

BEYAZ-ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA SİYANÜR
BİYODEGRADASYONU

AHMET ÇABUK

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

Kasım 2005

**CYANIDE BIODEGRADATION
BY
WHITE ROT FUNGI**

Ahmet ÇABUK

Ph.D. THESIS

Department of Biology

November 2005

BEYAZ-ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA SİYANÜR BİYODEGRADASYONU

Ahmet Çabuk

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışmanlar:

Prof. Dr. Yalçın ŞAHİN

Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA

Kasım 2005

ÖZET

Siyanür, endüstriyel aktivitelerin doğal bir ürünü olarak çevreye yayılır. EPA (Environmental Protection Agency) tarafından tehlikeli bir madde ve toksik bir kirletici olarak tanımlanmıştır. Bazı mikroorganizma gruplarının siyanür yıkım yeteneğine sahip oldukları bilinmekle birlikte *Basidiomycetes* grubu mikroorganizmaların siyanür yıkım özellikleri hakkında sınırlı sayıda bilgi vardır.

Bu çalışmada, *Trametes (Coriolus) versicolor* (ATCC 2000801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju* gibi bazı *Basidiomycetes* üyeleri arasından siyanür yıkım yetenekleri bakımından etkin tür seçilmiştir. Denenen funguslar arasında *Trametes versicolor* (ATCC 2000801) hücrelerinin diğerlerine kıyasla daha yüksek bir yıkım aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Seçilen bu etkin türle; inkübasyon süresi, biyokütle miktarı, başlangıç siyanür konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında, amonyak, format ve formamit gibi siyanür yıkımı sonucu oluşan bazı ürünlerin varlığı araştırılmıştır. Aynı zamanda, siyanür içeren atıklarda bulunabilecek etanol, metanol ve fenol gibi kirleticilerin *Trametes versicolor* (ATCC 2000801) hücrelerinin siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Optimum siyanür yıkım değeri; 42 saat inkübasyon süresi, 3.5 g biyokütle miktarı, 125 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu, 30 °C sıcaklık, pH 10.5 ve 150 rpm çalkalama hızı koşullarında elde edilmiştir.

Belirlenen optimum koşullar altında *Trametes versicolor* (ATCC 2000801), hücreleri ile siyanür yıkımı sonucunda, çözeltilerde amonyak bulunmuştur. Ancak format ve formamit belirlenememiştir. Ayrıca, siyanür içeren atıklarda kirletici olarak bulunan etanol, etkin türle siyanür yıkım yeteneğini azaltmış fakat metanol ve fenol zayıf etki göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Trametes versicolor* (ATCC 2000801)'un siyanürle kirlenmiş bölgelerin temizlenmesinde etkin olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

Cyanide is released to the environment as a result of industrial activities and natural processes. Cyanide has been defined as a hazardous substance and toxic pollutant according to EPA (Environmental Protection Agency). In nature, some microorganisms are responsible for the degradation of cyanide, but there is limited information about the degradation characteristics of *Basidiomycetes* for cyanide.

In this study, was the selection of potent strain from the point of view cyanide degradation in some *Basidiomycetes* strains including *Trametes (Coriolus) versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) and *Pleurotus sajor-caju*. The degradation activity of *Trametes versicolor* (ATCC 200801) was found to be more than that of the other fungi examined. The parameters including incubation time, amount of biomass, initial cyanide concentration, temperature, pH and agitation rate were tested for *Trametes versicolor* (ATCC 200801). It was investigated that, some cyanide degradation products such as ammonia, formate and formamide under the determined optimum conditions. Also, the effects of cyanide-containing waste contaminants such as ethanol, methanol and phenol on the biodegradation of cyanide by *Trametes versicolor* (ATCC 200801) were studied.

The optimum cyanide degradation was obtained after 42 hours of incubation at 30 °C. The optimum pH and agitation rate was measured as 10.5 and 150 rev.min⁻¹, respectively. The biomass was found as 3.5 g for the maximum degradation with an initial cyanide concentration of 125 mg l⁻¹.

Ammonia was found in the solution of the *Trametes versicolor* (ATCC 200801) degradation of cyanide under the determined optimum conditions, no formate and formamide were detected. Addition of the cyanide containing waste contaminants, like ethanol reduced the cyanide degradation of the effective strain, but methanol and phenol affected poorly.

We propose that, according to its ability to degrade cyanide, *Trametes versicolor* (ATCC 200801) might be effective in the treatment of cyanide contaminated sites.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen, çalışma boyunca öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle yol gösteren değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Yalçın Şahin ve Sayın Prof. Dr. Nazif Kolankaya' ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yönlendirilmesinde ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Tez İzleme Komite Hocalarım, Sayın Prof. Dr. Emir Cansunar'a, ve Sayın Doç. Dr. Münevver Arısoy'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmalar sırasında farklı zamanlarda yardımlarını esirgemediğim yanımda olan ve destek veren, Sayın Yrd. Doç. Dr. D. Ümit Şirin'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç'a Sayın Dr. Arzu Ünal'a, Sayın Dr. Sibel Tunalı'ya, Sayın Araş. Gör. Tamer Akar'a, Sayın Araş. Gör. Mesut Şam'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenen 200419035 no'lu proje kapsamında yapılmıştır. Desteklerinden dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve doktora çalışmalarım boyunca Yurt içi Doktora Burs programı çerçevesinde destek veren TÜBİTAK-Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim yaşantımda büyük pay sahibi olan ve her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme, bugün yanımda olmasa bile desteğinin eksikliğini hiç hissetmediğim ananem' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Siyanür'ün Genel Özellikleri	4
2.2. Başlıca Siyanür Kaynakları.....	5
2.3. Siyanürün Toksik Özellikleri	8
2.3.1. Siyanür Zehirlenmeleri.....	10
2.3.2. Siyanür Zehirlenmesi İçin Uygulanan Tedavi Yöntemleri.....	10
2.4. Siyanürün Arıtımında Kullanılan Yöntemler	10
2.4.1. Siyanürün Biyolojik Yöntemlerle Arıtımı	12
2.4.1.1. Siyanür Yıkımında Etkili Olan Enzimler:	17
2.5. Kirlenici Kimyasalların Yıkımında Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı	21
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	23
3.1. Besiyeri Ortamının Hazırlanması ve Mikroorganizmaların Kültürasyonu.....	23
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar	23
3.1.2. Mikroorganizmaların Üretimi	23
3.2. Kültürlerde Siyanür Yıkımının Ölçümü.....	23
3.2.1. Pikrik Asit Yöntemi.....	24
3.3. Optimizasyon Çalışmaları	24
3.3.1. Optimum CN Yıkım Süresinin Belirlenmesi.....	24
3.3.2. CN Yıkımında Optimum Biyokütle Miktarının Belirlenmesi	25
3.3.3. CN Yıkımında Optimum Başlangıç Siyanür Konsantrasyonunun Belirlenmesi	25
3.3.4. CN Yıkımında Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	25
3.3.5. CN Yıkımında Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	26
3.3.6. CN Yıkımında Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi	26
3.4. Siyanür İçeren Atıklarda Bulunabilecek Kirlenicilerin CN Biyoyıkımına Etkisi	26
3.5. Analitik Yöntemler	27
3.5.1. CN Yıkım Ürünlerinin Ölçümü	27

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.5.1.1. Amonyak Ölçümü	27
3.5.1.2. Formik Asit Ölçümü	27
3.5.1.3 Formamit Ölçümü	27
3.6. Siyanür Oksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Siyanür Biyoyıkımı İçin Etkin Mikroorganizmanın Belirlenmesi	29
4.2. Siyanür Biyoyıkımı için Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	30
4.3. Siyanür Biyoyıkımı için Gerekli Optimum Biyokütle Miktarının Belirlenmesi	31
4.4. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum Siyanür Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
4.5. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	33
4.6. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum İnkübasyon pH'sının Belirlenmesi	34
4.7. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi.....	35
4.8. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Üzerine Ortamda Bulunabilecek Kirleticilerin (Etanol, Metanol ve Fenol) Etkisinin Belirlenmesi.....	36
4.8.1. Etanolün etkisi.....	36
4.8.2. Metanolün etkisi	36
4.8.3. Fenolün etkisi	36
4.8.4. Etanol, metanol ve fenolün birlikte bulunduğu durumda siyanür yıkımı üzerine etkisi	36
4.9. Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Siyanür Yıkımında Ortaya Çıkan Amonyak Miktarının Belirlenmesi	39
4.10. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Sonucu Oluşan Formik Asit Miktarının Belirlenmesi :	39
4.11. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Sonucu Oluşan Formamit Miktarının Belirlenmesi	40
4.12. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımından Sorumlu Olabilecek Siyanür Oksijenaz Aktivitesinin Ölçümü	40
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	42
6. EK AÇIKLAMALAR	50
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1 Siyanür çeşitlerinin sınıflandırılması.....	4
2.3.1 Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun şematik gösterimi.....	9
3.6.1 Siyanür oksijenaz enzim aktivitesi için çözülmüş oksijen miktarının tayini çalışmalarında kullanılan reaktörn görünümü....	28
4.1.1 Fungusların CN biyoyıkım etkinlikleri.....	29
4.2.1 <i>T. versicolor</i> ATCC (200801) ile siyanür yıkımının inkübasyon süresine bağlı değişimi.....	30
4.3.1 <i>T. versicolor</i> hücreleri ile siyanür yıkımına biyokütle miktarının etkisi.....	31
4.4.1 <i>T. versicolor</i> ATCC (200801) hücreleri ile siyanür yıkımına başlangıç substrat miktarının etkisi.....	32
4.5.1 <i>T. versicolor</i> ATCC (200801) hücreleri ile farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen % siyanür yıkımı.....	33
4.6.1 İnkübasyon pH'sının CN biyoyıkımına etkisi.....	34
4.7.1 CN biyoyıkımına çalkalama hızının etkisi.....	35
4.8.1 Etanol, metanol ve fenolün <i>T. versicolor</i> hücreleri ile siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi.....	37
4.8.2 Etanol, metanol ve fenol karışımlarının <i>T. versicolor</i> ATCC (200801) hücreleri ile siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi.....	38
4.9.1 Optimum koşullarda inkübasyon ortamında zamana bağlı CN ve amonyak miktarındaki değişimler.....	39
4.12.1 CN biyoyıkımında zamana bağlı ortamdaki çözünen O ₂ miktarındaki değişimler.....	41
B.1 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siyanür çözeltilerinin pikrik asit yöntemine göre 520 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri ve elde edilen standart eğri.....	51
B.2 Nesslerizasyon yöntemi ile elde edilen standart eğri.....	52
B.3 Formik asit miktarının belirlenmesi yöntemine göre elde edilen standart eğri.....	53
B.4 Formamit miktarının belirlenmesi yöntemine göre elde edilen standart eğri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
2.2.1	Endüstride kullanılan başlıca siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler.....	7
2.4.1	Siyanür arıtımı için yöntem seçimi.....	12
2.4.1.1	Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar.....	16
2.4.1.1.1	Siyanür yıkımında görev alan enzimler ve oluşturdukları reaksiyonlar.....	18
C.1	Sodyum asetat- asetik asit tamponunun hazırlanması.....	55
C.2	Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄ tamponunun hazırlanması.....	56
C.3	NaHCO ₃ -NaOH tamponunun hazırlanması.....	56

1. GİRİŞ

Ondokuzuncu yüzyılın başından günümüze kadar geçen zaman içinde teknoloji ve endüstri patlaması yaşanmış, endüstri ürünlerinin üretimi ve tüketimi hızla artmıştır. Bunun yanı sıra oluşan endüstriyel atıkların birikimi ve bunların doğa üzerine olan etkileri tolere edilebilir sınırların çok ötesine geçmiştir.

Bu süreç içerisinde insanlar doğayı sanki tükenmez kaynaklar zinciri olarak algılamış ve hiçbir önlem alınmadan yapılan ve işletilen endüstri işletmeleri tüm dünyayı kaplamıştır. Son yıllarda meydana gelen türlerde yok olma ve canlıların yaşamsal etkinliklerindeki anormallikler, insanların dikkatinin çevresel kirleticiler üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Çağımızda endüstriyel atık sular, çoğunlukla kentsel atıkların oluşturduğu kanalizasyon sularının yanında, yüzey sularını kirleten, önemli kaynaklar haline gelmiştir.

Kışlalıoğlu ve Berkes (1994)' e göre, doğada kirlenme geometrik bir hızla artmaktadır. Bu iddia doğru olarak kabul edilirse, kirlenme ile savaşımın alıcı ortam fazla kirlenmeden başlatılması gerektiği anlaşılmaktadır. Kirlenme, her gün hacmini iki misline çıkaran bir bitkiye benzetilmektedir. Böyle bir bitki bir göle yerleştirildiği takdirde, her geçen gün gölün daha büyük bir kısmını kaplayacaktır. Dolayısıyla, en geç gölün yarısını kapladığı gün yok edilmezse, çok geç olacaktır, çünkü bir sonraki gün hacmini iki misline çıkartarak gölün tamamını kaplayacaktır (Kışlalıoğlu ve Berkes, 1994).

Aslında, endüstriyel olarak gelişmiş ülkelerde çevrede yüksek düzeylerde kirleticilere rastlamak normaldir. Ancak bu gelişmeye koşut olarak artan çevre kirliliği bu yüzyılın en önemli sorunları arasına girmiştir. Bilinen en toksik madde olan siyanür de bu kirleticiler arasında önemli bir yere sahiptir. Pek çok endüstride siyanürün yer aldığı teknolojik süreçler kullanılmakta ve bunun sonucu olarak endüstrilerin atığı olarak da çevrede siyanür ve türevlerine rastlanılmaktadır. Tekstil, boya, metal özütleri, gübre, kaplama, dezenfektan madde yapımları, organik maddelerin sentezi, madencilik, fotoğrafçılık, farmasötik gibi günümüzde insanoğlunun geliştirdiği ve vazgeçemeyeceği endüstri kolları değişik amaçlarla siyanür ve türevlerini kullanmaktadır. Siyanürü

kullanan endüstrilerin yıllık ortalama 3 milyar litrenin üzerinde siyanür atığı oluşturdukları bilinmektedir (Raybuck, 1992). Bunun yanı sıra pek çok bitkinin ve birkaç mikroorganizmanın siyanojenik glikozitler şeklinde siyanür bileşiklerini sentezleme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Ancak biyolojik olarak sentezlenen bu siyanür bileşikleri endüstrinin atık olarak çevreye verdiği siyanür miktarıyla kıyaslanamayacak kadar azdır.

Siyanür ve türevlerinin arıtımı için çeşitli kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Raybuck, 1992; Botz, 2001; Akcil et al., 2003). Ancak biyolojik arıtım yöntemleri, bu yöntemler ile yapılan arıtım sonucunda ortamda toksik madde kalmaması ve ilave bir arıtıma gerek bulunmaması nedeniyle belirli bir üstünlüğe sahiptir. Siyanürün biyolojik arıtımı amacıyla yapılan çalışmaların geçmişi çok eskilere dayanmamaktadır. İlk çalışmalar 1970'li yıllarda başlamış ve ancak son 10-15 yıllık süreç içerisinde artış göstermiştir. Bu çalışmalarda pek çok bakteri ve fungus türünün etkin siyanür yıkım yetenekleri ortaya çıkartılmıştır. Siyanürün biyolojik arıtımı için 1980'li yıllarda ABD'de bir tesis kurulmuştur. Bu arıtım tesisinde aerobik biyolojik arıtım yapılmaktadır (Botz, 2001).

Beyaz çürükçül fungusların çok çeşitli çevresel kirleticileri karbondioksit kadar mineralize etme yeteneğinde oldukları bilinmektedir. Yapılan literatür taraması çalışmasının sonunda, bugüne kadar pek çok bakteri ve fungus türünün siyanür biyoyıkımında kullanıldığı görülmüştür. Ancak bu doktora tez çalışmasında kullanılması hedeflenen beyaz-çürükçül funguslarla siyanür biyoyıkımına yönelik yapılmış her hangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada elde edilecek verilerin bilim ve teknolojiye önemli oranda katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmada temel amaç ise, siyanür ile kirlenmiş ortamların biyoremediasyonunda (biyolojik iyileştirilmesinde) kullanılacak mikroorganizmal veya enzimatik çözüm ve yolları aramaktır.

Bu çalışmada, sentezledikleri ve substrat spesifitesi göstermeyen enzimleri aracılığıyla çok değişik moleküler yapıdaki organik bileşiklerin stabilizasyonunda (mineralizasyonunda) rol oynadıkları bilinen *Basidiomycetes* grubuna giren beyaz-çürükçül fungusların siyanür yıkımındaki etkinlikleri araştırılmıştır. En etkin tür olarak

belirlenen *Trametes versicolor* ATCC 200801 hücreleri ile siyanür yıkımı için optimum koşullar belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda siyanür yıkımı sonucu oluşan ürünler belirlenmiştir. Ayrıca, siyanür içeren atıklarda bulunabilecek olan etanol, metanol ve fenolün siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi araştırılmıştır.

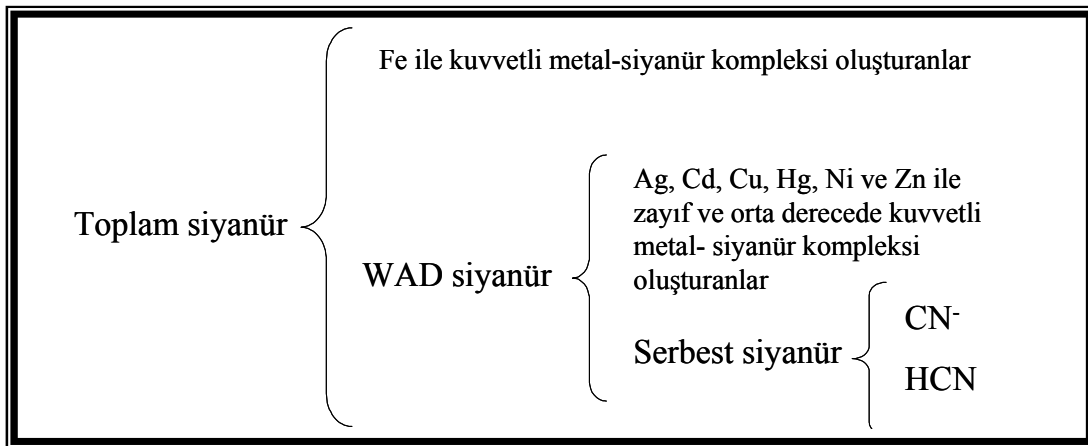
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siyanür'ün Genel Özellikleri

Siyanür, 1 C ve 1 N atomunun 3 bağ yaparak oluşturduğu anyonik karakterde ve alkali katyonlarla tuz meydana getiren, çeşitli metal katyonları ile de iyonik kompleksler oluşturabilen toksik bir kimyasaldır. Na, K, Ca ile oluşturduğu tuzları oldukça toksiktir ve suda kolayca çözülebilir. Asitlerin etkisiyle HCN açığa çıkarılır. Cd, Cu ve Zn ile oluşturdukları zayıf ya da ılımlı kararlılıktaki kompleksler zayıf-asit ayrışabilir (WAD: weak-acid dissociable) olarak tanımlanır. Metal-siyanür kompleksleri daha az toksik olmasına rağmen, çözülmeleri sonucunda hem serbest siyanür hem de metaller açığa çıkar (Online: www.cyantist.com, Greenwood and Earnshaw, 1984; Boikesss, et al., 1986; Skoog, et al., 1996).

Siyanür terimi 3 siyanür çeşidini ifade eden genel bir terimdir. Bu çeşitlerin yer aldığı siyanür sınıflandırılmasına göre olmak üzere 3 çeşit siyanür bulunmaktadır (Bkz Şekil 2.1.1).

- 1) toplam siyanür;
- 2) zayıf-asit ayrışabilir (WAD) siyanür;
- 3) serbest siyanür.



Şekil 2.1.1. Siyanür çeşitlerinin sınıflandırılması (Botz, 2001'e göre).

Siyanür çeşitleri içerisinde en zehirli olanı serbest siyanürdür. Şekil 2.1.1'den de görülebileceği gibi bu çeşit hem gaz formunda hem de sıvı formda bulunabilen siyanür

anyonunu (CN⁻) ve hidrojen siyanürü (HCN) içerir. pH değeri 9.3-9.5 olan çözeltilerde siyanür ve hidrojen siyanür dengede ve eşit miktarda bulunur. pH 11.0 ve üzerinde çözeltideki siyanür miktarının %99'u CN formundayken pH 7.0 ve altındaki değerlerde % 99 HCN formundadır. HCN suda çok kolay çözünebilir olmasına karşın sıcaklığın artmasıyla ve yüksek tuz yoğunluğuna bağlı olarak çözünürlüğü azalmaktadır. Sulu çözeltilerde HCN'nin hem gaz hem de sıvı formu renksiz, acıbadem kokusuyla karakterize edilir. Ancak kokusuyla tanımlama yapmak toksik özelliği nedeniyle sakıncalıdır (Online: [www. cyantist.com](http://www.cyantist.com), Greenwood and Earnshaw, 1984; Boikesss, et al., 1986). Siyanür, altın, civa, kobalt ve demir ile zayıf asidik koşullarda bile oldukça kararlı kompleksler oluşturur. Bununla birlikte doğrudan ultraviyole dalga boyundaki ışığa maruz kalan sulu çözeltilerdeki hem ferro- hem de ferri siyanürler ortamdaki serbest siyanürün kaynağı olurlar. Bu süreç karanlık koşullarda tersine işler. Siyanür tuzlarının ve komplekslerinin kararlılığı pH'a bağlıdır. Bu da siyanürün potansiyel çevresel önemi ve çevre ile etkileşimini doğrudan etkilemektedir. Aynı zamanda siyanür iyonları kükürtle birleşerek tiyosiyonat oluştururlar. Tiyosiyonat hidrojen siyanüre göre yaklaşık 7 kat daha az toksiktir. Fakat akciğerler üzerine çok tahriş edici etkiye sahiptir (Online: www. cyantist.com, Greenwood and Earnshaw, 1984; Boikesss, et al., 1986; Skoog, et al., 1996).

2.2. Başlıca Siyanür Kaynakları

Genel anlamda siyanürün 2 temel kaynağı vardır. Bunlardan ilki doğal olarak çeşitli organizmalar tarafından oluşturulan siyanür, ikincisi ise endüstriyel kaynaklı olan siyanür ve türevleridir. Siyanürler doğada siyanojenik glikozitler olarak bazı bitkiler tarafından (acı badem, süpürge, kahve, nohut, elma, şeftali, kayısı, erik, vişne, kiraz, armut, kırmızı turp, patates, keten, mürver, tesbih ağacı, ortanca, şalgam ve değişik diğer *Rosacea* familyasına ait bitkiler) üretilir. Bu bitki türlerinin sayısının 1000'den fazla olduğu bilinmektedir. Doğada mikropsal siyanür üretimi de görülmektedir. Knowles ve Bunch, 1986' a göre ilk olarak 1871 yılında *Marasmius oreades* olarak bilinen bir fungusun da siyanür ürettiği bildirilmiştir. Daha sonra çeşitli *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* ve *Zygomycetes* sınıflarına ait çok sayıda fungus türünün siyanür üretebildiği bildirilmiştir (Knowles and Bunch, 1986; Evered and Harnet,

1988). Siyanürün bakteriyel üretiminin de olduğu 1913 yılından itibaren bilinmektedir (Evered and Harnet, 1988; Online: www.cyanicode.org). Siyanür ürettiği belirlenen türler; *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas aureofaciens*' dir. Şiddetli ve çok ağrı veren yanık yaralarının enfeksiyonlarında *P. aeruginosa*' nın siyanür üretmesinin hastanın ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Dökmeci, 2001; Online: www.cyanicode.org).

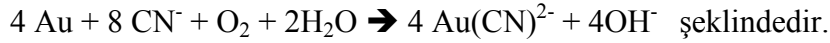
Fotosentetik mikroorganizmalardan *Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Plectonema borganum* ve *Nostoc muscorum*' un siyanür ürettiği 1974 yılından beri bilinmektedir (Knowles and Bunch, 1986; Raybuck, 1992; Dökmeci, 2001; Ebbs, 2004; Online: www.cyanicode.org).

Tekstil, boya, metal özütleri, gübre, kaplama, dezenfektan madde yapımları, organik maddelerin sentezi, madencilik, fotoğrafçılık, farmasötik endüstrileri değişik amaçlarla siyanür ve türevlerini kullanmaktadır. Towill ve ark.(1978)'a göre endüstriyel toksik atıkların önemli bir grubunu oluşturan siyanürü kullanan endüstriler yıllık ortalama 3 milyar litrenin üzerinde siyanür atığı oluştururlar (Raybuck, 1992; Adjei and Ohta, 1999). Endüstriyel kaynaklı siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler Çizelge 2.2.1'de verilmiştir.

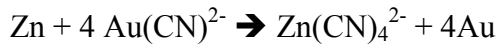
Sülfosiyanürler, ferri ve ferro siyanürler ve tiyosiyanatlar fazla toksik değildir. Toksisitesi hidrojen siyanüre göre çok daha az (lethal doz 50 g) olan kalsiyum siyanamid, alkole direnci azaltır. Kauçuk, plastik madde, sentetik iplik, temizleme, metal ve rafinaj endüstrisinde kullanılan akrilonitrilin lethal dozu 1 mg dır. Asetonitril ise yüksek performanslı sıvı kromatografisinde çok kullanılan bir çözücüdür. Asetonitril ile birlikte dimetilaminopropionitril farmasötik endüstrisinde sentez ara maddesi olarak kullanılır. Gübre olarak kullanılan ve kısmen hidroliz edilebilen kalsik siyanamid, suda çözünmez, katı haldedir ve hidrojen siyanür açığa çıkarmaz. İzosiyanatlar ise özellikle izoforon diizosiyanat (IPDI), heksametilen- diizosiyanat (HDI) ve difenilmetan diizosiyanat (MDI) sentez ara maddesi olarak endüstride kullanılır. Metil izosiyanat ve karbamat insektisitlerin sentezinde yararlanılan siyanür türevleridir. Siyanoakrilat, metil ya da etil polysiyanoakrilat içeren siyan akrolük

tutkallar uçucu nitelikte monomerler olmasına karşın hidrojen siyanür açığa çıkarmazlar (Online: www. cyantist.com; Dökmeci, 2001).

Siyanidasyon, maden cevherinden, siyanür ile altın elde edilme işlemidir. Bu reaksiyon Elsner eşitliğine göre:



Sementasyon işlemi yani Zn ile çöktürme işlemi aşağıda görüldüğü gibidir.



Siyanidasyon işlemi sonucunda ortamda kalan siyanürün uygun bir yöntemle uzaklaştırılması hem çevre hem insan sağlığı ve hem de zengin altın ve gümüş yataklarına sahip olan ülkemiz ekonomisi açısından önem taşımaktadır.

Çizelge 2.2.1. Endüstride kullanılan başlıca siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler (Dökmeci, 2001)

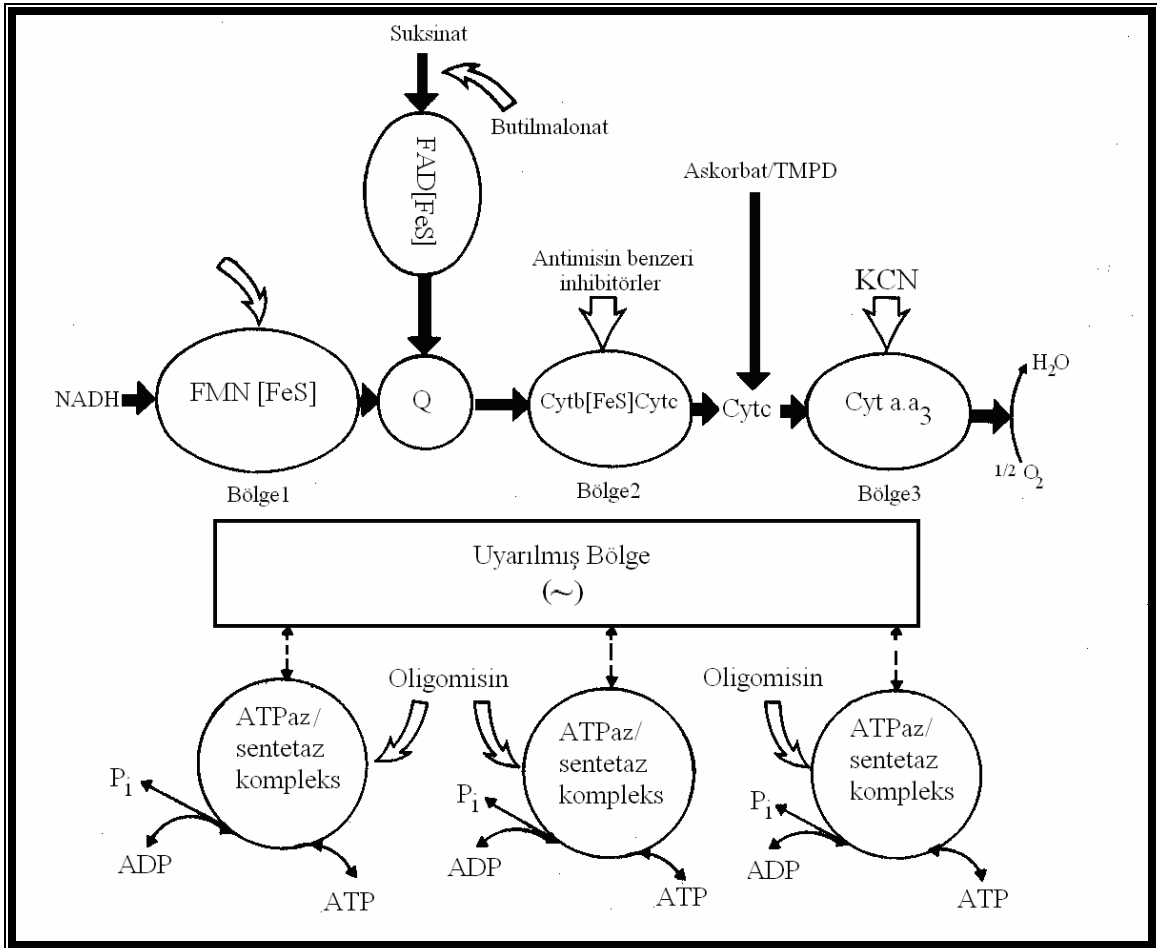
Siyanür türevleri	Kullanıldığı yerler
Siyanhidrik asit HCN	- Koyunların dış parazitlerine karşı ve ev haşerelerinin yuvalarını yok etmede - Fotoğrafçılıkta
Siyanür tuzları KCN NaCN	- Altın ve gümüş madenciliğinde - Elektropilatin - Organik sentezler - Metal parlatici - Toprak sterilizasyonu
Organik nitriller Iminodipropionitril Glikonitril Asetonitril Akrilonitril	Sentetik kauçuk, fumigan gazlar
Siyanamid	Siyanür salgılayan ilaçlar
Siyanojen klorür	Kimyasal analizler
Nitroprussid	Kimyasal sentez, antihipertansif ilaç

2.3. Siyanürün Toksik Özellikleri

Siyanür, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından bilinen en toksik madde olarak tanımlanmıştır. Tarih boyunca siyanür en öldürücü ve yıkıcı zehir olarak bilinmektedir (Chin and Calderon, 2000). Siyanürün solunum üzerine olan inhibitör etkisi 1920'lerden beri bilinmektedir. Kunz ve ark (1998)'e göre ilk kez Warburg ve Keilin, siyanürün sitokrom oksidazdaki 3 değerlikli demir ile kombine olduğunu göstermiştir. Siyanür, aşırı derecede toksik olmasına karşın, biyolojik olarak da oluşturulur ve detoksifikasyonunun varlığı ile yaşadığımız ekosistemin bir parçasıdır (Kunz, et al., 1998).

Siyanür bileşikleri çok toksik olmalarına karşın kaza zehirlenmelerine ve ölümlere beklenilenden daha az yol açarlar. Çok eskiden beri bilinen zehirler arasındadırlar; intihar ve kasıtlı zehirlenme/zehirlenme aracı olarak kullanılmaktadırlar. Etki şekline göre dejeneratif, kimyasal yapısına göre gaz ve uçucu zehirler arasında sınıflandırılırlar. Hidrosiyanik asit ve tuzları (Na, K, Ca, Cu) en yaygın bulunan siyanür bileşikleridir. Yüksek yoğunluktaki HCN'nin birkaç kez solunması NaCN ya da KCN'nin 50-100 mg'ının ağız yoluyla alınmasına eş değerdir ve çok kısa sürede anoksi ve ölüme neden olabilir. Daha düşük dozları, mental konfüzyon, baş dönmesi, baş ağrısı, solunum yavaşlaması gibi belirtilere neden olur. Deri, mukoza ve diğer yollarla da organizmaya girebilir. Absorpsiyonu çok hızlıdır, solunum yoluyla birkaç saniye, sindirim yoluyla birkaç dakikadır. Kana ulaştığında alyuvarlara ve çok az miktarlarda da plazma proteinlerine bağlanır. Dokulara dağılımı çok hızlıdır. Karaciğer ve böbrekte rodanaz ya da tiyosülfat-sülfür transferaz enzimi ile tiyosiyanatların biyotransformasyonu gerçekleştirilir. Fakat bu durum akut zehirlenme olaylarında çabuk geçer. Siyanürün az bir bölümü hidroskobalaminden (B12 vitamini prekürsörü) siyanokobalamin oluşumunda rol oynar. Sülfosiyanürler, ferri ve ferrosiyanürler fazla toksik değildirler. Kalsiyum siyanamid ve akrilonitril düşük toksisiteye sahiptirler. Siyanürler hangi yolla vücuda girerse girsin etki mekanizması aynıdır. Mitokondrial sitokrom a₃'ü bloke eder (Şekil 2.3.1). Sitokrom oksidaz-siyanür komplekslerinin gelişmesi ile hızlı bir şekilde sitokrom oksidaz inhibisyonu gerçekleşir. Sonuçta ETS bloke olur. Sitokrom oksidaz bloke olunca Krebs döngüsündeki piruvat transformasyonu inhibe olur ve sonuçta laktat birikimi ve

metabolik asidoz oluşur (Cain and Skilleter, 1987; Chin and Calderon, 2000; Dökmeçi, 2001).



Şekil 2.3.1. Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun şematik gösterimi (Cain and Skilleter, 1987).

Siyanür metabolizmasında, akciğerden atılım, sisteine bağlanma, oksidasyon ve tiyosülfat yol izleri gibi mekanizmalar rol oynar ancak detoksifikasyon için yeterli olamamaktadırlar. Siyanürün minimal letal dozu (MLD) farklı siyanür bileşikler için değişiklik gösterir. Ölümden önce büyük bir kısmı absorbe edilmeden atılır. Erişkinlerde (70 kg) MLD değerleri NaCN için 150 mg, KCN için 200 mg, HCN için 100 mg dır. Akut HCN zehirlenmelerinde ilk olarak merkezi sinir sistemi etkilenmektedir. Siyanürün besin zincirinde biyomagnifikasyonu bildirilmemiştir. Gaz haldeki HCN'nin LD50 değeri 100-300 mg/l dir. Solunum yolu ile alınan siyanür 10-60 dakika içerisinde ölüme neden olur. Solunum yolu ile alınan siyanürün konsantrasyonu

arttıkça ölüm süresi azalır. Eğer 2000 mg/l HCN solunum yolu ile alınırsa 1 dakika içerisinde ölüm görülür (Online: www.cyanidecode.org; Dökmeci, 2001).

2.3.1. Siyanür Zehirlenmeleri

Subakut Zehirlenme: Çok kısa bir latent dönemden sonra akut nefes alamama ve bilinç kaybı görülür. Kalp durmasıyla kısa bir sürede ölüm meydana gelebilir.

Akut Zehirlenme: Letal dozun altındaki miktarlarda CN alımı söz konusu ise tedavi şansı vardır. Zehirlenme sürecinde 3 aşama gözlenir.

1. Ağız ya da solunum yolundan zehirlenmenin erken döneminde baş dönmesi, görme keskinliğinde azalma, solunum ve kalp hızlanması, kan basıncında düşme ve bir çığlık atmadan sonra bilinç kaybı görülür.

2. Yüzeysel solunum ve geçici solunum durması görülür.

3. İstem dışı şiddetli kasılmaları takiben sakin ve derin bir koma durumu izler.

Önce solunum sonra kalp durmasıyla ölüm meydana gelir.

Hafif Zehirlenmeler: Merkezi sinir sistemi bozuklukları, baş ağrısı, geçici solunum durması gibi durumlar gözlenir.

Kronik Zehirlenmeler: Meslek hastalığı olarak bilinir. Baş dönmesi, güçsüzlük, iştah kaybı, mental gerileme, ekzema, dermatit gibi belirtiler görülür (Dökmeci, 2001).

2.3.2. Siyanür Zehirlenmesi İçin Uygulanan Tedavi Yöntemleri

Akut zehirlenmelerde antidot tedavisi uygulanır. 4-5 kez amil nitrit solunum yoluyla verilir. Nitritler kanda methemoglobulin oranını artırır. Methemoglobulin siyanür ile zayıf kompleks (siyan methemoglobin) yapar. Daha sonra tiyosülfat bileşikleri verilerek siyanmethemoglobinden ayrılan serbest siyanürün inaktif tiyosiyonat kompleksi oluşturması sağlanır. Sodyum tiyosülfat, intravenöz yolla yavaş verilir ve siyanür iyonlarını siyanokobalamine dönüştürür. Günümüzde hidroskobalamin ve sodyum tiyosülfat içeren ampüller (Cyanokit) piyasada bulunmaktadır (Dökmeci, 2001).

2.4. Siyanürün Arıtımında Kullanılan Yöntemler

Atık suda eğer siyanür bulunuyorsa, bu atık su çevreye deşarj edilmeden önce mutlaka siyanür yoğunluğu < 1 mg/l düzeyine getirilmelidir (Raybuck, 1992). Bunun için 2 yol izlenebilir:

- 1) Kimyasal arıtım,
- 2) Biyolojik arıtım.

Siyanür içeren atık suların detoksifikasyonu çoğunlukla kimyasal arıtım yöntemleri ile yapılmaktadır. Ancak kimyasal arıtım yöntemlerinde yan ürün olarak yine toksik bileşikler oluşmaktadır. Ayrıca kimyasal yöntemlerin yüksek maliyetli olması da bir dezavantajdır. Biyolojik yöntemler ise hem siyanürün hem de kimyasal arıtımla oluşabilecek diğer toksik yan ürünlerin transformasyonu ve yıkımında alternatif potansiyel bir araçtır (Knowles and Bunch, 1986; Raybuck, 1992; Pereira et al., 1996; Botz, 2001).

Siyanürün arıtımında kullanılan kimyasal yöntemler şunlardır:

- Alkali klorlama
- Ozonlama
- Nemli-hava oksidasyonu
- Kükürt temelli teknolojiler
- Caro's asit (H_2SO_5) uygulaması
- H_2O_2 uygulaması
- Fe-CN presipitasyonu
- Aktif karbon muammesi

Biyolojik arıtma yöntemlerinin dayandığı 2 temel mekanizma detoksifikasyon ve biyoyıkımdır. Biyolojik arıtma çalışmalarında pek çok fungus, bakteri ve bazı bitkilerin kullanıldığı bilinmektedir (Haris and Knowles, 1983; Raybuck, 1992; Ezzi and Lynch, 2002; Ebbs, 2004). Aerobik koşullar altında mikrobiyal aktivite ile siyanürün amonyak ve daha sonra oksidasyonla nitrata dönüştürülebildiği bilinmektedir. Bu aktivitenin 200 mg/l' ye kadar etkin olduğu gösterilmiştir.

Dünyada ilk defa siyanürün biyolojik arıtımı için 1980'li yıllarda Amerika'da başarılı bir tesis kurulmuştur (Botz, 2001). Bu arıtım tesisinde aerobik biyolojik arıtım yapılmakta ve günümüze kadar yüksek etkinlikte başarı ile kullanılmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir.

Siyanürün arıtımı için hangi yöntemin seçilmesinin daha uygun olacağı Botz tarafından (2001) özetlenmiştir. Çizelge 2.4.1'de siyanür arıtım sürecinde yöntem seçimi için genel bir karşılaştırma verilmektedir.

Çizelge 2.4.1. Siyanür arıtımı için yöntem seçimi (Botz, 2001).

Arıtım yöntemi	Fe-CN uzaklaştırılması	WAD CN uzaklaştırılması	Çamur uygulamaları	Çözelti uygulamaları
SO ₂ /Hava	✓	✓	✓	✓
H ₂ O ₂	✓	✓		✓
Caro's asit		✓	✓	
Alkali klorlama	✓	✓		✓
Fe presipitasyonu	✓	✓	✓	✓
Aktif karbon	✓	✓		✓
Biyolojik	✓	✓		✓
CN geri kazanımı		✓	✓	✓
Doğal	✓	✓	✓	✓

2.4.1. Siyanürün Biyolojik Yöntemlerle Arıtımı

Yaklaşık 200 yıldır siyanürün canlılar üzerine olan etkileri ve Biyolojideki yeri bilim adamları tarafından tartışılmakla birlikte siyanürün biyoyıkımı üzerine yapılan çalışmaların tarihi çok eskiye dayanmamaktadır. Bu çalışmaların sonucunda etkin bir çok mikroorganizma izole edilmiştir. Bunlar arasında *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus* genusları sayılabilir. Bu mikroorganizmalar siyanürü karbon ve azot kaynağı olarak kullanırlar ve sahip oldukları metabolik enzimler siyanürü metabolize ederler. Yapılan çalışmalarda izole edilen ve etkinliği gösterilen mikroorganizmalar Çizelge 2.4.1.1'de verilmektedir.

Bu çalışmaların bazılarında sadece potent mikroorganizmalar izole edilerek etkinlikleri gösterilmiştir (Meyers, et al., 1993; Pereira, et al., 1996; Dumestre et al., 1997; Adjei and Ohta, 1999; Akcil et al., 2003). Bazı çalışmalarda da etkin türlerden siyanür yıkımında görev aldığı bilinen enzimlerin varlığı araştırılmış ve bu enzimlerin aktiviteleri ve kinetikleri incelenmiştir (Fry and Millar, 1972; Padmaja and Balagopal, 1985; Basheer, et al., 1992; Barclay, et al., 1998a, 1998b; Watanabe, et al., 1998; Pereira, et al., 1999; Ezzi and Lynch, 2002; Ezzi, et al., 2003; Kao, et al., 2003). Bazı

araştırmacılarda siyanürün metallerle oluşturdukları komplekslerin uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar yapmışlardır (Aksu, et al., 1999; Dursun ve Aksu, 2000; Patil and Paknikar, 2000; Aksu and Gülen, 2002).

Yüksek bitkilerde siyanür metabolizması ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan bir tanesi Blumenthal ve arkadaşları (1968) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada inceledikleri bazı bitkilerin β -siyanoalanin sintaz enzim aktivitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir (Blumenthal, et al., 1968).

Stemphylium loti hücreleri ile yapılan bir çalışmada, hem hücreler ve hem de bu hücrelerden elde edilen enzim sistemleri kullanılarak siyanür yıkımı takip edilmiş ve yıkım ürünleri belirlenmiştir (Fry and Millar, 1972). Bu çalışma siyanür biyoyıkımı konusunda yapılan neredeyse ilk detaylı çalışmalardan bir tanesidir.

Atkinson, 1975 yılında *Bacillus stearothermophilus* hücrelerinin rodonaz enzimine sahip olduğunu ve bakterinin bu enzime bağlı siyanür detoksifikasyon yeteneğini ortaya koymuştur (Atkinson, 1975).

Pseudomonas fluorescens hücreleri ile İngiltere'den bir araştırma grubunun arka arkaya yayımladığı birkaç çalışmada hem hücreler ve hem de bu hücrelerden elde edilen siyanür oksijenaz ve siyanaz enzimleri ile siyanür yıkımının yapılabildiğini bildirmişlerdir (Harris and Knowles, 1983; Rollinson, et al., 1987; Door and Knowles, 1989).

Shah ve arkadaşları (1991) bir beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* türü ile yapmış oldukları çalışmanın sonucunda bu türün siyanürü mineralize edebilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Pereira ve arkadaşları (1996) yılında yapmış oldukları çalışmada mikroorganizmaları 25-35 mg/l siyanür içeren ve pH 8.2 olan sentetik iplik fabrikasının atık suyundan izole etmişlerdir. Malt-özütü sıvı besiyerine siyanür eklenerek seçicilik sağlamışlar ve etkin olan türleri seçmişlerdir. Seçilen türlerle Czapek sıvı besiyerine formamid-hidroliyaz aktivitesini teşvik etmek için 1 mM siyanür eklenmiş ve 200 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Miseller filtre edilerek Tris/HCl tamponu (pH 8.0) ile yıkanmış ve formamid-hidroliyaz aktivitesi belirlenmiştir. Biyokütle miktarı belirlenmiştir. Siyanür ölçümü pikrik asit yöntemi ile yapılmıştır. Formamit

ölçümleri kolorimetrik olarak amid belirleme yöntemine göre yapılmıştır. Oksijen tüketim ölçümleri elektrot ile yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma koningii*, *Gliocladium virens*, *Mucor* sp. türlerinin 10 mM dan daha fazla siyanür içeren çözeltide büyüebildikleri ve bunlar arasından *Fusarium oxysporum* ve *Gliocladium virens*'nin 20 mM gibi canlılar için çok yüksek bir siyanür konsantrasyonunda büyüme yeteneklerini koruduklarını bildirilmiştir.

Barclay ve arkadaşları (1998a, 1998b) *Fusarium solani* ile yaptıkları çalışmada; siyanit hidrataz aktivite ölçümü, amidaz aktivite ölçümü, formamit ölçümü yapmışlardır. Hücre ile pH 7.0'de ve pH 4.0'de biyotransformasyon çalışmaları yapmışlardır. Enzim (siyanit hidrataz) saflaştırma çalışmaları yapılmıştır ve enzim kinetikleri belirlenmiştir.

Adjei ve Ohta, (1999) tarafından yapılan çalışmada topraktan, KCN ilave edilmiş ortamda seçici izolasyon yapılmış ve etkin kültür *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada mineral tuz ortamına glukoz ve KCN ilave edilerek bakteriyel büyüme ve buna bağlı siyanür kullanımı takip edilmiştir. Büyüme eğrisi ile siyanür kullanımı ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Substrat seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla organik ve inorganik siyanür kaynakları ortama ilave edilmiştir. Ham enzim aktivitesi oluşan amonyak miktarına bakılarak ölçülmüştür. Siyanür ölçümü için pikrik asit yöntemi, amonyak ölçümü için Neslerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Glukoz, format ve formamide ölçümleri HPLC ile yapılmıştır. Sonuç olarak, *B. cepacia*'nın erken ve dinlenme safhasındaki hücrelerinin ve ayrıca ham hücre özütünün siyanür yıkımında etkin bir şekilde kullanılabileceğini bildirilmiştir (Adjei and Ohta, 1999).

Adjei ve Ohta (2000) yaptıkları çalışmada *Burkholderia cepacia* ile siyanür biyoyıkımında pH'ın etkisi (pH 3-11 aralığında), sıcaklığın etkisi (20-50 °C aralığında), karbon kaynağının etkisi, metal iyonlarının etkisi, azot kaynağının etkisi, ve siyanür içeren atık suda bulunabilecek diğer kontaminantların etkisi araştırılmış ve sonuç olarak etkinliği daha önceden yine kendileri tarafından bildirilmiş olan *Burkholderia cepacia* için uygun koşullar ortaya konmuştur.

Ezzi ve Lynch, 2002 yılında *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma pseudokoningii* ve birkaç farklı *Trichoderma* sp. ile yaptıkları çalışmada rodanaz enzim

aktivitesini Sorbo, 1955' e göre tayin etmişlerdir. Aynı zamanda siyanit hidrataz/ formamit hidroliz aktivitesini Fry ve Miller, 1972' e göre; β -siyanoalanin sintaz aktivitesini ise Blumenthal ve ark, 1968'e göre incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda denenen tüm *Trichoderma* türlerinin siyanür yıkımında rol alan rodonaz ve siyanür hidrataz enzimlerinin içerdiği ancak β -siyanoalanin sintaz aktivitesi göstermediklerini bildirmişlerdir. Literatür bilgisine göre bugüne kadar β -siyanoalanin sintaz enzimine sahip olan sadece birkaç bakteri ve bitki türü bildirilmiştir (Blumenthal, et al., 1968). Hiçbir fungal türün bu enzime sahip olduğunu bildiren bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Trichoderma harzianum ve *Trichoderma pseudokoningi* ile yapılan bir çalışmada rodonaz enzim aktivitesine bakılarak bu enzimin K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir (Ezzi, et al., 2003).

Siyanür içeren atık sudan izole edilen ve *Klebsiella oxycota* olarak tanımlanan mikroorganizma ile yapılan bir araştırmada; siyanür ölçümü pikrik asit yöntemine göre yapılmıştır. Format belirlenmesinde ticari format dehidrojenaz kullanılmıştır. Metan oluşumu GC ile belirlenmiştir. *K. oxycota*'nın siyanürü azot kaynağı olarak kullandığı ve sonuçta amonyak oluşturduğunu bildirmişlerdir (Kao, et al., 2003).

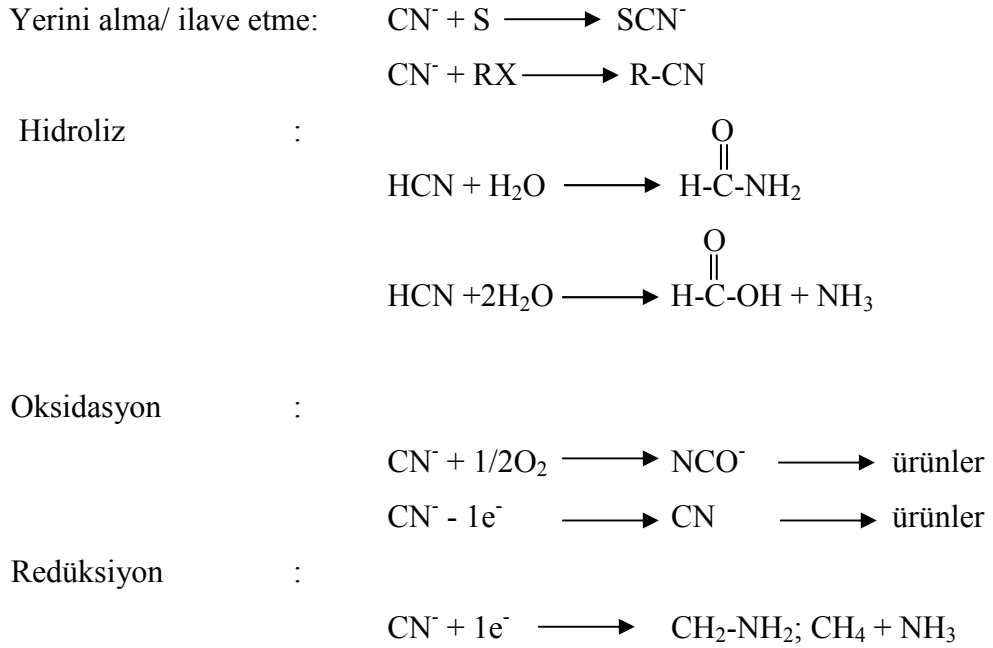
Gurbuz ve arkadaşları (2004) 3 farklı alg türü ile yapmış oldukları çalışmada koşulların optimizasyonunu incelemişlerdir. Sonuç olarak *Scenedesmus obliquus* türünün serbest siyanürü etkin bir şekilde detoksifiye edebildiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 2.4.1.1. Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Bildirilen çalışmalar
<i>Stemphylium loti</i>	Fry and Millar, 1972
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Atkinson, 1975
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Harris and Knowles, 1983; Rollinson, et al., 1987; Door and Knowles, 1989; Kunz, et al., 1992; Kunz, et al., 1994; Suh, et al., 1994; Wang, et al., 1996; Chen and Kunz, 1997; Kunz, et al., 1998; Kunz, et al., 2001.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Padmaja and Balagopal, 1985
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Shah, et al., 1991
<i>Bacillus pumilus</i>	Meyers, et al., 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cunningham and Williams, 1995
<i>Gliocladium virens</i>	Pereira, et al., 1996.
<i>Mucor</i> sp.	Pereira, et al., 1996.
<i>Trichoderma koningii</i>	Pereira, et al., 1996.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pereira, et al., 1996.; Barclay, et al., 1998; Pereira, et al., 1999.
<i>Fusarium solani</i>	Dumestre, et al., 1997; Barclay, et al., 1998.
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Watanabe, et al., 1998
<i>Pseudomonas diminuta</i>	Kowalska, et al., 1998
<i>Staphylococcus seiuri</i>	Kowalska, et al., 1998
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Kowalska, et al., 1998
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adjei and Ohta, 1999; Adjei and Ohta, 2000.
<i>Citrobacter</i> sp.	Patil and Paknikar, 2000
<i>Trichoderma</i> sp.	Ezzi, et al., 2002; Ezzi, et al., 2003.
<i>Klebsiella oxycota</i>	Kao et al., 2003.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ezzi, et al., 2003.
<i>Pseudomonas</i> sp.	Akcil, et al., 2003
<i>Trichoderma pseudokoningi</i>	Ezzi, et al., 2003.
<i>Arthrospira maxima</i>	Gurbuz, et al., 2004
<i>Chlorella</i> sp.	Gurbuz, et al., 2004
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Gurbuz, et al., 2004

2.4.1.1. Siyanür Yıkımında Etkili Olan Enzimler:

Siyanür üzerine etkili olan enzimatik reaksiyonlar kabaca dört gruba ayrılabilir (Raybuck, 1992):



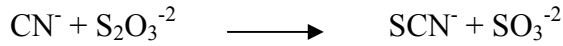
Her bir reaksiyon çeşidinin kendine has özellikleri ve siyanür yıkımında önemli görevleri olmakla birlikte, kofaktör gereksinimleri, arıtım sürecinde hücre canlılığının devamlılığı, siyanürün ve oluşan enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünlerin de kullanılabilirliği daha ileri düzeyde yıkımlar için önemlidir (Raybuck, 1992).

Siyanür yıkımında rolü olduğu bilinen enzimler ve gerçekleştirdikleri reaksiyon tipleri Çizelge 2.4.1.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.4.1.1.1. Siyanür yıkımında görev alan enzimler ve oluşturdukları reaksiyonlar.

Enzim	Reaksiyon tipi
Rodanaz (Thiyosulfat:siyanür sulfurtransferaz) (EC 2.8.1.1)	Yerini alma/ ilave etme
Formamid hidro-liyaz (Siyanür hidrataz) (EC 4.2.1.66)	Hidroliz
β -siyanoalanin sentetaz (EC 4.4.1.9)	Yerini alma/ ilave etme
γ -siyano- α -aminobutirik asit sentetaz	Yerini alma/ ilave etme
Merkaptopiruvat sülfürtransferaz (EC 2.8.1.2)	Yerini alma/ ilave etme
Siyanaz (Siyanat amidohidroliyaz) (E.C. 3.5.5.3)	Oksidasyon
Nitrojenazlar	Redüksiyon
Siyanidaz	Hidroliz
Siyanür oksijenaz	Oksidasyon

Siyanürü substurat olarak kullanan ve yerini alma / ekleme tipinde reaksiyon sergileyen Rodonaz (Thiyosulfat:siyanür sulfurtransferaz) (EC 2.8.1.1) enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler:

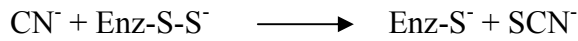
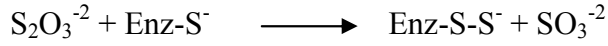


Siyanür, zayıf asitlerle birleşir ve yer değiştirme reaksiyonlarında kuvvetli bir nükleofildir. Aynı zamanda siyanür, sülfüre özellikle persüfit formuna (R-S-S-) karşı büyük bir afiniteye sahiptir.

Rodonaz enziminin varlığı hayvanlarda, bitkilerde funguslarda ve diğer mikroorganizmalarda gösterilmiştir (Blumenthal, et al., 1968; Raybuck, 1992; Barclay, et al., 1998a; Pereira, et al., 1999; Ezzi and Lynch, 2002; Ezzi, et al., 2003; Kao, et al., 2003). Rodonaz enzimi için bakteriyal kaynaklar *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans*, *Rhodospirillum palustris*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Azotobacter vinelandii*' dir. Rodonazın fizyolojik fonksiyonları çok iyi bilinmemekle birlikte bulunduğu canlılarda çok amaçlı bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Memelilerin karaciğer hücrelerinde mitokondrilerde rodonaz enziminin yoğun olarak bulunması ve sitokrom c oksidazın inaktivasyonuna karşı

koruyucu bir görev üstlenmesi siyanür detoksifikasyonunda rol aldığı savını desteklemektedir (Raybuck, 1992).

Rodonaz enzimi pek çok kaynaktan saflaştırılmış olmakla birlikte, en fazla çalışmalar sığır böbreğinden saflaştırılan enzimle yapılmıştır. Enzimin tek polipeptid zinciri 32.900 dalton dur ve ne metal ve ne de ek bir kofaktör içerir. Enzimin üç boyutlu yapısı Hol ve arkadaşları tarafından (1983) difraksiyon yöntemi ile aydınlatılmıştır. Kinetik çalışmalar reaksiyonun 2 basamakta gerçekleştiğini desteklemektedir. Birinci basamakta, enzim persülfid ara köprüsünden proteinin sistin sülfidriline tiyosülfat bağlanır. İkinci basamakta ise siyanür bağlanır (Hol et al., 1983; Raybuck, 1992).



Protein, benzer yapıda fakat aminoasit dizileri farklı olan iki kısım içerir. Aktif bölge iki kısmın ara yüzeyindedir. Aktif bölgedeki sülfidril Cys 247 hidrofobik bir ceple kapalıdır. Anyonik karakterdeki substrat zincirde bağlanmayı kolaylaştıran katyonik bölge sayesinde Arg 186 ve Lys 249 ile bağlanır (Raybuck, 1992).

Merkaptopiruvat sülfürtransferaz (EC 2.8.1.2) rodonaz enzimine benzer bir enzimdir. Ko-substrat olan merkaptopiruvat sistinin biyokimyasal olarak transaminasyonundan meydana gelir. Enzimin hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerden *E. coli* ile *A. vinelandii*' de varlığı gösterilmiştir. Merkaptopiruvat sülfürtransferaz, fare karaciğerinden, *E. coli* ve sığır böbreğinden saflaştırılmıştır. Sığır böbreğinden saflaştırılan enzim tek bir zincir içermektedir. Bu zincirde metal ve kofaktör bulunmamaktadır (Raybuck, 1992). Yapılan çalışmalar, merkaptopiruvat sülfürtransferaz'ın rodonaz kadar yaygın olarak bulunmaması ve reaksiyon için ko-substrata gereksinim duyması pratikte kullanılabilirlik açısından rodonazın daha avantajlı olduğunu göstermiştir (Raybuck, 1992).

β -siyanoalanin sentetaz (EC 4.4.1.9) enzimi siyanürün aminoasitteki üç karbonla yer değiştirmesini katalizler. Enzim aktivitesi *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, ve *Chromobacterium violaceum* gibi bakterilerde gösterilmekle birlikte bazı alg ve yüksek bitkilerde de aktivite bildirilmiştir (Blumenthal, et al., 1968; Raybuck, 1992).

Bugüne kadar hiçbir fungal kaynaktan β -siyanoalanin sentetaz aktivitesinin var olduğu bildirilmemiştir (Ezzi and Lynch, 2002).

Bazı fitopatojenik funguslar tarafından siyanür yıkımı formamid hidro-liyaz (siyanür hidrataz) (EC 4.2.1.66) enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir ve son ürün formamittir. Enzim aktivitesi ilk kez Fry ve Millar tarafından 1972 yılında *Stemphylium loti*’ de gösterilmiştir (Fry and Millar, 1972). Maksimum aktivitenin pH 7.0-9.0 arasında olduğu ve enzimin EDTA, amonyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür ve kalsiyum klorür ile inhibe olmadığı bildirilmiştir. Raybuck, (1992)’de bildirildiğine göre Fry ve Evans tarafından yapılan çalışmada 31 fungal türde formamid hidro-liyaz aktivitesi taranmış ve sonuç olarak patojenik olmayan 6 türde, siyanojenik olmayan bitki patojenlerinin 14 türünün dokuzunda, 11 siyanojenik bitki patojeninde pozitif sonuç bulduklarını bildirmişlerdir (Raybuck, 1992).

Siyanidaz enziminin aktivitesi sonucunda CN yıkım ürünleri olarak formik asit ve amonyak oluşmaktadır. Ingvorsen ve arkadaşları (1988) *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans*’ ın etkin bir siyanidaz üreticisi olduğunu bildirmişlerdir (Ingvorsen et al., 1988). Araştırmacılar, bu mikroorganizmadan saflaştırdıkları siyanidazın karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu geliştirdikleri preparat günümüzde CYANIDASE ismiyle piyasada bulunmaktadır (Ingvorsen et al., 1988; Raybuck, 1992).

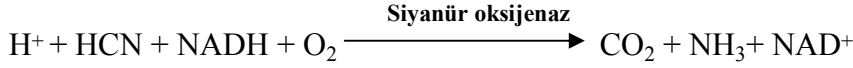
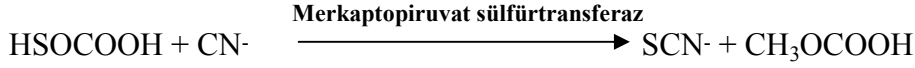
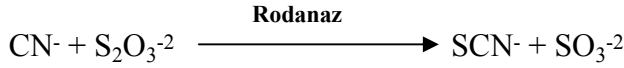
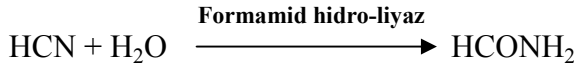
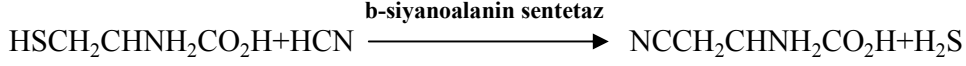
Siyanür oksijenaz enziminin katalizlediği reaksiyonun ürünleri ise karbondioksit ve amonyaktır. Bu enzim *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764’den izole edilmiş ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Harris and Knowles, 1983; Rollinson, et al., 1987; Door and Knowles, 1989; Kunz, et al., 1992; Kunz, et al., 1994; Suh, et al., 1994; Wang, et al., 1996; Chen and Kunz, 1997; Kunz, et al., 1998; Kunz, et al., 2001).

Neredeyse tüm yaşam formlarına karşı toksik etkiye sahip olması nedeniyle siyanüre karşı geliştirilmiş çeşitli metabolik yıkım yollarının olması da doğaldır. Ancak siyanür içeren endüstriyel kaynaklı atık suların arıtımı için en iyi kaynağın mikroorganizmalar olduğu düşünülmektedir (Raybuck, 1992).

Günümüze kadar siyanür üzerine etkili olan enzimlerin aktivitelerini ve özelliklerini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmaların sonucunda, bütün reaksiyonların tam anlamıyla aydınlatılamamış olduğu vurgulanmaktadır. Yalnız sadece yerini alma /

ekleme reaksiyonları hakkında yeterli bilgi olduğu ve hangi proteinlerin siyanür yıkımını katalizlediği ve sınırlamaların neler olduğu bilinmektedir.

Yukarıda özellikleri belirtilen bazı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir.



2.5. Kirletici Kimyasalların Yıkımında Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı

Beyaz çürükçül fungusların çok çeşitli çevresel kirleticileri mineralize etme yeteneğinde oldukları bilinmektedir. Odundaki ligninin biyolojik yıkımından sorumlu olan beyaz çürükçül funguslar çok çeşitli sayıda çevre kirleticisini kayda değer ölçüde parçalama yeteneğindedir. Lignin, biyolojik parçalanmaya oldukça dirençli, fenilpropanoid alt birimlerinden oluşan karmaşık bir polimerdir. Bununla birlikte, beyaz çürükçül funguslar tarafından karbondioksite kadar yıkılmaktadır. Ligninin yıkımı, spesifik olmayan, ekstrasellüler, ve oksidatif bir süreçtir. *Phanerochaete chrysosporium*' un ekstrasellüler çevresinde oldukça reaktif serbest radikaller oluşturması nedeniyle spesifik olmayan ve kuvvetli okside edici yeteneğe sahiptir (Eriksson, et al., 1990; Shah, et al., 1992; Madigan, et al., 1997; Çev. M.Arısoy, 2003).

Eriksson ve arkadaşları (1990) tarafından öne sürüldüğü gibi *P. chrysosporium*' un ligninolitik enzim sistemi, asıl olarak azot açlığı ile başlatılan çeşitli fizyolojik (sekonder metabolik) olayların sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mikroorganizmada ligninolitik aktivite, veratril alkol üretimi ve peroksidaz aktivitesi

üremenin 4. günde kendiliğinden başlar. Ancak lignin yıkımı primer büyüme fazı sırasında olmaz. Sekonder metabolizma, karbonhidrat veya sülfür açlığı ile de başlatılabilir. Bu bulgular *P. chrsosporium* ve diğer birçok beyaz çürükçül fungus için geçerlidir. Bununla birlikte bazı beyaz çürükçüller N ile o kadar etkin kontrol edilmezler ve bu funguslar uygun besin şartlarında lignini yıkıma uğratırlar (Eriksson, et al., 1990).

Lignin peroksidazlar hidrojen peroksitle aktive edilirler. Organik kimyasallar aktif enzim ile iki elektron basamağında okside edilir. Literatürde lignin yıkımından sorumlu olan enzim sisteminin çevrede bulunabilecek dirençli organokimyasalları da yıkıma uğratabilecek yeteneğe sahip olduğu bildirilmektedir (Shah, et al.,1991; Shah, et al., 1992). *Phanerochaete chrysosporium*'un DDT, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), benzopyrene, lindan (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) ve PCB (polichlorinatetbiphenil) türevlerini karbondioksite kadar mineralize ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra çeşitli kirletici etkenlerin *Trametes versicolor* başta olmak üzere çok sayıda beyaz çürükçül tarafından ve bunların sahip olduğu çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla parçalanabildiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Shah et al., 1992; Arisoy and Kolankaya, 1997; Taşpınar and Kolankaya, 1998; Tuomela et al., 2000; Ünal and Kolankaya, 2001; Lara et al., 2003).

Beyaz çürükçül funguslar pek çok eşsiz özelliğe sahiptir. Bunlardan ilki çok çeşitli organik kirleticiler için yıkım yeteneğine sahip olmalarıdır. İkincisi yıkıcı enzimlerin (lignin peroksidaz) azot yokluğuna bir cevap olarak sentezlenmesi nedeniyle fungusların yıkımı hedeflenen kimyasala alıştırılmaya gereksinimlerinin olmayışdır. Bir diğer özellikleri bu funguslar besin kaynağı olarak lignoselülozik materyali kullanabilme yeteneklerinden dolayı diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilirler (Tuomela et al., 2000).

Yukarıda sıralanan ve bilinen diğer pek çok özelliğinden dolayı beyaz çürükçül fungusların biyoyıkıma dayanan biyoarıtım teknolojileri geliştirmek için ideal mikroorganizmalar olduğu söylenebilir.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Besiyeri Ortamının Hazırlanması ve Mikroorganizmaların Kültürasyonu

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmalarda, *Basidiomycetes* sınıfına ait beyaz çürükçül funguslardan *Trametes (Coriolus) versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju* kullanılmıştır. Mikroorganizmaların tamamı Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'dan, Sayın Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA'dan temin edilmiştir. Mikroorganizmalar stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak için Malt-özütü-agar (Merck) katı besiyeri ortamı kullanılmış ve kültürler kullanılmak üzere + 4 °C'de muhafaza edilmektedirler.

3.1.2. Mikroorganizmaların Üretimi

Çalışmada kullanılan fungusların aktivasyonu için Malt-özütü-agar kullanılmıştır. Denemelerde Ünal, (2004) tarafından bildirilen Modifiye Vogel Minimal Sıvı Besiyeri (Bkz. Ek Açıklamalar-A.) kullanılmıştır (Ünal, 2004). Hazırlanan modifiye vogel sıvı besiyerleri otoklavda (110 °C' de 1.5 atm.de 25 dakika) sterilize edilmiştir.

Çalışmalarda, önceden yatık malt özütü agarlı besiyerlerinde üretilen fungusların stok kültürlerinden, hazırlanan besiyeri ortamlarına ekim yapılmıştır. Yatık malt özütü agar stok kültürleri 5 ml steril distile su içerisinde süspanse edildikten sonra hazırlanan miselyum süspansiyonu steril koşullarda 100 ml besiyeri içeren 250 ml'lik Erlenmeyer şişelerine ekilmiştir. Ekimin ardından kültürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm, 30 °C' de 10 gün süreyle inkübe edilmiştir.

3.2. Kültürlerde Siyanür Yıkımının Ölçümü

Bu çalışmada kullanılacak olan *Trametes versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju'* nun siyanür biyoyıkım yetenekleri açısından karşılaştırılmaları ve en etkili türün belirlenmesi amacıyla vogel minimal sıvı besiyerinde 3.1.2'de anlatıldığı gibi kültürasyonları

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda (10 gün) kurutma kağıdı kullanılarak filtrasyon işlemi yapılmış, süpernatant ve hücreler ayrılmıştır. Elde edilen biyokütleler kullanılarak siyanür yıkım yeteneklerinin karşılaştırılması için bir tarama çalışması yapılmıştır.

Tarama çalışması için, yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen yaş fungal biyokütleler (2.0 g) 250 ml'lik erlenlerde 100 ml'lik çalışma hacminde NaOH (0.1 M) - NaHCO₃ (0.05 M) pH 10.5 tamponu içerisinde hazırlanan yaklaşık 400 mg/l siyanür içeren çözelti içerisine eklenerek kullanılmıştır. Çalışma 30 °C' de çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de, gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Pikrik Asit Yöntemi

Siyanür ölçümleri Fisher ve Brown (1952) tarafından önerilen pikrik asit ölçüm yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Siyanür içeren çözelti (5.0 ml)'ye 5.0 ml % 1.0 pikrik asit ve 5.0 ml 0.5 M Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Çözelti kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilerek 85 ml distile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 30 dakika çeşme suyunda bekletilerek oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 520 nm'de absorbansı köre karşı okunmuştur (Fisher and Brown, 1952). Bu yöntem kullanılarak elde edilen standart eğri Ek Açıklamalar-B' de verilmiştir. Bu çalışmada koşullar sabit tutulmak kaydıyla negatif kontrol olarak hücre içermeyen siyanür çözeltisi, pozitif kontrol olarak da literatür bilgisine göre (Ezzi and Lynch, 2002; Ezzi, et. al., 2003) siyanür yıkımı açısından etkin olduğu bilinen *Trichoderma harzianum* kullanılmıştır. Çalışma en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.3. Optimizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum CN Yıkım Süresinin Belirlenmesi

Çalışmalarda siyanür yıkımı bakımından beyaz çürükçüller arasında en etkin tür olarak saptanan *Trametes versicolor* (ATCC 200801) hücreleri yukarıda açıklandığı şekilde üretilmiş ve filtrasyon yapılarak hücreler elde edilmiştir. Tarama çalışması için kullanılan ve 3.2 de belirtilen çalışma koşullarında sadece başlangıç siyanür konsantrasyonu 150 mg/l olarak değiştirilmiş diğerleri sabit tutulmuştur. Çalışma boyunca 30. saate kadar 6 saat aralıklarla ve 30. saatten itibaren 12 saat aralıklarla

örnekler alınmış ve siyanür ölçümleri pikrik asit yöntemine göre yapılmıştır. Toplam 102 saat süreyle siyanür miktarındaki değişim takip edilmiş ve çalışma en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu çalışmada ve bundan sonra yapılan bütün optimizasyon çalışmalarında koşullar sabit tutulmak kaydıyla kontrol olarak *T. versicolor* hücrelerini içermeyen siyanür çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmalar en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.3.2. CN Yıkımında Optimum Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

T. versicolor hücreleri ile CN yıkımında gerekli optimum biyokütle miktarının belirlenmesi için; 3.3.1.'de belirtilen koşullar sabit tutulmak kaydıyla, 0.5-10.0 g arasında değişen miktarlarda yaş biyokütle eklenerek karışım inkübe edilmiştir. Çalışma, inkübasyon sürenin optimizasyonu deneyinde belirlenen en uygun değer olan 42. saate kadar sürdürülmüş ve bu süre içinde 6 saat aralıklarla CN ölçümleri için inkübasyon ortamından örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.3. CN Yıkımında Optimum Başlangıç Siyanür Konsantrasyonunun Belirlenmesi

T. versicolor biyokütlesi ile siyanür biyoyıkımında uygun başlangıç siyanür konsantrasyonu değerinin belirlenmesi için 3.3.1.' de belirtilen çalışma koşullarında sadece başlangıç siyanür konsantrasyonu 25-200 mg/l aralığında değiştirilmiş ve biyokütle miktarının optimizasyonu çalışmasında belirlenen en uygun değer olan 3.5 g yaş biyokütle eklenerek çalışılmıştır. Çalışma, sürenin optimizasyonu çalışmasında belirlenen en uygun değer olan 42. saate kadar sürdürülmüş ve 6 saat aralıklarla örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.4. CN Yıkımında Optimum İnkübasyon Sıcaklığın Belirlenmesi

T. versicolor biyokütlesi ile siyanür biyoyıkımında uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi için; 3.3.1.' de belirtilen ve bundan önceki optimizasyon çalışmalarında belirlenen koşullar sabit tutulmak kaydıyla 20-60 °C arasında değiştirilen sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, 42. saate kadar sürdürülmüş ve 6 saat aralıklarla örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.5. CN Yıkımında Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

T. versicolor biyokütlesi ile siyanür biyoyıkımında uygun pH değerinin belirlenmesi için; 3.3.1.' de belirtilen ve bundan önceki optimizasyon çalışmalarında belirlenen koşullar sabit tutulmak kaydıyla çözeltinin pH değeri 3.0-11.0 aralığında değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. 3.0-5.0 pH değeri aralığındaki çalışmalar asetat tamponu ile, 6.0-8.0 pH değerindeki çalışmalar fosfat tamponu ile ve 9.0-11.0 pH değeri aralığındaki çalışmalar NaOH-NaHCO₃ tamponu kullanılarak yapılmıştır. Tamponların hazırlanışları Ek. 3'de verilmiştir. Çalışma, 42. saate kadar sürdürülmüş ve 6 saat aralıklarla örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.6. CN Yıkımında Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi

T. versicolor biyokütlesi ile siyanür biyoyıkımında uygun çalkalama hızının belirlenmesi için; 3.3.1.' de belirtilen ve bundan önceki optimizasyon çalışmalarında belirlenen tüm koşullar sabit tutulmak kaydıyla statik durumdan 200 rpm' e kadar arttırılan çalkalama hızı değerlerinde çalışılmıştır. Çalışma, 42. saate kadar sürdürülmüş ve 6 saat aralıklarla örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.4. Siyanür İçeren Atıklarda Bulunabilecek Kirleticilerin CN Biyoyıkımına Etkisi

Siyanür içeren endüstriyel atıklarda yaygın olarak bulunabilecek diğer kirleticiler fenol, etanol ve metanol dür. *T. versicolor* hücreleri Vogel ortamında 10 gün 30 °C'de 140 rpm'de çalkalamalı olarak geliştirilmiştir. 10. gün filtrasyon yapılarak süpernatant ve hücreler ayrılmıştır. pH 10.5 NaOH-NaHCO₃ tamponu içerisinde yaklaşık 125 mg/l siyanür çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiliye 3.5 g yaş fungus biyokütlesi ilave edilmiştir. Hücre çalışmasının kontrolü olarak hücre içermeyen, siyanür çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma sürenin optimizasyonuna bağlı olarak karar verilen süre olan 42. saate kadar sürdürülmüştür. Daha önce belirlenen optimum koşullar sabit tutulmak koşulu ile; siyanür içeren endüstriyel atıklarda siyanür ile birlikte bulunabilen etanol, metanol ve fenolün ayrı ayrı farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400 ve 500 mg/l) ve 3'ünün birlikte (200 ve 400 mg/l) *T. versicolor*'un siyanür biyodegradasyonu üzerine etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmalar en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5. Analitik Yöntemler

3.5.1. CN Yıkım Ürünlerinin Ölçümü

3.5.1.1. Amonyak Ölçümü

CN yıkımına bağlı olarak ortamlarda oluşacak amonyak miktarının belirlenmesi Nesslerizasyon yöntemine (Greenberg, et al., 1992) göre yapılmıştır. Bu amaçla 50.0 ml örnek 50.0 ml distile su ile seyreltilip 0.05 ml EDTA (0.01 mol) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 2 ml nessler reaktifi (Aldrich) ilave edilmiş ve yine karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika bekletilmiştir. Standart amonyak ve kontrol için de aynı işlemler yapılmıştır. 425 nm’ de absorbans okunmuştur. Belirtilen yöntem ile elde edilen standart eğri Ek Açıklamalar-B’de verilmiştir. Ayrıca çözeltilerin hazırlanışları Ek. 3’de verilmiştir.

3.5.1.2. Formik Asit Ölçümü

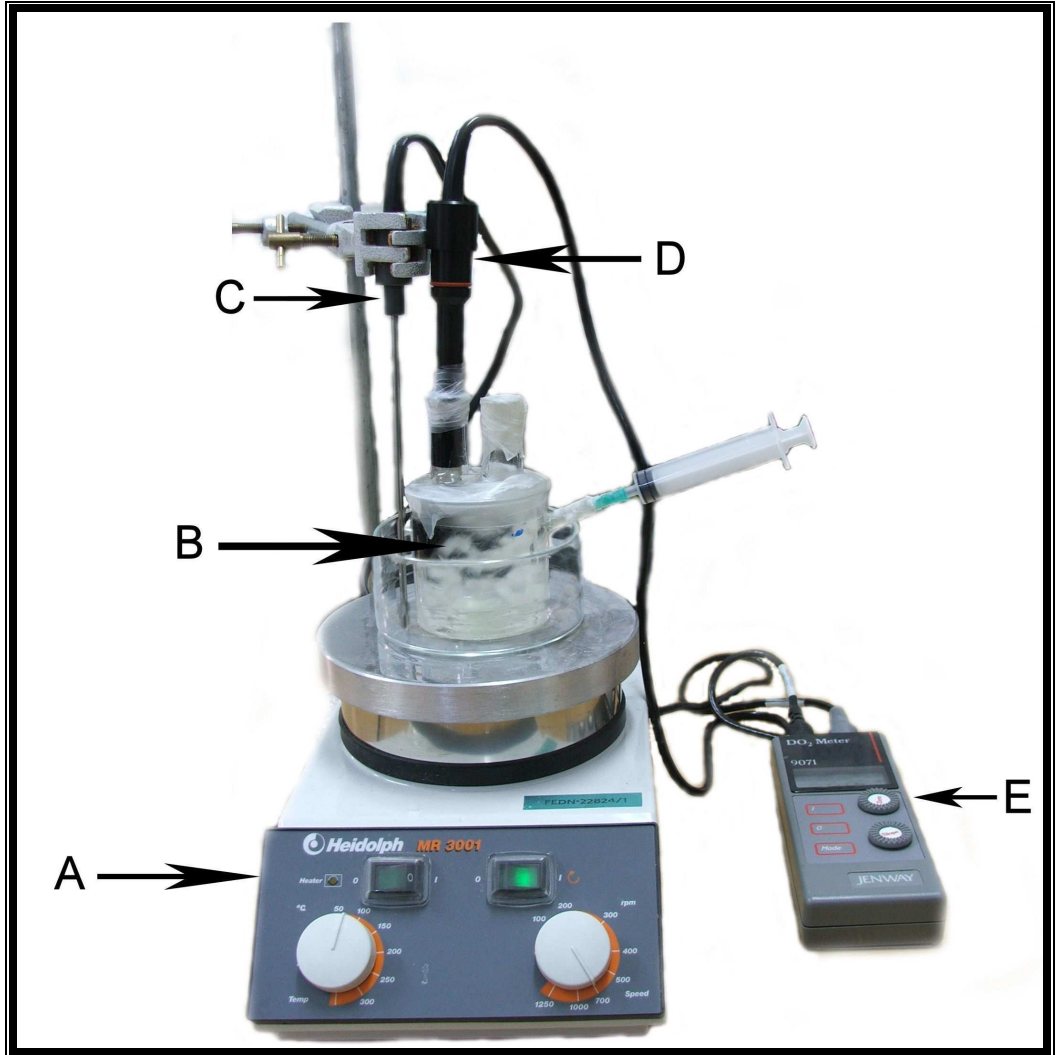
CN yıkımına bağlı olarak ortamlarda oluşacak format miktarının belirlenmesi Kao, ve arkadaşları (2003) tarafından bildirilen yöntemine göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımından (18-20 μ mol KH_2PO_4 (pH 7.5), 0.4 mmol NAD^+ , 160 mU format dehidrojenaz (Sigma) 0.4 ml alınmıştır ve 0.01-0.02 ml örnek ilave edilmiştir. 340 nm dalga boyunda absorbans okunarak ve 2-4 dakika sürecinde oluşan format belirlenmiştir (Kao, et al, 2003). Belirtilen yöntem ile elde edilen standart eğri Ek Açıklamalar-B’de ve çözeltilerin hazırlanışları Ek Açıklamalar-C’ de verilmiştir.

3.5.1.3 Formamit Ölçümü

CN yıkımına bağlı olarak ortamlarda oluşacak formamit miktarının belirlenmesi Fry ve Millar, (1972) tarafından belirtilen yöntemine göre yapılmıştır. 0.1 ml örnek 0.2 ml karışımla 10 dakika 60 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Karışım: 3.5 N NaOH ve 2.3 M hidroksil amin hidroklorit (1:1) içerir. İnkübasyondan sonra 0.1 ml 4N HCl 0.1 ml 1.23 M FeCl_3 ilave edilmiştir. FeCl_3 ilave edildikten 5 dakika sonra 540 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur (Fry and Millar, 1972). Belirtilen yöntem ile elde edilen standart eğri Ek Açıklamalar-B’de verilmiştir. Ayrıca çözeltilerin hazırlanışları Ek Açıklamalar-C’ de verilmiştir.

3.6. Siyanür Oksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Siyanür oksijenaz aktivitesinin ölçümü için Haris ve Knowles tarafından 1983 yılında bildirilen ve tüketilen oksijenin ölçümüne dayalı olan yöntem kullanılmıştır (Haris and Knowles, 1983). Oksijen tüketiminin ölçümü kapalı bir cam reaktörde Jenway marka (Jenway DO₂ meter 9071) çözünmüş oksijen tayin probu kullanılarak yapılmıştır. Bu cam reaktöre pH 10.5 NaOH-NaHCO₃ tamponu içerisinde yaklaşık 125 mg/l siyanür hazırlanmış ve 3.5 g yaş biyokütle ilave edilmiştir. Bu reaktör bir manyetik karıştırıcının üzerine yerleştirilerek karışım sağlanmış ve çözünmüş oksijen probu ile oksijen tüketimi takip edilmiştir (Şekil 3.6.1).

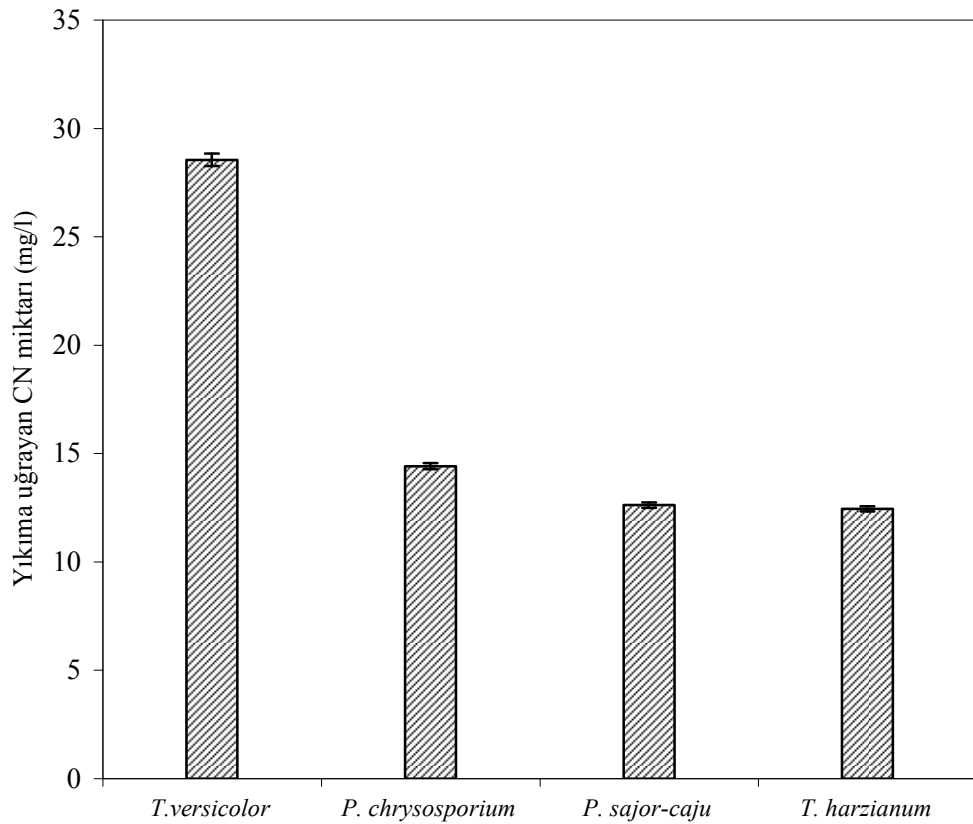


Şekil 3.6.1. Siyanür oksijenaz enzim aktivitesi için çözünmüş oksijen miktarının tayini çalışmalarında kullanılan reaktörün görünümü (A: Isıtıcı manyetik karıştırıcı, B: Reaktör kabı, C: Isı probu, D: O₂ elektrodu, E: Oksijen metre)

4. BULGULAR

4.1. Siyanür Biyoyıkımı İçin Etkin Mikroorganizmanın Belirlenmesi

Siyanür yıkımı için etkin mikroorganizmanın belirlenmesi amacıyla, *Basidiomycetes* sınıfına ait beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju* kullanılmıştır. Bu türler arasında CN biyoyıkımı bakımından etkin türün belirlenmesi için yapılan eleme çalışmasının sonuçları Şekil 4.1.1'de verilmektedir. Ayrıca *Trichoderma harzianum* hücreleri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. En yüksek siyanür yıkım değerine *Trametes versicolor* hücreleri ile ulaşılmıştır. Denenen diğer beyaz çürükçül fungusların her ikisinin de en az pozitif kontrol kadar bir yıkım yeteneğine sahip olduğu görülmüştür.

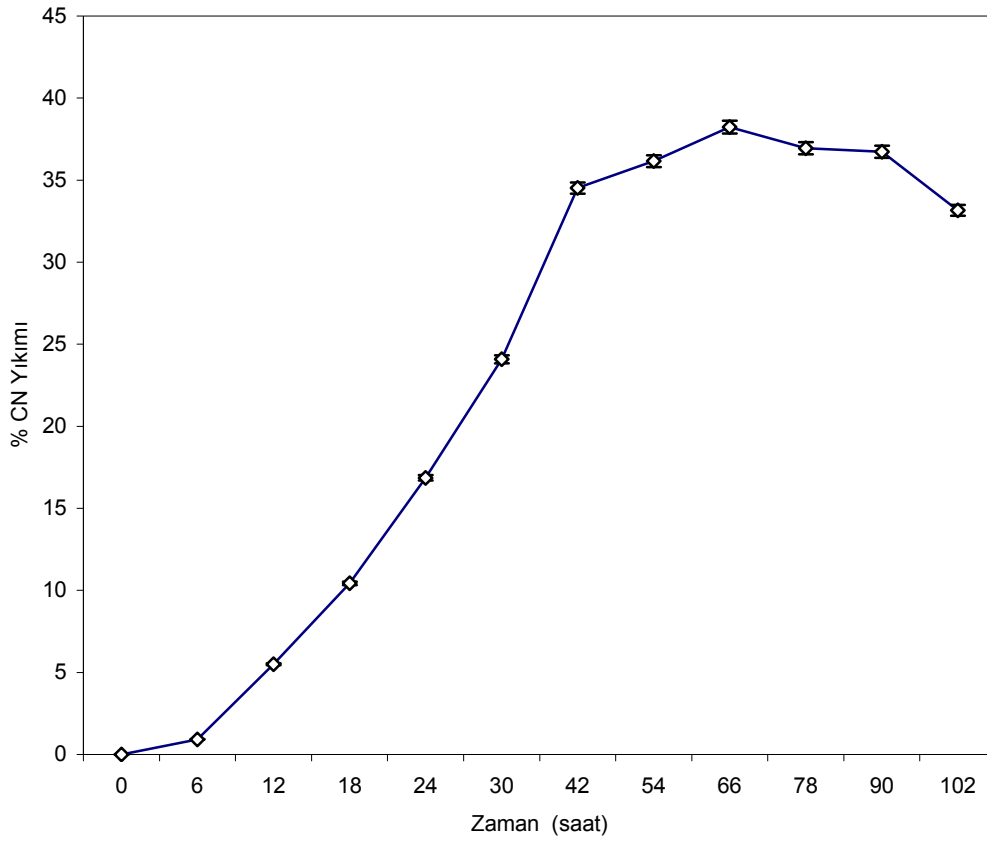


Şekil 4.1.1. Fungusların CN Biyoyıkım Etkinlikleri

(çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 24 saat; 2.0 g yaş biyokütle; başlangıç siyanür konsantrasyonu, ~ 400 mg/l; 30 °C; pH 10.5; 150 rpm)

4.2. Siyanür Biyoyıkımı için Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

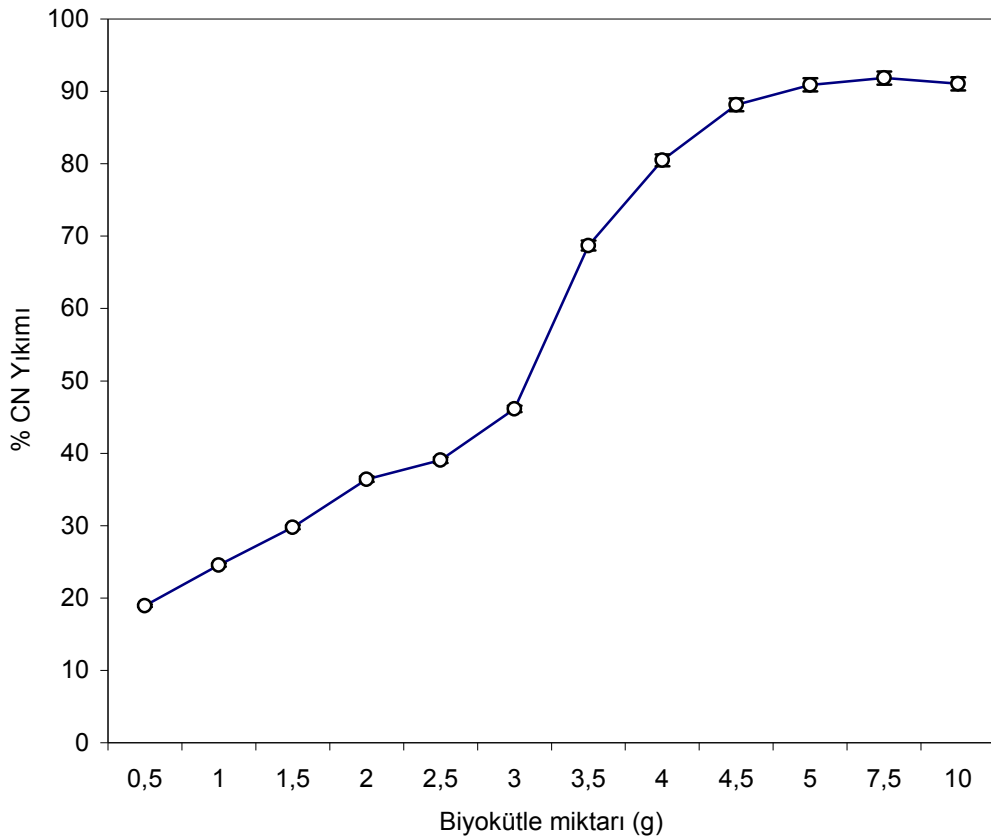
İnkübasyon süresinin optimizasyonu amacıyla 3.3.1’de belirtildiği gibi yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.2.1’de verilmiştir. *T. versicolor* hücreleri ile siyanür yıkımı sürenin artışıyla birlikte bir artış göstermiştir. Ancak bu artışın 42. saatten sonra neredeyse dengeye ulaştığı görülmüştür. 66. saatten itibaren siyanür yıkımında az da olsa bir düşüş kaydedilmiştir.



Şekil 4.2.1. *T. versicolor* ATCC (200801) ile siyanür yıkımının inkübasyon süresine bağlı değişimi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 2.0 g yaş biyokütle; ~150 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 °C; pH 10.5; 150 rpm)

4.3. Siyanür Biyoyıkımı için Gerekli Optimum Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

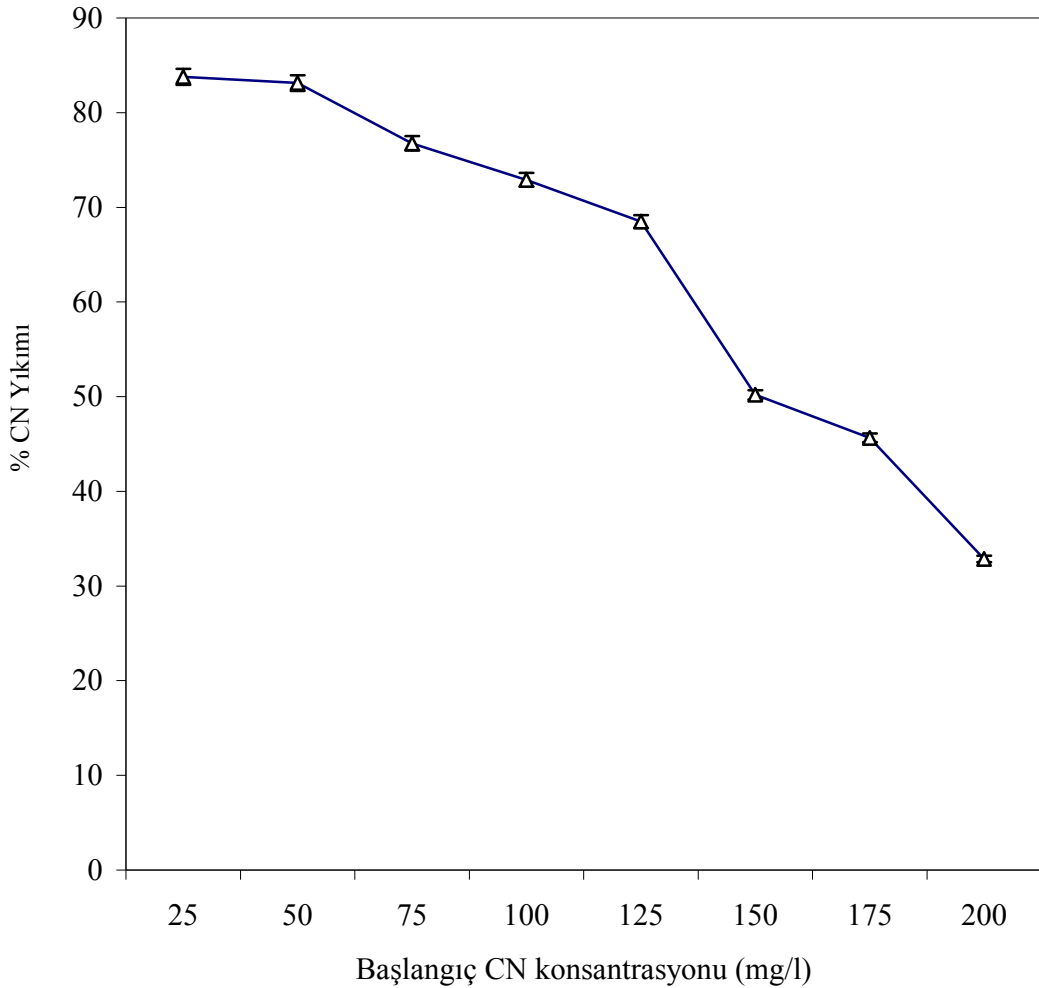
T. versicolor hücreleri ile siyanür biyoyıkımı için en uygun biyokütle miktarının belirlenmesi amacıyla 0.5-10.0 g arasında değişen miktarlarda biyokütle ilave edilerek yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.3.1’de verilmektedir. Bu sonuçlara göre eklenen biyokütle miktarının artışıyla birlikte siyanür yıkımında artmaktadır. Optimum biyokütle miktarı 3.5 g olarak belirlenmiştir. Eklenen biyokütle miktarı 5 gram ve daha üzeri değerlerde bir denge durumundan söz edebiliriz. Hatta biyokütle miktarının 2 katına çıkması (10 g) durumunda bile siyanür yıkımının çok fazla değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.3.1. *T. versicolor* hücreleri ile siyanür yıkımına biyokütle miktarının etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; ~150 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 °C; pH 10.5; 150 rpm)

4.4. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum Siyanür Konsantrasyonunun Belirlenmesi

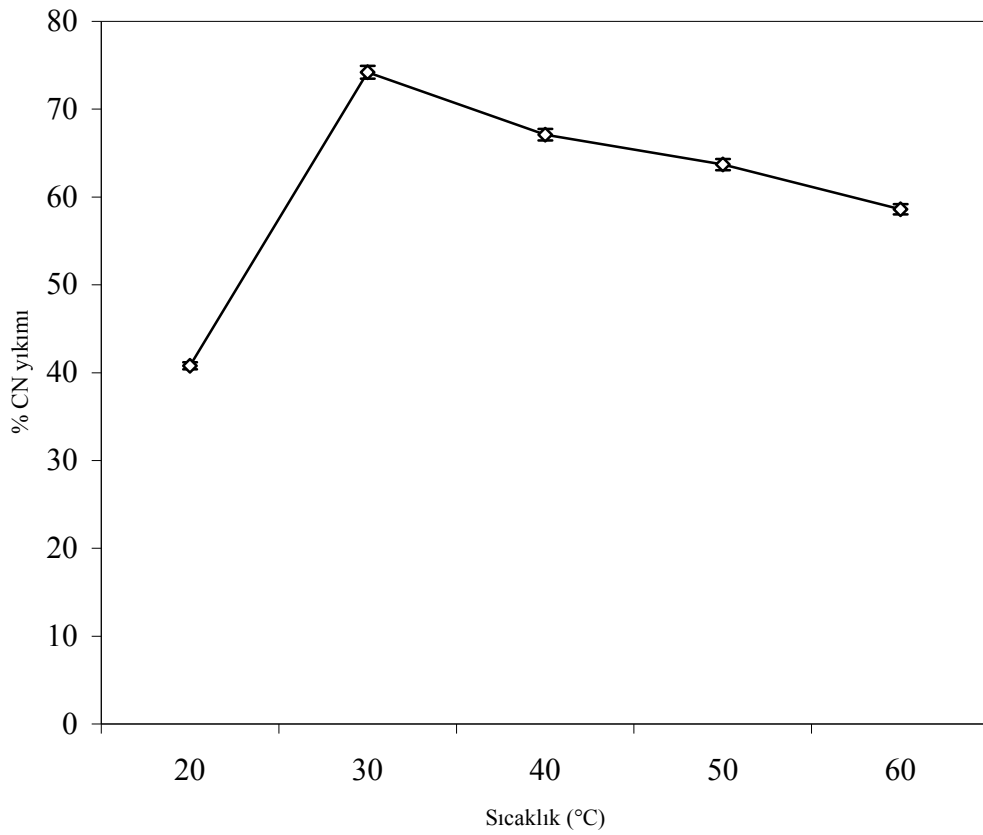
T. versicolor hücreleri ile siyanür biyoyıkımı için en uygun başlangıç siyanür miktarının belirlenmesi amacıyla yaklaşık 25-200 mg/l arasında değişen miktarlarda siyanür içeren ortamlarda yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.4.1’de verilmektedir. Başlangıç siyanür konsantrasyonu arttıkça % siyanür yıkım değeri azalmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak en yüksek % siyanür yıkım değerine yaklaşık 25 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonunda ulaşılırken, en düşük değere yaklaşık 200 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonunda ulaşılmıştır.



Şekil 4.4.1. *T. versicolor* ATCC (200801) hücreleri ile siyanür yıkımına başlangıç substrat miktarının etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 3.5 g yaş biyokütle; 30 °C; pH 10.5; 150 rpm)

4.5. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

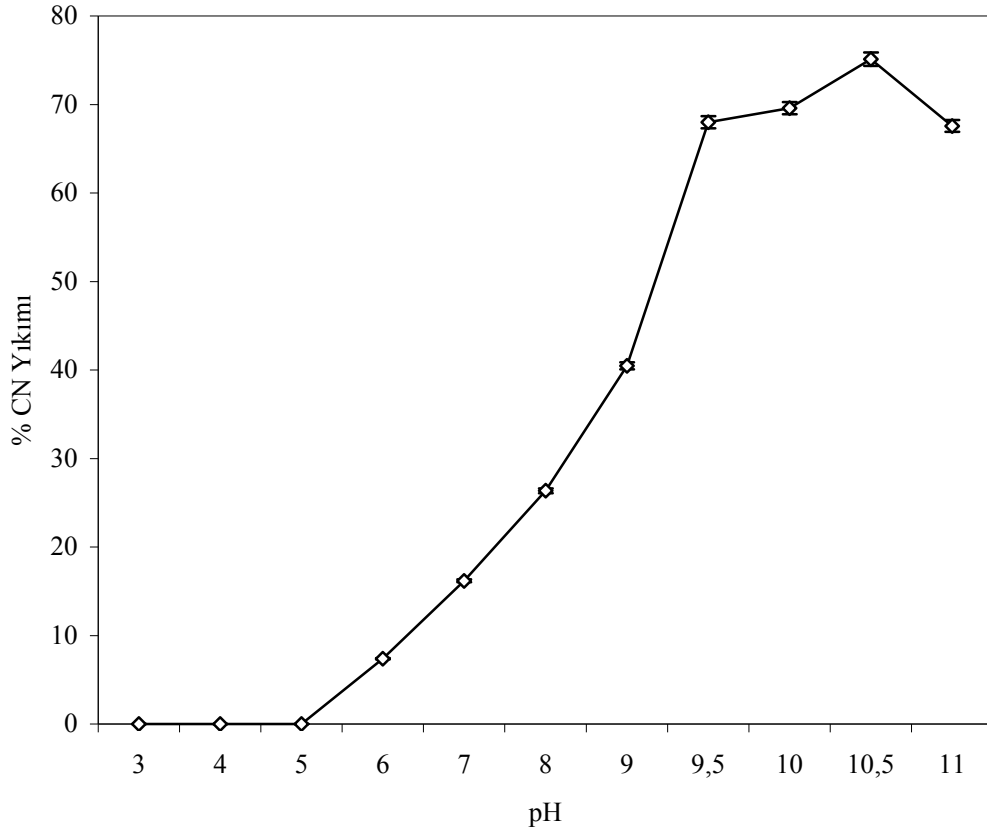
Etkin tür olarak belirlenen *T. versicolor* hücreleri ile siyanür biyoyıkımı için en uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla 20-60 °C arasında 10 °C'lik artışlarla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.1'de verilmektedir. En yüksek % siyanür yıkım değerine 30 °C'de ulaşılmıştır. 30 °C'den sonra sıcaklığın artışı siyanür yıkımını olumsuz yönde etkilemiştir. Sıcaklığın artmasıyla siyanür yıkımı da azalma eğilimi göstermiştir.



Şekil 4.5.1. *T. versicolor* ATCC (200801) hücreleri ile farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen % siyanür yıkımı (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 3.5 g yaş biyokütle; ~125 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; pH 10.5; 150 rpm)

4.6. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum İnkübasyon pH'sının Belirlenmesi

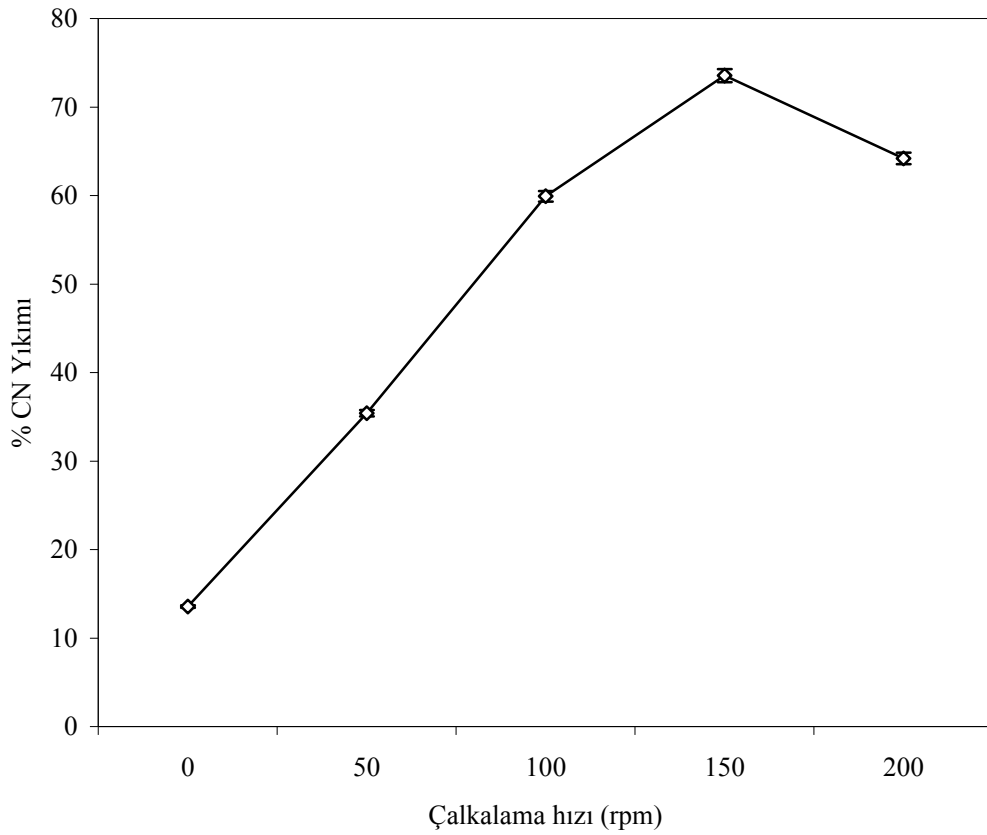
Etkin tür olarak belirlenen *T. versicolor* hücreleri ile siyanür biyoyıkımı için en uygun pH değerinin belirlenmesi amacıyla 3.0-11.0 pH değerleri arasında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.1'de verilmektedir. Düşük pH değerine sahip çözeltilerde % siyanür yıkımı en düşük değerlerde elde edilmiştir. pH değer nötrale yaklaştığında % siyanür yıkımı artış göstermekle birlikte siyanürün yapısal özelliği nedeniyle en yüksek % siyanür yıkım değerine bazik pH değerlerinde ve özellikle pH 10.5 değerinde ulaşılmıştır.



Şekil 4.6.1. İnkübasyon pH'sının CN Biyoyıkımına Etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 3.5 g yaş biyokütle(*T. versicolor*); ~125 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 °C; 150 rpm)

4.7. Siyanür Biyoyıkımı İçin Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi

Etkin tür olarak belirlenen *T. versicolor* hücreleri ile siyanür biyoyıkımı için en uygun çalkalama hızının belirlenmesi amacıyla statik durumdan 200 rpm'e kadar artan çalkalama hızları denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.1.'de verilmektedir. Çalkalama hızının artmasıyla % siyanür yıkımı bir artış göstermiş ve en yüksek değere 150 rpm de ulaşılmıştır.



Şekil 4.7.1. CN Biyoyıkımına Çalkalama Hızının Etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 3.5 g yaş biyokütle (*T. versicolor*); ~125 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 °C; pH 10.5)

4.8. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Üzerine Ortamda Bulunabilecek Kirleticilerin (Etanol, Metanol ve Fenol) Etkisinin Belirlenmesi

4.8.1. Etanolün etkisi

Etanolün siyanür yıkımı üzerine etkisi için elde edilen veriler Şekil 4.8.1'de verilmektedir. Ortama 100 mg/l etanol eklenmesi sonucunda *T. versicolor* hücrelerinin siyanür yıkım yeteneğinin önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür. Artan etanol konsantrasyonu ile % siyanür yıkımında ki azalmanın neredeyse bir dengeye ulaştığı görülürken bu durum 500 mg/l etanol konsantrasyonu ile tekrar azalma göstermiştir.

4.8.2. Metanolün etkisi

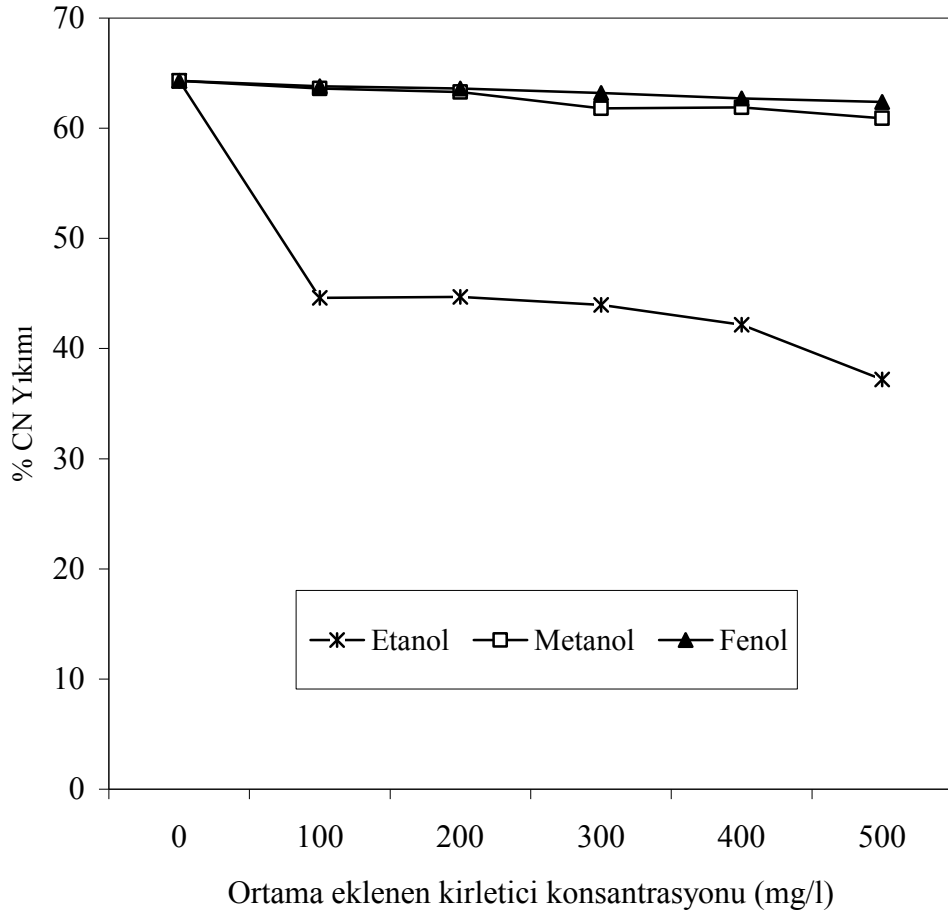
Metanolün siyanür yıkımı üzerine etkisi için elde edilen veriler Şekil 4.8.1'de verilmektedir. *T. versicolor* hücreleri ile belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen siyanür yıkımı üzerine metanolün denenen konsantrasyonlarda neredeyse bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

4.8.3. Fenolün etkisi

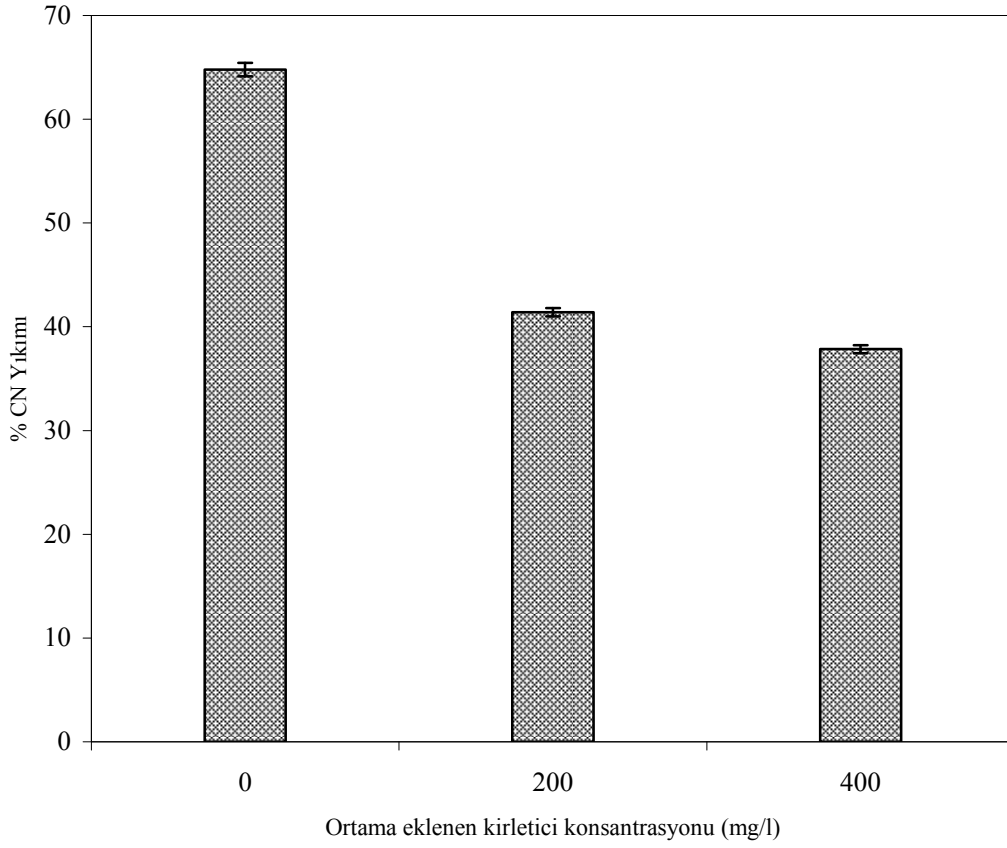
Fenolün siyanür yıkımı üzerine etkisi için elde edilen veriler Şekil 4.8.1'de verilmektedir. *T. versicolor* hücreleri ile belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen siyanür yıkımı üzerine fenolün denenen konsantrasyonlarda neredeyse bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

4.8.4. Etanol, metanol ve fenol'ün birlikte bulunduğu durumda siyanür yıkımı üzerine etkisi

Etanol, metanol ve fenolün karışım halinde bulunması durumunda siyanür yıkımı üzerine olan etkileri için elde edilen veriler Şekil 4.8.2'de verilmektedir. Denenen her iki konsantrasyonda da (200 mg/l ve 400 mg/l) etanol, metanol ve fenol karışımları *T. versicolor* hücrelerinin siyanür yıkımını olumsuz yönde etkilediği görülmüştür.



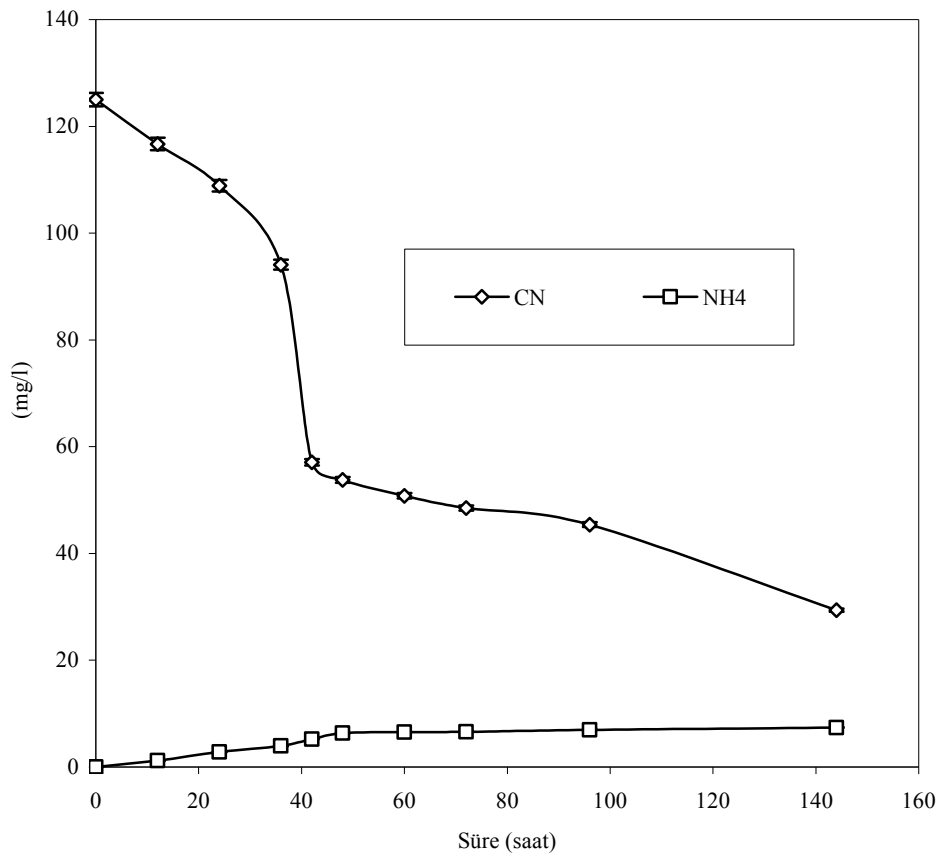
Şekil 4.8.1. Etanol, metanol ve fenolün *T. versicolor* hücreleri ile siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi (Çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer, pH 10.5 (NaOH-NaHCO₃ tamponu), başlangıç siyanür konsantrasyonu yaklaşık 125 mg/l, sıcaklık 30 °C, eklenen biyokütle (yaş) miktarı 3.5 g, çalkalama hızı 150 rpm.)



Şekil 4.8.2. Etanol, metanol ve fenol karışımlarının *T. versicolor* ATCC (200801) hücreleri ile siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer, pH 10.5 (NaOH-NaHCO₃ tamponu), başlangıç siyanürkonsantrasyonu yaklaşık 125 mg/l, sıcaklık 30 °C, eklenen biyokütle (yaş) miktarı 3.5 g, çalkalama hızı 150 rpm.)

4.9. Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Siyanür Yıkımında Ortaya Çıkan Amonyak Miktarının Belirlenmesi

Belirlenen optimum inkübasyon koşulları kullanılarak *T. versicolor* hücreleri ile yapılan siyanür biyoyıkımı çalışmasının sonucunda inkübasyon zamanına bağlı olarak ortamdaki siyanür ve amonyak miktarındaki değişimler Şekil 4.9.1’de verilmektedir.



Şekil 4.9.1. Optimum koşullarda inkübasyon ortamında zamana bağlı CN ve amonyak miktarındaki değişimler. (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer, pH 10.5 (NaOH-NaHCO₃ tamponu), başlangıç siyanür konsantrasyonu yaklaşık 125 mg/l, sıcaklık 30 °C, eklenen biyokütle (yaş) miktarı 3.5 g, çalkalama hızı 150 rpm.

4.10. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Sonucu Oluşan Formik Asit Miktarının Belirlenmesi :

Belirlenen optimum koşullar sabit tutularak *T. versicolor* hücreleri ile yapılan siyanür biyoyıkımı çalışmasının sonucunda yıkım ürünü olarak oluşması beklenen

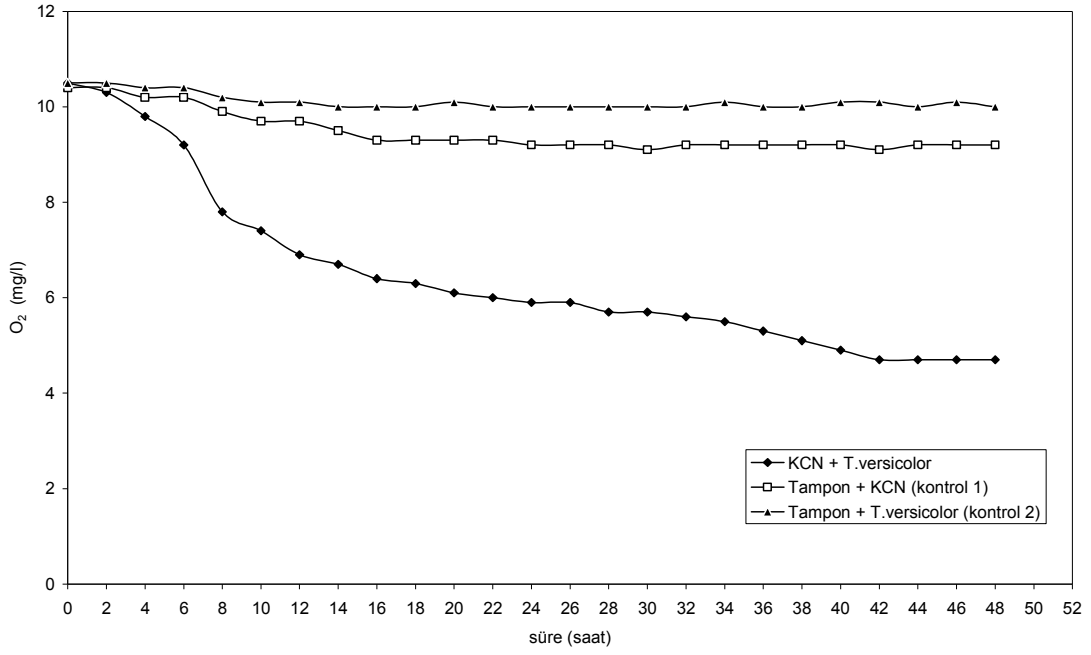
ürünlerden bir tanesi formik asittir. Bölüm 3.5.1.2' de belirtildiği şekilde yapılan ölçümler sonucunda *T. versicolor* hücreleri ile siyanür yıkımına bağlı olarak formik asit miktarında herhangi bir artış kaydedilememiştir.

4.11. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımı Sonucu Oluşan Formamit Miktarının Belirlenmesi

Belirlenen optimum koşullar sabit tutularak *T. versicolor* hücreleri ile yapılan siyanür biyoyıkımı çalışmasının sonucunda yıkım ürünü olarak oluşması beklenen ürünlerden bir tanesi formamittir. Bölüm 3.5.1.3' de belirtildiği şekilde yapılan ölçümler sonucunda *T. versicolor* hücreleri ile siyanür yıkımına bağlı olarak formamit miktarında herhangi bir artış kaydedilememiştir.

4.12. Belirlenen Optimum Koşullarda Siyanür Yıkımından Sorumlu Olabilecek Siyanür Oksijenaz Aktivitesinin Ölçümü

Siyanür oksijenaz enzim aktivitesinin ölçümü 3.6.'da anlatıldığı şekilde tüketilen çözünmüş oksijen miktarının belirlenmesi ile yapılmıştır. Şekil 4.12.1.'de bu yöntemle göre yapılan ve kontrol grupları ile kıyaslamalı olarak verilen çözünmüş oksijen tüketim değerleri verilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda *T. versicolor* hücreleri ile süre ilerledikçe çözünmüş oksijen tüketiminin arttığı ancak kontrol gruplarında kayda değer bir değişimin olmadığı dikkat çekmektedir.



Şekil 4.12.1. CN Biyoyıkımında Zamana Bağlı Ortamdaki çözünür-O₂ miktarındaki Değişimler (Çalışma koşulları: pH 10.5 (NaOH-NaHCO₃ tamponu), başlangıç siyanür konsantrasyonu yaklaşık 125 mg/l, sıcaklık 30 °C, eklenen biyokütle (yaş) miktarı 3.5 g)

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde endüstriyel alana çok fazla yatırım yapılmasının doğal bir sonucu olarak bu endüstrilerin atıkları çevreye yayılmaktadır. Çevreye yayılan bu kirleticiler ya zamanla bozunurlar ya da bozunmadan yıllarca kalabilirler. Bu durum gerek insan ve çevre sağlığı ve gerekse ülkelerin ekonomisi üzerinde olumsuz sonuçlar doğurabilir.

Bu nedenle endüstriyel alandaki bu hızlı gelişime koşut bir şekilde kullanılan ham maddelere bağlı olarak oluşan ve çoğunlukla çevresel açıdan tehdit oluşturan atıkların zararlı özelliklerinin ortadan kaldırılması ya da bu atıkların başka bir yolla değerlendirilmesi için gerekli teknolojilerin de geliştirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir.

Günümüzde, özellikleri bir birinden çok farklı olsa da içeriklerinde siyanür ve türevlerini içeren pek çok endüstriyel atık her geçen gün çevreye atılmaktadır. Bilinen en toksik madde olması nedeniyle siyanürün çevreye bırakılması ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Siyanürün arıtımına yönelik yapılan çalışmalardan en verimli sonuçlar biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ile elde edilmiştir.

Öncelikle etkin olan türü belirlemek amacıyla yapılan ön eleme çalışması ile *Trametes versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju* siyanür biyoyıkım yetenekleri açısından karşılaştırılmışlardır. Bu çalışma sonucunda *T. versicolor* (ATCC 200801) diğer denenen funguslardan daha yüksek bir siyanür yıkım yeteneği göstermesi nedeniyle en etkin tür olarak seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.1.1.).

En etkin tür olarak belirlenen *Trametes versicolor* (ATCC 200801) hücreleri ile siyanür yıkımı için optimum koşullar belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda *T. versicolor* hücrelerinin muhtemel olarak kullanabilecekleri metabolik yol izleri ve dolayısıyla enzim sistemlerinin anlaşılabilmesi nedeniyle siyanür yıkımı sonucu oluşan ürünler tespit edilmiştir. Ayrıca siyanür içeren atıklarda bulunabilecek olan etanol, metanol ve fenolün siyanür biyoyıkımı üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan daha önceki çalışmalarda *Trichoderma harzianum*'un ve diğer bazı *Trichoderma* türlerinin siyanür biyoyıkımı açısından etkili

türler oldukları bildirilmiştir (Ezzi and Lynch, 2002; Ezzi, et al., 2003). Etkin türün belirlenmesi amacıyla yapılan tarama çalışması sırasında, denenen 3 beyaz çürükçül fungusun yanısıra *T. harzianum* hücreleri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Şekil 4.1.1'den de anlaşıldığı gibi, *T. versicolor* (ATCC 200801) ve *P. chrysosporium* (ME 446) hücreleri, denenen diğer beyaz çürükçül fungus olan *P. sajor-caju* ve pozitif kontrol olarak seçilen *T. harzianum*'a kıyasla daha fazla siyanür biyoyıkım yeteneğine sahiptirler. *P. sajor-caju* hücreleri ile elde edilen siyanür biyoyıkım oranı düşük olsa bile yine pozitif kontrol olan *T. harzianum* ile kıyaslanabilir ölçüde bir siyanür biyoyıkımından söz edebiliriz. Bu durum bize denenen bütün beyaz çürükçül fungusların siyanür biyoyıkımı açısından literatürde bildirilenlerden daha yüksek bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.

Tarama çalışmasında elde edilen yıkım miktarının az olduğu düşünülebilir. Ancak tarama çalışmasında çok yüksek oranda başlangıç siyanür konsantrasyonu denenmiştir. Pereira ve arkadaşları (1996) endüstriyel atıklardan siyanür yıkımı yapabilen fungus türlerini izole etmişler ve ancak izolatlarının çoğunun 260 mg/l den daha yüksek siyanür içeren ortamlarda gelişme göstermediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte aynı çalışma kapsamında sadece *Fusarium oxysporium* ve *Gliocladium virens* olarak tanımladıkları fungusların 520 mg/l siyanür içeren ortamda gelişebildiklerini bildirmişlerdir (Pereira, et al., 1996). 300 mg/l'nin üzerindeki siyanür konsantrasyonlarının mikroorganizmalar için toksik olduğu bildirilmekle birlikte bazı çalışmalarda bu değer üzerinde denemelerin yapıldığı görülmektedir (Pereira, et al., 1996; Gürbüz, et al., 2004). Bu nedenle 400 mg/l gibi mikroorganizmalar dahil tüm canlılar için toksik olan bir değerde yüksek yıkım yeteneği göstermesi nedeniyle seçilen *T. versicolor* (ATCC 200801) ile elde edilen sonuçların literatürle kıyaslanabilir olacağı düşünülmektedir. Bu kadar yüksek konsantrasyonda siyanür içeren bir ortamda diğerleri arasından daha yüksek yıkım yeteneği nedeniyle seçilen *T. versicolor* hücreleri ile koşulların optimizasyonu sonucunda elde edilecek parametreler sayesinde daha yüksek yıkım değerlerine ulaşılabileceği de düşünülmektedir.

Çalışmada, ortamlardaki siyanür miktarının ölçümü için pikrik asit yöntemi kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde benzer çalışmalarda pikrik asit yönteminin çok tercih edildiği görülmektedir (Pereira et al., 1996; Adjei and Ohta, 1999; Akcil et al., 2003; Kao et al., 2003). Pikrik asit yöntemi spektrofotometrik bir yöntem olması ve

Fisher and Brown'a (1952) göre 1.0 mg/l duyarlılıkta hassas ölçümler yapılmasına olanak sağlaması nedeniyle kullanışlı bir yöntemdir.

CN yıkımı bakımından etkin tür olarak seçilen *T. versicolor* (ATCC 200801) hücreleri ile siyanür biyoyıkımı 30. saate kadar 6 saat aralıklarla ve 30. saatten itibaren 12 saat aralıklarla toplam 102 saat süreyle pikrik asit yöntemi ile ölçümler yapılarak takip edilmiştir. Şekil 4.2.1.'den de görülebileceği gibi 42. saatten itibaren yıkım miktarında önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Bu nedenle 42. saat, en uygun süre olarak belirlenmiştir. Kao ve arkadaşları (2003) *Klebsiella oxycota* hücrelerini kullanarak siyanür yıkımı amacıyla yapmış oldukları çalışmalarında 80 saat süreyle siyanür yıkımını takip etmişlerdir. Yaklaşık 48. saatten itibaren siyanür yıkımının dengeye ulaştığını bildirmişlerdir. Gurbuz ve arkadaşları (2004) *Scenedesmus obliquus* hücreleri ile siyanür yıkımını 72 saat süre ile takip etmişler ve büyüme ortamında yaklaşık 25. saatten itibaren etkin yıkım olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen optimum süre literatürle kıyaslandığında daha kısa sürede siyanür yıkımının gerçekleştiği söylenebilir.

Siyanür biyoyıkımı için yıkım ortamına eklenen *T. versicolor* (ATCC 200801) hücre miktarının etkisini araştırmak üzere 0.5 - 10.0 g arasındaki yaş ağırlık değerleri seçilmiştir. Beklendiği gibi biyokütle miktarındaki artışa koşut olacak şekilde siyanür biyoyıkımında da artış gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3.1.). 5.0 g ve daha yüksek biyokütle miktarı değerlerinde %90 civarında bir yıkım olduğu görülmüştür. Denemede seçilen en yüksek iki biyokütle miktarı olan 7.5 g biyokütle miktarı ile 36. saatten itibaren; 10.0 g biyokütle ile 30. saatten sonra çözeltide ölçülebilecek miktarda siyanür bulunmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda 3.5 g yaş ağırlık optimum biyokütle miktarı olarak seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda sabit tutulmuştur. Literatürde de biyokütle miktarının artmasıyla siyanür yıkımının arttığına ilişkin veriler bulunmaktadır (Raybuck, 1992; Pereira, et al., 1996).

Başlangıç siyanür konsantrasyonunun etkisini araştırmak üzere 25-200 mg/l aralığında siyanür içeren oramlarla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.1.'de verilmiştir; 125 mg/l siyanür konsantrasyonu düzeyine kadar başlangıç substrat konsantrasyonu arttıkça, biyoyıkım miktarında bir azalma olduğu ancak bu konsantrasyondan sonra ani bir düşüşün olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın sonucunda 125 mg/l CN optimum siyanür konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Burkholderia cepacia C-3 suşu ile yapılan bir çalışmada yaklaşık 400 mg/l siyanür konsantrasyonuna kadar *Burkholderia cepacia* C-3 suşunun etkilenmediği ancak daha yüksek konsantrasyonlarda etkilendiği bildirilmiştir (Adjei and Ohta, 2000). Daha düşük konsantrasyonlarda Ezzi ve Lynch (2002)'in yapmış oldukları çalışmada *Trichoderma spp.* ile yüksek siyanür yıkımı elde etmişler ve bu durumu organizmanın rhodanaz enzimi ile ilişkilendirmişlerdir. Padmaja ve Balagopal, *Rhizopus oryzae* ile yapmış oldukları çalışmalarında yaklaşık 130 mg/l siyanür konsantrasyonunda *R. oryzae*'nin etkin yıkım yapabildiğini bildirmişlerdir (Padmaja and Balagopal, 1985). *Fusarium oxysporum* hücrelerinin yüksek siyanür konsantrasyonlarına dirençli olduğu ve 500 mg/l'den daha yüksek konsantrasyonlarda bile gelişebildiği bildirilmiştir (Pereira et al., 1996; Pereira et al., 1999).

Siyanür biyoyıkımı üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada 20-60 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır. 30 °C'den daha yüksek sıcaklık değerlerinde sıcaklık yükseldikçe siyanür yıkım miktarında bir azalma olduğu dikkat çekmektedir (Bkz. Şekil 4.5.1.). 42 saat sonunda 30 °C'de %74.2 ile yüzde olarak en yüksek siyanür yıkım değerine ulaşılmıştır.

Bazı mikroorganizmalar için sıcaklık değeri azaldığında siyanür yıkım oranının arttığı bildirilmiş olmakla birlikte (Blumenthal, et al, 1968) bunun aksine sonuçlar da literatürde görülmektedir (Blumenthal, et al, 1968; Gurbuz, et al., 2004). Örneğin *Burkholderia cepacia* hücreleri ile 30 °C'de elde edilen siyanür yıkım oranının 15 °C'ye kıyasla daha fazla olduğu vurgulanmıştır (Blumenthal, et al, 1968). Çalışmamızda 20° ve 30 °C' de elde ettiğimiz sonuçlar bu durumu desteklemektedir. Bununla birlikte 30 °C'den sonra sıcaklığın artması yıkım miktarının azalmasına yol açmıştır. Yapılan denemeler çerçevesinde en düşük siyanür biyoyıkım değerine 20 °C'de ulaşılmıştır (Bkz. Şekil 4.5.1.).

İnkübasyon ortamının düşük pH değerlerinde negatif kontrol grubu ile çalışma gruplarında birbirine siyanür yıkımı bakımından çok yakın değerler elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.6.1.). Bu nedenle pH 3.0, 4.0 ve 5.0 pH değerlerinde siyanür biyoyıkımından söz etmek mümkün olamamaktadır. pH 6.0, 7.0 ve 8.0 değerlerinde çalışma grubunda kontrolden biraz daha fazla giderim olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.6.1.). Ancak yine kontrol gruplarında yüksek miktarda kendiliğinden bir siyanür uzaklaşması görülmektedir. Literatür bilgisine göre düşük pH değerlerinde sulu

çözeltilerde bulunan CN anyonları doğal olarak HCN haline gelmekte ve gaz halinde ortamdan uzaklaşmaktadır (online: <http://www.cyanidecode.org>; Botz, 2001). İnkübasyon ortam pH değerinin 9.0 ve daha yüksek olduğu durumlarda HCN formunda kendiliğinden uzaklaşmanın daha az oranda olduğu ve bu durumun pH değeri arttıkça azaldığı bilinmektedir (Botz, 2001). Bu nedenle pH 9.0 dan yüksek pH değerleri daha sık aralıklarla çalışılmıştır (9.0-9.5-10.0-10.5-11.0). Özellikle pH değeri 9.5 ve daha yüksek değerlerde HCN formunda uzaklaşmanın neredeyse ölçülemeyecek kadar düşük konsantrasyon değerlerinde olduğu görülmüştür. Bu pH değerleri arasında elde edilen siyanür biyoyıkım oranları birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek giderim oranına pH 10.5’de ulaşılmıştır (Bkz. Şekil 4.6.1). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı çalışmaların büyüme ortamına siyanür ilavesi ile yapıldığı görülmektedir (Pereira, et al., 1996). Ancak funguslar özellikle asidik pH değerlerinde daha iyi gelişim gösterirler. Asidik pH değerlerinde ise siyanür yıkımının biyolojik yolla olduğunu ileri sürmek her zaman mümkün olamamaktadır. Bununla birlikte nötral pH değerlerinde ve bazik pH değerlerinde de pek çok çalışmanın yapıldığı ve bu koşullarda elde edilen değerlerin daha sağlıklı bir şekilde biyoyıkım olarak yorumlanabileceği açıktır (Ezzi, et al., 2003; Gurbuz, et al., 2004; Ebbs, 2004).

İnkübasyon ortamının ajitasyonunun ve havalandırmanın etkisinin araştırıldığı denemelerde Şekil 4.7.1.’de görüldüğü gibi statik etüvde yapılan inkübasyon sonunda en düşük yıkım değerinde ulaşılrken, 150 rpm’e kadar çalkalama hızı artıkça yıkım oranı da önemli derecede artış göstermiştir. Ancak 150 rpm’den sonra yıkım miktarında bir artış kaydedilmemiş ve hatta bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu nedenle optimum çalkalama hızı olarak 150 rpm seçilmiştir.

Etkin tür olarak belirlenen *T. versicolor* ATCC (200801) hücreleri ile yapılan optimizasyon denemeleri sonucunda optimum süre olarak 42 saat; biyokütle miktarı 3.5 g (yaş ağırlık); başlangıç siyanür konsantrasyonu 125 mg/l; sıcaklık değeri 30 °C; pH değeri de 10.5 olarak belirlenmiştir.

Doğada pek çok tehlikeli atık bulunmakla birlikte bu atıkların tek başına bulunduğu ortamlar olduğunu söylemek çoğu zaman zordur. Dolayısıyla endüstriyel atıklar pek çok kirleticiyi ve bunların yanı sıra bu kirleticilerin parçalanmasına olumsuz etkiler gösterebilen kimyasalları da bulundurlar.

Adjei ve Ohta (2000)'ya göre kömür, çelik ve metal endüstrilerinin atık suları gibi siyanür içeren atıklarda bulunabilecek en önemli kirleticiler etanol, metanol ve fenoldür. *T. versicolor* ATCC (200801) ile yapılan bu çalışmada, belirlenen optimum koşullarda kirletici olarak etanol, metanol ve fenolün tek tek ve birlikte buldukları durumlarda siyanür yıkımı üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; etanolün 100 mg/l konsantrasyondan itibaren *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür yıkımını olumsuz yönde önemli ölçüde etkilediğini söyleyebiliriz (Bkz. Şekil 4.8.1.). Fakat, metanol ve fenolün siyanür yıkımı üzerine olumsuz etkisinin etanole oranla çok daha az olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.8.1.). Kang ve Kim (1993) *Pseudomonas* sp. hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada fenolün siyanür yıkımı üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz veriler bu çalışma ile paralellik göstermiştir. Ancak Adjei ve Ohta (2000) *Burkholderia cepacia* C-3 suşu ile yapmış oldukları çalışmada etanol ve metanolün siyanür yıkımı üzerinde etkisiz ve ancak fenolün önemli derecede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Etanol, metanol ve fenolün birlikte bulunması durumunda *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür yıkım yeteneğinde önemli oranda azalma kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.8.2.). Bu durumun etanolün etkisi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Elde edilen veriler sonucunda *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür ile birlikte metanol ve fenol içeren atık suların arıtımında da etkin olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Siyanürün biyoyıkımı sonucu oluşabilecek ürünler mikroorganizmanın sahip olduğu enzim sistemine bağlı olarak karbondioksit, formik asit, formamit ve amonyak olduğu bilinmektedir (Raybuck, 1992). Dolayısıyla *T. versicolor* ATCC (200801) hücreleri ile siyanür yıkımı sonucunda oluşması beklenen ürünlerden bir tanesi amonyaktır. Literatür bilgisine göre biliyoruz ki, oluşan amonyağın kaynağı siyanürde bulunan azottur (Harris and Knowles,1983; Dorr and Knowles 1989; Raybuck, 1992). Optimum koşullarda yapılan çalışmada 42. saate kadar siyanür yıkımında gözlenen sürekli artışa koşut olarak amonyak miktarında da artış kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.9.1.). Ölçülen amonyağın siyanür yıkımı sonucunda oluşan bir yıkım ürünü olup olmadığını anlamak için iki farklı kontrol grubu oluşturulmuştur. Birinci kontrol grubu, hücre çalışmasının kontrolü olarak, hücre içermeyen, siyanür-tampon çözeltisidir. Diğer kontrol ise siyanür içermeyen pH 10.5 NaOH-NaHCO₃ tamponu içerisine *T.*

versicolor hücreleri ilave edilerek oluşturulmuştur. Burada amaç ölçülen amonyağın bir yıkım ürünü mü yoksa tampon sistemde hücrelerden proteoliz sonucu mu oluştuğunu göstermektir. Her iki kontrol grubunda da amonyak tayininde kullanılan Nesslerizasyon yöntemine göre 420 nm’de okunan absorbans değerlerinin zamanla değişim göstermediği görülmüştür. Bu da bize oluşan amonyağın *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanürü parçalaması sonucunda oluştuğunu göstermektedir. (Raybuck, 1992; Kao, et al., 2003).

Literatürde siyanür yıkımında kullanıldığı bildirilen fungusların çoğunun yıkım ürünleri olarak formik asit ve formamit oluşturdukları bildirilmektedir (Raybuck, 1992; Pereira, et al., 1996). Buradan yola çıkarak *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin de bu ürünleri oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. Ancak amonyak çalışmasına benzer şekilde oluşturulan kontrol grupları ile çalışma grubunun verdiği sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık görülemediği. Bu nedenle *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür yıkım ürünü olarak adı geçen ürünleri oluşturmadığı düşünülmektedir. Bu da bize *T. versicolor* ATCC (200801)’un formamit hidroliz enzimine sahip olmadığını düşündürmektedir.

Yıkım ürünü olarak amonyak oluşması ve bunun yanısıra formik asit ve formamit gibi siyanürdeki karbondan oluşabilecek ürünlerin ortamda belirlenememesi sonucunda *T. versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür biyoyıkımı için muhtemelen *siyanür oksijenaz* enzim sisteminin kullanabildiğini düşündürmektedir. Ancak burada karbondioksit oluşup oluşmadığının da kontrol edilmesi yerinde olacaktır. Bununla birlikte çalışılan ortam pH değerinin 10.5 gibi yüksek bazik karakterde olması ve ortamda NaOH gibi kuvvetli bir CO₂ bağlayıcısının bulunması nedeniyle bu ortamda çözünmüş karbondioksit okumak bilinen yöntemlerle mümkün olmamıştır. Ancak yapılan birkaç çalışmada ¹⁴C işaretli K¹⁴CN kullanılarak sintilasyon yöntemi ile yıkım ürünü olarak karbondioksit oluştuğu gösterilmiştir (Fry and Millar, 1972; Door and Knowles, 1989).

Siyanürün biyoyıkım ürünü olarak amonyak ve karbondioksit oluşturabilecek diğer bir enzim grubu *nitrojenazlardır* (Raybuck, 1992). Ancak bu grup enzimlerin aerobik koşullardan olumsuz etkilenmesi nedeniyle bu çalışmada kullanılan yıkım koşullarında aktivite göstermesi beklenmemektedir.

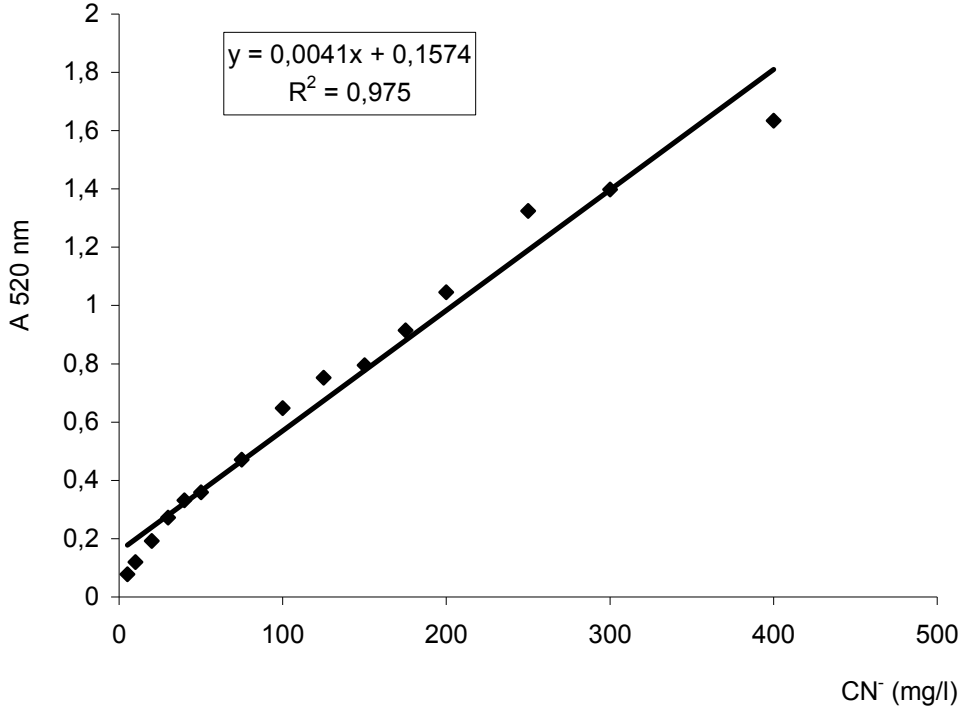
Siyanür yıkımında rolü olduğu bilinen enzimlerden bir diğeri de *siyanür oksijenaz* enzimidir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda oluşan ürünler karbondioksit ve amonyaktır. Literatürde siyanür oksijenaz enziminin ölçüm yöntemi olarak oksijen tüketiminin takibine dayalı bir yöntem önerilmektedir (Haris and Knowles, 1983). Şekil 4.12.1’de görüldüğü gibi, oksijen tüketimi 48 saat süre ile takip edilmiştir. Çalışma sonucunda oluşturulan kontrol gruplarındaki oksijen miktarındaki azalmanın çalışma grubuna göre oldukça düşük oranda olduğu görülmektedir. Gerek yıkım ürünlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar ve gerekse oksijen tüketiminin takip edilmesi çalışmalarının sonuçlarına bakarak, *Trametes versicolor* ATCC (200801)’in siyanür oksijenaz enzimi aracılığıyla siyanür yıkımını gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.

Beyaz çürükçül funguslar ile siyanür biyoyıkımı açısından literatürde sınırlı sayıda çalışmaya rastlanırken, özellikle bu çalışmada etkin tür olarak belirlenen *Trametes versicolor* ATCC (200801) ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle elde edilen verilerin bu alandaki yapılan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. *Trametes versicolor* ATCC (200801) hücrelerinin siyanür içeren endüstriyel atıksuların arıtımında ve siyanür ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde etkin olarak kullanılacak potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

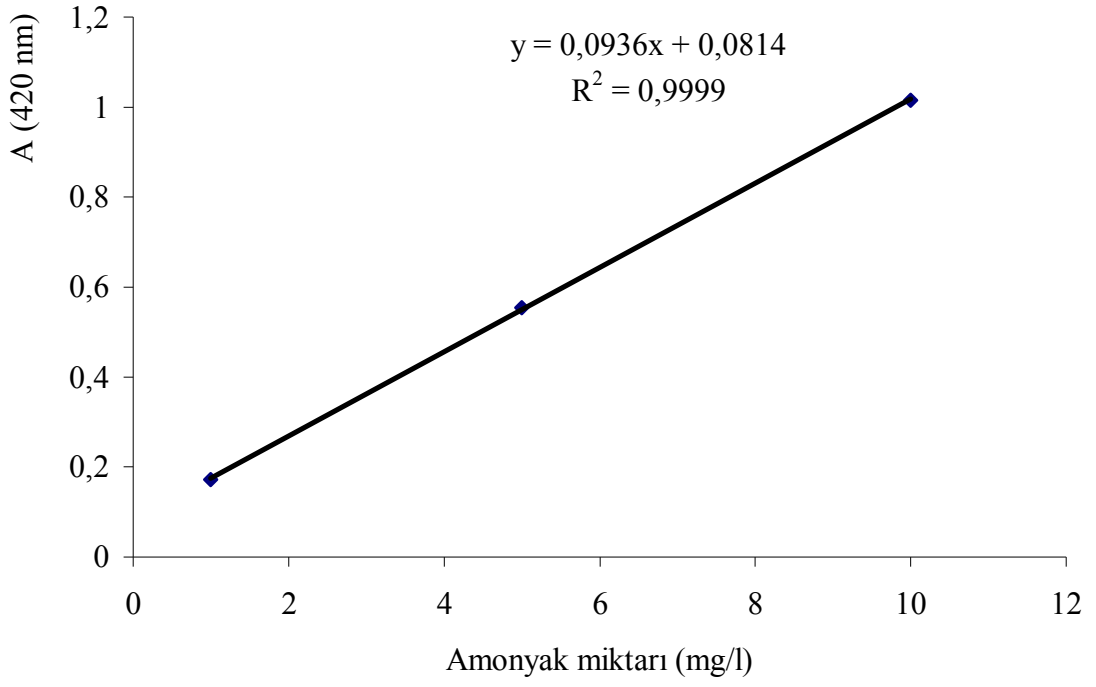
6. EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar-A. Modifiye Vogel Besiyerinin Hazırlanması

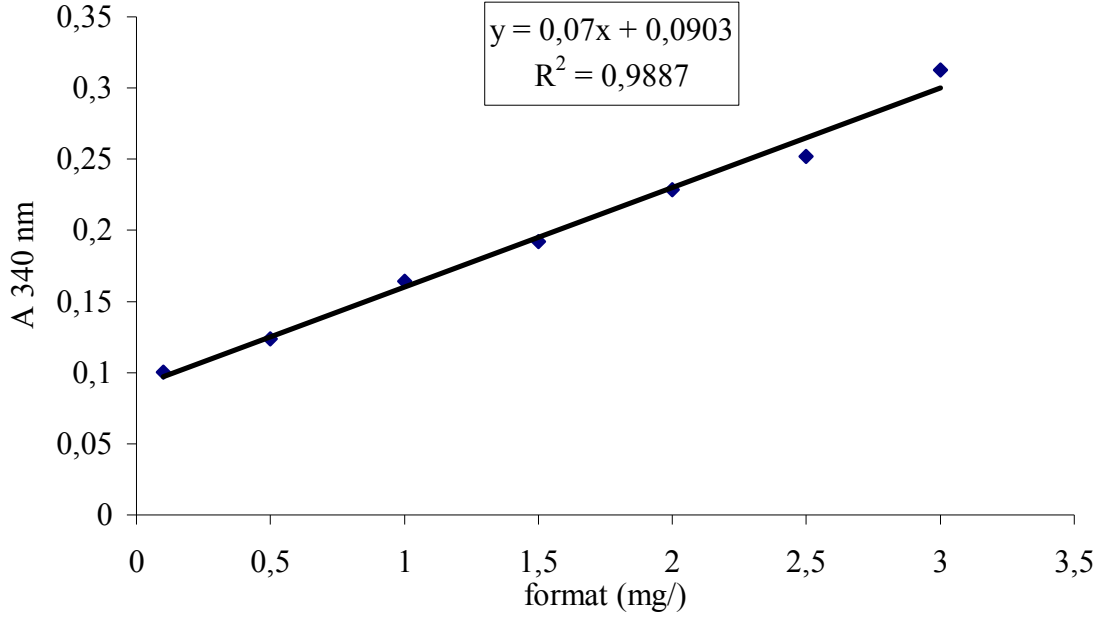
Bu çalışmada, Ünal (2004) tarafından karbon ve vitamin kaynakları değiştirilerek elde edilen modifiye vogel ortamı kullanılmıştır. Modifiye vogel sıvı besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Ana stok çözeltisine (g/100 ml olarak; Na-sitrat: 15, Sitrik asid monohidrat: 2.5, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 2.5, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$: 0.5, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0.125, $MnSO_4 \cdot H_2O$: 0.025, H_3BO_3 : 0.025, $H_3P[(Mo_3O_{10})]H_2O$: 0.025) %1 (v/v) oranında eklenerek elde edilen karışıma daha sonra % 3 oranında glukoz (Merck) eklenip, 1 N HCl ile pH'sı 4.7' ye ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanıp 1000 ml'lik Erlen-meyer şişelerine 500 ml hacminde dağıtılan ve daha sonra 1.5 atm basınç altında 110 °C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilen glukoz-mineral tuz çözeltilerine milipor filtrasyonu ile sterilize edilmiş, % 0.1 thiamin-HCl çözeltisinden %0.1 (v/v) oranında eklenmiştir.

Ek Açıklamalar-B. Standart Eğriler

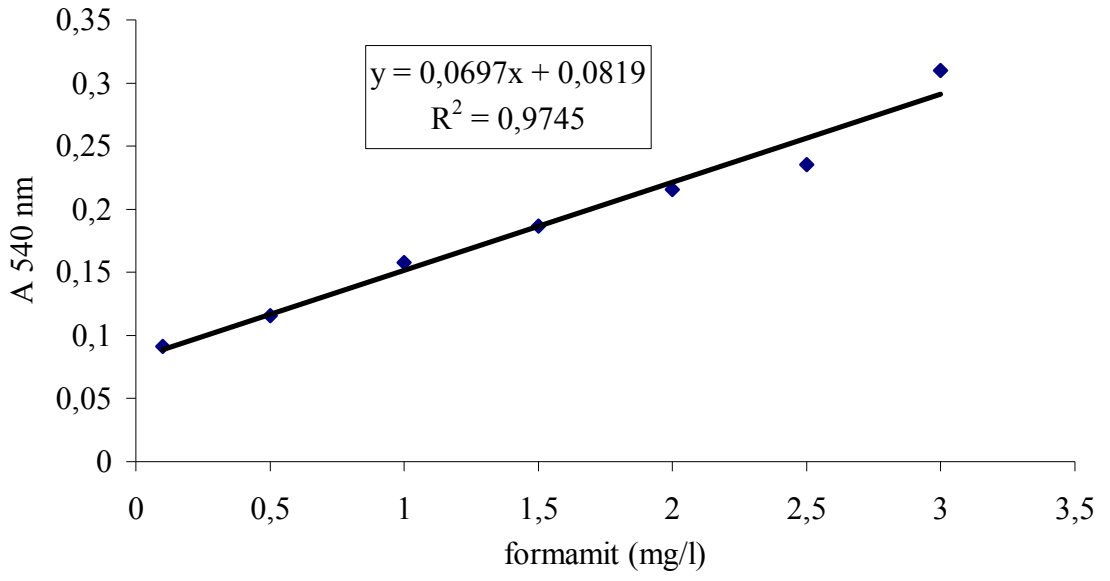
Şekil B.1. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siyanür çözeltilerinin pikrik asit yöntemine göre 520 nm dalga boyunda okunan absorbanans değerleri ve elde edilen standart eğri.



Şekil B.2. Nesslerizasyon yöntemi ile elde edilen standart eğri.



Şekil B.3. Formik asit miktarının belirlenmesi yöntemine göre elde edilen standart eğri.



Şekil B.4. Formamit miktarının belirlenmesi yöntemine göre elde edilen standart eğri.

Ek Açıklamalar-C. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Stok Siyanür Çözeltisinin Hazırlanması:

1 g siyanür (CN) için gerekli olan KCN (Merck) miktarı (2.50275 g) orantıyla hesaplanarak tartıldı ve 1 l'ye hangi pH tamponunda hazırlanacaksa o tampon çözeltisi ile tamamlanarak 1g/l'lik stok siyanür çözeltisi hazırlanmıştır. Denemeler sırasında bu stok çözeltiden yine aynı tampon çözelti ile gerekli seyreltme yapılarak istenilen konsantrasyonlarda siyanür çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin pikrik asit yöntemi ile ölçümleri yapılarak konsantrasyonları kontrol edilmiştir.

pH Tamponları İçin Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması:

pH optimizasyonu için seçilen pH değerleri 3.0-11.0 arasındadır. 3.0-4.0-5.0 pH değerleri için asetat tamponu; 6.0-7.0-8.0 pH değerleri için fosfat tamponu; 9.0-9.5-10.0-10.5-11.0 pH değerleri için NaOH-NaHCO₃ tamponu kullanılmış ve adı geçen bu tamponlar içerisinde siyanür çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponların hazırlanmasında Perrin and Dempsey, 1974'de verilen ve aşağıda gösterilen çizelgelerden yararlanılmıştır.

Çizelge C.1. Sodyum asetat- asetik asit tamponunun hazırlanması

pH	X
3.0	0.3
4.0	1.85
5.0	6.95

x ml 2 M sodyum asetatından alınır ve (10-x) ml 2 M asetik asit ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge C.2. Na₂HPO₄- NaH₂PO₄ tamponunun hazırlanması

pH	X
6.0	6.15
7.0	30.5
8.0	47.35

x ml 0.2 M Na₂HPO₄ (13.6 g/l) alınır ve (50-x) ml 0.2 M NaH₂PO₄ (4.0 g/l) ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge C.3. NaHCO₃-NaOH tamponunun hazırlanması

pH	X
9.0	3.1
9.5	5.0
10.0	10.7
10.5	17.8
11.0	22.7

50 ml 0.05 M NaHCO₃ (4.2 g/l) alınır ve x ml 0.1 M NaOH (4.0 g/l) ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanır.

% 1.0'lik Pikrik Asit Çözeltisinin Hazırlanması:

Ticari olarak satılan pikrik asitten (Fluka) 2.75 g tartılıp, 250 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Na₂CO₃ (0.5 M) Çözeltisinin Hazırlanması:

13.2485 g Na₂CO₃ (Merck) tartılarak 250 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Nesslerizasyon Yöntemi İçin Disodyum Etilendiamin Tetraasetat Dihidrat (EDTA) Çözeltisinin Hazırlanması:

10 g NaOH içeren 60 ml distile su içerisinde 50 g EDTA çözülmüştür (Tamamen çözülme sağlanana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Gerekli ise hafif bir ısıtma uygulanabilir). 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.

NaOH (3.5 N) Çözeltisinin Hazırlanması

140 g NaOH (Merck) tartılarak 1 l'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Hidroksilamin Hidroklorit (2.3 M) Çözeltisinin Hazırlanması:

15.98 g hidroksilamin hidroklorit (Merck) tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

HCl (4 N) Çözeltisinin Hazırlanması:

%37'lik HCl (Merck)'den 324 ml alınır ve litreye distile suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

FeCl₃ (1.23 M) Çözeltisinin Hazırlanması:

19.95.g FeCl₃ (Merck) tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Etanol, Metanol ve Fenol Çözeltilerinin Hazırlanması:

Derişik etanol (Merck), metanol (Merck) ve fenol (Fluka) den orantı ile hesaplanarak elde edilen miktarlar ilave edilerek istenilen konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır.

Ek Açıklamalar-D. Kullanılan Gereçler

1. Otoklav, Prior
2. UV-Visible Spektrofotometre, Jasco-V-530
3. Santrifüj, Selecta Meditronic
4. Hassas terazi, Sartorius CP224S
5. Vorteks, IKA mini shaker
6. Çalkalamalı su banyosu, Memmert
7. Çalkalamalı inkübatör, Otto-bühler
8. Steril kabin, Chemocell LRCX-Teknomar
9. Homojenizatör, Heidolph Silent Crusher M
10. pH-ion metre, WTW 735
11. Manyetik karıştırıcı, Heidolph MR 3001
12. Etüv, Binder
13. Jenway DO₂ meter 9071

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adjei, M.D. and Ohta, Y., 1999, Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 699-704.
- Adjei, M.D. and Ohta, Y., 2000, Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 3, 274-277.
- Akcil, A., Karahan, A.G., Ciftci, H. and Sagdic, O., 2003, Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.), *Minerals Engineering*, 16, 643-649.
- Aksu, Z., Çalik, A., Dursun, A.Y. and Demircan, Z., 1999, Biosorption of iron (III)-cyanide complex anions to *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms, *Process Biochemistry*, 34, 483-491.
- Aksu, Z. and Gülen, H., 2002, Binary biosorption of iron (III) and iron (III)- cyanide complex ions on *Rhizopus arrhizus*: modelling of synergistic interaction, *Process Biochemistry*, 38, 161-173.
- Atkinson, A., 1975, Bacterial cyanide detoxification, *Biotec. and Bioengin.*, 17, 457-460.
- Aust, S.D. 2003, Beyaz çürükçül fungusların yıkım mekanizmaları, (Çev. M. Arısoy), *Orlab on-line Mikrobiyoloji dergisi*, 1,11,17-21.
- Arısoy, M. and Kolankaya, N., 1997, Biodegradation of lindane by *Pleurotus sajor-caju* and toxic effects of lindane and its metabolites on mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 352-359.
- Barclay, M., Hart, A., Knowles, C.J., Meeussen, J.C.L. and Tett, V.A., 1998a, Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 223-231.
- Barclay, M., Tett, V.A. and Knowles, C.J., 1998b, Metabolism and enzymology of cyanide/metallocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions, *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 321-330.
- Basheer, S., Kut, Ö.M., Prenosil, J.E. and Bourne, J.R., 1992, Kinetics of enzymatic degradation of cyanide, *Biotec. and Bioengin.*, 39, 629-634.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Blumenthal, S.G., Hendrickson, H.R., Abrol, Y.P. and Conn, E.E., 1968, Cyanide metabolism in higher plants, *The J. of Biol. Chem.*, 243,20, 5302-5307.
- Boikesss, R., Breslauer, K. and Edelson, E., 1986, *Elements of Chemistry, General, Organic, and Biological*, Prentice-Hall., 768p.
- Botz, M.M., 2001, Overview of cyanide treatment methods, *Mining Environmental Management*, Mining Journal Ltd., London, UK., 28-30.
- Cain, K., and Skilleter, D.N., 1987, Preparation and use of mitochondria in toxicological research, In: *Biochemical toxicology, a practical approach*, Ed. Snell, K., ve Mullock, B., IRL Pres., 286p.
- Chin, R.G. and Calderon, Y., 2000, Acute cyanide poisoning: a case report, *The Journal of Emergency Medicine*, 18, 4, 441-445.
- Chen, J.L. and Kunz, D.A., 1997, Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore, *FEMS Microbiology Letters*, 156,61-67.
- Cunningham, L. and Williams, H.D., 1995, Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-intensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 177,2,432-438.
- Door, P.K. and Knowles C.J., 1989, Cyanide oxygenase and cyanase activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *FEMS Microbiology Letters*, 60, 289-294.
- Dökmeci, İ., 2001, *Toksikoloji, Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*, Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, 749s.
- Dumestre, A., Chone, T., Portal, J.M., Gerard, M. and Berthelin, J., 1997, Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 2729-2734.
- Dursun, A.Y. and Aksu, Z., 2000, Biodegradation kinetics of ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor, *Process Biochemistry*, 35, 615-622.
- Ebbs, S., 2004, Biological degradation of cyanide compounds, *Current opinion in Biotechnology*, 15, 231-236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P., 1990, Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, Heidelberg, 407 p.
- Evered, D. and Harnett, S., 1988, Cyanide compounds in Biology, John Wiley & Sons.
- Ezzi, M.I. and Lynch, J.M., 2002, Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp., *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 1042-1047.
- Ezzi, M.I., Pascual, J. A., Gould B.J. and Lynch J.M., 2003, Characterisation of the rhodanese enzyme in *Trichoderma* spp., *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 629-634.
- Fisher F.B. and Brown J.S., 1952, Colorimetric determination of cyanide in stack gas and waste water, *Analytical Chemistry*, 24, 9, 1440- 1444.
- Fry, W.E. and Millar, R.L., 1972, Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151, 468-74.
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. and Eaton, A.D., 1992, Standart Methods for the water and waste water 18th edition APHA, AWWA, WEF 1137p.
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A., 1984, Chemistry of elements, Butterworth, Heinemann, 1542.
- Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A. and Karahan, A.G., 2004, Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae, *Hydrometallurgy*, 72, 167-176.
- Harris, R.E. and Knowles, C.J., 1983, The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth, *FEMS Microbiology Letters*, 20, 337-341.
- Hol, W.G.J., Lijk, L.J. and Kalk, K.H., 1983, The high resolution three dimensional structure of bovine liver rhodanese, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3, 370-376.
- Ingvorsen, K.Yde B., Godtfredsen, S. and Tsuchiya, R, 1988, Microbial hydrolysis of organic nitriles and amides. In: Evered, D and Harnett, S (Eds). Cyanide compounds in biology, Jhon Wiley & Sons, New York, 16-31pp,
- Kao, C.M., Liu J.K., Lou, H.R., Lin C.S. and Chen, S.C., 2003, Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*, *Chemosphere*, 50, 1055-1061.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kang, S.M. and Kim, D.J., 1993, Degradation of cyanide by a bacterial mixture composed of new types of cyanide-degrading bacteria, *Biotechnology Lettr*, 15, 201-205.
- Kışlalıoğlu, M. ve Berkes, F., 1994, *Ekoloji ve Çevre Bilimleri*, Remzi Kitabevi, 2. Basım, İstanbul, 350s.
- Kowalska, M., Bodzek, M. and Bohdziewicz, J., 1998, Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms, *Process Biochemistry*, 33,2, 189-197.
- Kunz, D.A., Nagappan, O., Avalos, J.S. and Delong, G., 1992, Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion, *Applied and Environmental Microbiology*, 58,6, 2022-2029.
- Kunz, D. A., Wanf, C.S. and Chen, J.L., 1994, Alternative routes of enzymatic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *Microbiology*, 140, 1705-1712.
- Kunz, D.A., Chen, J.L. and Pan, G., 1998, Accumulation of α -keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *Applied and Environmental Microbiology*, Nov, 4452-4459.
- Kunz, D.A., Fernandez, R.F. and Parab, P., 2001, Evidence that bacterial cyanide oxygenase is a pterin-dependent hydroxylase, *Biochemical and biophysical research communications*, 287, 514-518.
- Knowles, C.J. and Bunch, A.W., 1986, Microbial Cyanide Metabolism, *Adv. In Microbial Physiology*, 27, 73-111.
- Lara, M.A., Malavar, A.J.R., Rojas, O.J., Holmquit, O., Gonzalez, A.M., Bullon, J., Peraloza, N. and Araujo, E., 2003, Black liquar lignin biodegradation by *Trametes elegans*, *Int. Biodet. And Biodeg.*, 52, 167-173.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, 8th edition, Prentice Hall, 986p.
- Meyers, P.R., Rawlings, D.E., Woods, D.R. and Lindsey, G.G., 1993, Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1, *Journal of Bacteriology*, Oct., 6105-6112.

On-line: www.cyantists.com.

On-line: www.cyanicode.org

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Padmaja, G. and Balagopal, C., 1985, Cyanide degradation by *Rhizopus oryzae*, *Can. J. of Microbiol.*, 31, 663-669.
- Patil, Y.B. and Paknikar, K.M., 2000, Development of a process for biotransformation of metal cyanides from waste waters, *Process Biochemistry*, 35, 1139-1151.
- Pereira P.T., Arrabaça, J.D. and Amaral Collaço, M.T., 1996, Isolation, selection and characterization of a cyanide-degrading fungus from an industrial effluent, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45-52.
- Pereira, P., Pires, A.S. and Roseiro, J.C., 1999, The effect of culture aging, cyanide concentration and induction time on formamide hydro-lyase activity of *Fusarium oxysporum* CCMI 876, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 736-744.
- Perrin, D.D. and Dempsey, B., 1974, *Buffers for pH and Metal ion control*, Chapman and Hall, 176p.
- Raybuck, S.A., 1992, *Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation*, 3, 3-18.
- Rollinson, G., Jones, R., Meadows M.P., Harris, R.E. and Knowles, C.J., 1987, The growth of a cyanide utilising strain of *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture on nickel cyanide as a source of nitrogen, *FEMs Microbiology Letters*, 40, 199-205.
- Shah, M.M., Grover, T.A. and Aust, S.D., 1991, Metabolism of cyanide by *Phanerochaete chrysosporium*, *Archives of biochemistry and biophysics*, 290, 1, 173-178.
- Shah, M.M., Barr, D.P., Chung, N. and Aust S.D., 1992, Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals, *Toxicology Letters*, 64/65, 493-501.
- Sorbo, B.H., 1955, Rhodanese, *Methods in Enzymology*, 2, 334-337.
- Skoog, D.A., West, D.M. and Holler, F.J., 1996, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Saunders College Publishing.
- Suh, Y.J., Park, J.M. and Yang J.W., 1994, Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite, *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 529-533.
- Taşpınar, A. and Kolankay, N., 1998, Optimization of enzymatic chlorine removal from kraft pulp, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 15-28.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Towill, L.E., Dury, J.S., Whitefield, B.L., Lewis, E.B., Galyan, E.L. and Hammons, S., 1978, Review of the environmental effect of pollutants, V. Cyanide, US. Cincinnati, OH: Environmental Protection Agency.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., 2000, Biodegradation of lignin in copost environment: a review, *Bioresource Tech.* 72, 169-183.
- Ünal, A. and Kolankaya, N., 2001, Dechlorination of bleached kraft pulp by laccase enzyme produced from some white-rot fungi, *Turkish Journal of Biology*, 25,1, 67-72.
- Ünal, A., 2004, Lakkaz enzimi ile bazı toksik klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonu, Doktora Tez, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 104s.
- Wang, C.S., Kunz, D.A. and Veanables, B.J., 1996, Incorporation of molecular oxygen and water during enzymatic oxidation of cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *Applied and Environmental Microbiology*, 62,6, 2195-2197.
- Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K. and Karube I., 1998, Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase, *Microbiology*, 144, 1677-1682.

ÖZGEÇMİŞ

Bu tez ile Doktora çalışmasını sunan Ahmet Çabuk, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup, 04.06.1977 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini Ankara'da tamamladı. 1999 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden lisans derecesini aldı. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevini sürdürmektedir. 2001 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı'ndan yüksek lisans derecesini aldı.