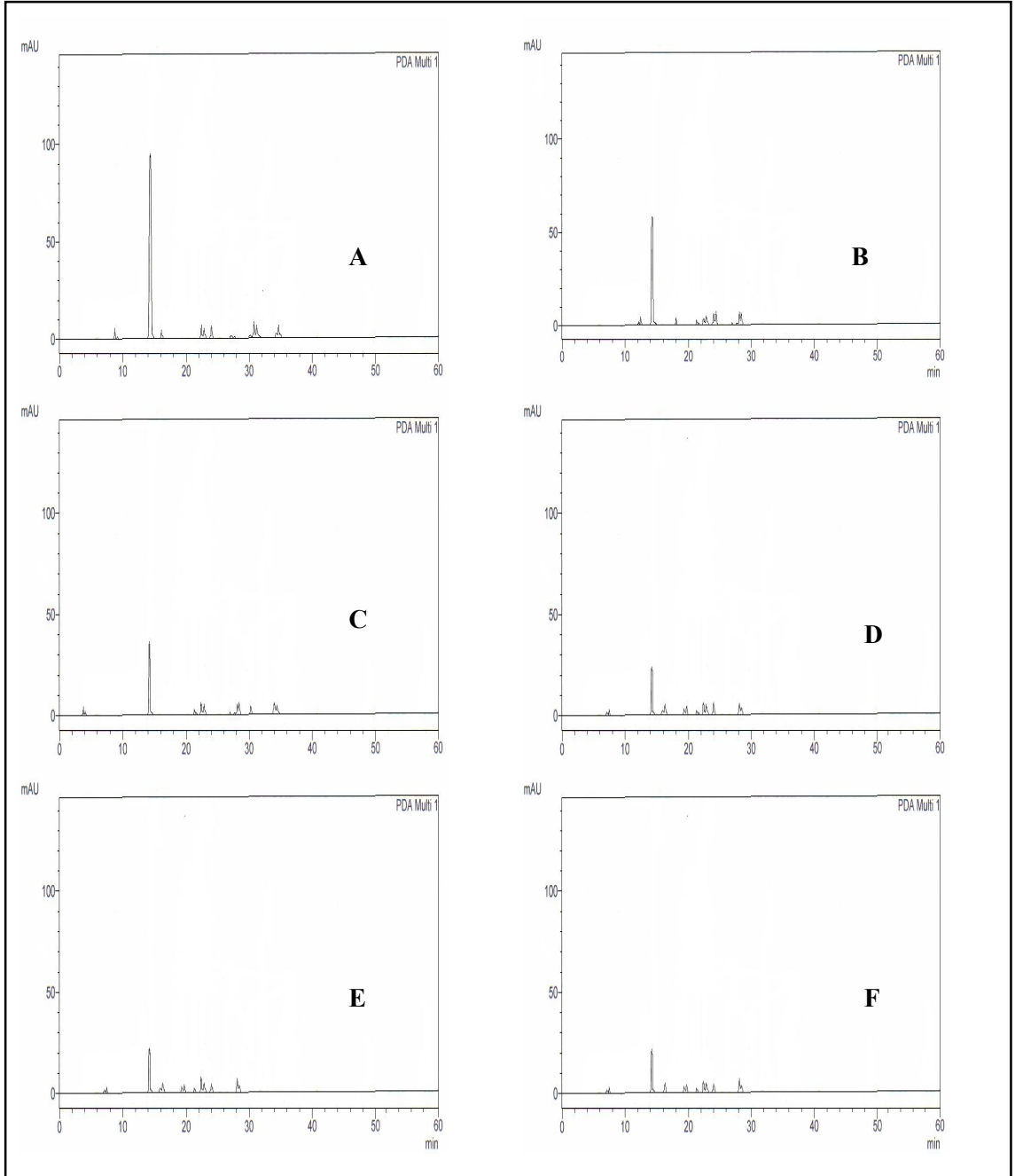
Ek-12: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 50 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20.
günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



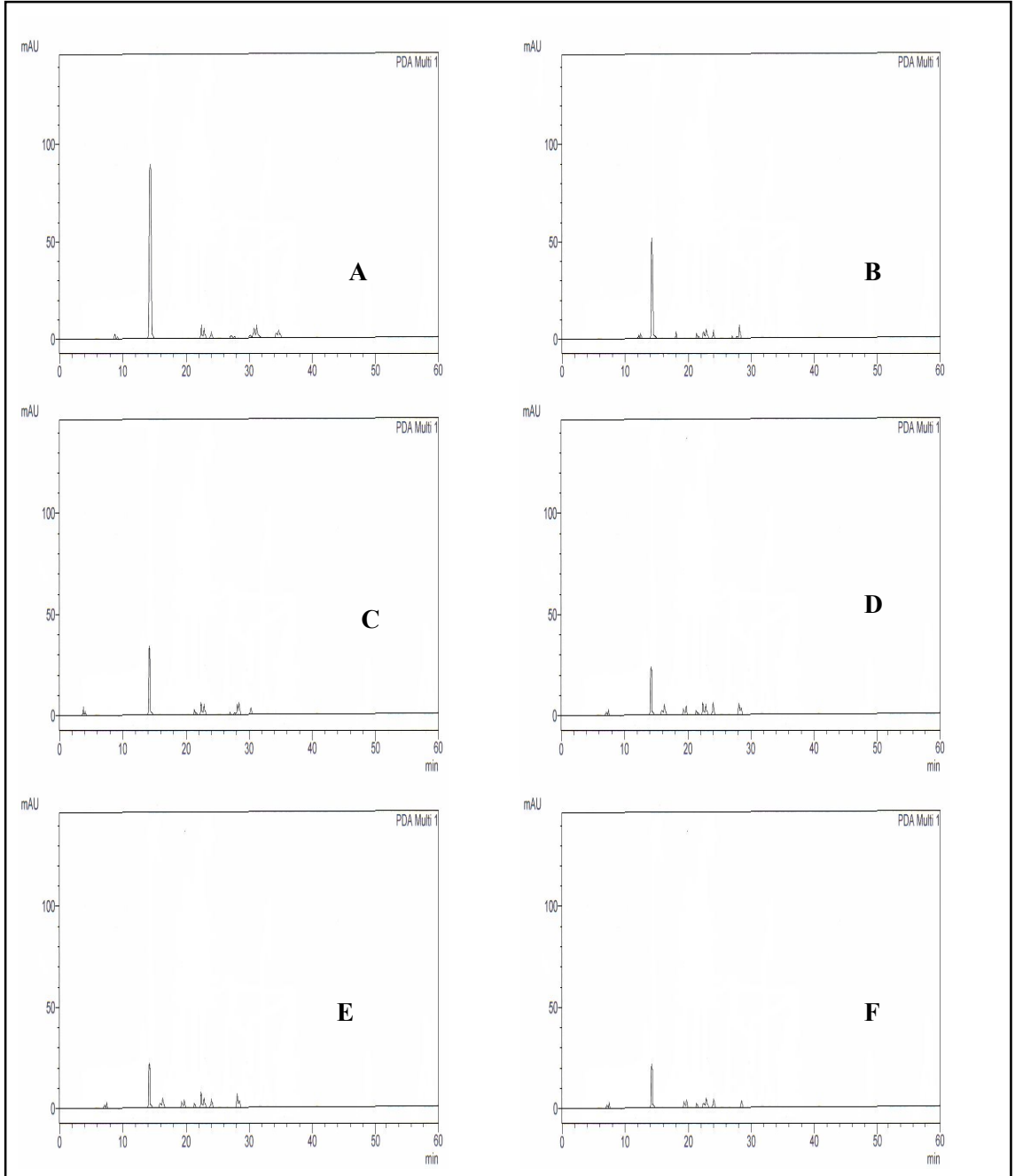
Ek-13: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 40 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20.
günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



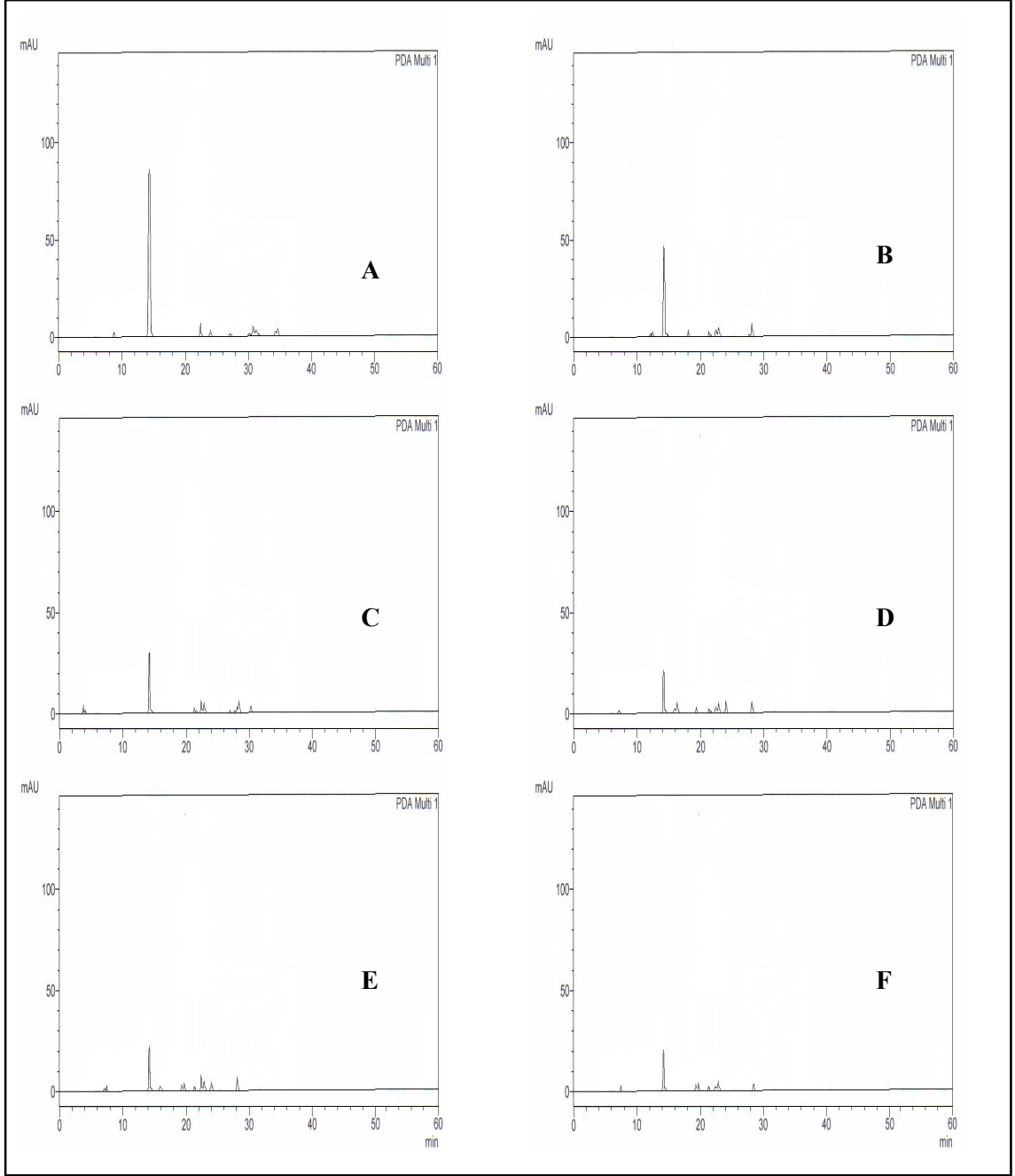
Ek-14: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20.
günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



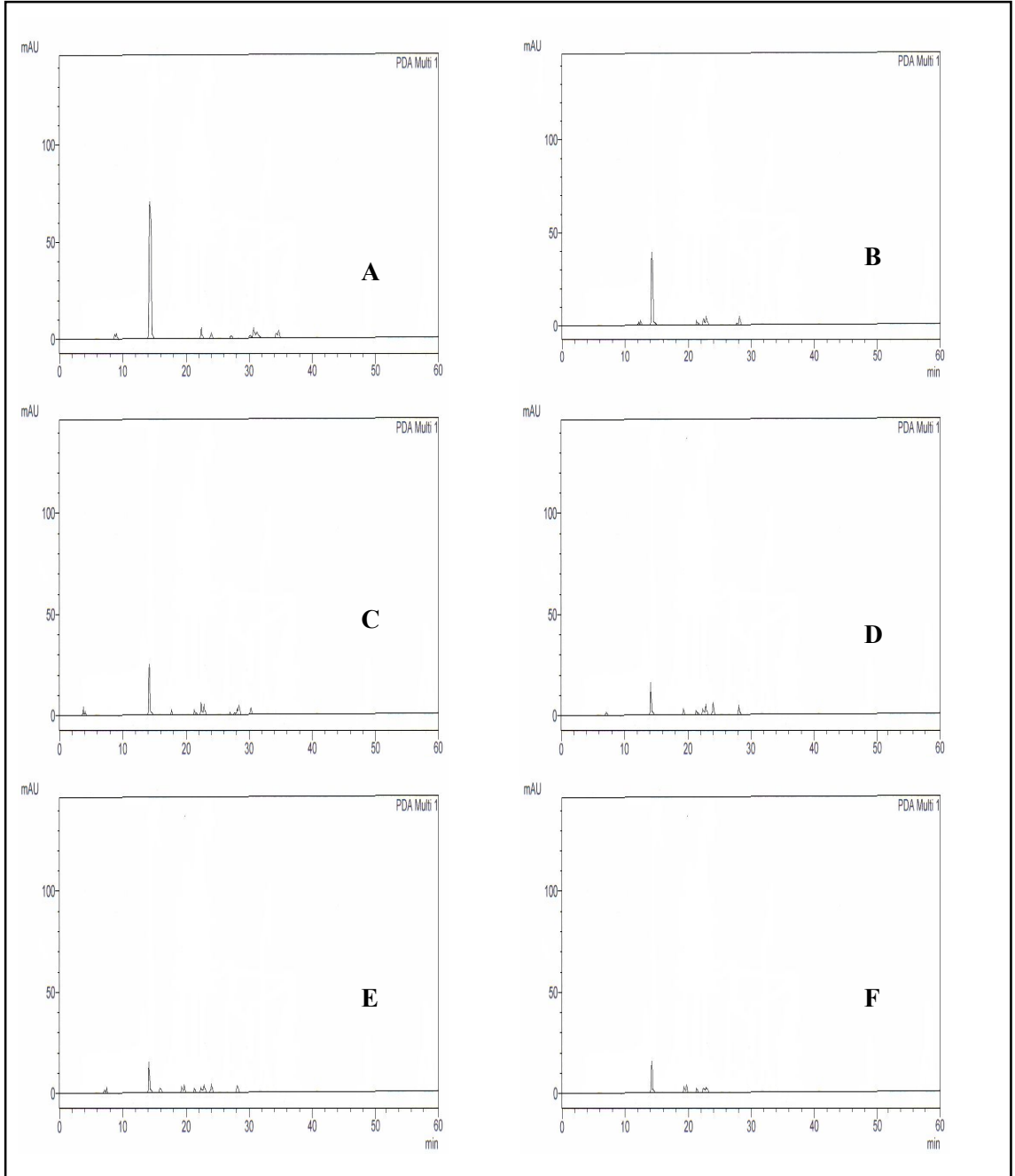
Ek-15: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 20 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20.
günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



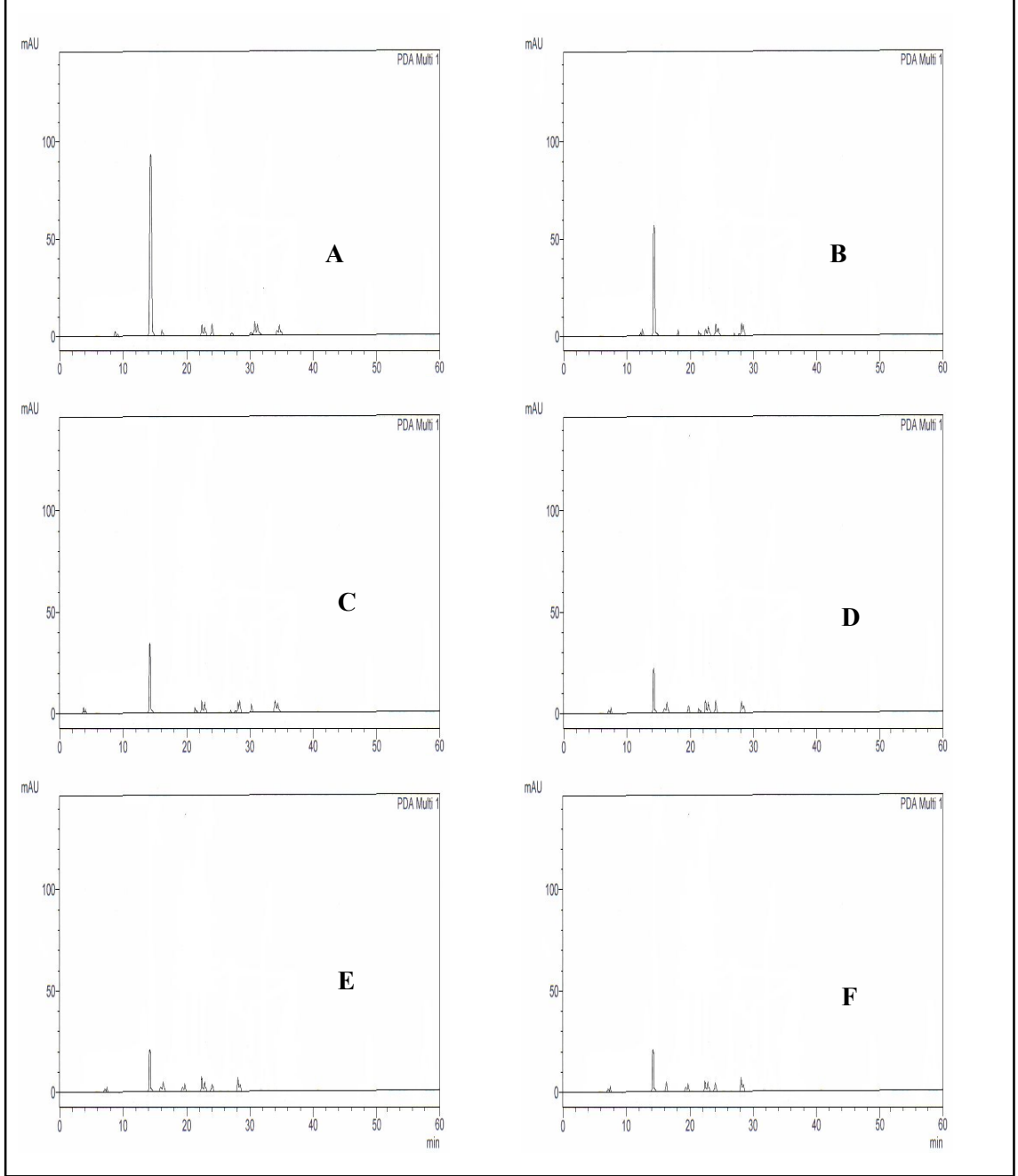
Ek-16: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 10 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu;
A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20.
günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



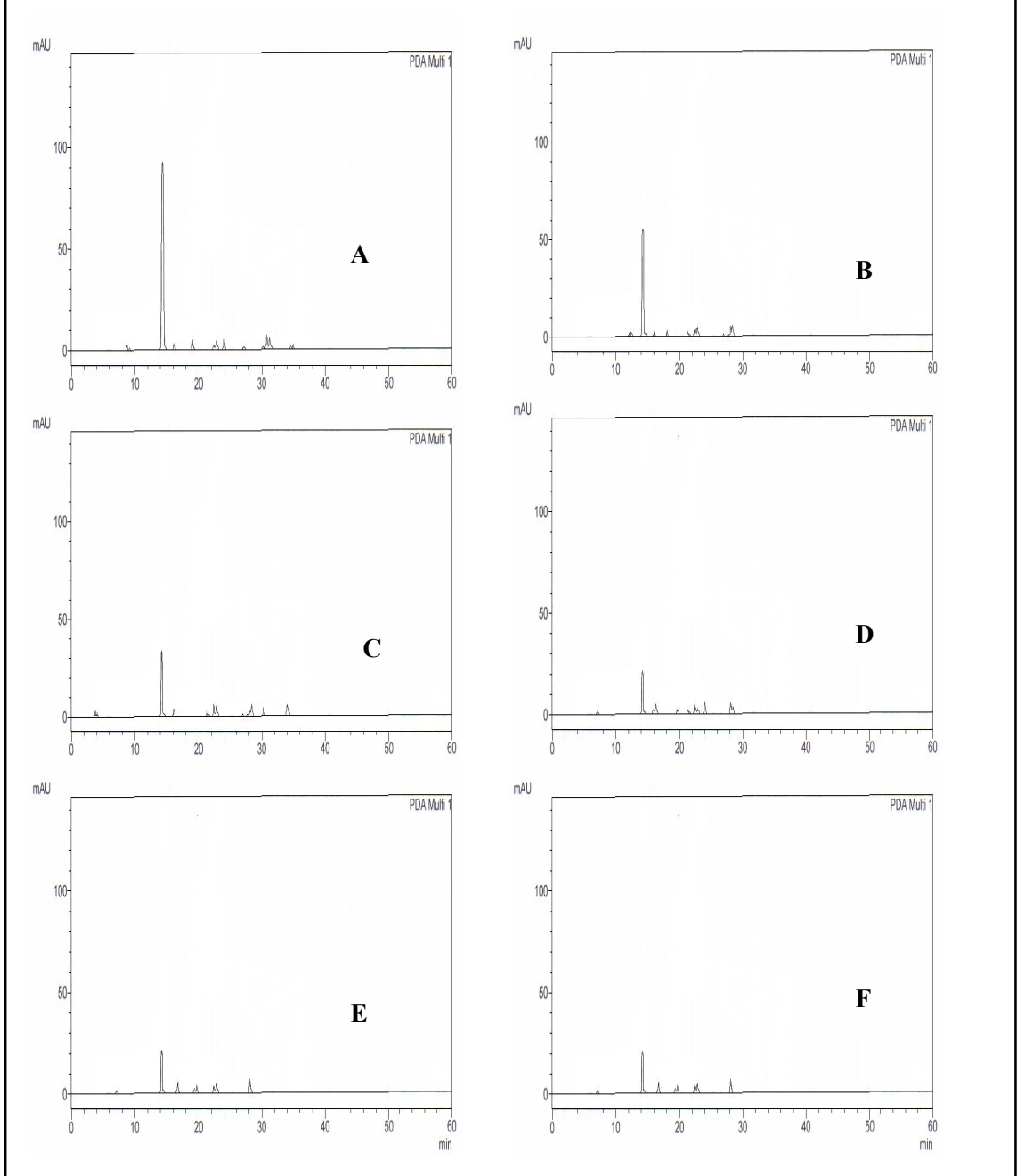
Ek-17: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 5 mg/L fluoren'in biyodegradasyonu; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



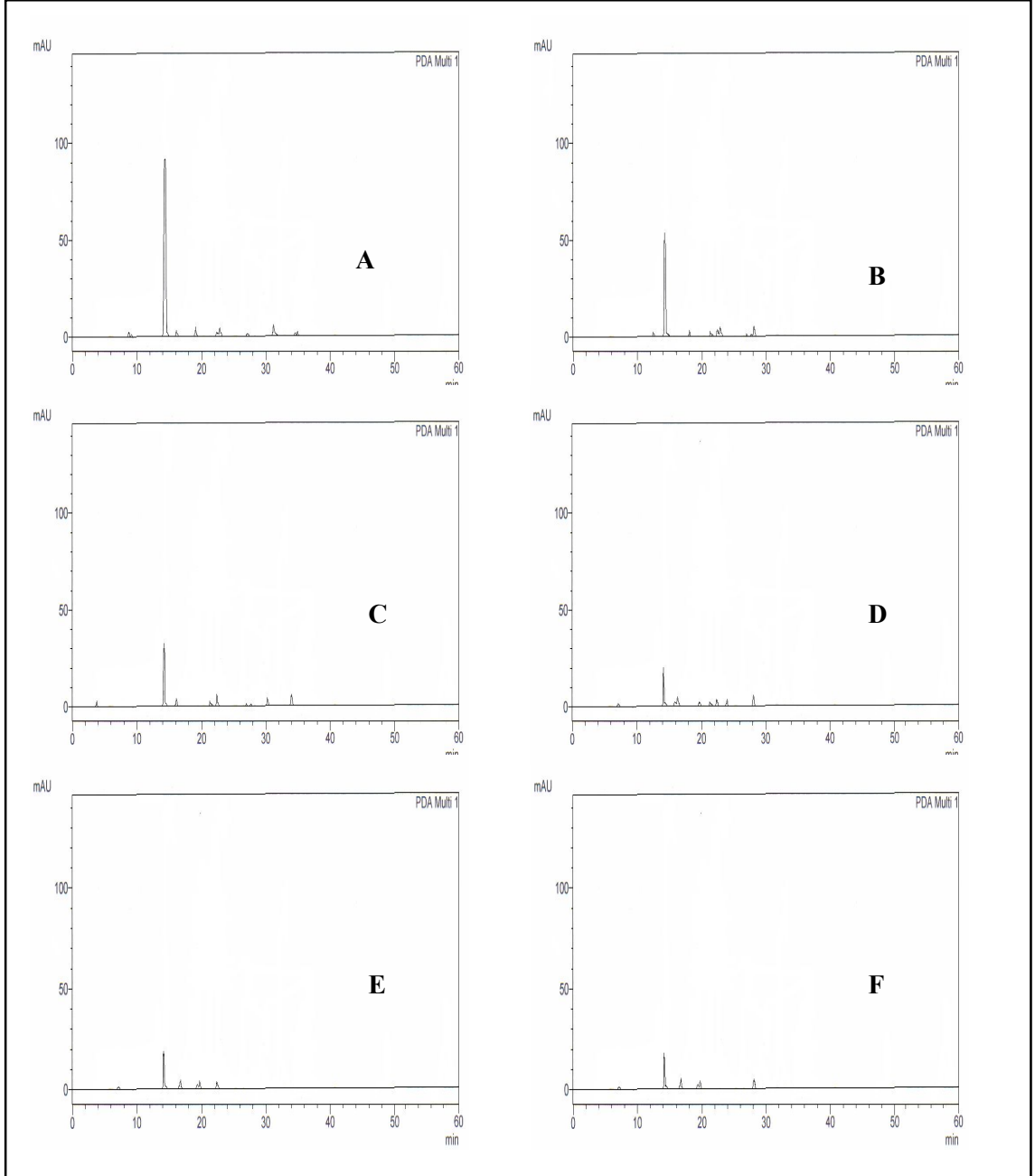
Ek-18: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



Ek-19: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile Sentetik atık su (1)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu; A: yıkımın 5. günü, B: yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



Ek-20: İmmobilize *Pleuratus osteratus* (2) ile Sentetik atık su (2)'deki 30 mg/L fluoren'in kesikli dolgu yatak reaktöründe biyodegradasyonu; A: yıkımın 5. günü, B:yıkımın 10. günü, C: yıkımın 15. günü, D: yıkımın 20. günü, E: yıkımın 25. günü F: yıkımın 30. gününe ait kromatogramlar



ÖZGEÇMİŞ

Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Tel (iş) : 0258 2963610
Tel (ev) : 0 258 2125694
Fax : 0 258 2963535
E-mail : hardag@pau.edu.tr
İş adresi : Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
 Kimya Bölümü, P.O. 286,
 20070 Denizli-TURKİYE
Ev adresi : Bursa Caddesi Yunusemre Mahallesi
 Pınar Apt. No:87 20070 Kınıklı/Denizli/TURKEY
Doğum tarihi ve yeri : 13.09.1979 HOLLANDA
Medeni hali : Evli
Dili : İngilizce

EĞİTİM / ÖĞRETİM

Kimya Lisans (1996-2000) : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Denizli

Kimya Yüksek Lisans (2003-2006) : Çipura (*Sparus aurata*) karaciğer mikrozomlarındaki ilaçları metabolize eden enzimlerin yaş ile değişimi ve karakterizasyonu (Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli)

Kimya Doktora (2006-2010) : Serbest ve İmmobilize Beyaz Çürükçül Funguslar ile Fluoren'in Biyodegradasyonu (Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli)

DENEYİMLER

2000- : Biyokimya anabilim dalında Araştırma Görevlisi, Pamukkale Üniversitesi, Kimya Bölümü, Denizli

ÜYE OLDUĞU DERNEKLER

Turkish Biotechnology Society (2006-)
Avrupa Biyoteknoloji Federasyonu (2009-)

PROJELER

Proje Adı	Destek	Yıl
Menderes nehrinde organik kirliliğin su ve doku örneklerindeki polisiklik aromatik hidrokarbonlar'ın yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ölçümüyle tespit ve takibi	PAÜ BAP	2001-2003
New Schiff Base and Oxime in Metal Complexes of Contain Azo Function Group Syntesis and Characterization	PAÜ BAP	2002
Çipura (<i>Sparus aurata</i>) karaciğer mikrozomlarındaki ilaçlarınmetabolize eden enzimlerin yaş ile değişimi ve karakterizasyonu	PAÜ BAP	2003-2006
Serbest ve İmmobilize Beyaz Çürükçül Funguslar ile Fluoren'in Biyodegradasyonu	PAÜ BAP	2010-

YAYINLAR

1. **Akdogan Ardag H**, Sen A, “ Changes of drug metabolizing enzymes activities in senescent gilthead seabream (*Sparus aurata*) ”*FEBS Journal*, 273: 140-140, June 2006.
2. Pazarlioglu Kasikara N, Kuzucu M, Ozmen F, Karani O.R, **Ardag Akdogan H**, Gocenoglu A, Ucar M.C, Erden E, “Stimulation of cinnabarinic acid production in batch cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*” *Journal of Biotechnolog*, 136S S402-S459, 2008.
3. Nurdan Kasikara Pazarlioglu, Alper Akkaya, **Hatice Ardag Akdogan**, Burcin Gungor, “Biodegradation of Direct Blue 15 by Free and Immobilized *Trametes versicolor*” *Water Environment Research*, Volume 82, Number 7, July 2010 , pp. 579-585.
4. **Hatice Ardag Akdogan**, Nurdan Kasikara Pazarlioglu, “Fluorene removal from synthetically concocted marine water by *Trametes versicolor*”*Asian Journal of Chemistry*, 2010, Kabul edildi.

ULUSLARARASI BİLDİRİLER

1. Changes of Drug Metabolizing Enzymes Activities in Senescent Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) **Hatice Ardağ Akdoğan**, Alaattin ŞEN 31th FEBS Congress (2006) 24-29 June İstanbul, TURKEY (**Poster**)
2. Assessment Of Aging On Monooxygenases and Glutathione S-Transferases in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) **Hatice Ardağ Akdoğan**, Alaattin ŞEN Microsomal Drug Oxidation (MDO) (2006) 3-7 September Budapest, HUNGARY (**Poster**)
3. Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Activities in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*), as a Possible Bioindication of Exposure to Various Environmental and/or Dietary Compounds **Hatice Ardağ Akdoğan**, Alaattin ŞEN 6th IC-TST (International Congress of Turkish Society of Toxicology “Chemical Safety and Toxicology” (2006) 2-5 November Antalya, TURKEY (**Poster**)
4. GST-CDNB Activities in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Liver Cytosol of Different Ages **Hatice Ardağ Akdoğan & Alaattin ŞEN** International

Symposium on Drug Research and Development “From Chemistry to Medicine”
DRD 2007 (2007) 17-20 Mayıs Antalya, TURKEY (*Poster*)

5. Biodegradation of New Bisazo Dye by *Trametes Versicolor*; **H. Ardag Akdogan**, C. Aydemir, A. Demircali, N.Pazarlioglu, F. Karci_International Enzyme Engineering Symposium 01-05 October 2008 Kusadasi/TURKEY(*Poster*)
6. The Role of Laccase Produced by *Pycnoporus cinnabarinus* on Phenol Biodegradation; M. Cigdem Ucar, **Hatice Ardag Akdogan**, Emre Erden, Aslı Göcenoglu, Nurdan Pazarlioglu International Enzyme Engineering Symposium 01-05 October 2008 Kusadasi/TURKEY(*Poster*)
7. The Chromatographic Analysis of Phenol Biodegradation by *Pycnoporus cinnabarinus*; M. Çiğdem Uçar, **Hatice Ardağ Akdoğan**, Emre Erden, Aslı Göçenoğlu, Nurdan Pazarlıoğlu AACD2008 Denizli/TURKEY(*Poster*)
8. Biodegradation of Direct Blue 15 by *Trametes versicolor* and GC-MS Analysis of Degradation Products; Alper Akkaya, **Hatice Ardag Akdogan**, Nurdan Pazarlioglu AACD2008 Denizli/TURKEY(*Poster*)

ULUSAL BİLDİRİLER

1. Analysis of (PAH)s in Dalaman River(River Basin of Bedirbey) with HPLC; **Hatice Ardağ Akdoğan**, M. Zafer ÖZEL, Alaattin ŞEN; Denizli/Turkey, December 2002 (*Sözlü Sunum*)
2. Determination of (PAH)s in Menderes River with HPLC; **Hatice Ardağ Akdoğan**, Mustafa. Zafer Özel ve Alaattin Şen; Chemistry Symposium, Kuşadası/Aydın/Turkey, 2005 (*Poster*)
3. Determination of Benzo(a)Pyrene in olive oil With HPLC; Demirhan Çıtak, **Hatice Ardağ Akdoğan**, Mustafa Zafer Özel; Chemistry Symposium, Kuşadası/Aydın/Turkey, 2005 (*Poster*)
4. AROD Activities in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Liver Microsome of Different Ages; **Hatice Ardağ Akdoğan**, Alaattin ŞEN; Chemistry Symposium, Malatya/Turkey, 2007(*Poster*)
5. Biodegradation of Fluorene by *Trametes versicolor*; **Hatice Ardağ Akdoğan**, Nurdan Kaşıkara Pazarlıoğlu; XIII. Biotechnology Symposium, Antalya/Turkey, 2007 (*Sözlü Sunum*)

6. Biodegradation of Phenol by *Pycnoporus cinnabarinus*; M.Çiğdem Uçar, **Hatice Ardağ Akdoğan**, Emre Erden, Aslı Göçenoğlu, Nurdan Pazarlıoğlu; Ulusal HPLC Ve Mass Spektrometri Çalıştayı ve Sempozyumu, Ankara/Turkey, 2008 (*Poster*)
7. Biodegradation of Fluorene by immobilized *Pleurotus ostreatus* in Packed Bed Systems; **H. Ardağ Akdoğan**, N. Kaşıkara Pazarlıoğlu; XIV. National Biotechnology Congress, Antalya/Turkey, 13-16 December 2009 (*Sözlü Sunum*)