



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 32 (2017)  
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)  
doi: 10.7161/omuanajas.281969



## Direct Black 22 azo boyasının *Pleurotus ostreatus* ile biyogiderimi ve optimizasyonu

Hüseyin Özkan Cañelik, Ayşe Hümeýra Taşkın Kafa, Murat Çankaya\*

Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye  
\*Sorumlu yazar/corresponding author: mcankaya@erzincan.edu.tr

Geliş/Received 28/12/2016

Kabul/Accepted 05/01/2017

### ÖZET

Ticari olarak kullanılan sentetik boyaların büyük bir kısmını toksik, kanserojenik ve mutajenik özelliklere sahip olan azo boyalar oluşturmaktadır. Boyalar özellikle tekstil endüstrilerinde boyama ve baskı işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyaların fabrika deşarj sularından arıtılması için kullanılan kimyasal ve fiziksel arıtım teknolojileri yetersiz kaldığından ve özellikle kimyasal arıtım yöntemlerinde kullanılan bazı oksidan moleküller çevre için tehlikeli olduğundan biyolojik arıtım önem kazanmaktadır. *Pleurotus ostreatus*, dünyanın hemen hemen bütün ılıman iklim bölgelerinde; kavak, kayın, meşe, karaağaç, akçaağaç, ıhlamur, söğüt, ceviz ve kestane gibi birçok ağaç türünün çürümüş gövdelerinde çürükçül olarak yaşar. Üzerinde bulunduğu bitkinin hemiselüloz, selüloz ve lignin gibi polisakaritlerini ekstraselüler olarak deşrede eder ve karbon kaynağı olarak kullanır. Genel olarak beyaz çürükçül fungusların büyük bir çoğunluğu tarafından üretilebilen ligninoselülotik enzimler, boya maddelerinin atık sulardan arıtılmasında kullanılır. Çalışmada kullanılan ve Erzincan'dan izole edilen *P. ostreatus* mantarının, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan Direct Black 22 azo boyasının biyosorpsiyonu-biyodegradasyonu ve bu amaçla fonksiyon gösteren enzimlerin aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca özellikle tekstil boya endüstrisinde kullanılan ve bu işletmelerden çevreye bırakılan atık su içerisindeki önemli kirlilik faktörü olan sentetik boya maddelerin düşük maliyetle ve kısa sürede biyolojik olarak arıtılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, polifenol oksidaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz gibi enzimlerin azo boyaların giderimi üzerinde etkili sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Özellikle lakkaz enziminin aktivitesi yüksek çıkmıştır. Ayrıca arıtım üzerine farklı kerestecilik atıklarının da besin kaynağı olarak kullanımı denenmiş ve *P. ostreatus*'un üzerinde çürükçül olarak yaşadığı ağaç türlerinin kabuk kısımlarını mikro partikül haline getirdiği ve boyarmadde giderim ortamında kullandığı belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler:  
*Pleurotus ostreatus*  
Azo boyalar  
Biyosorpsiyon  
Biyodegradasyon

### Biological treatment and optimization of Direct Black 22 Azo Dyes with *Pleurotus Ostreatus*

#### ABSTRACT

Most commercial synthetic dyes consist of azo dyes which have toxic, carcinogenic and mutagenic properties. Dyes are widely used in painting and printing processes especially in textile industries. Because of the inadequate chemical and physical treatment techniques used to treat these dyes from factory discharge waters, and some oxidant molecules used in chemical treatment methods danger for the environment, biological treatment is gaining importance. *P. ostreatus* is saprophyte that lives in almost all temperate climates; Many trees such as poplar, beech, oak, elm, maple, linden, willow, walnut and chestnut in the rotten trunks. It degrades the plant's polysaccharides such as hemicellulose, cellulose and lignin extracellular and uses it as a carbon source. Lignocellulosic enzymes, which can be produced by a large majority of white rot fungi in general, used to treat dye substances from waste water. In this study, the biosorption-biodegradation of Direct Black 22 azo dyes widely used in the textile industry by *P. ostreatus* fungi, which are used in this study and isolated from Erzincan, and for this purpose the activities of enzymes of function have been investigated. Also it is aimed to biological treatment of synthetic dye materials which are used in the textile dyeing industry and which are the important pollution factors in the wastewater which are left to the environment. Consequently, it was

Keywords:  
*Pleurotus ostreatus*  
Azo dyes  
Biosorption  
Biodegradation

observed that enzymes such as polyphenol oxidase, laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase gave effective results on the treatment of azo dyes. In particular, the activity of the enzyme laccase has been high. In addition the tried to use different logging waste as a source of nutrient treatment on and It has been determined that tree species that have been saprophyte on *P. ostreatus* have turned their shell parts into microparticles and used them in the environment of dyeing.

## 1. Giriş

Günümüzde uluslararası çevre sorunlarından biri de sucul ekosistemlerin kirlenmesidir. Sucul ekosistemlerde kirliliğin büyük kısmı endüstriyel atıklar nedeni ile meydana gelmektedir. Genellikle tekstil boya endüstrisi fabrikalarından deşarj edilen atıklar göller ve akarsular gibi sucul sistemlere verilmektedir. Bu atıkların bazı arıtım proseslerinden geçirilip en zararsız hale dönüştürülerek doğaya verilmesi gerekmektedir. Ancak gelişmekte olan ülkelerin çoğunda ürün maliyetini düşük tutmak amacıyla gerek üretim gerek arıtım prosesinde eski teknolojiler kullanılmaktadır. Eskiden fiziksel ve kimyasal arıtım yapılırken şimdi biyolojik arıtım yapılmaktadır (Şişli, 1996).

Tehlikeli maddeleri, zararsız (su ve karbondioksit) veya daha az zararlı maddelere parçalamak için mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreçli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir. Biyoremediasyon; mikroorganizmaların kirleticileri çevreden alma kapasitesine sahip olmaları ve bunları büyüme ve metabolik faaliyetleri için kullanmaları esasına dayanmaktadır. Biyoremediasyon, biyosorbsiyon ve biyodegradasyon şeklinde yapılabilir. Kimyasal maddelerin mikrobiyal kütle tarafından adsorpsiyonu veya kütlede birikimi biyosorpsiyon olarak ifade edilmektedir. Biyodegradasyon ise yaşayan mikrobiyal organizmalar tarafından organik bileşiklerin enzimler kullanılarak küçük parçalara ayrılması işlemidir. Biyosorbsiyon hücre dış yüzeyinde veya iç yüzeyine tutunma olarak gerçekleşirken biyodegradasyon hücre dışında parçalanması veya hücre içine metabolize edilmesi şeklinde olmaktadır. Mantar ile yapılan renk giderim çalışmalarında kullanılan glikoz derişimi genellikle 1-5 g L<sup>-1</sup> 'dir (Zhang ve ark., 1999, Kapdan ve Kargi, 2001). Basidiomycetes sınıfına ait olan beyaz çürükçül mantarların sentezledikleri lakkaz, Mn-peroksidaz, lignin peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) ekstrasellüler enzimleri biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Wesenberg ve ark., 2002).

Ticari olarak kullanılan sentetik boyaların büyük bir kısmını toksik, kanserojenik ve mutajenik özelliklere sahip olan azo boyalar oluşturmaktadır (Seesuriyachana ve ark., 2007). Genel bir sınıflandırma yapmak gerekirse boyar maddeler üç grupta incelenebilir (Fu ve Viraraghavan, 2002). 1. Katyonik boyar maddeler: Bazik boyar maddeler, 2. Anyonik boyar maddeler: Direkt, asit ve reaktif boyar maddeler, 3. İyonik olmayan boyar maddeler: Dispers boyar maddeler.

Anaerobik koşullarda azo boyalarının parçalanması ile aromatik aminlere kolaylıkla parçalanabilmektedir. Ancak oluşan bu aromatik aminler genellikle anaerobik

koşullarda daha ileri parçalanmaya dirençlidir (Kuai, De Vreese ve Vandevivere, 1998). Oluşan bu aromatik aminlerin aerobik kademedeki giderimi ile boyar maddelerin anaerobik/aerobik proseslerle mineralizasyonu gerçekleştirilmiştir (Zaoyan ve ark., 1992; An ve ark., 1996).

Azo boyaları, yapılarındaki kromofor grup olan azo (-N=N-) grubu ile karakterize edilir (Başer ve İnanıcı, 1990). Doğal boyar maddelerin hiç birinde azo grubuyla karşılaşılmaz. Bu sınıf boyar maddelerin hepsi sentetik olarak elde edilirler. Sentezlerinin sulu çözelti içinde ve basit olarak gerçekleştirilmesi ve başlangıç maddelerinin sınırsız olarak değiştirilebilmesi çok sayıda azo boyar maddesinin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990; Taner, 2006). Azo grubu içerdiği bilinen tek bir doğal ürün, 4,4'-dehidroksiazobenzen mevcuttur. Endüstriyel olarak üretilen azo boyaların tümü ksenobiyotik bileşiklerdir (Pagga ve Brown, 1986). Azo boyaları günümüzde tekstil endüstrisinde kullanılmakta olup çevre kirleticileri içinde oldukça önemli bir yeri tutmaktadırlar. Bu hedeften yola çıkarak Direct Black 22 azo boyasını, Erzincan'dan izole edilen *P. ostreatus* mantarının üzerinde biyosorbsiyonu-biyodegradasyonu araştırdık.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kimyasallar

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline-6-sülfonik asit) ABTS, Agar, Sodyum Asetat, Bakır (II) sülfat, Glukoz, Pepton, Amonyum Nitrit, Magnezyumsülfat-7-hidrat, Potasyum Klorür, Çinko(II)sülfat-7-hidrat, Kalsiyum Klorür (II) hidrat, Tiamin, Sodyum Malonat, Mangan (II) sülfat, Hidrojen Peroksit ve Velatril Alkol Sigma firmasından temin edilmiştir. Potato Dekstroza Agar PDA Fluka firmasından temin edilmiştir. Malt Ekstrakt, Yeast Ekstrakt, Potasyum sodyum tartarat, Potasyum Bisfosfat Merck firmasından temin edilmiştir. Demir (II) sülfat-7-hidrat (Riedel de Haen) Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir.

#### 2.1.2. Mikroorganizma

Çalışmada lakkaz enziminin üretiminde kaynak olarak beyaz çürükçül fungus *P. ostreatus* kullanılmıştır. Mantar örneği laboratuvara getirildikten sonra spor tozlarının renklerini saptamak ve sporları mikroskop altından incelemek için şapkanın sapı şapkaya yakın bir yerden kesilerek himenium tabakası

ashağı gelecek şekilde beyaz bir kağıt üzerine bir süre bırakılmıştır. Böylelikle sporların dökülmesi sağlanmış ve spor baskısı tespit edilmiştir.

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Uygun stok ortamının belirlenmesi

*P. ostreatus*'un stoklayabilmek için kullanılacak besiyeri seçiminde iki farklı besiyeri kompozisyonu belirlenmiştir. Bu stok ortamlarında yapılan denemelerde besiyerlerine ekilen hücreler 14 gün boyunca 28°C inkübasyona bırakılarak gelişimleri ve kontaminasyon olup olmadığı takip edilmiştir.

### 2.2.2. Rose bengal agar

Rose Bengal Agar (RBA) hazır besiyeridir. RBA ortamının hazırlanışında 1 litre çözeltide 32,2 gram RBA olacak şekilde 100 ml'lik ortam hazırlanıp 121°C de 1 atm'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi ve 9 cm çaplı petrilere 12,5 ml olacak şekilde aseptik koşullarda aktarımı yapıldı.

### 2.2.3. Potato dekstroz agar (PDA)

Potato Glukoz Agar (PGA) [PDA = potato dekstroz agar da denilebilir.] PGA ortamı hazırlanışında 1 litre çözeltide 39 gram PGA olacak şekilde 100 ml'lik ortam hazırlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C de 1 atm'de 20 dakika sterilize edildi ve 9 cm çaplı petrilere 12.5 ml olacak şekilde aseptik koşullarda aktarımı yapıldı.

### 2.2.4. Yatık agar

Katı besiyerinden sıvı besiyerine hücre inokülasyonu için yatık agar kullanıldı. Roux şişesinde 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilizasyon yapılan besiyerleri ardından 55 °C'ye kadar soğutulmuş steril vidalı deney tüplerine steril ortamda 5'er ml aktarıldı.

### 2.2.5. Büyüme ortamı

Büyüme ortamı olarak Malt Ekstrakt Broth (MEB) kullanıldı (1,7 g/100ml). Hazırlanan Malt Ekstrakt Broth (MEB) 250 ml erlenlere 95 ml olacak şekilde koyuldu ve otoklavda sterilize edildi. Yatık agara ekimi yapılan mikroorganizmalar 5 ml serum fizyolojik su yardımı ile aseptik koşullarda alındı ve büyüme ortamına yine aseptik koşullarda ilave edildi. 6 gün 28 °C de 125 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi.

### 2.2.6. Uygun Enzim Üretim Ortamının Belirlenmesi

*P. ostreatus* tarafından üretilen polifenol oksidaz, lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz enzimlerinin üretim ortamının belirlenmesi için, dört farklı ortamda bu enzimlerin aktivitesi 14 gün boyunca

izlendi. Bu çalışmada kullanılmak üzere 4 farklı ortam denenmek üzere seçildi. Birinci ortamın içeriğinde; 2.5 g L<sup>-1</sup> Glukoz, 1 g L<sup>-1</sup> Yeast ekstrakt, 2.3 g L<sup>-1</sup> Potasyum sodyum tartarat, 1 g L<sup>-1</sup> Pepton, 0,00639 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> bulunmaktadır. pH 6.6'ya ayarlanarak 95 ml'lik besi ortamları hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir. İkinci ortamın içeriğinde; 2.5 g L<sup>-1</sup> Mannitol, 1 g L<sup>-1</sup> Yeast ekstrakt, 2.3 g L<sup>-1</sup> Potasyum sodyum tartarat, 1 g L<sup>-1</sup> Pepton, 0,00639 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> bulunmaktadır. pH 6,6'ya ayarlanarak 95 ml'lik besi ortamları hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Ortama mannitol ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir. Üçüncü ortamın içeriğinde; 10 g L<sup>-1</sup> Glukoz, 0,724 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g L<sup>-1</sup> KCl, 0,5 g L<sup>-1</sup> Yeast ekstrakt, 0,001 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,0028 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,033 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10 g L<sup>-1</sup> Pepton bulunmaktadır. pH 6'ya ayarlanarak 95 ml'lik besi ortamları hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir. Dördüncü ortamın içeriğinde; 5 g L<sup>-1</sup> Glukoz, 2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,05 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> Tiamin ortamı hazırlanıp içerisine 0,5 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>, 0,1 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, eser element solüsyonu hazırlanarak 100 ml'lik karışım içerisine 10 ml ilave edildi. pH 4.5'e ayarlanarak 95 ml'lik besi ortamları hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir.

### 2.2.7. Enzim aktivite tayini

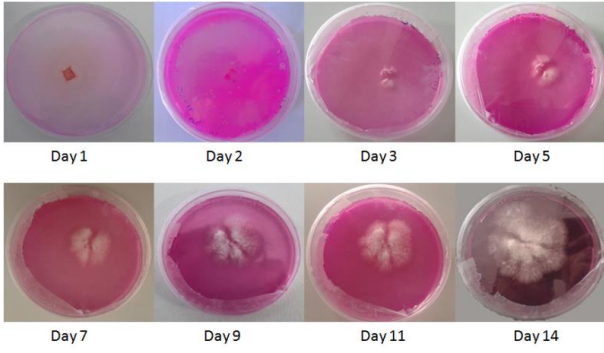
Polifenol oksidaz aktivitesi katekol'ü oksitlediğinden dolayı oluşturduğu kompleksin 420nm'de verdiği karakteristik absorpsiyon ölçülür. Lakkaz'ın aktivitesi, lakkaz ABTS'yi oksitlemesiyle kinon bileşikleri oluşturur oluşan bu kinonlar 420 nm'de karakteristik absorpsiyon verir. Mangan peroksidaz'ın aktivitesi, manganla malonatın oluşturduğu kompleksin 270 nm'de verdiği karakteristik absorpsiyon ölçülür. Veratril alkolün H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aracılığı ile oksitlenmesi sonucu oluşan yapının 310 nm de verdiği karakteristik absorpsiyon ölçülür.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Uygun stok ortamının belirlenmesi

#### 3.1.1. Petri stok kültürü

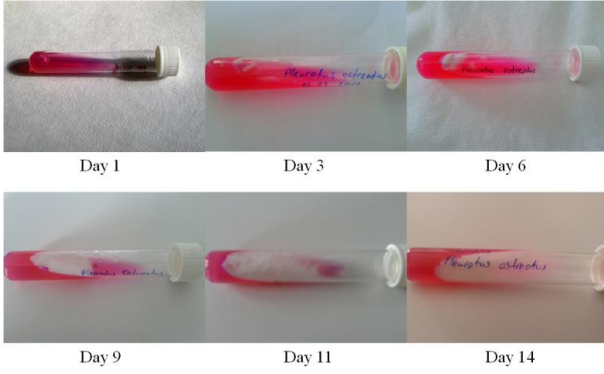
PDA'da kontaminasyon riski yüksek olduğundan dolayı petri stok kültüründe Rose Bengal Agar seçilmiştir. Her PDA ve RBA'da *P. ostreatus* aynı gelişimi göstermiş herhangi bir morfolojik ve biyokimyasal değişime uğramamıştır (Şekil 1).



Şekil 1. RBA Petri Stok Kültürü

### 3.1.2. Yatık agar

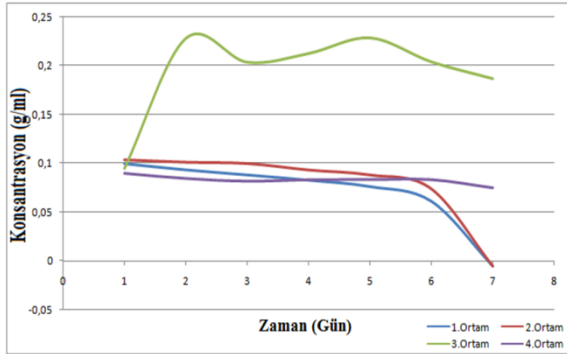
Yatık agar besiyeri olarak kullanılan RBA da organizmamız 14 günün sonun da yüzeyde misel oluşturmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. RBA Yatık Stok Kültürü

### 3.2. Uygun enzim üretim ortamının belirlenmesi

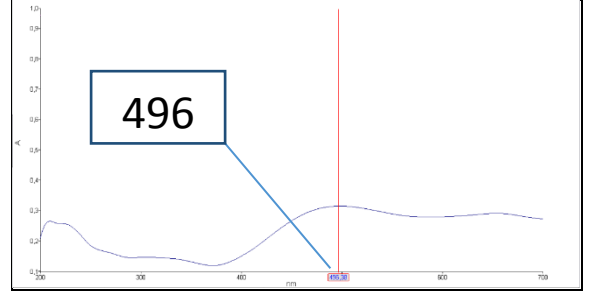
Uygun enzim ortamını belirlemek için denemeler yapılmış, Şekil 3.'de sunulmuştur. Sonuçlara göre birinci ortam besi yerinde boya giderimi ve enzim aktiviteleri yüksek olduğundan dolayı çalışmalara bu kompozisyon ile devam edilmiştir.



Şekil 3. Uygun Enzim Üretim Ortamı Grafiği

### 3.3. Boyaların spektrum taraması

Biyogiderimi yapılan boyaların saf hallerinin maksimum absorbsans değerlerini bulmak amacı ile spektrum taraması yapıldı. Böylelikle boya moleküllerinin maksimum absorbsans verdiği dalga boyları bulundu. Spektrum taraması yapılırken kör olarak saf su kullanılıp boyaların saf halde 0.02 g L<sup>-1</sup> konsantrasyonlar da çözeltilerinin 700 nm – 200 nm aralığında spektrum taramaları yapıldı. Yapılan bu taramalar sonucu her boya için maksimum absorbsans veren dalga boyu tespit edildi. Boyaların spektrum taramaları Şekil 4' de sunulmuştur.

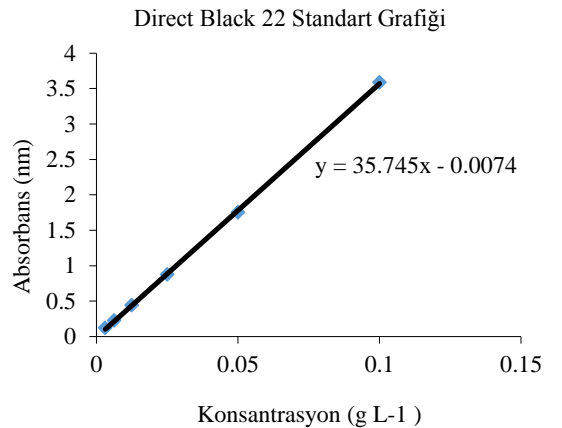


Şekil 4. Direk Black 22 Spektrum Taraması

### 3.4. Boyaların standart grafiklerinin oluşturulması

Enzim üretim ortamında biyogiderimin takip edilebilmesi için, günlük olarak sıvı kültürden alınan numunelerde ne kadar boya kaldığını; standart grafiği oluşturularak tespiti yapıldı. Standart grafiği oluşturmak için saf boya maddesini belirli oranlarda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin, her boya için maksimum absorbsans verdikleri dalga boylarında ölçümleri yapıldı. Bu boya çözeltilerinin konsantrasyonlarıyla, absorbsans– konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 5).

Bu grafikler sonucu oluşturulan  $y = a x + b$  grafik denklemleri de standart grafik denklemleri olarak kullanıldı.

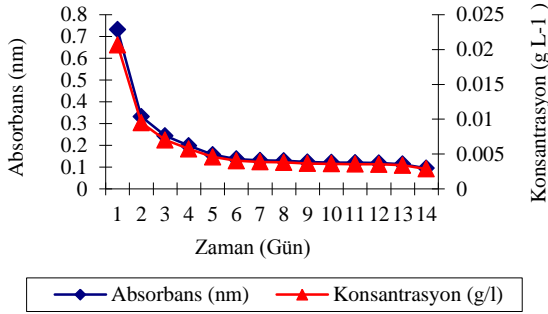


Şekil 5. Direct Black 22 standart grafiği

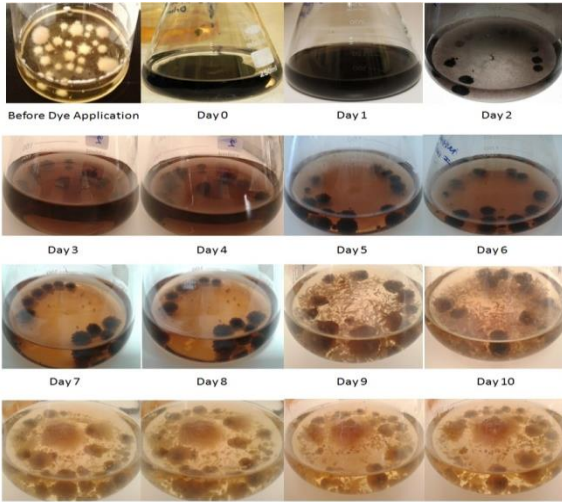
### 3.5. Boyaların gideriminin takibi

Enzim üretim ortamında bulunan boya miktarının takibi için günlük olarak sıvı kültürlerden 1'er ml aseptik koşullarda numune alındı. Alınan bu numuneler 16000 xg'de santrifüj yapıldı. Santrifüj yapılan numunelerin süpernatant kısmı alınarak her biri için özgül dalga boylarında absorbansları alındı. Kör olarak sterilize edilmiş sıvı kültür kullanıldı. Sonuçlar Şekil 6'de sunulmuştur ve denemesi yapılan boyaların biyogiderimi gün gün fotoğraflar ile takip edilmiştir (Şekil 7).

Direct Black 2 Biyodegradasyon Grafiği (E.Ü.O. Belirleme)



Şekil 6. Direct Black 22 boya giderim grafiği

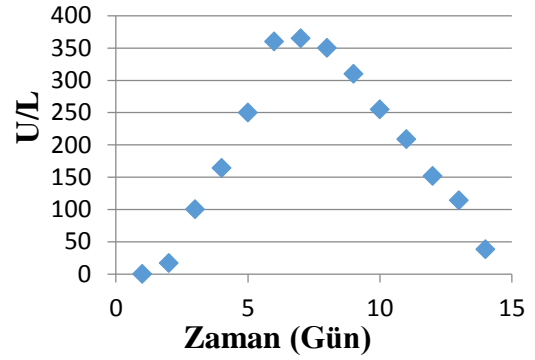


Şekil 7. Direct Black 22 Boya Giderim Görüntüsü

### 3.6. Lakkaz enziminin aktivite grafiği

Yaptığımız çalışmalarda gün gün takip edilen lakkaz, lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) enzimlerinin aktivite tayinlerinde lakkaz enziminin aktivitesinde gözle görülür bir şekilde değişiklik saptanmıştır (Şekil 8).

Direct Black 22 Lakkaz Aktivite Grafiği

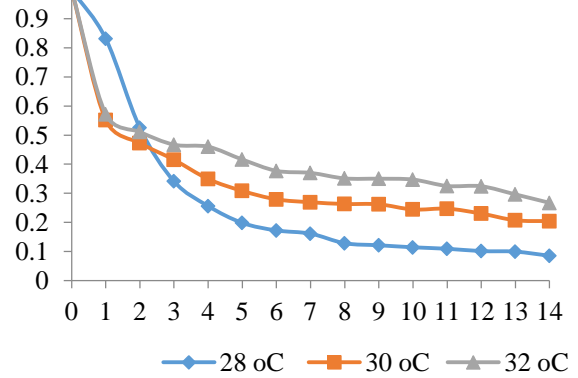


Şekil 8. Direct Black 22 lakkaz aktivite grafiği

### 3.7. Sıcaklık optimizasyonu

Sıcaklık optimizasyonu yaparak toksik boyaların hangi sıcaklıkta daha iyi degrede olduklarını ve hücrelerin hangi sıcaklık aralığında maksimum aktivite verdiği belirlendi (Şekil 9).

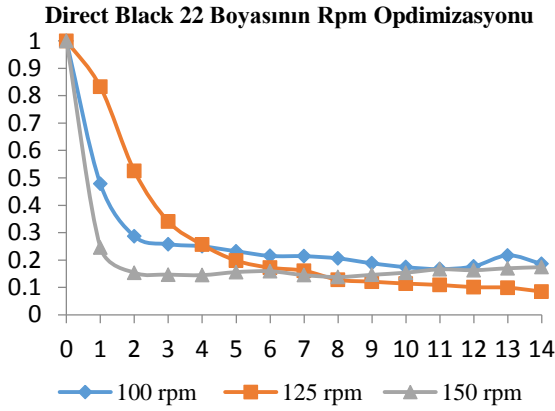
Üç Farklı Sıcaklıkta Direct Black 22 Boyasının Biyodegradasyonu



Şekil 9. Farklı sıcaklıkta Direct Black 22 boyasının biyodegradasyonu

### 3.8. Çalkalama hızı optimizasyonu

Çalkalama hızı optimizasyonu yaparak oksijen transferinin hangi aralıkta olduğunu belirleyip maksimum enzim aktivite verimini tespit ettik (Şekil 10).

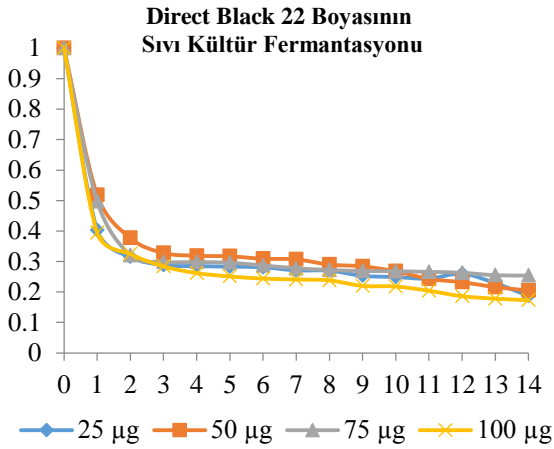


Şekil 10. Direct Black 22 boyasının rpm optimizasyonu

### 3.9. Sıvı kültür fermantasyonu

Şekil 11'de boyaların sıvı kültür fermantasyon sonuçları sunulmuştur. Sıvı kültür fermantasyonun da ağaç endüstrisinde atık olan malzemeyi kullanarak atık bir maddenin giderimi yine bir atık madde ile sağlanmış oldu. Enerji, bir karbon kaynağı yerine, ağaç artıklarının kullanılmasıyla sağlanmıştır. Dolayısı ile glikoz olarak kullanılan karbon kaynağından tasarruf edilmiş oldu.

Bir başka yaklaşım olarak da, kullanılan ağaç parçacıkları enzimin doğal substratı olduğundan dolayı bir gen indüksiyonuna neden olabileceği ve ekspresyon düzeyi hızlanıp genin daha fazla çalışması ile giderim daha hızlanacağı düşünülmüştür. Bunun sonucunda da giderimin daha etkili olacağı belirlenmiştir.



Şekil 11. Direct Black 22 boyasının sıvı kültür fermantasyonu

### 3.10. Biyokütle hesabı

Denemelerimizde kullandığımız mantar koloni hücrelerini ortalama aynı büyüklükte ve 10 koloni hücresi olacak şekilde belirledik. Belirlediğimiz 10 koloni hücresinin kuru ağırlıklarını tartıp canlı hücre miktarındaki artışına baktık. Buradaki biyokütle artışının önemi bir canlı ortamdaki boyayı rahat bir

şekilde kullanıp da toksik etki görmüyorsa biyokütlesini artırır. Çünkü bu ortam canlı için elverişli bir yaşam alanıdır. Canlıın biyokütlesini artırmasının önemi giderimi yapıyorken ne kadar çoğalmış ve ne kadar protein üretmiş ise o kadar fazla biyogiderim anlamına gelmektedir. Bu da çalışmalarımızın daha iyi bir verimle gerçekleşmesine katkı sağlamaktadır.

Toplam 10 koloni hücresinin ağırlığı 0,0137 g olarak tartılmıştır. Üç farklı azo grubu boyaların üzerinde denemeler sonucunda Direct Black 22'de 0,128 g olarak tartılmıştır. Bunları Yüzde(%) olarak verecek olursak Direct Black 22 % 734 oranında hücre artışı nicel olarak belirlenmiştir.

Uygun stok ortamı için Rose Bengal Agarı seçtik bunun nedeni *Pleurotus ostreatus*'un hiflerinin Rose Bengal Agarda gelişiminin daha iyi olduğudur. Potato Dekstroz Agarda kontaminasyon olduğundan dolayı bu besi yerini stok ortamı olarak tercih etmedik. Enzim ortamını belirlerken dört farklı içerik kompozisyonuna sahip ortamlar kullandık.

## 4. Sonuç ve Öneriler

Beyaz çürükçül mantarlar lignolitik enzimlerini çoğunlukla sadece karbon ve/veya azot kaynağı sınırlayıcı hale geldiğinde salgırlar (Stolz, 2001, Murray, 1990). *P. ostreatus*, beyaz çürükçül mantarlar içerisinde katı lignoselülozik artıkları en etkili şekilde ayrıştıran türlerdir. Bu yüzden, birçok tarımsal ve endüstriyel atık, *P. ostreatus* türlerinin üretimi için substrat olarak kullanılabilir (Zadrazil ve Brunnert, 1981, Platt ve ark., 1984). Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boyaları gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikler salgıladıkları spesifik olmayan ekstraselüler enzimlerle oksitleyebilirler (Cripss ve ark., 1990). *P. ostreatus* türleri en etkili lignolitik aktiviteye sahip beyaz çürükçül mantarlar grubu içerisinde yer almaktadır. İçerisinde tarımsal artıkların da yer aldığı geniş bir substrat grubunu kullanabilirler. *P. ostreatus* türleri tarımsal artıkların lignoselüloz kısımlarını ve organik çevre kirlenici maddeleri ksilanaz, endoglukonaz,  $\beta$ -glukosidaz, laminarinaz, lakkaz ve polifenol oksidaz gibi enzimlerini kullanarak parçalayabildikleri bilinmektedir (Ardon ve ark., 1998).

*Pleurotus ostreatus*'un hiflerinin yetiştirmek için seçtiğimiz birinci ortamda boya miktarı ilk gün 0.0997 g L<sup>-1</sup> konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0.0054 g L<sup>-1</sup>'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmalarımızı bu ortam içeriğini göre ilerlettik. İkinci ortamda; boya miktarı ilk gün 0.104 g L<sup>-1</sup> konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0.0051 g L<sup>-1</sup>'ye düştüğü belirlenmiştir. Birinci ortamda karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmaktadır. İkinci ortamda ise karbon kaynağı için mannitol kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu ortamı seçmememizdeki neden mannitol'un çözünmesinin glukozla göre daha yavaş olduğudur. Üçüncü ortamda ise boya miktarı başlangıçta 0.0949 g L<sup>-1</sup> konsantrasyona sahipken 7.

günün sonunda  $0.1873 \text{ g L}^{-1}$  'ye yükseldiği belirlenmiştir. Bu ortamda boya giderimi gözlenmeyip aynı zamanda kontaminasyon gerçekleşmiştir. Dördüncü ortamda ise boya miktarı başlangıçta  $0.0896 \text{ g L}^{-1}$  konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda  $0.0759 \text{ g L}^{-1}$  'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu ortamda boya gideriminin çok yavaş ve ortama konulan malzeme çok fazla olduğundan tercih etmedik. Hücrelerin E.Ü.O. sıcaklık optimizasyonu yaptık ve sonuç olarak aynı boyanın farklı sıcaklıklarda biyodegradasyon sonuçlarına göre  $28^\circ\text{C}$  de daha iyi bir sonuç aldık ve bu sıcaklığı seçtik.

Denemesi yapılan boyaların gün gün boya giderimine bakılarak; lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri takip edildi. Boyaların maksimum aktivite verdiği günler belirlendi. Direct Black 22 maksimum lakkaz aktivitesi verdiği 7. gün  $365 \text{ U/L}$ 'de boyanın % 97,1 kadarı çözülmüştür. Enzim üretim ortamlarındaki boya giderimini yüksekten düşüğe doğru karşılaştırdığımızda boya giderimi başlangıçta Direct Black 22'de  $100 \text{ ml}$  de  $0.01 \text{ g}$  boya varken 14.günün sonucunda  $0.00286 \text{ g ml}^{-1}$  kadar boya kalmıştır.

Hücrelerin enzim üretim ortamlarının da sıcaklık optimizasyonu, çalkalama hızı optimizasyonu, doğal besinini olan ağaç parçalarını kullanarak sıvı kültür fermentasyonu ve polifenol oksidaz (PPO), lakkaz, lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) enzimlerin biyodegradasyon da rol oynadıkları belirlenmiştir.

## Teşekkür

Çalışmanın alt yapısı sarf malzeme giderleri Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) tarafından desteklenen FEN-A-070114-0057 numaralı proje ile karşılanmıştır.

## Kaynaklar

- An, H., Qian, Y., Gu, X., Tang, W. Z., 1996. "Biological Treatment of Dye Waste water using Anaerobic-Oxic System", *Chemosphere*, 33(12): 2533-2452.
- Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y., 1998. "Enhancement of Lignin Degradation and Laccase Activity in *Pleurotus ostreatus* by Cotton Stalk Extract", *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 676-680.
- Başer, İ., İnanıcı, Y., 1990. "Boyar Madde Kimyası", Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları, İstanbul, 47-52, 35-37, 90-187.

- Cripss, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D., 1990. "Biodegradation of azo and hetero- cyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.* (56): 1114-1118.
- Fu, Y., Vıraghavan, T., 2002. "Removal of Congo Red From an Aqueous Solution by Fungus *Aspergillus niger*", *Advances in Environmental Research*, 7: 239-247.
- Kapdan, K.I., Kargı, F., 2001. "Biological Decolorization of Textile Dyestuff Containing Wastewater by *Coriolus versicolor* in Rotating Biological Contactor", *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 195-199.
- Kuai, L., De Vreese, I., Vandevivere, P., 1998. "GAC-Amended UASB Reactor for The Stable Treatment of Toxic Textile Wastewater", *Environmental Technology*, 19: 1111-17.
- Murray, P.R. 1990. "Medical Microbiology", St. Louis: Mosby, 616.
- Pagga, U., Brown, D., 1986. "The Degradation of Dyestuffs: Part II Behaviour of Dyestuffs in Anaerobic Biodegradation Tests", *Chemosphere*, 15(4): 479-491.
- Platt, M.K., Hadar, Y., Chet, I., 1984. "Fungal Activities Involve in Lignocellulose Degradation by *Pleurotus*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 150-154.
- Seesuriyachana, P., Takenakab, S., Kuntiyaa, A., Klayraunge, S., Murakamib, S., Aokib, K., 2007. "Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization", *Water Research*. 41: 985 – 992.
- Stolz A., 2001. "Basic and Applied Aspects in the Microbial Degradation of Azo Dyes, App.", *Microbiol Biotechnol.* 56: 69-80.
- Şişli, N., 1996. "Çevre Bilim Ekoloji" H.Ü. Fen Fakültesi. Ankara.
- Taner, T., 2006. "Katyonik Alkiltrimetilamonyum Bromür Surfaktantlar İle C.I. Reactive Orange 16 Etkileşimi", Yüksek Lisans Tezi, T.Ü Fen Bil. Enst., Edirne.
- Wesenberg, D., Buchon, F., Agathos, S.N., 2002. "Degradation of Dye Containing Textile Effluent by *Agaric White - Rot Fungus Clitocybula dusenii*", *Biotechnology Letters*, 24: 989-993.
- Zadrzıl, F., Brunnert, F., 1981. "Investigation of Physical Parameters Important for Solid State Fermentation of Straw by White Rot Fungi, *Eur. J. Appl.*", *Microbiol Biotechnol*, 11, 183-188.
- Zaoyan, Y., Ke, S., Guangling, S., Fan, Y., Jinshan, D., Huanian, M., 1992. "Anaerobic – Aerobic Treatment of a Dye Wastewater by Combination of RBC With Activated Sludge", *Water Sci. Technol.*, 26(9-11): 2093-96
- Zhang, F., Knapp, J.S., Tapley, K.N., 1999. "Decolourisation of Cotton Bleaching Effluent with Wood Rotting Fungus", *Water Resources*, 33: 919-928.