



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ**

AKTİF KARBONUN LAKKAZ ENZİMİYLE BİYOREJENERASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP MERVE TİRYAKİ

OCAK-2020



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE VE ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ**

AKTİF KARBONUN LAKKAZ ENZİMİYLE BİYOREJENERASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP MERVE TİRYAKİ

**TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. ÖZGÜR AKTAŞ**

OCAK-2020

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrencisi olan Zeynep Merve TİRYAKİ'nin hazırladığı ve jüri önünde savunduğu “AKTİF KARBONUN LAKKAZ ENZİMİYLE BİYOREJENERASYONU” başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Özgür AKTAŞ
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA

.....

Üyeler:

Prof. Dr. Erkan ŞAHİNKAYA
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Kozet BAKIRCI
Marmara Üniversitesi

.....

Tez Savunma Tarihi:

13.01.2019

ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Yüksek Lisans tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezde;

- 1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;
- 2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;
- 3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dahil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;
- 4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Zeynep Merve TİRYAKİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen, eğitimimin başlangıcından sonuna kadar tecrübeleri ile yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Özgür AKTAŞ'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresinde beni yönlendiren, her an didaktik yaklaşımlarıyla bilimsel doğruları bulma konusunda yol gösteren, her zaman desteklerini hissettiğim Sayın Dr. Arş. Gör. Işık ÇOBAN'a ve Sayın Dr. Arş. Gör. Songül YAŞAR YILDIZ'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Verdikleri katkıdan ötürü çalışma arkadaşlarım Ece İŞLER, Güldenur ÖZTEMUR, Zeynep TAYRAN, Ahmet ŞAHİN, Emir Kasım DEMİR ve Mehmet Emin KAZANCI'ya gönülden teşekkür ederim. Her konuda destekleri ile bana güç veren kuzenim Begüm Asena TİRYAKİ ve sevgili dostum Sevdener DEMİREL'e şükranlarımı sunarım.

Her zaman yanımda olan maddi ve manevi varlıklarını benden hiç eksik etmeyen bugünlere gelmemi sağlayan, hayat boyu haklarını ödeyemeyeceğim annem Ayten TİRYAKİ'ye, babam Özkan TİRYAKİ'ye, abim İbrahim Safa TİRYAKİ'ye, kardeşim Seyit Musa TİRYAKİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmaya maddi desteklerinden dolayı İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Birimi'ne (Proje No: F-GAP-2018-1270) ve TÜBİTAK (Proje No:118Y010)'a teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2020

Zeynep Merve TİRYAKİ

İÇİNDEKİLER

ONAY	İ
ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI.....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER	İİİ
KISALTMA LİSTESİ.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
ÖZET.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. AKTİF KARBON	3
2.1.1. Aktif Karbonun Arıtmada Kullanımı	4
2.1.2. Aktif Karbonun Aktivasyonu.....	6
2.1.3. Adsorpsiyon	7
2.1.4. Desorpsiyon	8
2.2. BİYODEGREDASYON	11
2.2.1. Fenolik Bileşiklerin Biyodegradasyonu	11
2.2.1.1. Fenol ile Yapılan Giderim Çalışmaları.....	13
2.2.1.2. 2-Nitrofenol ile Yapılan Giderim Çalışmaları	15
2.2.1.3. Bisfenol-A ile Yapılan Giderim Çalışmaları	17
2.2.2. Lakkaz Enzimiyle Fenolik Bileşiklerin Degradasyonu	18
2.2.2.1. Enzimatik Reaksiyonlar.....	18
2.2.2.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	20
2.2.2.3. Lakkaz Enzimi	20
2.2.2.4. Lakkaz Enzimiyle Fenolik Bileşiklerin Giderim Çalışmaları.....	23

2.3. ENZİMATİK BİYOREJENERASYON	27
2.3.1. Biyorejenerasyon	27
2.3.2. Ekzoenzimatik Reaksiyonlara Bağlı Biyorejenerasyon	28
2.3.3. Biyorejenerasyona etki eden faktörler	30
3. YÖNTEM.....	33
3.1. MATERYAL.....	33
3.2. ADSORPSİYON DENEYLERİ.....	35
3.3. DESORPSİYON DENEYLERİ	39
3.4. BİYODEGREDASYON DENEYLERİ	40
3.5. ENZİMATİK BİYOREJENERASYON DENEYLERİ	41
3.6. ANALİZLER	43
3.6.1. 4-AAP Metodu	43
3.6.2. Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini.....	47
3.6.3. HPLC Analizleri	52
3.6.4. KOİ Analizleri.....	56
3.6.5. İyon Kromatografisi Analizleri	57
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. FENOL İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	58
4.1.1. Aktif Karbon ile Fenolün Adsorpsiyonu.....	58
4.1.2. Aktif Karbon ile Fenolün Desorpsiyonu	59
4.1.3. Lakkaz ile Fenolün Biyodegradasyonu	60
4.1.4. Aktif Karbon ile Fenolün Enzimatik Biyorejenerasyonu	65
4.1.5. HPLC’ de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi.....	67
4.2. 2-NİTROFENOL İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	70
4.2.1. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Adsorpsiyonu.....	70
4.2.2. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Desorpsiyonu	71
4.2.3. Lakkaz ile 2-Nitrofenolün Biyodegradasyonu	72
4.2.4. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Enzimatik Biyorejenerasyonu.....	77
4.2.5. HPLC’ de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi.....	79
4.2.6. İyon Kromatografisi’ de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi	81
4.3. BİSFENOL-A İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	84

4.3.1. Aktif Karbon ile Bisfenol-A Adsorpsiyonu	84
4.3.2. Aktif Karbon ile Bisfenol-A'nın Desorpsiyonu	90
4.3.3. Lakkaz ile Bisfenol-A'nın Biyodegradasyonu	95
4.3.4. Aktif Karbon ile Bisfenol-A'nın Enzimatik Biyorejenerasyonu	101
4.3.5. HPLC'de yapılan ölçümlerin değerlendirilmesi	105
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	106
KAYNAKÇA	110
ÖZGEÇMİŞ	117

KISALTMA LİSTESİ

2-CP	: 2-Clorophenol
2-NF	: 2-Nitrofenol
2-NP (2-NF)	: 2- Nitrophenol (2-Nitrofenol)
4-AAP	: 4-Aminoantipyrine
ABD	: Anabilim Dalı
AK	: Aktif Karbon
BAK	: Biyolojik Aktif Karbon
BP	: Bisphenol-A
NOM	: Natural Organic Matter
GAK	: Granüler Aktif Karbon
HMW	: High Molecular Weight
HPLC	: High Performance Liquid Chromtography
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
LMW	: Low Molecular Weight
nm	: nanometre
Ph	: Phenol
PACT	: Powdered Activated Carbon Treatment
PCPs	: Penta Chloro Phenol
PZG	: Plane of Zero Gradient
RPM	: Rounds Per Minute
SOCs	: Syntetic Organic Compounds
SRT	: Çamur bekleme süresi
TAK (PAC)	: Toz Aktif Karbon (Powdered Activated Carbon)
vd.	: ve diğerleri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin özellikleri	33
Tablo 2. Kullanılan aktif karbonların özellikleri.....	34
Tablo 3. 4-AAP metoduyla belirlenen fenol için standart ölçümü	44
Tablo 4. 4-AAP metoduyla belirlenen 2-nitrofenol için standart ölçümü	45
Tablo 5. 4-AAP metoduyla belirlenen bisfenol-A için standart ölçümü	46
Tablo 6. Lakkaz enzimi aktivite tayin yöntemi.....	49
Tablo 7. Lakkaz enziminin aktivite tayini sonuçları.....	51
Tablo 8. Lakkaz enzimi aktivite tayin sonuçları	52
Tablo 9. HPLC’de yapılan fenol için standart ölçümleri	53
Tablo 10. HPLC’de yapılan 2-NF için standart ölçümleri.....	54
Tablo 11. HPLC’de yapılan BPA için standart ölçümleri	55
Tablo 12. Fenolik bileşikler için hesaplanan KOİ	57
Tablo 13. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının fenol adsorpsiyon kapasiteleri	58
Tablo 14. PKDA ve CAgran aktif karbonlarında 25 °C’ de fenol desorpsiyon ve biyorejenerasyon verimlerinin karşılaştırılması.....	66
Tablo 15. Lakkaz Enzimiyle (1 U/mL) fenolün enzimatik biyorejenerasyon verimlerine sıcaklığın etkisi	67
Tablo 16. Lakkaz Enzimiyle (1 U/mL) fenolün enzimatik biyodegradasyon deneyi sırasında alınan numunelerin HPLC’ de ölçülmesi.....	68
Tablo 17. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının 2-NF’ü adsorpsiyon kapasiteleri... 70	
Tablo 18. 2-NF’ün pH 7’de 50 °C’de biyorejenerasyon kapasitesi	77
Tablo 19. Lakkaz enzimiyle (1 U/mL) 2-nitrofenolün enzimatik biyodegradasyon numunelerinin HPLC’ de ölçülmesi	80
Tablo 20. Bisfenol-A adsorpsiyonu için Freundlich izoterm katsayıları	86
Tablo 21. Bisfenol-A adsorpsiyonu için Langmuir izoterm katsayıları ve hesaplanan RL değerleri	89

Tablo 22. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının bisfenol-A adsorpsiyon kapasiteleri	90
Tablo 23. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının bisfenol-A desorpsiyon kapasiteleri ve yüzdeleri	91
Tablo 24. Bisfenol-A desorpsiyonu için elde edilen Freundlich izoterm katsayıları.	93
Tablo 25. Bisfenol-A desorpsiyonu için elde edilen Langmuir izoterm katsayıları ..	95
Tablo 26. 0,2 U/mL Lakkaz Enzimiyle 200 mg/L BPA'nın 25°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri.....	102
Tablo 27. 1 U/mL Enzim Aktivitesi Dozunda Lakkaz Enzimiyle 200 mg/L BPA'nın 25°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri	104
Tablo 28. 1 U/mL enzim aktivitesi dozunda lakkaz enzimiyle 100 mg/L BPA'nın 50°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri	105
Tablo 29. Fenolik bileşiklerin HPLC ölçümlerinde elde edilen piklerinin karşılaştırılması	105

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Lakkaz üreten <i>Trametes versicolor</i> mantarı	21
Şekil 2. <i>Trametes Versicolor</i> 'dan elde edilen lakkazın bakır merkezleri (Riva, 2006).	21
Şekil 3. Fungal lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları (Tuncer, 2010).	22
Şekil 4. Lakkazın BPA gideriminde oluşan ürünler (Atacağ Erkurt, 2015)	24
Şekil 5. Lakkaz ile BPA degradasyonunda oluşan ürünler (Hongyan vd., 2019).....	25
Şekil 6. Biyorejenerasyon sırasında kirletici konsantrasyonları (Çeçen ve Aktaş, 2011: 191)	28
Şekil 7. 25 °C çalışmalarında kullanılan çalkalama sistemi	35
Şekil 8. 25°C'de ve 50°C'de enzimatik degradasyon ve biyorejenerasyon deneylerinde kullanılan çalkalamalı ısıtıcılar	40
Şekil 9. 4-AAP metoduyla fenol için konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi çalışmaları	44
Şekil 10. 4-AAP metoduyla belirlenen Fenol konsantrasyon kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 11. 4-AAP metoduyla belirlenen 2-NF konsantrasyon kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 12. 4-AAP metoduyla belirlenen bisfenol-A konsantrasyon kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 13. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu (ABTS).....	48
Şekil 14. Lineweaver-Burk Lineerizasyon Metodu	50
Şekil 15. ABST ile lakkaz enziminin aktivite tayininde elde edilen kalibrasyon eğrisi	51
Şekil 16. HPLC'de yapılan fenol için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği.....	53
Şekil 17. HPLC'de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 100 mg/L fenol.....	54
Şekil 18. HPLC'de yapılan 2-NF için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği.....	54

Şekil 19. HPLC’de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 200 mg/L 2-NF.....	55
Şekil 20. HPLC’de yapılan BPA için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği	56
Şekil 21. HPLC’de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 100 mg/L BPA	56
Şekil 22. Fenolün distile suyla ve tamponlanmış suyla PKDA ve CAgran’dan desorpsiyon kapasiteleri	60
Şekil 23. 25 °C 1 U/mL ve 5 U/mL dozlarda Lakkaz enziminin fenol degradasyonu (Ph:7,2).....	61
Şekil 24. 25 °C pH 7,2’de ve pH 4,7’de 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol degradasyonu.....	62
Şekil 25. 50°C’de ve pH 7,2’de 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol degradasyonu	63
Şekil 26. Fenol ile biyodegradasyon çalışmalarında görülen kahverengi çökelti.....	63
Şekil 27. Enzim yokluğunda abiyotik ortamda fenol konsantrasyonu.....	64
Şekil 28. Lakkazın fenolü biyodegradasyonu için ph7 şartlarında yapılan deneyde 1 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC’de ölçülmesi	69
Şekil 29. Lakkazın fenolü biyodegradasyonu için ph7 şartlarında yapılan deneyde 4 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC’de ölçülmesi	69
Şekil 30. 2-NF’nin distile suyla ve tamponlanmış distile suyla PKDA ve CAgran’dan desorpsiyon kapasiteleri	72
Şekil 31. 25°C’de ve pH 7 ve pH 5’te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin 2-NF degradasyonu.....	74
Şekil 32. 25°C’de ve pH 7 ve pH 5’te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin 350 ve 170 mg/L	74
Şekil 33. 25°C’de ve pH 7 ve pH 5’te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol ve 2-NF degradasyonu.....	75
Şekil 34. 25 °C’de, pH 6’da enzim yokluğunda abiyotik 2-NF profili.....	75
Şekil 35. Lakkazın 2-NF’yi biyodegradasyonu için ph5 şartlarında yapılan deneyde 1 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC’de ölçülmesi	81
Şekil 36. Lakkazın 2-NF’yi biyodegradasyonu için ph5 şartlarında yapılan deneyde 24 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC’de ölçülmesi	81

Şekil 37. pH5'te 2-NF'nin stok ölçümü 200 mg/L	82
Şekil 38. pH7 2-NF'nin stok ölçümü 160 mg/L	82
Şekil 39. Lakkazın 2-nitrofenolü biyodegradasyonu için pH7 şartlarında yapılan deneyde 3 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromatografi'de ölçülmesi	83
Şekil 40. Lakkazın 2-nitrofenolü biyodegradasyonu için pH7 şartlarında yapılan deneyde 10 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromatografi'de ölçülmesi	83
Şekil 41. Lakkazın 2-nitrofenolü biyodegradasyonu için pH5 şartlarında yapılan deneyde 3 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromatografi'de ölçülmesi	83
Şekil 42. PKDA için BPA adsorpsiyonu	84
Şekil 43. CAgran için BPA adsorpsiyonu.....	85
Şekil 44. PKDA için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	86
Şekil 45. CAgran için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	86
Şekil 46. PKDA için Langmuir adsorpsiyon izotermi	88
Şekil 47. CAgran için Langmuir adsorpsiyon izotermi	89
Şekil 48. Bisfenol-A'nın distile suyla PKDA'dan kümülatif desorpsiyonu	91
Şekil 49. Bisfenol-A'nın distile suyla CAgran'dan kümülatif desorpsiyonu	92
Şekil 50. PKDA için Freundlich desorpsiyon izotermi.....	93
Şekil 51. CAgran için Freundlich desorpsiyon izotermi.....	93
Şekil 52. PKDA için Langmuir desorpsiyon izotermi	94
Şekil 53. CAgran için Langmuir desorpsiyon izotermi	95
Şekil 54. 1 U/mL Lakkaz enzim aktivitesinde farklı BPA konsantrasyonlarında pH 7 ve 25°C şartlarında degradasyon.....	96
Şekil 55. 1 U/mL Lakkaz enzim aktivitesinde farklı pH koşullarında (5 ve 7) ve 25°C şartlarında BPA (50 mg/L) degradasyonu.....	97
Şekil 56. Farklı Lakkaz enzim aktivitesi dozlarında (1 U/mL ve 0,2 U/mL) pH 7 ve 25°C şartlarında BPA (100 mg/L) degradasyonu	98
Şekil 57. pH 7'de enzim yokluğunda abiyotik ortamda 25 °C'de BPA konsantrasyonu değişimi	99

Şekil 58. Enzim yokluğunda abiyotik ortamda 50 °C’de BPA konsantrasyonu değişimi	99
Şekil 59. Lakkaz ile 50°C’de pH 7 ve pH 5 şartlarında BPA degradasyonu	100

ÖZET

Aktif karbon, konvansiyonel biyolojik atıksu arıtma tesislerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aktif karbon biyolojik sistemlerde kombine edildiğinde toksik etkisi olan organik bileşikler adsorplamaktadır ve mikroorganizmaları bu toksik etkilerden korurken, aktif çamurdaki mikrobiyal topluluk da zamanla bu bileşiklere aklime olmaktadır. Böylece mikroorganizmalar zamanla bileşiklerin parçalanması için uygun enzimleri üretmektedirler. Adsorplanmış bileşiklerin konsantrasyon gradyanıyla veya enzimatik aktivitelerle aktif karbonun gözeneklerinden desorbe olmaları ve sonrasında aklime olmuş mikroorganizmalarla biyolojik olarak ayrıştırılmalarına aktif karbonun biyorejenerasyonu denmektedir. Biyorejenerasyon, aktif karbonun kullanım süresini arttırarak aktif karbon ilavesi veya rejenerasyonu ile ilgili masrafları azaltmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda aktif karbonun enzimatik biyorejenerasyonun gerçekleşmesi birçok kez tahmin edilmiştir, fakat doğrudan enzim kullanılmadığı veya işlev gören enzimler tespit edilmediği için enzimatik biyorejenerasyon kesin olarak tespit edilememiştir. Bu çalışmada, hedef bileşik olarak öncelikli mikrokirleticiler arasında bulunan fenol, 2-nitrofenol ve bisfenol-A'nın arıtılmasında aktif karbonun enzimatik biyorejenerasyonu incelenmiştir. Bu amaçla kimyasal ve termal olarak aktive edilmiş granüler aktif karbonlar ile adsorpsiyon, abiyotik desorpsiyon ve enzimatik biyorejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Fenolik bileşikler reaksiyona soktuğu literatürden bilinen lakkaz enzimi enzimatik degradasyon ve biyorejenerasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Sonuçlar enzimatik biyorejenerasyon verimleri ile abiyotik desorpsiyon verimleri arasında hedef bileşik ve aktif karbon türüne bağlı olarak değişen değerlerde önemli farklar olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar literatürde ilk defa sadece hücre dışı enzimlerden kaynaklanan biyorejenerasyonu nicel olarak göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: aktif karbon, biyorejenerasyon, fenol, 2-nitrofenol, bisfenol-A, lakkaz

ABSTRACT

Activated carbon is widely used in conventional biological wastewater treatment plants. When activated carbon is combined in biological systems, it adsorbs organic compounds that have toxic effects and protects microorganisms from these toxic effects, while the microbial community in the activated sludge acclimates to these compounds in time. Thus, microorganisms produce enzymes suitable for decomposition of these compounds within time. The desorption of the adsorbed compounds due to formation of a concentration gradient or by enzymatic activities through the pores of the activated carbon and subsequent biodegradation by microorganisms that have been considered is called bioregeneration of activated carbon. Bioregeneration reduces the costs associated with the addition or regeneration of activated carbon by increasing the lifetime of the activated carbon.

In the literature, enzymatic bioregeneration of activated carbon has been predicted many times, but enzymatic bioregeneration could not be determined precisely because neither direct enzyme was used nor functional enzymes were detected. In this study, enzymatic bioregeneration of activated carbon in the purification of phenol, 2-nitrophenol and bisphenol-A, which are among the primary micro-pollutants as target compound, was investigated. For this purpose, adsorption, abiotic desorption and enzymatic bioregeneration studies were carried out with chemically and thermally activated granular carbons. The laccase enzyme, which is known from the literature to react with phenolic compounds, has been used in enzymatic degradation and bioregeneration studies. The results showed that there were significant differences between enzymatic bioregeneration yields and abiotic desorption yields with varying values depending on the target compound and the type of activated carbon. This was the first time in the literature that bioregeneration caused only by extracellular enzymes was shown quantitatively.

Keywords: activated carbon, bioregeneration, phenol, 2-nitrophenol, bisphenol-A, laccase

1. GİRİŞ

Aktif karbon, içme suyu ve atıksu arıtımında yoğun olarak kullanılmaktadır. Aktif çamur ve membran biyoreaktör prosesleriyle entegre edilerek özellikle endüstriyel atık suların veya zor ayrışan mikrokirleticilerin arıtılmasında arıtma performanslarını önemli ölçüde arttırmaktadır. Çoğunlukla endüstriyel atıksulardan gelen ve bu atıksularda yüksek konsantrasyonlarda bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir bölümü öncelikli kirleticiler arasına girmektedir ve biyolojik proseslerde arıtılamamakta veya toksik etki yapmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda hedef bileşikler olarak biyolojik sistemlerde inhibitör etkileri olan ve yüksek konsantrasyonlarda klasik biyolojik sistemlerde artımı zor olan fenolik bileşikler seçilmiştir. Özellikle fenolün literatürde farklı adsorpsiyon, biyorejenerasyon veya enzimatik biyodegradasyon çalışmalarında hedef bileşik olarak kullanılması, literatürle karşılaştırma imkanı vermektedir. Biyolojik ayrıştırılması çok zor olması ve inhibitör özellikleri nedeniyle ikinci bileşik olarak da 2-nitrofenol seçilmiştir. Diğer hedef bileşik olan bisfenol-A endokrin bozucu özelliğiyle öncelikli kirleticiler arasında yer almaktadır. Atık sulardan giderilmesinin ve yüzeysel sularına karışımının önlenmesinin önemli olması nedeniyle bu bileşik ile yapılan arıtma çalışmaları son yıllarda sıklık kazanmıştır.

Çalışmanın amacı, termal ve kimyasal olarak aktive edilmiş karbonların sadece hücre-dışı enzimlerden kaynaklanan biyolojik rejenerasyon kapasitesini tespit etmek ve abiyotik desorpsiyondan olan farklarını incelemektir. Bu amaçla fenol, 2-nitrofenol ve bisfenol-A bileşiklerinin adsorplanabilme, desorplanabilme ve enzimatik biyorejenerasyon kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Enzimatik biyorejenerasyon verimleri ile abiyotik desorpsiyon verimlerinin karşılaştırılması ve aralarındaki farkın tespit edilmesi konsantrasyon gradyanına ek olarak sadece enzimlerden kaynaklanan biyorejenerasyonu deneysel olarak göstermiş olacaktır. Termal ve kimyasal olarak aktive edilmiş iki farklı aktif karbon kullanılarak aktif

karbonun aktivasyon yönteminden kaynaklanan yüzey özelliklerinin adsorpsiyona, desorpsiyona ve enzimatik biyorejenerasyona etkisinin ortaya konulması da amaçlanmıştır. Ayrıca, çalışmanın sonuçlarının uzun vadede biyolojik arıtma tesislerinde kullanılan aktif karbonun sistem içerisinde iyi derecede biyorejenere edilmesini sağlayarak kullanım ömrünü uzatma, verimini artırma ve sık rejenerasyon gereksinimini azaltarak maliyetin düşürülmesi hususunda yenilikçi bir yaklaşıma öncülük etmesi de amaçlanmaktadır.

Çalışmada öncelikle aktif karbonların adsorpsiyon ve desorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Daha sonra abiyotik ortamda yalnız lakkaz ile fenolik bileşiklerin teması sağlanarak lakkazın fenolik bileşikleri giderim potansiyeli incelenmiş ve giderim için uygun olan şartlar belirlenmiştir. Son olarak aktif karbona bileşiklerin doyurulması, ardından enzimle rejenerasyonunun sağlanması ve post-adsorpsiyon çalışmalarıyla iki aktif karbon tipi için biyolojik olarak rejenerasyon potansiyeli belirlenmiştir. Ayrıca hedef fenolik bileşiklerin biyodegradasyon mekanizmaları ve polimerizasyonları, aromatik halkalarının kırılması veya degradasyonları sırasında enzimin etkisiyle oluşabilecek ara ürünler araştırılmıştır. Giderimin uygun şekilde izlenmesi ve oluşabilecek ara ürünlerin tahmini için farklı ölçüm metodları denenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. AKTİF KARBON

Aktif karbon, şekilsiz, gözenekli yapısından dolayı geniş yüzey alanına sahip olan, adsorpsiyon yoluyla çözünmüş inorganikleri ve organikleri tutan, aktivasyon işleminden geçirilmiş yüksek karbon içeriğine sahip maddedir.

Aktif karbonun hammaddesi olarak kömür, linyit, odun, turba, fındık kabuğu, hindistan cevizi kabuğu kullanılabilir. İç yüzey alanının büyük olmasından dolayı fazla miktarda madde adsorbe edilebilir. Adsorptif yüzey alanı 500-1500 m²/g' dır. Gözenekli yapısı çözünenleri ve gazları adsorbe eder. Toplam gözenek hacmi 0,7-1,8 cm³/g' dır.

Toz Aktif Karbon -TAK (Powdered Activated Carbon - PAC) ve Granül Aktif Karbon – GAK (Granular Activated Carbon - GAC) şeklinde bulunur. Üretim prosesi karbonizasyon ve aktivasyon olmak üzere iki aşamadır.

Adsorbsiyon yüzeyindeki gözenekler;

Ultramikroporlar <0,7 nm

Mikroporlar <2 nm

Mezoporlar 2-50 nm

Makroporlar <50 nm olarak sınıflandırılır.

En fazla adsorpsiyon mikro ve mezoporlarda olmaktadır (Çeçen ve Aktaş, 2011: 13).

Aktif karbon, karbon atomlarının kaynaşmış altıgen halkalarından oluşan mikro kristallerden oluşur. Grafit ile benzer yapıdadır. Mikrokristallerin arasındaki boşluklara gözenek denir. Adsorpsiyonun çoğunun gerçekleştiği aktif karbon mikrogözenekleri 3-35 Å ara katman mesafesine sahip iki paralel kristal düzlemi

arasında iki boyutlu boşluklar biçimindedir. Mikrokristallerin çapı kabaca bir karbon altıgen genişliğinin dokuz katıdır. Adsorpsiyon, mikrokristallerin düzlemsel yüzeylerinde ve fonksiyonel grupların uçlarında oluşur. Mikrokristallerin üzerindeki adsorpsiyon van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanır.

Aktif karbon yüzeyi çeşitli oksijen kompleksleri içerir. Bu kompleksler AK yüzeyinde güçlü karboksilik, zayıf karboksilik, fenolik ve karbonil grupları olmak üzere dört çeşittir ve asitli yüzey oksidi formlarında bulunurlar. Ayrıca, halkalı eterler de bulunur. Yüzey oksitlerin varlığı aktif karbonlara polar bir nitelik katar. Yüzey fonksiyonel gruplar çeşitli organik moleküllerin adsorpsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Örneğin aromatik bileşikler karbon yüzeylerindeki karbonil oksijenlerini elektron verici - alıcı kompleksleştirme mekanizmasıyla adsorbe eder. Çözeltinin aromatik halkası elektron tutucu olarak hareket ederken, karbonil oksijen elektron verici olarak hareket eder. Adsorpsiyon mikrokristal düzlemlerin yüzey fonksiyonel grupları ile hidrojen bağlanması ve fenolik protonların halkaları ile kompleksleşmesiyle oluşur.

AK'da kalsiyum, sülfat ve fosfat bulunur. Asidik veya bazik fonksiyonel grupları AK yüzey özelliklerini etkiler. AK' da kül miktarı % 1-12' dir. Kül; silika, alümina, oksitler, toprak alkali metaller içerir. Su arıtımında TAK kullanılıyorken, kül miktarının yüksek olması reaktör duvarlarına yapışmamayı sağlamasından daha avantajlı olmaktadır (Çeçen ve Aktaş, 2011: 15).

2.1.1. Aktif Karbonun Arıtmada Kullanımı

Aktif karbon, endüstriyel proseslerde, hava filtrelerinde, su ve atıksu arıtımında çeşitli organik ve inorganik türleri tutmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, konvansiyonel biyolojik atık su arıtma tesislerinde giderilemeyen veya biyolojik arıtımı zor olan organik bileşiklerin arıtımı için kullanılır. Aktif karbon, kirleticileri adsorbe eder ve arıtma verimini arttırarak çıkış suyunun deşarj standartlarına uygun olmasına yardımcı olur.

Aktif karbon ayrıca biyolojik sistemlerle kombine edilmek suretiyle de yaygın olarak kullanılmaktadır. Toz aktif karbon takviyeli aktif çamur sistemleri ve biyolojik granüler aktif karbon filtrelerinde, aktif karbon toksik etkisi olan veya biyolojik olarak ayrışmaya dirençli organik bileşikler adsorplayarak mikroorganizmaları bu toksik etkilerden korurken aynı zamanda bu bileşiklerin sistemde kalma süresini uzatır. Buna bağlı olarak zamanla bu bileşiklere aklime olan mikroorganizmalar da aktif karbona adsorplanmış bileşiklerin konsantrasyon gradyanına bağlı olarak veya enzimatik aktiviteler sonucunda desorbe olması sonrasında biyolojik olarak ayrıştırılmasını sağlar. Bu mekanizmaya aktif karbonun biyorejenerasyonu denilir. Aktif karbon ile kombine edilmiş sistemlerde biyorejenerasyonun gerçekleşmesi, aktif karbonun biyolojik sistem içerisinde kullanım süresini artırarak aktif karbon ilavesi veya aktif karbonun rejenerasyonu ile ilgili masrafları önemli ölçüde azaltır (Çeçen ve Aktaş, 2011).

Toz aktif karbon ilaveli arıtma, aktif çamur prosesine TAK eklenmesi ile adsorpsiyon ve biyodegradasyonun aynı askıda büyüme reaktöründe olmasıdır. Anaerobik arıtmada ve membran biyoreaktörlere TAK eklenmesiyle de kullanılmıştır. SRT ile aynı sürede TAK sistemde tutulur. TAK atık çamurda kalır ve ayırma işlemi gerektirmemektedir. Endüstriyel atıksu, kentsel atıksu ve içme suyu arıtımında kullanılır. Granüler aktif karbon ilaveli arıtmada GAK üzerinde bağlı büyüyen prosesle biyofilm tabakası geliştirilir. Genellikle ozonlamayla birlikte kullanılması daha verimli olur. Yüzey suları, yeraltı suları, kentsel atıksu, içmesuyu ve depolama sahası sızıntı suyu arıtımında kullanılır. Yüzey ve yeraltı suları arıtımında doğal organik maddelerin (NOM) ve sentetik organik bileşiklerin (SOCs) gideriminde etkilidir. Biyolojik Aktif Karbon - BAK (Biological Activated Carbon - BAC), biyolojik prosese GAK eklenmesiyle oluşturulur. Örneğin, Avustralya’da Gerroa ve Namibia’da Windhoek arıtma tesislerinde, kentsel atıksuların arıtımında fizikokimyasal çöktürme, kum filtrasyonu ve ozonlama aşamasından sonra ayrı olarak BAK filtrasyonunun uygulanır ve sonrasında mikrofiltasyon veya UV dezenfeksiyonu devam eder (Çeçen ve Aktaş, 2011: 141).

TAK ve GAK gelişmiş ayrı biyolojik arıtma sistemleri ve entegre sistemlerde organik kimyasallar, petrokimyasallar, tekstil boyaları, organik mikrokirleticiler, hormonlar, ilaç atıkları, kişisel bakım ürünlerinde bulunan kimyasallar (PCPs), tarım ilaçları gibi maddelerin giderimi için evsel, endüstriyel atıksularda ve sızıntı sularında kullanılmaktadır (Çeçen ve Aktaş, 2011: 30).

2.1.2. Aktif Karbonun Aktivasyonu

Aktif karbonun üretim prosesi karbonizasyon ve sonrasında aktivasyon olmak üzere iki aşamadır.

Karbonizasyon: Katran ve diğer hidrokarbonlar gibi istenmeyen ürünleri kaldırmak üzere kurutulur ve ısıtılır. Piroliz edilir, O_2 ’siz ortamda $400 - 600^\circ C$ ’de karbonize edilir. Bu uçucu düşük molekül ağırlıklı fraksiyonu giderir ve malzemenin aktivasyona girmesine neden olur.

Aktivasyon: Aktif karbon hazırlanırken aktivasyonu kimyasal ve termal olarak iki şekilde yapılabilir.

Termal Aktivasyon: $800^\circ C$ ’nin üstünde buhar veya yüksek sıcaklıklarda CO_2 gibi oksidasyon gazlarının kullanılmasıyla termal olarak aktivasyon sağlanabilir.

Kimyasal Aktivasyon: Hammaddenin fosforik asit (H_3PO_4), çinko klorür ($ZnCl_2$) ve potasyum hidroksit (KOH) gibi kimyasallarla doyurulmasını içerir. Mikrogözenekler aktivasyon işlemi sırasında oluşur. Hammadde elde edilen aktif karbonun özelliklerinde ve performans üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Çeçen ve Aktaş, 2011: 13).

Aktivasyon şekli adsorpsiyonun kimyasal veya fiziksel olmasını, adsorpsiyon kapasitesini, desorpsiyon verimini (adsorpsiyonun tersinirliğini) ve buna bağlı olarak biyolojik sistemlerde biyorejenerasyonu etkiler. Aktivasyonu kimyasal olarak yapılmış karbonlarda baskın mekanizma fiziksel adsorpsiyondur ve adsorbe etme miktarı termal olarak aktive edilmişlere göre daha azdır. Bununla birlikte fiziksel adsorpsiyonun desorbe olması kolay olur ve tersinirliğinin fazla olduğu görülmüştür. Termal aktivasyon yapılmış karbonlarda kimyasal adsorpsiyon mekanizması baskındır ve tersinirliğinin az olduğu görülmüştür. Termal aktive edilmiş karbonlarda, kimyasal

aktive edilmiş karbonlara göre adsorpsiyon verimi daha yüksek, desorpsiyon verimi daha düşüktür (Aktaş ve Çeçen, 2006a).

Fenolik bileşiklerle yapılan önceki çalışmalar özellikle termal olarak aktive edilmiş karbonlarda biyorejenerasyonun konsantrasyon gradyanına bağlı desorplanabilirlikten daha fazla olduğunu ve hücre dışı enzimlerle (enzimatik) biyorejenerasyonun gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir (Aktaş, 2006). Fenoller için termal aktive edilmiş karbonlar adsorpsiyon kapasitelerinin yüksek olması ve biyorejenerasyon veriminin yüksek olması nedeniyle tercih edilir (Aktaş ve Çeçen, 2006a).

2.1.3. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, bir yüzey veya arayüzdeki maddelerin birikimi veya konsantrasyonudur. Adsorban (adsorbate), adsorbe edilen maddedir. Adsorbsiyon yüzeyi (adsorbent), maddelerin tutunduğu yüzeydir. Adsorpsiyon sıvı-sıvı, gaz-sıvı, sıvı-katı, gaz-katı ara yüzlerde oluşabilir. AK' da emici faz katıdır. Katı- sıvı faz arasında varsayımsal bir yüzey tabakada iki bölge tanımlanır. Bu tabakalar AK yüzey tabakası ve katı yüzeyin kuvvet alanında kalan akışkan kısmıdır. Sıvı fazın yüzeyinde oluşan yüzey gerilimi sıvı molekülleri arasındaki cazibe kuvvetlerinden kaynaklanır. Yüzey gerilimini düşüren bir çözünen madde yüzeyde yoğunlaşır. Adsorpsiyon kuvvetleri, çözünürlük kuvveti (maddenin hidrofobik ve hidrofilik olması) ve cazibe kuvvetidir (elektrik, van der Waals ve kimyasal kuvvetler). Van der Waals kuvvetleriyle adsorpsiyon genelde fiziksel adsorpsiyondur (physisorption). 150°C' nin altında baskındır. Fiziksel olarak adsorbe edilmiş molekül ara yüzey içinde serbestçe dolaşır. Kimyasal adsorpsiyona göre daha az kuvvetle bağlıdır. Kimyasal adsorpsiyonda (chemisorption) elektron değişimi ve kuvvetli kimyasal bağ oluşur, yüksek adsorpsiyon enerjisi mevcuttur (Çeçen ve Aktaş, 2011: 17).

Aktif karbona adsorbe edilebilen organik gruplar, evsel ve endüstriyel atıksularda ve içme suyu kaynaklarında bulunan, böcek ve bitki ilaçları, aromatik çözücüler, klorlu aromatikler, fenolik bileşikler, klorlu çözücüler, yüksek moleküler ağırlığa sahip alifatik asitler (HMW), HMW aminler, aromatik aminler, aromatik asitler, eterler, yağlar, alkoller, yüzey etkin maddeleri, çözünmüş organik boyalardır. Düşük molekül

ağırlıklı bileşikler (LMW), LMW aminleri gibi yüksek polariteye sahip bileşikler, glikoller, bazı eterler, nitrozaminler adsorpsiyon için uygun değildir.

2.1.4. Desorpsiyon

Adsorpsiyonun tam tersi mekanizmasıdır. Doymuş aktif karbonun yüzeyi ile sıvı faz (saf su) arasında oluşacak konsantrasyon gradyanı sayesinde desorpsiyon gerçekleşir.

Biyorejenerasyon, konsantrasyon gradyanı ve enzimlerin etkisi ile adsorplanan kirleticilerin suya salınmasıyla sıvı fazda bulunan enzimlerin veya mikroorganizmaların kirleticileri parçalamasıdır. Giderim devam ettikçe konsantrasyon gradyanı oluşur ve kirleticiler sıvı faza geçmeye devam eder. Bu nedenle desorpsiyon, biyorejenerasyonun önemli aşamalarından biridir.

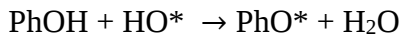
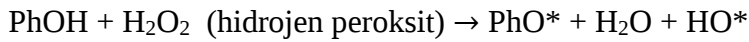
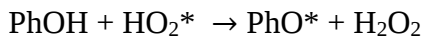
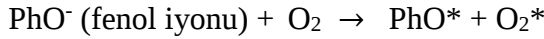
Desorpsiyon ve biyorejenerasyon arasındaki ilişki:

Biyorejenerasyon sadece kolaylıkla desorbe olabilen bileşiklerle sınırlı değildir. Ancak humik maddeler gibi bazı kompleks substratların AK'dan biyorejenerasyonu sınırlı olmaktadır. Çünkü bunların adsorpsiyonu tersinir değildir (irreversible). Bu nedenle biyorejenerasyon adsorpsiyonun tersine çevrilebilirliği ile kontrol edilir. AK desorbe olamayan (nondesorbable) bileşiklerle yüklendiğinde biyorejenere olamaz. Böyle durumlar düzensizlik veya gecikme (irreversibility) olarak adlandırılır.

Tersinir olmayan adsorpsiyona yol açan iki mekanizma vardır. Bunlardan biri adsorban moleküllerin, karbon yüzeyinin aktif bölgeleri üzerindeki özel fonksiyonel gruplara yüksek enerjili kovalent bağlanmasıdır. Yüzey fonksiyonel grup ve adsorbanın tipine bağlı olarak yeterince güçlü bir bağ ve dirençli desorpsiyon oluşturmaktadır. Bu nedenle kimyasal adsorpsiyon geri dönüşümü olmayan adsorpsiyonu açıklamaktadır. Diğer taraftan geri dönüşümlü (reversible) adsorpsiyon, van der Waals kuvvetleri ve zayıf yük transfer komplekslerinin bir sonucudur. Fiziksel adsorpsiyon enerjisi zayıf olduğundan daha tersinirdir. İkinci olasılık fenolik bileşiklerin oksijen varlığında AK üzerinde oksidatif polimerizasyonudur. Bir oksidatif birleştirme reaksiyonu geçiren fenol molekülleri (PhOH) aktif karbon üzerinde geri dönülmez şekilde adsorbe olabilmektedir. Moleküler oksijen, denklemde

gösterildiği fenoksi radikalleri (PhO*) üretmek için fenol molekülleri ile reaksiyona sokularak oksidatif birleştirme reaksiyonlarında bir başlatıcı olarak hareket etmektedir (Çeçen ve Aktaş, 2011: 196).

Fenollerin oksidatif polimerizasyonu:



Her fenolik molekülden bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla oluşan fenoksi radikalleri (PhO*) oda sıcaklığında diğer fenoksi radikalleri ile doğrudan bağlanmaya katılabilirken, aktif karbon yüzeyi bir katalizör görevi görür. Nitrofenoller haricindeki fenolik bileşiklerin oksidatif bağlanmasının, adsorpsiyonun tersinirliğini azalttığı bulunmuştur (Vicić vd. 1993). Fenoksi grupları adsorbanın oksitlenme olasılığını etkilemektedir. Genel olarak doymamış gruplar (karboksil ve nitro grupları) oksidasyona karşı duyarlılığı azaltırken, doymuş gruplar (metil grupları) oksidasyon olasılığını arttırmaktadır.

Fenolik bileşiklerin adsorpsiyonu tamamen fiziksel tipte değildir. Ayrıca literatürde fenolik olmayan bileşikler için oksidatif polimerizasyon bildirilmemiştir. Örneğin, bir çalışma fenolik bir bileşiğin ve o-cresolün adsorpsiyonunun moleküler oksijen varlığında arttığını gösterirken, fenolik olmayan bir bileşiğin 3-klorobenzoik asitin adsorpsiyonunun oksijen varlığından etkilenmediğini göstermiştir. (Jonge vd., 1996)

Fenoller için aktif karbonun fiziksel formundan (toz veya granüler) çok aktivasyon tipi ve yüzeyin kimyasal özellikleri fenolün adsorbe edilebilirliği ve tersinirliği üzerinde daha önemli rol oynamaktadır (Aktaş ve Çeçen, 2006b). Termal olarak aktive edilmiş karbon yüksek oranda tersinir olmayan adsorpsiyona ve düşük

biyorejenerasyona sahiptir. Bunun sebebi termal olarak aktive edilmiş karbonların oksijene olan ilgisi ve oksijen ile temas ettiğinde yüzey kimyasında olan değişimdir (Çeçen ve Aktaş, 2011: 197). Termal aktivasyon oksijen olmadan gerçekleştirildiği için reaktif bir yüzeye yol açar. Kimyasal aktivasyonda ise aktif karbon tamamen oksitlenmiş aktif bölgeleri olan bir yüzeye sahip olduğundan oksijen ile etkileşimi yüzeyi etkilememektedir (Aktaş, 2006).

Fenolün oksidatif polimerizasyonu, termal olarak aktifleştirilmiş karbonların düşük biyorejenerasyonu için makul bir açıklamadır. Bununla birlikte, termal olarak aktifleştirilmiş karbonların biyorejenerasyon verimleri, enzimatik biyorejenerasyon nedeniyle toplam desorpsiyondan yüksek olabilmektedir (Aktaş, 2006).

2.2. BİYODEGREDASYON

Biyodegradasyon, biyolojik olarak parçalanabilir, yavaş biyolojik parçalanabilir ve adsorbe edilebilir bileşikler için geçerlidir. Yavaş biyodegrade olabilen bileşikler yeterli süre verildiğinde bozunabilirler.

Toz aktif karbonlu (TAK) aktif çamur arıtma (Powdered Activated Carbon Treatment – PACT) sistemlerinde bu bileşikler TAK tarafından adsorbe edilirler ve çamur yaşı süresince biyokütleyle temas halindedirler. AK içermeyen biyolojik arıtma tesislerinde yavaş parçalanabilen organik bileşikler çıkış suyuyla atılırlar. AK'lu sistemlerde kloroform, klorinli benzenler gibi parçalanamayan bileşikler adsorbe edilirler ve bağlı mikroorganizmalar tarafından metabolize edilirler.

AK'a adsorplanan kirleticiler sistemde daha uzun süre kalırlar. Örneğin PACT 'da çözünmüş organikler SRT ile eşit sürede sistemde kalırlar (10-50 gün). Konvansiyonel sistemlerde HRT ile aynı sürede sistemde kalırlar (6-36 saat). Sonrasında atık çamur ile birlikte sistemden atılırlar. GAK' da çamur bekleme süresi daha uzun olduğundan bağlı ve askıda mikroorganizmalar aklime olurlar ve biyodegradasyon verimi artar (Aktaş, 2011).

2.2.1. Fenolik Bileşiklerin Biyodegradasyonu

Su Kirliliği Kontrolü yönetmeliğine göre atıksularında en çok fenolik bileşik içeren endüstriler olan petrol, tekstil, kimya ve kömür sanayilerinden çıkan atıksuyun alıcı ortama deşarj standartı 1 mg/L olarak sınırlandırılmıştır. Fenolik bileşiklerin giderim yöntemleri arasında aktif karbona adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Aktif karbona adsorpsiyon yöntemi ile fenol için yapılan bir çalışmada yaklaşık %60 oranında giderim verimi sağlanabilmektedir (Aktaş ve Çeçen, 2006).

Fenolik bileşikler, suda yaşayan hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar için biyolojik aktivitelerde inhibitör görevi yaparlar. Aynı zamanda akut toksisite etkisiyle tüm canlılar için tehlikeli olabilmektedirler. Fenoller, toksik etkilerinden

yararlanılarak mikrop öldürücülerin, ilaçların, herbisitlerin, boyaların ve asitlerin üretiminde dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılırlar. Fenole maruz kalmak karaciğerde, böbrekte, ciltte, sindirim sisteminde, sinir sisteminde ve üst solunum yollarında hasara neden olabilir (Aktaş, 2006). 1 g fenolün insanlarda öldürücü bir etkiye sahip olduğu ve vücutta fenol birikiminin kansere yol açabileceği bilinmektedir. Bu etkilerinden dolayı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA – Food and Drug Administration) içme sularında fenol konsantrasyonunu 0,001 mg/L olarak sınırlandırmıştır. Türkiye’de ise Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından İçme Suyu Temin Edilen Suların Kalitesi ve Arıtılması Hakkında Yönetmelik ile içme sularında fenol konsantrasyonu 0,01 mg/L olarak sınırlandırılmıştır.

Kirletici madde konsantrasyonu açısından zengin olan endüstriyel atıksularda yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşik bulunurlar. İlaç, maden, plastik, kağıt, tekstil, gıda, deri endüstrilerinin atıksuları ve patlayıcı üretimi, reçine üretimi, petrol rafinerileri, kömür işleme tesisleri, demir-çelik fabrikaları atık suları fenol ve fenol türevi bileşikleri yüksek oranda içeren endüstriyel atıksulardır. Su Kirliliği Kontrolü yönetmeliğine göre atıksularında en çok fenolik bileşik içeren endüstriler olan petrol, tekstil, kimya ve kömür sanayilerinden çıkan atıksuyun alıcı ortama deşarj standartı 1 mg/L olarak sınırlandırılmıştır.

Fenollerin gideriminde fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılır. Biyolojik yöntemler, az maliyetli ve zararsız ürünler oluşması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Biyolojik uygulamalarda aktif çamurla fenollere aklime olmuş mikroorganizmaların kullanımı ve membran uygulamaları yaygındır. Biyolojik proseslerde halkasal yapıyı parçalayan karışık bakteri kültürü veya fungus türleri kullanılmaktadır. Halkaya bağlı grupların sayısı, bağlanma yeri, karmaşıklığı giderimi etkileyen faktörler arasındadır. Biyolojik arıtmada bazı fenoller mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Deveci, 2014).

Fiziksel ve kimyasal giderim yöntemleri olan koagülasyon-flokülasyon, iyon değişimi, adsorpsiyon, klorlama ve membran proseslerinden yaygın olarak kullanılanları aktif karbona adsorpsiyon ve iyon değişim reçineleri uygulamalarıdır.

Fenoller bakteriler tarafından aerobik şartlarda karbondioksite, anaerobik şartlarda karbondioksit ve metana dönüştürülür. Fenollerin biyolojik parçalanması sonucu yapısına, mikroorganizma türüne ve ortama göre benzoat, kateşol, β - ketoadipat, cis-cis mukonat, asetat, oksalik asit, maleic asit, formik asit ve suksinat gibi farklı çeşitlerde oluşan çok sayıda ara ürün vardır. Aromatik halkalar oksijen kullanılarak orto veya meta oksidasyonu ile açılırlar. Kararlı yapıda olan fenol oksijen ile kararsız yapıda olan kateşole dönüştürülür (Deveci, 2014).

Klorlu aromatik bileşiklerin aerobik olarak degradasyonunda hidroksilasyon ve deoksijenasyon ile kateşollerin oluşması ile başlamaktadır. Oluşan ara ürünlerin aromatik halkası kırılır ve klor uzaklaşır. Son olarak oluşan ürünler minerilize edilir ve böylece parçalanma reaksiyonu tamamlanmaktadır. Klorlu aromatik bileşiklerin parçalanmasında *Arthrobacter*, *Phanerochaete*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* gibi mikroorganizmaların kullanıldığı bildirilmiştir (Deveci, 2014).

Enzimlerin halkasal yapıları parçalama özelliği beyaz çürükçül fungusların odun çürütme özelliğinden gidilerek tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin gideriminde enzim kullanılmasının, mikroorganizma kullanılmasına göre bazı avantajları bulunmaktadır. Enzimlerle yapılan çalışmalarda klorlu fenollerin daha az toksik metabolitlere parçalandıkları görülmüştür (Hammel ve Tardone, 1988).

2.2.1.1. Fenol ile Yapılan Giderim Çalışmaları

Sulu çözeltilerde fenolik bileşiklerin giderimi için beyaz çürükçül fungus türü *Phanerochaete chrysosporium*'un kullanıldığı bir çalışmada fungus Ca-alginate, Ca-alginate-polyvinyl alcohol (PVA) ve pektine tutundurulmuştur. Tutunan mikroorganizmaların serbest mikroorganizmalara göre daha yüksek oranda giderim sağladığı tespit edilmiştir. (Wu ve Yu, 2007).

Fenolik bileşiklerin parçalanmasında *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* fungal türlerinin karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmada en yüksek giderim verimi ve enzim

aktivitesinin beyaz çürükçül fungus türü olan *Phanerochaete chrysosporium* türünde olduğu tespit edilmiştir (Garcia vd., 2000).

Bu iki çalışmadan beyaz çürükçül fungusların fenol türevi bileşikleri oldukça iyi giderebildikleri anlaşılmaktadır.

Pseudomonas putida kültürüyle fenolün parçalanmasının incelendiği bir çalışmada 1000 mg/L fenol için ölçülebilir bir parçalanma ve mikroorganizma gelişimi gözlenmemiştir. Sonrasında ortama glikoz ve maya kültürü eklenerek yüksek konsantrasyonlardaki fenolün farklı karbon kaynakları ilavesiyle degradasyonu incelenmiştir. 750 mg/L konsantrasyonda fenol bulunan ortama 0,2 g/L ile 4 g/L arası değişen derişimlerde maya kültürü eklenmiştir. Maya kültürünün 2 g/L'den az olduğu durumlarda giderim verimi, 2 g/L'den çok olduğu durumlara göre daha iyi olmuştur. Maya kültürünün fazla olmasının enzim aktivitesini engellediği tespit edilmiştir. Glikoz eklenmesinin degradasyon mekanizmasındaki değişimini incelemek için reaktöre glikoz eklenmiştir. 1 g/L'den az konsantrasyonlardaki glikoz fenolün giderimine yardımcı olurken, fazla konsantrasyonların giderimi azalttığı görülmüştür (Loh ve Tan, 2000).

Pseudomonas putida kültürüyle benzen, fenol ve toluen bileşiklerinin degradasyonunun incelendiği bir çalışmada hedef bileşiğe adapte olmuş kültürün, adapte olmamış olanlara göre daha kısa sürede degrade ettikleri görülmüştür. Yaklaşık 90 mg/L benzen ve tolueni 24 saatte parçalayan kültürün, adaptasyondan sonra 6 saatte parçaladığı gözlemlenmiştir. 50 mg/L fenol 90 saatte giderilebiliyorken, kültürün adaptasyonundan sonra giderim 18 saatte olmuştur. Fenolün gideriminin ve mikroorganizmaların adaptasyonunun benzen ve tolüene göre daha uzun sürede gerçekleştiği görülmüştür (Abuhamed vd., 2004).

P. putida kültürüyle fenol, benzen ve toluen hedef bileşik olarak seçilerek tek ve karışık derişimde hazırlanan havalandırılmalı, kesikli reaktörler kullanılmıştır. Tek bileşik içeren reaktörlerde adaptasyon süreci benzen için 6,5, toluen için 7 ve fenol için 18 saattir. Giderim süreleri benzen için 14, toluen için 13, fenol için 85 saattir. Hedef bileşiklerin karışık bulunduğu reaktörlerde fenol ve tolüenin bulundurğu

reaktörde mikroorganizmalar önce tolüeni, fenol ve benzenin bulunduğu reaktörlerde mikroorganizmalar önce benzeni karbon kaynağı olarak kullanmışlardır. Toluen ve benzenin bulunduğu reaktörde ikisini eş zamanlı kullanmışlardır. Aromatik hidrokarbonların birlikte bulunduğu ortamda mikroorganizmaların fenol ve türevi bileşikleri daha karbon kaynağı olarak en son kullandıkları ve giderim ve adaptasyon süreçlerinin uzun olduğu görülmektedir (Reardon vd., 2000).

2.2.1.2. 2-Nitrofenol ile Yapılan Giderim Çalışmaları

2-NF ve fenolün aktif çamurla gideriminin karşılaştırıldığı bir çalışmada ortamda tek karbon kaynağı olarak fenol bulunduğunda aklime olmamış kültürle giderilebiliyorken, ortamda tek karbon kaynağı olarak 2-NF bulunduğunda 2-NF'nin giderilemediği görülmüştür. Ortamda 2-NF ve fenol birlikte bulunduğunda 2-NF'nin giderimi sağlanmıştır. Ortama fenolün eklenmesiyle değişen şartlar mikrobiyal toplulukta değişime yol açmıştır. Bu şekilde aklimasyonu sağlanmış olan aktif çamur 2-NF'yi giderebilmiştir. Fenolün çoğu 24 saat içinde uzaklaştırılmış, tamamı ise 48 saat içinde uzaklaştırılmıştır. Aklimasyonsuz çamurda fenol 24 saat içinde uzaklaştırılabiliyorken 48 saate çıkmasının sebebi 2-NF'nin ortamda inhibisyon etkisi yapmasıdır. 2 günlük sürenin bitiminde fenol ortamdaki tamamen uzaklaştırılmasına rağmen 2-NF için giderim olmamıştır. 2-NF'nin tamamının giderimi 2 günün ardından 6 günlük havalandırmayla sağlanmıştır. Bunun sonucunda mikroorganizmaların öncelikli karbon kaynağı olarak fenolu tercih ettikleri ve 2-NF'nin gideriminin fenole göre daha zor olduğu görülmüştür. Aklimasyon aşamasında üretilen ve fenole özgü olmayan fenol monooksijenaz enzimleri 2-NF'nin biyolojik olarak parçalanmasında rol oynamıştır. Deneyler sonunda ölçülen fenolik olmayan KOİ, fenolün biyodegradasyonu sırasında oluşabilecek yan ürünlerden ve 2-NF'nin çözünür mikrobiyal ürünlerinden (SMP) kaynaklanmaktadır (Aktaş, 2006).

Bu çalışmada, fenolün 2-CP ve 2-NF için iyi bir büyüme substratı olduğu görülmüştür. Biyorejenerasyon çalışmaları da biyodegradasyonda olduğu gibi 2-NF'nin AK'dan çıkarılması ortamda aklime edilmiş çamurun varlığında yani fenol bulunduğunda sağlanmaktadır. Böylece çalışmada, biyorejenerasyona metabolik bir substrat varlığının etkisi de ortaya koyulmuştur. Çalışmada elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri AK' a adsorpsiyon rekabetini yani daha kuvvetli bağlanmanın hangi hedef

bileşik için olacağını ortaya koymuştur. Sonuçlar, adsorpsiyon enerjilerinin ve ilk yüklenme koşullarının biyorejenerasyonda etkili olduğunu göstermiştir. Hem desorpsiyon hem de biyolojik bozunma, başlangıç adsorpsiyon koşullarına ve bileşiklerin biyodegrede olabilirliklerine bağlı olarak biyorejenerasyonda hız sınırlayıcı olabilmektedir. Çözücü ekstraksiyonları, desorbe edilemeyen ve biyorejenere edilemeyen önemli miktarda kimyasal olarak adsorbe edilmiş molekül olduğunu göstermiştir (Aktaş, 2006).

Aynı zamanda çalışmanın sonunda AK'da biyorejenerasyonun ekzoenzimlerle olmasının tespitinin gerekliliği ve bu konunun üzerinde çalışılmasının yenilikçi ve pratik çözümler geliştirilmesi açısından önemi vurgulanmaktadır (Aktaş, 2006).

Nitrofenollerle yapılan başka bir çalışmada nitrofenollerin yüksek toksisiteye sahip oldukları ve insan vücudunda aktive olma yetenekleri nedeniyle kansere sebep oldukları ve düşük biyodegradasyonları ile çevrede ciddi kirlilik oluşturdıkları rapor edilmiştir (Liu vd., 2011) 2-NF'nin, nitrofenolün diğer izomerik formlarından daha toksik olduğu ve sudaki yüksek çözünürlüğü ve stabilitesi bilinmektedir (Alam vd., 2017).

2-nitrofenolün yapısındaki aromatik halka nedeniyle klorlama ile yapılan giderim işlemlerinde stabil ve zehirli olan klorlu yan ürünler oluşmaktadır (Kupeta vd., 2018). Doğal sularda 2-nitrofenol konsantrasyonu 0.01-2.0 µg/L arasında olmak üzere sınırlandırılmıştır (Huong vd., 2016).

Nitrofenollerin atık sudan giderimi için fotokatalitik degradasyon, fenton işlemi, biyodegradasyon işlemi ve adsorpsiyon dahil olmak üzere çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu tekniklerin arasında, basit tasarımı ve kolay kullanımı nedeniyle adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu adsorpsiyon yöntemlerinde son yıllarda araştırmacılar aktif karbonun yanı sıra tarımsal ürünlerden veya endüstriyel katı atıklardan elde edilen çeşitli düşük maliyetli adsorbanları incelemektedirler (Nguyen vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada subkritik su hidrolizi ile işlendikten sonra pirinç kabuklarının ve pirinç samanının adsorban olarak kullanılarak 2-nitrofenolü adsorpsiyon kapasitesi

incelenmiştir. PH 7 için 493 K'de 2-NF'nin başlangıç konsantrasyonu 100 mg/L subkritik su ile hidrolize edilmiş pirinç samanı için 92.97 ± 1.31 mg/g olacak şekilde yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir. Bu çalışmada, lignoselülozik biyoetanol tesisinden gelen katı yan ürünler değerlendirilmiştir (Abaide vd., 2019).

2.2.1.3. Bisfenol-A ile Yapılan Giderim Çalışmaları

Son yıllarda giderimi üzerine çalışmaların arttığı diğer fenolik bileşik Bisfenol-A'dır. Endokrin bozucu bileşiklerden olan bisfenol-A, polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin üretiminde sıklıkla kullanılan endüstriyel bir kimyasaldır. Bisfenol-A'nın kadın üreme sistemi üzerinde endokrin bozucu özelliğinin yanı sıra prostat ve meme kanseri gelişmesi, obesitede artış, erkek spermalarında azalma, balık ve memelilerde fertilitenin azalması gibi hem insan sağlığı üzerine hem de ekolojik açıdan birçok olumsuz etkisi bilinmektedir (Asadgol vd., 2014). Konvansiyonel aktif çamur tesislerinde bir miktar giderimi sağlansa bile tamamen giderimi oldukça zordur ve yüksek maliyetli ileri kimyasal oksidasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Asadgol vd., 2014). Bu açıdan bisfenol-A ile yapılacak olan enzim ilavesiyle güçlendirilmiş biyolojik veya aktif karbona adsorpsiyon gibi fizikokimyasal yöntemlerle kombine edilmiş biyolojik sistemlerde arıtılabilirlik çalışmaları önem kazanmaktadır.

Nehir suyunda bisfenol A biyodegradasyonuna sahip bakterilerin izolasyonunu ve aerobik ve anaerobik şartlar altında BPA bozunmasının farkını belirlemek için yapılan bir çalışmada üç nehir suyu örneğine eklenen 1 mg/L BPA'nın aerobik koşullar altında hızlı bir şekilde giderildiği görülmüştür. Aerobik koşullarda BPA 2-3 günde yarılanmıştır ve 10 günde tamamen bozunmuştur. Anaerobik şartlarda ise 10 gün boyunca giderim % 10'dan az bir miktarda tespit edilmiştir. Ayrıca, yüksek BPA giderimi (yaklaşık % 90) gösteren iki bakteri türü *Pseudomonas sp.* ve *Pseudomonas putida*'dır (Kang ve Kondo, 2002).

GAK'da endokrin bozucu bileşiklerin adsorpsiyonunun incelendiği bir çalışmada nonilfenol ve bisfenol-A adsorpsiyonu için, kullanılmış karbonlar dahil çeşitli karbonlar denenmiştir. Kömür bazlı saf karbonun, daha büyük gözenek hacmi

nedeniyle nonilfenol ve bisfenol-A'nın adsorpsiyonunda diğer karbonlardan daha etkili olduğu bulunmuştur. Amitrol ile çalışıldığında biyolojik bozulma ile etkili bir şekilde uzaklaştırılrsa da, az miktarda adsorbe olmuştur. Tüm karbonlar, karbon türü ve çalışma yılına bakılmaksızın amitrol için düşük adsorpsiyon kapasiteleri göstermiştir. Amitrolü adsorbe etmeye alışkın olan kullanılmış karbonlarda bulunan mikroorganizmalar, amitrolü saf karbondan daha iyi uzaklaştırmıştır. Endokrin bozucu bileşiklerin adsorpsiyon mekanizması hakkında fikir veren bu çalışmada gözenek hacminin adsorpsiyon için önemli olduğu ancak elektriksel etkileşim nedeniyle yüzey yükünün ve pH'nın da önemli olduğu görülmüştür (Choi vd., 2005).

2.2.2. Lakkaz Enzimiyle Fenolik Bileşiklerin Degredasyonu

2.2.2.1. Enzimatik Reaksiyonlar

Enzimler canlı organizmalardaki çoğu kimyasal reaksiyonları kolaylaştıran veya hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin protein yapısına apoenzim denir. Bazı enzimler katalizleme reaksiyonları için apoenzime bağlanan metal iyonu olan kofaktöre veya kompleks bir organik bileşik yapısında olan koenzime ihtiyaç duyarlar. Her enzimde apoenzimlerin yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri farklıdır. Bu nedenle apoenzim enzimin özelliğini belirleyen kısımdır (Sekme, 2011). Enzimler aktif ya da inaktif olma durumlarına göre, faaliyet gösterdikleri yere göre ve katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılmaktadırlar. Aktif halde bulunan enzimler etki ettiği reaksiyonun çeşidine göre ve etki ettikleri maddenin sonuna “az” eki getirilerek adlandırılmaktadır. İnaktif halde bulunanlar substratın sonuna “jen” eki getirilerek adlandırılır. Salgılanıp faaliyet gösterdikleri yere göre sınıflandırmada hücre içindeki enzimlere “hücre içi” ve salgılandıkları yerden başka yerde faaliyet gösterenlere ise “hücre dışı” enzimler denmektedir.

Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), 1961 yılında yayımladığı raporda, enzimlerin katalizledikleri tepkimelere göre sınıflandırılmaları için bir numara dizisi oluşturulmuştur. Bu numaralandırma sistemine göre enzim kodu (EC) kısaltmasıyla başlar ve 4 sayı içeren bir kod numarası içerir (EC.1.10.3.2). Numaralardan ilki katalizlenen tepkimenin türünün ait olduğu sınıftır. 2. ve 3. Sayılar alıcı ve verici

gruplarını, 4. sayı ise adlandırılan enzimi belirtmektedir. Bu düzenlemeye göre enzimler, katalizledikleri tepkime türüne göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar (sentetazlar) olarak 6 gruba ayrılmıştır (Şimşek, 2011).

Enzim substrat kompleksinde substrat molekülü enzimin aktif merkezine bağlanarak enzim-substrat kompleksi olarak adlandırılan kararsız bir bileşik oluşturur. Bu bileşik enzim-ürün kompleksine dönüşür. Son olarak enzim ve ürün ayrılır, serbest kalan enzim tekrar katalizleme reaksiyonlarında kullanılabilir (Şimşek, 2011).



Enzimler canlı hücreler tarafından hücre içi ve hücre dışı enzimler olarak sentezlenirler. Sentezlenen enzimler hücreler canlılığını yitirdiğinde de bir süre aktif kalırlar. Tüm canlı hücrelerde oluşan reaksiyonlar enzimlerle uzak veya yakın bir şekilde ilgilidirler. Protein yapısında olmalarından dolayı proteinler gibi ısı ile denatüre olurlar ve ayrıca ortamın asit veya alkali olmasına hassastırlar.

Enzimler ile katalizlenen reaksiyonlar diğer reaksiyonlara göre 10^3 - 10^8 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Enzim tepkimelerinde substratın tamamı ürüne dönüştürülmektedir, yani yan ürün meydana gelmemektedir. Enzim çok büyük bir moleküldür fakat asıl tepkimenin yürütüldüğü aktif merkez küçük bir bölgedir. Enzim ile substrat birbirlerine elektrostatik, hidrojen ve Van der Waals bağları gibi zayıf bağlarla bağlanır (Şimşek, 2011).

Enzimli reaksiyonların hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu faktörler substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, iyonlar, pH, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör veya aktivatör konsantrasyonudur (Sekme, 2011).

Enzimler kağıt, deri, tekstil ve yiyecek-içecek endüstrileri gibi birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Biyolojik atıklar öncelikle hidrolazla işleminden geçirilerek biyolojik polimerleri bir ön arıtma basamağında bozunur. Hidrolazlar, atıkları biyolojik uygulamalara uygun hale getirir ve hayvansal besleme, kültür ortamları, ve biyodizel gibi çeşitli çıkışlara sahip katma değerli şekerlere, proteinlere

ve lipidlere biyo-iletkenlik sağlar. Oksidoredüktazlar ve liyazlar doğadaki çeşitli spesifik kirleticilerin biyotransformasyonu için kullanılır. Oksidoredüktazlar tekstil atık sularının, fenoller, ilaçları ve hormonları içeren suların çoğunlukla filtrasyon teknolojileri ile bağlantılı olarak detoksifikasyonu için değerlidir. Oksidoredüktazlar bir substrattan diğerine elektron transferini katalize eder. Oksitlenmiş substrat elektron verici olarak adlandırılır (Demarche vd., 2012).

2.2.2.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimler aktifliklerinin korunmasıyla uzun süre ve tekrar kullanımlarının sağlanması ve istenildiğinde ortamdan uzaklaştırılabilmeleri için katı bir destek maddesine tutturularak immobilize edilmektedirler. Suda çözünmeyen bir destek materyali tutunma veya birbirlerine bağlanma şeklinde immobilize olabilirler. Bu immobilizasyon kimyasal, fiziksel veya her iki şekilde tutunma şeklinde olabilmektedir.

Kimyasal immobilizasyonda yüzey silanlama, yüzeyin fonksiyonel gruplarla kaplanması veya aktive edilmesiyle enzimin yüzeye tutunmasıdır ve sağlam kovalent bağlar oluşur. Kovalent bağlanma veya çapraz bağlanma şeklinde olabilmektedir. Fiziksel immobilizasyonda enzimin daha zayıf bağlarla polimer matriksi, membran gibi destek materyallerine tutunmasıdır. Adsorpsiyon ve hapsedme şeklinde olabilmektedir.

İmmobilizasyon için kullanılan destek materyalinin yüzeyinin hidrofilik, hidrofobik yapısı, fonksiyonel grupları, gözenekliliği gibi özellikleri enzimlerin aktivitesini belirlemektedir. İmmobilizasyon ile yeni bir ortam oluşturulması enzimin K_m (Michealis sabiti – enzimin affinitesi) değerini, aktivitesini, aktif bölgesini ve optimum pH ve sıcaklık değerlerini değiştirebilir (Şimşek, 2011).

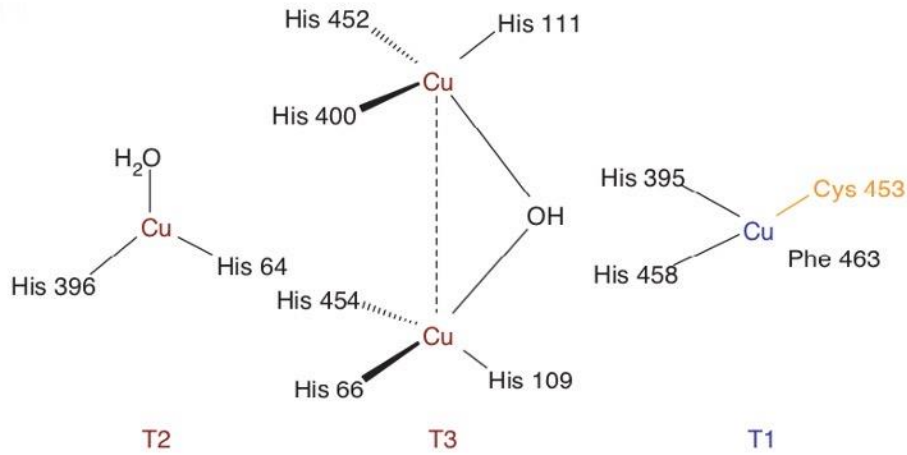
2.2.2.3. Lakkaz Enzimi

Lakkaz, EC 1.10.3.2 kodlu, her molekülü 4 bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktaz enzimidir. Aromatik ve aromatik olmayan farklı bileşiklerin kataliz reaksiyonlarında oksidasyon için moleküler oksijeni kullanmaktadır. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu oksijenin suya indirgenmesiyle sağlanır.

Lakkaz enzimi bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve beyaz çürükçül mantarlardan elde edilebilmektedir. Bu mantarlardan bazıları *Coriopsis Gallica*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Corilous hirsutus*, *Pyricularia oryzae*’ dir. Mantarlardan elde edilen lakkazlar izoenzimlerin kompleksler oluşturarak oligomerize olmalarından meydana gelmektedir. Monomerlerin moleküler kütleleri 50-110 kDa arasındadır. Lakkaz enzimlerinin protein kısmına bağlanmış karbonhidrat kısmı enzimin yüksek kararlılık göstermesini sağlamaktadır (Tuncer, 2010).



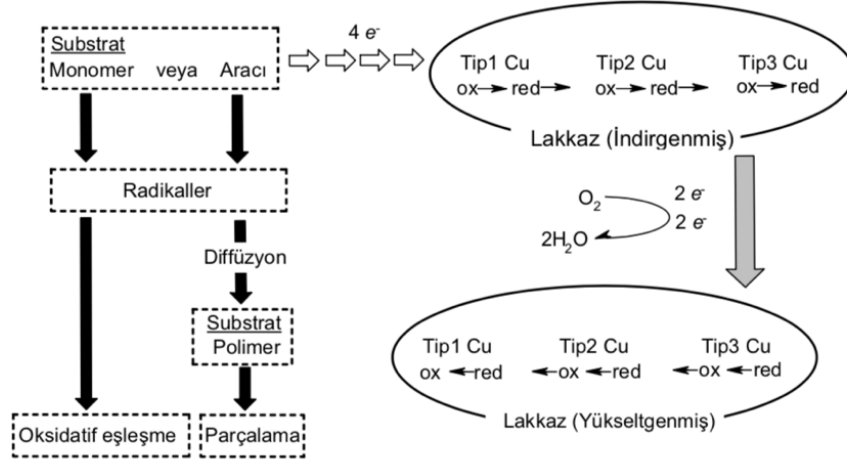
Şekil 1. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı



Şekil 2. *Trametes Versicolor*’dan elde edilen lakkazın bakır merkezleri (Riva, 2006).

Lakkazın yapısındaki bakır iyonlarından biri Tip1 (mavi bölge) bölgesine bağlıdır ve diğer 3 bakır iyonu Tip2 ve Tip3 bölgelerinin oluşturduğu trinuklear kümeye bağlıdır (Tuncer, 2010). Lakkazda bulunan farklı bakır merkezleri, indirgenmiş bir substrattan

aldıkları elektronları, toksik ara-ürünlerin oluşmasına yol açmadan, atmosferik moleküler oksijene aktarırlar. Bu reaksiyon Tip1 bakır tarafından katalizlenen substratın dört monoelektronik oksidasyonu ile olur. Daha sonra elektronlar moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun bırakıldığı trinuklear kümeye aktarılırlar (Şekil 3) (Tuncer, 2010).



Şekil 3. Fungal lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları (Tuncer, 2010).

Tip1 bakır ile dört-basamakta her defasında 1 elektron transferiyle substrat molekülleri oksitlenir. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi) iki basamaklı olarak Tip3 bakır çifti tarafından dört elektronun, moleküler oksijene transferi ile sağlanır. Substratların oksidasyonu reaktif radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Oluşan reaktif radikaller ise enzimatik olmayan reaksiyonlar ile polimerlerin parçalanması, aromatik halkaların kırılması ve monomerlerin çapraz-bağlanması reaksiyonlarına katılırlar (Tuncer, 2010).

Polimerlerin parçalanması düşük moleküler kütleli redoks araçları bileşikler ile katalizlenmektedir. Bu aracı moleküllerin lakkaz tarafından aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra, aktif enzim bölgesinden polimerlerin hedef bölgelerine diffüzelirler.

Monomerlerin oksidasyonu ile oluşan radikaller enzimatik olmayan eşleşme reaksiyonlarına katılırlar. Monomerlerin çapraz-bağlanması için pirogallol, p-kresol,

guaikol, 2,6- dimetoksifenol gibi fenolik bileşiklerin ve aromatik anilinlerin enzimatik oksidasyonu ile radikaller oluşur. Bu radikaller birbiri ile tepkimeye girerek C-C, C-N ve C-O bağları aracılığıyla kovalent olarak bağlanırlar ve dimerleri, oligomerleri veya polimerleri oluştururlar. Oluşan son ürünün yapısı, ara ürünlerin reaktivitesi ve reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH'sı ile belirlenir (Tuncer, 2010).

2.2.2.4. Lakkaz Enzimiyle Fenolik Bileşiklerin Giderim Çalışmaları

Lakkaz Enzimi ilk olarak japon lake ağacı *Rhus vernicifera*' da belirlenmiştir (Yoshida, 1883). Bakteriyel lakkazın kristal yapısı Enguita ve arkadaşları (2003) tarafından aydınlatılmıştır. Lakkaz enzimi ile en fazla çalışma funguslarda gerçekleştirilmiştir. Fungal enzimlerin lignin parçalanmasına katıldıkları kabul edilmektedir ancak, detoksifikasyon prosesi, morfojeniz, patojenisite ve başka fonksiyonlarının da olabileceği bilinmektedir. Lakkazlar, toprak ve suların biyolojik remediasyonu, gıda ve tekstil endüstrisindeki uygulamalar ve kimyasal sentez reaksiyonları gibi aşamalı uygulamalarda, ekolojik önemleri nedeniyle giderek artan bir ilgiye sahiptirler (Otto ve Schlosser, 2014). Beyaz çürükçül funguslar gibi önemli lakkaz üretici mikroorganizmalar farklı kirleticilerin biyolojik giderimi için kullanılmaktadır (Asadgol vd., 2014). Uhnakova vd. (2009) bromlu fenollerin *Trametes versicolor* fungusu ve ürettiği lakkaz enzimiyle biyodegradasyonunu araştırmışlardır. Zhang vd. (2008) 2,4-diklorofenol (2,4-DCP), 4-klorofenol ve 2-klorofenolün, *Coriolus versicolor* fungusunun ürettiği lakkaz enzimiyle degradasyonu üzerine çalışmışlardır.

Funalia trogii'nin endokrin bozucu bileşik olan bisfenol A'nın giderilmesi için kullanıldığı bir çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilen ticari saf lakkazın biyodegradasyon verimlilikleri, *F. trogii*'nin ham ekstraktı ve *T. versicolor*'dan elde edilen saf lakkazla karışımı ve termal olarak inaktive edilmiş *F. trogii* ham ekstraktı karşılaştırılmıştır. BPA hem ham ekstrakt hem de karışım ile tamamen giderilmiştir. BPA konsantrasyonu HPLC ile analiz edilmiştir ve BPA metabolitleri GC-MS ile karakterize edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 2 saatlik inkübasyon süresinden sonra BPA tamamen giderilmiştir. Degradasyon ürünleri olarak nonane, 5- (2-metilpropil) ve 4-etil-2-metoksi-fenol oluşmuştur ve *T. versicolor*'dan elde edilen saf lakkazda ve

F. trogii'nin ham ekstraktında benzer ürünler oluşmuştur (Atacag Erkurt, 2015) (Şekil 4).

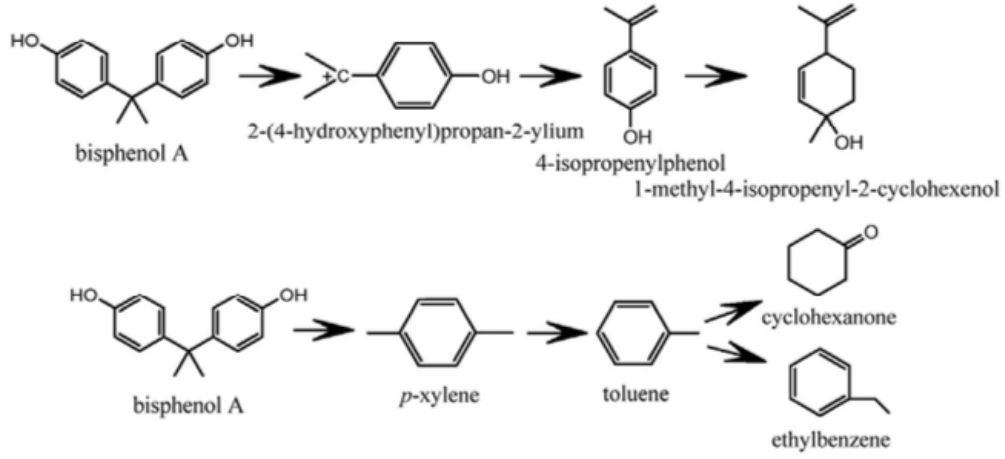
Table 1. Possible by-products of BPA degradation by the crude extract of *F. trogii* and pure laccase of *T. versicolor*. GC-MS analysis of metabolites obtained after degradation of BPA

Retention time (min)	Crude extract (2 h)	Crude extract (4 h)	Pure laccase (4 h)	Control (100 mg/L BPA) (4 h)
4.71	-		-	-
7.58				-
7.95	Nonane, 5-(2-methylpropyl)	Nonane, 5-(2-methylpropyl)	Nonane, 5-(2-methylpropyl)	-
9.41			-	-
11.65	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	-
17.65	-		-	-
20.51	-	Nonadecane	-	-
24.45	-			

Şekil 4. Lakkazın BPA gideriminde oluşan ürünler (Atacağ Erkurt, 2015)

BPA'nın gideriminin ham lakkaz çözeltisi kullanılarak incelendiği bir çalışmada 3 ve 6 saat reaksiyondan sonra dönüşüm ürünleri, gaz kromatografisi ile saptanmıştır. Analiz sonuçları, lakkaz ve BPA arasındaki reaksiyonun kendiliğinden olduğunu ve 24 saatteki bozulma oranının % 88.76'ya ulaştığını göstermiştir. Lakkaz tarafından katalize edilen BPA ara ürünleri arasında etilbenzen, p-ksilen ve sikloheksanon 1-metil-4-izopropenil-2-sikloheksenol bulunmuştur. Bu bulgu, *T. versicolor*'dan ham

lakkaz tarafından BPA degradasyonunun, BPA'yı bağlayan iki benzen halkası arasındaki C atomlarından başladığını ortaya koymaktadır. Ham lakkaz çözeltisinin BPA bozunması üzerindeki katalitik etkisinin, iki faktörü bağlayan izopropilden başladığı görülmektedir. İlk olarak, C-C bağı 2- (4-hidroksifenil) propan-2-ilyum elde etmek için lakkazın katalizi altında kırılmıştır, bu bağ bisfenol A'da çok zayıftır. Sonra izopropenilfenol ve 1-metil-4-izopropenil-2-sikloheksen serbest radikali elde edilmiştir. Aynı zamanda metilbenzen üretilmeye devam etmiştir ve benzen halkası ve siklo-heksanon üreten p-ksilene oksitlenmiştir (Hongyan vd., 2019).



Şekil 5. Lakkaz ile BPA degradasyonunda oluşan ürünler (Hongyan vd., 2019)

Yapılan bir çalışmada lakkaz enziminin (5 U/mL) pH 5'te ve 35°C'de fenol ve bisfenol-A'yı 30 dakikalık karıştırma süresince sırasıyla % 80 ve % 60 oranında degrede ettiği tespit edilmiştir (Asadgol vd., 2014).

Aktif karbonlu sistemlerde saflaştırılmış enzimlerin kullanılmasına yönelik literatürdeki tek çalışmada ise aktif karbon üzerine immobilize edilmiş lakkaz enziminin çeşitli ilaç aktif maddeleri ve bisfenol-A'yı serbest enzimlere kıyasla daha iyi degrede ettiği gösterilmiştir (Nguyen vd., 2016). Ancak bu çalışmada aktif karbonun biyorejenerasyonu çalışılmamış ve nicel olarak da tespit edilmemiştir. Ayrıca çalışmamızda, fenolik bileşiklerin aktif karbona adsorplandıktan sonra serbest enzimler tarafından kesikli reaktörlerde degradasyonu ve biyorejenerasyonu

alışılmışken, Nguyen vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada aktif karbona immobilize edilmiş enzimlerin granüler aktif karbon fıltesinde serbest organik maddeleri degrade edebilme özellikleri incelenmiştir. Ancak, amacı ve yöntemleri çok farklı olsa da Nguyen vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada kirleticilerin aktif karbona adsorplanarak aktif karbon yüzeyine immobilize edilmiş enzimlerle oksitlenebildiğini göstermesiyle biyorejenerasyonun gerçekleşmesinin mümkün olduğunun anlaşılması açısından yol gösterici olmaktadır. Literatürdeki bu çalışmada aktif karbon yüzeyinde lakkazın katalizör etkisiyle substrat ve oksijen arasında elektron transferinin serbest enzimlerle kıyaslandığında daha kolay gerçekleştiği gösterilmiştir.

2.3. ENZİMATİK BİYOREJENERASYON

2.3.1. Biyorejenerasyon

Rejenerasyon, kirleticileri imha etmeden aktif karbondan ayırma yöntemidir. Aktif karbonun rejenerasyon metodları buhar, termal, kimyasal, mikrodalga, ıslak oksidasyon, elektrokimyasal ve biyorejenerasyondur. Biyorejenerasyon AK'un adsorpsiyon kapasitesinin mikroorganizmaların faaliyetleriyle veya enzimlerle yenilenmesidir. Biyolojik prosesler ile birleştirilmiş aktif karbon uygulamalarında biyorejenerasyon ile daha fazla adsorpsiyon meydana gelebilir. Adsorpsiyon ve biyodegradasyonun entegrasyonu ekonomik açıdan ve verim açısından önemlidir.

Literatürde AK'un biyorejenerasyonundan bahsedilen iki ana teori vardır.

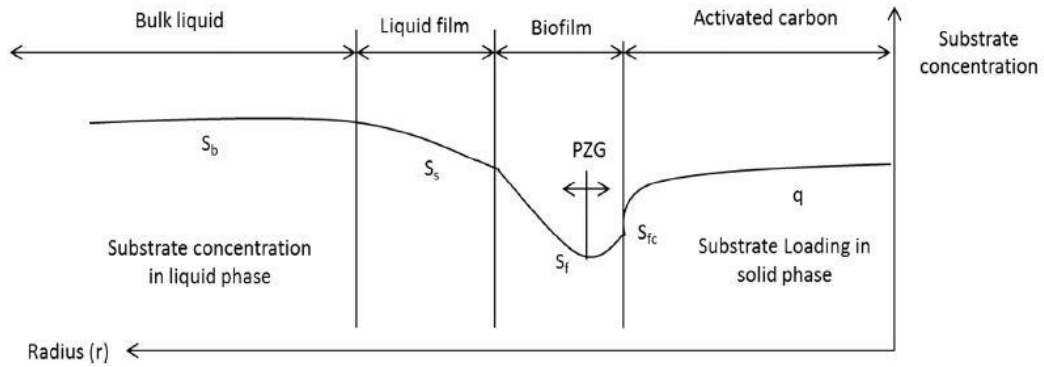
- Konsantrasyon gradyanına bağlı biyorejenerasyon
- Ekzoenzimatik reaksiyonlara bağlı biyorejenerasyon

Konsantrasyon gradyanına bağlı biyorejenerasyon

Biyorejenerasyon teorilerinden biri AK'un yüzeyi ile sıvı yüzey arasındaki konsantrasyon gradyanına bağlı desorpsiyonun ardından hedef bileşiğin biyodegrade olmasıdır. Adsorbe olmuş organikler karbon yüzeyi ve sıvı arasındaki konsantrasyon gradyanına bağlı olarak desorbe olurlar. Dengede, adsorbe olabilen maddeler karbon yüzeyi ve sıvının içinde dağılır. İlk olarak mikroorganizmalar tutulan maddeleri parçalar, denge bozulur ve sonuçta çözelti konsantrasyonu kısmen yükselerek desorpsiyona neden olur. Bu rejenerasyon prosesi tüm tersinir maddeler parçalanana kadar devam eder.

Biyorejenerasyon, biyodegradabilite, mikrobiyal popülasyon, adsorbe edilebilirlik ve adsorbanların tersinirliği faktörlerine bağlıdır. Konsantrasyon gradyanının yanı sıra çözeltideki adsorban molekülleriyle porların içindeki adsorban molekülleri arasındaki Gibbs serbest enerjisi farkının biyorejenerasyon için itici güç olduğu ileri sürülmüştür.

PZG (Plane of Zero Gradient), konsantrasyon gradyanının sıfır olduğu biyofilmdeki çizgi olarak tanımlanır. Biyofilm içindeki bu varsayımsal çizgide substratın konsantrasyonu minimum değere ulaşır. PZG, AK yüzeyinde önceden adsorbe edilmiş substratın biyodegrede edildiği bölümden, sıvının içindeki substratın biyodegrede edildiği bölümü ayırır. Sıvı konsantrasyonu azaldıkça PZG sıvı filme doğru hareket eder. Bu AK'un biyorejenerasyonudur. Sıvı konsantrasyonu arttığında PZG aktif karbon yönüne doğru hareket eder ve biyorejenerasyon gerçekleşmez.



Şekil 6. Biyorejenerasyon sırasında kirletici konsantrasyonları (Çeçen ve Aktaş, 2011: 191)

İki tip AK üzerindeki (SA4 ve CA1) yapılan çalışma fenolün aktif mikroorganizmaların varlığında tek başına abiyotik desorpsiyona kıyasla çok daha iyi biyorejenere olduğunu göstermektedir. Abiyotik desorpsiyon tek başına karbondaki fenol miktarında hafif bir azalmaya yol açmıştır çünkü denge katı ve sıvı fazlar arasında hızla elde edilmiştir. Bununla birlikte sıvı içindeki mikroorganizmaların varlığında, dengeye ulaşmak için sürekli desorpsiyon devam etmiştir. AK'un türüne bağlı olarak kimyasal olarak aktive edilmiş olan CA1 tipi AK'un adsorbsiyonunun düşük değerlerde olduğu fakat daha fazla biyorejenere olduğu görülmektedir (Çeçen ve Aktaş, 2011: 190).

2.3.2. Ekzoenzimatik Reaksiyonlara Bağlı Biyorejenerasyon

Bu teoriye göre biyorejenerasyon mekanizması ekzoenzimler tarafından katalize edilen reaksiyon nedeniyle organik maddenin desorpsiyonunu içerir. Mikrometre boyutlarındaki bakteriler, nanometre boyutlarındaki AK gözeneklerine yayılmak için

çok büyüktür. Bakteriler tarafından salgılanan bazı enzimler, sıvıdan AK gözeneklerine kolayca yayılabilirler ve adsorban ile kolayca reaksiyona girebilirler. Bu ekzoenzimler adsorban ile reaksiyona girmeden önce de adsorbe edilebilirler. Ayrıca organik madde adsorblanabilirliği enzimle reaksiyona girdikten sonra zayıflatılabilir. Bu nedenle adsorbanın daha fazla desorpsiyonu da gerçekleşebilir.

Bir enzimin aktif olarak bir gözenek için katalizör görevi görebilmesi için gözenek çapının enzimin boyutundan en az 3 kat daha büyük olması gerekmektedir. Bir monometrik enzimin ortalama moleküler çapının (molekül ağırlığı 13000-35000 arası) 31-44 Å'nın üzerinde olduğu düşünülürse, ekzoenzimin katalizleyebileceği gözenek çapı 100 Å'dan (10 nm) daha büyük olması gerekmektedir. Bu mezo gözeneklerinin ($\text{Ø}=2\text{nm}-50\text{nm}$) bir kısmının ve mikro gözeneklerin ($\text{Ø} < 2\text{nm}$) dışındadır.

Bazı araştırmacılar, gözenekler içindeki büyük hidrolitik enzimlerin düşük difüzyon hızına bağlı olarak enzimleri içeren biyorejenerasyon mekanizmalarının çok yavaş olacağını öne sürmüşlerdir. Yapılan çalışmalarda fenolle doyurulmuş termal olarak aktive edilmiş karbonların biyorejenerasyon veriminin desorplanabilme veriminden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Fenol esas olarak mikro ve mezo porlarda adsorbe olduğundan ve ekzoenzimlerin mikro gözeneklere ulaşması beklenmediğinden mezoporlarda ekzoenzimatik reaksiyonların olması beklenir. Sonuçlar ekzoenzimatik reaksiyonun mümkün olduğunu ancak aktivasyon tipi, adsorpsiyon karakteristikleri, ve karbonun gözenekliliğinin bunu etkilediğini göstermektedir. Bazı çalışmalar da mezoporlardaki desorpsiyona ekzoenzimatik desorpsiyon denmiştir (Çeçen ve Aktaş, 2011: 192).

Toz aktif karbon takviyeli aktif çamur sistemleri ve biyolojik granüler aktif karbon filtrelerinde, aktif karbon toksik etkisi olan veya biyolojik olarak ayrışmaya dirençli organik bileşikler adsorplayarak mikroorganizmaları bu toksik etkilerden korurken aynı zamanda bu bileşiklerin sistemde kalma süresini uzatır. Buna bağlı olarak zamanla bu bileşiklere aklime olan mikroorganizmalar da aktif karbona adsorplanmış bileşiklerin konsantrasyon gradyanına bağlı olarak veya enzimatik aktiviteler sonucunda desorbe olması sonrasında biyolojik olarak ayrıştırılmasını sağlar.

Biyokütlenin aklımasyonundan kaynaklanan biyorejenerasyon yüksek çamur yaşı gerektirmektedir.

Literatürdeki çalışmalar enzimatik biyorejenerasyonun kuvvetle muhtemel olduğunu göstermektedir (Aktaş ve Çeçen 2009;2010). Ancak biyorejenerasyonun aktif çamurdaki karışık kültürle sağlanması ve yalnızca enzimlerin kullanılmaması nedeniyle enzimatik biyorejenerasyonun geçerliliği kesin olarak ispat edilmemiştir.

Ayrıca önceki çalışmalarda, termal olarak aktive edilmiş karbonların kimyasal adsorpsiyona daha uygun olduğu, kimyasal olarak aktive edilmiş karbonların ise fiziksel adsorpsiyona yol açtığı ve enzimatik biyorejenerasyonun, aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğu kimyasal adsorpsiyonda daha büyük oranlarda gerçekleştiği yani termal olarak aktive edilmiş karbonlarda daha yüksek olduğu tartışılmıştır (Aktaş 2006; Aktaş ve Çeçen, 2006).

Saflaştırılmış enzimlerin degradasyonu zor olan organik kirleticilerin giderimi konusunda yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Oksidoredüktaz enzimleri olan lakkaz, peroksidaz ve tirozinaz gibi enzimlerin fenolik bileşikler, hormonlar, mikrokirleticiler ve tekstil boyalarının gideriminde kullanılmasıyla ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

2.3.3. Biyorejenerasyona etki eden faktörler

Substrat biyodegradasyonu:

Kolay biyolojik olarak parçalanabilir madde genellikle adsorbe edilmez ve tek başına biyolojik aktivite ile uzaklaştırılırken, biyolojik olarak çözünmeyen adsorbe edilebilir bileşiklerin uzaklaştırılması adsorpsiyon ile sağlanır. Biyorejenerasyon, bileşiklerin desorpsiyonu ardından biyodegradasyonu ile olur. Bu nedenle hem biyolojik olarak parçalanabilen hem de adsorbe edilebilir bileşikler söz konusu olduğunda biyorejenerasyon gerçekleşebilir. Örneğin, biyolojik olarak parçalanamayan bir bileşik ile yüklü AK biyorejenerasyon olamaz.

Substratın kimyasal özellikleri:

Fenolik olmayan bileşikler, 3-klorobenzoik asit, fenolik bileşikler, o-krezol'e göre PAC'ın biyorejenerasyonu için daha uygundur. Substratın hidrofobik veya hidrofilik olması, adsorpsiyonu ve desorpsiyonu ve dolayısıyla biyorejenerasyonu etkiler. Fenol, iyonik olmayan ve anyonik yüzey etkin maddelerine göre biyorejenerasyon için daha uygundur.

Karbonun partikül boyutu:

Biyorejenerasyon, PACT (askıda büyüyen) sistemlerine göre BAC (bağlı büyüyen GAC) sistemlerinde daha fazla olmaktadır. Sebebi GAC'ta çamur yaşının daha uzun olmasıdır. AK'un boyutu biyorejenerasyonu etkiler. GAC daha fazla makropora sahiptir. Enzimlerin biyorejenerasyonu için gözeneklerin büyüklüğü enzimin yarıçapından üç kat daha büyük olmalıdır.

Karbon gözenekliliği:

Mikro gözeneklere sahip aktif karbonun gözeneklerine büyük moleküllü enzimlerin ve mikroorganizmaların girememesi biyodegradasyonu engellemektedir. Gözenek çapı daha büyük olduğunda enzimler gözeneklere daha rahat girebildiğinden adsorplanan madde biyodegrade olabilmektedir. Böylece, mezo ve makroporlara sahip AK mikro gözenekler içeren daha fazla biyorejeneratördür (Yalınay, 2018).

Substrat-karbon temas süresi:

Bileşik ve AK arasında temas süresinin uzatılması adsorbe edilen bileşiğin kuvvetli bağlarla bağlanmasına sebep olacağından biyorejenerasyonunu azaltmaktadır. Adsorpsiyonun tersinirliği temas süresine göre değişkenlik gösterir (Çeçen ve Aktaş, 2011).

Konsantrasyon gradyanı ve karbonun doygunluğu:

Düşük bir hedef bileşik konsantrasyonu, AK'a geri dönüşümsüz yüksek enerjili bağlanır, bu durum desorpsiyonun zorlaşmasına ve biyorejenerasyonun azalmasına sebep olmaktadır.

Çözünmüş oksijen konsantrasyonu:

Havalandırılmalı sistemlerde çözünmüş oksijen konsantrasyonu biyorejenerasyonda bakteri canlı ve aktif tutulmaları ve enzim aktivitesi için önemli koşullardan biridir.

Aktivasyon tipi:

Aktivasyonu kimyasal olarak yapılmış karbonlarda adsorbe etme miktarı termal olarak aktive edilmişlere göre daha azdır. Bununla birlikte desorbe olmaları kolay olur ve tersinirliğinin fazla olduğu görülmüştür. Termal aktive edilmiş karbonlarda, kimyasal aktive edilmiş karbonlara göre adsorpsiyon verimi daha yüksek, desorpsiyon verimi daha düşüktür. Sebebi baskın olan adsorpsiyon mekanizmasıdır. Fenolik bileşikler için termal olarak aktive edilmiş karbonlarda biyorejenerasyon konsantrasyon gradyanına bağlı desorplanabilirlikten daha fazladır (Aktaş, 2006).

Desorpsiyon kinetikleri:

Biyorejenerasyonu belirlemek için iki kinetik önemlidir. Bunlar desorpsiyon kinetiği ve bakteriyel büyüme ve substrat degradasyonu kinetiğidir. Desorpsiyon hızı biyorejenerasyonun hızını önemli ölçüde belirlemektedir. Desorpsiyon hızı kültür veya enzim koşullarına, sıvı dinamiklerine, mikroorganizmaların veya enzimlerin aktivitesine ve karbon parçacıklarının türü ve yoğunluğuna bağlıdır (Abu-Salah ve diğ., 1996).

Koşullar ve uygulamalar:

Biyolojik atıksu arıtma tesislerinde mikro kirleticilerin ayrışmasının, anaerobik koşullardan ziyade aerobik koşullarda daha hızlı olduğu bildirilmiştir. Aromatik hidrokarbonlar, fenoller özellikle klorin türevleri ve sentetik organik bileşikler içeren endüstriyel atıksular, kirlenmiş yeraltı sularındaki patlayıcı kirleticiler adsorpsiyon ve biyorejenerasyon için ana hedef bileşiklerdir.

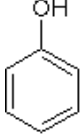
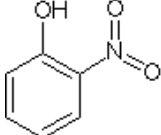
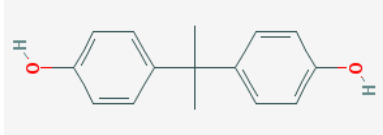
3. YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Deneyler, fenol, 2-nitrofenol ve bisfenol-A için yapılan adsorpsiyon, desorpsiyon, enzimatik biyodegradasyon ve enzimatik biyorejenerasyon çalışmalarını içermektedir. Tüm çalışmalar kesikli sistemlerde yapılmıştır. Granüler formda olmak üzere, termal ve kimyasal olarak aktive edilmiş iki farklı aktif karbon tipi (Norit PKDA ve Norit CAgan) kullanılmıştır. Norit PKDA 850-1000 °C sıcaklıkta buhar ile aktive edilmiş BET yüzey alanı 850 m²/g olan turba (peat) bazlı GAK, Norit CAgan ise 500 °C sıcaklıkta fosforik asit ile aktive edilmiş BET yüzey alanı 1400 m²/g olan odun bazlı bir GAK'tır (Aktaş, 2006).

Kullanılan fenolik bileşiklerin özellikleri Tablo 1'de ve aktif karbonların özellikleri Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin özellikleri

	Fenol	2-Nitrofenol	Bisfenol-A
Moleküler Yapı			
Formül	C ₆ H ₅ OH	C ₆ H ₅ NO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Moleküler ağırlık (g/mol)	94,11	139,11	228,29
Suda çözünürlük (mg/L) (25°C'de)	82000	2100	300
Ayrışma sabiti (25°C'de)	9,99	7,23	9,60
Buhar basıncı (10 ⁻² mm Hg) (25°C'de)	62	11,25	4,0x10 ⁻⁶
Oktanöl/Su ayrılım katsayısı (log K _{ow})	1,37-1,75	1,79	3,20

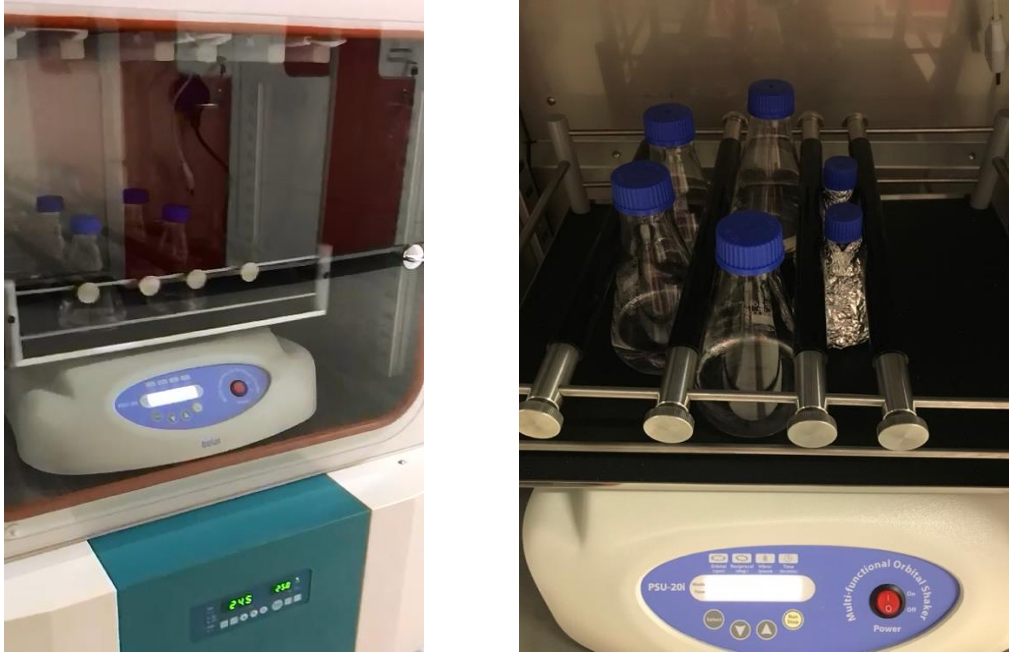
Tablo 2. Kullanılan aktif karbonların özellikleri

Aktif Karbon	PKDA	CAgran
Fiziksel form	granüler	granüler
Aktivasyon yöntemi	termal	kimyasal
Yoğunluk (g/L)	295	225
Nem (%)	2	12
Kül içeriği (%)	8	3
Metilen mavisi adsorpsiyonu (g/100g)		29
İyot oranı (mg/g)	750	
Toplam yüzey alanı (BET) (m ² /g)	850	1400
Partikül boyutu	0.5%>2 mm	1%>1.7 mm
	99%>0.59mm	2%<0.84mm
Gözenekler		
Toplam gözenek hacmi (cm ³ /g)	1,19	1,64
Micro (Φ<2nm)	0,3	0,4
Meso(Φ 2-50nm)	0,19	0,7
Macro(Φ >50nm)	0,7	0,54

Çalışmamızda kullanılan Lakkaz enzimi (benzendiol:oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) bakır içeren oksidazlar grubuna dahil bir enzimdir ve fenol türevleri, benzentioller, polifenoller, aromatik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH' lar) gibi aromatik substratların büyük çoğunluğunun tek elektron oksidasyonunu katalizler (Asadgol vd., 2014; Claus, 2014). Substratlar, daha sonrasında çapraz bağlanma ya da depolimerizasyon reaksiyonlarına uğrayacak olan radikallere okside olurlar. Bu uygun substratlar, lignin ve poliaromatik hidrokarbonlar gibi birçok maddenin de dolaylı oksidasyonunu sağlayan sözde redoks medyatörleri gibi davranabilirler (Claus, 2004). Kullanılan Lakkaz Enzimi Sigma Aldrich'ten temin edilen, Trametes Versicolor'dan elde edilmiş aktivitesi ≥ 0.5 U/mg olan bir üründür (Ürün Kodu: 34829).

3.2. ADSORPSİYON DENEYLERİ

Aktif karbona adsorpsiyon aşaması, uygun temas süresinde belirli miktardaki aktif karbonun, belirli konsantrasyondaki fenolik bileşik ile doyurulmasıyla gerçekleştirilir. Aktif karbonun adsorpsiyonu için 200 mg/L konsantrasyonda fenol, 2-NF ve BPA çözeltisi hazırlanmıştır. 250 mL'lik kapaklı erlenlerde, 100 mL hacimli 200 mg/L fenolik bileşik çözeltisine 100 mg GAK ilave edilerek, 25°C'de 150 RPM'de sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde 3 gün boyunca çalkalanmıştır (Abromaitis vd., 2016). Adsorpsiyon için dengeye gelme süresi yapılan bir çalışmada CAgran için iki gün ve PKDA için üç gün olarak belirlenmiştir (Aktaş ve Çeçen, 2006b).



Şekil 7. 25 °C çalışmalarında kullanılan çalkalama sistemi

Adsorpsiyon dengeye geldikten sonra erlenler çalkalayıcıdan çıkarılıp, doymuş aktif karbon çöktürülmüştür. Üstteki sıvı, içindeki fenolik madde konsantrasyonunu ölçmek üzere 50 mL'lik kapaklı plastik falkon tüplerinde saklanmıştır. Elde edilen 100 mg doymuş aktif karbon desorpsiyon veya biyorejenerasyon deneylerinde kullanılmak üzere saklanmıştır. Adsorpsiyon başlangıcında ve sonunda fenolik madde

konsantrasyonları ölçülerek adsorpsiyon kapasiteleri Eşitlik 1'e (Goeddertz vd., 1988) göre hesaplanmaktadır.

$$Q_{ads} = (C_b - C_f)/M \quad (Eş. 1)$$

Q_{ads} : adsorpsiyon kapasitesi (mg fenol/g AK)

C_b : Başlangıç fenol (veya 2-nitrofenol) konsantrasyonu (mg/L)

C_f : Final fenol (veya 2-nitrofenol) konsantrasyonu (mg/L)

M : Aktif karbon dozu (g/L)

GAK'ın konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Bisfenol-A için adsorpsiyon izotermi çizmek (Q_{ads} vs C_e) ve Freundlich ve Langmuir izotermine uygunlukları belirlenip Freundlich ve Langmuir katsayılarının hesaplanması amacıyla 0,1-1 g/L konsantrasyonlarında AK kullanılmıştır.

Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon işlemi sırasında adsorban tarafından tutulan madde miktarı ile sıvı içerisinde bulunan çözünmüş madde miktarı için sistem dengede olduğu anda, adsorbe eden maddenin birim kütlesine adsorplanan madde miktarı, derişim, sıcaklık veya denge basıncının bir fonksiyonudur. Sıcaklığın sabit olduğu ve kesikli sistemlerde adsorpsiyon kapasiteleri bahsedilen Eşitlik 1'e göre hesaplanmaktadır (Abromaitis vd., 2016). Adsorpsiyon izotermi için önerilen matematiksel modellerden Freundlich ve Langmuir izotermi en çok kullanılanlarıdır.

Langmuir İzotermi

Langmuir izotermi iki parametrelidir. AK yüzeyindeki adsorpsiyon noktalarının bir molekülü adsorplayarak yüzeyinde sadece bir molekül kalınlığında tabaka oluşacağı varsayılmaktadır. Adsorpsiyonda yüzeyin bazı kısımlarının örtüldüğü, yüzeyin her yerinde adsorpsiyon enerjisinin değişmediği ve yüzeyde tutunan moleküller arasında etkileşimin olmadığı gibi varsayımlar geliştirilmiştir (Foo ve Hameed, 2010).

Langmuir izotermi denklemleri (Langmuir, 1918):

$$q_e = \frac{q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (\text{Eş.2})$$

K_L = Langmuir adsorpsiyon sabiti (L/mg).

q_m = Adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi (sabit) (mg/g)

Bu eşitliğin doğrusallaştırılmasıyla iki denklem elde edilir.

Langmuir Tip 1:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m \cdot K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (\text{Eş.3})$$

Bu denklemde C_e/q_e e karşı C_e grafiği çizilerek Langmuir Tip 1 izotermi elde edilir.

Grafiğin eğimi $1/q_m$ 'ı, y eksenini kesim noktası $1/K_L$, q_m 'ı verir.

Langmuir Tip 2:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{C_e \cdot q_m \cdot K_L} + \frac{1}{q_m} \quad (\text{Eş.4})$$

Bu denklemde $1/q_e$ 'e karşı $1/C_e$ grafiği çizilerek Langmuir Tip 2 izoterm elde edilir.

Grafiğin eğimi $1/K_L$, q_m 'ı, y eksenini kesim noktası $1/q_m$ 'ı verir.

Adsorpsiyonun elverişliliği için R_L sabiti hesaplanır.

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (\text{Eş.5})$$

$R_L > 1$ bileşiğin adsorpsiyona uygun olmadığını,

R_L değerinin 0'a yakınlığı adsorpsiyonun tersinirliğinin düşük olduğunu,

R_L değerinin 1'e yakın olması ise yüksek oranda tersinir olduğunu gösterir (Aktaş, 2006).

Freundlich İzotermi

Freundlich modeli (Freundlich, 1906), tek tabakayla sınırlı olmayan geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlayan en eski model tipidir. Heterojen yüzey enerjileri için uygulanır.

$$Q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (\text{Eş.6})$$

Q_e = Adsorplanan madde miktarı(mg/g)

C_e = Dengede çözeltide kalan madde konsantrasyonu (mg/L)

K_f = Freundlich sabiti

n = Freundlich sabiti.

Bu eşitliğin doğrusallaştırılmasıyla Eşitlik 7 elde edilir.

$$\text{Log } Q_e = \text{Log } K_f + 1/n \text{ Log } C_e \quad (\text{Eş.7})$$

Log C_e 'ye karşılık Log Q_e grafiği çizilerek lineer regresyonun eğimi ve y eksenini kestiği noktadan Freundlich izoterm sabitleri K_f ve $1/n$ hesaplanmıştır. Eğim $1/n$ değerini, Grafiğin y eksenini kesim noktası K_f 'i verir.

K_f ; adsorpsiyon sabitidir. K_f değerinin yüksek olması adsorbanın yüksek adsorpsiyon kapasitesi olduğunu gösterir.

n ; adsorpsiyon şiddetini gösterir. n katsayısı sıfıra ne kadar yakın bir değer olursa yüzey o kadar heterojendir denir.

$n > 0$ olması adsorpsiyonun elverişli olduğunu,

$n > 1$ olması çok tabakalı adsorpsiyon olduğunu

$n < 1$ olması kimyasal adsorpsiyon olduğunu gösterir (Haghseresht ve Lu, 1998).

3.3. DESORPSİYON DENEYLERİ

Doymuş aktif karbon, adsorpsiyon deneyi koşulları ile aynı koşullarda, saf su ile temas ettirilir. Doymuş aktif karbonun yüzeyi ile sıvı faz arasında konsantrasyon gradyanı oluşmasıyla desorpsiyon gerçekleşir. Aktif karbonun desorpsiyonu için önceden yapılan adsorpsiyon çalışmasında fenolik bileşiğe doyurulmuş 100 mg AK kullanılmıştır. Ön-adsorpsiyon çalışmalarında hedef bileşikler adsorplamış olan AK adsorpsiyon suyundan süzülerek 250 ml'lik kapaklı erlene koyulmuştur. Üzerine yıkanması için 100 ml saf su eklenmiştir. Kapaklı erlenlerde, 100 ml hacimli saf su ve 100 mg GAK 25°C'de 150 RPM'de sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde 1 gün boyunca çalkalanmıştır (Oh vd., 2011). Desorpsiyon dengeye geldikten sonra erlenler çalkalayıcıdan çıkarılıp, 1 gün desorbe olmuş aktif karbon çöktürülüp üstte kalan sıvı kısımdan ayrılır. Ayrılan sıvı kısımdan fenolik bileşik konsantrasyonları ölçülerek desorbe edilen fenolik bileşik miktarı hesaplanmıştır. Ancak, abiyotik desorpsiyon testlerinde desorbe olan fenolik bileşiklerin su fazındaki konsantrasyonu azalmadığı için desorpsiyon kapasitesi bir desorpsiyon basamağıyla belirlenememektedir. Konsantrasyon gradyanını sürekli olarak yüksek tutabilmek için ayrılan AK'un desorpsiyonuna distile suyun 1 gün aralıklarla yenilenmesiyle tekrar edilmiştir. Desorpsiyon testlerine aktif karbondan fenolik bileşik desorbe olmayana veya ölçülebilecek seviyelerin altına inene kadar devam edilmiştir. Toplam desorpsiyon Eşitlik 8'e göre hesaplanmıştır (Aktaş, 2006). Her bir aktif karbon tipinin abiyotik rejenerasyon kapasiteleri (R_{des}) Eşitlik 9'a göre hesaplanmıştır.

$$Q_{des} = \Sigma (C_{des}/M) \quad (Eş. 8)$$

Q_{des} : desorpsiyon kapasitesi (mg fenol/g AK)

C_{des} : Her desorpsiyon basamağı sonrasında su fazındaki fenolik bileşik konsantrasyonu (mg/L)

M : Aktif karbon dozu (g/L)

$$R_{des} = (Q_{des} / Q_{ads}) \times 100 \quad (Eş. 9)$$

R_{des} : desorpsiyon yüzdesi (%)

3.4. BİYODEGREDASYON DENEYLERİ

Enzimatik biyodegradasyon çalışmalarıyla enzimlerin fenolik bileşiklerin oksidasyon aktivitesinin yüksek olduğu şartların (enzim dozu, pH ve sıcaklık) tespit edilmesi amaçlanmıştır. Saflaştırılmış serbest Lakkaz enzimi fenolik bileşikler oksitleme özelliklerinin belirlenmesi için farklı dozlarda enzimler, 2 farklı pH (5 ve 7) şartlarında, 25°C’de ve 50°C’de fenolik bileşiklerle sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde temas ettirilmiştir. Lakkaz enzimi elektron alıcı olarak oksijen kullanmaktadır. 1 U/mL enzim aktivitesi için enzim 0,17 g tartılarak, 25 ml fenolik bileşik çözeltisinin içine eklenmiştir. 100 ml lik kapaklı erlenler kullanılmıştır. Yüksek aktivite için enzimin ışık görmesinin engellenmesi amacıyla erlenler alüminyum folyo ile sarılmıştır. Erlenler optimum koşulların belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık, pH, enzim dozu ve temas süresinde 150 RPM’de sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde çalkalanmıştır. Biyodegradasyon sırasında giderim hızının belirlenebilmesi için saatlik numuneler alınarak ölçüm yapılmıştır. Böylelikle biyorejenerasyon deneylerinde uygulanmak üzere gerekli olan giderim süresi belirlenmiştir.



Şekil 8. 25°C’de ve 50°C’de enzimatik degradasyon ve biyorejenerasyon deneylerinde kullanılan çalkalamalı ısıtıcılar

3.5. ENZİMATİK BİYOREJENERASYON DENEYLERİ

Degradasyon deneylerinde belirlenen uygun şartlarda ve uygun konsantrasyondaki enzim çözeltisinin içine önceden adsorpsiyon işlemine tabi tutulmuş ve adsorpsiyon miktarı hesaplanmış doymuş aktif karbonun eklenmesiyle biyorejenerasyon başlatılır. Biyodegradasyon deneylerinde belirlenen kirleticinin parçalanması için gerekli olan süre kadar bekletilmesi yeterlidir.

Abiyotik desorpsiyon testlerinde olduğu gibi kullanılacak olan aktif karbonlar öncelikle hedef bileşiğe doyurulmuştur. Fenolik bileşiğe doymuş aktif karbon hazırlamak için 100 ml'lik kapaklı erlenlerde, 25 ml hacimli fenolik bileşik çözeltisine 25 mg GAK (1 g/L AK) ilave edilerek, 25°C'de (ve gerektiği görüldüğü durumlarda 50°C'de) ve pH 7 şartlarında (ve gerekli görüldüğü durumlarda pH 5 şartlarında), 150 RPM ile 3 gün boyunca çalkalanmıştır.

Adsorpsiyon dengeye geldikten sonra erlenler çalkalayıcıdan çıkarılıp, doymuş aktif karbon çöktürülmüştür. Üstteki sıvı alınarak ön-adsorpsiyon miktarının belirlenmesi için ölçüm yapılmıştır. Biyorejenerasyon için çözeltiden ayrılan 25 mg doymuş aktif karbon belirlenen pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonunda alüminyum folyoya sarılmış erlende lakkaz ile 1 gün boyunca adsorpsiyon deneylerinde uygulanan ortam şartları aynı olmak üzere çalkalanmıştır. Enzimatik biyorejenerasyon testleri esnasında belli aralıklarla sıvı fazdaki fenolik bileşik konsantrasyonları da ölçülerek desorbe olan ancak enzimlerin oksitleyemedikleri kısmı da takip edilmiştir.

Biyorejenere olmuş aktif karbona, 1 günün sonunda enzimli çözeltiden ayrılarak yenilenen adsorpsiyon kapasitesinin hesaplanması için post-adsorpsiyon yapılmıştır. Post adsorpsiyon testi ön-adsorpsiyon testiyle aynı şartlarda gerçekleştirilmiş ve ne kadar adsorpsiyon alanının enzimatik biyorejenerasyon sonunda rejenere edildiği Eşitlik 10'a göre hesaplanmıştır.

$$R_{enz} = (Q_{postads} / Q_{ads}) \times 100 \quad (Eş. 10)$$

R_{enz} : Enzimatik biyorejenerasyon yüzdesi (%)

Q_{ads} : Kullanılmamış aktif karbonun adsorpsiyon kapasitesi (mg fenol/g AK)

$Q_{postads}$: Enzimatik biyorejenere edilmiş aktif karbonun adsorpsiyon kapasitesi (mg fenol/g AK)

Enzimatik biyorejenerasyon ve abiyotik desorpsiyona bağlı rejenerasyon kapasiteleri arasındaki fark ($R_{enz} - R_{des}$), konsantrasyon gradyanına bağlı olmayan ve sadece enzimlerin neden olduğu rejenerasyonu göstermektedir. Böylece enzimatik biyorejenerasyonun farklı aktif karbon türleri için nicel olarak belirlenmesi mümkün olmuştur.

3.6. ANALİZLER

3.6.1. 4-AAP Metodu

Fenolik bileşiklerin konsantrasyonunun takibi için analizler standart metodlarda (APHA, 2005) tanımlanan 4-Aminoantipyrine (4-AAP) kolorimetrik yönteminde fenolik bileşiklerin ölçümü Direct Photometric Method 5530 D metodu ile yapılmıştır. Bu metod ile ölçülebilen fenolik bileşikler fenol, orto – meta bağlı fenoller ve para bağlı karboksil, halojen, metoksil veya sulfonik asit gruplarını içerir. Bu metod ile ölçülemeyen bileşikler ise para bağlı alkil, aril, nitro, benzoil, nitroso ve aldehit gruplarıdır (APHA, 2005). 5530 D metoduyla bir numunedeki çeşitli fenollerin nispi miktarları belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle fenol kolorimetrik prosedürler için standart olarak seçilmiştir ve diğer fenolik bileşiklerin reaksiyonu ile üretilen her hangi bir renk fenol olarak rapor edilir. Ayrı ayrı fenolik bileşiklerin tespit edilebilmesi için gaz-sıvı kromatografik yöntemler uygulanmalıdır (APHA, 2005).

Kullanılan kimyasallar:

NH₄OH çözeltisi: 0,5 N Amonyum Hidroksit (NH₄OH) hazırlanır. 35 g/mol Amonyum Hidroksit'ten 17 ml alınır. 1L olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

Fosfat tampon çözeltisi: pH 6,8 olacak şekilde bir tampon çözelti hazırlamak için 104,5 g K₂HPO₄ ve 72,3 g KH₂PO₄ 1 L saf suda çözündürülür.

4-AAP çözeltisi: 2 g 4-AAP, 100 mL saf suda çözündürülür. Günlük hazırlanır.

K₃Fe(CN)₆ çözeltisi: 8 g K₃Fe(CN)₆, 100 mL saf suda çözündürülür. Haftalık hazırlanır.

Ölçüm:

Numuneler 100 mL hazırlanmak üzere yeterli miktarlarda seyreltilir. 2,5 mL NH₄OH çözeltisi eklenir. Hızlı bir şekilde fosfat tamponla pH 7,8-8 arasında bir değere getirilir. 1 mL 4-AAP çözeltisi eklenir. 1 mL K₃Fe(CN)₆ çözeltisi eklenir. 15 dakika beklenir ve 500 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılır. Standart ölçümleri için fenolik bileşikler 1-5 mg/L konsantrasyon değerlerinde hazırlanmıştır ve fenolik bileşik ile renk değişiminin spektrofotometrede 500 nm'de absorbans değerlerinin tespit edilmesiyle kalibrasyon eğrisi belirlenmiştir. Çalışma boyunca tüm analizlerde

fenolik bileşik konsantrasyonu uygun seyreltmelerle < 5 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır.

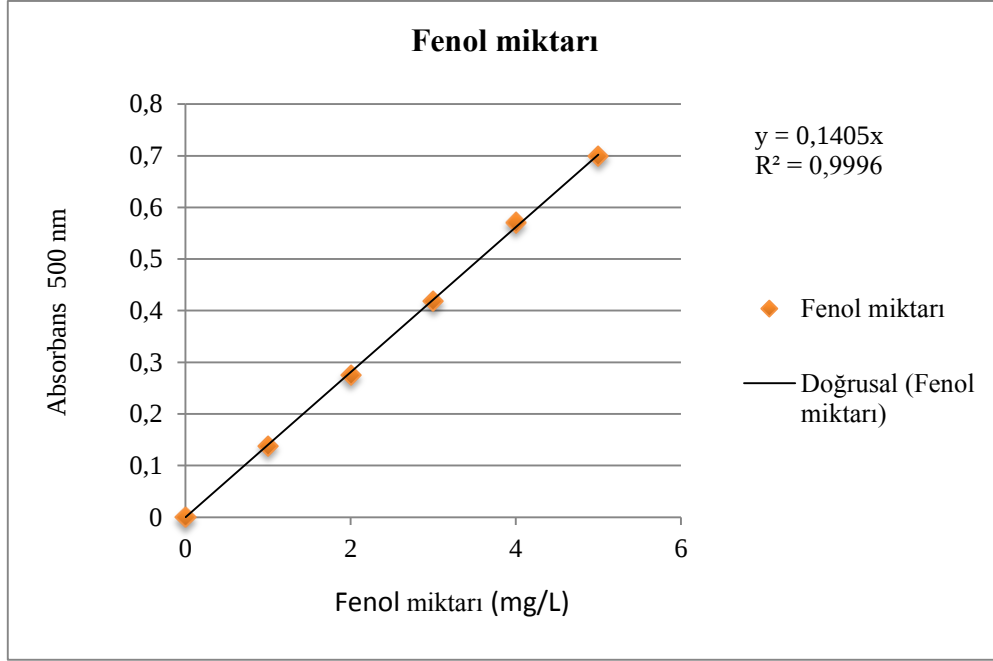
Fenol için konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi



Şekil 9. 4-AAP metoduyla fenol için konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi çalışmaları

Tablo 3. 4-AAP metoduyla belirlenen fenol için standart ölçümü

4-AAP Metodu fenol için standart ölçümü	Absorbans (500 nm)
Konsantrasyon (mg/L)	
0	0
1	0,138
2	0,275
3	0,418
4	0,571
5	0,7

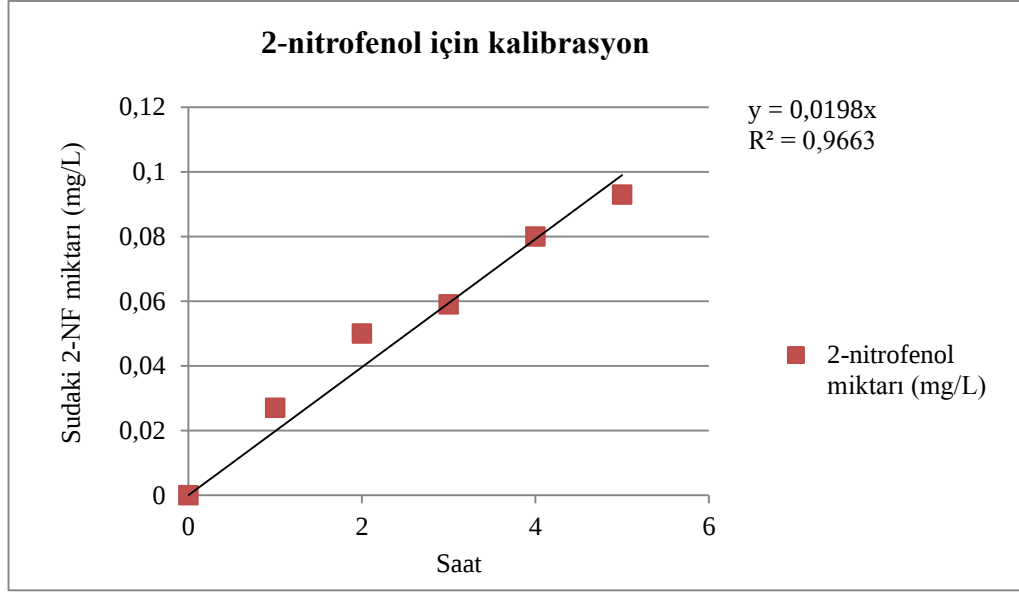


Şekil 10. 4-AAP metoduyla belirlenen Fenol konsantrasyon kalibrasyon eğrisi

2-Nitrofenol için konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi

Tablo 4. 4-AAP metoduyla belirlenen 2-nitrofenol için standart ölçümü

2- nitrofenol için standart	Absorbans (500 nm)
Konsantrasyon mg/L	
0	0
1	0,027
2	0,05
3	0,059
4	0,08
5	0,093

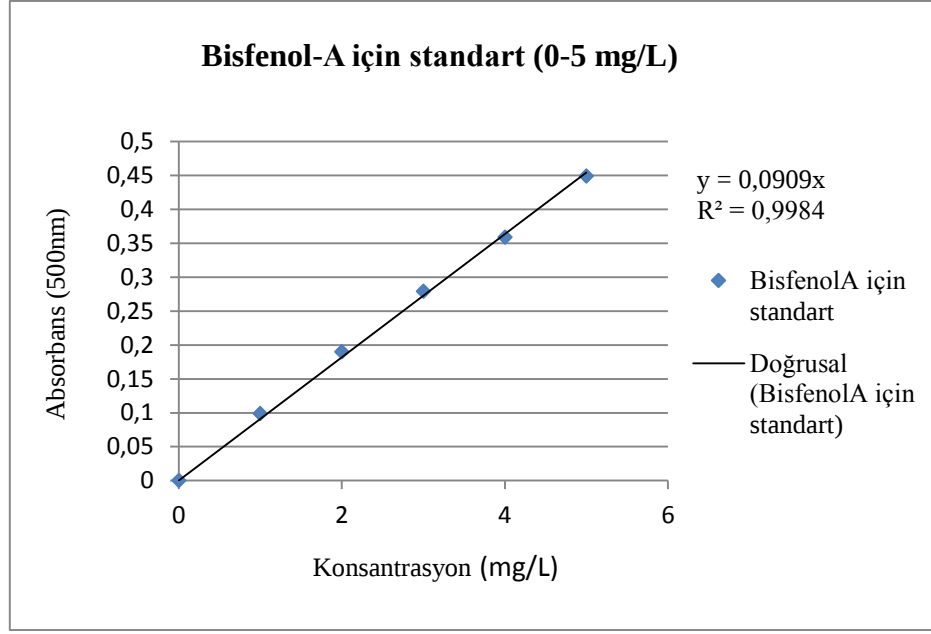


Şekil 11. 4-AAP metoduyla belirlenen 2-NF konsantrasyon kalibrasyon eğrisi

Bisfenol-A için konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi

Tablo 5. 4-AAP metoduyla belirlenen bisfenol-A için standart ölçümü

4-AAP Metodu BisfenolA için standart	Absorbans (500 nm)
Konsantrasyon mg/L , 100 ml hazırlandı.	
0	0
1	0,099
2	0,19
3	0,279
4	0,359
5	0,449



Şekil 12. 4-AAP metoduyla belirlenen bisfenol-A konsantrasyon kalibrasyon eğrisi

3.6.2. Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini

Lakkaz enziminin aktivite tayini için kullanılan en uygun metot spektrofotometre veya oksijen sensörü tekniğidir. Lakkazın genel substratları; ABTS, syringaldazin, 2,6-dimetoksifenol ve dimetil-p-fenilenediamin'dir (Niku-Paavola vd., 1990). Enzim aktivitesi için en yaygın kullanılan birim, U (unit = IU = uluslararası birim)'dur. Optimum koşullardaki enzim aktivitesi, 1 μ mol substratı 1 dakikada değiştiren enzim aktivitesini gösterir ve bu değer saniyede 16,67 nmol substratın, enzim tarafından ürüne dönüştürülmesine karşılık gelir (Atalay, 1978).

Enzimatik biyodegradasyondan önce lakkaz enziminin mevcut aktivitesi Niku-Paavola vd. (1990) tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için enzimin substratla etkileşimi izlenir. Enzim miktarı sabit olup substrat miktarı artırılarak hazırlanan numuneler spektrofotometrede ölçülür. Spektrofotometre zamana bağlı olarak enzimin substratla etkileşimini gösteren bir grafik oluşturur. Her substrat değeri için absorbans değişiminden bir eğim(ΔA) değeri elde edilir (Asadgol vd., 2014).

Ölçümlerde substrat olarak ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit) kullanılmıştır ve ABTS'nin 420 nm'de dalga boyunda okunan oksidasyonunda elde edilen değerlerden enzim aktivitesi (U/mL) hesaplanmıştır. Denemelerde ABTS, 0.1-1mM arası konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Şimşek, 2011). Gerçekleştirilen 10 ölçüm sonucunda elde edilen Absorbans/süre eğimi değerleri kaydedilmiştir ve enzim aktivitesi hesabı gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivite hesabı için Lineweaver-Burk denklemi kullanılmıştır.

Aktivite tayini için kullanılan kimyasallar ve lakkaz

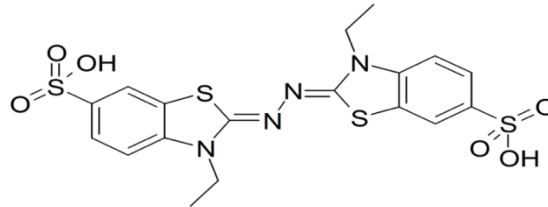
Sodyum Asetat: (NaCH₃COO.H₂O : 136,08 g/mol)

pH 4,65 olacak şekilde 0,1 M Sodyum Asetat Tampon çözeltisi hazırlanması: 6,8 g (50mmol) Sodyum Asetat (3H₂O) bir miktar saf su içerisinde çözdürüldükten sonra üzerine 2,87 ml (50 mmol) Glacial Asetik Asit (% 99,5) eklenmiştir. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

Lakkaz: 38429–10G SİGMA Lakkaz from Trameter versicolor powder, light Brown, ≥ 0.5 U/mg

Enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 g toz enzim tartılır ve 100 ml tampon çözelti içerisinde çözdürülür. Işık almayacak şekilde alüminyum folyoyle sarılı cam tüp içerisinde buzdolabında saklanır.

Substrat: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu (ABTS) (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄.2H₃N, MA: 548,68g/mol) Sigma



Şekil 13. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu (ABTS)

Substrat çözeltisinin hazırlanması: 550 mg ABTS tartılır ve 10 ml tampon çözeltide çözdürülür. Işık almayacak şekilde amber tüp veya alüminyum folyoyla sarılı cam tüp içerisinde buzdolabında saklanır. 10 mM stok ABTS çözeltisi elde edilmiştir.

Enzim aktivitesi belirleme yöntemi

Niku-Paavola vd. (1990) tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemde, Lakkaz enziminin aktivitesi, hazırlanan tampon, enzim ve substratın Tablo 4’ deki miktarlarda küvetlere eklenmesi sonrası 420 nm dalga boyunda 60 sn süresince spektrofotometrede zamana karşı absorbans değişimi olarak ölçülmüştür. (Sekme, 2011)

Başlangıçta küvete 20 µL enzim, 970 µL tampon çözeltisi ve 10 µL substrat eklenir, ardından spektrofotometrede 420 nm’de Δ değeri (absorbans değişim grafiğinin eğimi) ölçülür. Her ölçümde tampon 10 µL azaltılırken, substrat 10 µL artırılacak şekilde 10 adet ölçüm alınır.

Tablo 6. Lakkaz enzimi aktivite tayin yöntemi

Ölçüm sayısı	Enzim (µL)	Tampon (µL)	Substrat (µL)	Absorbans değişimi (ΔA)
1	20	970	10	
2	20	960	20	
3	20	950	30	
4	20	940	40	
5	20	930	50	
6	20	920	60	
7	20	910	70	
8	20	900	80	
9	20	890	90	
10	20	880	100	

Enzim aktivitesinin hesaplanması (Hein & Niemann, 1962)

Enzim aktivitesinin hesaplanması için en sık kullanılan denklem Lineweaver-Burk denklemdir. Lineweaver-Burk grafiğinin çizilebilmesi için C_s (S) ve V_0 değerlerine ihtiyaç vardır. C_s (substrat konsantrasyonu) bilinmektedir, V_0 değerleri ise aşağıdaki formülden hesaplanabilir:

$$\text{Enzim aktivite hızı} = V_0 = r_s^u \text{ (U/mL)} = 6.10^4 \frac{\Delta A.V_T}{\epsilon_s.V_e.\Delta t.d} \quad (\text{Eş. 11})$$

ΔA = Absorbans değişimi

V_T = Toplam çalışma hacmi (mL)

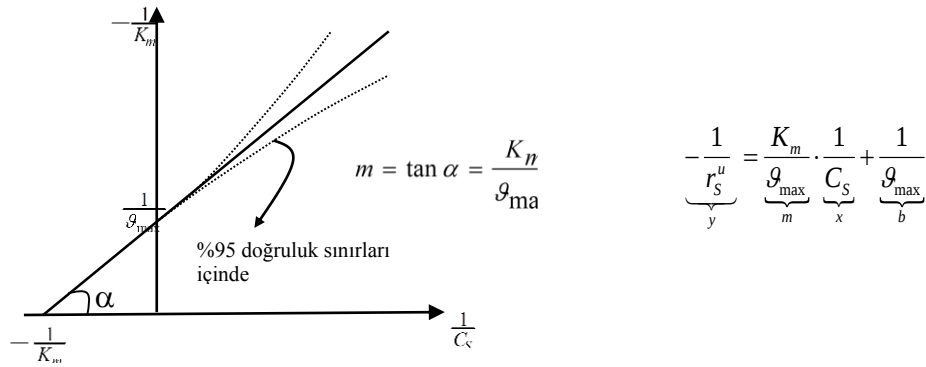
V_e = Enzim hacmi (mL)

$\epsilon_s = \epsilon_{ABTS}$ = Moleküler söndürme katsayısı (Lakkaz enzimi için 420 nm’de 36000 ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ veya $L.mol^{-1}.\text{cm}^{-1}$))

Δt = Geçen süre (s)

K_m = Michaelis Sabiti (Substrat affinitesi)

d = ölçüm ışık yolu (cm)



Şekil 14. Lineweaver-Burk Lineerizasyon Metodu

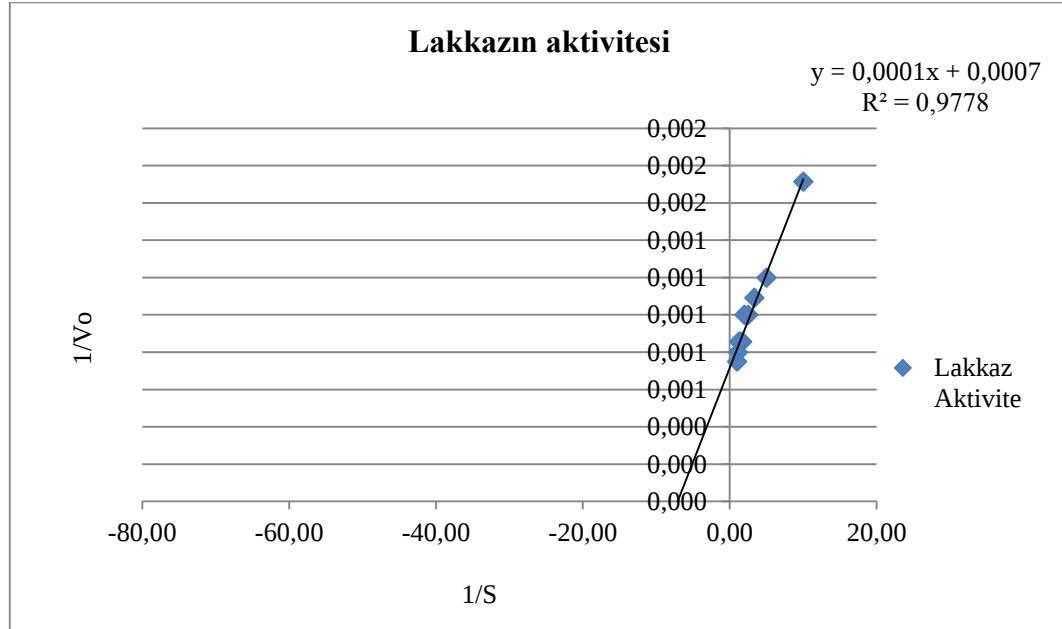
Deneylerde Kullanılan Lakkazın Aktivite Tayini

ABST ile lakkaz enzimi aktivitesinin tayininde farklı ABTS konsantrasyonları için elde edilen 420 nm dalga boyunda absorbans değerleri Tablo 5’te verilmiştir. Bu absorbans değerleri ve tablodaki diğer veriler kullanılarak tablodaki V_0 , $1/V_0$ ve $1/S$ değerleri elde edilerek Şekil 12’deki kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kullanılan toz

halindeki Sigma marka enzimin aktivitesi yaklaşık 0,116 U/mg olarak tespit edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 7. Lakkaz enziminin aktivite tayini sonuçları

Substrat Konsantrasyonu (mM)	1/V0	1/S	Vo (U/mL)	ΔA	Ve	Vt	Δt	ϵS
0,1	0,002	10,00	0,00972	0,007	0,02	1	60	36000
0,2	0,001	5,00	0,01389	0,01	0,02	1	60	36000
0,3	0,001	3,33	0,01528	0,011	0,02	1	60	36000
0,4	0,001	2,50	0,01667	0,012	0,02	1	60	36000
0,5	0,001	2,00	0,01667	0,012	0,02	1	60	36000
0,6	0,001	1,67	0,01944	0,014	0,02	1	60	36000
0,7	0,001	1,43	0,01944	0,014	0,02	1	60	36000
0,8	0,001	1,25	0,01944	0,014	0,02	1	60	36000
0,9	0,001	1,11	0,02083	0,015	0,02	1	60	36000
1	0,001	1,00	0,02222	0,016	0,02	1	60	36000



Şekil 15. ABST ile lakkaz enziminin aktivite tayininde elde edilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 8. Lakkaz enzimi aktivite tayin sonuçları

$1/V_m = 1/V_o$	$1/K_m$
43,025	7,105932
V_m (U/mL)	K_m
1,162	0,140727

1 ml içinde çözdürülen 10 mg enzim aktivitesi (V_m) Tablo 8.'de verilmiştir. Bu hesaba göre 1 mg enzimin aktivitesi 0,11624 U olarak bulunmuştur.

3.6.3. HPLC Analizleri

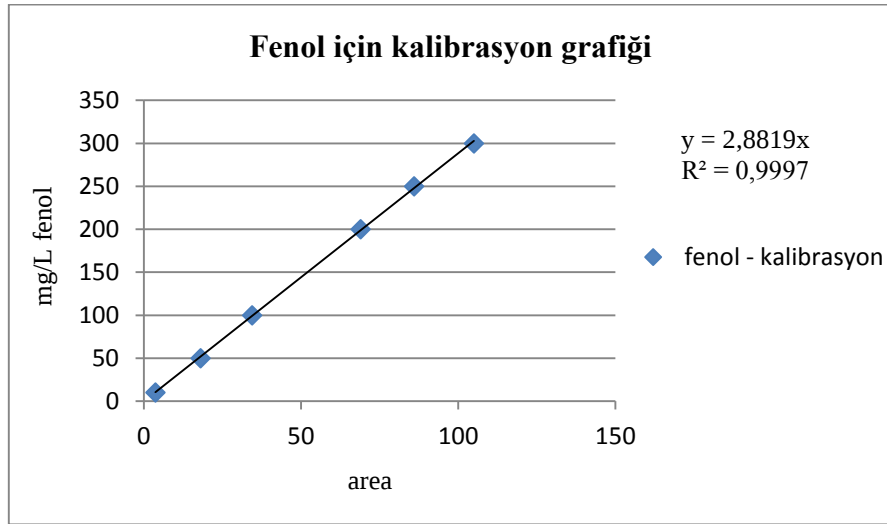
4-AAP metoduyla belirlenen fenolik bileşik konsantrasyonları ayrıca seçilen bazı numuneler için HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) metodu ile de ölçülerek metodun güvenilirliği ve yan ürünlerin girişim yapma ihtimali değerlendirilmiştir. Bu amaçla Dionex Ultimate 3000 HPLC cihazı ve C18 kolonu (3µm 4,6 mm x 150 mm Dionex Bonded Silica Products) kullanılmıştır. Ölçümler için fenolik bileşik standart çözeltileri ve 50 kat seyreltilmiş olan numuneler, içerisinde %10 metanol olacak şekilde 0,5 ve 1 mL arası hacimlerde hazırlanarak HPLC numune tüplerine koyulmuştur. Ölçüm sırasında taşıyıcı faz olarak ve ölçümler arasında kolonun yıkanması sırasında kolona %30 metanol ve %70 saf su verilmiştir (Shamar, 2013). Akış hızı 0,5 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve her enjeksiyon 25 dk sürmüştür. Çalışmalar sırasında kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit ve basınç 100 -130 bar arasında tutulmuştur. Ölçümlerde pikler, DAD dedektörü ile UV ve VIS olarak izlenmiş olup, 280 nm dalga boyunda piklere bakılmıştır.

Fenol İçin Konsantrasyon Kalibrasyonunun Belirlenmesi

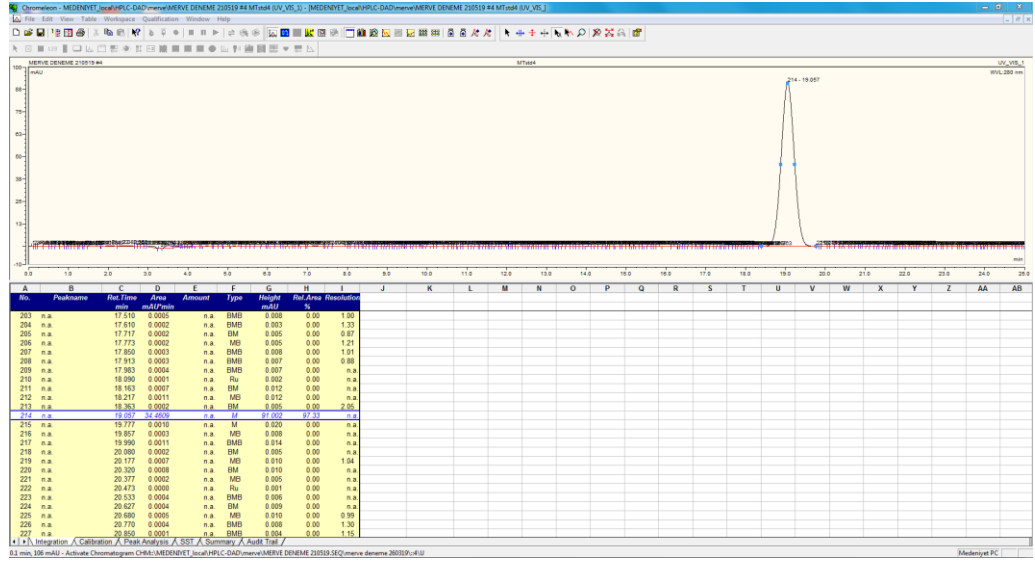
Fenol piki 19,1. dakikada görülmüştür.

Tablo 9. HPLC’de yapılan fenol için standart ölçümleri

Fenol – standart mg/L	Area	dakika
300	105,0319	19.170
250	85,923	19.107
200	68,9526	19.077
100	34,4609	19.057
50	17,9919	19.187
10	3,6439	19.130



Şekil 16. HPLC’de yapılan fenol için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği



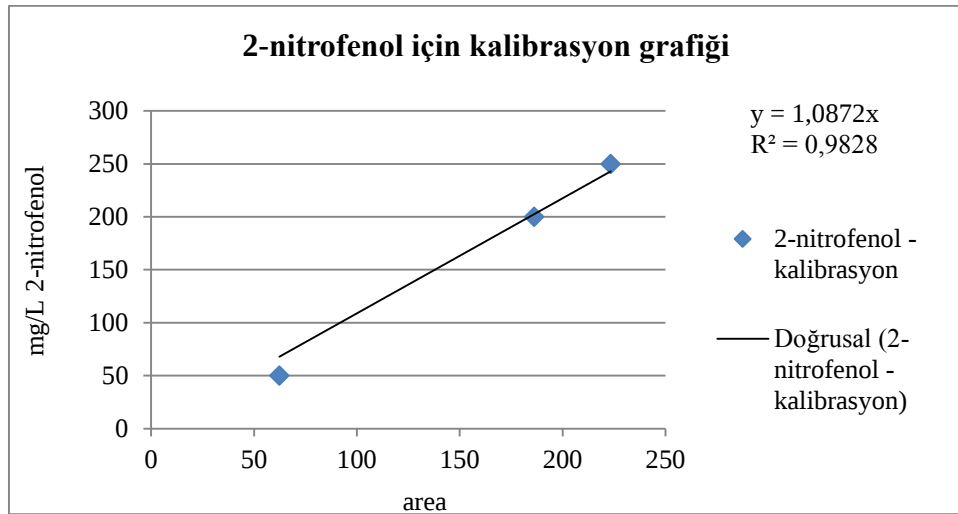
Şekil 17. HPLC’de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 100 mg/L fenol

2-Nitrofenol İçin Konsantrasyon Kalibrasyonunun Belirlenmesi

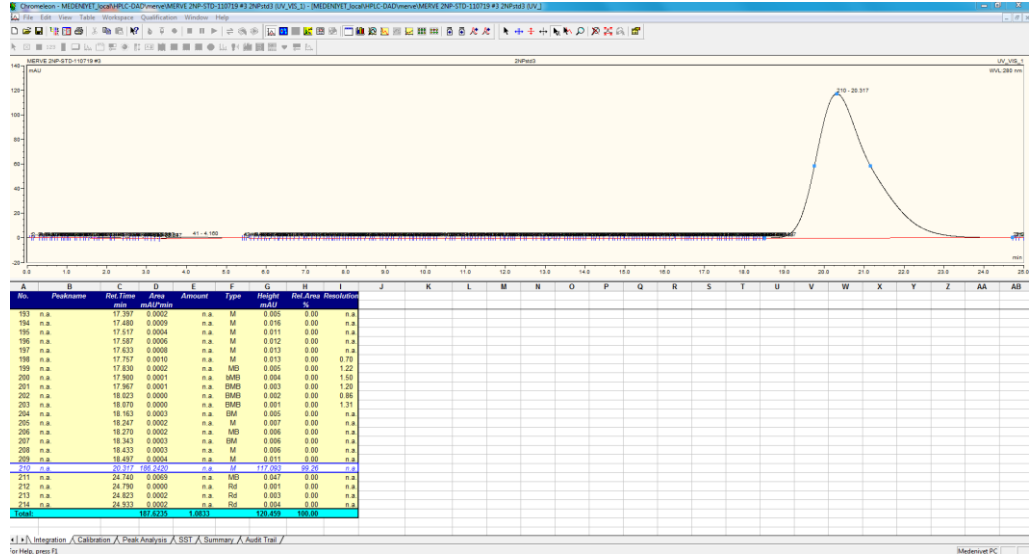
2-Nitrofenol piki yaklaşık 20,4. dakikada görülmüştür.

Tablo 10. HPLC’de yapılan 2-NF için standart ölçümleri

2-NF mg/L	Area	Dakika
250	223,4738	20.550
200	186,242	20.317
50	62,3727	20.220



Şekil 18. HPLC’de yapılan 2-NF için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği



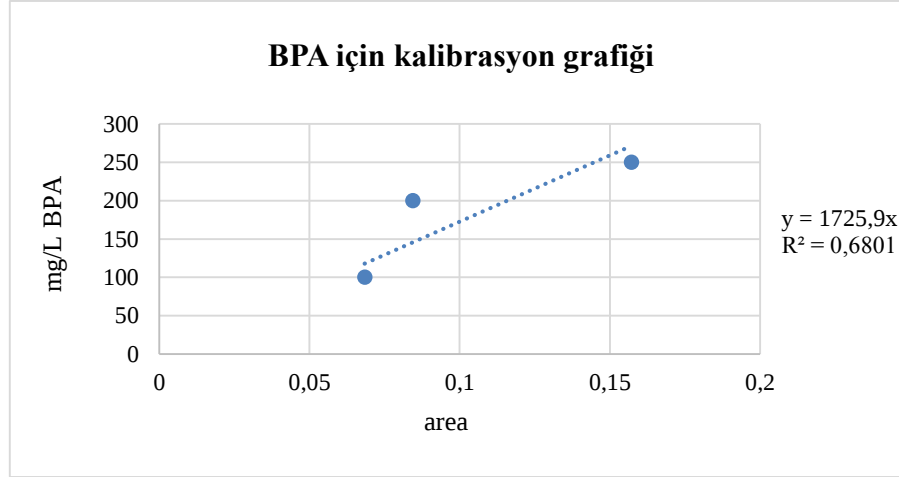
Şekil 19. HPLC’de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 200 mg/L 2-NF

Bisfenol-A İçin Konsantrasyon Kalibrasyonunun Belirlenmesi

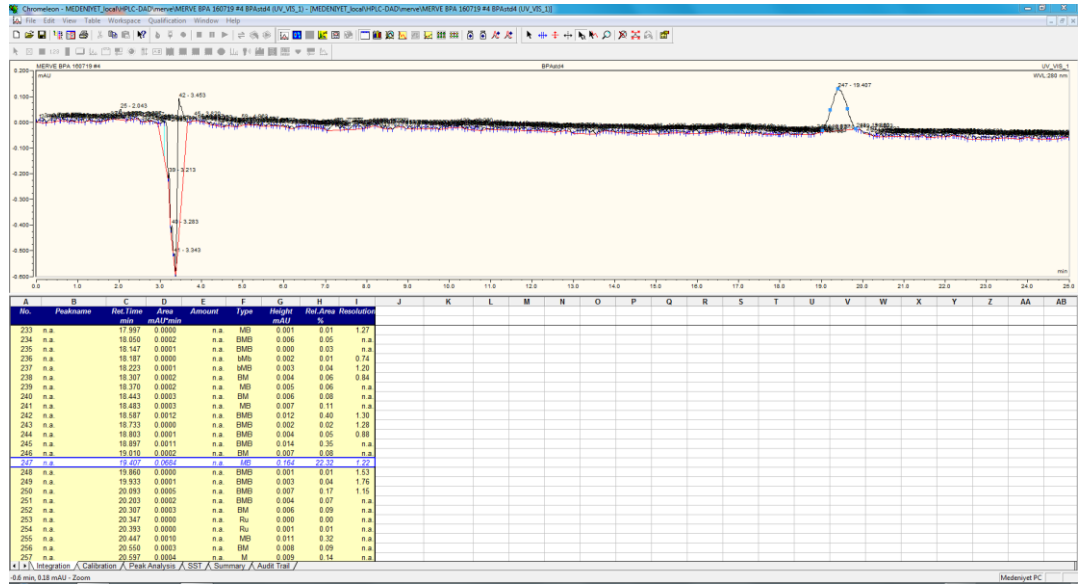
Bisfenol-A piki yaklaşık 19,4. dakikada görülmüştür.

Tablo 11. HPLC’de yapılan BPA için standart ölçümleri

BPA- mg/L	Area	dakika
250	0,1572	19.440
200	0,0844	19.370
100	0,0684	19.407



Şekil 20. HPLC’de yapılan BPA için konsantrasyon kalibrasyonu grafiği



Şekil 21. HPLC’de konsantrasyon kalibrasyonunun belirlenmesi için ölçülen 100 mg/L BPA

3.6.4. KOİ Analizleri

KOİ ölçümü ise; kapalı reflüks metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu metotta; asidik koşullarda numune içerisindeki organik madde Cr^{6+} ile indirgenerek kalan Cr^{6+} üzerinden hesaplama yapılmıştır.

Tablo 12. Fenolik bileşikler için hesaplanan KOİ

	KOİ (mg)
1 mg fenol	2,38
1 mg 2-NF	1,66
1 mg BPA	2,76

Teorik olarak hesaplanan KOİ miktarı Tablo 12.'de verilmiştir. Biyodegradasyon deneylerinde alınan numunelerden fenol, 2-NF, BPA ve lakkaz için KOİ ölçümü yapılmıştır, fakat numunelerin enzim içermesi sebebiyle anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

3.6.5. İyon Kromatografi Analizleri

4-AAP metoduyla belirlenen fenolik bileşik konsantrasyonları ayrıca seçilen bazı numuneler için İyon Kromatografisi metodu ile de ölçülerek metodun güvenilirliği ve yan ürünlerin girişim yapma ihtimali değerlendirilmiştir. Bu amaçla Dionex IonPac™ AS9-HC3000 cihazı kullanılmıştır. Ölçülen fenolik bileşik çözeltileri ve 50 kat seyreltilmiş olan numunelerdir. Ölçüm sırasında eluent olarak 9 mM Na₂CO₃ verilmiştir. Akış hızı 0,1 mL/dk olarak ayarlanmış ve kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit tutulmuştur.

Yapılan standart ölçümlerine göre oluşan pikler 6. dakikada klorür, 7. Dakikada nitrit, 10. dakikada nitrat, 17. dakikada sülfat miktarını göstermektedir. Kalibrasyon katsayıları ise klorür için 3,836, nitrit için 2,7861, nitrat için 1,4621 ve sülfat için 5,7771'dir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. FENOL İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.1.1. Aktif Karbon ile Fenolün Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon çalışmaları termal olarak aktive edilmiş PKDA (Norit) ve kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran (Norit) aktif karbonlarıyla 183 mg/L fenolün su içinde çözülmesi ve 100 ve 250 mg/L $\text{KH}_2\text{PO}_4+\text{K}_2\text{HPO}_4$ tamponunun içinde çözülmesi sonrasında aktif karbonla 3 gün temas ettirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Aktif karbon konsantrasyonu 1 g/L' dir. Başlangıç ve 3 gün sonundaki fenol konsantrasyonları arasındaki farktan adsorpsiyon kapasiteleri Eşitlik 1'e göre Tablo 13'deki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 13. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının fenol adsorpsiyon kapasiteleri

Aktif Karbon	Su içinde Q_{ads} (mg/g)	100 mg/L tampon ile Q_{ads} (mg/g)	250 mg/L tampon ile Q_{ads} (mg/g)
PKDA	103,6 (pH:8,5)	104,3 (pH:7,57)	112,5 (pH:7,22)
CAgran	85,8 (pH:5,48)	39,9 (pH:6,34)	66,5 (pH:6,44)

Analiz sonuçlarına göre PKDA'nın adsorpsiyon kapasitesi CAgran'a göre hem su içinde hem tamponlu çözeltilerde daha yüksek çıkmıştır. Tampon çözeltiyle pH'nın dengelenmesi neticesinde PKDA aktif karbonunda adsorpsiyon kapasitesinde çok az bir artış görülmesine rağmen, asidik özellikleriyle bilinen ve fosforik asitle aktive edilen CAgran aktif karbonunun adsorpsiyon kapasitesinin ise tamponla birlikte azaldığı tespit edilmiştir.

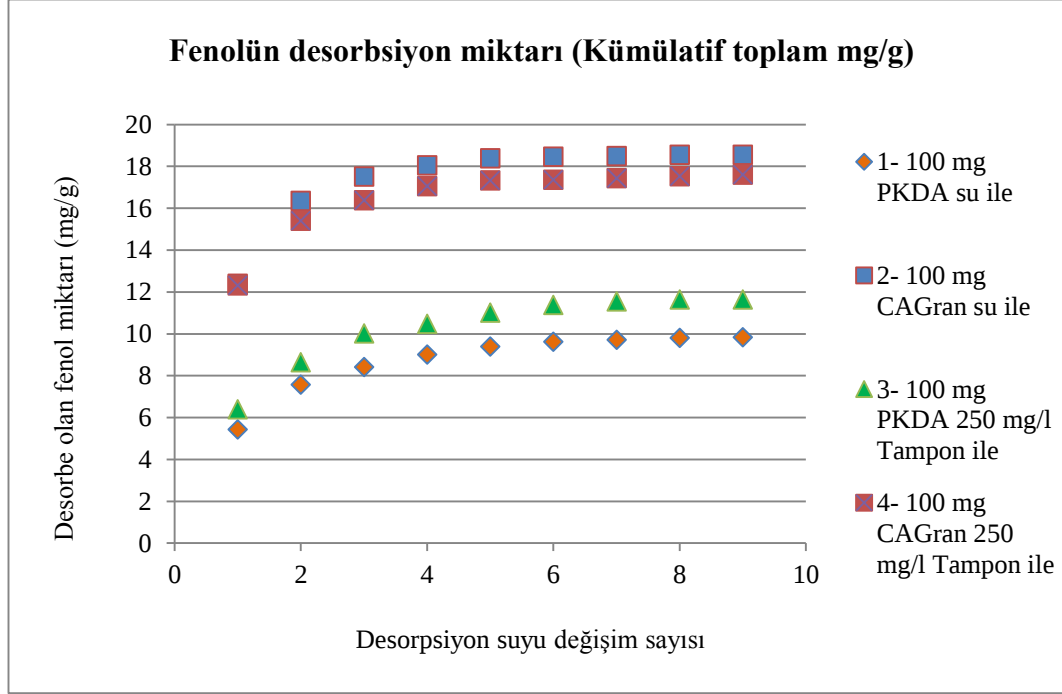
4.1.2. Aktif Karbon ile Fenolün Desorpsiyonu

Fenol için hesaplanan desorpsiyon kapasiteleri (mg fenol/g AK) Şekil 22’de verilmiştir. Kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran aktif karbonunun desorpsiyon kapasitesi termal olarak aktive edilmiş PKDA’ya göre çok daha yüksektir. Aktif karbonun aktivasyon tipinin desorpsiyon için çok önemli bir etken olduğu Bölüm 2.1.4.’te açıklanmaktadır. PKDA’nın adsorpsiyon kapasitesi daha yüksek olduğu için adsorbe olmuş fenolün desorpsiyon yüzdeleri ile karşılaştırıldığında CAgran’ın desorpsiyon kapasitesinin PKDA’nın 2 katından fazla olduğu görülmektedir. PKDA ile abiyotik şartlarda tamponsuz ve tamponlu desorpsiyon ile sırasıyla % 8,5 ve % 10 civarında desorpsiyon sağlanabilirken, CAgran ile desorpsiyon yüzdesi distile su kullanımı ile % 23,5 seviyesinde gerçekleşirken, tampon çözeltisiyle desorpsiyon verimi % 26’ya kadar yükselmiştir.

CAgran’da toplam desorpsiyon miktarının daha fazla olmasının sebebi fiziksel adsorpsiyon mekanizmasının baskın olmasıdır (Aktaş ve Çeçen, 2006a). Bunun sebebi termal olarak aktive edilmiş karbonların oksijene olan ilgisi ve oksijen ile temas ettiğinde yüzey kimyasında olan değişim olarak açıklanmaktadır (Çeçen ve Aktaş, 2011: 197). Termal aktivasyon oksijen olmadan gerçekleştirildiği için reaktif bir yüzeye yol açar ve oksijenli bir ortamda fenolik bileşiklerin yüzeye tersinirliği zor olan kovalent bağlarla bağlanmasını sağlayarak daha çok kimyasal adsorpsiyonun gerçekleşmesine sebep olur. Kimyasal aktivasyonda ise aktif karbon tamamen oksitlenmiş aktif bölgeleri olan bir yüzeye sahip olduğundan oksijen ile etkileşimi yüzeyi etkilememektedir (Aktaş, 2006). Böylece tersinirliği fazla olan fiziksel adsorpsiyon mekanizması baskın olur. Aktivasyon şeklinin farklı olduğu AK’larda değişen baskın adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.2’de ve adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.4.’te ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

Bu desorpsiyon verimleri aktif karbonun uzun süreli kullanımı için yeterli olmayıp, abiyotik şartlarda desorpsiyonun aktif karbonun rejenerasyonu için doğru yöntem

olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır. Hesaplanan abiyotik desorpsiyon verimleri fenolün enzimatik biyorejenerasyon verimleri ile Bölüm 4.1.4.' te karşılaştırılmıştır.

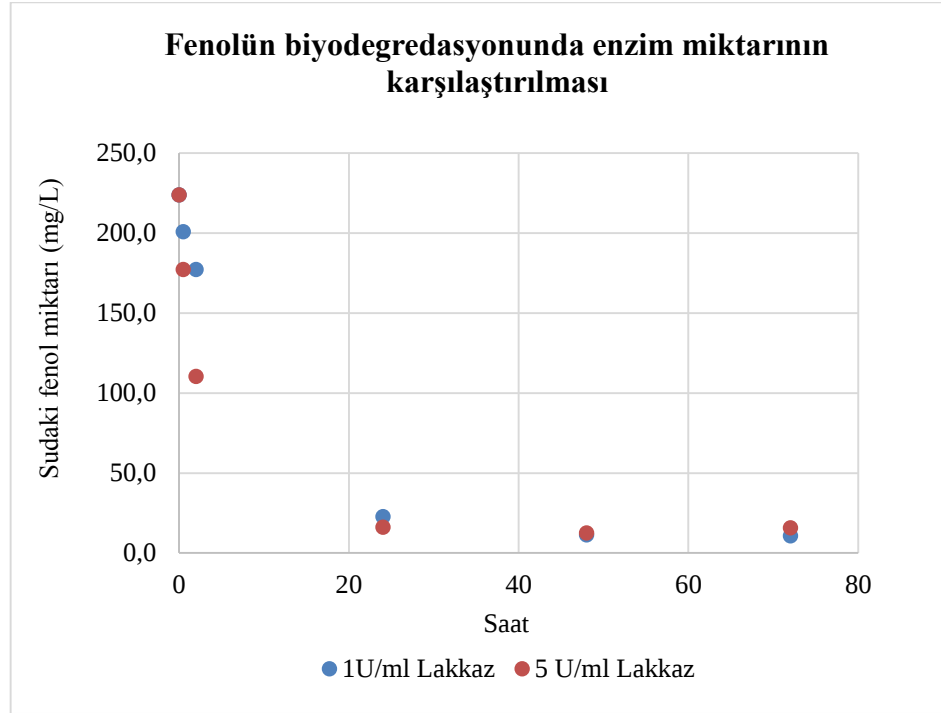


Şekil 22. Fenolün distile suyla ve tamponlanmış suyla PKDA ve CAGran'dan desorpsiyon kapasiteleri

4.1.3. Lakkaz ile Fenolün Biyodegradasyonu

Lakkaz ile fenolün enzimatik degradasyonunda sırasıyla enzim miktarının, pH'nın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Enzim miktarının etkisini belirlemek amacıyla daha önce aktivitesi belirlenmiş olan toz halindeki lakkaz enziminin konsantrasyonu 1 U/mL ve 5 U/mL aktiviteye sahip olacak şekilde ayarlanmıştır. Yaklaşık 200 mg/L konsantrasyondaki fenol için 1 U/mL aktiviteli enzim için 25 mL fenol çözeltisine 0,17 g lakkaz enzimi, 5 U/mL aktiviteli enzim için 25 mL fenol çözeltisine 0,83 g lakkaz enzimi eklenmiştir. 100 mL hacimli kapaklı erlenlerde fosfat tampon çözeltisi içinde çözülerek pH'sı 7,2'de sabitlenmiş yaklaşık 200 mg/L konsantrasyondaki fenol ile lakkaz 3 gün boyunca temas ettirilmiş ve konsantrasyon değişimi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 23'te verilmiştir. Lakkaz enziminin 200 mg/L konsantrasyondaki fenölü 24 saatten kısa bir zaman içerisinde % 93 oranında oksitleyebildiği görülmüştür. 5 U/mL enzim dozunda fenol degradasyonu daha hızlı gerçekleşmiştir,

fakat degrede edilen fenol miktarı açısından bir değişiklik olmadığı için yapılacak olan biyorejenerasyon deneyleri için 1 U/mL lakkaz yeterli bulunmuştur (Bölüm 4.1.4.). Her 2 tüpte de 15 mg/L fenol degrede edilemeden kalmıştır. Bu da 24 saatten kısa bir zaman içerisinde enzimin aktivitesini kaybettiğini ve bu nedenle fenolün bir kısmını degrede edemediğini göstermektedir.

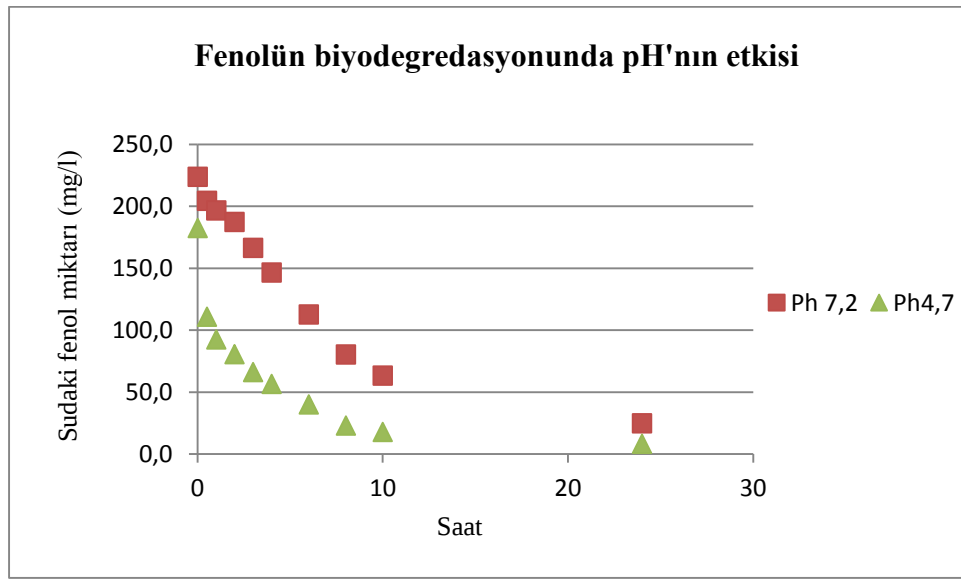


Şekil 23. 25 °C 1 U/mL ve 5 U/mL dozlarda Lakkaz enziminin fenol degradasyonu (Ph:7,2)

Lakkaz ile enzimatik degradasyona pH'nın etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda 2 farklı pH'da (7,2 ve 4,7) 1 U/mL enzim ile 25 °C fenol degradasyonu izlenmiştir (Şekil 24). pH 7,2 fosfat tamponu ile, pH 4,7 ise sodyum asetat tamponu ile sağlanmıştır. pH 7,2'de başlangıç fenol konsantrasyonu 224 mg/L iken % 89'luk bir fenol giderimiyle 24 saat sonunda 25 mg/L fenole inilmiştir. pH 4,7'de ise başlangıç fenol konsantrasyonu 183 mg/L iken % 96'luk bir fenol giderimiyle 24 saat sonunda 8 mg/L fenole inilmiştir. pH 4,7'de enzimatik degradasyonun veriminin pH 7,2'ye göre bir miktar daha fazla olduğu söylenebilmektedir. Ayrıca pH 4,7'de fenol konsantrasyonun daha büyük bir giderim hızıyla azaldığı anlaşılmaktadır. Fenol konsantrasyonu pH 7,2'de yaklaşık 6 saatte yarıya inerken, pH 4,7 ile ortam asidik

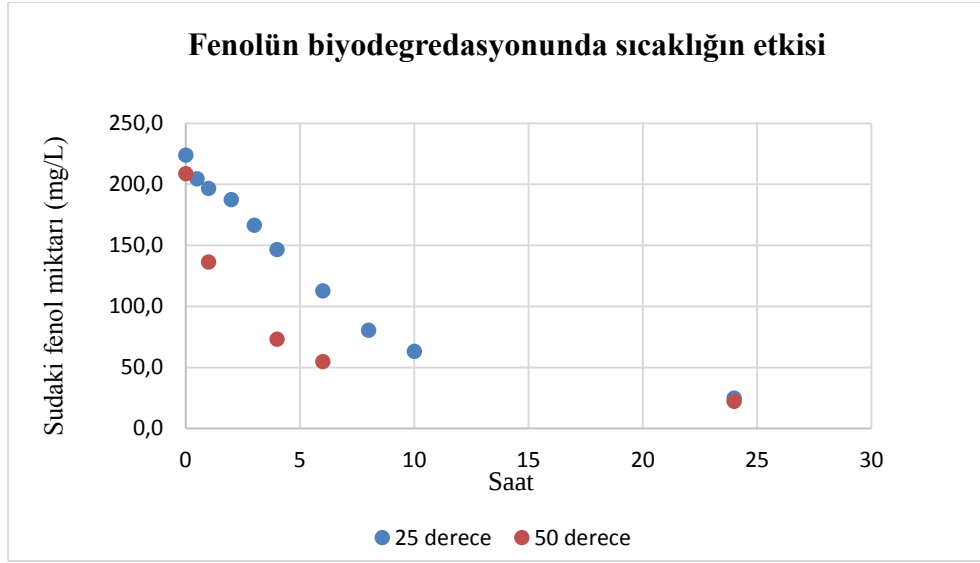
olduğunda 2 saat içerisinde yarılanmıştır. Degredasyon verimi açısından pH 4,7 ve 7,2 arasında çok önemli bir fark olmamakla birlikte lakkaz enzimi için degredasyon hızı pH 4,7’de daha yüksek olmuştur (Şekil 24).

Bakterilere göre daha düşük pH’larda enzim aktivitesi daha yüksek olan Funguslar tarafından lakkaz enziminin daha çok üretildiği bilinmektedir. Bu sebeple ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda düşük pH’lar lakkaz enziminin giderim mekanizması için bazik koşullara göre daha uygundur.



Şekil 24. 25 °C pH 7,2’de ve pH 4,7’de 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol degredasyonu

Sıcaklığın lakkaz enziminin aktivitesine olan etkisini tespit edebilmek amacıyla 50°C’de de enzimatik degredasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Fenolün 1U/mL lakkaz enzimi ile 50°C’de ve fosfat tamponu ile sağlanan 7,2 pH değerinde degredasyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 25’te verilmiştir. Şekil 24’te 25 °C ve 7,2 pH için verilen fenol giderim profiliyle karşılaştırıldığında, 50°C’de giderim hızının çok daha yüksek olduğu görülmektedir. 25 °C’de 1 saat sonunda yaklaşık 25 mg/L, 6 saat sonunda ise 115 mg/L fenol degrede edilebilirken, 50 °C’de 1 saat sonunda yaklaşık 70 mg/L, 6 saat sonunda ise 150 mg/L fenol degrede edilebilmiştir. 24 saat giderim sonunda ortamda her iki sıcaklıkta yaklaşık 20-25 mg/L fenol giderilmeden kalmıştır (Şekil 25). 50°C’de giderim hızı 25 °C’ye göre daha hızlı olmuştur fakat 24 saat sonunda iki şartta da giderim miktarı aynı olmuştur.



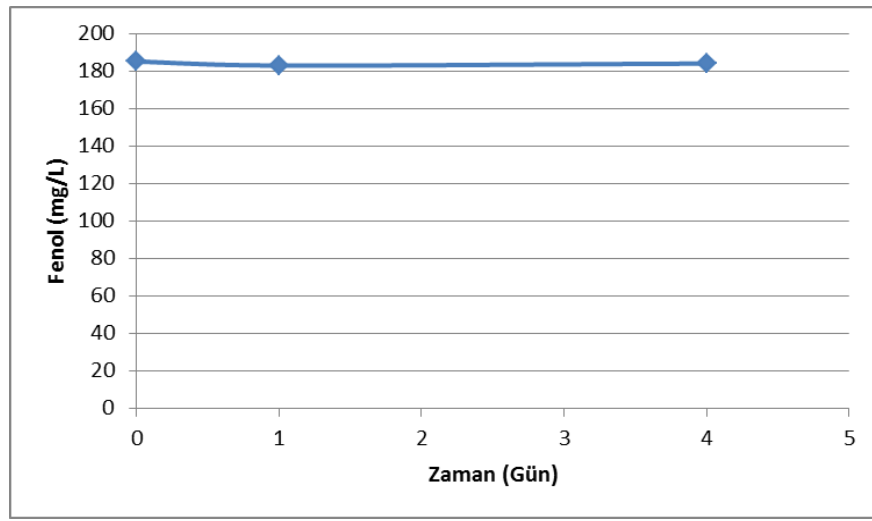
Şekil 25. 50°C’de ve pH 7,2’de 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol degradasyonu



Şekil 26. Fenol ile biyodegradasyon çalışmalarında görülen kahverengi çökelti

Biyodegradasyon deneyleri sonunda görülen kahverengi çökelti polimerize olmuş fenollerin çökerek uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 26). Lakkaz enzimiyle okside olan fenol, fenoksi radikallerine dönüşmektedir. Fenoksi radikalleri birbiri ile tepkimeye girerek ve C bağları aracılığıyla kovalent olarak bağlanarak polimerler oluşturmaktadırlar (Tuncer 2010).

Fenol gideriminin enzimatik reaksiyon dışında buharlaşma yoluyla da gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için 25 °C’de, pH 6’da ve 200 mg/L fenol enzim ilave edilmeden aynı şartlarda çalkalanmış ve zamana bağlı olarak fenol konsantrasyonu 4 gün süresince takip edilmiştir (Şekil 27). Ayrıca 50°C’de ve pH 7 ve 5 şartlarında da izlenmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki fenol buharlaşma veya cam yüzeyine adsorpsiyon vb. gibi enzimatik reaksiyon haricinde başka bir mekanizmayla ölçülebilir derecede giderilmemektedir. Enzimatik degradasyon bu çalışmalarda tek fenol giderim mekanizması olarak tespit edilmiştir.



Şekil 27. Enzim yokluğunda abiyotik ortamda fenol konsantrasyonu

Lakkaz ile fenolün enzimatik degradasyon çalışmalarında yalnız lakkaz ve fenolün bulunduğu bir ortam oluşturularak belirli koşullarda lakkazın fenolü giderimi izlenmiştir. Sonuçlar lakkaz enziminin fenolü hızlı ve yüksek oranda okside ettiğini göstermektedir. pH 4,7 olduğunda pH 7,2’ye göre, sıcaklık 50 °C iken 25°C olduğu şartlara göre ve enzim miktarı 5 U/mL iken 1 U/mL’ye göre oksidasyon daha hızlı gerçekleşmektedir. Fakat 24 saatlik giderim sonucunda, 50 °C ve 25°C şartlarında giderilmeden kalan fenol miktarı 20-25 mg/L ve 5 U/mL ve 1 U/mL enzim miktarlarında ise kalan fenol miktarı yaklaşık 15 mg/L dir ve %90 civarında giderim sağlanmaktadır. 24 saat sonunda ölçülen değerlerde pH 7,2’de de %90 civarında giderim görülürken pH 4,7’de %100’e yakın giderim görülmüştür. Enzim miktarının karşılaştırıldığı deneyde 3 gün boyunca aralıklarla alınan numunelerde 1 günün sonunda ve sonraki günlerde fenol miktarında değişimin gözlenmemesi lakkazın

aktivitesini 1 günün sonunda kaybettiğini göstermektedir (Şekil 23). Bu sebeple fenolle doyurulmuş AK'un enzimatik biyorejenerasyon çalışmasında, enzim eklenerek biyorejenerasyonun izlenmesi süresi 24 saat olarak uygulanmıştır.

Yapılan bir çalışmada lakkaz enziminin (5 U/mL) pH 5'te ve 35°C'de fenolü 30 dakikalık karıştırma süresince % 80 oranında degrede ettiği tespit edilmiştir (Asadgol vd., 2014). Bu çalışmayla karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz sonuçlarda 1 U/mL ve 25°C'de fenol konsantrasyonu pH 7,2'de yaklaşık 6 saatte yarıya inerken, pH 4,7 ile ortam asidik olduğunda 2 saat içerisinde yarılanmıştır. Lakkaz enziminin 200 mg/L konsantrasyondaki fenolü 24 saatten kısa bir zaman içerisinde % 93 oranında oksitleyebildiği görülmüştür.

4.1.4. Aktif Karbon ile Fenolün Enzimatik Biyorejenerasyonu

Fenolle yüklenmiş PKDA ve CAgran aktif karbonlarının lakkaz enzimiyle biyorejenerasyonunda, enzimatik degradasyon deneylerinde 1 U/mL Lakkaz enzimi dozunun ve 24 saat temas süresinin yeterli olduğu tespit edildiği için bu koşullar uygulanmıştır. Yaklaşık 200 mg/L konsantrasyonda fenol içeren, pH'sı fosfat tampon çözeltisi ile yaklaşık olarak 7'ye ayarlanmış ve sodyum asetat tampon çözeltisi ile yaklaşık olarak 5'e ayarlanmış olan 2 farklı çözelti içerisinde biyorejenerasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve enzimatik rejenerasyon sonrasında post-adsorpsiyon ile elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve bunlardan hesaplanan biyorejenerasyon verimleri Tablo 14'te verilmiştir. Ayrıca Bölüm 4.1.2.'de tartışılan abiyotik desorpsiyon verimleri de karşılaştırma amacıyla Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. PKDA ve CAgran aktif karbonlarında 25 °C’ de fenol desorpsiyon ve biyorejenerasyon verimlerinin karşılaştırılması

Aktif Karbon	pH	Ön-adsorpsiyon (mg/g)	Post-adsorpsiyon (mg/g)	Biyorejenerasyon Verimi (%) (1U/ml)	Abiyotik Desorpsiyon (%)
1 g/L PKDA	7	130.96	51.24	39.13	10.36
1 g/L CAgran	7	40.21	33.09	82.29	26.45
1 g/L PKDA	5	86.47	38.07	44.03	9.50
1 g/L CAgran	5	39.85	49.11	123.24	21.74

Abiyotik şartlarda maksimum toplam desorpsiyon verimi, adsorpsiyon kapasitesi en yüksek olan termal olarak aktive edilmiş PKDA karbonunda % 10 civarında iken lakkaz enzimiyle bu verim % 40 civarlarına çıkarılmıştır. Bu da göstermiştir ki fenole doyurulmuş aktif karbon lakkaz enzimiyle abiyotik şartlarda sadece suyla olabilecek maksimum desorpsiyonun (rejenerasyonun) çok üzerinde rejenerasyon sağlayabilmektedir. Kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran aktif karbonunda ise biyorejenerasyon verimi çok daha yüksek gerçekleşmiştir. CAgran için pH 7’de abiyotik şartlarda % 26 civarında olan desorpsiyon kapasitesi lakkaz enzimiyle %82’ye kadar yükselmiştir. İki aktif karbon tipi arasındaki oldukça yüksek biyorejenerasyon verimi farklılıkları aktif karbon tipinin önemini göstermektedir.

pH 5’te ise her iki aktif karbon tipi için de pH 7’ye göre daha yüksek biyorejenerasyon verimleri gözlenmiştir. Bölüm 4.1.3.’te pH 5’te lakkaz enzimiyle fenolik bileşiklerin degradasyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle pH 5’te biyorejenerasyon veriminin daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur.

Ayrıca pH 5’te lakkaz enzimiyle CAgranın teması sonrasında adsorpsiyon kapasitesinin hiç kullanılmamış aktif karbona göre daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak biyorejenerasyon veriminin %100’ü aştığı görülmektedir. Bunun sebebi aktif karbon yüzeyine bağlanan enzimlerin aktivitesini bir süre daha devam ettirmesi ve

post-adsorpsiyon esnasında enzimatik degradasyona neden olarak ön-adsorpsiyondan daha yüksek oranda fenolün giderimine neden olmalarıdır. Aktif karbon yüzeyinde immobilize edilen lakkaz enziminin askıdaki enzime göre aktivitesini daha uzun süre devam ettirdiği literatürdeki bir başka çalışmada da gösterilmiştir (Nguyen vd., 2016). Biyorejenerasyon çalışmalarında enzimle 1 günlük temas sonrasında her 4 reaktör içerisinde su fazında kalan fenol konsantrasyonu sadece 3 ile 5 mg/L arasında ölçülmüştür. Degradasyon çalışmalarından da tahmin edildiği gibi (Bölüm 4.1.3.) desorbe olan fenol askıdaki lakkaz enzimleri tarafından 24 saat içerisinde büyük oranda degrede edilmektedir.

Lakkaz Enzimiyle (1 U/mL) fenolün enzimatik biyorejenerasyon verimlerine sıcaklığın etkisini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda Tablo 15'te belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır. Her iki karbon tipi için de biyorejenerasyon verimlerinin 25 °C'de daha yüksek olduğu görülmüştür. Degradasyon deneylerinde 50 °C'de daha hızlı bir giderim gözlemlenmesine rağmen toplam fenol giderim miktarının aynı olduğu görülmüştür (Bölüm 4.1.3.). 25 °C'de AK'un biyorejenerasyonunun 50 °C'ye göre daha fazla olması, enzimlerin 25 derecede AK'a daha fazla immobilize olabildiğini veya immobilize olan enzimlerin aktivitelerinin daha uzun sürdüğünü göstermektedir.

Tablo 15. Lakkaz Enzimiyle (1 U/mL) fenolün enzimatik biyorejenerasyon verimlerine sıcaklığın etkisi

pH	AK	50 °C'de Biyorejenerasyon (%)	25 °C'de Biyorejenerasyon (%)	25 °C'de Abiyotik Desorpsiyon (%)
7	PKDA	30,19	39,13	10.36
7	CAGran	46,01	82,29	26.45

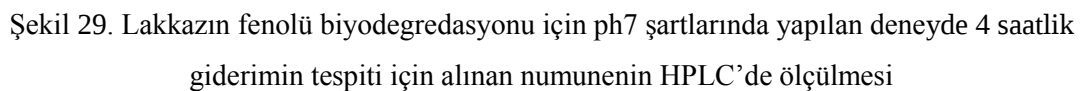
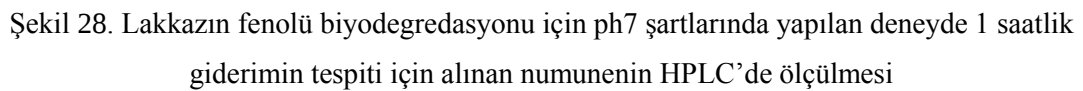
4.1.5. HPLC' de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlar 4-AAP metodu ile elde edilen sonular ile paralellik göstermektedir ve elde edilen pik

görüntülerinde 19. dakika ve civarında ara ürün oluşumunu gösterebilecek belirgin bir pike rastlanmamaktadır. Ancak Tablo 16’da 4-AAP ile elde edilen değerlerin HPLC ile elde edilenlerden daha yüksek olması HPLC metodunda tespit edilemeyen bazı fenolik ara ürünlerin de olabileceğini göstermektedir. Elde edilen görüntülerde 5. dakikaya kadar oluşan dalgalanmaların çözücü olan metanol veya daha düşük moleküler yapıları yan ürünler olabileceği düşünülmektedir. Ölçülen numuneler 50 kat seyreltilmiş numunelerdir.

Tablo 16. Lakkaz Enzimiyle (1 U/mL) fenolün enzimatik biyodegradasyon deneyi sırasında alınan numunelerin HPLC’ de ölçülmesi

pH	alınan numune	dakika	alan	HPLC	4-AAP ile
				konsantrasyon	ölçülen konsantrasyon
				mg/L	mg/L
7	stok				223,84
7	1 sa sonra	19.040	1,3538	195,08	196,79
7	4 sa sonra	19.107	0,889	128,10	146,61
7	10 sa sonra	19.093	0,3107	44,77	63,34
5	stok				182,56
5	1 sa sonra	19.003	0,6948	100,12	92,52
5	4 sa sonra	18.99	0,3202	46,14	56,58
5	10 sa sonra	18.890	0,0137	1,97	17,79
5	24 sa sonra	18,823	0,0048	0,69	8,18



4.2. 2-NİTROFENOL İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.2.1. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Adsorpsiyonu

2-nitrofenolle (2-NF) adsorpsiyon çalışmaları termal olarak aktive edilmiş PKDA (Norit) ve kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran (Norit) aktif karbonlarıyla 200 mg/L başlangıç 2-NF konsantrasyonunda çözeltinin 1 g/L aktif karbonla 3 gün boyunca 25°C’de 150 RPM’de sıcaklık ayarlı çalkalayıcıda temas ettirilmesi ve süreç sonunda kalan 2-NF konsantrasyonlarının 4-AAP metoduyla tayin edilmesini içermektedir.

200 mg/L 2-NF’ün su içinde çözülmesinin yanı sıra 250 mg/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ tamponunun içinde de çözündürülmüştür. Başlangıç ve 3 gün sonundaki fenol konsantrasyonları arasındaki farktan her durum için adsorpsiyon kapasiteleri Eşitlik 1’e göre Tablo 17’deki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 17. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının 2-NF’ü adsorpsiyon kapasiteleri

Aktif Karbon	Su içinde Q_{ads} (mg/g)	250 mg/L tampon ile Q_{ads} (mg/g)
PKDA	176,7 (pH: 6,46)	166,6 (pH: 6,78)
CAgran	164,1 (pH: 5)	156,5 (pH: 6,74)

Termal olarak aktive edilmiş PKDA’nın adsorpsiyon kapasitesi CAgran’a göre bir miktar daha yüksektir. Ancak 2 karbon tipi arasındaki fark fenolde olduğu kadar büyük değildir. Ayrıca her 2 aktif karbon tipi için de 2-NF adsorpsiyon kapasitesi fenol adsorpsiyon kapasitesine göre çok daha yüksektir. Özellikle CAgran aktif karbonunda 2-NF, fenole göre 2 kattan daha fazla adsorbe olabilmektedir. Tampon çözeltiyle pH’nın dengelenmesi neticesinde her iki aktif karbonunun adsorpsiyon kapasitesinin ise bir miktar azaldığı tespit edilmiştir.

4.2.2. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Desorpsiyonu

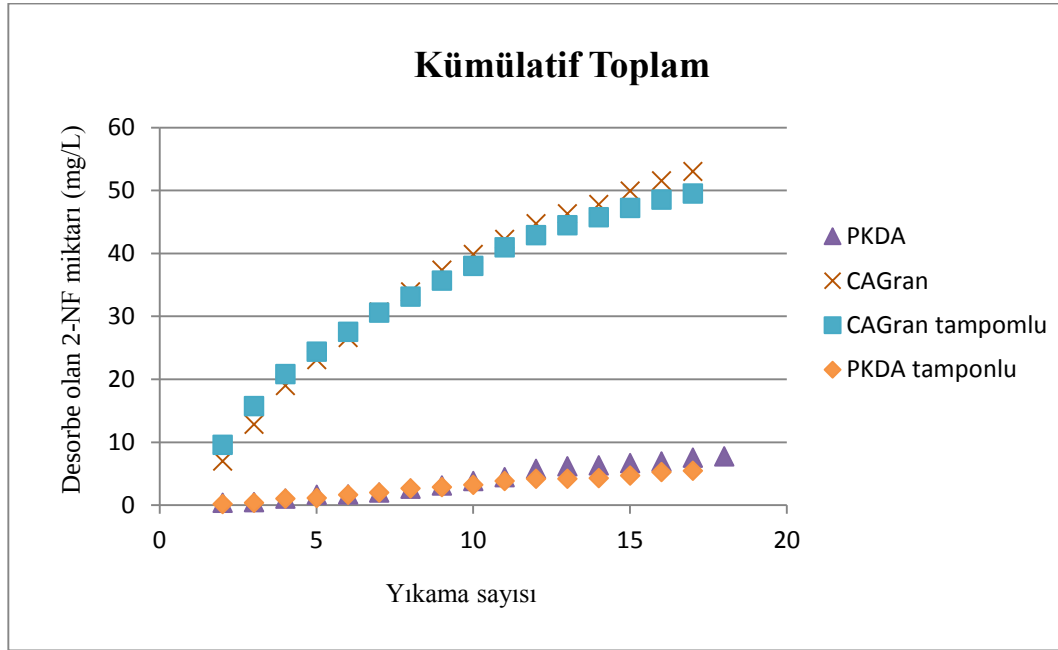
2-NF ile desorpsiyon çalışmalarında kullanılmış olan aktif karbonlar adsorpsiyon çalışmalarında 2-NF'ye doyurulmuş aktif karbonlardır. Desorpsiyon çalışmaları fenolle yapılan çalışmalardaki gibi yapılmıştır. Ancak fenolle yapılan çalışmalarda desorpsiyon, 7 desorpsiyon basamağında (gün) gerçekleşmiş ve bu 7 desorpsiyon basamağından sonra desorpsiyon devam etmemiştir. 2-NF ile yapılan çalışmalarda ise desorpsiyonun tamamlanması 30 desorpsiyon basamağı (gün) sonunda gerçekleşmiştir. Her durumda kümülatif desorpsiyon ve desorpsiyon yüzdeleri, sırasıyla eşitlik 9 ve 10'a göre hesaplanmıştır (Bölüm 3.3.).

2-NF için hesaplanan desorpsiyon kapasiteleri (mg 2-NF/g AK) Şekil 28'de verilmiştir. Kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran'ın desorpsiyon kapasitesi termal olarak aktive edilmiş PKDA'ya göre çok daha yüksektir. PKDA'nın desorpsiyon kapasitesi yaklaşık 10 mg/g iken, CAgran'ın desorpsiyon kapasitesi yaklaşık 55 mg/g'dır (Şekil 30). CAgran için desorpsiyon miktarı, PKDA için desorpsiyon miktarından yaklaşık 5 kat daha fazladır. Her 2 aktif karbon tipinde de tamponlu çözelti içerisinde desorpsiyon daha az gerçekleşmiştir. PKDA'nın adsorpsiyon kapasitesi daha yüksek olduğu için 2-NF'ün desorpsiyon yüzdeleri açısından 2 aktif karbon tipi arasındaki fark büyük olmaktadır. PKDA ile abiyotik şartlarda distile su ile % 7,6, tamponlu su ile % 6,2 desorpsiyon sağlanabilirken, CAgran ile desorpsiyon yüzdesi distile su kullanımı ile % 42,9 seviyesinde, tampon çözeltisiyle desorpsiyon verimi % 41,1 seviyesinde olmuştur.

CAgran'da toplam desorpsiyon miktarının daha fazla olmasının sebebi fiziksel adsorpsiyon mekanizmasının baskın olmasıdır (Aktaş ve Çeçen, 2006a). Aktivasyon şeklinin farklı olduğu AK'larda değişen baskın adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.2'de ve adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.4.'te ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

Desorpsiyon verimleri karşılaştırılırken PKDA karbonu ile 2-NF ve fenolün desorpsiyon verimleri yaklaşık olarak birbirine yakındır. PKDA'da fenolün desorpsiyon verimi % 9 civarındayken, 2-NF'nin desorpsiyon verimi % 7 civarındadır.

CAGran'da ise fenol için desorpsiyon verimi % 20 civarındayken 2-NF için desorpsiyon verimi % 40 civarındadır. Elde edilen bu desorpsiyon verimleri ile enzimatik biyorejenerasyon verimleri, 2-NF'nin enzimatik biyorejenerasyonu bölümünde karşılaştırılmıştır (Bölüm 4.2.4).



Şekil 30. 2-NF'nin distile suyla ve tamponlanmış distile suyla PKDA ve CAGran'dan desorpsiyon kapasiteleri

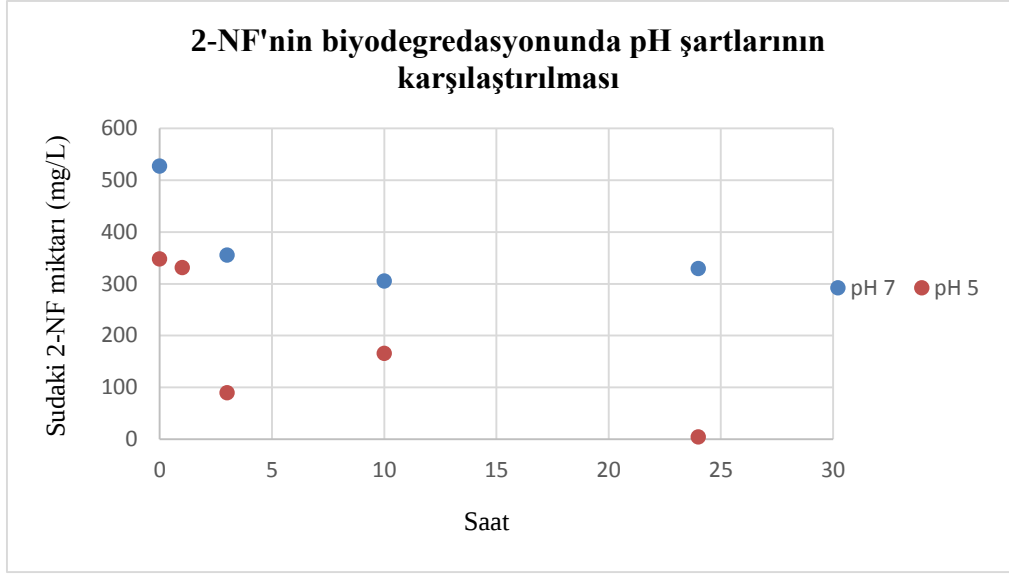
4.2.3. Lakkaz ile 2-Nitrofenolün Biyodegradasyonu

Lakkaz enzimi ile degradasyon çalışmaları 25 °C sıcaklığa ayarlı inkübatör içerisine yerleştirilen orbital çalkalayıcıda 150 RPM'de sürekli olarak çalkalama yoluyla, değişen konsantrasyonlarda enzim ve 2-NF çözeltilerinin temas ettirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Lakkazla 2-NF degradasyon çalışmalarında 25 °C sıcaklıkta yaklaşık pH 7 ve pH 5'de sırasıyla yaklaşık 500 ve 350 mg/L 2-NF ile 1 U/mL enzim eklenerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pH 7'de 1 U/mL enzimle 166 mg/L 2-NF konsantrasyonu denenmiştir. Degradasyon deneylerinde giderimin izlenebilmesi için 24 saat boyunca belli zaman aralıklarında alınan numunelerin konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.

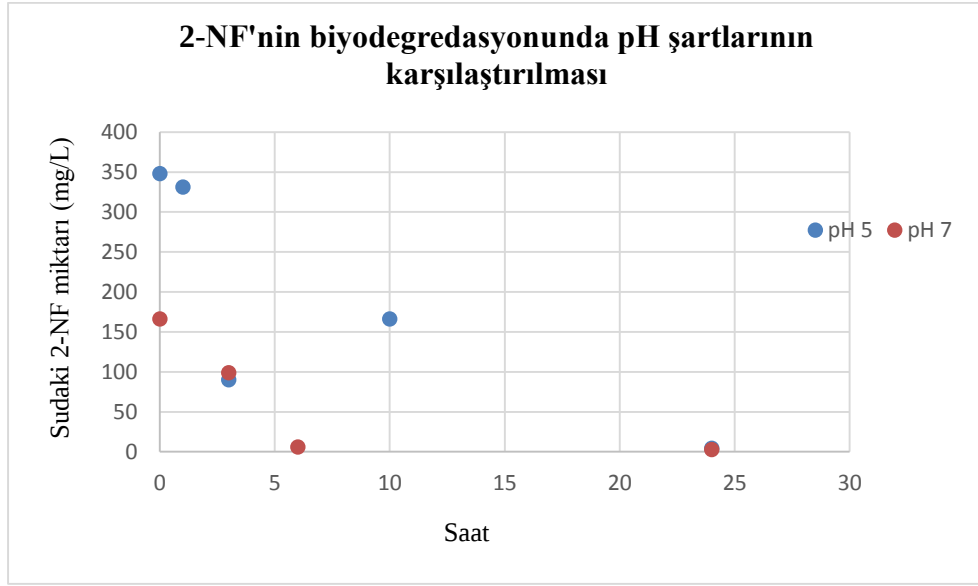
Elde edilen sonuçlarda 1 U/mL lakkazın 24 saat sonunda pH 7’de 527 mg/L 2-NF’yi 329 mg/L’ ye ve 166 mg/L 2-NF’yi 3 mg/L’ye kadar giderdiği görülmektedir (Şekil 31). pH 5 şartlarında ise 1U/mL lakkazın 348 mg/L 2-NF’yi 4 mg/L’ye kadar giderdiği görülmektedir (Şekil 32). Bu sonuçlar 2-NF’nin giderimi için pH 5 şartlarının pH 7 ‘ye göre daha uygun olduğunu ve yapılacak olan biyorejenerasyon çalışmaları için 1 U/mL enzim miktarının ve 24 saatlik bir sürenin yeterli olduğunu göstermektedir.

pH 5 şartlarında 1U/ml lakkaz ile yaklaşık 350 mg/L 2NF’nin biyodegradasyonu deneyinde 24 saat sonunda %99’luk bir giderim verimi elde edilmiştir. pH 7 şartlarında ise 1U/ml lakkaz ile 166 mg/L 2NF’nin biyodegradasyonu deneyinde 24 saat sonunda %99’luk bir giderim verimi elde edilmiştir. Lakkaz enziminin bakterilere göre daha düşük pH’larda enzim aktivitesi daha yüksek olan Funguslar tarafından daha çok üretilen bir enzim olması bu farkı açıklamaktadır. Düşük pH’larda enzim aktivitesinin yüksek olduğu fenolle yapılan biyodegradasyon deneylerinde de görülmektedir (Bölüm 4.1.3.) (Şekil 33). Bu nedenle lakkaz ile giderim çalışmalarında mümkünse pH’nın düşük ve 5 civarı uygulanması çıkış değerlerinin iyileştirilmesinde faydalı olacaktır.

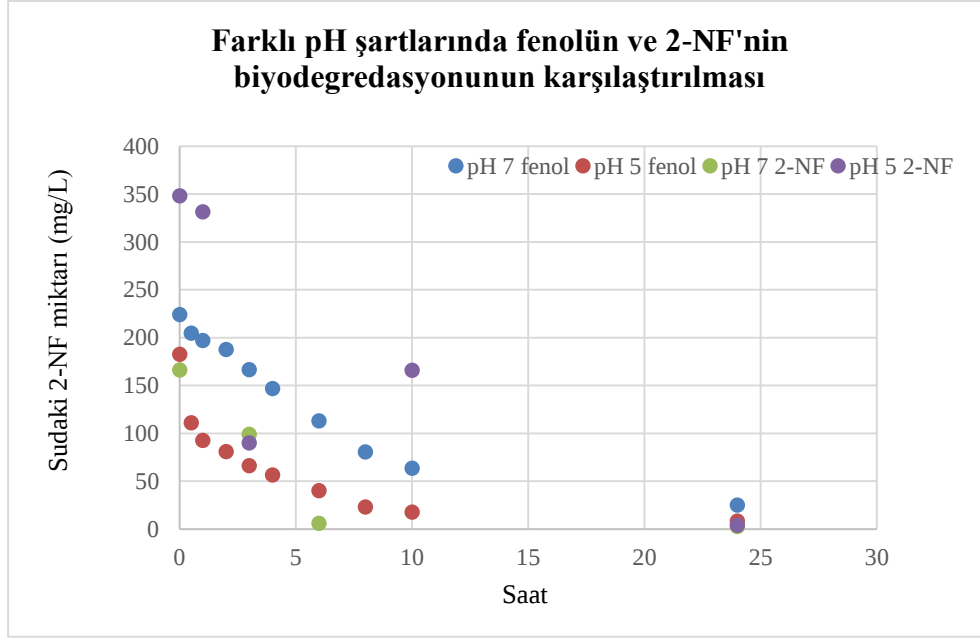
2-NF gideriminin enzimatik reaksiyon dışında buharlaşma yoluyla da gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için 25°C’de, pH 6’da ve enzim ilave edilmeden çalkalanmış ve zamana bağlı olarak 2-NF konsantrasyonu 5 gün süresince takip edilmiştir (Şekil 27). Ayrıca 50°C’de ve pH 7 ve 5 şartlarında da izlenmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki 2-NF buharlaşma veya cam yüzeyine adsorpsiyon vb. gibi enzimatik reaksiyon haricinde başka bir mekanizmayla ölçülebilir derecede giderilmemektedir.



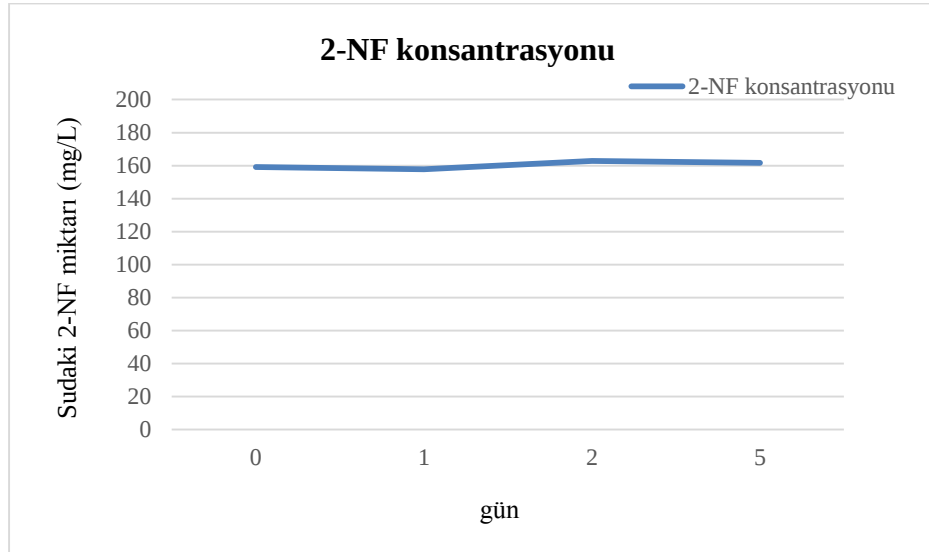
Şekil 31. 25°C'de ve pH 7 ve pH 5'te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin 2-NF degradasyonu



Şekil 32. 25°C'de ve pH 7 ve pH 5'te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin 350 ve 170 mg/L 2-NF'yi degradasyonu



Şekil 33. 25°C’de ve pH 7 ve pH 5’te 1 U/mL dozda Lakkaz enziminin fenol ve 2-NF degradasyonu



Şekil 34. 25 °C’de, pH 6’da enzim yokluğunda abiyotik 2-NF profili

4-AAP metodu ile 500 nm’de ortamda yalnızca 2-NF’nin ve AK’nun bulunduğu adsorpsiyon ve desorpsiyon deneylerinin numuneleri ölçülebilmıştır fakat 2-NF’nin lakkaz ile biyodegradasyonu sırasında bir azalma ölçülememiştir. Biyodegradasyon numunelerinin HPLC ile ölçülmesinde ise giderimin görülmesi (Bölüm 4.2.5.) 4-AAP metodunun lakkazlı 2-NF çözeltisi için uygun olmadığını göstermektedir. Zira 2-

NF'ün lakkazla degradasyonu esnasında kuvvetle muhtemel 4-AAP metodunda tespit edilebilen bir fenolik bileşik oluşmaktadır. Ayrıca 2-NF ile AK'nun biyorejenerasyonu için yapılan deneylerde yüksek oranda biyorejenerasyon verimi 4-AAP metodu ile ölçülebilmektedir (Bölüm 4.2.4.).

Çalışmamızda 2-NF ile yapılan biyodegradasyon deneylerinden alınan enzimli numunenin standart metodlarda tanımlanan 4-AAP metodu kullanılarak 500 nm'de gideriminin izlenememesinin sebebinin 2-nitrofenolün lakkaz ile biyodegradasyonu sırasında oluşan ara fenolik bileşikler olduğu düşünülmektedir.

2-NF ve fenolün aktif çamurla gideriminin karşılaştırıldığı bir çalışmada ortamda tek karbon kaynağı olarak fenol bulunduğunda aklime olmamış kültürle giderilebiliyorken, ortamda tek karbon kaynağı olarak 2-NF bulunduğunda 2-NF'nin giderilemediği görülmüştür. Ortamda 2-NF ve fenol birlikte bulunduğunda 2-NF'nin giderimi sağlanmıştır. Fenolün çoğu 24 saat içinde uzaklaştırılmış, tamamı ise 48 saat içinde uzaklaştırılmıştır. Aklimasyonsuz çamurda fenol 24 saat içinde uzaklaştırılabiliyorken 48 saate çıkmasının sebebi 2-NF'nin ortamda inhibisyon etkisi yapmasıdır. 2 günlük sürenin bitiminde fenol ortamdan tamamen uzaklaştırılmasına rağmen 2-NF için giderim olmamıştır. 30 mg/L 2-NF'nin tamamının giderimi 2 günün ardından 6 günlük havalandırmayla sağlanmıştır (Aktaş, 2006). Yapılan biyodegradasyon çalışmalarında elde ettiğimiz sonuçlarda ise pH 5 şartlarında 1U/ml lakkaz ile yaklaşık 350 mg/L 2NF'nin biyodegradasyonu deneyinde 24 saat sonunda %99'luk bir giderim verimi elde edilmiştir. pH 7 şartlarında ise 1U/ml lakkaz ile 500 mg/L 2-NF'yi 24 saat sonunda 200 mg/L kadar gidererek %40 civarında giderim verimi sağlayabilmiştir. pH 7 şartlarında, 1U/ml lakkaz ile 166 mg/L 2NF'nin biyodegradasyonu deneyinde ise 24 saat sonunda %99'luk bir giderim verimi elde edilmiştir. Lakkaz enziminin bakterilere göre daha düşük pH'larda enzim aktivitesi daha yüksek olan Funguslar tarafından daha çok üretilen bir enzim olması bu farkı açıklamaktadır.

4.2.4. Aktif Karbon ile 2-Nitrofenolün Enzimatik Biyorejenerasyonu

Enzimatik biyorejenerasyon deneylerinde 1 U/mL Lakkaz enzimi ile yaklaşık 140 mg/L konsantrasyonda 2-NF içeren pH'sı fosfat tampon ile 7'ye ayarlanmış 2-NF çözeltisi içerisinde biyorejenerasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve enzimatik rejenerasyon sonrasında post-adsorpsiyon ile elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve bunlardan hesaplanan biyorejenerasyon verimleri Tablo20'de verilmiştir.

Tablo 18. 2-NF'ün pH 7'de 50 °C'de biyorejenerasyon kapasitesi

AK	Ön - Adsorpsiyon (mg/g)	Post - Adsorpsiyon (mg/g)	Biyorejenerasyon (1U/ml) (%)	Desorpsiyon (%)
PKDA	135,10	116,41	86,17	7,6
CAgran	104,55	69,19	66,18	42,9

Fenol için biyorejenerasyon ve tüm biyodegradasyon çalışmalarında 25 °C ve 50 °C de yapılan deneylerde 50 °C de biyorejenerasyonun azaldığı izlenmekle birlikte önemli bir fark görülmemektedir (Bölüm 4.1.4.). Burdan yola çıkarak 2-NF'ün biyorejenerasyonu 50°C 'de izlenmiştir. Elde edilen desorpsiyon verimleriyle biyorejenerasyon verimleri karşılaştırıldığında biyorejenerasyon verimlerinin, desorpsiyondan verimlerinden her iki AK tipi için de oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Aynı zamanda CAgran daha fazla desorbe olmasına rağmen PKDA'nın daha fazla biyorejenere olduğu görülmektedir. Adsorpsiyon kapasitesi daha fazla olan PKDA karbonunun düşük abiyotik desorpsiyon verimi olması lakkazın termal olarak aktive edilmiş yüksek 2-NF doygunluğuna sahip olan AK'u büyük oranda rejenere edebildiğini göstermektedir.

Abiyotik şartlarda maksimum toplam desorpsiyon verimi, adsorpsiyon kapasitesi yüksek olan termal olarak aktive edilmiş PKDA karbonunda % 7 civarında iken lakkaz enzimiyle bu verim % 86 civarlarına çıkarılmıştır. Bu da göstermiştir ki 2-NF'ye doyurulmuş aktif karbon lakkaz enzimiyle abiyotik şartlarda sadece suyla olabilecek

maksimum desorpsiyonun 12 katından daha fazla rejenerasyon sağlayabilmektedir. CAgran için abiyotik şartlarda % 42 civarında olan desorpsiyon kapasitesi lakkaz enzimiyle % 66'ya kadar yükselmiştir. İki aktif karbon tipi arasındaki biyorejenerasyon verimi farklılıkları aktif karbon tipinin önemini göstermektedir. Yüksek adsorpsiyon ve yüksek biyorejenerasyon verimine sahip olması açısından 2-NF giderimi için yapılacak çalışmalarda termal olarak aktive edilmiş karbonların kullanımı daha uygun bulunmaktadır.

Desorpsiyon verimleri karşılaştırılırken 25 °C'de pH 7 şartlarında PKDA karbonu ile 2-NF ve fenolün desorpsiyon verimleri yaklaşık olarak birbirine yakındır. PKDA'da fenolün desorpsiyon verimi % 10,36 iken 2-NF'nin desorpsiyon verimi % 7,6'dır. CAgran'da ise fenol için desorpsiyon verimi % 26,45 iken 2-NF için desorpsiyon verimi % 42,9'dur. Her iki bileşik için de PKDA'nın desorpsiyonu CAgran'dan daha az oranda gerçekleşmektedir. Bunun sebebi termal olarak aktive edilmiş karbonların yüksek oranda tersinir olmayan adsorpsiyona ve düşük biyorejenerasyona sahip olmasıdır. Termal aktivasyon oksijen olmadan gerçekleştirildiği için reaktif bir yüzeye yol açar ve kimyasal adsorplanma gerçekleşerek tersinir olmayan kuvvetli bağlar oluşur. Kimyasal aktivasyonda ise aktif karbon tamamen oksitlenmiş aktif bölgeleri olan bir yüzeye sahip olduğundan oksijen ile etkileşimi yüzeyi etkilememektedir ve fiziksel adsorpsiyon gerçekleşerek daha fazla tersinir olan zayıf bağlar oluşur (Aktaş, 2006) (Bölüm 2.1.4.).

50 °C'de pH 7 şartlarında biyorejenerasyon verimleri karşılaştırıldığında fenolün biyorejenerasyon verimi CAgran'da % 46,01 iken PKDA 'da % 30,19'dur ve 2-NF'nin biyorejenerasyon verimi PKDA'da % 86,17 iken CAgran'da % 66,18'dir. Biyorejenerasyon fenol için CAgran'da daha yüksek oranda gerçekleşmişken 2-NF için PKDA'da daha fazla gerçekleşmiştir. Bunun sebebi fenollerin oksijene duyarlı termal aktif karbonların yüzeyinde oksidatif polimerizasyona katılması ve 2-NF'ün oksidatif polimerizasyon reaksiyonlarına katılmıyor olmasıdır. Nitrofenoller haricindeki fenolik bileşiklerin oksidatif bağlanması, adsorpsiyonun tersinirliğini azalttığı bilinmektedir (Vici vd. 1993). Böylece 2-NF'ler termal olarak aktifleştirilmiş karbonun yüzeyinden daha fazla biyorejenere olabilmektedirler.

Bununla birlikte, termal olarak aktifleştirilmiş karbonların biyorejenerasyon verimleri, enzimatik biyorejenerasyon nedeniyle toplam desorpsiyondan yüksek olabilmektedir (Aktaş, 2006) (Bölüm 2.1.4.).

Fenol gibi tek halkalı fenolik bileşiklerde (2-klorofenol, 2-nitrofenol) termal aktif karbonlarda adsorpsiyon miktarı yüksek olmaktadır (Aktaş,2006). Termal olarak aktive edilmiş karbonlarda kimyasal adsorpsiyon mekanizması baskın olduğundan fenol için oluşturduğu kovalent bağlardan dolayı desorpsiyon miktarı düşük olmaktadır (Aktaş, 2006). Bu sebeple fenol için CAgran'da desorpsiyon ve biyorejenerasyon verimleri daha yüksek olmaktadır. Fenol için bunu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (Bölüm 4.1.4.). Desorpsiyon verimlerine bakıldığında 2-NF ve BPA için de PKDA karbonunun daha az desorbe olduğu görülerek fenol sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir (Bölüm 4.1.2 - 4.2.2.). Fakat BPA için yapılan çalışmalarda da, 2-NF'e benzer olarak, PKDA için biyorejenerasyon verimi CAgran'dan daha yüksek olmaktadır. BPA için bu farklılığın sebebi bisfenol-A molekülünün diğerlerine göre daha büyük olması ve CAgranın da PKDA'ya göre mikropordan çok mezopor ağırlıklı olmasıdır. Böylelikle CAgran'da daha fazla adsorpsiyon oluşmaktadır (Aktaş ve Çeçen, 2006) (Bölüm 4.3.1.). Deney sonuçlarında PKDA'da CAgran'a göre yüksek biyorejenerasyon verimleri elde edilmesinin sebebi enzimsiz ortamda PKDA'da CAgran'a göre daha az miktarda adsorpsiyonun gerçekleşmiş olmasıdır. Tek halkalı fenolik bileşiklere göre yapısında iki halka bulundurarak daha büyük yapıya sahip bir bileşik olması PKDA için adsorpsiyonu zorlaştırmaktadır. AK'a immobilize olan enzimlerin bulunduğu bir ortamda ise degrede olarak daha küçük moleküler yapıya sahip bileşiklere ayrılan ve oksidatif polimerizasyona katılan BPA, PKDA'da CAgran'la hemen hemen aynı miktarda adsorbe olmaktadır. Böylece ön adsorpsiyon miktarlarıyla karşılaştırıldığında PKDA için daha yüksek biyorejenerasyon verimi elde edilmiştir (Bölüm 4.3.4.).

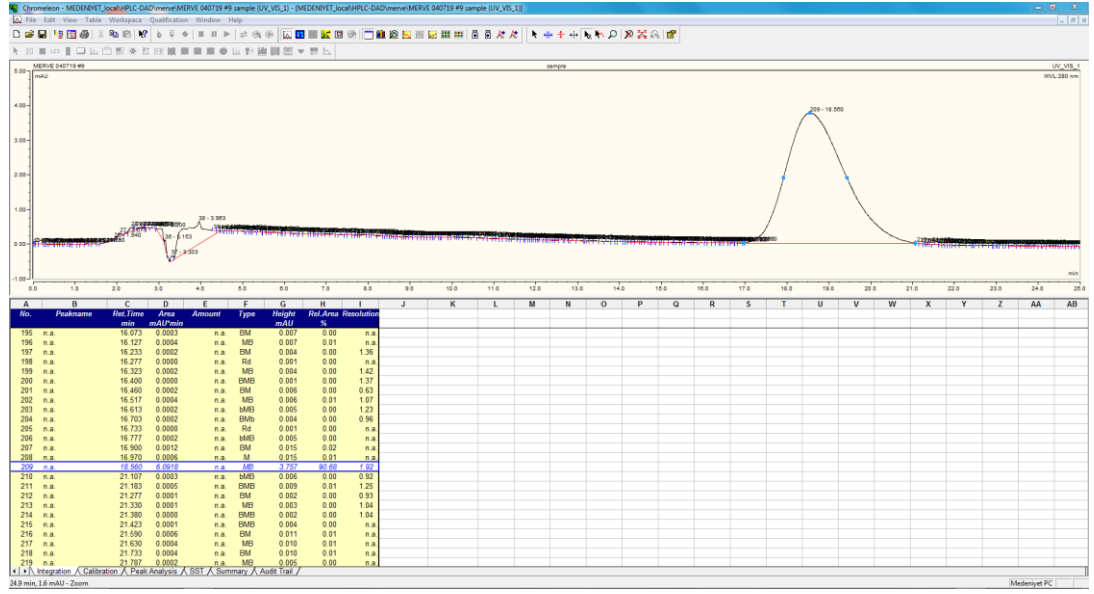
4.2.5. HPLC'de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılan ölçümlerde biyodegradasyon numunelerinde 4-AAP metodunun aksine 2-NF giderimi tespit edilmiştir. Elde edilen

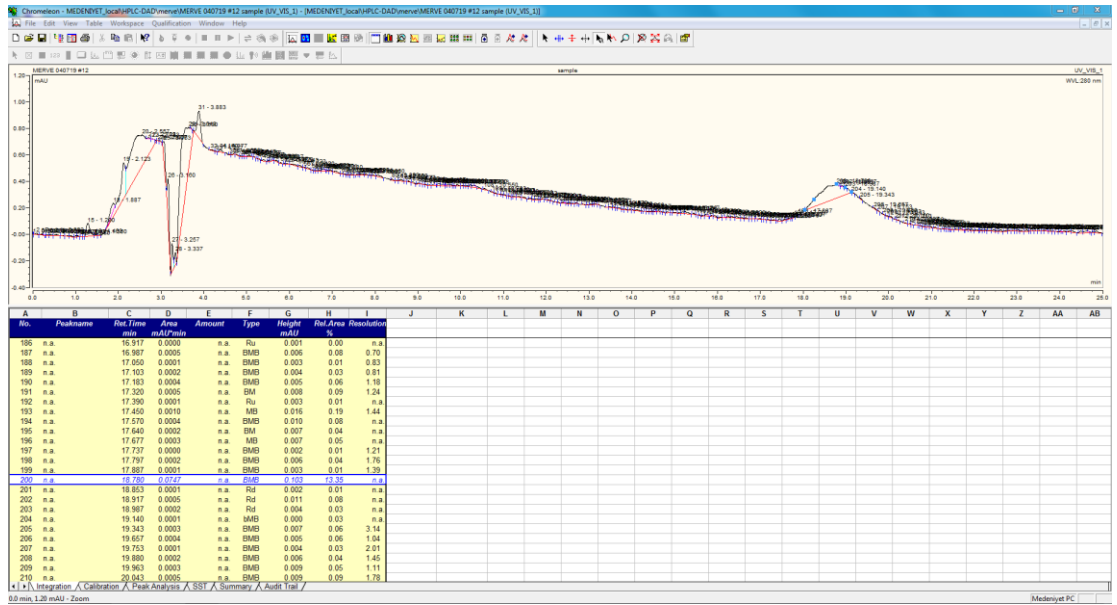
pik görüntülerinde 19. Dakika ve civarında ara ürün oluşumunu gösterebilecek belirgin bir pike rastlanmamaktadır. Görüntülerde 5. dakikaya kadar oluşan dalgalanmaların çözücü olan metanol veya daha küçük moleküler yapıları yan ürünler olabileceği düşünülmektedir(Şekil 35–36). Numuneler 50 kat seyreltilerek ölçülmüştür. Degredasyon sırasında belli saat aralıklarında alınan numunelerde HPLC ve 4-AAP metoduyla elde edilen değerler farklı olmuştur (Tablo 19.). Bu durum 2-NF'nin degradasyonunda HPLC metoduyla tayin edilemeyen ama 4-AAP ile renk veren fenolik bir yan ürünün birikmiş olabileceğini göstermektedir ve daha önce 4-AAP ile 2-NF giderimini tespit edemememize neden olmaktadır.

Tablo 19. Lakkaz enzimiyle (1 U/mL) 2-nitrofenolün enzimatik biyodegradasyon numunelerinin HPLC' de ölçülmesi

				HPLC ile ölçülen	4-AAP ile ölçülen
ph	alınan numune	dakika	alan	mg/L	mg/L
	Stok				527
ph7	3 saat	19.017	6,5335	355,16	537,87
ph7	10 saat	18.813	5,6182	305,41	479,79
ph7	24 saat	18.570	6,058	329,31	482,32
	Stok				348
ph5	1 saat	18.560	6,0918	331,15	290,4
ph5	3 saat	18.967	1,654	89,91	315,65
ph5	10 saat	18.857	3,0517	165,89	300,5
ph5	24 saat	18.780	0,0747	4,06	305,55
	Stok				166
ph7	3 saat	18.537	1,8187	98,86	161,61
ph7	6 saat	18.423	0,107	5,82	161,61
ph7	24 saat	18.987	0,0496	2,70	68,18



Şekil 35. Lakkazın 2-NF'yi biyodegradasyonu için ph5 şartlarında yapılan deneyde 1 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC'de ölçülmesi



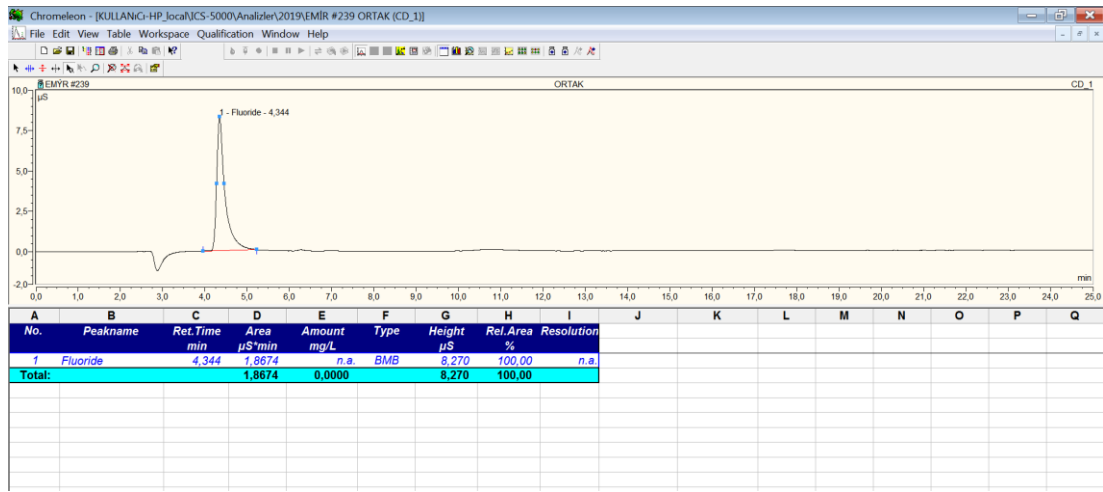
Şekil 36. Lakkazın 2-NF'yi biyodegradasyonu için ph5 şartlarında yapılan deneyde 24 saatlik giderimin tespiti için alınan numunenin HPLC'de ölçülmesi

4.2.6. İyon Kromatografi'de Yapılan Ölçümlerin Değerlendirilmesi

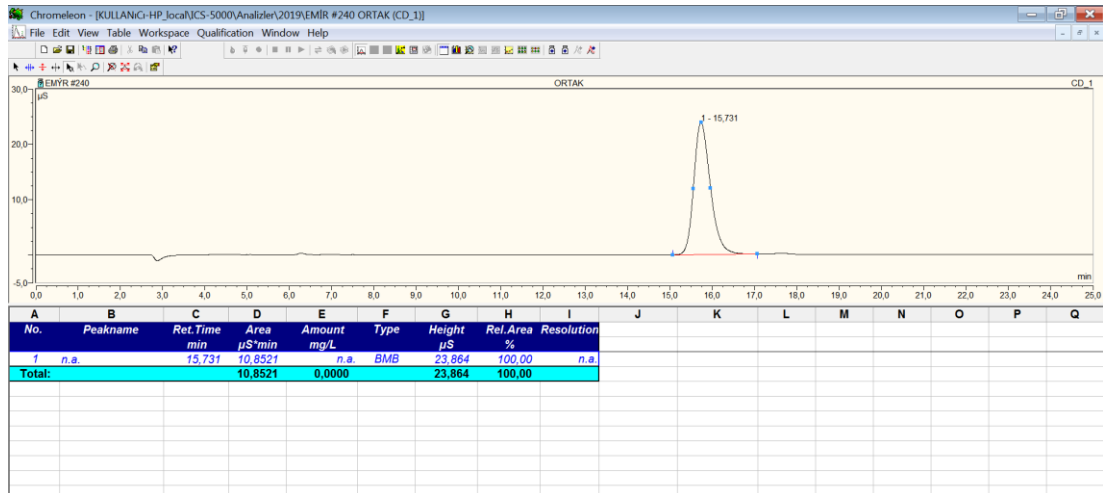
Analiz sonuçlarına göre, 2- nitrofenol ile yapılan biyodegradasyon çalışmasındaki saatlik analizlerde nitrit ve nitrat oluşmadığı görülmektedir. Biyorejenerasyon

deneyinde AK'lu adsorpsiyon, biyorejenerasyon ve post-adsorpsiyon numuneleri ölçüldüğünde ise bir miktar klorür ve sülfat olduğu görülmektedir.

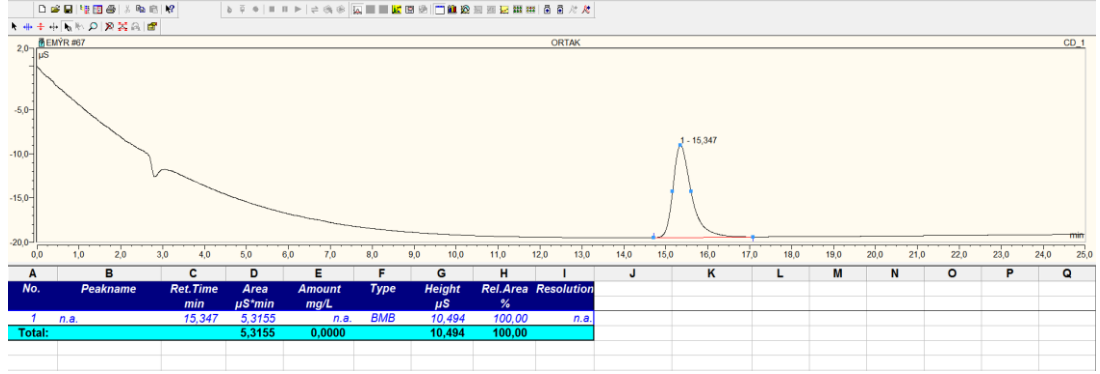
2-NF için stok çözeltilerden yapılan ölçümlerde pH 7 şartlarında 15,3. dakikada ve pH 5 şartlarında 4,3. dakikada pikler elde edilmiştir (Şekil 37 - 38). Bu piklerin ph 7 için kullanılan fosfat tampon çözeltisinden ve ph 5 için kullanılan sodyum asetat tampon çözeltisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Numunelerde de aynı dakikalarda pikler elde edilmiştir (Şekil 39-40-41).



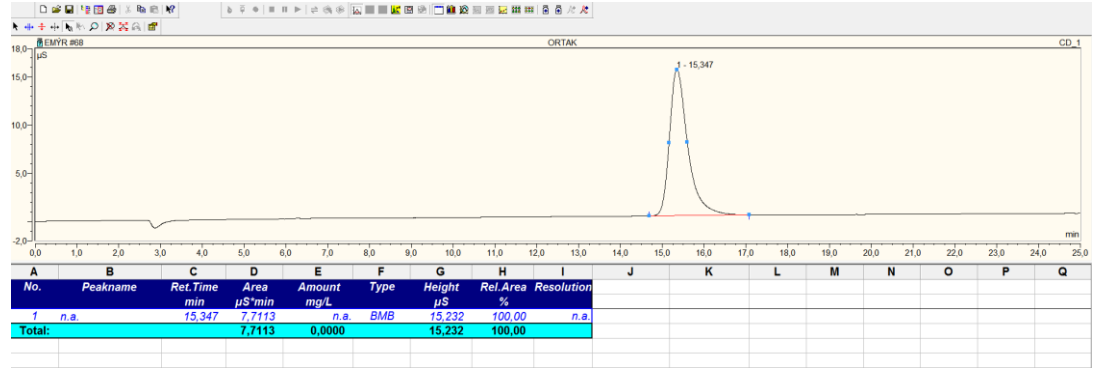
Şekil 37. pH5'te 2-NF'nin stok ölçümü 200 mg/L



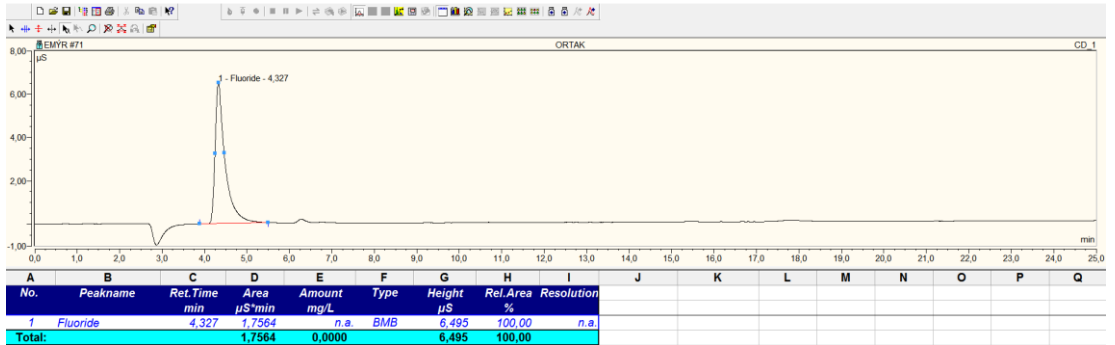
Şekil 38. pH7 2-NF'nin stok ölçümü 160 mg/L



Şekil 39. Lakkazın 2-nitrofenölü biyodegradasyonu için ph7 şartlarında yapılan deneyde 3 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromotografi’de ölçülmesi



Şekil 40. Lakkazın 2-nitrofenölü biyodegradasyonu için ph7 şartlarında yapılan deneyde 10 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromotografi’de ölçülmesi

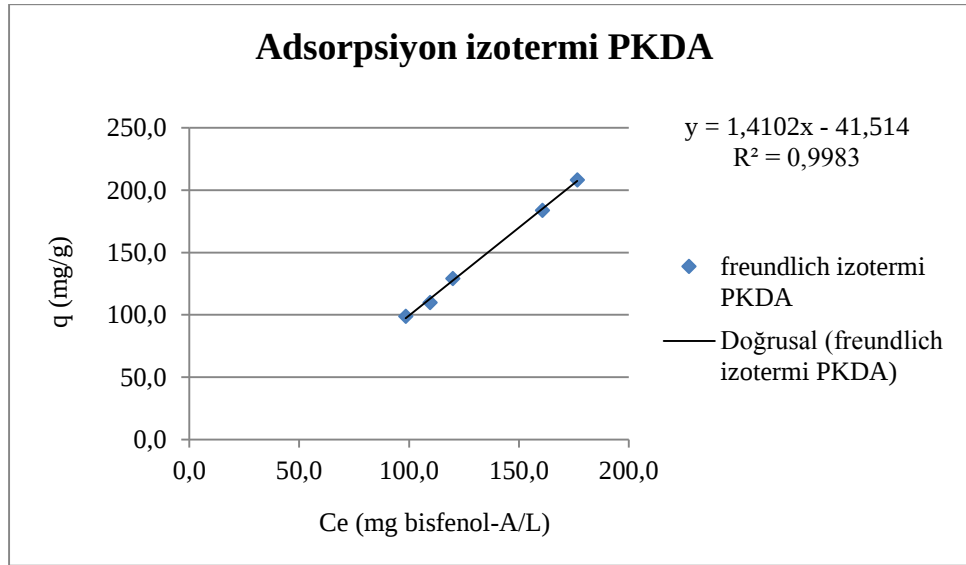


Şekil 41. Lakkazın 2-nitrofenölü biyodegradasyonu için ph5 şartlarında yapılan deneyde 3 saatlik giderimden sonra alınan numunenin İyon Kromotografi’de ölçülmesi

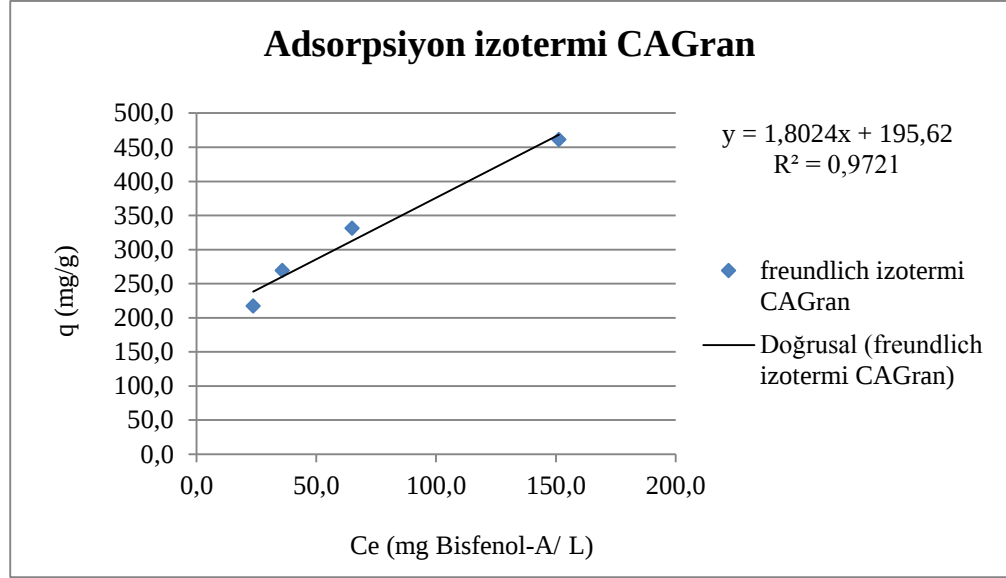
4.3. BİSFENOL-A İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.3.1. Aktif Karbon ile Bisfenol-A Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon çalışmaları termal olarak aktive edilmiş PKDA (Norit) ve kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran (Norit) aktif karbonlarıyla 200 mg/L bisfenol-A'nın su içinde çözülmesi sonrasında 0,1-1 g/L dozlarında aktif karbonla 25°C'de 150 RPM'de sıcaklık ayarlı çalkalayıcıda 3 gün temas ettirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen adsorpsiyon izotermi Şekil 42 ve 43'te verilmiştir. Adsorpsiyon çalışmalarında PKDA aktif karbonunun bazik özellikler nedeniyle pH değeri 8 civarına çıkarken, fosforik asitle aktive edilmiş olan CAgran'da ise asidik fonksiyonel yüzey grupları nedeniyle pH 5-5,5 arasına düşmüştür.



Şekil 42. PKDA için BPA adsorpsiyonu



Şekil 43. CAGran için BPA adsorpsiyonu

Adsorpsiyon aşağıdaki Freundlich eşitliği kullanılarak ifade edilmiştir:

$$q = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (\text{Eş. 12})$$

q: adsorplanan miktar (mg bisfenol-A/g aktif karbon)

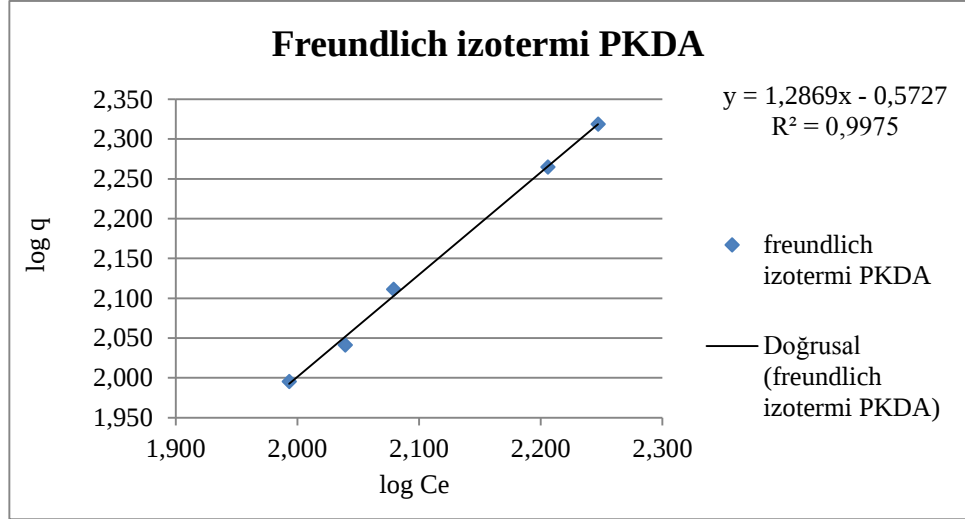
C_e: Denge konsantrasyonu (mg bisfenol-A/L)

K_f ve 1/n: Freundlich sabitleri (adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon yoğunluğu)

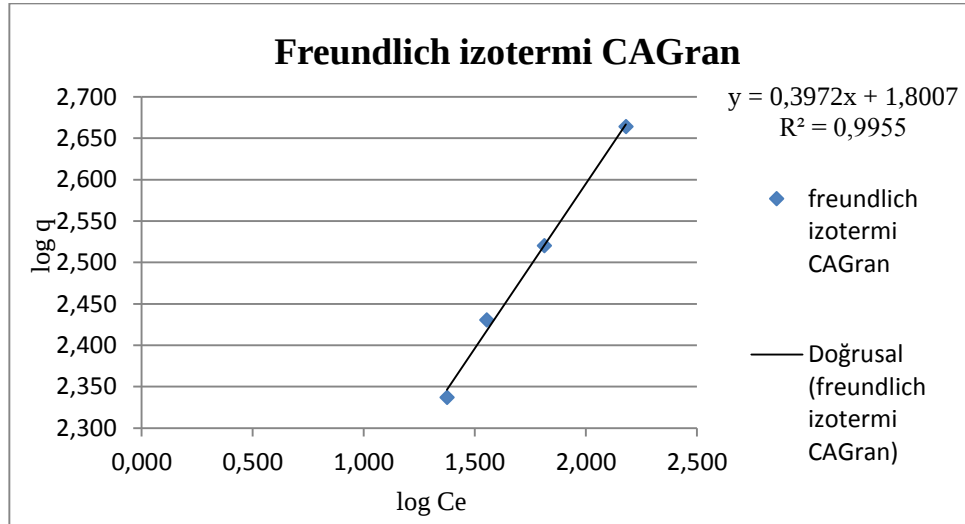
Freundlich eşitliğinin her iki tarafının logaritması alındığında aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\text{Log } q = \text{Log } K_f + 1/n \text{ Log } C_e \quad (\text{Eş. 13})$$

Log C_e'ye karşılık Log q grafiği çizilerek lineer regresyonun eğimi ve y eksenini kestiği noktadan Freundlich izoterm sabitleri K_f ve 1/n hesaplanmıştır. Şekil 44 ve 45'de Freundlich izoterm eğrileri görülmektedir. Her iki aktif karbon çeşidinde de bisfenol-A adsorpsiyonu Freundlich izotermine oldukça yüksek korelasyonla ($R^2 > 0,995$) uygun olarak gerçekleşmektedir.



Şekil 44. PKDA için Freundlich adsorpsiyon izotermi



Şekil 45. CAGran için Freundlich adsorpsiyon izotermi

Elde edilen Freundlich izoterm katsayıları Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20. Bisfenol-A adsorpsiyonu için Freundlich izoterm katsayıları

	K_f	$1/n$
PKDA	0,2675	1,2869
CAGran	63,1975	0,3972

K_f değerin yüksek olması adsorbanın yüksek adsorpsiyon kapasitesine işaret etmektedir. $1/n$ katsayısının 1'den büyük olması aktif karbon yüzeyinde çok tabakalı adsorpsiyon gerçekleştiğini göstermektedir. $1/n$, sıfıra ne kadar yakın bir değer olursa yüzey o kadar heterojen bir yapıya sahiptir. $1/n$ katsayısının 1'den küçük olması kimyasal adsorpsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Kimyasal adsorpsiyon, aktif karbonun yüzeyindeki spesifik fonksiyonel gruplarının adsorbana yüksek enerjili kovalent bağlanmalarının yanı sıra oksijen varlığında organik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonunun bir sonucudur (Vergili ve Gencdal, 2017).

Adsorpsiyon kapasitesini gösteren K_f değerin CAgran aktif karbonunda PKDA aktif karbonuna göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalarda tek benzen halkalı fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunda (fenol, 2-klorofenol ve 2-nitrofenol) PKDA aktif karbonunun CAgrana göre daha yüksek K_f değerleri ve buna bağlı olarak daha yüksek adsorpsiyon kapasiteleri olduğu tespit edilmiştir (Aktaş, 2006). Bu farkın en önemli sebebi bisfenol-A molekülünün diğerlerine göre daha büyük olması ve CAgranın da PKDA'ya göre mikropordan çok mezopor ağırlıklı olması olarak görülebilir (Aktaş ve Çeçen, 2006). Ürünün katalog bilgilerinde daha ziyade büyük moleküllerin adsorpsiyonu için üretilmiş bir ürün olduğuna vurgu yapılmaktadır (Cabot Europe). CAgran için $1/n$ katsayısının 1'den küçük olması ağırlıklı olarak kimyasal adsorpsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Adsorpsiyon izoterminin çok katmanlı adsorpsiyona uygun olan Freundlich izotermi yanı sıra tek katmanlı (monolayer) adsorpsiyonu gösteren Langmuir izotermine uygunluğu da incelenmiştir. Langmuir izoterm eşitliği aşağıdaki gibidir:

$$q_e = \frac{Q^0 \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (\text{Eş. 14})$$

K_L = Adsorbanın adsorptivitesine bağlı olan bir sabit (L/mg).

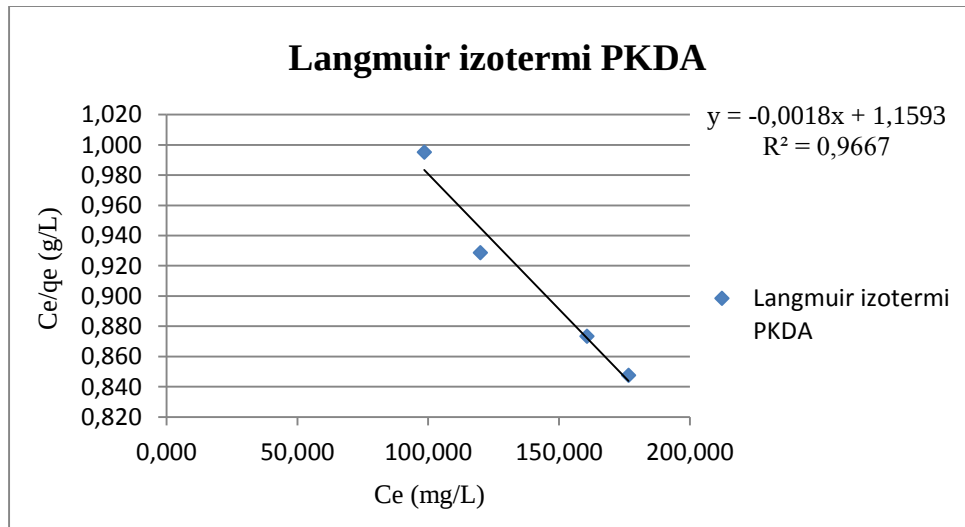
Q^0 = Yüzeyde tam bir tek tabaka oluşturmak için, adsorbanın birim ağırlığı başına adsorplanan bileşen miktarı (mg/g)

Bu eşitliğin doğrusallaştırılmasıyla Langmuir Tip 1 modeli ifade edilir:

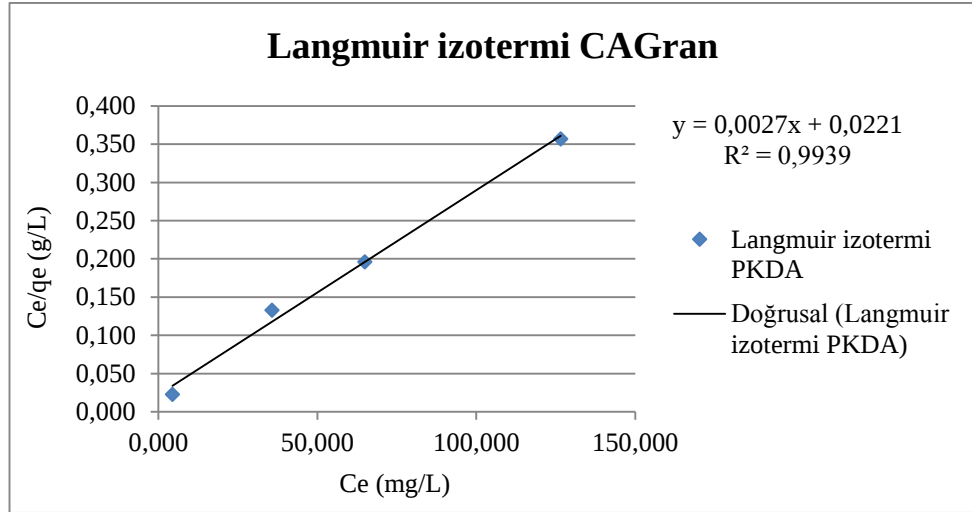
$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{Q^0} + \frac{1}{K_L Q^0} \quad (\text{Eş. 15})$$

Elde edilen eşitlik aracılığıyla C_e/q_e değerlerine karşılık C_e grafiği çizilerek Langmuir Tip 1 izotermi elde edilmiştir (Şekil 46 ve 47). PKDA nispeten düşük ve negatif korelasyonla Langmuir izotermi takip etmektedir. Ancak CAgran yüksek korelasyonla ($R^2=0,9938$) tek katmanlı Langmuir tipi adsorpsiyonuna uygun olarak bisfenol-A'yı adsorbe etmektedir. Grafiğin y eksenini kesim noktası $1/K_L Q^0$, eğimi $1/Q^0$ ı vermektedir. Adsorpsiyonun elverişliliğini bulmak için boyutsuz R_L sabiti hesaplanır ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması adsorpsiyona elverişliliği gösterir. 1'in üstü bileşiğin adsorpsiyona uygun olmadığını gösterir. R_L değerinin 0'a yakınlığı adsorpsiyonun tersinirliğinin düşük olduğunu, 1'e yakın olması ise yüksek oranda tersinir olduğunu gösterir (Aktaş, 2006). Langmuir izoterminden hesaplanan katsayılar Tablo 21'de verilmiştir.

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (\text{Eş. 16})$$



Şekil 46. PKDA için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 47. CAGran için Langmuir adsorpsiyon izotermi

Tablo 21. Bisfenol-A adsorpsiyonu için Langmuir izoterm katsayıları ve hesaplanan R_L değerleri

	K_L	Q^0	R_L
PKDA	-0,0017	-500	~0
CAGran	0,023	588,2	0,18

Tablo 21’de PKDA için hesaplanan Langmuir katsayıları için elde edilen negatif değerler ve Şekil 46’da görüldüğü gibi korelasyonun negatif olması PKDA’nın tek katmanlı Langmuir tip 1 adsorpsiyonuna uygun olmadığını göstermektedir. Ancak yüksek korelasyon değerleri CAGranın tek katmanlı adsorpsiyona uygun hareket ettiğini göstermektedir. CAGran için elde edilen R_L değerinin 1’den oldukça düşük olması, adsorpsiyonun büyük oranda tersinir olmadığını göstermektedir. Bu da bisfenol-A adsorpsiyonunun fizikselenden ziyade büyük oranda kimyasal adsorpsiyonla gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Her 2 aktif karbon tipi için 1 g/L aktif karbon ve 200 mg/L bisfenol-A başlangıç konsantrasyonunda ve 3 gün adsorpsiyon sonundaki bisfenol-A konsantrasyonları arasındaki farktan Eşitlik 1’e göre her durum için adsorpsiyon kapasiteleri Tablo 22’deki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 22. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının bisfenol-A adsorpsiyon kapasiteleri

Adsorpsiyon kapasitesi	
Q_{ads} (mg/g)	
PKDA	98,94
CAgran	193,00

Termal olarak aktive edilmiş PKDA'nın adsorpsiyon kapasitesi CAgran'a göre çok daha düşüktür. Bu bulgu Freundlich adsorpsiyon izoterm katsayılarının hesaplanması sonucunda yapılan yorumları desteklemektedir. Bu bulgular aktif karbonun aktivasyon yönteminin de adsorpsiyon kapasitesini belirleyen unsurlardan biri olduğunu göstermektedir.

4.3.2. Aktif Karbon ile Bisfenol-A'nın Desorpsiyonu

Bisfenol-A için hesaplanan kümülatif desorpsiyon kapasiteleri (mg bisfenol-A /g AK) her iki aktif karbon tipi için Şekil 48 ve 49'da verilmiştir. PKDA için üst suyun 10 kez değiştirilmesi sonucunda 10 günlük bir desorpsiyon süresi yeterli olurken CAgran için bisfenol-A'nın desorpsiyonu 74 gün (basamak) boyunca devam etmiştir. Bu da CAgrana adsorbe olmuş bisfenol-A'nın kolaylıkla ve hızlı bir şekilde desorbe olmadığını göstermektedir. Ancak Tablo 23'te, kimyasal olarak aktive edilmiş CAgranın desorpsiyon kapasitesi ve desorpsiyon oranı termal olarak aktive edilmiş PKDA'ya göre çok daha yüksek olmuştur. Bu durum önceki çalışmalarımızda da başka fenolik bileşikler için görülmüştür (Aktaş, 2006). Desorpsiyon çalışmaları süresince pH değeri her 2 aktif karbon tipi için de 6 civarında ölçülmüştür. Desorpsiyon verimleri Eşitlik 9' a göre hesaplanmıştır (Bölüm 3.3.).

CAgran aktif karbonunun PKDA'ya göre önceki bölümde görüldüğü gibi adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 2 kat fazla iken, desorpsiyon kapasitesi neredeyse 10 kat, adsorbe olmuş miktara göre de desorpsiyon yüzdesi yaklaşık 5 kat fazla gerçekleşmiştir. Bu da adsorpsiyonda olduğu gibi abiyotik desorpsiyonda da aktif karbonun aktivasyon

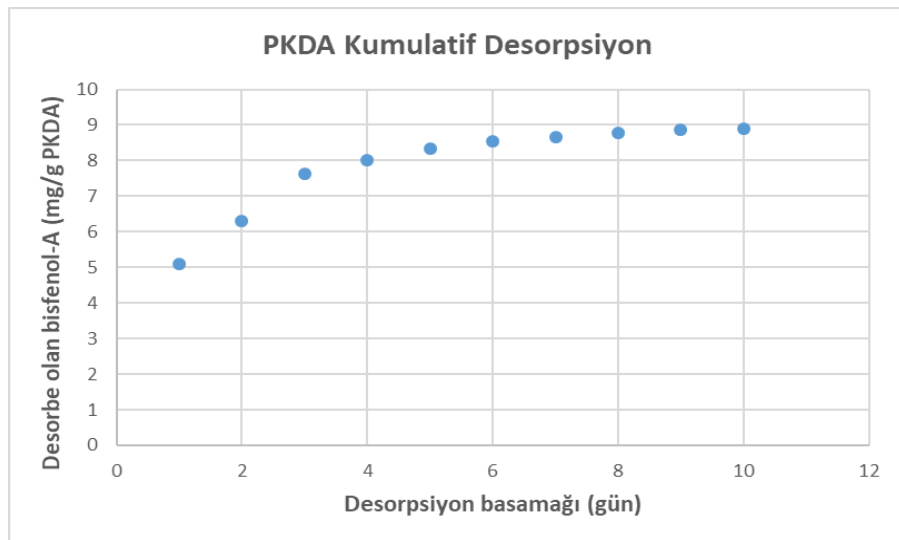
yönteminin çok belirleyici olduğunu, hatta adsorpsiyona göre çok daha etkili olduğunu göstermektedir.

CAgran'da toplam desorpsiyon miktarının daha fazla olmasının sebebi fiziksel adsorpsiyon mekanizmasının baskın olmasıdır (Aktaş ve Çeçen, 2006a). Aktivasyon şeklinin farklı olduğu AK'larda değişen baskın adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.2'de ve adsorpsiyon mekanizmaları Bölüm 2.1.4.'te ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

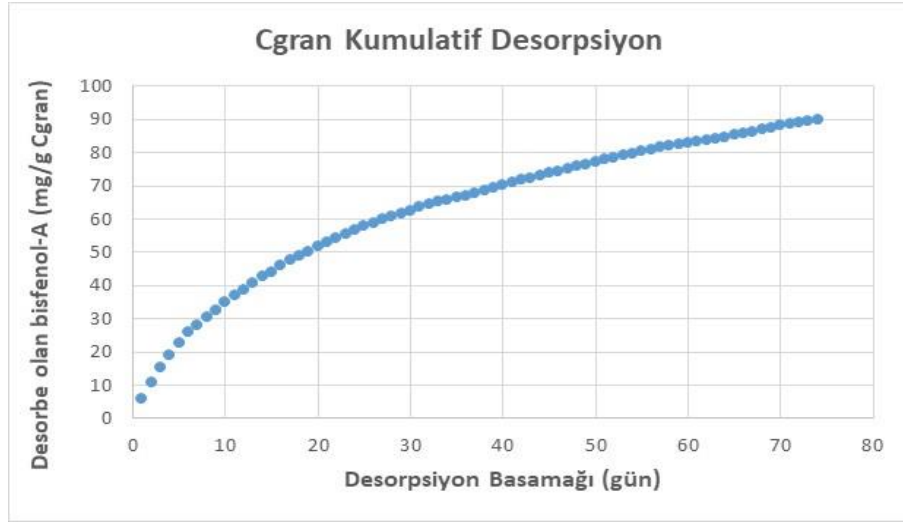
Tablo 23. PKDA ve CAgran aktif karbonlarının bisfenol-A desorpsiyon kapasiteleri ve yüzdeleri

	Desorpsiyon kapasitesi q_{des} (mg/g)	Desorpsiyon verimi (%)
PKDA	8,91	9,0
CAgran	89.85	46,6

Elde edilen desorpsiyon verimleri aktif karbonun uzun süreli kullanımı için yeterli olmayıp, abiyotik şartlarda desorpsiyonun aktif karbonun rejenerasyonu için doğru yöntem olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır. Hesaplanan abiyotik desorpsiyon verimleri Bölüm 4.3.4.'te enzimatik biyorejenerasyon verimleri ile karşılaştırılmıştır.

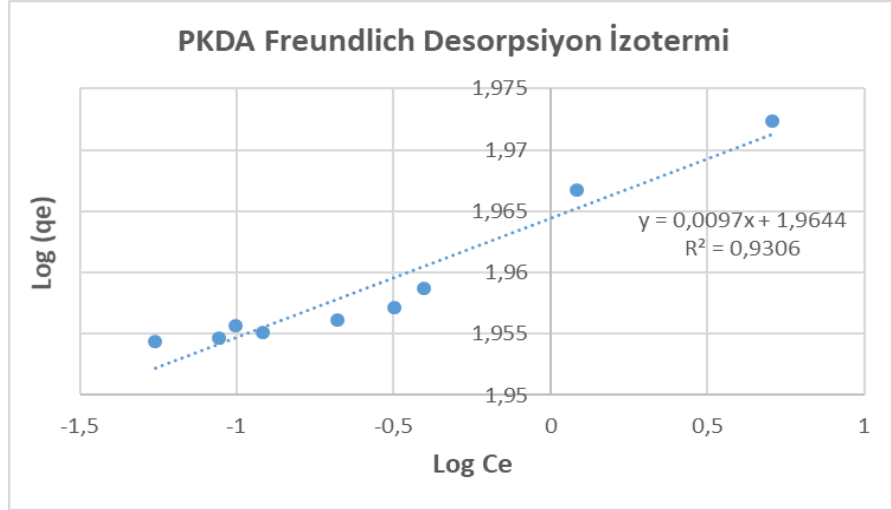


Şekil 48. Bisfenol-A'nın distile suyla PKDA'dan kümülatif desorpsiyonu

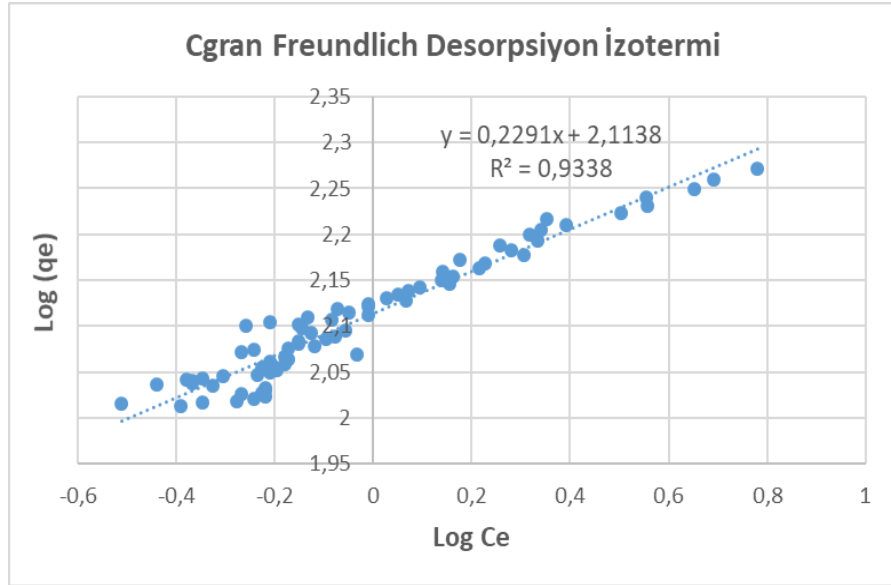


Şekil 49. Bisfenol-A'nın distile suyla CAgran'dan kümülatif desorpsiyonu

Freundlich ve Langmuir tip izoterm modelleri desorpsiyon verilerine de uygulanmıştır. Freundlich izotermine ait grafikler Şekil 50 ve 51'de verilmiştir. Her iki aktif karbon için de Freundlich eşitliğine uygun desorpsiyon izotermi elde edilmiştir. Desorpsiyon izotermine oluşturulmasında her bir desorpsiyon basamağı sonundaki sıvı fazda dengedeki bisfenol-A konsantrasyonu C_e (mg/L), aktif karbondaki adsorbe halde kalan dengedeki bisfenol-A yükü ise q_e (mg bisfenol-A/g aktif karbon) olarak ifade edilerek izoterm çizilmiştir ve izoterm katsayıları adsorpsiyon çalışmalarında olduğu gibi belirlenmiştir (Aktaş, 2006). Desorpsiyon basamakları boyunca, aktif karbon üzerinde adsorbe halde kalan dengedeki bisfenol-A yükü (q_e), her aşamada desorbe olan bisfenol-A'nın desorpsiyon başlangıcındaki toplam bisfenol-A yükünden çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 50. PKDA için Freundlich desorpsiyon izotermi



Şekil 51. CAgran için Freundlich desorpsiyon izotermi

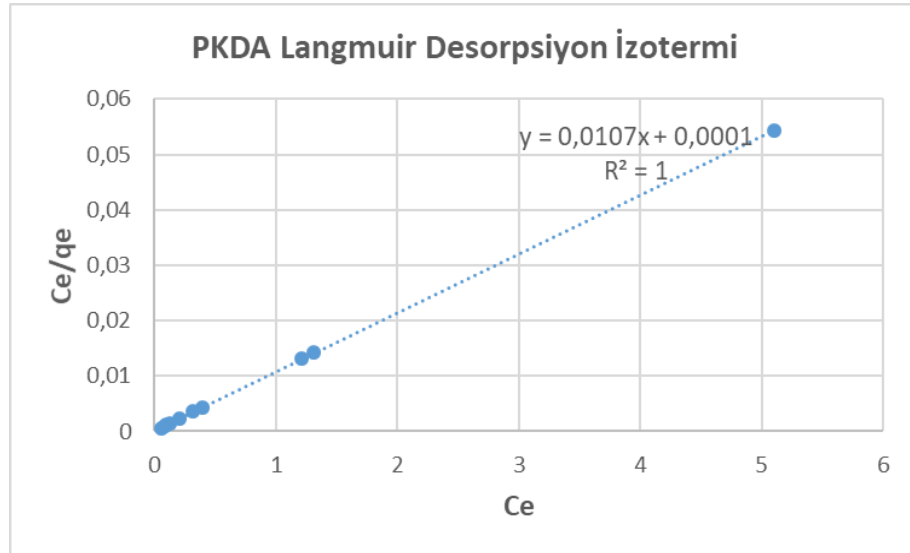
Elde edilen Freundlich izoterm katsayıları Tablo 24’te verilmiştir.

Tablo 24. Bisfenol-A desorpsiyonu için elde edilen Freundlich izoterm katsayıları

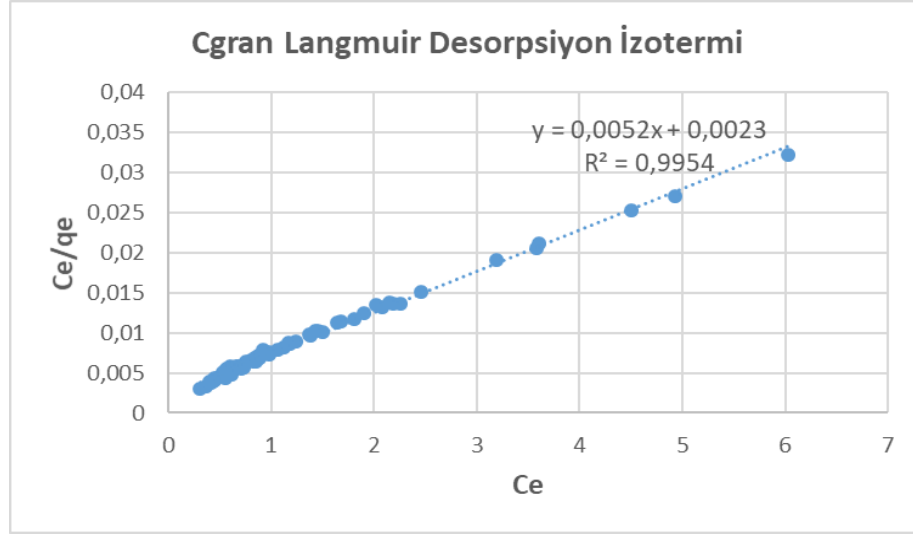
	K_f	$1/n_{des}$	$1/n_{ads}$
PKDA	92,13	0,0097	1,2869
CAgran	129,96	0,2291	0,3972

Freundlich izoterminde K_f desorpsiyon kapasitesiyle ilgili bir sabittir, $1/n_{des}$ ise adsorpsiyonun tersinirliğini göstermektedir. Desorpsiyon izoterminden elde edilen Freundlich $1/n_{des}$ katsayısının adsorpsiyon izotermi $1/n_{ads}$ katsayısından küçük olması desorpsiyonun yavaş veya adsorpsiyondan daha zor olduğunu göstermektedir (Ha ve Vinitnantharat, 2000). PKDA için bu farkın CAgran'a göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 26). Bu fark desorpsiyon verimlerinin PKDA için neden çok düşük olduğunun bir göstergesidir.

Desorpsiyon izotermi Langmuir eşitliğine göre de belirlenmiştir (Şekil 52 ve 53). Hesaplanan Q^0 ve K_L katsayı değerleri Tablo 25'de verilmiştir. Langmuir izotermi için Langmuir sabitlerinden Q_0 desorpsiyon kapasitesini, K_L ise desorpsiyon enerjisini göstermektedir. Langmuir izoterminden elde ettiğimiz katsayı Q^0 değerinin yüksek olması desorpsiyonun yavaş olduğunun göstergesidir. Çünkü, Q^0 değerinin yüksek olması desorpsiyondan sonra aktif karbon yüzeyinde hala yüksek miktarda adsorplanmış madde mevcut olduğu anlamına gelmektedir. K_L değerinin düşük olması da desorpsiyonun zor gerçekleştiğinin ifadesidir. Bu da CAgran'dan desorpsiyonun çok uzun süre içerisinde desorbe olmasını açıklamaktadır.



Şekil 52. PKDA için Langmuir desorpsiyon izotermi



Şekil 53. CAgran için Langmuir desorpsiyon izotermi

Tablo 25. Bisfenol-A desorpsiyonu için elde edilen Langmuir izoterm katsayıları

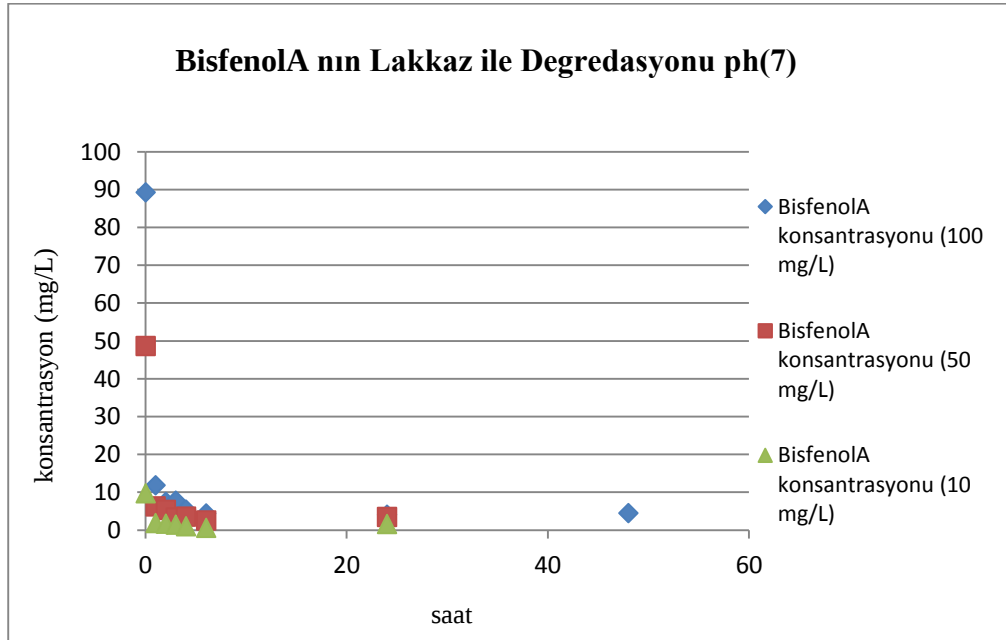
	K_L	Q^0
PKDA	107	93,46
CAgran	2,26	192,31

4.3.3. Lakkaz ile Bisfenol-A'nın Biyodegradasyonu

Bisfenol-A'nın enzimatik degradasyonu için saflaştırılmış serbest Lakkaz enziminin bisfenol-A oksitleme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı dozlarda enzimler, 25°C'de ve 50°C'de 2 farklı pH (5 ve 7) şartlarında bisfenol-A ile temas ettirilmiştir. Lakkaz enzimi elektron alıcı olarak oksijen kullanmaktadır.. Enzimatik degradasyon çalışmalarıyla enzimlerin bisfenol-A oksidasyon aktivitesinin yüksek olduğu şartlar (enzim dozu, pH ve sıcaklık) tespit edilmiştir.

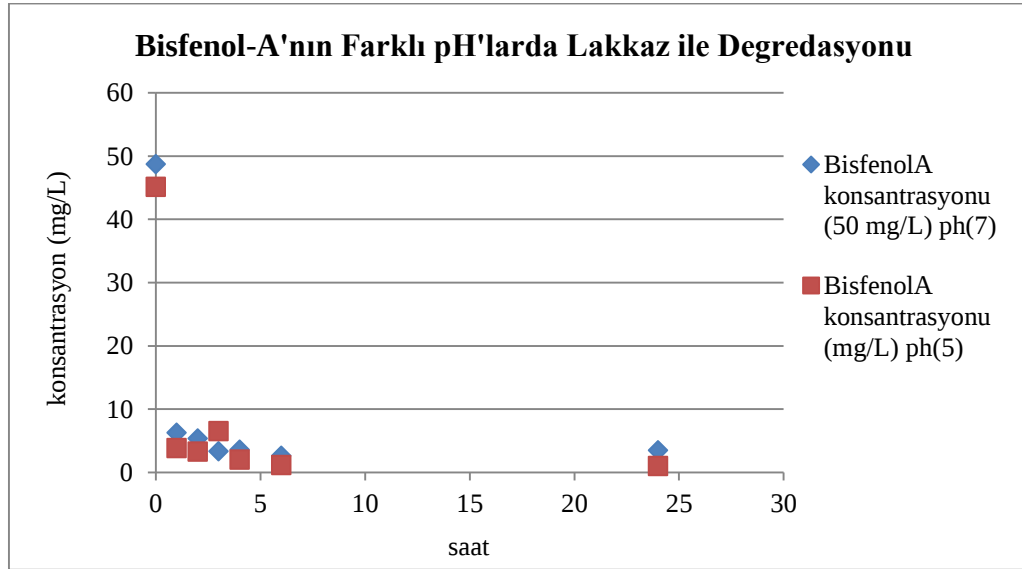
Lakkaz enzimi ile degradasyon çalışmalarımızda ilk olarak daha önce aktivitesi belirlenmiş olan toz halindeki lakkaz enzimi, konsantrasyonu 1 U/mL olacak şekilde tartılmıştır. Fosfat tampon çözeltisi içinde çözdürülen (pH 7,2) yaklaşık 10, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlardaki bisfenol-A ile 24 saat boyunca temas ettirilerek konsantrasyon değişimi gözlenmiştir (Şekil 54).

Lakkaz enzimi bisfenol-A oksitlenme reaksiyonunun büyük bölümünü ilk 1 saat içerisinde gerçekleştirmekte ve ilk 5-6 saat içerisinde su fazındaki bisfenol-A konsantrasyonu dengeye gelmektedir. Lakkaz, 100 mg/L konsantrasyondaki bisfenol-A'yı ilk 1 saatte % 90 oranında oksitleyebilmektedir. Giderim verimi 5-6 saat içerisinde % 95'e ulaşmıştır. Bu enzimatik degradasyon verimi fenolle biyodegradasyon çalışmasında elde edilen %93'lük giderime oldukça benzerdir (Bölüm 4.1.3.). Bu da lakkazın, mikroorganizmalar tarafından biyodegradasyonu fenole göre çok daha zor olduğu bilinen bisfenol-A'yı fenole benzer bir şekilde ve göreceli olarak yüksek bir hızla degrede edebildiğini göstermektedir. Bu nedenle lakkaz ile bisfenol-A degradasyonunun etkili bir yöntem olacağı anlaşılmaktadır. İlk 5-6 saatten sonra bisfenol-A konsantrasyonlarının sabit kaldığı görülmektedir. Bu da askıdaki lakkaz enziminin aktivitesinin 5-6 saati geçmediğini göstermektedir. Başlangıç bisfenol-A konsantrasyonunun 50 ve 100 mg/L olduğu durumlarda, enzimatik işlem sonunda, nihai bisfenol-A konsantrasyonu sırasıyla 3 ve 4 mg/L seviyesine düşmektedir. Başlangıç konsantrasyonu 10 mg/L iken, nihai konsantrasyon 1-2 mg/L arasında değişmektedir (Şekil 54).



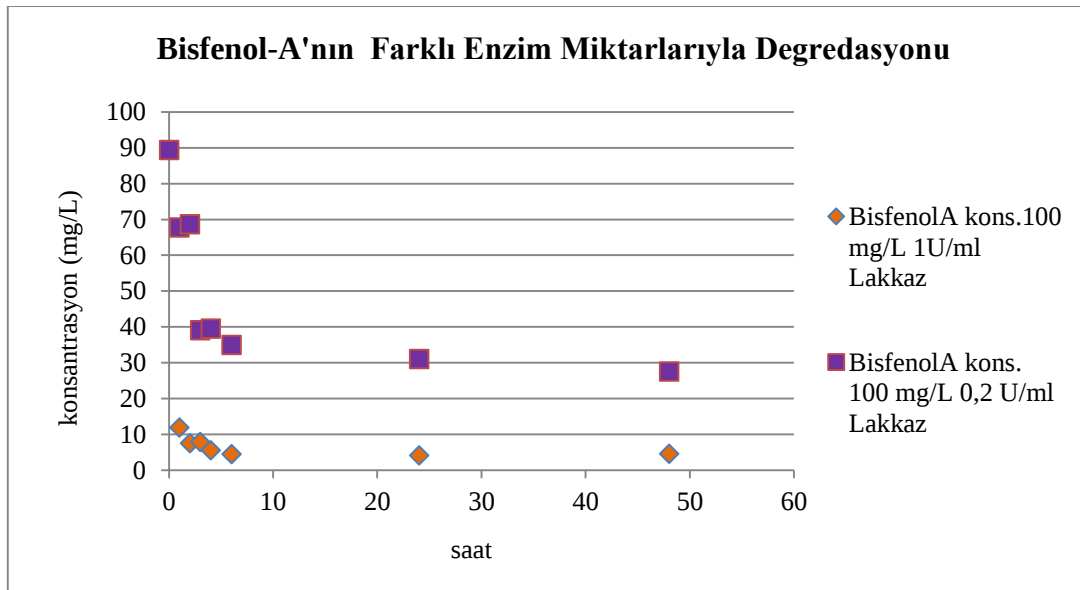
Şekil 54. 1 U/mL Lakkaz enzim aktivitesinde farklı BPA konsantrasyonlarında pH 7 ve 25°C şartlarında degradasyon

Enzimatik reaksiyonlarda pH da belirleyici olabilmektedir (Escalano vd., 2014). Bu nedenle fosfat tamponla 7 civarında tutulan pH ile yapılan çalışmaların yanı sıra ise sodyum asetat tamponu ile de yaklaşık 5 civarında tutulan pH değerlerinde de yine 1 U/mL Lakkaz enzim aktivitesinde ve 25°C sıcaklıkta, 50 mg/L başlangıç konsantrasyonunda BPA'nın degradasyonu çalışılmıştır (Şekil 55). pH'nın 7'den 5'e düşürülmesi BPA'nın degradasyonunda çok önemli bir farklılığa yol açmamaktadır. Ancak nihai BPA konsantrasyonu pH 7 şartlarında 3 mg/L civarında iken pH 5 şartlarında 1 mg/L'ye düşmektedir. Bu ilk bakışta çok önemli bir fark olarak görülmese bile, Bisfenol-A'nın öncelikli kirleticiler arasında olması ve çok düşük konsantrasyonlarının bile doğada endokrin bozucu etkilere neden olması nedeniyle, bu az fark çok önemli olabilmektedir. Lakkaz enziminin bakterilere göre daha düşük pH'larda enzim aktivitesi daha yüksek olan Funguslar tarafından daha çok üretilen bir enzim olması nedeniyle bu sonuç şaşırtıcı olmamıştır. Bu nedenle lakkaz ile giderim çalışmalarında mümkünse düşük pH 5 civarı uygulanması çıkış değerlerini bir miktar da olsa düşürecektir. Literatürdeki bir çalışmada da pH 6 değerinde daha yüksek BPA giderimi olduğu tespit edilmiştir (Escalona vd., 2014).



Şekil 55. 1 U/mL Lakkaz enzim aktivitesinde farklı pH koşullarında (5 ve 7) ve 25°C şartlarında BPA (50 mg/L) degradasyonu

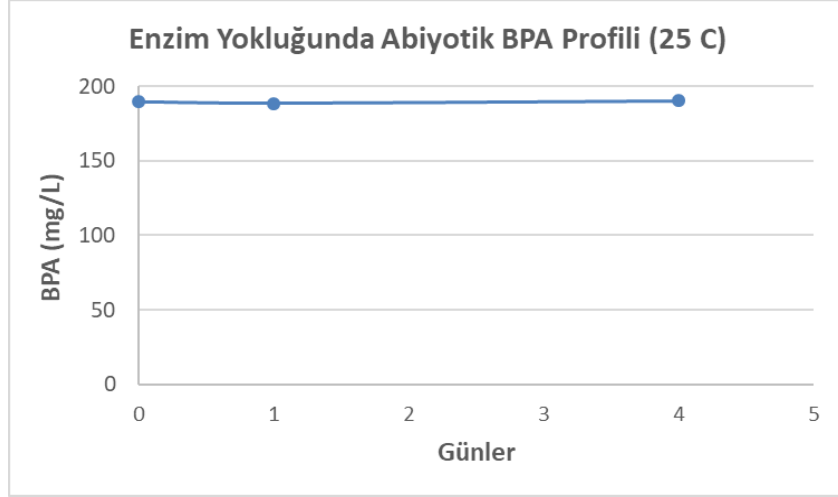
Hedef bileşik konsantrasyonunun karşılaştırılması (Şekil 54) ve pH koşullarının karşılaştırılması deneylerinde (Şekil 55) lakkaz enzimi 1 U/mL aktivite dozunda oldukça etkili bir BPA giderimi sağlamaktadır. Bu dozun üzerine çıkılması enzim maliyetini artırmasıyla birlikte önemli bir fayda sağlamayacaktır. Bu nedenle daha düşük enzim dozunun (0,2 U/mL) denenmesine karar verilmiştir. Şekil 56’da 2 farklı enzim dozunda lakkaz ile BPA giderimi gösterilmiştir. 1 U/mL lakkaz dozunda 4 mg/L civarında nihai BPA konsantrasyonu ile % 95 giderim görülürken, 0,2 U/mL lakkaz dozunda giderim verimi % 70’e düşmüş, nihai BPA konsantrasyonu ise 30 mg/L gibi oldukça yüksek seviyelerde kalmıştır. Ayrıca 1 U/mL enzim dozunda bisfenol-A degradasyonu daha hızlı gerçekleşmiştir. İlk 1 saatte, 1 U/mL lakkaz yaklaşık 100 mg/L BPA’nın %90’ını degrade ederken, 0,2 U/mL dozunda lakkaz sadece yaklaşık olarak %30’unu degrade edebilmiştir. Bu çalışmalar ile kullanılan enzim dozunun BPA gideriminde çok önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir.



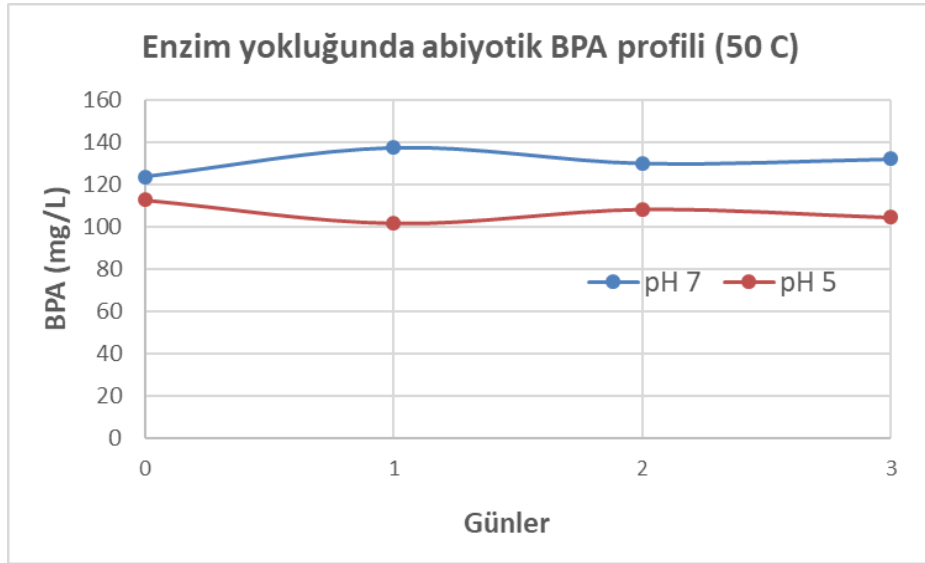
Şekil 56. Farklı Lakkaz enzim aktivitesi dozlarında (1 U/mL ve 0,2 U/mL) pH 7 ve 25°C şartlarında BPA (100 mg/L) degradasyonu

BPA gideriminin enzimatik reaksiyon dışında buharlaşma yoluyla da gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için 25 °C’de 200 mg/L BPA, enzim ilave edilmeden aynı şartlarda çalkalanmış ve zamana bağlı olarak BPA konsantrasyonu 4 gün süresince

takip edilmiştir (Şekil 57). 4 gün süresince BPA konsantrasyonunda bir azalma görülmemiştir.



Şekil 57. pH 7’de enzim yokluğunda abiyotik ortamda 25 °C’de BPA konsantrasyonu değişimi

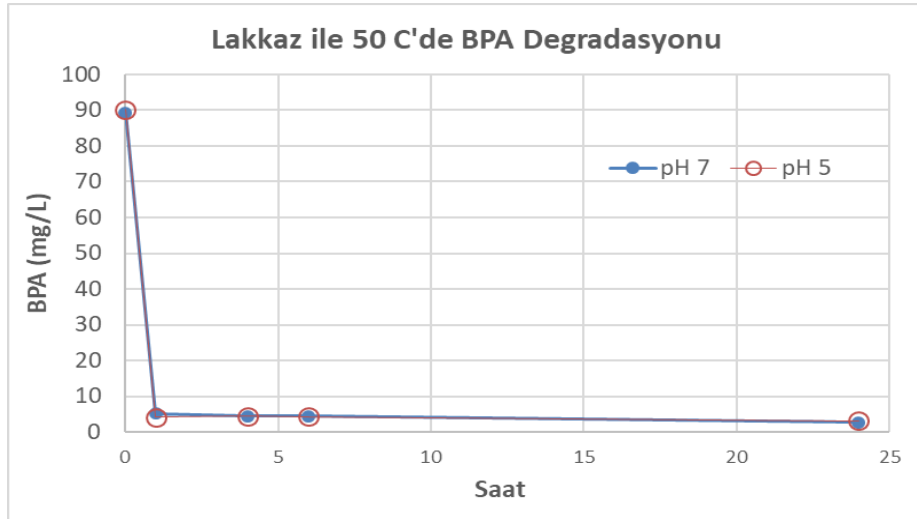


Şekil 58. Enzim yokluğunda abiyotik ortamda 50 °C’de BPA konsantrasyonu değişimi

Enzimatik biyorejenerasyon çalışmaları 50 °C’de de yapılacağı için, bu nispeten yüksek sıcaklıkta buharlaşma yoluyla BPA giderimi olup olmayacağını görmek amacıyla enzim yokluğunda 2 farklı pH şartında (pH 5 ve 7) 120 mg/L BPA başlangıç konsantrasyonunda değişim 3 gün boyunca izlenmiştir (Şekil 58). 50 °C’de de BPA konsantrasyonunda bir azalma görülmemiştir. Bu çalışmalar göstermiştir ki BPA 25

ve 50 °C ile pH 5 ve 7 ortam şartlarında buharlaşma veya cam yüzeyine adsorpsiyon gibi, enzimatik reaksiyon haricinde başka bir mekanizmayla, ölçülebilir derecede giderilmemektedir. Bu nedenle, enzim aktivitesi, yapmış olduğumuz enzimatik degradasyon çalışmalarında etkin olan tek BPA giderim mekanizması olarak tespit edilmiştir.

Sıcaklığın lakkaz enziminin aktivitesine olan etkisini tespit edebilmek amacıyla 50°C’de de enzimatik degradasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. BPA’nın 1U/mL lakkaz enzimi ile 50°C’de ve fosfat tamponu ile sağlanan pH 7 değeri ve asetat tamponu ile sağlanan pH 5 şartlarında konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 58’de verilmiştir. 50°C’de de, 25 °C’de olduğu gibi BPA oksidasyonu ilk 1 saatte gerçekleşmiştir. Ancak 25 °C’de BPA giderim verimi % 90 civarında olup, takip eden birkaç saatte de ilaveten % 5’lik bir giderim meydana gelmişken, 50°C’de bu oran ilk bir saatte %95 civarına ulaşmış ve takip eden saatlerde daha fazla giderim olmamıştır. Bu da 50 °C’de lakkaz ile BPA degradasyonunun 25 °C’ye göre daha hızlı olduğunu, ancak enzim aktivitesinin daha hızlı kaybolduğunu göstermektedir. 50°C’de yapılan çalışmalarda pH 7 ve pH 5 şartlarında herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 59).



Şekil 59. Lakkaz ile 50°C’de pH 7 ve pH 5 şartlarında BPA degradasyonu

Lakkaz ile gerçekleştirilen tüm degradasyon deneylerinde elde edilen degradasyon verimlerinin farklı şartlar altında olsa da literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür (Asadgol vd., 2014, Escalano vd., 2014, Nguyen vd., 2016).

F. trogii'nin ham ekstraktı ve *T. versicolor*'dan elde edilen saf lakkazla karışımının BPA biyodegradasyonunu inceleyen bir çalışmada 2 saatlik inkübasyon süresinden sonra BPA tamamen giderilmiştir (Atacag Erkurt, 2015). BPA'nın gideriminin *T. versicolor*'dan elde edilen ham lakkaz çözeltisi kullanılarak incelendiği bir çalışma ise 24 saatteki bozulma oranının % 88.76'ya ulaştığını göstermiştir (Hongyan vd., 2019). Başka bir çalışmada lakkaz enziminin (5 U/mL) pH 5'te ve 35°C'de bisfenol-A'yı 30 dakikalık karıştırma süresince % 60 oranında degrede ettiği tespit edilmiştir (Asadgol vd., 2014). Yapılan biyodegradasyon deneyleri sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. BPA'nın 1U/mL lakkaz enzimi ile giderimi 25 °C'de pH 7 ve 5 şartlarında incelenmiştir ve BPA giderim verimi ilk 1 saatte % 90 civarında olup, takip eden birkaç saatte de ilaveten % 5'lik bir giderim meydana gelmişken, 50°C'de bu oran ilk bir saatte %95 civarına ulaşmış ve takip eden saatlerde daha fazla giderim olmamıştır. Bu da 50 °C'de lakkaz ile BPA degradasyonunun 25 °C'ye göre daha hızlı olduğunu, ancak enzim aktivitesinin daha hızlı kaybolduğunu göstermektedir.

4.3.4. Aktif Karbon ile Bisfenol-A'nın Enzimatik Biyorejenerasyonu

Enzimatik biyorejenerasyon deneylerinde 0,2 U/mL ve 1 U/mL lakkaz enzimi aktivitelerinde yaklaşık 200 mg/L konsantrasyonda BPA içeren pH'sı fosfat tampon ile yaklaşık olarak 7'ye ayarlanmış ve sodyum asetat tampon ile pH'sı yaklaşık olarak 5'e sabitlenmiş olan 2 farklı çözelti içerisinde biyorejenerasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar ilk olarak 25°C sıcaklık şartlarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve enzimatik rejenerasyon sonrasında post-adsorpsiyon ile elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri ve bunlardan hesaplanan biyorejenerasyon verimleri Tablo 26'da 0,2 U/mL enzim aktivitesi dozu için ve Tablo 27'de 1 U/mL enzim aktivitesi dozu için verilmiştir.

Tablo 26. 0,2 U/mL Lakkaz Enzimiyle 200 mg/L BPA'nın 25°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri

Aktif Karbon	pH	Ön-adsorpsiyon (mg/g)	Post-adsorpsiyon (mg/g)	Biyorejenerasyon Verimi (%)	Desorpsiyon verimi (%)
1 g/L PKDA	7	89,11	157,32	176,5	9,0
1 g/L CAgran	7	174,92	156,88	89,7	46,6

Desorpsiyon çalışmalarında abiyotik şartlarda maksimum total desorpsiyon verimi kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran karbonunda % 45 civarında iken (Bölüm 4.3.2.), lakkaz enzimiyle bu verim % 90 civarlarına çıkarılmıştır. Ayrıca biyorejenerasyon için sadece bir günlük temas süresi yeterli olurken, söz konusu % 45'lik kümülatif abiyotik desorpsiyon Bölüm 4.3.2'de tartışıldığı gibi 74 basamakta, yani 74 günde gerçekleşmiştir. Bir günde gerçekleşen abiyotik desorpsiyon oranı ise % 3 civarındadır. Bu sonuçlar BPA'ya doyurulmuş CAgran aktif karbonunun lakkaz enzimiyle, abiyotik şartlarda sadece suyla olabilecek maksimum toplam desorpsiyonun (rejenerasyonun) en az 2 katı rejenerasyon sağlayabildiğini göstermiştir.

Termal olarak aktive edilmiş PKDA aktif karbonunda ise biyorejenerasyon verimi çok daha yüksek gerçekleşmiştir. Bölüm 4.3.2.'de PKDA için abiyotik şartlarda % 9 civarında olan rejenerasyon kapasitesi lakkaz enzimiyle %100'ün çok üzerine yükselmiştir. %100'ün üzerindeki verimler aktif karbon üzerine tutulmuş olan enzimlerin aktivitesinin, Bölüm 4.3.3.'teki aktif karbonsuz degradasyon deneylerindeki birkaç saat süren enzim aktivitesinden farklı olarak, çok daha uzun sürmesine ve post-adsorpsiyon süresince de aktif karbon üzerine tutulmuş enzimlerin degradasyona devam etmesine ve bu nedenle hesaplanan biyorejenerasyon verimlerinin çok daha yüksek olmasına bağlanmıştır. Aktif karbon üzerine tutulmuş enzimlerin aktivitesinin askıdaki enzimlere göre çok daha uzun sürdüğü başka

Çalışmalarda da görülmüştür (Nguyen vd., 2016). Çalışmamızda elde edilen bulgularla aktif karbonun enzimatik biyorejenerasyonunun, abiyotik desorpsiyonunun ve enzimatik degradasyonunun toplamından sinerjik bir etkiyle daha fazla olabildiği söylenebilmektedir. Böylece, enzimatik biyorejenerasyonun uygulama olarak enzimatik degradasyondan çok daha verimli etkileri olacağı anlaşılmaktadır.

İki aktif karbon tipi arasındaki biyorejenerasyon verimi farklılıkları aktif karbon tipinin onemini göstermektedir. Fenolle yapılan biyorejenerasyon çalışmasında (Bölüm 4.1.4.) CAgran aktif karbonu daha yüksek biyorejenerasyon verimleri vermesine rağmen, BPA'yla yapılan bu çalışmalarımızda tam tersi bir durum söz konusu olmuştur. Bu farkın en onemli sebebi bisfenol-A molekülünün diğerlerine göre daha büyük olması ve CAgranın da PKDA'ya göre mikropordan çok mezopor ağırlıklı olması olarak görülebilir (Aktaş ve een, 2006). PKDA'da CAgran'a göre yüksek biyorejenerasyon verimleri elde edilmesinin sebebi enzimsiz ortamda PKDA 'da CAgran'a göre daha az miktarda adsorpsiyonun gerçekleşmiş olmasıdır. Tek halkalı fenolik bileşiklere göre yapısında iki halka bulundurarak daha büyük yapılı bir bileşik olması PKDA için adsorpsiyonu zorlaştırmaktadır. AK'a immobilize olan enzimlerin bulunduğu bir ortamda ise daha kk moleküler yapılı bileşiklere dönüşen ve oksidatif polimerizasyona katılan BPA, PKDA'da CAgran'la hemen hemen aynı miktarda adsorbe olmaktadır. Böylece n adsorpsiyon miktarlarıyla karşılaştırıldığında PKDA için daha yüksek biyorejenerasyon verimi elde edilmiştir (Bölüm 4.3.4.). Biyorejenerasyon aşamasında enzimle 1 günlük temas sonrasında her reaktör içerisinde su fazında kalan BPA konsantrasyonu sadece 2 mg/L civarında ölçülmüştür. Bu da göstermiştir ki, önceki degradasyon çalışmalarından da tahmin edilebileceği gibi, desorbe olan BPA askıdaki lakkaz enzimleri tarafından 24 saat içerisinde büyük oranda giderilmektedir.

Enzim dozunu artırmanın biyorejenerasyon verimlerini nasıl etkileyeceğini görmek amacıyla 1 U/mL lakkaz aktivitesinde de biyorejenerasyon çalışmaları tekrarlanmıştır. Tablo 27'de görüldüğü gibi enzim dozunun artırılması biyorejenerasyon verimlerini artırmamıştır. Bölüm 4.3.3.'te enzimatik degradasyon çalışmalarında enzim dozunun artırılmasıyla enzimatik degradasyonun arttığı görülmüştür. Ancak bu artış enzimatik

biyorejenrasyonda görülmemiştir. Yani enzimatik biyorejenerasyon için 0,2 U/mL enzim aktivitesi dozu yeterli olmuştur. Bu aktif karbon üzerine immobilize edilen enzimlerin askıdaki enzimlere göre daha uzun süre aktif kalması ve daha fazla BPA'yı okside edebildiğini göstermektedir. Bu nedenle enzimatik degradasyona kıyasla enzimatik biyorejenerasyon çok daha düşük enzim ilavesiyle sağlanabilmektedir.

Tablo 27. 1 U/mL Enzim Aktivitesi Dozunda Lakkaz Enzimiyle 200 mg/L BPA'nın 25°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri

Aktif Karbon	pH	Ön-adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)	Post-adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)	Biyorejenerasyon Verimi (%)
1 g/L PKDA	7	92,19	159,08	172,55
1 g/L CAgran	7	178,22	168,10	94,32
1 g/L PKDA	5	106,71	86,58	81,13
1 g/L CAgran	5	174,26	137,08	78,66

Sıcaklığın enzimatik biyorejenerasyon üzerine etkisini görebilmek için 50 °C'de 1 U/mL enzim aktivitesi dozlarında pH 7 ve pH 5'te biyorejenerasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda öncekilerden farklı olarak 100 mg/L BPA ön ve post adsorpsiyonda kullanılmıştır. Tablo 28'de görüldüğü gibi 50 °C'de biyorejenerasyon verimleri 25 °C'ye göre azalmıştır. Bunun nedeni olarak immobilize olmuş enzimlerin 50 °C'de aktivitesini 25 °C'ye göre çok daha hızlı kaybetmesi olarak görülmektedir. Benzer durum fenolle yaptığımız çalışmada da (Bölüm 4.1.4.) tespit edilmiştir. Özellikle PKDA'da bu azalmanın daha belirgin olması, aktif karbon türünün enzim immobilizasyonunu da etkilemesi ihtimaline işaret etmektedir. PKDA üzerinde enzim immobilizasyonunun daha yüksek olması ve bu nedenle yüksek sıcaklıkta biyorejenerasyon verimlerinde azalmanın CAgrana göre daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca Tablo 28'de görüldüğü gibi PKDA biyorejenerasyonunun pH 5'te pH 7'ye göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu fark CAgran için söz konusu değildir. Bu durum buhar ile termal yolla aktive edilen PKDA'nın daha bazik yüzey fonksiyonel

gruplarına sahip olmasına ve fosforik asitle aktive edilen CAgranın asidik yüzey fonksiyonel gruplarına sahip olmasına bağlanabilir (Aktaş ve Çeçen, 2006).

Tablo 28. 1 U/mL enzim aktivitesi dozunda lakkaz enzimiyle 100 mg/L BPA'nın 50°C'de enzimatik biyorejenerasyon verimleri

Aktif Karbon	pH	Ön-adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)	Post-adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)	Biyorejenerasyon Verimi (%)
1 g/L PKDA	7	92,37	65,90	71,34
1 g/L CAgrın	7	89,99	65,24	72,49
1 g/L PKDA	5	97,85	25,96	26,53
1 g/L CAgrın	5	95,76	70,19	73,29

4.3.5. HPLC'de yapılan ölçümlerin değerlendirilmesi

200 mg/L konsantrasyonlarında ölçülen fenol, 2-NF ve BPA'da gösterilen piklerin alanları karşılaştırıldığında 200 mg/L BPA için oluşan pikin alanının 0,0844 mAU*min olduğu ve diğerlerine göre oldukça küçük bir değer olduğu görülmektedir (Tablo 29). Biyodegradasyon deneyleri sırasında alınan numunelerde BPA giderimi iyi olduğu için konsantrasyonlar düşmektedir. Bu sebeple düşük konsantrasyonlara sahip olan biyodegradasyon numunelerinin ölçümü sağlanamamıştır. Ayrıca yan ürün oluşumunun gözlenebileceği başka bir pik de elde edilmemiştir.

Tablo 29. Fenolik bileşiklerin HPLC ölçümlerinde elde edilen piklerinin karşılaştırılması

	Konsantrasyon (mg/L)	Area (mAU*min)	Dakika
Fenol	200	68,9526	19.077
2-NF	200	186,242	20.317
BPA	200	0,0844	19.370

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar *Trametes Versicolor* mantarında elde edilen, hücre dışı enzim olan lakkazın aktif karbonun biyorejenerasyonunu hangi mekanizmalarla ve ne ölçüde gerçekleştirebildiğini göstermekte ve bilimsel literatürdeki önemli bir eksikliği tamamlamaktadır. Hücre dışı enzimatik biyorejenerasyon literatürde ilk defa saflaştırılmış enzim kullanılarak gösterilmiştir. Enzimatik biyorejenerasyonda fenolik bileşiğin türünün yanı sıra kullanılan aktif karbonun da çok büyük önem taşıdığı tespit edilmiştir. Lakkaz enzimiyle fenol, 2-NF ve BPA'nın degradasyonu ve iki aktif karbon için de biyorejenerasyonları büyük oranda gerçekleşmiştir.

Fenol ve 2-NF için adsorpsiyon kapasitesi PKDA'da daha fazla, BPA için ise CAgran'da daha fazla bulunmuştur. Desorpsiyon miktarları ise tüm bileşikler için CAgran'da daha fazla olmaktadır. Biyorejenerasyon verimleri fenol için CAgran'da, 2-NF ve BPA için ise PKDA'da daha fazla bulunmuştur. İki aktif karbon tipi arasında görülen farklılıklar aktif karbon tipinin önemini göstermektedir.

Fenol için abiyotik şartlarda maksimum toplam desorpsiyon verimi, adsorpsiyon kapasitesi en yüksek olan termal olarak aktive edilmiş PKDA karbonunda % 10 civarında iken lakkaz enzimiyle bu verim % 40 civarlarına çıkarılmıştır. CAgran aktif karbonunda ise biyorejenerasyon verimi çok daha yüksek gerçekleşmiştir. CAgran için abiyotik şartlarda % 26 civarında olan desorpsiyon kapasitesi lakkaz enzimiyle % 80-100'e kadar yükselmiştir.

2-NF için abiyotik şartlarda maksimum toplam desorpsiyon verimi, adsorpsiyon kapasitesi yüksek olan termal olarak aktive edilmiş PKDA karbonunda % 7 civarında iken lakkaz enzimiyle bu verim yaklaşık 12 kat daha fazla olarak % 86 civarlarına çıkarılmıştır. CAgran için abiyotik şartlarda % 42 civarında olan desorpsiyon

kapasitesi lakkaz enzimiyle %66'ya kadar yükselmiştir. Yüksek adsorpsiyon ve yüksek biyorejenerasyon verimine sahip olması açısından 2-NF giderimi için yapılacak çalışmalarda termal olarak aktive edilmiş karbonların kullanımı daha uygun bulunmaktadır.

Fenol ve 2-NF için desorpsiyon verimleri 25 °C'de pH 7 şartlarında PKDA karbonunda yaklaşık olarak birbirine yakındır. PKDA'da fenolün desorpsiyon verimi % 10,36 iken 2-NF'nin desorpsiyon verimi % 7,6'dır. CAgran'da ise fenol için desorpsiyon verimi % 26,45 iken 2-NF için desorpsiyon verimi % 42,9'dur. Her iki bileşik için de PKDA'nın desorpsiyonu CAgran'dan daha az oranda gerçekleşmektedir. Bunun sebebi termal olarak aktive edilmiş karbonların yüksek oranda tersinir olmayan adsorpsiyona sahip olmasıdır. Termal aktivasyon oksijen olmadan gerçekleştirildiği için reaktif bir yüzeye yol açar ve kimyasal adsorplanma gerçekleşerek tersinir olmayan kuvvetli bağlar oluşur. Kimyasal aktivasyonda ise aktif karbon tamamen oksitlenmiş aktif bölgeleri olan bir yüzeye sahip olduğundan oksijen ile etkileşimi yüzeyi etkilememektedir ve fiziksel adsorpsiyon gerçekleşerek daha fazla tersinir olan zayıf bağlar oluşmaktadır (Aktaş, 2006) (Bölüm 2.1.4.).

Fenol ve 2-NF için biyorejenerasyon verimleri karşılaştırıldığında 50 °C'de pH 7 şartlarında fenolün biyorejenerasyon verimi CAgran'da % 46,01 iken PKDA 'da % 30,19'dur ve 2-NF'nin biyorejenerasyon verimi PKDA'da % 86,17 iken CAgran'da % 66,18'dir. Biyorejenerasyon fenol için CAgran'da daha yüksek oranda gerçekleşmişken 2-NF için PKDA'da daha fazla gerçekleşmiştir. Bunun sebebi fenollerin oksijene duyarlı termal aktif karbonların yüzeyinde oksidatif polimerizasyona katılması ve 2-NF'nin oksidatif polimerizasyon reaksiyonlarına katılmıyor olmasıdır. Nitrofenoller haricindeki fenolik bileşiklerin oksidatif bağlanmasının, adsorpsiyonun tersinirliğini azalttığı bilinmektedir (Vici vd. 1993). Böylece 2-NF'ler termal olarak aktifleştirilmiş karbonun yüzeyinden daha fazla biyorejenere olabilmektedirler.

BPA için ise abiyotik şartlarda maksimum toplam desorpsiyon verimi kimyasal olarak aktive edilmiş CAgran karbonunda % 45 civarında iken, lakkaz enzimiyle bu verim %

90 civarlarına çıkarılmıştır. Termal olarak aktive edilmiş PKDA aktif karbonunda ise abiyotik şartlarda % 9 civarında olan rejenerasyon kapasitesi lakkaz enzimiyle %100'ün bile üzerine yükselmiştir.

Fenol gibi tek halkalı fenolik bileşiklerde (2-klorofenol, 2-nitrofenol) termal aktif karbonlarda adsorpsiyon miktarı yüksek olmaktadır (Aktaş,2006). Termal olarak aktive edilmiş karbonlarda kimyasal adsorpsiyon mekanizması baskın olduğundan fenol için oluşturduğu kovalent bağlardan dolayı desorpsiyon miktarı düşük olmaktadır (Aktaş, 2006). Bu sebeple fenol için CAgran'da desorpsiyon ve biyorejenerasyon verimleri daha yüksek olmaktadır. Fenol için bunu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (Bölüm 4.1.4.). Desorpsiyon verimlerine bakıldığında 2-NF ve BPA için de PKDA karbonunun daha az desorbe olduğu görülerek fenol sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir (Bölüm 4.1.2 - 4.2.2.). Fakat BPA için yapılan çalışmalarda 2-NF'e benzer olarak PKDA için biyorejenerasyon verimi daha yüksek olmaktadır. BPA için bu farklılığın sebebi bisfenol-A molekülünün yapısında iki benzen halkası bulunmasıyla diğerlerine göre daha büyük olması ve CAgranın da PKDA'ya göre mikropordan çok mezopor ağırlıklı olmasıdır. Böylelikle CAgran'da daha fazla adsorpsiyon oluşmaktadır (Aktaş ve Çeçen, 2006) (Bölüm 4.3.1.). PKDA'da CAgran'a göre yüksek biyorejenerasyon verimleri elde edilmesinin sebebi enzimsiz ortamda PKDA 'da CAgran'a göre daha az miktarda adsorpsiyonun gerçekleşmiş olmasıdır. AK'a immobilize olan enzimlerin bulunduğu bir ortamda ise degrede olarak daha küçük moleküler yapıli bileşiklere ayrılan ve oksidatif polimerizasyona katılan BPA, PKDA'da CAgran'la hemen hemen aynı miktarda adsorbe olmaktadır. Böylece ön adsorpsiyon miktarlarıyla karşılaştırıldığında PKDA için daha yüksek biyorejenerasyon verimi elde edilmiştir (Bölüm 4.3.4.).

Fenol, 2-NF ve BPA için yüksek miktarda görülen ve bazı durumlarda %100' ü dahi aşan biyorejenerasyon verimleri, aktif karbon yüzeyine bağlanan enzimlerin aktivitesini bir süre daha devam ettirdiğini ve post-adsorpsiyon esnasında enzimatik degradasyona neden olarak ön-adsorpsiyondan daha yüksek oranda fenolün gideriminin sağlandığını göstermektedir (Nguyen vd., 2016). Biyorejenerasyon çalışmalarında enzimle 1 günlük temas sonrasında her reaktör içerisinde su fazında

kalan fenol ve BPA için konsantrasyon sadece 3 – 5 mg/L değerlerinde ölçülmüştür. 2-NF içinse 10 – 20 mg/L değerlerinde ölçülmüştür. 24 saatlik biyorejenerasyon süresinde desorbe olan fenolik bileşik askıdaki lakkaz enzimleri tarafından büyük oranda degrede edilebilmiştir.

Sonuç olarak, Fenol, 2-NF ve BPA için her iki AK'un biyorejenerasyon verimleri abiyotik toplam desorpsiyon verimlerine göre her durumda çok daha yüksek bulunmuştur. Bu da hücre dışı enzimlerin aktif karbonun biyorejenerasyonunda aktif rol aldığını göstermiştir. Fenol, 2-NF ve BPA için sıcaklık, pH, aktif karbon türü ve enzim miktarının biyorejenerasyon üzerinde etkilerinin olabildiği tespit edilmiştir ve bu şartların maksimum biyorejenerasyonu verecek şekilde optimize edilmesinin mümkün ve gerekli olduğu anlaşılmıştır. Özellikle biyorejenerasyon çalışmalarımızda kullanılabilecek enzim dozunun, aktif karbon üzerine enzim immobilizasyonunun enzim aktivite süresini uzatması nedeniyle, enzimatik degradasyon için gerekenden daha düşük olabileceğinin tespit edilmesi önemli bir bulgudur. Maksimum biyorejenerasyon için yeterli olabilecek minimum enzim dozlarının gelecekte yapılacak çalışmalarda tespit edilmesi faydalı olacaktır.

Hedef bileşiklerin üçünün bir arada uygulandığı çalışmalar yapılarak AK'un ve lakkazın giderim potansiyelini izlemek sürekli sistemlerde, pilot ölçekli ve tam ölçekli çalışmalarda yol gösterici olacaktır. Aynı zamanda bu bileşiklerin diğer fenolik bileşiklerle kombinasyonu veya lakkaz enziminin *trametes versicolor* mantarı veya diğer mantarların ürettiği enzimlerle kombinasyonu şeklinde çalışmalar yapılarak uygun enzimlerin tespiti ve birlikte etkileri izlenebilir. Böyle çalışmalarda HPLC, İyon Kromatografi, GC-MS, LC-MS/MS gibi uygun analiz cihazlarının kullanılması oluşabilecek yan, ara ve nihai ürünlerin tespit edilmesi açısından önemli olacaktır. Çalışmanın, enzimlerin biyolojik aktif karbon sistemleri içerisinde membranlar ile zenginleştirilmesi veya aktif karbon arıtma sistemlerine saflaştırılmış enzim ilavesiyle doymuş aktif karbonun biyorejenere edilmesi konularında çalışmalara kaynaklık etmesi beklenmektedir. Özellikle lakkazın farklı aktif karbonlar üzerine immobilizasyonu ve immobilizasyona bağlı olarak biyorejenerasyonun maksimize edilmesi konularında çalışmalar yapılması önerilebilir.

KAYNAKÇA

- Abaide, E. R., Dotto, G. L., Tres, M. V., Zabet, G. L., & Mazutti, M. A. (2019). Adsorption of 2-nitrophenol using rice straw and rice husks hydrolyzed by subcritical water. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.110>
- Abromaitis, V., Racys, V., van der Marel, P., & Meulepas, R. J. W. (2016). Biodegradation of persistent organics can overcome adsorption-desorption hysteresis in biological activated carbon systems. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.085>
- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., & Mehmetoğlu, Ü. (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00210-3)
- Aktaş, Ö., Çeçen, F., 2010. Adsorption and cometabolic bioregeneration in activated carbon treatment of 2-nitrophenol, *Journal of Hazardous Materials*, 177, 956-961.
- Aktaş, Ö., 2006. Bioregeneration of Activated Carbon in the Treatment of Phenolic Compounds, Doktora tezi, Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü.
- Aktaş, Ö., Çeçen, F., 2007. Bioregeneration of activated carbon: a review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 257-272.
- Aktaş, Ö., Çeçen, F., 2009. Cometabolic bioregeneration of activated carbons loaded with 2-chlorophenol, *Bioresource Technology*, 100, 4604-4610.
- Aktaş, Ö., & Çeçen, F. (2006a). Effect of activation type on bioregeneration of various activated carbons loaded with phenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.1472>

- Aktaş, Ö., & Çeçen, F. (2006b). Effect of type of carbon activation on adsorption and its reversibility. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.1363>
- Alam, M.K., Rahaman, M.M., Abbas, M., Torati, S.R., Asiri, A.M., Kim, D., Kim, C., 2017. Ultra-sensitive 2-nitrophenol detection based on reduced graphene oxide/ZnO na- nocomposites. *J. Electroanal. Chem.* 788, 66–73.
- APHA. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC, USA.
- Asadgol Z., Forootanfar H., Rezai S., Mahvi A.H., Faramarzi M.A., 2014. Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution, *J. Environ Health Sci. Engineer.*, 12, 93-97.
- Atacag Erkurt, H. (2015). Biodegradation and Detoxification of BPA: Involving Laccase and a Mediator. *Clean - Soil, Air, Water*. <https://doi.org/10.1002/clen.201400628>
- Atalay, A. 1978. Deneysel Biyokimya. H.Ü.FF. Yayınları Ders Kitapları Dizisi: 5, 95 - 99.
- Cabot Europe, <https://www.ulprospector.com/en/na/Food/Suppliers/17187/CabotEurope?st=1>
- Choi, K. J., Kim, S. G., Kim, C. W., & Kim, S. H. (2005). Effects of activated carbon types and service life on removal of endocrine disrupting chemicals: Amitrol, nonylphenol, and bisphenol-A. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.080>
- Claus, H. 2004. “Laccases: structure, reactions, distribution”, *Micron*, 35, 93-96.
- Demarche, P., Junghanns, C., Nair, R. R., & Agathos, S. N. (2012). Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.013>
- E.U. Deveci. 2014. Fenol Ve Fenol Türevi Bileşiklerin Biyolojik Parçalanabilirliği. Niğde Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü / ISEM2014
- Escalona, I., de Grooth, J., Font, J., Nijmeijer, K. 2014. “Removal of BPA by enzyme

polymerization using NF membranes”, Journal of Membrane Science, 192-201. Freundlich HMF (1906) Über die adsorption in lösungen. Z Phys Chem.,57A,385–470.

Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. Chemical Engineering Journal, 156(1), 2-10. doi:10.1016/j.cej.2009.09.013

F.Haghseresht, G.Lu, Adsorption characteristics of phenolic compounds onto coal reject-derived adsorbents, Energy Fuels 12 (1998) 1100–1107.

F. Çeçen, Ö. Aktaş. Activated Carbon for Water and Wastewater Treatment, Integration of Adsorption in Biological Treatment. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2011.388

Garcia, I. G., Pena, P. R. J., Venceslada, J. L. B., Martin, A. M., Santos, M. A. M., & Gomez, E. R. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger, Aspergillus terreus and Geotrichum candidum. Process Biochemistry.

Goeddertz JG, Matsumoto MR and Weber AS, Offline biore- generation of granular activated carbon. J Environ Eng 114:1063–1076 (1988).

Haghseresht, F., & Lu, G. Q. (1998). *Adsorption Characteristics of Phenolic Compounds onto Coal-Reject-Derived Adsorbents. Energy & Fuels*, 12(6), 1100–1107. doi:10.1021/ef9801165

Hammel, K. E., & Tardone, P. J. (1988). The Oxidative 4-Dechlorination of Polychlorinated Phenols Is Catalyzed by Extracellular Fungal Lignin Peroxidases. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00417a055>

Ha, S.R., Vinitnantharat, S. 2000. “Competitive removal of phenol and 2, 4 dichlorophenol in biological activated carbon system”, Environmental Technology, 21 (4), 387-396.

Hein, G. E., & Niemann, C. (1962). Steric Course and Specificity of α -Chymotrypsin Catalyzed Reactions. I. *Journal of the American Chemical Society*.

<https://doi.org/10.1021/ja00882a024>

- Hongyan, L., Zexiong, Z., Shiwei, X., He, X., Yinian, Z., Haiyun, L., & Zhongsheng, Y. (2019). Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.143>
- Huong, P. T., Lee, B. K., Kim, J., & Lee, C. H. (2016). Nitrophenols removal from aqueous medium using Fe-nano mesoporous zeolite. *Materials and Design*. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.04.020>
- Jonge, R.J. de, Breure, A.M., Andel, J.G. van 1996. "Bioregeneration of powdered activated carbon (PAC) loaded with aromatic compounds", *Water Research*, 30 (4), 875-882.
- Kang, J. H., & Kondo, F. (2002). Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1209-0>
- Kim, D., Miyahara, T., Noike, T. 1997. "Effect of C/N ratio on bioregeneration of biological activated carbon", *Water Sci. Technol.*, 36, 239-249.
- Klimenko, N., Smolin, S., Grechanyk, S., Kofanov, V., Nevynna, L., Samoylenko, L. 2003. "Bioregeneration of activated carbons by bacterial degraders after adsorption of surfactants from aqueous solutions", *Colloids and Surfaces*, 230, 141-158.
- Kupeta, A. J. K., Naidoo, E. B., & Ofomaja, A. E. (2018). Kinetics and equilibrium study of 2-nitrophenol adsorption onto polyurethane cross-linked pine cone biomass. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.034>
- Langmuir I (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and Platinum. *J Am Chem Soc.*, 40(9),1361–1403.
- Liu, C., Yong, D., Yu, D., & Dong, S. (2011). Cell-based biosensor for measurement of phenol and nitrophenols toxicity. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.006>
- Loh, K. C., & Tan, C. P. P. (2000). Effect of additional carbon sources on

- biodegradation of phenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s0012800068>
- Nguyen, L.N., Hai, F.I., Dosseto, A., Richardson, C., Price, W.E., Nghiem, L.D. 2016. “Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by GAC bound laccase in a packed-bed enzyme reactor”, *Bioresource Technol.*, 210, 108-116.
- Nguyen, T. A. H., Ngo, H. H., Guo, W. S., Zhang, J., Liang, S., Yue, Q. Y., ... Nguyen, T. V. (2013). Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.124>
- Oh, W. Da, Lim, P. E., Seng, C. E., & Sujari, A. N. A. (2011). Bioregeneration of granular activated carbon in simultaneous adsorption and biodegradation of chlorophenols. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.107>
- Reardon, K. F., Mosteller, D. C., & Bull Rogers, J. D. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20000820\)69:4<385::AID-BIT5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000820)69:4<385::AID-BIT5>3.0.CO;2-Q)
- Schultz, J.R., Keinath, T.M. 1984. “Powdered activated carbon treatment process mechanisms”, *Journal of Water Pollution Control Federation*, 56 (2), 143-151.
- Sekme, Semra. 2011. “Çeşitli Mantarlarda Polifenol Oksidaz İndüksiyonunun İncelenmesi.” Yıldız Teknik Üniversitesi
- Shamar, J. M. (2013). Determination of some phenols in Tigris River by HPLC. *Ibn Al-Haitham Journal For Pure And Applied Science*, 26(1), 250–258.
- Sirotkin, A.S., Koshkina, I.Y., Ippolitov, K.G. 2001. “The BAC process for treatment of wastewater containing non-iogenic synthetic surfactants”, *Water Research*, 35, 3265-3271.
- Sublette, K.L., Snider, E.H., Sylvester, N.D. 1982. “A Review of the Mechanism of Powdered Activated Carbon Enhancement of Activated Sludge Treatment”,

Water Research, 16, 1075-1082.

Şimşek, Şeyma Ruhan. 2011. “Manyetik Hidrojel Nanokompozitlerine Lakkaz İmmobilizasyonu Ve Metil Oranjin Renginin Giderilmesi.” Gazi Üniversitesi

Tuncer, Münir. 2010. Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri Ve Dağılımları *Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü. 33342 Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22, 19-63

Uhnakova, B., Petrickova, A., Biedermann, D., Homolka, L., Vejvoda, B., Bendnar, P., Papouskova, B., Sulk, M., Martinkova, L. 2009. “Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*”, *Chemosphere*, 76, 826–832.

Wu, J., & Yu, H. Q. (2007). Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.018>

Vergili, I., Gencdal, S. 2017. “Removal of Organic Matter and Etodolac from Pharmaceutical Industry Wastewater by PAC Adsorption”, *Water Environment Research*, 89, 641.

Vergili, I.H., Barlas, 2009, Removal of 2,4-D, MCPA and Metalaxyl from water using Lewatit VP OC 1163 as sorbent, *Desalination*, DES-09420.

Vidic, R., Suidan, M.T., Brenner, R.C., 1993. Oxidative coupling of phenols on activated carbon: Impact on adsorption equilibrium. *Environmental Science and Technology*, 27, 2079-2085.

Yalımaı, Gulimila. 2018. “İlaç Aktif Maddelerinin Abiyotik-Biyotik Adsorpsiyon Prosesleriyle Giderimi ve Biyorejenerasyonu.” İstanbul Üniversitesi.

Yoshida, H. (1883). LXIII. - Chemistry of lacquer (Urushi) Part I: Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>

Zhang, J., Liu, X., Xu, Z., Chen, H., Yang, Y. 2008. “Degradation of chlorophenols

catalyzed by laccase”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61:351-356.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Zeynep Merve TİRYAKİ

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi ve Yeri: 12 Ekim 1992, Üsküdar

Elektronik Posta: zeynepmervet@gmail.com



EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lise	Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi	2010
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü	2015
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Çevre ve Enerji Sistemleri Mühendisliği	

YABANCI DİLLER

Orta düzeyde İngilizce

KURSLAR

Patent ve Marka Uzmanlığı - Erdem Kaya Patent - Sağlık Bilimleri Üniversitesi

İngilizce Kursu - Londra Edgware Academy

Tezhip Sanatı - Laciverd Sanat Atölyesi