BAZI ŞAPKALI MAKROFUNGUSLARIN *In vitro* METAL TOLERANSLARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Fatma GÖNEN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2005

INVESTIGATION ON METAL TOLERANCE OF SOME MACROFUNGI *In vitro*

Fatma GÖNEN

Thesis of Master
Department of Biology

September 2005

BAZI ŞAPKALI MAKROFUNGUSLARIN *In vitro* METAL TOLERANSLARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Fatma GÖNEN

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

Danışman:
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Eskişehir
Eylül 2005

Fatma GÖNEN'İN YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Bazı şapkalı makro fungusların ağır metal toleransı üzerine çalışmalar" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

.. / .. / ....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

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

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, *Clavariadelphus truncatus, Tricholoma auratum, Ganoderma carnosum, Lenzites betulina, Polyporus arcularius, Rhizopogon roseolus, Lepista nuda, Trametes hirsuta, Ganoderma sp* makrofunguslarının katı ve sıvı ortamlarda çinkoya karşı toleransları ve biyosorpsiyon kapasiteleri araştırılmıştır.

Katı ortamda misel kuru ağırlığına göre en yüksek çinko konsantrasyonunda (225 ppm Zn) *C. truncatus* %88 ve *T. auratum* %47 oranlarında tolerans göstermiştir. Sıvı ortamda en yüksek çinko konsantrasyonunda (150 ppm Zn) *C. truncatus* %84,5, *T. hirsuta* % 46, *T. auratum* %31,15 ve *G. carnosum* %11,04 oranlarında toleranslı oldukları bulunmuştur. Çinko içeren sıvı ortamda *G. carnosum* izolatının büyüyen miselleri ile biyosorpsiyon kapasitesi (150 ppm Zn) 138 mg/g $_{\text{kuru ağırlık}}$ olarak belirlenmiştir.

Kuru ve yaş misellerle 100 ppm çinko konsantrasyonunda yapılan biyosorpsiyon tarama çalışmasında *G. carnosum* izolatına ait kuru misellerin Q_{max} değeri 38,04 mg/g $_{\text{kuru ağırlık}}$ ve yaş miseller için Q_{max} 33,3 mg/g $_{\text{kuru ağırlık}}$ olarak tayin edilmiştir.

G. carnosum'un farklı hücre tipleri ile biyosorpsiyon denemelerinde dinlenen hücrelerin 12.saatte Q_{max} değeri 31 mg/g $_{\text{kuru ağırlık}}$ tayin edilmiştir. Gerçekleştirilen tolerans ve biyosorpsiyon tarama çalışmaları neticesinde *G. carnosum* izolatının en yüksek konsantrasyonunda sıvı ortamda büyüyen miselleri en iyi (138 mg/g $_{\text{kuru ağırlık}}$) sonucu vermiştir. Deneyler 27 ºC, 150 rpm ve farklı çinko konsantrasyonlarında yapılmıştır.

ABSTRACT

In this work, the tolerance of *Clavariadelphus truncatus, Tricholoma auratum, Ganoderma carnosum, Lenzites betulina, Polyporus arcularius, Rhizopogon roseolus, Lepista nuda, Trametes hirsuta, Ganoderma sp,* to the zinc in solid and liquid media, and the biosorption capacity of mentioned macrofungi have been researched.

In solid media, according to the dry weight,in the highest zinc concentration (225 ppm Zn), *C. truncatus* have tolerated with a percent of %88 and *T. auratum* with a percent of %47. In liquid media, in the highest zinc concentration (150 ppm), it has been found that *C. truncatus* was tolerant wite a ratio of % 84,5, *T. hirsuta* % 46, *T. auratum* %31,15 and *G. carnosum* %11,04. In a liquid media including zinc the growing mycelia of *G. carnosum* and the capacity of biosorption were defined as (150 ppm Zn) 138 mg/g dry weight.

In a work of biosorption screening, made in 100 ppm zinc concentration wite dry and wet mycelia, the Qmax value of dry mycelia belonging to *G. carnosum* isolate was found as 38,04 mg/g dry weight and for wet mycelia Qmax 33,3 mg/g dry weight.

The Qmax value of different cell types of *G. carnosum* and the resting cells of biosorption experiments in the 12 th hour has been 31 mg/g dry weight.

As a result of biosorption and tolerance screening, the growing mycelia in liquid media with the highest concentration of *G. carnosum* has shown the best results (138 mg/g dry weight). The experiments were performed in 27 °C, 150 rpm and different zinc concentration.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince konu seçimi ve çalışmanın yürütülmesinde değerli görüş ve bilgilerinden istifade ettiğim ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımdaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Ahmet ÇABUK ve Arş. Gör. Sevil PLATİN' e çok teşekkür ederim. Tez çalışmamda gerektiğinde bana yardımcı olan Elif ŞAHİN, Fatma BİLGİLİ, Hasan KÖSTEKÇİ ve Gül ERGİNBAŞ' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında benden maddi ve manevi katkı ve desteklerini hiç esirgemeyen, bitmek bilmeyen sabrından dolayı kıymetli eşim Sayın Süleyman GÖNEN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim-öğretim ve hayatımın her döneminde göstermiş oldukları maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Ağır Metal Olarak Çinko	2
1.2.1. Kimyasal Özellikleri	2
1.2.2. Çinkonun Üretimi ve Kullanım Alanları	2
1.2.3. Canlılar ve Çinko	3
1.2.3.1. İnsanlarda Çinkonun Fizyolojik Etkileri	3
1.2.3.2. Çinkonun Bitkiler Üzerindeki Fizyolojik Etkileri	3
1.2.3.3. Toksik Etkileri	4
1.3. Ağır Metallerin Biyolojik Yolla Giderimi	6
1.3.1. Çözeltilerden Ağır Metallerin Biyosorpsiyonu	6
1.3.2. Biyosorpsiyon Uygulamalarının Avantajları	8
1.4. Makrofunguslarla Ağır Metallerin Etkileşimi	9
1.5. Biyogöstergeler Olarak Makrofungusların Kullanımı	11
1.6. Mikorizal Mantarlar ve Metal Toleransları	12
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Makrofungus Türleri	15
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	16
2.1.2.1. Besiyerleri	16
2.1.2.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	17
2.2. Metodlar	18
2.2.1. Makrofungus İzolatlarının Elde Edilmesi	18
2.2.1.1. Makrofunguslardan Misel Eldesi	18
2.2.1.2. Misel Formlarının Saklanması	18
2.2.2. Makrofungusların *In vitro* Koşullarda Metal Toleranslarının Belirlenmesi	18
2.2.2.1. Katı Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi	18

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa No

2.2.2.2. Glikoz-Pepton Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi 19
2.2.2.3. Tolerans İndeksinin Hesaplanması 20
2.2.3. Makrofunguslar Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi 20
2.2.3.1. Kuru ve Yaş Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemeleri 20
2.2.3.2. *Ganoderma carnosum'* a Ait Farklı Hücre Tiplerinin Çalkalamalı Ortamda Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması 21
2.2.3.2.1. *Ganoderma carnosum'a* Ait Büyüme Eğrisi 21
2.2.3.2.2. Canlı, Ölü, Dinlenen, EPS, Alginat ve Agarla İmmobilize Hücrelerin Pellet Formlarının Elde Edilmesi 21
2.2.3.2.3. Canlı Hücreler ile Biyosorpsiyon Denemeleri 22
2.2.3.2.4. Ölü Hücreler ile Biyosorpsiyon Denemeleri 22
2.2.3.2.5. Dinlenen Hücreler ile Biyosorpsiyon Denemeleri 23
2.2.3.2.6. İmmobilize Hücreler ile Biyosorpsiyon Denemeleri 23
2.2.3.2.6.1. Ca-alginat ile İmmobilize Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemesi 23
2.2.3.2.6.2. Agar ile İmmobilize Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemesi 24
2.2.3.2.7. Eksopolisakkarit EPS ile Biyosorpsiyon Denemeleri 24
2.2.3.2.8. Öğütülmüş Mantarla Biyosorpsiyon Denemeleri 25
2.2.4. Analitik İşlemler 26
3. BULGULAR 27
3.1. Makrofungusların *In vitro* Koşullarda Metal Toleranslarının Belirlenmesi 27
3.1.1. Katı Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi 27
3.1.1.1. Misel Kuru Ağırlığına Göre Tolerans 29
3.1.1.2. Koloni Çapına Göre Tolerans 30
3.1.2. Glikoz-Pepton Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi 31
3.2. Makrofunguslar ile Biyosorpsiyon Denemeleri 33
3.2.1. Çalkalamalı Kültürde Yaş ve Kuru Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemeleri 33
3.2.3. *Ganoderma carnosum'* a Ait Farklı Hücre Tiplerinin Çalkalamalı Ortamda Biyosorpsiyon Açısından Karşılaştırılması 34
3.2.3.1. *Ganoderma carnosum' a* Ait Büyüme Eğrisi Sonuçları 34
3.2.3.2. Farklı Hücre Tiplerinin Biyosorpsiyon Denemeleri 36
4. TARTIŞMA ve SONUÇ 43
5. KAYNAKÇA 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1. Çalışmada kullanılan makrofunguslar ve yayılımları	15
Çizelge 2. Katı besiyerinde çinko tolerans sonuçları	28
Çizelge 3. Katı ortamda misel kuru ağırlığına göre çinko tolerans indeksi değerleri	29
Çizelge 4. Katı ortamda misel çapına göre çinko tolerans indeksi değerleri	30
Çizelge 5. Sıvı ortamda çinko toleransı denemeleri sonuçları	31
Çizelge 6. Sıvı ortamda çinko tolerans indeksi değerleri	32
Çizelge 7. Kuru ve yaş hücrelerin Qmax değerleri	33
Çizelge 8. Sıvı ortamda büyüyen misellerle çinko biyosorpsiyonu Qmax sonuçları	34
Çizelge 9. Büyüme Eğrisi Misel Kuru Ağırlıkları (g)	35
Çizelge 10. Farklı hücre tiplerine ait biyosorpsiyon sonunda ortamda kalan çinko miktarları	37
Çizelge 11. Farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon çalışması Qmax değerleri	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. *Ganoderma carnosum'a* ait büyüme eğrisi grafiği 35
Şekil 2. Agar kontrol ve agarla immobilize *G. carnoum'un* biyosorpsiyon grafiği 39
Şekil 3. Alginat kontrol ve alginatla immobilize *G. carnoum'un* biyosorpsiyon grafiği 40
Şekil 4. Pozitif kontrol olarak kullanılan aktif karbon ve kile ait biyosorpsiyon grafiği 41
Şekil 5. Canlı, ölü ve dinlenen hücreler, eksopolisakkarit ve öğütülmüş mantara ait biyosorpsiyon grafiği 42

1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Çağımız, dünya tarihindeki en hızlı gelişme ve değişme dönemini yaşamaktadır. Hızlı endüstrileşmeyle birlikte çevrenin kirlenmesi ve bunun ortaya çıkaracağı tehlikeler yüzyılımızın sonlarına doğru anlaşılabilmiştir. Çevre, insanı ve diğer canlıları doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal etmenlerin tümüdür. Yirminci yüzyılın sonlarına doğru teknolojik ilerleme sonunda insanların yaşadıkları ortamda havanın, suyun ve toprağın kirlenerek, sağlığa zararlı bir hal alması çevre kirlenmesi olarak adlandırılır. Çevre kirlenmesi bütün dünya üzerinde önemle durulan sorunlardan biridir. Bu nedenle araştırıcılar çevre kirlenmesine yol açan unsurları ve bu unsurların kaynaklarını tespit etmeye, diğer yandan sorunu çözümleyici tedbirleri ortaya koymaya yönelmişlerdir (Dedeoğlu, 2000).

Çağımızda endüstriyel atık sular, kentsel atıkların ve kanalizasyon sularının yanında, yüzey sularını kirleten, önemli kaynaklar haline gelmiştir. Zehirleyici özelliklerine rağmen taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle, ağır metaller, endüstride geniş ölçüde kullanılmakta ve endüstriyel atıklardan belli miktarlar besin zincirine girmektedir (Sağ et al., 1995)

Ağır metallerin çevreye yayınımında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Havaya atılan ağır metaller, hayvan ve insanlar tarafından havadan aeresol olarak veya toz halinde solunurlar (Tuna, 2001).

Ağır metaller üst toprakta kuvvetle tutunduklarından alt toprağa doğru hareketleri zayıftır. Ancak toprak asitleşmeye başlarsa üst topraktaki ağır metaller serbest kalarak taban sularına kadar ulaşabilir. Böylelikle ağır metaller insanlar tarafından içme suyundan ve de bitki bünyesinden besin zinciri yoluyla alınabilirler. Ayrıca ağır metallerin toprak suyunda yoğun bir şekilde bulunması bitkiler için öldürücü etki yapar (Tuna, 2001).

1.2. Ağır Metal Olarak Çinko

1.2.1. Kimyasal Özellikleri

Ağır metal olarak çinkonun kimyasal sembolü Zn, atom ağırlığı 65,39, atom numarası 30'dur. Çinko ilk olarak M.Ö. 2000 yıllarında Çinliler ve Romalılar tarafından alaşım materyali olarak, pirinç yapımında kullanılmıştır. Bilinen en eski çinko arkeolojik kalıntı Romanya Trasilvanya'da Doroseh şehrindeki prehistorik Dacian yerleşim merkezinde bulunmuştur (Anonim, 2005 a). Çinko kayalarda, doğal silikatlarda ve oksit, sülfit, karbonat veya fosfat gibi maden cevherinde bulunur. Litosferin çinko içeriği 800 ppm dir. Toprakların eser içeriği 10-300 ppm arasında değişir, bunun yaklaşık onda biri bitkilerde mevcuttur (Tuna, 2001).

1.2.2. Çinkonun Üretimi ve Kullanım Alanları

Günümüzde çinko; alüminyum ve bakırdan sonra Dünya'da miktar olarak yıllık tüketimi en fazla olan metaldir. Kimyasal yönden aktif olması ve diğer metallerle kolayca alaşım yapabilmesi nedeniyle çinko, endüstride birçok alaşımın ve bileşiğin üretiminde kullanılmaktadır. Kuvvetli elektropozitif özelliğinden dolayı diğer metallerin özellikle demir-çelik ürünlerinin aşınmaya karşı korunmasında kullanılmaktadır. Üretilen çinko metalinin ana ürün olarak tüketildiği belli başlı beş alan bulunmaktadır. Bunlar; galvenizleme, pres-döküm alaşımları, pirinç ve bronz alaşımları, çinkooksit ve haddelenmiş çinko alaşımlarıdır. Ekotoksik etkileri nedeniyle çinko, bazı alanlarda sınırlı tüketilmektedir (Anonim, 2005 a).

Otomotiv, elektrik ve donanım endüstrilerinde kullanılan döküm kalıplarının yapımında da çinko yer alır. Çinko oksit; boya, yazıcı mürekkepleri, sabun, tekstil ürünleri, elektronik aletler, kauçuk yan ürünleri, yer kaplamaları, plastik ve kozmetik ürünler gibi günlük yaşamımızın çeşitli tamamlayıcılarında karşımıza çıkmaktadır. Çinko sülfit floresan özelliğe sahiptir ve parlak kadranların, floresan lambaların, X-ışını ve televizyon ekranlarının yapımında kullanılır (Anonim, 2005 b). Özellikle uzay

sanayi ve robotların geliştirilmesinde, otomatik kontrol sistemlerinde kullanım sahası genişlemektedir (Anonim, 2005 a).

1.2.3. Canlılar ve Çinko

1.2.3.1. İnsanlarda Çinkonun Fizyolojik Etkileri

İnsan bedeninde toplam olarak 2–2,5 mg bulunur. Demirden sonra yoğunluğu en fazla olan ikinci madde çinko, büyümenin normal olmasını, yaraların iyileşmesini sağlar. Vücuttaki pek çok fonksiyonda görev alan çinko, vücuttaki her hücrede bulunur. RNA ve DNA oluşumu ve proteinlerin enerjiye dönüştürülmesi için çok önemlidir. Özellikle kalp, beyin ve üreme sistemi çinkoya ihtiyaç duyar. Zihinsel fonksiyonlarda, vücudun kendi kendini iyileştirmesi ve yenilemesi gereken durumlarda, kanın stabilizasyonunda, vücuttaki alkali dengesinin korunmasında önemli roller üstlenir. A vitamini fonksiyonlarında etkilidir. Deri sağlığına yararlıdır. Deri hücrelerinin üremesine, yağ bezlerinin çalışmasına ve kollajen dokuya etki eder. Böylelikle hem cildin sağlığının korunmasına hem de yanık gibi nedenlerle oluşan hasarların tamir edilmesine yardımcı olur. Prostat bezi, göz, dalak ve kas dokularına olumlu etkisi vardır. Enerji üretiminde ve fosforun kemiğe tutunmasında etkilidir. Kemik ve dişlerin yapısında rol alır. Antioksidan özelliği ile hem hücreleri serbest radikallerden korur, hem de hücre zarı ve fonksiyonlarına yardım eder. Bağışıklık sistemine oldukça büyük destek verir. Aşıların etkilerini göstermesinde yardımcıdır (Anonim, 2005 c).

1.2.3.2. Çinkonun Bitkiler Üzerindeki Fizyolojik Etkileri

Bitkiler çinkoyu kökleri ve püskürtüldüğü takdirde yaprakları aracılığıyla Zn^{+2} iyonları halinde alırlar. Toprak çözeltisindeki bağımsız Zn^{+2} ve toprak kompleksine bağlı Zn^{+2} iyonları yarayışlı çinkoyu oluşturur. Bitkilerin Zn gereksinimleri oldukça azdır. Çinkonun bitkiler üzerine olan etkileri bugün için tam olarak bilinmemektedir. Fakat çinkonun bitki gelişiminde olumlu etki yapan bazı enzimler ve bitkisel

metabolizmada yürüyen bazı reaksiyonlar için mutlaka gerekli olduğu bilinmektedir. Çinko eksikliği belirtileri gösteren bitkilerde, inorganik fosfor ve suda çözünebilir azotlu bileşik miktarlarının arttığı araştırmalar sonucu saptanmıştır. Çinko kök gelişmesi ve bitkilerin su alımları üzerinde de olumlu etki yapmaktadır. Birkaç ppm bitkilerin büyümesi için gereklidir. Çinko eksikliği genellikle zararlıdır, fakat çinko bakımından zengin topraklarda yetiştirilen bitkilerde ise toksik etkilerden söz edilebilir (Tuna, 2001).

1.2.3.3. Toksik Etkileri

Çinko çevrede hava, toprak, su ve tüm gıdalarda vardır. Doğal süreçlerle çevreye yayılır. Ayrıca maden çıkarılması, işlenmesi ve çinko üretimiyle hava, su ve toprağa karışır. Çinkonun havaya karışması çelik üretimi, kömür ya da atık maddelerin yakılması ile de olur. Yüzey sularına karışması, metal üretimi ve kimyasal sanayi atıklarının ev atık sularına boşaltılması ile olur. Ayrıca yüzey sularındaki çinkonun varlığı, yüksek çinkolu topraklara sağnak yağmurların düşmesiyle de olabilmektedir. Bu şekilde doğal olarak meydana geldiği gibi insanların uygulamaları sonucunda da olabilir. Çünkü çinko bileşenleri zirai topraklarda kullanılan gübrelerde de bulunmaktadır. Çinkonun havadaki ortalama konsantrasyonu 1 m^3 te 1 µg dan daha azdır. Sanayi alanlarında bu miktar 5 µg olarak ölçülmüştür. Yüzey sularında çinkonun ortalama konsantrasyonu 0,02-0,05 mg/L arasında; içme sularında ise 0,01-0,1 mg/L dir. Çinko genellikle toprak partiküllerine bağlı olarak daha üst tabakalarda kalır ve toprağın özelliklerine bağlı olarak yer altı sularına da süzülür (Anonymus, 2005 d).

Bakır ve çinko omurgalı hayvanlarda kemik oluşumu, kalbin çalışması, hücreler arası bağışıklık ve bağ dokusu gelişiminde işlev yapmaları nedeniyle diğer ağır metallere oranla organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için eser miktarda ihtiyaç duydukları metallerdir. Ancak ortamdaki derişimlerinin artması durumunda organizmalara toksik etki yapar. Çinko, bakır ve çinko-bakır karışımında *Tilapia nilotica'nın* dalak, beyin ve kas dokularındaki metal birikimi belirlenmiştir. Üç seri olarak planlanan deneylerde balıklar birinci seride bakırın 0,1, 0,5 ve 1 ppm; ikinci

seride çinkonun 1, 5 ve 10 ppm ve üçüncü seride bakır-çinko karışımlarının 0,1 + 0,1, 0,5 + 5 ve 1 + 10 ppm derişimlerinin etkisine 30 ve 60 gün sürelerle bırakılmışlardır. Deneylerde en yüksek metal derişimlerinde mortalite gözlenmemiştir. Belirlenen sürelerde en yüksek bakır ve çinko birikimleri dalakta olurken, bu iki metalin en düşük birikimleri ise beyinde olmuştur. Dokularda bir metalin birikimi diğer metalin varlığında azalmıştır (Karakoç ve Kargın, 1997).

Bir başka çalışmada deniz omurgasızlarından *Idotea baltica* (*Crustacea, Isopda*) kullanılarak çinko, bakır ve kurşunun akut toksisitesi statik biyolojik deneylerle ölçülmüş ve hem erkek hem dişi bireyler için öldürücü zaman (LT50) hesaplanmıştır. Hayatta kalma süreçleri çinko, bakır ve kurşun konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Çinko, bakır ve kurşundan daha toksik bulunmuştur. Denenen bu metallerden en az toksik olanı ise kurşun olarak bulunmuştur (Bat ve arkadaşları,1999).

Çinkonun ratlarda canlı ağırlık ve bazı serum enzimleri (ALT, AST, ALP) üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da 0 ve 100 ppm de AST dışındaki enzimlerde artış gözlenmezken, 500 ppm den 2000 ppm e kadar ki konsantrasyonlarda ratların enzim düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir. Bu artışlar oral yolla yüksek dozlarda alınan çinkonun ratlar için toksik olduğunu göstermiştir (Tekeli ve arkadaşları, 2002).

Tatlı su amfipodlarından *Gammarus pulex pulex* (L.,1758) lerde çinko, bakır ve kurşun toksisitesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. *Gammarus pulex pulex* türleri için bakır, çinko ve kurşun LC_{50} değerleri sırasıyla 0,028-0,080, 5,2-12,1 ve 11,2-23,2 mg/L arasında bulunmuştur. Bu türler için en toksik metal bakır olmuş ve bunu çinko daha sonra da kurşun izlemiştir (Bat ve arkadaşları, 2000).

Bitkilerde çinko toksisitesinden kaynaklanan kök tip hücrelerinin çekirdeğinde büyük değişiklikler gözelenmiştir. Kromatin matreyal çok yoğunlaşır, kortikal hücrelerin bazılarında aksaklıklar görülür. Ayrıca 7,5mM çinko varlığında nüklear membranda dilatasyon tespit edilmiştir. Sıtoplazmada da yapısal değişiklikler gözlenmiştir; vakuollerin gelişimi, hücre organellerinin parçalanması gibi (Rout and Das, 2002) .

Yapılan başka bir çalışmada yüksek sıcaklıklarda *Eisenia fetida'*ya çinkonun toksik etkisinin de arttığı bulunmuştur (Spurgeon et al.,1997).

Ağır metallerin toksisitesi pH, çözünmüş oksijen, sıcaklık, balığın büyüklüğüne oranla çözeltinin hacmi, çözeltinin yenilenme frekansı, çözeltideki diğer maddeler ve sinerjetik etki gibi faktörlere bağlıdır (Mutluay ve Demirak, 1996).

İki ağır metal ya da bir ağır metalle başka bir madde arasındaki sinerjik etkiye gelince örneğin bakır-çinko kombinasyonları bazen tek başına çinko veya bakırdan daha zehirlidir (Mutluay ve Demirak, 1996).

İnsanlar çinkoyu su ve yiyecekler yoluyla vücutlarına alırlar. Ayrıca çinko tozu ile kontamine hava yoluyla ciğerlerimize çinko girişi olur. Havadaki çinko maden eritme, çok az da kaynak vasıtası ile gerçekleşir. Deri yoluyla alınan çinko miktarı çok azdır (Anonymus, 2005 d).

İnsanlarda çinko bileşikleriyle ağız yolundan zehirlenmelere sık rastlanmaz. Daha çok endüstride çinko oksit buharlarının solunmasıyla, başlangıçta öksürük, ateş, bulantı, kolinerjik tipte etkiler ve genel bir bitkinlik tablosuyla karakterize belirtiler göze çarpar. Ayrıca, çinko sülfat toz ve buharlarıyla da akut zehirlenmelere rastalanılır. Çocuklarda ve bazen yetişkinlerde sindirim ve solunum yolu irritasyonları, ateş, dispne, bronkospazm, pnömoni ve kollaps gibi belirtilere neden olabilirler (Dökmeci, 1994).

1.3. Ağır Metallerin Biyolojik Yolla Giderimi

1.3.1. Çözeltilerden Ağır Metallerin Biosorpsiyonu

Belediye atık suları ve endüstriyel atık sularından metallerin biosorbsiyonu için mikrobiyal biyomasın kullanımı geleneksel ağır metal yönetimi stratejilerine karşı alternatif bir öneri olarak sunulmuştur. Brady ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalara göre (1994), metal sorbsiyonunun mekanizması ve mikroorganizmalar tarafından alımı hala tamamen anlaşılamamıştır; polisakkaritler ve diğer moleküllerle sorbsiyon hücre duvarının dış tabakasında meydana gelir. Kimyasal deneylerle hücre duvarı yapısı değiştirilir, çeşitli fonksiyonel gruplar, katyon bağlayıcılarda katılabilir. Beyaz çürükçül basidiomisetler biyosorbsiyon için önerilen bir materyaldir ayrıca çeşitli subtratlarda yüksek verimde kolaylıkla kültüre edilebilir. Çalkalamalı batık

kültürasyonla pelletler şeklinde gelişir, iyi mekanik özelliklere ve yüksek yüzey hacim oranına sahiptirler. Hücre duvarları diğer mantarlarla aynı şekilde, çoğunlukla polisakkaritler, peptitler ve pigmentlerden oluşur, ağır metal bağlayıcılığı için iyi bir kapasiteye sahiptirler (Baldrian, 2003).

Beyaz çürükçül mantarların çözeltilerden ağır metalleri absorblama yetenekleri üzerine çalışmalar son on yılda artmıştır. Yetis ve arkadaşları (2000), fungal hücre duvarı ağır metallerin sorbsiyonunda anahtar bir role sahiptir. Beyaz çürükçüllerin miselleriyle ağır metal adsorbsiyonu Langmiur adsorbsiyon isotermine uygundur. Kinetik bakış açısıyla biyosorpsiyon, iki aşamalı bir prosestir, hızlı bir yüzey adsorbsiyonu (30 dk-1sa) ve yavaş intraselüler diffüzyon (2-3sa) 6 saatte dengeye ulaşabilir. Matheickal ve arkadaşları (1997); Çeribaşı ve arkadaşlarına (2001) göre interaksiyonun ilk dakikalarında, protonların serbest kalmasıyla pH azalır. Mashitah'a (1999) göre iyon değişim mekanizması metal bağlamada önemli bir rol oynar. *P.sanguineus* miselleriyle Pb sorbsiyonunda misellerden Ca'un serbest kalmasıyla iyon değişimi gerçekleşir (Baldrian, 2003). Fiziksel adsorpsiyon veya iyon değişimi canlı veya cansız hücre yüzeyinde çok hızlı ve kısa sürede meydana gelir, akümülasyon ise metabolik aktiviteye göre yavaş ve canlı hücrelerde meydana gelir (İlhan et al., 2004).

Nakajima ve arkadaşları (1993); Arica ve arkadaşları (2001); Zulfadhly ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmalara göre metal bağlayıcı yapıların iyon değişim mekanizması pH değerindeki değişimlerle muhtemelen sorpsiyon/desorpsiyon döngüsünde tekrarlanır (Baldrian, 2003).

Canlı fungal hiflerin bakır adsorpsiyon kapasitesi üzerinde organik çözücüler küçük, pozitif bir etki göstermiştir. Fungal miselyum üzerinde bakır adsorpsiyonu, sudan bakır katyonunun devamlı alınması ve uzaklaştırılması için fungal miselyuma özgü bir özellik olan pH kontrolüyle kolaylıkla tekrar edilebilmiştir (Sing, C., and Yu, J., 1998).

Gabriel ve arkadaşlarının (2001) çalışmalarına göre hücre duvarının sorpsiyon kapasitesi miselyumdan daha yüksektir. Yetiş ve arkadaşları (2000); Cihangir ve arkadaşlarına (1999) göre metal bağlama kapasitesi, misel yaşına ve Gabriel ve arkadaşlarına (2001) görede kültür ortamının kompozisyonuna bağlıdır. Bu olgular belkide hücre duvarı kompozisyonunda değişimlere neden olabilirler. Metal bağlamada

miselin fiziksel ve kimyasal işlemlere tutulmasıda etkili olabilir. Bu süreçler alkali veya asit muameleleri veya miselin kurutulması süreçlerini içerir (Baldrian, 2003).

Veglio ve Beolchini'ye göre (1997) ağır metal iyonlarının biyolojik özümsenmesi üzerine etki eden birçok faktör vardır; pH, adsorpsiyon süresi, iyonik güç, biyomas konsantrasyonu, sıcaklık, farklı konsantrasyonlarda metal çözeltileri. Bu faktörlerin çeşitliliği gerçek atık sularda onların biyolojik özümseme performanslarının etkinliğinin incelenmesini gerekli kılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ve deneyler neticesinde anlaşılmıştır ki biyolojik özümseme süreci oldukça komplekstir ve metallerin uzaklaştırılması mekanizmalarının test edilmesini gerektirmektedir (Yalçınkaya et al., 2002) .

Toprağın tam oalarak temizlenmesinin yerine ağır metallerle kontamine olmuş tarım topraklarında uygun, çok teknik olmayan ve ekonomik bir proses olarak kadmiyumun topraktan ürünlere transferinin kontrolü güvenilir bir yöntem olabilir (Lebeau et al., 2002).

Metal akümülasyonu biyoprosesleri genellikle iki gruba ayrılır, cansız biyomas tarafından biyosorptif alım ve canlı hücrelerle biyoakümülasyon. Ağır metal giderimi için yeni atık su biyoremediyasyon tekniklerinde canlı mikrobiyal hücrelerle biyoakümülasyondan ziyade cansız biyomas kullanılarak biyosorptif mekanizmalar üzerine odaklanmıştır. Biyogiderimde yetişen kültür kullanmanın birçok avantajı vardır. Ayrı bir biyomas üretim sürecini önler, kullanım öncesi kültürasyon, hasat, kurutma, işleme ve depolama işlemleri gibi. Canlı hücreleri çeren sistemin kullanılmasında biyolojik arıtımın etkisini, çözeltilerdeki ağır metallerin potansiyel toksisitesi, taşımaları sınırlar. Bununla birlikte pek çok geleneksel atık su işleme sürecinin canlı mikroorganizmalarla yapılması bu sınırlamaların onların uygulamalarını engellemeyeceğini gösteriyor (Dursun et al., 2003).

1.3.2. Biyosorpsiyon Uygulamalarının Avantajları

Kapoor ve arkadaşları (1995) göre biyosorbentlerin maliyeti çok düşüktür. Endüstriyel iyon değişim reçineleri aynı miktarda biyosorbente göre çok daha pahalıdır. Yin ve arkadaşları (1999) göre üretimin maliyeti, ucuz substratların kullanımı ile daha

da azaltılabilir. Andres'e (1995) göre sistem, etkili geniş bir sıcaklık ve pH aralığında iyileştirilebilir. Metaller funguslar tarafından önem sırasına göre seçilerek alınır (Baldrian and Gabriel, 1997). Besin ve endüstriyel fermantasyon süreçleri fungal biyomasın sürekli ve ucuz bir şekilde elde edilmesini sağlar, büyüme ortamı ve katkısız fermantasyon teknikleri kullanılarak kolaylıkla kültüre edilebilirler (Sağlam et al., 1999).

Grau ve arkadaşları (1995); Denizli ve arkadaşları (1999) göre ağır metallerin giderimi için kullanılan yöntemler kimyasal çökelme ve iyon değişimini içermektedir. Bu yöntemler özellikle ağır metal iyon konsantrasyonu 1-100 mg/l düzeyinde ise verimsiz veya pahalı olmaktadır (Say et al., 2001).

Bu nedenler hiç kalıntı bırakmayan yeni ekonomik politikalar geliştirilmesinde etkili olmuştur. Özellikle yiyeceklerden, atık su rehabilitesi ve farmokolojiden elde edilen biyomassların tekrar kullanım imkanlarının bulunması açısından bakıldığında iyi bir politika olduğu söylenebilir. Biyosorpsiyonun diğer bir avantajı alkalin ve yeralkalini metalleri gibi diğer iyon karışımlarının bulunduğu ağır metallerde bile biyomasların gösterdiği üstün ayrıştırma kabiliyetleridir. Buna ilaveten yeni teknolojilerin geliştirilmesi durumunda da biyomasların bu yeni teknolojilere adaptesi kolay olmakta ve onlarda da kullanımı sağlanmaktadır (Yalçınkaya et al ., 2002).

1.4. Makrofunguslarla Ağır Metallerin Etkileşimi

Beyaz çürükçül mantarların lignin degredasyonu karakteristik tek özelliğidir. Buna ilaveten yapısal olarak benzer organik bileşikleri parçalayabilirler (Baldrian et al., 2000). Bu mantarların fizyolojik, ekolojik ve biyoteknolojik özellikleri çalışılmıştır. Beyaz çürükçül mantarların üzerinde ağır metallerin fizyolojik etkileri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Sadece son zamanlarda beyaz çürükçül mantarların meydana getirdiği biyoteknolojik süreçte ağır metallerin etkisiyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Baldrian, 2003).

Hughes ve arkadaşlarının (1991) çalışmalarına göre mantar metabolizması için bazı ağır metaller gereklidir. Ancak diğerlerinin de biyolojik rolleri olduğu

bilinmektedir. Hem esansiyel hem de esansiyel olmayan ağır metaller aşırı derecede bulunursa mantarlar için toksik etki yapar (Baldrian, 2003).

Gadd'a (1993) göre mantar gelişimi için esansiyel metaller Cu, Fe, Mn, Mo, Zn ve Ni; esansiyel olmayan metallerde Cr, Cd, Pb, Hg, Ag tür (Baldrian, 2003).

Hagemeyer ve arkadaşlarına (1975) göre mantarlar gerekli iz metal iyonlarını çeşitli kaynaklardan ayırabilme kabiliyetine sahip olmalılar. Bu kaynaklarda metaller iz miktarlardan toksik seviyeye kadar çeşitli konsantrasyonlarda bulunabilirler. Ağır metal iyonlarının kendi ana kaynaklarında konsantrasyonları genellikle düşüktür. Koeleman'a (1999) göre beyaz çürükçül mantarlar sıklıkla toprakta gelişim sırasında metal iyonlarının toksik seviyeleriyle başa çıkmak zorundadır. Topraktaki ağır metal iyonlarının konsantrasyonu genellikle odundan daha yüksek ve konsantrasyon büyük ölçüde belirli alanlardaki sanayi kirlenmesinin sonucu olarak değerlendirilebilir. Otobanlar, gaz istasyonları, yakılan bitkiler ve diğer sanayi tesisleri yakınında ağır metal iyonlarıyla toprak kontaminasyonu yüksek düzeydedir. Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAHs) varlığı da kirliliğe eşlik eder. Giersig ve arkadaşları (1995) böyle yerlerde organik kirleticilerin beyaz çürükçül mantarlarla degredasyonunun önemli bir problem olduğunu bildirmektedir (Baldrian, 2003).

Lignolitik enzimlerin aktiviteleri üzerinde ağır metallerin etkileri, sıvı külütrde belirgin şekilde daha azdır. Çünkü toprak mikroflorasının aktivitesinde metallerin etkisi nispeten düşüktür, biyodegredasyon sürecine etkisi çoğunlukla sınırlıdır (Baldrian et al., 2000).

Favero ve arkadaşları (1991) göre çevrede var olan ağır metaller mantarın ekstraselüler enzimleriyle direk etkileşime girebilir. Ancak fizyolojik bir tepki oluşabilmesi için ağır metallerin funguslar tarafından alınması zorunludur. Sıvı çevreden alım sadece laboratuvar şartları altında değil su içeren substratların varlığında bile basit durumdur. Beyaz çürükçül mantarlar substrattan alınan metalleri kendi misellerinde kontrol edebilir. *Pleurotus astreatus* 150 ppm Cd içeren sıvı ortamda 20 mg/g Cd biriktirebilir. Biriken miktarın %20 si interselüler boşluktadır. Gabriel ve arkadaşları (1996) göre *Daedalea quercina'*nın gelişimi süresince equimolar metaller içeren ortamda akümüle edilen metal iyonlarının konsantrasyonları Zn>Cu>Pb>Al sırasında azalmıştır (Baldrian, 2003). *A. niger* miselleri ile kolonda biyosorpsiyon çalışmasında Qmax değerini 97,6 mg Zn/g misel olarak bulunmuştur (Luef et al., 1991).

Purkayastha ve arkadaşları (1992) göre sıvı ortamda ağır metal akümülasyonu deneylerinin mantarların kapasitesi ile ilgili faydalı bilgiler veriyor olmasına rağmen doğadaki ortamı tam manasıyla yansıtmaz. Örneğin *Volvariella volvacea'nın* sıvı kültüründe Pb ve Hg alımı daha düşük, Cu alımı önceliklidir (Baldrian, 2003).

Tyler ve ekibine (1982) göre beyaz çürükçül mantarlar Cd, Fe, Zn ve Cu'ı odunlardan alırlar ve karpoforda toplarlar, aynı zamanda Pb ve Mn'ı atarlar. Metal alımı ve atımı ile ilgili benzer sonuçlar çöp ayrıştırmasında ve ektomikorizal toprak mantarlarında da bulunur. Cuny'e (2001) göre ağır metallerin alımı pek çok beyaz çürükçül mantar türünün doğal substratı olan topraktan başlar (Baldrian, 2003).

1.5. Biyogöstergeler Olarak Makrofungusların Kullanımı

Baldrian ve Gabriel (1997); Gast ve arkadaşları (1988) göre beyaz çürükçül mantarlar bulundukları çevrede ağır metallerin akümülasyonu için iyi bir potansiyele sahiptirler. Odunda ağır metallerin çok düşük konsantrasyonları vardır (çinko dışında). Karpoforda ağır metaller için esas kaynak atmosferdir. Beyaz çürükçül mantarlar atmosfer kirliliğinin biyomonitörleridir (Baldrian, 2003). Beyaz çürükçül mantarlar toprakla direk bağlantı kurmazlar. Onlar ağır metalleri esasen kuru ve nemli atmosferik tortulardan alırlar (Čurdová et al., 2004).

Gast ve arkadaşları (1988); Seeger (1982); Tyler'a (1982) göre kadmiyum, civa ve bakır karpoforda akümüle olur, manganez ve çinkonun düzeyleri ilgili substrat ve karpoforda karşılaştırılabilir, kurşun ve demir konsantrasyonları ise karpoforda substrattan daha düşüktür (Kalač, P., and Svoboda, L., 2000).

1.6. Mikorizal Mantarlar ve Metal Toleransları

Mikoriza kelime anlamı olarak kök mantarı anlamına gelir. Mikoriza toprak kökenli mantarlarla yüksek bitkilerin kökleri arasında karşılıklı yararlanmaya dayanan bir ilişkidir. Doğadaki bitki topluluklarının %96'sından fazlasının kök yapıları mikoriza ile simbiyotik yaşam içindedirler. Karşılıklı bu simbiyotik yaşam gereği olarak bitki mikorizaya enerji kaynağı olarak karbon vermekte, buna karşılık mantar da bitkinin gereksinim duyduğu besin elementleri ve su alımını sağlamaktadır. Konukçul bitki mikoriza arasındaki simbiyotik ilişki ekosistemdeki besin döngüsü yanında, bitki topluluklarının canlılığının devamını sağlamaktadırlar (Ortaş ve arkadaşları, 1999).

Mikoriza hifleri çok ince yapısı ile köklerin giremediği ince porlara girerek su besin elementlerinden yararlanabilmektedirler. Bazı bitkiler için mikoriza mantarı mutlak gerekli olup yüksek düzeyde gübreleme uygulamalarına rağmen bitkiler yine de mikoriza infeksiyonlara gereksinim duyarlar (Ortaş ve arkadaşları, 1999).

Tolerans yüksek metal kontaminasyonlu çevrelerde büyüme için genetik adaptasyon olarak adlandırılabilir. Duyarlılık yabani tipteki populasyonlar içinde bulunan, metallere karşı cevaplarında çşitlilik olarak tanımlanabilir. Tolerans ve duyarlılık arasındaki fark kontamine bölgelerin ağaçlandırılmasında ektomikorizal mantarların potansiyel rolü anlaşıldığında önemli olabilir (Hartley et al., 1997b)

Colpaert ve Van Assche (1992, 1993); Brown ve Wilkins (1985); Denny ve Wilkins (1987 a,b); Jones ve Hutchinson'a (1998) göre konakçı bitki için diğer yararlarının yanında, mikorizal simbiyozis, fitobiyontun ağır metallere toleransını arttırabilmektedir (Vodnık et al., 1998).

Diğer yandan, ağır metalin toksik konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak mikobiyontun gelişiminin inhibisyonu bu iyileştirici etkinin yok olmasıyla sonuçlanabilir. Topraktaki artan ağır metal seviyelerine karşı tolerans fungal türler ve suşlar arasında farklılık arzetmektedir. Ağır metallerle kontamine topraklardan elde edilen ekotipler ağır metallere karşı, kontamine olmamış topraklardan elde edilen suşlara göre daha toleranslıdır (Vodnık et al., 1998). Godbold'a (1994) ve Innes'e (1993) göre asidifikasyon ve Al ile ağır metallerin toprakta artan konsantrayonlarının neden olduğu atmosferik kirlilik, orman ekosistemini tehdit eden en önemli etkenlerdendir. Toprak çözeltilerinde bu elementlerin toksik konsantrasyonları köklere

zarar vererek diğer mineral elementlerinin alımını etkiler ve fizyolojik prosesleri zayıflatır. Alüminyum özellikle hücre bölünmesini ve uzamasını, DNA sentezini ve apoplastta Ca değişimini engelleyerek etkisini gösterir. Ernst'e (1996) göre ağır metallerin fazlalığı biyolojik membran bütünlüğünü ve nitrat redüktaz gibi anahtar enzimlerin aktivitesini azaltır (Brunner and Frey, 2000).

Smith ve Read'e (1997) göre kuzey ya da ılıman bölgelerdeki çoğu odunlu bitkinin kökleri ektomikorizal funguslarla doğada mutualistik simbiyozis oluşturacak şekilde kolonize olmuştur. Bu organlar iki simbiyotik ortak arasında besinlerin depolandığı ve değişimin yapıldığı yerler olarak düşünülürler (Brunner and Frey, 2000). Ayrıca bunlar epidermal ve kortikal hücreler arasında interselüler harting ağı ve fungal manto oluştururlar. Turner (1994); Wilkinson ve Dickinson (1995); Leyval ve arkadaşları (1997) son çalışmalarında ektomikorizal funguslarla ağaç köklerindeki kolonizasyonun konakçıların topraktaki toksik konsantrasyonlardaki metal varlığında toleranslarını artırdığını göstermiştir (Brunner and Frey, 2000; Helmisaari et al., 1999).

Leyval ve arkadaşları (1997) göre ağır metallerce zengin yerlerde çözünebilir ağır metalleri çözünemez forma dönüştürme yeteneği fungal örtü tarafından sağlanan bir bariyer oluşumu ile sonuçlanabilir. Bu da konakçı bitkiye koruma sağlar (Turnau et al., 2001).

Wainwright ve Gadd'a (1997) göre orman ekosistemleri üzerinde antropojenik etkiler, asit ve nitrojen depoları, atmosferik CO_2 deki artışlar, metal veya organik maddelerle kirlenmesi gibi mikorizal kommünite yapısını çok fazla etkileyebilir ve mikorizal çeşitlilikte bir kayıp ortaya çıkabilir (Jentschke and Godbold, 2000).

Marx ve Artman'a (1979) göre ektomikorizalar üzerine yapılan ilk çalışmalarda *Pisoluthus tinctorius* ile konifer köklerine inokülasyonu fide yaşam süresini ve yüksek derecelerde metal ve aşırı asit içeren madenlerde büyümeyi çok fazla geliştirmiştir (Jentschke and Godbold, 2000).

Al, Fe, Cu, Zn, Ni, Cd, Cr, Pb ve Hg'ya karşı ektomikorizal mantaraların *in vitro* toleransı, metal kontaminasyonlu bölgelerdeki potansiyel ektomikorizal birlikler bu metallerin tayini için daha önemlidir (Tam,1995).

Birçok yayın ektomikorizalar tarafından metal zehirliliğinin azaltıldığını gösterdiğini iddia etmesine rağmen, sadece birkaç çalışma bu tür bir etki için direk kanıt sunmuştur. Bu çalışmalarda, ektomikorizal mantarın, Al (Cumming and Weinstein,

1990; Hentschel et al., 1993; Schier ve Mc Quattie, 1995, 1996), Ni (Jones and Huctchinson, 1986; 1988a), Zn (Brown and Wilkins, 1985) ve Cd (Jentschke et al., 1999) un toksik etkilerine bağlı olarak fidelerinin gelişiminin olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Diğer önemli ağır metaller için Hg ve Pb gibi, ektomikorizal mantarlar tarafından direk iyileştirme kanıtı bulunmamaktadır (Jentschke and Godbold, 1999).

Marschner'e (1991) göre kök büyümesindeki gerilemeye ek olarak Ca ve Mg'un azaltılmış alımı Al fitoksisitesi ile birlikte oluşan yaygın bir özelliktir. Alüminyum aynı zamanda P alımınıda engelleyebilir. Alüminyuma maruz kalma mikorizal *Pinus rigida* fidelerinde değil, mikorizal olmayanlarda P alımını azaltmıştır (Jentschke and Godbold, 2000).

Rizosfer pH'ı metal toksisitesinde önemli bir faktördür ve mikorizal iyileştirmenin verimliliğini etkileyebilir. Rizosfer pH'ı çok fazla N'a bağlıdır. Al toksisitesinin mikorizal iyileştirmesinde N kaynağının etkileri Cumming'in grubu tarafından araştırılmıştır. Al, NO_3^- verilmiş mikorizal olmayan *Pinus rigida* fidelerinin kök büyümesini engellerken, böyle bir etki NH_4^+ varken olmamıştır (Jentschke et al., 2000). Atık alanlardaki vegetasyon yetersizliğinin nedenlerinden birinin, bitkilerin üzerinde mikorizaların yetişmemesi olduğunu göstermiştir (Fay and Mitchell, 1999).

Toksik metallere ektomikorizal fungusların cevapları kirlenmiş alanların ıslahında, bitki gelişimi ve üretimi üzerine etkili olabilir. Farklı bitki-fungal kombinasyonları arasındaki cevaplarda geniş bir ayrılık olmasına rağmen, ektomikorizal funguslar tarafından metal fitotoksisitesinin azalışı geniş biçimde gösterilmiştir (Blaudez et al., 2000).

Çalışmamızda çeşitli makrofungus türlerinin ağır metal gideriminde kapasitelerinin ve pratikte kullanım imkanlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Eskişehir'in farlı bölgelerinden toplanan farklı beyaz çürükçül ve ektomikorizal mantar izolatlarının katı ve sıvı ortamlarda çinko toleransları ve biyosorpsiyon kapasitelerinin tespitine yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1.MATERYAL

2.1.1.Çalışmada Kullanılan Makrofungus Türleri

Çalışmada kullanılan makrofungus türleri, Eskişehir ilinin Türkmenbaba Dağı, Sarıcakaya ve Meşelik bölgelerinden toplanmıştır. Laboratuvarda uygun koşullarda saklanan makrofunguslar metal toleransı ve biyosorpsiyonu deneylerinde kullanılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan makrofunguslar ve yayılımları

Mantar Türü	**Kodu**	**Lokalite**	**Kaynak**
Rhizopogon roseolus	T-21	Türkmenbaba Dağı	Köstekci ,2004
Ganoderma sp	T-99	Türkmenbaba Dağı	Köstekci, 2004
Tricholoma auratum	T-174	Türkmenbaba Dağı	Köstekci, 2004
Clavariadephus truncatus	T-192	Türkmenbaba Dağı	Köstekci, 2004
Lepista nuda	T-373	Türkmenbaba Dağı	Köstekci, 2004
Polyporus arcularius	T-438	Türkmenbaba Dağı	Köstekci, 2004
Trametes hirsuta	T-587	Türkmenbaba Dağı	Köstekci ve ark., 2004
Ganoderma carnosum	M-88	Meşelik	Köstekci, 2004
Lenzites betulina	S-2	Sarıcakaya	Köstekci ve ark., 2004

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

2.1.2.1. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri, içeriği distile suda çözülüp otoklavda 121ºC sıcaklıkta, 15 dakika süreyle steril edilmiştir.

Besiyeri 1: MMN Besiyeri (Melin – Norkrans)

Glikoz	10	g
$FeCl_3 . 6H_2O$	0,001	g
$KH_2 PO_4$	0,5	g
$(NH_4)_2 H PO_4$	0,25	g
$CaCl_2$	0,05	g
NaCl	0,025	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,15	g
Agar	10	g
Distile su	1000	ml

Makrofungusların misel kültürlerini geliştirmek için kullanılmıştır (Blaudez ve arkadaşları, 2000).

Besiyeri 2: Glikoz-Pepton Besiyeri

Glikoz	20	g
Pepton	10	g
NaCl	0,2	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,25	g
$KH_2 PO_4$	0,5	g
$CaCl_2 .2 H_2O$	0,1	g
KCl	0,1	g
$FeSO_4 . 7 H_2O$	0,005	g
$NaHCO_3$	0,05	g
Distile su	1000	ml

Makrofungusların sıvı ortamda pelletler şeklinde gelişimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Potato Dekstroz Agar Besiyeri

Ticari preparat olarak elde edilen hazır besiyerinden (Merck) 39 g/l oranında tartılarak hazırlanır.

2.1.2.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

$ZnSO_4.7H_2O$ çözeltisi; Metal tolerans testlerinde 25, 75, 150, 225 ppm lik konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Çalkalamalı kültürle geliştirilen biyomasın biyosorpsiyon çalışmalarında 100 ppm lik konsantrasyonda kullanılmıştır.

Fizyolojik Tuzlu Su (% 0,9 NaCl); Misel kültürlerinin homojen süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

$H_2 SO_4$; Besiyeri pHının ayarlanmasında kullanılmıştır .

0,1 N NaOH; Besiyeri pHının ayarlanmasında kullanılmıştır .

Etanol; EPS (eksopolisakkarit) elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

2.2. METOTLAR

2.2.1. Makrofungusların İzolatlarının Elde Edilmesi

2.2.1.1. Makrofunguslardan Misel Eldesi

Makrofungusların metal toleranslarının ve biyosorpsiyon aktivitelerinin belirlenmesinde gerekli olan misel formlarını geliştirmek için, makrofunguslardan alınan doku parçaları, steril şartlarda Patates Dekstroz Agar (PDA) ve MMN agara inoküle edilmiştir. Makrofungusların yüzey sterilizasyonu, %96'lık alkol içerisine batırılıp bek alevinde yakılarak gerçekleştirilmiştir. PDA'ya üç nokta ekimi ile inoküle edilen doku parçaları, 25 ºC'de 10 gün inkübe edilmiştir.

2.2.1.2. Misel Formlarının Saklanması

Petrilerde elde edilen misel formları yatık PDA ve MMN tüplerinde geliştirilerek stok kültür haline getirilmiş ve + 4 ºC'de saklanmıştır.

2.2.2. Makrofungusların *In vitro* Koşullarda Metal Toleranslarının Belirlenmesi

2.2.2.1. Katı Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Katı ortamda makrofungusların çinkoya karşı toleranslarının belirlenmesi amacıyla MMN agar besiyerleri hazırlanarak pH'ı 5,5'e ayarlanmıştır. Otoklavdan sonra 25, 75 ve 225 ppm konsantrasyonlarda çinko içerecek şekilde steril stok çinko çözeltisinden MMN ortamına steril şartlarda ilave edilmiştir. Çinko çözeltisi 0,45 µm membran filtre ile steril edilmiştir. Bu şekilde besiyeri hazırlandıktan sonra, MMN besiyerindeki 10 günlük misel formlarından steril şartlarda alınarak çinko içeren MMN agar ortamına inoküle edilmiştir. Miseller 10 gün süreyle 25 ºC'de etüvde inkübasyona

bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda petrilerde gelişen mantarların koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Sonuçlar koloni çapına göre tolerans indekslerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Daha sonra misel tabakasının agardan ayrılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında petrilerin agarı eritilmiştir. 90 ºC sıcaklıktaki distile suda miseller yıkanmıştır ve tamamen agardan arındırılmıştır. Miseller darası alınmış şişelere alınarak 40 ºC'de tamamen kurumaları sağlanmıştır. Kurutulan miseller hassas terazide tartılarak, misel kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar misel kuru ağırlığına göre tolerans indekslerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Çalışmalarda her bir metal konsantrasyonu için 3 ve kontroller içinde 2 şer paralel deneme uygulanmıştır.

2.2.2.2. Glikoz-Pepton Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Sıvı ortamda tolerans testlerinde 4 makrofungus kullanılmıştır. Glikoz-Pepton besiyeri hazırlanarak otoklavdan önce ortam pH'ı 6 olarak ayarlanmıştır. Otoklavdan sonra besiyerlerine steril stok çinko çözeltisinden hesaplanan miktarlarda ilave edilerek 25, 75 ve 150 ppm lik konsantrasyonlarda çinko içeren sıvı ortamlar elde edilmiştir. MMN agarda gelişen 10 günlük misellerden alınarak 5 ml steril fizyolojik suda homojenize edilmiştir. 250 ml'lik erlenlerde 100 ml glikoz-pepton besiyerine steril şartlarda inoküle edilmiştir. 27 ºC'de 150 rpm devirde 3 gün ön inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yine aynı şartlarda hazırlanan sıvı ortama aktarılarak 7 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Toplam 10 günlük inkübasyon süresi sonunda misellerin pelletler şeklinde gelişimi gözlenmiştir. Denemeler 3 er paralel olarak yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda pelletler şeklinde gelişen kültürler**,** filtrasyon işlemiyle kültür sıvısı ve pelletler birbirinden ayrılmıştır. Distile su ile iki kez yıkanarak 80 ºC'de 24 saat süreyle tamamen kurumaları sağlanmıştır. Kuru misel ağırlıkları hassas terazide tartılarak tolerans değerleri hesaplanmıştır.

Ayrıca inkübasyon sonunda sıvı ortamda kalan çinko miktarları AAS (atomik absorbsiyon spektrofotometresi) ölçülmüştür. Çinko içeren sıvı ortamda büyüyen misellerin biyosorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır.

2.2.2.3. Tolerans İndeksinin Hesaplanması

Makrofungus türlerinin, MMN agar ve Glikoz-Pepton besiyerinde metallere karşı toleransı, aşağıdaki formül ile belirlenmiştir.

$$\text{Tolerans İndeksi (T.I.) (kuru ağırlığa göre)} = \frac{\text{Misel Kuru Ağırlığı}}{\text{Kontrol Miseli Kuru Ağırlığı}} \times 100$$

$$\text{Tolerans İndeksi (T.I.) (misel çapına göre)} = \frac{\text{Misel Çapı}}{\text{Kontrol Miseli Çapı}} \times 100$$

Makrofungus türlerinin, MMN agar ve Glikoz-Pepton besiyerinde metallere karşı toleransının belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde kontrol grupları için metal içermeyen besiyerleri kullanılmıştır (Vodnik et al., 1998).

2.2.3. Makrofungusların Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Kuru ve Yaş Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemeleri

Glikoz-Pepton besiyerinde geliştirilen makrofungus türlerinin yaş ve kuru hücreleriyle biyosorpsiyon kapasiteleri tayin edilmiştir. Sıvı ortamın pH'ı 6 olarak ayarlanmıştır. MMN agar besiyerinde geliştirilen 10 günlük fungal kolonilerden alınarak 5 ml steril fizyolojik suda homojenize edilmiştir. 250 ml'lik erlenlerde 100 ml sıvı besiyeri içeren ortama inoküle edilmiştir. Kültürler 27 ºC'de 150 rpm çalkalamalı etüvde 3 gün süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Yine aynı şartlarda hazırlanan sıvı ortama aktarılarak 7 gün daha inkübasyona bırakılmıştır. Toplam 10 günlük inkübasyon sonrasında pelletler şeklinde gelişen miseller filtrasyonla kültür ortamından

ayrılmıştır. Distile su ile birkaç kez yıkanan misellerin yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Hücrenin bir kısmı yaş hücre olarak kullanılmak üzere ayrılmıştır ve kalan miktarı da 80 ºC'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. 50 mg kuru hücre ve buna karşılık gelen yaş hücre kullanılmıştır. 250 lik erlenlerde 50 ml 100 ppm konsantrasyonda çinko içeren çözeltide 27 ºC'de 30 dakika 150 rpm çalkalamalı etüvde tutulmuştur. Etüvden çıkarıldıktan sonra hücrelerin çökmesi ile 10 ar ml metal çözelti örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler AAS ölçülmüştür (Gabriel et.al., 2001) .

2.2.3.2. *Ganoderma carnosum*'a Ait Farklı Hücre Tiplerinin Çalkalamalı Ortamda Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması

2.2.3.2.1. *Ganoderma carnosum' a* Ait Büyüme Eğrisi

Biyosorpsiyon denemelerinde kullanılmak üzere *Ganoderma carnosum'a* ait büyüme eğrisinin çıkarılması için PDA besi yerine stok kültürlerden steril şartlarda üç nokta ekimi yapılarak 27 ºC' de 5 gün inkübasyonla misel formları elde edilmiştir. 9 cm lik petrilerde geliştirilen miseller 30 ml distile suda homojenizatörde steril şartlarda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenattan 1 ml alınarak 100 ml glikoz-pepton besiyeri içeren 250 ml lik erlenlere inoküle edilmiştir. Her saat için 2 şer paralel erlen kullanılmıştır. 0.dakikadan başlanarak her 12 saatte bir hücreler besiyerinden filtrasyonla ayrılarak birkaç kez distile su ile yıkandıktan sonra 24 saat süreyle 80 ºC' de kurutulmuştur. Kuru hücre ağılıkları 24 saatin sonunda tartılarak belirlenmiştir (Çeribaşı ve Yetiş, 2001).

2.2.3.2.2. Canlı, Ölü, Dinlenen Hücreler, EPS, Alginat ve Agarla İmmobilize Hücrelerin Pellet Formlarının Elde Edilmesi

PDA besiyerine stok kültürlerden steril şartlarda üç nokta ekimi yapılarak 27 ºC' de 5 gün inkübasyonla misel formları elde edilmiştir. 9 cm lik petrilerde geliştirilen

miseller 30 ml distile suda homojenizatörde steril şartlarda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenattan 1 ml alınarak 100 ml glikoz-pepton besiyeri içeren 250 ml lik erlenlere inoküle edilmiştir. 27 ºC'de 150 rpm de 8 gün inkübe edilerek pelletler şeklinde gelişmiştir. Pelletler eksponansiyel fazın başlangıcında (192. saat) alınarak filtre edilmiştir.

2.2.3.2.3. Canlı Hücreler İle Biyosorpsiyon Denemeleri

İnkübasyon süresi sonunda besiyeri ortamından filtrasyonla ayrılan hücrelerden 0,1 g kuru ağırlığa karşılık gelen yaş hücre miktarı tartılarak aynı pH değerine ayarlanmış taze besiyerine konulmuştur. Konsantrasyon 100 ppm olacak şekilde steril Zn çözeltisi ilave edilmiştir. Biyosorpsiyon işlemi 27 ºC'de 150 rpm de çalkalamalı etüvde gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınmıştır. Çalışmalar 3 paralel olarak yapılmıştır. Aynı şekilde metal içermeyen glikoz-pepton besiyeri kullanılarak 3 paralel kontrol grubu da çalışılmıştır. Çalışmalar steril şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Metalin besiyeri bileşenlerinden biri ile reaksiyonunun olup olmadığını kontrol etmek amacı ile, aynı pH değerine ayarlanmış taze besiyeri metal karışımı 27 ºC' de 150 rpm de çalkalamalı etüvde tutulmuştur. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınarak 3 paralel olarak çalışılmıştır.

2.2.3.2.4. Ölü Hücreler İle Biyosorpsiyon Denemeleri

Filtrasyonla ayrılan hücreler yıkanmadan otoklavda 121 ºC'de 20 dakika tutularak ölü hücre elde edilmiştir. 0,1 g kuru ağırlığa karşılık gelen yaş hücre miktarı tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine ölü hücreler aktarılmıştır. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınmıştır. 3 paralel olarak yapılmıştır. Ayrıca hücrelerin öldüğünü kontrol etmek amacıyla 0,1 g kuru ağırlığa karşılık gelen ölü yaş hücre steril

glikoz-pepton besiyerine alınarak inkübatörde 27 ºC'de 150 rpm de 3 gün süreyle tutulmuştur.

2.2.3.2.5. Dinlenen Hücreler İle Biyosorpsiyon Denemeleri

Hücreler filtre edildikten sonra yıkanmadan kullanılmıştır. 0,1 g kuru ağırlığa karşılık gelen yaş hücre miktarı tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine aktarılmıştır. Farklı zaman aralıklarında1 er ml örnek alınarak 3 paralel olarak çalışılmıştır.

2.2.3.2.6. İmmobilize Hücreler İle Biyosorpsiyon Denemeleri

2.2.3.2.6.1. Ca-alginat ile İmmobilize Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemesi

Hücreler birkaç kez steril su ile yıkanmıştır. 2 g yaş hücre 100 ml steril distile suda 5-10 saniye blenderda homojenize edilmiştir. 100 ml hücre süspansiyonu 100 ml % 2 Na–alginat ile karıştırılmıştır. 200 ml 0,1 M $CaCl_2$ üzerine, 200 ml hücre süspansiyonu + Na alginat karışımı 10 luk enjektör ucundan peristaltik pompa ile damlatılmıştır. Manyetik karıştırıcı ile $CaCl_2$ çözeltisinin sürekli karıştırılması sağlanmıştır. Hazırlanan karışım 2 saat buzdolabında bekletildikten sonra steril distile su ile yıkanmış ve kullanılıncaya kadar +4 ºC $CaCl_2$ çözeltisinde saklanmıştır. 0,5 g ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de 150 rpm de biyosorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınarak 3 paralel deneme yapılmıştır.

G.carnosum'a ait farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla Ca-alginatla immobilize hücrelerin kontrol grubu olarak kullanılmak üzere, 100 ml % 2 Na–alginat, 100 ml 0,1 M $CaCl_2$ üzerine, 10 luk enjektör ucundan peristaltik pompa ile damlatılmış, manyetik karıştırıcı ile $CaCl_2$ çözeltisinin sürekli karıştırılması sağlanmıştır. Hazırlanan karışım 2 saat buzdolabında

bekletildikten sonra steril distile su ile yıkanmıştır. 0,5 g ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de 150 rpm de biyosorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınarak 3 paralel deneme yapılmıştır (Chang ve arkadaşları,1998; Bayramoğlu ve arkadaşları, 2003).

2.2.3.2.6.2. Agar ile İmmobilize Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemesi

Hücreler birkaç kez steril su ile yıkanmıştır. 2 g yaş hücre 100 ml steril distile su suda 5-10 saniye blenderda homojenize edilmiştir. 2 g agar 90 ml % 0,9 NaCl de ısıtılmıştır. 50 ºC ye kadar soğutulan agara 10 ml hücre süspansiyonu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım petrilere dökülerek dondurulmuştur. Daha sonra 1,8 mesh lik elekten geçirilerek 1 mm çapında elde edilen partiküller % 0,9 NaCl ile yıkanmış ve kullanılıncaya kadar % 0,9 NaCl içinde, 4 ºC'de depolanmıştır. 0,5 g ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de150 rpm de biyosorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

G.carnosum'un farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla agar ile immobilize hücrelerin kontrol grubu olarak kullanılmak üzere, 2 g agar 90 ml % 0,9 NaCl de ısıtılmıştır. 50 ºC'ye kadar soğutulan agar petrilere dökülerek dondurulmuştur. Daha sonra elekten geçirilerek % 0,9 NaCl ile yıkanmış ve kullanılıncaya kadar % 0,9 NaCl içinde, + 4 ºC'de depolanmıştır. 0,5 g ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de 150 rpm de biyosorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Kierstan, ve Coughlan, 1985; Phillips ve Poon, 1988).

2.2.3.2.7. Eksopolisakkarit (EPS) ile Biyosorpsiyon Denemesi

100 ml kültür sıvısı, 400 ml etanol ile karıştırılarak çalkalamalı etüvde şiddetli biçimde çalkalanması sağlanmıştır. Buzdolabında 1 gece bekletilerek sıvı ve tabanda çöken kısım 10000 g de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Tabanda çöken kısım liyofilize edildikten sonra öğütülmüştür. Uygun büyüklükte partiküller elde edebilmek amacı ile 1,8 mesh lik elekten geçirilmiş ve kullanılıncaya kadar + 4 ºC'de depolanmıştır. 0,1 g

ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de 150 rpm de biyosorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınarak 3 paralel olarak çalışılmıştır (Kim et al., 2002).

2.2.3.2.8. Öğütülmüş Mantarla Biyosorpsiyon Denemesi

Doğadan toplanan *G.carnosum* birkaç kez distile su ile yıkanarak, laboratuvar şartlarında kurutulmuş, blendırdan geçirilmiş ve 50 ºC'ye kadar kurutulmuştur. Öğütülen kuru mantar karpoforundan uygun büyüklükte partiküller elde edebilmek amacı ile 1,8 mesh lik elekten geçirilerek 1mm çapında partiküller elde edilmiştir. 0,1 g ağırlık tartılarak 100 ml 100 ppm lik Zn çözeltisine alınıp çeşitli zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınmış ve 3 paralel olarak yapılmıştır (Muraleedharan et al., 1995; Zulfadhly et al ., 2001)

G.carnosum'a ait farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile yapılan denemelerde tüm hücreler için negatif kontrol grubu olarak herhangi bir sorbant ilave edilmemiş çinko çözeltisi 27 ºC'de 150 rpm de tutularak aynı zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınmış ve 3 paralel olarak yapılmıştır.

Biyosorpsiyon çalışmasında pozitif kontrol grubu olarak kil ve aktif karbon kullanılmıştır. Örneklerden 0,1 er g tartılarak Zn çözeltisine alınıp 27 ºC'de 150 rpm de adsorpsiyon işlemi 3 paralel olarak yapılmıştır. Çeşitli zaman aralıklarında 1 er ml örnek alınmıştır. Aktif karbon için partikül büyüklüğü 1,8 mesh lik elekten geçirilerek 1 mm ye ayarlanmıştır.

2.2.4. Analitik İşlemler

Ölçümler Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde yapılmıştır. Sıvı ortamda biyosorpsiyon, çalkalamalı kültürde elde edilen pelletlerin kuru ve yaş formlarıyla biyosorpsiyon tarama çalışması ve farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon denemelerinde kullanılan hücre ve sorbentlerin Q_{max} değerlerini hesaplamak amacı ile aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Dilek et al., 2002; Yetis et al., 2000) .

$$\text{Qmax mgZn/ g kuru biyomass} = \frac{V\ (\ Co - C)}{M}$$

Qmax Metal alımı (mg g^{-1})

V Örnek hacmi (ml)

Co Başlangıç metal konsantrasyonu (mg l^{-1})

C Biyosorbsiyon sonrası kalan metal konsantrasyonu (mg l^{-1})

M Biyosorbent miktarı (g)

3. BULGULAR

3.1. Makrofungusların *In vitro* Koşullarda Metal Toleranslarının Belirlenmesi

3.1.1. Katı Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Makrofungusların katı ortamda tolerans deneylerinin sonuçları koloni çapına ve kuru ağırlığa göre belirlendi. Çizelge 2 de dokuz makrofungusun koloni çapının ve misel kuru ağırlıkları ile kontrol misellerinin koloni çapları ve kuru ağırlıkları verilmiştir.

Tolerans deneylerinde makrofungal misellerin farklı konsantrasyonlarda metal içeren ve metal içermeyen ortamlarda geliştirilmeleri sonucunda metal tolerans indeksleri çizelge 3 ve çizelge 4 te sunulmuştur. Tolerans indeksleri misel kuru ağırlığına ve koloni çapına göre hesaplanmıştır. Sonuçlar % değerleri olarak verilmiştir.

Çizelge 2 Katı Besiyerinde Çinko Tolerans Sonuçları

	Çinko Konsantrasyonu (ppm)							
Mantar Türü	**Kontrol**		**25**		**75**		**225**	
	M.Ç.	M.K.A.	M.Ç.	M.K.A.	M.Ç.	M.K.A.	M.Ç.	M.K.A.
Lenzites betulina	4±0,00	16,1±0,00	4±0,00	11±0,00	3±0,00	5±0,00	0±0,00	0±0,00
Trametes hirsuta	4,0±0,00	7,35±0,00	4,0±0,00	7,1±0,00	2,5±0,00	8,63±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
Tricholoma auratum	5,0±0,00	7,6±0,00	5,0±0,00	6,26±0,00	4,0±0,00	4,9±0,00	1,5±0,00	3,6±0,00
Ganoderma sp.	5,0±0,00	8,25±0,00	4,5±0,00	8,86±0,00	3,83±0,28	5,63±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
Lepista nuda	3,5±0,35	4,2±0,00	3,0±1,15	6,05±0,00	2,6±0,000	6,15±0,00	1,0±0,00	0,83±0,00
Polyporus arcularius	4,25±0,25	11,8±0,01	3,33±0,76	5,06±0,00	0±0,00	0,53±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
Clavariadephus truncatus	3,6±0,00	9,85±0,00	3,6±0,17	12,2±0,00	3,36±0,15	10,56±0,00	2,66±0,2	8,76±0,00
Rhizopogon roseolus	2,0±0,00	2,85±0,00	2,0±0,00	3,5±0,00	1,00±0,00	1,43±0,00	0,0±0,00	0,25±0,00
Ganoderma carnosum	5,0±0,00	13,9±0,01	5,0±0,00	23,8±0,00	4,5±0,00	15,63±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00

M.K.A. : Misel kuru ağırlığı (x 10^{-3} g)

M.Ç.: Koloni çapı (cm)

3.1.1.1. Misel Kuru ağırlığına Göre Tolerans İndeksi

Katı ortamda gerçekleştirilen metal tolerans denemelerinde misel kuru ağırlığına göre elde edilen tolerans değerlerine ait bulgular çizelge 3 te verilmiştir.

Çizelge 3 Katı ortamda misel kuru ağırlığına göre çinko tolerans indeksi değerleri

Misel Kuru Ağırlığına Göre Tolerans İndeksleri (%)			
	Çinko Konsantrasyonu(ppm)		
Mantar Türleri	**25**	**75**	**225**
Lenzites betulina	53,0±2,5ab	64,0±2,7ac	2,0±0,6ab
Trametes hirsuta	97,0±3,8acd	117,0±2,0b	0,0±0,0a
Tricholoma auratum	81,5±3,0abd	64,0±6,0ac	47,0±3,2c
Ganoderma sp.	107,0±7,0cd	68,0±2,6ac	0,0±0,0a
Lepista nuda	142,0±7,2cef	97,0±4,1ab	9,0±3,2b
Polyporus arcularius	43,0±2,3b	4,5±0,9d	0,0±0,0a
Calvariadelphus truncatus	124,0±6,6de	107,0±4,3b	88,0±2,1d
Rhizopogon roseolus	125,0±7,4de	50,0±2,3c	7,0±0,3ab
Ganoderma carnosum	171,0±12,4f	117,0±7,1b	7,0±0,4ab

3.1.1.2. Koloni Çapına Göre Tolerans

Katı ortamda gerçekleştirilen metal tolerans denemelerinde koloni çapına göre elde edilen tolerans değerlerine ait bulgular çizelge 4 te verilmiştir.

Çizelge 4 Katı ortamda koloni çapına göre çinko tolerans indeksi değerleri

Koloni Çapına Göre Tolerans İndeksleri (%)			
	Çinko Konsantrasyonu (ppm)		
Mantar Türleri	**25**	**75**	**225**
Lenzites betulina	100,0± 0,0a	75,0± 0,0a	0,0± 0,0a
Trametes hirsuta	100,0±0,0a	62,0±0,0b	0,0±0,0a
Tricholoma auratum	100,0±0,0a	80,0±0,0c	30,0±0,0b
Ganoderma sp.	90,0±0,0ab	76,0±5,8ac	0,0±0,0a
Lepista nuda	92,0±15,5b	80,0±0,0c	0,0±0,0b
Polyporus arcularius	77,0±8,0ab	0,0±0,0d	0,0±0,0a
Calvariadelphus truncatus	100,0 ±4,8a	92,0±4,2e	72,0±2,1c
Rhizopogon roseolus	100,0 ±0,0a	50,0±0,0f	0,0±0,0a
Ganoderma carnosum	100,0±0,0a	90,0±0,0e	0,0±0,0a

3.1.2. Glikoz-Pepton Besiyerinde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Sıvı kültürde gerçekleştirilen tolerans testlerinde elde edilen misel kuru ağırlıkları çizelge 5 te verilmiştir .

Çizelge 5 Sıvı ortamda çinko toleransı denemeleri sonuçları

	Çinko Konsantrasyonu (ppm)			
Mantar Türü	**Kontrol**	**25**	**75**	**150**
	M.K.A.	**M.K.A.**	**M.K.A.**	**M.K.A.**
Calvariadelphus truncatus	0,9659±0,31	0,9498±0,40	0,9178±0,32	0,8163±0,67
Trametes hirsuta	0,6963±0,03	0,7086±0,04	0,4568±0,14	0,3197±0,01
Tricholoma auratum	0,6234±0,03	0,5984±0,01	0,4806±0,14	0,1942±0,01
Ganoderma carnosum	0,1955±0,02	0.2256±0,01	0,1573±0,02	0,0217±0,00

M.K.A.: Misel kuru ağırlığı (g)

Sıvı kültürde yapılan tolerans deneylerinde elde edilen misel kuru ağırlıklarına göre tolerans indeksi değerlerinin verileri % olarak çizelge 6 da gösterilmiştir.

Çizelge 6 Sıvı ortamda çinko tolerans indeksi değerleri

Misel Kuru Ağırlığına Göre Tolerans İndeksleri (%)			
	Çinko Konsantrasyonu (ppm)		
Mantar Türleri	**25**	**75**	**150**
Calvariadelphus truncatus	98,3± 7,0a	88,7± 4,3a	84,5± 4,4a
Trametes hirsuta	101,7± 3,4b	65,0± 5,6a	45,9± 3,6b
Tricholoma auratum	96,0± 2,6b	77,1± 6,9ab	31,2± 2,1c
Ganoderma carnosum	115,3± 6,4b	80,4± 4,5ac	11,0± 1,6d

3.2. Makrofunguslar ile Biyosorpsiyon Denemeleri

3.2.1. Çalkalamalı Kültürde Yaş ve Kuru Hücrelerle Biyosorpsiyon Denemeleri

Sıvı kültürde pelletler şeklinde gelişen misellerin yaş ve kuru hücreleri kullanılarak 100 ppm çinko konsantrasyonunda gerçekleştirilen biyosorpsiyon deneylerinde elde edilen Qmax (mg Zn /g kuru biyomas) değerleri çizelge 7 de verilmiştir.

Çizelge 7. Kuru ve yaş hücrelerin Qmax değerleri

Mantar Türü	**Kuru Hücre (Qmax) mg/g**	**Yaş Hücre (Qmax) mg/g**
Lenzites betulina	20,7	25,25
Trametes hirsuta	27,5	27,7
Tricholoma auratum	14,5	21,6
Ganoderma spp	18,5	18,35
Lepista nuda	18,95	21,25
Polyporus arcularis	21,25	18,95
Calvariadelphus truncatus	20,06	16,03
Rhizopogon roseolus	16,25	18,1
Ganoderma carnosum	38,04	33,3

Sıvı kültürde 25, 75 ve 150 ppm lik çinko derişimlerinde gerçekleştirilen tolerans denemelerinde, ortamda kalan metal miktarları AAS de ölçülerek biyosorpsiyon kapasiteleri (Qmax değerleri) hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 8 de gösterilmiştir.

Çizelge 8. Sıvı ortamda büyüyen misellerle çinko biyosorpsiyonu Qmax sonuçları

Qmax Değerleri (mg/g kuru biyomas)			
Mantar Türü	**Çinko Konsantrasyonu(ppm)**		
	25	**75**	**150**
Calvariadelphus truncatus	0,63	1,85	1,96
Trametes hirsuta	1,27	5,91	35,48
Tricholoma auratum	1,16	4,78	12,87
Ganoderma carnosum	4,43	31,7	138

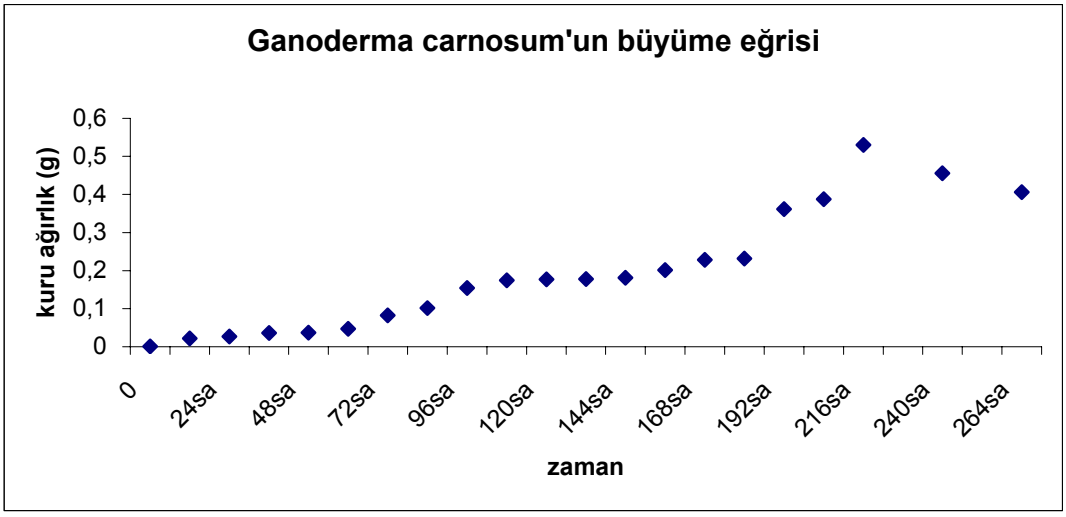
3.2.3. *Ganoderma carnosum*'a Ait Farklı Hücre Tiplerinin Çalkalamalı Ortamda Biyosorpsiyon Açısından Karşılaştırılması

3.2.3.1. *Ganoderma carnosum'a* Ait Büyüme Eğrisi Sonuçları

Sıvı kültürde pelletler şeklinde gelişen misellerin belirtilen saatlerde alınan örneklerinin kuru ağırlık değerleri çizelge 9 da verilmiştir. Fungusa ait büyüme eğrisi şekil 1 de gösterilmiştir.

Çizelge 9. Büyüme Eğrisi Misel Kuru Ağırlıkları (g)

Zaman (saat)	Ortalama Misel Kuru Ağırlığı
0	0,001±0,00
12	0,025±0,00
24	0,026±0,00
36	0,036±0,00
48	0,037±0,00
60	0.047±0,00
72	0,082±0,00
84	0,101±0,00
96	0,154±0,03
108	0,174±0,01
120	0,177±0,02
132	0,177±0,00
144	0,181±0,00
156	0,201±0,04
168	0,228±0,00
180	0,231±0,02
192	0,361±0,01
204	0,387±0,03
216	0,530±0,02
240	0,456±0,02
264	0,406±0,00



Şekil1. *Ganoderma carnosum'a* ait büyüme eğrisi grafiği

3.2.3.2. Farklı Hücre Tiplerinin Biyosorpsiyon Denemeleri

Sıvı kültürde geliştirilen misellerin farklı tipleriyle yapılan biyosorpsiyon denemelerinde Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi de yapılan ölçümlerde bulunan çinko miktarları ppm olarak çizelge 10 da verilmiştir.

Farklı hücre tipleriyle çalkalamalı kültürde yapılan biyosorpsiyon çalışmasında elde edilen Qmax (mg Zn /g kuru biyomas) değerleri çizelge 11 de verilmiştir.

Farklı hücrelerle gerçekleştirilen biyosorpsiyon denemelerinde elde edilen Qmax sonuçlarına ait grafikler şekil 2, 3, 4 ve 5 te gösterilmiştir.

Çizelge 10. Farklı hücre tiplerine ait biyosorpsiyon sonunda ortamda kalan çinko miktarları

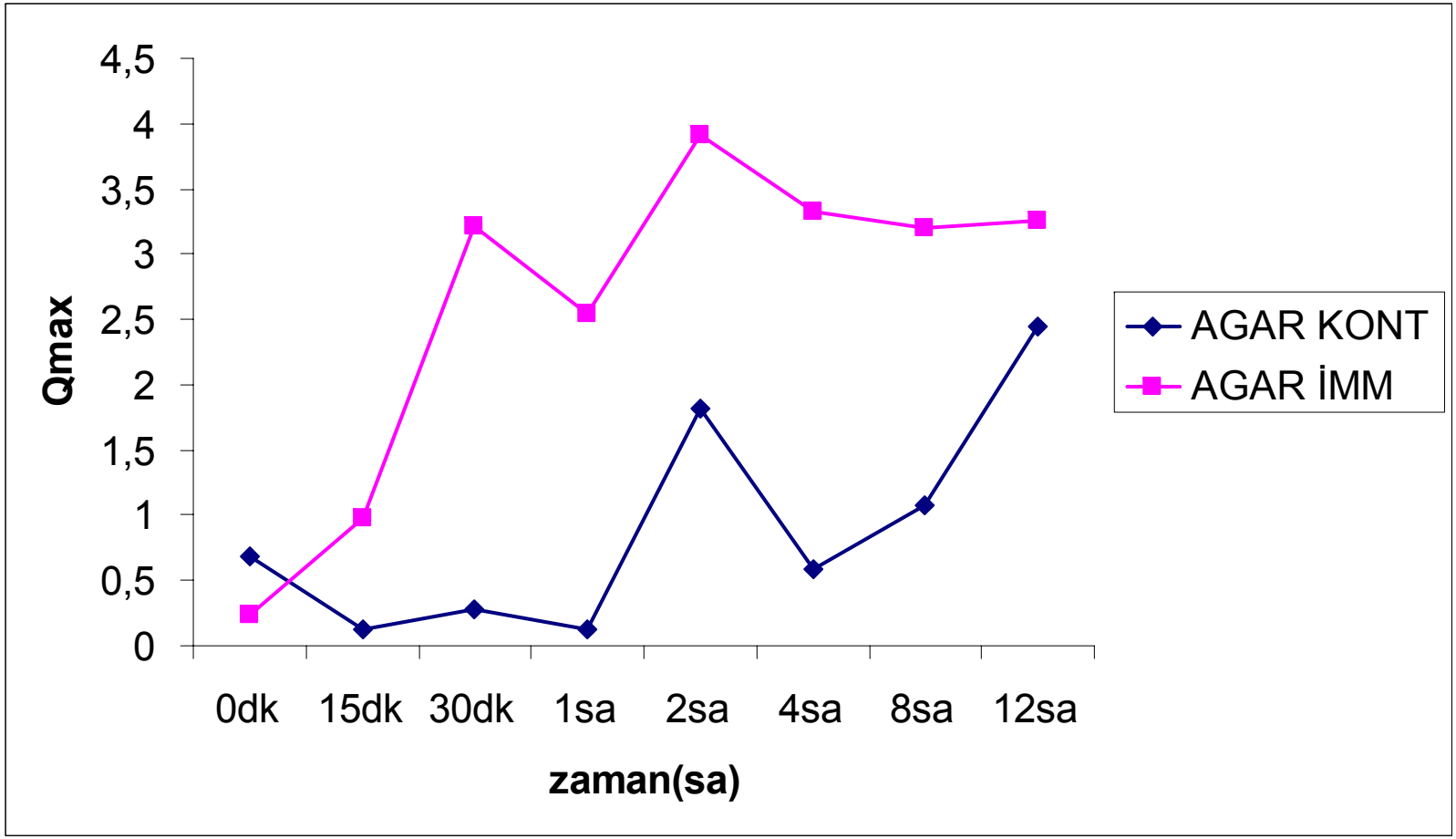
Zn KONSANTRASYONU (100 ppm, 27 ºC'de, 150 rpm)												
SÜRE	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
0. sa	115,4	114,5	113,2	115,2	114,6	112	114,2	114,9	115,3	112,6	113,9	109,4
15.dk	116,7	116,7	116,7	113,5	101,8	116,1	111,8	110,4	114,7	107	116,7	115
30.dk	112,7	110,5	111,5	98,3	90,9	111,3	96,6	102	110,4	97.3	112,5	111,3
1.sa	111,3	111,1	105,9	93	90,5	110,7	98,6	98,4	107,8	101.3	111	109,4
2.sa	117,5	105,4	106,2	103	101,9	108,4	97,9	103	104,6	105,8	102,7	113,8
4.sa	108,3	104,5	96,6	92,4	90,5	105,4	91,7	92,8	102,1	96,4	95,7	106,7
8.sa	106,8	100,9	92,7	93,6	97,6	101,4	90,8	92,8	99,6	79	90,9	103,6
12.sa	116	113,2	99,3	81,9	81,7	103,8	99,7	99,8	110,8	85	97,3	105

A: Negatif Kontrol B: Aktif Karbon C: Kil D: Alginat Kontrol E: Alginat İmmobilize F: Agar Kontrol
G: Agar İmmobilize H: EPS I: Kurutulmuş-Öğütülmüş Mantar J: Dinlenen Hücre K: Ölü Hücre L: Canlı Hücre

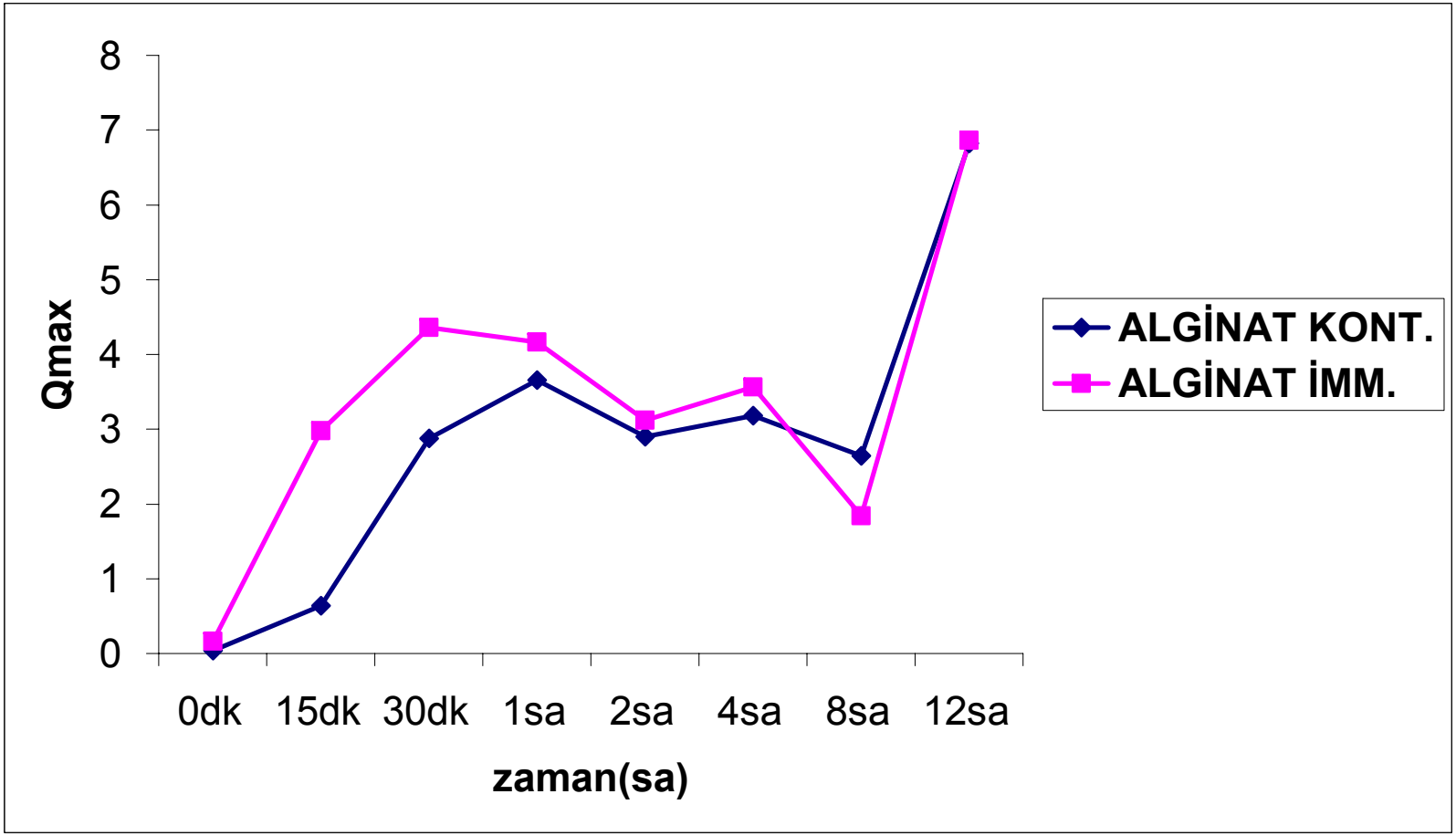
Çizelge 11. Farklı hücre tiplerinin biyosorpsiyon çalışması Qmax değerleri

Q MAX DEĞERLERİ (mg Zn/ g kuru biyomas)											
SÜRE	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
0. sa	0,9	2,2	0,04	0,16	0,68	0,24	0,5	0,1	2,8	1,5	6
15.dk	0	0	0,64	2,98	0,12	0,98	6,3	2	9,7	0	1,7
30.dk	2,2	2,2	2,88	4,36	0,28	3,22	10,7	2,3	15,4	0,2	1,4
1.sa	0,2	5,4	3,66	4,16	0,12	2,54	12,9	3,5	10	0,3	1,9
2.sa	12,1	11,3	2,9	3,12	1,82	3,92	14,5	12,9	11,7	14,8	3,7
4.sa	3,8	11,7	3,18	3,56	0,58	3,32	15,5	6,2	11,9	12,6	1,6
8.sa	5,9	14,1	2,64	1,84	1,08	3,2	14	7,2	27,8	15,9	3,2
12.sa	2,8	16,7	6,82	6,86	2,44	3,26	16,2	5,2	31	18,7	11

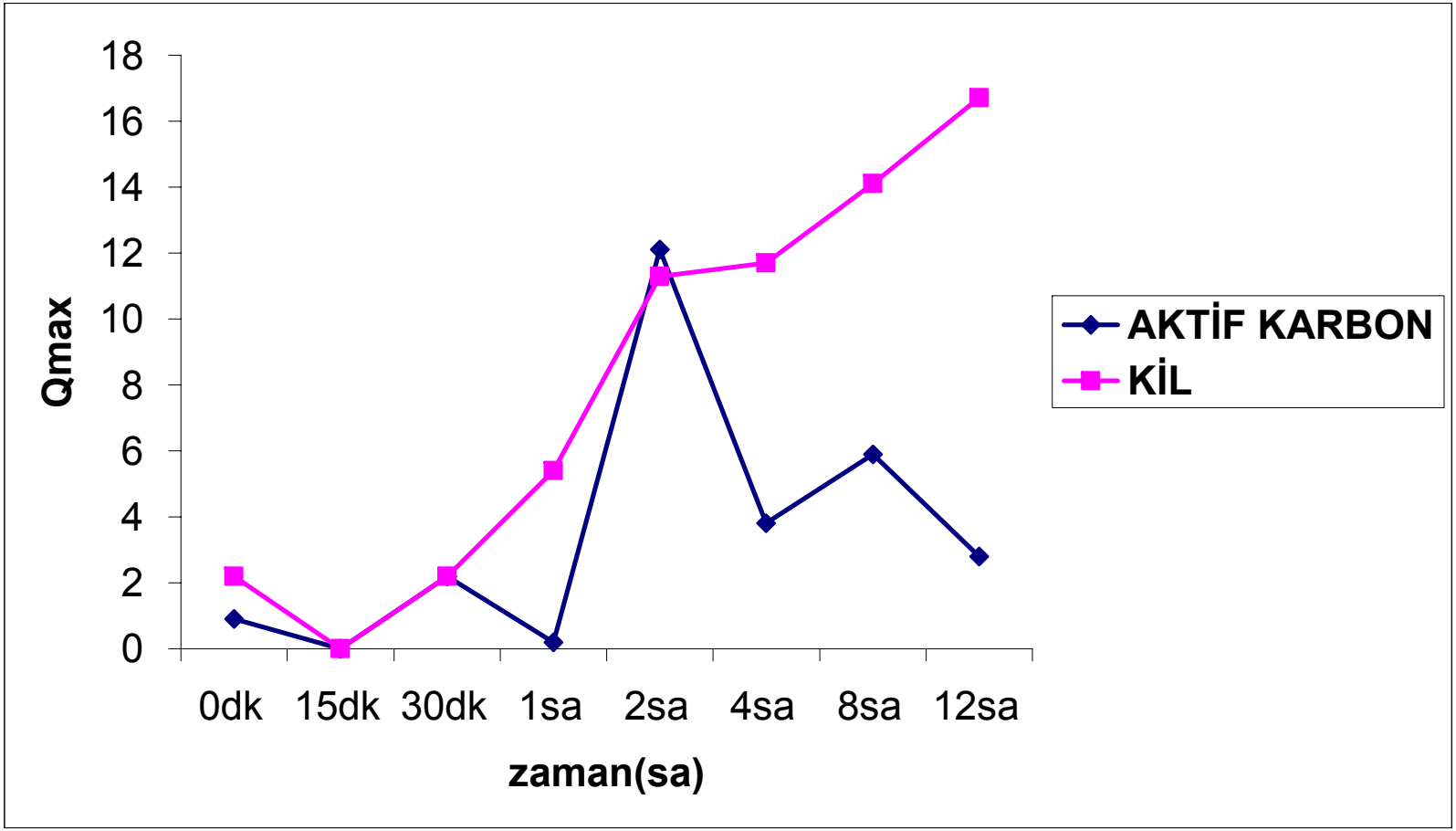
B: Aktif Karbon C: Kil D: Alginat Kontrol E: Alginat İmmobilize F: Agar Kontrol G: Agar İmmobilize
H: EPS I: Kurutulmuş-Öğütülmüş Mantar J: Dinlenen Hücre K: Ölü Hücre L: Canlı Hücre



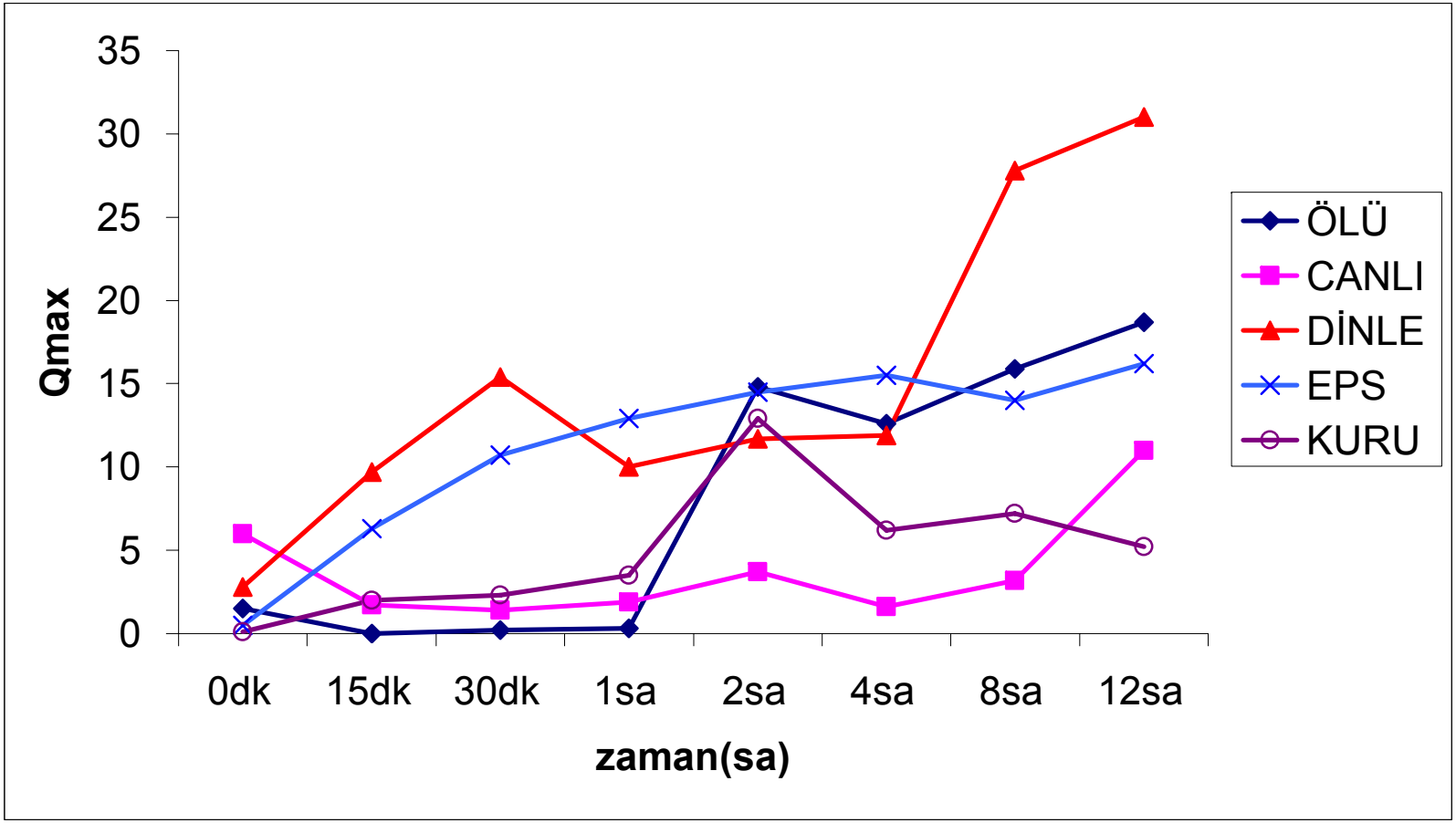
Şekil 2. Agar kontrol ve agarla immobilize *G. carnosum'un* biyosorpsiyon grafiği



Şekil 3. Alginat kontrol ve alginatla immobilize *G. carnosum'un* biyosorpsiyon grafiği



Şekil 4. Pozitif kontrol olarak kullanılan aktif karbon ve kile ait biyosorpsiyon grafiği



Şekil 5 Canlı,ölü ve dinlenen hücreler, eksopolisakkarit ve öğütülmüş mantara ait biyosorpsiyon grafiği

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toksik ağır metaller ve beyaz çürükçül mantarların interaksiyonları bazı fizyolojik, ekolojik ve teknolojik sonuçlara sahiptir. Esansiyel metaller fungal büyüme ve gelişme için gereklidir, fakat onların fazlalığı toksik etki yapabilir. Mantarların çevresinde ağır metallerin varlığı, toprakta organik maddenin parçalanması ve dekompozisyon sürecini etkiler (Baldrian, 2003).

Dokuz makrofungus türünün katı ortamda gelişen misellerinin çinko toleransları test edilmiştir. Kuru ağırlığa göre en düşük çinko konsantrasyonunda (25 ppm) *Polyporus arcularis* diğer türlere nazaran daha az gelişim göstermiştir (% 43). Düşük çinko konsantrasyonu bütün mantar türlerinin gelişimini önemli oranlarda artırmıştır. Çünkü çinko metali mantarlar için esansiyeldir. *Ganoderma carnosum* türü için 25 ppm lik konsantrasyon kontrol miseline göre % 171 oranında büyümeyi artırmıştır. Metal konsantrasyonunun artmasıyla tolerans değerleri de azalmaktadır. Organizmalar için gerekli bir metal olan çinkonun fazlalığı durumunda makrofunguslar için toksik etki göstermektedir. En yüksek çinko konsantrasyonu olan 225 ppm de en dirençli türün *Clavariadelphus truncatus* olduğu kaydedilmiştir. Ancak *Ganoderma sp., Polyporus arcularius, Lenzites betulina ve Trametes hirsuta* türlerinde inihbisyonun çok güçlü olduğu görülmektedir. Hiçbir şekilde misel gelişimi kaydedilmemiştir. *Rhizopogon roseolus* ve *Ganoderma carnosum* türlerinde de en yüksek konsantrasyondaki inhibisyon etkisi oldukça fazladır ve tolerans indeksleri % 7 olarak hesaplanmıştır**.** *Tricholoma auratum'*da en düşük ve en yüksek metal konsanratsyonlarında tolerans değerleri arasında % 37 oranında fark vardır. En yüksek konsantrasyondaki inhibisyon oranı kontrol misellerine göre % 53 tür. % 47 oranında ki tolerans değeri oldukça iyi bir sonuçtur. *Tricholoma auratum'*da en toleranslı ikinci tür olarak tespit edilmiştir. En düşük konsantrasyonda türler için misel gelişimi önemli oranlarda stimüle edilirken *Polyporus arcularius* ve *Lenzites betulina* için aynı sonuç geçerli değildir. Bu iki türün misel gelişimi diğerlerine oranla daha azdır. *Polyporus arcularius* 75 ppm lik konsantrasyonda sadece % 4,5 oranında tolerans gösterebilmiştir.

Katı ortamdaki tolerans testlerinde *C. truncatus* ve *T. auratum* çinkoya karşı en fazla direnç gösteren izolatlardır. *Rhizopogon roseolus'*ta en düşük konsantrasyondan

en yüksek metal konsantrasyonuna doğru tolerans değerleri belirgin şekilde azalmaktadır. *T. hirsuta* ve *L. betulina* türlerinde 75 ppm lik konsantrasyondaki tolerans değerleri 25 ppm lik konsantrasyondaki değerlere göre az da olsa bir artış göstermiştir.

Misel çapına göre tolerans indeksleride tayin edilmiştir. Kuru ağırlığa göre tolerans sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Şöyle ki en yüksek konsantrasyon için *T. auratum* ve *C. truncatus'*ta inihbisyon etkisi diğer türlere göre yüksek değildir. Özellikle *C. truncatus* 225 ppm lik konsantrasyonda dahi gelişimini devam ettirmiştir. İnhibisyon etkisi *L. betulina*, *T. hirsuta, G. carnosum, Ganoderma sp., R. roseolus, P. arcularius* ve *L. nuda* türleri için çok güçlüdür. Misel gelişimi tamamen inhibe olmuştur. 225 ppm lik çinko konsantrasyonu bu türler için toksik etki göstermiştir.

Fungal kültürlerin misel çapına dayanan tolerans indeksleri fungal metal toleransının belirlenmesinde uygun bir parametre olmayabilir. *L. laccata* kültüründe diğer mantarlardan daha seyrek misel formları gözlenmiştir. Misel yapısındaki bu tip farklılıklar kuru ağırlığın tolerans belirlenmesinde daha uygun bir paramatre olabileceğini göstermektedir (Vodnik et al., 1998).

Farklı konsantrasyonlarda metal içeren katı ortamda misel gelişimleri bu şekilde gözlenmiştir. Bu çalışmada çinko toleransında güçlü bir interspesifik çeşitlilik tayin edilmiştir. Bu sonuçlar bize kullanılan mantarların çinko içeren ortamlarda, topraklarda aynı şekilde gelişim göstereceklerini kanıtlamaz. Laboratuvar şartlarıyla doğal ortamlar arasında farklılıklar vardır. Yine çinko makrofunguslar için gerekli metaller arasında yer alır. Eser miktarlarda misel gelişimi ve metabolizma için gereklidir. Bu nedenle düşük konsantrasyonlarda, çalışmamızda kullanılan türlerin çoğu için genelde stümüle edici bir etki göstermiştir.

Ağır metal içeren atık sulardan metal gideriminde yararlanmak amacıyla makrofungusların kullanımıda yaygınlaşmıştır. Katı ortamda yapılan tolerans testlerinde misel gelişimi sonunda ortamda kalan metal miktarını belirlemek mümkün olmamıştır. Bu amaçla katı ortamda yapılan tolerans deneyleri ve çalkalmalı kültürde üretilen misellerin kuru ve yaş formlarıyla yapılan tarama çalışması sonuçlarına göre seçtiğimiz dört izolat ile sıvı ortamda tolerans deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Sıvı ortamda misel gelişimi pelletler şeklinde olmuştur. Pellet formları metal konsantrasyonunun artmasıyla daha belirgin hale gelmiştir. Kontrol miselleri ve 25

ppm lik konsantrasyonlarda misellerin ipliksi yapıları daha belirgindir. 150 ppm lik konsantrasyonlarda ise bütün türler için misel gelişimi boncuğa benzer küre şeklinde, farklı çaplarda pelletler şeklinde olduğu görülmüştür. Metal miktarının artmasıyla morfolojik görünümleride değişmiştir. Metal konsantrasyonun artmasına paralel olarak fungal gelişimde inhibisyon artmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon artışını en iyi şekilde *G. carnosum* göstermektedir. 25 ppm de tolerans değeri % 115 iken 150 ppm de %11,04 olmuştur. Yaklaşık % 100 oranında inhibisyon görülmektedir.

C. truncatus içinde katı ortamdaki tolerans değerlerine göre sıvı ortamdaki tolerans değerleri daha azdır. Metallerin toksik etkisi sıvı ortamda daha güçlüdür. Bu sebeplede sıvı kültürdeki en yüksek metal konsantrasyonu 150 ppm olarak belirlenmiştir. Bu tür için 150 ppm deki toleransı % 84,5 olarak bulunmuştur. Diğer türlere göre yine en toleranslı tür *C. truncatus* olmuştur. Katı ortamdaki tolerans deneylerinde de aynı tür daha toleranslı olarak kaydedilmiştir.

Tricholoma auratum içinde sıvı ortamdaki tolerans değerleri katı ortamdaki değerleri ile karşılaştırıldığında daha az olduğu görülmektedir. 150 ppm de %31,15 oranında toleranslı olduğu görülmüştür. 25 ve 75 ppm lik çinko varlığında sırasıyla % 96 ve % 77,09 oranlarında çinkoya karşı toleranslı olduğu görülmektedir.

*T. hirsuta, C. truncatus'*tan sonra sıvı ortamdaki 150 ppm de % 45 oranında en fazla direnç gösteren tür olmuştur.

Sıvı kültür ortamında geliştirilen fungusların kuru ve yaş miselleriyle yapılan denemelerde; biyosorpsiyon miktarının türden türe, yaş ve kuru misellere göre değiştiği görülmüştür. Dokuz makrofungus türünün biyosorpsiyon tarama çalışmasında kuru hücrelerle biyosorpsiyonda en yüksek Qmax değeri 38,04 mg Zn/g kuru biyomas ile *G. carnosum*'a aittir. *T. hirsuta* için bu değer 27,5 mg/g olmuştur. *P. arcularius*'in kuru hücreleri için Qmax 21,25 mg/g olarak tayin edilmiştir.

Yaş hücre biyosorpsiyon denemelerinde 33,3 mg/g Qmax değeri ile *Ganoderma carnosum* en fazla biyosorpsiyon aktivitesi göstermiştir. *L. betulina* için bu miktar 25,25 mg/g olurken, *T. hirsuta* için 27,7 mg/g dır. Kuru ve yaş hücrelerle biyosorpsiyon sonuçları sadece *T. hirsuta* için birbirine eşittir. *T. auratum ve L. nuda* türlerinde yaş hücre biyosorpsiyon değerleri birbirine eşittir. *Ganoderma sp, P. arcularius* ve *R. roseolus* türleri için Qmax değerleri de birbirlerine yakın sonuçlardır.

Katı ve sıvı ortamda yapılan tolerans denemelerinde metal iyonlarına en dirençli tür olan *Clavariadelphus truncatus* izolatının kuru ve yaş hücre biyosorpsiyon sonuçlarıda sırasıyla 20,06 mg/g ve16,03 mg/g olarak gözlenmiştir. Ayrıca sıvı kültürde tolerans denemeleri sonucu gerçekleştirilen ölçümlerde 150 ppm lik kültür sıvısında kalan metal iyon miktarı 134 ppm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre *C. truncatus'un g*elişen miselleriyle gerçekleştirdiği biyosorpsiyon miktarı metale en dirençli tür olmasına rağmen oldukça düşüktür. Bu da bize toleransının (direncinin) yüksek olmasına karşın metal iyonlarını çok miktarda biyosorbe ettiği anlamına gelmediğini düşündürmektedir. Bazı araştırmaların sonuçlarına göre mikrobiyal biyomas tarafından metal adsorpsiyonu ile metal toleransı arasında herhangi bir bağlantının olmadığı gösterilmiştir (Rho, J.Y., and Kim, J.H, 2002).

Metal içeren sıvı kültürde inkübasyon sonunda fungusların biyosorpsiyon değerlerini belirlemek için ortamda kalan metal miktarlarının ölçümleri yapılarak türlerin Qmax sonuçları hesaplanmıştır. *G. carnosum* 150 ppm lik metal varlığında en fazla biyosorpsiyon aktivitesine sahip tür olarak bulunmuştur. Tolerans sonuçlarına göre *C. truncatus* diğer türlerden daha toleranslı olmasına rağmen metal iyonlarının biyosorpsiyonu açısından *G. carnosum* daha başarılı olmuştur. Ayrıca başlangıç metal miktarının artmasıyla biyosorpsiyon oranınında arttığı kaydedilmiştir. *G. carnosum* için 150 ppm lik konsantrasyonda Qmax değeri 138 mg/g kuru biyomas olarak hesaplanmıştır. Oysa ki en fazla metal içeren ortamda misel gelişimi en az *G. carnosum* için gözlenmiştir.

Gelişen misellerle çinko biyosorpsiyon miktarları *G. carnosum, T. hirsuta, T. auratum ve C. truncatus* sırasınca azalmıştır. Tolerans değerleride *C. truncatus, T. hirsuta, T. auratum ve G. carnosum* olarak azalmaktadır. Gelişen misellerle biyosorpsiyon miktarları, kuru ve yaş hücrelerle gerçekleştirilen biyosorpsiyon denemelerinde elde edilen Qmax değerlerinden daha fazladır. Yalnızca *T. auratum* için aynı sonuç geçerli değildir. Bu izolatın kuru ve yaş hücreleriyle elde edilen sonuçlar daha başarılıdır.

Konsantrasyonun artmasıyla birlikte tolerans değerleride azalmıştır. Bu durumdan en az seviyede etkilenen tür *C. truncatus'tur. C. truncatus* çinkoya karşı misellerin hassasiyeti ve bunların metal bağlayıcılık özelliği çinko alımını önlemede etkili olmuş olabilir. Katı ve sıvı ortamda gerçekleştirilen tarama çalışmaları sonucunda

atık sulardan ağır metallerin gideriminde *T. hirsuta ve G. carnosum* mantarlarının canlı miselleri kullanılabilir. Bu sonuçlara göre metal içeren ortamlarda misel gelişimi ile biyosorpsiyon arasında doğru orantı olmadığı görülmektedir. Metal iyonlarını biyosorbe edebilme yeteneği ile hücre miktarı arasında direk ilişki bulunmamaktadır. En toleranslı tür olan ancak metal biyosorpsiyonu en az olan *C. truncatus* ile tolerans değeri en az olmasına rağmen en fazla metal akümüle eden *G. carnosum'*un misel yapılarının ve hücre içi metabolizmalarının da detaylı olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Ağır metal kirliliği olan alanların mikorizal fidelerle ağaçlandırılması ile ıslah çalışmalarında *C. truncatus, T. auratum, L. nuda, R. roseolus* kullanılabilir fungus izolatları olarak önerilebilir.

Katı ve sıvı ortamdaki tolerans denemeleri, kuru ve yaş hücrelerle biyosorpsiyon denemeleri ve büyüyen hücrelerle biyosorpsiyon sonuçlarına göre *G. carnosum* izolatının farklı hücreleri ile biyosorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Sıvı kültürde geliştirilen *Ganoderma carnosum* misellerinin 12 şer saat arayla alınan örneklerinin kuru ağırlıkları belirlenerek fungusa ait büyüme eğrisi çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hücre miktarının en fazla arttığı zaman aralığı 192. saat olarak tespit edilmiştir. Büyüme eğrisine ait grafiğe bakıldığında 108. ve 192. saatte olmak üzere iki farklı noktada hücre miktarının arttığı görülür. Bu durumu iki farklı karbon kaynağı kullanan hücrelerde görmekteyiz. *G. carnosum* hücreleride iki faklı karbon kaynağı kullanan bir fungus türüdür. 216. saatten itibarende hücre miktarında belirgin bir azalma görülmüştür.

Büyüme eğrisi çıkarılan *G. carnosum'a* ait farklı hücre tipleri ile 100 ppm çinkoda biyosorpsiyon aktiviteleri araştırılmıştır. Alginatla immobilize edilmiş hücrelerde ilk yarım saat içinde hızlı biyosorpsiyon, 1. saat sonuna kadar sonucun değişmediği, 8.saate kadar da yavaş yavaş bir azalma olduğu görülmüştür. 12. saatte elde edilen sonuç ise 30.dakika da elde edilen sonuçtan şaşırtıcı olarak daha yüksek bulunmuştur. İlk 1 saat içinde hızlı bir biyosorpsiyondan sonra desorpsiyon sürecine girdiği 12. saatte (6,86 mg/g) tekrar biyosorpsiyon gerçekleşmiş olduğu düşünülebilir. Biyosorpsiyon desorpsiyon sürecinin dönüşümlü olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Bu süreçte hücre duvarı yapısı, alginat ve çinko metalinin etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Agarla immobilize hücrelere göre daha iyi sonuç vermiştir. Ancak kontrolüyle karşılaştırıldığında kayda değer bir fark görülmemektedir.

Agar ile immobilize edilmiş hücrelerin sonuçlarında da 2. saatin sonunda elde edilen Qmax değeri diğer saatlere göre daha yüksektir. 2. saatin sonundan itibaren yavaş yavaş bir azalma görülmektedir. Alginatla immobilize edilmiş hücrelerde olduğu gibi 12. saatte (3,26 mg/g) tekrar bir artış kaydedilmemiştir.

Dinlenen ve ölü hücrelerin sonuçlarını karşılaştırdığımızda dinlenen hücrelerde ölü hücrelere göre daha fazla Qmax değeri elde edilmiştir. Her iki hücre tipinde de 12. saatin sonunda en yüksek değerlerine ulaştığı görülmüştür. Dinlenen hücreler için Qmax 31 mg/g ölü hücreler için Qmax 18,7 mg/g olarak hesaplanmıştır. Bu iki farklı hücre tipinde elde edilen sonuçların hücre duvarı yapısındaki farklılıktan kaynaklanması muhtemeldir. Metallerin hücre duvarı bileşenleriyle etkileşimleri biyosorpsiyon sürecinde etkilidir. Isısal ve kimyasal yöntemlerle öldürülen hücrelerin biyosorpsiyon kapasitesini artırdığı yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Yetiş et al., 2000). Dinlenen hücre yüzeyindeki farklılıklar ölü hücrelerden daha iyi bir sonuç elde edilmesinin sebebi olabilir. Metal iyonlarının hücre yüzeyine tutunması (pasif biyosorpsiyon) ve sonra hücre içine alınması (aktif biyosorpsiyon) ile biyosorpsiyon süreci tamamlanır.

Kuru ve yaş hücrelerle yapılan biyosorpsiyon tarama çalışmalarında elde edilen sonuçlar (*G.carnosum'*a ait) karşılaştırıldığında belirgin bir fark gözlenmiştir. Dinlenen ve ölü hücrelerle yapılan çalışmaların sonuçlarına göre kuru ve yaş hücrelerin biyosorpsiyon değerleri daha yüksektir. Dinlenen hücrelerde yıkama işlemi yapılmamıştır. Yaş hücrelerle biyosorpsiyon çalışmasında ise birkaç kez distile su ile yıkama ve hücrelerin fazla suyu el basıncıyla giderilmiştir. Hücrelere uygulanan işlemler ile hücre ve hücre duvarı yapısında değişiklikler meydana gelebilir bu durumda biyosorpsiyon kapasitesini etkileyebilir. Yapılan benzer çalışmalarda da elde edilen en iyi Qmax değerleri dinlenen hücrelere, en düşük değerlerde canlı hücrelere aittir (Yetiş et al., 2000).

Canlı hücreler, ölü ve dinlenen hücrelerle karşılaştırıldığında daha düşük biyosorpsiyon kapasitesi görülmüştür. 12. saatin (Qmax 11 mg/g) sonunda biyosorpsiyon sürecinin dengeye ulaştığı kaydedilmiştir. Metal içeren sıvı ortamdaki 10 günlük inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında (150 ppm de) daha düşük değerler elde edilmiştir. İki çalışma arasında çeşitli faktörlerin farklılığı söz konusudur. Tolerans çalışmasında büyüyen hücreler ilk dakikadan itibaren metale

maruz kalmış ve metal içeren ortamda gelişimini tamamlamıştır. Bu çalışmada ise ortama 192. saatin sonunda metal ilavesi yapılmıştır. Burada kültür yaşı, ortamdaki metabolitlerle çinko arasındaki kimyasal bir etkileşim, başlangıç metal konsantrasyonu farkı, metalle temas süresi, metabolik aktivitelerin azalması veya hızlanması gibi faktörler biyosorpsiyon aktivitesini etkilemiş olabilir. Yine katı ortamdaki tolerans çalışmasında 75 ppm lik çinko da *G.carnosum'un* çinkodan etkilenmediği, 225 ppm de büyümenin yüksek oranda inhibe olduğu bulunmuştur.

Eksopolisakkarit ile yapılan denemelerde de agar ve alginatla immobilize hücrelere göre daha fazla biyosorpsiyon kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. 2. saatin sonunda dengeye ulaştığı yavaş yavaş gerçekleşen bir artışla da 12. saatin (Qmax 16,2 mg/g) sonunda en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür. Dinlenen ve ölü hücrelerden sonra en iyi biyosorpsiyon aktivitesini göstermiştir.

Kurutulmuş-öğütülmüş mantarla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara bakıldığında biyosorpsiyon kapasitesinin 2. saatin (Qmax 12,9 mg/g) sonunda en yüksek değerini verdiği, 12. saatte Qmax miktarının 5,2 mg/g a gerilediği görülmüştür.

Pozitif kontrol olarak kullanılan aktif karbon ve kile ait Qmax değerleri karşılaştırıldığında kilin adsorpsiyon süresince yavaş yavaş arttığı ve 12. saatte (16,7 mg/g) maksimum değerine ulaştığı kaydedilmiştir. Aktif karbonda ise 2. saatin sonundaki adsorpsiyon kapasitesinin en yüksek değerinde olduğu, sonraki saatlerde ise yavaş yavaş azaldığı kaydedilmiştir (12. sa. Qmax 2,8 mg/g).

Tüm hücre tipleri göz önünde bulundurulduğunda en iyi sonuç dinlenen hücrelere daha sonrada ölü hücrelere aittir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda *G.carnosum'un* büyüyen hücreleriyle çinko biyosorpsiyonu endüstriyel atık sulardan çinko gideriminde iyi bir kapasiteye sahip olduğu görülmüştür (150 ppm Zn konsantrasyonu, pH 6, sıcaklık 27 °C ve çalkalama hızı 150 rpm de).

Ölü biyomasın biyoadsorpsiyon kapasitesi canlı biyomastan daha az veya eşit olabilir, metal biyoadsorpsiyon kapasitesini artırmada alkali işlemlerinin uygulanmasıda etkili olabilir. Canlı *Mucor rouxii* tarafında Zn biyoadsorpsiyonu 4,89 mg/g olarak bulunmuştur (Yan, G., and Viraraghavan, T., 1999).

Düşük pH Zn biyosorpsiyonunu azaltır, mantarlarda bağlanma bölgeleri için hidrojen iyonları ile yarışmasından dolayı. Ayrıca ligandların varlığıda metal alımını azaltan bir faktördür (Zhou, 1999).

Misellerle ağır metallerin alımı ve taşınımı çalışması, mikorizal bitki köklerine metal alımı ve sürgünlerde artan konsantrasyonlarda alımda değerlendirmek için kullanılabilir. Artan ağır metal konsantrasyonlarında toprakta geniş miseller oluşturma yeteneğinin yanında funguslarda, misellerin bağlama ve taşıma özellikleri de mikoriza ağır metal etkileşiminde önemlidir. Ekstramatriksel misellerin ağır metal bağlamaları mikorizanın etkisini artırır. Ekstramatriksel misellerin küçük biyokitleleri, ağır metallerle daha geniş miktarlarda mücadeleyi sınırlandırır (Vodnik et al.,1998).

Fungal türler arasındaki sorpsiyon farklılıkları hücre duvarı kompozisyonu ve pelletlerin fiziksel özellikleri farklılığıyla açıklanabilir. Biyoteknolojik açıdan bakıldığında *Phanerochaete chrysosporium, Pleurotus ostreatus ve O. mucida* en iyi mekanik özellikleri göstermektedir. Volesky'e göre *Rhizopus arrhizus* ve *Aspergillus oryzae* ile metal sorpsiyonu, biyokütlenin üretimi için kullanılan kültür ortamı içeriğinden etkilenmiştir. Gadd'a göre (1990) mikrobiyal hücre duvarı yapısı substrat kompozisyonuna bağlı olduğundan farklı besiyerlerinde gelişme metal bağlama kapasitesini etkileyebilir. *Phanerochaete chrysosporium* ile bakır sorpsiyonunda besiyeri kompozisyonunun etkisini çalışmak için tanımlı mineral besiyeri (MM), mısır-steep (CS), sığır eti ekstratı (BE) ve patates ekstratı (PF) içeren üç kompleks besiyeri kullanılmıştır. Mısır step, basidiomisetlerin kültürasyonunda yaygın olarak kullanıldığı ve iyi biyokitle verimi sağladığı için seçilmiştir (Gabriel et al., 2001).

Toksik metallere ektomikorizal fungusların cevapları, kirlenmiş toprakların ıslahında ve bitki gelişimi ve üretimi üzerinde etkili olabilir. Farklı bitki-fungal kombinasyonları arasındaki cevaplarda geniş bir şekilde belirlenmesine rağmen ektomikorizal funguslar tarafından metal fitotoksisitesinin azalışı geniş biçimde gösterilmiştir (Blaudez et al. , 2000). Kültür ortamının içeriği ve pH değişikliği metal bağlama kapasitesinde bazı iyileştirmeler sağlayabilir. Beyaz çürükçül fungusların belli türleri belli metallere karşı belirgin ilgiye sahip olabilir. Bu da bunların metal bağlayıcı hücre yapılarının kimyasal içeriğinin farkından kaynaklanmaktadır (Gabriel et al., 1996, 2001). Mantarlardaki metal seviyeleri için türler arasındaki farklılıklar toprak faktörlerinden daha önmelidir (Gast et al.,1988). Ektomikorizal mantarlar hem ekonomik hem ekolojik yönden metal kontaminasyonlu alanların iyileştirilmesinde başarıyla uygulanabilir (Hartley et al., 1997a)

*Suillus bovinus'*un yüksek dış metal konsantrasyonunda iğne yapraklı çamlarda çinko miktarını azalttığı keşfedilmiştir. Bu etki, fungus çinko ile 6 aylık ön muameleye tutulduğunda artmıştır (Bücking and Hyser, 1994). Başka bir çalışmada Denny ve Wilkins (1987a,b) mikorizal *betula*'daki çinko toksisitesinin, hif yüzeyine çinko adsorpsiyonu yoluyla azaltıldığını göstermişlerdir.

Karışık metal kontaminasyonlu alanlarda ağır metallerin varlığı teknolojik işlemlerle önemli bir sınırlama olmaktan çıkarılabilir. İleriki araştırmalar metal fungal ilişkileri için olacak, böylece metaller tarafından arındırılmış lignolitik enzimlerde *in vitro* enzimatik süreçlere dayanmasının regülasyon veya atık sulardan metallerin seçici alımı için fungal misellerin orijinal biyoteknolojik prosesler gibi uygulamaların gelişimi veya ilerlemesi ve basit ekolojik kavramların anlaşılması için iyi bir fırsat olabilir (Baldrian, 2003).

Makrofunguslar tarafından endüstriyel atık sulardan ağır metallerin giderimi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar genellikle biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi, metal alım mekanizmaları ve metallerin geri kazanılmasına yöneliktir. Yaptığımız bu çalışma ile gerçekleştirilen biyosorpsiyon çalışmalarına bir katkı sağlamak, daha önce çalışılmamış makrofungusların, farklı çinko konsantrasyonlarında biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan ektomikorizal fungus izolatlarının dördü *Tricholoma auratum*, *Lepista nuda*, *Clavaradelphus truncatus* ve *Rhizopogon roseolus* idi. Toprak ortamındaki bu izolatların yüksek çinko toleransı simbiyotik koşullar altındaki metal toleransı hakkındaki çalışmalara önderlik edebilir.

Makrofunguslar ile yapılan bu tip ağır metal giderimi çalışmaları ile endüstride daha ucuz maliyetli biyosorbentlerin çeşitliliği ortaya çıkarılabilir. Büyüyen hücrelerle metal gideriminde iyi sonuçlar alınabilir. Bununla birlikte çalışmamızda biyosorpsiyon kapasiteleri belirlenen fungusların, metal alım mekanizmalarının aydınlatılması, metalin geri kazanımı, biyosorpsiyon değerlerinin artırılmasına yönelik optimal şartların belirlenmesi, metallerin makrofunguslarda ortaya çıkardığı fizyolojik etkiler, farklı metaller ile biyosorpsiyon, *G.carnosum'*un hücre duvarı yapısının araştırılması gibi çok yönlü çalışmalara konu olmasını bekliyoruz.

5. KAYNAKÇA

Anonim, 2005 a: http://www.maden.org.tr/yeni3/yayinlar/cinko.htm

Anonim, 2005 b: http://www.biltek.tubitak.gov.tr/periyodik/kullanim2.html

Anonim, 2005 c: http://www.nutrifarma.com.tr/index.asp?s=vitamin&id=cinko

Anonymus, 2005 d:http://www.ead.anl.gov/pub/doc/zinc.pdf

Arıca, M.Y., Kaçar, Y. and Genç, Ö., 2001, Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution, Bioresource Technology, 80, 121-129.

Baldrian, P., and Gabriel, J., 1997, Effect of Heavy Metals on the Growht of Selected Wood-Rotting Basidiomycetes, 42(5), 521-523.

Baldrian, P., Wıesche, C., Gabriel, J., Nerud, F., and Zadražıl, F., 2000, Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil, Applied and Environmental Microbiology, 66, 6, 2471-2478.

Baldrian, P., 2003, Ineractions of heavy metals with white-rot fungi, Enzyme and Microbial Technology, 32, 78-91.

Bat, L., Sezgin, M., Gündoğdu, A. ve Çulha, M., 1999, Toxicity of Zinc, Copper and Lead to *Idotea baltica* (*Crustacea , Isopoda*), Tr. J.of Biology, 23, 465-472.

Bat, L., Akbulut, M., Çulha, M., Gündoğdu, A., ve Satılmış, H.H., 2000, Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex* (L.,1758), Turk J. Zool, 24, 409-415.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Bayramoğlu, G., Bektaş, S. ve Arıca, M.Y., 2003, Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*, Journal of Hazardous Materials, B101, 285-300.

Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J.V., Ahonen-Jonnarth, U., Fınlay, R., Botton, B., and Calot, M., 2000, Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*, Mycol. Res.,104(11), 1366-1371.

Brown, M.T., and Wilkins, D.A., 1985, Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*, New Phytol., 99, 101-106.

Brunner, I., and Frey, B., 2000, Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings, Environmental Pollution ,108,121-128.

Bücking, H., Heyser, W., 1994, The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L., Plant Soil., 167, 203-212.

Chang, J.S., Huang, J.C., Chang, C.C., and Tarn, T.J.,1998, Removal and Recovery of Lead Fixed-Bed Biosorption With Immobilized Bacterial Biomass, Wat. Sci. Tech., 38, 4-5, 171-178.

Colpaert, J.V., Vandenkoornhuyse, P., Adriaensen, K., and Vangronsveld, J., 2000, Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycetes *Suillus luteus*, New Phytol, 147, 367-379.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Čurdova, E., Vavruškova, L., Suchánek, M., Baldrian, P., and Gabriel, J., 2004, ICP-MS determination of heavy metals in submerged cultures of wood-rotting fungi, Science Direct, 62, 483-487.

Çeribaşı, I.H., ve Yetis, U., 2001, Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system-Kinetics, Water SA, 27, 1, January 2001.

Dedeoğlu, E.D., 2000, Kurşun Pollusyonlu Topraklardan İzole Edilen Fungusların Kurşun Toleranslarının ve Atık Sulardaki Kurşunu Sorblama Yeteneklerinin Belirlenmesi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi).

Denny, H.J., and Wilkins, D.A., 1987a, Zinc tolerance in *Betula* spp. III. variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates, New Phytol., 106, 535-544.

Denny, H.J., and Wilkins, D.A., 1987b, Zinc tolerance in *Betula* spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity, New Phytol., 106, 545-553.

Dilek, F.B., Erbay, A., ve Yetis, U., 2002, Ni (II) biosorption by *Polyporous versicolor,* Process Biochemistry, 37, 723-726.

Dökmeci, İ., 1994, Toksikoloji: Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, 2. bs., İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 342-343.

Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y. ve Aksu, Z., 2003, Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing *Aspergillus niger*, Process Biochemistry, 38, 1647-1651.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Fay, D.A., and Mitchell, D.T., 1999, A Preliminary Study of the Mycorrhizal Associations of Tree Seedlings Growing on Mine Spoil at Avoca, Co. Wicklow, Biology and Environment, 99B, 1, 19-26.

Gabriel, J., Vosahlo, J., and Baldrian, P., 1996, Biosorption of Cadmium to Mycelial Pellets of Wood-Rotting Fungi, Biotechnology Techniques, 10, 5, 345-348.

Gabriel, J., Baldrian, P., Hladikova, K., and Hakova, M., 2001, Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes, Letters in Applied Microbiology, 32, 194-198.

Gadd GM. (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. Experiential 46, 834-840.

Gast, C.H., Jansen, E., Bierling, J., Haanstra, L., 1988, Heavy metals in mushrooms and their relationships with soil characteristics, Chemosphere, **17**, 789-799.

Hartley, J., Cairney, J.W.G., and Meharg, A.A., 1997a, Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment, Plant and Soil, 189: 303-319.

Hartley, J., Cairney, J.W.G., Sanders, F.E., and Meharg, A.A., 1997b, Toxic interactions of metal ions (Cd^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} and Sb^{-3}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi, New Phytol., 137, 551-562.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Helmisaari, H.S., Makkonen, K., Olsson, M., Viksna, A., and Mälkönen, E., 1999, Fine-root growth, mortality and heavy metal concentrations in limed and fertilized *Pinus silverstris* (*L.*) stands in the vicinity of a Cu-Ni smelter in SW Finland, Plant and Soil, 209, 193-200.

Ilhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kılıçarslan, S. ve Özdağ, H., 2004, Removal of chromium, lead and copper ions from indüstrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*, Tukish Electronic Journal of Biotechnology, 2, 50-57.

Jentschke, G., and Godbold, D.L., 2000, Metal toxicity and ectomycorrhizas, Physiologia Plantarum, 109: 107-116.

Kalač, P., and Svoboda, L., 2000, A review of trace element concentrations in edible mushrooms, Food Chemistry ,69, 273-281.

Karakoç, M., ve Kargın, F., 1999, *Tilapia nilotica'*da Metal ve Metal Karışımının Dalak, Beyin ve Kas Dokularındaki Birikimi, Tr .J. of Zoology, 23, 2, 719-724.

Kierstan, M.P.J. and Coughlan, M.P., 1985, Immobilisation of Cells and Enzymes by Gel Entrapment, Immobilized Cells and Enzymes Ed. Woodward, J., IRL Press, 39-48 s.

Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H., and Yun, J.W., 2002, Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media, Letters in Applied Microbiology, 34, 56-61.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Kovačevic, Z.F., Sipos, L., and Briški, F., 2000, Biosorption of Chromium, Copper, Nickel and Zinc Ions onto Fungal Pellets of *Aspergillus niger* 405 from Aqueous Solutions, Food technol. biotechnol., 38 (3), 211-216.

Köstekçi, H., Yamaç, M., Solak, M.H., 2004, Meşelik Kampüsü (Osmangazi Üniversitesi–Eskişehir) ve Civarında Belirlenen Bazı Makrofungus Türleri, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21- 24 Haziran 2004, Adana.

Köstekçi, H., 2004, Türkmenbaba Dağı (Eskişehir) Makrofungusları Üzerine Taksonomik Araştırmalar, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K., Fabre, B., 2002, Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture, The science of the Total Environment, 291, 73-83.

Luef, E., Prey, T., and Kubicek, C.P., 1991, Biosorption of zinc by fungal mycelial wastes, Appl. Microbiol. Biotechnol., 34: 688-692.

Muraleedharan, T.R., Iyengar, L., and Venkobachar, C., 1995, Screening of Tropical Wood-Rotting Mushrooms for Copper Biosorption, Applıed nd Environmental Microbiology, 61, 9, 3507-3508.

Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996, Su Kimyası, 83-84, Beta BasımYayım Dağıtım AŞ., İstanbul.

Ortaş, İ., Ergün, B., Ortakçı, D., Ercan, S., Köse, Ö., 1999, Mikoriza Sporlarının Üretim Tekniği ve Tarımda Kullanımı, Tr. J. Of Agriculturel and Forestry, 23, 4, 959-968.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Phillips, C.R. and Poon, Y.C., 1988, Immobilization of Cells, Springer-Verlag, 11-65s.

Rho, J.Y., and Kim, J.H, 2002, Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of *Streptomycetes*, J. Microbiol. 40, 51-54.

Raout, G.R., and Das, P., 2002, Effect of Metal Toxicity On Plant Growth and Metabolism: I. Zinc, Plant Biotechnology Division, Regional Plant Resource Centre, Nayapalli , Bhubaneswar-751 015, India.

Sağ, Y., Nourbakhsh, M., Aksu, Z. ve Kutsal, T., 1995, Dolgulu Kolon Reaktörde Ca-Aljinat ve Tutuklanmış Mikroorganizma Sistemleriyle Karşılaştırmalı Ağır Metal Adsobsiyonu, Tr. J. of Engineering and Environmental Sciences, 19, 145-157.

Sağlam, N., Say, R., Denizli, A., Patır, S., Arıca, M.Y., 1999, Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to *Phanerochaete chrysosporium* mycelium, Process Biochemistry, 34, 725-730.

Say, R., Denizli, A., and Arıca, M.Y., 2001, Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Bioresource Technology, 76, 67-70.

Sıng, C., and Yu, J., 1998, Coper Adsorption and Removal From Water by Lıvıng Mycelium of White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Wat.Res., 32, 9, 2746-2752.

Spurgeon, D.J., Tomlin, M.A., and Hopkin, S.P., 1997, Influence of Temperature on the Toxicity of Zinc to the Earthworm *Eisenia fetida*, Bull. Environ., Contam. Toxicol, 58: 283-290.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Tam, P.C.F., 1995, Heavy metal tolerance by ectomycorhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*, Mycorrhiza, **5**, 181-187.

Tekeli, S.K., Toker, N.Y., ve Tekeli, F., 2002, Çinkonun Ratlarda Canlı Ağırlık ve Bazı Serum Enzimleri Üzerine Etkisi, Turk J.Vet. Anim. Sci, 26, 79-84.

Tuna, H., 2001, Bozüyük Yöresinde Endüstriyel Faaliyetlerden Kaynaklanan Ağır Metallerin Bitki ve Topraktaki Birikimi, Anodolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Turnau, K., Przybylowicz, W.J.,and, Przybylowicz, M.J., 2001, Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas-as revealed by micro–PIXE analysis, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 181, 649-658.

Vodnik, D., Byrne, A.R., and, Gogala, N., 1998, The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture, Mycol. Res., 102 (8): 953-958.

Volesky, B., and Ha, M.P., 1995, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyce cerevisiae*, Appl. Microbiol Biotechnol.,42(5): 797-806.

Yalçınkaya, Y., Soysal, L., Denizli, A., Arıca, M.Y., Bektaş, S. ve Genç, Ö. 2002, Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor*, Hydrometallurgy, 63, 31-40.

Yan, G., and Viraraghavan, T., 2000, Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii,* Water SA, 26, 1, 119.

Yetis, U., Dolek, A., Dilek, F.B. ve Ozcengiz, G., 2000, The Removal of Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium*, Wat. Res., 34,16, 4090-4100.

5. KAYNAKÇA (Devam)

Zhou, J.L., 1999, Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi, Appl. Microbiol. Biotechnol, 51: 686-693.

Zulfadhly, Z., Mashitah, M.D., and Bhatia, S., 2001, Heavy metals removal in fixed-bed column by the macro fungus *Pycnoporus sanguineus*, Environmental Pollution,112 , 463-470.