



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TATLI SU EĞRELTİSİ *AZOLLA FILICULOIDES* LAM.
KULLANILARAK PETROL HİDROKARBONLARININ
FİTOREMEDİASYONU**

**Taylan KÖSESAKAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Programı**

**Danışmanlar
Prof.Dr. Muammer ÜNAL
Dr. Bayram YÜKSEL
Haziran, 2011**

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TATLI SU EĞRELTİSİ *AZOLLA FILICULOIDES* LAM.
KULLANILARAK PETROL HİDROKARBONLARININ
FİTOREMEDİASYONU**


**Taylan KÖSESAKAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Programı**

**Danışmanlar
Prof.Dr. Muammer ÜNAL
Dr. Bayram YÜKSEL
Haziran, 2011**

İSTANBUL

Bu çalışma 10/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof.Dr. Muhammer ÜNAL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof.Dr. Meral ÜNAL
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof.Dr. Orhan KÜÇÜKER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof.Dr. Memduh SERİN
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi


Doç.Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 2227 numaralı doktora tez projesi ve TÜBİTAK Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı (1007), Kamu Araştırmaları Grubu (KAMAG), 105G079 nolu “Bitki, Alg ve Mikroorganizmalar Kullanılarak Hidrokarbonlarla Kirlenmiş Alanların İyileştirilmesinin Araştırılması” başlıklı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam Biyoloji Bölümü Başkanı Prof.Dr. Muammer ÜNAL' a en içten dileklerle teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamı vermiş olduğu desteği, fikirleri ve deneyimiyle katkılarını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Bayram YÜKSEL'e saygılarımı ve içten dileklerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarını TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda, TARAL 105G079 nolu proje kapsamında tamamladım. Bana bu fırsatı sağlayan Prof.Dr. Abdurrezzak MEMON'a ve GMBE müdürlüğüne, çalışmamın en önemli kısımlarından biri olan petrol hidrokarbon analizlerinde bilgi birikimini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Yard.Doç.Dr. V. Selma ÜNLÜ'ye, spektrofotometrik analizler için destek veren Prof.Dr. Gülşen ALTUĞ'a, projede birlikte çalıştığım Hüma KURTOĞLU, Yasemin YILDIZHAN, Özlem ERTEKİN, Sinem ERAKIN, Dr. Sönmez DAĞLI, Dr. Birsen CEVHER KESKİN, Dr. Oktay KÜLEN, Doç.Dr. Selma ONARICI, Dr. Çiğdem EROL, İlyas GÖNÜL, Volkan PELİTLİ, Sevan GÜRÜN ve sevgili Ali DANACI'ya,

Tez izleme komitesindeki jüri üyelerim, Prof.Dr. Meral ÜNAL ve Prof. Dr. Orhan KÜÇÜKER'e

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Gül CEVAHİR ÖZ, Dr. Sırrı YÜZBAŞIOĞLU, Eda KAPLAN DALYAN ve Elif YÜZBAŞIOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim aileme, eşim Gülden'e ve hayatımın en değerli varlığı sevgili kızım Elif Eylül'e en içten sevgilerimi sunarım.

Haziran, 2011

Taylan KÖSEKAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
TABLO LİSTESİ	X
SEMBOL LİSTESİ.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ÇEVRE KİRLİLİĞİ	3
2.1.1. Petrol Kirliliği.....	4
2.1.2. Sularda Petrol Kirliliği	5
2.2. HAM PETROLÜN YAPISI	7
2.2.1. Petrolün Çevredeki Davranışı.....	12
2.2.2. Petrolün Biyodegradasyonu	14
2.2.2.1. Petrol Biyodegradasyonunun Değerlendirilmesi	15
2.3. FİTOREMEDİASYON.....	16
2.3.1. Fitoremediasyonu Etkileyen Biyolojik Süreçler.....	19
2.3.1.1. Kirleticinin Biyoyararlanımı	20
2.3.1.2. Bitki Mikroorganizma Etkileşimleri	21
2.3.1.3. Kirleticilerin Bitkiye Alınımı	25
2.3.1.4. Taşınma	27
2.3.1.5. Degradasyon	29
2.4. HAM PETROLÜN BİTKİLER ÜZERİNE ETKİSİ	37
2.5. AZOLLA	39

3. MALZEME VE YÖNTEM	43
3.2. BİTKİ TEMİNİ VE YETİŞTİRİLMESİ	43
3.3. BATMAN HAM PETROL UYGULAMASI	45
3.4. BATMAN HAM PETROLÜNÜN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İZLENMESİ	46
3.4.1. Farklı Deney Serilerini İçeren Ortamların Ön Sentez İşlemi.....	46
3.5. PETROL HİDROKARBON ANALİZLERİ	48
3.5.1. Ultraviyole Fluorospektrofotometre (UVF) ile Toplam Petrol Hidrokarbonlarının Analizi	48
3.5.2. Senkronize Ultraviyole Fluorospektrofotometre (SUUVF) Analizi	48
3.5.3. Kolon Kromatografisi ile Temizleme Yöntemi.....	48
3.5.4. Gaz Kromatografi / Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizi	48
3.5.5. Kütüphane Taraması	50
3.6. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR	51
4. BULGULAR	52
4.2. BATMAN HAM PETROLÜNÜN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İZLENMESİ	52
4.3. PETROL HİDROKARBON ANALİZLERİ	57
4.3.1. Ekstrakte Organik Madde Miktarı (EOM).....	57
4.3.2. UVF Yöntemiyle Toplam Petrol Hidrokarbonlarının (Σ TPH) Analizi	58
4.3.3. GC-MS Analiz Bulguları	61
4.3.3.1. Total İyon Kromatogramları (TIC)	61
4.3.3.2. Batman Ham Petrol Uygulaması ile Bitki ve Kontrol Örneklerinde Tespit Edilen ... <i>n</i> -Alkan Dağılımları	69
4.3.3.3. İsoprenoid Oranları Kullanılarak Petrol Hidrokarbon Degradasyonunun Değerlendirilmesi.....	82
4.3.3.4. Aromatik Hidrokarbonların Davranışları	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	101
KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	135

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Ham petrol içerisinde bulunan organik bileşik örnekleri	9
Şekil 2.2: Petrolün çevredeki temel ayrışma süreçleri.....	12
Şekil 2.3: Petrol hidrokarbonlarının (PHC) rizoremediasyonu	24
Şekil 2.4: Bitki hücrelerinde inorganik ve organik kirleticilerin tolerans mekanizmaları	27
Şekil 2.5: Bitki hücrelerinde benzenin oksidatif degradasyonu	30
Şekil 2.6: Trikloroetilen (TCE) in bitki dokularındaki metabolizması.....	33
Şekil 2.7: Ksenobiyotiklerle sekonder bitki metabolitlerinin yapısal olarak benzerlikleri	35
Şekil 2.8: Bermuda çimlerinin (<i>Cynodon dactylon</i>) petrol kirliliği karşısında vermiş oldukları moleküler cevap.....	39
Şekil 2.9: <i>Azolla</i> nın morfolojisi.....	41
Şekil 2.10: <i>Azolla filiculoides</i>	42
Şekil 3. 1: <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin yetiştirildiği stok büyüme ortamı.	43
Şekil 3. 2: Deney uygulaması öncesinde bitkilerin alındığı büyüme kapları.	44
Şekil 3. 3: n-Alkan standardı.	50
Şekil 3. 4: PAH (mix 9) standardı.	50
Şekil 3. 5: GC-MS Kütüphane Taraması.....	51
Şekil 4.1: <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine farklı konsantrasyonlarda Batman ham petrolünün uygulanması	52
Şekil 4.2: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. gündeki genel görünüşü	53
Şekil 4.3: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış negatif kontrol örneklerinin 15.gündeki genel görünüşü.....	54
Şekil 4.4: Batman ham petrol konsantrasyonlarının 15.günün sonunda <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin kök büyümesi üzerine olan etkisi.....	55
Şekil 4.5: Batman ham petrol konsantrasyonlarının (% 0 - % 0,5) 15.günde bitki büyümesi ve ağırlık artışı üzerine etkisi.....	57

Şekil 4.6: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitki örneklerinden 15. günde elde edilen ekstrakte organik madde (EOM) miktarları.....	58
Şekil 4.7: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol ve bitki deney gruplarının besiyerlerinin, 15. günde alt tabakalarındaki Σ TPH değerlerinin dağılımı	59
Şekil 4.8: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol ve bitki deney gruplarının besiyerlerinin, 15. günde üst tabakalarındaki Σ TPH değerlerinin dağılımı	59
Şekil 4.9: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait 15. günde Σ TPH değerlerinin dağılımı	60
Şekil 4.10: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) negatif kontrol örneklerinin alt tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları..	62
Şekil 4.11: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının alt tabakasına ait 15.gündeki TIC kromatogramları.....	62
Şekil 4.12: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) negatif kontrol örneklerinin üst tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları .	63
Şekil 4.13: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının üst tabakasına ait 15.gündeki TIC kromatogramları.....	63
Şekil 4.14: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin alt tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları..	64
Şekil 4.15: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının alt tabakasına ait 15.gündeki TIC kromatogramları.....	64
Şekil 4.16: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin üst tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları .	65
Şekil 4.17: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının üst tabakasına ait 15.gündeki TIC kromatogramları.....	65
Şekil 4.18: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları.....	66

Şekil 4.19: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları.....	66
Şekil 4.20: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin 15. gündeki TIC kromatogramları.....	68
Şekil 4.21: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları.....	68
Şekil 4.22: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	70
Şekil 4.23: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	70
Şekil 4.24: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15.günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	71
Şekil 4.25: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	71
Şekil 4.26: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15.günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	72
Şekil 4.27: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	72
Şekil 4.28: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15.günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	73
Şekil 4.29: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	73
Şekil 4.30: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15.günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	74

Şekil 4.31: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	74
Şekil 4.32: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15.günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	75
Şekil 4.33: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı	75
Şekil 4.34: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	77
Şekil 4.35: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	77
Şekil 4.36: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	78
Şekil 4.37: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	78
Şekil 4.38: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	79
Şekil 4.39: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.....	79
Şekil 4.40: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen toplam alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.	80
Şekil 4.41: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.....	81

Şekil 4.42: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde tespit edilen toplam alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.....	82
Şekil 4.43: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	83
Şekil 4.44: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	84
Şekil 4.45: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	84
Şekil 4.46: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	85
Şekil 4.47: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	85
Şekil 4.48: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.....	86
Şekil 4.49: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde, C17/Pr isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.....	87
Şekil 4.50: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde, C18/Ph isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.....	88
Şekil 4.51: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde, Pr/Ph isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.....	88
Şekil 4.52: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde, isoprenoid oranlarının (C17/Pr, C18/Ph, Pr/Ph) kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.	89
Şekil 4.53: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.....	90
Şekil 4.54: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.....	91
Şekil 4.55: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.....	91

Şekil 4.56: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.	92
Şekil 4.57: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.	92
Şekil 4.58: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.	93
Şekil 4.59: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	94
Şekil 4.60: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	95
Şekil 4.61: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	95
Şekil 4.62: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	96
Şekil 4.63: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	96
Şekil 4.64: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.	97
Şekil 4.65: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı ..	97
Şekil 4.66: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine ait, 15. günde, fenantren miktarlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: U.S. EPA tarafından yayınlanan öncelikli kirleticiler listesindeki 16 PAH bileşiminin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.....	11
Tablo 2.2: Fitoremediasyon mekanizmaları.....	19
Tablo 2.3: Organik bileşiklerin degradasyonunda rol alan bitkisel ve mikrobiyal enzimler.....	31
Tablo 2.4: Fitoremediasyonun avantaj ve dezavantajları.....	36
Tablo 3.1: <i>Azolla filiculoides</i> Lam. bitkisine uygulanan Batman ham petrol konsantrasyonları.	45
Tablo 3.2: Otomatik Soxhlet ekstraksiyon çalışma metodu.....	47
Tablo 3.3: GC-MS Parametreleri.	49
Tablo 4.1: Batman ham petrol konsantrasyonlarının <i>Azolla filiculoides</i> üzerine olan etkileri.....	56
Tablo 4.2: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0 - %0,5), negatif kontrol ve bitki büyüme ortamları ile bitki örneklerine ait 15. gündeki Σ TPH değerlerinin dağılımı.....	60
Tablo 4.3: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) bitki ve kontrol örneklerinin 15. günde, alifatik fraksiyonlarına ait GC/MS kromatogramlarında görülen ilk karbon sayıları.....	76
Tablo 4.4: Batman ham petrol (BHP) konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) kontrol ve bitki örneklerinin 15. gündeki isoprenoid (C17/Pr, C18/Ph, Pr/Ph) oranları.....	86
Tablo 4.5: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) kontrol örneklerinde, 15. günde tespit edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkillenmiş PAH homologları.....	99
Tablo 4.6: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkillenmiş PAH homologları.....	100

SEMBOL LİSTESİ

TPH	: toplam petrol hidrokarbonları
PAH	: polisiklik aromatik hidrokarbonlar
U.S. EPA	: Amerika Birleşik Devletleri çevre koruma örgütü
PCB	: poliklorlu bifeniller
PCDD	: poliklorlu dibenzodioxinler
BTEX	: benzen, toluen, etilbenzen, ksilen
Pr	: pristan
Ph	: fitan
TCE	: trikloroetilen
TNT	: trinitrotoluen
PHC	: petrol hidrokarbonları
NA	: nikotianamin
GSH	: glutatyon
PCs	: fitokelatin
Cys	: sistein
MT	: metalohiyonin
ADH	: alkol dehidrogenaz

ÖZET

TATLI SU EĞRELTİSİ *AZOLLA FILICULOIDES* LAM. KULLANILARAK PETROL HİDROKARBONLARININ FİTOREMEDİASYONU

Petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş tatlı su alanlarının fitoremediasyonu alternatif ve çevre dostu bir teknoloji olarak umut vermektedir. Bu çalışmada bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin petrol hidrokarbonlarının fitoremediasyonundaki etkinliği araştırıldı. Bitkiler azot içermeyen Hoagland besi suyunda sera koşullarında yetiştirildi. Deney grubu bitkilerine 15 gün süreyle % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 konsantrasyonlarında ham petrol uygulandı. Taze ağırlık artışı, kök uzunluğu ve sayısı büyüme parametresi olarak alındı. Bitki büyüme ortamı, bitki ve kontrol ortamlarından alınan örneklerdeki petrol hidrokarbonlarının analizleri yapıldı.

Bitki büyümesinin % 0,005 ve % 0,01 ham petrol konsantrasyonlarında teşvik edildiği, % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonlarında çok az indirildiği, % 0,2 petrol konsantrasyonunda ise kontrole göre neredeyse % 50 azaldığı ve % 0,3 ve daha yüksek ham petrol konsantrasyonlarında ise populasyondaki bitkilerin çoğunluğunun öldüğü görüldü. Bitki büyüme yüzdesi, taze ağırlık artışı ve kök büyümesinden elde edilen değerler *A. filiculoides* bitkisinin ham petrole olan toleransının % 0,1 - % 0,2 aralığında olabileceğini gösterdi. Toplam alifatik ve aromatik (fenantren) hidrokarbonların kontrole göre biyodegradasyonları % 0,05 - % 0,2 petrol konsantrasyonları aralığında sırasıyla % 94 - % 73 ve % 81 - % 77 gibi yüksek değerler saptanırken % 0,3 - % 0,5 petrol konsantrasyonları aralığında ise sırasıyla % 71 - % 63 ve % 75 - % 71 arasında bulundu. Uygulanan ham petrol konsantrasyonlarından elde edilen yüksek biyodegradasyon yüzdeleri *A. filiculoides* bitkisinin ham petrole kirlenmiş tatlı su alanlarının fitoremediasyonunda etkili olabileceğini önermektedir.

SUMMARY

PHYTOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS BY USING A FRESHWATER FERN SPECIES *AZOLLA FILICULOIDES* LAM.

The phytoremediation of freshwater resources contaminated with petroleum hydrocarbons is an environment-friendly promising approach. In this study, the phytoremediation capacity of petroleum hydrocarbons of *Azolla filiculoides* Lam was investigated. The plants were grown in nitrogen-free Hoagland nutrient solution under greenhouse conditions. The plants in the experimental group were grown in the mediums containing 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5% crude oil for 15 days. The increase in fresh weight, root length and number of roots were used to measure growth rate. The effect of the plants on the degradation rate of petroleum hydrocarbons was gaged by analyzing the amount of hydrocarbons in the experimental and control media and in the plant samples.

Although the growth of plants were not too much influenced in the medium containing 0.005% and 0.01% crude oil, the presence of the oil in the growth medium from 0.05% and 0.1% insignificantly reduced the growth, however the higher concentrations of crude oil significantly retarded the growth; e.g., 0.2% oil in the media reduced growth approximately 50% relative control media, and the oil concentrations of crude oil 0.3% and higher the majority of plants were killed. The results from the percentage of plant growth, fresh weight increase and root growth showed that the tolerance of *A. filiculoides* plants to crude oil could be between 0.1% and 0.2%. In comparison to control values of the biodegradation of total aliphatic and aromatic (phenathrene) hydrocarbons between 0.05% - 0.2% oil concentrations, respectively, 94% - 73% and 81% - 77% was high, between 0.3% - 0.5% oil concentrations respectively 71% - 63% and 75% - 71%. The high biodegradation rates suggested that *A. filiculoides* plants could be used for the phytoremediation of crude oil contaminated freshwater resources.

1. GİRİŞ

Endüstriyel gelişme, artan dünya nüfusu ve kentsel yaşamın beraberinde getirdiği çevre kirliliği, özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren doğal yaşamı tehdit etmektedir. Artan endüstriyel faaliyetler beraberinde enerjiye duyulan gereksinimi de artırmaktadır. Alternatif enerji kaynaklarının geliştirilmesi için yoğun bir araştırma olmasına rağmen, petrol hala vazgeçilemez enerji kaynağıdır. Petrol ürünlerinin kullanımındaki artış, meydana gelen petrol tanker kazaları ve petrol boru hatlarındaki sızıntılar nedeniyle petrol hidrokarbonları, toprak ve su (deniz ve tatlı su) ortamında en fazla bulunan kirleticiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Deniz, tatlı su ve toprak alanlarında meydana gelen petrol hidrokarbonları kaynaklı kirlilik, petrol taşımacılığında transit ülke olan Türkiye’de çevre ve insan sağlığı açısından her geçen gün daha büyük bir sorun oluşturmaktadır.

Çevre ve doğal kaynakların kirlenmeye karşı korunması, çevre kirliliğinin önlenmesi açısından kritik öneme sahip olmakla birlikte kirlenmiş alanların temizlenmesi de mevcut çevre kirliliklerinin çözümünde büyük önem taşımaktadır. Toprak ve suya karışan ve buralarda birikme yapan kirleticiler, mikrobiyal aktiviteye, toprak verimliliğine, biyolojik çeşitliliğe ve ürün kayıplarına, hatta besin zinciri yoluyla çevre ve insan sağlığı problemlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Petrol hidrokarbonları kökenli çevresel kirlilik kaynaklarının tüm dünyada artış göstermesi bunların doğal ortamdan uzaklaştırılmalarına yönelik tekniklerin geliştirilmesi zorunluluğunu da beraberinde getirmiştir. Çevresel kirliliğin ortadan kaldırılmasında canlı organizmaların (bitki, bakteri, alg v.b.) kullanılması biyoremediasyon olarak adlandırılmakta ve bu teknolojilerde temel olarak kirliliğin *in situ* temizlenmesi hedeflenmektedir. Bu uygulamalar gerek düşük maliyeti ve gerekse çevre dostu olmaları dolayısıyla alternatif teknoloji olarak son zamanlarda birçok araştırmanın konusu olmuştur. Biyoremediasyon türü olan fitoremediasyon, bitkiler kullanılarak insan aktiviteleri sonucunda kirletilmiş toprak, su ve havanın temizlenmesi

olarak tanımlanmaktadır. Farklı bitki türleri kullanılarak fitoremediasyonla topraktaki petrol kirliliğinin temizlenebildiğine dair çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak tatlı su bitkileri kullanılarak petrol hidrokarbonlarının fitoremediasyonu ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada petrolle kirlenmiş tatlı su alanlarının temizlenmesinde bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin etkinliğinin araştırılması amaç edinilmiştir.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde petrol ve petrol türevlerinin çevre kirliliği üzerindeki etkileri anlatılmış ve tezin çalışma alanı ile ilgili olarak petrol kirliliğinin su alanları üzerindeki etkisi vurgulanmıştır. Ham petrolün yapısı ve bileşenleri tanıtıldıktan sonra petrolün çevredeki davranışı, biyodegradasyonu ve biyodegradasyonun değerlendirilmesi anlatılmıştır. Fitoremediasyon ve fitoremediasyon türleri tanıtılarak, fitoremediasyonu etkileyen biyolojik süreçler, organik bileşiklerin bitkiye alım mekanizmaları ve metabolizmaları hakkında bilgiler verilmiştir. Son olarak ham petrolün bitkiler üzerine olan etkileri anlatıldıktan sonra bu çalışmada kullanılan bitki tanıtılmıştır. “Malzeme ve Yöntem” bölümünde bitki temini, yetiştirilmesi ve ham petrol uygulaması açıklanmıştır. Ham petrolün bitki üzerine olan etkisi ve petrol analizlerinin hangi yöntemler kullanılarak değerlendirileceği sunulmuştur. “Bulgular” bölümünde deneyler sonucunda elde edilen veriler belirtilerek tablo ve şekillerde gösterilmiştir. “Tartışma ve Sonuç” bölümünde bulgular kısmında elde edilen veriler bu alanda yapılmış mevcut literatür bilgileriyle karşılaştırılarak tartışılmış, sonuçlar ortaya konularak çalışmanın önemi vurgulanmıştır.

Hızlı büyümesi ve laboratuvar koşullarında kolaylıkla yetiştirilebilmesi *Azolla* yı özellikle fitoremediasyon çalışmaları için çekici kılmaktadır. Dünya literatüründe petrol üzerine yapılmış sayısız çalışma mevcuttur. Ancak bu tez konusu ile çalışılan bitkide (*Azolla filiculoides*) ham petrolü konu alan herhangi bir veriye rastlanılamamıştır. Bu tez çalışmasının amacı: (1) bir tatlı su eğreltisi olan ve su üzerinde yüzerek yaşayan *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin ham petrole olan tolerans sınırlarını belirlemek, (2) bitkinin fitoremediasyon potansiyeli saptanarak, petrol bileşiklerinin biyodegradasyonları üzerindeki rolünü değerlendirmektir. Elde edilen veriler bu bitkinin yaygın olarak kullanıldığı özellikle pirinç tarımında olmak üzere sulak alanlarda meydana gelecek petrol kirliliğinde fitoremediasyon çalışmalarına kaynak oluşturacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÇEVRE KİRLİLİĞİ

Kirlilik, ekosistem üzerinde düzensizliklere ve zararlara sebep olarak, canlı yaşamını olumsuz bir şekilde etkileyebilecek olan kirleticilerin çevreye girişi ve bu alanlarda yüksek miktarlarda birikmesi şeklinde tanımlanabilir. Toplumun ekonomik büyümesi, dünya nüfusundaki artış ve buna paralel olarak endüstrileşme sürecindeki hızlı değişim ile birlikte çevreye yayılan kirleticilerin miktarı ve çeşidi her geçen gün artmaktadır. Canlı ve yaşadığı çevre üzerinde yapısal zararlar meydana getiren, organik ve inorganik yapıdaki kirleticilerin hava, su ve toprağa karışması olayına "çevre kirliliği" adı verilmektedir.

Çevre kirliliği çeşitleri genel olarak; hava kirliliği, su kirliliği ve toprak kirliliği şeklinde sınıflandırılabilir. Hava kirliliği, doğal ortamda atmosferik havanın fiziksel, biyolojik ve kimyasal özelliğinin çeşitli etkenlerle canlı yaşamını tehdit edecek şekilde değişikliğe uğramasıdır. Atmosferde toz, duman, gaz, koku ve saf olmayan su buharı şeklinde bulunan kirleticiler, insanlar ve diğer canlılara zarar verebilecek seviyelere ulaşabilmektedir. Su kirliliği, istenmeyen zararlı maddelerin, suyun niteliğini ölçülebilecek oranda bozmalarını sağlayacak miktar ve yoğunlukta suya karışması olayıdır. Doğal çevrenin önemli bir kısmını oluşturan su alanlarının ve ayrıca içme sularının farklı etkenlerle, insan başta olmak üzere diğer canlıların yaşamını olumsuz yönde etkileyecek biçimde bozulması sonucu su kirliliği oluşur. Konutlar, endüstri kuruluşları, termik santraller, gübreler, kimyasal mücadele ilaçları, tarım ve sanayi atık suları, nükleer santrallerden çıkan sular ve toprak erozyonu gibi süreçler su kirliliğini meydana getiren başlıca kaynaklardır. Toprak, ilişkili olduğu su ve hava sistemlerinin içerdiği kirletici unsurlar için son depolama noktasıdır. Toprakların fiziksel, kimyasal ve biyolojik dengesinin çeşitli kirletici unsurlarla bozulması olayına toprak kirliliği adı verilmektedir. Bu kirleticiler toprağın verim gücünü düşürmekte ve optimum toprak özelliklerini bozmaktadırlar. Evsel, tarımsal ve sanayi atıkları ile kirlenmiş sulama suları, tarımsal mücadelede kullanılan kimyasallar ve gübreler, inorganik, organik ve radyoaktif maddeler, toprak kirliliğine neden olan kirleticilerdir (Büyükgüngör, 2006).

Çevre kirliliğine sebep olan organik ve inorganik yapıdaki bileşikler genel olarak, endüstri, enerji santralleri, fabrika bacaları, rafineriler, otomobil eksozları, benzin istasyonları ve evsel atıklardan kaynaklanabildiği gibi tarımda kullanılan gübre ve pestisitlerden de kaynaklanabilir. Herhangi bir şekilde çevre kirliliğine sebep olan bu bileşikler doğal döngü içerisinde havaya, toprağa, yeraltı sularına, göllere, nehirlere ve denizlere karışabilmekte ve buralarda yüksek oranlarda birikerek, bulunduğu alanlardaki canlı yaşamını tehdit edebilmektedir.

2.1.1. Petrol Kirliliği

İnsan aktivitelerinin bir sonucu olarak çevreye bırakılan organik ve inorganik bileşiklerin büyük kısmı ciddi çevresel problemlere sebep olmaktadır. Bu problemler arasında yer alan, endüstriyel kaynaklı ve diğer aktiviteler sebebiyle (Petrol boru hatlarındaki sızıntılar ve petrol tanker kazaları gibi) meydana gelen su ve topraktaki petrol kontaminasyonu büyük çevresel hasarlar yaratmaktadır. Petrol hidrokarbonlarının temel enerji kaynağı olarak kullanılması sürmekte ve bu nedenle büyük bir küresel kirlenici olarak etkinliği devam etmektedir (Ferrari ve diğ., 1999, Vasudevan ve Rajaram, 2001, Mrayyan ve Battikhi, 2005).

Toksik, mutajen, karsinojen ve/veya kalıcı özellikteki kirlenitçiler, insan sağlığını, tarımsal verimliliği ve çevreyi tehdit etmektedir. Bu kirlenitçilere örnek olarak toplam petrol hidrokarbonları (TPH), polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH), halojenli hidrokarbonları, pestisitleri, solventleri ve metalleri verebiliriz. Çevresel etkilerinden dolayı bu bileşikler tarafından kirlenitilmiş alanların temizlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak bazı alanların temizlenmesi yeterince masraflı ve zaman alıcı olabilir (Pilon-Smits, 2005; Greenberg ve diğ., 2007).

Petrol; n-alkanlar, aromatikler, reçineler ve asfaltlenler gibi hidrofobik ve su içermeyen bileşiklerin kompleks bir karışımıdır. Bu bileşiklerin çoğu, toksik (Swoboda-Colberg, 1995), mutajen ve karsinojendir (Zappi ve diğ., 1996; Propst ve diğ., 1999; Mrayyan ve Battikhi, 2005). Bu bileşikleri insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Örgütü (U.S. EPA) öncelikli çevre kirlenitçiler olarak sınıflandırmaktadır (U.S. EPA, 1986; Mrayyan ve Battikhi, 2005). Bu bileşiklerin çevreden temizlenebilmesi için çeşitli yöntemler önerilmektedir. Yakma,

klorlama ve ozonlama gibi fiziksel ve kimyasal yöntemler; pahalı, ayrıntılı donanım ve önemli miktarda yakıt gerektirirken, organik kirleticilerin biyolojik olarak temizlenmesi fiziksel ve kimyasal sürece oranla daha basit, güvenilir ve ucuz bir teknoloji olarak umut vermektedir (Thayer, 1991; Exner, 1994; Klein, 2000; Mrayyan ve Battikhi, 2005).

Ham petrol, özellikle petrol hidrokarbonları, endüstriyel önem ve onun enerji ihtiyacı açısından baktığımızda, modern toplumun ekonomik büyümesi için en önemli ve vazgeçilmez kaynağı olmuştur. Bu gerçeklik daha fazla petrol rezervi bulmak adına yoğun arama çalışmalarına dönüşmüş ve buna paralel olarak yapılan keşif çalışmaları da çevrenin aşırı miktarda kirletilmesiyle sonuçlanmıştır (Okoh, 2006). Ham petrol kazayla ya da kasıtlı olarak çevreye karışabilir ve bu da ciddi çevre problemlerine yol açabilir (Thouand ve diğ., 1999; Okoh, 2006). Petrol hidrokarbonlarının az miktarlarda bile su kaynaklarına karışması çözünmüş hidrokarbon konsantrasyonlarının olması gereken sınırların çok üzerine çıkmasına sebep olabilir (Spence ve diğ., 2005). Bu kirlilik problemleri, özellikle karsinojen ve nörotoksik organokirletici familyasına ait bazı hidrokarbon bileşiklerinden dolayı ekosistemin biyotik ve abiyotik bileşenleri üzerinde ciddi hasarlarla sonuçlanmaktadır (Mueller ve diğ., 1992; Hallier-Soulier ve diğ., 1999; Okoh, 2006). Sulak alanların pestisitler, PAH ve ağır metaller gibi çeşitli kirleticilerle kontaminasyonu ekosistemin doğal dengesinin bozulmasına yol açmıştır.

2.1.2 Sularda Petrol Kirliliği

Canlı biyokimyası için temel bir bileşik olan su, ekosistemler arasındaki bağlantının sürdürülmesini de sağlamaktadır. Ayrıca su, bitki büyümesi ve akuatik türlere habitat olmasının yanısıra, sediment, besin ve kirleticilerin küresel biyojeokimyasal döngü içerisinde taşınmasındaki en önemli aktörlerden biridir (De Sherbinin ve diğ., 2007). Dünyamızdaki suyun % 97,2'si okyanuslarda bulunur ve bu su içmek, tarımsal sulama yapmak ya da sanayi kullanımı için oldukça tuzludur. Geri kalan suyun % 2,8'lik kısmı tatlı sudur ve bu suyun büyük çoğunluğu buzullarda donmuş, toprak altında ulaşılamayacak kadar derinlerde ya da kullanmak için oldukça tuzlu haldedir. Böylece dünyamızın toplam su hacminin sadece % 0,014'ü kolaylıkla kullanabileceğimiz durumdadır. Bu su da toprak nemi, kullanılabilir yer altı suyu, su buharı, göller ve akarsular olarak karşımıza çıkmaktadır (U.S. EPA, 1997). Küresel düzeyde

kullanılabilecek durumda olan tatlı suyun büyük kısmı (yaklaşık % 70'i) tarımsal sulama, % 23'ü sanayi ve % 8'i evsel olarak kullanılmaktadır (De Sherbinin ve diğ., 2007). Bu amaçla gün geçtikçe kirlenen ve tükenen tatlı su kaynaklarımızı dünyamızın geleceği açısından korumak ve bilinçli bir şekilde kullanmak durumundayız.

En son teknolojik gelişmelere rağmen, ekstraksiyon, taşıma, depolama, arıtma ve dağıtım gibi rutin işlemler sırasında ham petrol ve ham petrol ürünlerinin kazayla çevreye dökülmeleri sıklıkla meydana gelmektedir. Her yıl 1.7 – 8.8 milyon metrik ton arasında petrol ve petrol türevlerinin dünya sularını kirlettiği tahmin edilmekte (NAS, 1985) ve bu kirlenmenin % 90'dan fazlasının doğrudan insan aktiviteleri sonucunda meydana geldiği de bilinmektedir (Zhu ve diğ., 2001).

Deniz ortamındaki petrol kirlilikleri, özellikle büyük ölçekli petrol tanker kazaları deniz kıyı ortamları için tehdit oluşturmakta ve telafisi zor zararlara sebep olmaktadır. 1989'da Alaska'da meydana gelen tanker kazasında (Exxon Valdez) 37.000 ton ham petrol denize dökülmüştür. Bu tanker kazası, binlerce deniz kuşu ve memelisinin ölümüne yol açarak popülasyonunun azalmasına ve yanısıra uzun vadeli çevresel etkilere neden olmuştur (Spies ve diğ., 1996; Zhu ve diğ., 2001). Son olarak yakın zamanda, Deepwater Horizon petrol platformunun 21 Nisan 2010 da patlamasının ardından batması sonucu oluşan petrol sızıntısı, eşi benzeri görülmemiş bir çevre felaketine yol açmıştır. Bu süreç içerisinde 24 – 38 milyon galon ham petrolün mavi sulara karışmış olduğu belirtilmektedir (Levy ve Gopalakrishnan, 2010).

Denizlerdeki petrol kirliliği ile karşılaştırıldığında, iç sulardaki petrol kirliliği çok daha az dikkat çekmektedir. Ancak Amerika Birleşik Devletleri tatlı sularında ortalama olarak her yıl 2000'den fazla petrol kirliliği meydana gelmektedir (Owens ve diğ., 1993; Zhu ve diğ., 2001). Tatlı sularda meydana gelen petrol kirlilikleri denizde oluşan kirliliklere oranla daha küçük hacimli olma eğilimi taşırsa (Stalcup ve diğ., 1997) da kalabalık nüfuslu alanlar içinde meydana gelmesi, doğrudan yüzey suları ve yer altı su kaynaklarını kontamine etmesi nedeniyle halk sağlığı ve çevre için oldukça büyük tehlike yaratmaktadır (Zhu ve diğ., 2001).

Tatlı su alanları, içlerinde barındırdıkları organizmalar için yaşam alanı olmalarının yanında endüstriyel ve evsel kaynaklardan gelen birçok tehlikeli kimyasalları da içermektedir. Bu kimyasallar arasında poliklorlu bifenilleri (PCB), poliklorlu dibenzodioxinleri (PCDD), poliklorlu dibenzofuranları, polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH), pestisitleri, deterjanları ve ağır metalleri sayabiliriz (Cheevaporn ve Beamish, 2007; Sharma ve Cyril, 2007).

Akuatik sedimentler, fiziksel ve biyolojik atıkların deposudur, çok çeşitli organik ve inorganik kirleticileri içeren bir havuz olarak değerlendirilebilirler (Zoumis ve diğ., 2001; Perelo, 2010). Sucul ekosistemlerde bulunan kirleticiler sedimentte taşınmayıp, birikebilir ya da farklı bileşiklere dönüşebilir (Martínez-Jerónimo ve diğ., 2008; Perelo, 2010). Ağır metaller gibi inorganik bileşiklerin aksine hidrokarbonlar biyolojik süreçler aracılığı ile başka bileşiklere dönüştürülebildiği gibi tamamen degradasyona uğrayabilmekte hatta bu degradasyon bazen mineralizasyonla da sonuçlanabilmektedir. Akuatik sedimentler anaerobik koşulları ve içerdikleri bol miktarda karbon ve enerji kaynaklarından dolayı organik bileşikleri degrade edebilme potansiyeline sahip bol miktarda mikrobiyal kütle ve çeşitliliğe de sahiptirler (Himmelheber ve diğ., 2007; Perelo, 2010).

Sucul ekosistemlere hidrokarbon girişi, doğrudan atık veya dökülme ile olabileceği gibi dolaylı olarak karasal veya atmosferik kaynaklı da olabilir. Hidrokarbonların çevrede kalıcı olmaları temel olarak kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Daha karmaşık yapılı, daha halojenli ve hidrofobik olanlar, sedimentte daha çok birikme eğilimi gösterdiklerinden kirletici olarak daha etkilidirler. PAH ve PCB ler gibi kalıcı ve karsinogen yapıda olan hidrokarbonlar besin zincirine girdiklerinde, daha tehlikeli olabilirler (IARC, 1983; Perelo, 2010).

2.2. HAM PETROLÜN YAPISI

Ham petrol doğal yollarla oluşmuş, toksik, yanıcı, farklı moleküler ağırlıkta, kompleks hidrokarbon karışımlarından ve diğer organik bileşiklerden meydana gelmiştir. Yerküre içerisindeki jeolojik katmanlarda bulunur. Genellikle koyu siyah renkli ve sıvı haldedir. Petrol (İng., *Petroleum*) Latince, *petra* (kaya) ve *oleum* (yağ) kelimelerinden gelir.

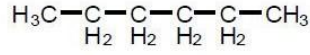
Temel olarak ham petrol, tortullaşmış kaya yataklarında meydana gelmiş sıvı, katı ve gaz haldeki hidrokarbonların karışımıdır. Moleküler düzeyde hidrokarbonların kompleks bir karışımı olan petrol, azot, kükürt ve oksijenli organik bileşikleri ve özellikle vanadyum, nikel, demir ve bakır gibi metalik bileşenleri içerir. Elementel içeriğine bakıldığında petrolün % 83 – 87'si karbon, % 10 – 14'ü hidrojen, % 0,05 – 6'sı kükürt, % 0,1 – 2'si azot ve % 0,05 – 1,5'i ise oksijendir. Petrol içerisinde bulunan metallerin oranı ise % 0,1'i kadardır (Speight, 1991; U.S. EPA, 2001).

Petrol bileşenleri organik çözücüler içerisindeki farklı çözünürlüklerine göre dört büyük grup altında sınıflandırılabilir (Leahy ve Colwell, 1990; Zhu ve diğ., 2001) (Şekil 2.1).

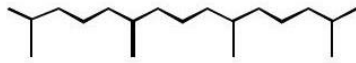
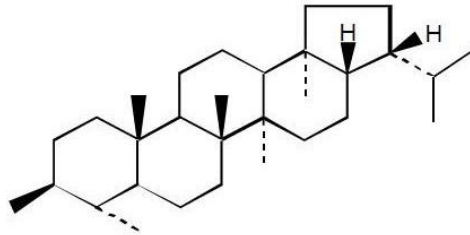
1. Doymuş Hidrokarbonlar:

Normal ve dallanmış alkanları içeren C_nH_{2n+2} formülüne sahip *Alifatik Hidrokarbonlar* ve C_nH_{2n} formülü ile gösterilen sikloalkanları içeren *Alisiklik Hidrokarbonlar*dır. Zincir uzunlukları 1 ile 40 karbon arasında değişmektedir. Doymuş hidrokarbonlar genellikle ham petrol içerisinde en fazla bulunan bileşenlerdir. Genel olarak n-alkanlar en kolay parçalanılan petrol bileşenleridir (Zobell, 1946; Atlas, 1981; Zhu ve diğ., 2001). 10 ile 26 arasında karbona sahip olan alkan bileşikleri en fazla ve sık kullanılan hidrokarbonlardır (Atlas, 1995; Zhu ve diğ., 2001).

DOYMUŞ HİDROKARBONLAR



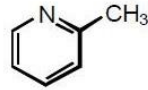
n-hekzan

n-heptadekan (n-C₁₇H₃₆)pristan (C₁₉H₄₀)

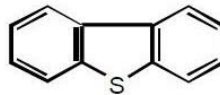
17α(H),21β(H)- hopen

REÇİNELER

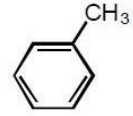
2- metilpridin



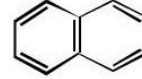
dibenzotiofen



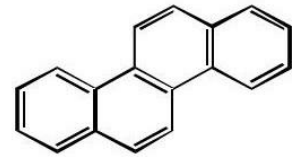
AROMATİKLER



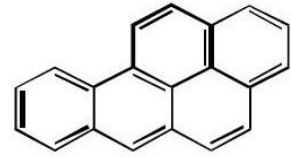
toluen



naftalen

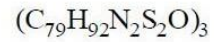


krizen



benzo [a] piren

ASFALTENLER



Şekil 2. 1: Ham petrol içerisinde bulunan organik bileşik örnekleri (Zhu ve diğ., 2001).

2. Aromatik Hidrokarbonlar:

Monoaromatik hidrokarbonlar; BTEX bileşikleri (benzen, toluen, etilbenzen ve ksilen gibi) ve Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (Naftalen, antrasen ve fenantren gibi) olmak üzere iki gruptan oluşurlar. PAH'lar kimyasal ürünlerin tamamen yanmaması ve kompleks kimyasal reaksiyon serilerinin piroliz süreci

sırasında oluşmuş kimyasal gruplardır (Ergut ve diğ., 2006; Dhammapala ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2007; Rey-Salgueiro ve diğ., 2008). Çevreye yayılan PAH'ların büyük kısmı fosil yakıtların tamamen yanmaması ve petrol tanker kazalarından kaynaklanmaktadır. PAH'lar mutajen ve karsinojen özelliklerinden dolayı çeşitli çevre ve sağlık kuruluşları tarafından önemli kirleticiler listesine alınmıştır (Rey-Salgueiro ve diğ., 2008) (Tablo 2.1).

Aromatik hidrokarbonlar genellikle biyodegradasyona daha dirençli olmalarına rağmen, naftalen gibi molekül ağırlığı düşük bazı aromatik bileşikler, doymuş hidrokarbonların birçoğundan daha önce okside olabilirler (Focht ve Westlake, 1987; Zhu ve diğ., 2001). Monoaromatik hidrokarbonlar, hücre membranları üzerindeki çözücü etkilerinden dolayı bazı mikroorganizmalar için toksik etkiye sahiptirler. Ancak aerobik koşullar altında, düşük konsantrasyonlarda kolaylıkla biyodegrade olabilirler. 2 – 4 halkalı PAH'lar, daha az toksiktirler ve biyodegradasyon oranları yapıları kompleksleştikçe azalmaktadır. 5 ve daha fazla halkaya sahip PAH bileşiklerinin biyodegradasyonları ise daha çok mikroorganizmaların ortak metabolizması ile olabilmektedir. Alkillenmiş aromatikler ana bileşiklerine oranla daha yavaş yıkılırken, daha çok alkillenmiş gruplarda az alkillenmiş gruplara göre daha yavaş yıkılırlar (Prince, 1993; Cerniglia, 1992; Zhu ve diğ., 2001).

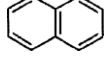
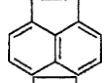
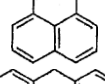
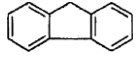
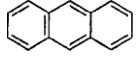
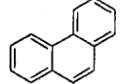
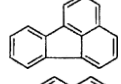
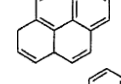
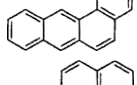
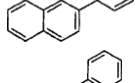
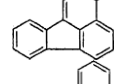
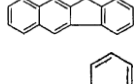
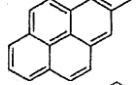
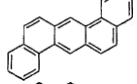
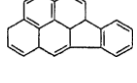
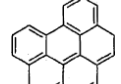
3. **Reçineler:**

Azot (N), kükürt (S) ve oksijen (O) içeren polar bileşiklerdir (pridinler ve tiyofenler gibi). Genellikle NSO bileşikleri olarak bilinirler.

4. **Asfaltanlar:**

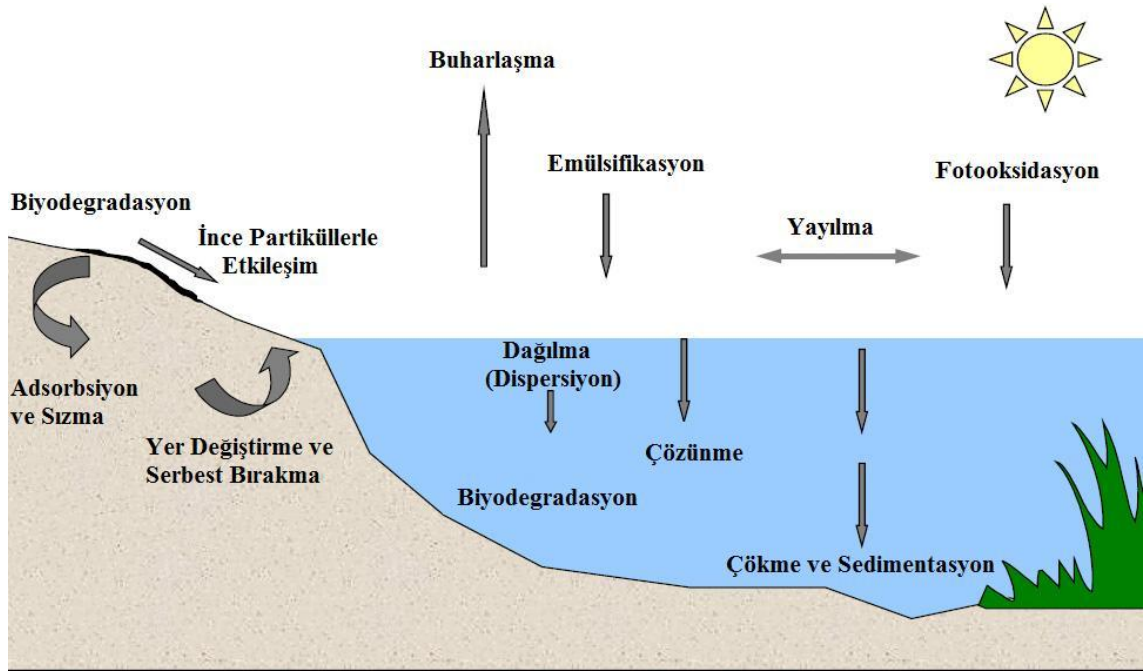
Hem yüksek molekül ağırlıklı ve zayıf yapılı hidrokarbonlar hem de NSO bileşiklerinden oluşurlar. Nikel, vanadyum ve demir gibi metaller de yapılarında bulunur. Doymuş hidrokarbonlar ve aromatik hidrokarbonlarla karşılaştırıldığında, reçineler ve asfaltanların biyodegradasyonu, kompleks yapılarından dolayı analizleri zor olduğundan çok az bilinmektedir. Ancak asfaltan degradasyonunun ortak metabolizma ile olabileceği (Leahy and Colwell, 1990; Zhu ve diğ., 2001) ve özellikle düşük molekül ağırlıklı reçine fraksiyonlarının düşük konsantrasyonlarda biyodegradasyona uğrayabileceği belirtilmiştir (NAS, 1985; Zhu ve diğ., 2001).

Tablo 2. 1: U.S. EPA tarafından yayımlanan öncelikli kirleticiler listesindeki 16 PAH bileşiminin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri (Antizar-Ladislao ve diğ., 2004; Van Epps., 2006).

	Molekül ağırlığı	Formülü	Yapısı	log K _{OW}	Çözünürlük (mg/L)	H _i atm m ³ mol ⁻¹
Naftalen	128	C ₁₀ H ₈		3.00 – 4.00	31	4.5 x 10 ⁻³
Asenaftilen	152	C ₁₂ H ₈		3.70	16.1	-
Asenaften	154	C ₁₂ H ₁₀		3.92 – 5.07	3.8	2.4 x 10 ⁻⁴
Floren	166	C ₁₃ H ₁₀		4.18	1.9	7.4 x 10 ⁻⁵
Antrasen	178	C ₁₄ H ₁₀		4.46-4.76	0.045	-
Fenantren	178	C ₁₄ H ₁₀		4.45	1.1	2.7 x 10 ⁻⁴
Floranten	202	C ₁₆ H ₁₀		4.90	0.26	1.9 x 10 ⁻³
Piren	202	C ₁₆ H ₁₀		4.90	0.132	1.3 x 10 ⁻⁵
Benzo[a]antrasen	228	C ₁₈ H ₁₂		5.61-5.70	0.011	1.2 x 10 ⁻⁶
Krizen	228	C ₁₈ H ₁₂		5.61	1.5 X 10 ⁻³	6.7 x 10 ⁻⁷
Benzo[b]floranten	252	C ₂₀ H ₁₂		6.57	0.0015	-
Benzo[k]floranten	252	C ₂₀ H ₁₂		6.84	0.00008	-
Benzo[a]piren	252	C ₂₀ H ₁₂		6.04	0.0038	2.7 x 10 ⁻⁷
Didenzo[a,h] antrasen	278	C ₂₂ H ₁₄		5.80-6.50	5 X 10 ⁻⁴	2.0 x 10 ⁻⁹
Indeno[1,2,3- cd]piren	276	C ₂₂ H ₁₂		7.66	0.062	-
Benzo[g,h,i] perilen	276	C ₂₂ H ₁₂		7.23	0.0003	2.0 x 10 ⁻⁷

2.2.1. Petrolün Çevredeki Davranışı

Petrol çevreye karıştığında bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlerden geçer (Şekil 2.2). Ayrışma süreçleri, genel olarak petrolün yayılmasını, buharlaşmasını, çözünmesini, ışıkla parçalanmasını, dağılmasını, emülsifikasyonunu, biyodegradasyonunu ve bulunduğu ortama göre sedimentasyonunu veya adsorpsiyonunu içermektedir. Bu ayrışma süreçleri petrol bileşimini ve özelliklerini değiştirmekte ve bu haliyle petrol kirliliğine müdahale yöntemlerini de etkilemektedir (Zhu ve diğ., 2001).



Şekil 2. 2: Petrolün çevredeki temel ayrışma süreçleri (Zhu ve diğ., 2001).

Yayılma

Petrolün su üzerindeki yayılması dökülmenin ilk saatleri boyunca en önemli süreçlerden biridir. Yayılma petrolün akma sıcaklığının ortam sıcaklığından daha düşük olması ile sağlanmaktadır. Petrolün yayılmasını etkileyen ana kuvvetler, yoğunluk, eylemsizlik, sürtünme, vizkozite ve yüzey gerilimidir. Yayılma süreci dökülmenin olduğu yüzey alanını artırmakta böylece buharlaşma, çözünme ve daha sonraki biyodegradasyon aracılığı ile kütle transferini etkilemektedir (Zhu ve diğ., 2001).

Buharlaşma

Çevresel etki anlamında buharlaşma petrol dökülmesinin erken evreleri boyunca en önemli ayrışma süreçlerinden biridir. Buharlaşma, oldukça toksik, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ortamdaki kaldırılmasında sorumlu olabilir. Su üzerine dökülmüş

petrol için, buharlaşma ile C₁₅ ten daha küçük normal alkanlar 1-10 gün arasında ortamdaki kaldırılabilir. Benzen ve toluen gibi uçucu aromatik bileşikler buharlaşma ile ortamdaki daha hızlı bir şekilde kaldırılabilir. Buharlaşma oranını etkileyen en önemli faktörler, petrolün bileşimi ve fiziksel özellikleri, dalga hareketi, rüzgar hızı ve su sıcaklığıdır (Jordan ve Payne, 1980; Zhu ve diğ., 2001).

Çözünme

Petrol dökülmesini takiben suda artan çözülmüş hidrokarbon konsantrasyonları, biyoremediasyona olan etkileri ve biyolojik sistemler üzerindeki toksisitelerinden dolayı oldukça önemlidir. Çözünmenin genişliği dökülen petrolün çözünürlüğüne, hava koşullarına ve dökülmenin olduğu alanın karakteristiğine bağlıdır. Düşük molekül ağırlıklı aromatikler suda en fazla çözünebilir petrol bileşenleridir ve aynı zamanda ham ve rafine olmuş petroldeki en toksik bileşenlerdir. Çözünme oranları ayrıca fotokimyasal ve biyolojik süreçler tarafından da etkilenmektedir (NAS, 1985; Zhu ve diğ., 2001).

Fotooksidasyon

Ayrışma süreçlerinden biri olan fotooksidasyonun önemli biyolojik sonuçları olabilir. Oksijen varlığında güneş ışığı, yüksek molekül ağırlıklı aromatik ve polar bileşikler gibi birçok karmaşık petrol bileşimini bir dizi serbest radikal zincir reaksiyonları ile basit bileşikler haline dönüştürmek için yeterli enerjiye sahiptir. Bu süreç hidroperoksitler, aldehitler, ketonlar, fenoller ve karboksilik asitler gibi polar bileşiklerin oluşumu nedeniyle petrolün sudaki çözünürlüğünü arttırabilir. Zararlı etkilerin, petrolün sudaki çözünürlüğünde ve fotooksidasyonla toksik bileşiklerin oluşumundaki artış ile bağlantılı olduğu söylenebilir (Nicodem ve diğ., 1997; Zhu ve diğ., 2001).

Dağılma

Dağılma ya da petrolün su içerisindeki emülsiyonu, su kolonu içerisinde küçük yağ damlacıklarının oluşumunu içermektedir ve böylelikle petrolün yüzey alanı artmaktadır. Su içerisindeki petrolün emülsiyonu genellikle kararlı değildir. Dağılma, petrol ile mikroorganizmalar arasındaki ilişkiyi artırarak ve/veya daha çözünür petrol bileşenlerinin çözünürlüğünü artırarak petrolün biyodegradasyon oranını etkileyebilir (Zhu ve diğ., 2001).

Emülsifikasyon

Petrolün emülsifikasyon süreci su üzerindeki kaygan petrol ya da su içerisindeki petrolün dağılmasından petrol içerisindeki suyun emülsiyonu olmak üzere değişen

durumları içermektedir. Kalın ve yapışkan özellikteki bu yapı % 80 civarında su içermektedir. Emülsifikasyonların oluşumu ve stabilitesi temel olarak petrolün kimyasal kompozisyonu ile ilgilidir, vaks ve asfaltik maddelerle zenginleştirilmiştir. Fotokimyasal ve biyolojik süreçler aracılığı ile oluşturulan yüzey aktif maddeler de emülsiyon oluşumuna katılmaktadır. Emülsiyon oluşumu fiziksel olarak petrolün temizlenmesini zorlaştırmakta ve aynı zamanda doğal yollarla petrol biyodegradasyonu oranını azaltmaktadır (Zhu ve diğ., 2001).

2.2.2. Petrolün Biyodegradasyonu

Petrol biyodegradasyonu, özellikle uçucu olmayan petrol bileşenlerinin ayrışması ve çevreden tamamen kaldırılmasını içeren en önemli süreçlerden biridir. Petrol biyodegradasyonu kirliliğin meydana geldiği çevrenin karakteristiğinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Zhu ve diğ., 2001). Çevredeki petrol kirliliğinin ortadan kaldırılmasındaki en önemli mekanizma mikrobiyal degradasyondur (Zeinali ve diğ., 2007). Petrol biyodegradasyonunda etkin olan mikroorganizmalar genel olarak petrol hidrokarbonları ve ilişkili bileşikleridegrade edebilme yeteneğine sahiptirler. 200 ün üzerinde bakteri, maya ve mantar türünün, tek karbonlu metandan yapısında 40 ın üzerinde karbon atomu içeren bileşiklere kadar hidrokarbonları degrade edebildiği bilinmektedir (Zobell, 1973; Zhu ve diğ., 2001). Deniz ortamındaki petrol biyodegradasyonunda, bakteriler daha baskınken, tatlı sularda maya ve mantarlar da önemli rol oynayabilmektedir (Cooney, 1984; Floodgate, 1984; Zhu ve diğ., 2001). Son dönemde yapılan çalışmalar, petrol biyodegradasyonunda bitkilerin (Liste ve Alexander, 2000; Gao ve diğ., 2005; Merkl ve diğ., 2006; Tao ve diğ., 2006; Gao ve diğ., 2008; Khan ve diğ., 2008; Huesemann ve diğ., 2009; Mohsenzade ve diğ., 2009; Wu ve diğ., 2009) ve alglerin de (Hong ve diğ., 2008) rol oynayabileceğini göstermektedir. Petrol hidrokarbonlarının mikrobiyal degradasyona duyarlılığını aşağıdaki gibi gösterebiliriz:

n-alkanlar > dallanmış alkanlar > küçük molekül ağırlıklı aromatikler > halkalı alkanlar.

Ancak bu model genel bir olgu değildir. Farklı ham petrol türleri arasındaki kompozisyonel heterojenlik, petrol bileşenlerinin biyodegradasyon oranlarını büyük ölçüde etkilemektedir. Aynı petrol bileşenlerinin degradasyon oranları farklı petrol türleri için anlamlı derecede farklılık gösterebilir (Zhu ve diğ., 2001). Diğer taraftan

petrol biyodegradasyonu, ayrışma süreçleri, sıcaklık, pH, tuzluluk, oksijen ve besin durumu ile konsantrasyonu (N ve P) gibi önemli çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir (Zhu ve diğ., 2001).

2.2.2.1. Petrol Biyodegradasyonunun Değerlendirilmesi

Petrol biyodegradasyonunun değerlendirilmesi, kompleks ayrışma süreçleri ve kirlenmiş alanların heterojenliğinden dolayı oldukça zordur. Daha önceden de belirtildiği gibi fiziksel ve kimyasal ayrışma petrolün konsantrasyonunu ve içeriğini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Zhu ve diğ., 2001). Bu sebeple petrol biyodegradasyonunun değerlendirilmesinde, biyodegrade olmayan veya yavaş biyodegrade olan petrol bileşenleri (biyomarkırlar) kullanılmaktadır (Lee ve diğ., 1997; Zhu ve diğ., 2001).

Ham petrol biyodegradasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan biyomarkırlar; isoprenoidler [**pristan** (Pr) ve **fitan** (Ph)], steranlar ve hopanoidlerdir (Peters and Moldowan, 1993; Zhu ve diğ., 2001). İsooprenoidler pristan ve fitan, benzer kaynama noktasına sahip n-alkanlara (C₁₇, C₁₈) oranla, biyodegradasyona daha dirençlidirler. Bu yüzden, nC₁₇:pristan ve nC₁₈:fitan oranları biodegradasyon derecesinin yorumlanmasında kullanılmaktadır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin uzun zaman periyotlarında daha hızlı degrade oldukları görülmüştür (Prince, 1993; Bragg ve diğ., 1994; Zhu ve diğ., 2001). İsooprenoidlerin doğal koşullar altında degrade olmalarından dolayı, n-alkan:isoprenoid oranının biyodegradasyon çalışmalarının ilk aşamalarında kullanılması daha doğrudur (Prince ve diğ., 1994; Zhu ve diğ., 2001).

Biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan diğer biyomarkırlardan **Hopan**, prokaryotik ve ökaryotik membranların moleküler fosillerinden kökenlenmektedir (Peters and Moldowan, 1993; Zhu ve diğ., 2001) ve biyodegradasyona oldukça dirençlidir. Diğer taraftan biyodegradasyon **alkillenmiş PAH homolog serilerinin** degradasyon oranlarının saptanması ile de gösterilebilir (Zhu ve diğ., 2001).

2.3. FİTOREMEDİASYON

Gelişmekte olan bir teknoloji olarak fitoremediasyon, bitkiler ve onlarla ilişkili rizosferik mikroorganizmalar kullanarak toprak, sediment, yeraltı suları, yüzey suları ve hatta atmosferde bulunan kimyasal kirleticilerin, ortadan kaldırılması, parçalanması ya da biriktirilmesi sürecidir. Bitkiler petrol hidrokarbonları, pestisitler, metaller, radyonüklidler ve patlayıcılar gibi çoğu kirleticinin çevreden temizlenmesinde kullanılabilir. Fitoremediasyon için bitki türleri, ürettikleri degrade edici enzimlerine, büyüme oranları ve verimlerine, kök sistemlerinin derinliğine, kirleticileri biriktirme yeteneklerine ve yeraltı sularını evapotranspirasyon potansiyellerine göre seçilirler (Chappell, 1997).

Fitoremediasyon, mühendislik tabanlı iyileştirme (remediation) çalışmaları için uygun maliyetli, çevreci, alternatif ya da tamamlayıcı teknoloji olarak son 20 yıldır kabul görmektedir. Bitkiler kirleticileri stabilize etmede, ekstraksiyonda, parçalamada ya da buharlaştırmada kullanılabilir (Pilon-Smits, 2005).

Fitoremediasyon, organik ve inorganik kirleticilerin birçoğu için etkin bir yöntemdir. Çevrede bulunan organik kirleticilerin çoğu insan yapımıdır ve organizmalar için ksenobiyotiktir. Birçoğu toksik ve bazıları da karsinojendir. Organik kirleticiler, dökülmeler (petrol, çözücüler), askeri aktiviteler (patlayıcı, kimyasal silahlar), tarım ilaçları (pestisit, herbisit) ve sanayi atıkları (kimyasal, petrokimyasal) ile çevreye girebilmektedir. Organik kirleticiler özelliklerine bağlı olarak bitkilerin kök bölgesinde degrade edilebilir ya da bitki tarafından alınarak, bitki içinde degrade edilebilir, konjugasyonla ya vakuolde ya da hücre çeperi alanlarında tutulabilir veya buharlaştırılabilir (Pilon-Smits, 2005). Organik kirleticilerden, Trikloetilen (TCE, en sık rastlanılan yer altı suyu kirleticisi) (Newman ve diğ., 1997; Shang ve diğ., 2003) gibi organik çözücüler, atrazin (Burken ve Schnoor, 1997) gibi herbisitler, TNT (Hughes ve diğ., 1997) gibi patlayıcılar, petrol, gazolin, benzen, toluen ve PAH'lar (Aprill ve Sims, 1990; Olson ve diğ., 2003) gibi petrol hidrokarbonlar ve poliklorlu bifeniller (PCB) (Harms ve diğ., 2003) başarılı bir şekilde fitoremediasyonla ortamdan temizlenebilmektedir (Pilon-Smits, 2005).

Toprak, sediment ve sudaki kirleticilerin bitkiler tarafından hangi mekanizmalarla kullanıldığı araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Genel olarak fitoremediasyon mekanizmaları; Fitoekstraksiyon, fitovolatilizasyon, fitodegradasyon, rizodegradasyon, rizofiltrasyon, fitostabilizasyon ve hidroluk kontrol olmak üzere yedi başlık altında toplanabilir.

- **Fitoekstraksiyon (Phytoextraction):** Bitkilerin metaller ve diğer bileşikleri, topraktan kaldırarak yaprak ya da diğer bitkisel dokulara taşıma yeteneğini ifade eder. Yapılan uygulamadan sonra bitkiler uygulama alanından tamamen kaldırılmalı ya da hasat edilmelidir. Fitoekstraksiyon yönteminin kullanımı genellikle toprak ve sedimentteki metaller ya da diğer inorganik bileşiklerle sınırlıdır (U.S. EPA, 2000; Van Epps., 2006).
- **Fitovolatilizasyon (Phytovolatilization):** Fitovolatilizasyonda, kirletici bitki tarafından alındıktan sonra uçucu form ya da uçucu degradasyon ürünü olarak yapraklardan su buharıyla birlikte atmosfere bırakılmaktadır. Fitovolatilizasyon aynı zamanda yapraklara ulaşmadan önce kirleticinin difüzyonla gövde ya da diğer bitki kısımlarına hareketini gerektirmektedir (McCutcheon ve Schnoor; 2003). Fitovolatilizasyon toprak, su ya da sedimentte uçucu organik bileşiklerin ya da Se, Hg ve Ar gibi uçucu formda inorganik kimyasalların bulunması ile meydana gelebilir. (Van Epps., 2006).
- **Fitodegradasyon:** Fitodegradasyon bitki tarafından alınan kirleticinin metabolik süreç aracılığı ile parçalanması ya da kirleticinin bitki tarafından üretilen çeşitli bileşiklerle (enzimler gibi) dış ortamda parçalanmasıdır (U.S. EPA, 2000). Fitoekstraksiyon ve fitovolatilizasyonda olduğu gibi kirleticinin bitki tarafından alınımı kirleticinin çözünürlüğüne ve hidrofobitesine bağlıdır. Fitodegradasyon, toprak, sediment ve yeraltı sularında bulunan herbisitler, klorlu çözeltiler ve patlayıcılar gibi bazı organik kirleticilerin temizlenmesinde kullanılmıştır (Van Epps., 2006).
- **Fitostabilizasyon:** Fitostabilizasyon, kirleticinin kökler tarafından absorpsiyonu ve akümülasyonu, kökler üzerinde adsorpsiyonu ya da bitkinin kök bölgesinde biriktirilerek immobilizasyonu olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, bitki ve bitki kökleri kullanarak rüzgar ve su erozyonu, çözünme ve toprağa dağılması aracılığıyla kirleticilerin toprak içerisinde başka bir yere yayılmasının engellenmesi olarak ta tanımlanabilir (U.S. EPA, 2000). Fitostabilizasyon,

metaller ve diğer inorganik bileşiklerin toprak ve sedimentten temizlenmesinde başarı ile uygulanmaktadır (Van Epps., 2006).

- **Rizodegradasyon (Fitostimülasyon):** Rizodegradasyon, kirleticilerin bitki kök bölgesinde ya da rizosferindeki mikrobiyal aktivite sonucunda parçalanması olarak tanımlanmaktadır. Rizodegradasyon, bitki destekli parçalama, bitki destekli biyoremediasyon ya da gelişmiş rizosferik biyodegradasyon olarak ta bilinir (U.S. EPA, 2000). Rizodegradasyon rizosferde bulunan çok sayıda ve türde bakteriler ya da diğer mikroorganizmalar tarafından yapılmaktadır (McCutcheon ve Schnoor; 2003; Van Epps., 2006). Kök eksudatları bitki tarafından üretilen ve bitki köklerinden salınan bileşiklerdir. Rizosferde bulunan bu eksudatlar, şekerleri, aminoasitleri, organik asitleri, yağ asitlerini, steroller, nükleotidleri, büyüme faktörlerini, flavononları, enzimleri ve diğer bileşikleri içerirler (Schnoor ve diğ., 1995; U.S. EPA, 2000). Rizosferdeki mikrobiyal populasyon ve aktivite, kök eksudatlarının varlığında daha da artabilir ve böylece organik kirleticilerin biyodegradasyonlarının da hızlanmasını sağlayabilir. Rizodegradasyonla, biyodegradasyona uğrayan organik bileşiklere petrol hidrokarbonları, PAH lar, klorlu çözücüler, pestisitler, PCB ler, benzen, toluen, etilbenzen ve ksilenler gibi organik bileşikler verebiliriz (Van Epps., 2006).
- **Rizofiltrasyon:** Rizofiltrasyon, abiyotik ve biyotik süreçler tarafından bitki kök bölgesinin çevrelediği çözültide bulunan kirleticilerin, bitki kökleri üzerinde adsorbsiyonu veya birikmesi ya da bitki köklerinin içine adsorbsiyonu olarak tanımlanır (U.S. EPA, 2000). Rizofiltrasyon sürecinde bitki tarafından alınmış olan kirletici bitkinin hasat edilmesi ile ortamdaki kaldırılmış olur. Ancak ortamdaki kaldırılan bu kirletici bitki kök sisteminde çözünmüş ve konsantre olarak bulunmaktadır. Daha sonra kirleticiler bitkiden fiziksel olarak kaldırılır. Rizofiltrasyon daha çok yer altı suları, yüzey suları ya da atık sularda bulunan metallerin ya da diğer inorganik bileşiklerin temizlenmesinde kullanılır (Van Epps., 2006).
- **Hidrolik Kontrol:** Hidrolik kontrol bitkiler kullanarak yer altı sularının alınımı ve tüketimi ile kirleticilerin birikmesinin ve yayılmasının önlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Hidrolik kontrolde kullanılan bitkiler yüksek hacimlerdeki suları transpirasyonla tükettikleri için buldukları bölgede su dengesi

yaratmakta ve bu şekilde artan transpirasyonla kirleticilerin bölgeden göçünü engellemektedirler (McCutcheon ve Schnoor; 2003; Van Epps., 2006).

Fitoremediasyon mekanizmalarını Tablo 2.2 deki gibi özetleyebiliriz.

Tablo 2. 2: Fitoremediasyon mekanizmaları (U.S. EPA, 2000; Pivetz, 2001).

Mekanizma	Amaç	Ortam	Kirleticiler
Fitoekstraksiyon	Kirleticinin ekstraksiyonu ve toplanması	Toprak, sediment, çamurlaşmış atıklar	Metaller, radyonüklidler
Fitovolatilizasyon	Kirleticinin ortamdaki ekstraksiyonu ve atmosfere bırakılması	Yeraltı suyu, toprak, sediment, çamurlaşmış atıklar	Uçucu organikler, klorlu çözücüler, bazı inorganik bileşikler (Se, Hg and As)
Fitodegradasyon	Kirleticinin yok edilmesi	Toprak, sediment, yeraltı suyu, yüzey suları	Organik bileşikler, fenoller, herbisitler.
Fitostabilizasyon	Kirleticinin biriktirilmesi	Toprak, sediment, çamurlaşmış atıklar	Metaller
Rizodegradasyon	Kirleticinin yok edilmesi	Toprak, sediment, yeraltı suyu, yüzey suları	Organik bileşikler (TPH, PAH, pestisitler, klorlu çözücüler, PCB ler)
Rizofiltrasyon	Kirleticinin ekstraksiyonu ve toplanması	Yeraltı suyu, yüzey suyu	Metaller, radyonüklidler
Hidrolik Kontrol	Kirleticinin degradasyonu ve biriktirilmesi	Yeraltı suyu, yüzey suyu	Suda çözünebilen organikler ve inorganikler

2.3.1. Fitoremediasyonu Etkileyen Biyolojik Süreçler

Fitoremediasyonla kirleticiler büyük ölçüde ortamdaki uzaklaştırılmasına rağmen, çoğu zaman bu işlemin altında yatan biyolojik mekanizma tamamen bilinmemektedir. Fitoremediasyon teknolojilerinin verimliliğini artırabilmek için biyolojik süreçler hakkında daha fazla bilgi edinmemiz gerekmektedir. Biyolojik süreçler; bitki-mikroorganizma etkileşimleri ve rizosferik süreçleri, bitkiye alınma, taşınma ve tolerans mekanizmalarını, iletim ve depolamadaki bitki çelatörlerini içermektedir.

2.3.1.1. Kirleticinin Biyoyararlanması

Kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılabilmesi için öncelikle bitkiler ve ilişkili oldukları mikroorganizmaların kirleticilerle temas halinde olması ve onları etkilemesi gerekmektedir. Bu yüzden bir kirleticinin biyolojik olarak kullanımı o kirleticinin ortamdaki uzaklaştırılması için önem taşımaktadır. Kirleticinin biyoyararlanması, kirleticinin kimyasal özelliğine, toprak yapısına, çevresel koşullara ve biyolojik aktiviteye bağlıdır. Küçük partikül yapısına sahip topraklar (killi), kumlu topraklara göre daha fazla su tutarlar ve özellikle katyonlar (Katyon Değişim Kapasitesi: KDK) daha fazla bağlayıcı alanlara sahiptir (Taiz ve Zeiger, 2002; Pilon-Smits, 2005). Topraktaki organik yapının (humus) konsantrasyonu KDK ile pozitif korelasyon gösterdiği kadar, hidrofobik organik kirleticileri bağlama kapasitesi ile de pozitif korelasyon gösterir. Çünkü, humus temel olarak ölü bitki materyalinden oluşmuştur. Bitki hücre çeperleri negatif yüklüdür ve katyonları bağlar. Bunun yanı sıra lignin de hidrofobik bileşikler bağlar (Burken, 2003; Pilon-Smits, 2005).

Bir kirleticinin, hidrofobisite ve buharlaşma (volatilite) olmak üzere iki önemli kimyasal özelliği o kirleticinin topraktaki hareketini etkilemektedir. Hidrofobisite genellikle oktanol:su oransal katsayısı ya da $\log K_{ow}$ (oktanol:su dağıtım katsayısı, kirleticinin hidrofobisitesi için ölçü birimi) olarak tanımlanır (Trapp ve McFarlane, 1995). Yüksek $\log K_{ow}$ değeri yüksek hidrofobisiteye karşılık gelmektedir. PCB ler, PAH lar ve diğer hidrokarbonlar gibi son derece hidrofobik moleküller ($\log K_{ow} > 3$) toprağın organik yapısına sıkıca bağlıdırlar ve toprak gözeneklerindeki sularda çözünmezler. Biyoyararlanımdaki bu eksiklikleri fitoremediasyonda kullanımlarını engellediği için bu moleküller kalıcı kirleticiler olarak sınıflandırılır. Sudaki çözünürlüğü $\log K_{ow} < 3$ değerinden daha düşük organik bileşikler toprak gözeneklerindeki suda $\log K_{ow}$ değerlerinin tersi yönde çözünme eğilimi taşımaktadırlar (Pilon-Smits, 2005).

Kirleticinin uçuculuğu, Henry kanunu (H_i) olarak tanımlanır ve bir bileşiğin suya göre havadaki dağılıma eğiliminin bir ölçüsüdür (Davis ve diğ., 2003). $H_i > 10^{-4}$ değerinden büyük değere sahip kirleticiler toprak partikülleri arasındaki hava boşluklarında hareket etme (mobilité) eğilimi taşırken, $H_i < 10^{-6}$ olanlar çoğunlukla su içerisinde hareket eğilimindedir. H_i değeri 10^{-6} ile 10^{-4} arasında olan bileşikler ise hem havada hem de suda hareket edebilirler. Hem suda hem de havada hareket edebilen organik kirleticiler

pasif olarak bitkiye difüze olabilir. Suda hareketli organikler fitodegradasyonla parçalanabilir ya da inaktif duruma getirilirken, uçucu organikler bitkiler tarafından kimyasal modifikasyona uğratılmadan hızlı bir şekilde buharlaştırılabilir (Bromilow ve Chamberlain, 1995; Pilon-Smits, 2005).

Kirleticilerin biyoyararlanımını etkileyen süreçlerin anlaşılması fitoramediasyonun etkin bir şekilde optimize edilmesine yardım edebilir. Topraktaki iyileştirmeler metal katyonların bitkiler tarafından alınımını daha çekici kılabilir. Örneğin, sitrat ya da malat gibi doğal organik asitlerin toprağa eklenmesi pH yı düşürecek ve toprak partiküllerindeki Cd, Pb ve U gibi çelat metallerin bitkiler tarafından alınımını daha olanaklı hale getirecektir. Diğer taraftan organik madde eklenmesi hidrofobik organiklerin biyoyararlanımını düşürürken, yüzey aktif maddelerin ya da yüzey temizleyicilerin (sabun gibi) eklenmesi kirleticinin biyoyararlanımını artırmaktadır. Organik bileşikler farklı yüklerde az ya da çok protonlanmış formlarda olabildikleri için, toprak pH nın değiştirilmesi kirleticinin çözünürlüğünü ve böylece bitkiye alınımını da etkilemektedir (Pilon-Smits, 2005).

Sonuç olarak, bitki tarafından kimyasal alınımını ve dağıtımını etkileyen faktörlerden bazılarını şu şekilde sıralayabiliriz (Susarla ve diğ., 2002);

1. Bileşiğin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Sudaki çözünürlüğü, molekül ağırlığı, oktanol:su katsayısı, buhar basıncı gibi)
2. Çevresel özellikler (sıcaklık, pH, organik yapı, toprak nem içeriği gibi)
3. Bitki özellikleri (kök sistemi ve enzim tipleri gibi).

2.3.1.2.Bitki Mikroorganizma Etkileşimleri

Rizosferik Mikroorganizmaların Rolü

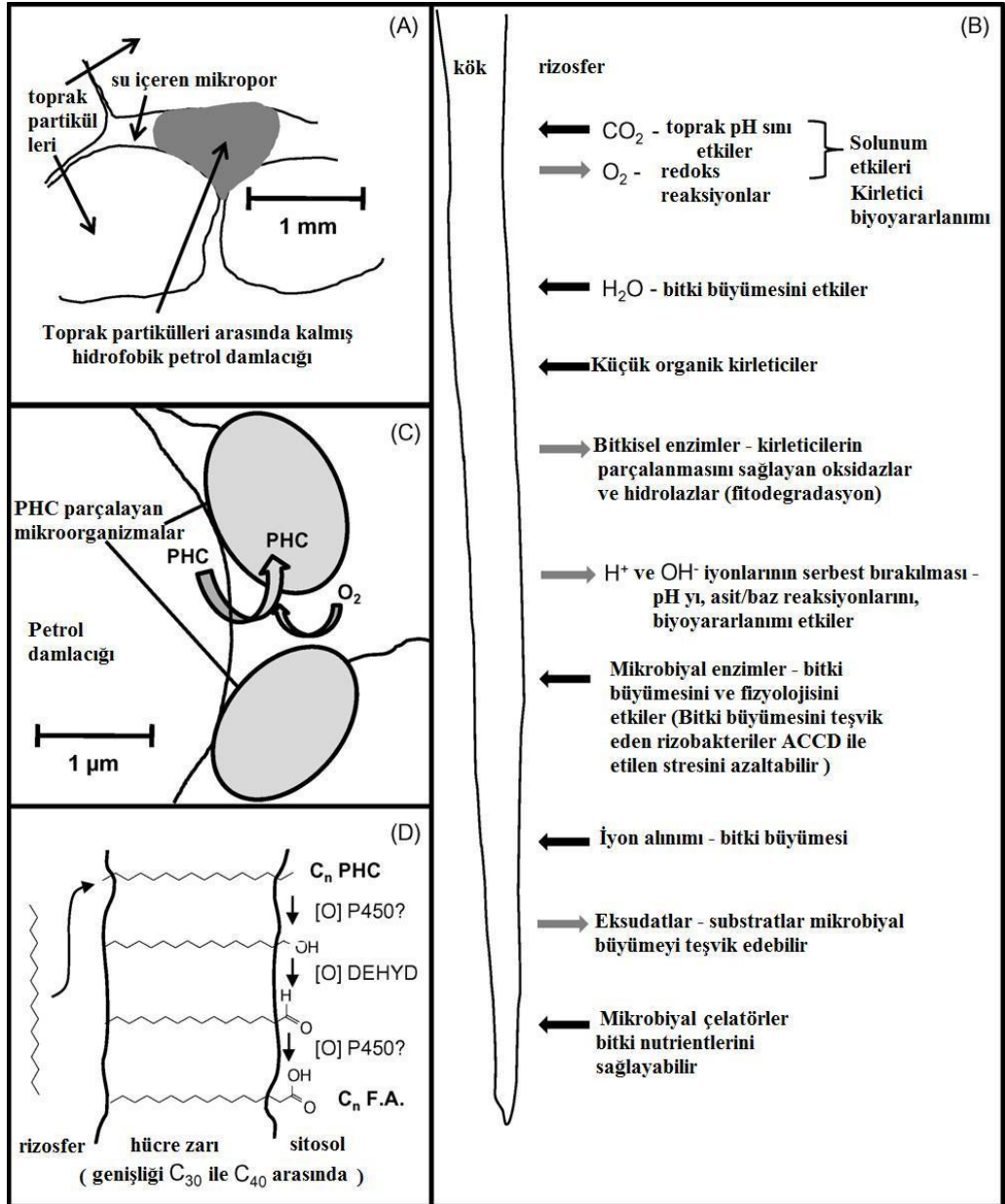
Rizosfer kökün yaklaşık olarak 1 mm lik alanına kadar uzanır ve kökün etkisi altındadır. Bitkiler tarafından serbest bırakılan çeşitli yapıdaki fotosentetik kökenli organik bileşikler rizosferde bulunan heterotrofik mantar ve bakteriler tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabilir (Bowen ve Rovira, 1991). Bitki köklerinin salgıladıkları basit şekerler, amino asitler, enzimler, alifatikler ve aromatikler gibi bileşikler rizosferdeki spesifik mikroorganizmaların büyümesini teşvik etmektedir (Macek ve diğ., 2000). Buna karşılık olarak bazı mikroorganizmalar ürettikleri bitki büyüme düzenleyicileri aracılığıyla kök büyümesini teşvik edebilmekte, su ve mineral madde

alınımını artırmakta ve diğer NO patojenik toprak mikroorganizmalarının büyümesini inhibe etmektedir (Kapulnik, 1996; Pilon-Smits, 2005). Rizosferde bitki ve mikroorganizma arasında meydana gelen etkileşimler karmaşıktır ve bazı durumlarda her iki organizma içinde karşılıklı yarara dayalı bir ilişki geliştirmiştir. Bu mutualistik ilişki bitki varlığında kirleticilerin daha hızlı bir şekilde parçalanmasından sorumludur (Hedge ve Fletcher, 1996; Macek ve diğ., 2000). Rizosfer remediasyonu bitki ve/veya mikroorganizmalar aracılığıyla meydana gelen aktif süreçlerin bir sonucu olabilir. Bu süreçler, kirleticinin biyoyararlanımını, alınımını ve degradasyonunu etkileyebilir. Kirletici biyoyararlanımı ise çeşitli bitkisel ve mikrobiyal aktivitelerden etkilenebilir. Bazı bakterilerin salgıladıkları biyoyüzeytemizleyiciler (rhamnolipidler gibi) hidrofobik kirleticileri suda daha çözünür hale getirebilir (Volkering ve diğ., 1998; Pilon-Smits, 2005). Bitki eksudatları ya da lizatlarının içerdiği lipofilik bileşikler, kirleticilerin sudaki çözünürlüğünü artırabilir ya da biyoyüzeytemizleyici üreten mikroorganizma popülasyonlarını teşvik edebilir (Siciliano ve Germida, 1998). Bu rizosferik etkiye ek olarak, bitkiler birçok organik atığı kökleri aracılığıyla topraktan ya da sudan pasif olarak alabilirler. Ayrıca bitkiler havadaki organik bileşikleri bağlama yeteneğine de sahiptirler. Rizosferde bulunan organik kirleticiler bitki kökleri tarafından salınan enzimler ya da mikrobiyal degradasyonun fitostimülasyonu ile degrade edilebilir (Pilon-Smits, 2005). Rizosferde normal toprak ortamına oranla daha hızlı bir şekilde degrade olabilen organik bileşiklere; polisiklik aromatik hidrokarbonları, total petrol hidrokarbonlarını (Nichols ve diğ., 1997; Pradhan ve diğ., 1998), klorlu pestisitleri, poliklorlu bifeniller (PCB) gibi diğer klorlu bileşikleri (Macková ve diğ., 1998), patlayıcıları (TNT, DNT), organofosfat insektisitleri ve yüzey aktif temizleyicilerini (deterjanlar) verebiliriz (Macek ve diğ., 2000), (Şekil 2.3). Bitkiler tarafından mikrobiyal degradasyonun stimüle edildiği süreçler;

1. Genel rizosfer etkisi: Mikrobiyal yoğunluğu artırmak için bitkiler tarafından rizosfere salınan karbonlu bileşikler.
2. Bitki kökleri tarafından salınan sekonder bitki bileşikleri: Bu bileşikler ya organik bileşiklerin degradasyonunda yer alan mikrobiyal genleri teşvik edebilir ya da mikrobiyal degradasyonu kolaylaştırmak amacıyla ko-metabolit olarak rol oynayabilirler.

olarak gösterilebilir (Fletcher ve Hegde, 1995; Leigh ve diğ., 2002; Pilon-Smits, 2005).

Bitki-mikroorganizma etkileşimleri hakkında daha fazla bilgi sahibi olunması, daha verimli fitoremediasyon stratejilerinin tasarlanması ya da daha etkili bitki-mikroorganizma konsorsiyumlarının oluşturulması açısından oldukça önem taşımaktadır.



Şekil 2. 3: Petrol hidrokarbonlarının (PHC) rizoremediasyonu. (A) PHC lerin biyoyararlanımı (bioavailability): hidrofobik petrol damlacıkları toprak partiküllerine bağlanabilir ya da fiziksel olarak mikroporlar içinde sıkışıp kalabilir. Bundan dolayı toprakta biyolojik olarak kolaylıkla ulaşılabilir durumda değildirler. Biyoyararlanım mikroçevrede, kimyasal, biyokimyasal, fiziksel ve çevresel parametreler arasındaki kompleks ilişkilere bağlıdır. (B) Rizoremediasyonu etkileyen genel süreçler: bitki kökleri, kök yüzeylerinde ve rizosferde mikrobiyal büyümeyi destekler. Kökler toprak içerisinde kanallar açarak O₂ ve H₂O nun hareketine izin verdikleri gibi toprak içerisinde sıkışıp kalmış geniş bir yelpazedeki kirlenicileri mikroorganizmalar için ulaşılabilir duruma da getirirler. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler; 1-aminosiklopropan-1-karboksilat deaminaz (ACCD). (C) Aerobik PHC degradasyonu: PHC-su arayüzeyinde (interface) mikroorganizmalar adhezyon yöntemlerini ve/veya biyoyüzey temizleyicileri kullanırlar. Mikrobiyal yüzey zara bağlı oksijenazları içerir ve degradasyonda ilk basamak olarak bunu kullanır. Degradatif yolun ilk basamağı yağ asidi analoglarını oluşturmak için PHC içerisindeki iki O atomunun birleştirilmesidir. Bu mikroorganizmalar daha sonra büyür ve yüzeyde sayılarını artırır. Bir mikroorganizma petrolün sadece bir kısmını parçalayabilir (kompleks karışım içerisindeki bazı bileşikler gibi) ve teorik olarak 1 g PHC nin mikrobiyal dönüşümü için 150 mg N ve 30 mg P gerekmektedir. Petrol damlacığı parçalandıkça farklı mikroorganizmalar da degradasyon sürecine devam edecektir. (D) PHC nin yağ asidine dönüşümü için olası mikrobiyal oksijenasyon yolu: sitokrom P450 (P450), Dehidrogenaz (DEHYD), Yağ asidi (F.A.). (Karen ve diğ., 2009).

2.3.1.3. Kirleticilerin Bitkiye Alınımı

Kirleticilerin bitki kökleri tarafından alınımı organik ve inorganik bileşikler için farklılıklar göstermektedir. Organik kirleticiler genellikle insan yapımı olduğundan dolayı bitkiler için ksenobiyotiktir ve bunun sonucu olarak bu bileşiklerin bitki zarlarında taşıyıcıları yoktur. Bu yüzden organik kirleticiler kimyasal özelliklerine bağlı olarak basit difüzyonla bitkiye girme eğilimindedir. Organik kirleticilerin bitkiye alınımında en önemli özelliklerinden birisi daha önceden de bahsedildiği gibi hidrofobitesidir (Briggs ve diğ., 1982; Trapp ve McFarlane, 1995). $\log K_{ow}$ değeri 0,5 ile 3 arasında olan organik bileşikler, yeterli hidrofobiktirler (hyrophobic enough), zarların lipid bilayerlerinden direkt olarak geçebilirler ve suda çözünebildiklerinden dolayı da hücre içine girebilirler. $\log K_{ow} < 0,5$ olan organik bileşikler oldukça hidrofilitirler, hücre zarlarından geçemezler ve bu yüzden bitkiye alınamazlar. $\log K_{ow} > 3$ olan organik bileşikler oldukça hidrofobiktirler, bitkinin periferinde hücre çeperi ile zarına yapışmış durumdadır ve hücre sıvısına giremezler. Organik bileşiklerin bitkiye alınımı ve hareketi biyolojik süreçten çok fiziksel olduğu için bitki türlerindeki alınımı tahmin edilebilmekte ve modellenmesi kolaylıkla yapılabilmektedir (Davis ve diğ., 2003). Bir çözeltiden bitki köklerinin içine organik kirleticilerin hareket etme eğilimi kök konsantrasyon faktörü olarak tanımlanmaktadır (RCF: kökteki konsantrasyon / çözeltideki konsantrasyon).

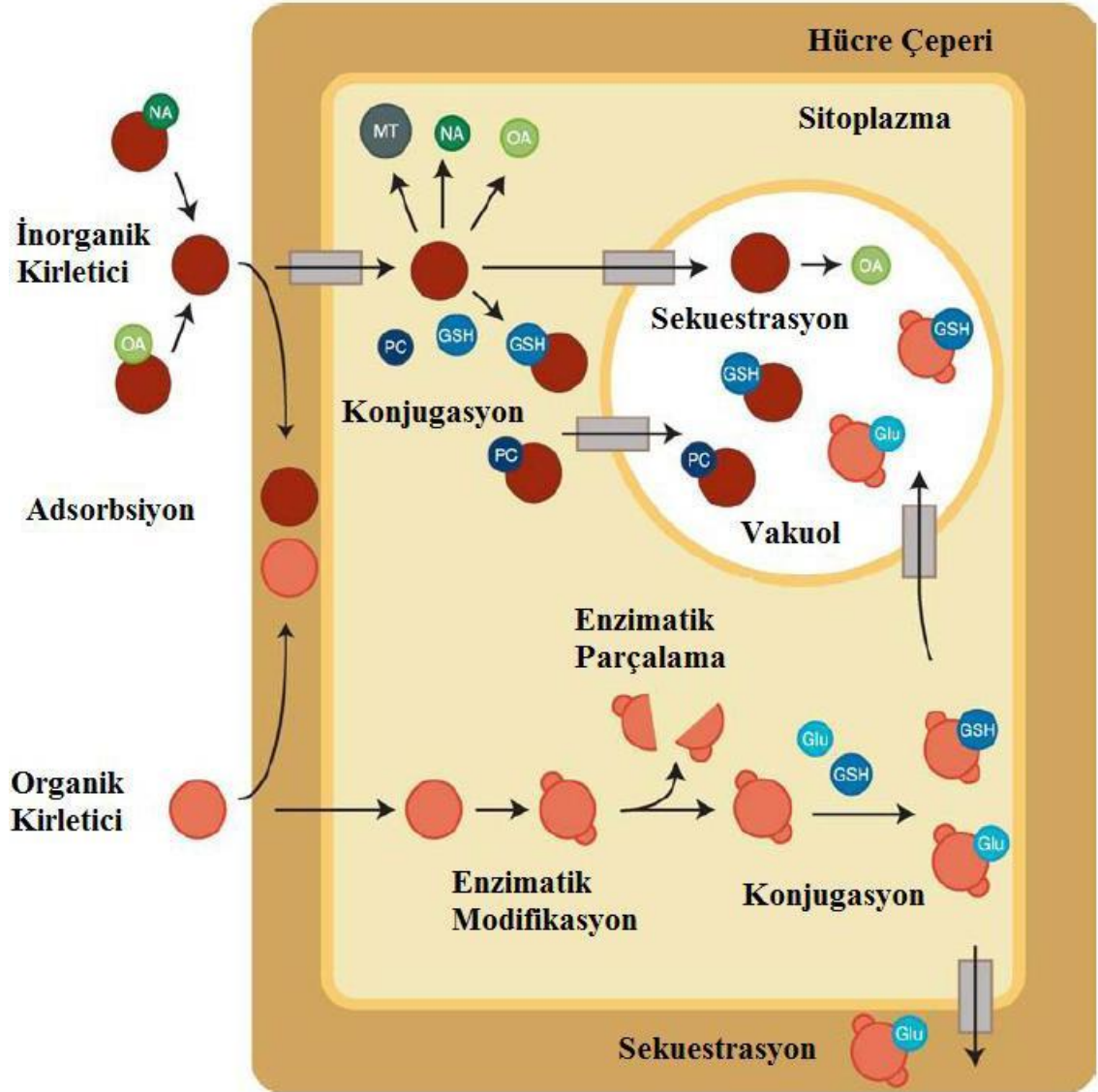
Buna karşılık olarak, inorganik bileşikler biyolojik süreçler tarafından taşıyıcı proteinler aracılığıyla yapılmaktadır. Bu taşıyıcılar doğal olarak ortaya çıkmışlardır. Çünkü inorganik kirleticiler ya bitkiler tarafından nutrient olarak kullanılırlar (Nitrat, fosfat, bakır, mangan, çinko gibi) ya da bitki mineral maddelerine kimyasal olarak benzer yapıda oldukları için yanlışlıkla (inadvertently) bitkiye alınırlar. Örneğin, arsenat fosfat taşıyıcıları tarafından, selenat ise sülfat taşıyıcıları tarafından bitkiye alınmaktadır (Abedin ve diğ., 2002). İnorganikler genellikle iyon formundadırlar ve membran taşıyıcı proteinlerinin yardımı olmadan zarlardan geçemezler (Pilon-Smits, 2005).

İnorganik kirleticiler dokuda biriktikleri zaman genellikle toksik etki yaparlar. Bu etkiyi hem direkt hücre yapısını hasara uğratarak (redoks aktivitelerinden dolayı oksidatif stres yaratarak) ve hem de dolaylı olarak esansiyel elementlerle yer değiştirerek yaparlar.

Organik bileşikler ise bitkiler için daha az toksik olma eğilimindedirler, çünkü bu bileşikler kolayca birikmezler ve daha az reaktiftirler (Pilon-Smits, 2005).

Köklerde Çelat Oluşumu

Daha öncede bahsedildiği gibi bitkiler, kirleticinin çözünürlüğünü ve bitkiye alınımını etkileyen bileşikleri köklerinden serbest bırakabilir. Bitki dokuları içindeki çelatör bileşikler, organik ve inorganik bileşiklerin taşınımı, sekuestrasyonu ve toleransında rol oynayabilir (Ross, 1994). Fitosideroforlar, demir (Fe) ve belki de çimenlerdeki (grasses) diğer metallerin alınımını kolaylaştıran çelatörlerdir. Biyosentetik olarak nikotianaminden (NA) sentezlenmişlerdir (Higuchi ve diğ., 1999). NA da metallerin taşınımında rol alabilir (Stephan ve diğ., 1996). Organik asitler (Sitrata, malat, histidin) sadece metallerin köklere alınımını kolaylaştırmakla kalmayıp aynı zamanda metallerin taşınım, sekuestrasyon ve toleransında da rol oynamaktadır (Küpper ve diğ., 2004;). Metaller tiolce zengin peptidler, glutatyon (GSH) ve fitokelatin (PCs) ya da Sistein (Cys)' ce zengin metalohiyonin proteinler (MT) le de bağlı olabilir (Cobbett ve Goldsbrough, 2000). Köklerdeki çelatlı metaller vakuolde depolanabilir ya da ksilem aracılığıyla gövdeye taşınabilir. Organik bileşikler ise konjuge olabilir, depo edilebilir ya da enzimatik olarak parçalanabilirler. Bu süreçler Şekil 2.4 de şematize edilmiştir (Pilon-Smits, 2005).



Şekil 2. 4: Bitki hücrelerinde inorganik ve organik kirlenicilerin tolerans mekanizmaları.

Detoksifikasyon genellikle konjugasyonu takiben apoplast ve vakuolde kirlenicinin daha az zararlı hale getirildiği aktif sekuestrasyonu içerir. Çelatörler GSH: glutasyon, Glu: glukoz, MT: metalohiyoninler, NA: nikotianamin, OA: organik asitler, PC: fitokelatınler kısaltmaları olarak aktif taşıyıcılar ise kutu içindeki ok işaretleriyle gösterilmiştir (Pilon-Smits, 2005).

2.3.1.4. Taşınma

Kökten gövdeye taşınım ilk olarak kök simplastından, ksilem apoplastına membran taşınımı gerektirmektedir. Kök endodermisindeki Kaspary Şeridi (hücre çeperinde bulunan geçirgen olmayan suberin tabaka) toprak çözeltisinden ya da kök apoplastından kök ksilemine suda çözülmüş maddelerin geçişini engellemektedir (Taiz ve Zieger, 2002). Organik kirleniciler kök simplastı ve ksilem apoplastı arasındaki zardan basit difüzyonla geçer. Transpirasyon akımı konsantrasyon faktörü (TSCF), ksilem sıvısı içindeki bir bileşiğin konsantrasyonunun dış solusyondaki konsantrasyonuna oranı

olarak tanımlanmaktadır ve bitkinin toprak üstü kısımlarına alınımının ölçüsüdür. Bitki taşınımının ölçülmesi için kullanılır. Organik kirleticinin ksileme girişi, bitki içine alınmalarında olduğu gibi membranlar üzerindeki benzer pasif taşınımına bağlıdır. Böylece, organik bileşikler için TSCF bileşiğin hidrofobisitesi (RCF) ile benzer korelasyon göstermektedir (Trapp ve McFarlane, 1995; Pilon-Smits, 2005).

Yapraklarda Çelat Oluşumu

Yaprak ksileminden yaprak hücrelerine madde alınımı bir diğer membran taşınım basamağını içermektedir. İnorganik bileşikler spesifik membran taşıyıcı proteinler tarafından alınırlar. Organik bileşikler gövde ksileminden yaprak simplastına basit difüzyonla geçerler. Kirleticiler yaprak simplastına girdikten sonra belli doku ya da hücre alanlara taşınabilir. Toksik kirleticiler genellikle temel hücresel süreçler ile daha az zararlı olabildikleri yerlerde sekuestrasyona uğratılırlar. Kirleticiler hücresel düzeyde genellikle vakuol ya da hücre çeperinde biriktirilirken (Cobbett ve Goldsbrough, 2000; Burken, 2003), doku seviyesinde ise epidermis ve trikomlarda biriktirebilirler (Hale ve diğ., 2001; Pilon-Smits, 2005).

Kirleticilerin dokularda sekuestre edilmeleri genellikle çelatörler ya da konjugat formlarıyla bağlanmaları ile olur (Şekil 2.4). Metal sekuestrasyonuna katılan çelatörlere tripeptid GSH (γ -glu-cys-gly) ve oligomerlerini (PC'ler) verebiliriz. GSH ya da PC'ler ile çelat oluşumundan sonra ABC – tip taşıyıcı, metal – çelat kompleksini aktif olarak vakuole taşır. Bu kompleks vakuolde sülfidlerle daha da kompleks bir duruma getirilir (Lu ve diğ., 1997). Malat ve sitrat gibi organik asitler de büyük olasılıkla vakuolde bulunan metal çelatörlerdir (Küpper ve diğ., 2004). Ferritin kloroplastlardaki bir demir (Fe) çelatörüdür (Theil, 1987; Pilon-Smits, 2005).

GSH ile konjugasyon organik kirleticilerin toleransı ve sekuestrasyonunda da rol oynamaktadır. Farklı substrat spesifitesindeki GSTs (GSH-S-transferazlar) ailesi GSH nin sitosolde organik bileşiklerle konjugasyonuna aracılık etmektedir (Neuefeind ve diğ., 1997; Hatton ve diğ., 1996). Glutasyon S-konjugatları vakuol ya da apoplasta (ATP-bağlı membran pompalarıyla) aktif olarak taşınırlar (Sandermann, 1994; Marrs ve diğ., 1995; Wolf ve diğ., 1996). Bitkilerde organik bileşikler için alternatif bir konjugasyon-sekuestrasyon mekanizması, organik bileşiklerin glukoz ya da malonil-

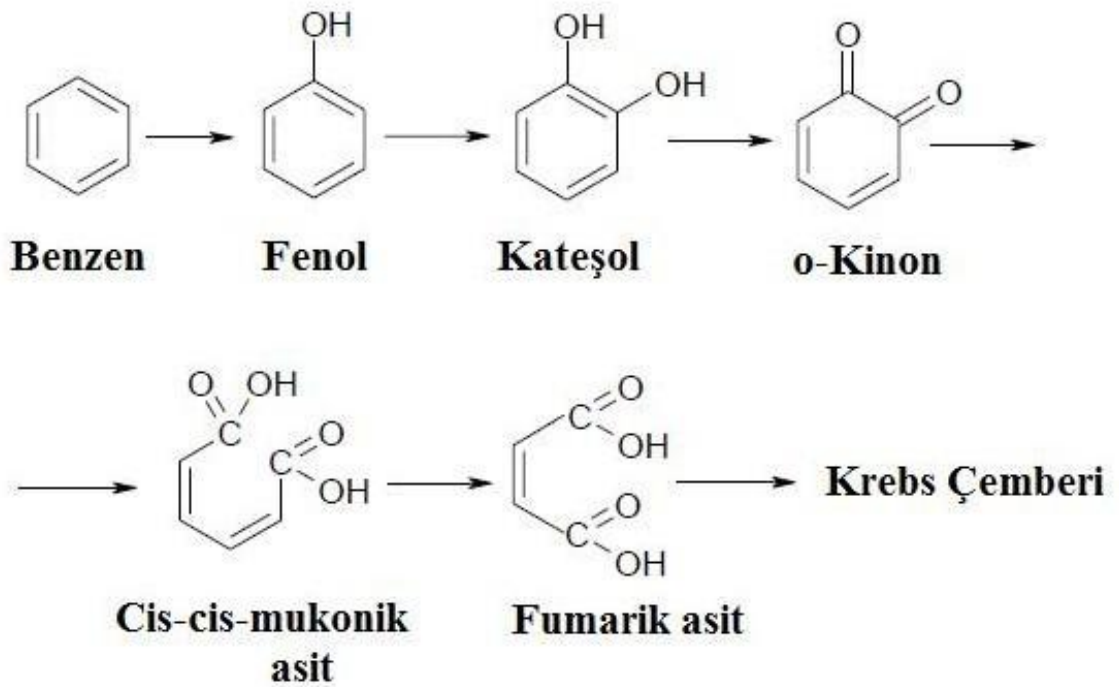
gruplarıyla birleşmesini ve bunu takiben oluşan konjugatların vakuol ya da apoplasta taşınımını içermektedir (Coleman ve diğ., 1997). Bu konjugasyon aşamaları glukoziltransferazlar ya da maloniltransferazlar tarafından organize edilir (Burken, 2003; Pilon-Smits, 2005).

Organik bileşiğin konjuge olabilmesi için kimyasal modifikasyona gereksinim vardır. Kimyasal modifikasyonla organik bileşikte konjugasyon için uygun yan gruplar oluşturulur. Bu modifikasyon reaksiyonları oksitleyici (yükseltgeyici) ya da indirgeyici olabilir. Örnek olarak, sitokrom P450 mono-oksigenaz oksidatif bir transformasyonu katalizler. Bunu da atrazin gibi organik bir moleküldeki oksijenin bir oksijen atomu arasına girip hidroksil yan grubu oluşturarak yapar (Coleman ve diğ., 1997). Nitroredüktazlar indirgeyici transformasyon yapan enzimlere örnek olarak verilebilir. Bu enzim grubu ise TNT gibi organik bileşiklerdeki nitro gruplarını amino gruplarına dönüştürmektedir (McCutcheon ve diğ., 2003). Organik kirleticilerin modifikasyonlarına aracılık eden diğer enzimlere örnek olarak dioksigenazları, peroksidazları, peroksigenazları ve karboksilesterazları verebiliriz (Burken, 2003). Böylece organik kirleticilerin akümüasyonu, kimyasal modifikasyon, konjugasyon ve sekuestrasyon olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.4). Enzimler ve taşıyıcıların bazı doğal fonksiyonları; flavonoidler, alkaloidler, bitki hormonları ve abiyotik streslere karşı savunma gibi doğal bitkisel bileşiklerin biyosentezini ve taşınımını içermektedir (Marrs, 1996; Pilon-Smits, 2005).

2.3.1.5. Degradasyon

Degradasyonla fitoremediasyon sadece organik bileşikler için geçerlidir. İnorganik elementler parçalanamazlar ve sadece ya stabilize edilebilirler ya taşınırlar ya da depo edilirler. Fitodegradasyonda bitki enzimleri organik kirleticiler üzerinde etkindirler ve onları katabolize ederek ya tamamen inorganik bileşiklere mineralize eder (CO_2 , H_2O ve Cl_2 gibi) ya da kısmen degrade ederek bitki içinde depo edilebilecekleri ara bir forma dönüştürürler (McCutcheon ve Schnoor, 2003; Pilon-Smits, 2005), (Şekil 2.5). Organik bileşiklerin enzimatik degradasyonu kök, gövde ve yaprak gibi bitkisel dokularda meydana gelebileceği gibi bazı durumlarda bitkinin içerdiği endofitik mikroorganizmalar tarafından da yapılabilir (Barac ve diğ., 2004; McGuinness ve Dowling, 2009). Bitkisel dokularda akümüasyondan sorumlu olan aynı sınıfa ait

enzimlerden bazıları fitodegradasyonda da görev almaktadır. Modifiye edici bu enzimler organik bileşiklerde yan gruplar oluşturarak bileşiğin çözünürlüğünü artırmakta ve konjugasyona olanak sağlayarak fitodegradasyonun ilk aşamalarında önemli bir rol oynamaktadırlar. Fitodegradasyonda rol alan enzim sınıflarına örnek olarak, dehalogenazları, mono- ve dioksijenazları, peroksidazları, peroksijenazları, karboksilesterazları, lakkazları, nitrilazları, fosfatazları ve nitroredüktazları verebiliriz (Wolfe ve Hoehamer, 2003; Pilon-Smits, 2005), (Tablo 2.3).



Şekil 2. 5: Bitki hücrelerinde benzenin oksidatif degradasyonu (Kvesitadze ve diğ., 2009).

Tablo 2. 3: Organik bileşiklerin degradasyonunda rol alan bitkisel ve mikrobiyal enzimler. Bakteriler (B), mantarlar (M) olarak kısaltılmıştır (Gerhardt ve diğ., 2009).

Enzim Ailesi	Katalitik olay	Örnekler
Alınım, taşınma, sekuestrasyon ve degradasyondan sorumlu çeşitli bitkisel enzimler	Genel Alınım ve degradasyon	Bütün bitkiler
Dehalogenaz	Halojenli alifatik ve aromatik hidrokarbonlardan florin hidrolizi	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (B) <i>Populus</i> spp. <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (B)
Lakkaz	Çeşitli aromatik bileşiklerin degradasyonu	<i>Medicago sativa</i> <i>Trametes versicolor</i> (M) <i>Coriolopsis polyzona</i> (M)
Dioksigenaz	Çeşitli aromatik bileşiklerin degradasyonu	<i>Pseudomonas</i> sp. (B) <i>Mycobacterium</i> sp. (B)
Peroksidaz	Çeşitli aromatik bileşiklerin degradasyonu; alifatik hidrokarbonların indirgeyici dehalojenasyonu	<i>Armoracia rusticana</i> <i>Phanerochaete chrysosporidium</i> (M) <i>Phanerochaete laevis</i> (M) <i>Medicago sativa</i>
Nitrilaz	Aromatik ve alifatik nitrillerden siyanür gruplarının ayrılması	<i>Salix</i> spp. <i>Aspergillus niger</i> (M)
Nitroredüktaz	Nitroaromatik bileşiklerin nitro gruplarına indirgenmesi; Halka yapısından N nin kaldırılması	<i>Comamonas</i> sp. (B) <i>Pseudomonas putida</i> (B) <i>Populus</i> spp.
Fosfataz	Organofosfatlardan fosfat gruplarının ayrılması	<i>Spirodela polyrhiza</i>
Sitokrom P450 mono-oksigenaz	Aromatik ve alifatik hidrokarbonların hidroksilasyonu	Aerobik bakterilerin çoğu, mantarların ve bitkilerin hepsi

Ksenobiyotiklerin Metabolizması

Organik kirleticilerin birçoğunun hidrofobisitesi oldukça yüksektir. PAH lar, PCB ler ve dioksinler gibi çoğu organik bileşiğin log K_{ow} değerleri 4 ün üzerindedir. Sudaki çözünürlüklerinin düşük olması ve yüksek kimyasal stabiliteleri bu kirleticilerin çevrede neden uzun süre bozulmadan kaldıklarını açıklamaktadır. Kalıcı organik kirleticilerin toprak, sediment ya da atıklarda artan miktarlarda birikimi uzun vadede büyük riskler yaratmaktadır. Kalıcı organik bileşiklerin biyoremediasyon ya da fitoremediasyonunu sınırlayan en önemli faktör bu bileşiklerin düşük biyoyararlanım kapasiteleridir (Campanella ve Paul, 2000; Schwitzguébel, 2001).

Yüksek bitkiler yaşadıkları çevrede bulunan kirleticilerin ve insan yapımı kimyasalların (ksenobiyotikler) potansiyel fitotoksik etkilerinden kendilerini korumak için iyi çalışan bir sisteme sahiptir. Bitki hücrelerindeki ksenobiyotik metabolizması birbirinden farklı aşamaları içermektedir.

I. aşama reaksiyonlarında lipofilik substratlardaki fonksiyonel gruplar (-OH, -NH₂, -SH) indirgeyici, oksidatif (yükseltgeyici) ya da hidrolitik enzimler tarafından tanınırlar. Hidrolitik reaksiyonlar (esterazlar ya da amidazlar tarafından katalize edilirler) oldukça siktir. I. aşamadaki en yoğun ilgiyi oksidasyon reaksiyonları (epoksidasyon, O- ya da N-dealkilasyonu, aril- ya da alkil-hidroksilasyonu, N- ya da S-oksidasyonu) almaktadır. Çünkü bu reaksiyonlar sitokrom P450 mono-oksigenazlar tarafından katalize edilmektedir (Schwitzguébel, 2001). Sitokrom P450 mono-oksigenazlar (hidroksilazlar), doğal steroidler, yağ asitleri ve ksenobiyotikler gibi farklı substratlara oksijen girişini (eklenmesini) katalize ederler. Sitokrom P450 ler bitkilerde, flavonoidler ve alkaloidler gibi sekonder metabolitlerin ve hormonların biyosentezinde görev almalarının yanında herbisitler ve diğer ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadırlar. Bitkiler çeşitli stres koşullarında sekonder metabolitleri üretebilmektedirler. Böylece, bitki P450 enzimlerinin rizosferdeki ksenobiyotik degradasyonunu; sekonder bitki metabolitlerinin üretimini teşvik ederek ya da kirleticiyi direkt olarak detoksifiye ederek etkileyebildiğini söyleyebiliriz (Andrew ve diğ., 2003). Bu aşamada genellikle organik kirleticilerin daha az toksik metabolitleri üretilir (Abhilash ve diğ., 2009).

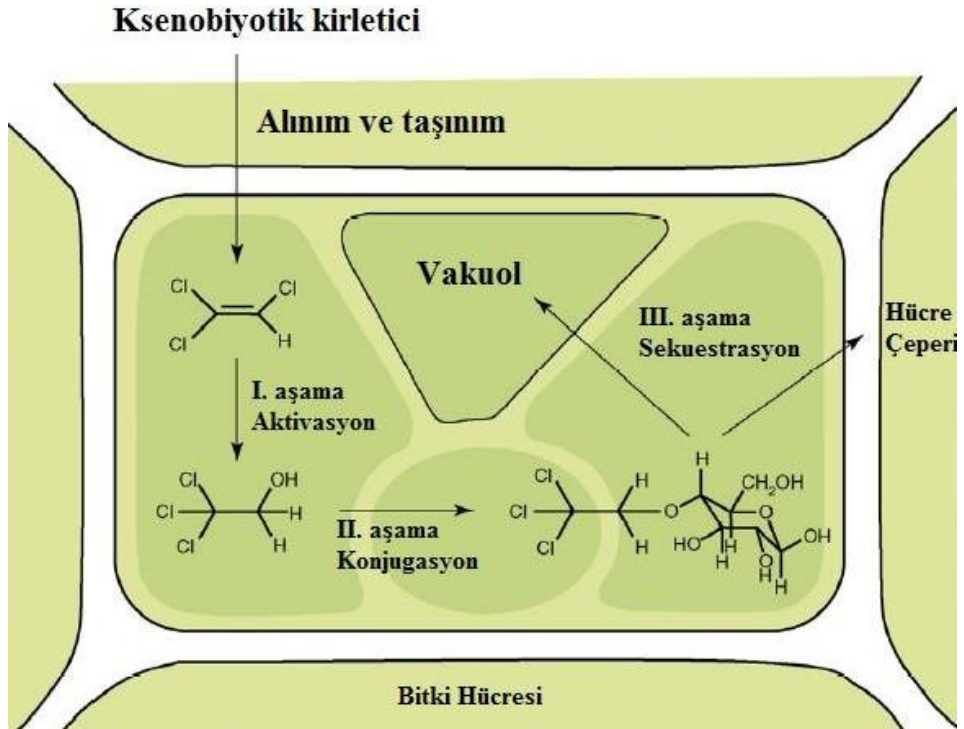
II. aşama reaksiyonları çeşitli tranferazlara dayalı olarak işler. Burada baskın olarak glukozil ya da diğer glukozil yapıları I. aşamadaki fonksiyonel gruplarla birleştirilirler. Çeşitli aminoasitler, malonik asit ya da glutatyon kalıntıları bu aşamada transfer olur ve bunun sonucu olarak metabolitlerin kompleks bir karışımı meydana gelir (Schwitzguébel, 2001). Bu aşamada hidrofilik bileşikler oluşturulur (Abhilash ve diğ., 2009).

III. aşama ise, temel olarak glukoz ya da glutatyon konjugasyonundan kökenlenen herbisit ya da diğer ksenobiyotik metabolitlerinin çözünmeyen bağlı kalıntılar (bound residues) olarak ya ekstrasellular matrikste ya da hücre çeperinde depo edilmelerini, ya da suda çözünebilir metabolitler olarak vakuolde biriktirilmelerini içermektedir (Schwitzguébel, 2001).

Ksenobiyotiklerin bitki hücrelerindeki metabolizmasını III aşamada (Şekil 2. 6) özetleyebiliriz (Tront, 2004).

Kirleticinin alınımı ya da taşınımı

- I. Transformasyon reaksiyonları
(oksidasyon, indirgenme, hidroliz)
- II. Konjugasyon reaksiyonları
- III. Dağıtım (kompartmantasyon)
(vakuol, hücre çeperi)



Şekil 2. 6: Trikloroetilen (TCE) in bitki dokularındaki metabolizması. I. aşama, TCE nin trikloroetanole oksidasyonu ile aktivasyonu; II. aşama, bitkisel bir molekül ile konjugasyonu; III. aşama, konjugasyon sonrası oluşan bileşiğin hücre çeperi ya da vakuol içerisinde sekuestrasyonu (Van Aken, 2008).

Biyoremediasyon ve fitoremediasyon çalışmalarından neden başarılı sonuçlar alındığının anlaşılabilmesi için sekonder bitki metabolitlerinin de iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

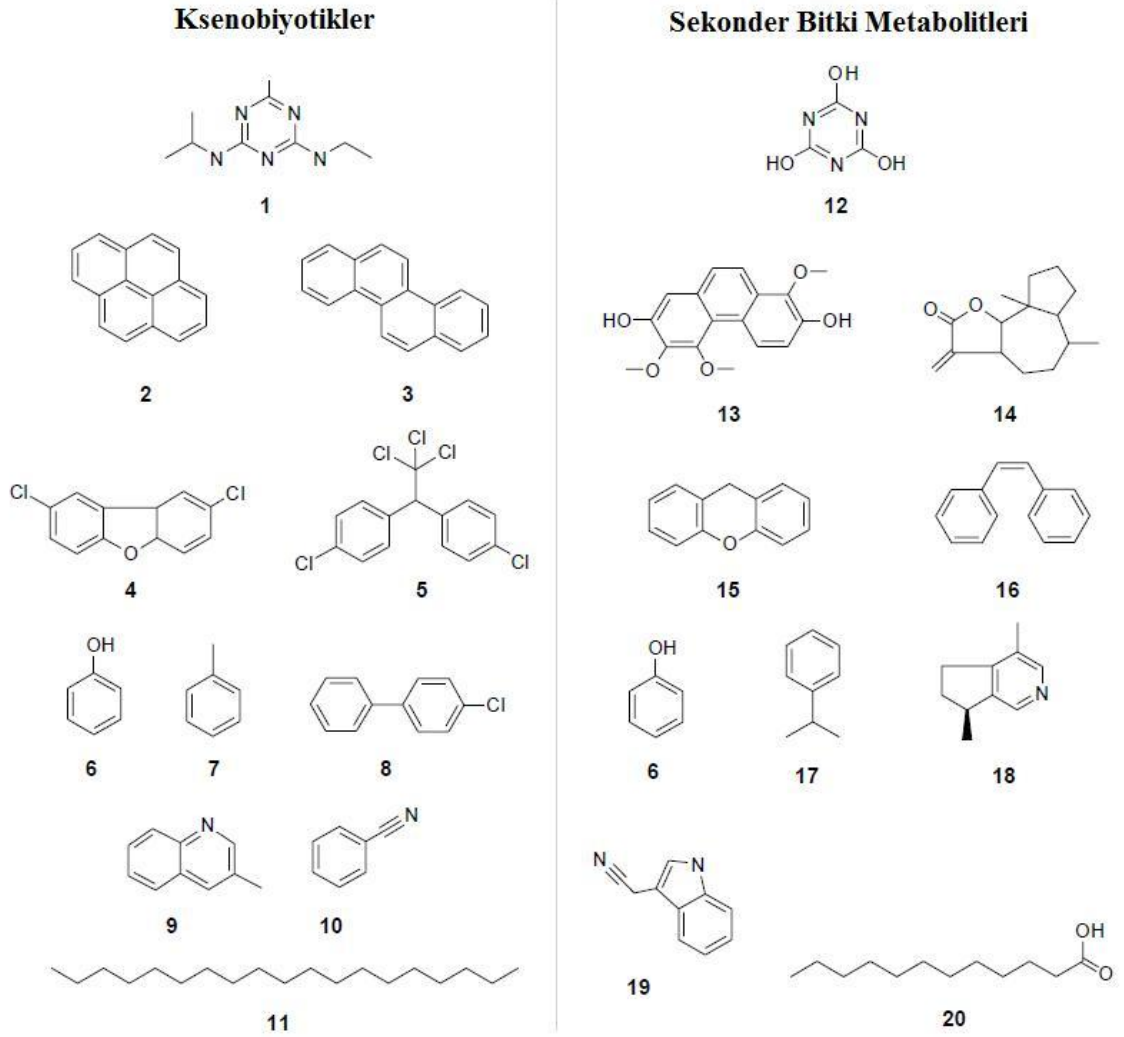
Sekonder Bitki Metabolitleri

Bitkiler tarafından üretilen toplamda 500 000' in üzerinde sekonder metabolit bulunduğu belirtilmekte ve bunların 100 000'den daha fazlasının düşük molekül ağırlıklı olduğu tahmin edilmektedir (Hadacek, 2002; Andrew ve diğ., 2003). Sekonder metabolitler geleneksel olarak bitkilerin temel metabolik süreçlerinde gereksinim duyulmayan bileşikler olarak görülmüşlerdir (Dixon, 2001; Andrew ve diğ., 2003). Floral olmayan ve uçucu sekonder bileşikler arasında en yaygını izoprenlerdir. İzoprenler ise daha kompleks kimyasal yapıya sahip terpenoidlerin yapı taşıdır (Paul ve diğ., 2000; Andrew ve diğ., 2003). Terpenoid ailesinin en geniş üyesi olan seskuiterpenoidler toksik ve antibiyotik maddeler, böcek büyüme (juvenile) hormon taklitleri, fitoaleksinler, bitki büyüme düzenleyicileri ve antioksidanları da içeren çok çeşitli biyolojik faaliyetlerde görev almaktadır (Dixon, 2001;). Sekonder bitki metaboliti ailesine ait diğer bir büyük grup ise fenoliklerdir. Bu grubun en önemli üyesi ise kumarinlerdir. Bitki fenolikleri arasında en yaygın olanı ise flavonoidlerdir. Bitkilerin mikroorganizmalar ya da böcekler tarafından korunmada ve diğer bitkilerle olan etkileşimlerinde de çeşitli sekonder metabolitleri ürettikleri bilinmektedir (Andrew ve diğ., 2003).

Ksenobiyotiklerin Remediasyonunda Sekonder Metabolitlerin Rolü

Bitkisel kökenli birçok kimyasalın, ksenobiyotiklerin parçalanabilmesi için mikroorganizmaları stimüle ettikleri bilinmektedir (Miya ve Firestone, 2001; Isidorov ve Jdanova, 2002; Andrew ve diğ., 2003). Özellikle bitkilerde sistemik edinilmiş bağışıklığı (SAR) (Meyer ve diğ., 1999) teşvik eden salisilatın bir PAH bileşiği olan naftalenin mikrobiyal degradasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Yen ve Gunsalus, 1982; Andrew ve diğ., 2003). Chen ve Aitken (1999) salisilatın floranten, piren, benz[a]antrasen, krizen ve benz[a]piren gibi PAH bileşiklerinin *Pseudomonas saccharophila* P15 ile degradasyonunu büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Yapılan çoğu çalışmalardan elde edilen veriler PCB degradasyonu ile salisilat arasında da bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Ayrıca flavonoidlerin de PCB parçalayan bazı mikroorganizmaların büyümesini desteklediği ve PCB metabolizmasını etkileyebildiği

belirtilmektedir. Diğer taraftan terpenoid bileşiklerinin PCB biyodegradasyonunda mikroorganizmaları teşvik ettiği de gösterilmiştir. Sekonder bitki metabolitlerinin varlığında degrade olan substratların çeşitliliği kirleticiler ile sekonder bitki metabolitlerinin benzer iskelet özellikleri göz önünde bulundurularak açıklanabilir (Andrew ve diğ., 2003), (Şekil 2.7).



Şekil 2. 7: Ksenobiyotiklerle sekonder bitki metabolitlerinin yapısal olarak benzerlikleri. (1) Atrazin; (2) Piren, (3) Krizen; (4) 3,8-Diklorodibenzo-p-dioksin; (5) p,p-Diklorodifenil-trikloroetan (DDT); (6) Fenol; (7) Toluen; (8) 4-Klorobifenil (PCB); (9) 3-Metilkuinolin; (10) Benzonitril; (11) n-Nonadekan; (12) Siyanürük Asit; (13) Konfusarin; (14) Pseudoguaianolide; (15) Ksanton; (16) Stilben; (17) Kumen; (18) Aktinidin; (19) İndol-3-asetonitril; (20) Farnesol. (Andrew ve diğ., 2003).

Son 20 yılda kamu kurumları, üniversiteler ve endüstride gün geçtikçe artan bir ilgi kazanan fitoremediasyonun, klasik remediasyon metodlarıyla karşılaştırıldığında avantaj ve dezavantajlarını Tablo 2.4 te belirtildiği gibi özetleyebiliriz (Kamath ve diğ., 2004).

Tablo 2. 4: Fitoremediasyonun avantaj ve dezavantajları.

Fitoremediasyonun Avantajları	Fitoremediasyonun Dezavantajları
Daha düşük maliyet	Uzun zaman alması
Kolay uygulanabilirlik ve sürdürülebilirlik	İklimeye bağlı olması
Çeşitli mekanizmaların kullanılabilmesi	Besin zincirine etkisinin bilinmemesi
Çevreyle dost	Kirleticinin nihai sonunun bilinmemesi
Hasat edilebilir bitkisel materyal	Sonuçlarının değişken olması

Sonuç olarak, moleküler biyolojideki gelişmelerin ışığında çeşitli bitki, bakteri ve hayvanlardan izole edilen genlerin çalışmanın amacına göre metal akümüasyonu, ya da organik bileşiklerin degradasyonu gibi fitoremediasyon çalışmalarında kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Bu amaçla, bitkilere ksenobiyotikleri bağlayan ya da taşıyan spesifik protein ya da peptidlerin transformasyonu, bitki biyodegradatif enzimlerinin aktivite ve kalitesinin artırılması ya da rizosfere salınan bileşiklerle topraktaki mikroorganizma performansının artırılması gibi çalışmalar yapılabilir (Donnelly ve diğ., 1994; Macek ve diğ., 2000).

Fitoremediasyonu genel hatlarıyla özetleyecek olursak;

1. Bitki ve ilişkili oldukları mikroorganizmalar kirleticileri, stabilize ederek, rizosferde degradasyona uğratarak, bitki içinde degrade ederek, hasat edilebilir dokularda biriktirerek ya da buharlaştırarak ortamdan temizleyebilirler.
2. Fitoremediasyon mali yönden etkin ve çevreye dost alternatif ya da konvansiyonel metodları tamamlayıcı bir teknoloji olarak önerilmektedir.

3. Fitoremediasyon geniş bir çerçevede organik ve inorganik kirleticilerin etkili bir şekilde ortamdaki kaldırılmasında etkin bir yöntem olmasına rağmen bu mekanizmaların altında yatan biyolojik süreçler büyük ölçüde bilinmemektedir. Bitki-mikroorganizma etkileşimleri, organik bileşikler için bitkideki degradasyon mekanizmaları, bitkideki taşınımları ve inorganik bileşikler için çelat oluşum mekanizmaları gibi bazı önemli süreçler daha geniş kapsamlı bilimsel çalışmaları gerektirmektedir.
4. Araştırmalardan elde edilen bilgiler fitoremediasyon için arazide uygulanmakta, transgenik bitkilerin arazi testleri ise ümit vermektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar etkili sonuçlar verdikçe çevreye dost ve maliyeti düşük bu teknolojinin kullanımı daha da yaygınlaşabilecektir (Pilon-Smits, 2005).

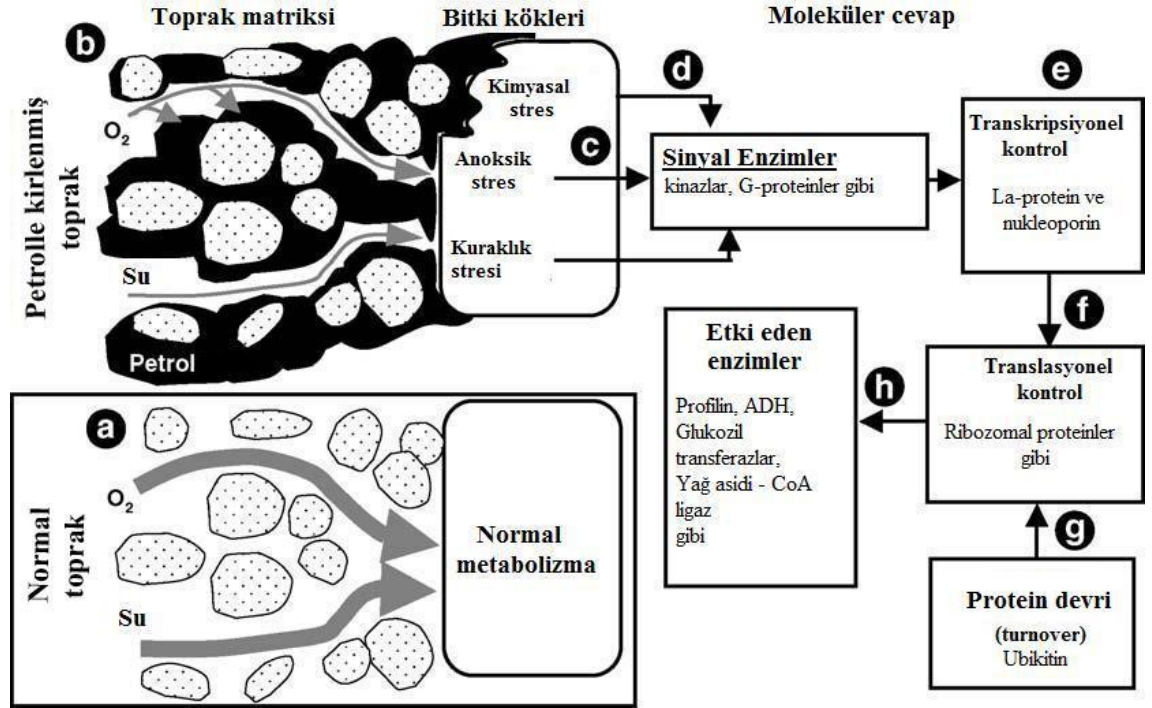
2.4. HAM PETROLÜN BİTKİLER ÜZERİNE ETKİSİ

Bitkilerin yaşam ortamlarında petrol hidrokarbonlarının (PHC) varlığı bitki büyüme ve gelişmesi için olumsuz etkiler yaratmaktadır (Li ve diğ., 1997; Pena-Castro ve diğ., 2006). PHC lerin bitkiler üzerindeki zararlı etkileri, tohum çimlenmesinin inhibisyonu, bitki büyümesinin indirgenmesi, fotosentetik pigmentlerin ve fotosentez veriminin azaltılması şeklinde ortaya çıkmaktadır (Udo ve Fayemi, 1975; Malallah ve diğ., 1998; Pena-Castro ve diğ., 2006). Aynı zamanda petrolde bulunan bazı bileşiklerin biyolojik membranlarda çözüldüğü ve bunun sonucu olarak kök yapısına zarar verdiği de düşünülmektedir (Chaineau ve diğ., 1997; Pena-Castro ve diğ., 2006).

Petrolün bitkiler üzerinde yarattıkları toksisiteye petrolle kirlenmiş toprakların hidrofobisitesinin teşvik ettiği kuraklık stresi (Li ve diğ., 1997; Pena-Castro ve diğ., 2006) ile yine bu kirlenmiş topraklardaki karakteristik yüksek biyokimyasal oksijen istemine ve bu toprakların zayıf tarımsal özellikte olmalarına sebep olan anoksik stres yol açmaktadır (Rentz ve diğ., 2003). Anoksik streste genel olarak petrol, kök ve tohum yüzeylerini kaplayarak hücrelere oksijen girişini engellemektedir (Pena-Castro ve diğ., 2006). Petrol toksisitesine karşı kavak ağaçlarıyla yapılan bir çalışmada rizosfere oksijen eklenmesinin petrol kirliliğinin fitoremediasyonunda etkili olduğu rapor edilmiştir (Rentz ve diğ., 2003). Bir başka çalışmada ise petrol kirliliğine karşı bermuda çimlerinin (*Cynodon dactylon*) vermiş olduğu tepki incelendiğinde izole edilen alkol

dehidrogenaz (ADH) cDNA (Cd51) larının petrol konsantrasyonları karşısında artan ekspresyonları anoksik stresin bitkilerin petrol stresine karşı en önemli bileşenlerinden biri olduğunu göstermiştir (Pena-Castro ve diğ.,2006). Bilindiği gibi ADH ler bitki anaerobik metabolizmasının en son basamağında yer alırlar ve asetaldehitden etanol sentezini katalizlerler (Drew, 1997). Yine bermuda çimleriyle yapılan çalışmada farklı petrol konsantrasyonlarına karşılık olarak artan glukoziltransferaz (GT) enzim ekspresyonları ve izole edilen CdR60 and CdR149 cDNA ları bu enzimlerin kimyasal stresin ortadan kaldırılmasında etkili olabileceklerini göstermektedir (Pena-Castro ve diğ., 2006). Bilindiği gibi GT ler aktive edilmiş karbohidratlarla salisilik asit ve flavonoidler gibi organik substratların konjugasyonunu katalize eden enzimlerdir (Jones ve Vogt, 2001). Ksenobiyotik stresinin detoksifiye edildiği II. aşamada da görev almaktadırlar. GT lerin fenoller, anilinler ve PAH lar gibi kirleticilerin oksidasyonu üzerinde de etkili oldukları belirtilmektedir (Harvey ve diğ., 2002; Schöffner ve diğ., 2002). Ayrıca yine aynı çalışmada elde edilen uygulanan petrol konsantrasyonları sonucunda ekspresyonlarında artış gözlenen iki cDNA (profilin CdR12 ve uzun zincirli yağ asidi-CoA ligaz CdR29) nın izolasyonu petrol kirliliğine karşı bitkinin hücre çeperi ve zarlarındaki hasarların giderilmesinde rol alabileceğini göstermektedir (Pena-Castro ve diğ., 2006). Çünkü petrolde bulunan hafif fraksiyonlar özellikle hücre çeperi ve zarları üzerinde biyolojik hasarlara sebep olmaktadır (Adam ve Duncan, 2002). Profilin hücre içi iskelet yapısının yeniden düzenlenmesinde, kök oluşumunda ve uzamasında önemli bir rol oynamaktadır (Ramachandran ve diğ., 2000). Uzun zincirli yağ asidi-CoA ligaz ise, lipid metabolizmasındaki anahtar enzimlerden biridir (Ji ve diğ., 2003).

Yukarıda anlatılanlara ek olarak bermuda çimlerinin petrol kirliliği karşısında vermiş oldukları moleküler cevabı bir modelle Şekil 2.4. teki gibi özetleyebiliriz (Pena-Castro ve diğ., 2006).



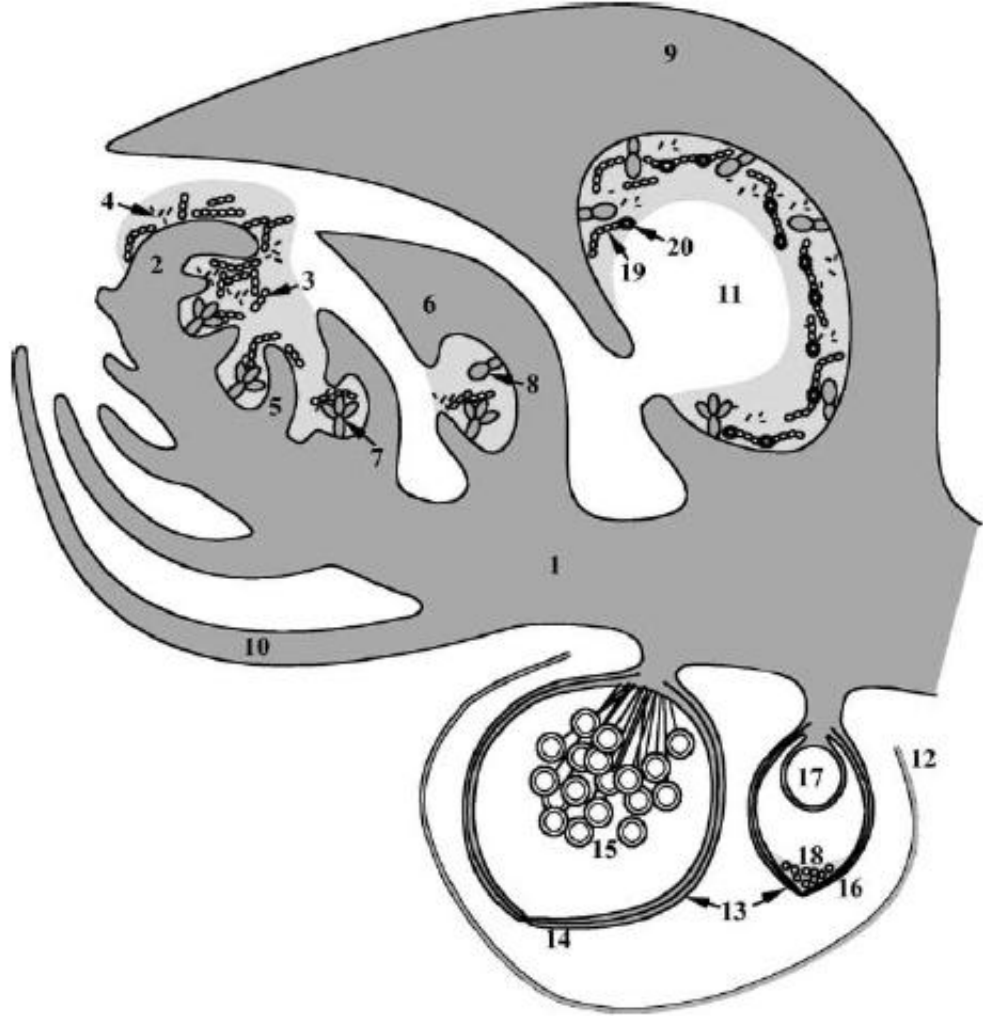
Şekil 2. 8: Bermuda çimlerinin (*Cynodon dactylon*) petrol kirliliği karşısında vermiş oldukları moleküler cevap. (a) Toprak ve bitki kökleri arasında yeterli oksijen ve suyun sağlandığı bitki büyümesi için ideal koşullar. (b) Ancak, kökler petrole kirlenmiş alanda büyüdüklerinde, toprak partiküllerinin hidrofobik tabaka ile kaplanmasından dolayı su alınımı indirgenmekte ve toprak mikroorganizmalarının oksijen talebi karşılanamamaktadır. (c) Bu durum anoksik ve kuraklık stresine neden olmakla birlikte kirleticinin hidrofobik yapısından dolayı kimyasal strese de sebebiyet vermektedir. (d) Stres karşısında oluşan enzim sinyalleri ile teşvik edilen (e) transkripsiyonel kontrol, (f) translasyonel kontrol ve (g) protein dönüşümü ile petrolün zararlı etkilerini ortadan kaldıracak enzimlerin sentezi gerçekleşmektedir. (Pena-Castro ve diğ., 2006).

2.5. AZOLLA

Yunanca kökenli bir kelime olan *Azolla*, “azo” ve “olloy” kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur ve “kuraklıkla ölen” anlamı taşımaktadır (Moore, 1969; Ashton ve Walmsley, 1976, Carrapiço ve diğ., 2000). Bitkinin susuzluğa karşı olan duyarlılığı da bunu doğrulamaktadır (Carrapiço ve diğ., 2000). Sucul bir eğrelti olan *Azolla* genellikle tropikal ve ılıman bölgelerde, göller, göletler, sulak alanlar, kanallar, pirinç tarlaları ve yavaş akan nehirlerin yüzeyinde yüzer halde bulunmaktadır. Dünya genelinde yedi ayrı türe sahip olan *Azolla*, *Rhizosperma* ve *Azolla* olmak üzere iki bölüme ayrılır. *Rhizosperma* bölümü, *Azolla nilotica* (batı Afrika, Nil havzası) ve genellikle iki varyete ile bilinen *A. pinnata*: *A. pinnata* var. *pinnata* (Afrika, Madagaskar, Avustralya) ve *A. pinnata* var. *imbricata* (subtropikal ve tropikal Asya) olmak üzere iki türle temsil edilmektedir. *Azolla* bölümü ise *A. caroliniana* (doğu, orta ve güney ABD, batı

Avrupa), *A. mexicana* (ABD nin batı kıyılarından Meksika ve orta Amerika), *A. microphylla* (Amerika kıtasının tropik ve subtropik bölgeleri), *A. filiculoides* (Alaska'dan güney Amerika'ya, güney Afrika, batı Avrupa, güney Avustralya, Yeni Zelanda, uzakdoğu) ve *A. rubra* (uzakdoğu, güney Yeni Zelanda) olmak üzere beş türle temsil edilir (Carrapiço ve diğ., 2000; van Hove ve Lejeune, 2002).

Azollaceae familyasına ait bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla* sürekli ve kalıtsal ortağı, azot fikse eden, heterosist yapısına sahip filamentli bir siyanobakteri olan *Anabaena azollae* ile birlikte simbiyotik olarak yaşamaktadır. Siyanobakteri tarafından serbest bırakılan NH_3 bitki tarafından alınırken bitki de siyanobakteriye yaprak kavitesine bıraktığı sukrozu sağlar. Ayrıca yaprak kavitesinde ve yaprak yüzeyinde çeşitli heterotrofik bakteriler de bulunmaktadır (Şekil 2.9). Dorsal yaprak boşluklarında yaşayan, azot fikse eden simbiyotik ortağından dolayı genellikle pirinç tarlalarında gübre olarak kullanılmaktadır. Ayrıca iyi aminoasit profili, yüksek protein ve karotenoid içeriğinden dolayı balık, domuz, kümes hayvanları, tavşan ve hatta insanların beslenmesinde de kullanılabilir. Yeşil olan yaprakları direkt güneş ışığı altında ya da olumsuz çevresel koşullarda kırmızıya dönmektedir (van Hove ve Lejeune, 2002; Cohen ve diğ., 2004; Hashemloian ve Azimi, 2009; Pereira ve diğ., 2009).



Şekil 2. 9: *Azolla* nın morfolojisi (Longitudinal kesit) 1. Stem; 2. Stem apex; 3. Heterosistsiz *Anabaena* kolonileri; 4. Diğer bakteriler; 5. Yaprak primordiyumu; 6. Genç yaprak; 7. Çok hücreli dallanmış tüy; 8. İki hücreli yalın tüy; 9. Üst yaprak lobu; 10. Alt yaprak lobu; 11. Yaprak kavitesi; (gaz içeren merkezi bölge ve periferel müsilaıjlı bölge). 12. Involucre; 13. İndusyum; 14. Mikrosporokarp; 15. Mikrosporangia (Mikrosporlar); 16. Megasporokarp; 17. Megasporangium (Megaspor); 18. *Anabaena* akinetleri; 19. *Anabaena* nın vejetatif hücreleri; 20. Heterosist. (van Hove ve Lejeune, 2002).

Azolla genellikle vejetatif olarak her bir yaprakçıının tabanındaki absisyon tabakasının bölünmesi ile çoğalmaktadır. Eşeyli üremesi oldukça karmaşıktır ve çoğunlukla olumsuz çevresel koşullar altında meydana gelmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10: *Azolla filiculoides* (A). Simbiyotik ortak *Anabaena azollae* (Pabby ve diğ., 2003) (B). Mikrosporlar (C). h: heterosist, v: vejetatif hücre

Bu tez çalışmasında ham petrol konsantrasyonlarının *Azolla filiculoides* bitkisinin büyüme ve gelişmesi üzerine olan etkileri incelenerek bitkinin ham petrole olan tolerans sınırları saptanmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu bitkinin ham petrolde bulunan alifatik ve aromatik bileşiklerin biyodegradasyonları üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ TEMİNİ VE YETİŞTİRİLMESİ

Tez kapsamında deney materyali olarak kullanılan bitki, bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla filiculoides* Lam.'dır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *Azolla filiculoides* Türkiye'de tek bir lokaliteden toplanmıştır (Ünal ve Üzen, 1996). Bitkiler habitatlarından alındıktan sonra sera ve iklim odasına konularak adaptasyon çalışmaları başlatıldı. Bu amaçla; farklı sıcaklık ve nem değerleri ile, Hoagland besi suyunun farklı konsantrasyonları denenerek optimizasyon çalışmaları yapıldı (Şekil 3.1). *Azolla* – *A. azollae* birlikteliğinin azotu (N_2) amonyağa (NH_3) indirgeme yeteneğinden dolayı *Azolla* türleri azotlu bileşikleri içermeyen besiyerlerinde yetiştirilebilmektedir. Böylece bu bitkinin literatürce önerilen yetiştirme ortamları (Masood ve diğ., 2006) denenerek en ideal ortam saptanmaya çalışıldı.



Şekil 3. 1: *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin yetiştirildiği stok büyüme ortamı.

Sonuç olarak 1/8 kat sulandırılmış, azot içermeyen Hoagland besi çözeltisi ve 22 – 28°C ortam sıcaklığının *Azolla filiculoides* için en uygun büyüme ortamı olduğu tespit edildi.

Bitkiler stok büyüme ortamında yetiştirildikten sonra deney uygulamasına geçilmeden yaklaşık olarak 15 gün öncesinden stok büyüme ortamlarından alınarak Şekil 3.2 de gösterilen büyüme kaplarına alındı ve burada büyümeleri sağlandı. Bu uygulamadaki amaç stok büyüme ortamından alınan herbir bitkinin kontrollü bir şekilde gözden geçirilmesi ve deney büyüme kaplarına sağlıklı ve genç olan bitkilerin alınmasını sağlamaktır. Bu şekilde bitkilerin eşit koşullarda büyümeleri sağlanarak deneysel olarak bir homojenlik yaratılmaya çalışılmıştır.



Şekil 3. 2: Deney uygulaması öncesinde bitkilerin alındığı büyüme kapları.

3.2. BATMAN HAM PETROL UYGULAMASI

Farklı oranlarda Batman ham petrolü içeren su kültürü ortamında *Azolla filiculoides*' in yetiştirilmesi ve değişik Batman ham petrol konsantrasyonlarının *Azolla* üzerine olan etkisi araştırılmak üzere denemeler yapıldı. Öncelikle bitkilerin yetiştirildiği beher kaplarında petrol uygulanmayan besiyerindeki (kontrol, % 0 ham petrol) bitki büyümesi incelenerek bitkilerin bütün yüzeyi tamamen kapladığı süre saptandı. Böylece deney süresinin bitimi bitki transferini takiben 15. gün olarak belirlendi. Denemeler sonucunda elde edilen konsantrasyonlardan uygun olanları seçilerek deney uygulama serisi belirlendi. Bitkinin petrole olan tepkisi incelenmek üzere ilk olarak % 0 (kontrol), % 0,5, % 1, % 2, % 3 konsantrasyonlarında 15 gün süreyle Batman ham petrol uygulaması yapıldı ancak uygulanan konsantrasyonlarda bitkilerin yaşayamadığı tespit edildi. Bitki canlılığının kaybolmasından dolayı, bu denemelerden sonra uygulanan maksimum ham petrol konsantrasyonlarının düşürülmesine karar verildi ve Tablo 3.1 de belirtilen konsantrasyonlarda petrol içeren besiyeri ortamlarının 15 gün süreyle *Azolla filiculoides*' e olan etkisi gözlemlendi.

Tablo 3. 1: *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine uygulanan Batman ham petrol konsantrasyonları.

Bitki	Batman Ham Petrol Konsantrasyonları (%)								
<i>Azolla filiculoides</i>	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Deney uygulama serileri belirlendikten sonra (Tablo 3.1) bitkilere petrol uygulaması şu şekilde yapılmıştır;

Deney uygulamasından 24 saat önce cam beher kaplarına 500 ml azot içermeyen 1/8 Hoagland besi çözeltisi içerisinde % 0, % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 konsantrasyonlarında olacak şekilde ham petrol uygulandı. Bu uygulamanın yapılmasındaki amaç, bitki büyüme odası fiziksel şartlarının deney setlerini etkilememesi, homojenliğinin sağlanabilmesi ve petrolün su yüzeyine tamamen yayılmasını sağlamaktır. Petrol uygulamasından bir gün sonra her bir seri için 3 gram olacak şekilde bitki tartılarak besiyerlerine konuldu ve bitkiler sera koşullarında büyümeye bırakıldı. Uygulamanın 15. gününde deney sonlandırıldı.

Yukarıda anlatılanlardan anlaşılacağı üzere deneyde kullanılan seriler şu şekilde özetlenebilir:

Ham Petrol Negatif Kontrol Serisi

Cam beher kaplarına 500 ml azot içermeyen 1/8 Hoagland besi çözeltisi içerisinde % 0 % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 konsantrasyonlarında olacak şekilde ham petrol uygulanarak sera koşullarında bırakıldı.

Bitkili Ham Petrol Serisi

Cam beher kaplarına 500 ml azot içermeyen 1/8 Hoagland besi çözeltisi içerisinde % 0 % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 konsantrasyonlarında olacak şekilde ham petrol ilave edilerek hazırlandıktan 24 saat sonra her bir deney kabına 3 gram olacak şekilde bitki tartılarak transfer edildi ve sera koşullarında büyümeye bırakıldı.

3.3. BATMAN HAM PETROLÜNÜN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İZLENMESİ

Deney sonu ve başlangıcı arasındaki taze ağırlık farkı bitki büyüme parametresi olarak değerlendirildiği için petrol uygulaması öncesinde deney ortamlarına yaş ağırlıkları tartılarak konulan bitkilerin deney bitiminde tekrar yaş ağırlıkları alınarak uygulanan petrol yüzdelерinin bitki büyümesi üzerine olan etkisi hesaplandı.

3.3.1. Farklı Deney Serilerini İçeren Ortamların Ön Sentez İşlemi

Su Örnekleri

Sıvı/sıvı ekstraksiyon için kullanılacak farklı deney serilerini içeren besiyeri ortamları, deney kaplarının alt ve üst tabakalarından 50 ml alınarak, önceden hidroklorik asitle temizlenmiş olan kapaklı cam şişelere konuldu ve ekstraksiyon işlemine kadar +4 °C de karanlık ortamda saklandı. Daha sonra *Azolla filiculoides* ve kontrol deneylerinin besiyerlerinin diklorometan (DCM) ile sıvı/sıvı ekstraksiyonları yapıldı (US EPA, METOD 3541). Ekstraksiyon işlemi yapılan her bir numuneye 1µl 2-fluorobiphenyl

(Dr. Ehrenstorfer) internal standart olarak eklendi. Ekstraksiyon bakiyesi düşük baskı altında distillendi ve distilasyon bakiyesi (yaklaşık 1 ml) n-hexane ile balon joje içerisinde 10 ml ye tamamlanarak Ultraviole fluorospektrofotometre (UVF) analizi için +4 °C de saklandı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla balon joje kapakları parafilm ile sıkıca kapatıldı.

Bitki Örnekleri

15 günlük deney süresinin sonunda uygulama ortamlarından alınan bitki örnekleri; yağ ağırlık tartımları yapıldıktan sonra sıvı azotta donduruldu ve katı/sıvı ekstraksiyona kadar -80 °C de saklandı. Katı/sıvı ekstraksiyon işlemlerine başlamadan önce cam pamuğu arasına sarılan bitki örneklerinin üzerine, yapıdaki suyu çekmek için 2 gram susuz sodyum sülfat (Merck) eklendi. Otomatik Soxhlet ekstraksiyonu (US EPA, METOD 3600C) uygulanacak numunelerin üzerine internal standart (1 µl 2-fluorobiphenyl) ilavesi yapıldı ve örnekler Otomatik Soxhlet 6 lı yağ ekstraksiyon cihazı (SER 6 VELP marka) ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon öncesinde boş ağırlıkları alınan ekstraksiyon kaplarının ekstraksiyon sonrasında tamamen kurumuş olarak tekrardan tartımları alınarak örneklerin ekstraksiyonlarından kazanılan bakiyelerdeki ekstrakte olmuş organik madde (EOM) miktarları hesaplandı. Ekstraksiyon koşulları Tablo 3.2. de verilmektedir.

Tablo 3. 2: Otomatik Soxhlet ekstraksiyon çalışma metodu

Ekstraksiyon Programı	
Sıcaklık	110 °C
Daldırma (İmmersiyon)	30 dk
Yıkama (Washing)	90 dk
Geri kazanım (Recovery)	45 dk
Kullanılan DCM Miktarı	
	80 ml

3.4. PETROL HİDROKARBON ANALİZLERİ

3.4.1. Ultraviyole Fluorospektrofotometre (UVF) ile Toplam Petrol Hidrokarbonlarının Analizi

Ekstraksiyon bakiyelerinin toplam petrol hidrokarbon (\sum TPH) miktar analizi Ultraviyole fluorospektrofotometrede (Shimadzu RF-5301) yapıldı. Ekstraksiyon bakiyelerinin toplam petrol hidrokarbon miktarları, referans malzeme olarak kullanılan Batman ham petrolü hekzan içinde belli konsantrasyonlarda hazırlanarak (0,25, 0,5, 1, 1,5 ve 2 μ g/ml) UVF cihazı ile 310/360 nm (ex/em) deki floresans intensiteleri ölçülerek çizilen standart eğri ile hesaplandı (Ehrhardt ve diğ., 1992).

Referans Batman ham petrol kullanılarak çizilen standart eğri denklemi:

$$F1=383.49*c + 41.946 \quad (r^2=0.99) \quad F1= \text{Absorbans} \quad (ax+b) \quad c: \text{konsantrasyon}$$

3.4.2. Senkronize Ultraviyole Fluorospektrofotometre (SUUVF) Analizi

Referans olarak kullanılan Batman Ham Petrolü ve örneklerin total hacim üzerinden 310/360 nm (ex/em) spektrumları Jasco 6300 cihazı ile 220-700 nm arası sabit ve 23 nm dalga boyu aralığı ile tarandı. Ölçüm için 1 cm kalınlığında ince kuvarz küvet kullanıldı (Lloyd, 1971).

3.4.3. Kolon Kromatografisi ile Temizleme Yöntemi

UVF ile miktar tayini yapıldıktan sonra, ölçümden kalan bakiyeler, U.S. EPA, METOD 3620C ye göre GC-MS analizi için kolon kromatografisi ile alifatik ve aromatik gruplar olmak üzere 2 fraksiyona ayrıldı. Toplam ekstrakt florasil kolon (tamamen aktif 2 g florasil üzerine sodyum sülfat konularak) kullanarak, kolon kromatografisi ile fraksiyone edildi. Ekstraktlar (0,5-1 ml) dikkatli bir şekilde kolona ilave edildi ve fraksiyonlar toplandı: (1) 10 ml hekzan (alifatik hidrokarbonlar) ve (2) 10 ml 1:1 diklorometan:hekzan (aromatik bileşikler). Ekstraktların hepsi azot akımında yaklaşık olarak 100 mikrolitreye konsantre edildi.

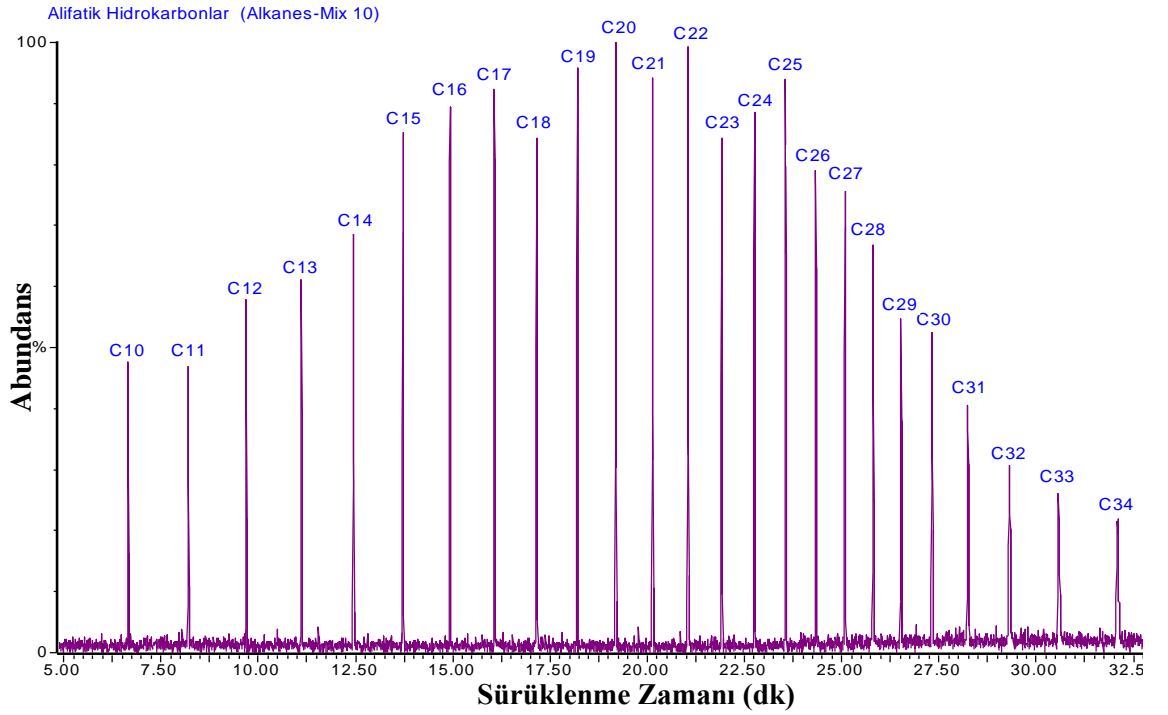
3.4.4. Gaz Kromatografi / Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizi

Petrol uygulaması yapılan ve \sum TPH miktarları belirlenen kontrol ve bitki örneklerinin enstrümantal analizleri Perkin Elmer marka Autosystem XL GC model GC-MS cihazı kullanılarak Tablo 3.3 de verilen parametreler uygulanarak gerçekleştirildi.

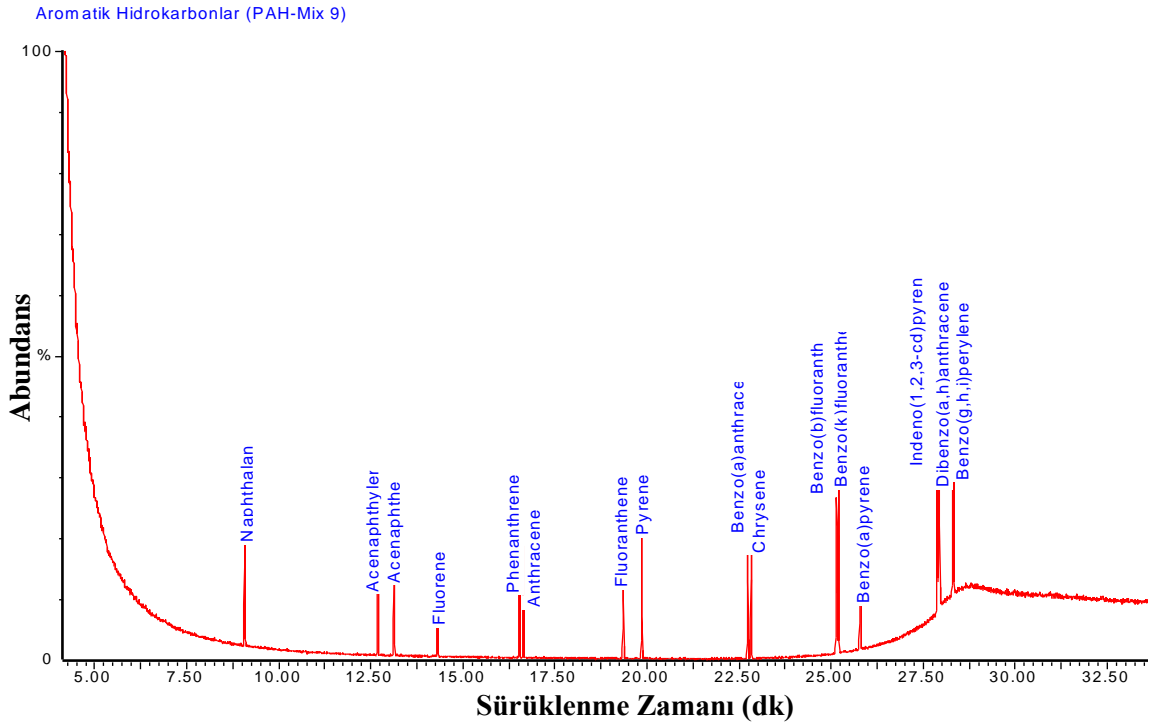
Tablo 3. 3: GC-MS Parametreleri.

Enjektör Parametreleri		
Enjeksiyon modu	Splitless	
Enjeksiyon hacmi	1 µl	Otomatik örnekleyici kullanılmıştır
Enjektör yıkaması	Ön yıkama (2 kez)	
Enjektör sıcaklığı	Sabit, 280°C	
GC Parametreleri		
Kolon	HP-5MS	30-mx0,25mmx0,25 µm
Taşıyıcı gaz	Helyum	1 ml/dk
Turbo MS Parametreleri		
MS interfaz	220°C	
Scan modu	50-650 m/z	
Çalışma Metodu		
Başlangıç sıcaklığı	50°C	1 dk bekleme
Sıcaklık artışı	10°C/dk	
Bitiş sıcaklığı	320°C	5 dk bekleme

GC-MS analizlerinde **n-Alkan tayini için**, Alkanes Mix 10 (nC₁₀-nC₃₅) (Dr. Ehrenstorfer) **Polisiklik Aromatik Hidrokarbon tayini için**, PAH mix 9 (Dr. Ehrenstorfer) standartları kullanıldı. Numunelerdeki alifatik zincirin kalitatif ve kantitatif tayini için kullanılan standarta ait TIC kromatogramı Şekil 3.3 de poliaromatik hidrokarbon bileşenlerinin miktar tayini için kullanılan PAH karışım standartı ise Şekil 3.4 de verilmiştir.



Şekil 3. 3: n-Alkan standartı.

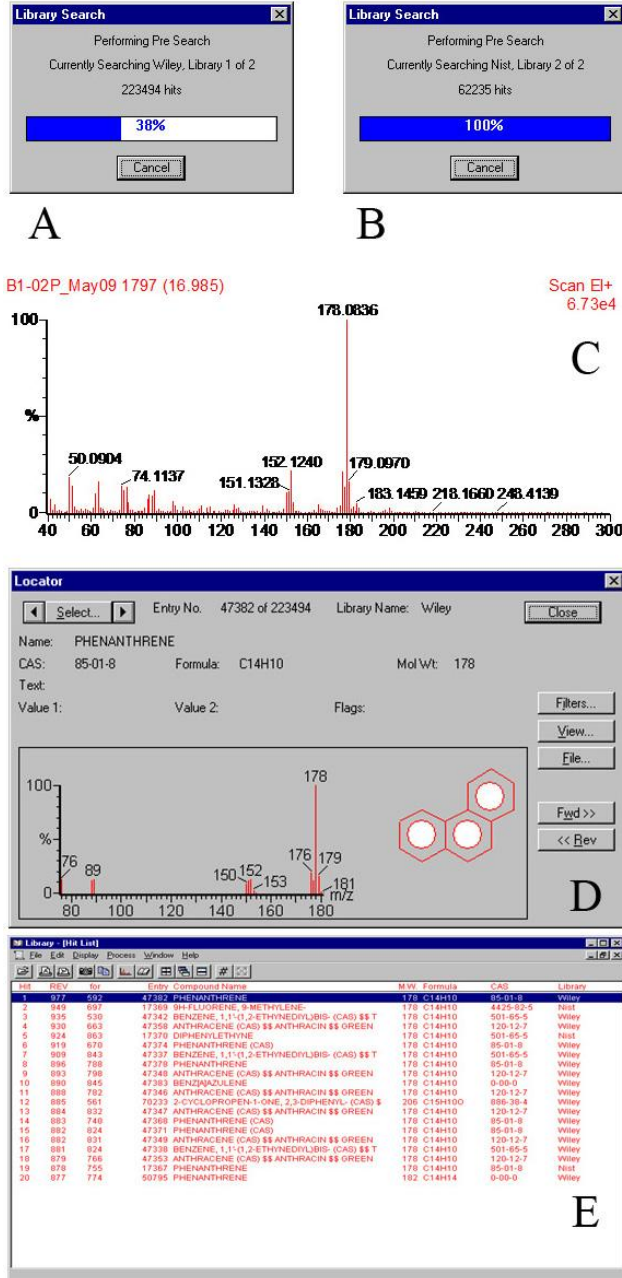


Şekil 3. 4: PAH (mix 9) standartı.

3.4.5. Kütüphane Taraması

Kolon kromatografisi sonrasında örneklerdeki PAH lar ve alkillenmiş homolog PAH serileri WILEY (Şekil 3.5 A) ve NIST (Şekil 3.5 B) kütüphaneleri taranarak araştırıldı. Bunun için öncelikle örnekte araştırılacak olan molekülün hedef iyonu girilerek

kütüphanede taratıldı (Şekil 3.5) ve örneğin kütle spektrumu ile (Şekil 3.5 C) tarama sonucunda çıkan hedef iyonun kütle spektrumu (Şekil 3.5 D) karşılaştırıldı. Kütüphane taraması sonucunda elde edilen yüzdelik değer (Şekil 3.5 E mavi dolgu) kütle spektrumunda taranan pikin doğruluk yüzdesini vermektedir.



Şekil 3. 5: GC-MS Kütüphane Taraması.

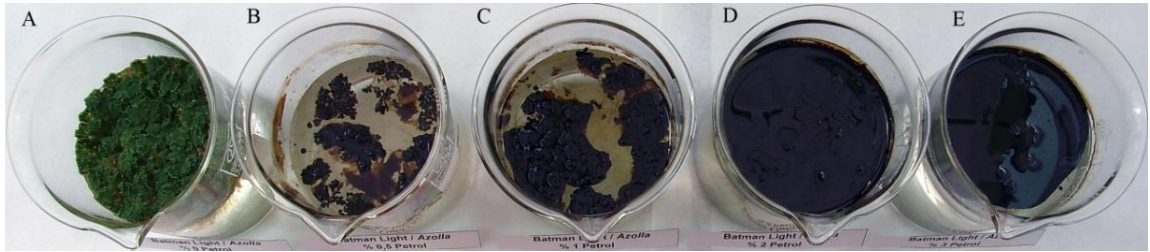
3.5. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR

Bütün deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesi one way-ANOVA ile yapıldı. Barlar (\pm) standart sapmayı göstermektedir.

4. BULGULAR

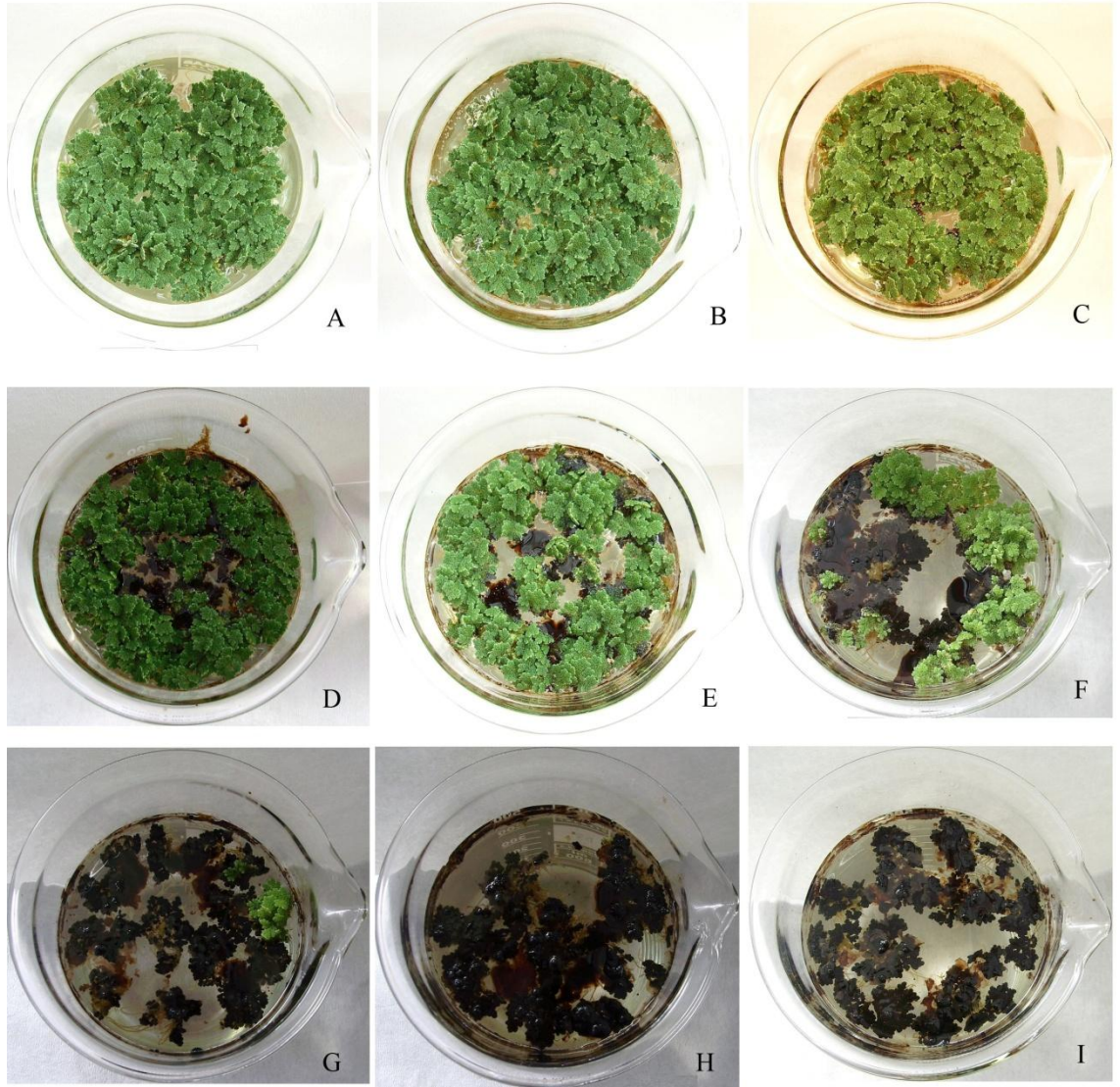
4.1. BATMAN HAM PETROLÜNÜN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İZLENMESİ

Bitkinin ham petrole olan cevabı incelenmek üzere ilk olarak % 0, % 0,5, % 1, % 2, % 3 konsantrasyonlarında 15 gün süreyle Batman ham petrol uygulaması yapıldı ancak uygulanan konsantrasyonlarda bitkilerin öldüğü tespit edildi (Şekil 4.1). Bu denemelerden sonra, bitki canlılığının kaybolmasından dolayı ham petrol konsantrasyonlarının düşürülmesine karar verildi ve *Azolla filiculoides* bitkisi Tablo 3.1 de belirtilen konsantrasyonlarda petrol içeren besiyeri ortamlarında 15 gün süreyle yetiştirildi.



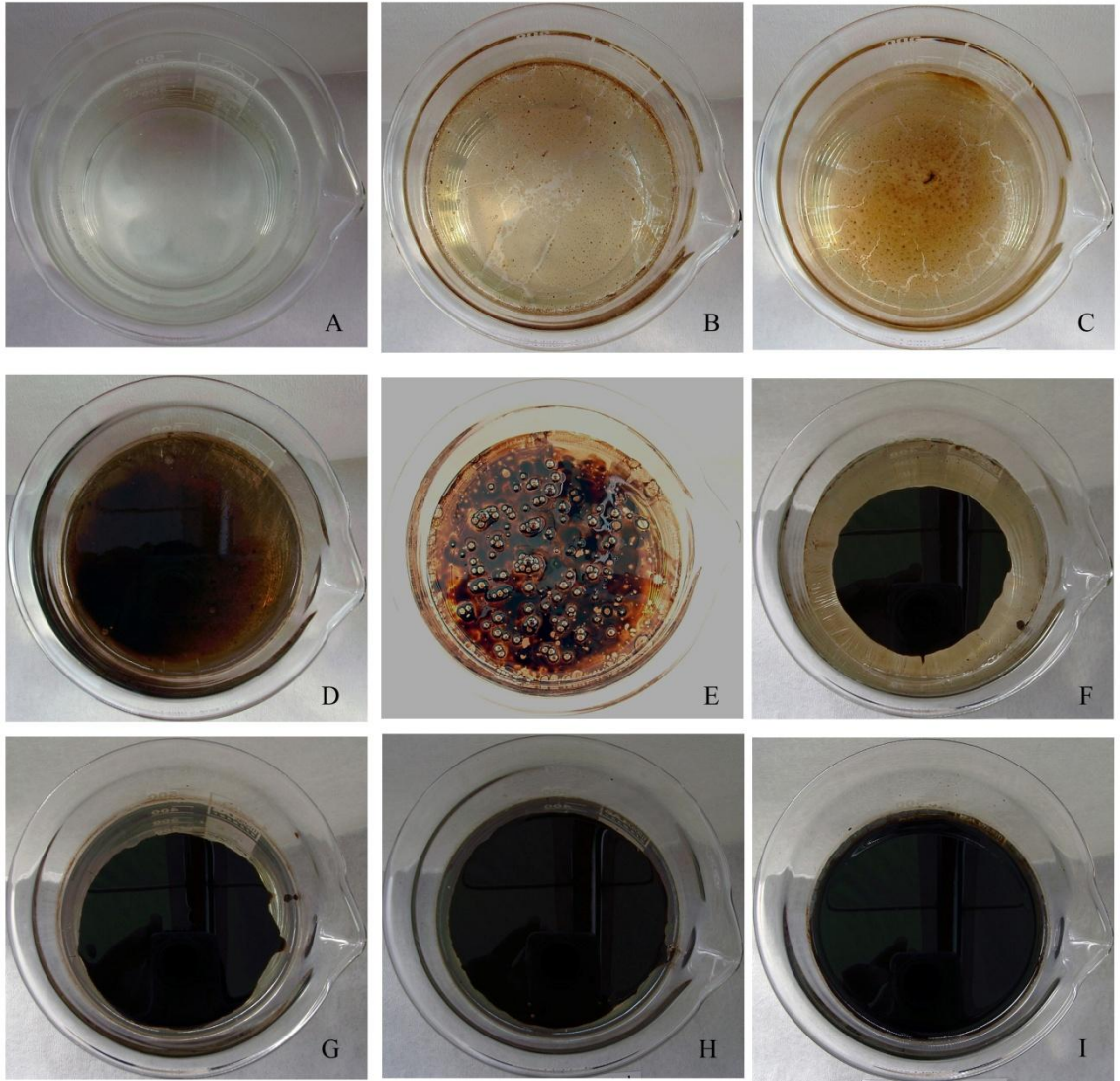
Şekil 4. 1: *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine farklı konsantrasyonlarda Batman ham petrolünün uygulanması (A. % 0 B. % 0,5 C. % 1 D. % 2 E. % 3).

Tablo 3.1 de belirtilen konsantrasyonlarda Batman ham petrolü içeren besiyerinde *Azolla filiculoides* bitkisi yetiştirilmiş ve bu aşamadan sonra öncelikli olarak petrol konsantrasyonlarının 15 gün süreyle *Azolla filiculoides*' in gelişmesine olan etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.2). Şekil 4.2 de uygulanan % 0,005 (B) ve % 0,01 (C) petrol konsantrasyonlarında bitki büyümesi kontrolle (A) paralel seyrederken % 0,05 (D) ve % 0,1 (E) petrol konsantrasyonlarında bitki büyümesinin kontrolle (A) göre biraz gerilediği izlenmektedir. % 0,2 (F) petrol konsantrasyonunun bitki büyümesini kontrolle (A) göre yaklaşık % 50 indirdiği, % 0,3 (G) petrol konsantrasyonundan itibaren petrolün konsantrasyona bağlı olarak bitki yüzeyini zaman içerisinde tamamen kapladığı ve bitkilerin ölümüne sebep olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 2: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. gündeki genel görünüşü. A. % 0 (Kontrol), B. % 0,005, C. % 0,01, D. % 0,05, E. % 0,1, F. % 0,2, G. % 0,3, H. % 0,4, I. % 0,5

Şekil 4.3 de, Tablo 3.1 de belirtilen konsantrasyonlarda petrol içeren besiyeri ortamlarının 15 günlük uygulama süresinin sonunda negatif kontrol ortamlarındaki davranışı görülmektedir. Şekil 4.3 de görüldüğü gibi düşük konsantrasyonlarda [% 0,005 (B), % 0,01 (C), % 0,05 (D), % 0,1 (E)] ham petrolün yüzeye dağılımı homojen bir görünüm sergilemiştir. Buna karşılık olarak artan konsantrasyonlarla birlikte [% 0,2 (F), % 0,3 (G), % 0,4 (H), % 0,5 (I)] yoğunlaşan petrol tabakası daha çok merkezi kısımlardan başlamak üzere konsantrasyon artışına bağlı olarak kenarlara doğru yayılım göstermiştir.



Şekil 4. 3: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış negatif kontrol örneklerinin 15. gündeki genel görünüşü. A. % 0, B. % 0,005, C. % 0,01, D. % 0,05, E. % 0,1, F. % 0,2, G. % 0,3, H. % 0,4, I. % 0,5

Şekil 4.4 de 15 günlük deney süresinin sonunda petrol konsantrasyonlarının bitki kökleri üzerine olan etkisi görülmektedir. Bitki ve kök gelişimi açısından bakıldığında % 0,2 (F) petrol konsantrasyonu da dahil olmak üzere düşük petrol konsantrasyonlarının bitki gelişimini çok fazla etkilemediği saptanmıştır. Özellikle % 0,005 (B), % 0,01 (C), % 0,05 (D) ve % 0,1 (E) petrol konsantrasyonlarında kök gelişiminin kontrole (% 0) benzer bir büyüme gösterdiği gözlenmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4: Batman ham petrol konsantrasyonlarının 15. günün sonunda *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin kök büyümesi üzerine olan etkisi. A. % 0 (Kontrol) B. % 0,005, C. % 0,01, D. % 0,05, E. % 0,1, F. % 0,2, G. % 0,3, H. % 0,4, I. % 0,5. Bar uzunlukları 1 cm dir.

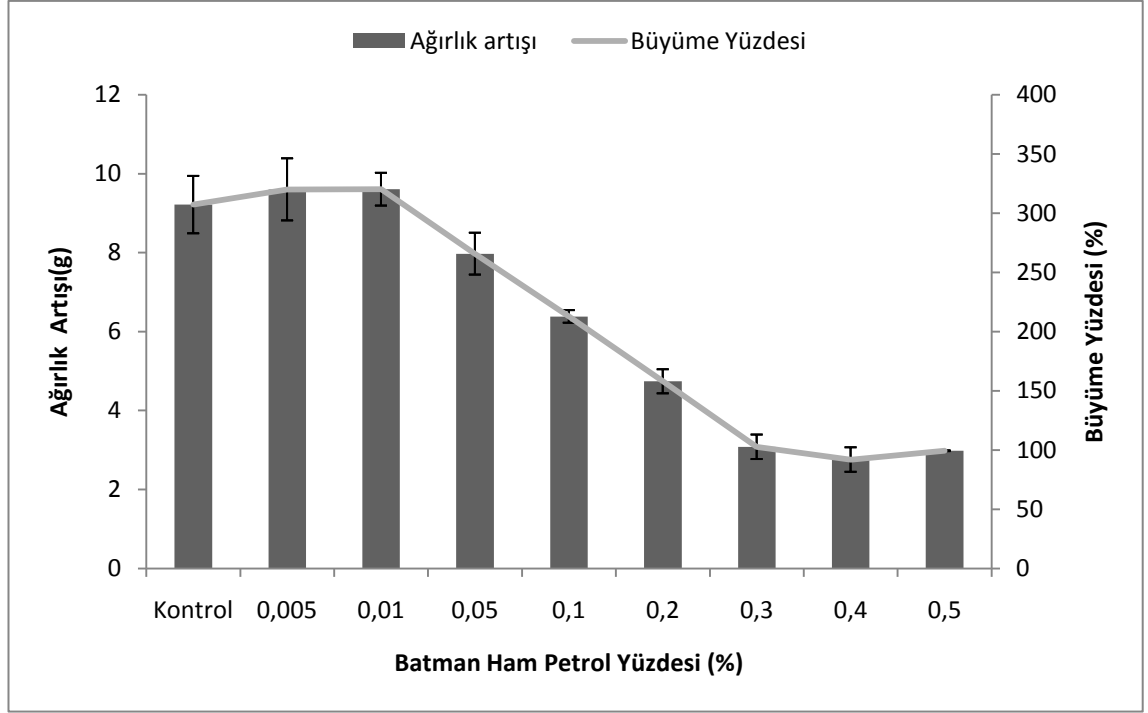
Şekil 4.2 ve Şekil 4.4 ten elde edilen veriler dikkate alındığında Batman ham petrol konsantrasyonlarının *Azolla filiculoides* Lam. bitkisi üzerindeki etkileri değerlendirilerek Tablo 4.1 de verilmiştir. Buna göre % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2 petrol konsantrasyonlarının 15 günlük deney süresi boyunca bitkiler için öldürücü etki yaratmadığı, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarının ise bitkilerin ölümüne sebep olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1: Batman ham petrol konsantrasyonlarının *Azolla filiculoides* üzerine olan etkileri.

(+ net büyüme, - büyüme yok)

Batman Ham Petrol Yüzdesi (%)	<i>Azolla filiculoides</i>
% 0,005	+
% 0,01	+
% 0,05	+
% 0,1	+
% 0,2	+
% 0,3	-
% 0,4	-
% 0,5	-

Petrol uygulaması öncesinde deney ortamlarına taze ağırlıkları alınarak konulan bitkilerin deney bitiminde tekrar taze ağırlıkları alınarak uygulanan petrol yüzdelерinin bitki büyümesi ve taze ağırlık artışları üzerine olan etkileri hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Şekil 4.5 te görüldüğü gibi 15 günlük deney süresinin sonunda kontrol (% 0) ortamında *Azolla filiculoides* bitkisi deneye başlanıldığında alınan taze ağırlığına göre % 307 lik bir artış göstermiştir. Bu da yaklaşık olarak bitkinin taze ağırlığının 7,5 günde 2 katına çıktığı sonucunu vermektedir. Diğer taraftan % 0,005 ve % 0,01 petrol konsantrasyonlarındaki büyüme yüzdelерinin % 320 olduğu saptanmıştır. Ancak istatistiki olarak bakıldığında bu büyümenin kontrole göre anlamlı bir fark yaratmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Artan konsantrasyonlarla birlikte (% 0,05, % 0,1, % 0,2) kontrole göre bitki büyüme yüzdesi de düşmektedir. Bu düşüş 15 günlük deney süresinin sonunda % 0,2 petrol uygulanan bitkilerde kontrole göre % 49 olarak belirlenmiştir. Deney süresinin bitiminde % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol uygulanan bitkilerde görülen sırasıyla 3,1, 2,8 ve 3 gramlık ağırlık artışlarının bitki büyümesinden daha çok bitki yüzeyinde biriken petrolün ağırlığının etkisi ile meydana geldiği söylenebilir (Şekil 4.5).

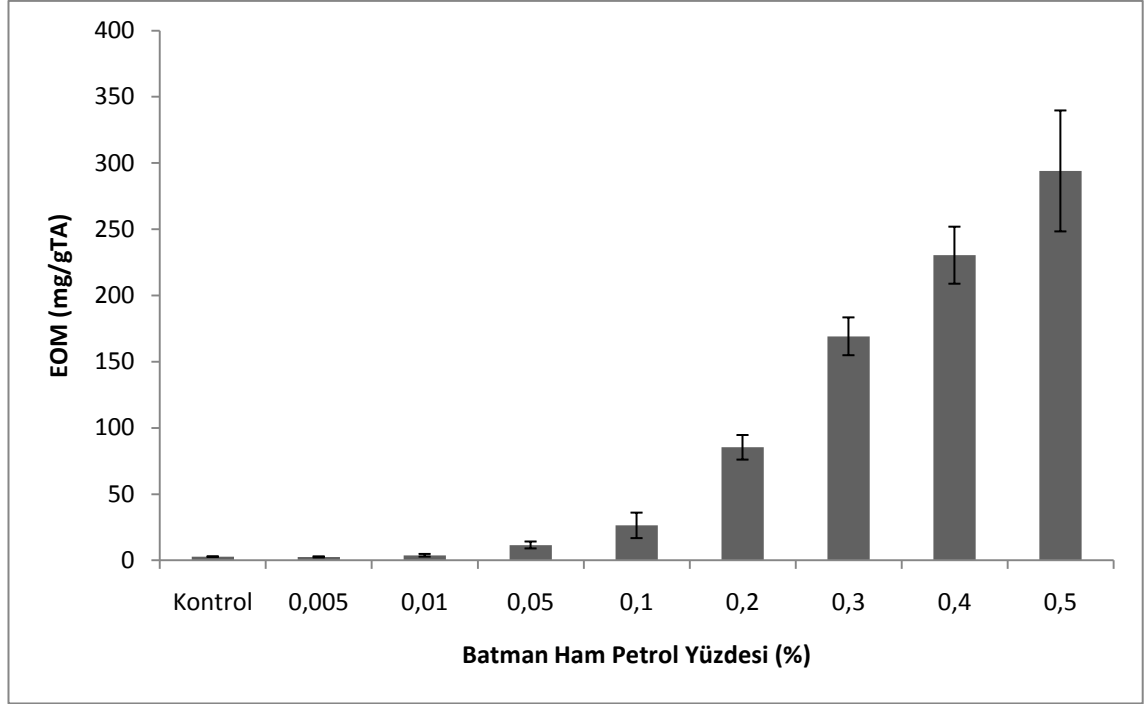


Şekil 4. 5: Batman ham petrol konsantrasyonlarının (% 0 - % 0,5) 15. günde bitki büyümesi ve ağırlık artışı üzerine etkisi. (p<0,0001).

4.2. PETROL HİDROKARBON ANALİZLERİ

4.2.1. Ekstrakte Organik Madde Miktarı (EOM)

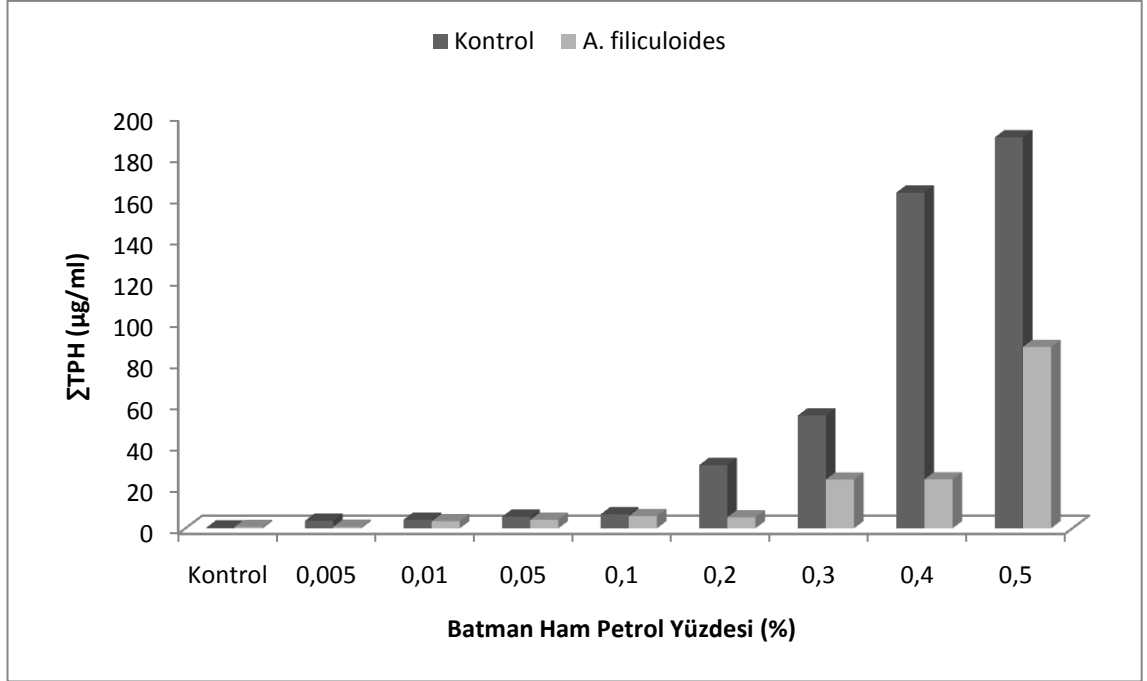
Deney süresinin sonunda uygulama ortamlarından alınarak; tartımları yapıldıktan sonra sıvı azotta dondurulan ve -80 °C de saklanan bitki örneklerinin organik madde miktarları belirlenmek üzere katı/sıvı ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen EOM miktarları Şekil 4.6 da verilmiştir. Kontrol (% 0) ile kıyaslandığında 15 günün sonunda elde edilen EOM miktarının % 0,005 petrol uygulamasında % 7,8 lik bir azalma gösterdiği, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol uygulamalarında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Şekil 4.6).



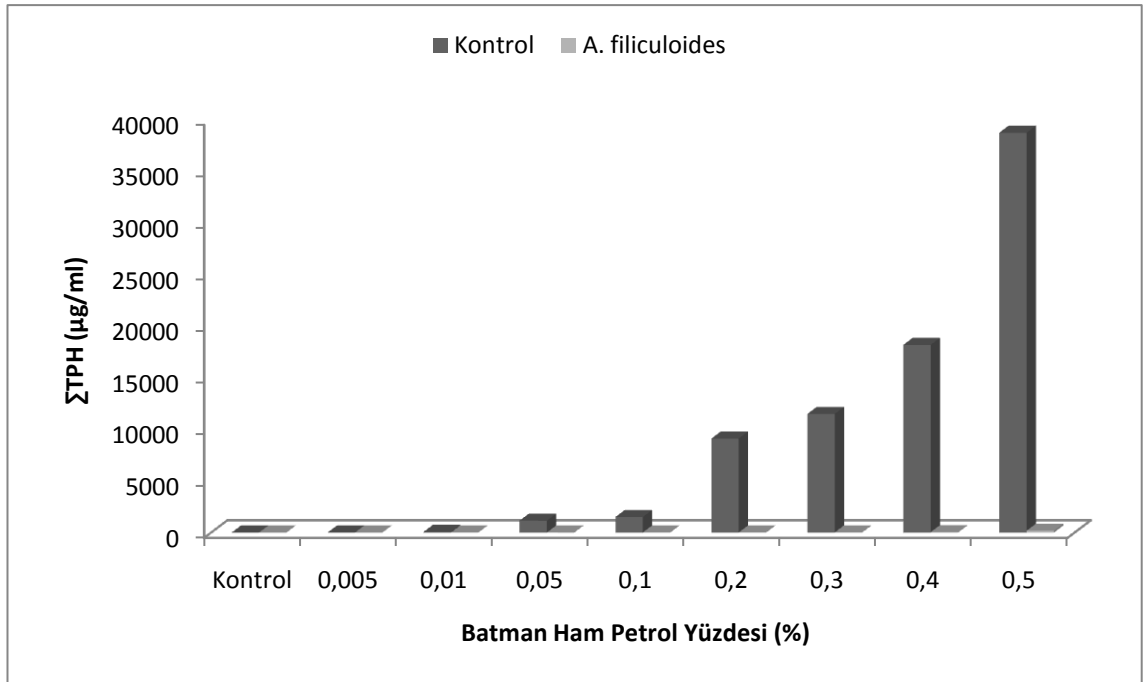
Şekil 4. 6: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitki örneklerinden 15. günde elde edilen ekstrakte organik madde (EOM) miktarları. ($p < 0,0001$).

4.2.2. UVF Yöntemiyle Toplam Petrol Hidrokarbonlarının (Σ TPH) Analizi

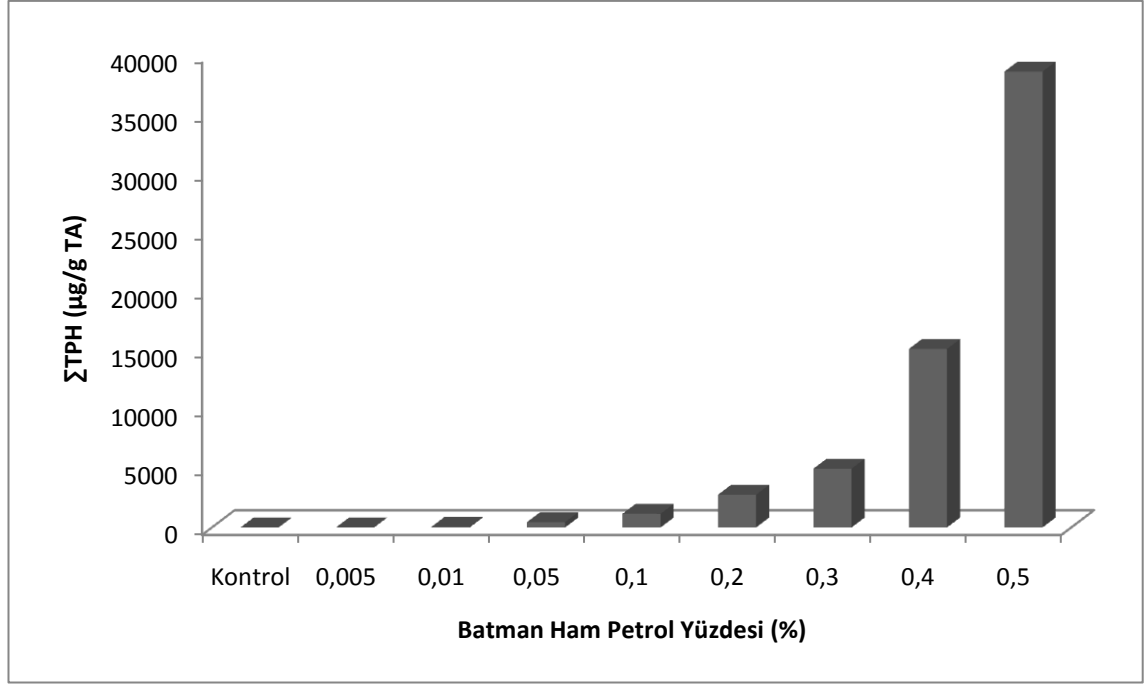
Azolla filiculoides Lam. bitkisine uygulanan petrol konsantrasyonları sonucunda negatif kontrol ve bitki büyüme ortamları ile bitkideki toplam petrol hidrokarbon miktarlarının belirlenebilmesi için ultraviyole florespektrofotometre (UVF) ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.7 – Şekil 4.9 ve Tablo 4.2 de verilmiştir. Bitkisiz büyüme ortamına (negatif kontrol) değişik konsantrasyonlarda petrol uygulandığı zaman (% 0, % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5) ortamda bulunan TPH miktarları uygulanan petrol konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Buna karşılık olarak bitki büyüme ortamlarının alt ve üst tabakasındaki TPH miktarlarının 15 günlük uygulama süresinin sonunda kontrole oranla belirgin şekilde düşüş gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.7, 4.8 ve Tablo 4.2). Aynı şekilde *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin büyüme ortamına uygulanan petrol konsantrasyonları sonucunda bitkideki TPH miktarlarının da artan petrol yüzdelere paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Tablo 4.2).



Şekil 4. 7: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol ve bitki deney gruplarının besiyerlerinin, 15. günde alt tabakalarındaki Σ TPH değerlerinin dağılımı. ($p < 0,0001$).



Şekil 4. 8: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol ve bitki deney gruplarının besiyerlerinin, 15. günde üst tabakalarındaki Σ TPH değerlerinin dağılımı. ($p < 0,0001$).



Şekil 4. 9: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait 15. günde Σ TPH değerlerinin dağılımı. ($p < 0,0001$).

Tablo 4. 2: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol ve bitki büyüme ortamları ile bitki örneklerine ait 15. gündeki Σ TPH değerlerinin dağılımı. ($p < 0,0001$).

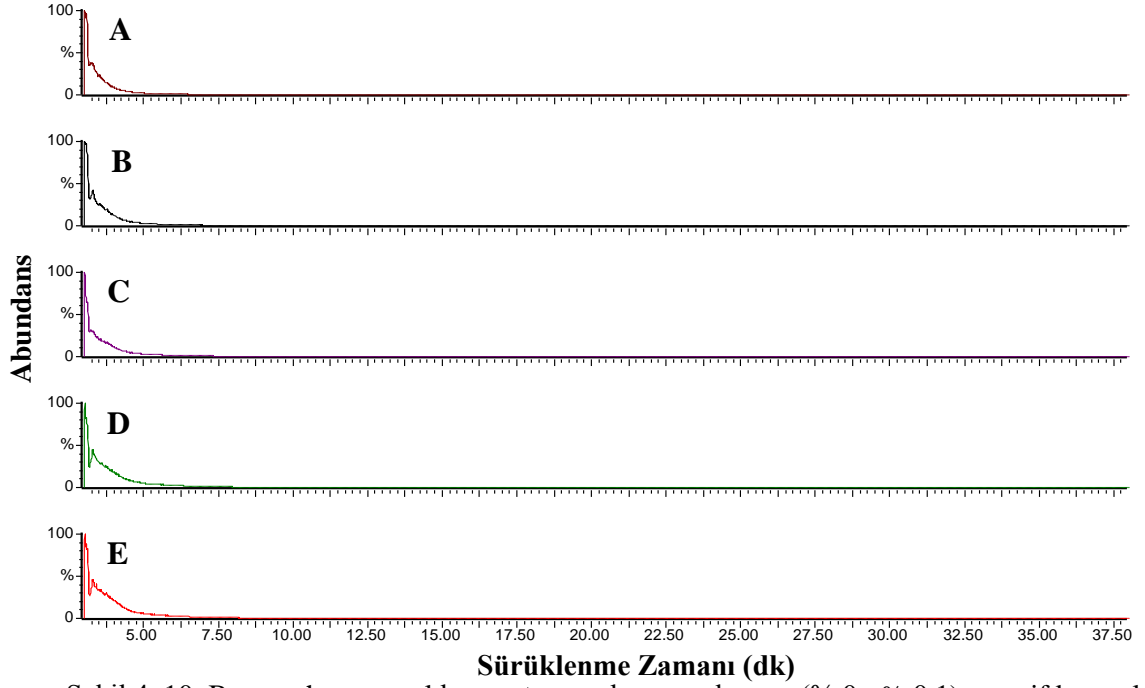
Petrol Yüzdesi (%)	Toplam Petrol Hidrokarbon Miktarı (Σ TPH)				
	Alt Kontrol (µg/ml)	Alt Bitki (µg/ml)	Üst Kontrol (µg/ml)	Üst Bitki (µg/ml)	Bitki (µg/gTA)
0	0,40 ± 0,02	0,72 ± 0,22	0,89 ± 0,07	0,96 ± 0,15	1,00 ± 0,22
0,005	3,71 ± 1,27	0,73 ± 0,12	1,26 ± 0,17	1,02 ± 0,37	1,81 ± 0,30
0,01	4,21 ± 0,51	3,44 ± 0,79	62,74 ± 8,82	3,88 ± 0,18	52,53 ± 16,35
0,05	5,65 ± 0,27	4,14 ± 0,85	1142,75 ± 433,72	2,08 ± 0,15	448,86 ± 87,57
0,1	6,81 ± 0,45	5,96 ± 0,72	1500,00 ± 76,85	6,69 ± 0,84	1152,54 ± 139,86
0,2	30,67 ± 3,71	5,34 ± 0,84	9095,98 ± 989,37	8,93 ± 0,87	2766,59 ± 390,62
0,3	54,69 ± 8,14	23,65 ± 2,14	11476,92 ± 1427,60	10,44 ± 1,65	4977,08 ± 452,75
0,4	162,72 ± 22,65	23,74 ± 2,06	18161,83 ± 4382,57	33,97 ± 2,00	15122,34 ± 3077,53
0,5	189,52 ± 24,75	87,92 ± 6,69	38706,09 ± 3241,49	169,64 ± 24,23	38618,38 ± 7031,14

4.2.3. GC-MS Analiz Bulguları

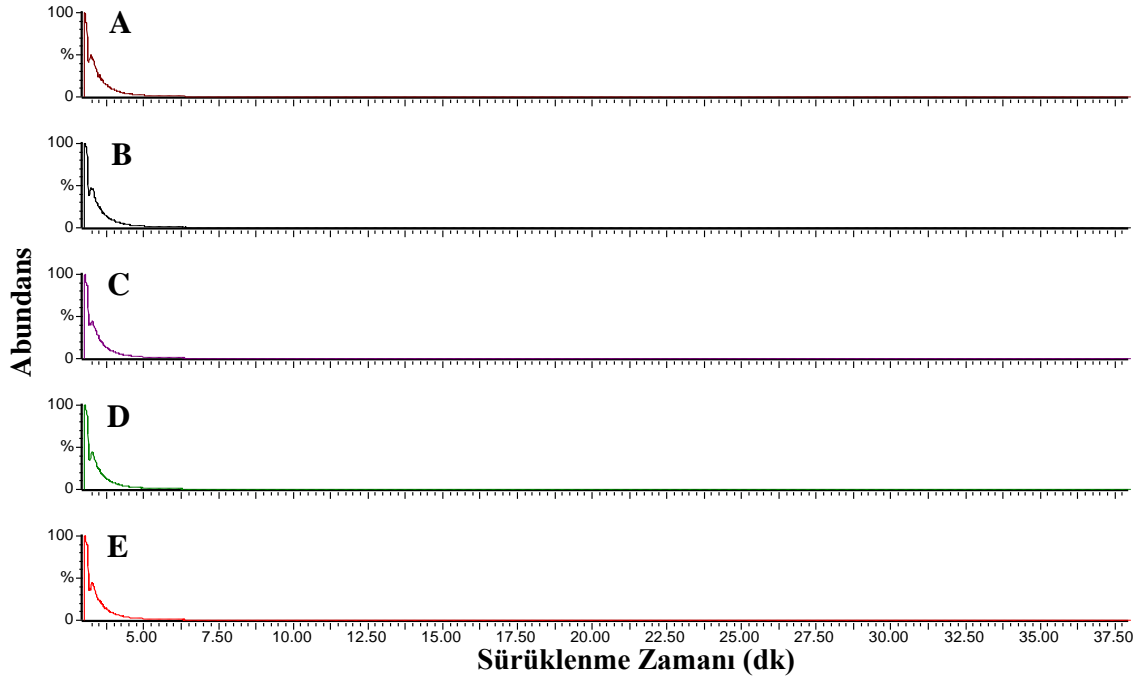
Deney süresinin bitiminde uygulanan petrol konsantrasyonlarında bitki ve bitki besiyerleri ile negatif kontrol ortamlarındaki petrolün davranışının görülebilmesi amacıyla örneklerin GC-MS analizleri yapılmış ve Total İyon Kromatogramları (TIC) belirlenmiştir. Öncelikli olarak petrol biyodegradasyonun belirlenebilmesi için hedef iyon 57 (m/z) ye göre kromatogramlarda isoprenoid oranları hesaplanmış ve örneklerdeki (besiyerleri ve bitki) alifatik hidrokarbon miktarları saptanmıştır. Deney gruplarının içerdikleri aromatik hidrokarbonların da miktar tayini yapılmıştır.

4.2.3.1. Total İyon Kromatogramları (TIC)

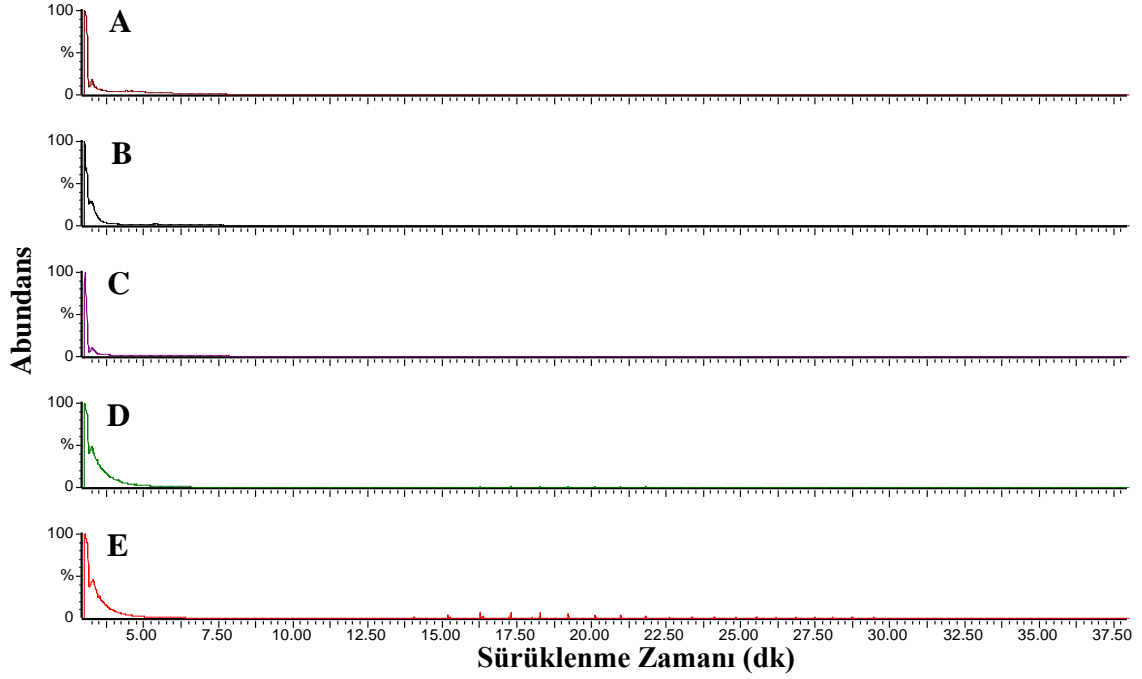
Azolla filiculoides Lam. bitkisi ve negatif kontrol besiyerlerine uygulanan % 0, % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3 , % 0,4 ve % 0,5 ham petrol konsantrasyonlarına ait TIC Şekil 4.10 - 19 arasında verilmiştir. % 0, % 0,005 ve % 0,01 petrol uygulanmış numunelere ait GC-MS kromatogramlarında, petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait piklere rastlanılmamıştır (Şekil 4.10 – Şekil 4.13 ve Şekil 4.18 A, B, C). % 0,05 petrol uygulamasından başlayarak artan tüm konsantrasyonların üst fazına ait negatif kontrol numunelerinin Total İyon Kromatogramlarında, petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait pikler ($nC_{14} - nC_{35}$) görülmüştür (Şekil 4.12 ve Şekil 4.16). Ancak, bitkili deney seti numunelerinde söz konusu pikler ($nC_{12} - nC_{35}$) üst faz besiyeri numunelerinin uygulanan konsantrasyonlarında görülmemektedir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.17).



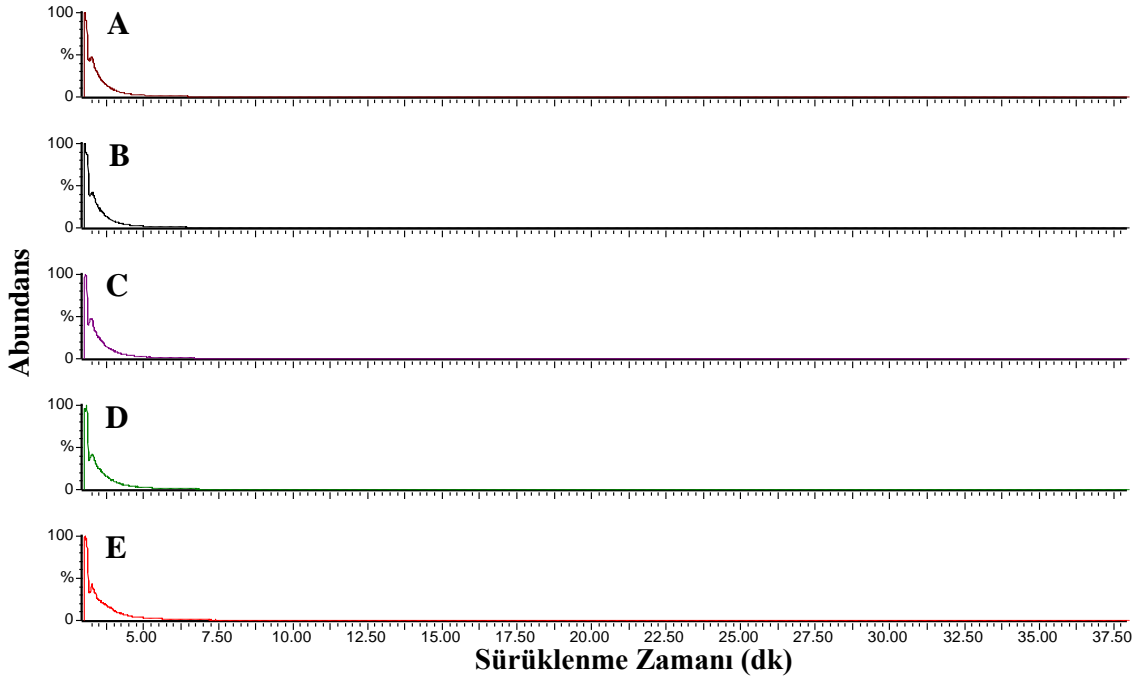
Şekil 4. 10: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) negatif kontrol örneklerinin alt tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,005 **C.** % 0,01 **D.** % 0,05 **E.** % 0,1



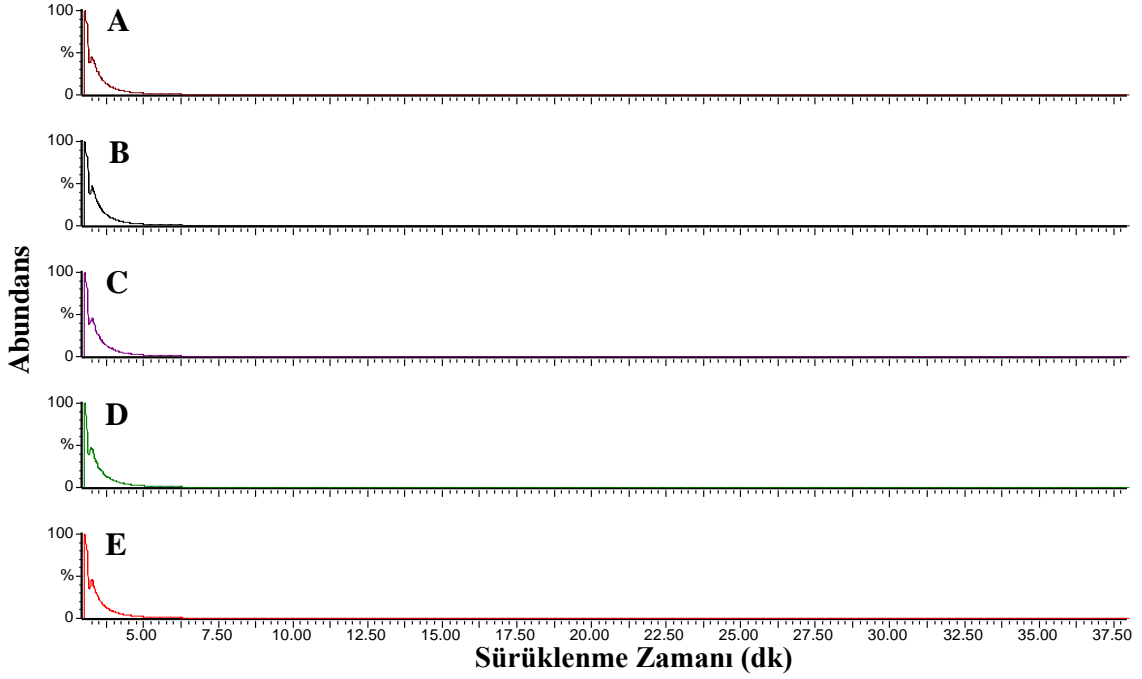
Şekil 4. 11: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının alt tabakasına ait 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,005 **C.** % 0,01 **D.** % 0,05 **E.** % 0,1



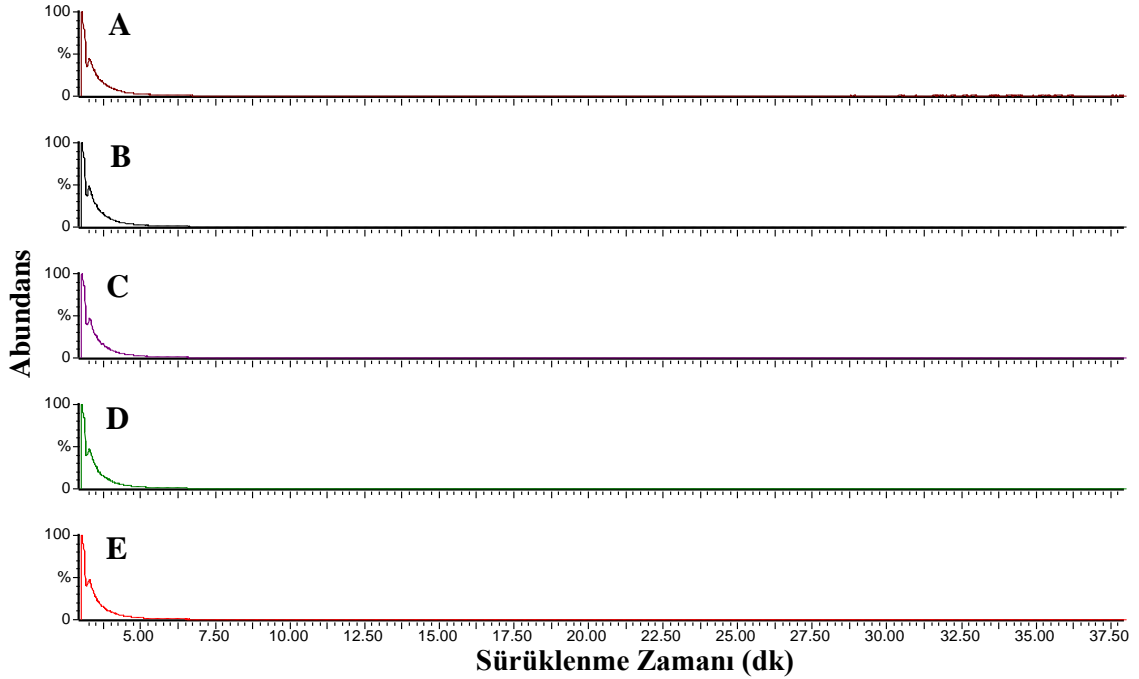
Şekil 4. 12: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) negatif kontrol örneklerinin üst tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,005 **C.** % 0,01 **D.** % 0,05 **E.** % 0,1



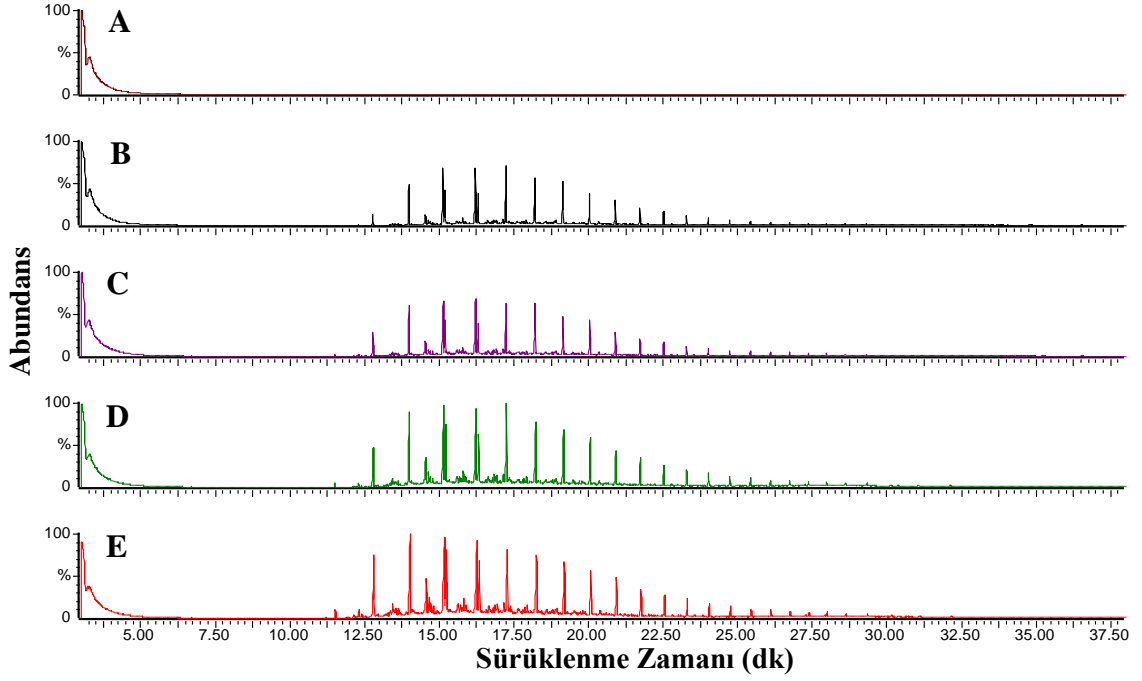
Şekil 4. 13: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının üst tabakasına ait 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.**%0 **B.** % 0,005 **C.** % 0,01 **D.** % 0,05 **E.** % 0,1



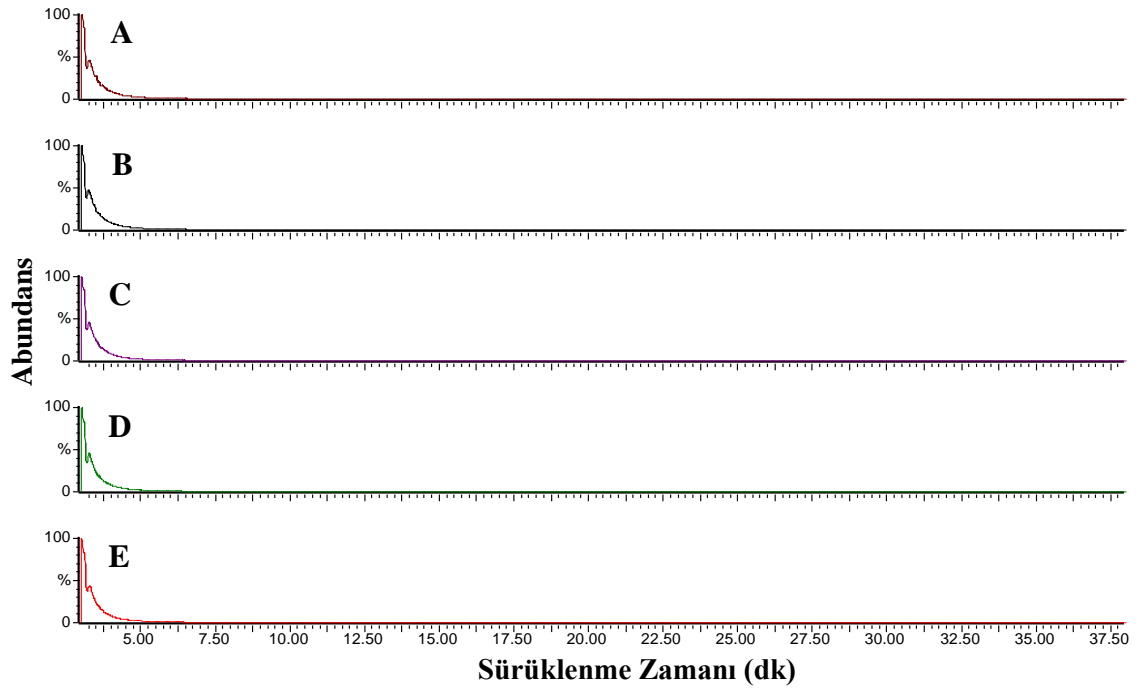
Şekil 4. 14: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin alt tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,2 **C.** % 0,3 **D.** % 0,4 **E.** % 0,5



Şekil 4. 15: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının alt tabakasına ait 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.**%0 **B.** % 0,2 **C.** % 0,3 **D.** % 0,4 **E.** % 0,5



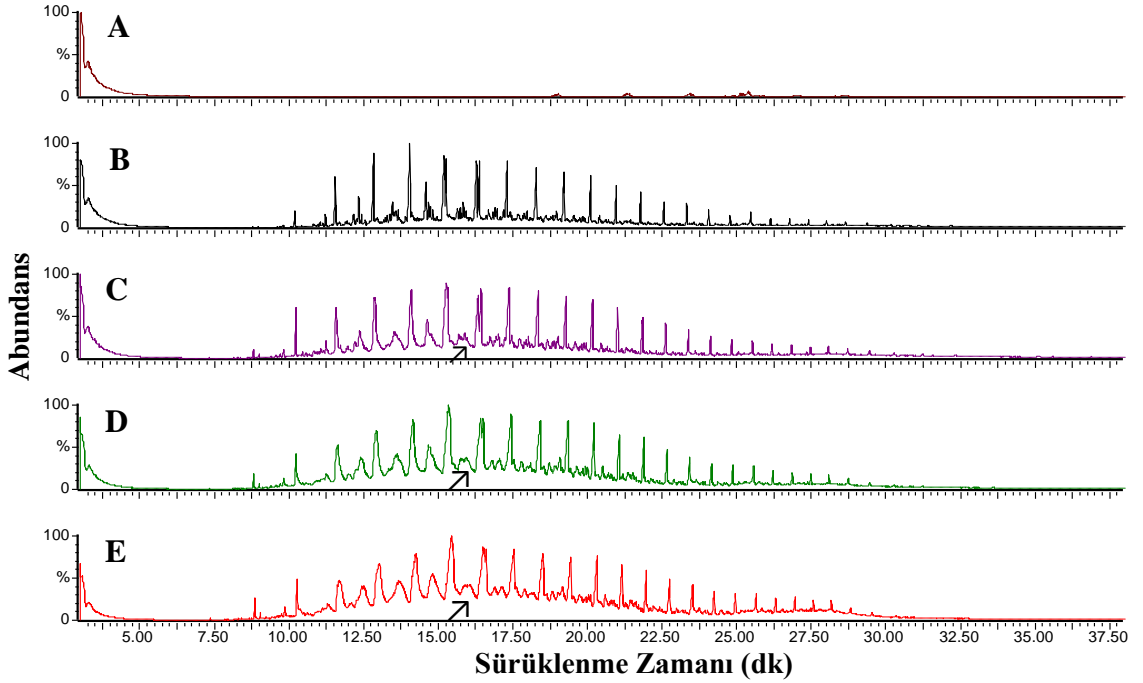
Şekil 4. 16: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin üst tabakasına ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,2 **C.** % 0,3 **D.** % 0,4 **E.** % 0,5



Şekil 4. 17: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin büyüme ortamlarının üst tabakasına ait 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,2 **C.** % 0,3 **D.** % 0,4 **E.** % 0,5



Şekil 4. 18: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,1) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. A. % 0 B. % 0,005 C. % 0,01 D. % 0,05 E. % 0,1

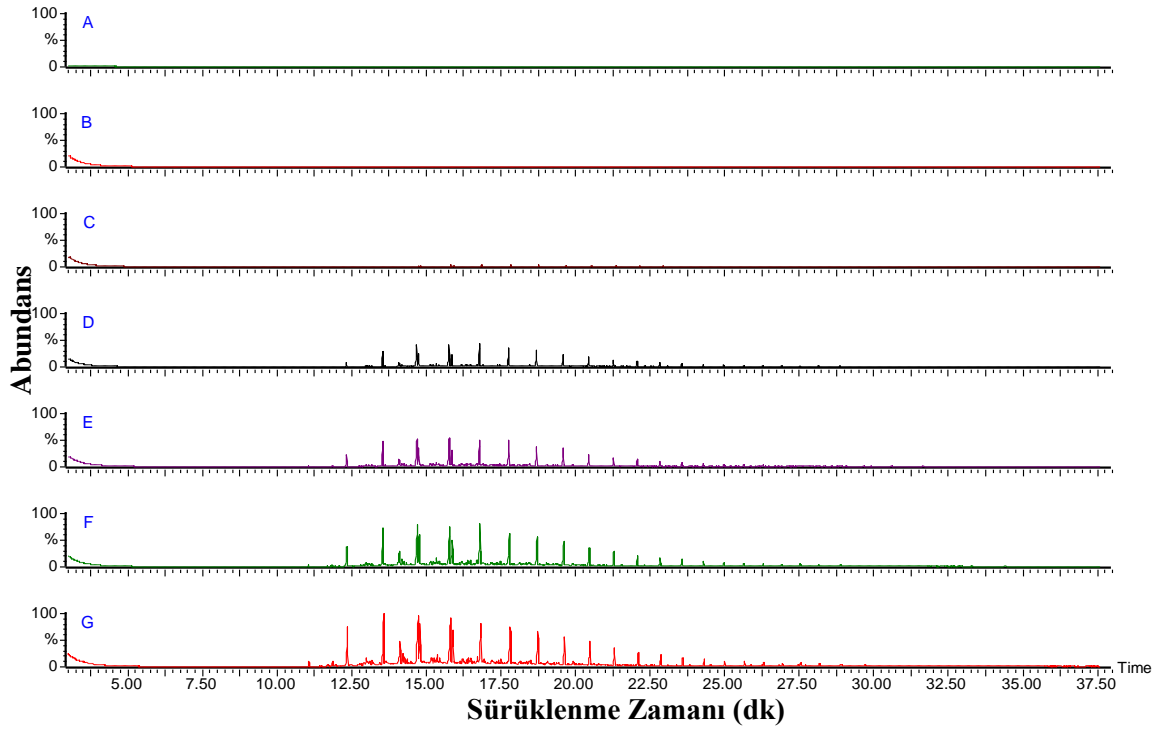


Şekil 4. 19: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. A. % 0 B. % 0,2 C. % 0,3 D. % 0,4 E. % 0,5. “↗”işareti UCM (çözünmemiş kompleks karışım) yi göstermektedir. UCM ayrışma süreci içerisinde degradasyona uğrayacak olan petrol hidrokarbon karışımlarına ait eğri (hump) yi tanımlamaktadır.

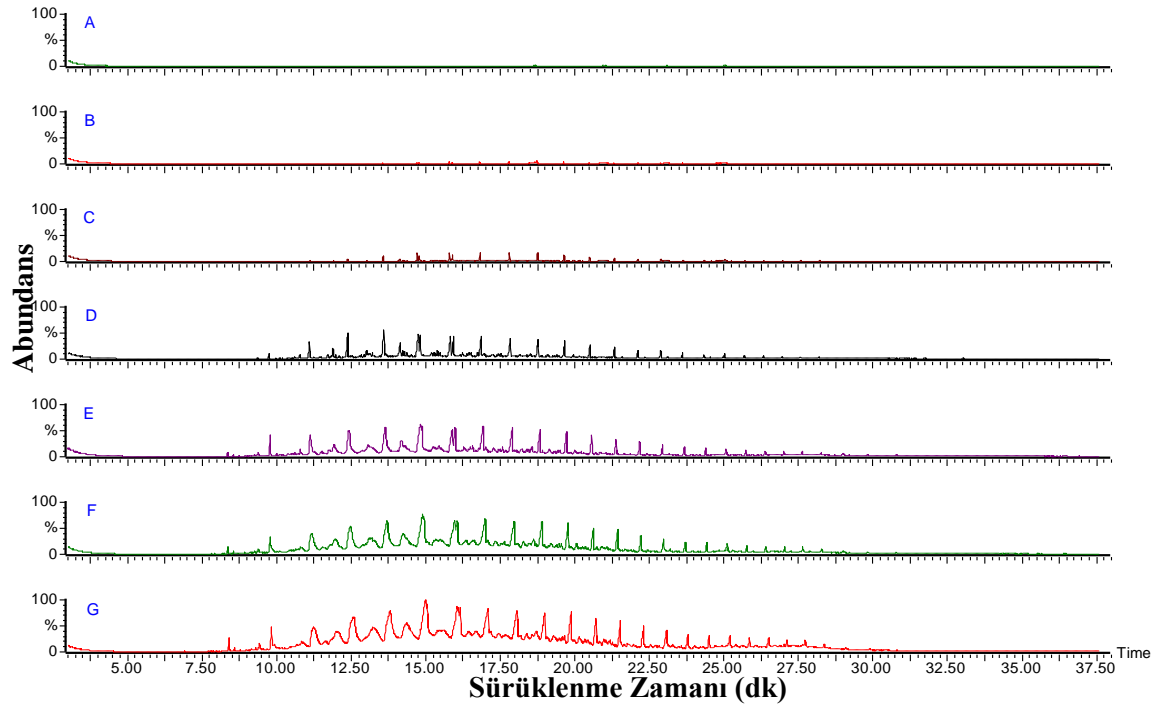
GC-MS analizi ile elde edilen Total İyon Kromatogramları incelendiğinde uygulanan petrol konsantrasyonlarında bitki büyüme ortamlarının ve negatif kontrol serilerinin alt tabakalarının hiçbirinde petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait piklere rastlanılmamıştır (Şekil 4.10, 4.11, 4.14 ve 4.15). Ayrıca uygulanan petrol konsantrasyonlarında bitki besiyerlerinin üst tabakasına ait örneklerde de petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait piklere rastlanılmamıştır (Şekil 4.13 ve 4.17). Diğer taraftan % 0,05 petrol uygulamasından başlayarak artan tüm konsantrasyonların üst fazına ait negatif kontrol numunelerinin Total İyon Kromatogramlarında, petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait pikler görülmüştür (Şekil 4.12 D,E ve Şekil 4.16 B,C,D,E). Bitki örneklerine ait TIC incelendiğinde Şekil 4.18 D,E ve Şekil 4.19 B,C,D,E örneklerinde petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait pikler görülmektedir.

Bu sebeple bu aşamadan itibaren gerek alifatik hidrokarbonlar ve isoprenoid oranları ($C_{17}:Pr$, $C_{18}:Ph$ ve $Pr:Ph$) ve gerekse aromatik hidrokarbonlara ait değerlendirmelerde, negatif kontrol ortamının üst tabakası ile bitki örnekleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla negatif kontrol ve bitki örneklerinde karşılaştırılan ham petrol konsantrasyonlarını şu şekilde sıralayabiliriz; % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5.

Bu sonuçlara göre elde edilen negatif kontrol (kontrol) ve bitki örneklerine ait Total İyon Kromatogramları Şekil 4.20 ve Şekil 4.21 de verilmiştir.



Şekil 4. 20: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) negatif kontrol örneklerinin 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,05 **C.** % 0,1 **D.** % 0,2 **E.** % 0,3 **F.** % 0,4 **G.** % 0,5



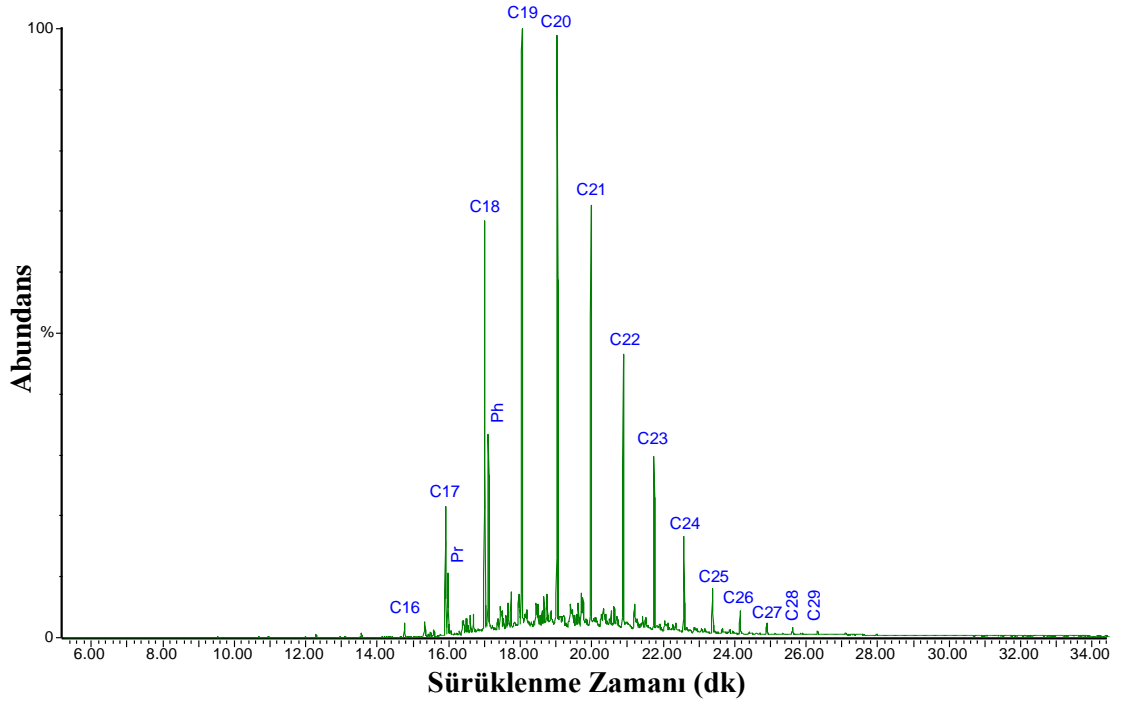
Şekil 4. 21: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. gündeki TIC kromatogramları. **A.** % 0 **B.** % 0,05 **C.** % 0,1 **D.** % 0,2 **E.** % 0,3 **F.** % 0,4 **G.** % 0,5

4.2.3.2. Batman Ham Petrol Uygulaması ile Bitki ve Kontrol Örneklerinde Tespit Edilen n-Alkan Dağılımları

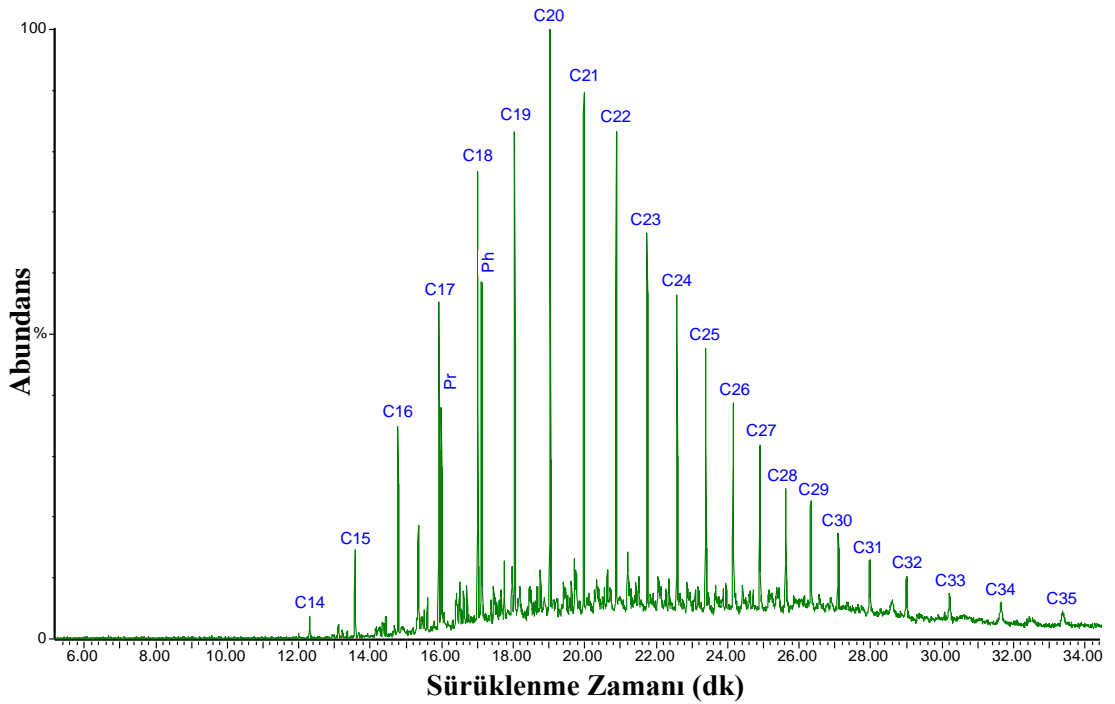
Azolla filiculoides Lam. bitkisine 15 gün süre ile uygulanan Batman ham petrol konsantrasyonlarının kontrol ve bitki numunelerindeki alifatik (n-alkan) fraksiyonlarının, 57 (m/z) iyon kromatogramlarındaki piklerinin karşılaştırılması yapılmış, alifatik zincirdeki kayıplar araştırılmış ve ayrıca biyolojik degradasyon belirteci olarak kullanılan isoprenoid oranlarında meydana gelen değişimler değerlendirilmiştir.

n-Alkan Piklerinin Kalitatif Dağılımları

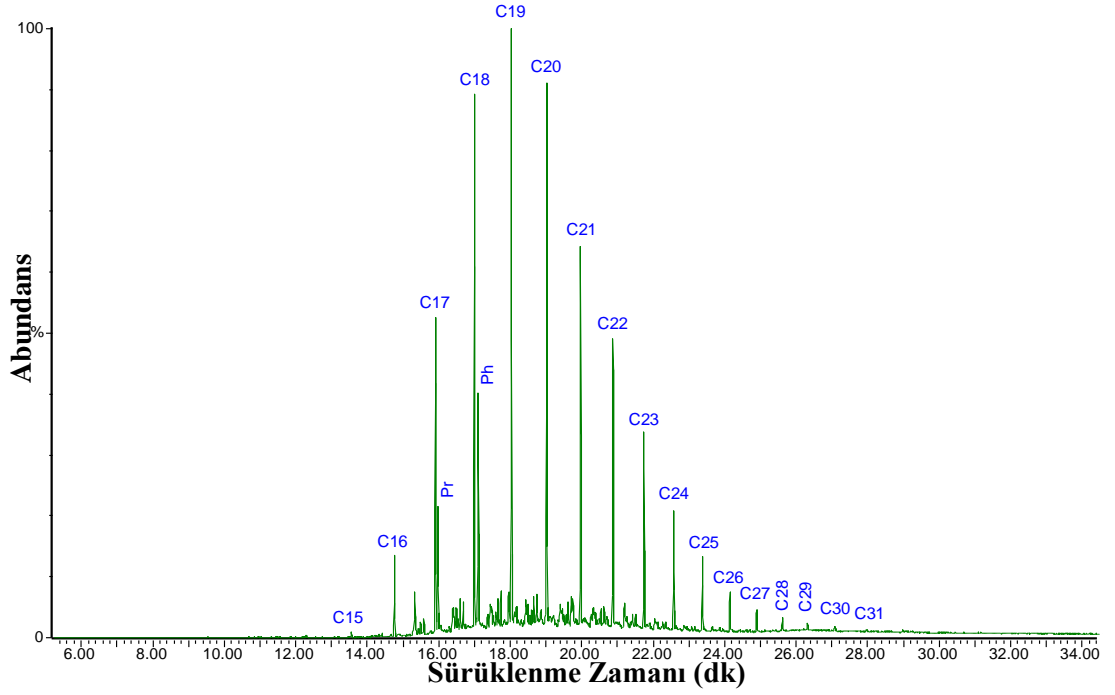
Azolla filiculoides bitkisine Batman ham petrol uygulaması sonucunda elde edilen numunelere kolon kromatografisi uygulanarak örneklerdeki alifatik (n-alkan) fraksiyonlar alınmıştır. Örneklerin GC-MS analizinden elde edilen alifatik zincire ait n-alkan dizilişi ve isoprenoidlerin kalitatif dağılımı Şekil 4.22 – 33 de verilmiştir.



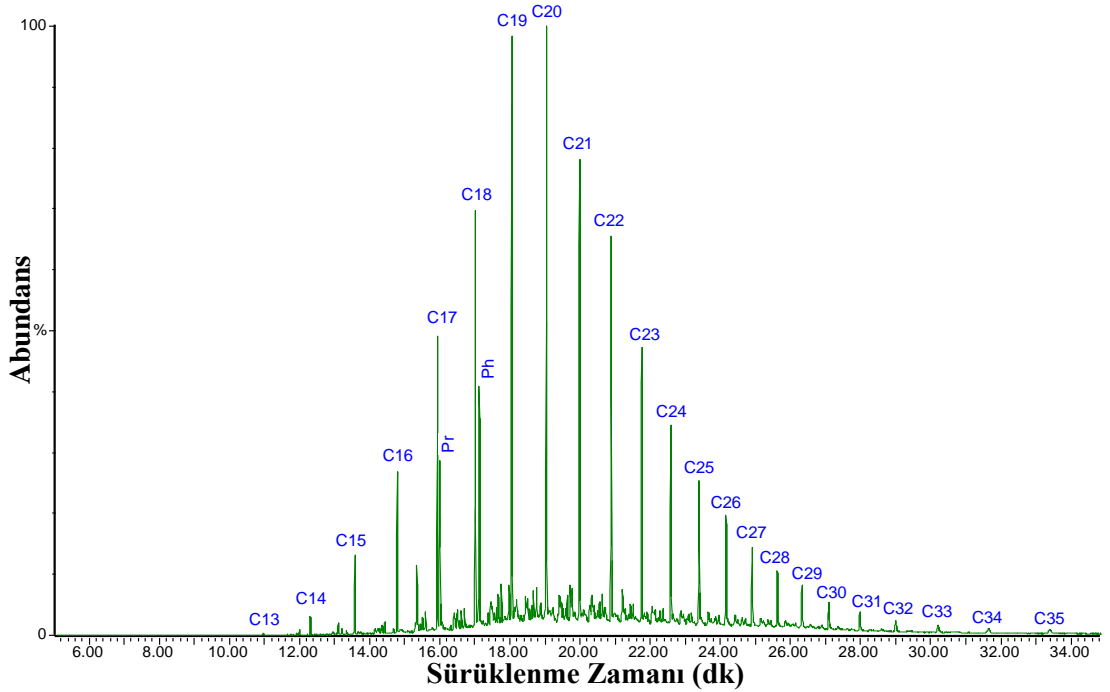
Şekil 4. 22: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



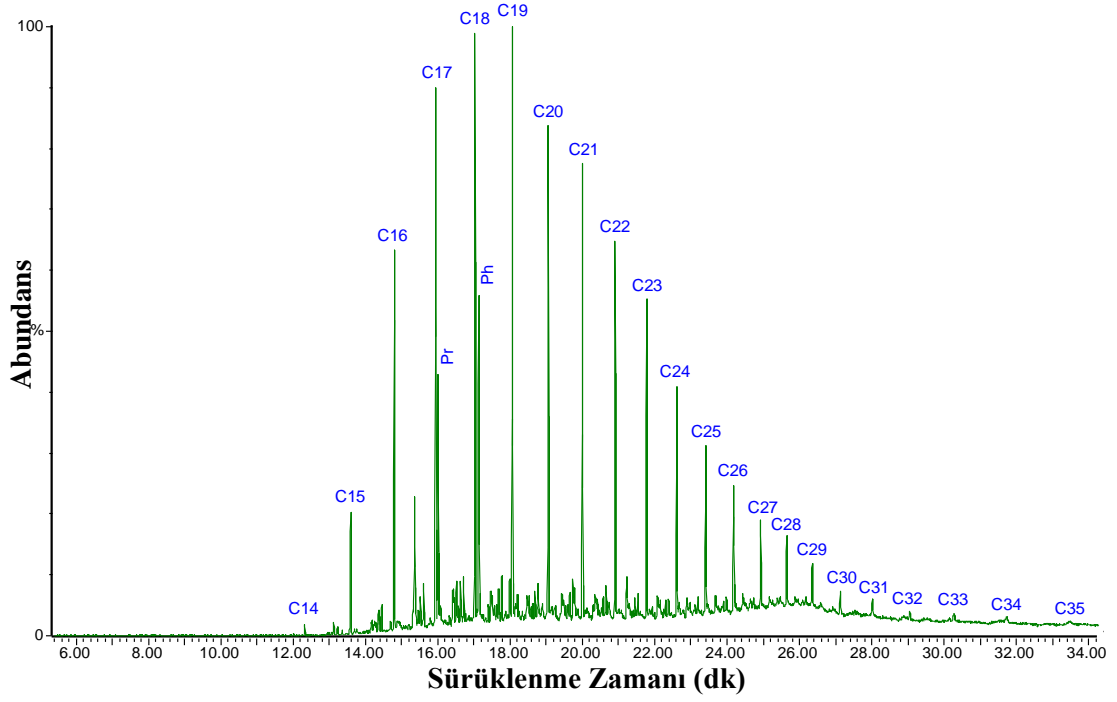
Şekil 4. 23: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



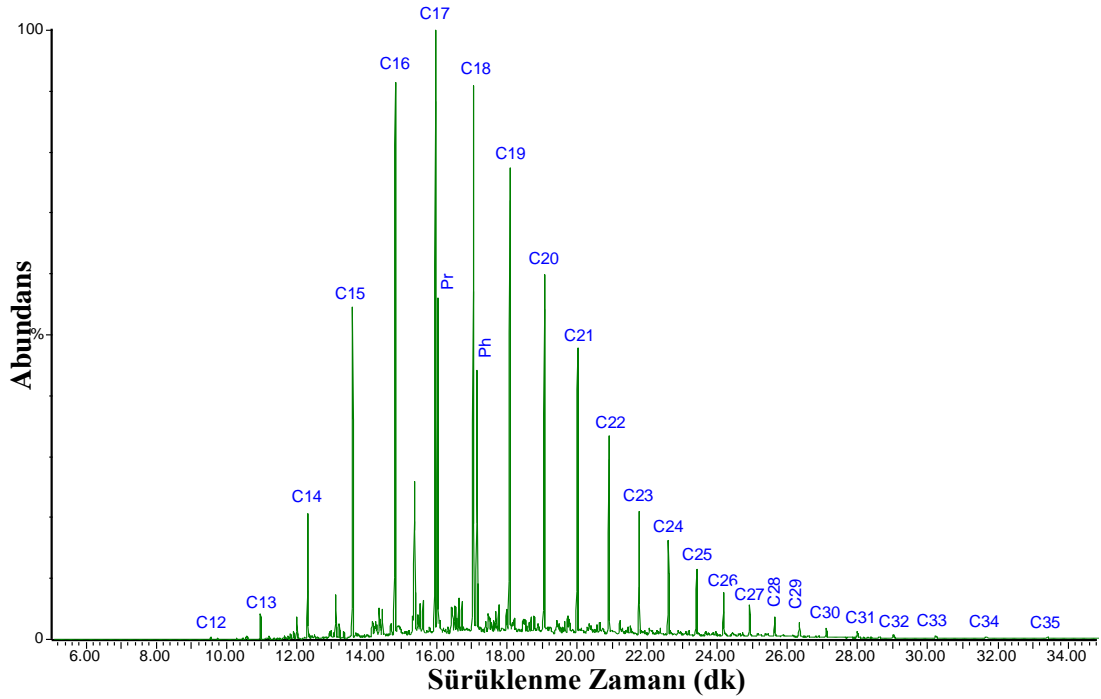
Şekil 4. 24: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



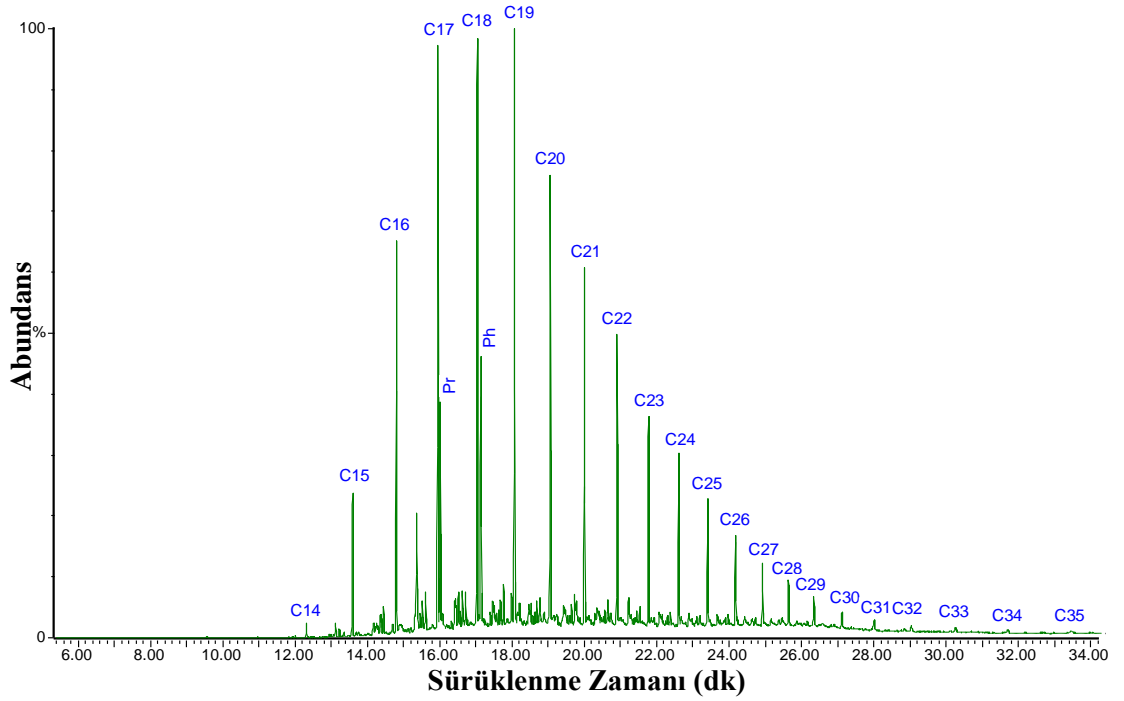
Şekil 4. 25: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



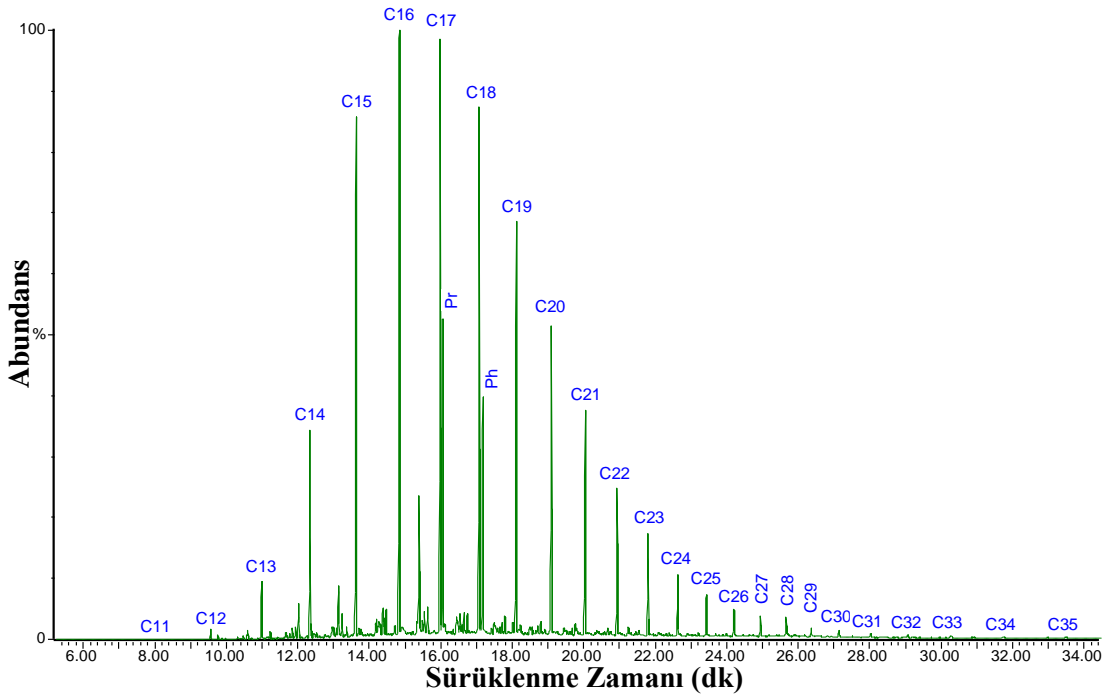
Şekil 4. 26: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



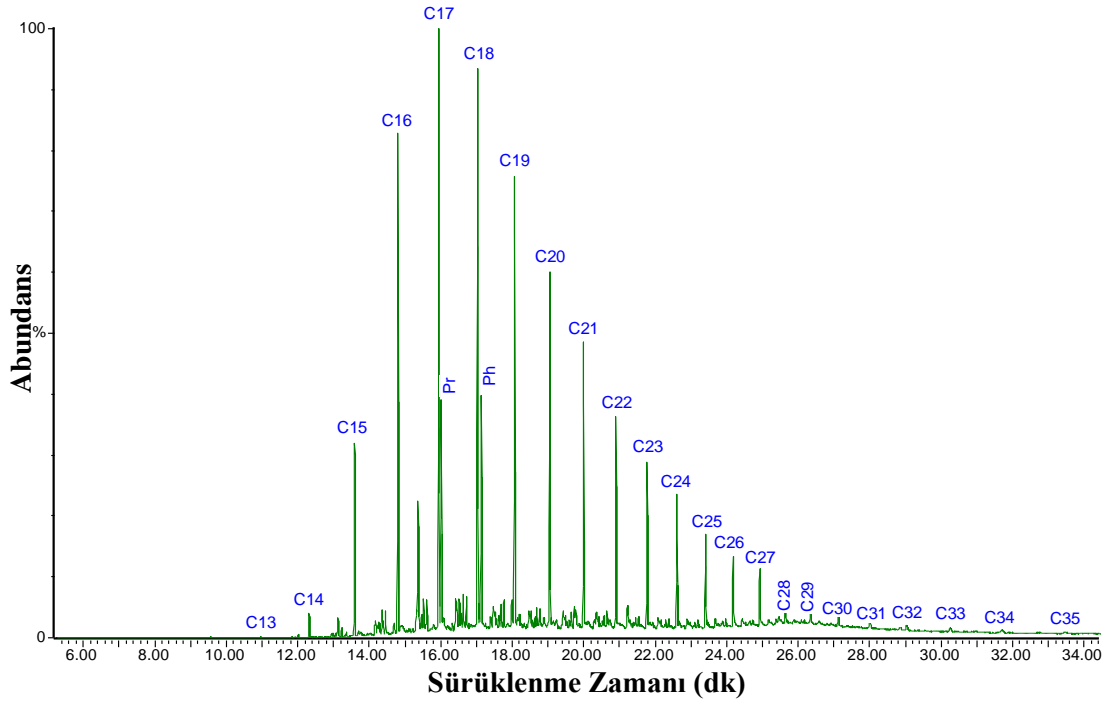
Şekil 4. 27: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



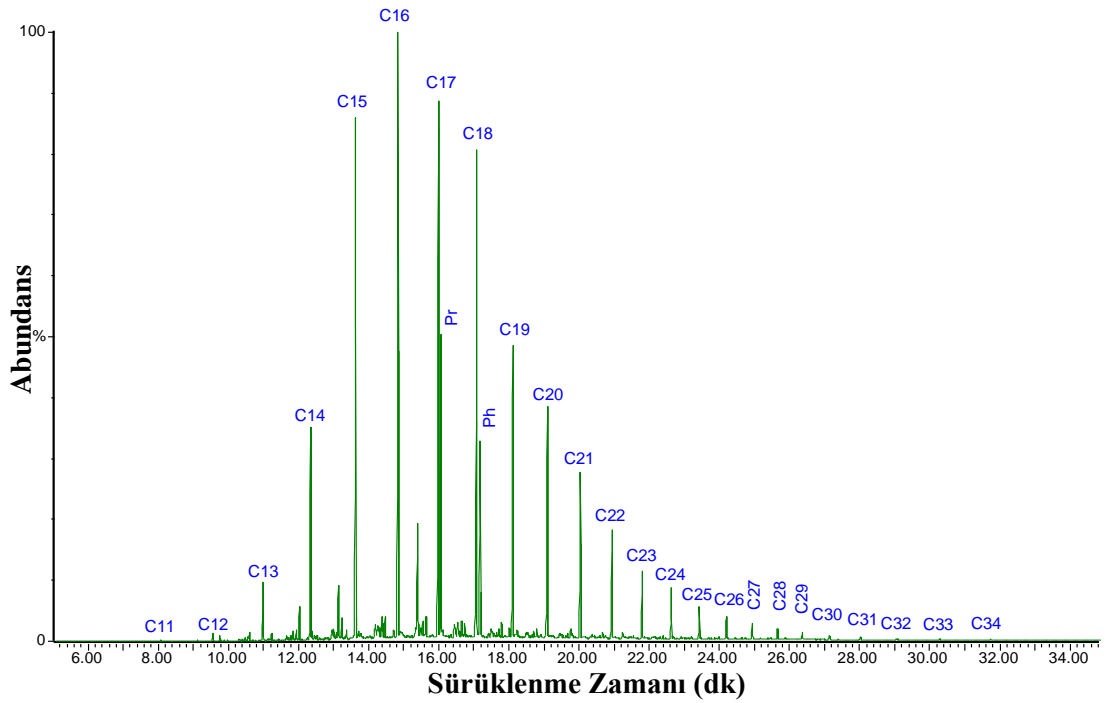
Şekil 4. 28: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



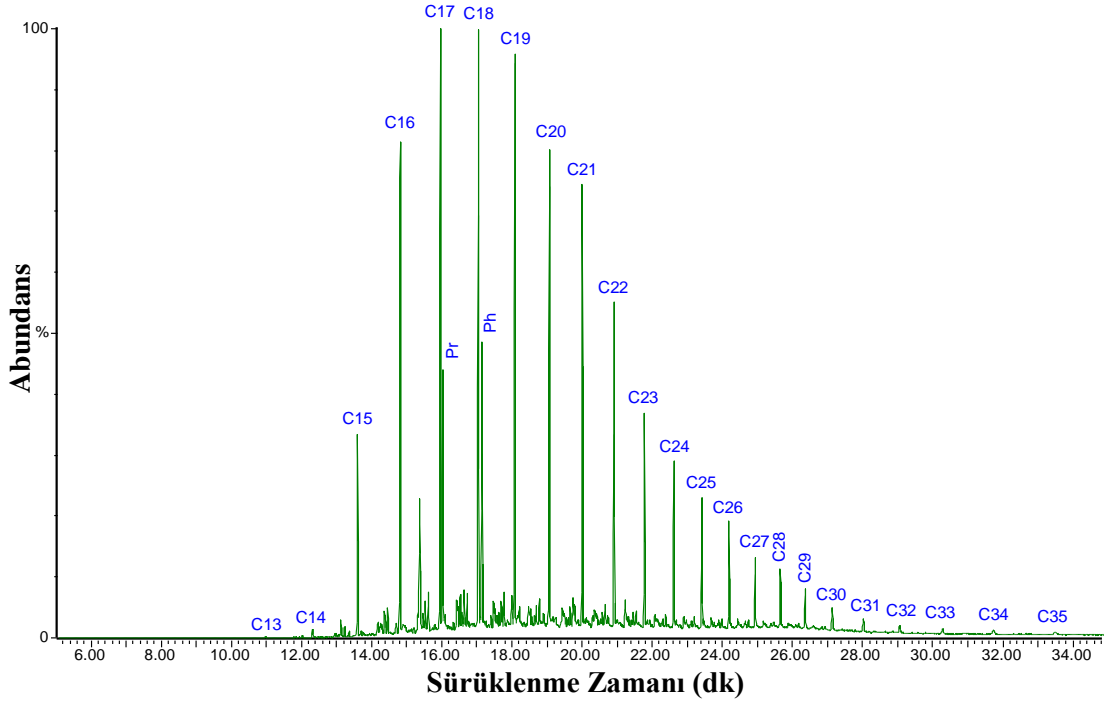
Şekil 4. 29: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



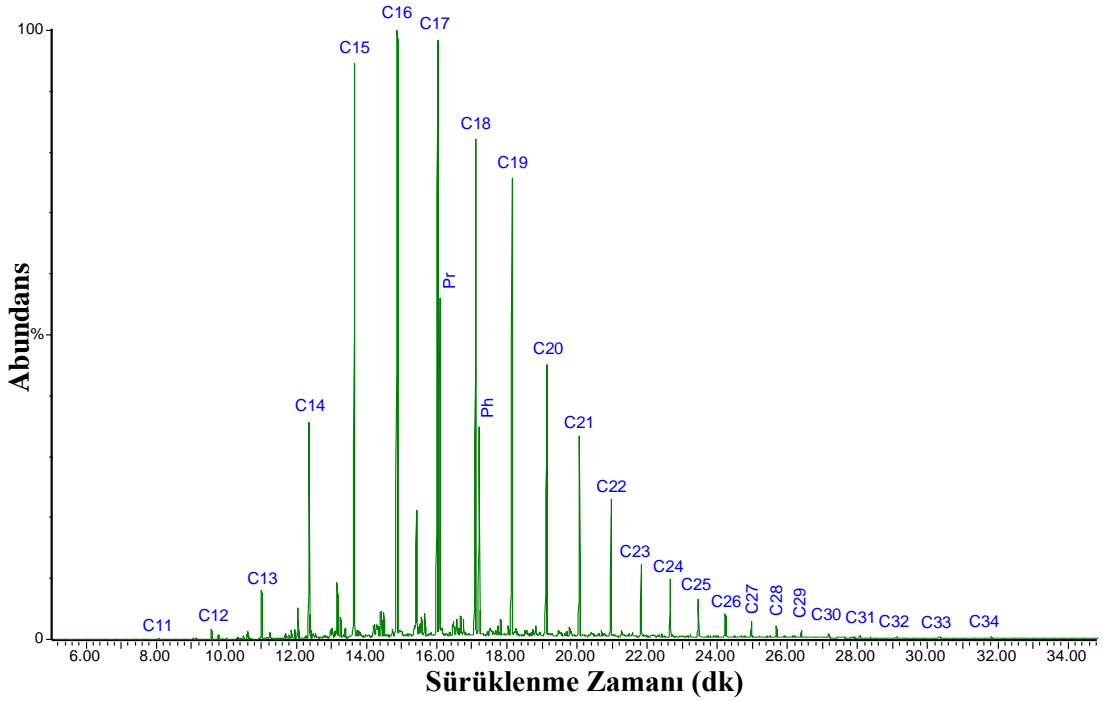
Şekil 4. 30: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



Şekil 4. 31: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



Şekil 4. 32: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol örneğinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan



Şekil 4. 33: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin 15. günde, alifatik zincire ait n-alkan ve isoprenoid dizilişini gösterir GC-MS kromatogramı. Pr: Pristan, Ph: Fitan

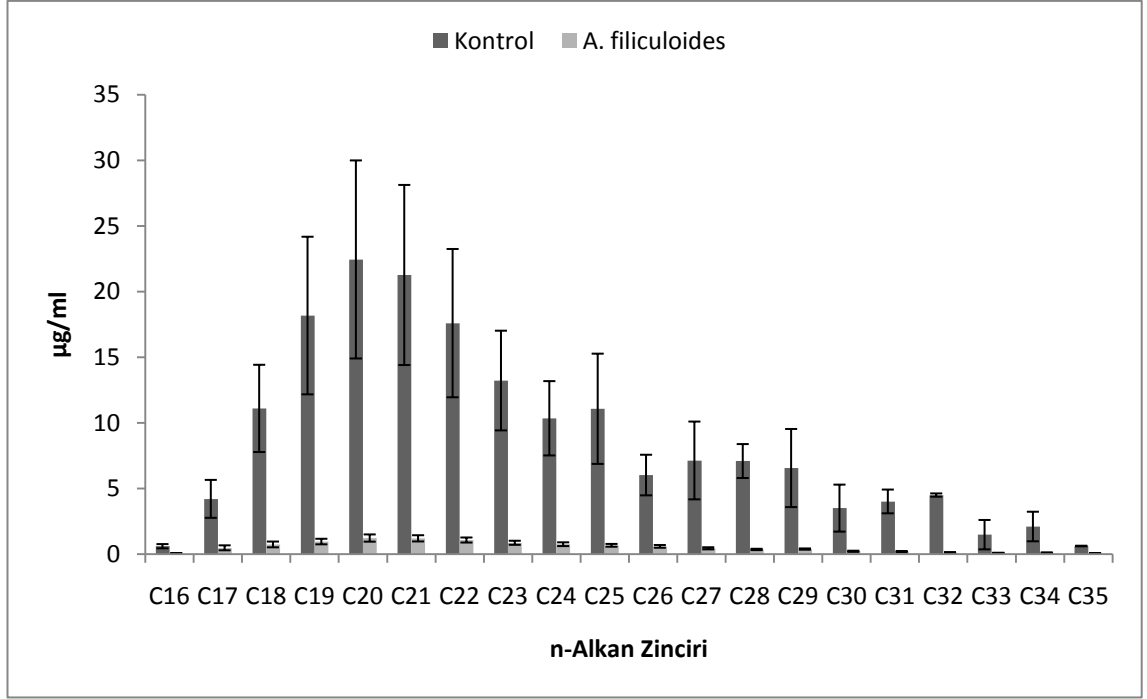
Şekil 4.22 – 33 de verilen alifatik zincire ait n-alkan dizilişi ve isoprenoidlerin kalitatif dağılımını gösteren GC-MS 57 (m/z) iyon kromatogramlarına göre örneklerde görülen ilk karbon sayıları Tablo 4.3 de verilmiştir.

Tablo 4. 3: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) bitki ve kontrol örneklerinin 15. günde, alifatik fraksiyonlarına ait GC/MS kromatogramlarında görülen ilk karbon sayıları.

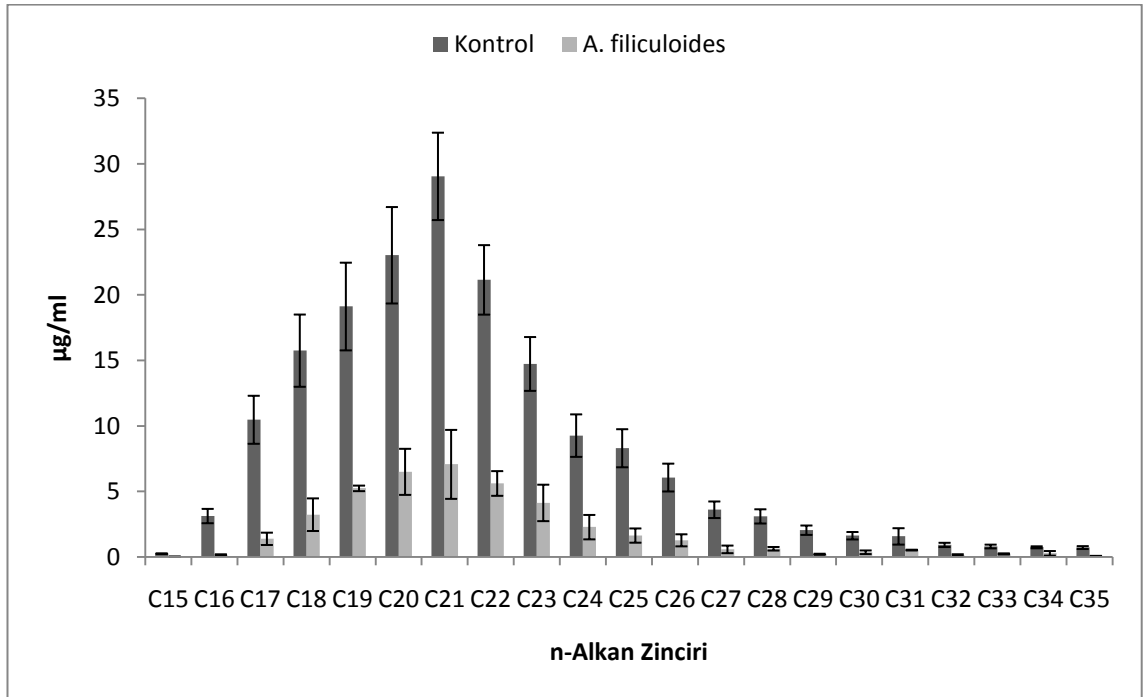
	Batman Ham Petrol Konsantrasyonu (%)					
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Kontrol	16	15	14	14	13	13
<i>Azolla filiculoides</i>	14	13	12	11	11	11
Görülen İlk Karbon Sayısı (nC_x)						

Alifatik Hidrokarbonların Kantitatif Dağılımı

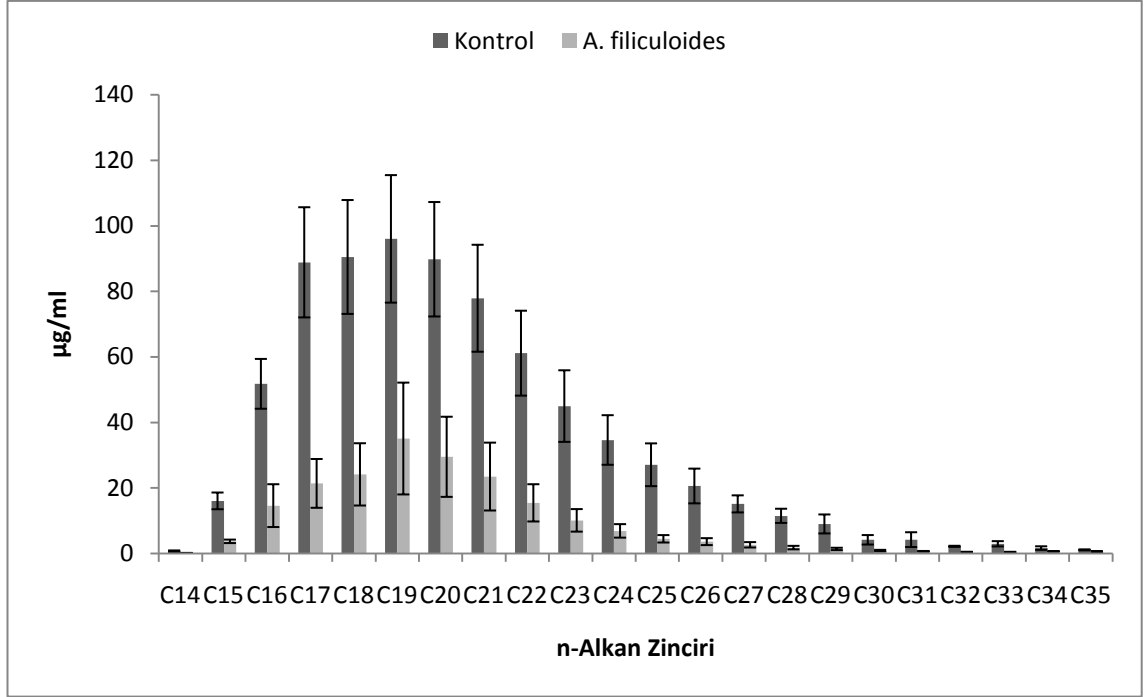
Örneklerin GC-MS analizinden elde edilen alifatik hidrokarbon miktarları, Şekil 4.34 – Şekil 4.39 da verilmiştir. 15 günlük uygulama süresinin bitiminde kontrol ve bitki örneklerinin n-alkan zinciri incelendiğinde petrol konsantrasyonu arttıkça örneklerin içerdikleri alkan miktarlarının da buna paralel olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Kontrol örneklerinin içermiş oldukları en yüksek alkan miktarları % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonları için 19 – 22 (18 µg/ml – 29 µg/ml) arasında karbon atomu içeren alkan bileşiklerinde belirlenirken % 0,2 petrol konsantrasyonu için 17 – 21 (88 µg/ml – 96 µg/ml), % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonları için ise 16 – 21 (167 µg/ml – 357 µg/ml) arasında karbon atomu içeren alkan bileşiklerinde saptanmıştır (Şekil 4.34 – 39). Diğer taraftan alkanların, bitki örneklerinde özellikle % 0,05 petrol konsantrasyonunda neredeyse tamamen tükendiği saptanmıştır (Şekil 4.34). Bitki örneklerinin n-alkan miktarlarının % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında ise kontrole oranla belirgin şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.35 ve Şekil 4.36). Uygulanan % 0,005, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 petrol konsantrasyonlarında bitki örneklerinde elde edilen en yüksek değere sahip alkanlar ve miktarları sırasıyla C₂₀ (1,23µg/ml), C₂₁ (7,07 µg/ml), C₁₉ (35,06µg/ml), C₁₇ (116,14µg/ml), C₁₇ (124,72µg/ml), C₁₇ (228,63µg/ml) olarak saptanmıştır (Şekil 4.34 – 39).



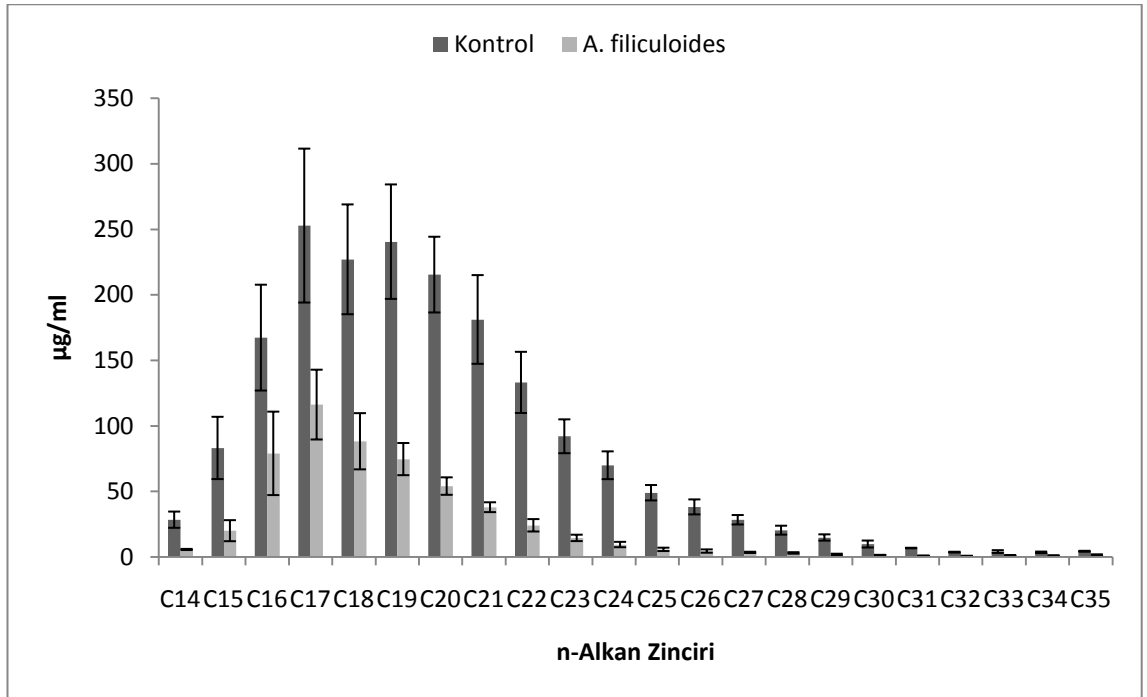
Şekil 4. 34: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.



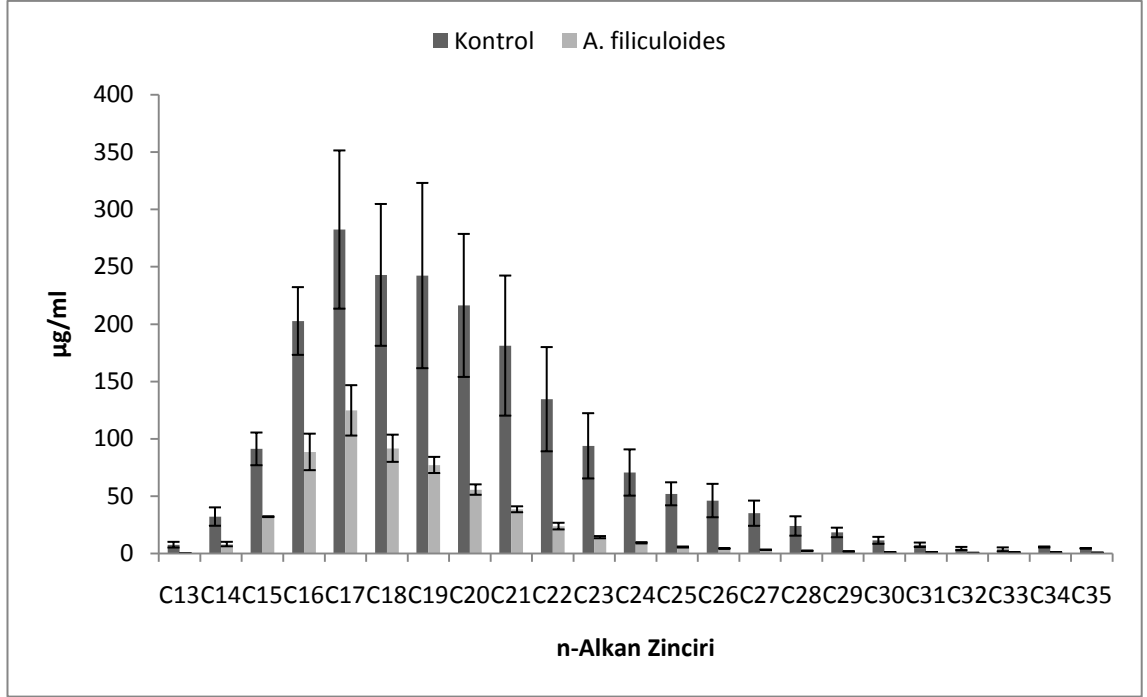
Şekil 4. 35: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.



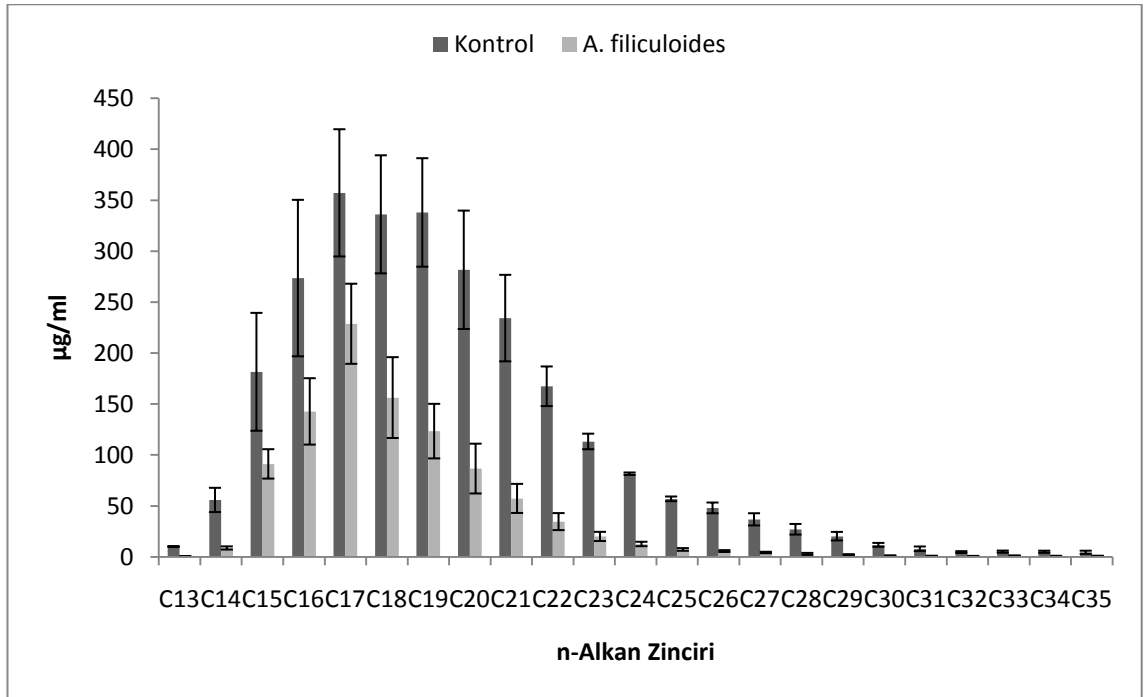
Şekil 4. 36: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.



Şekil 4. 37: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.

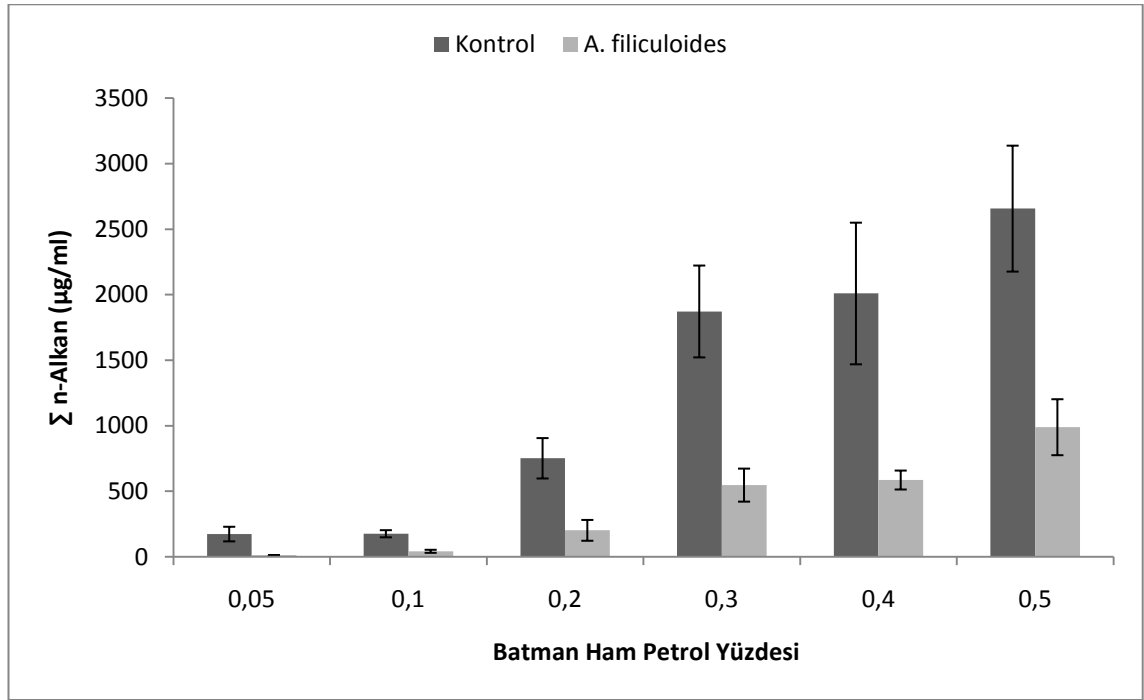


Şekil 4. 38: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.



Şekil 4. 39: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kantitatif dağılımı.

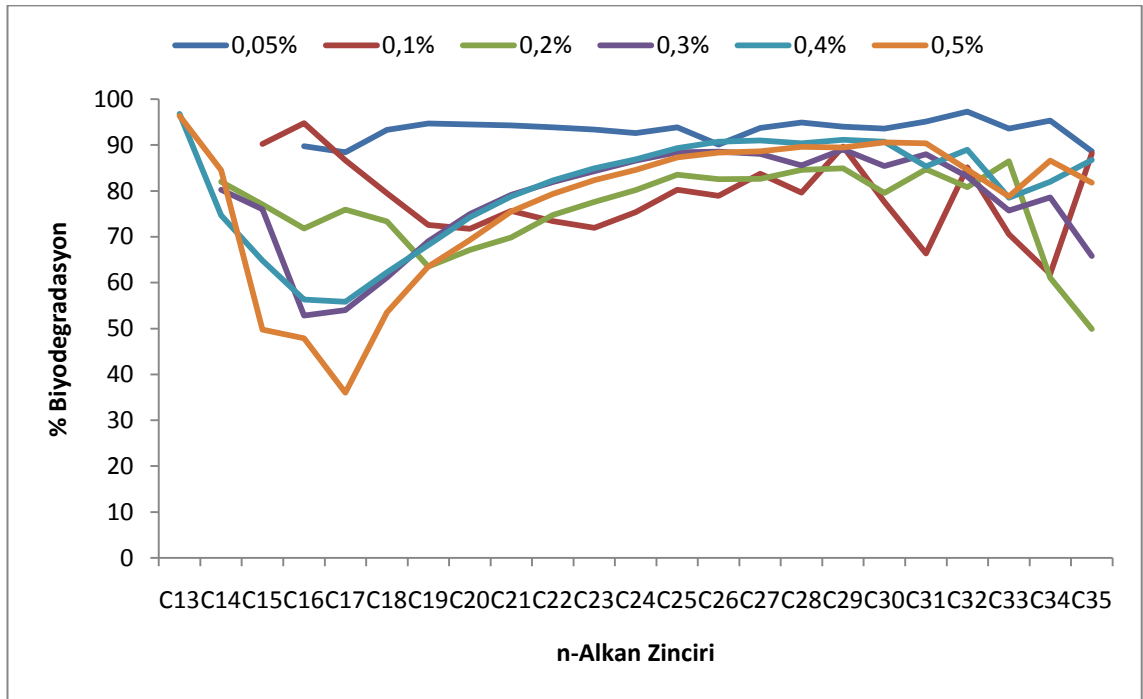
Şekil 4.40 da görüleceği gibi uygulanan petrol konsantrasyonları arttıkça örneklerde saptanan toplam n-alkan miktarlarının da arttığı bulunmuştur. Kontrol örneklerinin içerdikleri toplam n-alkan miktarları % 0,05 petrol konsantrasyonunda 173 µg/ml, % 0,5 petrol konsantrasyonunda ise 2657 µg/ml olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonların bitki örneklerinde ise n-alkan miktarları sırasıyla 11 µg/ml ve 989 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bitki örneklerinde tespit edilen toplam n-Alkan miktarlarının özellikle %0,05 petrol konsantrasyonunda kontrole göre büyük oranda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bitki örneklerinin % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında elde edilen toplam n-Alkan miktarlarının kontrole oranla belirgin bir düşüş gösterdiği de saptanmıştır.



Şekil 4. 40: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen toplam alifatik hidrokarbonların kalitatif dağılımı.

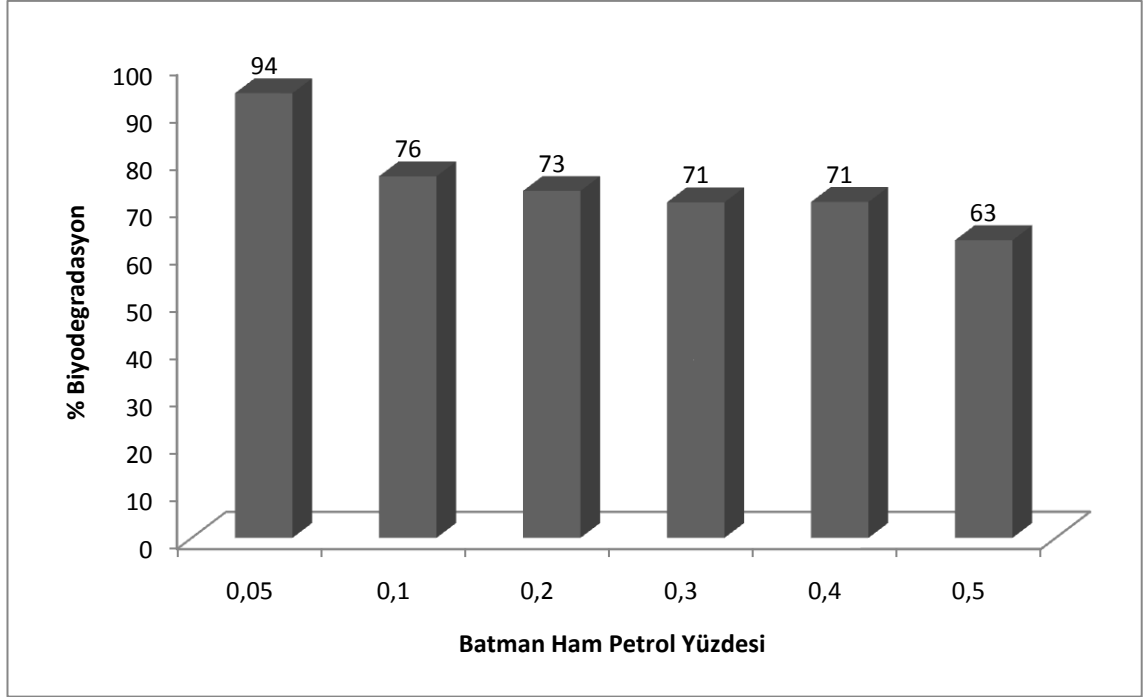
Şekil 4.41 de Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri verilmiştir. Buna göre kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında alifatik hidrokarbon biyodegradasyonu % 0,05, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 petrol konsantrasyonlarında sırasıyla 16, 15, 14, 14, 13, 13 karbon atomu içeren bileşiklerden itibaren hesaplanmıştır. Uygulama süreci içerisinde petrol konsantrasyonu ile ortamda tükenen alifatik hidrokarbon sayıları arasında ters bir orantı

olduğu saptanmıştır. % 0,05 petrol konsantrasyonunda 10 – 15 arasında karbon atomu içeren alkanlar tespit edilemezken % 0,5 petrol konsantrasyonunda 10 – 12 arasında karbon atomu içeren alkanlar tespit edilememiştir. Kontrole oranla bitki örneğinin % 0,05 petrol konsantrasyonunda n-alkan zincirinin 16 karbonlu bileşiğinden başlamak üzere 34 karbon atomu içeren bileşiğine kadar bütün bileşiklerin % 90'ın üzerinde biyodegradasyona uğradığı saptanmıştır.



Şekil 4. 41: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde tespit edilen alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

Uygulanan petrol konsantrasyonlarında bitki örneklerinde tespit edilen toplam alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyonları Şekil 4.42 de verilmiştir. Buna göre özellikle % 0,05 - % 0,2 petrol konsantrasyonu aralığında % 94 - % 73 arasında belirgin bir biyodegradasyon gözlenirken % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarında sırasıyla % 71, % 71 ve % 63 olmak üzere azalan biyodegradasyon yüzdeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4. 42: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde tespit edilen toplam alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

4.2.3.3.İsoprenoid Oranları Kullanılarak Petrol Hidrokarbon Degradasyonun Değerlendirilmesi

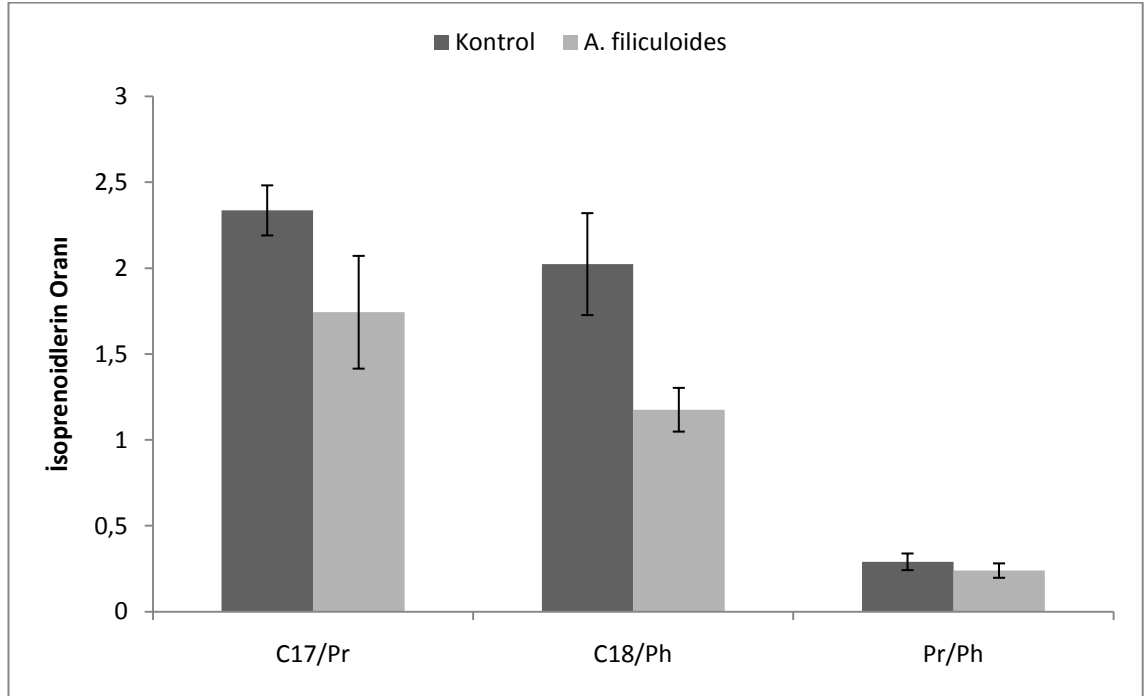
Azolla filiculoides bitkisinin petrol hidrokarbonlarını degrade etme kapasitesinin anlaşılması amacıyla incelenen numunelerde tayin edilen isoprenoid oranları Şekil 4.43 – Şekil 4.48 ve Tablo 4.4 de verilmiştir. İsoprenoid oranları kullanılarak petrol hidrokarbonlarının degradasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla uygulanan % 0,05 petrol konsantrasyonunda elde edilen değerler Şekil 4.43 de verilmiştir. % 0,05 petrol konsantrasyonunda kontrol örneğinin C₁₇/Pr oranı 2,34 iken bitki örneğinde bu değer 1,74 olarak bulunmuştur. Diğer taraftan C₁₈/Ph oranı kontrol örneğinde 2,02 olarak belirlenirken bitki örneğinde bu değer 1,18 olarak saptanmıştır. Pr/Ph oranları incelendiğinde ise bitki örneğinde (0,24) kontrole göre (0,29) bir azalma gözlenirken bu azalmanın kaydadeğer bir azalma olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.43 ve Tablo 4.4).

İsoprenoid oranlarına bakıldığında C₁₇/Pr oranının özellikle % 0,1 ve % 0,2 ham petrol konsantrasyonlarında belirgin bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. Bu oran % 0,1 petrol konsantrasyonunda kontrol örneğinde 2,63 iken bitki örneğinde 2,09 dur. Diğer taraftan

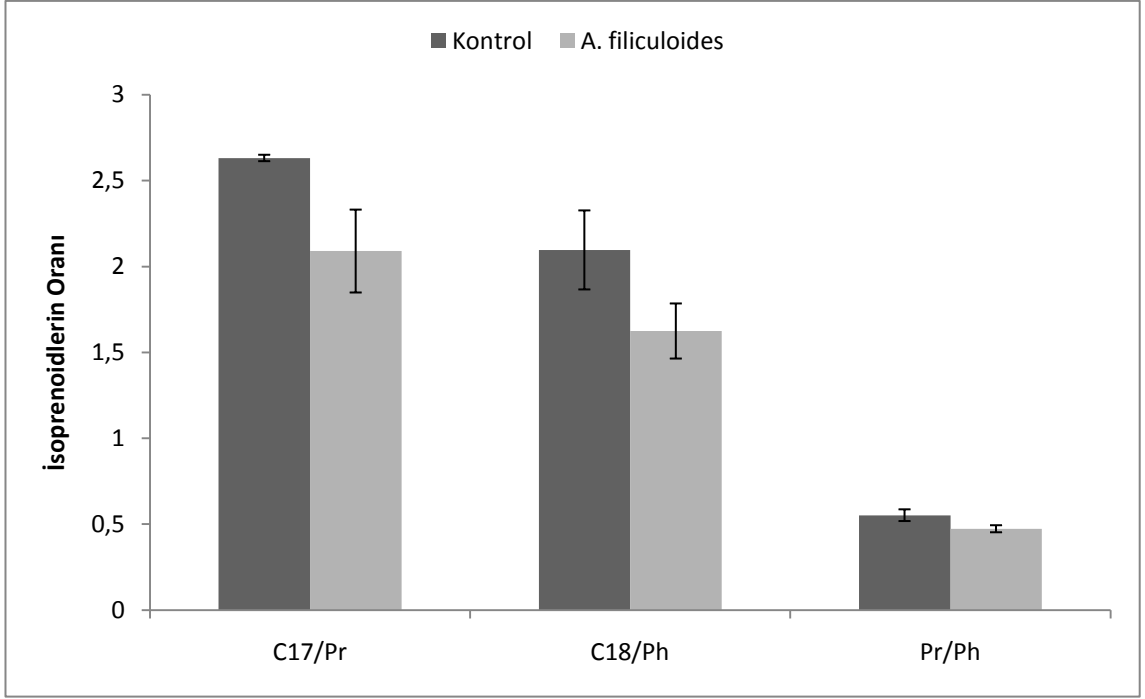
% 0,2 kontrol örneğinde C_{17}/Pr oranı 3,34 iken bitki örneğinde bu değer 2,58 olarak bulunmuştur (Şekil 4.44 ve Şekil 4.45). Uygulanan % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarının kontrol ve bitki örneklerinden elde edilen C_{17}/Pr oranlarının birbirlerine çok yakın değerler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.46 – 48 ve Tablo 4.4).

C_{18}/Ph oranları incelendiğinde özellikle % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında kontrole oranla belirgin bir düşüşün olduğu saptanmıştır. C_{18}/Ph oranları % 0,1 ve % 0,2 kontrol örneklerinde 2,1 ve 2,4 iken bitki örneklerinde bu değerler % 0,1 ve % 0,2 örnekleri için sırasıyla 1,6 ve 1,8 dir (Şekil 4.44 – 45 ve Tablo 4.4). Ancak % 0,2 bitki örneğinden elde edilen C_{18}/Ph değeri anlamlı bir fark ($p>0,001$) yaratmamıştır (Şekil 4.45 ve Tablo 4.4).

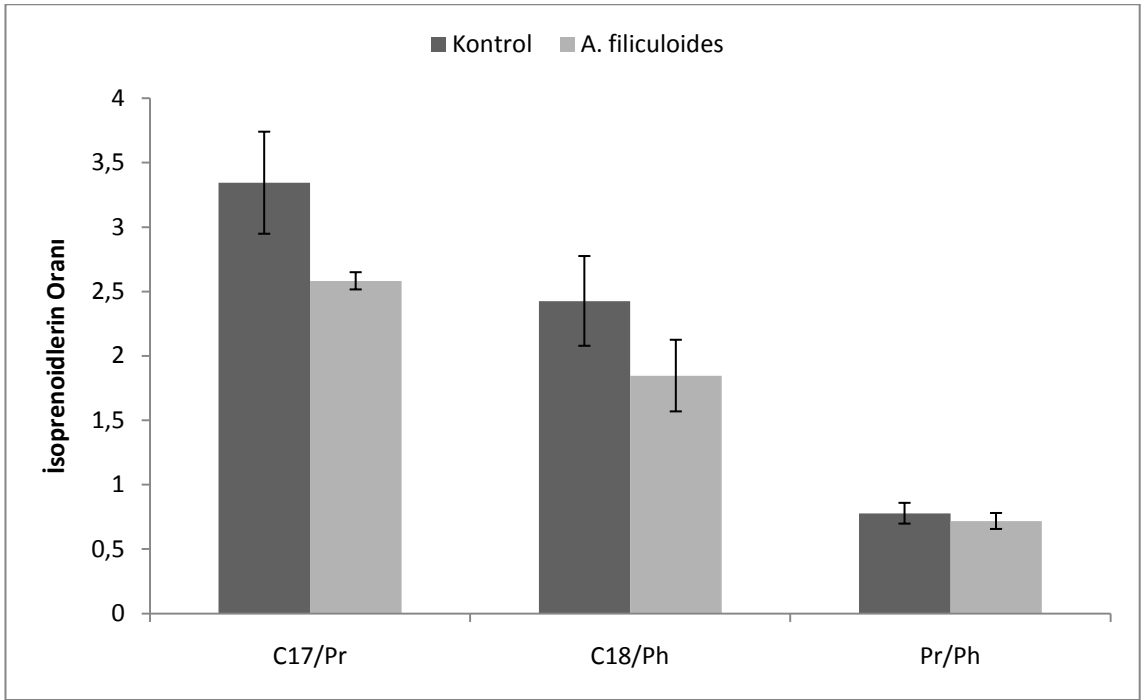
Şekil 4.44 - Şekil 4.48 ve Tablo 4.4 incelendiğinde örneklerden elde edilen Pr/Ph oranlarında kontrol örneğine göre sadece % 0,1 petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki örneğinde belirgin bir azalmanın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.44 ve Tablo 4.4). Uygulanan diğer petrol konsantrasyonlarından elde edilen Pr/Ph değerleri kontrole benzerdir (Şekil 4.45 – 48 ve Tablo 4.4).



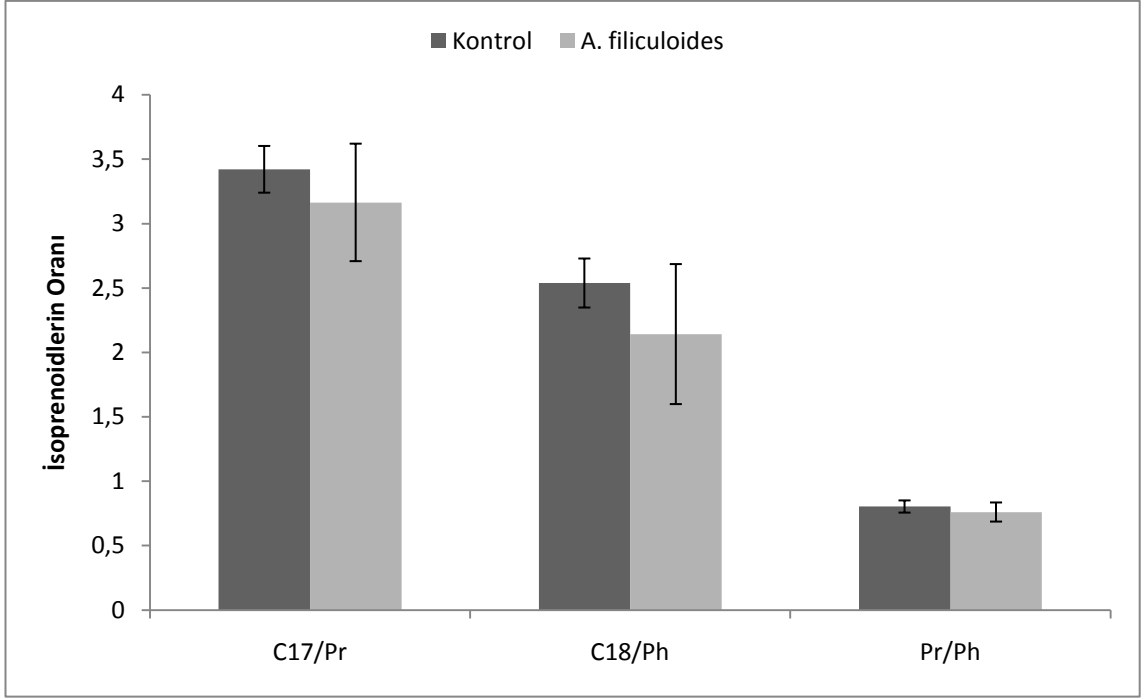
Şekil 4. 43: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.



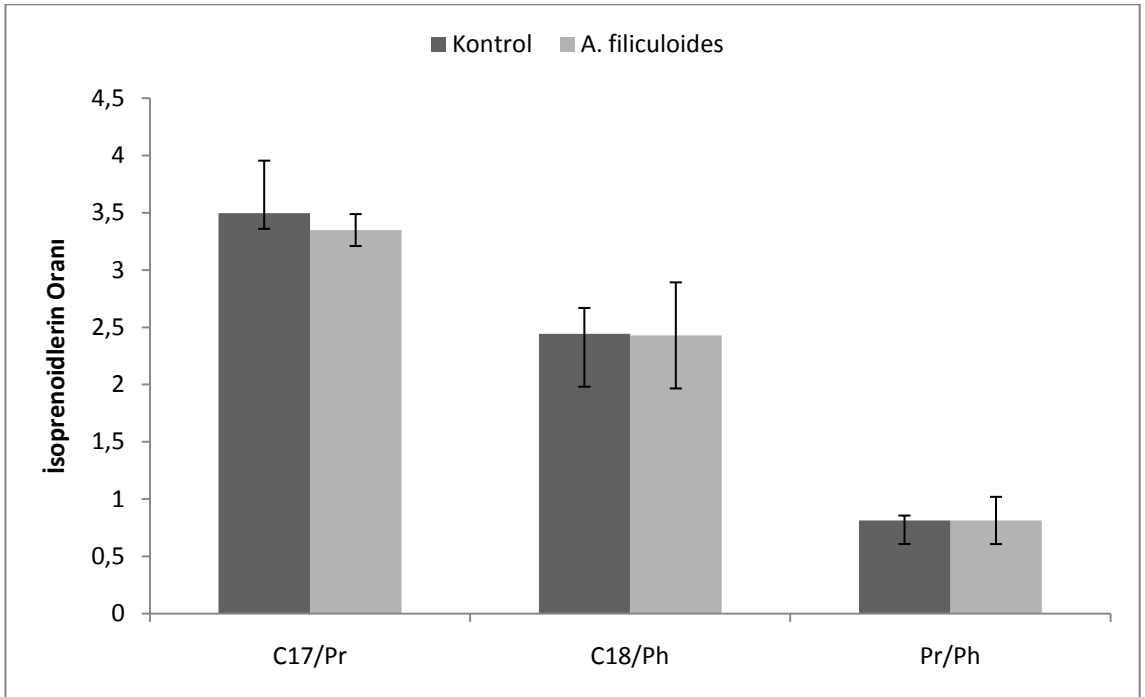
Şekil 4. 44: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.



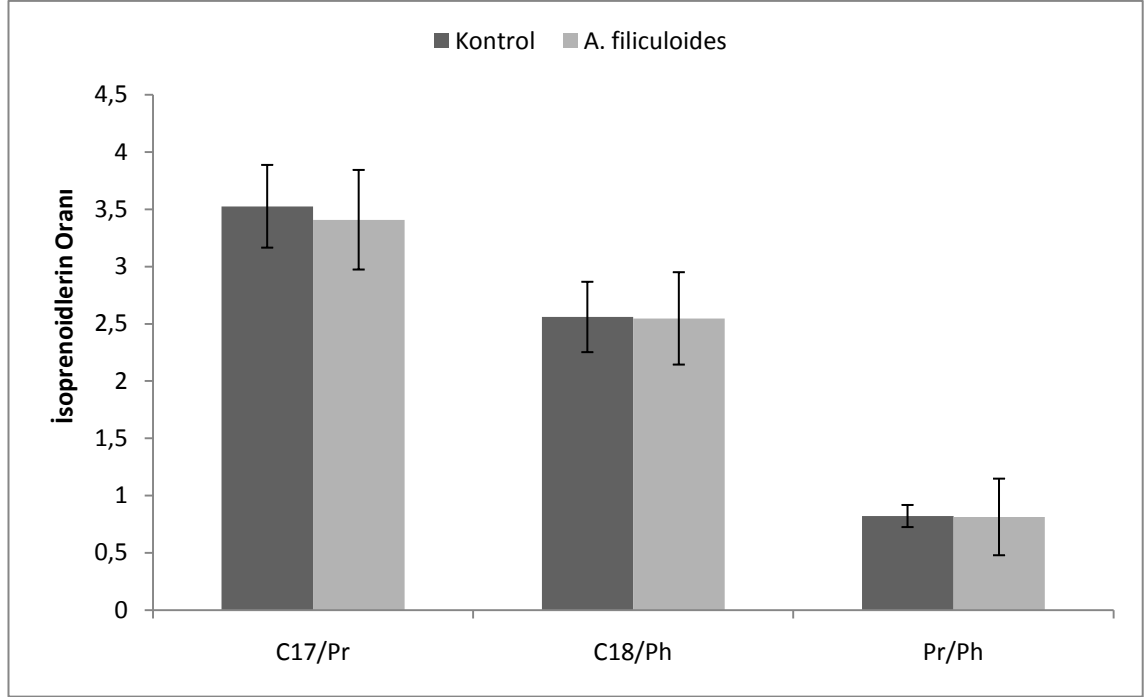
Şekil 4. 45: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.



Şekil 4. 46: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.



Şekil 4. 47: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.



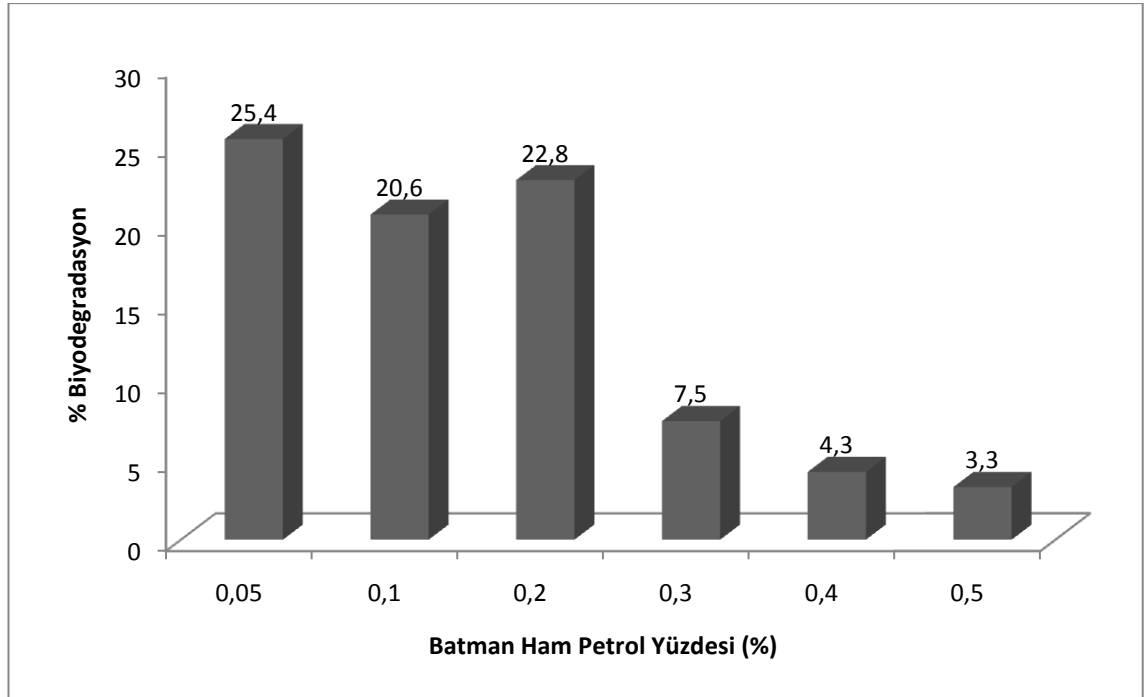
Şekil 4. 48: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonunda, 15. günde, kontrol ve bitki örneklerindeki isoprenoid oranlarının dağılımı.

Tablo 4. 4: Batman ham petrol (BHP) konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) kontrol ve bitki örneklerinin 15. gündeki isoprenoid (C17/Pr, C18/Ph, Pr/Ph) oranları.

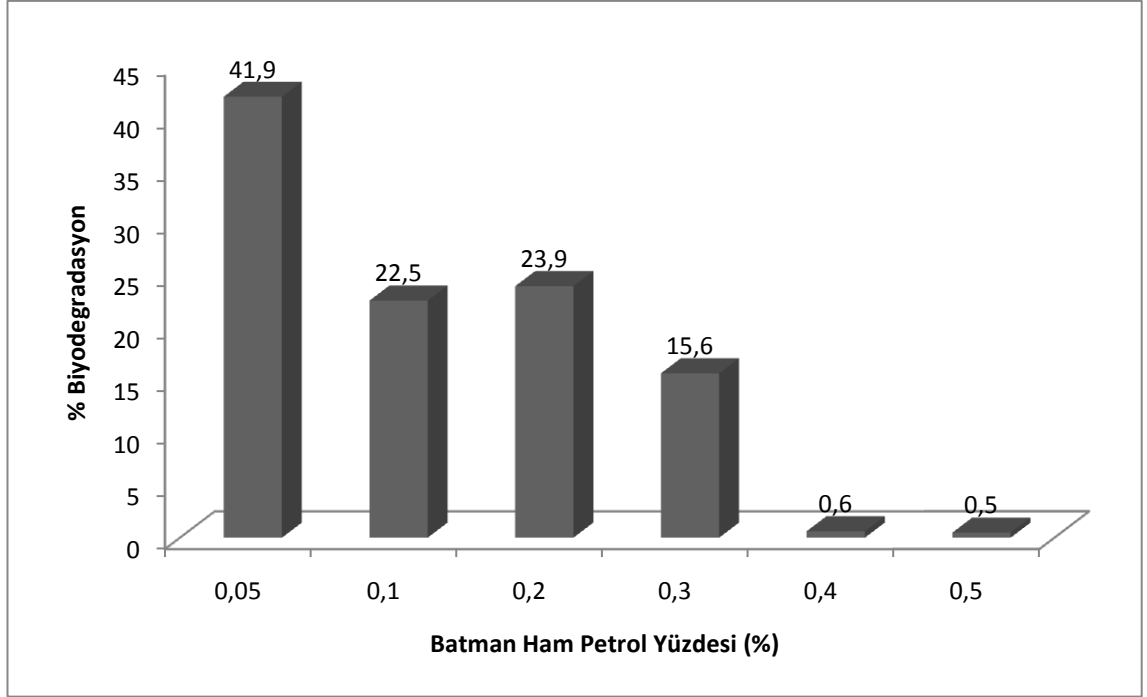
BHP Yüzdesi (%)	Uygulama	C17/Pr	C18/Ph	Pr/Ph
0,05	Kontrol	2,34 ± 0,15	2,02 ± 0,30	0,29 ± 0,05
	<i>A. filiculoides</i>	1,74 ± 0,33	1,18 ± 0,13	0,24 ± 0,04
0,1	Kontrol	2,63 ± 0,02	2,10 ± 0,23	0,55 ± 0,03
	<i>A. filiculoides</i>	2,09 ± 0,24	1,62 ± 0,16	0,47 ± 0,02
0,2	Kontrol	3,34 ± 0,40	2,43 ± 0,35	0,78 ± 0,08
	<i>A. filiculoides</i>	2,58 ± 0,07	1,85 ± 0,28	0,72 ± 0,06
0,3	Kontrol	3,42 ± 0,18	2,54 ± 0,19	0,80 ± 0,05
	<i>A. filiculoides</i>	3,16 ± 0,46	2,14 ± 0,54	0,76 ± 0,07
0,4	Kontrol	3,50 ± 0,46	2,44 ± 0,22	0,81 ± 0,04
	<i>A. filiculoides</i>	3,35 ± 0,14	2,43 ± 0,46	0,81 ± 0,21
0,5	Kontrol	3,53 ± 0,36	2,56 ± 0,31	0,82 ± 0,10
	<i>A. filiculoides</i>	3,41 ± 0,43	2,55 ± 0,40	0,81 ± 0,33

İsoprenoid Oranlarının Kontrole Göre Biyodegradasyon Yüzdeleri

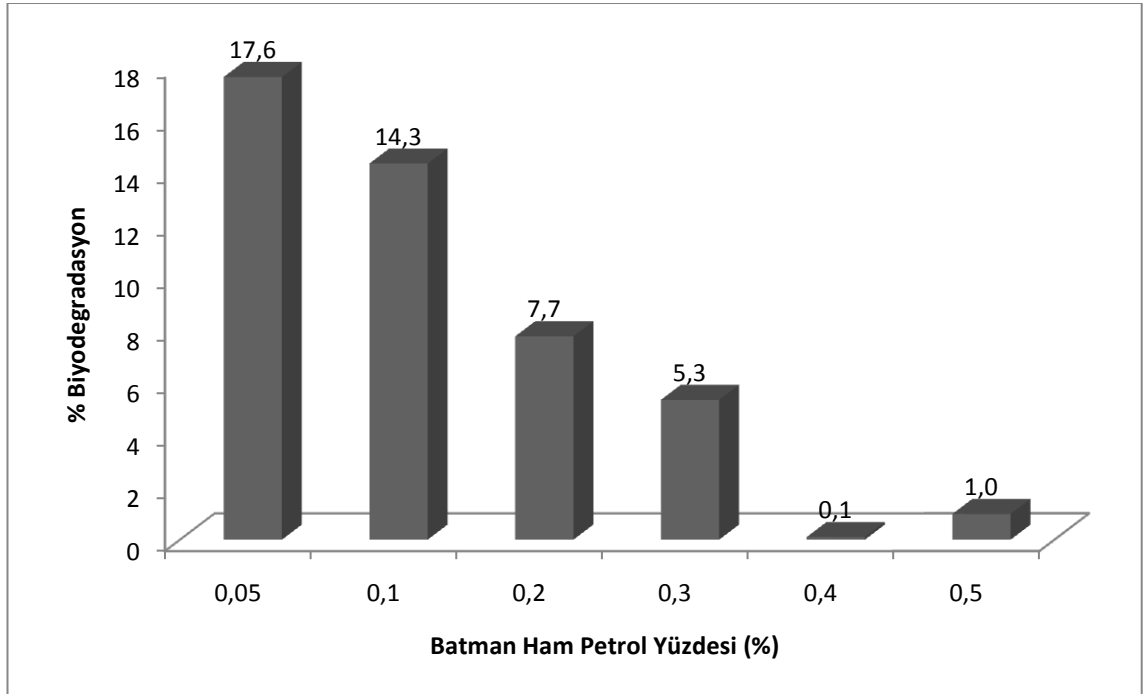
Bitki örneklerinin uygulanan Batman ham petrol konsantrasyonlarında, kontrol örneklerine göre isoprenoid oranlarının biyodegradasyon yüzdeleri, Şekil 4.49 – 52 de verilmiştir. C₁₇/Pr isoprenoid oranının biyodegradasyon yüzdesi % 0,05, % 0,1 ve % 0,2 ham petrol konsantrasyonlarında % 25,4, % 20,6 ve % 22,8 olarak saptanmıştır (Şekil 4.49). % 0,05 petrol konsantrasyonunda C₁₈/Ph isoprenoid oranının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdesi % 42 gibi yüksek bir değere sahipken, % 0,1 ve % 0,2 örneklerinde ortalama olarak % 23 civarındadır (Şekil 4.50). Pr/Ph isoprenoid oranlarına bakıldığında ise biyodegradasyon yüzdesinin en yüksek değerini % 17,6 ve % 14,3 olmak üzere sırasıyla % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonlarında gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.51). Diğer taraftan, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarının hepsinde C₁₇/Pr, C₁₈/Ph ve Pr/Ph isoprenoid oranlarının biyodegradasyon yüzdeleri kontrol örneklerinden çok az farklılık göstermiştir (Şekil 4.49 – 51).



Şekil 4. 49: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde, C₁₇/Pr isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

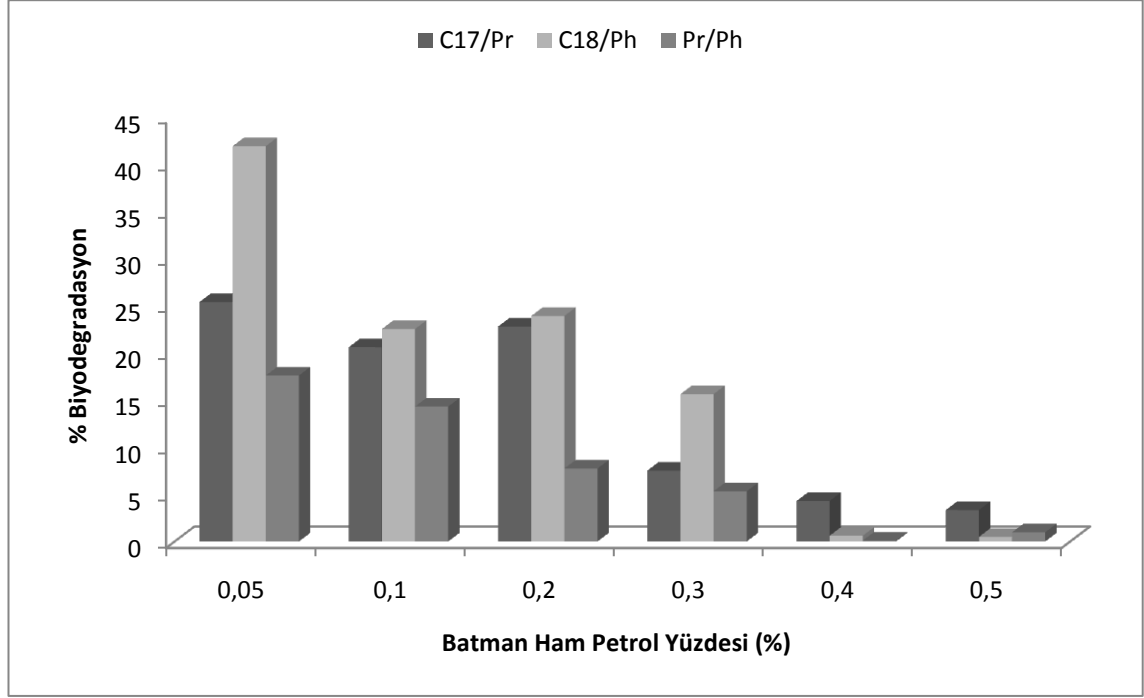


Şekil 4. 50: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde, C18/Ph isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.



Şekil 4. 51: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde, Pr/Ph isoprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

İsoprenoid oranları (Şekil 4.42 – Şekil 4.47) ve biyodegradasyon yüzdeleri (Şekil 4.48 – Şekil 4.51) incelendiğinde % 0,05 - % 0,5 petrol aralığında *Azolla filiculoides* Lam. bitkisinin düşük konsantrasyonlarda (% 0,05, % 0,1 ve % 0,2) daha yüksek, artan konsantrasyonlarda ise daha düşük biyodegradasyona yol açtığı görülmüştür (Şekil 4.52).



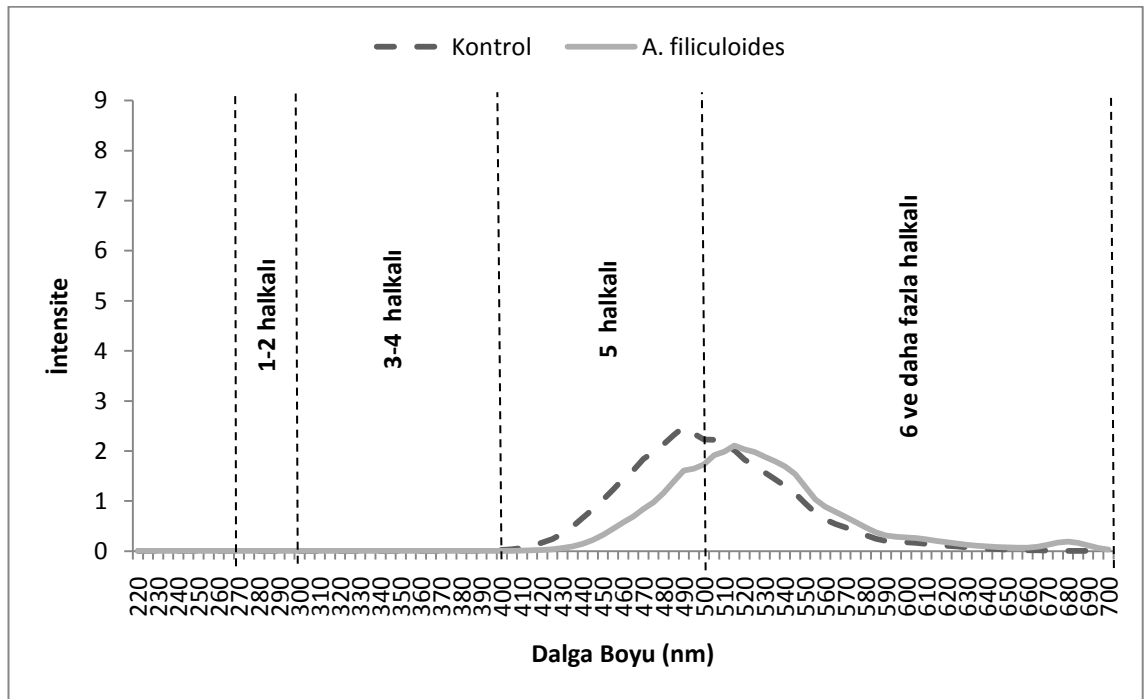
Şekil 4. 52: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde, isoprenoid oranlarının (C17/Pr, C18/Ph, Pr/Ph) kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

4.2.3.4. Aromatik Hidrokarbonların Davranışları

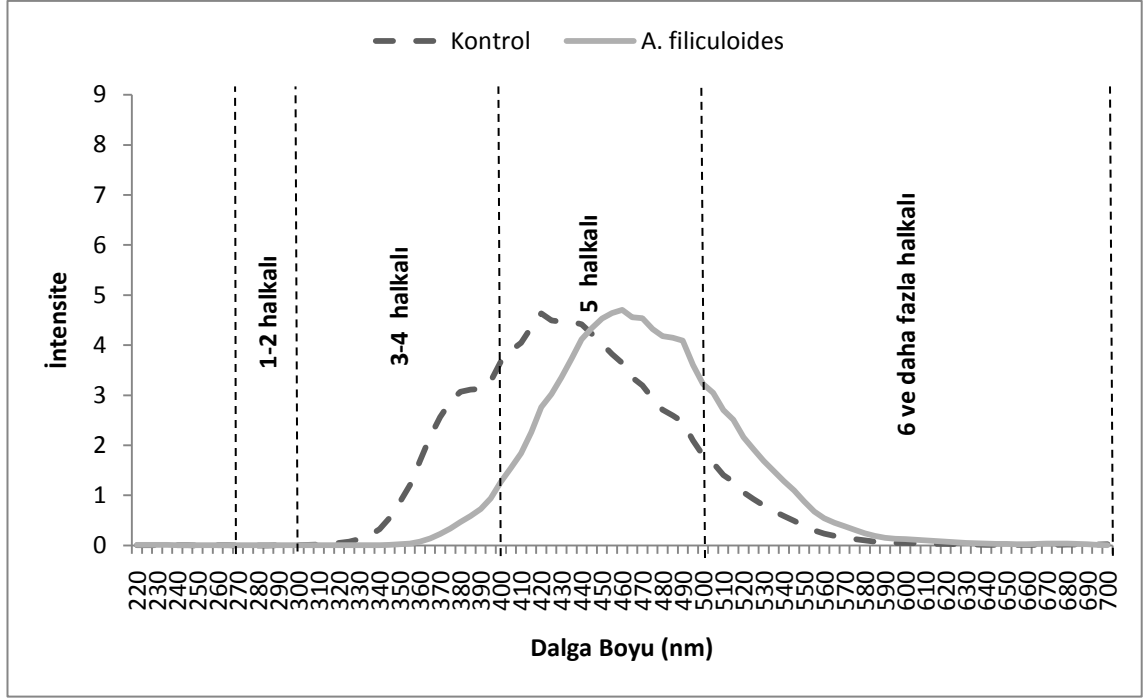
Senkronize Ultraviyole Fluorospektrofotometre (SUUV) Sonuçları

Polisiklik aromatik bileşenlerin köken ve konsantrasyonlarının saptanmasında örneklerde görülen ve spektrumlarla belirlenen PAH halka sayıları kullanılabilir. Farklı sayıda bileşene sahip birleşik aromatik halkaların emisyonları senkronize spektrumlarında saptanabilir. 15 gün süre ile uygulaması yapılan Batman ham petrol konsantrasyonlarının kontrol ve bitki numunelerindeki SUUV değerleri Şekil 4.53 – Şekil 4.58 de verilmiştir. Floresans yoğunluğu (intensite) kontrol ve bitki örneklerine ait aromatik bileşenlerin kalitesi ile ilişkilendirilmiştir.

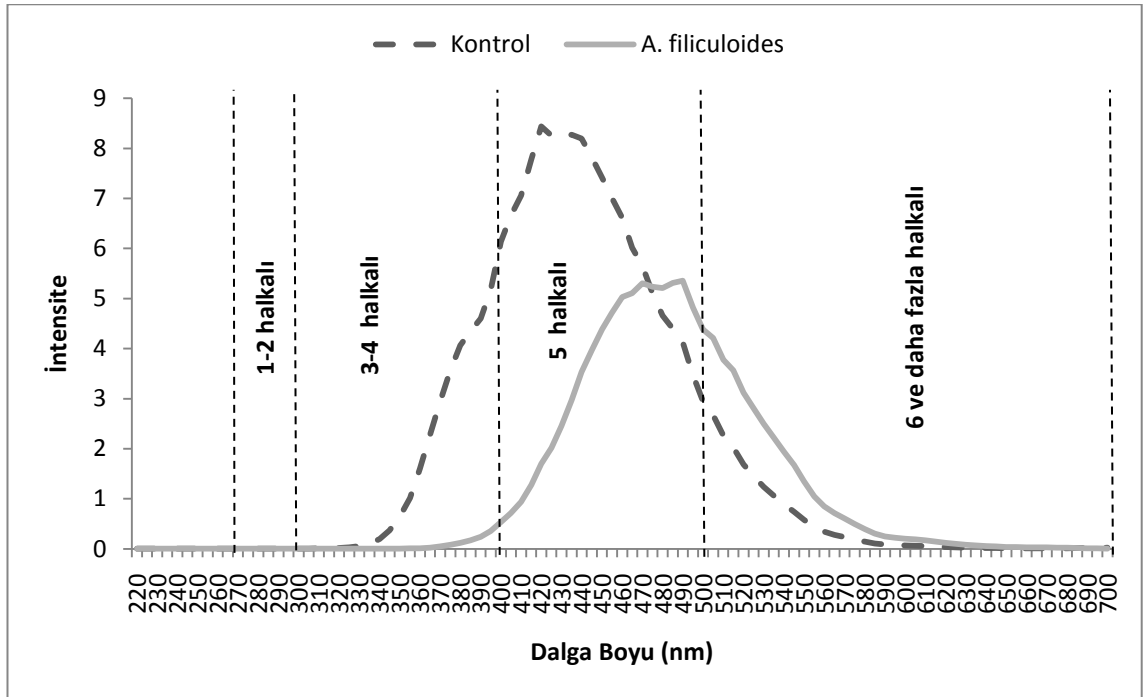
% 0,05 petrol uygulaması sonucunda elde edilen kontrol ve bitki örneklerine ait SUVF değerleri Şekil 4.52 de verilmiştir. Bu konsantrasyona ait kontrol ve bitki örneklerinde 1-2 halkalı bileşiklere rastlanılmazken, 3-4 halkalı bileşiklerin yoğunluğu ise oldukça azdır. 5 halkalı bileşiklerin floresans yoğunluğu bitkide kontrole göre daha az bulunmuştur. Diğer taraftan 6 ve daha fazla sayıda halka içeren bileşiklerin her iki örnekte de benzer intensiteye sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 4.52). % 0,1 - % 0,5 petrol konsantrasyonu aralığındaki bitki örneklerinde 3-4 halkalı bileşikler çok düşük değerlerde floresans yoğunluğuna sahipken kontrol örneklerinde bu bileşikler oldukça yüksek intensiteye sahiptir. 5 halkalı bileşikler için bitki örneklerinde görülen floresans yoğunlukları sadece % 0,1 (Şekil 4.53) petrol konsantrasyonunda kontrole yakın değerler verirken, % 0,2 - 0,5 petrol konsantrasyonu aralığında kontrolden daha düşük değerler sergilemiştir (Şekil 4.54 – 57).



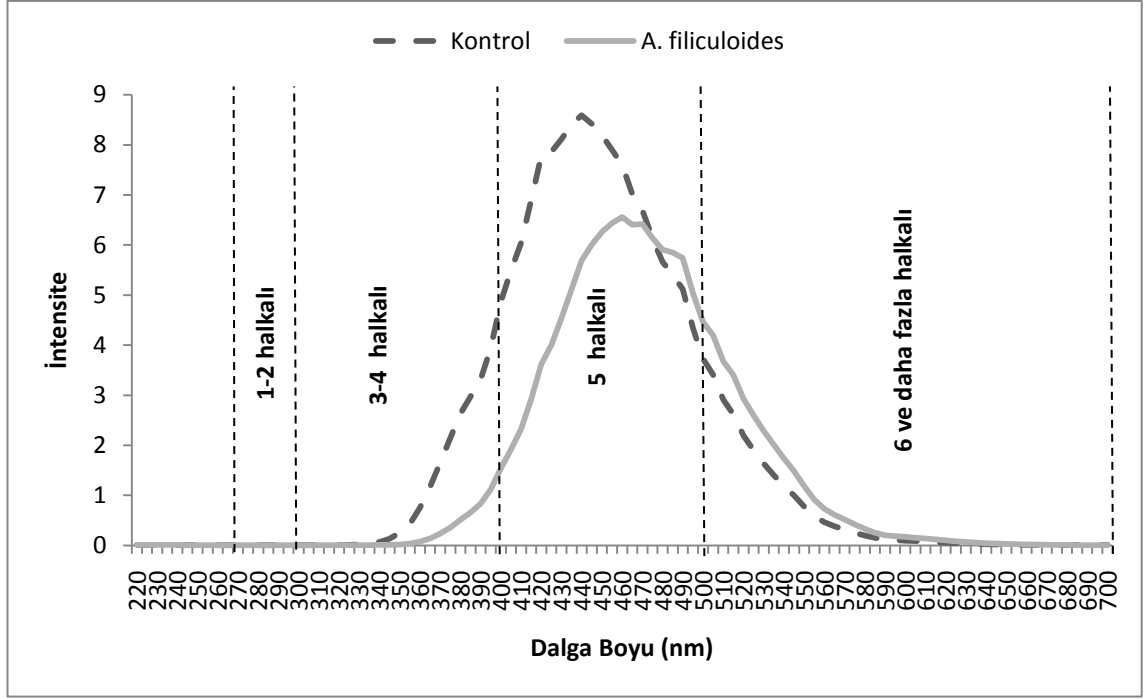
Şekil 4. 53: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.



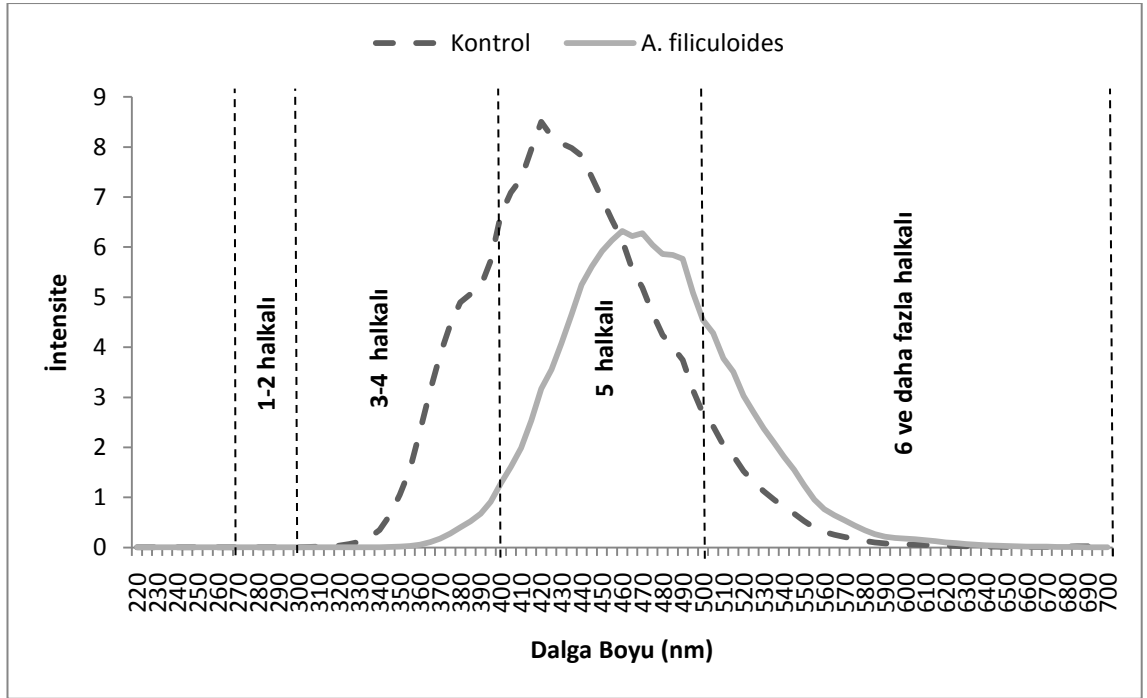
Şekil 4. 54: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.



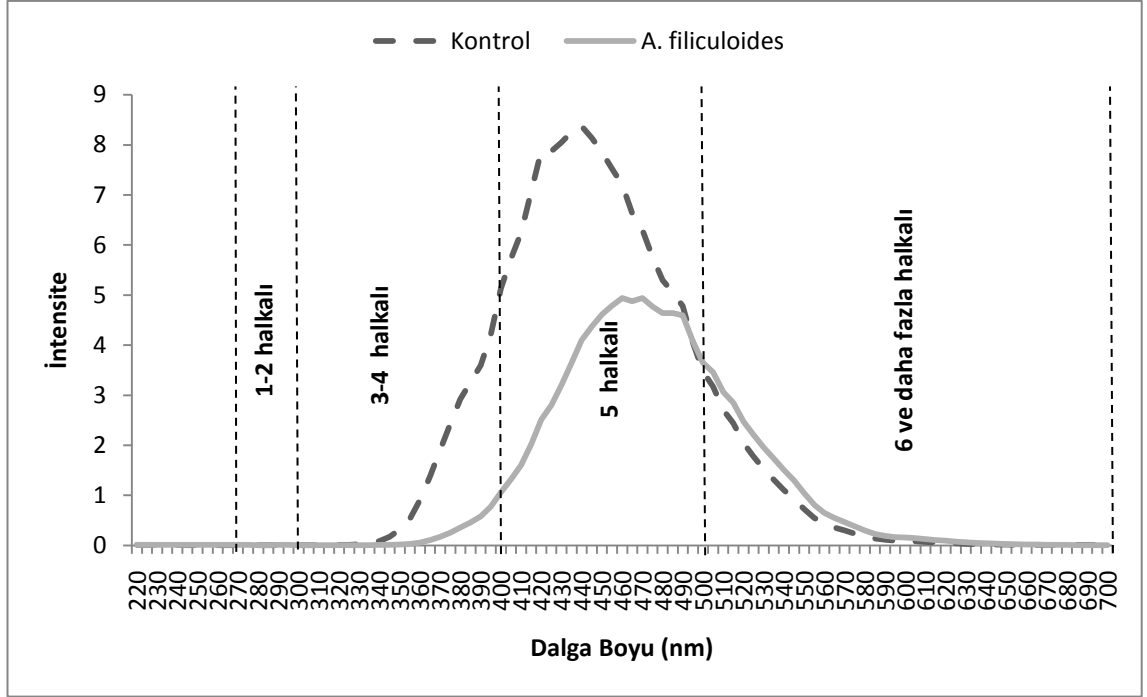
Şekil 4. 55: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.



Şekil 4. 56: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.



Şekil 4. 57: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.



Şekil 4. 58: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış bitki ve kontrol örneklerinde 15. günde tespit edilen SUVF değerleri.

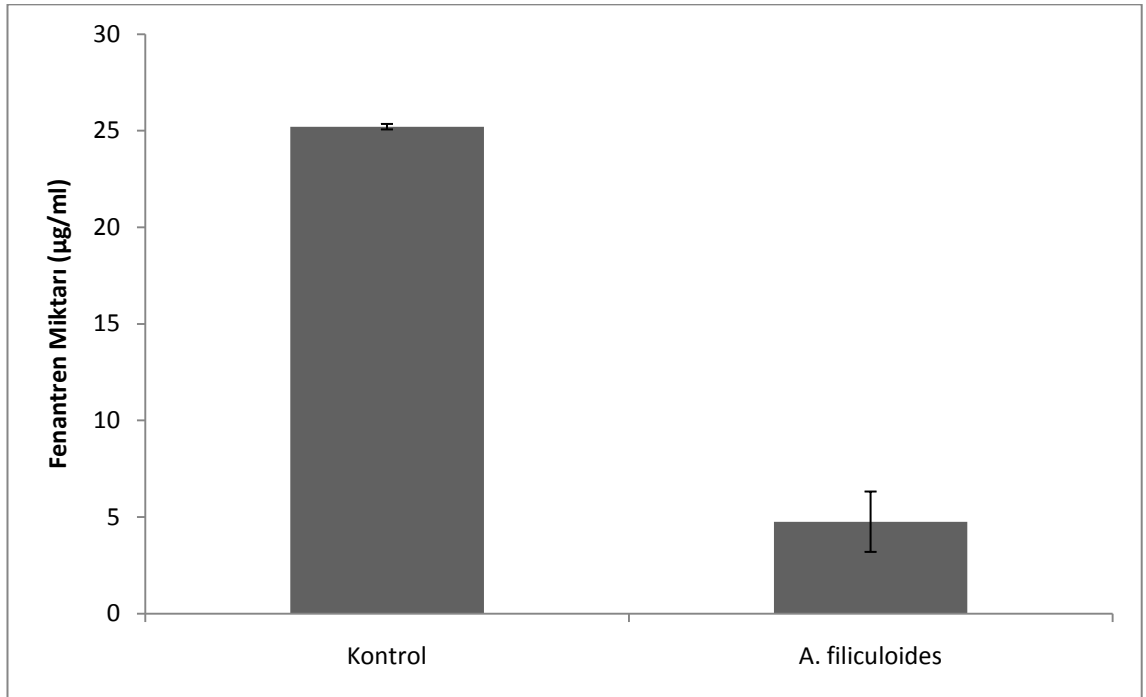
Azolla filiculoides bitkisine 15 gün süre ile uygulanan Batman ham petrol konsantrasyonlarının kontrol ve bitki numunelerinin kolon kromatografisi yöntemi ile elde edilen aromatik (polisiklik aromatik hidrokarbonlar) fraksiyonlarının GC-MS analizi yapılmıştır.

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Kantitatif Dağılımları

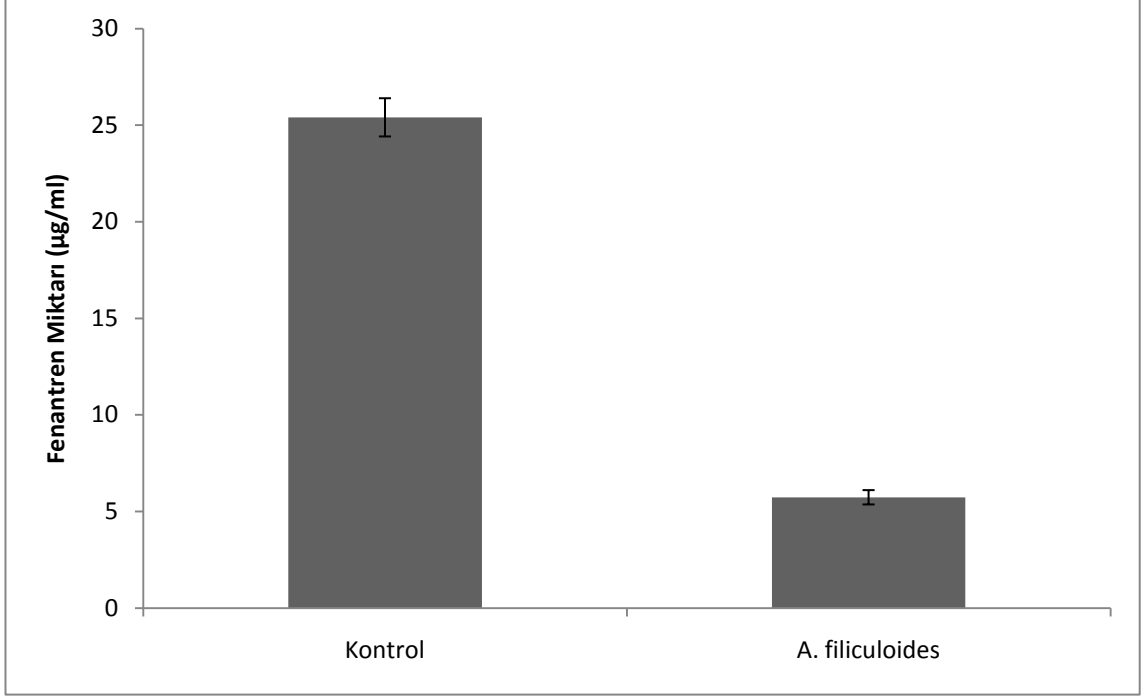
Deney gruplarına ait olan SUVF spektrumları baz alınarak baskın olan polisiklik aromatik hidrokarbon halkaları belirlenmiştir. Bu halka gruplarından 3 – 6 halkalı bileşiklerin spektrumları ve floresans yoğunlukları Şekil 4.53 – 58 de verilmiştir. Bu halka gruplarından 3 halkalı bileşiği temsil eden fenantren aromatik hidrokarbonu kısa dönemli degradasyon yeteneği göstermektedir. Ancak diğer halka gruplarının degradasyonları daha uzun zaman dilimlerinde olmaktadır (White ve diğ., 2006). Bu çalışmada fenantren bileşiğinin degradasyon profilinin değerlendirilmesi; 1.) Biyoremediasyon çalışmalarında kullanılan hedef bileşiklerden biri olmasının yanında kimyasal yapısının belli bazı karsinojen PAH bileşiklerini yansıtmaması (Flocco ve diğ., 2002), 2.) Çalışmanın deney süresinin 15 gün gibi kısa zaman aralığında olmasından dolayıdır.

Deney Gruplarında Tayin Edilen Fenantren Bileşiminin Kantitatif Dağılımı

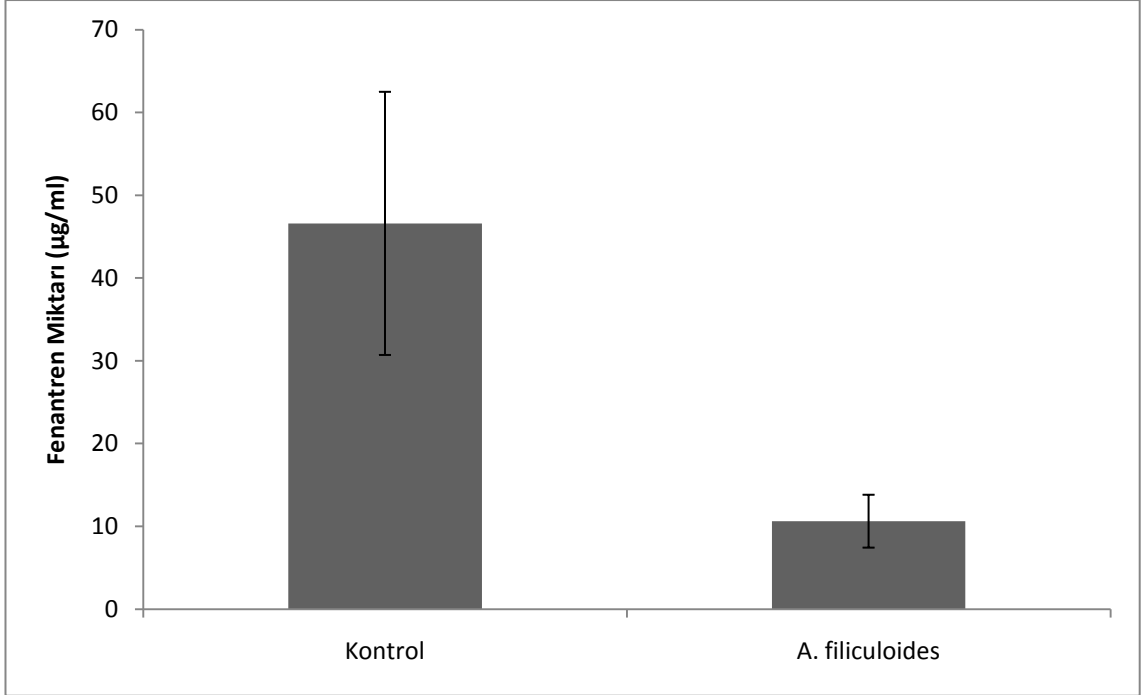
GC-MS analizinden elde edilen deney gruplarına ait kromatogramlar, kütüphane taraması (WILEY, NIST) ve analizde kullanılan standart ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin GC-MS analizinden elde edilen fenantren miktarları, Şekil 4.59 – Şekil 4.65 de verilmiştir. Uygulanan petrol konsantrasyonları sonucunda kontrol ortamlarında tespit edilen en düşük fenantren miktarı % 0,05 Batman ham petrol uygulamasında 25,2 $\mu\text{g/ml}$ iken % 0,5 petrol uygulamasında 70,3 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Buna karşılık olarak bitki örneklerinde tespit edilen fenantren miktarları uygulanan petrol konsantrasyonlarında % 0,05 (4,8 $\mu\text{g/ml}$), % 0,1 (5,7 $\mu\text{g/ml}$) % 0,2 (10,6 $\mu\text{g/ml}$), % 0,3 (13,0 $\mu\text{g/ml}$), % 0,4 (16,9 $\mu\text{g/ml}$) , % 0,5 (20,2 $\mu\text{g/ml}$) olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre bitki ortamına uygulanan en yüksek petrol konsantrasyonunda bile (% 0,5) tespit edilen fenantren miktarının (20,2 $\mu\text{g/ml}$) kontrol ortamına uygulanan en düşük petrol konsantrasyonunda (% 0,05) tespit edilen fenantren miktarından (25,2 $\mu\text{g/ml}$) daha düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.59 – 4.65).



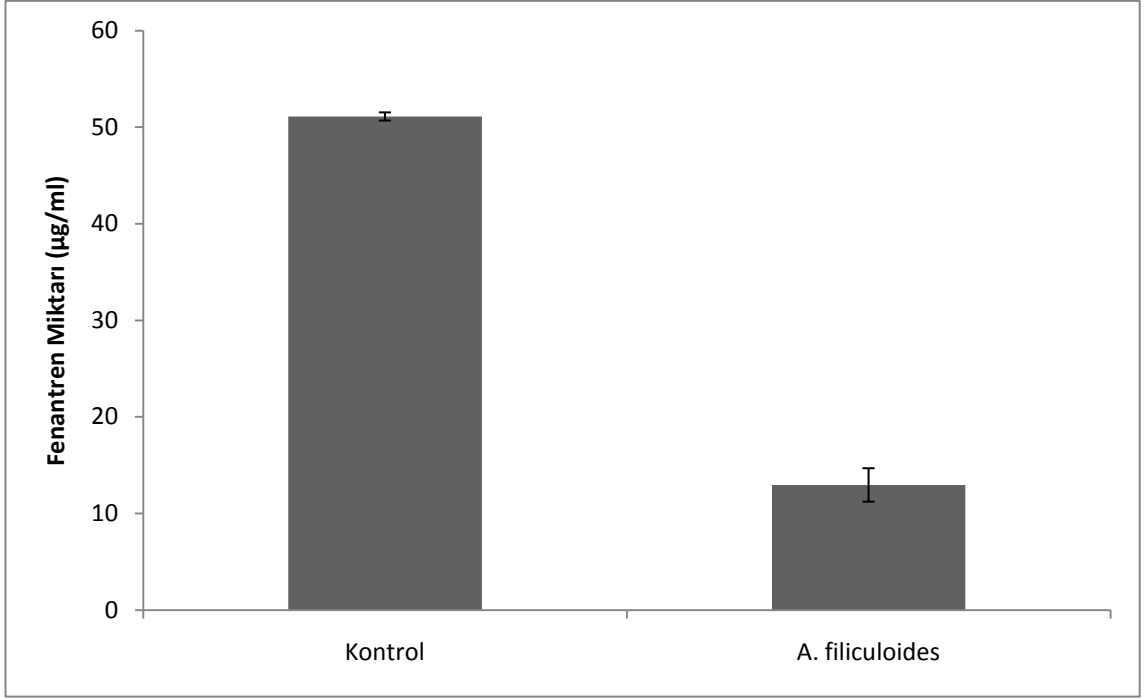
Şekil 4. 59: % 0,05 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.



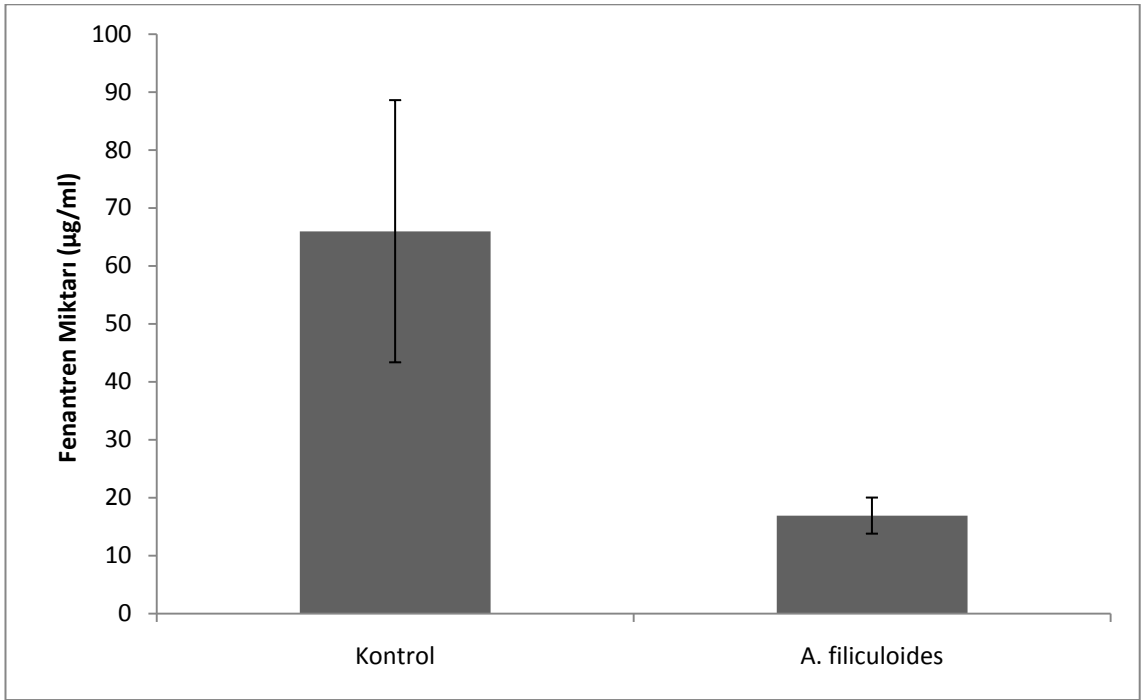
Şekil 4. 60: % 0,1 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.



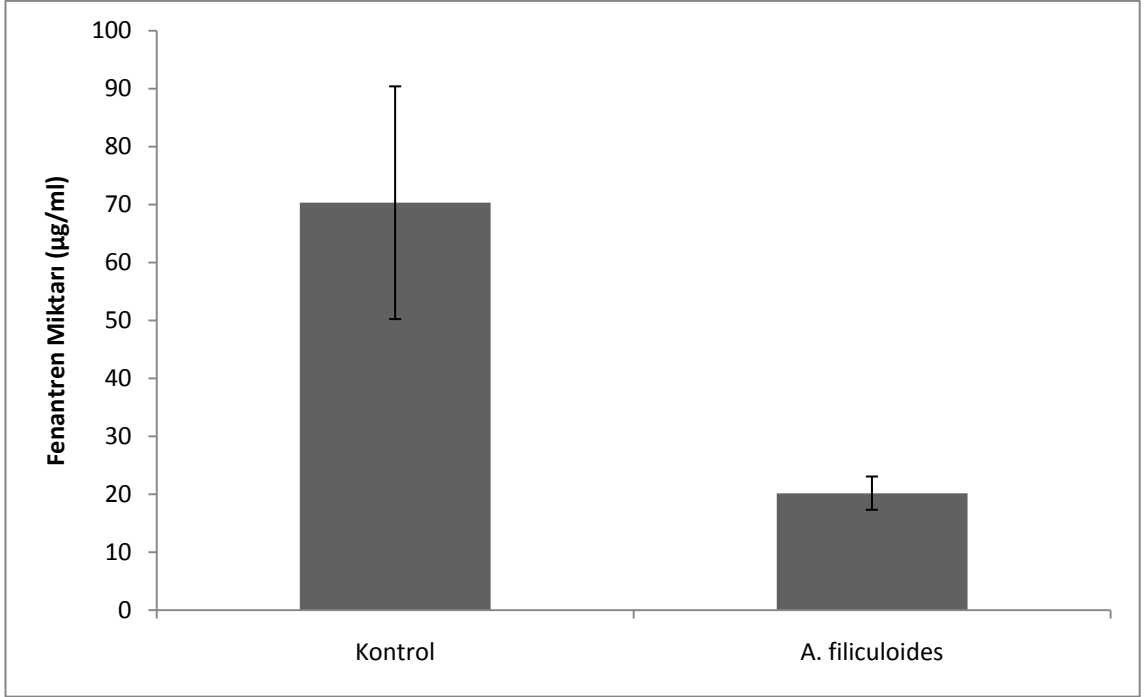
Şekil 4. 61: % 0,2 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.



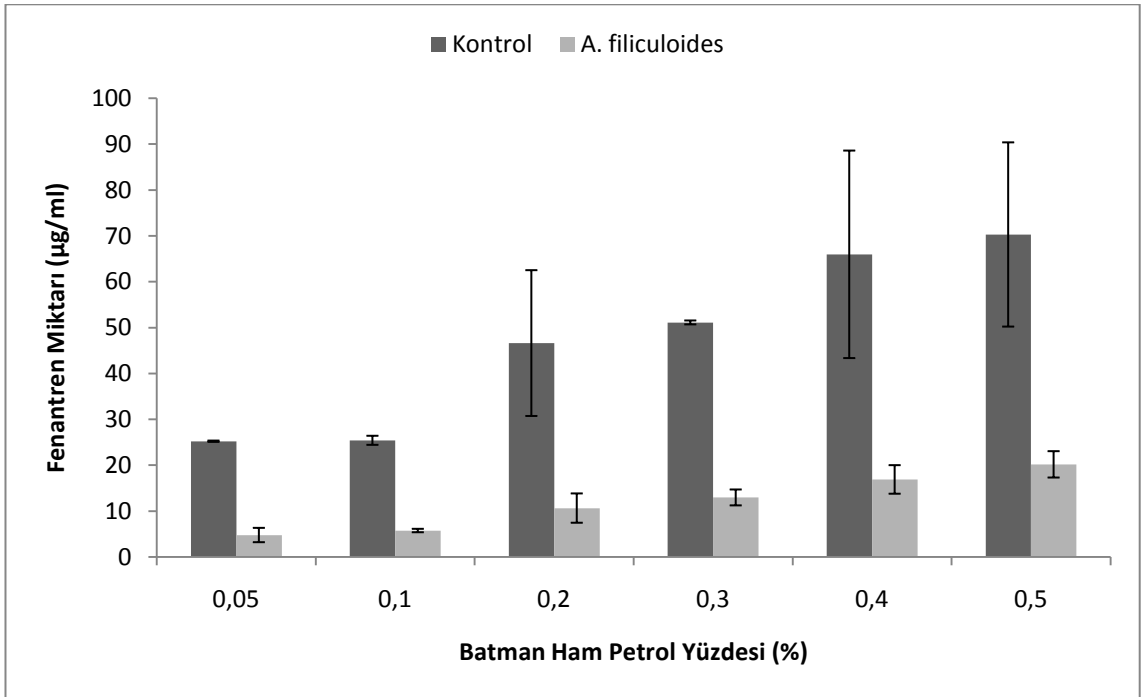
Şekil 4. 62: % 0,3 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.



Şekil 4. 63: % 0,4 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.

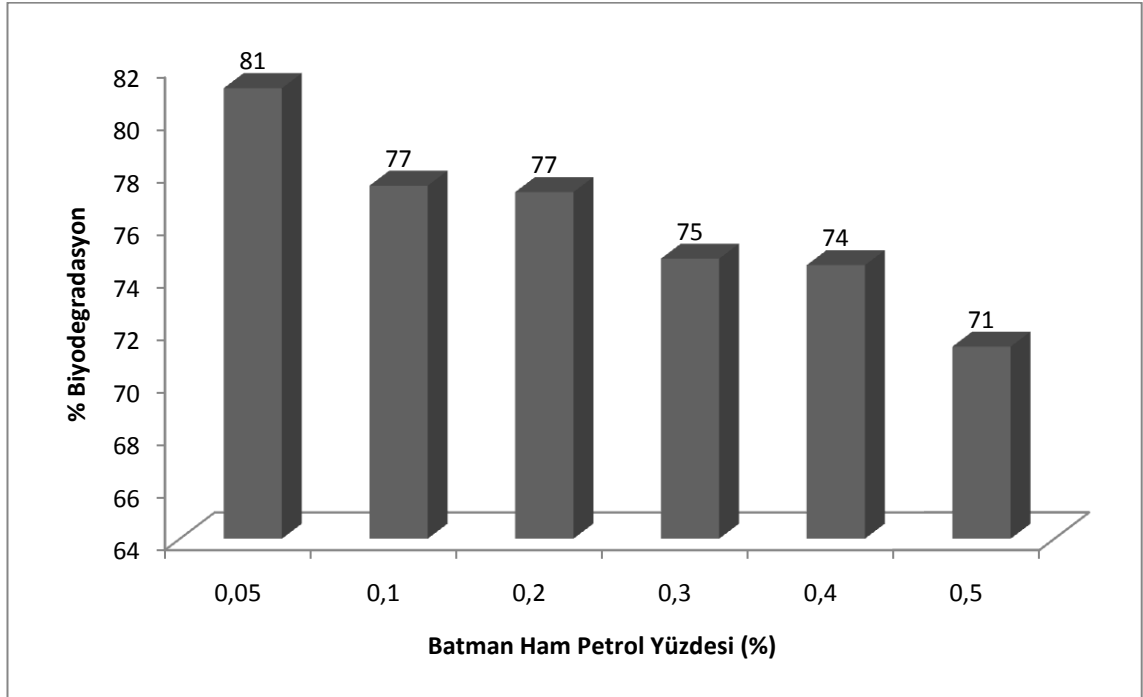


Şekil 4. 64: % 0,5 Batman ham petrol konsantrasyonu uygulanmış kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı.



Şekil 4. 65: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (%0,05 - %0,5) kontrol ve bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen fenantrenin kantitatif dağılımı. ($p < 0,0001$)

Bitki örneklerinin uygulanan petrol konsantrasyonlarında, kontrol örneklerine göre fenantren miktarlarının biyodegradasyon yüzdeleri, Şekil 4.66 da verilmiştir. Uygulanan petrol konsantrasyonlarında fenantren miktarlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri % 81 ile % 71 arasında dağılım göstermiştir (Şekil 4.66). Kontrol örneklerine göre özellikle % 0,05, % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında elde edilen sırasıyla % 81, % 77 ve % 77 lik biyodegradasyon yüzdeleri ile fenantren miktarının bu örneklerde daha belirgin bir azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.66).



Şekil 4. 66: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) *Azolla filiculoides* Lam. bitkisine ait, 15. günde, fenantren miktarlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri.

Deney Gruplarında Tespit Edilen Diğer Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Alkillenmiş PAH Bileşikleri

Uygulamalar sonrasında örneklerdeki Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve alkillenmiş PAH bileşikleri ve homolog serileri kromatogramların kütüphane taraması yapılarak saptanmıştır. Buna göre kontrol ve bitki örneklerinde tespit edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkillenmiş bileşik ve homologları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 da verilmiştir.

Tablo 4. 5: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) kontrol örneklerinde, 15. günde tespit edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkillenmiş PAH homologları. (C1-, C2-, C3-, C4-: Sırasıyla; Bir, iki, üç, dört metil grubuna sahip, - : tespit edilemedi.)

Bileşik	Halka Sayısı	Hedef İyonu	Kontrol					
			0,05%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
Naftalen								
C0-naftalen	2	128	-	-	-	-	-	-
C1-naftalen	2	142	-	-	-	-	-	-
C2-naftalen	2	156	-	-	-	-	+	+
C3-naftalen	2	170	-	-	+	+	+	+
C4-naftalen	2	184	-	-	-	-	-	-
Fenantren								
C0-fenantren	3	178	+	+	+	+	+	+
C1-fenantren	3	192	+	+	+	+	+	+
C2-fenantren	3	206	+	+	+	+	+	+
C3-fenantren	3	220	+	+	+	+	+	+
C4-fenantren	3	234	+	+	+	+	+	+
Dibenzotiofen								
C0-dibenzotiofen	3	184	+	+	+	+	+	+
C1-dibenzotiofen	3	198	+	+	+	+	+	+
C2-dibenzotiofen	3	212	-	-	-	-	-	-
C3-dibenzotiofen	3	226	-	-	-	-	-	-
Floren								
C0-floren	3	166	-	-	-	-	-	+
C1-floren	3	180	-	+	+	+	+	+
C2-floren	3	194	+	+	+	+	+	+
C3-floren	3	208	-	-	-	-	-	-
Krizen								
C0-krizen	4	228	-	-	-	-	-	-
C1-krizen	4	242	-	-	-	-	-	-
C2-krizen	4	256	-	-	-	-	-	-
C3-krizen	4	270	-	-	-	-	-	-
Piren	4	202	-	-	-	-	+	+

Tablo 4. 6: Batman ham petrol konsantrasyonları uygulanmış (% 0,05 - % 0,5) bitki örneklerinde, 15. günde tespit edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkillenmiş PAH homologları. (C1-, C2-, C3-, C4-: Sırasıyla; Bir, iki, üç, dört metil grubuna sahip, - : tespit edilemedi.)

Bileşik	Halka Sayısı	Hedef İyonu	<i>A. filiculoides</i>					
			0,05%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
Naftalen								
C0-naftalen	2	128	-	-	-	-	-	-
C1-naftalen	2	142	-	-	-	-	-	-
C2-naftalen	2	156	-	-	-	-	-	-
C3-naftalen	2	170	+	+	+	+	+	+
C4-naftalen	2	184	-	-	-	-	-	-
Fenantren								
C0-fenantren	3	178	+	+	+	+	+	+
C1-fenantren	3	192	+	+	+	+	+	+
C2-fenantren	3	206	+	+	+	+	+	+
C3-fenantren	3	220	+	+	+	+	+	+
C4-fenantren	3	234	+	+	+	+	+	+
Dibenzotiofen								
C0-dibenzotiofen	3	184	-	-	-	-	-	-
C1-dibenzotiofen	3	198	-	-	-	+	+	+
C2-dibenzotiofen	3	212	-	-	-	-	-	-
C3-dibenzotiofen	3	226	-	-	-	-	-	-
Floren								
C0-floren	3	166	-	-	-	-	-	+
C1-floren	3	180	-	-	+	+	+	+
C2-floren	3	194	-	-	-	-	+	+
C3-floren	3	208	-	-	-	-	-	-
Krizen								
C0-krizen	4	228	-	-	-	-	-	-
C1-krizen	4	242	-	-	-	-	-	-
C2-krizen	4	256	-	-	-	-	-	-
C3-krizen	4	270	-	-	-	-	-	-
Piren	4	202	-	-	-	-	-	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler kirleticilerin toksik etkilerini belirli bir seviyeye kadar tolere edebilseler de kirlenmiş alanlarda yetişen bitkilerin büyümeleri indirgenebilir. Fitoremediasyon sistemlerinin daha etkili ve düzenli bir şekilde yapılabilmesi için kullanılacak bitki türlerinin yüksek çimlenme yüzdesine ve hızlı büyüme oranlarına sahip bitkilerden seçilmesi gerekmektedir (Fernet, 2008). Petrol hidrokarbonları tohum çimlenmesini geciktirmek, bitki büyümesini, fotosentez hızını ve biyokütleyi azaltmak gibi etkiler gösterebilir ya da bitkinin tamamen ölmesine neden olabilir. Petrol hasarının büyüklüğü öncelikle dökülen petrolün hacmi ve tipi, yayıldığı alandaki türler ve bitki örtüsü, dökülmenin olduğu mevsim, hava koşulları, petrol ayrışma derecesi ve toprak yapısı olmak üzere abiyotik ve biyotik bir dizi faktöre bağlıdır (Hershner ve Moore, 1977; DeLaune ve diğ., 1979; Alexander ve Webb, 1987; Mendelsohn ve diğ., 1990; Lin ve Mendelsohn, 1996; Pezeshki ve diğ., 2000; Lin ve diğ., 2002; Parada ve De Viana, 2005; Lin ve Mendelsohn, 2009). Ham petrol benzen, toluen, etil benzen ve ksilen gibi sayısız hidrofobik bileşikleri ve kısa zincirli alifatik bileşikleri içermektedir. Bu bileşikler kök ve yaprak gibi yüzeylere bağlanarak su ve gaz alınımını sınırlayan hidrofobik bir alan yaratmaktadır (Schnoor, 1997; Issoufi ve diğ., 2006). Ham petrol toksisitesi aynı zamanda oksijen yetersizliği yaratması sebebiyle hücre solunumunu da sınırlamaktadır (Cunningham ve diğ., 1995; Issoufi ve diğ., 2006). Ham petrolün kökler üzerindeki etkisi ya direkt mitokondriyal solunumu etkileyerek ya da dolaylı olarak hücre bölünmesi ve büyümesi aracılığıyla yarattığı hücrel hasarlarla bağlantılıdır (Issoufi ve diğ., 2006).

Bitkilerin petrol bileşenlerine vermiş oldukları cevaplar petrol türlerine ve konsantrasyonlarına göre farklılıklar göstermektedir. Cohen ve diğ. (2002) laboratuvar koşullarında uyguladıkları çalışmada dizel yakıt konsantrasyonlarından sadece % 0,005 lik deney ortamında *Azolla pinnata* bitkisinin yaşayabildiğini diğer konsantrasyonlarda ise (% 0,01, % 0,015, % 0,02, % 0,025, % 0,05, % 0,1, % 0,25, % 0,5, %1) öldüğünü belirtmiştir. Buna karşılık olarak uygulanan dizel yakıt konsantrasyonlarından (% 0,05, % 0,1, % 0,25, % 0,5, %1) *Pistia stratiotes* in sadece % 0,05 dizel konsantrasyonunda ve *Salvinia molesta* bitkisinin ise ancak % 0,05 ve % 0,1 dizel konsantrasyonunda yaşayabildikleri tespit edilmiştir (Cohen ve diğ., 2002). Meudec ve diğ. (2007)

Salicornia fragilis ile yaptıkları fitotoksisite deneyinde % 2 ve % 20 ham petrol uygulamalarında bitkilerin sırasıyla % 57 ve % 90 oranında öldüğü saptanmıştır. Bu çalışmada *Azolla filiculoides* bitkisinin uygulanan % 0,005, % 0,01, % 0,05, % 0,1, % 0,2 ham petrol konsantrasyonlarında yaşayabildiği ancak % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarının ise bitkilerin ölümüne sebep olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1). Yaprak yüzeyleri stoma ile gaz alış-verişi için geniş yüzey alanları sağlar. Yaprakta bulunan mumlu kutikula bitkileri dehidrasyondan ve hastalıklardan korur. Ancak yapraklar bu mumlu kutikula yapısından dolayı lipofilik özelliktedir. Böylece lipofilik karakterdeki bazı hidrokarbonlar kolaylıkla yaprak yüzeyine adsorbe olabilir (Fernet, 2008). Bu şekilde yüksek konsantrasyonlarda (% 0,3, % 0,4 ve % 0,5) uygulanan petrolün yaprak yüzeyini tamamen kaplayarak bitkinin kısa zamanda ölümüne sebep olduğu söylenebilir (Tablo 4.1, Şekil 4.2 ve 4.4).

Merkl ve diğ. (2004) ham petrolün bitki büyümesini önemli derecede indirgediğini belirtmiştir. Adam ve Duncan (2002), dizel yakıtın (25 ve 50 g dizel/kg toprak) birçok bitki türünde çimlenme oranlarında azalma ve çimlenme zamanında gecikmeye sebep olduğunu saptamıştır. Ogbo ve diğ. (2009) *Paspalum scrobiculatum* bitkisine uyguladıkları ham petrol konsantrasyonlarının (% 2,5, 5, 7,5, 10, 12 ve 15) bitki uzunluğu ve taze ağırlığı üzerine olan etkisini incelemiştir. Her bir konsantrasyon için büyüme kaplarında 3, 6 ve 9 olmak üzere farklı sayılarda bitki yetiştirilmiştir. Buna göre bitki kütlesi (biyomas), taze ağırlık kullanılarak değerlendirilmiştir. 6 adet bitki içeren kaplarda uygulanan % 2,5, % 5, % 7,5 ve % 10 ham petrol konsantrasyonlarında elde edilen taze ağırlıklar kontrole benzer değerler sergilemiştir. Bu örneklerde ham petrolün inhibe edici etkisi % 12,5 ve % 15 konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Sharifi ve diğ. (2007) 6 farklı bitki türü üzerine (*Medicago truncatula*, *Bromous mermis*, *Secale serale*, *Triticum sativa*, *Agropyron deserterum*, *Linum ussitasimum*) motor yağının (25, 50, 75, 100 g/kg toprak) etkisini araştırmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kirlenmiş topraklarda bitkilerin vermiş oldukları cevapların uygulanan doza bağlı olduğunu göstermiştir. *Bromous mermis*, *Agropyron deserterum*, *Linum ussitasimum* bitkilerinin kuru ağırlıkları uygulanan konsantrasyonların hepsinde kontrole oranla azalma göstermiştir. *Medicago truncatula*, *Secale serale*, *Triticum sativa* bitkilerinde ise özellikle 25 g/kg toprak konsantrasyonunda bitki kuru ağırlıkları kontrolden yüksek değerler sergilemiştir. Üzerinde çalışılan bitkiler arasında bitki çimlenmesi, büyümesi

ve kuru ağırlığı açısından en dayanıklı türün *Medicago truncatula* olduğu belirlenmiştir. Lin ve Mendelssohn (1996) tuzlu (*Spartina alterniflora*), hafif tuzlu (*Spartina patens*) ve tatlı (*Sagittaria lancifolia*) sularda yaşayan üç bitki türüne m² de 4, 8, 16 ve 24 L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda ham petrol uygulamıştır. Bu çalışmada *Spartina* türlerinin artan petrol konsantrasyonları ile bitki büyümelerinin indirgendiği (4 ve 8 L m⁻²) ya da bitkilerin öldükleri (16 ve 24 L m⁻²) bulunmuştur. Ancak diğer taraftan *Sagittaria lancifolia* da artan petrol konsantrasyonları ile birlikte bitki büyümesinin de arttığı saptanmıştır. Li ve diğ. (1990) düşük miktarlarda hidrokarbon eklenmesinin *Spartina alterniflora* bitkisinin büyümesini artırırken yüksek seviyelerin bitki büyümesinin indirgenmesine sebep olduğunu belirtmiştir. Peng ve diğ. (2009) sera koşullarında *Mirabilis jalapa* L. ile yaptıkları çalışmada % 0,5 oranında petrol içeren toprakta yetişen bitki biyokütlesinde kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir azalmanın olmadığını belirtmiştir. Diğer taraftan artan petrol konsantrasyonlarıyla birlikte (% 1 ve % 2) biyokütlenin de azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada uygulanan ham petrol konsantrasyonlarının bitki büyümesi üzerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.2 ve Şekil 4.5), % 0,005 ve % 0,01 ham petrol konsantrasyonlarında bitki büyüme yüzdesi ve taze ağırlık artışı kontrolle aynı hatta kontrolün biraz üzerinde büyüme göstermiştir. Petrolün bazı bitkilerin büyümesini stimüle etme mekanizması açık bir şekilde anlaşılamamıştır. Ancak bunun ya dolaylı olarak, mikrobiyal N fiksasyonundaki artış aracılığı ile, ya da direkt petrol ya da petrol metabolitlerinin bitki büyümesini stimüle edici etkisi ile olabileceği ileri sürülmüştür (Lin ve Mendelssohn, 1996). Bu çalışmada % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonlarında 15 günün sonunda bitki büyüme yüzdeleri ilk ağırlıklarının dört katına yakın bir değer göstermiştir. Diğer bir ifadeyle % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonları bitki büyümesini çok az indirgemıştır. % 0,2 petrol konsantrasyonunda ise bitki büyümesi ilk ağırlığının iki katı kadardır. % 0,3 petrol konsantrasyonundan itibaren ise bitkiler ölmüştür (Şekil 4.5). Bitki büyüme parametrelerinin inhibisyonu (çimlenme, bitki uzunluğu ve biyokütle) ham petrolde bulunan düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonların toksik etkilerinden kaynaklanabilir. Çünkü bu bileşikler hücre zarlarından geçebilmekte ve böylece zar geçirgenliğini indirgemekte ve/veya bitki hücresinin ölümüne sebebiyet verebilmektedir (Zand ve diğ., 2010).

Ham petrolle kirlenmiş alanlarda yetişen bitkilerin fide gelişimi ve büyüme oranları bu bitkilerin fitoremediasyon potansiyellerinin belirlenmesi için kullanılabilir. Bitkinin bu alanlarda tutunabilmesi çimlenme oranları, bitki uzunluğu, kök ve gövde biyokütlesi göz önüne alınarak tahmin edilebilir. Ham petrolle kontamine olmuş alanlarda bitkinin tutunabilmesinin değerlendirilmesinde bu parametrelerden en önemlisi kök biyokütlesidir (Issoufi ve diğ., 2006). Fitoremediasyonla kirleticilerin etkin bir şekilde degradasyonu, yaygın bir kök sistemine bağlıdır. Kökler kirleticileri sekwestre ederek, toprak havalanmasını sağlayarak ve toprakta kirleticilerin hareketlerini kısıtlayarak fitoremediasyonun etkinliğini artırır. Ham petrolle kirlenmiş alanların temizlenmesinde köklerin sunduğu en önemli katkı kuşkusuz mikroorganizmaların aktivitesini artırmalarıdır (Spiars ve diğ., 2001). Çünkü artan kök biyokütlesi ile rizosfer etkisi de artmaktadır. Rizosferde bulunan mikroorganizma popülasyonu rizosfersiz alanlardan genel olarak 10-100 kat daha fazladır (Issoufi ve diğ., 2006). Merkl ve diğ. (2005) % 5 (w/w) oranında ağır ham petrolle kontamine olmuş toprakta 6 farklı bitki türü (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Stylosanthes capitata*, *Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus*, *Eleusine indica*) ile çalışmıştır. Bu çalışmada özellikle *Brachiaria brizantha* bitkisinin kök ve gövde büyümesi diğer bitkilere oranla hem kontamine olmuş ve hem de kontrol ortamlarında daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu bitki türünün kök büyümesi kontamine olmamış kontrol ortamında yetişen *Brachiaria brizantha* bitkisine oranla oldukça indirgenmiştir. Yine bu çalışmada kullanılan çok yıllık iki çim türünün (*Brachiaria brizantha* ve *Cyperus aggregatus*) kök biyokütlesi ile petrol degradasyonu arasında önemli bir ilişkinin olduğu görülmüştür (Merkl ve diğ., 2005). Gaskin ve diğ. (2008) Avustralya doğal çim türlerini dizel yakıt ve motor yağı karışımı (60:40) ile hazırladıkları % 0,5 ve % 1 konsantrasyonlardaki topraklarda, sera koşullarında yetiştirmiştir. Çimlenme performansları göz önüne alınarak büyüme deneyleri için *Brachiaria decumbens*, *Cymbopogon ambiguus* ve *Microlaena stipoides* var. Griffin bitkileri değerlendirilmiştir. *B. decumbens* bitkisi kontaminasyondan olumsuz bir şekilde etkilenmemiştir. Kök biyokütlesi açısından 60. ve 120. günde kontamine olmuş topraklarda yetişen bitki ile kontamine olmamış topraklarda yetişen bitki arasında önemli bir fark bulunmamıştır. *C. ambiguus* her iki konsantrasyonda özellikle 120. günde kök biyokütlesinde kontrole oranla önemli derecede artış göstermiştir. *M. stipoides* ise 60. günde % 0,5 konsantrasyonda kök biyokütlesinde artış gösterirken %1

konsantrasyonda bu etki gözlenmemiştir. 120 günlük deney süresinin sonunda kontamine ve kontamine olmayan toprakta yetişen *M. stipoides* bitkisinin kök biyokütelleri arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Zand ve diğ. (2010), *Zea mays* L. ve *Festuca arundinacea* bitkilerinin petrolle kontamine olmuş, turba katkısı (peat amendments) içeren ve içermeyen topraklardaki büyümelerini incelemiştir. Petrolle kontamine olmuş ve bitki gübresi içeren toprakta yetişen *Festuca arundinacea* bitkisinin kök biyokütlesinde kontrole göre önemli bir azalma bulunmazken *Zea mays* L. bitkisi için kök biyokütlesi kontrole göre % 28 indirgenmiştir. Peng ve diğ. (2009) sera koşullarında *Mirabilis jalapa* L. ile yaptıkları çalışmada % 0,5 oranında petrol içeren toprakta yetişen bitki kök uzunluğu ve kök biyokütlesi kontrole yakın değerler sergilemiştir. Artan petrol konsantrasyonları (% 1 ve % 2) ile kök uzunluğu ve kök biyokütlesi indirgenmiştir. Lin ve Mendelssohn (2008) sera koşullarında 0, 20, 40, 80, 160, 320 ve 640 mgdizel g⁻¹ içeren kuru sedimentte yetiştirdikleri tuzlu kıyı ve bataklık bitkisi olan *Juncus roemerianus* in dizel fitoremediasyonundaki etkinliğini ve dizel yakıtı karşı toleransını araştırmıştır. Bu çalışmaya göre 1 yıllık deney süresinin sonunda *Juncus roemerianus* bitkisinin dizel yakıtı toleransının 160 - 320 mgdizel g⁻¹kuru sediment arasında olabileceği belirtilmiştir. Diğer taraftan düşük dizel konsantrasyonları (20 – 40 mgdizel) su altında kalan bitki kısımlarının biyokütlesi üzerinde önemli bir etki yaratmazken yüksek konsantrasyonlar (80 – 640 mgdizel) oldukça etkili olmuştur. Şekil 4.4 incelendiğinde bu çalışmada özellikle % 0,005 - % 0,1 ham petrol konsantrasyonu aralığındaki kök büyümesi ve yoğunluğunun kontrole yakın ya da benzer görünüm sergilediği bulunmuştur. Artan petrol konsantrasyonları ile birlikte (% 0,2 - % 0,5) kök yoğunluğu ve büyümesinin indirgeniği görülmüştür. Bitki büyüme yüzdesi, taze ağırlık artışı ve kök büyümesinden elde edilen değerler incelendiğinde *A. filiculoides* bitkisinin ham petrole olan toleransının % 0,1 - % 0,2 petrol konsantrasyonu aralığında olabileceği söylenebilir.

Ekstrakte organik madde (EOM) miktarının kontrol örnekleri ile kıyaslandığında sadece % 0,005 petrol uygulamasında azaldığı buna karşılık olarak uygulanan diğer bütün petrol konsantrasyonlarında konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Şekil 4.6). Bu yüzden örneklerden elde edilen EOM miktarlarının önemli bir bölümünü toplam hidrokarbonların oluşturduğunu söyleyebiliriz. Aynı şekilde kontrol ve bitki büyüme ortamları ile bitkideki toplam petrol hidrokarbonlarının (TPH) da uygulanan

petrol konsantrasyonlarına paralel olarak arttığı saptanmıştır (Şekil 4.7 – 9 ve Tablo 4.2). Bitki büyüme ortamlarının üst tabakalarından elde edilen TPH miktarları kontrol büyüme ortamlarının üst tabakalarından elde edilen TPH miktarlarına göre yüksek oranda azalma göstermiştir. Bunun sebebi olarak deney süresinin bitiminde bitkinin ortamdaki kaldırılması sırasında bitki üzerine adsorbe olan petrol bileşenlerinin de bitki ile birlikte alınması gösterilebilir. Çünkü bitki örneklerinden elde edilen TPH miktarları kontrol besiyerinin üst fazı ile aynı paralelde değerler vermiştir (Tablo 4.2). Ayrıca Şekil 4.2 incelendiğinde ortamda petrolün tamamen tükenmediği de görülmektedir. Diğer taraftan *Azolla filiculoides* bitkisinin tatlı su alanlarında meydana gelecek petrol kirliliğinde fitoremediasyon çalışmalarında kullanılmasının yanısıra, petrol bileşiklerinin yaprak yüzeyine adsorbe olmalarından dolayı yüksek konsantrasyonlardaki petrolün fiziksel olarak temizlemesinde de kullanılabileceği söylenebilir.

Huang ve diğ. (2005) yaklaşık olarak % 5 oranında total petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş tarım alanında çok yönlü fitoremediasyon sistemini (arazi tarımı, biyoremediasyon ve fitoremediasyon yöntemlerinin hepsini içeren) 8 ay boyunca uygulamıştır. Ayrıca bu sistemi tek tek uygulanan fitoremediasyon, biyoremediasyon ve arazi tarımı (havalandırma ve gün ışığı gibi doğal koşullar) ile karşılaştırmıştır. 8 aylık süre sonunda topraktan kaldırılan TPH miktarı fitoremediasyonla % 55 olarak bulunurken çok yönlü fitoremediasyon sisteminde % 90 olarak saptanmıştır. Arazi tarımı (% 20) ve biyoremediasyon (% 40) yöntemleri ise oldukça düşük değerler sergilemiştir. Brown ve diğ. (1998) biyoremediasyon çalışması için aktif olmayan rafineri alanından alınan kompleks petrol bileşikleriyle kontamine olmuş toprağı kullanmıştır. Bu toprağı yüksek ve düşük oranlarda azot içeren kompost karışımları ilave edilmiştir. 110 günlük deney süresi boyunca petrol bileşiklerinin farklı toprak koşullarındaki biyodegradasyonları incelenmiştir. 110 günün sonunda kontrol toprakta TPH kaybı sadece % 7 de kalırken yüksek oranda azotlu kompost karışımı içeren topraktan TPH kaybı % 50 - % 62 arasında olmuştur. Lin ve Mendelssohn (2008), *Juncus roemerianus* bitkisi kullanarak yaptıkları bir yıl süren fitoremediasyon çalışmasının sonunda hem yüzey sedimentinde (0-2 cm) ve hem de alt sedimentte (8-10 cm) bulunan TPH miktarının bitkisiz ortamdaki TPH miktarına oranla anlamlı derecede azaldığını bulmuştur. Nedunuri ve diğ. (2000) Teksas' ta bulunan ham petrolle

kirlenmiş tarım alanında *Sorghum bicolor* L., *Lolium annual* ve *Stenotaphrum secundatum* L. bitkilerinin fitoremediasyon kapasitelerini test etmiştir. Buna göre TPH konsantrasyonu 21 ay sonunda *L. annual* için % 42, *S. secundatum* için % 50 azalma göstermiştir. Peng ve diğ. (2009) % 0,5, % 1 ve % 2 oranında petrol içeren toprakta sera koşullarında *Mirabilis jalapa* L. bitkisinin fitoremediasyonunu araştırmıştır. 127 günlük deney süresinin bitiminde bitkili toprakta TPH degradasyonu % 41,61 - 63,20 arasında bulunurken bitkisiz toprakta % 19,75 – 37,92 arasında kalmıştır. Genel olarak bakıldığında TPH degradasyonunda fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların hepsi etki göstermektedir. Bitkisiz kontrol ortamlarındaki degradasyon ise sıklıkla buharlaşma ve fotolizden kaynaklanmaktadır (Peng ve diğ., 2009). Bu çalışmada bitki uygulaması ile büyüme ortamlarından elde edilen TPH miktarları bitkisiz kontrol ortamlarından elde edilen TPH miktarlarına oranla anlamlı derecede ($p < 0,0001$) düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında *A. filiculoides* bitkisinin petrol fitoremediasyonunda etkili olduğu söylenebilir.

Şekil 4. 18 – 19 da *A. filiculoides* bitkisine ait TIC lerde, uygulanan % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarında UCM (çözünmemiş kompleks karışım) belirgin olarak görülmektedir. Buna karşılık olarak % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonlarında (Şekil 4. 18) UCM gözlenmezken % 0,2 petrol konsantrasyonunda oldukça düşük bir değerdedir (Şekil 4. 19). UCM genel olarak kapiler GC kolonları tarafından çözünemeyen dallı ve halkalı hidrokarbonların birçok yapısal kompleks izomer ve homologlarının karışımı olarak kabul edilir. Kimyasal degradasyon teknikleri kullanılarak UCM nin temel olarak dallanma noktalarında “T-şeklinde” moleküllerle (dallanmış alkanlar gibi) sonuçlanan düz karbon zincirlerinden oluştuğu gösterilmiştir. Bu moleküller biyolojik parçalanmaya dirençlidirler. Alifatik hidrokarbon kromatogramlarında UCM varlığının genel olarak degrade olmuş ya da hava etkisine maruz kalmış petrol artıkları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Readman ve diğ., 2002). UCM sıklıkla biyodegradasyona uğramış petrol ve hidrokarbon ekstralarında gözlenmektedir. Biyodegrade olmuş petrolün UCM si tipik olarak ya düşük yoğunlukta alifatik bileşiklere sahiptir ya da bu bileşiklerden tamamen yoksundur (Ventura ve diğ., 2008).

Şekil 4.10 – 21 arasındaki Total İyon Kromatogramları incelendiğinde petrol hidrokarbonlarından alifatik zincire ait pikler kontrol örneklerinde C_{14} ten, bitkili deney seti numunelerinde C_{12} den itibaren görülebilmektedir (Şekil 4.10 – 21). Ancak kolon kromatografisi sonucunda elde edilen örneklere ait kromatogramlar (Şekil 4.22 - 33) incelendiğinde alifatik zincir, kontrol örneklerinde C_{13} ten, bitki örneklerinde C_{11} den başlamıştır. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen bitki ve kontrol örneklerine ait kromatogramlarda $C_{11} - C_{35}$ arasındaki n-alkanlar karakteristik normal (gaus) dağılım göstermiştir. Benzer bir sonuç Brown ve diğ. (1998) nin çalışmasında da bulunmuştur. Kontrol ve bitki örneklerinin n-alkan zinciri incelendiğinde (Şekil 4.34 - 39) petrol konsantrasyonu arttıkça örneklerin içerdikleri alkan miktarları da artmaktadır. Ancak kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında bitki örneklerinin içerdikleri alkan miktarları oldukça düşüktür. Örneğin, % 0,05 petrol konsantrasyonunun kontrol örneğinde elde edilen en yüksek alkan miktarı $22,5\mu\text{g/ml}$ (C_{20}) iken aynı petrol konsantrasyonunun bitki örneğinde $1,23\mu\text{g/ml}$ (C_{20}) dir (Şekil 4.34 – 39). Toplam alkan miktarları bitki örneklerinin özellikle % 0,05, % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında kontrol örneklerine göre oldukça azalmıştır. % 0,05 petrol konsantrasyonunda bitki örneğinde elde edilen toplam alkan miktarı kontrol örneğinin yaklaşık 1/15 i kadardır. Bu değer % 0,5 petrol konsantrasyonu içeren bitki örneğinde ise kontrol örneğinin yaklaşık 1/3 ü kadardır (Şekil 4.40). 15 günlük deney süresi sonunda % 0,05 petrol konsantrasyonunda heksadekana (C_{16}) kadar olan alkan bileşikleri tespit edilemezken % 0,5 petrol konsantrasyonunda tridekana (C_{13}) kadar olan alkan bileşikleri tespit edilememiştir. Bu şekilde petrol konsantrasyonunun artışıyla ters orantılı olarak ortamdan kaldırılan alkan bileşiklerinin içerdiği karbon sayılarının azaldığı söylenebilir. % 0,05 petrol konsantrasyonunda $C_{16} - C_{35}$ arasındaki alifatik hidrokarbonların kontrol örneklerine göre biyodegradasyonları $> \% 89$ dur (Şekil 4.41). Diğer taraftan özellikle % 0,3 - % 0,5 petrol konsantrasyonu aralığında $C_{16} - C_{18}$ arasındaki alkan bileşiklerinin biyodegradasyon yüzdeleri büyük oranda (% 58 - % 46) düşmüştür (Şekil 4.41). Günther ve diğ. (1996) *Lolium perenne* L. ekili topraktaki hidrokarbon kaybının bitkisiz topraktan çok daha fazla olduğunu bulmuştur. Özellikle rizosfer toprak sisteminde alifatik hidrokarbonların (C_{10} - C_{24}) bitkisiz toprağa oranla oldukça hızlı bir şekilde ortamdan kaldırıldığı belirtilmiştir (Günther ve diğ., 1996). Huang ve diğ. (2005) nin çalışmasında % 5 oranında petrolle kontamine olmuş toprakta fitoremediasyon yöntemi TPH 1 % 55 oranında azaltmasının yanında özellikle (C_{23} - C_{34}) ve (C_{34} - C_{50}) arasında

karbon içeren kalıcı fraksiyonların da ortamdan önemli ölçüde kaldırılmasını sağlamıştır. Lin ve Mendelssohn (2008), *J. roemerianus* ile fitoremediasyon çalışmasında n-alkanlar % 85 ile % 99,8 arasında ortamdan kaldırılırken bitkisiz ortamda bu oran % 38 ile % 87 arasındadır. Peng ve diğ. (2009) *Mirabilis jalapa* L. yı kullandıkları petrol fitoremediasyonu çalışmalarında 127 günün sonunda doymuş hidrokarbon degradasyonunun aromatik fraksiyonlar, asfaltenler ve polar bileşiklerden oldukça yüksek olduğunu belirtmiştir. Doymuş hidrokarbon degradasyonu % 60,52-73,11 ile en yüksek değeri verirken ikinci olarak aromatik fraksiyonlar % 21,61-48,50 arasında degradasyona uğramıştır. Bu çalışmada laboratuvar koşullarında ham petrolle kontamine olmuş büyüme ortamlarında yetiştirilen *Azolla filiculoides* bitkisinin toplam alifatik hidrokarbonların biyodegradasyonları üzerine olan etkisi % 0,05 - % 0,2 petrol konsantrasyon aralığında % 94 - % 73 gibi yüksek değerlere sahipken % 0,3 - % 0,5 petrol konsantrasyonunda % 71 - % 63 arasındadır. Diğer bir ifadeyle bitkinin canlı kaldığı petrol konsantrasyonlarında (% 0,05, % 0,1, % 0,2) toplam alifatik hidrokarbonların biyodegradasyonları ortalama % 81 iken bitki gelişiminin büyük oranda inhibe edildiği ve yaşamını sürdüremediği petrol konsantrasyonlarında (% 0,3, % 0,4, % 0,5) % 68 dir (Şekil 4.42).

Kromatogramlarda görülen baskın fitan pikleri n-alkan konsantrasyonlarının büyük olasılıkla % 75-90 oranında kaybolduğunu gösterdiği ifade edilmiştir (Brown ve diğ., 1998). Bu çalışmada en baskın pik fitan piki olmamasına rağmen çoğu örnekte fitan pikleri pristan piklerinden daha baskındır (Şekil 4.22 - 33). % 0,05 - % 0,2 petrol konsantrasyonu aralığında toplam alkan biyodegradasyonu ortalama % 81 olarak bulunmuştur (Şekil 4.42). Petrol hidrokarbonlarından alkanlar diğer bileşiklere oranla daha kolay degradasyona uğramaktadır (Zhu ve diğ., 2001). Bu şekilde düşük petrol konsantrasyonlarında *A.filiculoides* bitkisinin alkan biyodegradasyonunda oldukça etkili olduğu söylenebilir. Taze ham petrol için C₁₇/Pristan, C₁₈/Fitan oranlarının tipik olarak 2.0 dan büyük olduğu belirtilmektedir (Brown ve diğ., 1998). 15. günde kontrol örneğinin % 0,05 petrol konsantrasyonunda C₁₇/Pr, C₁₈/Ph ve Pr/Ph oranları sırasıyla 2,34, 2,02 ve 0,29 iken bitki örneğinin % 0,05 petrol konsantrasyonunda ise sırasıyla 1,74, 1,18 ve 0,24 tür (Şekil 4.43 ve Tablo 4.4). Örneklere uygulanan petrol konsantrasyonları arttıkça C₁₇/Pr, C₁₈/Ph ve Pr/Ph oranları da artmıştır (Şekil 4.43 – 48 ve Tablo 4.4). Şekil 4.43 – 48 arasındaki şekiller ve Tablo 4.4 incelendiğinde, bitki

örneklerinin C_{17}/Pr ve C_{18}/Ph oranlarının özellikle % 0,05, % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında kontrole göre belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Pr/Ph oranları bitkinin canlı kaldığı petrol konsantrasyonlarında (% 0,05, % 0,1 ve % 0,2) kontrolden düşük değerler sergilerken, anlamlı bir düşüş sadece % 0,1 petrol konsantrasyonunda saptanmıştır (Şekil 4.44). İsooprenoid oranlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdelere bakıldığında % 0,05 petrol konsantrasyonunda C_{18}/Ph % 42 ile yüksek bir değere sahiptir. Diğer taraftan % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarında C_{17}/Pr ve C_{18}/Ph oranlarının kontrole göre biyodegradasyon yüzdeleri ortalama olarak sırasıyla % 22 ve % 23 tür. % 0,05 ve % 0,1 petrol konsantrasyonlarında Pr/Ph isoprenoid oranlarının biyodegradasyon yüzdesi ortalama % 16 civarındadır. Ham petrolde bulunan pristan ve fitan gibi yapısal olarak kompleks alkanlar, 4-6 halkalı PAH lar, sikloalkanlar, asfaltanlar, reçineler ve polar bileşiklerin biyodegradasyonları daha yavaştır. Pristan ve fitan biyoremediasyon çalışmalarının erken evreleri için kullanılan biyomarkırlardır. Petrol biyodegradasyonu kompleks yapıya benzer kaynama noktası ve çözünürlüğe sahip olan bu alkanların miktarlarındaki azalma ile değerlendirilmektedir (Prince, 1993; Bragg ve diğ., 1994; Zhu ve diğ., 2001). Bu çalışmada C_{17}/Pr , C_{18}/Ph ve Pr/Ph oranlarından elde edilen değerler Brown ve diğ. (1998) ve Okoro (2008) nun biyoremediasyon çalışmalarından elde edilen verilerle paralellik göstermektedir.

Forni ve diğ. (2002) sülfadimetoksin antibiyotiğinin laboratuvar koşullarında *Azolla filiculoides* tarafından etkin bir şekilde degrade edildiğini belirtmiştir. Flocco ve diğ. (2002) hidroponik kültürde *Medicago sativa* varlığında fenantrenin yarı ömrünün bitkisiz ortama göre 2.7 kat azaldığını belirtmiştir. Ling ve Gao (2004) *Amaranthus tricolor* ekili toprakta fenantren kaybının % 87,85 - % 94,03 olmasına rağmen bitkisiz toprakta bu kaybın ancak % 2,55 - % 13,66 arasında olduğunu bulmuştur. Gao ve diğ. (2006) pirinç ve PAH parçalayıcı bakteriler (*Acinetobacter* sp.) ile birlikte uyguladıkları fitoremediasyon çalışmasında fenantrenin 40 günde % 86 – 87 oranında kaldırılırken, kontrol toprağında fenantrenin 80 günde % 70 – 78 civarında kaldırıldığını bulmuştur. Yan ve diğ. (2011) bir sualtı makrofiti olan *Vallisneria spiralis* in tatlı su sedimentinde bulunan fenantren konsantrasyonlarına (8,24,40,56 ve 80 $mg\ kg^{-1}$ kuru sediment) karşı toleransını ve kaldırma potansiyelini araştırmıştır. 80 $mg\ kg^{-1}$ kuru sedimente kadar olan fenantren konsantrasyonlarında bitki büyümesi olumsuz bir şekilde etkilenmemiştir.

Bitkili sedimentte fenantrenin kaldırılması bitkisiz sedimente oranla % 18 daha fazla bulunmuştur. Huesemann ve diğ. (2009) *Zostera marina* ile yaptıkları *in situ* fitoremediasyon çalışmasında aromatik halka sayılarından ve klorlama derecelerinden bağımsız olarak tüm PAH ve PCB lerin bitkili sedimentte bitkisiz kontrollere oranla çok daha fazla oranda kaldırıldığını bulmuştur. 60 haftalık deney süresinin sonunda toplam PAH bitkili sedimentte % 73 azalırken bitkisiz kontrolde sadece % 25 azalmıştır. Wei ve Pan (2010) *Medicago sativa*, *Brassica campestris* ve *Trifolium repens* bitkilerinin fenantren ve piren degradasyonunu teşvik ettiğini belirtmiştir. Fenantren biyoremediasyonunda en etkili tür ise *B. campestris* olarak bulunmuştur. Wild ve diğ. (2005) fenantren ve antrasenle kontamine olmuş büyüme ortamından mısır ve buğday köklerine bu bileşiklerin alınması ve taşınmasının araştırıldığı iki foton uyarması mikroskobu (TPEM) ile yapılan çalışmada apoplastik taşınımın, kökte taşınım için baskın yol gibi görüldüğü belirtilmiştir. Aynı zamanda antrasen degradasyonu direkt olarak her iki bitki türünün metabolik olarak aktif olgun kök korteks hücrelerinin hücre çeperlerinde gözlenmiştir. Wu ve diğ. (2009) arbuskular mikorizal fungus (*Glomus etunicatum* L.) varlığının *Medicago sativa* tarafından köklerde yüksek miktarda fenantren birikimini artırdığını bulmuştur. Yine aynı çalışmada fenantrenin köklere alınımının apoplastik yolla olduğu vurgulanmıştır. Böylece arbuskular mikorizal inokülasyonun kimyasal kompozisyonda değişimler yaratarak fenantrenin kökler tarafından emilimi ve alınımının yanısıra bitki içerisindeki translokasyonunu da etkilediği belirtilmiştir. Bu çalışmada bitkili ortama uygulanan en yüksek petrol konsantrasyonunda (% 0,5) bile elde edilen fenantren miktarı kontrol ortamına uygulanan % 0,05 petrol konsantrasyonundan elde edilen fenantren miktarından % 20 daha düşüktür (Şekil 4.59 – 4.65). Bitkinin canlı kaldığı % 0,05, % 0,1 ve % 0,2 petrol konsantrasyonlarının kontrol örneklerine göre biyodegradasyon yüzdeleri % 81 – 77 arasında iken bitki popülasyonunun çoğunluğunun öldüğü % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 petrol konsantrasyonlarında bu değer % 75 – 71 arasındadır (Şekil 4.66). Fenantren için bu çalışmadan elde edilen veriler yapılan diğer PAH fitoremediasyon çalışmaları ile paralellik sağlamaktadır. Sediment ve tatlı sularda PAH ların yarattığı potansiyel karsinogen risklerin değerlendirilmesi ve bu alanlardaki kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır (Maillacheruvu ve Safaai, 2002). Aromatik bileşiklerin ve diğer organik kirleticilerin remediasyonu oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu süreç bitki, ilişkili oldukları mikroorganizmalar ve kirleticinin bitki ve

mikroorganizmalar tarafından biyoyararlanımı gibi birçok faktöre bağlıdır. PAH bileşiğinin molekül ağırlığı ve içerdiği benzen halkası arttıkça degradasyonu yavaşlamaktadır. Fenantren, 4 ve daha fazla halkalı PAH bileşiklerine göre daha az lipofiliktir ve sudaki çözünürlüğü daha fazladır (Haritash ve Kaushik, 2009). Yapılan çalışmalardan (Wild ve diğ.,2005; Wu ve diğ., 2009) fenatrenin köklere apoplastik yolla alındığı ve fenatrenle aynı molekül ağırlığına sahip üç halkalı aromatik hidrokarbon olan antrasenin kök korteks hücrelerinde degradasyona uğradığı (Wild ve diğ.,2005) da bilinmektedir. Bu çalışmadan elde edilen verilerle *A. filiculoides* in fenantren kirliliğinin ortadan kaldırılmasında etkin olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Ham petrol kirliliğinin ortamdan kaldırılması için yapılan fitoremediasyon çalışmalarında temel olarak; bitkiler, bitki ve mikroorganizmalar, bitki ve gübre tarzında katkıları, bitki, mikroorganizma ve katkı maddelerinin hep birlikte olduğu çok yönlü süreçler kullanılmaktadır. Genel olarak ham petrol kirliliğinin temizlenmesinde bitki ve/veya diğer ortamların birlikte kullanıldığı alanlardaki degradasyonun bitkisiz ortamlara oranla daha etkili olduğu söylenebilir. Sulak alanların temizlenmesi sucül bitki yüzeyleri de dahil olmak üzere katı yüzeyleri örten bakteriyel perifitonu içeren çeşitli ekolojik grupların mikrobiyal birlikteliğinin katılımıyla gerçekleştirilebilir. Sucül bitkilerin bakteriyel perifitonu olumsuz koşullara karşı toleranslıdır ve kirleticilerin birçoğunun dönüşümü ve degradasyonunda yüksek bir potansiyele sahiptir. Bitkiler mikroorganizmalara substrat desteğinin haricinde, enzimleri aracılığı ile ksenobiyotikleri absorbe ederek, akümüle ederek ya da dönüştürerek kirliliğe karşı cevap oluştururlar. Su bitkilerinin ve mikroorganizmaların kirleticilere karşı kararlılığı ve degrade edici aktiviteleri su alanlarının fitoremediasyonu için biyoteknolojik çözümler sunmaktadır (Tumaikina ve diğ., 2008). *Azolla* nın dorsal yaprak kavitelerinde bulunan simbiyotik birliktelikler azot fikse eden siyanobakteri (*Anabaena*) ve heterotrofik bakterilerden oluşmaktadır. Yaprak kavitesindeki ve diğer bitki dokuları ile yakın ilişkili heterotrofik bakteriler azot fikse etme metabolizmaları aracılığı ile simbiyotik birlikteliğe yarar sağlayabilir. *Azolla* yaprak kavitesinde ve dokularında tespit edilen bakteriler, gram-pozitif *Arthrobacter* ve *Rhodococcus* türleri ile gram-negatif *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* ve *Pseudomonas* türleridir (Cohen ve diğ., 2004a). Petrol biyodegradasyon çalışmalarında ortama besin eklenmesi, besin uygulanmamış kontrol örneklerine göre biyodegradasyonda tipik olarak 3-5 katlık

artışlar sağlamaktadır. Tatlı su ve deniz ortamlarında meydana gelen büyük ölçekli petrol kirliliklerinde karbon kaynağı önemli ölçüde artarken azot ve fosfor genellikle petrol biyodegradasyonu için sınırlayıcı faktör haline gelmektedir (Atlas, 1984; Leahy ve Colwell, 1990; Zhu ve diğ., 2001). Teorik olarak 1 g hidrokarbonun hücre materyaline dönüşümü için 150 mg N ve 30 mg P gerekmektedir (Rosenberg ve Ron, 1996; Zhu ve diğ., 2001). Fitoremediasyon çalışmalarının başarılı olabilmesi için her ne kadar bitki ve mikroorganizmaların mutlaka yaşaması gerekli olsa da (White ve diğ., 2006) bu her zaman istenen bir durum olmayabilir. Çünkü tatlı su eğreltisi olan *Azolla* öldüğü zaman depoladığı azotu serbest bırakmaktadır (Cohen ve diğ., 2004b).

Sonuç olarak, tatlı su alanlarındaki petrol konsantrasyonunun, *Azolla filiculoides* kullanarak yapılacak fitoremediasyon çalışmalarında başarılı transplantasyonu kontrol eden önemli faktörlerden biri olduğu söylenebilir. Bu çalışmadan elde edilen veriler bitkilerin petrol konsantrasyonlarına verdikleri cevapların, değerlendirilen parametreler göz önüne alındığında iki kısımda incelebileceğini göstermiştir. Düşük ham petrol konsantrasyonları (% 0,05, % 0,1 ve % 0,2) büyüme üzerinde çok az etkide bulunurken, yüksek petrol konsantrasyonları (% 0,3, % 0,4 ve % 0,5) bitkilerin kısa zamanda ölümüne sebep olmuştur (Şekil 4.2, Tablo 4.1). Bitki büyüme yüzdesi, taze ağırlık artışı ve kök büyümesinden elde edilen değerler incelendiğinde *A. filiculoides* bitkisinin ham petrole olan toleransının % 0,1 - % 0,2 petrol konsantrasyonu aralığında olabileceği söylenebilir (Şekil 4.2 - 5). Gerek isoprenoid oranları, gerek alifatik hidrokarbon miktarları ve gerekse fenantren miktarlarındaki düşüş göz önüne alındığında bitkinin uygulanan petrol konsantrasyonlarında 15 gün gibi kısa zaman aralığında etkin bir şekilde çalıştığı görülmektedir. Bitkinin canlı kaldığı konsantrasyonlarda (% 0,05, % 0,1 ve % 0,2) alifatik (ortalama % 81) ve aromatik (fenantren, ortalama % 78) bileşik biyodegradasyonundan elde edilen yüksek değerler canlı bitkinin petrol bileşiklerinin degradasyonunda daha etkin bir kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Bitki canlılığının sürdüğü bu konsantrasyonlarda *A. filiculoides* in ürettiği enzimler aracılığı ile petrol bileşenlerinin degradasyonunu başarıp başarmadığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak, rizosferde bulunan mikroorganizmalarla ya da bitki yüzeyinde bulunan bakteriyal periftonla olan degradasyon, kök eksudatlarının stimüle etmesi, ve/veya bitki enzimleri fitoremediasyon çalışmalarında organik bileşiklerin remediasyonunun artırılmasında geniş bir şekilde kabul gören en temel süreçlerdir. Bitki

ölse bile (% 0,3, % 0,4 ve % 0,5) alifatik (ortalama % 68) ve aromatik (fenantren, ortalama % 71) bileşikler için yine de büyük oranda biyodegradasyona sebep olduğu görülmüştür. Bilindiği üzere çevredeki petrol kirliliğinin ortadan kaldırılmasındaki en önemli mekanizma mikrobiyal degradasyondur ve petrol kirliliği olan alanlarda canlı organizmalar için azot ve fosfor kullanılabilirliği de sınırlanmaktadır. Böylece *Azolla filiculoides* bitkisinin öldüğü petrol konsantrasyonlarında bile alifatik ve aromatik bileşiklerin etkili bir şekilde biyodegradasyonları, bitkinin ölümü ile açığa çıkan azot, fosfor ve mikro elementlerin bitki üzerinde ya da rizosferde yaşayan bakterileri teşvik etmesiyle olabileceği söylenebilir.

Genel olarak bakıldığında ham petrol kirliliğinin temizlenmesinde bitki kullanımının bitkisiz ortamlara oranla daha etkin degradasyona yol açtığı bilinmektedir. Bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla filiculoides* ile yapılan bu çalışmada özellikle yurdumuz pirinç tarımı açısından bu bitkinin kullanımının teşvik edilmesi gerekmektedir. Ayrıca organik kökenli kirliliklerin giderilmesinde kullanılmak üzere sanayi ve tarım bölgelerine yakın tatlı su alanlarında büyümeleri de sağlanabilir. Azot fikse eden simbiyotik ortağından dolayı pirinç tarımında dünya genelinde etkin bir şekilde kullanılan *A. filiculoides* düşük konsantrasyonlardaki petrol kirliliğinin temizlenmesinde etkin bir cevap vermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu bitkiye PAH bileşikleri ayrı ayrı uygulanarak bu bileşiklerin bitki üzerindeki biyokimyasal etkileri, fitoremediasyonları ve degradasyonları araştırılabilir, ayrıca bitki üzerinde yaşayan bakteriler belirlenerek bu bakterilerin petrol degradasyonu üzerindeki etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

- ABEDIN, M.J., FELDMANN, J., MEHARG, A.A., 2002, Uptake kinetics of arsenic species in rice plants, *Plant Physiology*, 128, 1120-1128.
- ABHILASH, P.C., JAMIL, S., SINGH, N., 2009, Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics, *Biotechnology Advances*, 27, 474-488.
- ADAM, G., DUNCAN, H., 2002, Influence of diesel fuel on seed germination, *Environmental Pollution*, 120, 363-370.
- ALEXANDER, S.K., WEBB, J.W., 1987, *Relationship of Spartina alterniflora growth to sediment oil content following an oil spill*, In: The Proceeding of 1987 Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington, DC.
- ANDREW, C.S., DAVID E.C., IAN P.T., 2003, Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation, *TRENDS in Biotechnology* 21(3), 123-130.
- ANTIZAR-LADISLAO, B., LOPEZ-REAL, J.M., BECK, A.J., 2004, Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated Waste Using Composting Approaches, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34 (3) 249-289.
- APRILL, W., SIMS, R.C., 1990, Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil, *Chemosphere*, 20, 253-265.
- ASHTON, P.J., WALMSLEY, R.D., 1976, The aquatic fern *Azolla* and its *Anabaena* symbiont, *Endeavour*, 35, 39-43.
- ATLAS, R.M., 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective, *Microbial Reviews*, 45, 180-209.
- ATLAS, R.M., 1984, *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York.
- ATLAS, R.M., 1995, Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 178-182.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J.V., VANGRONSVELD, J., van der LELIE, D., 2004, Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants, *Nature Biotechnology*, 22 (5), 583-588.

- BOWEN, G.C., ROVIRA, A.D., 1991, *The rhizosphere—the hidden half of the hidden half*. In *Plant Roots-The Hidden Half*, eds. YWaisel, A Eshel, U Kaffkafi, Marcel Dekker, New York.
- BRAGG, J.R., PRINCE, R.C., HARNER, E.J., ATLAS, R.M., 1994, Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill, *Nature*, 368, 413-418.
- BRIGGS, G.G., BROMILOW, R.H., EVANS, A.A., 1982, Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley, *Pesticide Science*, 13, 405-504.
- BROMILOW, R.H., CHAMBERLAIN, K., 1995, *Principles governing uptake and transport of chemicals*. In *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*, ed. S Trapp, JC McFarlane, Lewis, Boca Raton.
- BROWN, J.L., SYSLO, J., LIN, Y.-H., GETTY, S., VEMURI, R., NADEAU, R., 1998, On-Site Treatment of Contaminated Soils: An Approach to Bioremediation of Weathered Petroleum Compounds, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 7 (6), 773-800.
- BURKEN, J.G., 2003, *Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model*. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- BURKEN, J.G., SCHNOOR, J.L., 1997, Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees, *Environmental Science & Technology*, 31, 1399-1406.
- BÜYÜKGÜNGÖR, H., 2006, Çevre Kirliliği ve Çevre Yönetimi, *Toprak İşveren Dergisi*, 72, 9-17.
- CAMPANELLA, B., PAUL, R., 2000, Presence, in the rhizosphere and leaf extracts of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.) of molecules capable of increasing the apparent aqueous solubility of hydrophobic pollutants, *International Journal of Phytoremediation*, 2, 145-158.
- CARRAPIÇO, F., TEIXEIRA, G., DINIZ M.A., 2000, *Azolla* as a Biofertiliser in Africa. A Challenge for the Future, *Revista de Ciências Agrárias*, 23(3-4), 120-138.
- CERNIGLIA, C.E., 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation*, 3, 351-368.
- CHAIINEAU, C.H., MOREL, J.L., OUDOT, J., 1997, Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons, *Journal of Environmental Quality*, 26, 1478-1483.

- CHAPPELL, J., 1997, *Phytoremediation of TCE using Populus*, Status Report prepared for the U.S. EPA Technology Innovation Office under a National Network of Environmental Management Studies Fellowship Compiled June-August 1997, Available on-line at: <http://www.clu-in.org/download/studentpapers/phytotce.pdf>
- CHEEVAPORN, V., BEAMISH, F.W.H., 2007, Cytochrome P450 1A activity in liver and fixed wavelength fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of tongue-fish (*Cynoglossus acrolepidotus*, Bleeker) in relation to petroleum hydrocarbons in the eastern Gulf of Thailand, *Journal of Environmental Biology*, 28 (4), 701-705.
- CHEN, S.-H., AITKEN, M.D., 1999, Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15, *Environmental Science & Technology*, 33, 435-439.
- COBBETT, C.S., GOLDSBROUGH, P.B., 2000, *Mechanisms of metal resistance: phytochelatins and metallothioneins*, In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*, ed. I Raskin, BD Ensley, Wiley, New York.
- COHEN, M.F., MEZIANE, T., YAMASAKI, H., 2004a, A photocarotenogenic *Rhodococcus* sp. isolated from the symbiotic fern *Azolla*, *Endocytobiosis and Cell Research*, 15, 350-355.
- COHEN, M.F., WILLIAMS, J., YAMASAKI, H., 2002, Biodegradation of Diesel Fuel by an *Azolla*-Derived Bacterial Consortium, *Journal of Environmental Science and Health, Part A- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 37 (9), 1593-1606.
- COHEN, M.F., YAMASAKI, H., MAZZOLA, M., 2004b, Bioremediation of Soils by Plant-Microbe Systems, *International Journal of Green Energy*, 1 (3), 301-312.
- COLEMAN, J.O.D., BLAKE-KALFF, M.M.A., DAVIES, T.G.E., 1997, Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation, *Trends Plant Science*, 2, 144-51.
- COONEY, J.J., 1984, *The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems*, In: Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York.
- CUNNINGHAM, S.D., BERTI, W.R., HUANG, J.W., 1995, *Remediation of contaminated soils and sludges by green plants*. In: R. E. Hinchee, J. L. Means and D. R. Burns, eds. *Bioremediation of Inorganics*, 3rd International In Situ and

- on site Bioreclamation Symposium. San Diego, CA, Battelle Press, Columbus, OH, USA.
- DAVIS, L.C., ERICKSON, L.E., NARAYANAN, N., ZHANG, Q., 2003, *Modeling and design of phytoremediation*, In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC, McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- DE SHERBININ, A., CARR, D., CASSELS, S., JIANG, L., 2007, Population and Environment, *Annual Review of Environment and Resources*, 32, 345-373.
- DeLAUNE, R.D., PATRICK Jr., W.H., BURESH, R.J., 1979, Effect of crude oil on a Louisiana *Spartina alterniflora* salt marsh, *Environmental Pollution (1970)*, 20, 21-31.
- DHAMMAPALA, R., CLAIBORN, C., SIMPSON, C., JIMENEZ, J., 2007, Emission factors from wheat and Kentucky bluegrass stubble burning: Comparison of field and simulated burn experiments, *Atmospheric Environment*, 41, 1512-1520.
- DIXON, R., 2001, Natural products and plant disease resistance, *Nature*, 411, 843-847.
- DONELLY, P.K., HEDGE, R.S., FLETCHER, J.S., 1994, Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants, *Chemosphere*, 28, 984-988.
- DREW, M.C., 1997, Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 223-250.
- EHRHARDT, M.G., BURNS, K.A., BICEGO, M.C., 1992, Sunlight-induced compositional alterations in the seawater-soluble fraction of a crude oil, *Marine Chemistry*, 37, 53-64
- ERGUT, A., GRANATA, S., JORDAN, J., CARLSON, J., HOWARD, J.B., RICHTER, H., LEVENDIS, Y.A., 2006, PAH formation in one-dimensional premixed fuel-rich atmospheric pressure ethylbenzene and ethyl alcohol flames, *Combustion and Flame*, 144, 757-772.
- EXNER, J.H., 1994, *Introduction*, in: P.E. Flathrnan, D.E. Jerger, J.H. Exner (Eds.), *Bioremediation: Field Experience*, Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- FERNET, J.L., 2008, *Plant Bacterial Inoculants To Remediate Hydrocarbon Polluted Soil*, Thesis (M.Sc.), Department of Soil Science, University of Saskatchewan Saskatoon.

- FERRARI, M.D., NEIROTTI, E., ALBORNOZ, C., MOSTAZO, M.R., COZZO, M., 1999, Biotreatment of hydrocarbons from petroleum tank bottom sludge's in soil slurries, *Biotechnology Letters*, 18, 1241-1246.
- FLETCHER, J.S., HEGDE, R.S., 1995, Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation, *Chemosphere*, 31, 3009-3016.
- FLOCCO, C.G., LOBALBO, A., CARRANZA, M.P., BASSI, M., GIULIETTI, A.M., MAC CORMACK, W.P., 2002, Some Physiological, Microbial, and Toxicological Aspects of the Removal of Phenanthrene by Hydroponic Cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *International Journal of Phytoremediation*, 4 (3), 169-186.
- FLOODGATE, G., 1984, *The fate of petroleum in marine ecosystems*, In: Atlas (Ed), Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Company, New York.
- FOGHT, J.M., WESTLAKE, D.W.S., 1987, *Biodegradation of hydrocarbons in freshwater*, In: Vandermeulen and Hruday (Ed), Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology. Pergamon Press, New York.
- FORNI, C., CASCONI, A., FIORI, M., MIGLIORE, L., 2002, Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: a model for drug remediation, *Water Research*, 36, 3398-3403.
- GAO, Y., SHEN, Q., LING, W., REN, L., 2008, Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trifolium pretense* L. from water in the presence of a nonionic surfactant, *Chemosphere*, 72, 636-643.
- GAO, Y., YU, X.Z., WU, S.C., CHEUNG, K.C., TAM, N.F.Y., QIAN, P.Y., WONG, M.H., 2006, Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil, *Science of the Total Environment*, 372, 1-11.
- GAO, Y., ZHU, L., LING, W., 2005, Application of the partition-limited model for plant uptake of organic chemicals from soil and water, *Science of the Total Environment*, 336, 171-182.
- GASKIN, S., SOOLE, K., BENTHAM, R., 2008, Screening of Australian Native Grasses for Rhizoremediation of Aliphatic Hydrocarbon-Contaminated Soil, *International Journal of Phytoremediation*, 10 (5), 378-389.

- GERHARDT, K.E., HUANG, X.-D., GLICK, B.R., GREENBERG, B.M., 2009, Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges, *Plant Science*, 176, 20-30.
- GREENBERG, B.M., HUANG, X.-D., GERHARDT, K., GLICK, B.R., GURSKA, J., WANG, W., LAMPI, M., KHALID, A., ISHERWOOD, D., CHANG, P., WANG, H., WU, S.S., YU, X.-M., DIXON, D.G., GERWING, P., 2007, Field and laboratory tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils, In: Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium. Gavaskar, A.R. and Silver C.F., eds., Batelle Press, Columbus, OH.
- GUNTHER, T., DORNBERGER, U., FRITSCH, W., 1996, Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil, *Chemosphere*, 33 (2), 203-215.
- HADACEK, F., 2002, Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives, *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 273-322.
- HALE, K.L., McGRATH, S., LOMBI, E., STACK, S., TERRY, N., PICKERING, I.J., GEORGE, G.N., PILON-SMITS, E.A.H., 2001, Molybdenum sequestration in *Brassica*: a role for anthocyanins?, *Plant Physiology*, 126, 1391-1402.
- HALLIER-SOULIER, S., DUCROCQ, V., MAZURE, N., TRUFFAUT, N., 1999, Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene, *FEMS Microbiology Ecology*, 20, 121-133.
- HARITASH, A.K., KAUSHIK, C.P., 2009, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1-15.
- HARMS, H., BOKERN, M., KOLB, M., BOCK, C., 2003, *Transformation of organic contaminants by different plant systems*, In Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- HARVEY, P.J., CAMPANELLA, B.F., CASTRO, P.M.L., HARMS, H., LICHTFOUSE, E., SCHÄFFNER, A.R., SMRCEK, S., WERCK-REICHHART, D., 2002, Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols, *Environmental Science and Pollution Research*, 9, 29-47.
- HASHEMLOIAN, B.D., AZIMI, A.A., 2009, Alien and exotic *Azolla* in northern Iran, *African Journal of Biotechnology*, 8 (2), 187-190.

- HATTON, P.J., DIXON, D., COLE, D.J., EDWARDS, R., 1996, Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species, *Pesticide Science*, 46, 267-275.
- HEDGE, R.S., FLETCHER, J.S., 1996, Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology, *Chemosphere*, 32, 2471-2479.
- HERSHNER, C., MOORE, K., 1977, *Effects of the Chesapeake Bay oil spill on salt marshes of the lower bay*, In: Proceeding of 1977 Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington, DC.
- HIGUCHI, K., SUZUKI, K., NAKANISHI, H., YAMAGUCHI, H., NISHIZAWA, N.K., MORI, S., 1999, Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores, *Plant Physiology*, 119, 471-480.
- HIMMELHEBER, D.W., PENNELL, K.D., HUGHES, J.B., 2007, Natural attenuation processes during in situ capping, *Environmental Science & Technology*, 41, 5306-5313.
- HONG, Y.-W., YUAN, D.-X., LIN, Q.-M., YANG, T.-L., 2008, Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem, *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1400-1405.
- HUANG, X.-D., EL-ALAWI, Y., GURSKA, J., GLICK, B.R., GREENBERG, B.M., 2005, A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils, *Microchemical Journal*, 81, 139-147.
- HUESEMANN, M.H., HAUSMANN, T.S., FORTMAN, T.J., THOM, R.M., CULLINAN, V., 2009, *In situ* phytoremediation of PAH- and PCB-contaminated marine sediments with eelgrass (*Zostera marina*), *Ecological Engineering*, 35, 1395-1404.
- HUGHES, J.B., SHANKS, J., VANDERFORD, M., LAURITZEN, J., BHADRA, R., 1997, Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures, *Environmental Science & Technology*, 31, 266-271.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1983, *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds Part I*, in: IARC (Ed.), IARC Press, Lyon.

- ISIDOROV, V., JDANOVA, M., 2002, Volatile organic compounds from leaves litter, *Chemosphere*, 48, 975-979.
- ISSOUFI, I., RHYKERD, R.L., SMICIKLAS, K.D., 2006, Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 192, 310-317.
- JI, S.-J., LU, Y.-C., FENG, J.-X., WEI, G., LI, J., SHI, Y.-H., FU, Q., LIU, D., LUO, J.-C., ZHU, Y.-X., 2003, Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array, *Nucleic Acids Research*, 31 (10), 2534-2543.
- JONES, P., VOGT, T., 2001, Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers, *Planta*, 213, 164-174.
- JORDAN, R.E., PAYNE, J.R., 1980, *Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment*, Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, MI.
- KAMATH, R., RENTZ, J.A., SCHNOOR, J.L., ALVAREZ, P.J.J., 2004, *Chapter 16 Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications*, Petroleum Biotechnology-Developments and Perspectives, Vazquez-Duhalt, R., Quintero-Ramirez, R., (Editors), *Studies in Surface Science and Catalysis*, 151, 447-478, Published by Elsevier B.V. ISBN: 780444516992.
- KAPULNIK, Y., 1996, *Plant growth promotion by rhizosphere bacteria*, In *Plant Roots—The Hidden Half*, ed. YWaisel, A Eshel, U Kaffkafi, Marcel Dekker, New York.
- KHAN, S., AIJUN, L., ZHANG, S., HU, Q., ZHU, Y.-G., 2008, Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 506-515.
- KLEIN, J., 2000, *Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation*, in: H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), *Environmental Processes. II. Soil Decontamination, Biotechnology*, 2nd ed., vol. 11b, Wiley-VCH, Weinheim, FRG.
- KÜPPER, H., MIJOVILOVICH, A., MEYER-KLAUCKE, W., KRONECK, M.H., 2004, Tissue- and qge-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges

- Ecotype) revealed by x-ray absorption spectroscopy, *Plant Physiology*, 134, 748-757.
- KVESITADZE, E., SADUNISHVILI, T., KVESITADZE, G., 2009, Mechanisms of Organic Contaminants Uptake and Degradation in Plants, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 55, 458-468.
- LEAHY, J.G., COLWELL, R.R., 1990, Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbial Reviews*, 53(3), 305-315.
- LEE, K., LUNEL, T., WOOD, P., SWANNELL, R., STOFFYN-EGLI, P., 1997, *Shoreline cleanup by acceleration of clay-oil flocculation processes*, Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington DC.
- LEIGH, M.B., FLETCHER, J.S., FU, X., SCHMITZ, F.J., 2002, Root turnover: an important source of microbial substances in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants, *Environmental Science & Technology*, 36, 1579-1583.
- LEVY, J.K., GOPALAKRISHNAN, C., 2010, Promoting Ecological Sustainability and Community Resilience in the US Gulf Coast after the 2010 Deepwater Horizon Oil Spill, *Journal of Natural Resources Policy Research*, 2 (3), 297-315.
- LI, X., FENG, Y., SAWATSKY, N., 1997, Importance of soil–water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils, *Plant and Soil*, 192, 219-226.
- LI, Y., MORRIS, J.T., YOCH, D.C., 1990, Chronic Low Level Hydrocarbon Amendments Stimulate Plant Growth and Microbial Activity in Salt-Marsh Microcosms, *Journal of Applied Ecology*, 27 (1), 159-171.
- LIN, Q., MENDELSSOHN, I.A., 1996, A Comparative Investigation of the Effects of South Louisiana Crude Oil on the Vegetation of Fresh, Brackish and Salt Marshes, *Marine Pollution Bulletin*, 32 (2), 202-209.
- LIN, Q., MENDELSSOHN, I.A., 2009, Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands, *Ecological Engineering*, 35, 85-91.
- LIN, Q., MENDELSSOHN, I.A., SUIDAN, M.T., LEE, K., VENOSA, A.D., 2002, The dose–response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*, *Marine Pollution Bulletin*, 44, 897-902.
- LING, W., GAO, Y., 2004, Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.), *Environmental Geology*, 46, 553-560.

- LISTE, H.-H., ALEXANDER, M., 2000, Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil, *Chemosphere*, 40, 11-14.
- LLOYD, J.B.F., 1971, The nature and evidential value of the luminescence of automobile engine oils and related materials. I. Synchronous excitation of fluorescence emission, *Journal of the Forensic Science Society*, 11 (2), 83-94.
- LU, Y.P., LI, Z.S., REA, P.A., 1997, AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 94, 8243-8248.
- MACEK, T., MACKOVÁ, M., KÁS, J., 2000, Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation, *Biotechnology Advances*, 18, 23-34.
- MACKOVÁ, M., MACEK, M., KUCEROVÁ, T., BURKHARD, J., TRÍSKA, J., DEMNEROVÁ, K., 1998, Plant tissue cultures in model studies of transformation of polychlorinated biphenyls, *Chemical Papers*, 52, 599-600.
- MAILLACHERUVU, K., SAFAAI, S., 2002, Naphthalene Removal from Aqueous Systems by *Sagittarius* Sp, *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 37 (5), 845-861.
- MALALLAH, G., AFZAL, M., KURIAN, M., GULSHAN, S., DHAMI, M.S.I., 1998, Impact of oil pollution on some desert plants, *Environment International*, 24, 919-924.
- MARRS, K.A., 1996, The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127-158.
- MARRS, K.A., ALFENITO, M.R., LLOYD, A.M., WALBOT, V.A., 1995, Glutathione s-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2, *Nature*, 375, 397-400.
- MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F., CRUZ-CISNEROS, J.L., GARCÍA-HERNÁNDEZ, L., 2008, Comparison of the response of *Simocephalus mixtus* (Cladocera) and *Daphnia magna* to contaminated freshwater sediments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 26-31.
- MASOOD, A., SHAH, N.A., ZEESHAN, M., ABRAHAM, G., 2006, Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla*

- (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*), *Environmental and Experimental Botany*, 58, 216-222.
- McCUTCHEON, S.C., MEDINA, V.F., LARSON, S.L., 2003, *Proof of phytoremediation for explosives in water and soil*, In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- McCUTCHEON, S.C., SCHNOOR, J.L., 2003, *Overview of Phytotransformation and Control of Wastes*, *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, S. McCutcheon and J. Schnoor (eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- McGUINNESS, M., DOWLING, D., 2009, Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 2226-2247.
- MENDELSSOHN, I.A., HESTER, M.W., SASSER, C., FISCHER, M., 1990, The effect of Louisiana crude oil discharge from a pipeline break on the vegetation of a southeast Louisiana brackish marsh, *Oil and Chemical Pollution*, 7, 1-15.
- MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R., ARIAS, M., 2006, Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil, *Microbiological Research*, 161, 80-91.
- MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R., INFANTE, C., 2004, Phytoremediation in the Tropics-The Effect of Crude Oil on the Growth of Tropical Plants, *Bioremediation Journal*, 8 (3-4), 177- 184.
- MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R., INFANTE, C., 2005, Assessment of Tropical Grasses and Legumes for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils, *Water, Air, and Soil Pollution*, 165, 195-209.
- MEUDEC, A., POUPART, N., DUSSAUZE, J., DESLANDES, E., 2007, Relationship between heavy fuel oil phytotoxicity and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in *Salicornia fragilis*, *Science of the Total Environment*, 381, 146-156.
- MEYER, D.G., CAPIEAU, K., AUDENAERT, K., BUCHALA, A., MÉTRAUX, J.P., HÖFTE, M., 1999, Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 450-458.

- MIYA, R.K., FIRESTONE, M.K., 2001, Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris, *Journal of Environmental Quality*, 30, 1911-1918.
- MOHSENZADE, F., NASSERI, S., MESDAGHINIA, A., NABIZADEH, R., ZAFARI, D., CHEHREGANI, A., 2009, Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91 (8), 1443-1453.
- MOORE, A.W., 1969, *Azolla*: Biology and agronomic significance, *Botanical Review*, 35, 17-34.
- MRAYYAN, B., BATTIKHI, M.N., 2005, Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge, *Journal of Hazardous Materials*, B120 (1-3), 127-134.
- MUELLER, J.G., RESNICK, S.M., SHELTON, M.E., PRITCHARD, P.H., 1992, Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil, *Journal of Industrial Microbiology*, 10, 95-102.
- NATIONAL ACADEMY of SCIENCES (NAS), 1985, *Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects*, National Academy Press, Washington DC.
- NEDUNURI, K.V., GOVINDARAJU, R.S., BANKS, M.K., SCHWAB, A.P., CHENS, Z., 2000, Evaluation of Phytoremediation for Field-Scale Degradation of Total Petroleum Hydrocarbons, *Journal of Environmental Engineering*, 126 (6), 483-490.
- NEUEFEIND, T., REINEMER, P., BIESELER, B., 1997, Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification, *Biological Chemistry*, 378, 199-205.
- NEWMAN, L.A., STRAND, S.E., CHOE, N., DUFFY, J., EKUAN, G., RUSZAJ, M., SHURTLEFF, B.B., WILMOTH, J., HEILMAN, P., GORDON, M.P., 1997, Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars, *Environmental Science & Technology*, 31, 1062-1067.
- NICHOLS, T.D., WOLF, D.C., ROGERS, H.B., BEYROUTY, C.A., REYNOLDS, C.M., 1997, Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air, and Soil Pollution*, 95, 165-178.
- NICODEM, D.E., FERNANDES, M.C., GUEDES, C.L.B., CORREA, R.J., 1997, Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills, *Biogeochemistry*, 39, 121-138.

- OGBO, E.M., ZIBIGHA, M., ODOGU, G., 2009, The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalum scrobiculatum* L.) –phytoremediation potential of the plant, *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3 (9), 229-233.
- OKOH, A.I., 2006, Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (2), 38-50.
- OKORO, C.C., 2008, Biodegradation of hydrocarbons in untreated produce water using pure fungal cultures, *African Journal of Microbiology Research*, 2, 217-223.
- OLSON, P.E., REARDON, K.F., PILON-SMITS, E.A.H., 2003, *Ecology of rhizosphere bioremediation*. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- OWENS, E.H., TAYLOR, E., MARTY, R., LITTLE, D.I., 1993, *An inland oil spill response manual to minimize adverse environmental impacts*, Proceedings of 1993 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington DC.
- PABBY, A., PRASANNA, R., NAYAK, S., SINGH, P.K., 2003, Physiological characterization of the cultured and freshly isolated endosymbionts from different species of *Azolla*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 73-79.
- PARADA, G.L., De VIANA, M.L., 2005, Germination and survival of *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) in soils containing petroleum hydrocarbon contaminants, *Ecologia Austral* 15, 177-181.
- PAUL, N.D., HATCHER, P.E., TAYLOR, J.E., 2000, Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives, *Trends in Plant Science*, 5(5), 220-225.
- PENA-CASTRO, J.M., BARRERA-FIGUEROA, B.E. FERNANDEZ-LINARES, L., RUIZ-MEDRANO, R., XOCONOSTLE-CAZARES, B., 2006, Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress, *Plant Science*, 170, 724-731.
- PENG, S., ZHOU, Q., CAI, Z., ZHANG, Z., 2009, Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis jalapa* L. in a greenhouse plot experiment, *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1490-1496.
- PEREIRA, A.L., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G., CARRAPIÇO, F., 2009, Volatile compounds from the symbiotic system *Azolla filiculoides*-

- Anabaena azollae* bacteria, *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 143 (2), 268-274.
- PERELO, L.W., 2010, Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments, *Journal of Hazardous Materials*, 177, 81-89.
- PETERS, J., MOLDOWAN, J.M., 1993, *The Biomarker Guide. Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- PEZESHKI, S.R., HESTER, M.W., LIN, Q., NYMAN, J.A., 2000, The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review, *Environmental Pollution*, 108 (2), 129-139.
- PILON-SMITS, E., 2005, Phytoremediation, *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39.
- PIVETZ, B.E., 2001, Ground Water Issue: *Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites*, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Solid Waste and Emergency Response: Superfund Technology Support Center for Ground Water, National Risk Management Research Laboratory, Subsurface Protection and Remediation Division Robert S. Kerr Environmental Research Center Ada, Oklahoma EPA/540/S-01/500, Available on-line at: http://www.clu-in.org/download/remed/epa_540_s01_500.pdf
- PRADHAN, S.P., CONRAD, J.R., PATEREK, J.R., SRIVASTAVA, V.J., 1998, Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP Sites. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 7, 467-480.
- PRINCE, R.C., 1993, Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 19, 217-242.
- PRINCE, R.C., CLARK, J.R., LINDSTROM, J.E., BUTLER, E.L., BROWN, E.J., WINTER, G., GROSSMAN, M.J., PARRISH, P.R., BARE, R.E., BRADDOCK, J.F., STEINHAEUER, W.G., DOUGLAS, G.S., KENNEDY, J.M., BARTER, P.J., BRAGG, J.R., HARNER, E.J., ATLAS, R.M., 1994, *Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy*, In: R.E. Hinchee et al.(Eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- PROPST, T.L., LOCHMILLER, R.L., QUALLS, C.W., MCBEE, K., 1999, *In situ* (mesocosm) assessment of immunotoxicity risk to small mammals inhabiting petrochemical waste sites, *Chemosphere*, 38, 1049-1067.

- RAMACHANDRAN, S., CHRISTENSEN, H.E.M., ISHIMARU, Y., DONG, C.-H., CHAO-MING, W., CLEARY, A.L., CHUA, N.-H., 2000, Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 124, 1637-1647.
- READMAN, J.W., FILLMANN, G., TOLOSA, I., BARTOCCI, J., VILLENEUVE, J.-P., CATINNI, C., MEE, L.D., 2002, Petroleum and PAH contamination of the Black Sea, *Marine Pollution Bulletin*, 44, 48-62.
- RENTZ, J.A., CHAPMAN, B., ALVAREZ, P.J.J., SCHNOOR, J.L., 2003, Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments, *International Journal of Phytoremediation*, 5 (1), 57-72.
- REY-SALGUEIRO, L., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., GARCÍA-FALCÓN, M.S., SIMAL-GÁNDARA, J., 2008, Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons plant foods, *Food Chemistry*, 108, 347-353.
- ROSENBERG, E., RON, E.Z., 1996, *Bioremediation of petroleum contamination*, In *Bioremediation: principles and Applications*, R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), Cambridge University Press, UK.
- ROSS, S.M., 1994, *Toxic metals in soil-plant systems*, Chichester, Wiley, England.
- SANDERMANN, H., 1994, Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept, *Pharmacogenetics*, 4, 225-241.
- SCHÄFFNER, A., MESSNER, B., LANGERBARTELS, C., SANDERMANN, H., 2002, Genes and enzymes for *In-planta* phytoremediation of air, water and soil, *Acta Biotechnologica*, 22, 141-152.
- SCHNOOR, J.L., 1997, *Phytoremediation*, Ground Water Technology Analysis Center: Technology Evaluation Report TE-98-01.
- SCHNOOR, J.L., LICHT, L.A., McCUTCHEON, S.C., WOLFE, N.L., CARREIRA, L.H., 1995, Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants, *Environmental Science & Technology*, 29, 318-323.
- SCHWITZGUÉBEL, J.-P., 2001, Hype or Hope: The Potential of Phytoremediation as an Emerging Green Technology, *Remediation*, 11 (4) 63-78.

- SHANG, T.Q., NEWMAN, L.A., GORDON, M.P., 2003, *Fate of trichlorethylene in terrestrial plants*. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- SHARIFI, M., SADEGHI, Y., AKBARPOUR, M., 2007, Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4 (4), 463-470.
- SHARMA, B.S., CYRIL, W., 2007, Distribution and abundance of zooplankton in relation to hydrocarbon content along the coast of Killam (Quilon), south west coast of India, *Journal of Environmental Biology*, 28 (1), 53-62.
- SICILIANO, S.D., GERMIDA, J.J., 1998, Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria, *Environmental Reviews*, 6, 65-79.
- SINGER, A.C., CROWLEY, D.E., THOMPSON, I.P., 2003, Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation, *Trends in Biotechnology*, 21 (3), 123-130.
- SPEIGHT, J.G., 1991, *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Marcel Dekker, Inc. New York, New York.
- SPENCE, J.M., BOTTRELL, S.H., THORNTON, S.F., RICHNOW, H.H., SPENCE, K.H., 2005, Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer, *Journal of Contaminant Hydrology*, 79, 67-88.
- SPIARES, J.D., KENWORTHY, K.E., RHYKERD, R.L., 2001, Root and shoot biomass of plants seeded in crude oil contaminated soil, *Texas Journal of Agriculture and Natural Resources*, 14, 117-124.
- SPIES, R.B., RICE, S.D., WOLFE, D.A., WRIGHT, B.A., 1996, *The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment*, Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium, American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- STALCUP, D., YOSHIOKA, G., MANTUS, E., KAIMAN, B., 1997, *Characteristics of oil spills: inland versus coastal*, Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington DC.
- STEPHAN, U.W., SCHMIDKE, I., STEPHAN, V.W., SCHOLZ, G., 1996, The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants, *Biometals*, 9, 84-90.

- SUSARLA, S., MEDINA, V.F., McCUTCHEON, S.C., 2002, Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination, *Ecological Engineering*, 18, 647-658.
- SWOBODA-COLBERG, N.G., 1995, *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, in: L.Y. Young, C.E. Cerniglia (Eds.) Wiley-Liss, New York.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., 2002, *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Sinauer.
- TAO, S., JIAO, X.C., CHEN, S.H., LIU, W.X., COVENEY Jr, R.M., ZHU, L.Z., LUO, Y.M., 2006, Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*), *Environmental Pollution*, 140, 406-415.
- THAYER, A.M., 1991, Biodegradation: innovative technology for cleaning up hazardous waste, *Chemical & Engineering News*, 23-44.
- THEIL, E.C., 1987, Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms, *Annual Review of Biochemistry*, 56, 289-315.
- THOUAND, G., BAUDA, P., OUDOT, J., KIRSCH, G., SUTTON, C., VIDALIE, J.F., 1999, Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula, *Canadian Journal of Microbiology*, 45(2), 106-115.
- TRAPP, S., McFARLANE, C., 1995, *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Processes*, Lewis, Boca Raton, FL.
- TRONT, J.M., 2004, *Plant Activity and Organic Contaminant Processing by Aquatic Plants*, Thesis (PhD), School of Civil and Environmental Engineering, Georgia Institute of Technology.
- TUMAIKINA, Y.A., TURKOVSKAYA, O.V., IGNATOV, V.V., 2008, Degradation of Hydrocarbons and Their Derivatives by a Microbial Association on the Base of Canadian Pondweed, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44 (4), 382-388.
- U.S. EPA, 1986, *Test Method for Evaluating Solid Waste*, SW-846, 3rd ed., vol. 1A, U.S. EPA, Washington, DC.
- U.S. EPA, 1997, *Water Pollution Prevention and Conservation Pollution Prevention (P2) Education Toolbox Tools for Helping Teachers Integrate P2 Concepts in the Classroom*, United States Environmental Protection Agency, EPA-905-F-97-011.
- U.S. EPA, 2000, *Introduction to Phytoremediation*, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268, EPA 600-R-99-107.

- U.S. EPA, 2001, Innovative Technology Verification Report: *Field Measurement Technologies for Total Petroleum Hydrocarbons in Soil*, CHEMetrics, Inc., and AZUR Environmental Ltd RemediAid™ Total Petroleum Hydrocarbon Starter Kit. Tetra Tech EM Inc. 200 East Randolph Drive, Suite 4700 Chicago, Illinois 60601, EPA/600/R-01/082.
- U.S. EPA, METHOD 3541
- U.S. EPA, METHOD 3600C
- U.S. EPA, METHOD, 3620C
- UDO, E.J., FAYEMI, A.A.A., 1975, The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn, *Journal of Environmental Quality*, 4, 537-540.
- ÜNAL, M., ÜZEN, E., 1996, A New Aquatic Fern Record For The Flora of Turkey: *Azolla filiculoides* Lam., *Turkish Journal of Botany*, 20, 379-381.
- VAN AKEN, B., 2008, Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution, *Trends in Biotechnology*, 26 (5), 225-227.
- VAN EPPS, A., 2006, *Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Environmental Careers Organization for U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Office of Superfund Remediation and Technology Innovation Washington, DC, Available on-line at: http://www.clu-in.org/download/studentpapers/A_Van_Epps-Final.pdf
- VAN HOVE, C., LEJEUNE, A., 2002, The *Azolla–Anabaena* symbiosis, *Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy*, 102B (1), 23-26.
- VASUDEVAN, N., RAJARAM, P., 2001, Bioremediation of oil sludge contaminated soil, *Environment International*, 26, 409-411.
- VENTURA, G.T., KENIG, F., REDDY, C.M., FRYSSINGER, G.S., NELSON, R.K., VAN MOOY, B., GAINES, R.B., 2008, Analysis of unresolved complex mixtures of hydrocarbons extracted from Late Archean sediments by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC), *Organic Geochemistry*, 39 (7), 846-867.
- VOLKERING, F., BREURE, A.M., RULKENS, W.H., 1998, Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation, *Biodegradation*, 8, 401-417.

- WANG, Z., LI, K., LAMBERT, P., YANG, C., 2007, Identification, characterization and quantitation of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and other organic compounds in tire fire products, *Journal of Chromatography A*, 1139, 14-26.
- WEI, S., PAN, S., 2010, Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species, *Journal of Soils and Sediments*, 10, 886-894.
- WHITE, P.M. Jr., WOLF, D.C., THOMA, G.J., REYNOLDS, C.M., 2006, Phytoremediation of Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Crude Oil-Contaminated Soil, *Water, Air, and Soil Pollution*, 169, 207-220.
- WILD, E., DENT, J., THOMAS, G.O., JONES, K.C., 2005, Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots, *Environmental Science & Technology*, 39 (10), 3695-3702.
- WOLF, A.E., DIETZ, K.J., SCHRODER, P., 1996, Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole, *FEBS Letters*, 384, 31-34.
- WOLFE, N.L., HOEHAMER, C.F., 2003, *Enzymes used by plants and microorganisms to detoxify organic compounds*, In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, Wiley, New York.
- WU, N., HUANG, H., ZHANG, S., ZHU, Y.-G., CHRISTIE, P., ZHANG, Y., 2009, Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L. under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Environmental Pollution*, 157, 1613-1618.
- YAN, Z.-S., GUO, H.-Y., SONG, T.-S., HU, Y., JIANG, H.-L., 2011, Tolerance and remedial function of rooted submersed macrophyte *Vallisneria spiralis* to phenanthrene in freshwater sediments, *Ecological Engineering*, 37, 123-127.
- YEN, K-M., GUNSALUS, I.C., 1982, Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 79, 874-878.
- ZAND, A.D., BIDHENDI, G.N., MEHRDADI, N., 2010, Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34, 429-438.
- ZAPPI, M.E., ROGERS, B.A., TEETER, C.L., GUNNISON, D., BAJPAI, R., 1996, Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons, *Journal of Hazardous Materials*, 46, 1-12.
- ZEINALI, M., VOSSOUGH, M., ARDESTANI, S.K., BABANEZHAD, E., MASOUMIAN, M., 2007, Hydrocarbon degradation by thermophilic *Nocardia*

- otitidiscaviarum* strain TSH1:physiological aspects, *Journal of Basic Microbiology*, 47, 534-539.
- ZHU, X., VENOSA, A.D., SUIDAN, M.T., LEE, K., 2001, *Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands*, U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development National Risk Management Research Laboratory Land Remediation and Pollution Control Division 26 W. Martin Luther King Drive Cincinnati, OH 45268 Available online at: <http://www.epa.gov/osweroel/docs/oil/edu/bioremed.pdf>
- ZOBELL, C.E., 1946, Action of microorganisms on hydrocarbons, *Bacteriological Reviews*, 10 (1-2), 1-49.
- ZOBELL, C.E., 1973, *Microbial degradation of oil: Present status, problems, and perspectives*, In: Ahearn and Meyers (Eds.), *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*, Publication No. LSU-SG-73-01, Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- ZOUMIS, T., SCHMIDT, A., GRIGOROVA, L., CALMANO, W., 2001, Contaminants in sediments: remobilization and demobilization, *Science of the Total Environment*, 266, 195-202.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Malatya’ da doğdum. Lise eğitimimi 1996 yılında Malatya Gazi Lisesi’ nde tamamladım. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Botanik programında yüksek lisans eğitimime başladım ve 2005 yılında yüksek lisans tezimi bitirdim. 2001 yılının Aralık ayında Botanik Anabilim Dalı’ na 50/d maddesi ile atandığım Araştırma Görevlisi kadrosundan 2010 yılında kadro geçişlerinde yaşanan sıkıntılardan dolayı Fen Fakültesi Biyolog kadrosuna geçiş yaptım, halen görevime devam etmekteyim. Evli ve bir kız çocuğu babasıyım.