

Bazı Metallerin *Pleurotus* türlerinin Boya Dekolorizasyonu ve Lakkaz, MnP Enzim Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisi

Serkan FİDAN, S. Elif KORCAN, İ. Hakkı CİĞERCİ, S. Feyza ERDOĞMUŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Afyonkarahisar.
e-posta: ekorcan@aku.edu.tr

Geliş Tarihi: 14 Mayıs 2012; Kabul Tarihi: 31 Temmuz 2012

Özet

Bu çalışmada, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida* test organizması olarak kullanılarak, farklı metal tuzlarının (HgCl₂, Pb(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CoCl₂.6H₂O, Cd(NO₃)₂.4H₂O, CuSO₄.5H₂O) dekolorezasyon ve dekolorezasyonda rol alan ekstraselüler enzimlerin aktivitelerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada Pb ve Ni'in 0,001 mM ≤; Hg, Pb ve Cd'nin 0.005 mM ≤ ve Co'ın 0.05 mM ≤ konsantrasyonunda *P. sajor-caju*'nun gelişim inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p≤0.05). *P. florida* miselyal gelişimi Ni ve Cd hariç denenen tüm metallerde 0.001 mM ≤ konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı iken Ni'in 0.005 mM ≤ ve Cd'nin 0.01 mM ≤ konsantrasyonlarındaki inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *P. ostreatus*' da Hg ve Pb 0,01 mM ≤ konsantrasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon saptanmıştır. Diğer metallerde 0,001 mM ≤ konsantrasyonlarda gelişimin inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Enzim çalışmaları metallerin Lakkaz aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığını göstermiştir. *P. sajor-caju*'da %20 inhibisyonu sağlayan tüm metal konsantrasyonlarında kontrole oranla MnP aktivitesinin arttığı saptanmıştır. *Pleurotus florida*'da MnP aktivitesini Co %42 arttırmış, bunu %32 ile Pb takip etmiştir. Hg ve Ni, *Pleurotus ostreatus*'un MnP aktivitesini arttırdığı ancak Zn, ve Cd, MnP aktivitesini düşmüştür.

Anahtar kelimeler

Dekolorizasyon, Lakkaz,
Mangan peroksidaz,
Pleurotus sp.

Effects of Some Metals on Laccase, MnP Enzym Activities and Dye Decolorization of *Pleurotus* species

Abstract

This study searches the influence of distinct metals (HgCl₂, Pb(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CoCl₂.6H₂O, Cd(NO₃)₂.4H₂O, CuSO₄.5H₂O) on decolorization and extracellular enzyme activities by using *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida*.

The study has found the inhibition of *P. sajor-caju*'s development statistically meaningful (p≤0.05) in Pb and Ni's 0,001 mM ≤; Hg, Pb and Cd's 0.005 mM ≤ and Co's 0.05 mM ≤ concentrations. In side of *P. florida*, while 0.001 mM ≤ concentration in all tested metals except for Ni and Cd is significant, the inhibition in Ni's 0.005 mM ≤ and Cd's 0.01 mM ≤ concentrations has been found statistically meaningful. In *P. ostreatus*, the inhibition has been determined statistically significant following Hg and Pb 0,01 mM ≤ concentration. Inhibition of development in 0,001 mM ≤ concentration has been found considerable in other metals.

Enzym assays showed that metals did not make a significant change in enzyme activity of laccase. In *P. sajor-caju* all metal concentrations which were 20% inhibition have increased MnP activities compared with control groups In *Pleurotus florida*, Co 42% has increased MnP activity which is followed by Pb with 32%. MnP activities of *Pleurotus ostreatus* were increased with Hg and Ni but were decreased with Zn and Cd.

Key words

Decolorization,
Laccase, Manganase
peroxidase, *Pleurotus*
sp.

1. Giriş

Günümüzde kullanılabilir durumda olan tatlı su kaynakları, çeşitli sebeplerden dolayı hızla kirlenmekte ve giderek azalmaktadır. Hızla artan nüfus, kentleşme, sanayileşme ve gelişen teknoloji ile birlikte her gün yeni kirlilik çeşitleri gündeme gelmektedir. Kentsel ve kanalizasyon atık sularının yansira endüstriyel atık sular yüzey suyu kaynaklarını etkileyen en önemli etmendir. Özellikle tekstil, kozmetik, boya, kâğıt, deri, gıda, plastik vs. gibi birçok endüstriyel atık suların neden olduğu organik (proteinler, karbonhidratlar, yağ, gres, sürfaktanlar, fenoller, pestisidler, klorlu bileşikler vb.), inorganik (krom, çinko, kurşun, nikel, bakır, arsenik, civa, antimon, kadmiyum vb.) ve çeşitli boyar madde kirlilikleri insan sağlığını ve ekolojik dengeyi tehdit etmektedir. Bu nedenle endüstriyel atıklardan bu tür kirletici maddelerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. (Acemioğlu, 2004; Kaushik *et al.*, 2009).

Organik ve inorganik kirleticileri geniş çapta içeren endüstriyel atık suların kullanım yeri ve amacına göre ulusal veya dünya sağlık örgütünün izin verdiği değerlere indirmek için işlenmesine gereksinim duyulmaktadır (USEPA, 1997). Günümüzde boyar maddelerin giderimleri çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında en kullanışlı ve ekonomik olanı ise biyolojik sistemlerdir (Robinson *et al.* 2001).

Bugüne kadar arıtım amacı için kullanılan mikroorganizma grubu içerisinde algler de dâhil olmak üzere çeşitli bakteri, maya, mantar türleri bulunmaktadır. Mantarlardan *Neurospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Pleurotus* türleri metal kontaminasyonunda kullanılan organizmalardandır. Özellikle *Pleurotus* türleri bu tip çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Sağlam ve Cihangir, 1995). Son yıllarda fungusların tekstil boyalarını biyosorpsiyon ile uzaklaştırdığı ve dekolorezasyon çalışmalarında kullanılacağı üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Yeşilada, 1998; Sani ve Azmi, 1998; Yeşilada ve Özcan, 1999).

Odunsu bitkilerde bulunan, lignini parçalayabilen ve ksenobiyotik maddelerin parçalanması amacıyla

çalışmalarda yaygın olarak kullanılan beyaz çürükçül küf *Phanerochaete chrysosporium*'un, lignin peroksidaz, mangan bağlı peroksidaz gibi enzimleri kullanarak boyar maddeleri parçalayabildiği bilinmektedir (Palma *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001). Yaşayan hücreler için temel mekanizma biyodegradasyondur. Çünkü yaşayan organizmalar, lakkaz, mangan peroksidaz (MnP) ve lignin peroksidaz (LiP) gibi lignin modifiye enzimleri lignini ve boyar maddeyi mineralize edebilmek için sentezleyebilirler (Raghukumar *et al.*, 1996). Literatür taramaları, bu enzimlerin dekolorezasyona katılımının türler arasında farklı olabileceğini göstermektedir.

Pasti-Grigsby ve ark. (1992) *P. chrysosporium*'da boyar maddenin dekolorezasyonundan sorumlu enzimin LiP olduğunu bildirmiştir. Ollikka ve ark.'ları ise (1993) azo bayalarının, trifenilmetanın, heterosiklik ve polimerik boyaların dekolorezasyonunda LiP'in temel rolü oynadığı ancak bu boyaların degradasyonunun başlamasında MnP'a gereksinim duyulmadığını bildirmişlerdir (Young and Yu, 1997).

Pek çok durumda boya gibi organik maddeler atık sularda ağır metaller ile kompleks halde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, ağır metallerin, beyaz çürükçül fungusların ekstraselüler enzim üretimlerini ve boya dekolorezasyon yeteneklerini etkilediğini göstermiştir. (Baldrian and Gabriel, 1997; Novotny *et al.*, 2004; Pointing *et al.*, 2000).

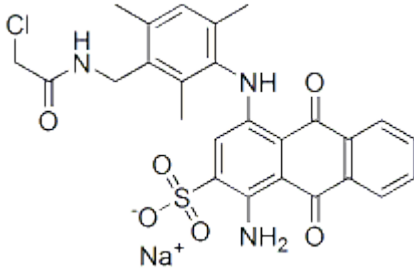
Bu çalışmada bazı metallerin, *Pleurotus* türlerinin (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida*) Lanaset Blue 2R'nin dekolorezasyonuna ve dekolorezasyonda rol oynayan lakkaz, MnP enzimleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

2. Materyal ve Metod

2.1 Test Mikroorganizmaları ve boyar madde

Pleurotus ostreatus, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida* suşları Aksaray Üniversitesi, Prof. Dr. Necdet Sağlam'dan elde edilmiş ve dekolorezasyon çalışmalarında kullanılan fungal

türlerdir. Lanaset Blue 2R (Şekil 1) dekolizasyon deneylerinde besi yerine boyar madde olarak katılmıştır.



Şekil 1. Lanaset Blue 2R'nin kimyasal yapısı

2.2 Metallerin *Pleurotus* Türlerinin Gelişimleri Üzerine Etkisi

0.001-0.5 mM konsantrasyon aralığında farklı metal tuzları içeren (HgCl_2 (Fluka 83366), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Fluka 15335), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haen 13621), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haen 14455), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich 20218-5), $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haen 12849)) agarlı besiyeri (nişasta 3 g L^{-1} , malt ekstrakt 15 g L^{-1} ve agar 20 g L^{-1}) hazırlanmıştır. 6 mm çapında kesilmiş 7 günlük taze *Pleurotus sp.* suşlarının ekimleri, plakların tam ortasına gelecek şekilde yapılmıştır. 27°C 'de, 7-14 gün inkübasyonun ardından metal içermeyen ve farklı konsantrasyonlarda metal tuzları içeren plaklardaki fungal gelişim, koloninin çapı mm olarak ölçülerek % inhibisyon zonları kontrol grubu (metal tuzu içermeyen Malt Agar) ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Çalışmada, 3 tekrar sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır (Hotmany and Mecs, 2003).

2.3 Metallerin dekolizasyon üzerine etkisinin belirlenmesi

Metallerin boya dekolizasyonuna etkisini belirlemek amacıyla %20 inhibisyonu sağlayan metal konsantrasyonu ve boyar madde (0.15 g L^{-1}) besiyerine eklenmiştir. Metal olarak Mn içermeyen besiyeri ortamlarına Mn substrat olarak 20 mM oranında katılarak mangan peroksidaz enziminin (MnP) aktivite göstermesi sağlanmıştır. Besiyerinin

pH'sı $6.5'$ e ayarlandıktan sonra metallerin fungal misellere gelişimine olan etkisini belirlemede kullanılan ekim yöntemi ile ekimler yapılmıştır. 15 günlük inkübasyonun ardından dekolizasyon zonları mm olarak ölçülerek değerlendirilmiştir. Her bir deneme 3 paralel olarak çalışılmıştır.

2.4 Metallerin *Pleurotus* Türlerinin Lakkaz ve Mn Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Boya gideriminde rol alan Lakkaz, mangan peroksidaz (MnP) enzimleri değerlendirmeye alınmıştır. Ekstraselüler enzimler metal ve boyar madde içeren agar plaklarından elde edilmiştir. Bunun için öncelikle 2 mL g^{-1} agar olacak şekilde siteril distile su ile karıştırılarak, homojenizatörde parçalanmış ve santrifüj edilmiştir ($7500 \text{ g}'de$ 10 dak). Süpernatant enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır.

MnP aktivitesinin belirlenmesinde Wariishi ve ark.'larının (1992) kullandığı metod kullanılmıştır. Deneyde 0.5 mM MnSO_4 , 50 mM sodyum molonat (pH 4.5) içerisine katılarak, reaksiyonu başlatmak için $10 \mu\text{L H}_2\text{O}_2$ final konsantrasyon 0.4 mM olacak şekilde eklenmiştir. Mn (III)-malonat kompleksi $270 \text{ nm}'de$ spektrofotometrik olarak belirlenmiştir ($\epsilon_{270}=11,590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

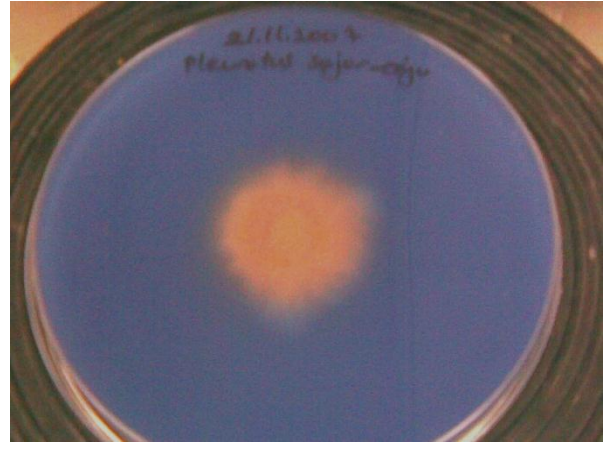
Lakkaz aktivitesi 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin)-6-sulfonat (ABTS) oksidasyonu ile belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0.3 mM ABTS 50 mM sodium molonat (pH4.5) içerisine katılarak hazırlanmıştır. Oksidasyon miktarı $420 \text{ nm}'de$ absorbans miktarına bakılarak ölçülmüştür ($\epsilon_{420}=36, 0000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Wolfenden and Willson, 1982).

2.5 İstatistiksel analiz

Koloni çapları arasında istatistiksel bir farklılığın olup olmadığı SPSS 10.0 programı kullanılarak Oneway Anova Dunnet t testi ile belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

3. Bulgular

P. florida miselyal gelişimi Ni ve Cd hariç denenen tüm metallerde 0.001 mM ≤ konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı iken Ni'in 0.005 mM ≤ ve Cd'nin 0.01 mM ≤ konsantrasyonlarındaki inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo1). *P. ostreatus'* ta Hg ve Pb 0,01 mM ≤ konsantrasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon saptanmıştır. Diğer metallerde 0,001 mM ≤ konsantrasyonlarda gelişimin inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. (Tablo2). Pb ve Ni'in 0,001 mM ≤; Hg ve Cd'nin 0.005 mM ≤; Co'ın 0.05 mM ≤ konsantrasyonunda *P. sajor caju'*nun miselyal gelişim inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P≤0.05) (Tablo3).



Şekil 1 *Pleurotus sajor-caju'*nun boya dekolourizasyonu

Tablo 1. Metallerin *Pleurotus florida'*nin miselyal gelişimi üzerine olan etkisi

	Metaller	Konsantrasyon (mM) X (Zon Çapı) mm±(SD)						
		kontrol	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5
<i>Pleurotus florida</i>	Hg	6,16(0,15)	3,5(0,1)*	3,8(0,1)*	3,53(0,15)*	3,00(0,1)*	2,86(0,11)*	-
	Ni	6,33(0,57)	4,36(0,05)	3,8(0,01)*	3,93(0,11)*	3,3(0,01)*	2,16(0,28)*	1,9(0,1)*
	Co	5,7(0,5)	4,7(0,01)*	4,93(0,4)*	4,6(0,17)*	4,03(0,05)*	4,00(0,01)*	-
	Zn	6,33(0,5)	4,9(0,17)*	4,73(0,23)*	3,6(0,69)*	3,4(0,01)*	-	0,5(0,01)*
	Pb	6,16(0,15)	3,93(0,11)*	4,66(0,57)*	4,00(0,3)*	3,7(0,88)	3,4(0,4)*	-
	Cd	5,7(0,5)	5,5(0,2)	5,43(0,11)	4,83(0,28)*	5,13(0,32)	2,83(0,28)	-

Tablo 2. Metallerin *Pleurotus ostreatus'*un miselyal gelişimi üzerine olan etkisi

	Metaller	Konsantrasyon (mM) X (Zon Çapı) mm±(SD)						
		kontrol	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Hg	5,7(0,5)	5,5(0,2)	5,43(0,11)	4,83(0,28)*	5,13(0,32)*	2,83(0,28)*	-
	Ni	5,86(1,02)	4,6(0,36)*	3,9(0,1)*	-	3,36(0,41)*	2,73(0,25)*	-
	Co	6,76(0,25)	6,2(0,1)*	5,56(0,05)*	5,46(0,05)*	5,26(0,25)*	5,13(0,11)*	-
	Zn	6,00(0,01)	4,16(0,57)*	3,46(0,05)*	2,80(0,26)*	2,53(0,05)*	2,26(0,15)*	2,03(0,05)*
	Pb	6,53(0,05)	6,56(0,11)	6,43(0,20)	6,00(0,01)*	5,96(0,05)*	4,83(0,05)*	-
	Cd	7,06(0,6)	5,9(0,1)*	5,33(0,47)*	5,46(0,55)*	5,06(0,20)*	3,9(0,17)*	-

Tablo 3. Metallerin *Pleurotus sajor-caju*'nun miselyal gelişimi üzerine olan etkisi

Metaller	Konsantrasyon (mM)							
	X (Zon Çapı) mm±(SD)							
	Kontrol	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	
Hg	6,23(0,25)	6,00(0)	5.2(0,2)*	5.03(0,41)*	4.96(0,45)*	4.30 (0,1)*	-	
Ni	5,00(0)	4.36(0,20)*	4.16(0,05)*	3.90(0,26)*	4,76(0,25)	3.93(0,11)*	-	
Co	8,16(0,28)	7,5(0,1)	7,4(0,1)	7,5(0,2)	6(0,5)*	5.93(0,5)*	-	
Zn	5(0)	4,63(0,11)	3,93(0,3)	3,7(0,43)	-	-	3(0,26)	
Pb	6,23(0,25)	4,6(0)*	5,1(0,3)*	4,43(0,25)*	4,5(0,1)*	-	-	
Cd	6,23(0,25)	6(0)	5,2(0,2)*	5,03(0,41)*	4,96(0,45)*	4,3(0,1)*	-	

Tablo 4. Metallerin *Pleurotus sajor-caju*'nun Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Metaller	Dekolorizasyon çapı (mm)		Enzim Aktivitesi (UL ⁻²)	
	(Kontrolle göre dekolorizasyondaki % azalış)		MnP	Lakkaz
-	74(100)		12(100)	46(100)
Hg ²⁺	52 (30)		19(+58)	ND
Ni ²⁺	44(41)		22(+83)	46(0)
Co ²⁺	60(19)		40(+233)	44(-3)
Zn ²⁺	40(46)		32(+166)	46(0)
Pb ²⁺	46(38)		18(+50)	47(+4)
Cd ²⁺	52(30)		19(+58)	46(0)

Tablo 5. Metallerin *Pleurotus ostreatus*'un Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Metaller	Dekolorizasyon çapı (mm)		Enzim Aktivitesi (UL ⁻²)	
	(Kontrolle göre dekolorizasyondaki % azalış)		MnP	Lakkaz
-	70(100)		19(100)	39(100)
Hg ²⁺	52(26)		22(+16)	41(+16)
Ni ²⁺	46(34)		27(+42)	49(+26)
Co ²⁺	52(26)		ND	ND
Zn ²⁺	25(64)		18(-5)	38(-3)
Pb ²⁺	66(6)		17(-11)	39(0)
Cd ²⁺	53(24)		18(-5)	38(-3)

Tablo 6. Metallerin *Pleurotus florida* 'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Metaller	Dekolorizasyon çapı (mm)		Enzim Ünitesi (UL ⁻²)	
	(Kontrolle göre dekolorizasyondaki % azalış)		MnP	Lakkaz
-	61(100)		26(100)	44(100)
Hg ²⁺	38(38)		ND	ND
Ni ²⁺	43(30)		ND	ND
Co ²⁺	40(34)		37(+42)	44(0)
Zn ²⁺	48(21)		24(-8)	44(0)
Pb ²⁺	39(36)		32(+23)	42(-1)
Cd ²⁺	51(16)		19(-26)	46(+1)

Metallerin *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida* suşları'nın Lakkaz ve MnP Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri Tablo 4,5,6'da gösterilmiştir. Şekil 1'de *Pleurotus sajor-caju*'nun besiyerinde oluşturduğu dekolorizasyon zonu verilmiştir. *P.sajor-caju*'da %20 inhibisyonu

sağlayan tüm metal konsantrasyonlarında kontrole oranla MnP aktivitesinin arttığı saptanmıştır. En fazla artış Co'lu besiyerinde (%233) olmuştur .Bunu %166 ile Zn, %83 ile Ni ve Cd takip etmiştir. Metal içeren ortamlar arasında en iyi dekolorizasyonunda yine Co'lu ortamda olduğu görülmüştür. *P. sajor*

caju'da metallerin Lakkaz aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Denenen tüm metaller besiyeri üzerindeki dekolorizasyon oranının azalmasına neden olmuştur. En çok azalış %46 ile Zn içeren besiyerinde gözlemlenmiştir (Tablo 4). *Pleurotus ostreatus*'da besiyeri üzerindeki dekolorizasyon oranı *P. sajor-caju*'ya benzer olarak metaller varlığında azalmıştır. Dekolorizasyonun Zn içeren besiyerinde %64 oranında azalttığı saptanmıştır. Hg ve Ni, içeren besiyerinde *Pleurotus ostreatus*'un MnP aktivitesini artmış ancak Zn, ve Cd'lu besiyerinde MnP aktivitesini düşmüştür (Tablo 5). *Pleurotus florida*'nın MnP aktivitesinin Co'lu besiyerinde %42 arttığı saptanmıştır. Bunu %32 ile Pb takip etmiştir. Cd %26, Zn ise %8 oranında MnP aktivitesini düşürmüştür. Lakkaz aktivitesinde metaller önemli bir değişmeye neden olmamıştır. Metal içeren besiyerleri arasında en iyi dekolorizasyon oranı %51 ile Cd ortamda saptanmıştır (Tablo 6).

4. Tartışma ve Sonuç

Hızla artan dünya nüfusu ve sanayileşme sonucunda kullanılabilir su kaynakları giderek azalmaktadır. Tekstil ve boya sanayilerinin artan bu kirlilikte önemli payları vardır. Son yıllarda su kirliliği kontrolüne yönelik çalışmalar giderek artmıştır. Atık suların boyaların uzaklaştırılmasında etkili ve düşük maliyetli olan biyosorpsiyon gibi alternatif arıtma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Boyalar tekstil, gıda, ve diğer birçok endüstriyel ürünlere besin renk vermek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda fungusların tekstil boyaların biyosorpsiyon ile uzaklaştırdığı ve dekolorizasyon çalışmalarında kullanılabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (Sani ve Azmi, 1998; Yeşilada, 1995; Yeşilada ve Özcan, 1998).

Boya gibi organik maddeler pek çok durumda ağır metaller ile kompleks halinde bulunmaktadır. Ağır metallerin, beyaz çürükçül fungusların ekstraselüler enzim üretimlerini ve boya dekolorizasyon yeteneklerini etkilediği belirlenmiştir (Baldrian and Gabriel, 1997; Pointing *et al.*, 2001).

Cd ve Hg basidiomisetler için genellikle çok fazla toksik etki gösterir. PAH lar ile kontamine olmuş topraklarda Cd bulunur ve biyoteknolojik proseslerde *P. ostreatus* kullanarak ksenobiyotiklerin biyodegradasyonu sağlanmaktadır. Sıvı kültürlerde Cd'nin Lakkaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Ancak bu bulgu doğal ortam altında doğrulanmamıştır. *P. ostreatus* doğal ortamda yüksek Cd konsantrasyonlarını (5 mM) tolere etmesine rağmen laboratuvar koşullarında 1 mM'da inhibe olmaktadır. Cihangir ve Sağlam (1997) *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 ve *Pleurotus sajor-caju*'yu Cu, Co, Cd, Zn ve Ag metal tuzları içeren ortamda geliştirdiklerinde *Phanerochaete chrysosporium* ME-446'yu *Pleurotus sajor-caju*'ya göre metallere daha dirençli olduğunu ve metal konsantrasyonunun artması ile miselyal gelişimin inhibe olduğunu saptamışlardır. Pointing ve ark.'ları (2000); Pb, Zn ve Cu'nun 0.2 mM konsantrasyonları *P. chrysosporium*'un kuvvetli inhibisyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Purkayastha ve ark. (1994) *P. sanguineus* ve *T. versicolor*'un sıvı kültürlerinin *P. sajor-caju*'nun 0.09mM konsantrasyonları ile benzer sonuç verdiğini ve 0.007mM Pb'nin *P.sajor-caju* 'nun gelişimini %85 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda *Pleurotus florida*'nın Ni hariç denenen tüm 0.001 mM'lık metal konsantrasyonlarındaki gelişimi inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Pleurotus ostreatus*'da ise Hg ve Pb'nin 0,01mM, diğer metallerin 0,001 mM konsantrasyonlarındaki gelişim inhibisyonu istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$) anlamlıdır. *P. sajor-caju*'nun metallere karşı denenen türler arasında en iyi direnç gösteren suş olduğu saptanmıştır

Yapılan çalışmalar; beyaz çürükçül fungusların lignin parçalanmasında LiP, MnP ve lakkaz enzimlerini kullandıklarını göstermektedir. (Hammel and Cullen, 2008). Lignin parçalayabilen bu enzimler aynı zamanda çok çeşitli kiretici maddeleride ortamdan uzaklaştırabilirler. Pek çok

çalışmada, beyaz çürükçül fungusların endüstriyel atıkları (Axtell *et al.*, 2000; Sheremata and Hawari, 2000), PCB'leri (Fernandez-Sanchez *et al.*, 2001), petrol (Isikhuemhen *et al.*, 2003) and PAH'ları (Hadibarata, 2009) bu enzimler ile ortadan uzaklaştırabildiklerini göstermektedir.

Pasti-Grigsby ve ark. (1992), *P. chrysosporium*'da boyar maddenin dekolozasyonundan sorumlu enzimin LiP olduğunu bildirmiştir. Ollikka ve ark. (1993) ise azo bayalarının, trifenilmetanın, heterosiklik ve polimerik boyaların dekolozasyonunda LiP'in temel rolü oynadığı ancak bu boyaların degradasyonunun başlamasında MnP'a gereksinim duyulmadığını bildirmişlerdir. Young ve Yu (1997) azo bayalarını, indigo, antrokinon, metal kompleks bayalarında içeren 8 sentetik boya ile yaptığı çalışmada *T. versicolor*'un MnP'in dekolozasyonun başlaması için gerekli olmadığını ancak ligninazın boyaların %80 ini oksidasyon ile uzaklaştırdığını göstermişlerdir. *T. versicolor*'un temel ekstraselüler enzimi lakkaz olmasının nedeni antrakinin, azo ve indigo bayalarının dekolozasyonunda lakkaz aktivitesi temel mekanizma olduğu gösterilmiştir (Wong and Yu, 1999).

Knapp ve ark. (1995) renk gideriminin sınırlı olduğunu (genellikle %50 den az) bildirmiştir. Benito ve ark. (1995) ise *T. versicolor* ile yaptıkları çalışmada bu oranın %5–10 ile sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Boussaid (1995) *Sagenomella striatisporanın* deneylerde ortamdaki renk gideriminin %74 oranında gerçekleştiğini ancak bunun %12 sinin absorpsiyonu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Gallagher ve ark. (1997) *Rhizopus oryzae* bioması ile reaktif birillan red kullanarak yaptıkları çalışmada absorpsiyon olayının kombin bir mekanizma olduğunu (Freundlich ve Langmuir izoterm model) saptamıştır. Brahimi- Horn ve ark. ları(1992) sonikasyona tabi tuttukları hücreleri 1 ila 24 saat 3 boya solüsyonunda tutmuşlar ve yaklaşık 1 saat içinde aynı miktarda boyayı absorbladığını fakat 24 saat boya absorpsiyonunun arttığını

saptamışlardır.

P.sajor-caju'da %20 inhibisyonu sağlayan tüm metal konsantrasyonlarında kontrole oranla MnP aktivitesinin arttığı saptanmıştır. En fazla artış Co'lu besiyerinde (%233) olmuştur .Bunu %166 ile Zn, %83 ile Ni ve Cd takip etmiştir. Metal içeren ortamlar arasında en iyi dekolozasyonunda yine Co'lu ortamda olduğu görülmüştür. *P. sajour caju*'da metallerin Lakkaz aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Denenen tüm metaller besiyeri üzerindeki dekolozasyon çapının azalmasına neden olmuştur. En çok azalış %46 ile Zn içeren besiyerinde gözlemlenmiştir (Tablo 4). *P. sajour-caju*'nun metallere karşı denenen türler arasında en iyi direnç gösteren suş olduğu ve metal içeren ortamda MnP aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Hatvani ve Mecs (2003) Fe ve Hg varlığında *L. edodes*'de MnP miktarının arttığını ve boya deşredasyonunda bu enzimin etkin olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda Lakkaz aktivitesi metal ve boya içeren ortamda deşişmezken MnP aktivitesinde farklılıklar belirlenmiştir.

Sonuç olarak metallere toleranslı funguslar, toksik metallere kontamine çevrelerde biosorpsiyon teknolojisi ile remediasyon çalışmalarında kullanılabilir. Endüstriyel atıklar genellikle kompleks karışımlar olup çeşitli metal tuzları içerirler. Bu çalışmadan elde edilen verilerin *Pleurotus* türlerinin boyar maddelerle kontamine olmuş sularda, biyoremediasyon teknolojiler kullanılarak renk giderimi konusunda yapılacak çalışmalara yararlı olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma AKÜ Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu tarafından desteklenmiştir (07.FENED.14). Ayrıca suşların temininde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Necdet Sağlam'a teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

Acemioğlu, B., 2004. Removal of Fe(II) ions from aqueous solution by Calabrian pine bark wastes,

- Bioresource Technology*, **93**, 99 - 102.
- Aksu, Z. and Tezer, S. 2000. Equilibrium and kinetic modeling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system effect of temperature, *Process Biochemistry*, **36**, 431-439.
- Axtell, C.M., Holman, D.J., Unsworth, K.L., Wall, T.D., Waterson, P.E. and Harrington, E., 2000. Shopfloor innovation: facilitating the suggestion and implementation of ideas, *Journal of Occupational & Organizational Psychology*, **73**, 265-85.
- Baldrian, P. and Gabriel, J., 1997. Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes, *Folia Microbiologica*. **42**, 521-523.
- Baldrian, P. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30(2)**, 215-242. doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Boussaid, A., 1995. Pulp-mill effluent color removal using *Sagenomella striatispora*, Ph.D.Thesis, Oregon State University, USA.
- Brahimi-Horn, M.C., Lim, Liany, S.L., Mou, D.G., 1992. Binding of textile azo dyes by *Mirothecium verrucaria* Orange II, 10B (blue) and. RS (red) azo dye uptake for textile wastewater decolorization, *Journal of Indian Microbiology*, **10**, 245-261.
- C. Novotny, K. Svobodova, A. Kasinath and P. Erbanova, 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions, *International Biodeteriation and Biodegradation.*, **54**, 215-223.
- Fernandez-Sánchez J.M., Rodríguez-Vázquez R., Ruiz-Aguilar G. and Álvarez P.J.J. 2001. PCB biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health*, **36**, 1145-1162.
- Gallagher, K.A., Healy, M.G., Allen, S.J., 1997. Biosorption of synthetic dye and metal ions from aqueous effluents using fungal biomass. In: Wise, D.L.(Ed.), *Global Environmental Biotechnology*. Elsevier, UK, 27-50.
- Global Environmental Biotechnology. Elsevier, UK, pp. 27-50
- Hadibarata, T. 2009, Oxidative degradation of benzo[a]pyrene by the ligninolytic fungi, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Environmental Research in Asia*, Eds., Y. Obayashi, T. Isobe, A. Subramanian, S. Suzuki and S. Tanabe, 309-316.
- Hammel, K.E. and Cullen, D., 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11(3)**, 349-355.
- Hatvani and Imre Mecs., 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 199-203.
- Hatvani, N. and Mecs, I., 2002. Effect of the nutrient composition on dyedecolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 381-386
- Isikhuehmen O, Anoliefo G and Oghale O. 2003, Bioremediation of crude oil polluted soil by the white rot fungus *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Sing. *Environmental Science Pollution Research*, **10**, 108-112.
- Kaushik, P. and Malik, A. 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential, *Environment International*, **35**, 127-141.
- Knapp, J.S., Newby, P.S., Reece, L.P., 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 664-668.
- Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V. M., Glumoff, T., Rajjola, T. and Suominen, I., 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, **59 (12)**, 4010-4016.
- Palma, C., Moreira, M.T., Mielgo, I., Feijoo, G. and Lema, J.M., 1999. Use of fungal bioreactor as a pretreatment or post treatment step for continuous decolorisation of dyes, *Water Science and Technology*, **40(8)**, 131-136.
- Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L., 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58(11)**, 3605-3613.
- Pointing SB., 2001, Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied and Microbial Biotechnology*, **57**, 20-33.
- Purkayastha, R.P., Mitra, A.K. and Bhattacharyya, B., 1994. Uptake and toxicological effects of some heavy metals on *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **27**, 7-13, doi:10.1006/eesa.1994.1002.
- Raghukumar, C., Chandramohan, D., Michel Jr., F.C. and Reddy, C.A., 1996. Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi. *Biotechnology Letters*, **18 (1)**, 105-106.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresource Technology*. **77**, 247-255.
- Sağlam, N. and Cihangir, N., 1995. Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorpsiyonu çalışmaları, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **11**, 157-161.
- Sani, R.K., Azmi, W. and Banerjee, U.C., 1998. Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica* **43(1)**, 85-8.
- Sheremata, T. W., and J. Hawari. 2000. Mineralization of RDX by the White Rot fungus *Phanerochaete*

- chryso sporium* to carbon dioxide and nitrous oxide. *Environmental Science and Technology*, **34**, 3384–3388.
- Swamy, J., Ramsay, J.A., 1999. Effects of glucose and NH₄ concentrations on sequential dye decolorization by *Trametes versicolor*, *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 278-84.
- USEPA, 1997. Profile of the textile industry, U.S: Environmental Protection Agency, Office of Compliance Notebook Sector Project, EPA/310-R- 97-009.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H., 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chryso sporium*, *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 23688–23695.
- Wolfenden, B.S. and Willson, R.L., 1982. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 805–812.
- Wong, Y. and Yu, J., 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, **33(16)**, 3512-3520.
- Yeşilada, O. and Özcan, B., 1998. "Decolorization of Orange II with the crude culture filtrate of white rot fungus *Coriolus versicolor*, *Turkish Journal of Biology*, **22**, 463-76.
- Yeşilada, E., Ozmen, M. and Yeşilada, O., 1999, Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin* **8**, 732-9.
- Young, L. and Yu, J., 1997. Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, **31(5)**, 1187-1193.
- Zhang, F., Knapp, J.S. and Tapley, K.N., 1999. Decolourisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. *Water Research*, **33(4)**, 919-928.