

***Trametes versicolor* Lakkazı ile Pentaklorofenol ve 2,6-Diklorofenol'den Klor Uzaklaştırılması¹**

Özge Tabak², Serap Gedikli², Pınar Aytar², Arzu Ünal³,
Ahmet Çabuk⁴, Nazif Kolankaya⁵

Özet

Yüksek toksisiteleri, kanser oluşturabilmeleri ve dayanıklılıkları nedeni ile toprak, sediment, yüzey suları ve atık sularda yaygın olarak bulunan önemli kirleticiler olarak bilinen klorofenollerin pestisit, herbisit ve odun koruyucu olarak yaygın kullanım alanları vardır. Söz konusu bileşiklerin yapısına klor ilave edilerek dayanıklılıkları artırılmaktadır. Ancak bazı mikroorganizmaların bu bileşiklerin biyolojik yıkımında büyük ölçüde etkili oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla bu bileşiklerin biyolojik olarak yıkıma uğratılabilmesi için yapılarındaki klor iyonlarının da uzaklaştırılması önemli bir aşamadır.

Modifiye Vogel ortamında *Trametes versicolor* ATCC (200801)'un inkübe edilmesi ile elde edilen lakkaz aktivitesi yüksek kültür sıvısı ile pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenolden klor uzaklaştırılması işleminde inkübasyon süresi, pH, başlangıç substrat konsantrasyonu ve enzim miktarı parametreleri incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda oksijen tüketimi ile klor uzaklaştırılması arasındaki korelasyon araştırılmıştır.

Optimum deklorasyon koşulları pentaklorofenol için inkübasyon süresi 5 dakika, pH 5.0, başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM ve enzim miktarı 4 ml; 2,6 diklorofenol için inkübasyon süresi 2 dakika, pH 5.0, başlangıç substrat konsantrasyonu 600 µM ve enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Lakkaz, *Trametes versicolor*, pentaklorofenol, 2,6-Diklorofenol, klor uzaklaştırılması

¹ Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Doç. Dr. Ahmet ÇABUK danışmanlığında hazırlanıp, Eylül 2008 tarihinde tamamlanan "Çeşitli Basidiomycetes İzolatları ile Klorofenolik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı" başlıklı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

² Uzman Biyolog, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

³ Dr., Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara.

⁴ Doç. Dr., Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji AbD, Eskişehir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: acabuk@ogu.edu.tr

⁵ Prof. Dr., Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji AbD, Ankara.

Giriş

Klorlu aromatik bileşikler, önemli miktarlarda üretilmeleri, parçalanmaya direnç göstermeleri, toksik olmaları yanı sıra sediment ve biyotada birikmeleri gibi nedenlerden dolayı çevresel kirleticilerin başında gelmektedirler. Klorlu fenoller ve türevlerinin yıllık üretimi ve kullanımları binlerce tonla ifade edilen miktarlara ulaşmıştır (1, 2).

Klorlu fenolik bileşiklerin pestisit olarak kullanımları da yaygındır. Pestisitler uzun yıllar tarım yapılan hemen her ülkede yaygın bir biçimde kullanılmıştır. Getirilen yasal düzenlemelerle pestisitlerin kullanımı sınırlandırılmıştır. Ancak tüm dünyada düzenlemelere rağmen yasal olmayan yollarla da pestisitlerin kullanılmaya devam ettiği görülmektedir. Benzer durumlar ülkemiz için de geçerlidir. Ülkemizde pestisit kullanımı yıllara göre azalıp çoğalmakla birlikte, zirai amaçla kullanılan pestisitlerin toplam miktarı 1999 yılı için yaklaşık 32.000 tondur (1). Türkiye' de tarım ilacı olarak pestisit tüketimi, 1979'a göre 2002 yılında % 45.29' luk bir artış göstermiştir. Bu artışa karşın ülkemizde pestisit tüketimi diğer ülkelere göre oldukça düşüktür (3).

Pestisitler içerisinde sınıflandırılan klorofenoller, sıklıkla kullanılan, geniş spektrumlu biyositlerdir. Klorofenoller, gerek endüstriyel atıklarda ve gerekse yaşadığımız çevrede bulunan kirleticilerdir. Suda kısmen çözünürler, dolayısıyla bu toksik bileşiklere nehirlerde, göllerde ve toprakta sıklıkla rastlanılmaktadır. Bu nedenle çevrede bulunan organizmalar üzerinde gösterdikleri olumsuz etkilerin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (4).

Klorofenollerin çevreye karışmasında en önemli kaynaklar arasında suyun dezenfeksiyon işlemleri, atıkların yakılması ve biyositlerin kontrolsüz kullanımı gibi endüstriyel ve tarımsal aktiviteler bulunmaktadır. Bu bileşikler ayrıca, yapılarındaki klorofenoksi bileşikler içeren herbisitlerin biyokimyasal reaksiyonları sonucunda ara ürünler olarak da oluşabilmektedir (5).

Klorofenoller, canlılardaki oksidatif fotofosforilasyon, protein sentezi ve lipid biosentezi gibi metabolik reaksiyonlar üzerinde etkilerini gösterirler. Klorofenollerin sucul ortamlar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilen akut toksisite çalışmaları sonucunda, bu bileşiklerin mg/l düzeyindeki konsantrasyonlarda sudaki organizmalara yüksek oranda toksik olduğu gösterilmiştir (6).

Biyolojik arıtma süreçleri, klorofenollerin güç ayrışabilir yapılarına rağmen, ekonomik nedenler ve yan ürün oluşumunun düşük olmasından dolayı, diğer arıtma yöntemlerine göre ekonomik açıdan önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir (7). Klorofenollerin veya diğer benzer amaçlarla kullanılan toksik kimyasalların biyolojik olarak ortamdaki uzaklaştırılması genel olarak yıkım reaksiyonları ile ya da söz konusu kimyasalın yapısında bulunan klor iyonlarının uzaklaştırılması şeklinde olabilmektedir. Mikrobiyal ataklara karşı dayanıklılığı artırmak amacı ile klor ilave edilen sentetik bileşiklerden, klor iyonlarının uzaklaştırılması bu bileşiklerin toksisitelerini azaltırken biyolojik olarak yıkıma daha hassas bir özellik kazanmalarına yol açar (8).

Yukarıda sözü edilen kimyasallar rekalsitran (biyolojik yıkıma dirençli) olmalarına rağmen, bazı bakteri ve fungusların sahip olduğu eşsiz metabolik özellikleri nedeni ile yıkıma uğratılabilmektedir (9-11).

Bakteriler arasında *Pseudomonas* genusu bu bakımdan dikkat çeken üyelere sahiptir. Bununla birlikte, funguslar arasında Basidiomycetes grubu pek çok alanda kullanılabilir önemli türleri içeren ve bu nedenle üzerinde çok çalışılan bir gruptur. Nitekim, bu grup fungusların çeşitli üyelerinin klorlu aromatik yapıdaki rekalsitran kimyasalları metabolize edilebileceği gösterilmiştir (12-14). Ksenobiyotik (yeni sentez, doğaya yabancı) ve rekalsitran özellikteki kimyasallar söz konusu fungusların sahip olduğu ve geniş substrat-özellik gösteren peroksidaz grubu enzimlerle yıkılabilmektedir (15-18). Ancak ekonomik açıdan bakıldığında, yukarıda sözü edilen yöntemin en önemli eksikliklerinden birisi, oksitleyici ajan olarak kullanılan H_2O_2 'nin pahalı olması ve tepkime sırasında yüksek miktarlarda tüketildiğinden bu şekildeki arıtım sürecinin işletim maliyetini artırmasıdır. Bu nedenle son yıllarda fenol ve türevlerinin gideriminde peroksidaz grubu enzimlerin yerine fenol oksidazların kullanılması gündeme gelmiştir. Bu tercihin başlıca nedeni, fenol oksidazların oksitleyici ajan olarak H_2O_2 yerine moleküler oksijeni (O_2) kullanmalarıdır. Böylece, peroksidaz enziminin kullanıldığı fenol giderimi sürecinde, H_2O_2 kullanımına bağlı olarak karşı karşıya kalınan yüksek maliyet sorunu fenol oksidaz grubu enzimlerin kullanılmasıyla ortadan kalkmaktadır (19).

Bu çalışmanın amacı Modifiye Vogel besiyerinde üretilen *Trametes versicolor* ATCC200801'den elde edilen ve fenol oksidaz grubu enzimlerden olan lakkaz aktivitesi açısından yüksek kültür sıvısı ile çevresel kirletici olarak endüstriyel aktivitelerin önemli bir atığı olan klorofenolik bileşiklerden pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılması için optimum koşulların belirlenmesidir.

Materyal ve Yöntemler

Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Çalışmalarda, *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Çalışma süresince ve sonrasında kültürler potato dekstroz agarda (PDA-Acumedica) +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Stok kültürlerden yatık PDA besiyerlerine ekim yapılarak 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve bu kültürler aşılama için aktif kültürler olarak kullanılmıştır. Kültürün yüzeyinden kazıma ile distile su içerisine alınan miseller toplam 40 ml hacimde homojenizatör ile (Heidolph) homojenize edilmiştir. Homojenizattan 1 ml alınarak Modifiye Vogel ortamına (20) ekim yapılmıştır.

Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü

Lakkaz aktivitesi ölçümünde Taşpınar ve Kolankaya'nın (1998) belirttiği yöntem izlenmiştir. Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4.9 ml ve 1 mM guaiakol içeren 50 mM Sodyum-Asetat tamponu (pH 4.5) ve enzim kaynağı olarak 0.1 ml kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Sp-2102UVP Spectrum UV Vis-spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür (21). Çalışmada, 37 °C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0.1 birim artıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

Serbest Klor Ölçümleri

Deklorinasyon çalışmalarında yapılan klor ölçümleri literatürde civa tiyosiyanat yöntemi olarak bilinen ve serbest klor ölçümüne dayanan bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre, 9 M (100ml) HNO₃, 0.25 M (100ml) Fe(NH₄)(SO₄)₂.12H₂O ve doymuş Hg(SCN₂) çözeltileri hazırlanmıştır (22).

Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Deklorinasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarında elde edilen veriler sabit tutularak deklorinasyona koşul olarak ortamda tüketilen oksijen miktarı (Jenway 9071 Model) oksijen metre ile ölçülerek takip edilmiştir.

Deklorinasyon Çalışmaları

Deklorinasyon Çalışmalarında Kullanılan Biyoreaktörün Özellikleri

Enzimatik deklorinasyon çalışmaları için gerekli olan biyoreaktör, reaktör-kabı, karıştırıcı-ısıtıcı sistem, ısı kontrollü su-banyosundan oluşmaktadır. Bu çalışmada Ünal, (2004) tarafından tasarlanan biyoreaktör kullanılmıştır (8). Biyoreaktör kabı borosilikat camdan yapılmış ve toplam çalışma hacmi 100 ml'dir. Karıştırıcı-ısıtıcı sistem ise, dijital ısıtıcı tablası olan ve reaktör kabının içine yerleştirildiği su banyosunda sıcaklık-probu ile sıcaklık kontrolü yapabilen termostatlı bir manyetik karıştırıcıdan oluşmaktadır.

Tüm optimizasyon çalışmalarında denatüre enzim konularak kontrol grupları oluşturulmuş elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı ve bir birinden bağımsız olarak yapılmıştır.

Biyoreaktörde Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Biyoreaktörde enzimatik deklorinasyonun optimizasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresi, ortam pH değeri, substrat konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonlarının etkisi her iki bileşik (pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol) için ayrı ayrı denenmiştir. Denemelerde enzim kaynağı olarak Modifiye Vogel ortamında üretilen *T.versicolor* ham lakkazı kullanılmıştır. Denemelerde, klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 etanol ilave edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında enzim aktivitesi pentaklorofenol denemeleri için 6.9 ve 2,6-diklorofenol denemeleri için 7.6 U/mL, ortam sıcaklığı ise 25±1 °C olacak şekilde sabit tutulmuştur.

İnkübasyon süresinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşikler (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) ile enzimin etkileşim süresi değiştirilmiştir. Bu amaçla toplam 10 dakika sürede çalışma sürdürülmüş ve birer dakika aralıklarla örnek alınarak klor miktarı takip edilmiştir. Sürenin etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar, reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik miktarı 1 ml ve 200 µM, serbest enzim miktarı 1 ml, ortam pH'sı 5.0 olarak sabit tutulmuştur.

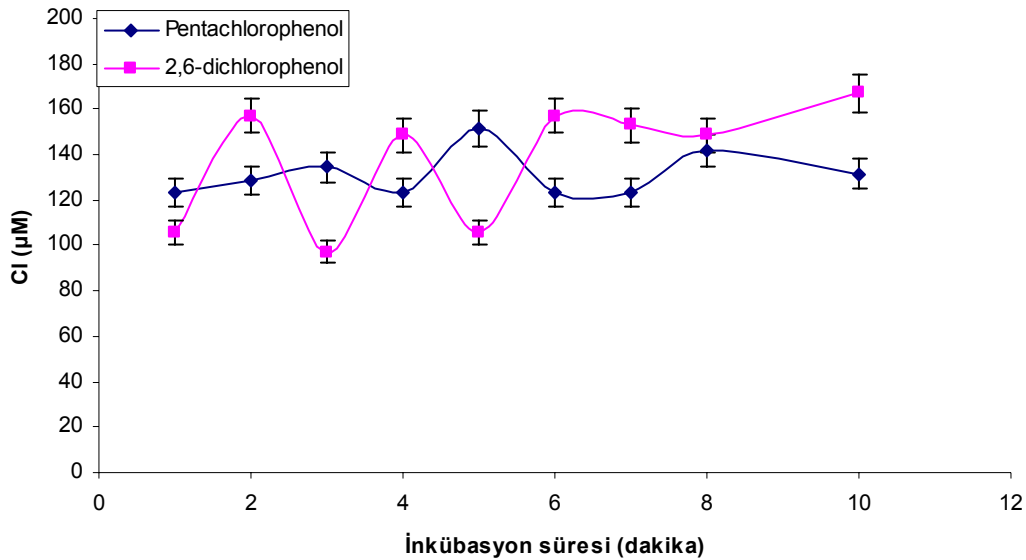
Ortam pH değerinin enzimatik deklorinasyona etkisi incelemek amacı ile çeşitli tampon çözeltilerle farklı pH'larda ortamlar hazırlanmıştır ve pH 3-10 aralığında değiştirilmiştir. pH 3.0-5.0 için 0.2 M asetat tamponu, pH 6.0-8.0 için 0.2 M fosfat tamponu, pH 9.0-10.0 için ise 0.2 M Tris-HCl tamponları seçilmiş ve kullanılmıştır. Bu deneyler sırasında reaktördeki reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) konsantrasyonu 200 μ M, serbest enzim miktarı 1 ml ve deklorinasyon süresi belirlenen optimum sürede, sabit tutulmuştur.

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) konsantrasyonu 50-700 μ M arasında değiştirilmiştir. Substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar; reaksiyon hacmi 100 ml, serbest enzim miktarı 1 ml olarak sabit tutulmuştur.

Enzim aktivitesinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 0.5-4.0 ml aralığında değişen farklı miktarlardaki lakkaz enzimi, klorofenolik bileşikler olarak pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Enzim miktarının etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar; reaksiyon hacmi 100 ml ve ortam pH'sı 5.0 olarak sabit tutulmuştur.

Sonuçlar ve Tartışma

İnkübasyon süresinin pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasına etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre 5 dakika, 2,6-diklorofenol için ise 2 dakika olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir.

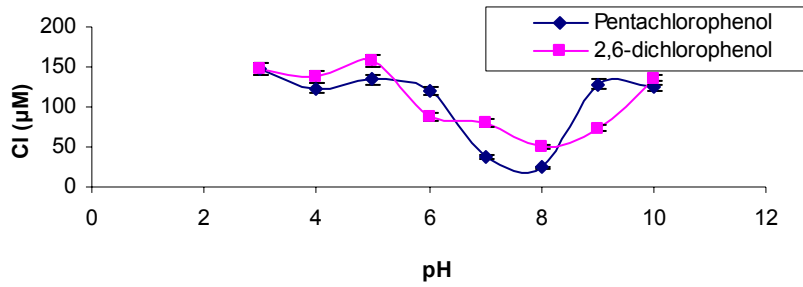


Şekil 1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasına sürenin etkisi (Çalışma koşulları; substrat konsantrasyonu 200 μ M; enzim miktarı: 1 ml; pH 5)

Şekil 1 incelendiğinde pentaklorofenolden uzaklaşarak serbest hale geçen klor miktarı süre arttıkça nispeten dengeli bir eğri şeklinde karşımıza çıkarken, 2,6-diklorofenolde 6. dakikaya kadar salınımların olduğu ve ancak 6. dakikadan sonra bir dengeye ulaşılabildiği söylenebilir.

Literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen optimum süre değerlerinin nispeten düşük olduğu söylenebilir (23). Burada kısa sürede elde edilen yüksek deklorinasyon değerleri çevresel uygulamalar açısından önemli bir üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir. Klor değerlerindeki salınımlar, düşük konsantrasyonda çalışılmasına ve sık örneklem yapılması ile açıklanabilir. Şekil 1’de görülen salınımlara birbirinden bağımsız olarak yapılan tüm ölçümlerde rastlanılmıştır. Şekil 1 bu deneylerin ortalama verileri ile oluşturulmuştur. Belirlenen en uygun süreler her bir denemede en yüksek değere ulaşılan reaksiyon süresi olarak karşımıza çıkan değerlerdir.

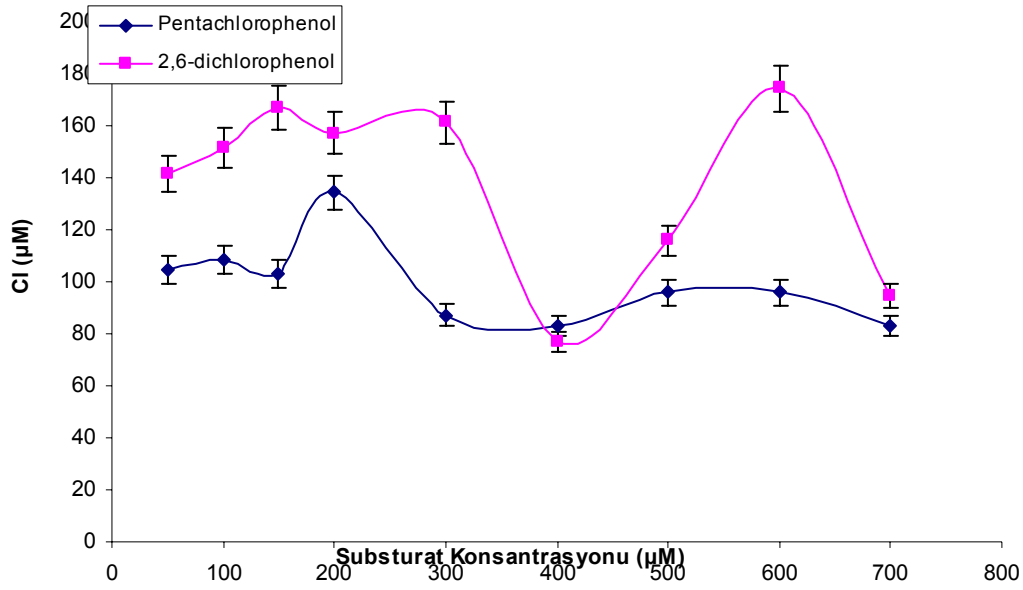
Pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında pH değerinin etkisini belirlemek için geniş bir pH aralığında yapılan çalışma sonucunda en uygun değer her iki klorlu bileşik için pH 5 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasına pH değerinin etkisi (Çalışma koşulları; substrat konsantrasyonu 200 µM; enzim miktarı 1 ml; inkübasyon süresi; pentaklorofenol için 5 dakika, 2,6-diklorofenol için 2 dakika)

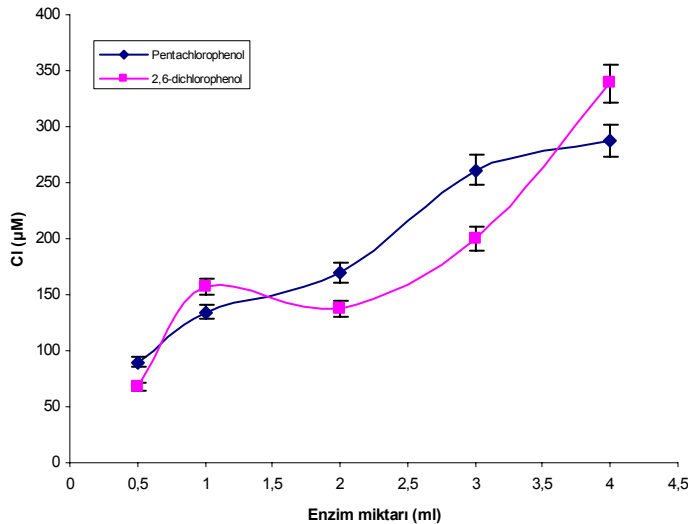
Ünal (2004), yaptığı benzer bir çalışmada 2,4,6-triklorofenol, 2,4-diklorofenol, 4-klorofenol bileşiklerinin deklorinasyonunda yine lakkaz enzimini kullanmış ve optimum pH değerini 5.0 olarak belirlediğini bildirmiştir. Elde edilen bu değer literatürde de pek çok araştırmacı tarafından yapılan ve farklı substratlar kullanıldığında lakkaz enzimi için elde edilen optimum pH değerine yakın bir değer olduğu söylenebilir (8, 23, 24).

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmaların sonucu Şekil 3’de verilmiştir. Ortama ilave edilen pentaklorofenol miktarı 200 µM olduğunda en yüksek deklorinasyon değerine ulaşılmıştır. 200 µM’den sonra bir düşüş gözlenmiş ve 300 µM’den itibaren neredeyse dengeli deklorinasyon değerleri elde edilmiştir. 2,6-diklorofenol için substrat konsantrasyonu arttıkça deklorinasyon değerleri elde edilmiştir. 50-150 µM aralığında bir artış kaydedilmiş fakat 150-300 µM arasında ise bir denge görülmüştür. Başlangıç substrat konsantrasyonunu 400 µM olduğunda bir düşüş gözlenmiş, ancak başlangıç substrat konsantrasyonu arttıkça en yüksek deklorinasyon değerine 600 µM’da ulaşılmıştır.



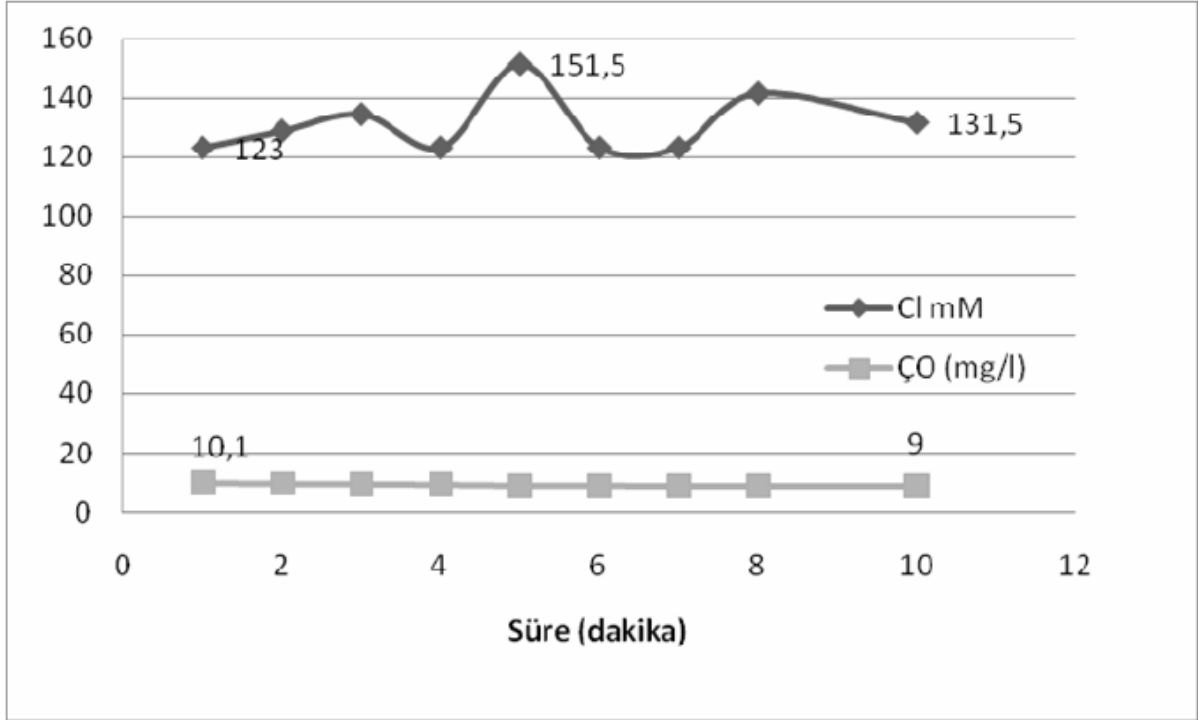
Şekil 3. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasına pH'nin etkisi (Çalışma koşulları; enzim miktarı 1 ml; inkübasyon süresi; pentaklorofenol için 5 dakika, 2,6-diklorofenol için 2 dakika, pH 5)

Enzim miktarının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı miktarlarda enzim kullanılarak yapılan çalışmanın Şekil 4'de verilmektedir. Pentaklorofenol ile yapılan çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde, beklenildiği gibi enzim miktarının artışına koşut olarak deklorinasyon değerinde de artış kaydedilmiştir. En yüksek deklorinasyon değerine 4 ml enzim miktarı ile ulaşılmıştır. Benzer bir durum 2,6-diklorofenol ile yapılan çalışmalar içinde söylenebilir. Yine en yüksek deklorinasyon değerine 4 ml enzim ile ulaşılmıştır.



Şekil 4. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasına enzim miktarının etkisi (Çalışma koşulları; inkübasyon süresi; pentaklorofenol için 5 dakika, 2,6-diklorofenol için 2 dakika, pH 5, substrat konsantrasyonu; pentaklorofenol için 200 µM, 2,6-diklorofenol için 600 µM).

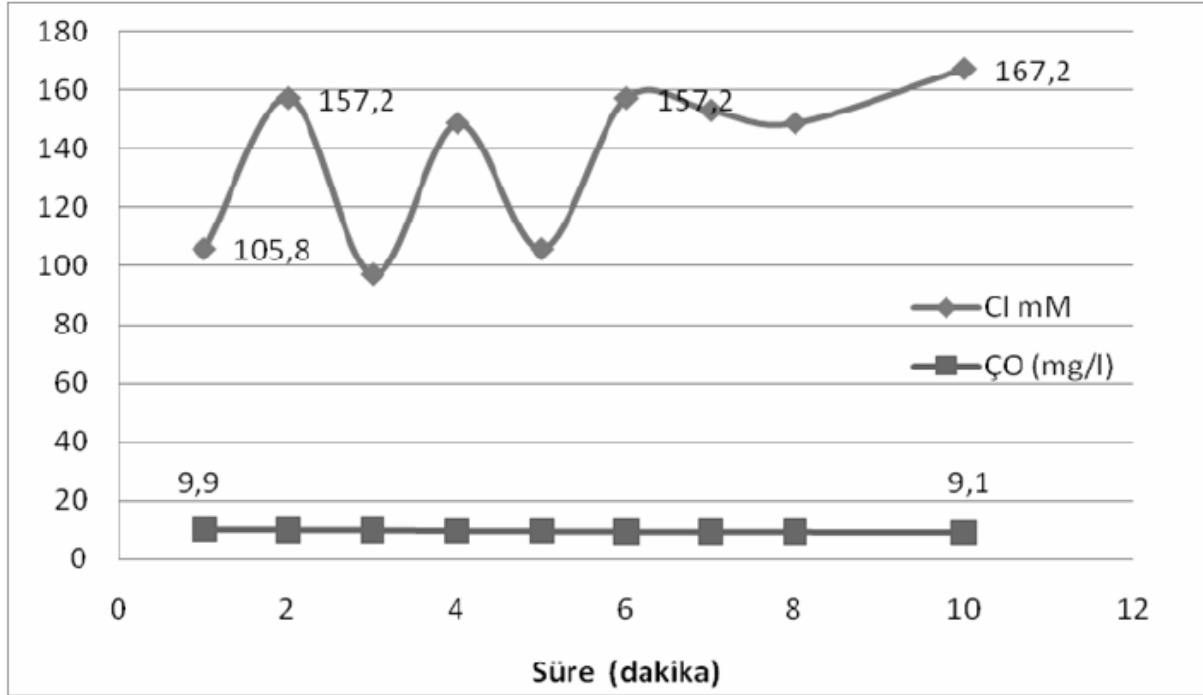
Enzimatik klor uzaklaştırılması sürecinde ortamdaki çözülmüş oksijen miktarındaki değişim, çözülmüş oksijen probu ile takip edilmiştir. Bu amaçla, enzim miktarı 1 ml olacak şekilde diğer optimum koşullar sabit tutulmak kaydı ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol bileşiklerinin lakkaz enzimi ile deklorasyonları sürecinde ortamda bulunan çözülmüş oksijen miktarındaki değişim takip edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında enzim miktarı daha önce belirtildiği gibi 4 ml olarak belirlenmiştir. Ancak, reaksiyon ortamında beklenildiği üzere oksijen tüketimindeki değişimi görebilmek ve reaksiyon ortamını daha az seyreltmek için bu çalışmada enzim miktarı 1 ml olarak sabit tutulmuştur. Elde edilen veriler Şekil 5 ve 6'da verilmektedir. Her iki grafikten de görülebileceği gibi, her iki bileşik için deklorasyon arttıkça oksijenin tüketildiği görülmektedir. Lakkaz enziminin aktivite gösterebilmesi için ortamda çözülmüş oksijene gereksinim duymaktadır. Bu nedenle reaksiyon ilerledikçe ortamdaki oksijen miktarı azalmaktadır. Burada oksijen tüketiminin az olduğu düşünülebilir. Ancak inkübasyon süresinin 10 dakika gibi çok kısa olması bu durumu açıklamaktadır.



Şekil 5. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 200 µM başlangıç substrat konsantrasyonu ve enzim miktarı 1 ml)

Denemelerde modifiye vogel ortamında *T. versicolor*'un inkübe edilmesi sonucunda elde edilen yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür sıvısı kullanılmıştır. Bu kültür sıvısından lakkazın saflaştırılmasına yönelik herhangi bir işlem yapılmamıştır. Bu nedenle kültür sıvısında lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerinin de bulunması göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen klor gideriminden lakkaz enziminin sorumlu olup olmadığının ortaya konulması gerekmektedir. Bilindiği gibi peroksidaz grubu enzimler oksitleyici ajan olarak H₂O₂'e bağımlıdır. Bu nedenle ortamda H₂O₂'in bulunması zorunludur. Buradan yola çıkılarak reaksiyon ortamına

H₂O₂ ilave edilmediği için herhangi bir peroksidaz aktivitesi olmadığı söylenebilir. Ancak, inkübasyon sırasında oluşabilecek olası H₂O₂'in etkisini ortadan kaldırmak için kültür sıvısı katalaz ile muamele edilmiştir. Katalaz ile işlem görmüş kültür sıvısı ile katalaz ilave edilmemiş kültür sıvısından elde edilen deklorinasyon değerleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum kültür sıvısında bulunan lakkaz enziminin deklorinasyondan sorumlu olduğu fikrini desteklemektedir.



Şekil 6. Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 600 µM başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı 1 ml)

Bu çalışmanın devamında belirlenen optimum koşullarda deklorinasyonu yapılan söz konusu bileşikler için detoksifikasyonun değişip değişmediği ve deklorinasyon sonucunda oluşan bileşiklerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular incelendiğinde literatürde pek çok klorofenolik bileşik ile yapılmış çalışmalara rastlanırken, pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenol ile yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu nedenle elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynak Listesi

1. Kolankaya, D. 2006. Organochlorine Pesticide Residues and Their Toxic Effects on the Environment and Organisms in Turkey. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 86:147-160.
2. Ünal, A., Kolankaya, N. 2004. Chlorine Removal from pp'DDT by Laccase Enzyme Produced from Trametes versicolor. Turkish Electronic Journal of Biotechnology 2:27-21.

3. Delen, N., Durmuşoğlu, M., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliđi VI. Teknik Kongresi. Ankara.
4. Miyazaki, A., Amano, T., Saito, H., Nakano, Y. 2002. Acute Toxicity of Chlorophenols to Earthworms Using a Simple Paper Contact Method and Comparison with Toxicities to Fresh Water Organisms. *Chemosphere*. 47:65-69.
5. Jardim, W.F., Moraes, S.G., Takiyama, M.M.K. 1997. Photocatalytic Degredation of Aromatic Chlorinated Compounds Using TiO₂: Toxicity of Intermediates. *Water Research*. 31:1728-1732.
6. Guerra, R., 2001, Ecotoxicological and Chemical Evaluation of Phenolic Compounds in Industrial Effluents. *Chemosphere*. 44:1737-1747.
7. Uysal, A., Türkman, A. 2006. 4-Klorofenolun Aktif Çamurda Kometabolik Ayrışması Üzerine Biosurfaktan Etkisi. *İtüdergisi/e-Su Kirlenmesi Kontrolü*. 16:15-23.
8. Ünal A. 2004. Lakkaz Enzimi ile Bazı Toksik Klorofenolik Bileşiklerin Detoksifikasyonu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, 104.
9. Li, D.Y., Eberspacher, J., Wagner, B., Kuntzer, J., Lingings, F. 1991. Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Azotobacter* sp. Strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1920–1928.
10. Liu, D., Maguire, R.J., Pacepavicius, G., Dutka, B.J. 1991. Biodegradation of Recalcitrant Chlorophenols by Cometabolism. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. 6:85–95.
11. Wang, C.C., Lee, C.M., Lu, C.J., Chuang M.S., Huang C.Z. 2000. Biodegradation of 2,4,6-Trichlorophenol in the Presence of Primary Substrate by Immobilized Pure Culture Bacteria. *Chemosphere*. 41:1873-1879.
12. Huynh, V., Chang, H.M., Joyce T.W., Kirk T.K. 1985. Dechlorination of chloro-organics by a white-rot fungus. *Tappi Journal*. 68:98-102.
13. Pellinen, J., Joyce, T.W., Chang, H.M. 1988. Dechlorination of High-Molecular-Weight Chlorolignin by the White-rot Fungus *P. chrysosporium*. *Tappi Journal*. 71:191-194.
14. Machado, K.M.G., Matheus, D.R., Monteiro, R.T.R., Bononi, V.L.R. 2005. Biodegradation of Pentachlorophenol by Tropical Basidiomycetes in Soils Contaminated with Industrial Residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:297–301.
15. Klibanov, A. M., Alberti, B.N., Morris, E.D., Felshin, L.M. 1980. Enzymatic Removal of Toxic Phenols and Anilines from Wastewater. *J. Appl. Biochem.* 2:414-421.
16. Alberti, B.N., Klibanov, A.M. 1981. Enzymatic Removal of Dissolved Aromatics from Industrial Aqueous Effluents. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11: 373.

17. Klibanov, A. M., Morris, E.D. 1981. Horseradish Peroxidase for Removal of Carcinogenic Aromatic Amines from Water. *Enzyme Microb. Technol.* 3:119-122.
18. Klibanov, A. M., Tu, T. M., Scott, K.P. 1983. Peroxidase Catalysed Removal of Phenols from Coal Conversion Wastewater. *Science.* 221:259-261.
19. Atlow, S.C., Banadonna-Apora, L., Klibanov, A. M. 1984. Dephenolization of Industrial Wastewaters Catalysed by Polyphenol Oxidase. *Biotechnology and Bioengineering.* 26:599-603.
20. Aktaş, N., Çiçek, H., Ünal, A., Kibarer, G., Kolankaya, N., Tanyolaç, A. 2001. Reaction Kinetics for Laccase-Catalyzed Polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology.* 80: 29-36.
21. Taşpınar, A., Kolankaya, N. 1998. Optimization of Enzymatic Chlorine Removal from Kraft Pulp. *Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol.* 61:15-21.
22. Greenberg, A. 1992. *Standart Methods for the Examinations of Waters and Wastewaters*, 18th ed., 6-61-6-65. American Public Health Association, Washington.
23. Zhang, Z., Cissoko, N., Wo, J., Xu, X. 2008. Factors Influencing the Dechlorination of 2,4-dichlorophenol by Ni-Fe Nanoparticles in the Presence of Humic Acid. *Journal of Hazardous Materials.* 165:78-86.
24. Cho, N., Rogalski, J., Jazsek, M., Luterek, J., Wojtas-Wasilewska, M., Malarczyk E., Fink-Boots M., Leonowicz A. 1999. Effect of Coniferyl Alcohol Addition on Removal of Chlorophenols from Water Effluent by Fungal Laccase. *J Wood Sci.* 45:174-178.