

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAM PETROLLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDA İSTİRİDYE
MANTARI (*Pleurotus ostreatus*)'NİN MİKOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceyda ZAZOĞLU

Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Mühendisliği Programı

MAYIS 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAM PETROLLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDA İSTİRİDYE
MANTARI (*Pleurotus ostreatus*)'NİN MİKOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ceyda ZAZOĞLU
(501101729)**

Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Sait YAZGAN

MAYIS 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 501101729 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ceyda ZAZOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**HAM PETROLLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDA İSTİRİDYE MANTARI (*Pleurotus ostreatus*)'NİN MİKOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mustafa Sait YAZGAN**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. İsmail TORÖZ**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Vesile Selma ÜNLÜ

İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : **22 Mayıs 2015**

Savunma Tarihi : **27 Mayıs 2015**

Değerli Gaia için,

ÖNSÖZ

Çalışmalarım öncesinde ve çalışmalarım boyunca maddi ve manevi bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Mustafa Sait YAZGAN'a, akademik bilgisini ve desteğini esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan Prof. Dr. İsmail TORÖZ'e çok teşekkür ederim. Analiz çalışmalarım sırasında hiçbir yükümlülüğü olmadığı halde bana vakit ayırıp, TPH analizleri konusunda metot gösterme ve uzun saatler süren yorucu seyreltme çalışmaları süresince bana yardımcı olmuş olan İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri Fakültesi'nin değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Selma ÜNLÜ'ye sonsuz teşekkür ederim. En büyük hayalimden birisi olan Amazon Mycorenewal Projesi dahilinde Ekvador Amazonları'ndaki mikoremediasyon çalışmasına katılabilmem için bana maddi destek sağlayan Prof. Dr. İsmail KOYUNCU'ya da teşekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca hep yanımda olup bana sabır gösteren değerli aileme ve özellikle bilimsel tecrübeleriyle bana öğrenim sürecim boyunca yardımcı olan ve beni bu konuda teşvik eden babam Sinan ZAZOĞLU'na, sevgili yol arkadaşım Dicle ÜRÜNAY'a da bana karşı gösterdiği sabır ve yardımlardan dolayı çok teşekkür ederim.

Haziran 2015

Ceyda ZAZOĞLU
(Biyolog)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Kapsam.....	3
1.2 Literatür Araştırması	4
2.TOPRAK KİRLİLİĞİNE YOL AÇAN KAYNAKLAR VE KİRLETİCİLER 7	7
2.1 Petrol Hidrokarbonları Kirliliği: Ham Petrol	7
3. BİYOREMEDİASYON	11
4. MİKOREMEDİASYON ARACI OLARAK MANTARLAR	13
4.1 Saprofitik Mantarlar (Ayrıştırıcılar).....	14
4.2 Odun Ayrıştırıcı Mantarlar (Wood-degrading fungi).....	15
4.3 Mantarların Mikoremediasyon Potansiyeli	17
4.3.1 Biyo-ayırıştırma (Biyodegradasyon)	17
4.3.2 Biyo-emilim (Biyosorpsiyon).....	18
4.3.3 Biyo-çevirim (Biyokonversiyon).....	18
4.3.4 Beyaz çürükçül mantarların biyoremediasyonda kullanımı	19
4.4 İstiridye Mantarı (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	20
4.4.1 İstiridye mantarı yetiştirilmesi.....	22
4.4.1.1 Sterilizasyon ve pastörizasyon farkı	23
4.4.1.2 Mantarın yetiştirilme koşulları.....	23
5. MATERYAL VE METOT	25
5.1 Toprak Özelliği ve Ölçülen Parametreler.....	25
5.1.1 pH ölçümü	25
5.1.2 Nem tayini	26
5.2 Fungal Kültür Hazırlanışı.....	27
5.2.1 İstiridye mantar kompostu temini.....	27
5.2.2 Sterilizasyon ve %2'lik malt-agar besiyeri hazırlanışı.....	27
5.2.3 Saf kültür	28
5.2.3.1 Saf kültürün ham petrole karşı davranışının gözlenmesi.....	29
5.3 Tohum (Grain) Tipi Seçimi ve İnokülasyon	31
5.3.1 Tohum (Grain) seçimi.	32
5.3.2 Tohum inokülasyonu.	32
5.4 Saman Temini ve Kompost (Spawn) Hazırlanışı.....	35
5.4.1 Saman pastörizasyonu.	36
5.4.2 Saman inokülasyonu.....	37
5.5 Deney Kurulumu	40

5.5.1 Toprağa ilave edilen ham petrol konsantrasyonları.....	43
5.5.2 Saman eklenmesi ve sterilizasyon.	44
5.5.3 Saman kompostu ilavesi ve inokülasyonu.....	44
5.5.4 Deney şartları ve süresi.....	45
5.5.5 Deney süresi sonunda kavanozların açılması.	45
5.6 Metot ve Analizler.....	46
5.6.1 Ekstraksiyonlar.	46
5.6.1.1 Toprakların ekstraksiyonu.....	47
5.6.1.2 Misellerin ekstraksiyonu.....	48
5.6.2 Distilasyonlar.....	48
5.6.2.1 Toprak örneklerinin distilasyonu.....	49
5.6.2.2 Misel örneklerinin distilasyonu.....	49
5.6.3 Esktrakte olmuş organik madde miktarı (EOM).	50
5.6.4 UVF (Ultraviole fluorospektrofotometre) analizi.....	51
6. DENEYSEL SONUÇLAR.....	55
6.1 Miselin Topraktaki Yayılımının İncelenmesi.....	63
6.2 Misel Morfolojisinin İncelenmesi.....	65
7. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	71
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	81

KISALTMALAR

AMP	: Amazon Mycorenewal Project
EOM	: Ekstrakte Olmuş Organik Madde
EPA	: Environment Protection Agency
DCM	: Diklorometan
KOK	: Kalıcı Organik Kirleticiler
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PCB	: Poliklorlubifeniller
TCE	: Trikloroetilen
TPH	: Toplam Petrol Hidrokarbonları
UVF	: Ultraviyole Floresans Spektrofotometri

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1 : Doğal Ortam Kirleticileri ve Onları Temizleyebilecek Mantar Türleri (Stamets, 2005)	18
Çizelge 4.2 : <i>Pleurotus ostreatus</i> mantarının bilimsel sınıflandırması.....	20
Çizelge 5.1 : Toprakta ölçülen parametreler.....	27
Çizelge 5.2 : Set I deney kurulumu	40
Çizelge 5.3 : Set II deney kurulumu	41
Çizelge 5.4 : 25. ve 50. gün sonunda ekstrakte edilen topraklardan elde edilen EOM miktarlarının aritmetik ortalamaları	50
Çizelge 5.5 : 25. ve 50. gün sonunda ekstrakte edilen misellerden elde edilen EOM miktarlarının (25 g'a eşdeğer) aritmetik ortalamaları	51
Çizelge 5.6 : Kısaltma amaçlı kavanoz etiketlerine verilen kodlar	53
Çizelge 6.1 : Set I ve Set II arasındaki korelasyon (İşaretli korelasyonlar $p < 0.05$ 'de anlamlı. N=15).....	58
Çizelge 6.2 : Set I ve Set II toprak örnekleri arasındaki korelasyon (İşaretli korelasyonlar $p < 0.05$ 'de anlamlı. N=9)	59
Çizelge 6.3 : Set I ve Set II misel örnekleri arasındaki korelasyon. (İşaretli korelasyonlar $p < 0.05$ 'de anlamlı. N=6)	61

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : (PAH)'ların remediasyon metotlarının maliyet karşılaştırması	9
Şekil 4.1 : Petri kabı içindeki kahve çekirdeği üzerinde İstiridye Mantarı (<i>Pleurotus ostreatus</i>) miseli büyümesi	13
Şekil 4.2 : (a) Ligninin moleküler yapısı, (b) (PAH)'ların moleküler yapısı	16
Şekil 5.1 : Toprağın alındığı bölge	25
Şekil 5.2 : 30 günün sonunda hazır komposttan çimlenen mantarlar	27
Şekil 5.3 : İstiridye mantarının uç kısmından ikiye ayrılması	28
Şekil 5.4 : İstiridye mantarının kök kısmından steril parça alımı	29
Şekil 5.5 : Ham petrol üzerinde yayılan istiridye mantar miselleri	29
Şekil 5.6 : Selüloz plağa emdirilmiş ham petrolün istiridye mantar miselleri tarafından absorblanması	31
Şekil 5.7 : Tohumların kaba terazide tartımı	33
Şekil 5.8 : Tohumların sterilizasyonu	33
Şekil 5.9 : Saf kültürlerin laminar kabinde steril edilmiş arpa tohumları üzerine ekimi	34
Şekil 5.10 : İnoküle edilmiş arpa tohumları	34
Şekil 5.11 : Miselin arpa tohumları üzerinde yayılımı	35
Şekil 5.12 : Saman pastörizasyon işlemi	36
Şekil 5.13 : Önceden inoküle olmuş tohumların pastörize edilmiş samana eklenmeden önce tartılması	37
Şekil 5.14 : Arpa tohumları ile inoküle edilmiş pastörize samanlar	37
Şekil 5.15 : Tohum inokülasyonu gerçekleştiren samanlar	38
Şekil 5.16 : Ekim, sterilizasyon ve inokülasyon kısımlarının şematik gösterimi	39
Şekil 5.17 : Ham petrol konsantrasyonlarına göre oluşturulan deney kurulumunun şematik gösterimi (Her iki set için)	42
Şekil 5.18 : Üç farklı konsantrasyon için cam bagetlerin cidarlarında kalan petrol	43
Şekil 5.19 : 5 g ham petrolle kirletilmiş toprağa saman eklenmesi	44
Şekil 5.20 : Steril edilen kavanozlara kompost ilavesi	45
Şekil 5.21 : 25. günün sonunda açılan kavanozlar. Set I, 15 g örnekleri	46
Şekil 5.22 : 50. günün sonunda açılan kavanozlar. Set II, 15 g örnekleri	46
Şekil 5.23 : Su banyosu ve soxhlet ekstraksiyon aparatı	47
Şekil 5.24 : DCM içinde çözülmüş halde bulunan misel ekstraktları	48
Şekil 5.25 : Distilasyon ünitesi	49
Şekil 5.26 : Irak (light) ham petrolü standart eğrisi	52
Şekil 5.27 : Ekstraksiyon bakiyelerinin seyreltilmesi	52
Şekil 6.1 : Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş toprak miktarlarının 25. ve 50. günler için alınan aritmetik ortalaması	55
Şekil 6.2 : Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş misel miktarlarının 25. ve 50. günler için alınan aritmetik ortalaması	56
Şekil 6.3 : Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş kontrol gruplarının 25. ve 50. günlerdeki durumu	56

Şekil 6.4 : Set I (25. gün) deney, deney tekrarı ve bunların miselleriyle kontrol gruplarının üç farklı konsantrasyondaki TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	57
Şekil 6.5 : Set I (50. gün) deney, deney tekrarı ve bunların miselleriyle kontrol gruplarının üç farklı konsantrasyondaki TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	57
Şekil 6.6 : Set I toprak örneklerinin TPH miktarları (mg/g).....	58
Şekil 6.7 : Set II toprak örneklerinin TPH miktarları (mg/g)	59
Şekil 6.8 : Set I misel örneklerinin TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	60
Şekil 6.9 : Set II misel örneklerinin TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	60
Şekil 6.10 : Ortalaması alınan toprak örneklerinin TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	61
Şekil 6.11 : Ortalaması alınan misel örneklerinin TPH miktarları ($\mu\text{g/g}$)	62
Şekil 6.12 : 25. ve 50. günler için % giderim oranları.....	62
Şekil 6.13 : İki set arasındaki kümelenme analizi.	63
Şekil 6.14 : Kavanozun dibine ulaşan miseller (Set II, 5 g)	64
Şekil 6.15 : Toprak içerisinde belli bölgelerde öbekteşen miseller	64
Şekil 6.16 : Petrolü emen ve rengi açılan miseller	65
Şekil 6.17 : Deney sonunda görülen primordia oluşumu.....	65
Şekil 6.18 : Ağır metal bulunan toprakta büyüyen misellerden çıkan pinler	66

HAM PETROLLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDA İSTİRİDYE MANTARI (*Pleurotus ostreatus*)'NİN MİKOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Çevrenin sentetik organik bileşiklerle kirlenmesi dünya genelinde büyük bir sorun haline gelmiştir. Biyosferde doğal olarak bulunmayan bu sentetik bileşiklere ksenobiyotik denir. Bu sentetik bileşiklerin çoğu doğal mikroflora ve fauna tarafından kolayca parçalanamazlar. Endüstriyel ve çevresel biyoteknolojiye dayalı biyolojik yaklaşımlar, atık üretimi azaltımı, atıkların temizlenmesi ve bu atıkların kullanışlı ya da zararı olmayan, kolayca ayrışabilen kimyasal formlara dönüşümü üzerinde çalışan "temiz teknolojiler" konusunun geliştirilmesine odaklanır. Temiz teknolojiler atıkların iyileştirilmesi için canlı organizmaların metabolik yollarını kullanmayı hedefler. Bu tarz biyolojik yöntemlerden birisi de mikoremediasyon (fungal remediasyon) yöntemidir. Mantarlar ve diğer funguslar, geniş sayıda atık/kirleticinin parçalanması için enzimatik birer mekanizma olarak görev alır. Biyoremediasyon aracı olarak mantarların, daha çok bazitli mantarların, günümüzde iyileştirme amacıyla kullanımı daha yaygın hale gelmektedir.

Bu tez çalışmasında fungusları, özellikle beyaz-çürükçül mantarları, kullanmanın getireceği beklentilerden birisi olan yapay olarak kirletilmiş toprakların temizlenmesi araştırılmıştır. Bu beyaz-çürükçül mantarlar hücre-dışı lignin modifiye edici enzimler salgılamalarından ötürü, çok çeşitli sayıda kirletici moleküllerin ayrıştırılmasında oldukça etkilidirler. Düşük substrat spesifiteleri vardır (çok sayıda substrata etki edebilir), bu yüzden lignine geniş çapta benzeyen birçok molekül üzerinde etkili olabilirler. Sistemlerinde lignini parçalamak için kullanılan enzimler; lignin peroksidaz (LiP), manganez peroksidaz (MnP), çeşitli H₂O₂ üreten enzimler ve lakkaz enzimini içerir. Ayrıştırma süreci kirlenmiş bölgelere kıymık, saman ve mısır koçanı gibi karbon kaynakları eklenerek artırılabilir.

Bu çalışmada 25 ve 50 günlük süreler boyunca, 5, 10 ve 15 g (% 2.5, % 5 ve % 7.5) Irak (light) ham petrolü ile yapay olarak kirletilen ve steril edilen toprakların, beyaz-çürükçül bir fungus olan istiridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) tarafından giderimi incelenip, ham petrol içerisindeki Toplam Petrol Hidrokarbon (TPH) seviyelerindeki değişimler, önceden oluşturulan standart eğriye göre belirlenmiştir.

Ticari komposttan saf kültür hazırlanması, tohum ve saman kompostu ile mantar kültürü yapımı, sterilizasyon ve pastörizasyon aşamaları, deney kurulumu, ham petrol konsantrasyonlarının eklenmesi, toprak ve misel örneklerinin ekstraksiyon, distilasyonları, ekstrakte olmuş organik madde miktarı hesaplamaları ve standart eğrinin oluşturulması 5. Bölümde anlatılmıştır. Bölüm 6'da deneysel sonuçlar tartışılıp, tartışma ve öneriler Bölüm 7'de verilmiştir.

Deneyde hem toprak, hem misel örneklerindeki TPH miktarları Irak (light) ham petrolü kullanılarak UVF spektrofotometrede bakılıp bunlar arasındaki korelasyonlar STATISTICA 6.0 istatistiksel analiz programıyla hesaplanmıştır.

Deney Seti I 15 g ve Deney Seti II 10 g toprak örneklerinde gözlenen TPH bulgularının, kendi kontrol gruplarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Set II misel TPH miktarlarının Set I misel TPH miktarlarına göre gerçekleşen artışı, 5, 10 ve 15 g konsantrasyonları için sırasıyla % 14.5, % 62.5 ve % 57.1 olarak elde edilmiştir. Bu verilere göre misele geçen miktar en yüksek olarak 10 g örneklerinde görülmüştür.

Kümelenme (Cluster) Analizi sonuçlarına göre 25. ve 50. günlerdeki setler arasında tek bir kümelenme altında toplanan birbiriyle oldukça ilişkili bir uyumun olduğu anlaşılmıştır.

Bu tez çalışmasına paralel yürütülen, üç farklı konsantrasyonda üç farklı ağır metal üzerinde *P. ostreatus*'un mikoremediasyon etkisinin araştırıldığı benzer bir deneyde 60 günün sonunda mantarın vejetatif gövde büyümesi (pin oluşumu), bu deneyde ise 50. gün sonunda sadece primordia oluşumu gözlenmiştir.

THE RESEARCH OF THE MYCOREMEDIATION CAPACITY OF THE OYSTER MUSHROOM IN THE CRUDE OIL CONTAMINATED SOILS

SUMMARY

The pollution of the environment with synthetic organic compounds has become a major problem all around the world. These synthetic compounds are called as xenobiotics which do not occur naturally in the biosphere. Many of these synthetic compounds are not easily degraded by the natural microflora and fauna. Biological approaches based on the industrial and environmental biotechnology are focusing on the development of "clean technologies" which emphasizes on reducing waste generation, treatment and conversion of waste in some useful or non-virulent, easily degradable chemical forms. Further, these clean technologies focus on the use of metabolic pathways of living organisms for the remediation of waste.

Different technologies for soil and groundwater cleanup of petroleum hydrocarbons have been developed in the last three decades. Each technology has certain restrictions and advantages in the applied field. One such biological method is mycoremediation (fungal remediation). The mushrooms and other fungi act as enzymatic machinery for degradation of a wide variety of waste/pollutant. However mushrooms, basidiomycetous fungi, are becoming more popular nowadays for remediation purposes as bioremediation tools. Therefore their cultivation all around the globe has become more popular.

Mushroom cultivation is carried out successfully on many industrial wastes. The use of mushrooms as mycoremediation tools in the bio-transformation of industrial wastes to protein-rich fruiting bodies provides mushroom itself while it helps to solve the problems that are caused by the disposal of pollutants, at the same time.

Fungi that are used by humans for thousands of years for a variety of applications, plant polymers such as cellulose, hemicellulose and lignin are one of the main parsers in any ecosystem. Mushrooms have the ability to mineralize, release many elements and ions and store toxic substances in their bodies. They can facilitate the energy exchange between underground and aboveground systems. It has been proven that the mushrooms modify the soil permeability and soil ion exchange and eliminate the harmful effects of contaminated soil. Edible and/or medicinal mushrooms, also aquatic fungi play a role as natural healers.

Fungal remediation is one of the most complex areas in applied remediation engineering. Over the last 20 years, many mycologists and engineers have tried using mushrooms for the purpose of the reduction of organic compounds and have achieved positive results from the studies.

Much of the information known about the interaction between mushrooms and the waste materials are mostly based on studies conducted in the laboratory. However, mushrooms have been used in the treatment of a wide variety of waste and wastewater in the last two decades and their role in remediating different numbers of hazardous and toxic compounds in soil and in the sediments have been determined.

Removal of metals, degradation and mineralization of phenols and chlorinated phenolic compounds, petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, chlorinated insecticides and pesticides, dyes by mushrooms have been proven.

Oyster mushroom (*P. ostreatus*) is a fungus which can be produced easily and grows on various plant residues as substrate. Also, it is one of the most successfully colonizing species in soil and is often used in bioremediation studies. *Pleurotus spp.* can reduce lignocellulosic compounds and convert into protein-rich biomass. It also helps the management of agricultural waste which constitutes disposal problems. Oyster mushrooms grown on different agricultural waste shows higher colonization rate, early development and sporophore efficiency compared to other fungal species. Due to the ability of keeping up with the different agro-climatic conditions, cultivation of this mushroom has increased greatly in the last few years.

Soil pollution by petroleum hydrocarbons, usually occurs during the supply or discharge of oil that is caused by the flowing leakage from storage tanks. Most of the oil component is dangerous to human health and to soil biota, therefore the measurement of total petroleum hydrocarbons (TPH) is the first and most common hazard indicator necessary for peripheral diagnose.

Petroleum hydrocarbons are known to have entered the environment frequently in various ways and in large volumes. One of the largest and naturally occurring ways is the leaks from natural deposits that cause the appearance of petroleum oils in aquatic environments. Other methods comprise production, storage and transmission steps which constitute a significant potential for the accidental spread of petroleum hydrocarbons. Numerous cases have been documented on the oil leakages from underground storage tanks and the pipelines for the last two decades.

Crude oil is a colloidal mixture of myriad of hydrocarbon and non-hydrocarbon materials. The source material for nearly all oil products is the crude oil.

In this study, the remediation process by a white-rot fungi, *Pleurotus ostreatus* of the sterilized soils that are previously contaminated with 5, 10 and 15 g of Iraq (light) crude oil artificially has been observed and the changes in the Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) levels in the crude oil according to the pre-established standard curve of oil has been determined during the period of 25 and 50 days.

Preparing the pure culture from the commercial compost, mushroom cultivation process by making grain and straw spawn, sterilization and pasteurization steps, experimental design, adding crude oil concentrations, extractions and distillations of soil and mycelium samples, calculation of extracted organic matters and creating a standart curve are explained in Section 5. Experimental results are discussed in Section 6. Discussions and recommendations are given in Section 7.

Both soil and mycelium samples are extracted in order to evaluate the levels of TPH that are present in the related samples. The correlations between them are calculated via STATISTICA 6.0, a statistical analysis program.

The TPH findings in the experimental design Set I 15 g and Set II 10 g soil samples are observed to be higher than their control groups. The increase in the amount of TPH levels in the Set II mycelium samples according to the amount of TPH levels in the Set I mycelium samples are respectively 14.5 %, 62.5 % and 57.1 % for 5, 10 and 15 g concentrations. With respect to these data, the highest amount that has passed to mycelium was seen in the samples of 10 g.

Considering the results of Cluster Analysis, each set results (25th and the 50th days) collected under one single cluster which is understood to be a fairly compliance for the overall set results is occurring.

In a similar experiment, which was carried out correspondingly with this thesis study, investigating the mycoremediation effect of *P. ostreatus* on three different heavy metals with three different concentrations, mushroom fruiting body vegetation was observed at the end of 60 days. In this study, only mushroom primordia formation was observed at the end of 50 days.

1. GİRİŞ

Tarihteki en eski kayıtlar, insanların çevrelerindeki doğal kaynakları kendi faydaları için işlediklerini ve kullandıklarını göstermektedir (Mrozik ve diğ., 2003). Modern çağda kaynak işlenmesi ve kullanımı önemli miktarda artmıştır. Bu kaynaklardan üretilen malzemelerden bir kısmı insan sağlığı açısından zararsız iken, bir kısmı ise günümüzde tehlikeli atık olarak sınıflandırılmaktadır. Hızla artmaya devam eden endüstriyel gelişme sonucu, toplumlar yüzeysel su kaynaklarıyla birlikte toprak ve yeraltı suyu kirlenmesi sorunuyla karşı karşıya gelmiş bulunmaktadır. Ortaya çıkan kirleticilerin çoğu toplum ve çevre sağlığı açısından direkt tehdit oluşturmaktadır.

Kirlenmiş sahaların remediasyonu için değişik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Ancak her bölge kendine özgü toksisite, volatilité, mobilite gibi değerlere sahip olduğundan remediasyon açısından uygulanabilecek standart bir yaklaşım çoğu zaman söz konusu olamamaktadır.

Kirlenmiş sahaların mikroorganizmalar kullanılarak zararlı maddeleri toksik olmayan bileşiklere dönüştüren bir proses olan biyoremediasyon tekniği yoluyla temizlenmesine, 1960'lı yıllarda tarımsal alanlarda pestisitlerin davranışlarını incelemek amacıyla yapılam araştırmalarla başlanmıştır. Bilim insanları 20. yüzyılın ortalarına doğru ksenobiyotik organik bileşiklerin indirgenmesi için funguslar ve bakterileri kullanmaya başlamıştır (Frazar, 2000). Bakterilerin kullanımı hızlı ve umut verici sonuçlar göstermiş ancak funguslarla yapılan araştırmalar, bakterilerle yapılan araştırmaların gerisinde kalmıştır. Özellikle son yıllarda mantarlarla ilgili yapılan biyoremediasyon çalışmaları, çevreye zararlı kirleticileri indirgeme konusunda mantarların en az bakteriler kadar başarılı olduğu elde edilen olumlu sonuçlarla kanıtlanmıştır (Goltapeh ve diğ., 2013).

Laboratuvar temelli yapılan çalışmalar, mantarların geniş çapta organik kirleticiyi ayrıştırabildiğini ve kirlenmiş toprakların iyileştirilmesinde inokulant olarak kullanım potansiyelleri olduğunu göstermiştir. Toprağın heterojen yapısından ötürü, kirleticileri gidermek için fungal inokülumların kullanıldığı çalışmaların farklı

derecelerde başarı göstermesi beklenmektedir. Örneğin fungal büyüme veya kirlilik dönüşümünde rol alan fungal hücre-dışı enzim aktivitesi için gerekli pH, besin ve oksijen seviyesi gibi toprak ortam şartlarını oluşturan parametreler bazı durumlarda misel büyümesi için uygun olmayabilir. Buna ek olarak, kalıcı organik kirleticilerin (KOK) funguslar yardımıyla değişikliğe uğratılmasıyla ilgili çıkan laboratuvar çalışması sonuçlarınının, toprak ortamından elde edilen sonuçlardan farklı olması muhtemeldir. Buna rağmen, kirlenmiş alanların iyileştirilmesine yönelik büyük ölçekli uygulamalarda, fungusların KOK'lerin büyük bir çoğunluğunu dönüştürdüğü kanıtlanmıştır (Lamar ve diğ., 1994).

Toprak remediasyonunun amacı sadece kirletici ayrıştırmayı, dönüştürmeyi veya detoksifikasyonu geliştirmek değil aynı zamanda çevresel kaliteyi ve biyolojik üretkenliliği devam ettirebilmek, ekosistem sınırları içerisinde canlılığını devam ettirebilmesi için toprağın kalitesini ve kapasitesini korumaktır (Goltapeh ve diğ., 2013).

Biyolojik remediasyon teknolojileri mikrobiyoloji, kimya, hidrojeoloji, mühendislik, toprak ve bitki bilimleri, jeoloji ve ekoloji gibi disiplinlerarası bilimlerin yardımına ihtiyaç duyar. Biyolojik süreçler genellikle daha düşük bir maliyete sahiptir ve biyolojik iyileştirme metotları, kirlenmiş topraklar, petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş yağlı atık çamurları, yeraltı suları, çözücüler, pestisitler ve diğer kimyasalların çevreye olan kötü etkilerini azaltmak amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Goltapeh ve diğ., 2013).

Biyolojik remediasyon çalışmaları Dünya'nın bir çok bölgesinde sıklıkla uygulanmaktadır. Bunlardan birisi fungal remediasyon teknolojisini ekolojik bir şekilde Ekvador Amazonları'ndaki petrol kirliliğine uygulamaya çalışan Amazon Mycorenewal Projesidir (AMP). Bilindiği üzere günümüzde Dünya'nın akciğerleri olarak tanımlanan Amazon Yağmur Ormanları, ciddi bir petrol kirliliği ile karşı karşıyadır. Bu ormanlar yeryüzünün biyo-çeşitlilik açısından en zengin bölgesi olup ekolojik açıdan eşsizdir.

30 yıldan fazla süredir petrol devi Texaco (şuan Chevron tarafından satın alınmıştır) Ekvador Amazonları'nda 18,5 milyon galondan fazla zehirli petrol atığını, önlem alınmadan açılmış yüzlerce astarsız çukura deşarj etmiştir. Geniş büyüklükte çevresel kontaminasyonla sonuçlanan bu olay, yerel halk için çok önemli sağlık problemleri

oluşturmaktadır. Şirketler tarafından bırakılan petrol, bu süre zarfı boyunca civar topraklara ve yeraltı sularına sızmakta, şiddetli yağın yağmurlarla taşarak kirliliği nehirlerle taşımaktadır. Ormanlarda yaşayan çok sayıda canlı da bölgedeki ham petrol kirliliğinden direkt olarak etkilenmekte, hatta ölmektedir. Bu çukurların çoğu yerleşim bölgelerine çok yakın kurulduğu için bir atık çukurunun sadece yanında durmak bile zehirli gazları içeren atık buharını solumayı mümkün kılmaktadır. Birçok atık çukuru bölgede hiçbir temizleme işlemi yapılmadan yıllarca olduğu gibi bırakılmıştır. Texaco'nun 1990'larda % 37,5'ini "temizlediği"ni iddia ettiği petrolle kirlenmiş bölgelerin, günümüzde çoğunun gerçek anlamda temizlenemediği ve sadece bir şekilde kamufle edildiği bilinmektedir (Darwish, 2013; Url-1)

AMP, Ekvador Amazonları'nda yanlış petrol çıkartma çalışmaları sırasında bırakılmış zehirli petrol çukurlarını, mikoremediasyon teknolojisini kullanarak temizlemek için testler yapan halk tabanlı bir projedir. AMP, endüstriyel petrol çıkarımıyla ilişkili olarak düşük maliyetli ve etkili bir proje olup, bölgedeki ciddi sağlık sorunlarına dikkat çekmek amacıyla doğal sistemler geliştirmek için 2006 yılından beri Ekvador'un kuzey bölgesi Lago Agrio/Sucumbios'ta çalışmaktadır. AMP, bölgeye ait özellikle petrol kirliliğine maruz kalmış ortamların üzerinde veya civarında yetişen yerel mantar türlerini sınıflandırıp kültürlerini yapmakta ve in-situ ve ex-situ yöntemlerle biyoremediasyon teknikleri geliştirmeye çalışmaktadır (Url-2).

Bu tez çalışması, Amazon Mycorenewal Projesi'nden ilham alınarak yapılmıştır. Bu projeye ilgili resimler EK-A'da verilmiştir.

1.1 Amaç ve Kapsam

Bu çalışmanın amacı, insan faaliyetleri sonucu petrol hidrokarbonlarıyla kirlenen toprakların, doğal, ekonomik, ekolojik ve sürdürülebilir bir yöntem olan mikoremediasyon (fungal remediasyon - mantarlarla yapılan çevresel iyileştirme) ile temizlenmesini araştırmaktır.

Bu amaçla seçilen istiridyeye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) tarımsal bir ürün olan saman üzerinde büyütülüp, yapay olarak farklı miktarlarda ham petrolle kirletilmiş topraklara eklenerek, iki farklı zaman diliminde mantarın gerçekleştirdiği biyolojik remediasyon süreci incelenmiştir.

1.2 Literatür Araştırması

Fungal remediasyon, uygulamalı remediasyon mühendisliğindeki en karmaşık alanlardan birisidir. Geçtiğimiz 20 yıl boyunca birçok mantar bilimcisi ve mühendis, fungusları organik bileşiklerin indirgenmesinde kullanmaya çalışmış ve yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Beyaz-çürükçül fungusların biyoremediasyon uygulamalarındaki değerinin keşfi büyük başarılar getirmiş ve bu yüzden dünya genelinde yapılan araştırmalarda bu mantar ile çalışılması teşvik edilmiştir. Zararlı organik bileşiklerin zarar teşkil etmeyecek bileşiklere dönüşmesi için fungal teknolojilerin kullanımında yeni bir dönem başlamıştır (Goltapeh ve diğ., 2013).

Mantar yetiştiriciliği birçok endüstriyel atık üzerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Singhal ve diğ., 2005; Kulshreshtha ve diğ., 2010; Dulay ve diğ., 2012; Kulshreshtha ve diğ., 2013). Endüstriyel atıkların proteince zengin mantar karpoforlarına (mantarın vücut bulmuş hali) biyo-çevriminde mantarların mikoremediasyon aracı olarak uygulanması, bir yandan mantar eldesi sağlarken diğer yandan kirleticilerin bertaraf edilmesinin doğuracağı sonuçların çözümünde yardımcı olmaktadır (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Son yıllarda, tehlikeli atık yönetiminde biyoremediasyon metodu oldukça önem kazanmıştır. Trikloroeten (TCE) ve bazı poliklorlubifeniller (PCB) gibi klorlu türleri içeren, parçalanmaya dirençli olacağı düşünülen bazı kimyasalların laboratuvar koşullarında biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüştür (Mohn, 2004).

Bir çok araştırma, *Pleurotus* türlerinin biyoremediasyon çalışmalarında kullanımına yönelik araştırma yayınlarını rapor etmiştir. Isikhuemhen ve diğ. (2003) ham petrole kirletilmiş toprağın, özellikle mantarın substratıyla birlikte toprağa yerleştirilmesi ve tam olarak kolonize olmasına izin verildiğinde, ham petrolün biyoremediasyonunun mümkün olduğunu göstermiştir.

P. ostreatus, toprağa en başarılı şekilde kolonize olabilen türlerden birisidir ve sıklıkla biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Baldrian, 2008).

Farklı substrat kombinasyonları kullanarak *P. ostreatus* üzerinde çalışan Liu ve diğ. (2005), substrat kombinasyonunun verimi etkilediğini bulmuşlardır. Diğer araştırmacılar da selülozik atıkların ve kümes hayvanlarının gübrelere, petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş topraklarda mantar büyümesini geliştirdiğini

bildirmişlerdir (Lamar ve Glaser, 1994; Zeddel ve diğ., 1993; Minai-Tehrani ve Herfatmanesh, 2007).

Okparanma ve diğ. (2011), kullanılmış beyaz-çürükçül fungus (*Pleurotus ostreatus*) substratının Nijerya petrol-bazlı sondaj kesim bölgelerinden alınan ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) içeren örneklerin laboratuvar koşulları altında biyolojik gideriminin yapılabileceğini belirtmiştir.

Bhattacharya ve diğ. (2014), Benzo[a]piren'in *Pleurotus ostreatus* tarafından degradasyonunun ağır metal katyonlarının ve vanilin ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) gibi medyatörlerin varlığından çok kuvvetli bir şekilde etkilendiğini bildirmiştir.

Biyoremediasyon sektöründe önemli bir katkısı bulunan Dr. S. A. Thomas ile birlikte 2000 yılında yürütülen bir deneyde, mazot ile kirletilmiş toprak, istiridye mantar miseliyle inoküle edilmiş ve geleneksel biyoremediasyon tekniği (bakterilerle) kontrol örnekleri üzerinde uygulanmıştır. Dört hafta sonra % 95'ten fazla (PAH)'ın, miselle inoküle edilmiş örneklerde zehirli olmayan bileşiklere indirgeniği görülmüştür. Kontaminantların nihai olarak karbondioksit ve suya parçalanmasında, doğal mikrobiyal topluluğun mantarlara iştirak ettiği görülmüştür. Hifli yapılarından ötürü kirlenmiş toprağa daha iyi giriş yapıp, (PAH)'lara daha kolay erişebilmelerinden dolayı mantarların bakteriler üzerinde avantajı vardır (Novotny ve diğ., 1999; April ve diğ., 2000).

2. TOPRAK KİRLİLİĞİNE YOL AÇAN KAYNAKLAR VE KİRLLETİCİLER

Her yıl büyük miktarda organik ve inorganik bileşik, endüstriyel aktiviteler sonucunda çevreye salınmaktadır. Toprak kirliliği, endüstriyel aktivitelerin kaçınılmaz bir sonucudur (Sabate ve diğ., 2004). Toprakta sıkça karşılaşılan kirleticiler; (PAH)'lar, klorlu uçucu organik bileşikler (VOC), alkil benzen (benzen, toluen, etil benzen ve ksilenler; BTEX) bileşikleri, (PCB)'ler ve TCE gibi antropojenik kaynaklı organik bileşiklerdir (Reible ve Demrenova, 2002). Bunun yanı sıra, petrol endüstrisinin genişlemesiyle birlikte tanklardan ve dolun boşaltım esnasında tankerlerden kaynaklanan sızma veya patlamalar sonucu meydana gelen petrol saçılması atık petrol ürünlerinin oluşmasına ve bu sebeple de çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Adeniyi ve Afolabi, 2002).

2.1 Petrol Hidrokarbonları ve Ham Petrol Kirliliği

Doğaya petrol hidrokarbonlarının salınımıyla ilgili gittikçe artan bir toplum endişesi vardır. Petrol hidrokarbonlarının çevreye çeşitli yollardan sıklıkla ve büyük hacimlerde giriş yaptığı bilinmektedir. En büyük ve doğal yollardan biri sucul ortamlarda petrol yağlarının görülmesine sebep olan doğal birikintilerden kaynaklanan sızıntılardır. Diğer yollar ise, petrol hidrokarbonlarının kaza sonucu yayılımı için önemli bir potansiyel oluşturan üretim, depolama ve iletim aşamalarını içerir. Son yirmi yıl boyunca yeraltı depolama tankları ve boru hatlarından çıkan petrol sızıntılarına dair sayısız vaka belgelemiştir. Denizde meydana gelen sızıntılar da aynı zamanda su ve kıyısal kirlenmenin başlıca kaynaklarından (Etkin, 1997a, Etkin 1997b).

1960'ların başlarından beri Birleşik Devletler deniz sularına yaklaşık olarak $1.14 \times 10^6 \text{ m}^3$ ($1.02 \times 10^9 \text{ kg}$) petrol sızıntısı listelenmiştir. Tankerler, mavnalar ve diğer deniz araçlarını içeren 826 vaka meydana gelmiştir ve yaklaşık $0.76 \times 10^6 \text{ m}^3$ ($0.68 \times 10^9 \text{ kg}$) petrol, kara boru hatlarından Birleşik Devletler topraklarına sızıntı yapmıştır (Etkin, 1998). 1965'ten beri Avrupa ve Asya'da $1.9 \times 10^6 \text{ m}^3$ ($1.7 \times 10^9 \text{ kg}$) ve $0.76 \times$

10^6 m^3 ($0.68 \times 10^9 \text{ kg}$) petrolün tankerlerden sızdığı belirlenmiştir (Etkin, 1997a, Etkin 1997b).

Petrolde elde edilen ürünler endüstriyel ve günlük hayatın başlıca enerji kaynağını oluşturur (Harayama ve diğ., 1999). Petrol aynı zamanda kozmetikler, boyalar ve plastikler gibi çeşitli ürünlerde ham madde olarak kullanılır. Petrol yağlarının ve ürünlerinin büyük miktarı sucul ve karasal ortamlara girip tüm yaşam formlarını ve doğal kaynakları etkileyerek ciddi uzun vadeli sorunlara neden olur. Petrol sızıntılarının ve petrol ürünlerinin kaynakları ve etkileriyle ilgili yüzlerce makale yayınlanmıştır. Tatlısu, karasal ve sucul ortamlardaki petrol hidrokarbonlarının degradasyonu yoğun ilgi çeken bir alan haline gelip, birçok yazar tarafından inceleme konusu olmuştur (Singh, 2006).

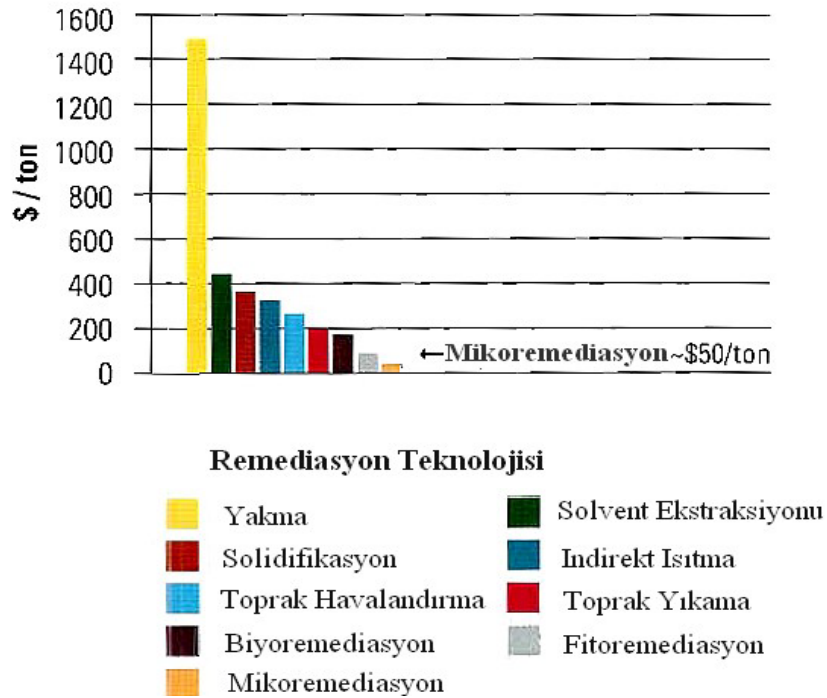
Ham petrol, çok sayıda hidrokarbon olan ve olmayan maddelerin koloidal bir karışımıdır (Cadwallaer, 1993). Neredeyse tüm petrol ürünleri için kaynak malzeme ham petroldür. Benzin, motorin, gaz yakıtları, ısıtma yağları ve diğer petrol ürünlerinin dökülme, sızıntı ve başka şekillerdeki yayılımı toprak ve suyun kontaminasyonu ile sonuçlanır. Petrol yağlarının % 90'ından fazlasını oluşturan hidrokarbonlar kimyasal yapılarına göre düz, dallanmış, siklik alkanlar ve aromatikler olarak gruplara ayrılır. Petrolün hidrokarbon olmayan bileşenleri (O_2 , N, S ---) ve porfirin oksijeni içeren naftenik asit, karboksilik asit, esterler, ketonlar, fenoller gibi bileşiklere ihtiyaç duyan bazı metalleri içerirler (Odu, 1981). Petrol kirliliği, petrolün insan etkileri sonucu direkt veya dolaylı yoldan çevreye girdiği ve herhangi bir canlının güvenliğini tehlikeye soktuğu olumsuz bir durum olarak ifade edilebilir. Ham petrol suya döküldüğünde kaygan bir form oluşturarak geniş bir alana yayılır ve derhal yüksek uçucu fraksiyonların buharlaşması, suda çözünen fraksiyonların ayrışması, fotokimyasal oksidasyon, emülsifikasyon, mikrobiyal degradasyon ve sedimentasyon gibi çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlere uğramaya başlar. Ham petrol, hidrokarbonlar ile kükürt, azot ve oksijenin organik bileşiklerinin ve bölgeden bölgeye yapısı değişen belli miktar su içeren petrolün bir karışımıdır (Anoliefo, 1991). Ham petrol bitkilerin ve hayvanların milyonlarca yıldır süregelen çürümesinden üretilir. Deniz yüzeyine boşaltılan ham petrol fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliğe uğrar. Hızlı fiziksel ve kimyasal süreçler, petrolün rüzgar ve akıntılarla yayılımı ve hareketini, havaya enjeksiyonunu, uçucu bileşiklerin buharlaşmasını, suya küçük damlacıkların serpilmesini, bozulma ve kimyasal

oksidasyonunu kapsar. Bunlarla eş zamanlı gerçekleşen diğer olaylar ise biyolojik süreçlerdir. Mikroorganizmalar tarafından yapılan ayrıştırma ile daha büyük organizmalar tarafından gerçekleştirilen metabolizma, depolama veya boşaltma eylemlerini içerir (Nelson-Smith, 1972).

Karmaşık yapılu bileşiklerinin varlığı, biyodegradasyonun ilerlemesini etkilediği için ham petrolün tam olarak parçalanması gerçekleşmez; karmaşık yapılu kalıntı kısmı her zaman kalır. Siyah zift rengindeki bu kalıntı, yüksek oranda asfaltik bileşen içerir. Kalıntı karışımı bir bölgeyi tıkamadığı sürece genellikle çok düşük bir toksisite ve biyolojik fayda gösterir (Atlas, 1995). Bu tarz bölgelerde bulunan ağır yapılu ham petrol, ya zaman içerisinde ortamdaki mikroorganizmaların uyarmasıyla ya da bölgeye sonradan eklenecek mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu dönüşüme uğratılabilir.

Son 30 yılda petrol hidrokarbonlarının temizliğine yönelik farklı toprak ve yeraltı suyu teknolojileri geliştirilmiştir. Her teknoloji uygulanan alanında belirli kısıtlamalara ve avantajlara sahiptir.

Petrol hidrokarbonları giderim yöntemleri maliyet açısından büyük bir değişkenlik göstermektedir. Petrol hidrokarbonlarına yönelik remediasyon teknolojilerinin maliyet açısından karşılaştırılması Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1: (PAH)'ların remediasyon metotlarının maliyet karşılaştırması (Stamets, 2005).

Buna göre remediasyon teknolojileri arasında biyoremediasyon teknolojilerinin daha düşük maliyete sahip olduğu gör÷lmektedir. Biyoremediasyon teknolojilerinin içerisinde de mikoremediasyon y÷ntemi en ekonomik y÷ntem olarak belirtilmektedir (Stamets, 2005).

3. BİYOREMEDİASYON

“Remediate” iyileştirme, bio-remediate ise toprak ve yer altı suyu kirliliğinin biyolojik ajanlar kullanılarak temizlenmesi anlamına gelir (Url-3).

Tehlikeli maddeleri, zararsız veya daha az zararlı maddelere dönüştürmek, nötralize etmek (Url-4) için mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreçli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir (Scragg 1999; Dua, 2002). EPA’ya göre biyoremediasyon “ortamda doğal olarak bulunan organizmaları kullanarak zararlı maddeleri daha az zararlı veya zararsız maddelere dönüştüren bir arıtma” olarak tanımlanır.

Biyoremediasyon doğal olarak meydana gelen bir süreçtir ve bu süreçte çevresel kirliliğin başka bölgelere yayılmasının engellenmesi ve mikroorganizmaların kirliliği dönüşüme uğratarak nihai/son ürün haline getirmesi amaçlanmaktadır. Biyoremediasyonun etkili olabilmesi için, mikroorganizmaların kirliliklere enzimatik saldırıda bulunarak onları çevreye ve diğer canlılara zarar vermeyecek hale dönüştürmeleri gerekir. Bu yöntem sadece çevresel şartların mikrobiyal büyüme ve aktiviteye izin verdiği durumlarda etkili olabilir. Mikroorganizmalar, kirleticiler ile yakın ilişkide ve doğru yerde olmalıdırlar. Eğer mikroorganizma popülasyonu mevcut değilse, onları kirleticilerle temas ettirmek için bazı mühendislik mekanizmaları geliştirilmelidir (Singh ve Ward, 2004). Çevresel koşullar kontrol edilmeli veya mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve büyümelerini optimize etmek için şartlar değiştirilmelidir. Biyoremediasyon için çevrenin optimizasyonunda; sıcaklık, nutrientler (başta azot ve fosfor), elektron alıcılar (oksijen, nitrat, sülfat) ve pH gibi çevresel faktörler düzenlenmelidir (Baker ve Herson, 1994). Sağlık ve ekolojik yönden geniş alana yayılmış olan petrol ve petrol türevleri, gazolin, PAH, perkloretilen (PCE), TCE ve klorlu aromatik hidrokarbonlar mikroorganizmalar tarafından kolayca detoksifikasyona uğratılırlar. Metaller biyolojik olarak parçalanamaları dahi mikroorganizmalar tarafından daha az zararlı hale dönüştürebildikleri için biyoremediasyon dahilinde değerlendirilirler (Vidali, 2001).

Biyoremediasyon toprakta ve yeraltı suyunda doğal olarak yaşayan organizmaların varlığına dayanır. Biyoremediasyonu uyarmak için eklenen kimyasalların insan sağlığı açısından tehlike arzmemesi gerekir. Örneğin, organizmaların büyümesi için eklenen besin maddeleri genellikle bahçelerde veya seralarda kullanılabilen ürünlerdir.

Biyoremediasyon dört kategoride incelenebilir:

- Bakteriyel Remediasyon (Mikrobiyal remediasyon): Bakteriyel remediasyon hidrokarbon gibi moleküler kirleticileri daha basit ve güvenli bileşiklere yıkmak için bakterilerin kullanıldığı bir prosestir (Kellogg ve Pettigrew, 2008).
- Fitoremediasyon: Fitoremediasyon kirlenmiş çevrelerin temizliğinde bitkileri kullanır. Bitkiler, metaller, pestisitler, klorlu çözücüler, PCB'ler, patlayıcılar, radyonüklitler ve petrol hidrokarbonlarını içeren bir çok kirletici çeşidini bağlayıp, ekstrakte edip ve dönüştürüp bu maddelerin temizlenmesine yardım eder (Darwish, 2013).
- Kompost Biyoremediasyonu: Kompostlama, organik ve/veya inorganik yan-ürünlerin ve enerjinin ısı formunda üretimiyle sonuçlanan, mikroorganizmaların organik maddeleri indirgediği (ayrıştırdığı) veya yediği bir prosestir (Williams ve Keehan, 1992).
- Mikoremediasyon (Fungal remediasyon): Mikoremediasyon kelimesi Paul Stamets tarafından türetilmiş (Url-5) bir terim olup, biyoremediasyonda özellikle fungal miselin (mantar miseli) kullanılması anlamına gelir. Ekosistemde fungusların en önemli rollerin birisi misel tarafından gerçekleştirilen ayrıştırma/çürütme olayıdır (Bavarva, 2015).

Mikofiltrasyon da mikoremediasyona benzer bir işlem olup topraktaki sudan fungal misel yardımıyla zehirli atıkları ve mikroorganizmaları filtreleme tekniğidir (Url-4).

Toprak remediasyonu için beyaz-çürükçül mantarların kullanımı bir kaç firma tarafından patentlenmiştir. Bunlar; Utah'taki EarthFax Development Corporation ve Almanya'daki Gebruder Huber Bodenrecycling firmalarıdır. Bu şirketler toprak remediasyonu için beyaz çürükçül mantarları kullanmaktadırlar (Singh, 2006).

4. MİKOREMEDİASYON ARACI OLARAK MANTARLAR

Fungal alem çok çeşitli yapılara sahip organizmaların bir grubunu temsil eder. Mantarların büyük bir çoğunluğu çiftler şekilde (Şekil 4.1) dallanan ağaçlar gibi uçtan büyüyen ve miselyum denen vejetatif yapılardan oluşur (Viniğra-Gonzales ve diğ., 1993). Miseller geniş dallanma gösteren ve iletişim kurabilen bir sisteme sahip, iplik benzeri ince boru şekilli eşsiz yapılardır. Her misel, her bir ağacın hif olarak bilindiği bir orman gibidir (Bartnicki-Garcia, 1990).



Şekil 4.1: Petri kabı içindeki kahve çekirdeği üzerinde İstiridyey Mantarı (*Pleurotus ostreatus*) miseli büyümesi (Url-6).

Funguslar, atık maddelerin ayrışmasında doğanın en güçlü ajanları arasında baş gösterirler ve toprakta yaşayan diğer biyotalar için gıda sağlayan, toprak besin ağının olmazsa olmaz bileşenidirler (Rhodes, 2012).

Ormanların zemini, bitkilerin direkt olarak üzerinde büyümediği bir önceki mevsimden kalma yaprak atıklarıyla doludur. Dökülmüş yapraklar diğer canlıların parçalaması ve sindirmesi için fazla dayanıklıdır ve bu yüzden içerdikleri tüm besinler dokularında kilitli olarak bulunmaktadır. Yaprak döküntülerini parçalayan

anahtar organizma ise funguslardır. Tam olarak bu işi yapan kısım, ölü odun, yaprak gibi materyaller üzerinde büyürken görülen ince, beyaz iplik şeklindeki yapı olan *miselyum*dur. Esasen funguslar, yeryüzünde odunu ayrıştırabilen tek organizmadır. Misel, hücre dışına bitki fiberinin temel iki bileşeni olan selülozu ve lignini parçalayabilen güçlü enzimler ve asitler yollar. Mantar, odun ve yaprakları parçalarken humus denilen zengin bir malzeme oluşur. Doğal ekosistemde, farklı alemlerden organizmalar, bu farklı iki substrat üzerine saldırı düzenler ve toprakta N, P, K ve diğer temel inorganik elementlerin olduğu iyi bir besin kaynağı varsa ayrıştırma hızı maksimum düzeye ulaşır (Rhodes, 2013).

Mantarlar ölü bitkilerden karbonu, hidrojeni, nitrojeni, fosforu ve mineralleri, yaşayan bitki, böcek ve o habitatı paylaşan diğer organizmalar için besine dönüştüren yegane canlılardır (Stamets, 2005).

Mantarların büyümesi genellikle yavaştır ve kometabolizma için çoğunlukla birden fazla substrata ihtiyaç duyar. Bu organizmaların misel şeklinde büyüme alışkanlığı substratların üzerinde hızlı bir şekilde kolonize olmalarına sebep olur. Fungal sıvı kültürleri geniş çapta bileşiğin biyotransformasyonunu incelemek için uygun model sistemlerini oluşturur. Bileşiklerin, atıkların veya atıksuların fungal biyotransformasyon süreci *mikotransformasyon* olarak adlandırılır (Singh, 2006).

Mantarlar beslenme şekillerine göre dört ana kategoriye ayrılabilir: saprofitik, parazitik, mikorizal ve endofitik. Yaklaşık 8000 makrofungus (çıplak gözle görülebilen) saprofit, 2000 ile 3000 arası mikorizal ve geri kalanlar da endofitik veya parazitiktir. Birçok tür sürekli keşfedilip sınıflandırılmaktadır (Stamets, 2005).

4.1 Saprofitik Mantarlar: Ayrıştırıcılar

Saprofitik mantarlar yani ayrıştırıcılar, ölü bitki, böcek ve diğer hayvanlarla beslenerek, besin zincirindeki ilk menüyü oluşturup şekillendirir ve biyolojik toplulukları çoğaltacak bir yol izlerler. Birçok gıda amaçlı tüketilen ve tıbbi olarak kullanılan mantar, gezegendeki birincil dönüştürücülerden olan odun-ayrıştırıcı mantarlardır. Her ne kadar bazı türler, değişen koşullar altında bir kategoriden diğerine geçebilse de birincil, ikincil ve üçüncül ayrıştırıcılar olarak saprofitik mantarlar üç ana gruba ayrılabilir. Birincil, ikincil ve üçüncül ayrıştırıcılar bir bölgede bir arada bulunabilir (Stamets, 2005).

Birincil çürükçüller genellikle hızlı büyüyüp, bitki dokularına kolayca bağlanarak onları ayrıştıran uzun misel ipliklerini hızlıca yayarlar. Bu ağaçlık yerde yaşayan türler istiridye (*Pleurotus* türleri), şitaki (*Lentinula edodes*) ve maitake (*Grifola frondosa*) mantarlarını kapsar. Ancak bu türler, bitki maddesini çeşitli ayrıştırma basamaklarına yıkmak için farklı kimyaya sahip enzimler kullanırlar. İkincil çürükçüller başlangıçta, az miktarda olsa bile, bitki ve hayvan dokularını yıkan birincil fungusların aktivitesine dayanır. Üçüncül ve en zor kategorize edilen grup olan üçüncül çürükçüller de çürütme prosesinin sonuna doğru bulunan fungusları kapsar. Bunlar birincil ve ikincil çürükçüller tarafından yıllar boyunca oluşturulmuş habitatlarda gelişirler (Stamets, 2005).

Saprofitik terimi, bir maddenin bozulma sürecinde rol oynayan herhangi bir mantarı tanımlamak için kullanılan genel bir kelime olduğundan, bunlar aynı zamanda çürükçül mantarlar olarak da bilinir. Bu tarz funguslar ve onların ürettikleri kuvvetli sindirim enzimleri son yıllarda sıklıkla çalışılmaktadır. Saprofitler, birçok iyi bilinen ve ticari olarak kültürü yapılan, yenilebilir ve tıbbi amaçla kullanılan türleri (şitaki, istiridye, portobello ve reishi mantarları) içerir (Darwish, 2013).

4.2 Odun Ayrıştırıcı Mantarlar (Wood-degrading fungi)

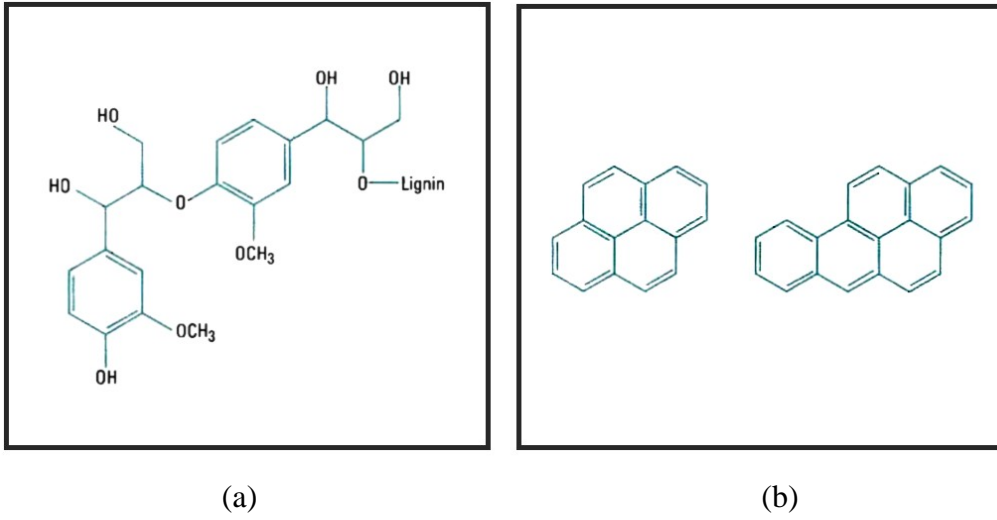
Bazitli mantarlar (Basidiomycota) Mantarlar Alemi'nin bir şubesidir. Bunlar patojenler ve ortak yaşayan simbiyotik organizmaların yanısıra, daha çok odun ayrıştıran türleri kapsayan fungusların %32'sini oluşturur (Riley ve diğ., 2014).

Odun bileşenini parçalama konusundaki becerisine dayanarak odun-ayrıştıran bazitli mantarlar beyaz-çürükçül ve kahverengi-çürükçül olarak sınıflandırılmıştır (Riley ve diğ., 2014). Beyaz-çürükçül mantarların uyguladığı strateji, odundaki lignini ayrıştırmak ve lignin matrisinde gömülü bulunan selüloz ve hemiselüloza ulaşım sağlamaktır. Kahverengi-çürükçül mantarlar tercihen odundaki selülozu çürütür ve lignini tam olarak parçalamaz (Hammel, 1997). Lignini ayrıştırma yeteneğine sahip olan bu iki grup ligninolitik mantarlar olarak adlandırılır. Bazı beyaz-çürükçül mantarlar önce lignini ortadan kaldırarak hemiselüloz ve selülozu enerji kaynağı olarak kullanır (Winquist, 2014). Beyaz-çürükçül mantarların ismi, enzim salgılarıyla lignini sindirip, çözünmemiş selülozdan ötürü, odun üzerinde ağartılmış, beyaz bir görünüm oluşturmalarından ötürü verilmiştir. Koyu renkli ligninin gideriminden sonra, çürümüş odun kalıntısı beyaza dönerek yumuşak ve lifli bir yapı kazanır.

Tersine kahverengi-çürükçül mantarlar selülozu parçalar ve lignini tipik kahverengimsi bir birikinti olarak bırakır (Stamets, 2005).

Birçok odun-ayırıştırıcı tür, *Phanerochaete*, *Pleurotus* ve *Trametes* cinslerinin üyelerine aittir. Bu türler, uygun substrat varlığında toprakta da hayatta kalma yeteneğine sahiptir (Baldrian, 2008).

Lignin ve (PAH)'ların (piren & benzo[a]piren) moleküler yapısının benzerliği Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2: (a) Lignin'in moleküler yapısı, (b) (PAH)'ların moleküler yapısı.

Lignin degradasyonu için beyaz-çürükçül mantarlar yarım yüzyıldan fazla süredir incelenmektedir. Beyaz-çürükçül bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'un hücre dışı oksidatif ligninolitik enzimlerinin keşfinden sonra, Bumpus ve diğ. 1985'te bu mantarın biyoremediasyon için kullanımını ön görmüştür. *P. chrysosporium* organo-kirleticilerin degradasyonu ile ilişkilendirilen ilk fungustur çünkü lignin parçalama mekanizmalarıyla ilgili yapılan araştırmalarda model bir organizma olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Evans C. ve Hedger J., 2001). İnatçı bileşiklerin ve ksenobiyotiklerin parçalanma mekanizmalarının ile ilgili *P. chrysosporium* hakkında çok sayıda araştırma makalesi vardır. *P. chrysosporium*'a ek olarak diğer farklı beyaz-çürükçül fungusların da (*Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus tuber-regium*, *Pleurotus pulmonarius*) kalıcı ksenobiyotik bileşikleri ayrıştırabildiği bilinmektedir (Singh, 2006; Adenipekun ve Lawal, 2012).

4.3 Mantarların Mikoremediasyon Potansiyeli

Mikoremediasyon aracı, geniş çeşitlilikteki birçok çevresel kalıcı kirleticinin indirgenmesi (Çizelge 4.1), endüstriyel ve tarımsal sanayi atıklarının ürünlere dönüştürülmesi yeteneğine sahip olmasından ötürü mantarlara ve onların enzimlerine verilen bir isimdir (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Bazitli mantarlar (bazidiomisetler), sadece biyoremediasyon aracı olarak değil, aynı zamanda bir protein kaynağı olarak misel ve olgun mantar sağladıklarından dolayı günümüzde daha popüler bir konumdadır. Farklı atıklardan elde edilen biyokütle veya olgun mantar formundaki, yiyecek proteini üretiminde kullanılan mantar türlerinin verimi, çeşitli hidroliz ve oksidasyon enzimlerinin salınımı vasıtasıyla atığı parçalamasındaki yetenektedir (Kuforiji ve Fasidi 2008; Zhu ve diğ., 2013). Bu durum, araştırmaların ilgisini mantar kültürleme ve atık remediasyonu üzerine çeker (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Civa, PCB'ler ve dioksinleri içeren zararlı maddeler birçok kaynaktan çıkarak besin zincirimizde alt kademelerden üst kademelere doğru geçer ve her seviyede daha konsantre olmuş bir halde bulunur. Besin zincirinin en tepesindeki memeliler zincirin alt kademelerindeki toksik maddeleri bünyesine almış olan organizmaları tükettiğinde zarar görürler. Miseller, toprakta bulunan bu toksinleri besin zincirine girmeden önce tahrip eder (Stamets, 2005).

Mantarlar kirli bölgeleri arındırmak ve doğayı canlandırmak için farklı yöntemler kullanır. Bu yöntemler; Biyo-ayırıştırma (Biyodegradasyon), Biyo-emilim (Biyosorpsiyon) ve Biyo-çevirim (Biyokonversiyon) olarak ayrılır.

4.3.1 Biyo-ayırıştırma (Biyodegradasyon)

Biyodegradasyon terimi nihai bozulma ve karmaşık moleküllerin kendi mineral bileşenlerine geri dönüşümünü tanımlamak için kullanılır. Başlangıç bileşiğinin canlı organizmalar tarafından daha basit olan CO₂, H₂O, NO₃ ve diğer inorganik bileşiklere tam mineralizasyonuna yol açan süreçtir.

Mantarlar hücre dışı peroksidazlar, ligninaz (lignin peroksidaz, manganez bağlı peroksidaz ve lakkaz), selülazlar, pektinazlar, ksilinazlar ve oksidazlar üretebilir (Nyanhongo ve diğ., 2007). Bu enzimler inatçı kirleticileri in-vitro ortamda okside

eder ve kendi substratları tarafından uyarılırlar. Aynı zamanda bu enzimlerin polimerik olmayan , nitrotoluenler, (PAH)'lar, organik ve sentetik boyalar ve pentaklorofenol gibi zorlu kirleticileri in-vitro şartlarda indirgediği bulunmuştur. Yakın zamanda mantar türlerinin plastik gibi polimerleri de indirgediği bildirilmiştir.

4.3.2 Biyo-emilim (Biyosorpsiyon)

Mantarlar tarafından çevreden metallerin/kirleticilerin giderimindeki ikinci önemli süreç biyo-emilimdir. Bu aşama, metallere ve diğer zıt koşullara karşı genellikle belirgin bir tolerans sergileyen canlı ya da kuru biyokütle tarafından, çıkış suyundan metal iyonlarının/kirleticilerin/ksenobiyotiklerin emilimine dayanan bir süreçtir. Atıksuda bulunan metallerin geri kazanımının yanında endüstriyel atık suların iyileştirilmesi için de bir alternatif olarak kabul edilir (Gavrilescu, 2004).

Kirleticilerin/ksenobiyotiklerin emilimi iki prosesin birleşimini içerir. Hem hücre içine iletim hem de hücrelerarası bileşenlere parçalanma olan, aktif metabolizmaya dayalı süreçleri kapsayan *Biyokümülyasyon* ve metabolik enerjiye ihtiyaç duymadan kirleticilerin biyokütleyle bağlanması olan *Biyosorpsiyon*.

4.3.3 Biyo-çevirim (Biyokonversiyon)

Günümüzde endüstriyel veya agro-endüstriyel çamurların başka faydalı formlara çevirimi üzerine yapılan araştırmalar sürmektedir. En önemli biyo-çevirim ürünü mantardır. Endüstriler tarafından oluşturulan lignoselülozik atıklar mantar türlerinin üretimi aşamasında kullanılabilir. Kültürleme için gerekli substratın seçimi çoğunlukla maddenin bölgesel ulaşılabilirliği tarafından belirlenir (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Kontamine olmuş bölgelerin belirli kirleticileri ve onları temizleyen genel türler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Doğal Ortam Kirleticileri ve Onları Temizleyebilecek Mantar Türleri (Stamets, 2005).

Doğal Ortam Kirleticileri	Önerilen Mantar Türleri
Petrol ürünleri (petrol, dizel, benzin, petrokimyasallar)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Kimyasal boyalar	<i>Ganoderma</i> ve <i>Trametes</i> türleri

Çizelge 4.1 (devam): Doğal Ortam Kirleticileri ve Onları Temizleyebilecek Mantar Türleri (Stamets, 2005).

Endüstriyel metaller (kurşun, kadmiyum, arsenik, civa, selenyum, radyoaktif sezyum-137 ve sezyum-134)	Yetişkin <i>Agaricus</i> , <i>Lepiota</i> ve mikorizal türler
Savaş Malzemeleri (TNT)	<i>Hypholoma</i> ve <i>Flammulinas</i> türleri
Organofosfatlar, kimyasal silahlar (VX, sarin)	Poliporlular, istiridye ve <i>Psilocybe</i> türleri
Biyolojikler (<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> sp.)	<i>Calvatia gigantea</i> , <i>Coprinus cornatus</i> , <i>Fomes fomentarius</i> , <i>Ganoderma</i> türleri, <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Pleurotus</i> türleri, <i>Polyporus umbellatus</i> ve <i>Stropharia rugoso annulata</i>
Nitratlar ve fosfor bağlı toksinler	<i>Agaricus bernardii</i> , <i>Agaricus silvicola</i> ve müttefikleri, <i>Coprinus comatus</i> ve <i>Psilocybe</i> türleri

4.3.4 Beyaz-çürükçül mantarların biyoremediasyonda kullanımı

Geçtiğimiz otuz yılın literatürüne bakıldığında, fungusların biyoremediasyonda kullanımı ile ilgili yapılan toplam araştırmaların en az %30'unun beyaz çürükçül mantarlardan oluştuğu görülmektedir. Bu mantarlar fungal biyoremediasyonun zaten karmaşık olan sistemine yeni bir boyut eklemiştir.

Organik moleküllerin çok geniş bir kısmı, beyaz-çürükçül fungusların çeşitli suşlarının faaliyetlerine göre değişen seviyelerde duyarlılık gösterirler ve hatta, (PAH)'ları da içeren son derece inatçı ve kalıcı maddeler bile bu mantarlar tarafından ayrıştırılabilir (Singh, 2006).

Topraklar, aynı zamanda topraktaki fungal türlerin büyümesini desteklemek için lignoselülozik substratların (talaş, saman ve mısır koçanı) gereksinimi sağlanarak da ham petrolden arıtılabilir (Lang ve diğ., 1995). Beyaz-çürükçül funguslar kullanılarak başarılı bir şekilde indirgenen diğer toksik maddeler: PCB'ler ve dioksinler, pestisitler, fenoller ve klorofenoller, kağıt fabrikası atık suları, boyarmaddeler ve ağır metallerdir (Singh, 2006).

Başarılı bir mikoremediasyon elde edebilmek için, belirli bir kirleticiyi hedefleyen doğru fungal tür seçilmelidir (Matsubara ve diğ., 2006).

4.4 İstiridyeye Mantarı (*Pleurotus ostreatus*)

Bilinen isimleri: İstiridyeye Mantarı, Kavak Mantarı, Ağaç İstiridyesi, Saman Mantarı. Diğer isimleri: Oyster Mushroom (İngilizce), Hiratake (Japonca “Düz Mantar”), Tamogitake (Japonca). İstiridyeye mantarının bilimsel sınıflandırma Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2: *Pleurotus ostreatus* mantarının bilimsel sınıflandırması.

Alem:	Fungi
Şube:	Basidiomycota
Sınıf:	Agaricomycetes
Takım:	Agaricales
Aile:	Pleurotaceae
Cins:	<i>Pleurotus</i>
Tür:	<i>P. ostreatus</i>

P. ostreatus yaygın olarak istiridyeye mantarı olarak bilinen yenebilen bir türdür. Bu tür bir saprofitik basidiyomisetir ve doğal bir ayrıştırıcıdır çünkü organik polimerleri parçalayan enzimler ve asitler salgılar. İnsan tüketimi için lignoselülozik substratlar üzerinde büyük ölçekli fungal biyokütle üretimi zaten geliştirilmiş olduğundan ve substratların sterilize edilmesine ihtiyaç olmadığından (pastörizasyon yeterlidir) Evans ve Hedger (2001) bu mantarın üretiminin ekonomik olarak uygulanabilir olması büyük bir avantajdır.

Biyoremediasyon uygulamalarında in-situ ve ex-situ olarak tanımlanan iki yaklaşım vardır. In-situ yöntemlerinde kirlenmiş materyale yerinde müdahale yapılırken ex-situ yöntemlerinde materyal fiziksel olarak uygulama yapılmak için başka bir yere taşınır. Kirli toprağı kazıyıp çıkarmak ve uzaklaştırmak, kimyasal metotlarla veya atık yakma süreciyle birleştiğinde oldukça pahalı bir işlemdir. Aksine, toprak olduğu yerde bırakılır ve orada arındırma yapılırsa toplam masraflar çok daha az olur. Dahası, atık yakımı kendi içinde problemlere sebep olurken, topraktan toksik maddeleri yıkama veya ekstrakte etme süresi boyunca kontaminasyon bir yerden diğerine rahatça taşınabilir ve kendiliğinden yok olmaz.

Fungal remediasyon çevre dostu bir yaklaşımdır ve sadece küçük bir alana, düşük maliyete, daha az kalifiye çalışana ihtiyaç duyar ve alan içinde kolayca uygulanabilir. Bunlara zıt olarak bu mikoremediasyon aracının uygulamasında bazı dezavantajları da vardır. Mantarlar çevreye ve atık temizlemeye uyum sağlamak için zamana ihtiyaç duyarlar. Endüstriyel atıklar üzerinde yetişen mantarlar

toksisiteye/genotoksisiteye sahip olabilir. Mantarların genotoksisitesi, yetiştirildikleri atıkta bulunan genotoksikantlar (Genotoksikler, yani hücre DNA'sında hasara yol açan maddeler DNA'da mutasyona ve kötü huylu kansere yol açar) tarafından etkilenir (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Mantarın vücut (karpofor) kısmındaki toksisite seviyesi iki gerçeğe dayanır, biyo-ayırıştırma ve biyo-emilim. substrattan kirleticilerin indirgenmesi ve daha az zararlı ürünlere dönüşümüne öncülük eden elverişli enzimatik biyo-ayırıştırma sistemlerine sahip olmaları, vücut kısımlarının tüketim için güvenli olmasını sağlar. Son yıllardaki çalışmalar mantarların sadece kirleticileri ayırıştırmadığı aynı zamanda toksisite veya mutajenisiteyi azaltabildiğini de bildirmiştir (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Toksisite azaltma aynı zamanda substrata da bağlıdır. Aynı fungus, farklı kirleticileri sadece ayırıştırmada görevli olan enzimlerinden ötürü değil, toksik ve genotoksik kirleticilerin Choi ve diğ. (2013) etkilerini azaltmada da görevli enzimlerinden ötürü farklı kabiliyete sahip olabilir. Farklı araştırmacılar kirleticilerin genotoksisitesini azaltmada kullanılabilen mantarın antimutajenik ve antigenotoksik gücünü kanıtlamışlardır (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

Bu tarz mantar türleri yeme ve hayvanları besleme amaçlı kullanılabilir. Bu durum, kirleticilerin başka bir sorun yaratmayacak ve vücut kısımlarının güvenle tüketilebileceği bir şekilde bertaraf edilmeleri hakkında yapılacak araştırmalara odaklanılmasını gerektirecek olan gelecekteki çalışmalara doğal bir rehberlik edecektir. Buna karşın, mantar tarafından kirleticilerin absorplanması onları tüketme açısından kullanışsız hale getirir. Çok sayıda araştırmacı kirlenmiş substrat üzerinde doğal veya yapay olarak büyümüş olan mantarların, absorpsiyon sürecinden ötürü vücutlarında çok yüksek miktarda metal içeriği ve mutajenisite olduğunu bildirmiştir (Mendez-Espinoza ve diğ., 2013; Taira ve diğ., 2005; Mlinaric ve diğ., 2004; Filipic ve diğ., 2002; Menoli ve diğ., 2001).

Mantarlar biyolojik kökenli ürün olduklarından dolayı biyolojik, tarımsal, agro-endüstriyel ve endüstriyel atıklardan elde edilebilirler. Bunun yanı sıra bu mantarlar sadece besin sağlamakla kalmazlar aynı zamanda tedavi amaçlı olarak kullanılan protein, aminoasit ve çeşitli biyo-aktif molekülün kaynağı olarak da kullanılabilirler (Kulshreshtha ve diğ., 2014).

4.4.1. İstiridye mantarının yetiştirilmesi

Mantarları temizleme amaçlı kullanmak için bol miktarda misel gerekir. Önem teşkil eden remediasyon işinin esas kısmını miseller yaptığı için, bu miktar ne kadar çok olursa o kadar iyi sonuç elde edilir. Mantar yetiştirme işinin en kolay kısmı miseli büyütme. Mantarın vejetatif vücut oluşumunu teşvik etmek için titizlik gerektiren hijyenik ortamı sağlamak zordur. Ancak remediasyon çalışmaları kapsamında yenen mantar elde etme endişesi yoktur, sadece kirli bölgeye bol miktarda misel uygulaması yapılması gerekmektedir (Darwish, 2013).

Çoğu endüstriyel kültürlenme prosesi, mikroorganizmaların büyütüldüğü karıştırma tankı biyoreaktörlerinde su içinde gerçekleştirilir. Ancak ligninolitik fungusların yetiştirilmesi için daha çok katı-faz üzerinde büyütme yapıldığı gözlenmiştir. Katı-faz yetiştiriciliğinde seçilen mikroorganizma katı bir madde üzerinde (substrat), serbest su olmadan büyütülür. Katı-faz yetiştiriciliğinin kültürlenme koşulları ve fungusların doğal yaşam şartları arasındaki benzerlikten ötürü bu yöntem, hem daha iyi oksijen transferini sağlar hem de büyütme boyunca karıştırmaya ihtiyaç duymaz ve bilhassa bu yüzden mantar yetiştiriciliği için daha uygundur (Vinięra-González ve diğ., 2003; Hölker ve diğ., 2004).

Katı-faz yönteminin avantajlarından birisi çeşitli tarımsal, gıda, ağaç işleme ve kağıt üretim endüstrileri atıklarını substrat olarak kullanılabilir (Winqvist ve diğ., 2008). Bu atıklar yeterli karbon miktarını ve diğer besin öğelerini ihtiva eden karmaşık bir ortam oluşturur. Bu atık maddeler yetiştiricilik sürecinde kullanılmadan önce bir önışlemeden geçmelidirler.

- Yüzey alanını artırmak için substrat olarak kullanılacak atık maddeleri kesmek, ezmek veya öğütmek,
- Nem oranının ayarlanması için substratın suya batırılıp yumuşatılması ve su emmesini sağlamak,
- Zararlı organizmaları elemek veya istenmeyenleri öldürmek ve yapılarını kısmen de olsa bozmak için pastörize etmek veya otoklavlamak (sterilizasyon).

4.4.1.1 Sterilizasyon ve pastörizasyon farkı

Saman gibi hacmi büyük olan (bulk) substratlar (gübre, kompost, odun kıymığı) genellikle inokülasyondan önce pastörize edilir. Sterilizasyon toprak karışımındaki iyi ya da kötü huylu her canlı organizmanın seçici olmayan şekilde öldürülmesi demektir. Pastörizasyon ise rekabetçi olmayan ısıya dayanıklı canlıların (termotolerant) popülasyonunu korurken, en önemli rakipleri olan patojen yapılı organizmaları seçici olarak öldürür. Pastörizasyon, kontaminasyon için ortaya çıkacak fırsatçı organizmaların faaliyetlerini engeller ve mantar miselinin dominant hale geçmesine olanak sağlar. Pastörizasyon genellikle 60-82 °C (140-180 °F)'de atmosferik basınç (1 psi) altında gerçekleşir (Stamets, 2000; Adenipekun ve Fasidi, 2005).

Mantarın üzerinde kolonize olduğu substratın yüzay alanı ve homojenliği önemlidir. Bu substratın, mantar tarafından üretilen karbondioksit ve ısının yayılmasını sağlamak için ortamın oksijen dağıtımına izin veren gözenekli bir yapıda kalması gerekir (Moilanen ve diğ., 2014).

Pastörizasyon sadece ısıya duyarlı organizmaları ve onların sporlarını, sterilizasyon ise tüm organizmaları ortadan kaldırır. Pastörizasyon sırasında hayatta kalan faydalı mikroorganizmalar (çoğunlukla bakteriler), miselin gelişimine zarar vermez ve substratı diğer kontaminantlardan (farklı türdeki küfler gibi) korur (Url-7).

4.4.1.2 Mantarın yetiştirilme koşulları

(i) Oksijen: Hemen hemen tüm mantarlar aerobiktir ve oksijenin eksikliği durumunda ya yetersiz büyür yada hiç büyümmezler. Bununla birlikte az sayıda anaerobik mantarın geniş getiren hayvanların rumeninde büyüdüğü bilinmektedir (Carlile ve diğ., 2004).

(ii) Su: Su tüm yaşam formları için gereklidir. Hücre kütlesinin % 70-90'ı sudan oluşur ve hücre içinde gerçekleşen tüm biyokimyasal reaksiyonlar su fazında meydana gelir. Ancak, çoğu mantarın su içerisinde düşük çözünürlüğü olan oksijene ihtiyaç duymasından ötürü mantarlar, genellikle serbest suyun sınırlı olduğu kültür ortamında daha iyi büyürler. Su çoğunlukla substrat tarafından absorblanır (Hölker ve diğ., 2004).

(iii) Sıcaklık: Birçok mantar gelişim için 30-40 °C'de en yüksek sıcaklığa, suyun donma noktasından biraz üstünde de minimum sıcaklığa sahiptir. Bazı termofilik

mantarlar sıcaklığın 40 °C'ye yükselebildiği kompostlar üzerinde büyüebilir (Carlile ve diğ., 2004).

(iv) Nem: Yetiştirilen çoğu mantar büyüme için bir miktar çevre nemine ihtiyaç duyar. Eğer sağlanan besin yeterli derecede suya doymuşsa ve mantar direkt güneş ışığı altına konmadıysa nem miktarı büyüme için kafidir. Yine de kompost kurudukça misel nemlendirilerek/sulanarak, teraryumda veya gevşek sarılmış plastik torba içinde tutularak ideal şartlar oluşturulabilir ve güneş ışığının kurutma etkisini azaltmak için gölge olan bir yer sağlanarak nem miktarı oranı yüksek bir seviyede tutulabilir (Darwish, 2013).

(v) pH: Çoğu mantar pH 4-7 arası gibi hafif asidik büyüme koşulunu tercih eder. Fungal yetiştiricilikte düşük pH fungal büyümeyi desteklediğinden pH genellikle bakteriyel kontaminasyonu engellemek için olabildiğince düşük tutulmaya çalışılır (Carlile ve diğ., 2004).

(vi) Işık: *Pleurotus ostreatus*'un gövde kısmının düzgün bir şekilde gelişebilmesi için ışığa ihtiyacı olduğu belirtilmiştir (Jang ve diğ., 2013).

5. MATERYAL VE METOT

5.1 Toprak Özelliği ve Ölçülen Parametreler

Yaklaşık 20 kg toprak örneği Temmuz 2014'te İstanbul Teknik Üniversitesi Ayazağa Kampüsü, Etiler Yolu üzerinden alındı (Şekil 5.1). Toprağın kaba yapısından dolayı önce çapı 3 mm (7 mesh) olan elekten geçirildikten sonra, çapı 2 mm (10 mesh) olan elekten tekrar elenerek, deney için kullanılmak üzere oda koşullarında bekletildi.



Şekil 5.1: Toprağın alındığı bölge.

5.1.1 pH ölçümü

pH bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir. Toprağın pH değeri besin moleküllerinin toprak içindeki çözünürlüğünü etkilediğinden toprağın üretkenliği açısından büyük öneme sahiptir.

Toprak pH'ı için EPA 9045D Metodu takip edildi.

- 20 g toprak numunesi 150 mL'lik beherde tartıldı.
- Üzerine 20 mL distile su eklendi.
- Beş dakika boyunca cam bagetle karıştırıldı.
- Bir saat boyunca askıda kalan maddelerin çökmesi beklendi.

- Üstte kalan sıvı faz pastör pipetle ayrılarak 50 mL'lik falkon santrifüj tüplerine koyuldu.
- Tüpler 10 dakika 9000 rpm'de santrifüj edildi.
- Daha sonra süpernatant kısmı 100 mL'lik beherlere alındı.
- Önceden kalibre edilmiş pH metre ile ölçüm yapıldı.

5.1.2 Nem tayini

Toprak nem içeriği aynı zamanda su miktarını ifade eder ve kuru toprak örneğinde bulunan su kütlesinin oranı olarak veya su hacminin toprağın toplam hacmine oranı olarak tanımlanır.

Bu yöntem, toprak nemini sabit bir tartıma gelene kadar fırında kurutmaya dayanan laboratuvar tayinini kapsar. Nem içeriği (%), kurutma öncesi ve sonrası örnek tartılarak aşağıdaki şekilde hesaplanır:

- Alüminyum tartım kabının ağırlığı kaydedildi.
- Yaklaşık 10 g örnek alüminyum kaba yerleştirildi ve bu ağırlık "ıslak toprak + dara" olarak kaydedildi.
- Örnek 105 °C'lik fırına yerleştirildi ve bir gece boyunca kurumaya bırakıldı.
- Fırından alınan örnek birkaç dakika oda sıcaklığına getirildikten sonra tartıldı ve bu ağırlık "kuru toprak + dara" olarak not edildi.
- Örnek tekrar fırına koyuldu ve birkaç saat daha kurutuldu ve fırından alınarak tekrar tartıldı, ağırlık "kuru toprak + dara" olarak not edildi.
- Arka arkaya yapılan tartımlar arasında fark kalmayınca kadar son aşama tekrar edildi.

Toprağın nem miktarı kuru toprak ağırlığı olarak hesaplandı (5.1).

$$\% \text{ Nem} = \frac{W_2 - W_3}{W_3 - W_1} \times 100 \quad (5.1)$$

Burada:

W_1 = Alüminyum tartım kabının ağırlığı (g)

W_2 = Nemli toprağın ağırlığı + tartım kabı (g)

W_3 = Kuru toprağın ağırlığı + tartım kabı (g)

Ölçüm sonuçları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1: Toprakta ölçülen parametreler

pH	Nem Miktarı (%)
5.9	11.75

5.2 Fungal Kültür Hazırlanışı

Fungal kültür, ticari olarak hazırlanmış komposttan üreyen istiridye mantarından, kullanılacak olan tek ve nihai suşu elde etmek amacıyla yapıldı.

5.2.1 İstiridye mantar kompostu temini

İstiridye mantarı kompostu ve saman balyası Marmara Mantar, Çatalca'dan Haziran 2014'te alındı. Karanlık ve sıcak bir ortam hazırlanarak, Kompost bir ay boyunca ortam sıcaklığının 25-30 °C derece arası, neminin de % 67-75 arası değiştiği özel bir odada bekletildi. Bu dönemde kompostta herhangi bir uygulama yapılmadı. 30 günün sonunda, kompost tamamen beyazlayıp, mantar misellerinin çimlenmesiyle mantarın vejetatif kısmı görüldükten sonra (Şekil 5.2), kompost karanlık ortamdan alınarak daha serin, güneş ışığına direkt maruz kalmayan aydınlık bir yere taşındı ve her gün bir miktar suyla sulandı. Büyüyen mantar kısımları kültürü yapılmak üzere komposttan ayrıldı.



Şekil 5.2: 30 günün sonunda hazır komposttan çimlenen mantarlar.

5.2.2 Sterilizasyon ve % 2'lik malt-agar besiyeri hazırlanışı

Malt-extract agar, çok sayıda çevresel kaynağın yanında, klinik örneklerden mayaları ve küfleri izole etmek ve kültürlerini yapmak amacıyla kullanılan genel amaçlı bir büyütme ortamıdır. Ortam 4 g kuru malt-extract ve 4 g agar agar 500 mL'lik cam

besiyeri şişesinde tartılıp 200 mL suda çözüldü. Magnetik balık yardımıyla ısı ayarlı magnetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldıktan sonra 121 °C'lik otoklavda 15 dakika steril edildi. Hazırlanan katı agar, tek kullanımlık petri kaplarına yaklaşık 20-25 mL olacak şekilde döküldü ve soğumaya bırakıldı (Stamets, 2000).

5.2.3 Saf kültür

Kültürleme çalışmaları İTÜ Çevre Mühendisliği Katı Atık Laboratuvarı Laminar kabininde yapıldı.

Saf kültür elde etme sürecinin ilk aşamasında kullanılacak olan laminar kabin, % 80'lik etil alkol ve % 1'lik çamaşır suyu ile düzgün bir şekilde dezenfekte edilip 15 dakika UV ışığı açık şekilde bekletildikten sonra kabine kültürü yapılacak olan istiridye mantarları yerleştirildi.

Saf kültür hazırlığının ikinci aşaması olarak, hasat edilen mantarın kök kısmı, bek alevinde steril edilmiş bistüri yardımıyla ikiye ayrıldı ve açılan temiz bölgeden hiç el değmeden steril pens ile küçük parçalar kopartılıp, daha önceden hazırlanmış % 2'lik malt-agar besiyerine ekildi (Şekil 5.3; Şekil 5.4). Ekimleri tamamlanan petrilerin kapakları parafin yardımıyla kapatılarak dış ortamdan kaynaklanabilecek herhangi bir kontaminasyondan korundu.

Mantarın kalın kök kısmından alınan parçaların petrilere ilk ekimleri yapıldıktan sonra yaklaşık bir hafta 25-30 °C sıcaklıkta (Ağustos ayı) büyümeleri gözlemlendi. Sıcaklığın da etkisiyle hızlı büyüme gösteren petrilere alınan parçalardan, saf kültür elde etmek amacıyla steril bir şekilde ikinci ekimler yapıldı. Benzer şekilde dört-beş kez petrilere aktarım yapıldı. Daha sonra kullanılmak üzere petrilere bir kısmı +4 °C'de muhafaza edildi (Sainos, 2006).



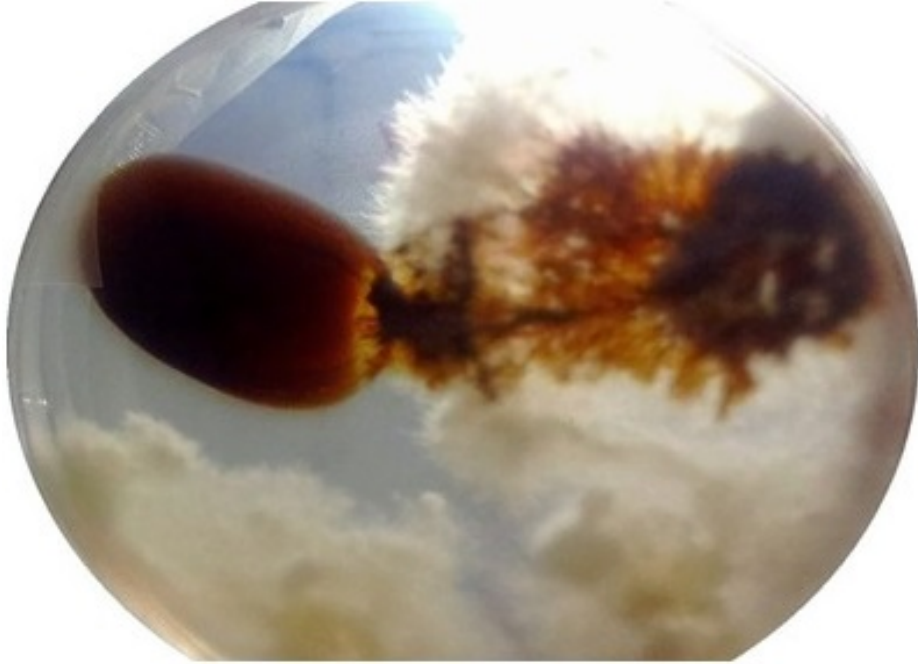
Şekil 5.3: İstiridye mantarının uç kısmından ikiye ayrılması.



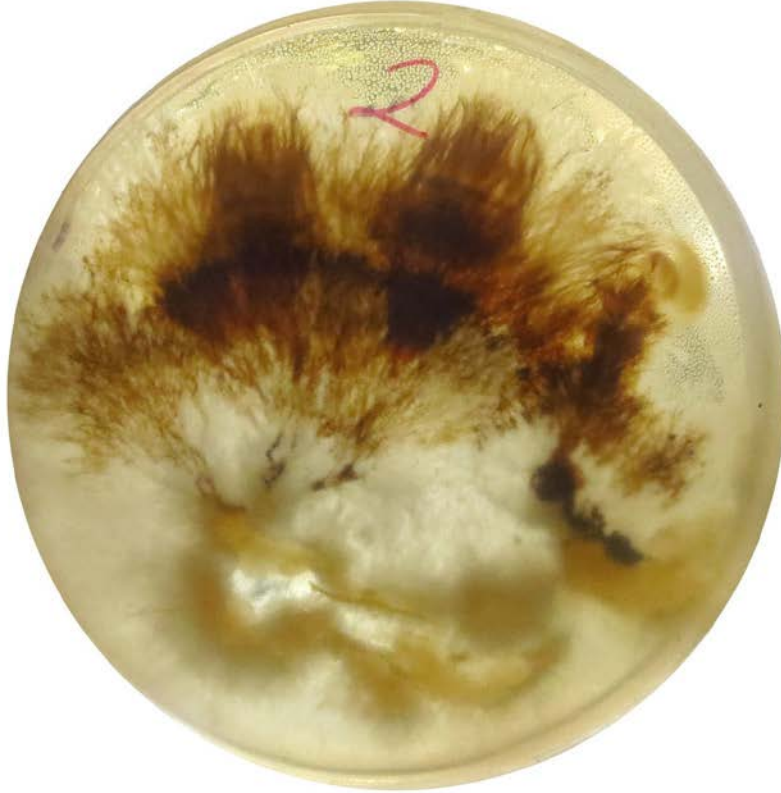
Şekil 5.4: İstiridye mantarının kök kısmından steril parça alımı.

5.2.3.1 Saf kültürün ham petrole karşı davranışının önceden gözlenmesi

Elde edilen saf kültürlerden birkaç tanesi, ham petrolün varlığında miselin nasıl davranacağını gözlemlemek için kullanıldı. Miseller petri kabının yaklaşık yarısını kapladıklarında, steril kabinde tekrar açılıp, birkaç damla kadar ham petrol, miselin henüz ulaşmadığı petri kabı bölgesine damlatıldı. Daha sonra tekrar uygun sıcaklıkta büyümeye bırakılan petri kabinde nitel olarak gözlemlendi (Şekil 5.5).

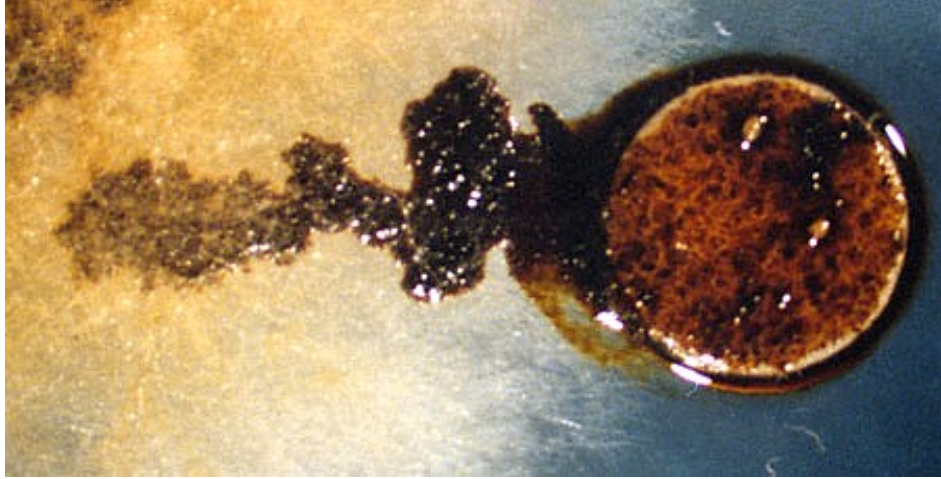


Şekil 5.5: Ham petrol üzerinde yayılan ıstiridye mantar miselleri.



Şekil 5.5 (devam): Ham petrol üzerinde yayılan istiridye mantar miselleri.

Stamets (2005), istiridye mantarı misellerinin ham petrolle doyurulmuş ve petri içerisine yerleştirilmiş selüloz plak karşısındaki davranışını gözlemlemiştir (Şekil 5.6). Buna göre, petrolü emen mantar miselleri önce koyulaşmaktadır. Koyu renkteki misellerin petrolü metabolize etmesinden sonra ise misellerin rengi gittikçe açılmaktadır (Stamets, 2005).



Şekil 5.6: Selüloz plağa emdirilmiş ham petrolün istiridye mantar miselleri tarafından absorblanması (Stamets, 2000).

5.3 Tohum (Grain) Tipi Seçimi ve İnokülasyon

Klingman, (1950)'de kompostu (spawn) uygun bir ortam veya substrat üzerinde büyüyen seçilmiş bir mantarın miseliyle beraber adlandırılan ismi olarak açıklamıştır. Kompost (spawn), kullanılacak olan substratın içine karıştırılan herhangi bir misel formudur (Stamets, 1993).

İstiridye mantar kompotu iki türlü materyal üzerinde oluşturulabilir. Bunlar; ya çeşitli cinsteki tohum taneleri ve kabukları, ya da endüstriyel bir atık olan tohum samandır. Saman üzerine ekilmeden önce tohum kompostunun oluşturulmasının sebebi, misel büyümesi için gerekli olan azot ve fosforun sağlanmasıdır.

Tohum kompostu (grain spawn) yapmak, misel kütlelerinin üstel bir şekilde çoğaltılması için gerekli olan bir aşamadır. Tohum kompostu oluşturmanın amacı, kullanılan substratı misel açısından yoğun hale getirip, miselin canlılığının en yüksek olduğu bir seviyeye yükseltmektir. Tohum, sadece miselin düzgün bir şekilde yayılması için gerekli bir madde olmamakla beraber, aynı zamanda besinsel bir tamamlayıcıdır. Tohum kompostu oluşturmada tam tahıl ürünleri kullanılır çünkü her bir tahıl tanesi, miselin çevresindeki alana sıçrayabildiği bir platform olan *misel kapsülü* görevi görür. Çoğu küçük ölçekli çalışan mantar yetiştiricileri organik yetiştirilmiş olan arpa veya buğday tohumundan faydalanırlar. Neredeyse tüm tahıl tohumları kompost üretimi için kullanılabilir. Her kompost üreticisi tecrübeleriyle en tatmin edici sonucu elde ettiği tohumu seçer (Stamets, 2000).

5.3.1 Tohum (Grain) seçimi

Mantar miselinin tohum üzerinde büyümesini gözlemek için ilk önce buğday tohumu denendi. Tohumlar Eminönü Pazarı'ndan temin edildi. Ağustos ayından Ekim ayına kadar buğday tohumuyla yapılan ekimler test amaçlı kullanıldı. Daha sonra kabuksuz arpa tohumunun, yapılan ekimler sonucunda zaman açısından daha hızlı ve gür büyüdüğü gözlemlenip optimize edildikten sonra deney için arpa tohumu seçildi. Kabuksuz arpa tohumu Üsküdar'dan temin edildi.

Kalsiyum sülfat (Alçı - $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

Tohum kompostu (grain spawn) hazırlama aşamasında sterilizasyondan sonra tohum tanelerinin yapışmasını engelleyip birbirinden ayrı tutmak için kullanılan bir tampon olan kalsiyum sülfat, sülfür veya sülfirik asite dönüşüncüye kadar pH'ı belli bir noktaya kadar $\frac{1}{2}$ oranında etkileyebilir. Aynı zamanda mantar büyümesini artıran temel elementler olan kalsiyumu (Ca) ve sülfürü (S) sağlar. Eğer substrat bu temel elementlerden yoksun kalırsa, verim zıt yönde etkilenir (Stamets, 2000).

Seçilen yaklaşık bir kilo tohum önce çeşme suyunda birkaç kez yıkanarak içindeki diğer yabancı maddelerden arındırıldı. Klorsuz distile su, tohumların üzerini kapatacak kadar eklendi. % 2'lik alçı (CaSO_4) (w/w) eklenerek Kathiravan ve diğ. (2014), 12-24 saat arası bir tencerede kapağı kapalı bir şekilde bekletildi. 12 saat sonunda bir ocak üzerinde beş dakika boyunca kaynatılan tohumlar daha sonra süzüldü. Bu aşamada tohumların kısa bir süre kaynatılmasının sebebi, tohum taneciklerine miselin rahatça yayılabileceği uygun bir kıvamı sağlatabilmek içindir. Tencereden buhar çıkışı tamamen durana kadar ara ara tencere sallandı. Buhar çıkışı durduktan sonra tencerenin ağzı kapatılarak tohumların oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

5.3.2 Tohum inokülasyonu

Deneyde kullanılan tüm kavanozların kapakları matkapla tam ortasından delindi. Sentetik elyaf, delinen kısımlara sıkıştırılarak cam kavanozlar modifiye edildi. Kavanozların bu şekilde modifiye edilmesinin sebebi, misel için gerekli oksijen geçişini sağlarken, diğer yabancı maddelerin ve mikroorganizmaların geçişini engellemek içindir.

300 g kabuksuz arpa tohumları özel olarak hazırlanmış cam kavanozlarda tartıldı (Şekil 5.7).



Şekil 5.7: Tohumların kaba terazide tartımı.

Daha sonra ağızları çok sıkı olmayacak şekilde kapatılıp alüminyum folyo ile sarılan kavanozlar otoklavda steril edildi (Şekil 5.8).



Şekil 5.8: Tohumların sterilizasyonu

Oda sıcaklığına getirilen kavanozlar laminar kabin altında önceden hazırlanmış *P. ostreatus* saf kültürüyle (yaklaşık bir petri kültürüyle iki tane kavanoz) dikkatli bir şekilde inoküle edildi (Şekil 5.9; Şekil 5.10).



Şekil 5.9: Saf kültürlerin laminar kabinde steril edilmiş arpa tohumları üzerine ekimi.



Şekil 5.10: İnoküle edilmiş arpa tohumları.

Misel ağları cam kavanozların yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ünü kapladığında (Şekil 5.11), tohumların birbirine yapışmasını engellemek ve tohum tanecikleri arasında hava boşluğu oluşturup miselin daha gür bir şekilde büyümesini sağlamak için kavanozlar çok sert bir şekilde elle çalkalandı. Etrafları tamamen sarılarak büyümeleri tamamlanmış olan miselli tohumlar (tohum/grain kompostu), saman hazırlanıncaya kadar büyümelerini yavaşlatmak için +4 °C'de beklemeye alındı.



Şekil 5.11: Miselin arpa tohumları üzerinde yayılımı.

5.4 Saman Temini ve Saman Kompostu (Spawn) Hazırlanışı

Çatalca'da bulunan Marmara Mantar şirketinden Haziran 2014'te bir balya buğday samanı alındı. Saman kalitesi zaman içerisinde azaldığı için iri ve daha canlı saman taneleri kötüleşmiş kısımlarından ayrıldı. Ayrılan bu kısım miselin yayılacağı yüzey alanını genişletmek için yaklaşık 2-5 cm uzunluğunda el ve makas yardımıyla küçük parçalara bölündü (Krishnakumari ve diğ., 2014). Patates filesine doldurulan samanlar gerekli nem oranını (% 65-70) elde etmek için bir buçuk saat ılık suda, tamamen suya batırılmış olduğundan emin olmak için üzerine sert bir taş konularak bekletildi. Genellikle 100 g olan kuru saman ıslatıldıktan sonra 300 g yaş samana dönüşür (Mushworld, 2004). Neme doyan ve hacmi genişleyen saman torbası sudan çıkartılarak, samanlar bir damla su akıtmayınca kadar bekletilmek üzere yüksek bir yere asıldı. Daha sonra nemlendirilmiş samanlar polietilen fırın poşetlerine 300 g kadar dolduruldu. Pastörizasyon sırasında poşetlerin içine su kaçmasını önlemek için ikinci bir poşete sarılan samanlar pastörizasyon için hazır hale getirildi.

Bu çalışmada ısıya dayanıklı plastik poşetler (fırın torbası) seçildi. Poşet içi sıcaklıkların poşet çevresindeki sıcaklıktan daha yüksek olması beklendi. Bu sıcaklık substratın pastörizasyon seviyesini artırmakta, kompost (spawn) büyümesini ve verimi geliştirmekte ve aynı zamanda kontaminasyondan uzak bir ortam sağlamaktadır. Fırın poşetleri bu işlem için daha uygundur çünkü kompost büyümesi süresince substrattaki göreceli nemi korur ve böylece diğer metotlarla kıyaslandığında substratın kurummasını önler (Mandeel ve diğ., 2005).

5.4.1 Saman pastörizasyonu

Pastörizasyon zararlı rekabetçi organizmaların miktarının azaltılması demektir. Pastörizasyon işlemi bittiğinde, substrat üzerinde faydalı bakteri formunda hala mikro-aktivite devam etmektedir.

Pastörizasyonun ilk amacı, besin için yarışacak veya direkt misele saldırarak olan rekabetçi böcekleri, küfleri ve bakterileri elemek ve bu şekilde özellikle termofiller gibi iyi huylu mikroorganizmaların kaybını en aza indirerek, mantara substrat üzerinde büyüebilmesi için bir avantaj sağlamasıdır (Url-8).

Doldurulmuş poşetlerden dört tanesi düdüklü tencerenin dibine yerleştirilerek, sabit durmaları için üzerlerine iki büyük ağır beton parçası konuldu. Üzerlerine geçecek kadar soğuk su eklenerek dijital termometre ile sıcaklığın yaklaşık 71 °C'ye ulaşması beklendi. Sıcaklık istenilen değere geldiğinde bir saatlik pastörizasyon işlemi başlatıldı (Şekil 5.12). Bir saat boyunca sürekli kontrol edilen sıcaklık, ocak arada bir kapatılıp açılarak 71-82 °C arasında tutulmaya özen gösterildi. Pastörizasyon işlemi bittikten sonra poşetler oda sıcaklığına getirildi



Şekil 5.12: Saman pastörizasyon işlemi

5.4.2 Saman inokülasyonu

Oda sıcaklığına gelen poşetler dış kısımdaki ikinci poşetten çıkartılarak, daha önceden hazırlanmış tohum kompostları (grain spawn) ile inoküle edildi. Tohum/Saman oranı % 25 olarak seçildi. Daha önceden 300 g saman doldurulan pastörize edilmiş poşetlere 75 g tohum kompostu, kaba terazide tartılarak eklendi (Şekil 5.13).



Şekil 5.13: Önceden inoküle olmuş tohumların pastörize edilmiş samana eklenmeden önce tartılması.

Tohumların poşetin her köşesine ulaşmasını sağlamak için poşetler çok iyi bir şekilde çalkalandı. Poşetlerin ağzı Şekil 5.14'deki gibi tuvalet kağıdı rulosu ve sentetik elyaf kullanılarak kapatıldı. Elyafın bu şekilde kullanılmasındaki amaç kompostun hava almasını sağlarken, diğer yandan yabancı maddelerin geçişini engellemek içindir.



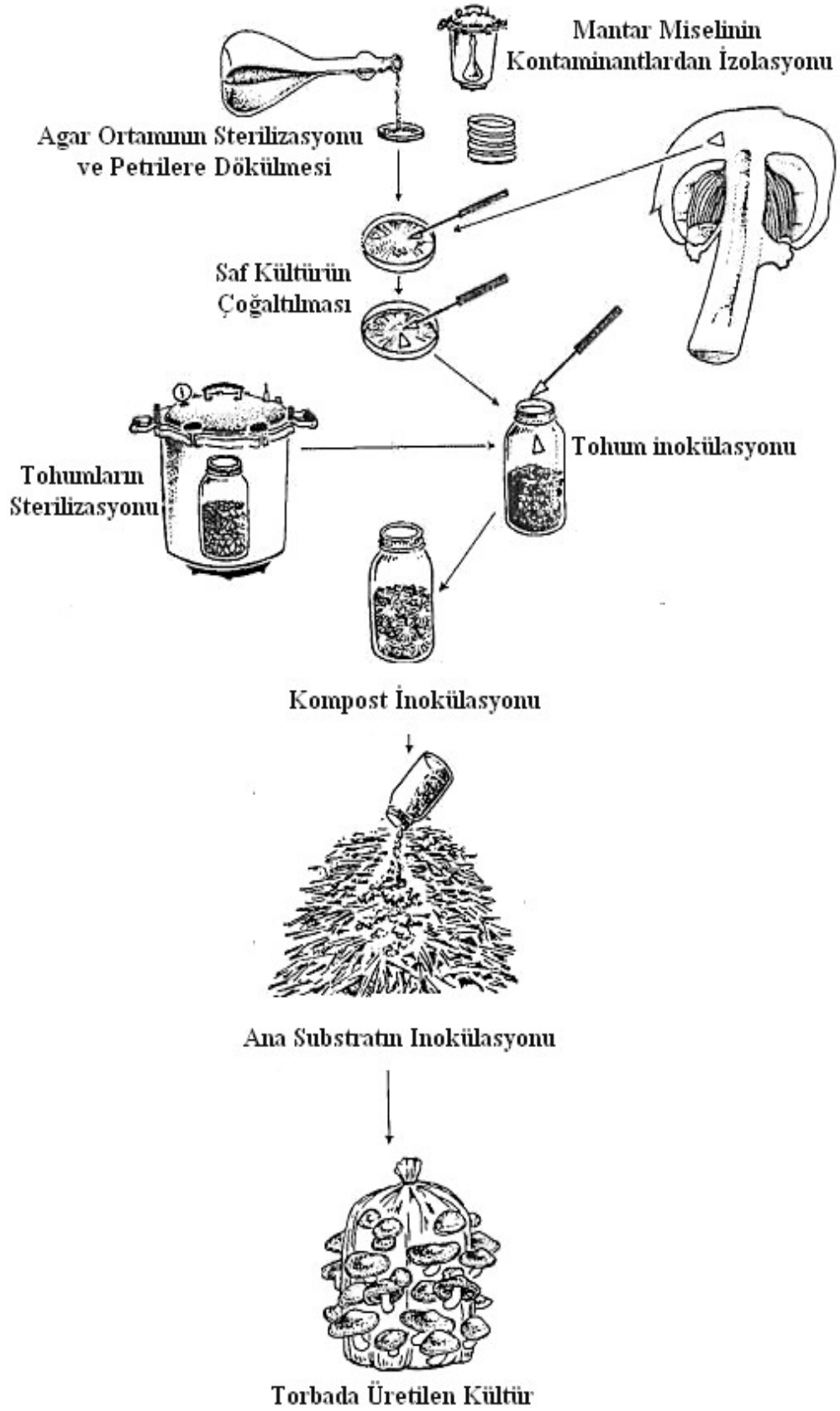
Şekil 5.14: Arpa tohumları ile inoküle edilmiş pastörize samanlar.

Yaklaşık iki hafta içerisinde inoküle olan saman kompostu Şekil 5.15'te gösterilmiştir.



Şekil 5.15: Tohum inokülasyonu gerçekleşen samanlar.

Bu aşamaya kadar yapılan ekim, sterilizasyon ve inokülasyon kısımlarını daha anlaşılır kılmak için Şekil 5.16'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.16: Ekim, sterilizasyon ve inokülasyon kısımlarının şematik gösterimi (Stamets, 2000'den alıntıdır).

5.5 Deney Kurulumu

Bu çalışmada, üç farklı konsantrasyonda (% 2.5, % 5, % 7.5) (w/w) ham petrolle yapay olarak kirletilmiş toprak örneklerinin, iki ayrı zaman diliminde (25. ve 50. gün) *Pleurotus ostreatus* mantar miselleri tarafından gideriminin, spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi amacıyla deney kurulumu gerçekleştirildi.

25. ve 50. günler sırasıyla I. ve II. Set olarak isimlendirildi.

Bunun için deney grubu, deney grubunun bir tekrarı, her deney grubunun birer tane kontrolü ve kirletilmemiş (sade) toprak şeklinde, her sette 10 kavanoz olmak üzere iki sette toplam 20 kavanoz düzeneği hazırlandı (Çizelge 5.2; Çizelge 5.3).

Çizelge 5.2: Set I deney kurulumu.

25. gün örnekleri SET I	200 gr. Toprak için eklenen ham petrol miktarları		
	5 g (% 2.5)	10 g (% 5)	15 g (%7.5)
Deney 1	200 g toprak + 5 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 10 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 15 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel
Deney 1 (Tekrar)	200 g toprak + 5 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 10 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 15 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel
Kontrol (Yapay olarak kirletilmiş)	200 g toprak + 5 g h. petrol	200 g toprak + 10 g h. petrol	200 g toprak + 15 g h. petrol
Sade Toprak (Kirletilmemiş)	200 g toprak	200 g toprak	200 g toprak

Çizelge 5.3: Set II deney kurulumu.

50. gün örnekleri SET II	200 gr. Toprak için eklenen ham petrol miktarları		
	5 g (% 2.5)	10 g (% 5)	15 g (%7.5)
Deney 1	200 g toprak + 5 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 10 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 15 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel
Deney 1 (Tekrar)	200 g toprak + 5 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 10 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel	200 g toprak + 15 g h. petrol + 25 g saman + 15 g misel
Kontrol	200 g toprak + 5 g h. petrol	200 g toprak + 10 g h. petrol	200 g toprak +15 g h. petrol
Sade Toprak (Kirlenmemiş)	200 g toprak	200 g toprak	200 g toprak

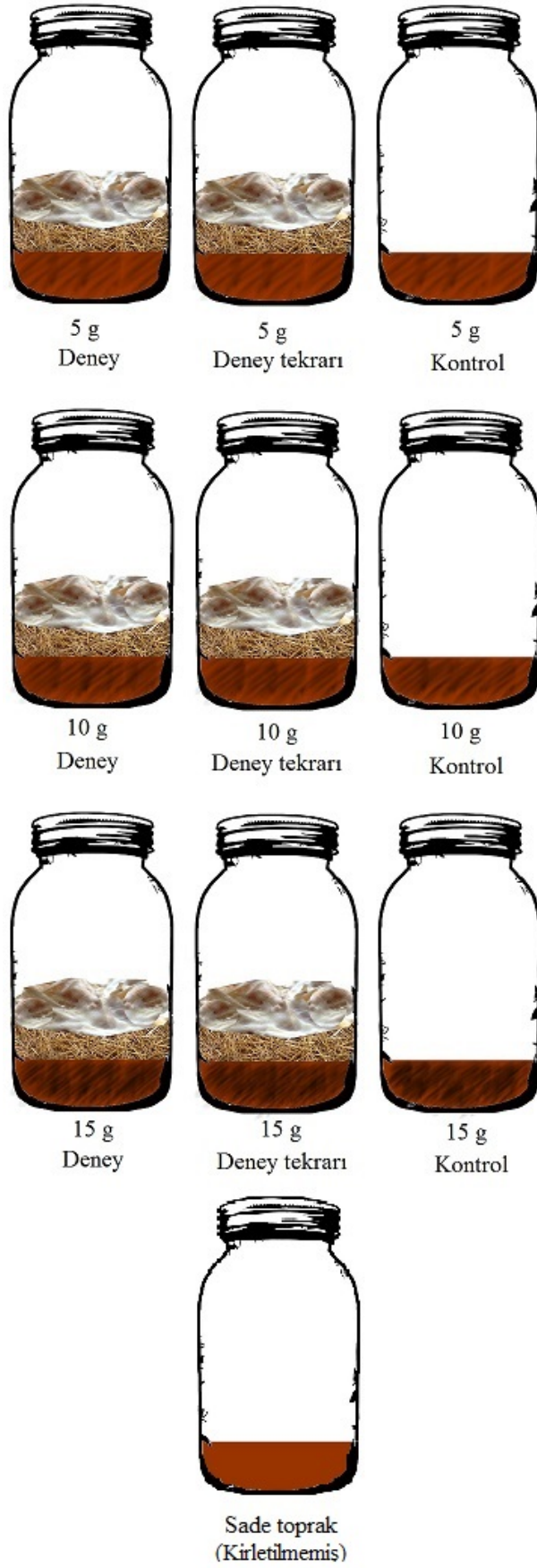
Set I ve Set II için ortak olan deney kurulumu şematik olarak Şekil 5.17’de verilmiştir.

Aynı oda şartlarında bekletilen kavanozlara deney süresi boyunca hiçbir müdahalede bulunulmadı.

Kontrol gruplarına sadece petrol, deney gruplarına (deney ve deney tekrarı) da saman ve kompost eklendi. Sade toprak da 25. ve 50. günler sonunda analiz edildi.

Her bir deney grubunda ve deney grubunun tekrarında bulunan miseller, 25. ve 50. günlerin sonunda analiz edildi.

Kavanozlar açıldıktan sonra, önce toprak ve misel örneklerinin ekstraksiyonu ve distilasyonu yapılarak, gravimetrik toplam ekstrakte olmuş organik madde miktarları tespit edildi. Daha sonra gravimetrik sonuçları alınan bu ekstraktlar seyreltilerek UVF spektrofotometre cihazında örneklerdeki TPH okumaları yapıldı.



Şekil 5.17: Ham petrol konsantrasyonlarına göre oluşturulan deney kurulumunun şematik gösterimi (Her iki set için).

5.5.1 Toprağa ilave edilen ham petrol konsantrasyonları

Kullanılan ham petrol BOTAŞ tarafından Irak'tan tedarik edildi. 200 g toprak örnekleri deney gruplarını oluşturmak için sırasıyla 5, 10 ve 15 g (% 2.5, % 5, % 7.5) (w/w) Irak (light) ham petrolü ile kontamine edildi.

Deneyde kullanılacak tüm kavanozların kaba terazide darası alındıktan sonra hepsine 200 g elenmiş toprak eklenip tartıldı.

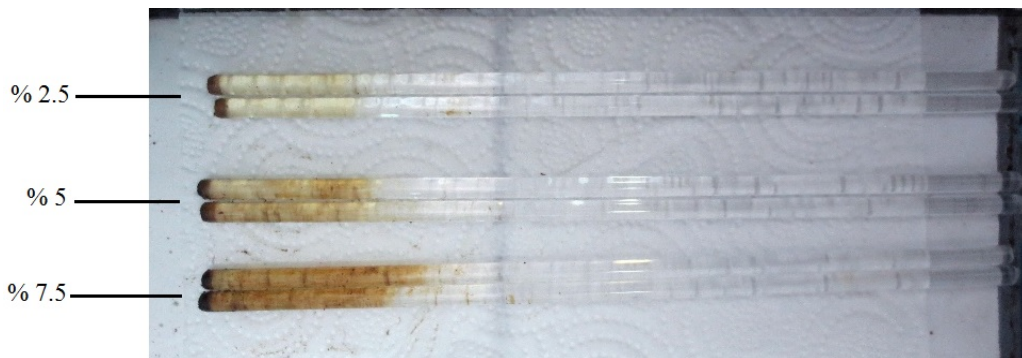
Toprağın nem miktarı düşük (% 11.75) olduğu için bu miktarı yükseltmek, aynı zamanda petrole akışkanlık sağlamak ve böylelikle ekleme sırasında ortaya çıkabilecek kayıpları en aza indirebilmek için her bir kavanoza 10 g saf su eklendi. Önce orta boy tek kullanımlık plastik tartım kabının darası alındı. 10 g saf su eklenen kabın tekrar darası alındıktan sonra, üzerine deney grubundaki kavanozlara eklenecek miktarda petrol sırayla ilave edildi. Böylelikle suyla beraber eklenen petrolün toprağa karışması daha kolay hale gelmiş, aynı zamanda gravimetrik olarak daha düzgün bir şekilde tartımlar alınabilmiştir.

Toplam kayıplar

Yapay olarak kirletilen toprakta petrolün toprağa en iyi şekilde karışmasını sağlayabilmek için cam baget ve metal kaşık kullanıldı. Aynı zamanda petrolün kavanozlardaki topraklara suyla karıştırılıp eklenmesi sonucunda kullanılan bu gereçlerin, yapılan en düzgün sıyırma ve karıştırma işlemleri sonucu cidarlarında kalan (Şekil 5.18) petrol miktarları hesaplandı. Bu hesap:

Maksimum ortalama kayıp = (Eklenen toplam petrol miktarı)g – (Cam baget + metal kaşık + plastik tartım kabı)g

şeklinde hesaplanıp, çıkan maksimum ortalama kayıp %1.5'u geçmediği için ve tüm kavanozlarda aynı oranlarda kayıp olduğu için ihmal edilmiştir.

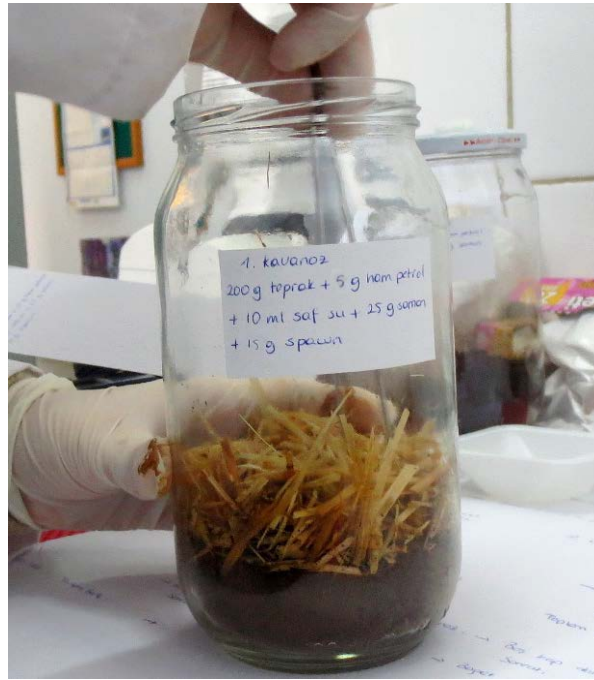


Şekil 5.18: Üç farklı konsantrasyon için cam bagetlerin cidarlarında kalan petrol.

5.5.2 Saman eklenmesi ve sterilizasyon

İstiridye mantarı toprakta büyüyen bir mantar türü olmadığından mantar misellerinin toprağın içine daha rahat bir şekilde yayılmasını sağlamak için kompost (spawn) inokülasyonundan önce toprağın üzerine saman eklenerek miselin, komposttan samana geçiş yapması sağlandı. Samanın toprağın üzerine eklenmesindeki amaç, komposttaki miselin çoğalmasını sağlarken aynı zamanda topraktaki kirlilikle karşılaşmadan önce ortama alışmasını sağlamaktır. Bu yüzden saman ilavesi misel için hem toprağa bir geçiş yolu oluştururken, hem de bu süre içerisinde miselin kullanabildiği bir besin görevi görmektedir.

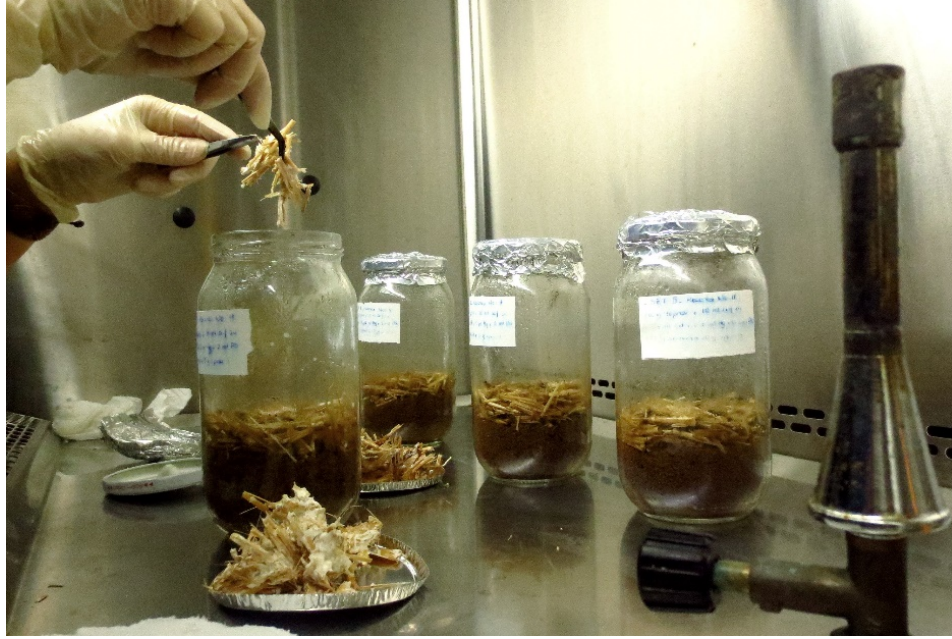
Kavanozlara eklenecek samanlar ılık suya bastırılıp bir saat boyunca bekletildi ve daha sonra asılarak fazla suyun akması sağlandı. Her bir deney grubuna 25 g saman çok bastırılmadan, sadece toprağa hafifçe değecek şekilde eklendi (Şekil 5.19) ve tüm kavanozlar sterilize edilmek üzere otoklava yerleştirildi..



Şekil 5.19: 5 g ham petrolle kirlenmiş toprağa saman eklenmesi.

5.5.3 Saman kompostu ilavesi ve inokülasyon

Sterilizasyon sonunda oda sıcaklığına getirilen kavanozların deney gruplarına laminar kabin altında daha önceden büyütülmüş saman kompostu ile inokülasyon yapıldı (Şekil 5.20).



Şekil 5.20: Steril edilen kavanozlara kompost ilavesi.

5.5.4 Deney şartları ve süresi

Ekimleri yapılan kavanozlar için hazırlanan odada sıcaklık ve nem değerleri her gün not edildi. 50 gün boyunca sıcaklık 20-29 °C ve nem % 40-77 arasında değişiklik gösterdi. Kavanozlar günışığı altında bekletildi.

Deney iki zaman grubunda yapıldı. 25. gün kavanozlarından I. setin, 50. günde de II. setin kavanozlarından ölçümler yapıldı. Analizi aynı gün içerisinde yapılamayan örnekler +4 °C’de beklemeye alındı.

5.5.5 Deney süresi sonunda kavanozların açılması

25. günün sonunda Set I örnekleri laboratuvara getirildi (Şekil 5.21). Deney grupları ve onların tekrarları olan kavanozlardaki miseller dikkatlice topraktan ayrılıp daha sonra ekstraksiyonları yapılmak üzere bekletildi (Bkz: Bölüm 5.6.1.2).

Misellerden ayrılan topraklar ise, iyice karıştırılarak Toprakların Ekstraksiyonu kısmında anlatılan şekilde tartılıp soxhlet ekstraksiyon ünitesine yerleştirildi (Bkz: Bölüm 5.6.1.1).

50. günün sonunda laboratuvara getirilen kavanozlar (Şekil 5.22) açılarak, içindeki toprak ve miseller de aynı şekilde muamele edilip ekstraksiyon için hazır hale getirildi.



Şekil 5.21: 25. gün sonunda açılan kavanozlar. Set I, 15 g örnekleri.



Şekil 5.22: 50. gün sonunda açılan kavanozlar. Set II, 15 g örnekleri.

5.6 Metot ve Analizler

5.6.1 Ekstraksiyonlar

Kontrol grubu ve deney grubu topraklarının ekstraksiyon ön işlemleri ile deney grubu kavanozlarından çıkan misellerin ön işlemleri farklı şekilde yapılırken, ekstraksiyon işlemi aynı şekilde ve sürede yapıldı.

5.6.1.1 Toprakların ekstraksiyonu

Toprak ekstraksiyonları EPA 3541 Metodu takip edilerek klasik Soxhlet Ekstraksiyonu yöntemiyle yapıldı (Şekil 5.23). Bunun için önce sistem çeker ocak içerisinde kuruldu. Isıtıcı olarak su banyosu, çözücü olarak da Diklorometan (DCM) kullanıldı.

Kaba terazi üzerinde cam bir beher tartılıp darası alınarak içine soxhlet selüloz kartuşu yerleştirildi. Her bir kavanozdaki toprak örneğinden 25 g alınıp kartuş içerisine dikkatli bir şekilde konuldu. Daha sonra kartuş pens yardımıyla ekstraksiyon çemberine yerleştirildi. 250 mL'lik boş ekstraksiyon balonu ekstraksiyon çemberine takıldıktan sonra, çemberin üzerinden numuneyi ilk seferde yıkamak için 150 mL DCM yavaşça döküldü ve çember sisteme takılarak su banyosuna yerleştirildi. Sistemin su girişi açıldıktan sonra sıcaklık 50 °C'de sabit tutulup ilk sifon gerçekleşene kadar beklendi. İlk sifondan itibaren 8 saat boyunca ekstraksiyon yapıldı. Sistemin en az dört kez sifon yaptığından emin olunduktan sonra ekstraksiyon sonlandırıldı. Su banyosu içerisinde sıcaklıkları yavaşça düşen balonlar ekstraksiyon çemberinden ayrılarak ağızları cam kapaklarla kapatılıp laboratuvar ısısında (~12 °C) bekletildi.



Şekil 5.23: Su banyosu ve Soxhlet Ekstraksiyon Aparatı.

5.6.1.2 Misellerin ekstraksiyonu

Kavanozlardan özenli bir şekilde çıkartılan miseller temiz kavanozlara alındıktan sonra üzerlerine 100 mL DCM dökülüp hafifçe çalkalandı. Yaklaşık 15-20 dakika kavanozun ağzı kapalı bir şekilde bekletilen ve arada bir hafifçe çalkalanan, misel içerisindeki petrolü ekstrakte etmiş olan çözücü daha sonra 250 mL'lik şilifli cam erlenlere aktarıldı. Kapakları kapatılan erlenler distilasyon işlemi için laboratuvar ortamında bekletildi (Şekil 5.24).



Şekil 5.24: DCM içinde çözülmüş halde bulunan misel ekstraktları.

Kavanozlardaki DCM ile ekstrakte olmuş olan miseller ise, çözücünün tam olarak uçması için ağzı açık şekilde bir gece bekletildikten sonra tartımları alınarak, ekstrakte edilen misel miktarları not edildi.

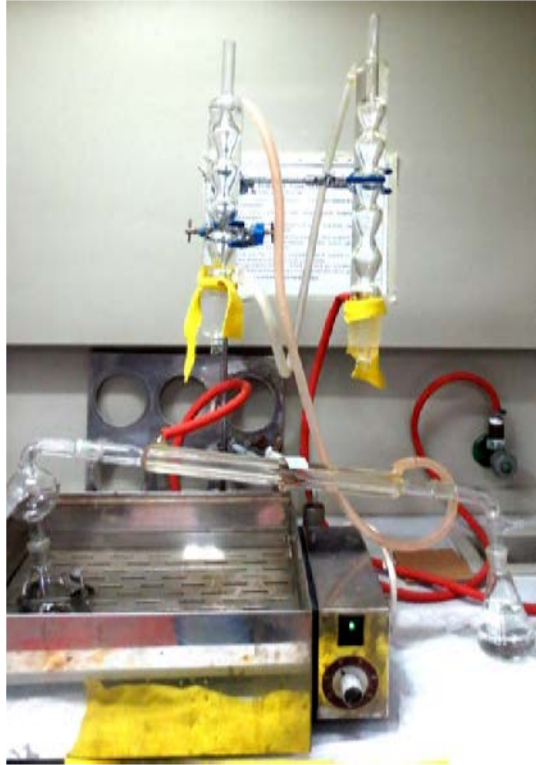
5.6.2 Distilasyonlar

Sabit tartım, iki tartım arasındaki fark 0,0001 gramı geçmediği tartımdır. Distilasyonlar gerçekleştirilmeden önce kullanılacak olan tüm 150 mL'lik şilifli cam balon erlenler numaralandırılıp ilk tartımları (dara) sabit bir değer alınca not edildi. İlk tartımları hassas terazide alınan erlenler, distilasyon işleminden çıktıktan sonra desikatörde bekletildi. Yaklaşık bir gün desikatörde bekletilen erlenler tekrar hassas terazide tartıldı ve ağırlıkları değişmediği anda tartımları not edildi. Gravimetrik ölçülen Ekstrakte olmuş Organik Madde (EOM) miktarları bu iki tartım arasındaki farkın alınmasıyla hesaplandı (5.2)

$$[\text{Boş erlen dara} + \text{Ekstrakte olmuş organik madde}] - [\text{Boş erlen dara}] \quad (5.2)$$

5.6.2.1 Toprak örneklerinin distilasyonu

Ekstraksiyonları gerekleŒmiŒ ve laboratuvar sıcaklığında bekleyen cam balonlardaki toprak numuneleri daha sonra çözücünün (DCM) uçurulması ve nihai ekstraktların elde edilmesi için distilasyon ünitesine takıldı (Œekil 5.25). Su banyosu üzerinde hazırlanan distilasyon ünitesine, distilasyonu olacak erlen ve çözücünün toplanacağı erlen takılarak iŒlem aynı sıcaklıkta (ekstraksiyonun gerekleŒtięi sıcaklık) baŒlatıldı. Çözücünün tamamen toplandığından emin olunduktan sonra erlenlerin su banyosu içerisinde sıcaklığının dūŒmesi beklenip setten çıkartıldı. DıŒarıdan herhangi bir partikül giriŒi olmaması için bir müddet çeker ocak kabininin içerisinde ağızları açık halde tutulan erlenlerin içinde kalan az miktardaki çözücü de uçtuktan sonra, erlenler tam olarak sabit tartıma gelmeleri için desikatöre kondu.



Œekil 5.25: Distilasyon ünitesi.

5.6.2.2 Misel örneklerinin distilasyonu

Ekstraksiyonları gerekleŒmiŒ ve laboratuvar sıcaklığında bekleyen 250 mL'lik Œilifli cam erlenlerdeki misel numuneleri, 150 mL'lik distilasyon erlenlerine aktarıldı. Çözücünün uçurulması ve nihai ekstraktların elde edilmesi için erlenler distilasyon ünitesine takıldı. Toprak numunelerinin distilasyon prosedürünün aynı misel numuneleri için de uygulandı.

5.6.3 Ekstrakte olmuş organik madde (EOM) miktarları

EOM, ekstrakte edilen örnekteki tüm alifatik, aromatik ve petrolün bulunduğu ortamdaki diğer canlı organik maddelerin toplamını ifade eden bir değerdir. TPH'nı ve (PAH)'ı belirlemek için petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş toprakların analizinde spektroskopik ve spektroskopik olmayan tekniklerin rolü birbirinden ayrılamaz (Okparanma ve Mouazen, 2013). Bu yüzden EOM'nin içindeki petrol hidrokarbonlarından aromatik halkaların miktarını belirleyebilmek için, ekstrakte olmuş maddelerin UV floresans spektroskopisi ile TPH miktarları belirlendi.

25. ve 50. gün sonunda Soxhlet Ekstraksiyonu ve distilasyonları tamamlanan tüm erlenlerdeki EOM miktarları formüle göre hesaplandı (5.2). Toprak ekstraktları için üç farklı konsantrasyondaki deney ve deney grubu tekrarlarının aritmetik ortalaması, ekstraksiyona giren madde miktarlarının (hepsinde 25 g toprak) aritmetik ortalamasına bölündü (Çizelge 5.4).

Ekstraksiyona giren misel miktarları değişiklik gösterdiği için hepsi 25 g'a eşit olacak şekilde denkleştirildikten sonra aritmetik ortalamaları alındı (Çizelge 5.5).

Kontrol gruplarının ve sade toprakların tekrarları olmadığı için aritmetik ortalamaları alınmadı.

Çizelge 5.4: 25. ve 50. gün sonunda ekstrakte edilen topraklardan elde edilen EOM miktarlarının aritmetik ortalamaları.

5, 10 ve 15 g ham petrol ile kirlenmiş toprakların ekstrakt miktarlarının aritmetik ortalaması. SET I (25. gün)		
5 g petrol/200 g	10 g petrol/200 g	15 g petrol/200 g
0.474 g/25 g	0.934 g/25 g	1.334 g/25 g

5, 10 ve 15 g ham petrol ile kirlenmiş toprakların ekstrakt miktarlarının aritmetik ortalaması SET I (50. gün)		
0.445 g/25 g	0.917 g/25 g	1.293 g/25 g

Çizelge 5.5: 25. ve 50. gün sonunda ekstrakte edilen misellerden elde edilen EOM miktarlarının (25 g'a eşdeğer) aritmetik ortalamaları.

5, 10 ve 15 g ham petrol ile kirletilmiş topraklardan çıkan misellerin, ağırlık olarak eşdeğer hale getirilmiş (25 grama eşdeğer) miktarlarının aritmetik ortalaması.

SET I (25. gün)

5 g ham petrol eklenmiş kavanozdan çıkan misel	10 g ham petrol eklenmiş kavanozdan çıkan misel	15 g ham petrol eklenmiş kavanozdan çıkan misel
0.130 g	0.146 g	0.53 g

5, 10 ve 15 g ham petrol ile kirletilmiş topraklardan çıkan misellerin, ağırlık olarak eşdeğer hale getirilmiş (25 grama eşdeğer) miktarlarının aritmetik ortalaması.

SET II (50. gün)

0.039 g	0.185 g	0,775 g
---------	---------	---------

5.6.4 UVF (Ultraviyole florespektrofotometre) Analizi

Toplam petrol hidrokarbonları (TPH) UV floresans spektroskopisi yöntemiyle analiz edildi (Ertekin ve diğ., 2011). Numuneler spektrofluorometrinin lineer kalibrasyon aralığına (100-1003 µg/ml) uyacak şekilde seyreltildi.

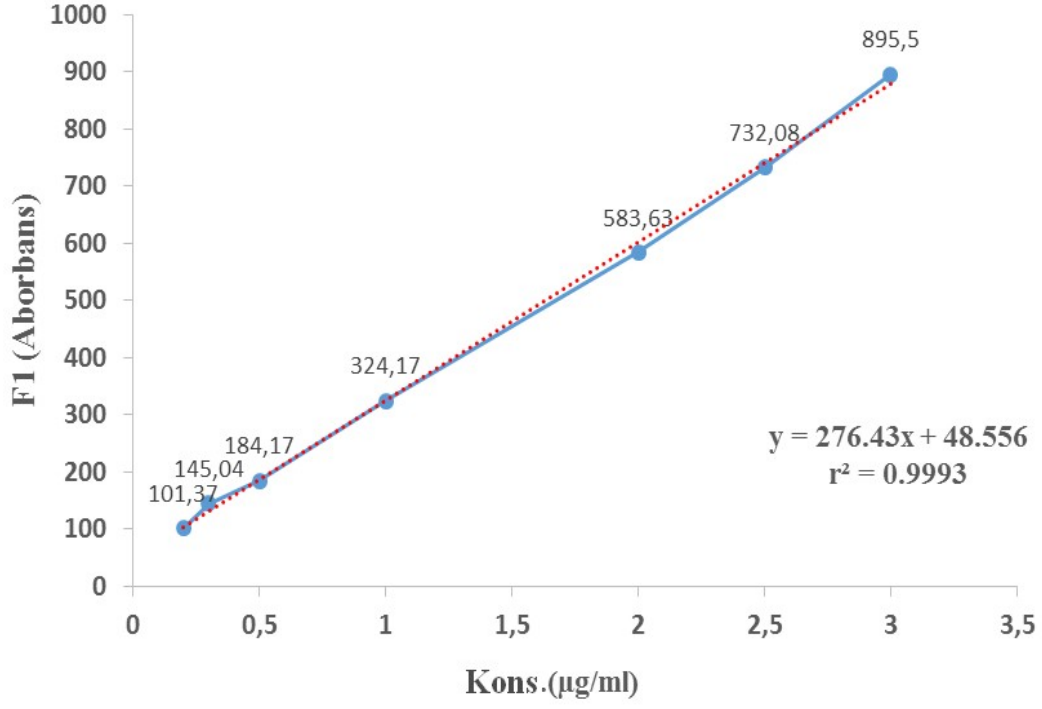
Numunelerin toplam petrol hidrokarbon miktarları, referans olarak kullanılan Irak (light) ham petrolü, n-hekzan içinde 7 noktada ve 0.20, 0.30, 0.50, 1.00, 2.00, 2.50, 3.00 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanarak UVF cihazı ile 310/360 nm (ex/em) deki flüoresans intensiteleri, çizilen standart eğri ile hesaplandı (Şekil 5.26).

Referans ham petroler kullanılarak çizilen standart eğri denklemi (5.3)'de gösterilmiştir.

$$\text{Irak ham petrolü (Light) } F1 = 276.43 \times c + 48.556 \quad r^2 = 0.9993 \quad (5.3)$$

F1 = Absorbans (ax+b)

c: Konsantrasyon



Şekil 5.26: Irak (light) ham petrolü standart eğrisi.

Ekstraksiyon bakiyeleri n-hekzan ile seyreltilerek UVF okuması için hazırlandı (Şekil 5.27). Önceden çizilmiş olan standart eğri baz alınarak oluşturulan denklem ile numunelerdeki TPH miktarları hesaplandı.



Şekil 5.27: Ekstraksiyon bakiyelerinin seyreltilmesi

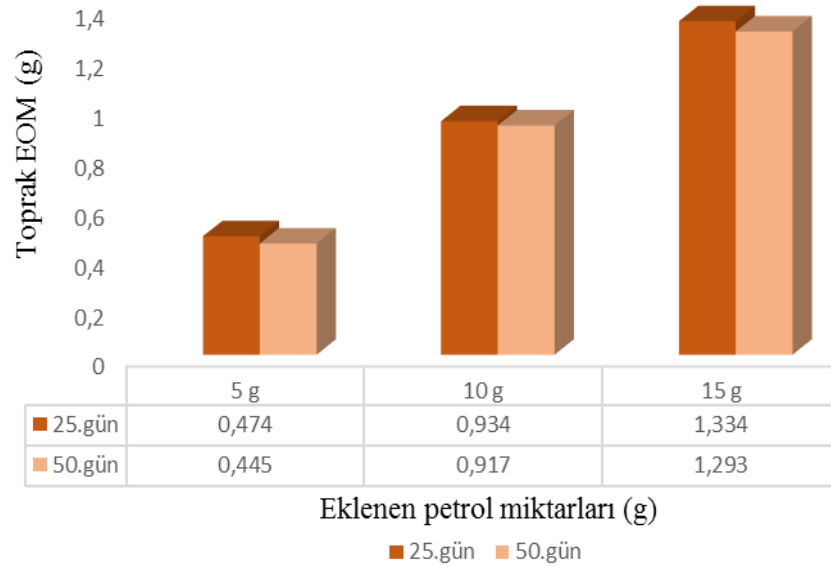
Kavanoz etiketleri grafiklerin daha rahat okunabilmesi için kod şeklinde kısaltıldı (Çizelge 5.6). Kontrol gruplarına kod verilmedi.

Çizelge 5.6: Kısaltma amaçlı kavanoz etiketlerine verilen kodlar.

Kavanoz Etiketleri	KODLAR	
	SET I	SET II
5 g - Toprak	T1a	T1A
5 g - Toprak Tekrar	T2a	T2A
5 g – (Misel)	M1a	M1A
5 g - Tekrar (Misel)	M2a	M2A
5 g - Kontrol	5 g – Kont.	5 g – KONT.
10 g - Toprak	T1b	T1B
10 g - Toprak Tekrar	T2b	T2B
10 g – (Misel)	M1b	M1B
10 g - Tekrar (Misel)	M2b	M2B
10 g - Kontrol	10 g – Kont.	10 g – KONT.
15 g - Toprak	T1c	T1C
15 g - Toprak Tekrar	T2c	T2C
15 g – (Misel)	M1c	M1C
15 g - Tekrar (Misel)	M2c	M2C
15 g - Kontrol	15 g – Kont.	15 g – KONT.

6. DENEYSEL SONUÇLAR

Set I ve Set II toprak ve misel EOM miktarlarının aritmetik ortalamasını gösteren Çizelge 5.4 ve Çizelge 5.5'ten elde edilen verilerle Şekil 6.1 ve Şekil 6.2 grafikleri çizildi. Şekil 6.1'e göre gravimetrik olarak ölçülen ekstrakte olmuş toprak miktarları, 5, 10 ve 15 g (% 2.5, % 5 ve % 7.5) ham petrol ilavesinde Set I ve Set II için doğrusal bir artış gösterirken, Set II'deki EOM miktarlarının Set I'e göre daha düşük olduğu görüldü. Bu düşüşün, inkübasyon süresi arttıkça topraktaki EOM miktarının azaldığına işaret ettiği düşünülmektedir.

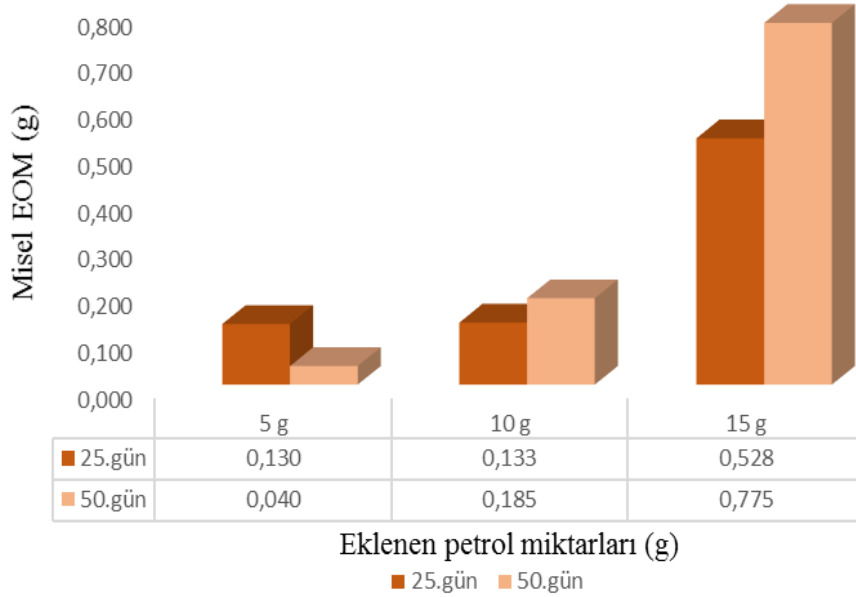


Şekil 6.1: Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş toprak miktarlarının 25. ve 50. günler için alınan aritmetik ortalaması.

Set II'nin Set I'e göre toprak EOM miktarlarında meydana gelen bu azalış, 5, 10 ve 15 g için sırasıyla % 6,1, % 1,8 ve % 3.1 olarak elde edildi. Bu verilere göre 50. günde 25. güne göre toprak EOM miktarında gerçekleşen azalış en çok 5 g'da gözlemlendi.

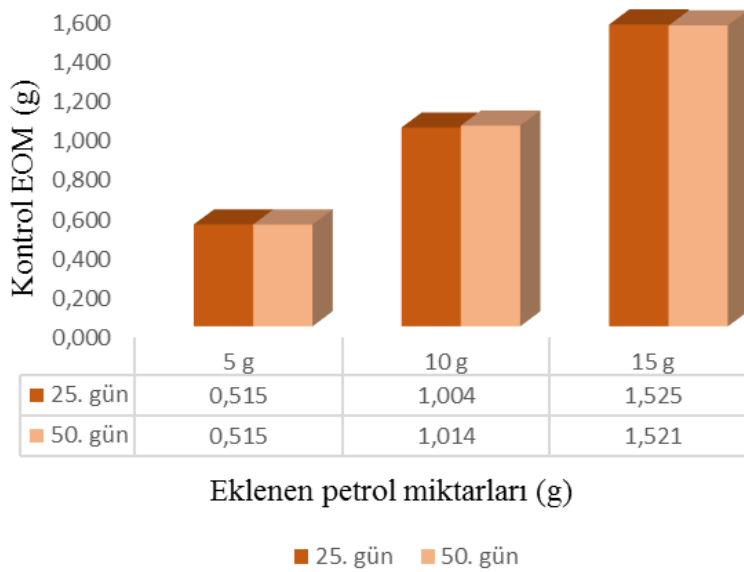
Şekil 6.2'e göre gravimetrik olarak ölçülen ekstrakte olmuş misel miktarları 5, 10 ve 15 g ham petrol ilavesinde Set I için artış gösterdi. 5 g için alınan ortalama EOM miktarının düşük çıkması, 50. günde ilk açılan kavanoz olmasının getireceği bir el hatasından (miseli çıkarma veya ekstrakte etme sırasında yapılan) kaynaklanıyor

olabileceği düşünülmektedir. Set II, 15 g’da misele geçen EOM miktarının diğer konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. 5 g (Set II)’de gözükten hata hariç, Şekil 6.1 ve Şekil 6.2, birbirleriyle ters orantı içerisinde. Bu orantıyı göz önünde bulundurarak, toprakta azalan EOM miktarlarının büyük bir kısmının misele geçtiği söylenebilir.



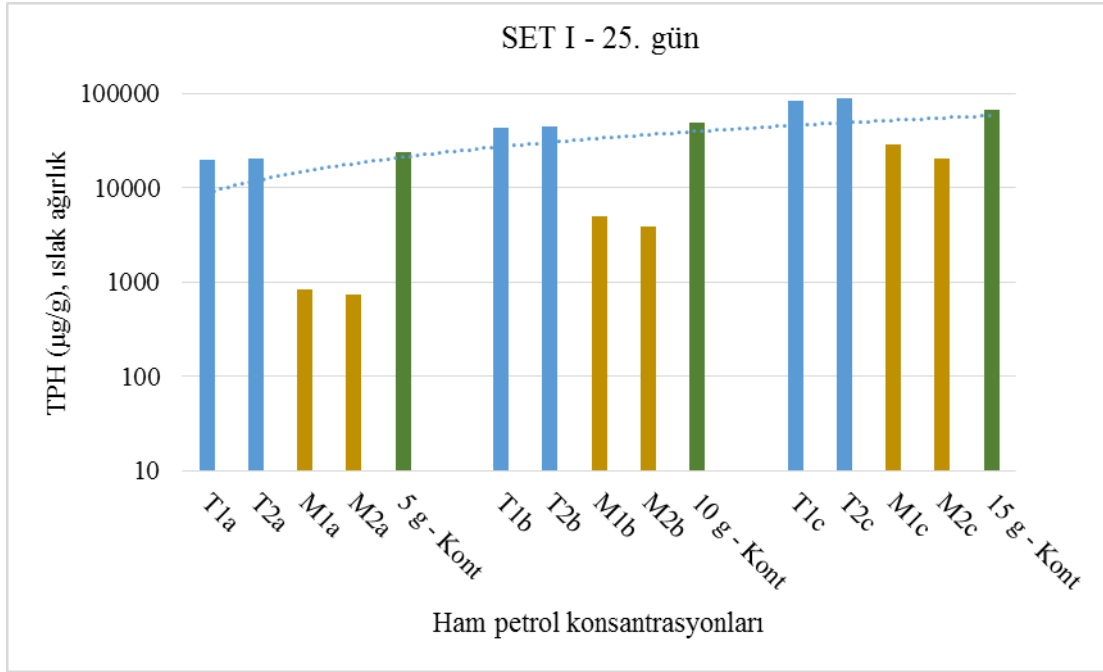
Şekil 6.2: Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş misel miktarlarının 25. ve 50. günler için alınan aritmetik ortalaması.

Şekil 6.3’te kontrol gruplarının 25. ve 50. günlerde EOM miktarlarında çok fazla bir değişiklik olmadığı görüldü.

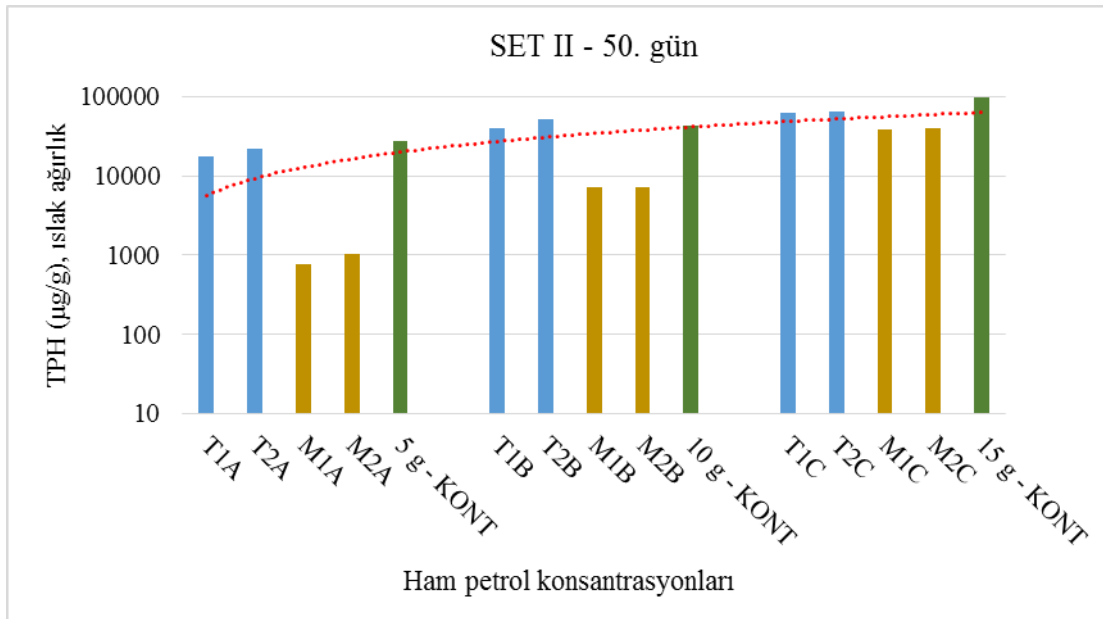


Şekil 6.3: Ham petrol konsantrasyonlarına göre elde edilen ekstrakte olmuş kontrol gruplarının 25. ve 50. günlerdeki durumu.

25. ve 50. günde UVF analizleri yapılan örnekler Şekil 6.4 ve Şekil 6.5'te görülmektedir. Şekil 6.4'e göre, artan konsantrasyonla birlikte doğrusal bir artış eğimi oluştu. Topraklarda deney ve deney tekrarları arasındaki fark çok az olmakla birlikte, her konsantrasyon için birbirleri arasındaki artışın doğrusal olduğu görüldü. Deney miselleri ve deney tekrar miselleri arasındaki farklar az olmakla beraber her konsantrasyon için aralarındaki azalışın doğrusal olduğu görüldü.



Şekil 6.4: Set I (25. gün) deney, deney tekrarı ve bunların miselleriyle kontrol gruplarının üç farklı konsantrasyondaki TPH miktarları (µg/g).



Şekil 6.5: Set I (50. gün) deney, deney tekrarı ve bunların miselleriyle kontrol gruplarının üç farklı konsantrasyondaki TPH miktarları (µg/g).

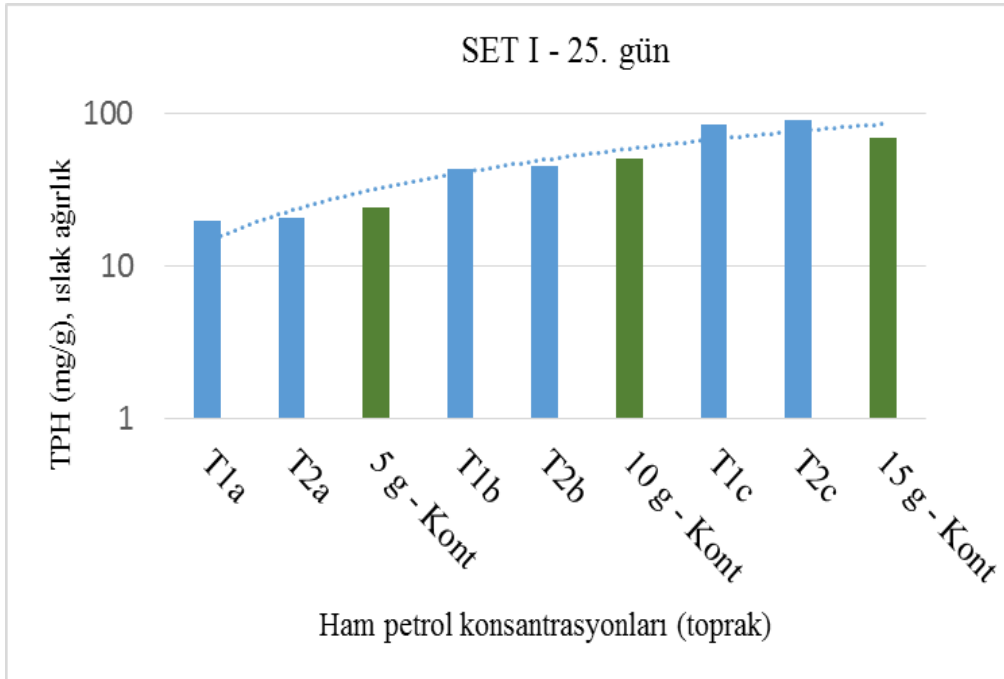
Şekil 6.5'e göre, Set I'de olduğu gibi konsantrasyon arttıkça doğrusal bir artış eğimi oluştu.

İstatistiksel bilgi analizi programı STATISTICA 6.0'da, iki setin birbirleri arasındaki korelasyon ilişkisi Çizelge 6.1'deki gibi elde edildi.

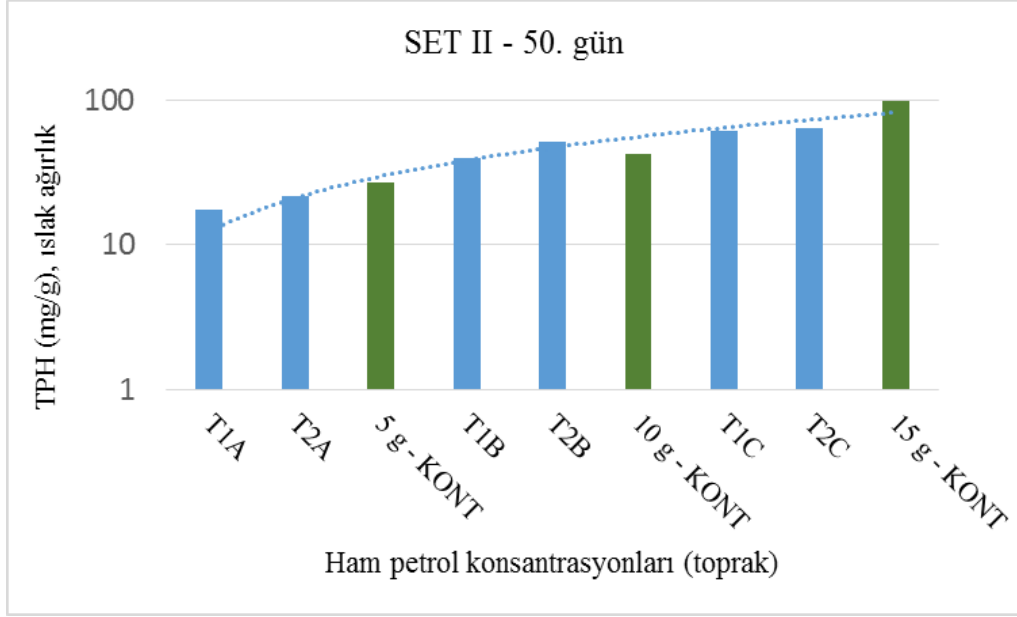
Çizelge 6.1: Set I ve Set II arasındaki korelasyon (İşaretili korelasyonlar $p < 0.05$ 'de anlamlı. N=15).

	SET I	SET II
SET I	1,00	0,90
SET II	0,90	1,00

Şekil 6.4 ve Şekil 6.5'in toprak ve misellerini ayrı ayrı gösteren grafikler, iki setin toprak ve kontrol örnekleri için Şekil 6.6 ve Şekil 6.7'de, misel örnekleri için de Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'da verildi. Grafik üzerinde daha net bir görüntü için toprak değerleri mg/g ıslak ağırlık, misel değerleri $\mu\text{g/g}$ (ppm) ıslak ağırlık cinsinden verildi.



Şekil 6.6: Set I toprak örneklerinin TPH miktarları (mg/g).



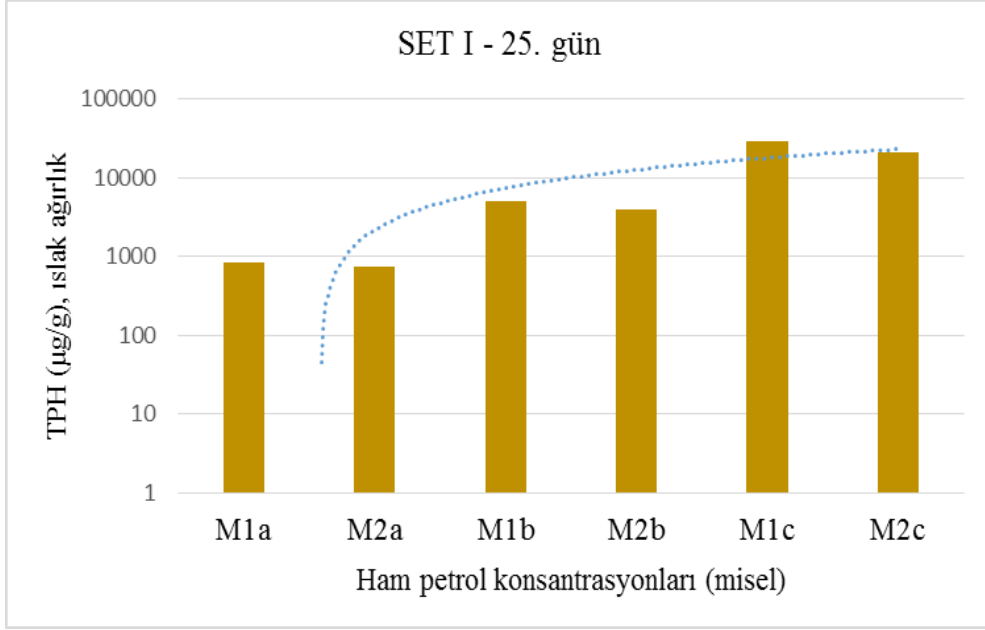
Şekil 6.7: Set II toprak örneklerinin TPH miktarları (mg/g).

Şekil 6.6’da 15 g örneklerinde ve Şekil 6.7’de 10 g örneklerinde gözlenen TPH bulgularının, kendi kontrol gruplarından daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulguların, ana bileşiğe (petrol hidrokarbon aromatik halkası) ait olan ancak deney koşulları sırasında oluşan alkillenmiş homolog bileşiklerinin UVF analizlerinde yüksek absorpsiyon ile kendini gösterdiği düşünüldü. Literatüre kayıtlı olan bazı çalışmalar mevcut durumu destekler yöndedir.

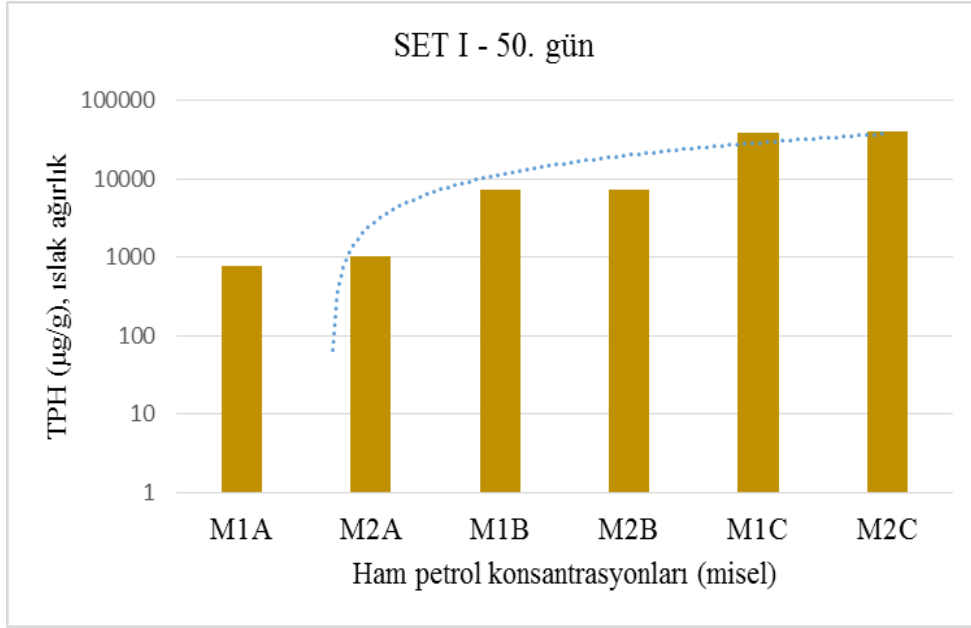
STATISTICA 6.0’da, Set I ve Set II toprak örnekleri arasındaki korelasyon ilişkisi Çizelge 6.2’deki gibi elde edildi.

Çizelge 6.2: Set I ve Set II toprak örnekleri arasındaki korelasyon (İşaretli korelasyonlar $p < 0.05$ ’de anlamlı. $N=9$).

	SET I	SET2
SET I	1,00	0,80
SET II	0,80	1,00



Şekil 6.8: Set I misel örneklerinin TPH miktarları (µg/g).



Şekil 6.9: Set II misel örneklerinin TPH miktarları (µg/g).

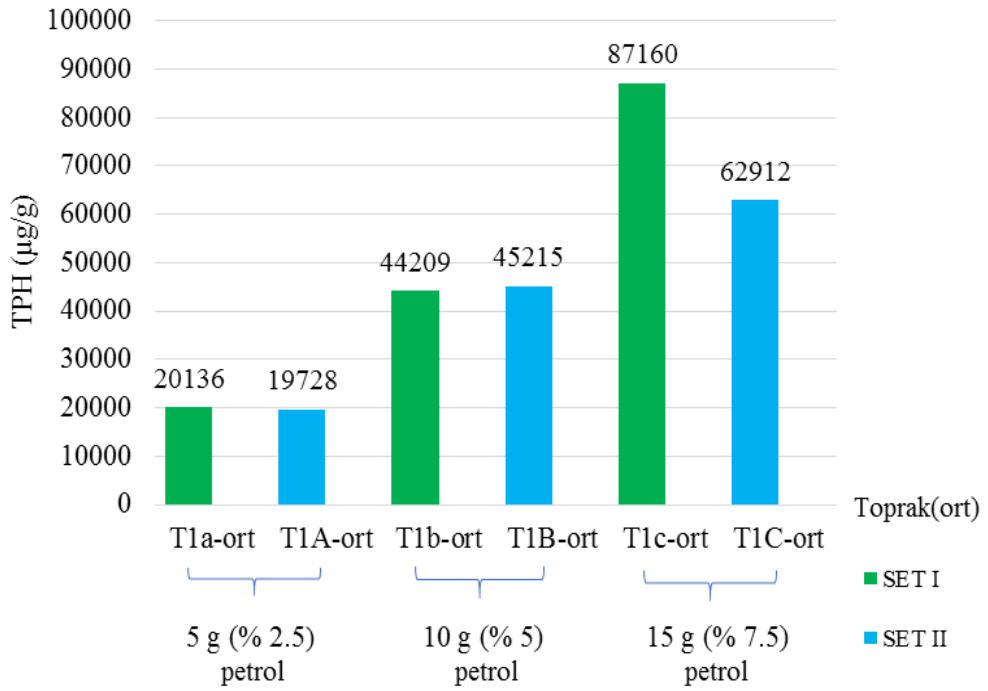
Şekil 6.8 ve Şekil 6.9’da artan konsantrasyon birlikte misele geçen miktarın paralel ilişkisi içerisinde olduğu gözlemlendi.

STATISTICA 6.0’da, Set I ve Set II misel örnekleri arasındaki korelasyon ilişkisi Çizelge 6.3’deki gibi elde edildi.

Çizelge 6.3: Set I ve Set II misel örnekleri arasındaki korelasyon. (İşaretli korelasyonlar $p < 0.05$ 'de anlamlı. $N=6$).

	SET I	SET2
SET I	1,00	0,97
SET II	0,97	1,00

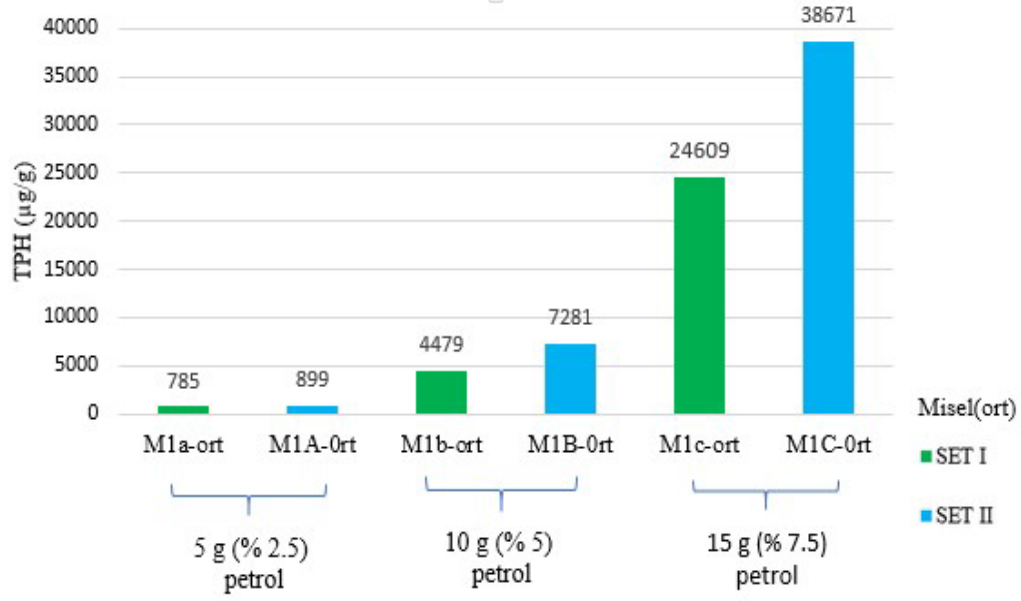
Şekil 6.6 ve Şekil 6.7'deki deney ve deney tekrarlarının (Set I ve Set II toprak örnekleri) ortalamaları alınmış şekilde gösterimi Şekil 6.10'da verilmiştir.



Şekil 6.10: Ortalaması alınan toprak örneklerinin TPH miktarları (µg/g).

Bu grafiğe göre 25. ve 50. günlerdeki (Set I ve Set II) 5 g ve 15 g örneklerindeki TPH miktarlarında azalış olduğu görüldü. Bu azalış, 5 g için çok az olurken 15 g için gözle görülür bir fark yaratmaktadır. 50. gündeki ortalama 10 g örneklerinde 25. güne göre gözlenen az miktardaki artış, ham petrol içerisindeki (PAH)'ların ana bileşiklerinden alkilenmiş homologların oluşması ve bunun UVF absorbansında yüksek bir değer şeklinde okunması olarak yorumlanabilir.

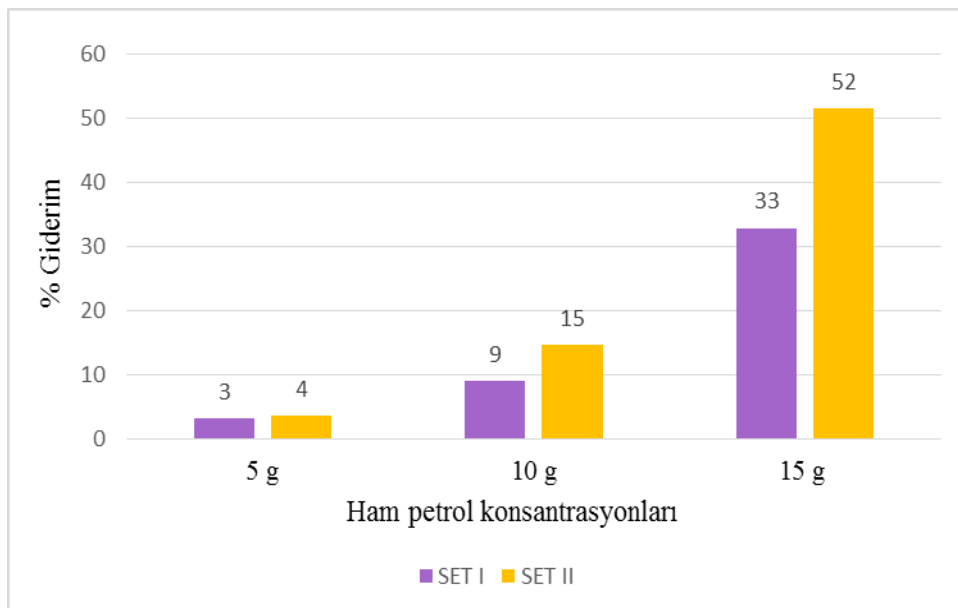
Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'daki deney ve deney tekrarlarının (Set I ve Set II misel örnekleri) ortalamaları alınmış şekilde gösterimi Şekil 6.11'de verilmiştir.



Şekil 6.11: Ortalaması alınan misel örneklerinin TPH miktarları (µg/g).

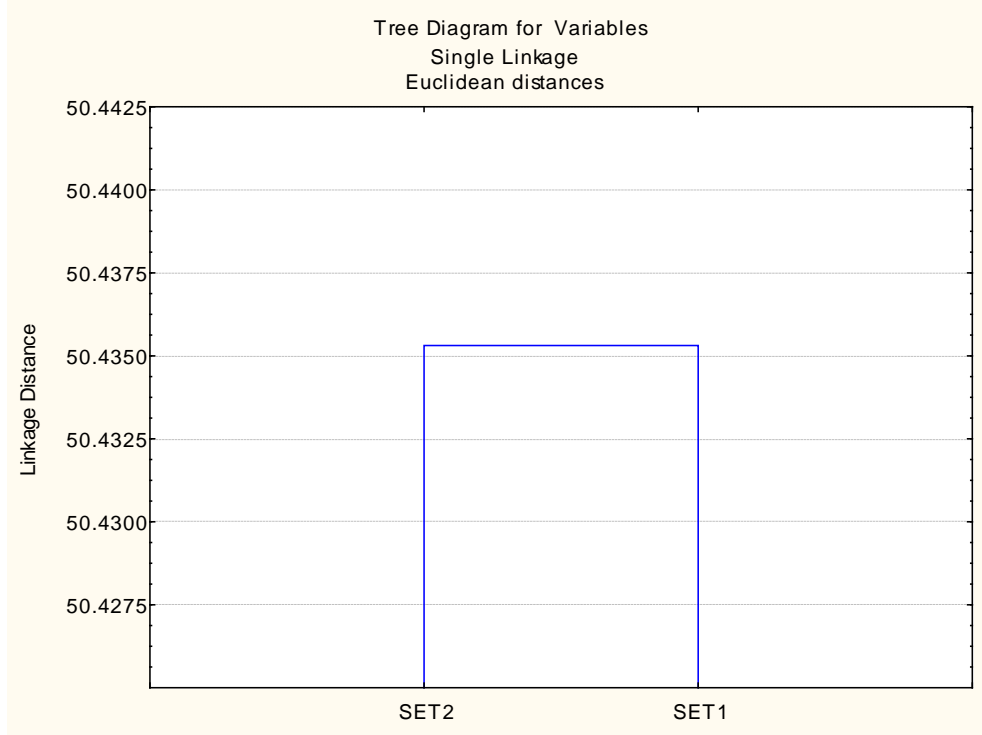
Bu grafiğe göre 25. ve 50. günlerdeki (Set I ve Set II) misellerde bulunan TPH miktarları, artan konsantrasyona paralel bir artış gösterdi. Set II misellerindeki TPH miktarının Set I misellerine göre gerçekleşen artışı, 5, 10 ve 15 g konsantrasyonları için sırasıyla % 14.5, % 62.5 ve % 57.1 olarak elde edildi. Bu verilere göre misele geçen oran en yüksek 50. gün 10 g örneklerinde görüldü.

Yüzde giderim miktarları, misele geçen oranın her konsantrasyona (%2.5, %5 ve %7.5) karşılık gelen ppm oranlarına bölünüp, 100 ile çarpılmasıyla elde edildi. Bu hesaplamadan elde edilen verilerle grafik Şekil 6.12 oluşturuldu.



Şekil 6.12: 25. ve 50. günler için % giderim oranları.

Buradan çıkan sonuçlarda 5 g için 25. günde giderim % 3 iken, 50. günde bu oranın % 4'e; 10 g için % 9'dan % 15'e, 15 g için de % 33'ten % 52'ye yükseldiği görüldü. Statistica 6.0'da oluşturulan ve iki set arasındaki uyumu gösteren Kümelendirme (Cluster) Analizi, Şekil 6.13'deki gibidir.



Şekil 6.13: İki set arasındaki kümelendirme analizi.

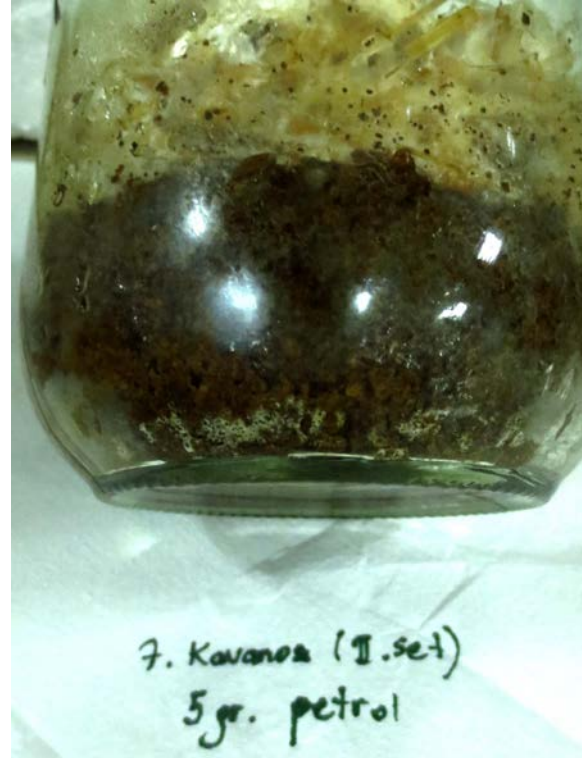
Kümelendirme Analizi'ne göre her bir grup, ya da küme homojendir; Aynı gruba ait gözlemler (olgular) birbirine benzer (Url-9). Bu analizden elde edilen sonuçlar, 25. ve 50. günlerdeki setler arasında (toprak, misel ve kontrol örnekleri), sadece tek bir kümelendirme ile sonuçlanan bir uyum olduğunu gösterdi. Bu da iki set arasındaki uyumun birbiriyle oldukça ilişkili olduğunu belirtmektedir.

6.1 Miselin topraktaki yayılımının incelenmesi

Miseller inkübasyonun ilk iki haftasında hızla büyüme gösterdi. Kavanozun dibine kadar erişen misellerin (Şekil 6.14) küçük beyazımsı noktalar şeklinde topraktaki belli bölgelerde öbekleştiği görüldü (Şekil 6.15). Bu olay 5 ve 10 g'lık konsantrasyonlarda daha hızlı gerçekleşirken zaman içerisinde 15 g'lık konsantrasyonda da aynı olayın gerçekleştiği fark edildi.



Şekil 6.14: Kavanozun dibine ulaşan miseller (Set II, 5 g).



Şekil 6.15: Toprak içerisinde belli bölgelerde öbikleşen miseller.

Stamets, 2005'te öngördüğü gibi petrolü emen miselin renginin açıldığı gözlemlendi (Şekil 6.16).



Şekil 6.16: Petrolü emen ve rengi açılan miseller.

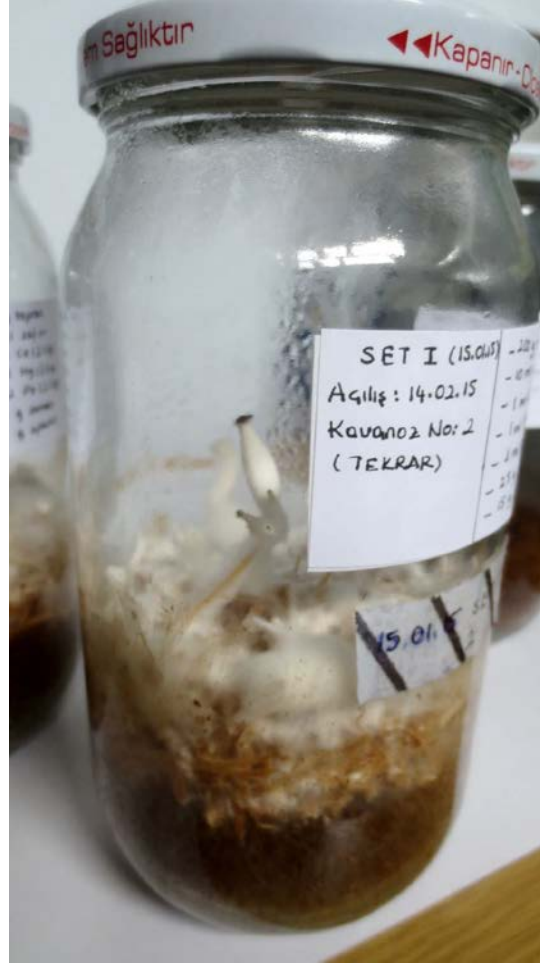
6.2 Misel morfolojisinin incelenmesi

Deney başlangıcından itibaren misellerde primordia (hif düğümleri) ve pin (vejetatif gövde büyümesi) oluşumu gözlemlendi. Primordia oluşumu miselin saman üzerindeki kolonizasyonundan ve misellerin toprağa yayılmaya başlamasından sonra gerçekleşti. Ancak deney sonuna kadar tüm konsantrasyonlarda büyüyen misellerden herhangi bir pin oluşumu görülmedi. Primordia oluşumu Şekil 6.17'deki gibidir.



Şekil 6.17: Deney sonunda görülen primordia oluşumu.

Aynı mantar kullanılarak ağır metal giderimi üzerine yapılan benzer bir çalışmada, iki aylık süre sonunda kavanozlarda pin oluşumu gözlenmiştir (Şekil 6.18) (Ürünay, 2015)



Şekil 6.18 Ağır metal bulunan toprakta büyüyen misellerden çıkan pinler.

7. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

TPH ve (PAH)'ı belirlemek için petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş toprakların analizinde spektroskopik ve spektroskopik olmayan tekniklerin rolü birbirinden ayrılamaz (Okparanma ve Mouazen, 2013). Spektroskopik teknik, kullanılan numunenin içinden geçen ışığın kantitatif fraksiyonunu ölçer. Aromatik hidrokarbonlar ultraviyole ışığı tarafından uyarıldıklarında floresan ışığını yayar ve fluorimetre, örnek ekstraktlarındaki konsantrasyonu ölçer (Url-10).

Deney sonuçları spektroskopik bir yöntem olan UV Floresans Spektroskopisi ile TPH miktarlarını okumak için kullanılmıştır. Ekstrakte edilen örneklerin gravimetrik yöntemle EOM miktarları tayin edildikten sonra örnekler distile edilip UVF spektrofotometrede TPH miktarları belirlenmiştir. EOM miktarları toprağa eklenen ve maisele geçen ham petrol içerisindeki alifatik, aromatik ve canlı organizmalardan kaynaklı tüm organik maddeleri kapsar. UVF spektrofotometrede okunan değerler ise EOM'lerin içindeki petrol hidrokarbonlarının aromatik halkaların miktarını ifade eder. Bu miktarlar degradasyonu zor olan maddelerin ne kadarının tutulduğunu gösterir.

Bu deneyde 25 ve 50 günlük süreler boyunca, 5, 10 ve 15 g Irak (light) ham petrolü ile yapay olarak kirletilen ve steril edilen toprakların, beyaz-çürükçül bir fungus olan istiridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) tarafından giderimi incelenip, ham petrol içerisindeki Toplam Petrol Hidrokarbonu (TPH) seviyelerindeki değişimler, önceden oluşturulan standart eğriye göre belirlenmiştir.

Deneyde hem toprak, hem misel örneklerindeki TPH oranlarına bakılmış olup, bunlar arasındaki korelasyonlar STATISTICA 6.0 istatistiksel analiz programıyla hesaplanmıştır.

Set I 15 g ve Set II 10 g toprak örneklerinde gözlenen TPH bulgularının, kendi kontrol gruplarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin ana bileşikten alkilenmiş homolog bileşilerin oluşması ve bunun UVF spektrofotometrede yüksek absorbanla kendini gösterdiği düşünülmektedir. Benzer bulgulara literatürde rastlanmıştır (Stogiannidis ve Laane, 2015).

Ana bileşiğin, saha koşullarında genellikle tek başına PAH kirleticisi olarak bulunmadığı, aksine alkilenmiş homologları ile birlikte ortaya çıktığı literatür çalışmalarında verilmiştir. Yapılan bir çalışmada alkilli naftalinler, ana naftalin kütlesi ile karşılaştırılmış ve alkilli bileşiklerin toplam naftalinin % 58.2 ± 8.8'sini oluşturduğu gözlenmiştir. Bu değer ana PAH bileşiklerinin tayininde alkilenmiş homologlarının verdiği daha yüksek sonucun hafife alındığı belirtilmiştir (Url-11). Liu ve diğ. (1997)'de alkilenmiş (PAH)'ların ana PAH bileşiklerinden daha yüksek *K* değeri gösterdiğini, çünkü yan zincirli (PAH)'ların hidrofobik hareketsiz fazda daha çözümlü olduğunu ve böylece tamamen ekstrakte edildiğini belirtmiştir.

Artan konsantrasyonla misele geçen TPH oranları arasında doğrusal bir artış olup, 50. gündeki misele geçen TPH miktarları 25. güne göre daha fazladır. Bu artışın sebebinin istiridye mantar misellerinin topraktaki petrolü kendi bünyesine alarak yaptığı biyolojik gideriminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Set II misellerindeki TPH miktarının Set I misellerine göre gerçekleşen artışı, 5, 10 ve 15 g konsantrasyonları için sırasıyla % 14.5, % 62.5 ve % 57.1 olarak elde edilmiştir. Bu verilere göre misele geçen oran en yüksek olarak 10 g örneklerinde görülmüştür.

STATISTICA 6.0'nın Kümelenme (Cluster) Analizi sonuçlarına göre 25. ve 50. günlerdeki setler arasında tek bir kümelenme altında toplanan birbiriyle oldukça ilişkili bir uyumun olduğu anlaşılmaktadır.

Bu tez çalışmasına paralel yürütülen, üç farklı ağır metal üzerinde *P. ostreatus*'un mikoremediasyon etkisinin araştırıldığı benzer bir deneyde 60 günün sonunda mantarın vejetatif gövde büyümesi (pin oluşumu), bu deneyde ise 50. gün sonunda sadece primordia oluşumu gözlenmiştir.

Mantarların remediasyon çalışmalarında kullanılması, mantarların ucuza elde edilebilecek çok sayıda endüstriyel atık üzerinde kolayca büyütülebilmesinden ötürü ekonomik açıdan fayda sağlar (Lavrovsky, 2004). Bu şekilde aynı zamanda birçok bitkisel, endüstriyel ve tarımsal atığın da değerlendirilmesi gerçekleşmektedir.

Mikoremediasyon Dünya'da, özellikle ülkemizde önemi yeni anlaşılmaya başlanmış bir konudur. Tarımsal ve endüstriyel bir çok atığın üzerinde yetişebilen mantarlar hem ekonomik açıdan fayda sağlarken, ekolojik olarak da çevreye dosttur. Mantarlar, yetiştikleri bölgede biyolojik çeşitliliği artıran ve miselli yapılarından ötürü doğadaki besin iletiminde önemli rolü olan eşsiz güzelliğe sahip gizemli canlılardır.

İstiridye mantarı yetiştirilmesi çok zor olmayan, çeşitli selülozik atık üzerinde rahatça büyüeyebilen ve lokal olarak erişimi kolay olan bir tür olmasından ötürü bu çalışma için özellikle seçilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre topraktaki TPH değerleri 50. gün sonunda 25. güne göre azalma göstermiştir. Aynı zamanda 50. gün sonunda misele geçen oranlar 25. güne göre daha fazladır. Bunun, toprakta mikrobiyal bir aktivitenin olduğuna işaret ettiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının deney süresi uzatılarak, kavanoz içi biyotik ve abiyotik koşulların ölçümleri yapılarak, TPH için ileri analiz teknikleri uygulanarak, istiridye mantarının değişik suşları veya farklı beyaz çürükçül mantar türleri kullanılarak veya farklı substratlar deneyerek, bu çalışmanın kapsamının genişletilmesi ve mühendislik kriterlerine uygun hale getirilmesi mümkündür.

Günümüzde insan kaynaklı petrol kirliliği doğaya ve canlılara ciddi zararlar vermektedir. Bu kirliliğin biyolojik temizliğine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. 20 Mayıs 2015'te Santa Barbara, Kaliforniya'da yeni gerçekleşen petrol sızıntısı vakasında 100.000 galondan fazla ham petrolün yaklaşık 21.000 galonu okyanusa ulaşmıştır ve çok sayıda deniz canlısı ve bölgede yaşayan hayvan kirlilikten ötürü can vermiştir. Bu tarz çevresel felaketler gerek endüstriler, gerekse bize emanet edilen tek ve nadide gezegenimize sahip çıkması gereken bilinçli tüm insanlar tarafından ciddiye alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adenipekun, C. O., Fasidi, I. O.** (2005). Bioremediation of oil polluted soil by *Lentinus subnudus* a Nigerian white rot fungus. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4(8): 796-798.
- Adenipekun, C.O., Lawal, R.** (2012). Uses of mushrooms in bioremediation: A review *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 7(3), pp. 62-68, September 2012.
- Adeniyi, A. A., Afolabi, J.A.** (2002) Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in lagos metropolis. *Environmental International*, 28, 79-82.
- Anoliefo, G.O.** (1991). Forcados Blend Crude oil Effects on Respiratory Metabolism, Mineral Element Composition and Growth of *Citrus vulgaris*. *Shrad. Ph.D Thesis*.
- April, T. M., Foght, J.M., Currah, R. S.** (2000). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 46 (1) :38-49.
- Atlas, R. M.** (1995) Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 178-182.
- Baker, K.H, Herson, D.S.** (1994). Bioremediation. McGraw – Hill, New York.
- Baldrian, P.** (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* 1(2008) 4-12.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1990). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. In: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*, I.B. Heath, ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 211-232.
- Bavarva, S. R.** (2015). *International Journal of Innovative and Emerging Research in Engineering* Volume 2, Issue 2. e-ISSN: 2394 – 3343.
- Bhattacharya, S. ve diğ.** (2014). Mycoremediation of Benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* in the presence of heavy metals and mediators .3 *Biotech*, 4(2), 205-211. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13205-013-0148-y#page-1>.
- Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright, and S.D. Aust** (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434–1436.
- Cadwellae, S.** (1993). *Encyclopaedia of Environmental Science and Engineering*. 4th ed.

- Carlile, M. J., Watkinson S. C., Gooday, G. W.** (2004). *The Fungi* (2nd Ed.). Elsevier Academic Press, London, 588 p.
- Choi, Y. S., Long, Y., Kim, M. J., Kim, J. J., Kim, G. H.** (2013) Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* KUC8958. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 48:501–508, doi:10.1080/10934529.2013.730419.
- Darwish, L.** (2013). *A Grassroot Guide to Healing Toxic and Damaged Landscapes*, p 123-180. ISBN 978-0-86571-729-9.
- Dulay, R. M. R., Parungao, A. G., Kalaw, S. P., Reyes, R. G.** (2012). Aseptic cultivation of *Coprinus comatus* (O. F. Mull.) Gray on various pulp and paper wastes. *Mycosphere.* 4: 392–397.
- Dua, M., Singh, A, Sethunathan, N., Johri, A.K.** (2002). Biotechnology and Bioremediation: Successes and Limitations. *Appl. Microbiol.* 63:329-331.
- Ertekin, Ö., Erol, Ç., Ünlü, S., Yıldızhan, Y., Pelitli, V., Yüksel, B., Memon, A.** (2011). Aliphatic Hydrocarbon Fingerprints in *Trifolium* spp. *Fresenius Environmental Bulletin.* p. 367-371.
- Etkin, D.S.,** ed. (1997a). *Oil Spill Intelligence Report (Special)*, Cutter Information Corp., Arlington, MA, May.
- Etkin, D.S.,** ed. (1997b). *Oil Spill Intelligence Report's White Paper Series*, Vol. 1(16). Cutter Information Corp., Arlington, MA, Oct.
- Etkin, D.S.,** ed. (1998). *Oil Spill Intelligence Report's White Paper Series*, Vol. 2. Cutter Information Corp., Arlington, MA.
- Evans, C., Hedger, J.** (2001). Degradation of cell Wall polymers. Bulunduğu yer: Gadd G. (ed) *Fungi in Bioremediation*, Cambridge, UK.
- Filipic, M., Umek, A., Mlinaric, A.** (2002). Screening of Basidiomycete mushroom extracts for antigenotoxic and bio-antimutagenic activity. *Harmazie* 57:416–420.
- Frazar, C.** (2000). *The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites.* National Network of Environmental Studies (NNEMS) Fellow.
- Gavrilescu, M.** (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Eng. Life Sci.* 4: 219–232, doi:10.1002/elsc.200420026.
- Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., ve Varma, A.** (2013). *Fungi as Bioremediators.* ISBN-13: 978-3642338106 ISBN-10: 3642338100.
- Hammel, K.E.** (1997). *Fungal Degradation of Lignin.* Institute for Microbial and Biochemical Technology, Forest Products Laboratory, Forest Service, US Department of Agriculture, Madison, WI 53705, USA.
- Harayamai S., Kishira H., Kasai Y. ve Shutsubo K.** (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-70.

- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J.** (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 175-186.
- Isikhuemhen, O.S., Anoliefo, G. ve Oghale, O.** (2003) Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil by the White Rot Fungus, *Pleurotus tuber-regium* (fr) Sing. *Environmental Science and Pollution Research*, 10, 108-112. <http://dx.doi.org/10.1065/espr2002.04.114>.
- Jang, M.J., Lee, Y.H., Ju, Y.C., Kim, S.M., Koo, H.M.** (2013). Effect of color of light emitting diode on development of fruit body in *Hypsizygus marmoreus*, *Mycobiology* 41 (2013) 63-66.
- Kathiravan, S., Krishnakumari, S. ve Nagalakshmi, M.** (2014). Spawn Production and Cultivation Strategies for *Pleurotus Eous* (Pink Oyster Mushroom). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 3, Issue 10, 915-924. Research Article.
- Kellogg, S. T., Pettigrew, S.** (2008). *Toolbox for Sustainable City Living (a Do-it-ourselves Guide)*, 184-187, South End Press.
- Klingman, A.M.** (1950). *Handbook of mushroom culture*. 2nd ed. J.B. Swamyne, Kennett Square, PA, USA.
- Krishnakumari, S., Kathiravan, S., Angeline, Christie Hannah. M., Rancy Ann, T. ve Nagalakshmi, M.** (2014) *Better Life with Mushrooms*. Kongunadu Arts and Science College, Coimbatore, 1st ed. 28 - 32.
- Kuforiji, O.O., Fasidi, I.O.** (2008). Enzyme activities of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer, cultivated on selected agricultural wastes. *Bioresource Technol* 99:4275–4278, doi:10.1016/j.biortech.2007.08.053.
- Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P., Jain, B. L.** (2010). Bioremediation of industrial wastes through mushroom cultivation. *J Environ Biol.* 4: 441–444.
- Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar P.** (2013). Cultivation of *Pleurotus citrinopileatus* on handmade paper and cardboard industrial wastes. *Ind Crop Prod.* 4: 340–346.
- Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar P.** (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* . 4: 29.
- Lamar, R. T., Davis, M.W., Dietrich, D. M & Glaser, J. A.** (1994). Treatment of a pentachlorophenol-and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1603-1611.
- Lamar, R. T., Glaser, J. A.** (1994). Field evaluation of the remediation of soils contaminated with wood-preserving chemicals using lignin-degrading fungi. In: Hunchee RE, Leeson A, Semprini L, Ong SK (Eds.) *Bioremediation of chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*. CRC, Press, Florida, pp.239-247.
- 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- 5Nov 1995, Maustrient. The Netherlands. Contaminated soils, 95: 1277-1278.

- Lavrovsky, V.** (2004). Microencapsulated enzyme systems. Enhanced oil recovery and bioremediation. Paper presented at the 2004 Calgary youth science fair. Retrieved on July 18,2012, from http://www.physics.uwo.ca/teamcana/2003/vladic_lavrovsky_report.pdf.
- Liu, J., Vijayakumar, C., Hall III CA, Hadley, M., Wolf-Hall, C. E.** (2005). Sensory and Chemical Analysis of Oyster Mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) Harvested from Different Substrates. *J. Food Sci.* 70(9):S586-S592.
- Liu, Y., Lee, M. L. ,Hageman, K.J., Yang, Y., Hawthorne, S. B.** (1997). Solid-phase microextraction of (PAH)'s from aqueous samples using fibers coated with HPLC chemically bonded silica stationary phases. *Analytical Chemistry* 69 (24), 5001-5005.
- Mandeel, Q. A., Al-Laith, A. A., Mohamad, S. A.** (2005). Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp*) on various lignocellulosic wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 601–607.
- Matsubara, M. ve diğ.** (2006). A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme Microbial Technology*, 39(7), 1365– 1372.
- Mendez-Espinoza, C., Garcia-Nieto, E., Esquivel, A.M., Gonzalez, M.M., Bautista, E.V., Ezquerro, C.C., Santacruz, L.J.** (2013). Antigenotoxic potential of aqueous extracts from the chanterelle mushroom, *Cantharellus cibarius* (higher Basidiomycetes) on human mononuclear cell cultures. *Int J Med Mushrooms* 15:325–32, doi:10.1615/IntJMedMushr.v15.i3.90.
- Menoli, R.C., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., Jordão, B.Q.** (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat Res* 496:5–13, doi:10.1016/S1383-5718(01)00227-3.
- Minai-Tehrani, D., Herfatmanesh, A.** (2007). Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Fractions of Heavy Crude Oil-Contaminated Soil: A Pilot Study. *Bioremed. J.* 11(2):71-76.
- Mlinaric, A., Kac, J., Fatur, T., Filipic, M.** (2004). Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extract in bacteria and in mammalian cells in vitro. *Pharmazie* 59:217–221.
- Mohn, W.W.** (2004) Biodegradation and bioremediation of halogenated organic compounds. In: Singh A, Ward OP (eds) *Biodegradation and bioremediation*. Springer, Heidelberg, pp 125–148.
- Moilanen, U., Winqvist, E., Mattila, T., Hatakka, A., Eerikäinen, T.** (2014). Production of manganese peroxidase and laccase in a solid-state bioreactor and modeling of enzyme production kinetics, *Bioprocess and biosystems engineering*.

- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. ve Labuzek, S.** (2003). Bacterial degradation and bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish J. Environ. Stud.* 12(1): 15-25.
- Mushworld.** (2004). Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation. ISSN 1739-1377.
- Nelson-Smith, A.** (1972). Oil Pollution and Marine Ecology. Paul Clack Scientific Brok Ltd. London. 420p.
- Novotny, C., Erbanova, P., Sasek, V., Kubatova, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J., Zadrazil, F.** (1999). Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation.* 10 (3) :159-68.
- Nyanhongo, G.S., Gübitz, G., Sukyai, P., Leitner, C., Haltrich, D., Ludwig R.** (2007). Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: A wealth of catalytic activity. *Food Technol Biotechnol* 45: 250–268.
- Odu, C.T.** (1981). Degradation and Weathering of crude oil under Tropical Condition. Proceeding of an International Seminar on Petroleum Industry and the Nigerian Environment. Thomopoulos Environmental Pollution Consultants Incorporation with the Petroleum Inspectorate of NNPC. Pp 143-153.
- Okparanma, R. N., Ayotamuno, J. M., Davis, D. D., Allagoa, M.** (2011). Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated oil-based drill-cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 10 (26) : 5149-5156.
- Okparanma, R. N, Mouazen, A.** (2013). Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: a review of spectroscopic and non-spectroscopic techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, Volume 48, Issue 6, p. 458-486.
- Reible, D., Demnerova, K.** (Eds) (2002) Innovative approaches to the on-site Assesment and remediations of contaminated sites. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 67-113.
- Rhodes, C.J.** (2012). Feeding and healing the world: through regenerative agriculture and permaculture. *Sci. Prog.*, 96(4), 417-427.
- Rhodes, C.J.** (2013). Applications of bioremediation and phytoremediation. *Sci. Prog.*, 96(4), 417-427.
- Riley, R., ve diğ.** (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111(27), 9923-8. 10.1073/pnas.1400592111.
- Sabate, J., Vinas, M., Solanas, A. M.** (2004) Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarboncontaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 19-25.
- Sainos, E., Díaz-Godínez, G., Loera, O., Montiel-González, A. M., Sánchez, C.** (2006). Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Scragg, A.** (1999). Environmental Biotechnology. Longman. England.
- Singh, H.** (1991). Role of yeasts and fungi in wastes and wastewaters treatment. Ph.D. dissertation, Greenwich University, Hilo, HI.
- Singh, H.** (2006). Mycoremediation – Fungal bioremediation, *John Wiley & Sons Inc.*, New Jersey, U.S.A., 592 p.
- Singh, A., Ward, O.P.** (2004) Soil Biology, Volume 2, Biodegradation And Bioremediation Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Singhal, V., Kumar, A., Rai, J. P.**(2005). Bioremediation of pulp and paper mill effluent with *Phanerochaete chrysosporium*. J Environ Biol. 4: 525–529.
- Stamets, P.** (1993). Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Berkeley: Ten Speed Press. ISBN 1-58008-175-4.
- Stamets, P.** (2000). Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms (3rd ed.) Ten Speed Press, Berkeley, CA , 574 p.
- Stamets, P.** (2005). Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World. Berkley: Ten Speed Press.
- Stogiannidis, E., Laane, R.** (2015). Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. Springer International Publishing Switzerland 2015. D.M. Whitacre (ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 234, DOI 10.1007/978-3-319-10638-0_2.
- Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, E., Negishi, T.** (2005). Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Mutat Res 586:115–123, doi:10.1016/j.mrgentox.
- Thomas S. A.** (2000). Mushrooms: Higher Macrofungi to Clean Up the Environment, Battelle Environmental Issues, Fall 2000.
- Türk, G., Aksu, E. H., Bozkurt, T.** (2005). Spermatozoon DNA'sı Hasarı. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2006, 20(1), 85-95.
- Ürünay, D.,** (2015). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji, ve Genetik Programı “Mycoremediation of Heavy Metal Contaminated Soil Using Oyster Mushroom: *Pleurotus ostreatus*”. Yüksek Lisans Tezi (Devam eden çalışma).
- Vidali, M.** (2001). Bioremediation: an overview. Pure Applied Chemistry 73, 1163–1172.
- Viniegra-Gonzalez, G., Saucedo-Castaneda, G., Lopez-Isunza, G. ve diğ.** (1993). Symetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1-10.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Noe Aguilar, C., de Jesús Romero-Gómez, J., Díaz-Godínez, G. ve Augur, C.** (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13, 157 (2003).

Williams, R. T., Keehan, K. R. (1992). Bioremediation using Composting, National Waste Processing Conference, 429- 433, 1992.

Winquist, E., Moilanena, U., Mettäläb, A., Leisola, M., Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi, *Biochemical Engineering Journal* **42**: 128-132.

Winquist, E. (2014). The Potential of Ligninolytic Fungi in Bioremediation of Contaminated Soils. Aalto University publication series Doctoral Dissertations 54/2014.

Zeddel, A., Majcherzyk, A., Hutterman, A. (1993). Degradation of polychlorinated biphenyls by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicol. Environ. Chem.*, **40**:255-260.

Zhu, M.J., Du, F., Zhang, G.Q., Wang, H.X., Ng, T.B. (2013) Purification a laccase exhibiting dye decolorizing ability from an edible mushroom *Russula virescens*. *Int Biodeterior Biodegrad* **82**:33–39, doi:10.1016/j.ibiod.

Url-1 <<https://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-122209-135034/unrestricted/OilRemediationFinalReport.pdf>>, alındığı tarih: 01.06.2015

Url-2 <<http://amazonmycorenewal.org/>>, alındığı tarih 01.06.2015

Url-3 <<http://ei.cornell.edu/biodeg/bioremed/>>, alındığı tarih: 14.04.2015

Url-4 <<http://en.wikipedia.org/wiki/Bioremediation>>, alındığı tarih: 27.03.2015

Url-5 <http://realitysandwich.com/150/paul_stamets_mushrooms_mycoremediation/>, alındığı tarih: 25.03.2015

Url-6

<[https://en.wikipedia.org/?title=Mycelium#/media/File:Oyster_mushroom_\(Pleurotus_ostreatus\)_mycelium_in_petri_dish_on_coffee_grounds.JPG](https://en.wikipedia.org/?title=Mycelium#/media/File:Oyster_mushroom_(Pleurotus_ostreatus)_mycelium_in_petri_dish_on_coffee_grounds.JPG)>, alındığı tarih: 27.03.2015

Url-7 <<http://www.shroomery.org/5247/What-is-the-difference-between-pasteurization-and-sterilization-of-casings-and-substrates>>, alındığı tarih: 30.03.2015

Url-8 <<http://extension.psu.edu/plants/vegetable-fruit/mushrooms/mushroom-substrate/microbial-activity>>, alındığı tarih: 15.04.2015

Url-9 <<https://www.statsoft.com/Portals/0/Products/Data-Mining/Clustering.pdf>>, alındığı tarih: 10.05.2015

Url-10

<http://iris.lib.neu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=civil_eng_theses>, alindiğı tarih: 19.05.2015

Url-11 *<<http://www.epa.gov/region02/water/dredge/rtcpcb.pdf>>, alindiğı tarih 24.05.2015*

EKLER

EK A: Amazon Mycorenewal Projesi Resimleri



EK B: Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar

Otoklav: NÜVE OT 032

Hassas/Kaba Terazı: METTLER TOLEDO AB204-S/PB1502-L

Agar Agar: MERCK

Malt Extract Agar: MERCK

Su Banyosu: GFL

Dijital yemek termometresi: TFA

Dijital oda termometresi: TFA

Selüloz Kartuş: FILTER-LAB

Cam Erlen (250 mL): BORU CAM

Cam Balon (250 mL): BORU CAM

Laminar Kabin: ESCO /Labculture Class II, Type A2

Petri Kapları: ISOLAB

Diklorometan: MERCK

n-Hegzan: MERCK

UVF cihazı: Shimadzu RF 1501



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ceyda ZAZOĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri: 04.03.1986

E-posta : ceydazazoglu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Bölümü