

Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Siyanür Biyodegradasyon Yeteneği Açısından
Değerlendirilmesi ve Optimum Koşulların Belirlenmesi

Yasemin Kevser Özel

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2008

Evaluation of cyanide biodegradation ability of various macrofungus isolates and
determination of optimum conditions

Yasemin Kevser Özel

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

July 2008

Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Siyanür Biyodegradasyon Yeteneği Açısından
Değerlendirilmesi ve Optimum Koşulların Belirlenmesi

Yasemin Kevser Özel

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

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Temmuz 2008

Yasemin Kevser ÖZEL' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Siyanür Biyodegradasyon Yeteneği Açısından Değerlendirilmesi ve Optimum Koşulların Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

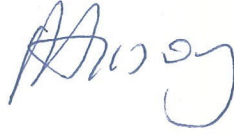
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK (Danışman)



Üye : Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA



Üye : Prof. Dr. Münevver ARISOY



Üye : Doç. Dr. Tamer AKAR



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) gibi *Basidiomycetes* sınıfına ait funguslardan siyanür yıkım yetenekleri bakımından etkin türler seçilmiştir. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Ganoderma lucidum* (D 33) hücrelerinin diğerlerine kıyasla daha yüksek siyanür yıkım yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Seçilen bu etkin türlerle; siyanür yıkımı için, başlangıç siyanür konsantrasyonu, pH, biyokütle miktarı, inkübasyon süresi, çalkalama hızı ve sıcaklık gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimum siyanür yıkım değeri; 100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu, pH 10.5, 3.0 g yaş biyokütle miktarı, 48 saat inkübasyon süresi, 100 rpm çalkalama hızı ve 30 °C sıcaklık koşullarında elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarından elde edilen deneysel verilere göre *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri diğerlerine kıyasla daha yüksek bir siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeni ile seçilerek agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilmiştir. Agarda immobilize hücrelerin daha yüksek siyanür biyoyıkım yetenekleri olduğu görülmüştür.

Laboratuvar koşullarında hazırlanan çözeltilerde elde edilen arıtım değerlerinin endüstriyel atıksularda da etkinliğinin araştırılması için Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örnekleri alınarak karakterizasyonları yapılmış ve agarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri belirlenen optimum koşullarda uygulanarak atıksulardaki siyanür biyoyıkım yetenekleri araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre agarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin siyanür ve türevlerini içeren endüstriyel atıksularda kullanılabiliceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyoyıkım, makrofungus, siyanür

SUMMARY

In this study, it is chosen some effective species of fungus belonging to *Basidiomycetes* category in terms of their degradation abilities such as *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35) and *Ganoderma lucidum* (D 33). It is seen that *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Ganoderma lucidum* (D 33) cells have got more cyanide degradation effect when compared to the others. The parameters such as initial cyanide concentration, pH, biomass amount, incubation time, agitation rate and temperature are optimized in these chosen effective species. The optimum cyanide degradation value is obtained in 100 mg/l initial cyanide concentration, pH 10.5, 3.0 biomass, 48 hours incubation process, 100 rpm agitation rate and 30 °C.

Polyporus arcularius (T 438) cells are chosen since they have got more cyanide biodegradation capability when compared to the others according to the data obtained from the optimization studies and they are immobilized in agar and polyacrylamide gel. It is seen that the cells which are immobilized in agar have higher cyanide biodegradation capabilities.

Waste water samples including cyanide and its derivatives are obtained from ESKİ contamination refinement institution in Eskişehir organized industry zone in order to research the efficiency of the refinement values obtained from the solutions prepared under laboratory conditions in industrial waste water. These samples are characterized and determined cyanide biodegradation capabilities by *Polyporus arcularius* (T 438) cells which are immobilized in agar.

According to the results; it is thought that *Polyporus arcularius* (T 438) cells immobilized in agar can be used in industrial wastewater which is including cyanide and its derivatives.

Keywords: biodegradation, macrofungi, cyanide

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesinde, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çabuk' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yalçın Şahin, Sayın Prof. Dr. Nazif Kolankaya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç, Sayın Doç Dr. Naime Arslan ve Uzman Kimyager Zerrin Kaynak' a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemediğim yanımda olan ve destek veren Serap Gedikli, Özge Tabak ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim yaşantımda her zaman yanımda olduklarını bildiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET..... | v |
| SUMMARY..... | vi |
| TEŞEKKÜR..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | IX |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | X |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. SİYANÜR'ÜN GENEL ÖZELLİKLERİ..... | 4 |
| 2.1.1. Siyanür ve Bileşikleri..... | 4 |
| 2.1.1.1. Basit Siyanürler..... | 4 |
| 2.1.1.2. Toplam siyanürler | 5 |
| 2.1.1.3. Kompleks Siyanürler..... | 6 |
| 2.2. BAŞLICA SİYANÜR KAYNAKLARI..... | 6 |
| 2.2.1. Endüstride yapılan çeşitli aktivitelerde kullanılan siyanür bileşikleri..... | 6 |
| 2.2.2. Biyolojik Siyanür Üretimi..... | 7 |
| 2.2.2.1. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan siyanür..... | 7 |
| 2.2.2.2. Bitkiler tarafından siyanür üretimi | 8 |
| 2.2.3. Diğer Kaynaklar | 9 |
| 2.2.3.1. Küçük ve Büyük çaplı yangınlar | 9 |
| 2.2.3.2. Tıbbi amaçlarla siyanüre maruz kalınabilmektedir..... | 9 |
| 2.2.4. Madencilikte siyanür | 10 |
| 2.3. ÇEVRESEL AÇIDAN SİYANÜRÜN ÖNEMİ..... | 10 |
| 2.4. SİYANÜRÜN TOKSİK ETKİSİ..... | 12 |
| 2.5. SİYANÜRÜN ARITIMINDA KULLANILAN YÖNTEMLER | 17 |
| 2.5.1. Biyolojik Arıtım..... | 18 |
| 2.6. SİYANÜR YIKIMINDA ETKİLİ OLAN ENZİMLER..... | 21 |
| 2.7. KİRLETİCİ KİMYASALLARIN YIKIMINDA BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN KULLANIMI | 22 |
| 2.8. HÜCRE İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ..... | 24 |
| 2.8.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi | 25 |
| 2.8.2. Çapraz Bağlama Yöntemi | 26 |
| 2.8.3. Tutuklama (Entrapping) Yöntemi | 26 |
| 3. YÖNTEM VE GEREÇLER | 31 |
| 3.1. BESİYERİ ORTAMININ HAZIRLANMASI VE MİKROORGANİZMALARIN KÜLTÜRASYONU | 31 |
| 3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar | 31 |
| 3.1.2. Mikroorganizmaların Üretimi | 32 |

İÇİNDEKİLER(devam)

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. KÜLTÜRLERİN SİYANÜR BİYOKİM YETENEKLERİ..... | 32 |
| 3.2.1. Siyanür Ölçüm Yöntemi | 32 |
| 3.2.2. Amonyak Ölçüm Yöntemi | 32 |
| 3.3. SİYANÜR YIKIMINDA UYGUN KOŞULLARIN BELİRLENMESİ..... | 33 |
| 3.3.1. Başlangıç Siyanür Konsantrasyonunun CN Yıkımına Etkisi | 33 |
| 3.3.2. PH Değerinin CN Yıkımına Etkisi | 33 |
| 3.3.3. Biyokütle Miktarının CN Yıkımına Etkisi..... | 33 |
| 3.3.4. İnkübasyon Süresinin CN Yıkımına Etkisi | 34 |
| 3.3.5. Çalkalama Hızının CN Yıkımına Etkisi | 34 |
| 3.3.6. İnkübasyon Sıcaklığının CN Yıkımına Etkisi | 34 |
| 3.4. İMMOBİLİZASYON VE ENDÜSTRİYEL ATIKSU UYGULAMALARI | 34 |
| 3.4.1. Agarda İmmobilizasyon | 35 |
| 3.4.2. Poliakrilamid Jelde İmmobilizasyon | 36 |
| 3.4.3. İmmobilize Hücrelerin Belirlenen Uygun Koşullardaki Siyanür Biyokim Yeteneklerinin Araştırılması | 37 |
| 3.4.4. Endüstriyel Atıksu Karakterizasyonu | 38 |
| 3.4.5. İmmobilize Fungal Biyokütle ile Atıksuda Siyanür Biyokimi | 38 |
| 3.4.6. İmmobilize Biyokütlenin Kullanım Süresinin Belirlenmesi..... | 39 |
| 4. BULGULAR | 40 |
| 4.1. SİYANÜR BİYOKİMİ İÇİN ETKİN MİKROORGANİZMANIN BELİRLENMESİ | 40 |
| 4.2. BAŞLANGIÇ SİYANÜR KONSANTRASYONUNUN CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ | 41 |
| 4.3. PH DEĞERİNİN CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ..... | 42 |
| 4.4. BİYOKÜTLE MİKTARININ CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ | 43 |
| 4.5. İNKÜBASYON SÜRESİNİN CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ | 44 |
| 4.6. ÇALKALAMA HIZININ CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ..... | 45 |
| 4.7. İNKÜBASYON SICAKLIĞININ CN YIKIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ..... | 46 |
| 4.8. SİYANÜR BİYOKİMİNDE ORTAYA ÇIKAN AMONYAK MİKTARININ BELİRLENMESİ | 47 |
| 4.9. İMMOBİLİZE HÜCRELERİN BELİRLENEN UYGUN KOŞULLARDAKİ SİYANÜR BİYOKİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI..... | 48 |
| 4.10. ENDÜSTRİYEL ATIKSU KARAKTERİZASYONU VE İMMOBİLİZE FUNGAL BİYOKÜTLE İLE ATIKSUDA SİYANÜR BİYOKİMİ | 49 |
| 4.11. İMMOBİLİZE BİYOKÜTLENİN KULLANIM SÜRESİNİN BELİRLENMESİ | 50 |
| 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA | 51 |
| 6. EK AÇIKLAMALAR | 59 |
| 7. KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 64 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.2.2.2.1. Amigdalın'ın hidrojen siyanüre dönüşümü..... | 8 |
| 2.4.1. Siyanürün detoksifikasyon mekanizması..... | 13 |
| 2.3. Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı..... | 28 |
| 4.1.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701), <i>Clavariadelphus truncatus</i> (T 192), <i>Pleurotus eryngii</i> (M 102), <i>Ganoderma applanatum</i> (M 105), <i>Trametes versicolor</i> (D 22), <i>Cerrena unicolor</i> (D 30), <i>Schizophyllum commune</i> (D 35) , <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücrelerininCN Biyoyıkım Etkinlikleri | 40 |
| 4.2.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımında başlangıç siyanür konsantrasyonunun etkisi | 41 |
| 4.3.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile inkübasyon pH değerinin CN biyoyıkımına etkisi | 42 |
| 4.4.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımına biyokütle miktarının etkisi..... | 43 |
| 4.5.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımının inkübasyon süresine bağlı değişimi..... | 44 |
| 4.6.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile CN biyoyıkımına çalkalama hızının etkisi | 45 |
| 4.7.1. <i>Polyporus arcularius</i> (T 438), <i>Schizophyllum commune</i> (T 701) ve <i>Ganoderma lucidum</i> (D 33) hücreleri ile farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen % siyanür yıkımı | 46 |
| 4.8.1. Optimum koşullarda inkübasyon ortamında zamana bağlı CN ve amonyak miktarındaki değişimler | 47 |
| B.1. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siyanür çözeltilerinin pikrik asit yöntemine göre 520 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri ve elde edilen standart eğri. | 60 |
| B.2. Nesslerizasyon yöntemi ile elde edilen standart eğri..... | 61 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| Çizelge | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1.1.1. Önemli Siyanür Bileşikleri | 5 |
| 2.2.1.1. Endüstride kullanılan başlıca siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler..... | 7 |
| 2.4.2. Kandaki siyanür düzeyleri ve insanlardaki etkileri | 15 |
| 2.4.3. Solunum havasındaki CN ⁻ konsantrasyonu ve insanlarda ortaya çıkan etkiler | 16 |
| 2.5.1. Siyanür arıtım sürecinde yöntem seçimi için genel bir karşılaştırma. | 18 |
| 2.5.1.1. Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar..... | 20 |
| 2.6.1. Siyanür yıkımında görev alan enzimler ve oluşturdukları reaksiyonlar..... | 21 |
| 4.9.1. Agar ve poliakrilamid jele immobilize <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) hücreleri ve hücre içermeyen immobilize agar ile siyanür biyoyıkımı..... | 48 |
| 4.10.1. Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örneklerinin karakterizasyonu ve İmmobilize fungal biyokütlenin atıksuya uygulanması..... | 49 |
| 4.11.1. Agarda immobilize edilen <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) biyokütlelerin gün sonuçları . | 50 |
| C.1. Sodyum asetat-asetik asit tamponunun hazırlanması | 62 |
| C.2. Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄ tamponunun hazırlanması | 63 |
| C.3. NaHCO ₃ - NaOH tamponunun hazırlanması..... | 63 |

1. GİRİŞ

İnsanlar, yaşadıkları ortamlarda hem canlı hem de cansız çevre ile sürekli bir ilişki içerisindeyler. Yeryüzünde ilk insanın görülmesinden beri insan çevresi ile etkileşim kurmaya başlamış ve her geçen gün bu etkileşim daha da artmış ve nihayet insan yaşadığı çevreyi değiştirmeyi de bu süreçte öğrenmiştir. Günümüzde insanların hayatını kolaylaştıran olanaklar nedeni ile vazgeçemeyeceği endüstri ve teknoloji alanındaki gelişmeler insanların çevreye olan etkilerinin önemli bir boyutunu oluşturmaktadır. Özellikle 20. yüzyılın son yarısından itibaren hızla artan nüfus, teknolojik gelişmeler, endüstrileşme sürecinde ortaya çıkan çevre kirliliği problemleri ve bu sorunların üstesinden gelmekteki zorluklar insanoğlunun çevresindeki değişimlere kayıtsız kalamayacağını göstermiştir.

Çevreyi kirleten pek çok etken vardır. Dolayısıyla her birinin ayrı ayrı değerlendirilip çevrede yarattığı olumsuz etki ortadan kaldırılmalıdır. Ancak burada önemli olan ve arıtım teknolojilerinin geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken bir nokta çevrede kirleticilerin tek tek değil çoğunlukla birkaç çeşidinin bir arada bulunmasıdır. Bu durumda geliştirilen ve geliştirilecek olan arıtım teknolojilerinin çevresel uygulamalarda başarılı olabilmesi için atık karakterizasyonunun iyi bilinmesi zorunludur.

Günümüzde çevreyi kirleten kimyasalların arıtımı için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemler, süreç sonucunda atık bir bileşen bırakmaması, arıtım için ilave bir kimyasala gereksinim duymaması ve daha da önemlisi bu süreçte kullanılan biyokütlelerin yenilenebilir olması nedeni ile diğer arıtım yöntemlerinden bir adım öne geçmektedir. Biyolojik yöntemler disiplinler arası çalışmaları gerektiren yöntemleri içerdiği için artık günümüzde biyolojik arıtım süreçlerinden söz edilirken aslında biyoteknolojik arıtım süreçleri ifade edilmektedir.

Çevre kirliliğine neden olan organik ve inorganik özellikte çok sayıda kimyasal ve bunların türevleri bulunmaktadır. Bu kirleticiler arasında zaman zaman ülkemiz gündeminde tartışılan siyanür gerek toksik özellikleri ve gerekse arıtılmasındaki güçlükler nedeni ile önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada üretilen 1.4 milyon ton hidrojen siyanürün, % 13'ü sodyum siyanür şeklinde altın ve gümüş madenciliğinde

kullanılırken, % 87'si diğer endüstri kollarında (yapıştırıcı, bilgisayar, elektronik, kozmetik, boya, naylon, ilaç sektörleri vb.) kullanılmaktadır. Siyanür kullanan endüstrilerin yıllık ortalama 3 milyar litrenin üzerinde siyanür atığı oluşturdukları bilinmektedir (Raybuck, 1992; Mudder, 2001).

Siyanür arıtma yöntemleri, siyanür geri kazanımı ve aktif karbon adsorpsiyonu gibi fiziksel süreçler ve oksidasyon tabanlı kimyasal veya biyolojik süreçler olarak sınıflandırılabilir. Çoğu siyanür oksidasyon süreçleri, siyanür ve metal komplekslerini amonyak, siyanat ve nitrat gibi daha az toksik ürünlere dönüştürme prensibine dayanır. Siyanür oksidasyonu, kimyasal, katalitik, elektrolitik, biyolojik, ultrasonik ve fotolitik yöntemler kullanılarak uygulanabilir (Young and Jordan, 1995; Augugliaro ve arkadaşları, 1997; Saterlay ve arkadaşları, 2000; Botz, 2001; Mudder, 2001).

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).

Çevresel kirleticilerin biyolojik gideriminde pek çok potansiyel organizma bulunmakla birlikte, beyaz çürükçül funguslar sentezledikleri ve substrat spesifitesi göstermeyen enzimleri aracılığıyla çok değişik moleküler yapıdaki organik bileşiklerin stabilizasyonunda (mineralizasyonunda) önemli alternatif organizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan literatür taraması çalışmasının sonunda, bugüne kadar pek çok bakteri ve fungus türünün siyanür biyo-yıkımında kullanıldığı görülmüştür. Beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* (Shah ve arkadaşları., 1991; Çabuk, 2005) *Pleuratus sajor-caju* ve *Trametes versicolor*'un (Çabuk, 2005; Çabuk ve arkadaşları, 2006) siyanür biyoyıkımında kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar vardır. Ancak bu yüksek lisans tez çalışmasında kullanılması hedeflenen beyaz-çürükçül funguslarla siyanür biyoyıkımına yönelik yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada elde edilecek verilerin bu alanda yapılan bilimsel çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Eskişehir ve çevresinden izole edilen ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungi Kültür Laboratuvarı'nda

tanımlanmaları yapılan ve aynı laboratuvarında muhafaza edilen funguslardan bazıları kullanılmıştır. Bu türler arasında siyanür biyo-yıkım yeteneği açısından en etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularis* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımı için optimum koşullar belirlenmiştir. Seçilen en iyi tür ile belirlenen optimum koşullarda geliştirilmeye çalışılan arıtım sürecinin endüstriyel atıksulara uygulanma potansiyelini belirlemek için Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden alınan kompozit atık su örneği ile denemeler yapılmıştır. Endüstriyel uygulamalarda biyolojik arıtım için kullanılan organizmanın ortamdan alınması ve tekrar tekrar kullanımlarının önemli olması nedeni ile *Polyporus arcularis* (T 438) agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilerek denemelerde kullanılmıştır.

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 çıkarırlar. Cd, Cu ve Zn ile oluşturdukları zayıf ya da ılımlı kararlılıktaki kompleksler zayıf-asit ayrışabilir (WAD: weak-acid dissociable) olarak tanımlanır (Online: [www. cyantist.com](http://www.cyantist.com), Greenwood ve Earnshaw, 1984; Boikesss ve arkadaşları, 1986; Skoog ve arkadaşları, 1996).

Toksik bir bileşik olan siyanür canlı yaşamında dikkatle incelenmesi gereken önemli bir kirlilik parametresidir. Gerek doğal unsurlardan ve gerekse endüstriyel atıklardan çevreye ulaşan siyanür ve bileşikleri canlılar için çeşitli sorunlar oluşturur (Online: [www. cyantists.com](http://www.cyantists.com)).

2.1.1. Siyanür ve Bileşikleri

Siyanür kelimesi ile genel olarak CN^- iyonu anlatılmakla beraber siyanürün anorganik bileşiklerini üç ayrı grup altında incelemek mümkündür (Çelik ve ark., 1998). Önemli siyanür bileşikleri Çizelge 2.1.1.1.' de görülmektedir (Staunton, 1991).

2.1.1.1. Basit Siyanürler

Tüm diğer bileşiklerde olduğu gibi karbonla azotun oluşturduğu -1 değerlikli iyonla sahip $C\equiv N$ bileşiklerdir. Bu gruptaki bileşikleri de kendi aralarında üç ayrı grupta toplayabiliriz:

I-Serbest Siyanürler

Üç ayrı fiziksel halde, bileşikler halinde bulunan CN^- iyonu taşıyanlardır. En yaygın olarak tanınan hidrojen siyanür gazı veya sudaki çözeltisidir. Suda çok fazla çözünen HCN, CN^- dan daha toksik olup 26 °C'de kaynayan renksiz bir gazdır. Çözünürlüğü sıcaklığa ve sulu ortamın pH değerine bağlıdır.

II- Basit Siyanürler

$A(CN)_a$ şeklinde tanımlayabileceğimiz siyanür bileşikleridir. Burada A; sodyum potasyum gibi alkali veya metal amonyum iyonu olabilir. A'nın değeri ise 'a' olup

bileşikteki siyanür iyonunun sayısını göstermektedir. Örnek olarak $Ba(CN)_2$ ve $Cd(CN)_2$ v.b.

Çizelge 2.1.1.1. Önemli Siyanür Bileşikleri (Staunton,1991).

| | |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Serbest Siyanürler | HCN, CN |
| Basit Bileşikler a- Kolay çözünür b- Nisbeten çözünmez | NaCN, KCN, $Ca(CN)_2$, $Hg(CN)_2$, NH_4CN $Zn(CN)_2$, CuCN, $Ni(CN)_2$, AgCN, AuCN $Fe_2 Fe(CN)_6$, $Cu_4Fe(CN)_6$ |
| Zayıf kompleksler | $Zn(CN)_4^{-2}$, $Cd(CN)_3^{-}$, $Cd(CN)_4^{-2}$, $Zn(CN)_2(OH)_2^{-2}$ |
| Orta Kuvvetli Kompleksler | $Cu(CN)_2^{-}$, $Cu(CN)_3^{-2}$, $Cu(CN)_4^{-2}$, $Ni(CN)_4^{2-}$, $Ag(CN)_2^{-}$, $Fe(CN)_6^{-3}$ |
| Kuvvetli Kompleksler | $Fe(CN)_6^{4-}$, $Co(CN)_6^{4-}$, $Au(CN)_2^{-}$, $Hg(CN)_4^{-2}$, $Fe(CN)_6^{-3}$ |
| Diğer Reaksiyon ürünleri | SCN^{-} , CNO |

III-Zayıf Siyanür Kompleksleri

Genel anlamda kolay ayrışabilen siyanür kompleksleri olup sulu ortamda basit veya serbest siyanüre dönüşen bileşiklerdir. Kurşun, kadmiyum ve çinko siyanür komplekslerini örnek verebiliriz ($K_2[Cd(CN)_4]$, $K_3[Mn(CN)_6]$, $Na_2[Ni(CN)_4]$) (Yarar, 2001).

2.1.1.2. Toplam siyanürler

Fotokimyasal reaksiyon sonunda parçalanarak basit siyanür bileşiklerine dönen kuvvetli siyanür kompleksleridir. Ferri siyanür, Ferro siyanür, Hekza siyano kobalt, Tiyo siyanatı örnek olarak verilebiliriz.

2.1.1.3. Kompleks Siyanürler

Kuvvetli siyanür kompleks bileşikleri olup hesaplama ile derişimlerini belirlediğimiz siyanürlerdir ve genellikle güç ayrışabilenleri kapsamaktadır.

$$\text{Kompleks siyanür} = \text{Toplam siyanür} - \text{Basit Siyanür}$$

Bu sınıflamanın yanı sıra genelde siyanür bileşliğini $A_xM(CN)_y$ formülü ile gösterirsek burada A, alkali metal; M, ağır metali; x, A iyonunun sayısını; y ise x sayısı ve M ile gösterdiğimiz ağır metal iyon değerliğinin matematiksel toplamına eşit olup CN^- iyonu sayısıdır.

Diğer inorganik siyanür bileşiklerine ise çinko, kadmiyum, bakır, gümüş, altın, nikel, kobalt, krom, civa v.b. örnekleri verebiliriz. Ayrıca kompleks siyanür bileşiklerinde bir siyanür iyonu yerine nitro grubu girebilir. Örneğin sodyum nitro feri siyanürde olduğu gibi ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$).

Bu grublamanın dışında ele alabileceğimiz diğer siyanür bileşikleri ise organik yapıda olanlardır. Bu bileşikler organik kimyada sentez ve reaksiyonlarda çok kullanılmaktadır. Ayrıca reaksiyon sonunda veya ara basamak ürünleri olarak çevreye verilmeleri açısından da önem taşımaktadırlar. Organik yapıdaki siyanür bileşiklerinin başlıcaları; organik siyanürlerin fenollerle yaptıkları aromatik bileşikler, aldehit ve ketonlarla α , β etilen bileşikleri, aseto siyanohidrin, asetonitril, akrilonitril, laktonitril, klor izosiyanürik asit ve l-siyano-1,3 butadiyendir (Greenberg ve arkadaşları, 1992).

2.2. Başlıca siyanür kaynakları

2.2.1. Endüstride çeşitli aktivitelerde kullanılan siyanür bileşikleri

- Elektroliz kaplamacılık (NaCN)
- Altın ve gümüş madenciliği (NaCN)
- Metal, fotoğraf işleveciliği (alkali ve metal siyanürler)
- Boya üretimi (alkali ve metal siyanürler)
- Sentetik kauçuk ve plastik üretimi (NaCN, asetonitril, akrilonitril)
- Tarım ilaçları (rodentisit, insektisit, gübre yapısı içerisinde)
- Petrol rafinasyonu, kok kömürü ve havagazı fabrikaları yıkama suları (metal siyanürler, CN) olarak gruplandırılabilir (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları, 1999).

Çizelge 2.2.1.1. 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 - Elektrolatin - Organik sentezler - Metal parlaticı - 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 |

2.2.2. Biyolojik Siyanür Üretimi

2.2.2.1. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan siyanür

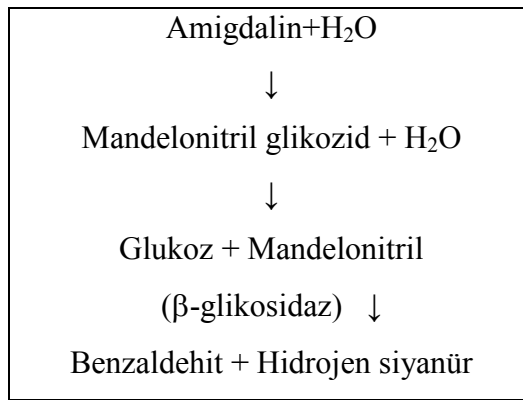
Doğada mikropsal siyanür üretimi de görülmektedir. Knowles ve Bunch, 1986' a göre ilk olarak 1871 yılında *Marasmius oreades* olarak bilinen bir fungusun da siyanür ürettiği bildirilmiştir. Daha sonra çeşitli *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* ve *Zygomycetes* sınıflarına ait çok sayıda fungus türünün siyanür üretebildiği bildirilmiştir (Knowles ve Bunch, 1986; Evered ve Harnet, 1988). Siyanürün bakteriyel üretimini de olduğu 1913 yılından beri bilinmektedir. 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 ve Bunch, 1986; Raybuck, 1992; Dökmeci, 2001; Ebbs, 2004; Online: www.cyanicode.org).

2.2.2.2. Bitkiler tarafından siyanür üretimi

Siyanojenik bitkiler olarak da isimlendirilen kayısı, badem, şeftali, elma ve vişne çekirdeklerinin yapısında amigdalin bileşiği bulunmaktadır, bu meyvelerin çekirdekleri yendiği zaman amigdalin vücutta sindirilerek HCN' e dönüşmektedir. Amigdalin Şekil 2.2.2.2.1'de görüldüğü gibi hidrojen siyanüre hidroliz olmaktadır (Vural, 1996; Gossel ve Bricker, 1984).



Şekil 2.2.2.2.1. Amigdalin'in hidrojen siyanüre dönüşümü (Vural, 1996; Gossel ve Bricker, 1984)

Amigdalin, asit ortamda daha yavaş hidroliz olur. Bu nedenle amigdalin içeren çekirdekler, mideden duodenuma geçerken alkali ortam oluştuğu için hidrolizle birlikte hidrojen siyanür ortaya çıkmaktadır (Vural, 1996; Gossel ve Bricker, 1984).

Diğer yandan Cassava ve Lima fasülyesinin yapısında bulunan Linamarin bileşiği de benzer şekilde HCN' e dönüşür. Bu tip meyvelerden hazırlanan meyve

suları çekirdekli ve çekirdeksiz presleme tekniğine göre değişen miktarlarda hidrosiyanik asit (HCN) içerebilmektedir.

Siyanür, hidrosiyanik asit olarak Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde yer almaktadır. Bu yönetmeliğe göre meyve sularında 1mg/kg, sert çekirdekli meyve konservelerinde 5 mg/kg, nugalatlar ve badem ezmelerinde 50 mg/kg'a kadar hidrosiyanik asit bulunmasına izin verilmektedir.

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı Ulusal Zehir Merkezi 1991 yılına ait verilerde 33 siyanür zehirlenmesi başvurusunun olduğu ve bu zehirlenmelerin tamamına yakınının çocuklarda ve amigdalin içeren meyve çekirdeklerinin yenmesi sonucu ortaya çıktığı görülmektedir (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları,1999).

2.2.3. Diğer Kaynaklar

2.2.3.1. Küçük ve büyük çaplı yangınlar

Poliüretan, akrilik banyo aksesuarları, ipek ve yün eşyaların yanması sonucu ve yangın olaylarında ortamda HCN gazı oluşmaktadır. Sigara dumanında da sigara başına ortalama 0.4-0.5 mg HCN gazı oluşmaktadır. Yangın ortamında siyanür, solunum yoluyla alınabileceği gibi deriden emilim yoluyla da alınabilmektedir (Gossel ve Bricker, 1984).

Laboratuvar ortamlarında, asit bulunan lavabo ya da drenaj deliklerine siyanür tuzlarının boşaltılması ile siyanür gazları ortaya çıkabilmektedir.

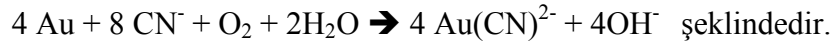
2.2.3.2. Tıbbi amaçlarla siyanüre maruz kalınabilmektedir

Akut hipertansiyon krizinde kullanılan sodyum nitroprussid vücutta siyanüre dönüşmektedir, vücuda hızlı verilmesi, yüksek dozda uzun süreli kullanılması ya da böbrek yetmezliği olması durumunda toksik etkiler ortaya çıkarabilmektedir.

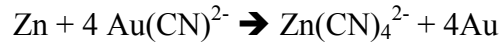
Kanser tedavisinde kullanılan Leatril (1g Leatril yaklaşık 60 mg siyanür içermektedir) tabletlerinden 12-13 adve arkadaşları olarak gerçekleştirilen intihar girişiminde ciddi metabolik asidoz ve konvülsiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları,1999).

2.2.4. Madencilikte siyanür

Dünyada üretilen siyanürün yaklaşık %20'si madencilikte kullanılmaktadır. 1980'li yıllarda özellikle büyük işletmeler altın üretiminde siyanürü kullanmaya başlamıştır. Bu tekniğe “siyanür ile yığın liçi ve aktif karbonla sıyırma tekniği” denilmektedir. Siyanidasyon, maden cevherinden, siyanür ile altın elde edilme işlemidir. Bu reaksiyon Elsner eşitliğine göre:



Sementasyon işlemi yani Zn ile çöktürme işlemi aşağıda görüldüğü gibidir.



Bu yolla, cevherdeki altını %97' ye varan oranda kazanmak olanaklı olabilmektedir. Siyanürün altın işletmelerinde kullanılmasının oluşturduğu olumsuzlukların bir bölümü, taşınması sırasında ya da işletme içi kazalardan kaynaklanabilmektedir. İşletme içi kazalar ise siyanür ya da bağlantılı akışkanların işlenmesi ya da işletme içinde borularla iletilmesinde, boru ya da bağlantılarda ortaya çıkan hasarlar ya da atık barajlarının sızma, taşma ya da yıkılması ile çok miktarda siyanürün ve ağır metal yüklü akışkan çamurun yayılmasına bağlıdır. Böylece, işletmeye komşu ve yakın alanlarda içme ve sulama suyu kaynakları etkilenmektedir. Siyanürle altın üretilmesinde oluşan bir diğer tehlikeli durum da işlem çamuru ve suyunda serbest siyanürün hidrojenle birleşip hidrojen siyanür gazı oluşturması, bunun da havada hızla yayılmasıyla ortama dağılmasıdır. Bu riskler nedeniyle siyanür tuzlarının ambalajlanması, taşınması ve depolanmasında uyulacak kayıt ya da kurallara bir düzen getirilmesi için dünyanın her yerinde ulusal ve uluslar arası komisyonlar kurulmuş olup, çalışmalar yapılmakta ve standartlar oluşturulmaya çalışılmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde 1971 ve 1977 yıllarında kabul edilen yasalarda, siyanürle ilgili çok çeşitli kısıtlamalar getirilmiştir (Tunalı, 2001).

2.3. Çevresel Açından Siyanürün Önemi

Siyanürün çoğu formu toksiktir. Tuzları veya kompleks bileşikleri söylenmeksizin sadece CN^- iyonu olarak tanımladığında serbest siyanürler ifade edilmektedir. Siyanürün bulunduğu ortamın ve siyanür bileşiğinin türünün kesinlikle

saptanması gerekir (Greenwood ve Earnshaw, 1984; Boikesss ve arkadaşları, 1986; Çabuk, 2005).

pH değeri 8 olan sulu HCN çözeltisinde siyanür serbest halde değildir ancak toksik bir özellik taşımaktadır. Toksisitesi pH 'la beraber değiştiği için özellikle atıksular ve doğal sularda pH 'ın bilinip ayrışan ve ayrışmadan kalan siyanürün bulunması ile daha sağlıklı yargılara ulaşılabilmektedir. Asidik karakterdeki sularda kompleks ve basit siyanür bileşikleri hidrolize olup serbest siyanür oluşturur ve dolayısıyla da gaz formuna ulaşır bulunduğu ortama, atmosfere karışmaktadır. Birkaç siyanür bileşiği dışında siyanür bileşiklerinin sulu ortamda toksik etkileri, kalıcılıkları, kararlılıkları ve kimyasal davranışları incelenmemiştir dolayısıyla bu konuda literatürde bilgi eksikliği dikkat çekmektedir (Train, 1979).

Canlı yaşam açısından düşük derişimleri, özellikle bakteriyolojik yaşam açısından önemlidir. Kanalizasyon sistemlerinde bulunması halinde birçok tür bakterinin aktivitelerini olumsuz yönde etkilemesiyle buralarda anaerobik biyolojik oksidasyon mekanizmasını engeller. Dolayısıyla doğal sulara yapılan deşarjlarda siyanürün minimum değerlerde tutulması önemlidir. Balık ve diğer su ortamındaki canlılarda siyanürün toksik etkisi: pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve diğer minerallerin derişimlerine bağlı olarak değişir. Yüksek sıcaklıklarda artan her 10 °C için toksik etkisi iki-üç kat artmaktadır. Düşük oksijen seviyesi siyanürün toksikliğini arttıran bir diğer unsurdur. Alabalıklar üzerinde yapılan deneylerde 17 °C su sıcaklığında oksijen doygunluğu; %95 iken 8 saatte, %73 iken 5 saatte, %45 iken 10 dakikada 0,105 mg/l CN- derişiminde yaşayabildikleri saptanmıştır (Greenwood ve Earnshaw, 1984; Boikesss ve arkadaşları, 1986; Skoog ve arkadaşları, 1996).

Bazı organizmalarda ise toksik etki sınırı daha yüksek sınırlarda olmaktadır. Tatarcık larvaları ve *Cricotopus bicinctus* lar 3,2 mg/l lik siyanür derişimine sahip elektro kaplama sularında yaşamlarını sürdürmüştür. *Daphnia magna* 3,4 mg/l, *Mayorelle palestinensis* 130 mg/l'lik siyanüre dayanıklılık gösterdiği deneylerde gözlemlenmiştir (Reich, 1955).

Konuyu insan sağlığı açısından ele alacak olursak; besinlerle azda olsa bir miktar siyanürü bünyemize almaktayız. İçme suyu yolu ile günde 4,7 mg siyanür alınması zararlı etki göstermektedir. Normal olarak 2 l su tüketen bir insan bu suda 2,3

mg/l siyanür derişimi bulunması halinde zarar görmeyecektir. Buna karşın toksik etkisinin güvenli bir sınırdaki tutulması için içme sularında 0,1 mg/l derişimi aşılmaması önerilir (WHO, 1984).

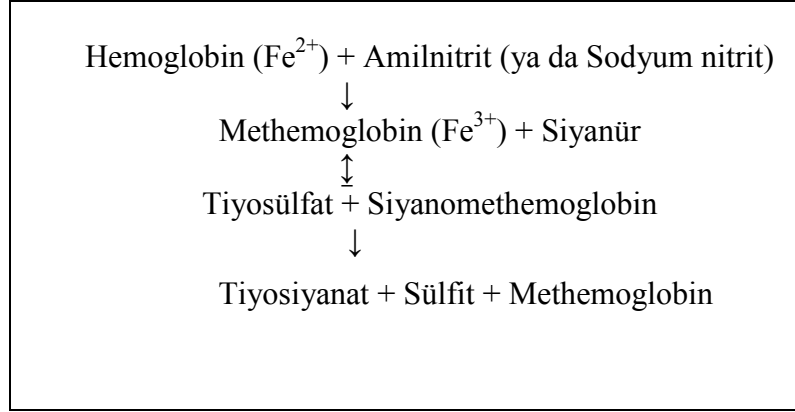
Atıksularda siyanür iyonu ağır metal iyonları ile metal siyanür kompleksleri oluşturur. Bu komplekslerin stabilitesi oldukça değişiktir. Çinko ve kadmiyum bileşikleri dayanıksız olup ayrışmaları nötral ve düşük asidik ortamda mümkündür. Kobalt siyanür kompleksi ise asidik ortamda bile oldukça güç ayrışır. Dayanıklı diğer bileşen demir siyanür kompleksi olmasına rağmen güneş ışığında (UV) fotokimyasal oksidasyon ile bozunur ama gece bu reaksiyon geri dönerek tekrar demir siyanür kompleksini oluşturur ki bu durum örnek alma yeri ve zamanı açısından büyük önem taşır. Suda HCN'ün koku sınırı 0,001 mg/l'dir. Çevreden ve endüstrilerden gelecek siyanüre dayanılabilecek maksimum güvenli sınır 18 mg/gün olarak tahmin edilmektedir (WHO, 1984).

Birçok organik bileşimin yapısında siyanür fonksiyon grubu olarak bulunur. Bu tür bileşikler nitriller olarak adlandırılır ve pek azı ayrışarak hidrojen siyanürü iyon veya moleküler olarak ortama verir. Organik asitler, alkoller, esterler ve amidler siyanürü radikal olarak bulundurur. Bu grupta olanlar çok sayıda siyanür bileşimi oluşturur veya yan ürün olarak ortama verilirler. Siyanürün sularda kalıcılığı oldukça değişken olup siyanür bileşiminin yapısına, derişimine ve diğer bileşenlerin durumuna bağlıdır. Permanganat ve klor gibi kuvvetli oksitleyicilerle zararlılığı giderilmeye çalışılması halinde bile reaksiyonun tamamlanamaması nedeniyle kalan ve / veya oluşan siyanojen klorür bileşimi toksik etkisini korur. pH'ı düşük ve iyi havalandırılması yapılan sularda hidrojen siyanür oluşarak gaz halinde atmosfere karışır. Düşük derişimleri veya toksisitesi mikrobiyotaya yardımıyla atık su arıtma tesislerinde veya çevrede aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar sayesinde parçalanabilir (Bodansky ve Levy, 1923).

2.4. Siyanürün Toksik Etkisi

Siyanür, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından bilinen en toksik madde olarak tanımlanmıştır. Tarih boyunca siyanür en öldürücü ve yıkıcı zehir olarak bilinmektedir (Chin ve 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 ve arkadaşları, 1998).



Şekil 2.4.1. Siyanürün detoksifikasyon mekanizması (Online: www.farma.hacettepe.edu.tr, Gossel ve Bricker,1984).

Basit alkali siyanürler oldukça zehirli maddelerdir ve suda çözüldükleri zaman, zehirlilik şiddeti artar. Çünkü sulu çözeltilerde hidrojen siyanür oluşur (özellikle düşük pH değerinde) ve bu siyanür iyonundan daha fazla zehirlidir. Örneğin, geniş ölçüde metal sertleştiricileri; özellikle soy metal çözücüleri olarak kullanılan sodyum siyanür ve potasyum siyanür çözeltilerinden, havadaki karbondioksitin etkisiyle çok zayıf olan hidrojen siyanür ortaya çıkar.

Diğer metal siyanürlerinden, civa oksit siyanür veya gümüş siyanür içeren preparatlardan ve teknik olarak metalleri pirinç kaplamada kullanılan çinko siyanürlerden de midede hidrojen siyanür oluşur. Siyanür zehirliliğinin pH düştükçe arttığı bilinmektedir. Örneğin, pH 8.0 den 6.5'e indiğinde, nikel siyanürün zehirliliği yaklaşık bin kat artar. Bununla birlikte siyanürün zehirliliği sıcaklık artışıyla da artmaktadır (DSİ, 1980; İmre, 1988)

Siyanür zehirliliğinin insan sağlığı üzerine etkisi ele alınırsa; yetişkin bir insan için minimal öldürücü doz 1 mg /kg olarak tanımlanır. Buna göre; 50-60 mg hidrojen siyanür, saflık derecesine göre 0.15-0.25 g potasyum siyanür ve 50 g acı badem ve acı badem suyu (% 0.1 HCN) ortalama öldürücü doz olarak verilebilir. Potasyumferri siyanür için verilen miktar ise 3503 mg/kg dır (İmre, 1988).

Siyanürün toksik etkisi dokulardaki oksijen değişimini durdurarak oksijen metabolizmasını engellemesi şeklindedir. Siyanojen bileşikleri birikim etkisi göstermez ama protoplazma için zehirleyicidir (çabuk zararsız hale dönüştürülebilir) ve hayvanların tümünde etkilidir. Siyanürün toksisitesi diğerlerine göre oldukça farklıdır. İndirgenmiş metabolizmaya moleküler oksijen transferini durdurarak yani sitokrom oksidaz sistemini engelleyerek toksik etkisini gösterir. Sitokrom oksidaz molekülleri ferrik demir-prophirin'in katalizörlüğü ile oksijenle kompleks oluşturur. Siyanür bu kompleksle birleşmesi (ferrik demir (III) atomlarıyla birleşmesiyle) engelleme mekanizmasını oluşturur. Ortamda bulunan diğer enzimlerde (peroksidaz, ksantanin oksidaz v.b.) siyanür tarafından engellenir. Bu işlemi sadece ayrışmamış HCN dokularda ve hücrelerde oluşturur. Dokularda oksijen mekanizmasının engellenmesi hücrede asphaksiya (histotoksik anoksiya) yol açması ya da diğer bir deyişle sitokrom oksidaz enzimidaki prostetik gruplarda demir atomuna oksijen yerine doğrudan siyanürün bağlanmasıyla ortaya çıkar (Train, 1979).

Fizyolojik olarak siyanür metabolizmasının çok kısıtlı birkaç mekanizması vardır. Hidroksi kobalamin siyanürü zararsız siyano kobalamine dönüştürüp tiyosiyanat oluşturur. Tiyosiyanat amino asitlerle birleşip dokularda oksitlenip karbondioksit, format v.b. bileşiklere dönüştürülür. Siyanürün zararsızlaştırdığı diğer mekanizma ise rodanaz enziminin sadece serbest siyanürlerle tiyosiyanatlara dönüştürülmesidir. Öldürücü olmayan dozlarda siyanür karaciğerde rodanaz enzimi yardımıyla 20 dakika ile 1 saatlik bir zaman aralığında tiyosiyanata (SCN^-) dönüşerek idrar ile vücuttan atılır (Greenwood ve Earnshaw, 1984; Boikess ve arkadaşları, 1986; Skoog ve arkadaşları, 1996; Çabuk, 2005).

Siyanürün hücrenin solunum aktivitesini tamamen durdurmadığı durumlarda söz konusudur. Tam etkilediği hücrede bile az da olsa bir miktar solunum devam eder. Düşük seviyede veya kalıntı solunumu sitokrom-b aktive eder. Kalıntı veya düşük solunumu siyanürle zehirlenmiş hücrede flavin aerobik dehidrogenaz aktivitesinde görebiliriz. Burada sitokrom olmaksızın oksijen transferini hidrojenle sağlamaktadır.

Birçok bitki tohum ve meyvelerin yapısında bulunan ve enzimatik ürün olarak siyanür oluşturan siyanogenik glikozit, amygladin, günlük beslenme alışkanlıklarımızla bünyemize almamıza rağmen toksik etkisi insanlar için yeterli değildir. Amygladin

(C₂₀H₂₇NO₁₁) enzimatik hidrolizi ile glikoza dönüşürken toksik hidrojen siyanür ve benzaldehit oluşur.

Alkali siyanür tuzlarının suda çözünürlüğü fazla olduğu için deri yolu ile vücuda girişi, deriden absorpsiyon yağda çözünürlükle doğru orantılı olduğundan dolayı, önemsiz miktardadır. Bu nedenle sadece ağız yolu ile toksik etki gösterebilirler. Hidrojen siyanür'ün (sıvı ya da gaz) siyanür tuzlarına göre deriden geçişi daha kolaydır, bu nedenle ağız, deri ve solunum olmak üzere her üç yolla toksisitesini gösterir. Solunum yolu ile hidrojen siyanür'e, ağız yolu ile alınan siyanür bileşiklerine göre vücuda daha hızlı bir giriş söz konusudur ve dolayısıyla toksik etkiler daha hızlı ortaya çıkar. İnsanlarda kaza ya da intihar girişiminde alkali siyanür tuzlarının ağız yolu ile alındığında ölüme neden olan dozları olgu raporları derlendiğinde en az 200-300 mg, hidrojen siyanürün ağız yolu ile insanlarda ölüm oluşturan en küçük dozu ise 50-100 mg arasındadır (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları,1999).

İnsanlardaki olgu raporlarından derlenen sonuçlara göre siyanür bileşiklerinin ağız yolu ile alındığında kandaki konsantrasyonları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan etkiler Çizelge 2.4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4.2. Kandaki siyanür düzeyleri ve insanlardaki etkileri (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları, 1999)

| Kan siyanür konsantrasyonu (mikrogram /ml) | Belirtiler |
|-----------------------------------------------|----------------------------|
| 0.2-0.5 | Herhangi bir belirti yok |
| 0.5- 1.0 | Taşikardi |
| 1.0- 2.5 | Şuur kaybı |
| 2.5- 3.0 | Koma ve solunum depresyonu |
| 3.0 ve üstü | Ölüm |

►► Sigara içen bireylerin

kan siyanür konsantrasyonu yaklaşık 0.41 mikrogram /ml

Belirti yok

Çizelge 2.4.3. Solunum havasındaki CN⁻ konsantrasyonu ve insanlarda ortaya çıkan etkiler (Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları,1999)

| Etki | Doz (ppm) |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Hemen ölüm | 270 |
| 10 dakikada ölüm | 181 |
| 30 dakikada ölüm | 135 |
| Hemen etki yok, geç etki (1saat maruziyet) | 45-54 |
| Hafif semptomlar (saatlerce maruziyet) | 18-36 maksimum maruziyet |
| Tiroid bezinde büyüme, başağrısı, uykusuzluk | 0.14-10.3 |
| Mitokondriyel enzim aktivitesinde azalma (5.4 yıl maruziyet sonrası) | 0.22 |
| Hiç etki yok | 0.1-0.9 hassas bireyler |

▪1 ppm HCN= 1.12 mg/m³ HCN

HCN'in Amerika Birleşik Devletleri Mesleki Güvenlik ve Sağlık Kurumu (OSHA) tarafından tespit edilen işyeri havasında bulunmasına izin verilen eşik sınır düzeyi; TLV-TWA = 10 ppm, TWA (deri) = 11 mg/m³ olarak belirlenmiştir.

2.5. Siyanürün Arıtımında Kullanılan Yöntemler

Atıksuda 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: Kimyasal arıtım ve 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 ve Bunch, 1986; Raybuck, 1992; Pereira ve arkadaşları, 1996; Botz, 2001; Çabuk ve arkadaşları, 2006).

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 uygulaması

Biyolojik arıtma yöntemlerinin dayandığı 2 temel mekanizma detoksifikasyon ve biyoyıktır. Biyolojik arıtma çalışmalarında pek çok fungus, bakteri ve bazı bitkilerin kullanıldığı bilinmektedir (Haris ve Knowles, 1983; Raybuck, 1992; Ezzi ve Lynch, 2002; Ebbs, 2004; Çabuk ve arkadaşları, 2006). Aerobik koşullar altında mikrobiyal aktivite ile siyanürün amonyak ve daha sonra oksidasyonla nitrate 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 2.5.1. Siyanür arıtım sürecinde yöntem seçimi için genel bir karşılaştırma (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 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

2.5.1. Biyolojik Arıtım

Bazı mikroorganizmalar düşük derişimlerdeki siyanür bileşiklerini oksitleyebilirler. Siyanür oksitleyen mikroorganizmalar, siyanür bileşikleri içeren ortamlardan (toprak, su) izole edilip daha yüksek siyanür derişimlerine alıştırdıktan sonra kullanılırlar. Alıştırma sırasında siyanür derişimi kademeli olarak artırılır ve ortam şartları optimize edilir. Siyanürün aerobik metabolizma ürünleri CO₂ ve H₂O, anaerobik ürünleri ise CH₄, CO₂ ve NH₃ dır. Siyanürün biyoyıkımı üzerine yapılan çalışmaların tarihi çok eskiye dayanmamaktadır. Bu çalışmaların sonucunda etkin birçok mikroorganizma izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda izole edilen ve etkinliği gösterilen mikroorganizmalar Çizelge 2.5.1.1'de verilmektedir.

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.

Adjei ve Ohta, (1999) tarafından yapılan çalışmada, KCN ilave edilmiş ortam ile topraktan 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 durgunluk safhasındaki hücrelerinin ve ayrıca ham hücre özütünün siyanür yıkımında etkin bir şekilde kullanılabileceğini bildirilmiştir (Adjei ve Ohta, 1999).

Adjei ve Ohta (2000) yaptıkları çalışmada *B. cepacia* ile siyanür biyoyıkımında pH'nın 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 *B. cepacia* için uygun koşullar ortaya konmuştur.

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 ve arkadaşları, 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.

Çabuk ve arkadaşları (2006) tarafından *Basidiomycetes* üyeleri *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju* arasından siyanür yıkım yetenekleri açısından etkin tür olarak seçilen *Trametes versicolor* hücreleriyle inkübasyon süresi, biyokütle miktarı, başlangıç siyanür konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda

amonyak, format ve formatit gibi siyanür yıkımı sonucu oluşan bazı ürünlerin varlığı araştırılmıştır. Aynı zamanda, siyanür içeren atıklarda bulunabilecek etanol, metanol ve fenol gibi kirleticilerin *Trametes versicolor* hücrelerinin siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çizelge 2.5.1.1. Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar (Çabuk, 2005).

| Mikroorganizma | Bildirilen çalışmalar |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Stemphylium loti</i> | Fry ve Millar, 1972. |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | Atkinson, 1975. |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Harris ve Knowles, 1983; Rollinson ve arkadaşları, 1987; Door and Knowles, 1989; Kunz ve arkadaşları, 1992; Kunz, ve arkadaşları, 1994; Suh ve arkadaşları, 1994; Wang ve arkadaşları, 1996; Chen ve Kunz, 1997; Kunz ve arkadaşları, 1998; Kunz ve arkadaşları, 2001; Dasha ve arkadaşları, 2007. |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Padmaja ve Balagopal, 1985 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Shah ve arkadaşları, 1991; Çabuk, 2005. |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Meyers ve arkadaşları, 1993. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Cunningham ve Williams, 1995 |
| <i>Gliocladium virens</i> | Pereira ve arkadaşları, 1996. |
| <i>Mucor</i> sp. | Pereira ve arkadaşları, 1996. |
| <i>Trichoderma koningii</i> | Pereira ve arkadaşları, 1996. |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Pereira ve arkadaşları, 1996; Barclay ve arkadaşları, 1998; Pereira ve arkadaşları, 1999; Campos ve arkadaşları, 2005. |
| <i>Fusarium solani</i> | Dumestre ve arkadaşları, 1997; Barclay ve arkadaşları, 1998. |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | Watanabe ve arkadaşları, 1998. |
| <i>Pseudomonas diminuta</i> | Kowalska ve arkadaşları, 1998. |
| <i>Staphylococcus seiuri</i> | Kowalska ve arkadaşları, 1998. |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> | Kowalska ve arkadaşları, 1998. |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | Adjei ve Ohta, 1999; Adjei ve Ohta, 2000. |
| <i>Citrobacter</i> sp. | Patil ve Paknikar, 2000. |
| <i>Trichoderma</i> sp. | Ezzi ve arkadaşları, 2002; Ezzi ve arkadaşları, 2003. |

| | |
|----------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Klebsiella oxycota</i> | Kao ve arkadaşları, 2003; Chen ve Kao, 2007. |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Ezzi ve arkadaşları, 2003. |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Akcil ve arkadaşları, 2003. |
| <i>Trichoderma pseudokoningi</i> | Ezzi ve arkadaşları, 2003. |
| <i>Arthrospira maxima</i> | Gurbuz ve arkadaşları, 2004. |
| <i>Chlorella</i> sp. | Gurbuz ve arkadaşları, 2004. |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | Gurbuz ve arkadaşları, 2004. |
| <i>Methylobacterium</i> sp. | Campos ve arkadaşları, 2005. |
| <i>Pleuratus sajor-caju</i> | Çabuk, 2005. |
| <i>Trametes versicolor</i> | Çabuk, 2005; Çabuk ve arkadaşları, 2006. |

2.6. Siyanür Yıkımında Etkili Olan Enzimler

Günümüze kadar siyanür üzerine etkili olan enzimlerin aktivitelerini ve özelliklerini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmaların sonucunda, bütün reaksiyonların tam anlamıyla aydınlatılamamış olduğu vurgulanmaktadır. Burada açıkça belirtilmelidir ki sadece yerini alma / ekleme reaksiyonları hakkında yeterli bilgi olduğu ve hangi proteinlerin siyanür yıkımını katalizlediği ve sınırlamaların neler olduğu bilinmektedir.

Çizelge 2.6.1. 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 |

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 mikrobiyal türler olduğu düşünülmektedir (Raybuck, 1992).

2.7. Kirletici Kimyasalların Yıkımında Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı

Beyaz çürükçül funguslar pek çok eşsiz özelliğe sahiptir. Bunlardan ilki çok çeşitli organik kirleticiler için yıkım yeteneğine sahip olmalarıdır. İkincisi yıkıcı enzimlerin azot yokluğuna bir cevap olarak sentezlenmesi nedeniyle fungusların yıkımı hedeflenen kimyasala alıştırmaya gereksinimlerinin olmayışıdır. Bir diğer özellikleri bu funguslar besin kaynağı olarak lignoselülozik materyali kullanabilme yeteneklerinden dolayı diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilirler (Tuomela ve arkadaşları, 2000; Eriksson ve arkadaşları, 1990; Shah ve arkadaşları, 1991).

Saprofit funguslar, doğal olarak meydana gelmiş lignin gibi bitkisel kökenli büyük molekülerin neredeyse tümünü parçalayabilen çok sayıda hücre dışı enzim üretirler. Bu özelliklerinden dolayı, biyojeokimyasal döngülerin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar. Az da olsa bu tip enzimleri oluşturan bakterilerde vardır.

Odunun yapısında bulunan maddeleri parçalama özelliğine göre funguslar ikiye ayrılır. Kahverengi çürükçüller, selüloz ve hemiselülozu parçalarken lignine dokunmazlar, böylelikle odun daha koyu bir renk alır. Kahverengi çürükçüllere *Serpula lacrymans*, *Laetiporus portentosus* ve *Fomitopsis lilacino-gilva* örnek olarak verilebilir. Beyaz çürükçüller ise hücre çeperini oluşturan selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritlerin yanında ligninide parçalarlar. Lignin uzaklaştırıldığı için odun daha açık bir renk alır (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001; Eriksson ve arkadaşları, 1990).

Beyaz çürükçül funguslara *Chrysosporium lignorum*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform* ve *Armillaria luteobubalina*, *Schizophyllum commune* ve *Daldinia concentrica* örnek olarak verebiliriz. Özellikle *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un kullanımı çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için, özellikle çevresel açıdan, yaygındır (Wainwright, 1992). Beyaz çürükçül funguslar, organik moleküller üzerinde rol oynayan çeşitli enzimleri üretirler. Özgül olmayan bu enzimler parçalanmaya karşı

dirençli olan kirleticilerin yıkımında etkin olarak kullanılabilirler. Lignin, kağıt endüstrisinde de istenmeyen bir bileşiktir. Lignin bu endüstride pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal bir işlemle uzaklaştırılmaktadır (Alain-Boudet, 2000). Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar kağıt endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadırlar. Beyaz çürükçül funguslar, biyoteknolojide pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su boşaltımları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli kompleks fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılır (Wainwright, 1992; Ünal ve Kolankaya, 2004; Arısoy ve Kolankaya, 1997). Bu fungusların lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri, polisiklik aromatikleri, poliklorlanmış bifenil ve dioksinleri, DDT' yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilir (Kirk ve arkadaşları, 1992), tekstil boyalarının renk gideriminde kullanılabilir (Yeşilada ve arkadaşları, 2003).

Beyaz çürükçül funguslar, fenol oksidazlar ve peroksidazlar dışında başka enzimler de salgırlar. Bu fungusların sahip olduğu enzimleri üçe ayırmak mümkündür. İlki oduna atak yapan enzimlerdir. Bunlar hem karbonhidrat bileşenlerinin (selüloz ve hemiselüloz) üzerinde hem de lignin üzerinde rol oynarlar. İkinci grup, süperoksit dismutaz ve glioksal oksidazı içerir. Bunlar birinci gruptaki enzimlerle birlikte çalışır ancak tek başına odunu etkilemezler. Üçüncü grup ise glukoz 1-oksidad, aril alkol oksidad, piranoz2-oksidad, sellobioz dehidrogenazı kapsar. Bu enzimlerin hepsi lignin degradasyonunda rol oynar (Leonowicz ve arkadaşları, 1999).

Yapılan birçok çalışma ile fungusların içerdikleri bazı metabolitlerin antagonistik ve stimulant etkileri belirlenmiştir (Benedict, ve arkadaşları., 1972). Makrofungusların antagonistik bileşiklerinin en iyi belirlenen grubu poliasetenlerdir. Bu antagonistik maddelerin 50'den fazla *Aleurodiscus*, *Clitocybe*, *Coprinus*, *Cortinarius*, *Marasmius*, *Pleurotus*, *Polyporus* ve *Tricholoma* cinslerini bir veya birkaç türünden bilinmektedir (Benedict ve arkadaşları, 1972; Ying ve arkadaşları, 1987).

Paice ve Jurasek (1984) *Schizophyllum commune*' den alınan ksilanaz enzimini, lignini alınmış titre kavağ hamurunda denemiş ve bir saat içerisinde hamurdaki hemiselülozun %20.4 'den %13.4'e, 24 saat içerisinde de %9.1'e düştüğünü bildirmiştir. Ancak enzim uygulaması sonucunda hamur viskozitesinin de önemli

derecede düştüğü izlenmiş, bu ise ortamda az miktarda dahi olsa selülaz enzimi varlığına bağlanmıştır.

Schizophyllum commune' den izole edilen schizophyllan polisakkaridinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*' ya karşı antibakteriyal etki gösterdiğini tespit etmiştir (Komatsu, 1973).

Ganoderma lucidum makrofungusunun çeşitli çözenler yardımıyla elde edilen ekstralarının, Gr (+) ve Gr (-) bakterilere ve bazı funguslara karşı etkin bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir.

Canlı mikroorganizmaların özellikle fungusların birbirlerine ve katı yüzeylere filmler halinde tutunduğu bilinmektedir. Bu şekildeki tutunma dış plağında, alg ve fungus cıvık tabakalarında olduğu gibi, toprak partikülleri üzerinde, bitki üzerinde ya da ince ve kalın barsak gibi hayvan dokuları üzerinde ve tavuğun kursak epiteli üzerinde oluşmaktadır. Aslında atık suların biyolojik arıtımında kullanılan damlatmalı filtreler, döner disk ve aktif çamur yöntemleri, tahta fiçilerde sirke üretimi, hayvansal doku kültürleri, minerallerin bakteriyal tekniklerle zenginleştirilmesi (bakteriyal liçing) ve toprak ile denizlerdeki mikrobiyal olaylar immobilize mikroorganizmalardan eskiden beri yararlanıldığını gösteren tipik örneklerdir (Wenhua ve Ding, 1993, Vilchez ve arkadaşları, 1997).

İmmobilize mikrobiyal hücrelerin endüstriyel amaçlı kullanılma çalışmaları çok yeni olup birkaçı dışında daha birçok mikroorganizmanın immobilizasyon koşullarındaki davranışları, biyokimyası, fizyolojisi, morfolojisi ve genetiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak bugüne kadar yapılan araştırmalar, immobilize mikroorganizmaların endüstriyel uygulamalarda büyük oranda ekonomik yararlar sağlayacağı ve diğer tekniklere kıyasla çeşitli üstünlüklerinin olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (Wenhua ve Ding, 1993, Vilchez ve arkadaşları, 1997).

2.8. Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimlerin endüstriyel, analitik ve tıbbi amaçlar için katalizör olarak kullanılması, son 20 yılda hızla gelişmiş ve enzim teknolojisi adı verilen yeni bir araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Bu alandaki çalışmalarda, enzimler, sentetik kimyasal reaksiyonlar için kullanılan alışılmış katı fazlı katalizörlere benzer şekilde daha rahat kullanımlar için immobilize edilmektedir.

Mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu üzerine pek çok literatür ve makaleler yayınlanmıştır. Buna rağmen, mikrobiyal hücrelerin bütün tiplerinin immobilizasyonu için uygulanabilen ideal genel bir yöntem geliştirilememiştir. Pratikte, her bir hücre tipinin immobilizasyonu için uygun yöntem ve şartları seçmek gerekir.

Şimdiye kadar çok sayıda immobilizasyon yöntemi yayınlanmıştır. Bu teknikle üç kategori içinde sınıflandırılabilir (Chibata ve arkadaşları,1986)

- Carrier-binding (taşıyıcıya bağlama yöntemleri)
- Cross-linking (çapraz bağlama yöntemi)
- Entrapping (tutuklama yöntemi)

2.8.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi

Taşıyıcıya bağlama yöntemi, hücrelerin doğrudan suda çözünmeyen taşıyıcılara fiziksel adsorpsiyonla, iyonik yada kovalent bağlarla bağlanmasına dayanır. Taşıyıcı olarak; suda çözünmeyen polisakkaritler, (selüloz, dekstran ve agaroz türevleri)

- Proteinler (jelatin ve albumin)
- Sentetik polimerler (iyon değiştirme reçineleri ve polivinilklorid)
- İnorganik maddeler (tuğla, kum, gözenekli cam) kullanılır (Chibata ve arkadaşları,1986).

İmmobilize hücrelerle yapılan ilk denemelerden birinde, süksinik asidin oksidasyonu için Dowex-1'e adsorbe edilen *E. coli* ve *Azotobacter agile* hücreleri kullanıldı. Adsorpsiyon olayı aslında elektrostatik etkileşimlere (Van der Waals kuvvetleri) ve hücre ile taşıyıcı madde arasındaki iyonik ve hidrojen bağlarına dayandığı için hücrelerin taşıyıcılara adsorpsiyonu çevresel özelliklere bağlıdır. Yüksek operasyonel stabiliteli enzim preparasyonlarının elde edilmesi nedeniyle kovalent bağlama yöntemi enzimlerin immobilizasyonu için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Fakat bu immobilizasyon işlemi hücreler için yaygın olarak kullanılmaz. Bunun nedeni, içerdiği bağlanma ajanlarının toksisitesinin bazen hem enzim aktivitesinin hem de hücre canlılığının kaybolmasına sebep olmasıdır (Chibata ve arkadaşları,1986).

Kovalent bağlanma, aktive edilmiş bir desteğe hücrelerin doğrudan bağlanmasıdır. Proteinlerin amino, karboksil,tiol, hidroksil, imidazol yada fenol grupları

gibi hücre yüzeyinin herhangi bir reaktif komponenti bağlanma için kullanılabilir. Kovalent bağlanmayı ortaya çıkarmak için genellikle taşıyıcının kimyasal modifikasyonu gereklidir. Bu immobilizasyon açıklayan birçok araştırmada inorganik ve organik taşıyıcılar kullanılmıştır. Silika ve seramik kullanılmış olan büyük inorganik taşıyıcılardır. Navarro ve Durand aminopropiltrietoksilan ile muamele edilip, glutaraldehit ile aktive edilmiş olan silika boncuklara *S. carlbergensis*'i immobilize etmişlerdir. Messing ve ark.'ları borosilikat camı ve zirkonia seramiklerine bir izosiyanat bağlama ajanı kullanarak *Serratia marcescens*, *S. carlbergensis* ve *S. amorcae* hücrelerini bağlamışlardır (Chibata ve arkadaşları,1986).

Organik taşıyıcılarla ilgili olarak; Jack ve Zajic hücrelerin karbodiimide maruz alması kaçınılmaz olan iki basamaklı bir işlemle *Micrococcus luteus* hücrelerini agaroz boncuk karboksil guplarına immobilize ettiler. Her ne kadar hücreler canlılığını yitirse de, bu hücrelerin urokanik asit oluşturma aktivitesi alıkonuldu. Bu yöntemin dezavantajı, enzim reaksiyonu sırasında otolizisten dolayı enzimlerin ortama sızmasıdır (Chibata ve arkadaşları, 1986).

2.8.2. Çapraz Bağlama Yöntemi

Hücreler glutaraldehitluendiizosiyanat gibi yada çok fonksiyonlu reaktiflerle çapraz bağlanarak immobilize edilir. İki fonksiyonlu reaktifler olan glutaraldehit ve toluen diizosiyanat ile hücre duvarları veya hücre membranlarını çapraz bağlayarak, yüksek aspartaz aktivitesine sahip *E. coli* hücrelerinin immobilizasyonu için bu yöntem kullanılmıştır (Chibata ve arkadaşları,1986).

2.8.3. Tutuklama (Entrapping) Yöntemi

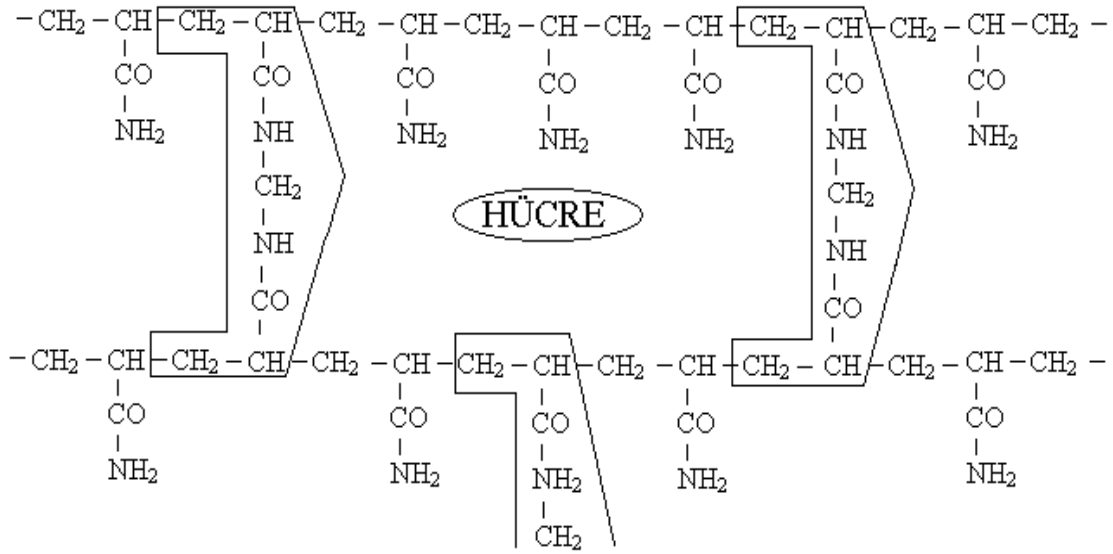
Polimer matriks içinde hücreleri direkt olarak yakalayan yöntem geniş olarak incelenmiştir. Bu amaçla şu matriksler kullanılmıştır; kollagen, jelatin, agar, alginat, karragenan, seluloz, triasetat, poliakrilamid jel, ve foto-cross linkable reçine en yaygın olarak kullanılanlardır (Chibata ve arkadaşları,1986).

İmmobilize enzimler ve hücrelerin yarımıyla mikrobiyal süreçlerin çalışılması modern biyoteknolojinin temel bir eğilimidir. İmmobilize hücrelerin pek çok durumda immobilize enzimlere göre daha randımanlı olduğu ispatlandı. Onlar amino ve diğer organik asitler, antibiyotikler, steroidler, koenzimler ve enzimler gibi organik

bileşiklerin biyosentezinde ve transformasyonlarında, atıkların yıkımında, kanalizasyon çamurundan, denizlerden ve tatlı sulardan ağır metal izolasyonunda, azot fiksasyonunda ve biophotolysisde, metan sentezinde ve oksidasyonunda, bira ve şarap yapımında kullanılmaktadır. Hücreler kovalent bağlanma, adsorpsiyon, çeşitli gellerde tutuklama gibi bazı yöntemlerle immobilize edilirler. Hücre tutuklanması için pek çok farklı taşıyıcılar kullanılabilir fakat polyakrilamid gel (PAG) en iyi tercihlerden biridir (Skryabin ve arkadaşları, 1984).

i. Poliakrilamid jel: Poliakrilamid jel yöntemi 1963'de Bernfeld ve ark. tarafından enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Daha sonra 1966'da Mosbach tarafından *Umblicaria pastulata* adlı liken hücrelerine uygulanmıştır (Chibata ve arkadaşları, 1986).

Çözünmeyen jel kafesin hazırlanma prosedürü, elektroforez işlemi için hazırlanan jelle aynıdır. Bu yöntem, sulu solüsyonda akrilamid monomerinin serbest radikal polimerizasyonuna dayandırılır. Akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu, hücreleri ve N,N-metilenbisakrilamid gibi bir çapraz bağlama ajanı içeren solüsyonda meydana gelir. Polimerizasyon hücrelerin hasar görmemesi için genellikle düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimerleşme reaksiyonu potasyum persülfat yada riboflavin ile başlatılır ve β -dimetilaminopropionitril yada N,N,N,N-tetrametilendiamin ile hızlandırılır. Oluşan jelin kimyasal formülü Şekil 2.3' de verilmiştir. Meydana gelen jel istenilen büyüklükteki partiküllere mekaniksel olarak parçalanır. Ama jeller yapısal olarak zayıftır. Çapraz bağlama derecesini optimize ederek bu problemin üstesinden gelinebilir. Hücre immobilizasyonu için gerekli şartlar incelenmiş (özellikle yüksek aspartaz aktivitesine sahip *E. coli* hücreleri üzerinde) ve oldukça yüksek aktivitede kararlı ve mekaniksel olarak dayanıklı immobilize hücreler elde edilmiştir (Chibata ve arkadaşları, 1986; Skryabin ve arkadaşları, 1984).



Şekil 2.3. Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı

Poliakrilamidin büyük bir dezavantajı, akrilamid monomerinin, çapraz bağlama ajanının, başlatıcının ve hızlandırıcının toksisitesidir. Bazı durumlarda, serbest radikal polimerizasyonu sadece enzim aktivitesinde bir azalma değil hücre canlılığında da bir azalmayla sonuçlanır. Bu yüzden mikroorganizmalar mümkün olan en kısa süre reaktiflere maruz bırakılmamalıdır (Chibata ve arkadaşları,1986).

Yapılan çalışmalar, 100-600 mg hücre (kuru ağırlık) jel bloklarda tutuklandıktan sonra, 1 ml jel ganüllerinin sırasıyla 1.9–11 mg hücre içerdiğini gösterdi.

ii. Agar: Bir agar jelde hücrelerin yakalanması, hücre immobilizasyonu için belirgin bir yöntemdir. Jelin mekanik olarak dayanıklılığının zayıf olması nedeniyle bu yöntemin kullanımı yaygın değildir. Agar da tutuklama için genel bir prosedür şöyle özetlenebilir. Bir termometre yardımıyla 45 ml agar solüsyonunun sıcaklığı kontrol edilir ve 50 °C olduğunda hazırlanan hücre süspansiyonundan 5 ml alınır iyice karıştırılır. Uygun kaplara dökülür. Agar tamamen donduktan sonra istenilen boyutlarda eleklerden geçirilir. Tutuklanamamış hücreleri uzaklaştırmak için % 0.9' luk NaCl de iyice yıkanır. Uygun bir tampon ya da serum fizyolojikte hücreler saklanır (Chibata ve arkadaşları, 1986).

iii. K-Karragenan: K-Karragenan su yosunundan izole edilen, rahatlıkla kullanılabilen nontoksik bir polisakkarittir. Gıda ve kozmetik endüstrilerinde jelleme koyulaştırma ve

stabilize edici bir ajan olarak kullanılır. Birim yapısı β galaktoz sülfat ve 3,6-anhidro- α -D galaktoz ' dan ibarettir (Chibata ve arkadaşları,1986).

K-Karragenan soğutulularak ya da K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , aminler yada suyla karışabilen organik solventler gibi jel teşvik edici bir ajan içeren solusyonla jel haline gelir. Uygun jel teşvik edici ajan kullanıldığı takdirde yüksek enzim aktiviteli bir preperasyon elde edilebilir (Chibata ve arkadaşları,1986).

K-Karragenan kullanmanın bir avantajı, istenilen enzimin aktivitesini bozabilen kimyasalları kullanmadan, çok hassas şartlar altında immobilizasyonun gerçekleştirilebilmesidir. Genel olarak, jel teşvik edici bir ajan olarak K^+ iyonlarının kullanıldığı immobilize mikrobiyal hücrelerin enzim aktiviteleri ve verimleri nispeten yüksektir (Chibata ve arkadaşları,1986).

Bu yöntemin diğer bir avantajı özel uygulamalar için immobilize hücrelerin çeşitli biçimlere sokulabilmesidir. Ayrıca, jel teşvik edici ajanlarla hazırlanmış immobilize hücreler fizyolojik tuzlu suda süspanse edildiği zaman K-Karragenan jel kolaylıkla çözülür ve serbest hücreli bir süspanسیون elde edilir. Bu özellik immobilizasyondan sonra hücre karakteristiklerinin incelenmesi açısından önemlidir (Chibata ve arkadaşları,1986).

K-Karragenan'ın bir dezavantajı reaksiyon karışımına bir jel teşvik edici ajan konmadığı takdirde jelin çözülmesiyle hücrelerin serbest hale geçmesidir. Aynı zamanda, jel teşvik edici ajan enzimin aktivitesini inhibe edebilir (Chibata ve arkadaşları,1986).

iv. Kalsiyum Alginat: Yosundan ekstraktı edilen alginat, D-Mannuronik ve L-Glikronik asidin bir lineer kopolimeridir. Ca ve Al gibi multivalent iyonlarla jel haline getirilebilir. Hücre immobilizasyonunda çapraz bağlı Ca^{2+} lı alginat tercih edilen yöntemdir. Bu yöntem bitki hücreleri ve protoplastların gibi çok hassas hücrelerin immobilizasyonu için kullanılmıştır (Chibata ve arkadaşları, 1986).

v. Foto Çapraz Bağlanabilir (Photo-Cross-Linkable) Reçine Prepolimerleri: Polyglikol oligomerler polimerize olabilen vinil son gupları ile karakterize edilir. Bir fotosensitizer ilave edilip bir kaç dakika UV ışığı ile aydınlatma halinde düz ağ tabakaları elde edilir. Oligomer zincir uzunluğu ağ gözeneklerini tayin etmek için kontrol edilebilir. Polyglikol prekürsörün kimyasal bileşimi matriksin hidrofilitesini tayin eder (Chibata ve arkadaşları,1986).

vi. Diğer Yakalama Yöntemleri: Mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunda kollajenin kullanılması Vieth ve arkadaşları tarafından enzim immobilizasyonu için geliştirilen teknikle başarılıdır. Bu yöntem membranlarda immobilize olmuş hücrelerin hazırlanması için uygundur. Kollagen membran zayıf olduğundan ve enzimler kolayca matriksten uzaklaşabileceğinden immobilizasyondan sonra çeşitli kuvvetlendirme muameleleri yapılır. Katılaştırma ajanı olarak formaldehit, glutaraldehit ve dialdehit nişastası kullanılır (Chibata ve arkadaşları,1986).

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 *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç'dan temin edilmiştir. Ayrıca tarama çalışması sırasında pozitif kontrol olarak kullanılan *Trametes versicolor* Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Kültürler potato dekstroz agarda +4 ° C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Mikroorganizmaların Üretimi

Çalışmada kullanılan fungusların aktivasyonu için Potato-Dekstroz-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.

Çalışmada kullanılacak olan funguslar stok kültürlerinden potato dekstroz agara ekilerek 4 gün süre ile 30 °C' de inkübasyona bırakılarak tazelenmiştir. Bu kültürlerden potato dekstroz sıvı besiyerine ekim yapılarak 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve aşı kültürler geliştirilmiştir. Üretilen aşı kültürler steril % 0.9 NaCl içerisinde homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 4 ml alınarak 250 ml'lik Erlenmeyer şişelerindeki 100 ml Modifiye Vogel ortamına aktarılmıştır. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 30 ° C sıcaklıkta ve 10 gün süre ile üretilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gelişen pelletler alınarak siyanür biyoyıkım çalışmalarında kullanılmıştır. Tüm üretim işlemleri aseptik koşullar altında yapılmıştır.

3.2. Kùltürlerin Siyanür Biyoyıkım Yeteneklerinin Belirlenmesi

Çalışmada siyanür biyoyıkım yetenekleri açısından karşılaştırılacak funguslar bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi üretilmiştir. Fungal biyokùtlelerden 2.0 g alınarak 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 aktarılmıştır. Tarama çalışması 30 ° C’ de çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında 42 saat sürdürülmüştür. Çalışma sonucunda ortamda kalan siyanür miktarı pikrik asit yöntemi ile ölçülerek denenen hücrelerin siyanür biyoyıkım yetenekleri belirlenmiştir. Çalışmada koşullar sabit tutulmak kaydıyla negatif kontrol olarak hücre içermeyen siyanür çözeltisi, pozitif kontrol olarak da literatür bilgisine göre (Çabuk ve arkadaşları, 2006) siyanür yıkımı açısından etkin olduğu bilinen *Trametes versicolor* kullanılmıştır. Çalışmalar en az 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tarama çalışmasının sonuçlarına göre, *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33), fungal biyokùtleleri diğer denenen türlere göre daha yüksek siyanür biyoyıkım yetenekleri ile seçilen türlerdir. Bu türler ile çalışmaya devam edilmiş ve her biri için ayrı ayrı siyanür biyoyıkımı için uygun koşullar belirlenmiştir.

3.2.1. Siyanür Ölçüm 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 ve Brown, 1952). Bu yöntem kullanılarak elde edilen standart eğri Ek Açıklamalar-B’ de verilmiştir.

3.2.2. Amonyak Ölçüm Yöntemi

CN yıkımına bağlı olarak ortamlarda oluşacak amonyak miktarının belirlenmesi Nesslerizasyon yöntemine (Greenberg ve arkadaşları, 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.

3.3. Siyanür Yıkımında Uygun Koşulların Belirlenmesi

3.3.1. Başlangıç Siyanür Konsantrasyonunun CN Yıkımına Etkisi

Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) biyokütleleri ile siyanür biyoyıkımında uygun başlangıç siyanür konsantrasyonu değerinin belirlenmesi için; bölüm 3.2.’ de belirtilen tarama çalışması koşullarında sadece başlangıç siyanür konsantrasyonu 25-250 mg/l aralığında değiştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda (42. saat) örnekler alınarak çözeltide kalan siyanür konsantrasyonu pikrik asit yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.2 pH Değerinin CN Yıkımına Etkisi

Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)’un biyokütleleri ile siyanür biyoyıkımında uygun pH değerinin belirlenmesi için; bölüm 3.2.’ de belirtilen ve uygun başlangıç siyanür konsantrasyonunun sabit tutulmak kaydıyla çözeltilerin 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 bu süre sonunda örnekler alınarak siyanür ölçümleri pikrik asit yöntemi ile yapılmıştır.

3.3.3. Biyokütle Miktarının CN Yıkımına Etkisi

Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)’un hücreleri ile CN yıkımında uygun biyokütle miktarının belirlenmesi için; bölüm 3.2.’de belirtilen diğer koşullar sabit tutulmak kaydıyla, pH 10.5 ve 100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonunda 0.5-7 g arasında değişen miktarlarda yaş biyokütle siyanür çözeltisine eklenerek inkübe edilmiştir. Çalışma, inkübasyon süresinin sonunda 42. saat CN ölçümleri için inkübasyon ortamından örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.4. İnkübasyon Süresinin CN Yıkımına Etkisi

Çalışmalarda siyanür yıkımı bakımından beyaz çürükçüller arasında en etkin tür olarak saptanan *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri, bölüm 3.1.2. 'de açıklandığı şekilde üretilmiş ve filtrasyon yapılarak hücreler elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin siyanür biyoyıkımına etkisinin belirlenebilmesi için tarama çalışmasındaki diğer koşullara ilave olarak, daha önce belirlenen uygun başlangıç siyanür konsantrasyonu (100 mg/l), pH 10.5 ve 3.0 g biyokütle miktarları sabit tutulmuştur. Çalışma boyunca 60. saate kadar 6 saat aralıklarla örnekler alınmış ve siyanür ölçümleri pikrik asit yöntemine göre yapılmıştır.

3.3.5. Çalkalama Hızının CN Yıkımına Etkisi

Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un biyokütleleri ile çalkalama hızının siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi için; bölüm 3.2.' de belirtilen ve bundan önceki çalışmalarda belirlenen tüm koşullar sabit tutulmak kaydıyla statik koşullardan 200 rpm' e kadar artırılan çalkalama hızı değerlerinde çalışılmıştır. Çalışma, siyanür biyoyıkımı için uygun süre olarak belirlenen 48. saate kadar sürdürülmüş ve bu süre sonunda örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır.

3.3.6. İnkübasyon Sıcaklığının CN Yıkımına Etkisi

Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un biyokütleleri ile inkübasyon sıcaklığının siyanür biyoyıkımına etkisinin belirlenmesi için; bölüm 3.2.' de belirtilen ve bundan önceki çalışmalarda belirlenen koşullar (100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu, pH 10.5, 3.0 g biyokütle miktarı, 48 saat inkübasyon süresi, 100 rpm çalkalama hızı) sabit tutulmak kaydıyla 20-60 ° C arasında değiştirilen sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, 48. saate kadar sürdürülmüş ve bu süre sonunda örnekler alınarak siyanür ölçümleri yapılmıştır. Tüm çalışmalarda hücre içermeyen kontrol grupları da oluşturularak elde edilen siyanür biyoyıkım değerinin ilgili hücrenin aktivitesine bağlı olup olmadığı araştırılmıştır.

3.4. İmmobilizasyon ve Endüstriyel Atıksu Uygulamaları

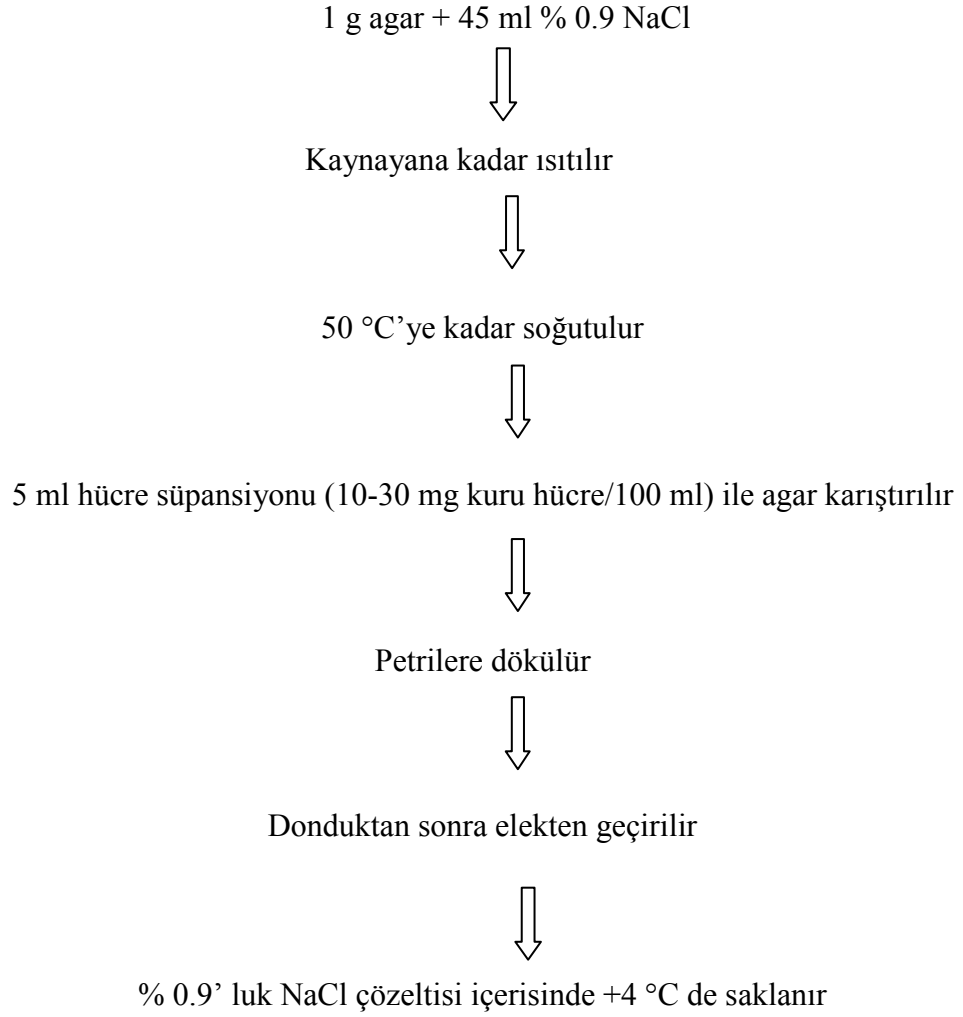
Çevresel kirleticilerin arıtmaları için geliştirilen biyolojik arıtım süreçlerinde önemli olan bir aşamada kullanılan biyokütlelerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bu aşamada immobilize edilen hücrelerin kullanılması önemli avantajlar sunmaktadır. Burada uygun ve ekonomik bir taşıyıcının kullanılması da endüstriyel uygulamalar için önemlidir. Bu amaçla tarama çalışması sonucunda seçilen 3 fungal türle yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel verilere göre *Polyporus arcularius* (T 438) diğerlerine kıyasla daha yüksek bir siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeni ile seçilerek agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilmiştir. Öncelikle agar ve poliakrilamid jelde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile belirlenen uygun koşullarda siyanür biyoyıkım yetenekleri araştırılmıştır.

Laboratuvar koşullarında hazırlanan çözeltilerde elde edilen arıtım değerlerinin endüstriyel atıksularda da etkinliğinin araştırılması geliştirilen arıtım sürecinin endüstriye uygulanması için önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örnekleri alınarak geliştirilmeye çalışılan arıtım sürecinin endüstriyel atık suya uygulanması hedeflenmiştir.

3.4.1. Agarda İmmobilizasyon

Hücrelerin agarda immobilize edilmesinde temel olarak Matsunaga ve ark.,'nın yöntemleri kullanılmıştır (Phillips and Poon, 1988).

1 g agar tartılarak 45 ml %0.9 NaCl içerisine ilave edilerek kaynatıldı. Bir termometre yardımıyla agar solüsyonunun sıcaklığı kontrol edildi ve 50 °C olduğunda hücre süspansiyonundan 5 ml ilave edilerek karıştırıldı. Hücre süspansiyonu; bölüm 3.1.2.'de anlatıldığı gibi üretilen hücreler, inkübasyon süresinin bitiminde % 0.9 NaCl içerisinde homojenizatör ile homojenize edilerek hazırlandı. Karışım, hızlı bir şekilde petrilere döküldü ve donmaya bırakıldı. Agar tamamen donduktan sonra 18-30 meş (595-1000µ) aralığındaki elekten geçirildi. Serbest hücreleri uzaklaştırmak için % 0.9' luk NaCl çözeltisinde iyice yıkandı. Elde edilen immobilize hücreler % 0.9' luk NaCl çözeltisi içerisinde kullanılana kadar muhafaza edildi. Kullanılan immobilizasyon yöntemi aşağıda diyagram halinde verilmiştir.

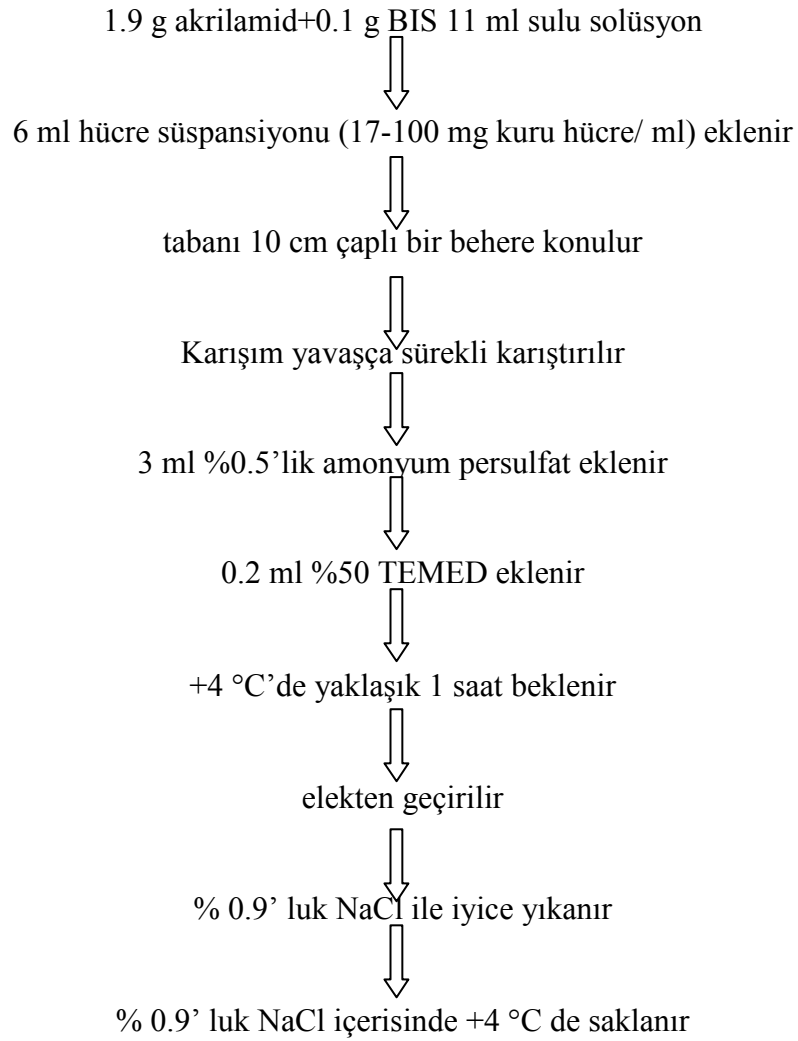


3.4.2. Poliakrilamid Jelde İmmobilizasyon

Hücrelerin poliakrilamid jelde immobilize edilmesinde temel olarak Chibata ve ark., 1986 ve Skryabin ve Koshcheenko, 1984' nun yöntemleri kullanılmıştır.

Soğuk monomer solüsyonu (11 ml) ve soğuk hücre süspansiyonu (6 ml) buz içeren bir küvete yerleştirilmiş olan 10 cm çapındaki bir cam behere döküldü ve karıştırıldı. Hücre süspansiyonu; bölüm 3.1.2.' de anlatıldığı gibi üretilen hücreler, inkübasyon süresinin bitiminde % 0.9 NaCl içerisinde homojenizatör ile homojenize edilerek hazırlandı. Üzerine 3 ml % 0.5' lik amonyum persulfat sulu solüsyonu (polimerleşmeyi başlatıcı olarak eklenir) ve en son olarak 0.2 ml % 50 TEMED (polimerleşmeyi hızlandırıcı olarak eklenir) ilave edildi. Bu karışım yavaşça sürekli olarak karıştırıldı. Jel oluşumu TEMED ilavesinden birkaç dakika sonra gözle görülebilir bir şekilde başladı. Ancak jelin yapısının kararlılığını sağlamak amacıyla jel

+4 ° C' de yaklaşık 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda 18-30 meş (595-1000 μ) aralığındaki elekten geçirildi. PAG' de tutuklanmış hücrelerden serbest hücreleri uzaklaştırmak amacıyla bol miktarda % 0.9' luk NaCl çözeltisi ile yıkandı ve hücreler kullanılana kadar % 0.9' luk NaCl çözeltisi içinde +4 °C' de saklandı. İmmobilizasyon yöntemi aşağıda diyagram halinde verilmiştir.



3.4.3. İmmobilize Hücrelerin Belirlenen Uygun Koşullardaki Siyanür Biyoyıkım Yeteneklerinin Araştırılması

İmmobilize hücrelerin büyük çapta endüstriyel kullanımı ve bu sayede büyük ekonomik yararlar sağlayacağı düşünülmüştür. Bu amaçla diğerlerine kıyasla daha

yüksek bir siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilip belirlenen uygun koşullarda siyanür biyoyıkım yetenekleri açısından karşılaştırılmıştır. +4 derecede saklanan immobilize hücreler serbest hücreleri uzaklaştırmak için % 0.9 'luk NaCl ile yıkanıp çalışmada belirlenen biyokütle miktarı kadar kullanılmıştır. Çalışmanın 1. gününde elde edilen deneysel verilere göre agarda immobilize edilen hücrelerin poliakrilamid jelde immobilize edilen hücrelere kıyasla daha yüksek siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeniyle çalışmaya *Polyporus arcularius* (T 438) agarda immobilize hücrelerle devam edilmiştir. Kontrol amaçlı içerisinde hücre bulunmayan immobilize agar denenmiştir.

3.4.4. Endüstriyel Atıksu Karakterizasyonu

Laboratuvar koşullarında hazırlanan çözeltilerde elde edilen arıtım değerlerinin *Polyporus arcularius* (T 438) agara immobilize hücrelerle atıksularda etkinliğinin araştırılması için, işlem görmemiş atıksuyun karakterizasyonu yapılmıştır. Atıksuyun bölüm 3.2.1.' de anlatılan pikrik asit yöntemi ile içerdikleri siyanür miktarları ölçülmüştür. Çalışma sonunda renk giderimini anlamak için absorbans değeri 520 nm' de köre karşı okunmuştur. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Su Ürünleri Laboratuvarında BOİ (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) miktarları ölçülmüştür. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde atomik absorpsiyon cihazında atıksuyun içerdiği metal derişimleri belirlenmiştir. Sıcaklık ve pH ölçümleri örnek alımını takiben yapılmıştır.

3.4.5. Immobilize Fungal Biyokütle ile Atıksuda Siyanür Biyoyıkımı

Laboratuvar koşullarında hazırlanan çözeltilerde elde edilen uygun koşullarda agarda immobilize edilmiş *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin endüstriyel atıksularda etkinliğinin araştırılması geliştirilen arıtım sürecinin endüstriye uygulanması için önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. Agarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri %0.9' luk NaCl çözeltisi ile yıkanıp, belirlenen biyokütle miktarı kadar tartılıp 250 ml'lik Erlenmeyer şişelerine 100 ml konulan atıksulara aktarılmış ve 48 saat süre sonunda ortamda kalan siyanür miktarı bölüm 3.2.1.' de anlatılan pikrik asit yöntemi ile ölçülmüştür. Immobilize biyokütle ile siyanür

biyoyıkımı gerçekleştirilen atıksuların özelliklerindeki değişim bölüm 3.4.4’de belirtilen laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

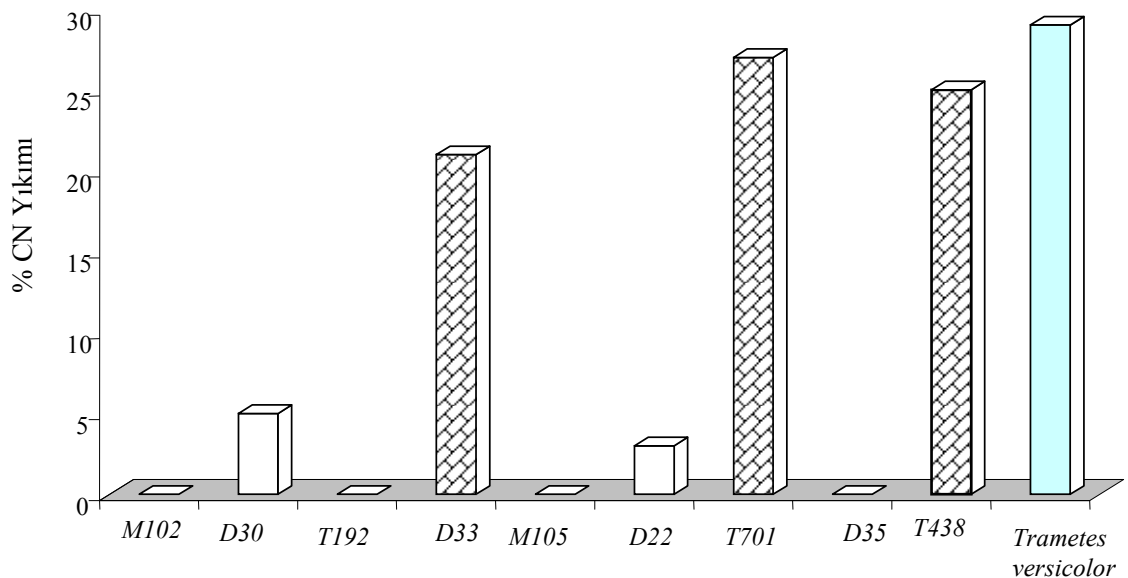
3.4.6. İmmobilize Biyokütlenin Kullanım Süresinin Belirlenmesi

Çevresel kirleticilerin arıtımları amacıyla geliştirilen biyolojik arıtım süreçlerinde endüstriyel uygulamalarda immobilize hücrelerin uzun süre kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bölüm 3.4.1.’de anlatıldığı gibi agarda immobilize edilen +4  C saklanan *Polyporus arcularius* (T 438) biyokütlenin kullanım süresinin belirlenmesi için belirlenen koşullarda 1.gün, 7.gün, 14.gün, 21.gün, 28.gün süre ile hücrelerin siyanür biyoyıkımları yapılmış ve bölüm 3.2.1.’de anlatıldığı gibi pikrik asit yöntemi ile llmştir. +4  C saklanan agarda immobilize hücreler %0.9’ luk NaCl zltisi ile yıkanıp kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Siyanür Biyoyıkımı İçin Etkin Mikroorganizmanın Belirlenmesi

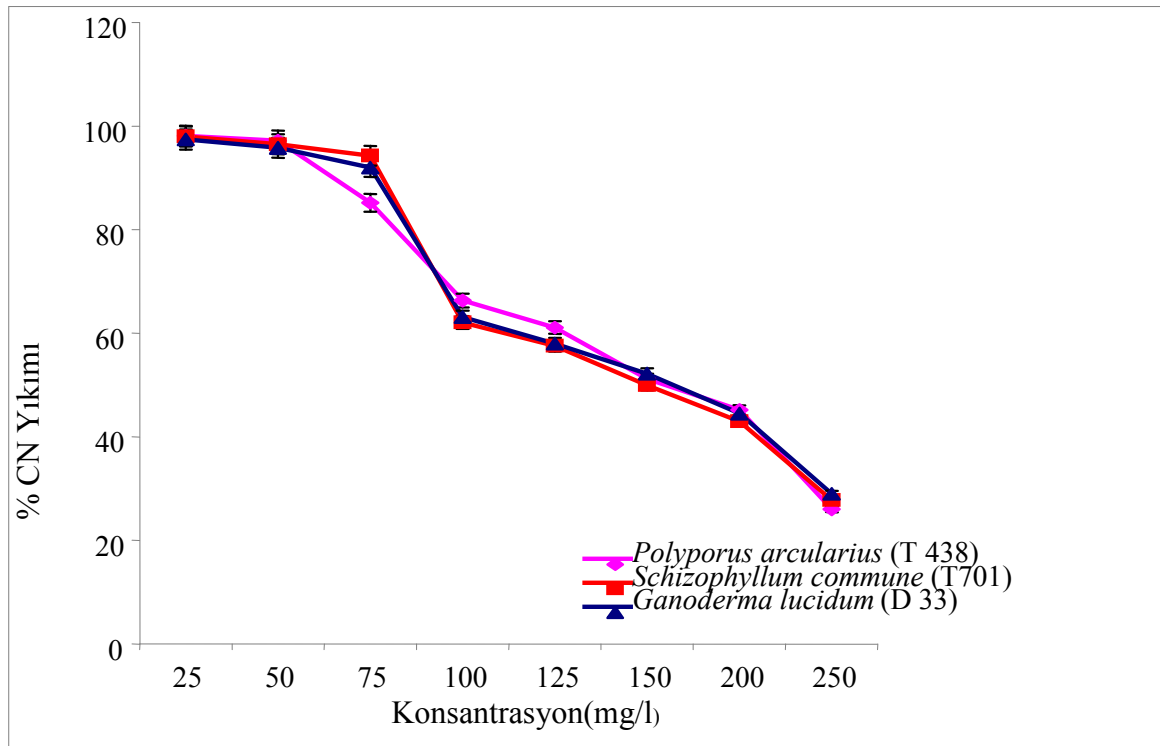
Siyanür yıkımı için etkin mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla *Basidiomycetes* sınıfına ait beyaz çürükçül funguslardan *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) kullanılmıştır. Bu türler arasında CN biyoyıkımı bakımından etkin türün belirlenmesi için yapılan eleme çalışmasının sonuçları Şekil 4.1.1.'de verilmektedir. Ayrıca negatif kontrol olarak hücre içermeyen siyanür çözeltisi, pozitif kontrol olarak da literatür bilgisine göre (Çabuk ve arkadaşları, 2006) siyanür yıkımı açısından etkin olduğu bilinen *Trametes versicolor* kullanılmıştır. En yüksek siyanür yıkım değerine *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile ulaşılmıştır.



Şekil 4.1.1. *P. arcularius* (T 438), *S. commune* (T 701), *C. truncatus* (T 192), *P. eryngii* (M 102), *G. applanatum* (M 105), *T. versicolor* (D 22), *C. unicolor* (D 30), *S. commune* (D 35), *G. lucidum* (D 33) hücrelerinin CN Biyoyıkım Etkinlikleri (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 2.0 g yaş biyokütle; başlangıç siyanür konsantrasyonu, ~ 400 mg/l; 30 ° C; pH 10.5; 150 rpm)

4.2. Başlangıç Siyanür Konsantrasyonunun CN Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

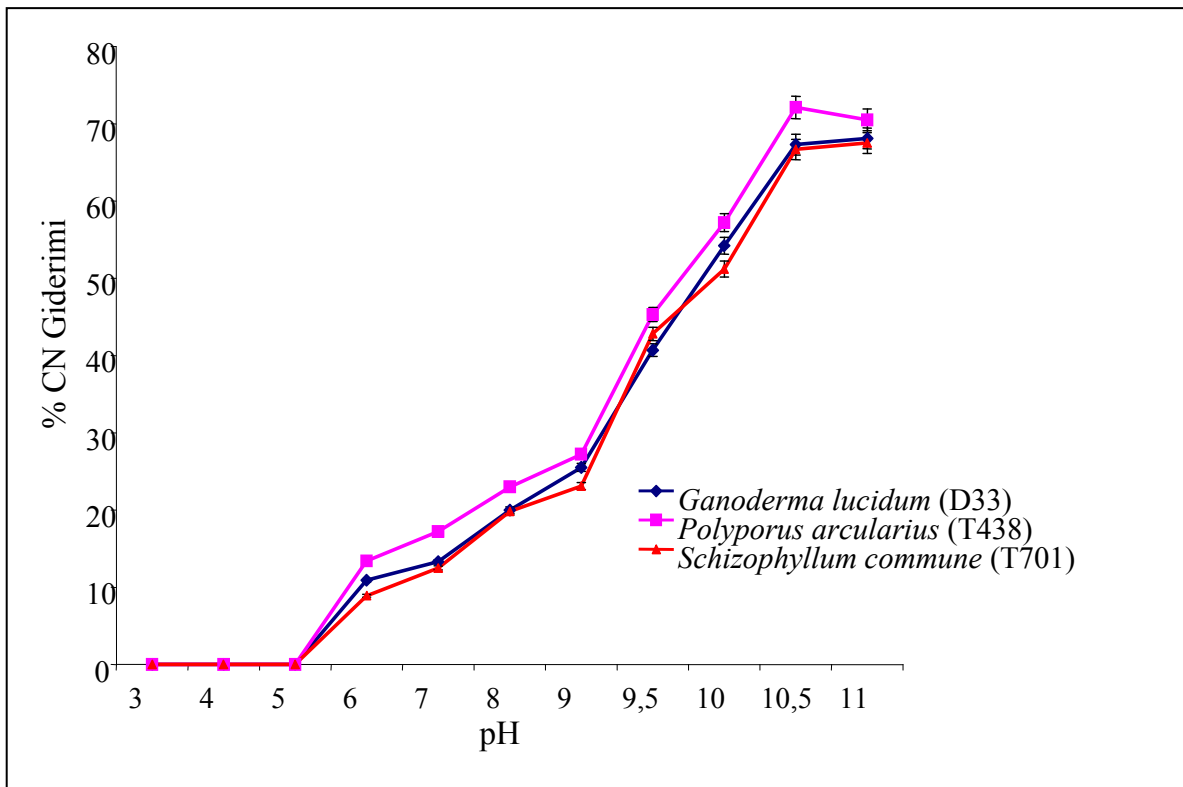
Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile başlangıç siyanür konsantrasyonunun siyanür biyoyıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla yaklaşık 25-250 mg/l arasında değişen miktarlarda siyanür içeren ortamlarda yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.2.1'de verilmektedir. Uygun başlangıç siyanür konsantrasyonu 100 mg/l olarak belirlenmiştir. Başlangıç siyanür konsantrasyonu arttıkça % siyanür yıkım değeri azalmaktadır. Şekil 4.2.1.'de görüldüğü gibi en yüksek % siyanür yıkım değerine yaklaşık 25 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonunun da ulaşılrken, en düşük değere yaklaşık 250 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonunda ulaşılmıştır.



Şekil 4.2.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımında başlangıç siyanür konsantrasyonunun etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 2.0 g yaş biyokütle; 30 ° C; pH 10.5)

4.3. pH Değerinin Siyanür Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

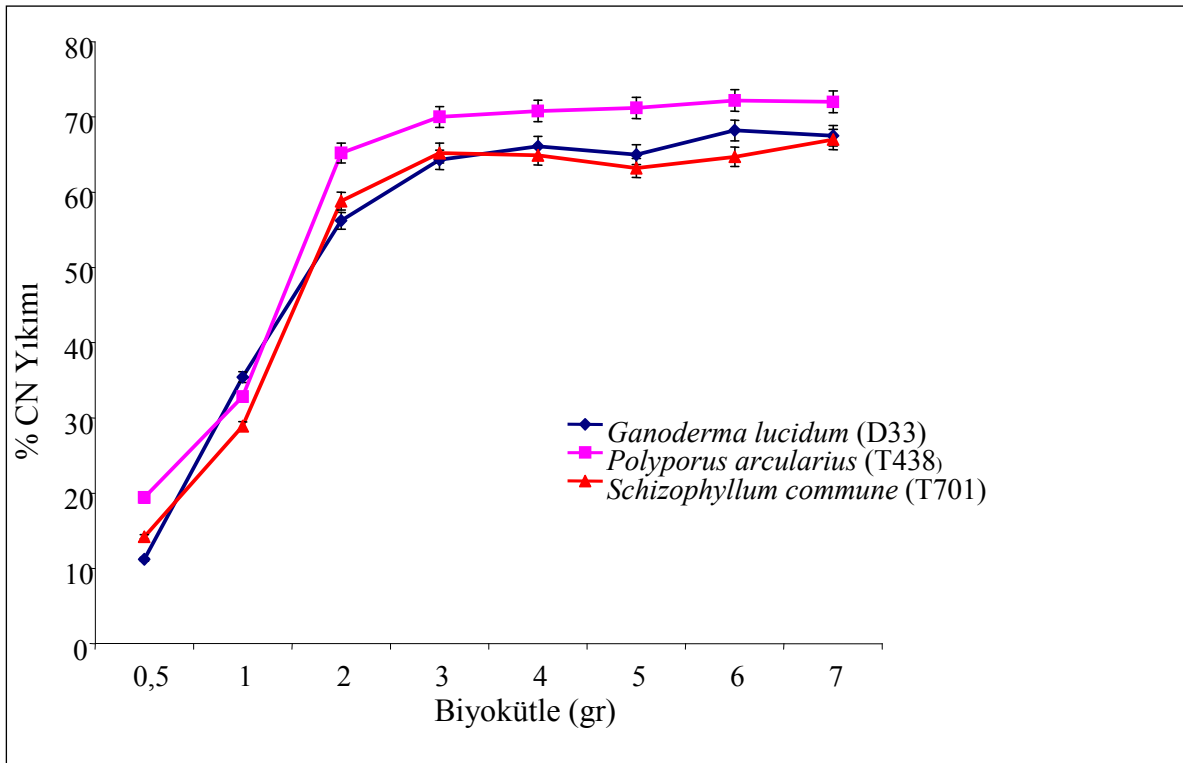
Etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile pH değerinin siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla 3.0-11.0 pH değerleri arasında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.1. 'de verilmektedir. Düşük 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 4.3.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile inkübasyon pH değerinin siyanür biyoyıkımına etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; 2.0 g yaş biyokütle; 30 ° C; pH 10.5)

4.4. Biyokütle Miktarının CN Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

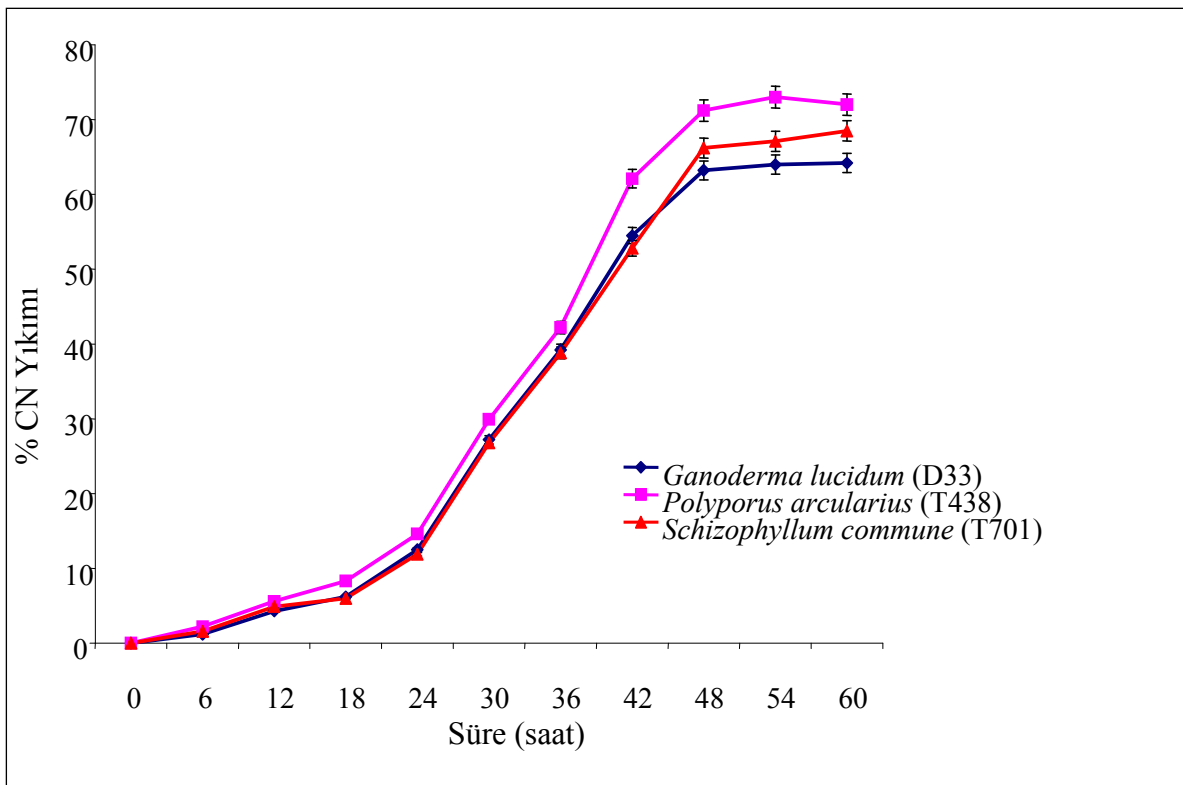
Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile biyokütle miktarının siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla 0.5-7 g arasında değişen miktarlarda biyokütle ilave edilerek yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.4.1. 'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre eklenen biyokütle miktarının artışıyla birlikte siyanür yıkımı da artmaktadır. Uygun biyokütle miktarı 3 g olarak belirlenmiştir. Eklenen biyokütle miktarı 3 gram ve daha üzeri değerlerde bir denge durumundan söz edebiliriz. Hatta biyokütle miktarının 7 gram olduğu değerlerde bile siyanür yıkımının çok fazla değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.4.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımına biyokütle miktarının etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 42 saat; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 ° C; pH 10.5; 150 rpm)

4.5. İnkübasyon Süresinin CN Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

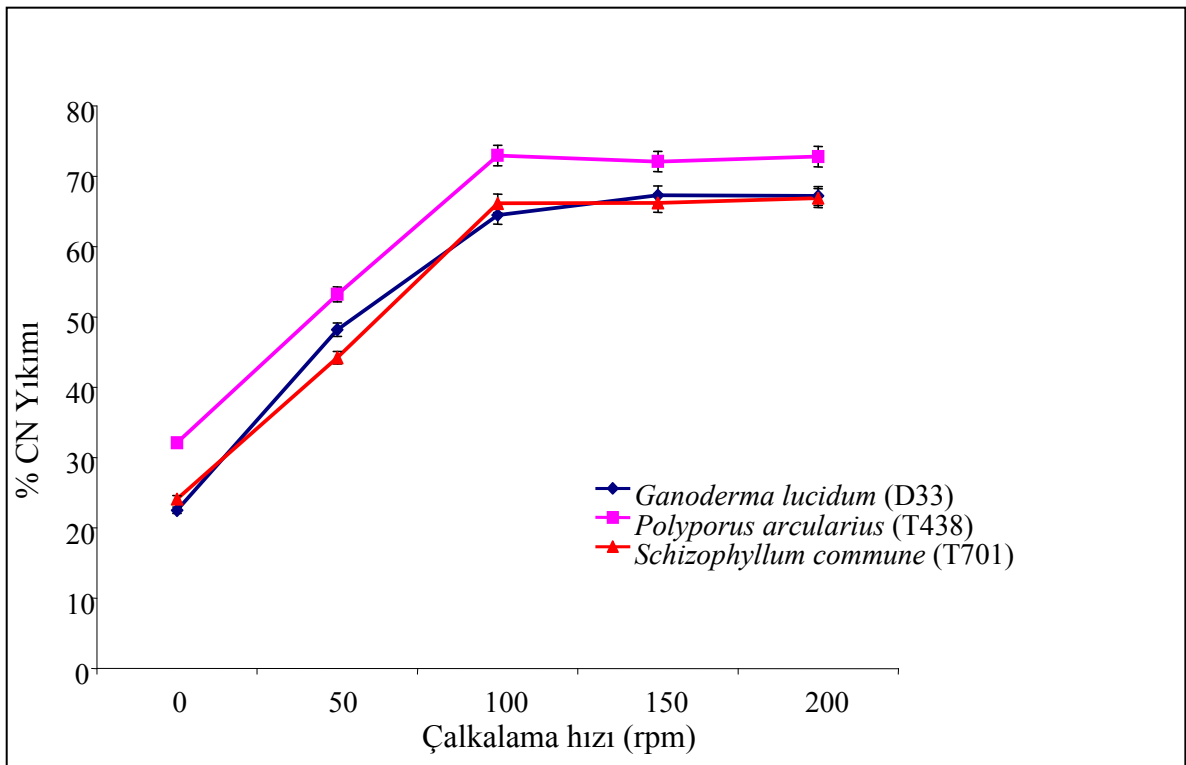
İnkübasyon süresinin siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.3.4.'de belirtildiği gibi yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.5.1.'de verilmiştir. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile siyanür yıkımı sürenin artışıyla birlikte bir artış göstermiştir. Ancak bu artışın 48. saatten sonra neredeyse dengeye ulaştığı görülmüştür.



Şekil 4.5.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımının inkübasyon süresine bağlı değişimi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 3.0 g yaş biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 ° C; pH 10.5; 150 rpm)

4.6. Çalkalama Hızının CN Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

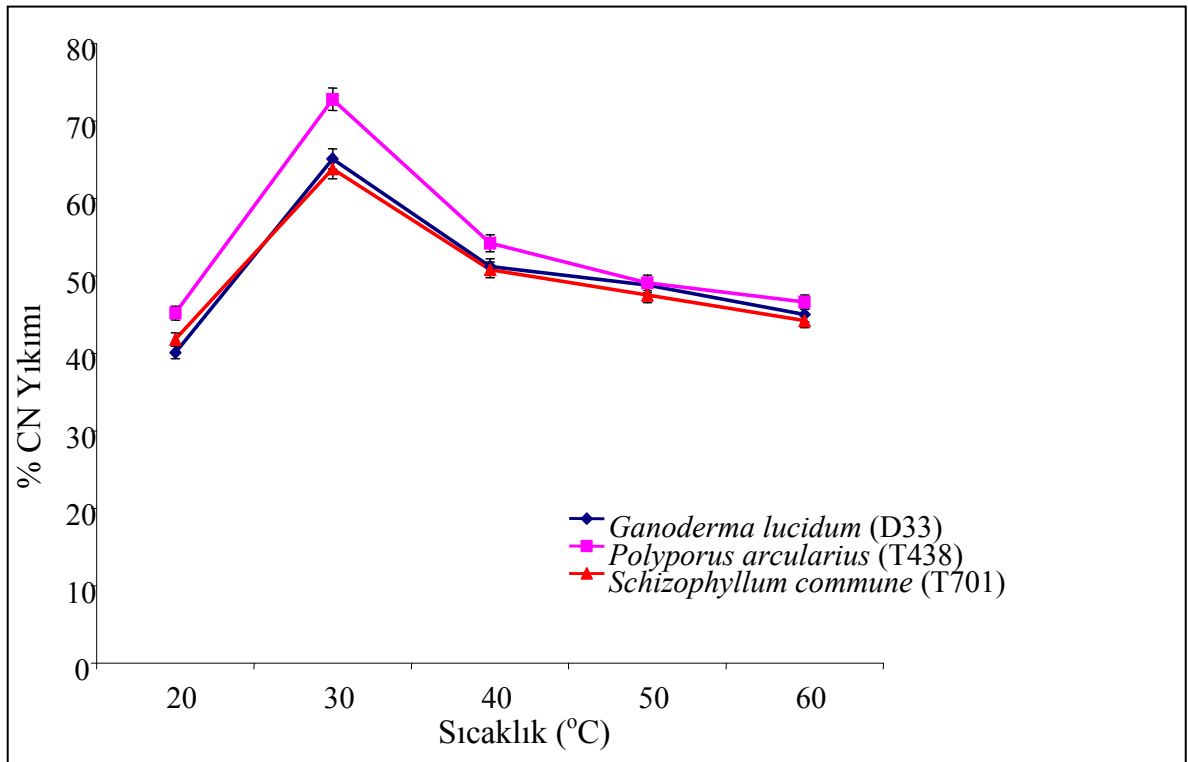
Etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile çalkalama hızının siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla statik koşullardan 200 rpm'e kadar artan çalkalama hızları denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.1'de verilmektedir. Çalkalama hızının artmasıyla % siyanür yıkımı bir artış göstermiş ve en yüksek değere 100 rpm de ulaşılmıştır.



Şekil 4.6.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile CN biyoyıkımına çalkalama hızının etkisi (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 48 saat; 3.0 g yaş biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; 30 ° C; pH 10.5)

4.7. İnkübasyon Sıcaklığının CN Yıkımına Etkisinin Belirlenmesi

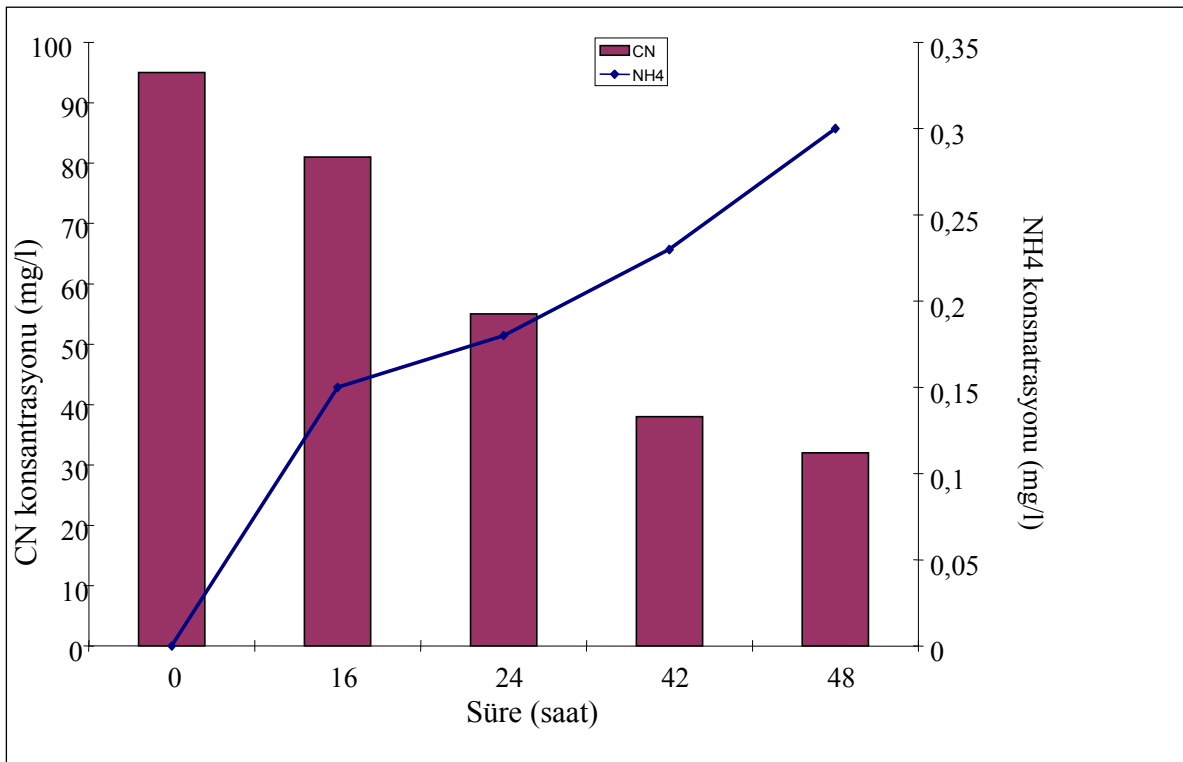
Polyporus arcularius (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33)'un hücreleri ile sıcaklık değerinin siyanür yıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla 20-60 ° C arasında 10 ° C'lik artışlarla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.1.'de verilmektedir. En yüksek % siyanür 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 4.7.1. *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen % siyanür yıkımı (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 48 saat; 3 g yaş biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; pH 10.5; 100 rpm)

4.8. Siyanür Biyoyıkımında Ortaya Çıkan Amonyak Miktarının Belirlenmesi

Belirlenen uygun inkübasyon koşulları kullanılarak *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile yapılan siyanür biyoyıkımı çalışmasının sonucunda inkübasyon zamanına bağlı olarak ortamdaki siyanür ve amonyak miktarındaki değişimler Şekil 4.8.1'de verilmektedir.



Şekil 4.8.1. Uygun 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 100 mg/l, sıcaklık 30 °C, eklenen biyokütle (yaş) miktarı 3.0 g, çalkalama hızı 100 rpm)

4.9. İmmobilize Hücrelerin Belirlenen Uygun Koşullardaki Siyanür Biyoyıkım Yeteneklerinin Araştırılması

Tarama çalışması sonucunda seçilen 3 fungal türle yapılan optimizasyon çalışmalarından elde edilen deneysel verilere göre *Polyporus arcularius* (T 438) diğerlerine kıyasla daha yüksek bir siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeni ile seçilerek agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilmiştir. Agar ve poliakrilamid jelde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin belirlenen uygun koşullarda siyanür biyoyıkım yetenekleri Çizelge 4.9.1.'de verilmiştir. Elde edilen deneysel verilere göre agarda immobilize edilen hücrelerin poliakrilamid jelde immobilize edilen hücrelere kıyasla daha yüksek siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeniyle çalışmaya *Polyporus arcularius* (T 438) agarda immobilize hücrelerle devam edilmiştir. Kontrol amaçlı içerisinde hücre bulunmayan agarın belirlenen koşullarda ki sonuçları Çizelge 4.9.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.9.1. Agar ve poliakrilamid jele immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ve hücre içermeyen immobilize agar ile siyanür biyoyıkımı (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 48 saat; 3 g immobilize biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; pH 10.5; 100 rpm)

| | Başlangıç CN miktarı (mg/l) | 48 saat inkübasyondan sonraki CN miktarı (mg/l) | % CN giderimi |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|---------------|
| Kontrol | 99,41 mg/l | 99,40 mg/l | |
| Agara immobilize T 438 | 99,41 mg/l | 28,82 mg/l | % 71 |
| Poliakrilamid jelde immobilize T 438 | 99,41 mg/l | 96,47 mg/l | %2.95 |
| Agar | 93.52 mg/l | 89,7 mg/l | % 0.3 |
| Poliakrilamid jel | 93.52 mg/l | 93.52 mg/l | %0 |

4.10. Endüstriyel Atıksu Karakterizasyonu ve İmmobilize Fungal Biyokütle ile Atıksuda Siyanür Biyoyıkımı

Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örneklerinin karakterizasyonu ve agarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin atıksularda kullanılarak siyanür biyoyıkım yetenekleri, metal derişimlerdeki farklılığı, BOİ sonuçları Çizelge 4.10.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.10.1. Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örneklerinin karakterizasyonu ve İmmobilize fungal biyokütlenin atıksuya uygulanması (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 48 saat; 3 g immobilize biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; pH 10.5; 100 rpm)

| Parametre | Atıksu (1) | Agarda immobilize <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) ile işlem gördükten sonra ki değerler | Atıksu (2) | Agarda immobilize <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) ile işlem gördükten sonra ki değerler |
|-------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sıcaklık (°C) | 24 | | 24.6 | |
| pH | 7.808 | 7.632 | 7.210 | 7.2 |
| CN (mg/l) | 0.012 | 0.008 | 0.08 | 0.016 |
| BOİ (mg/l) | 240 | 40 | 280 | 40 |
| Absorbans | 0.046 | 0.058 | 0.048 | 0.036 |
| Cu ²⁺ (mg/l) | 1.64 | 1.59 | 1.59 | 1.58 |
| Zn ²⁺ (mg/l) | - | - | - | - |
| Ni ²⁺ (mg/l) | 0.49 | 0.30 | 0.87 | 0.25 |
| Na ²⁺ (mg/l) | 262.50 | 217.50 | 859.50 | 845.00 |
| K ²⁺ (mg/l) | 67.50 | 66.00 | 77.50 | 70.50 |
| Cd ²⁺ (mg/l) | - | - | - | - |

| | | | | |
|-------------------------|-------|-------|--------|--------|
| Ca ²⁺ (mg/l) | 17.00 | 6.50 | 219.00 | 181.50 |
| Mg ²⁺ (mg/l) | 78.00 | 73.50 | 843.00 | 755.00 |
| Fe ²⁺ (mg/l) | - | - | - | - |
| Pb ²⁺ (mg/l) | 2.23 | 1.34 | 1.58 | 0.80 |

4.11. İmmobilize Biyokütlenin Kullanım Süresinin Belirlenmesi

Agarda immobilize edilen *Polyporus arcularius* (T 438) biyokütlelerin kullanım süresinin belirlenmesi için belirlenen koşullarda 1.gün, 7.gün, 14.gün, 21.gün, 28.gün süre ile bekletilen hücrelerin siyanür biyoyıkımları yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11.1.'de verilmiştir. Çizelgede de görüleceği gibi ilk gün kullanılan immobilize hücrelerin daha yüksek siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. İmmobilize edilen hücrelerin 28 gün bekleme süresi sonunda siyanür biyoyıkımın da kullanılmasının çok etkili olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.11.1. Agarda immobilize edilen *Polyporus arcularius* (T 438) biyokütlelerin gün sonuçları (çalışma koşulları: 100/250 ml Erlenmeyer; 48 saat; 3 g l günlük immobilize biyokütle; ~100 mg/l başlangıç siyanür konsantrasyonu; pH 10.5; 100 rpm)

| | Başlangıç CN miktarı (mg/l) | Agarda immobilize <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) bekletilme süreleri ve bu sürede CN yıkım aktivitesindeki değişimler | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 1. gün | 7. gün | 14. gün | 21. gün | 28. gün |
| Kontrol | 100 mg/l | 99,41 mg/l | 98,52 mg/l | 97,64 mg/l | 98,82 mg/l | 102,6 mg/l |
| Agarda immobilize <i>Polyporus arcularius</i> (T 438) ile işlem gördükten sonraki CN miktarı (mg/l) | | 28,82 mg/l | 73,23 mg/l | 92,64 mg/l | 92,64 mg/l | 102,3 mg/l |
| % CN Yıkımı | | % 71 | % 15.5 | % 5.1 | % 6.2 | % 0.2 |

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Çevreyi kirleten pek çok etken vardır. Dolayısıyla her birinin ayrı ayrı değerlendirilip çevrede yarattığı olumsuz etkinin ortadan kaldırılması zorunludur. Ancak burada önemli olan ve arıtım teknolojilerinin geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta çevrede kirleticilerin tek tek değil çoğunlukla birkaç çeşidinin bir arada bulunmasıdır. Bu durumda geliştirilen ve geliştirilecek olan arıtım teknolojilerinin çevresel uygulamalarda başarılı olabilmesi için atık karakterizasyonunun iyi bilinmesi zorunludur.

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 için *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) siyanür biyoyıkım yetenekleri açısından karşılaştırılmışlardır. Bu çalışma sonucunda *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) 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 *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür yıkımı için uygun koşullar belirlenmiştir. Belirlenen uygun koşullarda *P. arcularius* hücrelerinin muhtemel olarak kullanabilecekleri metabolik yol izleri ve dolayısıyla enzim sistemlerinin anlaşılabilmesi nedeniyle siyanür yıkımı sonucu oluşan ürünler tespit edilmiştir. Tarama çalışması sonucunda seçilen 3 fungal türle yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel verilere göre *Polyporus arcularius* (T 438) diğerlerine kıyasla daha yüksek bir siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeni ile seçilerek agar ve

poliakrilamid jelde immobilize edilmiştir. Öncelikle agar ve poliakrilamid jelde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin belirlenen koşullarda siyanür biyoyıkım yetenekleri araştırılmıştır. Laboratuvar koşullarında hazırlanan çözeltilerde elde edilen arıtım değerlerinin endüstriyel atıksularda da etkinliğinin araştırılması için Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örneklerinde agara immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri kullanılarak geliştirilmeye çalışılan arıtım sürecinin endüstriyel atık suya uygulanması hedeflenmiştir. İmmobilize hücrelerin kullanım süresinin belirlenmesi amacıyla belirlenen sürelerde denemeler yapılmıştır.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan daha önceki çalışmalarda *Trichoderma harzianum*, bazı *Trichoderma* türlerinin ve *Trametes versicolor*'un siyanür biyoyıkımı açısından etkili türler oldukları bildirilmiştir (Ezzi ve Lynch, 2002; Ezzi ve arkadaşları, 2003; Çabuk ve arkadaşları, 2006). Bu nedenle, etkin türün belirlenmesi amacıyla yapılan tarama çalışması sırasında, denenen 9 beyaz çürükçül fungusun yanı sıra *T.versicolor* hücreleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

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 sadece *Fusarium oxysporium* ve *Gliocladium virens* olarak tanımladıkları fungusların 520 mg/l siyanür içeren ortamda gelişebildiklerini bildirmişlerdir (Peraira ve arkadaşları, 1996). 300 mg/l'nin üzerindeki siyanür konsantrasyonlarının mikroorganizmalar için toksik olduğu bildirilmekle birlikte bazı çalışmalarda bu değer üzerinde denemelerin yapıldığı görülmektedir (Peraira ve arkadaşları, 1996; Gürbüz ve arkadaşları, 2004). Çabuk ve arkadaşları (2006) 400 mg/l gibi mikroorganizmalar dahil tüm canlılar için toksik olan bir değerde *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Pleurotus sajor-caju* hücrelerinin siyanür biyoyıkım yeteneklerini araştırmışlar ve etkin tür olarak *T.versicolor* hücreleri ile çalıştıklarını bildirmişlerdir. Bu kadar yüksek konsantrasyonda siyanür içeren bir ortamda diğerleri arasından daha yüksek yıkım yeteneği nedeniyle seçilen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T

701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile koşulların optimizasyonu sonucunda elde edilecek parametreler sayesinde daha yüksek yıkım değerlerine ulaşılabileceği de düşünülmektedir.

Başlangıç siyanür konsantrasyonunun etkisini araştırmak üzere 25-200 mg/l aralığında siyanür içeren ortamlarla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.1’de verilmiştir. 100 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 100 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 ve 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 ve arkadaşları, 1996; Pereira ve arkadaşları, 1999). Çabuk ve arkadaşları (2006), *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Pleurotus sajor-caju* hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada yaklaşık 125 mg/l siyanür konsantrasyonunda etkin yıkımın olduğunu bildirmişlerdir.

Düşük pH değerlerinde siyanür yıkımının neredeyse hiç olmadığı Şekil 4.3.1,’de görülmüştür. Bu nedenle pH 3.0, 4.0 ve 5.0 pH değerlerinde siyanür biyoyıkımından söz etmek mümkün olamamaktadır ama siyanürün ortamdan uzaklaştığı görülmüştür. 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; Çabuk, 2005). pH 6.0, 7.0 ve 8.0 değerlerinde çalışma grubunda kontrolden biraz daha fazla giderim olduğu görülmüştür. Ancak yine kontrol gruplarında yüksek miktarda kendiliğinden bir siyanür uzaklaşması

görülmektedir. 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; Çabuk, 2005). 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 4.3.1.). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı çalışmaların büyüme ortamına siyanür ilavesi ile yapıldığı görülmektedir (Pereia ve arkadaşları, 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 ve arkadaşları, 2003; Gurbuz ve arkadaşları, 2004; Ebbs, 2004; Çabuk ve arkadaşları, 2006).

Siyanür biyoyıkımı için yıkım ortamına eklenen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücre miktarının etkisini araştırmak üzere 0.5-7.0 gram arasındaki yaş ağırlık değerleri seçilmiştir. Biyokütle miktarındaki artışla birlikte siyanür biyoyıkımında da artış gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.4.1.). Eklenen biyokütle miktarı 3 gram ve daha üzeri değerlerde bir denge durumundan söz edebiliriz. Hatta biyokütle miktarının 7 gram olduğu değerlerde bile siyanür yıkımının çok fazla değişmediği gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 3.0 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 ve arkadaşları, 1996; Çabuk, 2005).

Siyanür yıkımı bakımından etkin tür olarak seçilen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile siyanür biyoyıkımı 60. saate kadar 6 saat aralıklarla pikrik asit yöntemi ile ölçümler

yapılarak takip edilmiştir. 48. saatten itibaren yıkım miktarında önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir (Bkz. Şekil 4.5.1.). Bu nedenle 48. 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. Çabuk ve arkadaşları (2006) *T. versicolor* hücrelerini kullanarak 102 saat süre ile siyanür yıkımını takip etmişler ve 42. saatten itibaren siyanür yıkımının dengeye ulaştığını bildirmişlerdir. Elde edilen optimum süre literatürle kıyaslandığında uygun bir sürede siyanür yıkımının gerçekleştiği söylenebilir.

İnkübasyon ortamının karıştırılmasının ve havalandırmanın etkisinin araştırıldığı denemelerde statik etüvde yapılan inkübasyon sonunda en düşük yıkım değerinde ulaşıırken (Bkz. Şekil 4.6.1.), 100 rpm'e kadar çalkalama hızı artıkça yıkım oranı da önemli derecede artış göstermiştir. Ancak 100 rpm'den sonra yıkım miktarında bir artış kaydedilmemiş ve bir denge durumunun olduğu görülmüştür. Bu nedenle uygun çalkalama hızı olarak 100 rpm seçilmiştir.

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 4.7.1.). 48 saat sonunda 30 ° C'de yüzde olarak en yüksek siyanür yıkım değerine ulaşılmıştır.

Bazı mikroorganizmalar için sıcaklık değeri azaldığında siyanür yıkım oranının arttığı bildirilmiş olmakla birlikte (Blumenthal ve arkadaşları, 1968) bunun aksine sonuçlar da literatürde görülmektedir (Blumenthal ve arkadaşları, 1968; Gurbuz ve arkadaşları, 2004). Örneğin *Burkholderia cepacia* hücreleri ile 30 ° C'de elde edilen siyanür yıkım oranının 15 ° C'ye kıyasla daha fazla olduğu vurgulanmıştır (Blumenthal ve arkadaşları, 1968). Çalışmamızda 20 ° C 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

Etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile yapılan çalışma sonucunda uygun koşullar, süre 48 saat; biyokütle miktarı 3.0 g (yaş ağırlık); başlangıç siyanür konsantrasyonu 100 mg/l; sıcaklık değeri 30 ° C; pH değeri de 10.5, çalkalama hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir.

Etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücrelerine kıyasla daha yüksek siyanür biyoyıkım yeteneğine sahip olması nedeni ile *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri agar ve poliakrilamid jelde immobilize edilmiştir. Agar ve poliakrilamid jelde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin siyanür biyoyıkıma ait literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Siyanürün biyoyıkımı sonucu oluşabilecek ürünler mikroorganizmanın sahip olduğu enzim sistemine bağlı olarak karbondioksit, formik asit, formamit ve amonyak olduğu bilinmektedir (Raybuck, 1992). Dolayısıyla *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile siyanür yıkımı sonucunda oluşması beklenen ürünlerden bir tanesi amonyaktır. Literatür bilgisine göre biliyoruz ki, oluşan amonyağın kaynağı siyanürde bulunan azottur (Harris ve Knowles,1983; Dorr ve Knowles 1989; Raybuck, 1992; Çabuk, 2005). Uygun koşullarda yapılan çalışmada 48. saate kadar siyanür yıkımında gözlenen sürekli artışa koşut olarak amonyak miktarında da artış kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.8.1.). Bu da bize oluşan amonyağın *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin siyanürü parçalaması sonucunda oluştuğunu göstermektedir. (Raybuck, 1992; Kao ve arkadaşları, 2003; Çabuk, 2005)

Agar ve poliakrilamid jelde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin siyanür biyoyıkım yetenekleri araştırılmıştır ve agarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile daha yüksek siyanür giderimi görülmüştür (Bkz. Şekil 4.9.1.). Kao ve arkadaşları (2007) *Klebsiella oxytoca* hücrelerini alginat ve triasetat matriksi içinde immobilize ederek siyanür biyoyıkımlarını araştırmışlardır. Bakteriyal biyoküteller ile yapılmış immobilize hücrelerin siyanür biyoyıkımı üzerine

yapılan çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte fungal biyokütlelerle yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması ile siyanür yıkım yeteneği ortaya konan ve diğer seçilen türler arasından da etkin yıkım yeteneği ile öne çıkan *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin agarda immobilize edilerek literatüre bu konuda katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden Eskişehir Su ve Kanalizasyon İşleri (ESKİ) atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atık su örneklerinde immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri kullanılarak geliştirilmeye çalışılan arıtım sürecinin endüstriyel atık suya uygulanması hedeflenmiştir. Immobilize hücrelerin uygun ve ekonomik bir taşıyıcı olması endüstriyel uygulamalar için önemlidir. Atıksuya uygulanan immobilize hücrelerin siyanür biyoyıkımı yeteneklerinin absorbansı pikrik asit yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen veriler, *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile endüstriyel atıksularda da siyanür biyoyıkımının yapılabileceğini göstermiştir.

Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ) aerobik koşullarda mikroorganizmaların sudaki organik maddeleri ayrıştırmaları için gerekli oksijen miktarı olarak tanımlanmaktadır. Endüstriyel atıksuların tüketecekleri çözünmüş oksijen miktarı, kirlenme potansiyelinin ve alıcı ortamın çözümleme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir parametredir. Bu amaçla Eskişehir Organize Sanayi bölgesinden ESKİ atık arıtım tesisine gelen siyanür ve türevlerini içeren kompozit atıksu örnekleri ve agara immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücreleri ile işlem görmüş aynı atıksuyun BOİ miktarı ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. BOİ miktarlarındaki düşüş bize agara immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin atıksularda siyanür yıkımı ile birlikte organik madde yükünde azalmasına katkı sağladığını göstermiştir.

Doğal veya endüstriyel nedenlerle ağır metallerin birikimi ve bunların nedenleri önemli çevresel sorunlar arasına girmiştir. Eser miktarlarda bile sakıncalı olabilen bu maddeler arasında en önemli gubu ağır metaller diye adlandırılan Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Pb, Mn, Hg, Ni, Se, T, U, V, Zn elementler oluşturur. Atıksuyun karakterizasyonunda içerdiği metal derişimlerine bakılmış ve agara immobilize hücrelerle işlem gördükten sonra atıksuda ki metal derişimlerinde düşmeler olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle Ni ve Pb gibi elementlerin konsantrasyonunda ki düşüşler

immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin siyanür biyoyıkımı dışında ağır metal giderimide yapması nedeniyle endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini bize göstermiştir.

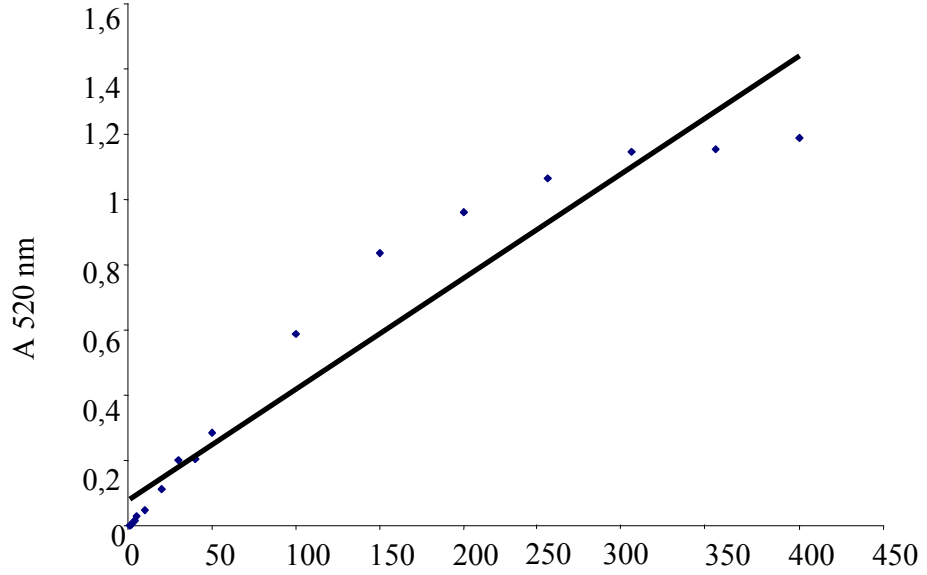
Çevresel kirleticilerin arıtmaları amacıyla geliştirilen biyolojik arıtım süreçlerinde endüstriyel uygulamalarda immobilize hücrelerin uzun süre kullanılması büyük önem taşımaktadır. Ağarda immobilize *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin belirlenen uygun koşullarda kullanılma süresinin belirlenmesi amacıyla 1.gün, 7.gün, 14.gün, 21.gün, 28.gün süre ile bekletilip denemeler yapılmıştır. İlk gün siyanür biyoyıkımında kullanılan immobilize hücrelerin daha fazla yıkım yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. 28.günde denenen immobilize hücrelerin siyanür biyoyıkımında fazla etkili olmadığı görülmüştür. .

Beyaz çürükçül funguslar ile siyanür biyoyıkımı açısından literatürde sınırlı sayı da çalışmaya rastlanırken, özellikle bu çalışmada etkin tür olarak belirlenen *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701) ve *Ganoderma lucidum* (D 33) hücreleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *Polyporus arcularius* (T 438) hücrelerinin immobilize edilip siyanür biyoyıkım yeteneklerinin araştırılması ve immobilize hücrenin atıksuya uygulanması gelişen arıtım sürecinde etkin olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olduklarını bize göstermiştir. Bu nedenle elde edilen verilerin bu alandaki yapılan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

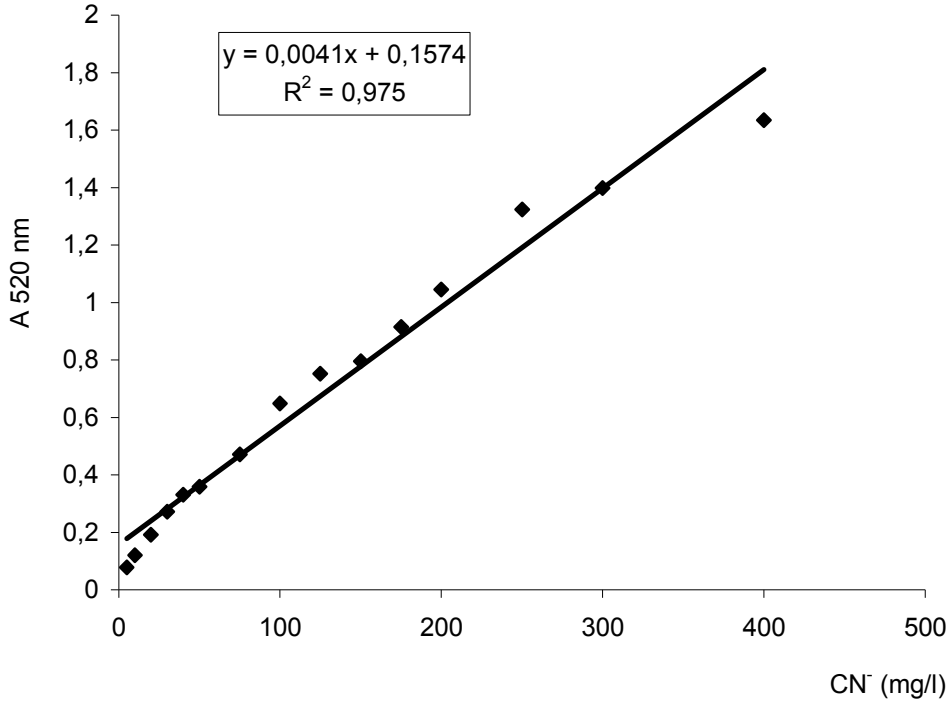
6. Ek Açıklamalar

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 Eğri

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



Şekil B.2. Nesslerizasyon yöntemi ile 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 belirlenmesi 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.

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.
- Alain-Boudet, M., 2000, "Lignins and lignification", *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 81.
- Arisoy, M., Kolankaya, N., 1997, Biodegradation of Heptachlor by *Phanerochaete chrysosporium* ME 446: The Toxic Effects of Heptachlor and Its Metabolites on Mice, *Journal of Biology*, 427-434.
- Atkinson, A., 1975, Bacterial cyanide detoxification, *Biotec. and Bioengin.*, 17, 458.
- Augugliaro, V., Loddo, V., Marci, G., Palmesano, L., Lopez-Munoz, M.J., 1997. Photocatalytic oxidation of cyanides in aqueous titanium dioxide suspensions. *Journal of catalysis*.166, 272-283.
- 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.
- Benedict, F.W., Paul, B., Nebert, W., 1972, Expression of benz[a]anthracene-inducible aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mouse-hamster and mouse-human somatic-cell hybrids, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48, 293 - 298.
- Blumenthal, S.G., Hendrickson, H.R., Abrol, Y.P., Conn, E., 1968, Cyanide metabolism in higher plants. 3. The biosynthesis of beta-cyanolanine, *J Biol Chem*, 243.
- Bodansky, M., Levy, M.D., 1923, "Some factors influencing the detoxication of cyanides in health and disease". *Arch. Int. Med.* 31.373.
- 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.
- Campos, M.G., Pereira, P., Roseiro, J.C., 2005, Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908, Enzyme and Microbial Technology, 38, 848 - 854.
- 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.
- Chen, C.Y., Kao, C.M., Chen, S.C., 2007, Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater, Chemosphere, 71, 133–139.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., 1986, Methods of Cell Immobilization, Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Ed. by Arnold L. Demain and Nadine A. Solomon.
- Chin, R.G. and Calderon, Y., 2000, Acute cyanide poisoning: a case report, J Emerg Med., 18, 441-5.
- Cunningham, L. and Williams, H.D., 1995, Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, 177,2,432 - 438.
- Çabuk, A., Unal, A.T., Kolankaya, N., 2006, Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*, Biotechnol Lett, 28, 1313–1317.
- Çabuk, A., 2005, Beyaz Çürükçül Funguslarla Siyanür Biyodegradasyonu, Doktora Tezi, O.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 60 s.
- Çelik, H., İpekoğlu, Ü., Mordoğan, H., 1998. “Bazı ağır metallerin alkali siyanür çözeltilerindeki davranışı”, Madencilik Dergisi, 37(1), 35 - 46.
- Dasha, R.R., Balomajumder, C., Kumara, A., 2007, Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption and biodegradation (SAB), Journal of Hazardous Materials 152, 387–396.
- DSİ, 1980, Aşağı Seyhan Havzası Master Planı.
- 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.
- Ebbs, S., 2004, Biological degradation of cyanide compounds, *Current opinion in Biotechnology*, 15, 231 - 236.
- 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.
- Fry, W.E. and Millar, R.L., 1972, Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151, 468 - 74.
- Gossel, A., Bricker, J., 1984, *Principles of Clinical Toksikology Cyanide syf:90- 94*
- 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 *Pseudomons fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth, *FEMS Microbiology Letters*, 20, 337 - 341.
- Hasenekoğlu İ., Yeşilyurt S., *Mikrobiyoloji Erzurum*, 2001.
- Hidrosiyamik Asit Toksikoloji Nevin Vural 1996 Syf:421 – 426.
- İmre, S., Sağlık, S. 1998. Fatty acid composition and colesterol content of some Turkish fish species. *Turkish J. Chem.* 22: 321 – 324.

- 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.
- Kirk, T.K., Lamar, T., Glaser, S.A., 1992, "The potential of white-rot fungi in bioremediation", Mongkolsuk, S., Lovett, P.S., Trempy, J.E. (ed), *Biotechnology and Environmental science molecular approaches*, Plenum Press, New York, 131.
- Knowles, C.J. and Bunch, A.W., 1986, Microbial Cyanide Metabolism, *Adv. In Microbial Physiology*, 27, 73-111.
- Komatsu, Y. and Tanaka, K., 1973, Deoxycytidine uptake by isolated membrane vesicles from *Escherichia coli* K 12, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 311, 496-506.
- 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.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999, "Biodegradation of Lignin by white rot fungi", *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175.
- McKee, J.E., Wolf, h.w., 1974, " water quality criteria"; 2nd Ed, California state water resources control board, Usa.
- 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.
- Murder, T., 2001. The cyanide guide, is special issue of *Mining Environmental Management*, Published by The Mining Journal ,London, England,45 p.

- Padmaja, G. and Balagopal, C., 1985, Cyanide degradation by *Rhizopus oryzae*, *Can. J. of Microbiol.*, 31, 663-669.
- Paice, M. G. and Jurasek, L., 1984, . *J. Wood Chem. Technol.* 4, 187-198.
- Patil, Y.B. and Paknikar, K.M., 2000, Development of a process for biodegradation 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.
- Phillips, C.R. and Poon, Y.C., 1988; *Immobilization of Cells*, Springer-Verlag, Berlin.
- Raybuck, S.A., 1992, *Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation*, 3, 3 - .18.
- Reich. K., 1955, "The effect of cyanide and azide on the respiration of the amoeba, *mayorella palestinensis*" *physiol. Zool.* 28.145.
- 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.
- Saterlay, A.J., Hong, Q., Compton, R.G., Clarkson, J., 2000. Ultrasonically enhanced leaching: removal and destruction of cyanide and other ions from uses carbon cathodes. *Ultrasonics Sonochemistry* 7, 1-6.
- 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.
- Skoog, D.A., West, D.M. and Holler, F.J., 1996, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Saunders College Publishing.
- Skryabin, G.K., Koscheenko, K.A., 1984, Immobilization of Living Mikrobial Cells in Poliakrilamid gel *Methods in Enzymology Vol 135, Immobilized Enzyme and Cells Part B.*, Ed. by Mosbach, K. p 198 - 215.
- Southgate, B., 1955, "Water Pollution". *Chem. And Ind.* 1194.

- Staunton W., 1991,. "Treatment of Gold Mine Waste Containing Cyanide" "Fate of Cyanide in the Environment Near Mine Tailings", Australian Mineral Industries Research Association Limited (AMIRA), Kasım 1991, P 227.
- 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.
- Train, E. Russel., 1979, "Quality Criteria for Water", England, p.65.
- Tunalı, İ., Adli Tıp Hidrosiyamik Asit Zehirlenmeleri syf:211 - 213
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., 2000, Biodegradation of lignin in copost environment: a review, *Bioresource Tech.* 72, 169 - 183.
- Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları,1999.
- Ünal, A., 2004, Lakkaz enzimi ile bazı toksik klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonu, Doktora Tezi, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 104s.
- Ünal, A., Kolonkaya, N., 2004, Chlorine removal from pp'DDT by laccase enzyme produced from *Trametes versicolor*, *Journal of Biotechnology*, 17 - 21.
- 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.
- Wainwright, M., 1992, *An Introduction to Fungal Biotechnology*, John Wiley and Sons, New York, 86.
- Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K. and Karube I., 1998, Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas* strain AK61, by cyanide, *Microbiology*, 144, 1677 - 1682.
- Wenhua H. and Ding Z., 1993, *Water Treatment* 8 , 119 - 126.
- World Health Organization, 1984, "Guidelines for Drinking Water Quality", Printed in Belgium, s.50,55.
- Vilchez M. J., Vigara J., Garbayo I. and Vilchez C., 1997, *Enzyme Microb.Technol.*,21, 45 - 47.
- Vural N., 1996, Toksikoloji Akut Zehirlenmelerde İlk Yardım Ve Antidot Tedavisinin Prensipleri syf:278 – 279.
- Yarar, B., 2001. "Cyanides in the environment and their long-term fate", *Proceedings of 17th International Mining Kongress and Exhibition of Turkey-IMCET2001*,85 - 93.

Yeşilada, Ö., Asma, D., Cing, S., 2003, “Decolorization of textile dyes by fungal pellets”, *Process Biochemistry*, 38, 933.

Ying, W., 1987, Removal of dioxins, pcb's and other halogenated organic compounds from wastewater, *Biotechnology Advances*, 5, 209.

Young, C.A., Jordan, T.S., 1995. Cyanide remediation:current and past Technologies,in *Proceedings of the 10 th Annual Conference on Hazardous Waste Research.Great Plains,Kansas State University,Kansas.*

On-line: [www. cyanicode.org](http://www.cyanicode.org)

On-line: [www. farma. hacettepe.edu.tr](http://www.farma.hacettepe.edu.tr)

On-line: [www. cyantist.com](http://www.cyantist.com)

On-line: [www. farma. hacettepe.edu.tr](http://www.farma.hacettepe.edu.tr) Boğucu Gazlar.