

Farklı Konsantrasyonlarda Ham Petrolün Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Misel Gelişimi Üzerine Etkisi

Numan Yıldırım¹, Nuran Cıkcıkoğlu Yıldırım²,
Hilal Acay³, Abdunnasır Yıldız⁴

Özet

Farklı ham petrol konsantrasyonlarının (%1, 2 ve 2.5) malt ekstrakt agarda geliştirilen bazı beyaz çürükçül fungusların (*Coriolus versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus florida*) misel gelişimi üzerine etkileri çalışıldı. Petrolün düşük konsantrasyonlarda, çalışılan tüm fungusların misel gelişimini sitümüle ettiği, buna karşın petrolün yüksek konsantrasyonunun (%2,5) ise misel gelişimini genel anlamda belirgin bir şekilde inhibe ettiği bulundu. One-way ANOVA ve Duncan testi tüm gruplarda istatistiksel farklılıkların değerlendirilmesi için kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme neticesinde; çalışılan fungusların petrol uygulamasına karşı misel gelişimi açısından istatistiksel olarak farklı yanıtlar ortaya çıkardığı saptandı. Sonuç olarak kontamine ortamların iyileştirilmesine yönelik biyodegradasyon çalışmaları için *Pleurotus florida* ve *Pleurotus sajor-caju*'nun en uygun funguslar olduğu saptanmıştır. Misel gelişimi, yakıt endüstrisinin yanı sıra tekstil ve **kâğıt endüstrisi** gibi biyoteknolojik uygulama alanlarında da öneme sahiptir.

Anahtar kelimeler: Ham petrol, beyaz çürükçül funguslar, misel gelişimi.

Giriş

Doğal olarak saf atmosfer az veya çok miktarda, büyük bölümü suni olan yabancı maddelerin üretimi ile kirletilir. Bunların başında petrol ürünleri ve endüstriyel kirleticiler gelmektedir. Özellikle son yıllarda, endüstriyel aktivitenin, şehirleşmenin ve nüfusun artması ile kirletici maddelerin kullanımı ve miktarı da hızla artmaktadır.

Petrol ve petrol türevi olan Poliaromatik Hidrokarbonlar (PAH), kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bulaşan ve sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar. Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda, 1.7- 8.8 milyon metrik ton petrol üretildiği ve bunun

¹ Yrd. Doç. Dr., Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevre Bilimleri AbD., Yazışmadan sorumlu yazarın e-posta adresi: numanyildirim@tunceli.edu.tr

²Yrd. Doç. Dr., Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevre Bilimleri AbD.

³ Doktora Öğrencisi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AbD.

⁴ Prof. Dr., Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji AbD.

önemli bir miktarın da zararlı olarak ya kullanım sonucu ya da kullanılmadan çevreye döndüğü bilinmektedir [1].

Çevreye dökülen PAH kirliliğinin etkisi uzun ve kısa süreli olabilir. Uzun süreli etki henüz iyi bilinmezken, kısa süreli etki oldukça iyi aydınlatılmıştır ve bu etki de kaplama veya havasız bırakma ve zehirlenme şeklindedir. Bunlardan kaplama veya havasız bırakma ışığın geçişini azaltma, çözünmüş oksijeni azaltma, deniz kuşlarına zarar verme ve havasız bırakma şeklinde zararlı olur. Ayrıca, PAH'ların toksik, mutajen ve kanserojen özelliklerinin de olduğu bilinmektedir [2, 3].

Beyaz çürükçül funguslar, *Basidiomycetes* sınıfına dahil olup, odunun bileşenlerini parçalar ve odunda beyaz renkli bir kalıntı oluşmasına neden olurlar. Doğal şartlar altında ölü **ya da** canlı odun üzerinde lignini etkin bir şekilde yıktığı ifade edilen canlıların sadece beyaz çürükçül funguslar olduğu rapor edilmiştir [4, 5].

Hava toprak ve tatlı suların özellikle poliaromatik hidrokarbonlarca (PAH) kontaminasyonu, bu PAH bileşiklerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilere sahip olmaları sebebiyle büyük problem teşkil etmektedir [6,7]. Reddy, [8] lignini yıkan beyaz çürükçül fungusların aynı zamanda yapısal olarak geniş spektrumda diğer pek çok toksik çevresel kirleticiyi de mineralize edebildiklerini rapor etmiştir. Aynı şekilde Lang ve ark., [9] lignin yıkan beyaz çürükçül fungusların rekalsitran özelliğe sahip poliaromatik hidrokarbonları yıkma yeteneğine sahip olduğunu ve bunların bu eşsiz yeteneklerinin kontamine toprakların iyileştirilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, ham petrol ilave edilen ortamlarda gelişimi en fazla indüklenen beyaz çürükçül fungus türünün tespiti ile kontamine olmuş çevrelerin iyileştirilmesi amaçlı yürütülmesi planlanan ileri çalışmalara ön bilgi sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan 4 adet beyaz çürükçül fungus türü (*Coriolus versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus florida*) Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji araştırma laboratuvarındaki kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Ham petrol ve hazırlanan ortamlar

Çalışmada kullanılan ham petrol Batman TÜPRAŞ rafinerisinden sağlanmış ve kullanılmadan önce %2 aseton kullanılarak magnetik karıştırıcıda 2 saat süreyle çözülmüştür. Besiyeri ortamı olarak Malt ekstrakt agar (MEA) (Sigma) kullanılmıştır. Uygulama grupları için MEA plakları %1, 2 ve 2.5 oranlarında %2 aetonla seyreltilmiş ham petrol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak hem saf MEA besiyeri hem de %2 aseton içeren MEA plakları hazırlanmıştır. Tüm gruplar için deneysel çalışma 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

Misel gelişiminin değişimi

Farklı oranlar ham petrol ile hazırlanmış MEA (Malt Extract Agar) plaklarına ana stoktan alınan fungus kültürleri eklenmiş ve 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ham petrolün fungus üremesi üzerine yapmış olduğu indüksiyon veya inhibisyon etkisi kontrol plaklarındaki üremeye karşılaştırılarak hesaplanmış ve % inhibisyon veya indüksiyon olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel yöntem

İstatistiksel değerlendirmeler; "SPSS Windows Version 12.0" paket program ile yapılmıştır. Değişkenlere ilişkin veriler, ortalama \pm standart hata ile verilmiştir. İki den fazla olan deney gruplarının karşılaştırılmasında, tek yönlü Varyans Analizi (one way ANOVA) kullanılmıştır. Deneysel sonuçların ikili karşılaştırılmasında ise "Duncan Testi" uygulanmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

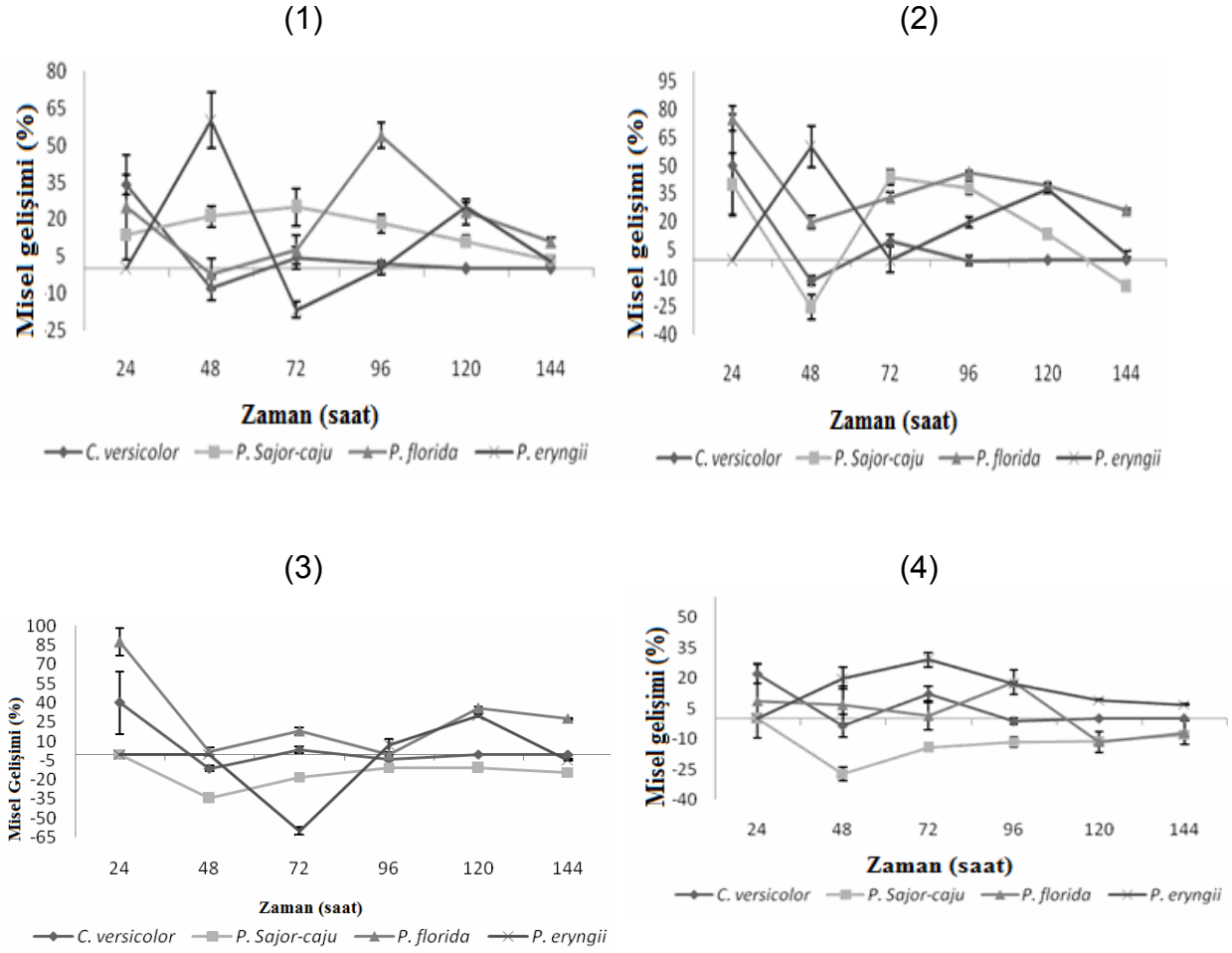
Yapılan bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ham petrolün bazı beyaz çürükçül fungusların katı besiyeri ortamındaki misel gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bilindiği üzere beyaz çürükçül funguslar, sahip oldukları ekstraselüler lignolitik enzimleri sayesinde pek çok rekalsitran özellikteki aromatik ve fenolik bileşikleri yıkabilme kapasitesine sahiptirler.

%1'lik ham petrol uygulaması sonucunda *P. sajor-caju* ve *P. florida*'nın misel gelişiminin kontrol ortamına ve %2'lik aseton içeren uygulama grubuna göre indüklendiği görülmüştür. Her iki fungus üzerindeki bu indüksiyon etkisinin *P. sajor-caju*'nun 48. saatteki gelişimi hariç diğer tüm saatlerde %2'lik petrol uygulama grubunda da devam ettiği görülmektedir. *P. florida* için %2'lik ham petrol uygulama grubunda 144 saat boyunca devamlı bir indüksiyon gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (%2,5) ham petrol uygulama grubunda, *P. sajor-caju* için sürekli bir inhibisyon meydana gelirken, *P. florida* için ise indüksiyonun devam ettiği görülmüştür (Şekil 1).

Tablo 1. incelendiğinde; %1, 2 ve 2,5'lik ham petrol uygulama gruplarında özellikle 120 ve 144. saatlerde *P. sajor-caju* ve *P. florida* misel gelişim yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farkların ortaya çıktığı görülmüştür ($p < 0.05$). %2,5'lik ham petrol uygulama gruplarında ölçümlerin alındığı tüm saatler boyunca *C. versicolor* ile *P. eryngii*'nin misel gelişim değerleri arasında da istatistiksel olarak farklı sonuçların ortaya çıktığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, çalışılan fungusların ham petrole karşı farklı fizyolojik yanıtlar ortaya çıkardığını göstermektedir. Bu durumun sebebinin ise çalışılan fungusların sahip olduğu petrol bileşenlerini yıkımdan sorumlu olan enzimlerin farklı kalıplarını sentezlediklerini işaret edebilir.

Calder and Lader, [10] toluen ve fenol gibi petrol bileşenlerinin düşük konsantrasyonlarda gelişimi sitümüle ettiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızın sonucunda da aynı şekilde düşük konsantrasyonların gelişimi ündüklendiği görülmüştür. Leahy ve Colwell [11] ise yüksek konsantrasyonlarda hidrokarbon

bileşiklerin yıkımı baskıladığını saptamışlardır. Aynı şekilde bizim sonuçlarımızda da %2,5'lik ham petrol uygulamasının genel anlamda gelişimi baskıladığı gözlenmiştir.



Şekil 1. %1 ham petrol(1), %2 ham petrol (2), %2,5 ham petrol (3) ve %2 asetonun (4) *C. versicolor*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. eryngii*'nin misel gelişimi üzerine etkisi

Röling ve ark., [12] petrol bileşenlerinin yıkımı için aktif ve etkili türlerin izolasyonunun ve belirlenmesinin bu tarz çalışmalar için önemli olduğunu vurgulamıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda; ham petrolün varlığıyla gelişimleri indüklenen yani petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp daha fazla misel gelişim potansiyeli gösteren türlerin *P. sajor-caju* ve *P. florida* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.). Yüksek konsantrasyona sahip ortamda petrolü tolere edebilmesi ve misel gelişiminin kontrole ve %2'lik aseton grubuna göre yüksek olması sebebiyle, iyileştirilme çalışmalarında kullanılması gereken fungusun *P. florida* olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Tablo 1. %1, 2 ve 2,5'lik ham petrolün ve %2'lik asetonun *C. versicolor*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. eryngii*'nin misel gelişimi üzerine etkisi

Zaman (saat)	Misel gelişimi (%±SH)					
	24	48	72	96	120	144
%1 Ham petrol						
<i>C. versicolor</i>	340±40,0 ^a	*-7,8±5,1 ^b	4,5±4,5 ^b	1,9±1,3 ^c	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b
<i>P. Sajor-caju</i>	140±16,3 ^b	21,1±4,2 ^b	24,9±7,3 ^a	18,4±3,7 ^b	11,0±2,3 ^b	3,4±1,1 ^b
<i>P. florida</i>	25,0±21,1 ^c	*-2,1±6,3 ^b	7,5±5,9 ^{ab}	54,0±5,2 ^a	22,9±5,1 ^a	10,7±1,9 ^a
<i>P. eryngii</i>	0,0±0,0 ^c	60,0±11,2 ^a	*-16,6±3,4 ^c	0,0±2,2 ^c	25,0±1,8 ^a	3,0±1,0 ^b
%2 Ham petrol						
<i>C. versicolor</i>	100±54,7 ^a	*-11,2±2,3 ^{bc}	10,1±2,8 ^b	*-0,6±2,6 ^c	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^b
<i>P. Sajor-caju</i>	40±16,3 ^b	*-25,4±6,5 ^c	43,5±4,0 ^a	38,0±3,6 ^b	13,6±0,9 ^b	*-14,0±1,0 ^c
<i>P. Florida</i>	125±13,3 ^a	19,9±3,4 ^b	33,0±3,0 ^a	92,0±2,0 ^a	39,3±1,7 ^a	26,1±0,7 ^a
<i>P. eryngii</i>	0,0±0,0 ^b	60,0±11,2 ^a	0,0±6,8 ^b	19,9±2,8 ^{bc}	37,5±2,5 ^a	3,0±1,3 ^b
%2,5 Ham petrol						
<i>C. versicolor</i>	40,0±24,4 ^b	*-11,2±2,3 ^b	3,3±2,8 ^b	*-,9±1,2 ^{ab}	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^b
<i>P. Sajor-caju</i>	0,0±0,0 ^c	*-34,5±0,7 ^c	*-18,0±2,6 ^c	*-10,7±1,2 ^b	*-10,8±1,0 ^d	*-14,0±1,0 ^d
<i>P. florida</i>	87,5±10,5 ^a	2,2±2,9 ^a	17,7±2,8 ^a	*-0,6±0,7 ^{ab}	35,6±1,2 ^a	27,6±0,7 ^a
<i>P. eryngii</i>	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^a	*-59,9±3,0 ^d	6,6±4,9 ^a	30±1,4 ^b	*-4,5±0,8 ^c
% 2 aseton						
<i>C. versicolor</i>	22,0±4,8 ^a	*-3,3±5,6 ^b	2,3±3,5 ^b	*-1,3±1,6 ^b	0,0±0,0 ^a	,0±0,0 ^{ab}
<i>P. Sajor-caju</i>	0,0±0,0 ^c	*-27,1±3,3 ^b	*-14,4±1,4 ^c	*-11,4±2,3 ^b	*-11,0±0,9 ^b	*-7,8±1,5 ^b
<i>P. florida</i>	8,7±1,8 ^b	6,7±9,3 ^{ab}	1,2±6,8 ^{bc}	18,0±5,9 ^a	*-11,5±5,2 ^b	*-6,9±5,8 ^b
<i>P. eryngii</i>	0,0±0,0 ^c	20,0±5,2 ^a	29,1±3,6 ^a	17,9±1,1 ^a	9,2±0,5 ^a	7,0±0,3 ^a

*inhibisyon, Aynı sütündeki farklı harfler Duncan testine göre farkın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.01)

Kaynaklar

1. Oil in the Sea-inputs, Fates, and Effects. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C., 1985.
2. Baker, J.M. (ed.) 1976. Marine Ecology and Oil Pollution. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. Wolfe, D.E. (ed.) 1977. Fates and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organism and Ecosystems. Pergamon Press, Inc., Elmsford, New York.
4. Eriksson, K. E., Blanchette, R.A., Ander, P., 1990. Biodegradation of Lignin. In: Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. T.E. Timell (ed.), Springer-Verlag GmbH & Co. KG, Berlin, pp: 225–397.
5. Eaton, R. A., M. D. C. Hale., 1993. Wood Decay, Pests and Protection. Chapman & Hall, o London. pp 546.
6. Bumpus, J.A., 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol 55:154–158.
7. Clemente, A.R., Anazawa, T.A., Durrant, L.R., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. Braz J Microbiol 32:255–261.
8. Reddy, C, A., 1998. The potential white – rot fungi in the treatment of pollutants .Curr. Opin. Biotechnol. 6(3): 320 – 328.

9. Lang, E., Eller, I., Kleeberg, R., Martens, R., Zadrazil, F., 1995. Interaction of white – rot fungi and micro-organisms leading to biodegradation of soil pollutants In: Proceedings of the 5th International FZK/TNO Conference on contaminated soil 30th Oct. – 5 Nov. 1995 Maastricht. The Netherlands by Van de Brink WJ, Bosman R, Arendt F. Contaminated Soils. 95: 1277 – 1278.
10. Calder, J.A., Lader, R.J., 1976. Effects of dissolved aromatic hydrocarbons on aquatic micro-organisms. *Appl. Microbiol.* 32: 95 –101.
11. Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54:305-315.
12. Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5537-5548.