

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

RAFİNERİ ATIK SULARINDAN İZOLE EDİLEN  
MİKROORGANİZMALAR İLE BİYOSÜRFEKTAN ELDESİ VE  
HİDROKARBON DEGRDASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

EMİNE YALÇIN

EKİM 2008

## ÖZET

### RAFİNERİ ATIK SULARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALAR İLE BİYOSÜRFEKTAN ELDESİ VE HİDROKARBON DEGREDASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

YALÇIN, Emine

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman : Doç. Dr. Aysun ERGENE

Ekim 2008, 136 sayfa

Bu çalışmada rafineri atık sularından izole edilen mikroorganizmalar ile biyosürfektan eldesi ve hidrokarbon degradasyonu çalışılmıştır. İzolasyon sonrasında mikroorganizmalar *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmıştır. Biyosürfektan üretiminin belirlenmesi amacıyla “drop-collapse” yöntemi uygulanmış ve tüm izolatların biyosürfektan sentezleme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* tarafından üretilen biyosürfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV olarak kodlanmıştır. İzolatlar tarafından üretilen biyosürfektan miktarı fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir ve MSM kültür ortamında BS-I,

BS-II, BS-III, BS-IV biyosüpfektanları için sırası ile 843, 623, 741 ve 559 mg/L üretim kapasitesine ulaşılmıştır. Biyosüpfektan üretiminde optimum koşulları belirlemek için pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve EDTA varlığının biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullarla modifiye edilen rafineri atık su örnekleri biyosüpfektan üretiminde temel besiyeri olarak kullanılmıştır. İzolatlar tarafından üretilen BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosüpfektanlarının yapısı FTIR analizi, protein, karbonhidrat ve lipid testleri ile özellikleri ise yüzey gerilimi, emülsiyon testi, antimikrobiyal ve hemoliz aktivite testleri ile incelenmiştir. İzolatlardan biyosüpfektan eldesi ve karakterizasyonu çalışmalarının tamamlanması sonrasında tüm izolatlar rafineri atık suları ile 10 gün 35°C’de inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde biyosüpfektan üretimi ve hidrokarbon degradasyonu araştırılmıştır. Kültürasyon süresi sonunda BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV için sırası ile 712, 536, 448 ve 356 mg/L’lik üretim kapasitesine ulaşılmıştır. Rafineri atık su içeriğinde bulunan total hidrokarbonun ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* tarafından %79.2, %54.0, %69.5 ve %40.2 oranlarında degrade olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada izole edilen mikroorganizmalar tarafından biyosüpfektan elde edilmesi ve aynı zamanda poliaromatik hidrokarbon içeren atık suların arıtılması sadece bilimsel gelişme açısından değil endüstriyel uygulanabilirlik açısından da oldukça önemli bir sonuçtur. Hidrokarbon parçalama yeteneğine sahip mikroorganizmaların, hidrokarbon ile kontamine olmuş ortamlara ekilmeleri, ekosistem dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler :** Rafineri Atık Suları, Poliaromatik Hidrokarbon, Biyosüpfektan,

Mikrobiyal degradasyon

## ABSTRACT

# BIOSURFACTANT PRODUCTION AND INVESTIGATION OF HYDROCARBON DEGRADATION WITH MICROORGANISMS ISOLATED FROM REFINERY WASTEWATERS

YALÇIN, Emine

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor : Assoc. Prof. Aysun ERGENE

October 2008, 136 pages

In this study, biosurfactant production and hydrocarbon degradation efficiency of microorganisms isolated from refinery wastewaters were studied. Isolated strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Burkholderia cepacia*. In order to determine the biosurfactant production, the “drop-collapse” method was applied and it was determined that all tested microorganisms were able to produce biosurfactant. Biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Burkholderia cepacia* were coded as BS-I, BS-II, BS-III and BS-IV, respectively. Biosurfactant amount produced by isolates were quantified by phenol-sulfuric acid method and production capacity of BS-I, BS-II, BS-III, BS-

IV were determined as 843, 623, 741, 559 mg/L, respectively. In order to determine the optimum conditions of biosurfactant production, the effects of pH, carbon source, nitrogen source and EDTA on biosurfactant production were investigated. Refinery wastewaters were modified with determined optimum parameters and used as basal medium for biosurfactant production. The structure of biosurfactants was investigated with FTIR, protein, carbohydrate, lipid analysis and the properties were analyzed with surface tension, emulsion, antimicrobial and hemolysis tests. After completion of biosurfactant production and characterization studies, isolates were incubated with refinery wastewaters at 35°C for 10 days then the biosurfactant production and hydrocarbon degradation were investigated with samples collected at defined time intervals. At the end of the incubation period, the production capacity of BS-I, BS-II, BS-III and BS-IV were 712, 536, 448 and 356 mg/L, respectively. Total hydrocarbon degradation in refinery wastewaters by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Burkholderia cepacia* was determined as 79.2%, 54.0%, 69.5% and 40.2%, respectively.

The biosurfactant production and purification of wastewaters containing polycyclic aromatic hydrocarbons by using microorganisms isolated in this study is a fairly important result not only in the scientific development but also in the industrial feasibility. Microorganism inoculation into hydrocarbon contaminated areas which possess hydrocarbon degradation ability, assist in reconstruction of ecosystem balance.

**Key Words:** Refinery wastewater, Polyaromatic hydrocarbon, Biosurfactant,

Microbial Degradation

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aysun ERGENE'ye teőekkürlerimi sunarım.

Kıymetli bilgi ve desteklerinden faydalandığım Tez İzleme Komitesi üyelerinden Prof. Dr. Belma ASLIM'a, analitik çalıőmalarım gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kultigin ÇAVUŐOęLU'na, deney ve yazım aőamalarında yardım gördüğüm Arő. Gör. Zeynep ELİBOL'a, Fadime YILMAZ'a ve Arzu KAYA'ya teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda beni destekleyen, sonsuz sevgi ve ilgisini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Kaynak Özetleri.....	3
1.1.1. Sanayi Sektörü ve Endüstriyel Kirlenme.....	4
1.1.2. Rafineri ve Petrokimya Sanayi.....	5
1.1.3. Petrol ve Petrol Türevleri .....	6
1.1.4. Petrol Kirliliği .....	8
1.1.5. Türkiye Denizlerinde Petrol Kirliliği.....	10
1.1.6. Petrol ve Türevlerinin Sucul Ortamda Birikimi ve Yarattığı Etkiler.	12
1.1.7. Petrol Endüstrisi Atık Sularının Arıtımı .....	17
1.1.7.1. Fiziksel Yöntemler.....	18
1.1.7.2. Kimyasal Yöntemler.....	18
1.1.7.3. Biyolojik Yöntemler.....	18
1.1.7.3.1. Mikrobiyal Degredasyon.....	19
1.1.8. Biosürefektanlar.....	26

1.1.9. Biosurfektanların Fonksiyonu.....	28
1.1.10. Biosurfektanların Sınıflandırılması.....	31
1.1.10.1. Glikolipidler.....	33
1.1.10.2. Lipopeptidler ve Lipoproteinler.....	35
1.1.10.3. Yağ asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler.....	36
1.1.10.4. Polimerik Biosurfektanlar.....	37
1.1.10.5. Partiküllü Biosurfektanlar.....	38
1.1.11. Biosurfektanların Sentezi.....	38
1.1.12. Biosurfektanların Uygulama Alanları .....	39
1.1.12.1. Endüstriyel ve Çevresel Uygulamalar.....	40
1.1.12.2. Biyomedikal Uygulamalar.....	44
1.1.12.3. Gıda Teknolojisi Uygulamaları.....	46
1.1.12.4. Kozmetik Sanayi Uygulamaları.....	47
1.1.12.5. Tarım Uygulamaları.....	47
1.1.12.6. Diğer Uygulama Alanları.....	48
1.1.13. Biosurfektanların Ticari Üretimi.....	48
1.2. Çalışmanın Amacı.....	50
2. MATERYAL VE YÖNTEM .....	53
2.1. Mikroorganizmalar.....	53
2.2. Mikroorganizmaların Üretilmesi.....	53
2.3. Ekim ve Kültürasyon.....	54
2.4. Kültürlerde Biosurfektan Varlığının Saptanması.....	55
2.5. Kültürlerde Biosurfektan Miktarının Ölçülmesi.....	55
2.6. Optimizasyon Çalışmaları.....	56
2.6.1. Biosurfektan Üretimi Üzerine pH Etkisi.....	56



2.6.2. Biyosürefektan Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi .....	56
2.6.3. Biyosürefektan Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi.....	57
2.6.4. Biyosürefektan Üretimi Üzerine EDTA Etkisi.....	57
2.7. Rafineri Atığından Biyosürefektan Eldesi.....	57
2.8. Biyosürefektan Karakterizasyonu.....	58
2.8.1. FTIR Analizi.....	58
2.8.2. Karbonhidrat, Protein ve Lipid Analizleri.....	59
2.8.3. Yüzey Gerilimi.....	59
2.8.4. Emülsiyon Testi.....	59
2.8.5. Antimikrobiyal Aktivite.....	60
2.8.6. Hemolitik Aktivite.....	61
2.8.7. Ağır Metal Giderimi.....	62
2.9. Hidrokarbon Degredasyonununun Araştırılması.....	62
2.10. İstatistiksel Analiz.....	64
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	65
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	65
3.2. Kültürlerde Biyosürefektan Varlığının Saptanması.....	66
3.3. Kültürlerde Biyosürefektan Miktarının Ölçülmesi.....	66
3.4. Optimizasyon Çalışmaları.....	68
3.4.1. Biyosürefektan Üretimi Üzerine pH Etkisi.....	68
3.4.2. Biyosürefektan Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi.....	69
3.4.3. Biyosürefektan Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi.....	70
3.4.4. Biyosürefektan Üretimi Üzerine EDTA Etkisi.....	71
3.5. Rafineri Atığından Biyosürefektan Eldesi.....	72
3.6. Biyosürefektan Karakterizasyonu.....	73

3.6.1. FTIR Analizi.....	73
3.6.2. Karbonhidrat, Protein ve Lipid Analizleri.....	74
3.6.3. Yüzey Gerilimi.....	77
3.6.4. Emülsiyon Testi.....	77
3.6.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini .....	78
3.6.6. Hemolitik Aktivite.....	86
3.6.7. Ağır Metal Giderimi .....	86
3.7. Hidrokarbon Degredasyonu.....	87
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	91
KAYNAKLAR .....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	136

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGE

1.1. Türkiye rafinerileri ve kapasiteleri.....	5
1.2. Farklı yapıdaki biyosürefektanlar ve mikrobiyal kaynakları.....	32
1.3. Biyosürefektanların uygulama alanları ve uygulama şekilleri.....	41
1.4. Biyosürefektanlar ve biyomedikal uygulamaları.....	45
2.1. MSM besiyeri içeriği.....	54
2.2. PAH ve türevlerinin analizinde kullanılan GC koşulları.....	64
3.1. İzole edilen mikroorganizmalar ve biyokimyasal özellikleri.....	65
3.2. Rafineri atık su içeriği.....	72
3.3. İzolatlara ait kültürlerde yüzey gerilimi.....	77
3.4. Biyosürefektanlara ait emülsiyon indeksi.....	78
3.5. İzolatlara ait biyosürefektanların antimikrobiyal etkinlikleri.....	80
3.6. Biyosürefektanların <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium inflexum</i> ve <i>Fusarium heterosporium</i> 'un misel gelişimleri üzerine etkileri.....	81
3.7. Biyosürefektanların hemolitik aktiviteleri.....	86
3.8. Biyosürefektanlara ait ağır metal giderim oranları.....	87

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

1.1. Petrol dökülmeleri ile deniz ortamında oluşan prosesler.....	10
1.2. Ham petrolde bulunan aktif kanser yapıcı poliaromatik bileşikler.....	17
1.3. Poliaromatik hidrokarbonların mikrobiyal degridasyon mekanizmaları.....	25
1.4. Biosürefektan molekülünün farklı modelleri.....	26
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' dan elde edilen ramnolipidin kimyasal yapısı.....	34
1.6. <i>Torulopsis bombicola</i> ' dan elde edilen sophorolipidin kimyasal yapısı.....	35
1.7. <i>Bacillus subtilis</i> tarafından üretilen siklik lipopeptidin kimyasal yapısı.....	36
1.8. <i>R. erythropolis</i> tarafından üretilen fosfotidilethanolaminin yapısı.....	36
1.9. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> tarafından üretilen polimerik biosürefektanın kimyasal yapısı.....	37
3.1. Kontrol sıvıları ve biosürefektan içeren sıvıların microwell plate kuyucuklarında dağılımı.....	67
3.2. Biosürefektan üretimi üzerine pH etkisi.....	69
3.3. Farklı karbon kaynaklarının biosürefektan üretimi üzerine etkisi.....	70
3.4. Farklı azot kaynaklarının biosürefektan üretimi üzerine etkisi.....	71
3.5. Biosürefektan üretimi üzerine EDTA etkisi.....	72
3.6. BS-I biosürefektanına ait FTIR spektrumu.....	75
3.7. BS-II biosürefektanına ait FTIR spektrumu.....	75

3.8. BS-III biyosürefektanına ait FTIR spektrumu.....	76
3.9. BS-IV biyosürefektanına ait FTIR spektrumu.....	76
3.10. İzolatlara ait biyosürefektanların antibakteriyel etkileri.....	79
3.11. İzolatlara ait biyosürefektanların antifungal etkileri.....	79
3.12. İzolatlara ait biyosürefektanların <i>Fusarium graminearum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	82
3.13. İzolatlara ait biyosürefektanların <i>Fusarium inflexum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	83
3.14. İzolatlara ait biyosürefektanların <i>Fusarium heterosporium</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	84
3.15. İzolatlara ait biyosürefektanların <i>Fusarium avenaceum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	85
3.16. İzolatlar tarafından TPH degradasyonu.....	89
3.17. TPH degradasyonu süresince biyosürefektan üretimi.....	89
3.18. TPH degradasyonuna ait GC kromatogramı.....	90

## KISALTMALAR DİZİNİ

TPH	Total Poliaromatik Hidrokarbon
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetikasit
A.P.I	Analitik Profil İndeks
PAH	Poliaromatik Hidrokarbonlar
EPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Kuruluşu
HSV	Herpes Simplex Virus
BS	Biyosürefektan
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetikasit
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
FTIR	Fourier Transform Infrared
E <sub>24</sub>	Emülsiyon indeksi
MSM	Mineral Salt Medium

## 1. GİRİŞ

Baş döndürücü bir hızla artan sanayi, teknolojideki gelişmeler, hızlı nüfus artışı ve buna paralel olarak doğal kaynakların hızla tükenmesi sonucu oluşan çevre kirliliği, ülkemiz ve dünya gündeminin çözüm bekleyen en önemli problemlerindendir. Çağdaş yaşamın bir sonucu olarak ortaya çıkan kirlilik, günümüzde üzerinde en çok durulan ancak en az çözüm getirilebilen konulardan birisidir. 16. yüzyıl sonrasında tıpta, endüstride ve tarımda görülen gelişmeler endüstride daha çok üretim zorunluluğuna yol açmış, daha çok üretim ise daha çok atık oluşmasına neden olmuştur. Özellikle 1970' li yıllarda, teknolojideki gelişmelere bağlı olarak üretimde ve tüketimde görülen baş döndürücü artışlar ekolojik dengede ciddi bozulmalara yol açmıştır. Plansız endüstrileşme, sağlıksız kentleşme, nükleer denemeler, bölgesel savaşlar, verimi artırmak amacıyla tarımda kimyasal maddelerin bilinçsizce kullanılması, gerekli çevresel önlemler alınmadan ve arıtma tesisleri kurulmadan yoğun üretime geçen sanayi tesisleri çevre kirliliğini tehlikeli boyutlara çıkarmıştır<sup>(1-3)</sup>.

Endüstride hammaddeler belirli bir amaca göre işlenirken bazı maddeler de atık olarak ortamda kalmaktadır. Bu tür atıkların hava, toprak ve su gibi alıcı ortamlara aktarılması çevre kirliliğine neden olmaktadır ve tüm canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Endüstriyel atıkların yok edilmeleri ya da kirlilik yüklerinin azaltılması bu problemlerin çözümünde uygulanan primer basamaklardır. Ancak ekonomik yönden değerlendirilmeleri en uygun çözüm yolu olduğundan, çeşitli değerlendirme şekilleri son yıllarda büyük önem kazanmıştır.

Petrol ve petrol türevleri, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda çevreye bulaşan, sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşiklerdir. Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda, 1.7-8.8 milyon metre ton petrol üretildiği ve bunun önemli bir miktarının da zararlı olarak çevreye döndüğü bilinmektedir<sup>(1,4,5)</sup>. Hidrokarbon yapıdaki bu tür bileşiklerin çevreden uzaklaştırılması fotooksidasyon ve kimyasal oksidasyon ile sağlanabilmektedir. Fakat, biyolojik degradasyon ve transformasyon bu tür bileşiklerin doğadan temizlenmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Petrol ya da petrol türevleri gibi hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, petrol ve diğer hidrokarbon kirliliklerinin giderilmesinde primer mekanizmadır. Fakat bu mekanizmada petrol ve türevleri gibi hidrofobik bileşiklerin suda çözünürlüğü düşük olduğundan biyolojik degradasyon ve transformasyon kısıtlanmaktadır<sup>(6,7)</sup>. Mikroorganizmalar tarafından üretilerek ekstrasellüler olarak ortama salınan biosürfektanlar, hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek ve hidrokarbonların periplazmik yüzeye penetrasyonunu arttırarak mikrobiyal degradasyonu kolaylaştırmaktadır. Bu tür özelliklerinden dolayı biosürfektanlar, ticari amaçla çok çeşitli endüstrilerde kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle makine sanayi ve motor yağları endüstrisinde, çevre biyoteknolojisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik sanayide yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Biosürfektanlar sentetik süर्फektanlara kıyasla sahip olduğu avantajlar ile fermentasyon teknolojisinde de ön plana çıkmaktadır. Sentetik süर्फektanlardan farklı yüzey aktif özellikler göstermeleri, non-toksik ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olmaları sundukları bazı avantajlardandır. Hidrokarbon kirliliğinin giderilmesi işlemlerinde kimyasal ajanlar yerine biyolojik olarak parçalanabilen biosürfektanların kullanılması ile ortaya



çıkabilecek yan ürünlerin oluşturacağı sekonder kirliliğin de önüne geçilmiş olacaktır<sup>(8)</sup>.

Petrol ve petrol türevleri ile kontamine olmuş ortamlarda doğal olarak bulunan ve bu ortamlardan izole edilen bakterilerin, hidrokarbon ile kontamine olmuş ortamlara aktarılmaları, ekosistem dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacaktır. Ayrıca, petrol ve petrol türevlerini parçalama özelliği ile ilgili plazmid veya gen fragmentlerinin başka bakterilere aktarılması, çevrenin daha kısa sürede temizlenmesi için, çevreci fenotipik karakterlere sahip yeni mikroorganizmaların ortaya çıkmasına da katkıda bulunacaktır. Rekombinant DNA teknolojisinin büyük nimetleri olarak petrol yiyen bakterilerin geliştirilmeleri, uygulamalı çevre bilimleri ve çevrenin hidrokarbonlardan temizlenmesi yönünden de oldukça önemlidir<sup>(7)</sup>.

### **1.1. Kaynak Özetleri**

Gelişen ve değişen dünyada, insanların temel ihtiyaçlarının büyük bir kısmı sanayinin ürettiği mal ve hizmetlerle sağlanmaktadır. Bu sanayi ürünleri ve hizmetleri modern ve çağdaş hayat standartlarının maddi tabanını oluşturmaktadır. Bu sebeplerle bütün toplumlar gelişen çağa göre değişen ihtiyaçlarını karşılayabilmek için sanayileşmeyi ulaşılması gereken hedef olarak kabul etmişlerdir. Sanayi bir yandan, doğal kaynakları kullanarak ürün verirken, diğer yandan da çevre kirliliğine sebep olmaktadır<sup>(2,3)</sup>. Çevre kirlenmesine sebep olan ve aynı zamanda bir ülke ekonomisinin temelini oluşturan sektörleri;

- i. Sanayi Sektörü,
- ii. Enerji Sektörü,
- iii. Madencilik Sektörü,

- iv. Tarım Sektörü,
- v. Yerleşim Alanları ve Altyapı, Ulaşım Sektörü,
- vii. Turizm Sektörü

şeklinde sıralamak mümkündür<sup>(3,4,9)</sup>.

### **1.1.1. Sanayi Sektörü ve Endüstriyel Kirlenme**

Sanayileşmenin çevre üzerindeki olumsuz etkisi, endüstriyel işlemler sonrası oluşan atıkların alıcı ortamlara bırakılması ile ortaya çıkmaktadır. Sanayileşme sürecini devam ettiren ülkelerde ucuz üretim amacı ile ucuz yakıt kullanılmakta, üretim gereği ortaya çıkan artıklar doğrudan alıcı kaynaklara verilmektedir. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de endüstriyel alandaki yatırımlar giderek artmakta; gelişen endüstriyel etkinliklere ve evlerden oluşan atıklara bağlı olarak doğanın dengesi bozulmakta, böylece önemli çevresel sorunlar oluşarak insan yaşamını olumsuz etkilemektedir. Endüstriyel kirlenme, gerek karşılaşılan kirlenme sorunlarının çok çeşitli olması gerekse doğanın korunması ve bu amaçla alınacak önlemlerin dengesi yüzünden en karmaşık kirlenme şeklini oluşturmaktadır. Endüstriyel atık suların hiçbir işlem uygulanmadan alıcı su ortamlarına atılması bugün gelişen dünyanın en tehlikeli ve önemli sorunlarından birisidir. Ülkemizde ise 20. yüzyılın ortalarında başlayan ve giderek hızlanan endüstrileşme sürecinde, özellikle gıda, tekstil, kimya ve petrokimya gibi sektörler bu sorunların oluşmasında öne çıkmaktadır<sup>(3-5)</sup>.

Temel hammaddeleri ekonomide, üretimden tüketime kadar pek çok sektörde kullanılan petrol ve ürünleri, nafta, gazyağı gibi rafineri ürünleri veya doğalgaz olan

rafineri ve petrokimya endüstrisini geniş kapsamlı bir sanayi olarak görmek mümkündür<sup>(10,11)</sup>.

### 1.1.2. Rafineri ve Petrokimya Sanayi

Petrol rafinerileri; çok farklı nitelikteki katı, sıvı ve gaz halindeki atık ve artıklarıyla çevreyi kirleten önemli sektörlerden birisidir. Petrol rafinerilerinin ürünleri gasolin, kerosen, asfalt, insektisitler, dizel yakıtı (mazot) ve sanayi yakıtları olarak da bilinen fuel oiller, madeni yağlar gibi maddelerdir. Ekonomide üretimden tüketime kadar pek çok sektörde kullanılan petrol ve ürünleri, ülke enerji ihtiyacının çok önemli bir kısmını karşılamaktadır. Türkiye’de dördü kamuya ve biri özel sektöre ait olmak üzere 2000 yılı sonu itibariyle beş adet ham petrol rafinerisi bulunmaktadır (Çizelge 1.1). İlk rafinerimiz 1955 yılında Batman’da kurulmuştur. Mevcut beş tesisin dördü (Kırıkkale, Batman, İzmit ve İzmir rafinerileri) TÜPRAŞ Genel Müdürlüğü’ne ait olup, Türkiye’de toplam rafineri kapasitesinin %85’ini oluşturmaktadır<sup>(5,12)</sup>.

**Çizelge 1.1.** Türkiye rafinerileri ve kapasiteleri<sup>(5,12)</sup>

Uygulama Alanı	Kapasite Milyon Ton/Yıl
Kırıkkale Rafinerisi	5.0
Batman Rafinerisi	1.1
Ataş Rafinerisi	4.4
İzmit Rafinerisi	11.5
İzmir Rafinerisi	10.0
<u>Toplam</u>	32.0

Denizlerde yaşanan petrol kirliliği, denetimsiz petrol taşımacılığı, petrol ve kimya tesislerinin yetersiz olan arıtmalarından boşalan atıklardan kaynaklanmaktadır. Dünyada petrol taşımacılığı sıklıkla deniz yolu ile yapılmaktadır ve bazı petrol kazaları okyanusun ve kıyıların belirgin bir şekilde zarar görmesi ile sonuçlanmaktadır. Ülkemizde gemiler yoluyla deniz kirlenmesi İzmit Körfezi, Çanakkale, İstanbul Boğazları ve Batı Marmara'da yaygın bir şekilde görülmektedir. Dünyada üretilen toplam petrolün yaklaşık %0.08-0.4'lük bir kısmı okyanuslara yayılmaktadır. Gemilerden, deniz yatağında yapılan petrol arama ve çıkarma çalışmalarından, kaza sonucu ortama saçılma ve nehirlerde taşınan petrolden dolayı dünyada 2-28 milyon ton/yıl petrol ürünü denizlere dökülmektedir<sup>(2,11,13)</sup>.

### **1.1.3. Petrol ve Petrol Türevleri**

Ulaştırma, sanayi, enerji, konut ve tarım alanlarında yoğun olarak kullanılan petrol, adını Yunanca-Latince taş anlamına gelen "petra" ile yağ anlamına gelen "oleum" sözcüklerinden almaktadır. Petrol sıvı halinde genellikle kahverengi, koyu yeşil veya siyah renkte, suda erimeyen ve su ile çok az miktarda karışabilen hidrokarbon yapıda yapışkan ve yanıcı bir sıvıdır. Petrol yaklaşık olarak %85 karbon, %12 hidrojen, %3'lük oksijen, azot ve sülfür içeren organik bir hidrokarbondur ve metan, etan, propan, bütan gibi bir takım hidrokarbonların karışımından meydana gelmiştir. Farklı kimyasal bileşimlere sahip hidrokarbonlar, farklı petrol tiplerini meydana getirmektedir<sup>(12-14)</sup>.

Petrol, deniz hayvanları, bitkiler ve plankton tipi organizma çökeltilerinin, deniz dibinde, kum içinde yavaş yavaş mayalanmasından oluşmakta ve zamanla yer

bilim tabakalarının kayması sonucunda bu hammadde, yerini karmaşık bir karbon-hidrojen karışımına bırakmaktadır. Bu karışım, sıvı haldeyken petrolü, gaz haldeyken doğal gazı oluşturmaktadır. Milyonlarca yıl boyunca yer kabuğunun geçirdiği sarsıntılar, petrolün doğduğu deniz kayaçlarından dışarı çıkmasına yol açmış, böylece komşu kayaçlara sızdıktan sonra açık havaya ulaşan petrol sızıntıları, bitüm örtüleri oluşturmuştur. Ama genellikle, geçirimsiz sert kayaçlarla karşılaşarak, alttaki tabakalara sızıp kararlı bir hal almış ve yoğunluk sırasına göre yayılmış, böylece, sünger gibi gözenekli kayaçlar içine yerleşerek, petrol yataklarının doğmasına yol açmıştır. Petrol yataklarından çıkan ham petrol, rafinerilerde elde edilen ürünlerden (akaryakıt, yağ) çok farklı yapıdadır<sup>(2,15)</sup>. Ham petrol hidrojen karbürün karışımıdır ve çok büyük moleküllerden oluşan ağır hidrojen karbürler, bitüm ya da parafin gibi aşağı yukarı katı olan maddeleri vermektedir. Daha küçük moleküllerden oluşanlar hidrojen karbürler ise gazları vermektedir. Dolayısıyla, ham petrolün, katkı maddelerinden arındırıldıktan sonra, çeşitli hidrojen karbürlere ayrıştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, ham petrol 40-60 metre yükseklikteki kulelerde kısmi damıtmadan geçirilmektedir. Kulelerin çeşitli katlarında gazlar (propan ya da butan), renksiz benzin, hafifçe sarı renkte kerosen ya da gaz yağı, daha koyu sarı mazot elde edilmektedir. Bu yolla, çağdaş dünya ve sanayi için vazgeçilmez olan ürünler elde edilmektedir<sup>(13-15)</sup>.

Plastikler, boyalar ve kozmetik gibi birçok kimyasal ürünün hammaddesi olan petrol kökenli ürünler, günlük hayatta ve endüstride yaygın bir şekilde kullanılan en önemli enerji kaynaklarıdır. Ham petrolün rafine edilmesi ile daha değerli ürünler elde edilmektedir. Bunlar, üretim sırasıyla, rafineri yakıt gazı, sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG), nafta, normal benzin, süper benzin, kurşunsuz benzin, solvent, jet yakıtı, gazyağı, motorin, kalorifer yakıtı, fuel oil, asfalt, madeni yağ ve diğerleridir. Ham

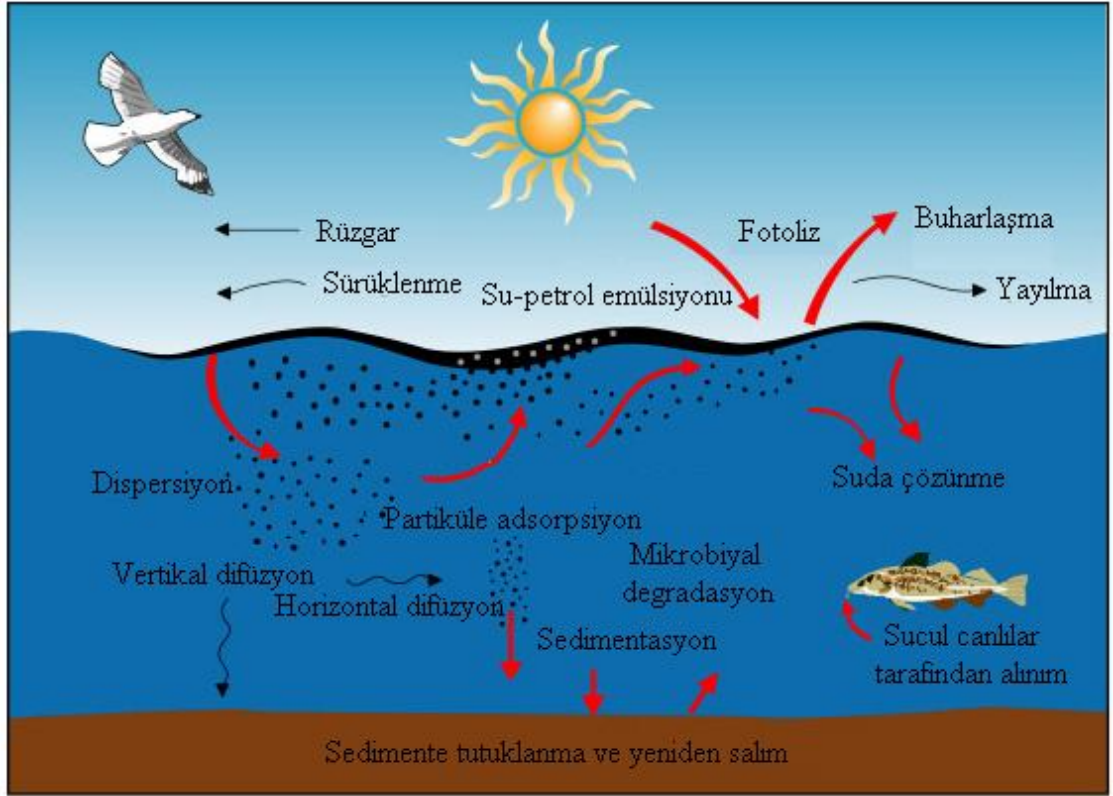
petrolün arıtımı ile parfüm ve böcek ilaçları gibi çeşitli ikincil ürünler de elde edilmektedir. Ayrıca, bu ürünlerin bir kısmı petrokimya sanayilerinde girdi veya destek ürün olarak da kullanılmaktadır. Temel petrokimya ürünleri etil, propilen, benzen, amonyak, metanol olarak sayılsa da, 4000'in üzerinde petrokimya ürünü bulunmaktadır. Patlamalı motorlarda benzin, tepkimeli uçaklarda ısıl gücü fazla olan kerosen, yanmalı motorlarda ise gazyağı yakıt olarak kullanılmaktadır. İlk damıtma kalıntısı olan mazot, önemli bir yakıttır ve çoğu durumda taşkömürünün yerini almıştır<sup>(15,16)</sup>. Petrol türevi olan yağlar mekanik yağlamada kullanılırken, parafinden kağıt üretiminde yararlanılmaktadır. Vazelin, pomatların bileşimine girmektedir. Katran tortusunun yüksek sıcaklıkta yükseltgenmesiyle elde edilen bitüm ya da asfalt, su geçirmez yol kaplamalarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Petrol, kimya sanayisinin bir dalı olan petrokimya için de önemli bir hammadde kaynağıdır. Ayrıca günümüzde petrokimya sanayinin ürünleri olarak yapay lif, gübre, kozmetik ürünleri, filmler, plakalar, besin maddeleri, plastik, sentetik kauçuk ve deterjan gibi 80.000 farklı ürün elde edilmektedir. Petrolün bütün türevleri günümüzde büyük önem taşımaktadırlar ve her ürünün ya da yan ürünün bir kullanım alanı vardır ve bu alanlar gün geçtikçe artmaktadır<sup>(3,17)</sup>.

#### **1.1.4. Petrol Kirliliği**

Uğruna yıllarca savaşların yapıldığı petrol ve türevlerinin çevreye dökülmeleri, çevre kirliliği oluşturmaları yönünden de bu maddeleri dünya gündeminde öncelikli hale getirmiştir. Petrol kirliliği petrol kazaları, fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmaları ve petrol rafinerisi atıkları ile oluşmaktadır. Petrol ve türevleri sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar<sup>(6)</sup>.

Petrol içerisinde poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) olarak adlandırılan pek çok madde bulunmaktadır ve PAH'ların 16 adedi Environmental Protection Agency-Birleşik Devletler Çevre Koruma Kuruluşu (EPA) tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmıştır. Bu maddeler, doğal su ortamlarına bulaşarak burada yaşayan canlılarda birikmekte ve kanserojenik/mutajenik etkilere yol açmaktadır. Denizlerde fitoplanktonlar ile başlayan besin zincirine giren PAH kirleticileri besin zinciri boyunca artarak insana ulaşmaktadır<sup>(10,18)</sup>.

PAH'ların denizlere ve tatlı su ortamlarına başlıca giriş yolları; biyosentez, fosil yakıtların su ortamlarına dökülmesi ve sızıntısı, evsel ve endüstriyel atıkların deşarjı ve atmosferik partiküllerin çökmesi ve yüzey akışı olarak sıralanabilmektedir. Petrol deniz ortamına döküldüğünde bileşimindeki hafif ve çabuk buharlaşabilen yapılar hızlı bir şekilde atmosfere yayılmakta ve geride sudan daha ağır olan katranımsı kısımlar kalmaktadır. Türbülans, dalga ve akıntı hareketleriyle çalkantı olan yüzey kısımlarda değişik kalınlıklarda yağ/su süspansiyonları oluşmaktadır. Yüzeiden kopan bileşikler su kütesinde kısmen çözünmekte, çözünmeyecek kadar ağır kısımlar ise küresel biçimlerini koruyarak dibe çökmektedirler. Çökme sırasında bu küreler birleşerek ağırlıkça büyümekte ve 'tar-ball' denilen yapıları oluşturmaktadır. Tar-ball küreleri dip akıntılarıyla hareket ederek, kum veya sedimentleri kaplamakta, dalga hareketleriyle kıyılara kadar ulaşarak sahillerin ve deniz taşıtlarının kirlenmesine neden olmaktadır. Kısaca, denize dökülen ham petrolün %15'i buharlaşarak atmosfere, %16'sı suya karışmaktadır, %22'si biyolojik olarak çözünmektedir, %3'ü açık denizlerde toplu olarak kalmakta, %15'i kıyıya vurmakta ve %28'i su dibine çökmektedir (Şekil 1.1). Deniz ve kıyı şeritlerde oluşan bu tür kirliliklerin giderilmesi sucul ekosistemin devamı için şarttır<sup>(19,20)</sup>.



**Şekil 1.1.** Petrol dökülmeleri ile deniz ortamında oluşan prosesler<sup>(21)</sup>

### 1.1.5. Türkiye Denizlerinde Petrol Kirliliği

Türkiye'yi çevreleyen 4515 deniz mili uzunluktaki kıyı şeridinde sahip denizlerimizdeki kirlenme, nüfus patlaması ve özellikle de endüstriyel gelişmeye paralel olarak belirginleşirken, son yıllarda karşılaşılan dış kökenli girişimlerle, ciddi boyutlara ulaşmıştır. Bu gelişmelerin gözlenebilen sonuçları, Türkiye'yi çevreleyen denizlerin oseanografik özellikleri ve petrol kirliliğinin birikim niteliği kirlenmeyi daha da ileri boyutlara taşımaktadır. Doğal savunma mekanizmaları, belirli bir sınır içerisinde bu tür kirliliklerin olumsuz etkilerini önleyebilmektedir. Fakat ekosistemin var olan dengelerini bozmaya yönelik girişimler bu tür savunma mekanizmalarının işleyişinde aksamalara neden olmaktadır. Bununla birlikte, antropojenik işlevler



sonucu ortaya çıkan kirlilik doğal savunma mekanizmalarının da etkisiz kalması sonucunu doğurmaktadır<sup>(22,23)</sup>.

Türkiye'nin ekonomik kalkınmasında temel ihtiyaçlar arasında yer alan enerji kaynakları içerisinde petrol, günümüzde yerini ve önemini korumakta ve gelecekte de bunu sürdüreceği beklenmektedir. Denizlerimizde görülen petrol ve türevleri kaynaklı kirlilikler petrol rafineri atıkları ve gemi kazaları sonucunda ortama yayılma ve saçılma şeklinde ortaya çıkmaktadır. Petrokimya sanayindeki gelişmeler kara, hava ve denizlerde kirlilik miktar ve çeşidini artırmıştır. Bu artış ile doğal kaynaklardan faydalanma olanağı azalmış veya yok olmuştur. Sonuç olarak; petrol rafinerileri ve petrokimya tesisleri çok farklı nitelikteki katı, sıvı ve gaz halindeki kimyasal atık ve artıklarıyla çevreyi kirleten en önemli endüstri kollarından birisidir. Ancak son teknolojilerin uygulandığı modern arıtma tesislerinin kurulması ve doğru işletilmesi halinde her türlü kirleticiler en alt seviyeye düşürülebilmektedir<sup>(21-23)</sup>. Globalleşen dünyamızda ülkeler ve kıtalararası ulaşımın önemi gittikçe artmakta ve daha ucuz olması nedeni ile tercih sebebi olan deniz taşımacılığı birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlardan biri ve en önemlisi deniz taşımacılığı sonucunda oluşan deniz kirliliğidir. Günümüzde büyük boyutlara ulaşan deniz kirlenmesi sorunu, denizci ülkelerle birlikte Türkiye'de çözüm bekleyen önemli bir konu haline gelmiştir. Marmara Denizi'nin üzerindeki Boğazlar, Karadeniz Ülkeleri'nin ve Rus petrolünün Akdeniz'e açıldığı güzergah üzerindedir. Taşınan tehlikeli maddelerin %70'ini ham petrol, %26' sını petrol ürünleri, %4' ünü ise sıvılaştırılmış gazlar ve kimyasal ürünler oluşturmaktadır. Türk Boğazları'ndan geçiş yapan gerek gemi tonajlarında gerekse de yabancı bandıralı gemi sayısında büyük artışlar yaşanmış olup, ortalama olarak İstanbul Boğazından yılda 50.000' in üzerinde gemi geçiş yapmaktadır<sup>(9,20)</sup>. Alınmayan önlemler ve dikkatsizlik sonucunda

son on yılda yaklaşık 62 deniz kazası olmuş ve bu kazalar sonucunda önemli oranda çevre ve deniz kirliliği meydana gelmiştir. Kaza ile dökülme ve doğal sızma, su ortamlarına PAH'ların miktarsal olarak önemli bir girişini göstermektedir. Deniz ulaşımı ve deniz kazaları sonucunda oluşan kirlenmeleri önleyebilmek için her türlü önlem, müdahale ve kontrol konularındaki eksikliklerini giderecek düzenlemelerin süratle hayata geçirilmeleri büyük önem taşımaktadır<sup>(2,21)</sup>.

#### **1.1.6. Petrol ve Türevlerinin Sucul Ortamda Birikimi ve Yarattığı Etkiler**

Deniz suyunda meydana gelen petrol kirliliği su içerisinde çözülmüş, partikül fazında birikim, su yüzeyinde oluşan filmler ve yüzer katranlar olmak üzere farklı şekillerde etkiler oluşturmaktadır. Deniz suyu kütledeki birikimler yüzeyde yoğunluk göstermekte ve derinlere gidildikçe yoğunluğu düşmekte, 2000 m ve daha fazla derinliklerde ise yok denecek kadar azalmaktadır. Bu bileşikler sudaki çözünürlükleri oldukça düşük olduklarından partiküllere ve sedimanlara oldukça kuvvetli bir şekilde absorbe olmaktadır. Sucul ortamdaki birikimler hidrokarbonların karbon sayısına bağlı olarak değişmektedir<sup>(22)</sup>.

Deniz ortamında çok yaygın olan petrol kirlenmesi ve bunun sonucu ortaya çıkan bileşikler, ekosistem içerisindeki tüm organizmaları önemli derecede etkilemektedir. Yapılan araştırmalar, kirlenmenin ileri boyutlara ulaştığı kıyı bölgelerinde yaşayan canlılarda hidrokarbonların önemli oranlarda biriktiğini, açık denizlerde ise canlılardaki birikime düşük oranlarda rastlandığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, deniz suyunda düşük oranlardaki hidrokarbon birikimi, biyoakümülyasyon sonucu, sucul organizmalarda besin zinciri yolu ile canlı organizmalarda birikime uğramasından dolayı yüksek oranlara ulaşabilmektedir.

PAH'lar sudaki canlıların bünyelerinde kolayca birikerek (akümülyasyon) canlı bünyesinde su ortamından daha yüksek seviyelere ulaşırlar. Poliaromatik hidrokarbonların suda çözünlüklerinin düşük olmasından dolayı doğrudan sedimentte ve organizma dokularında birikmelerinden dolayı, su ekosisteminde PAH'lar genellikle sedimentte en yüksek miktardadır, su canlılarında ise orta seviyelerdedir<sup>(24,25)</sup>.

Hidrokarbon yapıdaki petrol ve türevlerinin düşük çözünlükte olması bu tür bileşiklerin genellikle yüzeyde kalmasını sağlamaktadır. Bu nedenle yüzey tabakalarındaki organizmalar daha çok ve daha hızlı bir şekilde etkilenmektedir. Petrol tabakalarının yüzeyde birikmesi ışık geçirgenliği, fotooksidasyon ve buharlaşma gibi çeşitli mekanizmalarda aksamalara neden olmaktadır. Derinlerde yaşayan canlılar da bu mekanizmaların aksaması nedeniyle dolaylı olarak ve su sütunu içerisinde dispersiyon ve emülsiyon halindeki fazlardan direkt olarak etkilenmektedirler<sup>(21,26)</sup>.

Petrol kirlenmesinin sucul ekosistemdeki ilk etkileri balıklarda göze çarpmaktadır ve farklı balık türlerindeki etkisi oldukça değişik olabilmektedir. Genellikle en sık gözlenen etkiler, solungaçlara petrol bulaşması sonucu solunumun engellenmesi ve yutma nedeni ile petrol içerisinde bulunan toksik bileşiklerin alınmasıdır. Petrolün yoğun olarak yayıldığı alanlarda balıklarda daha çok akut etkiler gözlenirken beslenme, hareket ve üreme gibi fizyolojik işlevlerde ve tat, koku, renk gibi ekonomik değerde de kronik etkiler oluşabilmektedir. Bazı araştırmacılar sudaki petrol ürünlerinin fitoplanktonlarda düşük seviyelerde fotosentezi stimüle ettiğini, buna karşın orta seviyelerde bulunduğunda fotosentezi yavaşlattığını ve daha yüksek yoğunluklarda ise tümü ile durdurduğunu göstermişlerdir<sup>(24,25)</sup>. Petrol

ürünlerinin deniz canlıları üzerindeki direkt öldürücü toksik etkisi, doku ve hücrelerde birikim ve fizyolojik faaliyetlerin etkilenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Rafine edilmiş petrol ürünleri eşit miktardaki ham petrole oranla çok daha toksiktir. Düşük moleküllü parafinik hidrokarbonlar canlılarda narkoz etkisi yapmaktadır. Ancak bütün bu etkiler petrol türünün yapısına, çözünürlüğüne ve etkilediği canlı türü ile ortam şartlarına göre değişmektedir. En fazla etkilenme ise kendilerini zemine yapıştırarak yaşamlarını sürdüren, yer değiştirme yetenekleri olmayan sesil türlerde görülmektedir. Özellikle zemine gömülü olarak yaşamlarını sürdüren midye ve istiridye gibi türler petrol kirlenmesine karşı en duyarlı olanlardır. Midye gibi çift kabuklular ve balık türleri 5-50 ppm ve Gastropodlar ile algler 10-100 ppm oranına duyarlıdır<sup>(24,27)</sup>. Midyeler yaşamsal faaliyetleri için gerekli besin maddelerini deniz suyunu filtreleyerek buldukları ortamdan almalarından dolayı poliaromatik hidrokarbonlar midye bünyesine beslenme yoluyla girebilmektedir ve çeşitli akut/kronik etkilere sebep olmaktadır. Ayrıca bu türler taş, demir, ahşap gibi sert cisimlere yapışarak yaşadıklarından, bu cisimlerin üzerinde oluşan petrol filmleri bu olanağı ortadan kaldırmakta ve kütleli ölümlere yol açabilmektedir<sup>(3,28)</sup>. Petrol ürünlerinin canlılarda yarattığı toksik, akut ve/veya kronik etkilerin yanı sıra, dolaylı fizyolojik etkileri de söz konusu olmaktadır. Örneğin, petrol ürününün canlıların beslenmesinde yaşamsal rol oynayan kemo-reseptörleri kapatarak organizmanın beslenme olanağını ortadan kaldırdığı saptanmıştır. Bazı canlılarda ise üremeyi gerçekleştiren mekanizmalar arasında önemli rol oynayan feromonların maskelenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle dişi ve erkek fertlerin üreme için iletişim kurmalarını zorlaştırmaktadır. Yapılan araştırmalar, petrol ürünlerinin suya bırakılan gametlerin hareket yeteneğini engellediğini ve gelişmenin başlangıcındaki

larvaları da öldürmek sureti ile üremeyi büyük oranda durdurduğunu göstermiştir.

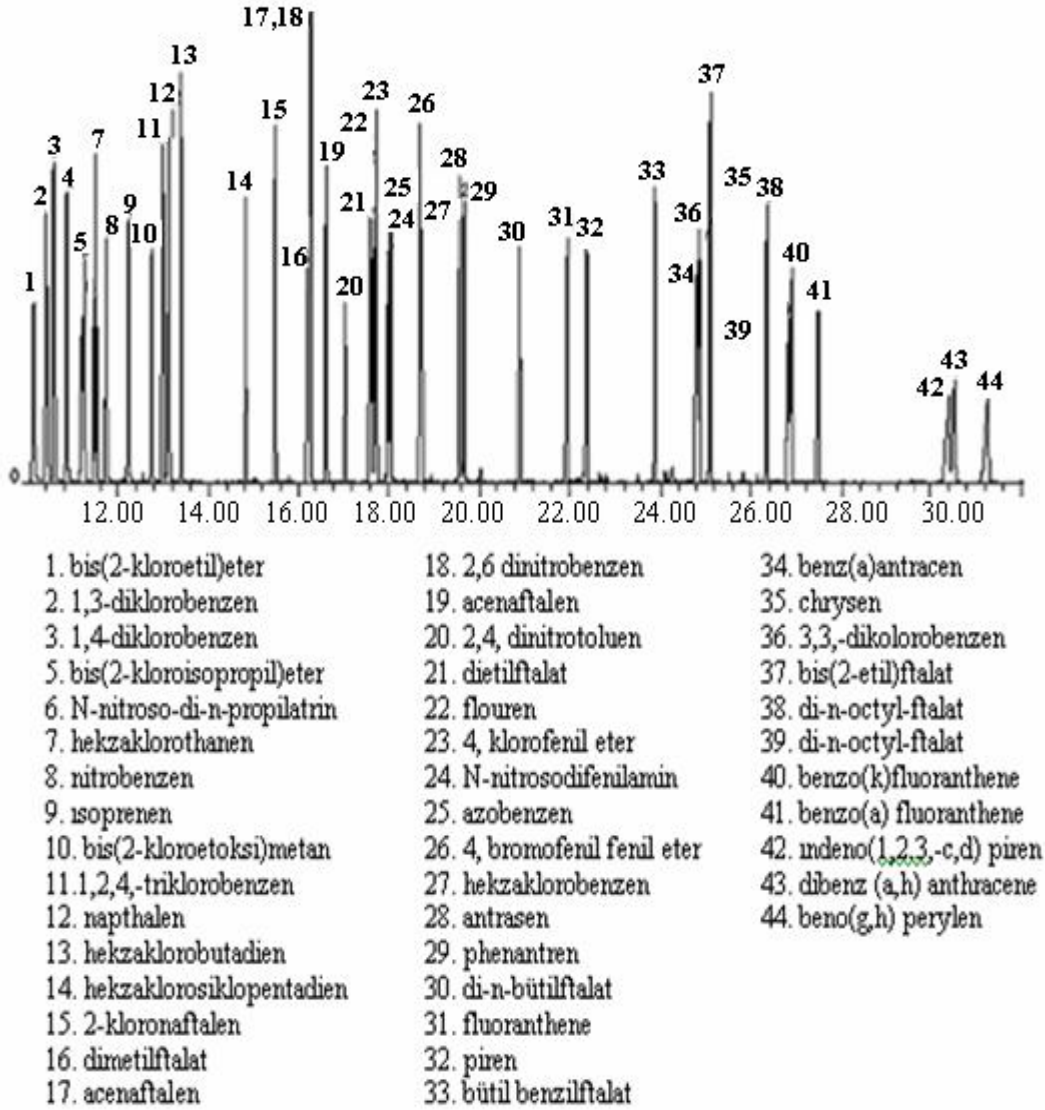
Petrol kirliliği sonucunda canlılarda oluşabilecek fizyolojik etkileri;

- i. Hücre bölünmesinin gecikme ve engellenmesi,
- ii. Anormal yumurtlama,
- iii. Kemotaktik beslenme tepkilerinin azalması,
- iv. Beslenme davranışlarının değişmesi,
- v. Yumurta dölleni ve üremenin engellenmesi,
- vi. Yem/su filtrasyonu işlevlerinin durdurulması,
- vii. Feromonların maskelenmesi,
- viii. Solunum, fotosentez gibi mekanizmalarda aksama,

şeklinde özetlemek mümkündür<sup>(24-25)</sup>. Denizel organizmaların yanı sıra, su yüzeyini paylaşan kuşlar da yüzeyde oluşan petrol katmanlarında etkilenmektedir. Özellikle büyük tanker kazaları ya da yüksek petrol dökümlerinin yaşandığı kazalardan sonra, martı, karabatak deniz kuşlarının kütleler halinde öldükleri gözlenmektedir. Su yüzeyini paylaşan bu tür canlılar avlanma amacı ile suya dalışları sırasında petrol ile sıvandıklarından hareket yetenekleri ve uçmaları kısıtlanmakta ve çarpınma sürecinde yuttukları petrolden zehirlenmektedirler<sup>(3,28,29)</sup>.

Rafineri ve petrokimya tesislerinden çıkan ürünlerin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olmaktadır. Besin zincirine girerek, insanlar da dahil olmak üzere yeryüzündeki her canlıya taşındığı belirlenen poliaromatik hidrokarbonların immün sistemi baskılayıcı, endokrin bozucu (disrupter), nörotoksik, kanserojenik ve teratojenik etkilerinin olduğu saptanmıştır. Rafineri ve petrokimya ürünleri arasında yer alan çeşitli gazların insan beyni ve karaciğeri üzerinde kanserojen etki yapmakta, derinin sıvı vinil klorür monomerle teması esnasında aşınma nedeniyle yaralar ve orta derecede kimyasal yanıklar oluşmaktadır. Stiren ünitesinden çıkan gazların ise

kızarıklık oluşturma ve bayıltıcı etki, gözlerde çok şiddetli kaşıntı, göz bozuklukları, deride kızarıklık, bulantı, kusma, iştah azalması, halsizlik ve baygınlık gibi akut ya da kronik etkileri mevcuttur. Petrol ürünleri ile kontamine olmuş su ve besin ürünlerinin insanlar tarafından tüketilmesi bu ürünlerdeki petrol konsantrasyonunun çok düşük düzeyde olması durumunda bile ciddi sakıncalar yaratmaktadır. Bu sakıncaların başında, ham petrolü oluşturan bileşiklerden bir bölümünün, memeli hayvanlar ve insanlarda kanser yapıcı olduğu bilinen veya bu konuda kuşkulu olan maddelerden oluşması gelmektedir. Bunlar arasında, halkalarında N ve S bulunan heterosiklik bileşikler, poliaromatik ve heterosiklik bileşiklerin metil türevleri ile polinükleer hidrokarbonlar yer almaktadırlar<sup>(28,30)</sup>. Ayrıca ayrıışmış, çözünmüş ve kısmen bozulmuş petrol ürünleri içersinde aktif kanserojen etkileri olan yükseltgeme ürünleri de oluşmaktadır. Ham petrolün destilasyonu sonucunda elde edilecek fraksiyonlarda 40'dan fazla kimyasal bileşik meydana gelmektedir. Bu bileşikler arasında, çok sayıda aromatik hidrokarbonlar, di-tri tetrametil naftalinler ve fenantenler, krisen ve krisen'in metil türevleri, perilen, trifenilen ve tetrametilfluoren, di- ve tetrametil-dibenzotiofen, tiobenzofluoren ve tetra- ve pentametilkarbazol'ler saptanmıştır (Şekil 1.2). Ayrıca 45 yıldan beri kanserojen etkisi bilinen benzo(a)piren'in de ham petrolde bulunduğu saptanmıştır. Deniz canlılarında oluşabilen DNA bozulmaları ve buna bağlı kanser hastalığı, aynı seyri izleyerek insanda da, benzer etkileri yaratabilmektedir. Kanser yapıcı maddeler, petrokimya atıklarıyla organizmadan organizmaya artarak geçerken, insanların tükettiği deniz ürünlerinde konsantre bir halde birikmektedir. Bu şekilde biriken PAH bileşikleri insanlarda katarakt, karaciğer ve böbrek hasarına neden olmaktadır. Ham petrolün fraksiyonlarından olan naftalene maruziyet ise eritrositlerde geri dönüşümsüz hasarlara neden olmaktadır<sup>(24,30)</sup>



Şekil 1.2. Ham petrolde bulunan aktif kanser yapıcı poliaromatik bileşikler<sup>(24)</sup>

### 1.1.7. Petrol Endüstrisi Atık Sularının Arıtımı

Petrol rafinerisi atıklarının arıtılmasında farklı yöntemler mevcuttur. Bu yöntemleri üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

### **1.1.7.1. Fiziksel Yöntemler**

Aritımda yaygın olarak kullanılan fiziksel yöntemler gravite ayrımı, hava flotasyonu ve buharlaştırmadır. Gravite ayırıcılar hemen hemen tüm rafinerilerde inşa edilmiştir ve yüzen yağların, çökebilir katıların uzaklaştırılması için kullanılmaktadır ve bu yolla %50-99 oranında yüzebilen yağ ve %10-85 askıda katı madde giderimi sağlamaktadır. Buharlaştırma yönteminde kirletici giderme verimi çok yüksektir fakat iklim ve arazi kullanılabilirliği ile kısıtlanmaktadır. Flotasyon kimyasal madde ilavesiyle veya kimyasal madde ilave etmeden doğrudan uygulanabilmektedir ve farklı arıtma verimleri elde edilmektedir<sup>(30,31)</sup>.

### **1.1.7.2. Kimyasal Yöntemler**

Kimyasal arıtımda adsorpsiyon, koagülasyon, iyon değişimi, kimyasal oksidasyon, pıhtılaştırma, yumaklaştırma ve çökeltme şeklinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal madde ilavesi ile flotasyon işlemi yapmak; yağ, kül ve askıda katı madde giderme açısından çok verimlidir. Organik maddeler daha çok biyolojik parçalanabilir özellikte olduğu için oksidasyon kısmi olarak gerçekleşmekte, bazı yöntemlerde sık pH kontrolü gerekmektedir. Kimyasal yöntemler ile koloidal maddelerin tam giderimi sağlanırken, organik madde giderimi bu yöntemlerle tam olarak gerçekleştirilememektedir<sup>(31,32)</sup>.

### **1.1.7.3. Biyolojik Yöntemler**

Petrol ve türevleri ile kontamine olmuş sucul ortamların arıtılmasında aktif çamur sistemleri, damlatmalı filtreler, havalandırılmalı lagünler ve oksidasyon



havuzları gibi biyolojik arıtma yöntemleri uygulanabilmektedir. Genelde seçilecek bu biyolojik arıtma süreçleri, petrolün ön arıtma ile giderilmesi ve pH kontrolü, koku kontrolü, yağ giderme, toksik maddelerin giderilmesi gibi ön ve son işlemler gerektirmektedir. Özellikle aktif çamur sistemlerinde ön arıtımın gerekliliği ve çamurun uzaklaştırılması sistem maliyetini ve uygulama süresini arttırmaktadır<sup>(33)</sup>. Bu noktada petrol ve türevleri gibi hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin mikrobiyal degradasyon yolu ile giderimi alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

#### **1.1.7.3.1. Mikrobiyal Degradasyon**

Petrol ve türevlerinin doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, bu tür kirliliklerinin yok edilmesinde primer mekanizmadır<sup>(6)</sup>. Hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin bakteriler tarafından parçalanmaları biyokimyasal ve genetik olarak gerçekleşmektedir ve bu mekanizmalar için ekstrakromozomal gen lokasyonlarının mevcut olduğu belirlenmiştir<sup>(34,35)</sup>. Literatürde deniz, tatlısu ve toprak ekosistemlerindeki petrol ve hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanma yollarını aydınlatmaya yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Şu ana kadar naftalen<sup>(36)</sup>, fenantren<sup>(37)</sup> ve antrasen<sup>(7)</sup> gibi çeşitli hidrokarbonların bakteriler tarafından parçalandığı tespit edilmiştir. Naftalenin mikroorganizmalardaki plazmidte kodlanan bir enzim sınıfı ile parçalandığı tespit edilmiştir<sup>(26)</sup>. Petrol ve türevleri gibi hidrokarbonların parçalanmasından sorumlu plazmid veya gen fragmentlerinin yeni bakterilere aktarılması, çevrenin daha kısa sürede temizlenmesi için yeni suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunacaktır. Rekombinant DNA teknolojisinin büyük getirisi olarak petrol kontaminasyonunu

giderebilen bakterilerin geliştirilmesi çevrenin hidrokarbonlardan temizlenmesi yönünden de oldukça önemlidir<sup>(8)</sup>.

Hidrokarbon yapıdaki petrol ve türevleri primer olarak bakteri ve funguslar tarafından parçalanmaktadır<sup>(38)</sup>. Hidrokarbon yapıdaki substratları kullanabilen ya da degrade edebilen mikroorganizmalar oldukça geniş bir çeşitlilik sergilemektedir. Floodgate, şu ana kadar yapılan çalışmalarda sucul ortamlarda hidrokarbon-parçalayan 25 bakteri ve 27 fungus cinsinin belirlendiğini rapor etmiştir<sup>(39)</sup>. Başka bir çalışmada toprakta hidrokarbon degradasyonu yapabilen 22 bakteri ve 31 fungus cinsi tespit edilmiştir ve hem toprak hem de deniz ortamlarında en önemli hidrokarbon-parçalayan bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* ve *Koryneform*'lar oldukları rapor edilmiştir<sup>(38)</sup>. Sucul ortamda hidrokarbon degradasyonu yapan mikroorganizmalar çoğunlukla bakterilerdir. Floodgate, sucul ekosistemde degradasyon yapabilen fungusların bakterilere kıyasla düşük seviyede kaldığı ve genellikle kıyı bölgelerde yoğunlaştıklarını rapor etmiştir. Aynı çalışmada hidrokarbon degradasyonu yapabilen *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi türlerinin hem topraktan hem de sucul ortamlardan izole edilebildiği de belirtilmiştir<sup>(39)</sup>. Topraktaki hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından parçalanma oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, n-hekzadekan degradasyonunun %82'sinin bakteriler ve %13'ünün funguslar tarafından parçalandığı gözlenmiştir<sup>(40)</sup>. Sucul ve karasal mikrobiyal komünitede algler ve protozoa'lar da önemli bir yere sahiptir. Fakat hidrokarbon degradasyondaki rolleri ve degradasyon performansı açısından aydınlatılmamış pek çok nokta mevcuttur. Cerniglia ve arkadaşları, naftaleni okside eden 9 siyanobakter, 5 yeşil alg, 1 kırmızı alg, 1 kahverengi alg ve 22 diatome tespit

etmişlerdir ve petrolü maddelerin toprağa inokülasyonu sonrasında ortamdaki bakteri ve fungus sayısının arttığını da rapor etmişlerdir<sup>(37)</sup>.

Mikrobiyal degradasyon farklı mikrobiyal komünite gibi biyotik faktörlerin yanında hidrokarbon konsantrasyonu ve kompozisyonu, sıcaklık, pH, tuzluluk gibi çeşitli abiyotik parametrelerden de etkilenmektedir. Petrol ve türevlerinin fiziki durumu ve konsantrasyonu degradasyonu etkileyen önemli bir faktördür. Suya dökülen petrol yüzeyde bir tabaka oluştururken rüzgar ve dalga hareketleri ile su-yağ ya da yağ-su emülsiyonları meydana gelmektedir. Bu emülsiyonun oluşumu, mikrobiyal erişilebilirlik açısından geniş bir yüzey alanı sağlayarak degradasyonu kolaylaştırmaktadır<sup>(38)</sup>. Sucul ekosistemlerde organik bileşiğin kullanılma ve yıkım oranları, Michaelis-Menten kinetiklerine uygun olarak bileşiklerin konsantrasyonlarıyla orantılıdır<sup>(41)</sup>. Fusey and Oudot, eşik değeri üzerindeki hidrokarbon konsantrasyonlarında oksijen limitasyonunun meydana geldiğini ve degradasyon oranının azaldığını rapor etmişlerdir<sup>(42)</sup>. Çözünürlüğü 0.01 mg/L'den düşük olan uzun zincirli alkanlarda degradasyonun çözünürlük limitlerinin aşıldığı noktalarda başladığı da belirlenmiştir. Bu bakımdan naftalen ve fenantren gibi yüksek moleküler ağırlıklı poliaromatik hidrokarbonların ve uzun zincirli alkanların kullanılma oranları toplam madde konsantrasyonundan daha çok suda çözünürlükleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir<sup>(43)</sup>.

Sıcaklık mikrobiyal metabolizmayı, petrolün kimyasal kompozisyonu ve fiziksel yapısını direkt etkilediği için hidrokarbon degradasyonunu da etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda, petrolün viskozitesi artarken, kısa zincirli alkanların buharlaşma oranları azalmaktadır. Bunlara bağlı olarak hidrokarbonların suda çözünürlüğü de artmaktadır. Sıcaklığın azalması ile biyolojik parçalanma oranlarının azalmasının

primer olarak enzimatik aktivite yada  $Q_{10}$  etkisinin bir sonucu olduğu düşünölmektedir. Ayrıca sıcaklığın artması ile emölsiyon oranının artması da değredasyonu arttırmaktadır. 30-40°C aralığında tipik olarak hidrokarbon değredasyonunun arttığı bu aralığın altında azalığı belirlenmiştir<sup>(44,45)</sup>.

Alifatik, siklik ve aromatik hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından değredasyonunun ilk adımı moleköler oksijenin ihtiyaç duyulduğu oksijenazlar aracılığı ile oksidasyondur. Bu nedenle çevredeki hidrokarbonların mikrobiyal oksidasyonunun başlayabilmesi için aerobik şartlar gereklidir<sup>(46,47)</sup>. Deniz ve tatlısu ortamlarında suyun üst yüzeylelerinde normal olarak aerobik şartlar sağlanabilmektedir fakat sedimentler yüzeyleindeki ince bir tabaka hariç genellikle anaerobiktir ve suyun katmanlarında gözlenen bu farklılıklar mikrobiyal değredasyonu önemli derecede etkilemektedir<sup>(48)</sup>. Toprakta ise oksijen erişilebilirliği mikrobiyal oksijen tüketimi, toprak tipi ve topraktaki organik yük ile bağlantılıdır. Bununla birlikte anaerobik hidrokarbon değredasyonu pek çok çalışmada rapor edilmiştir<sup>(38)</sup>.

Hidrokarbonların mikrobiyal parçalanmaları üzerine abiyotik faktörlerden tuzluluğun etkisi bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Ward ve Brock %3.3-28.4 aralığında tuzluluk oranlarında hidrokarbon değredasyonunun azalığını ve bu sonucun mikrobiyal metabolizma hızının azalması ile açıklanabileceğini belirtmişlerdir<sup>(49)</sup>.

pH, mikrobiyal metabolizmayı etkileyen önemli bir çevresel parametredir. Çoğu heterotrofik bakteri ve funguslar, mikrobiyal değredasyon sırasında nötraliteye yakın bir pH'ı tercih etmektedirler. 2.5-11.0 aralığındaki pH değerlerinde hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin mikrobiyal değredasyonu gerçekteşebilmektedir.

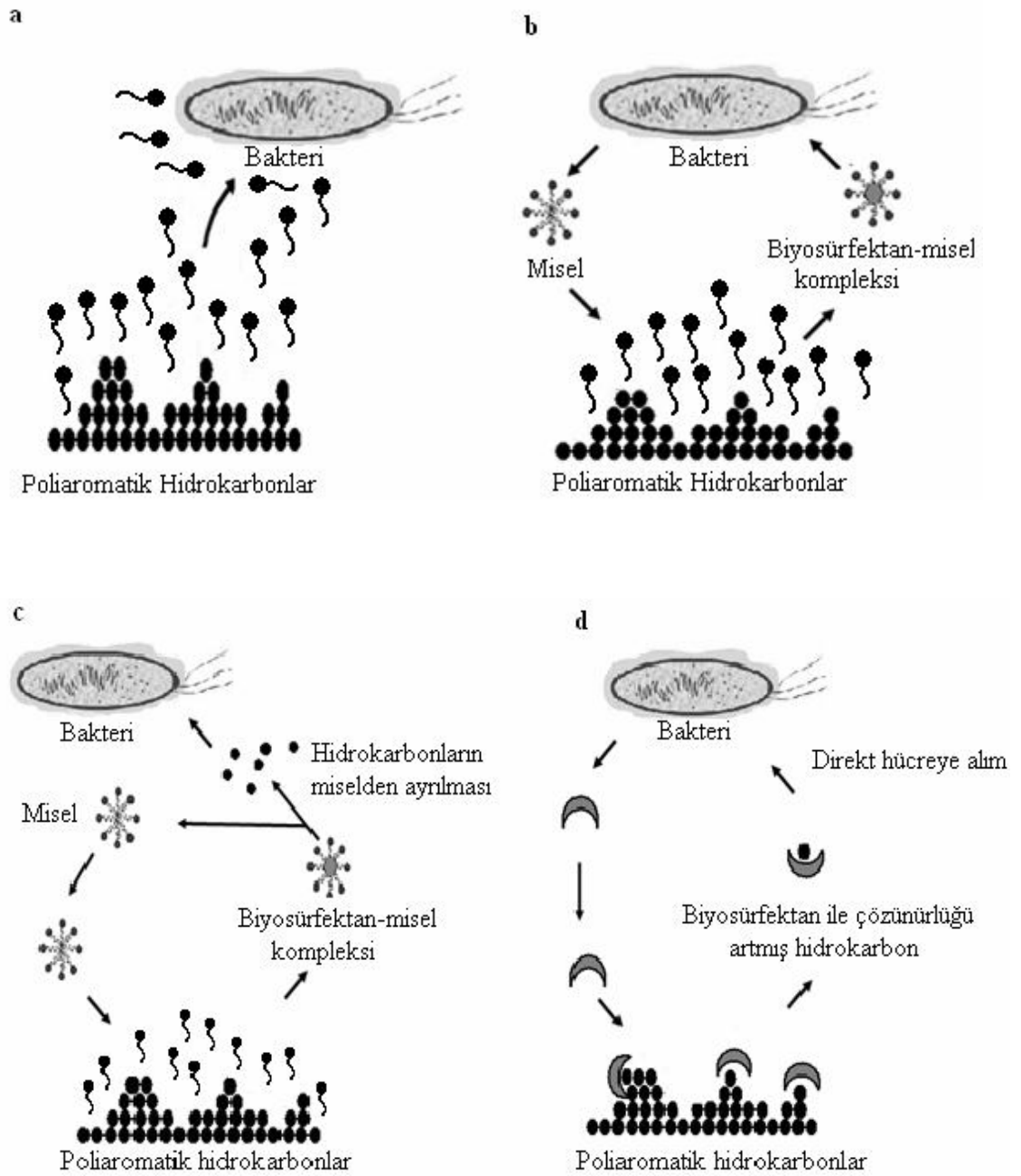
Ekstrem pH koşulları mikrobiyal degradasyonu olumsuz yönde etkilemektedir<sup>(38)</sup>. Dibble ve Bartha, topraktaki hidrokarbon kirliliğinin degradasyonunu 5.0-7.8 aralığında test etmiş ve optimum degradasyonun pH 7.8'de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir<sup>(50)</sup>. Verstraete ve arkadaşları, asidik ortamda gaz yağının parçalanma oranının iki katına çıktığını, pH 8.5'te ise parçalanma oranının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir<sup>(51)</sup>.

Su potansiyeli ya da su aktivitesi de degradasyonu önemli derecede etkilemektedir. Topraktaki su potansiyeli 0.0-0.99 aralığındaki değişim gösterirken sucul ortamlarda bu değer 0.98 olarak sabitlenmektedir. Bu nedenle topraktaki suyun mikrobiyal büyüme ve metabolizma için kısıtlanması hidrokarbon degradasyonunda azalmaya neden olmaktadır<sup>(38)</sup>.

Petrol hidrokarbonları çözünürler, aromatikler, asfaltlar ve rezinler olmak üzere dört farklı kompozisyonda bulunabilmektedirler. Hidrokarbonlar yapılarındaki bu farklılığa bağlı olarak mikrobiyal erişim yönünden de farklı derecelere sahiptirler. Bu derecelendirme n-alkanlar>dallı alkanlar>küçük moleküler ağırlıklı aromatikler>sikloalkanlar şeklinde sıralanabilir<sup>(52)</sup>. Çözünür hidrokarbonlarda mikrobiyal degradasyon oranı oldukça yüksek iken hafif ve yüksek moleküler ağırlıklı aromatiklerde ise mikrobiyal degradasyon oranı düşmektedir<sup>(53)</sup>. Poliaromatik ve hidrofobik bileşiklerin suda çözünürlüğü düşük olduğundan mikrobiyal dönüşüm için erişilebilirliği kısıtlanmakta ve biyodegradasyonu zorlaşmaktadır. Bu aşamada, mikroorganizmalar tarafından üretilen sürfektan maddelerin kullanımı biyodegradasyonu hızlandırmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilerek ekstrasellüler olarak ortama salınan biyosürfektan maddeler, hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek, hidrokarbonları emülsifiye etmektedir.

Ayrıca sürfektanlar tarafından suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik grupların yüzey alanının ve biyolojik uygunluklarının artırılması ile bu tür bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması da kolaylaşmaktadır. Çeşitli yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanan PAH'ların biyodegradasyonu kısmi olarak inhibe olmaktadır. Biosürfektanlar, yüzeylere bağlanan substratların çözünürlüklerini arttırarak, hareketini ve yüzeyden uzaklaşmasını sağlamaktadır. Bu yolla mikroorganizmanın hidrokarbona erişimi kolaylaşmakta ve mikrobiyal büyüme hızlanmaktadır. Ayrıca biosürfektanlar yağ/su emülsiyonlarında yüzeylerarası gerilimi ve yüzey gerilimini düşürerek hidrofobik moleküllerin çözünürlüğünü arttırarak, hücre hidrofobitesini değiştirerek biyodegradasyonun gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır<sup>(54,55)</sup>.

Mikroorganizmalar tarafından hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin degradasyonu farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir<sup>(56)</sup>. Mikroorganizmaların kısa zincirli hidrokarbonları direkt hücre içerisine aldığı ve degrade ettiği belirlenen mekanizmalardan biridir (Şekil 1.3a). Mikroorganizmalar tarafından üretilen biosürfektanların salınımı ile hücre hidrofobitesinin değişmesi, biosürfektanların poliaromatik hidrokarbonlarla kompleks oluşturması ve hücre yüzeyi ile etkileşimin artması degradasyonu açıklayan diğer bir mekanizmadır (Şekil 1.3b) <sup>(57,58)</sup>. Hidrokarbon degradasyonunda belirlenen başka bir mekanizmada ise mikroorganizmalar tarafından salınan biosürfektanların poliaromatik hidrokarbonlar ile etkileşerek çözünürlüğü ve kütle transferini arttırdığı, mikroorganizmanın hidrokarbona ulaşılabilirliğinin kolaylaştığı belirtilmektedir (Şekil 1.3c). Biosürfektanların hidrokarbon ile birlikte hücre tarafından alınarak ve bu yolla hidrokarbon ile mikroorganizma arasındaki difüzyon yolunu kısaltarak degradasyona yardımcı olduğu da belirlenmiştir (Şekil 1.3d)<sup>(59,60)</sup>.

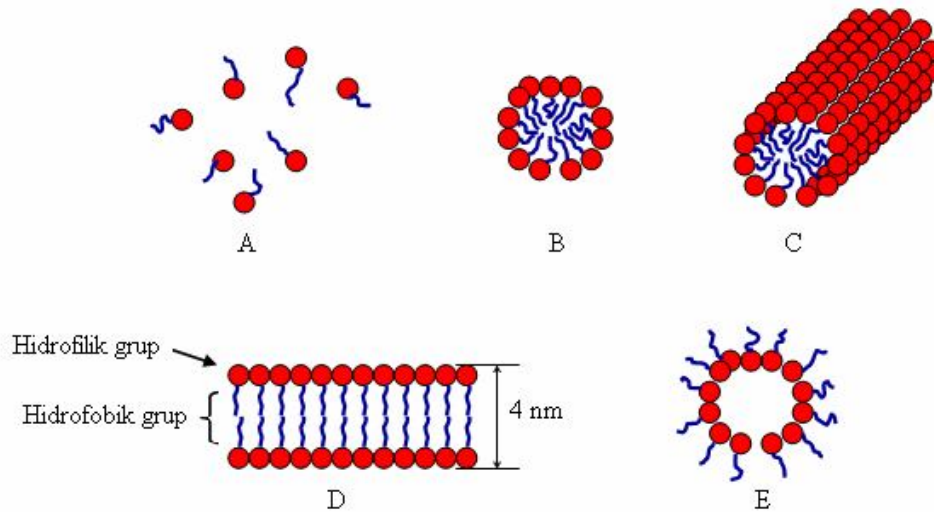


**Şekil 1.3.** Poliaromatik hidrokarbonların mikrobiyal degradasyon mekanizmaları<sup>(55)</sup>

a.hücreye direkt alınım, b. biyosümfektan-hidrokarbon kompleksinin hücreye direkt girişi, c. Misel yapıdaki biyosümfektan kompleksinden ayrılan hidrokarbonların hücreye alınması, d. Misel yapıda olmayan biyosümfektanların hidrokarbon degradasyonunu hızlandırması

### 1.1.8. Biosurfektanlar

Hidrofobik ve hidrofilik gruplar içeren etkili yüzey aktif özellikleri ile birçok endüstriyel alanlarda ve işlemlerde kullanılan biosurfektanlar çok çeşitli yapısal farklılıklar göstermektedir. Bir biosurfektan molekülünde hidrofilik grup aminoasitler, peptitler, anyonlar, katyonlar ve polisakkarit birimleri içerebilmektedir. Hidrofobik kısım ise doymamış ya da doymuş yağlar ve yağ asitlerini içerebilmektedir. Biosurfektan içerdiği bu gruplara göre glikolipidler, lipopeptitler, lipoproteinler, fosfolipidler, polimerik ve partiküllü biosurfektanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Sulu çözeltilerde konsantrasyona bağlı olarak biosurfektan birimleri farklı şekillerde bulunabilmektedir (Şekil 1.4). Konsantrasyonunun artması ile birlikte misel ve silindirik forma dönüşen biosurfektanlar düşük konsantrasyonlarda tekli ya da lineer formda bulunmaktadır<sup>(61,62)</sup>.



**Şekil 1.4.** Biosurfektan molekülünün farklı modelleri; a. tekli biosurfektan üniteleri, b. misel yapıdaki biosurfektan, c. silindirik biosurfektan, d. çift tabakalı biosurfektan, e. emülsiyon halindeki biosurfektan



Biyosümfektanlar, moleküler karakteristikleri doğrultusunda farklı uygulama alanlarına sahip mikrobiyal bileşiklerdir. Petrol depo tanklarının temizlenmesi, petrolün geri kazanımı, toprak biyoremediasyonu, çeşitli tarım ve madencilik uygulamaları, gıda endüstrisi ve endüstriyel temizlik biyosümfektanların kullanıldığı alanlardan bazılarıdır<sup>(63)</sup>. Biyosümfektanlar tarafından suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik grupların yüzey alanının ve biyolojik uygunluklarının artırılması ile bu tür bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması kolaylaşmaktadır. Bu nedenle biyosümfektanlar, petrol gibi hidrofobik substratlarla kontaminasyon sonucu oluşan kirliliğin giderilmesinde önemli rol oynamaktadırlar<sup>(64)</sup>. Sentetik sümfektanlara karşı mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektanlar özellikle fermentasyon teknolojisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Biyosümfektanlar sundukları çeşitli avantajlar ile sentetik formlarına kıyasla geniş kullanım alanına sahiptir. Biyosümfektanlar karbohidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir<sup>(63,64)</sup>. Biyosümfektan gibi yüzey aktif bileşiklerini sentezleyen birçok mikroorganizma bilinmektedir. Bunlardan çoğu bakteriler ve mayalardır<sup>(65)</sup>. Mikroorganizmalar özellikle suda çözünmeyen hidrofobik substratlarda gelişmeleri boyunca bu bileşikleri sentezlemektedirler. Biyosümfektanlar çok çeşitli substratlardan başta bitkisel yağlar, içki ve süt sanayi atıkları gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilebilirler. Biyosümfektanlar yüzey gerilimini azaltma, düşük kritik misel konsantrasyonu (CMC), emülsiyonları stabil etme, köpürmeyi düzenleme özelliklerine sahiptir. Genellikle nontoksiktirler ve biyolojik olarak parçalanabilirler. Hidrokarbon kirliliğinin giderilmesi işlemlerinde kimyasalların kullanılması sonucu ortaya çıkan yan ürünler ile çevre kontamine olabilmektedir. Halbuki biyolojik iyileştirmede biyosümfektanların kullanımı ile biyolojik olarak parçalanabilirlik

özelliğinden dolayı sekonder kirlilik oluşmamakta ve önemli ölçüde çevreyi kirleten maddelerin giderimi sağlanmaktadır<sup>(59,60)</sup>.

### 1.1.9. Biosürefektanların Fonksiyonu

Biosürefektanlar, ekstrasellüler olarak ortama salındıklarında hidrokarbonları emülsifiye etmektedirler. Ayrıca hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek çözünemeyen bileşiklerin yüzey alanlarını arttırarak biyolojik kullanılabilirliklerini ve biyodegradasyonunu kolaylaştırmaktadır<sup>(66)</sup>. Bu konuda yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* tarafından üretilen ramnolipidin oktadekan dispersiyonunu ve biyodegradasyonunu hızlandırdığı belirlenmiştir ve 1L ramnolipid çözeltisinde bulunan oktadekanın % 20'sinin 84 saat içinde mineralize olduğu görülmüştür<sup>(67)</sup>. Deziel ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, biosürefektan üretiminin naftalenin sudaki çözünürlüğünün artışından sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir<sup>(68)</sup>. Zhang ve arkadaşları, penantranın çözünmesi ve biyokullanımı üzerine iki ramnolipidin etkisini incelemiştir ve penantranın hem degradasyon oranında hem de çözünürlüğünde artış olduğunu rapor etmişlerdir<sup>(69)</sup>. Bu durum biosürefektan konsantrasyonunun kritik misel konsantrasyonunu aştığında yüzey geriliminde meydana gelen azalma ile açıklanabilmektedir. Yüzey gerilimi dispersiyon ve hidrojen bağlarının bir bileşkesidir. Su için dispersiyon kuvvetleri 23 mN/m 'lik bir yüzey gerilimi oluştururken, hidrojen bağları 50mN/m' lik bir kuvvet oluşturarak toplamda 73mN/m'lik bir yüzey gerilimi ortaya çıkmaktadır. Biosürefektanlar yüzeylerde akümüle olmakta ve hidrofilik grupları sayesinde su ile hidrojen bağları oluşturarak güçlü etkileşimlere girmektedir. Biosürefektanların yüzeyde birikmesi ile yüzey gerilimi azalmaktadır. İlk olarak tüm yüzey

biyosüurfektan birimleri ile kaplanmakta, biyosüurfektan miktarının artmasıyla su içerisinde hidrofilik gruplar suya dönük olacak şekilde miselleri oluşturmaktadır. Misel oluşumu için gerekli olan minimum biyosüurfektan konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır ve CMC değeri üzerindeki konsantrasyonlarda yüzey gerilimi sabit kalmaktadır. Misel konsantrasyonu ortamdaki biyosüurfektan miktarının artması ile artmaktadır fakat misel büyüklüğünde değişiklik olmamaktadır. Biyosüurfektan yapısının ve uzunluğunun CMC üzerine etkisi yoktur fakat misel büyüklüğü üzerine direkt etkisi vardır. Hidrofobik yapıdaki bileşikler miseller içerisinde çözünerek misellerin şişmesine yol açmaktadır. Yağ/su emülsiyonlarına biyosüurfektanların eklenmesi ile ara yüzeyde 2-5 nm kalınlığında bir tabaka oluşmakta ve yüzeyler arasında keskin bir şekilde belirgin olan sınırlar zayıflatmaktadır. Ayrıca yağ/su emülsiyonlarına biyosüurfektan ilavesi hidrojen bağlarının yüzeylerarası gerilime olan katkısını da azaltmaktadır<sup>(70)</sup>. Yüzeyle geri dönüşümsüz olarak bağlanan PAH'ların biyodegradasyonu kısmi olarak inhibe olmaktadır. Biyosüurfektanlar, yüzeye bağlanmış substratların sudaki çözünürlüklerini arttırarak yüzeyden uzaklaştırabilmekte ve bu yolla büyümeyi hızlandırmaktadırlar. Yüzeyler arası gerilimi düşüren biyosüurfektanlar yüzeye bağlanmış hidrofobik molekülleri düzenli olarak harekete geçirmede ve biyodegradasyonu gerçekleştirmede etkilidirler. Düşük misel konsantrasyonuna (CMC) sahip olan küçük moleküler ağırlıklı biyosüurfektanlar hidrokarbonları misellerin hidrofobik boşluklarına çekerek çözünürlüklerini arttırırlar. Bu durum *P. aeruginosa* tarafından üretilen rannolipidin poliaromatik hidrokarbonların degradasyonuna katılmasıyla görülmüştür<sup>(71)</sup>. Mikroorganizma tarafından salgılanan biyosüurfektan yüzeyde bir biyofilm tabakası oluşturabilir ve bu film biyosüurfektanın selektif özelliği ile belirli mikroorganizmaların ara yüzeylere bağlanmasını stimüle ederken diğerlerinin

bağlanmasını inhibe edebilmektedir<sup>(72)</sup>. Örneğin; *P. aeruginosa*'nın hücre yüzey hidrofobitesinin hücreyle ilişkili ramnolipid filminin oluşmasıyla çok fazla arttığı gözlenmiştir, *Acinetobacter* cinslerinde ise hücre yüzey hidrofobitesinin hücreye bağlı emülsifiyerin bulunmasıyla azaldığı rapor edilmiştir<sup>(73)</sup>. Bu veriler, mikroorganizmaların kendi biyosümfektanlarını ihtiyaca göre yüzeylere bağlanmak ve yüzeylerden ayrılmak için hücre yüzey özelliklerini regüle etmede kullanabildiklerini öne sürmektedir. Mikrobiyal biyosümfektanlar hidrokarbon yapıda substratları kullanarak gelişen mikroorganizmalar tarafından sentezlenmekte ve mikrobiyal hücre yüzeylerine yapışarak ya da kültür ortamına salgılanarak biyolojik aktivite göstermektedir. Ayrıca biyosümfektanların hücre duvarının yapısına katılarak hidrokarbonların periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırdığı da tespit edilmiştir<sup>(74,75)</sup>. Birçok sentetik ve biyolojik sümfektanlar biyoremediasyon prosesinde biyolojik olarak parçalanabilme amaçlı kullanılmaktadır. Biyosümfektanlar, kimyasal sümfektanlarla aynı mekanizmaları kullanarak yüzey ve yüzeyler arası gerilimi azaltan karakteristik özelliklere sahiptirler. Biyosümfektanların eşsiz özellikleri kimyasal olarak sentezlenen sümfektanların yerine birçok endüstriyel alanda kullanılmasına imkan vermektedir<sup>(61,76)</sup>. Biyosümfektanlar sentetik sümfektanlarla kıyaslandığında birçok avantaja sahiptir. Bunlardan bazıları;

- i. biyolojik olarak parçalanabilme,
- ii. genellikle düşük toksisite göstermeleri,
- iii. canlı dokulara zararsız ve sindirilebilir olmaları,
- iv. yenilenebilir maddelerden elde edilebilir olmaları,
- v. yüksek miktarda ve düşük maliyetle üretilebilir olmaları,
- vi. çevresel kontrolde yüksek verimde kullanılabilirlik,

- vii. yüksek özgünlük,
- viii. ekstrem sıcaklık, pH ve tuzlulukta yüksek etkinlik göstermeleri,
- ix. mikrobiyal aktiviteyi arttırmaları,

şeklinde sıralanabilir<sup>(61,71,76)</sup>.

#### 1.1.10. Biosürefektanların Sınıflandırılması

Genelde biosürefektanlar aminoasitler, peptit anyonları veya katyonları; mono-, di-, veya polisakkaritlerden oluşan hidrofilik kısım ile doymuş ya da doymamış yağ asitleri içeren hidrofobik kısımdan oluşmaktadır. Kimyasal olarak sentezlenen sürefektanlardan farklı olarak biosürefektanlar kimyasal kompozisyonları ve mikrobiyal orjinleri ile kategorize edilmektedir<sup>(76,77)</sup>.

Biosürefektanlar mikrobiyal orjinlerine göre bakteriyel sürefektanlar, maya sürefektanları ve fungal sürefektanlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Bakteriyel biosürefektanlar, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi cinsler tarafından üretilen ramnolipidler, trehaloz lipidler, aminoasit içeren lipidler ve hidrofobik proteinlerdir. Maya biosürefektanları, *Candida*, *Endomycopsis* ve *Torulopsis* gibi cinslerden elde edilen mannosileritritol lipidler ve soforoz lipidleri kapsamaktadır. Fungal biosürefektanlar ise *Ustilago* cinslerinden elde edilen ustilajik asit ve *Shizonella*'nın ürettiği mannosileritritol lipidlerdir<sup>(77)</sup>.

Kimyasal kompozisyonlarına göre biosürefektanları glikolipidler, lipidler, lipopeptit/ lipoproteinler, polimerler ve partiküller olmak üzere beş ana grupta sınıflandırmak mümkündür<sup>(76,77)</sup>. Farklı yapıdaki biosürefektanlar ve mikrobiyal kaynakları Çizelge 1.2' de verilmiştir.

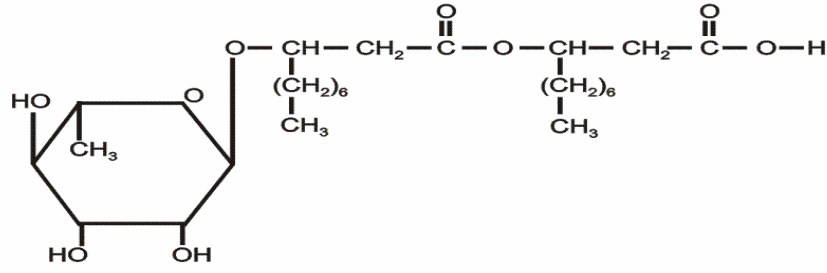
**Çizelge 1.2.** Farklı yapıdaki biyosümfektanlar ve mikrobiyal kaynakları<sup>(76,77)</sup>

Biyosümfektanın türü	Mikroorganizma
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-Ramnolipid	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Torulopsis bombicola</i>
-Soforolipid	<i>Torulopsis apicola</i>
	<i>Torulopsis petrophilum</i>
Glikolipidler	
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
-Trehalolipid	<i>Nocardia erythropolis</i>
	<i>Ustilago zae</i>
	<i>Ustilago maydis</i>
	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipidler	<i>Nocardia erythropolis</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	<i>Bacillus polymyxa</i>
Lipopeptidler/ Lipoproteinler	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Bacillus brevis</i>
Polimerler	<i>Candida lypolytica</i>
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Partiküller	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

### 1.1.10.1. Glikolipidler

Uzun zincirli alifatik asitlerin ve hidroksialifatik asitlerin kombinasyonu olan glikolipidler en iyi bilinen biyosümfektanlardır. Glikolipid yapıdaki biyosümfektanlar mono-, di-, tri ve tetrasakkarit bileşenleri, glukoz, mannoz, galaktoz, glukuronik asit, ramnoz ve galaktoz içermektedir. Yağ asidi bileşeni genellikle aynı mikroorganizmaların fosfolipidleriyle benzer bir kompozisyona sahiptir. *Mycobacterium* cinsine ait türler tarafından üretilen trehalolipidler, mayalar tarafından üretilen soforolipidler ve *Pseudomonas* cinsine ait türler tarafından üretilen ramnolipidler (Şekil 1.5) en çok çalışılan glikolipidlerdir<sup>(76,78)</sup>. Ramnoz içeren glikolipidlerin *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretimi ilk kez Jarvis ve Johnson tarafından rapor edilmiştir<sup>(79)</sup>. Ramnolipid yapısında bulunan ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken, yağ asitlere eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliklerini artırmaktadır. Bu özellikleri ramnolipidlerin kararlılığını ve hidrofobik bileşikleri çözebilme kapasitesini etkilemektedir<sup>(80)</sup>. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroksidekanoil-β-hidroksidekanoat ve L-ramnosil-β-hidroksidekanoil-β-hidroksidekanoat sırası ile ramnolipid 1 ve 2 olarak adlandırılmaktadır. Ramnolipid 3, β-hidroksidekanoik asit ile bir ramnoz ünitesi içerirken, ramnolipid 4, β-hidroksidekanoik asit ile iki ramnoz ünitesi içermektedir<sup>(80,81)</sup>.

Ramnolipid sentezi, ramnosil transferaz-1 enziminin katalizlediği dTP-L-ramnozun β- hidroksidekanoil-β-hidroksidekanoata transfer edildiği reaksiyon ile sentezlenmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* ramnolipidleri n-hekzadekana karşı 1mN/m yüzeyler arası gerilimi ve 25-30mN/m aralığında yüzey gerilimi sergilemektedir<sup>(82)</sup>.

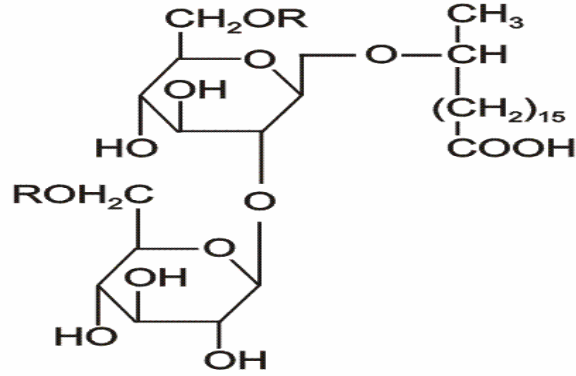


**Şekil 1.5.** *Pseudomonas aeruginosa* ' dan elde edilen rhamnolipidin kimyasal yapısı<sup>(76)</sup>

Trehaloz disakkaritlerinin uzun zincirli dallanmış hidroksi yağ asitleri olan mikolik asite (C-6 ve C-69) bağlanması ile oluşan trehalolipidler, glikolipid yapıdaki diğer bir biyosümfektan grubudur. Trehalolipidler yaygın olarak *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium* cinsine ait türler tarafından sentezlenmektedir. Farklı mikroorganizma türleri tarafından üretilen trehalolipidler mikolik asit yapısı, karbon atom sayısı ve büyüklük bakımından çeşitlilik sergilemektedir<sup>(83,84)</sup>. *Rhodococcus erythropolis* ve *Arthrobacter* sp. tarafından üretilen trehalolipidlerin sıvı besiyerinin yüzey gerilimini sırası ile 25 ve 40 mN/m azalttığı rapor edilmiştir<sup>(76,85)</sup>.

*Torulopsis bombicola*<sup>(86)</sup>, *Torulopsis petrophilum*<sup>(87)</sup> ve *Torulopsis apicola*<sup>(88)</sup> türü mayalar tarafından sentezlenen sophorolipidler yaygın çalışılan glikolipidik yapıda biyosümfektandır. Sophorolipidler uzun zincirli yağ asitlerine bağlanmış dimerik sophoroz üniteleri içermektedir (Şekil 1.6) ve genellikle 6-9 hidrofobik sophorozid ünitesinden oluşmaktadır. Laktonik ve asidik sophorolipidlerin n-hekzedekan ve su arasındaki yüzeyler arası gerilimi 40'dan 5 mN/m'e azalttığı ve pH/sıcaklık değişimlerine karşı kararlı kaldığı rapor edilmiştir<sup>(76,87)</sup>.

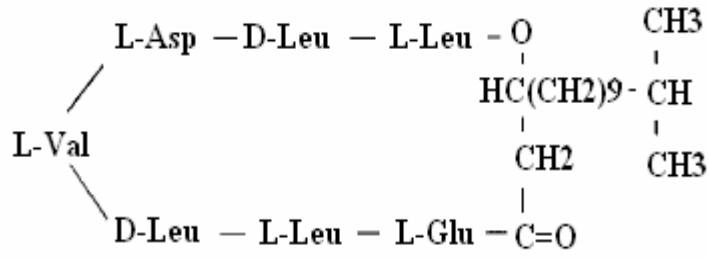




**Şekil 1.6.** *Torulopsis bombicola*'dan elde edilen sophorolipidin kimyasal yapısı<sup>(86)</sup>

### 1.1.10.2. Lipopeptidler ve Lipoproteinler

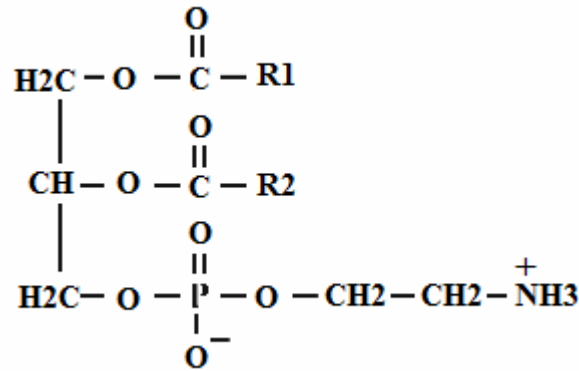
Dekapeptid antibiyotiklerini (gramisidin) ve lipopeptid antibiyotiklerini (polimiksin) içeren çok sayıda siklik lipopeptid yapıdaki biyosurfektanların büyük çoğunluğu *Bacillus brevis*<sup>(89)</sup> ve *Bacillus polymyxa*<sup>(90)</sup> türleri tarafından üretilmektedir. *Thiobacillus thiooxidans*<sup>(91)</sup> ve *Pseudomonas rubescens*<sup>(92)</sup> tarafından üretilen ornitin içeren lipidler; *Gluconobacter cerinus*<sup>(93)</sup> tarafından üretilen cerilipin, ornitin ve taurin içeren lipidler; *Agrobacterium tumefaciens*<sup>(94)</sup> tarafından üretilen ve lizin içeren lipidler, bu gruba ait biyosurfektanlardır. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen surfaktin en iyi çalışılmış siklik lipopeptid yapıda biyosurfektandır (Şekil 1.7). %0.005 gibi düşük surfaktin konsantrasyonlarında yüzey geriliminin 72'den 27.9 mN/m'ye azaldığı tespit edilmiştir<sup>(95)</sup>. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen lipopeptid yapıya sahip biyosurfektan (BL-86) pH, sıcaklık ve tuzluluğa karşı yüksek stabilite sergilemektedir ve suyun yüzey gerilimini 27 mN/m' ye düşürmektedir<sup>(96)</sup>. Bununla birlikte lipopeptit yapıdaki BL-86 biyosurfektanının hemoliz özelliği de tespit edilmiştir<sup>(95)</sup>.



Şekil 1.7. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen siklik lipopeptidin kimyasal yapısı<sup>(76)</sup>

### 1.1.10.3. Yağ asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler

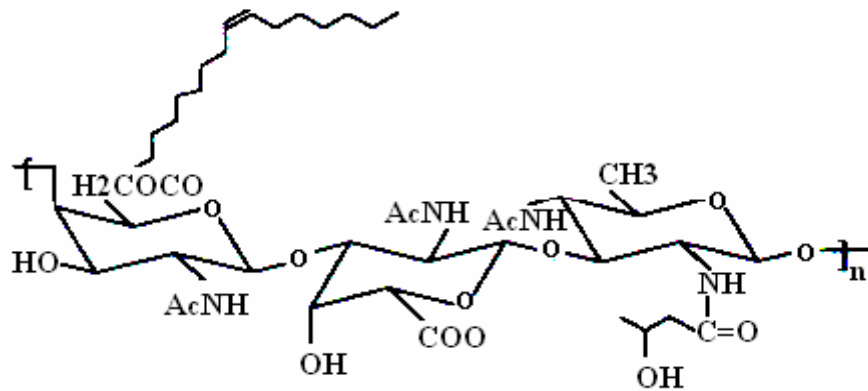
Çoğu bakteri ve maya türleri, n-alken içeren ortamlarda yüksek miktarda yağ asitleri ve fosfolipid üretmektedir<sup>(97)</sup>. *Acinetobacter* sp.'nin ürettiği fosfoditiletanolamin biyosümfektanı ile kültür ortamında alken mikroemülsiyonlarının oluştuğu gözlenmiştir<sup>(98)</sup>. N-alken bulunan ortamlarda *Rhodococcus erythropolis* tarafından üretilen fosfaditiletanolamin (Şekil 1.8) ile su ve n-hekzadekan arasında yüzeyler arası gerilimin 1 mN/m azaldığı belirlenmiştir<sup>(99)</sup>. Yağ asitleri, fosfolipid ve nötral lipid üreten diğer türler *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* sp. ve *Thiobacillus* sp. olarak sayılabilmektedir<sup>(76)</sup>.



Şekil 1.8. *R. erythropolis* tarafından üretilen fosfoditiletanolaminin yapısı<sup>(76)</sup>

#### 1.1.10.4. Polimerik Biyosüpfektanlar

Emülsan, liposan, mannoprotein ve protein-polisakkarit kompleksleri en iyi çalışılan polimerik biyosüpfektanlardır. *Acinetobacter calcoaceticus* tarafından üretilen polianyonik, amfipatik ve heteropolisakkarit yapıya sahip biyosüpfektan emülsan olarak adlandırılmaktadır<sup>(100)</sup>. Şekil 1.9’da kimyasal yapısı verilen emülsan, asetil-D-galaktozamin, N-asetilgalaktozaminuronik asit, ve N-asetil amino şeker birimlerinin tekrarlarından oluşan ve çok düşük konsantrasyonlarda (%0.001-0.01) dahi hidrokarbonları etkili bir şekilde emülsifiye edebilen biyosüpfektan türüdür<sup>(101)</sup>. *Acinetobacter calcoaceticus* tarafından üretilen anyonik biyodispersan glukozamin, 6-metilaminoheksos, galaktozaminuronik asit ve amino şeker olmak üzere dört şeker ünitesi içermektedir<sup>(102)</sup>. *Candida lipolytica* tarafından üretilen liposan ise %83 karbonhidrat (glukoz, galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit) ve %17 proteinden oluşmaktadır<sup>(97,98)</sup>. Mannoprotein çeşitli organik çözücülerde yüzey aktif özellik gösteren *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen polimerik biyosüpfektandır<sup>(86,87)</sup>.



Şekil 1.9. *Acinetobacter calcoaceticus* tarafından üretilen polimerik biyosüpfektanın kimyasal yapısı<sup>(69)</sup>

Desai ve arkadaşları, gasolin bulunan ortamlarda *Pseudomonas fluorescens* tarafından %50 karbonhidrat, %19.6 protein ve %10 lipid içeren biyoemulsifiyer yapıda bir biyosürefektanın sentezlendiğini rapor etmişlerdir<sup>(103)</sup>. Benzer şekilde *Candida tropicalis*<sup>(104)</sup> ve *Phormidium J1*<sup>(105)</sup> türleri tarafından karbonhidrat, lipid ve protein içeren biyosürefektanların üretildiği rapor edilmiştir.

#### **1.1.10.5. Partiküllü Biyosürefektanlar**

Mikroorganizmalar tarafından hidrokarbonların hücre içerisine alınmasında ekstrasellüler membran vezikülleri, hidrokarbonları mikroemülsiyon forma dönüştürerek önemli bir rol üstlenmektedirler. *Acinetobacter* cinsine ait türlerde veziküller 20-50 nm çaplarında protein, fosfolipid ve lipopolisakkaritten oluşmaktadır<sup>(98)</sup>. Bu tür veziküller aynı organizmanın dış membranına kıyasla 5 kat fazla fosfolipid, 350 kat fazla polisakkarit içermektedir. Partiküllü biyosürefektan üreten diğer mikroorganizmalar *Serratia* sp., *Bacillus brevis* ve *Acinetobacter calcoaceticus* olarak sayılabilir<sup>(105,106)</sup>.

#### **1.1.11. Biyosürefektanların Sentezi**

Biyosürefektanlar, mikroorganizmaların su ile karışmayan substratlarda üretilmesiyle sentezlenmektedir. Büyüme ortamına kompleks yağ asitlerinin ve hidrokarbonların eklenmesiyle biyosürefektanların üretiminde artış gözlenmektedir. Uzun zincirli yağ asitleri biyosürefektanların hidrofobik kısmını oluştururken; alkol, karbonhidrat ya da karboksilik asit gibi bileşenler hidrofilik kısmını oluşturmaktadır. Hidrofobik ve hidrofilik bileşenlerin sentezinde metabolik hidrokarbon ve

karbonhidrat reaksiyonlar ve bu reaksiyonlarda görev alan düzenleyici enzimler yer almaktadır<sup>(76,107)</sup>. Mikroorganizmalar tarafından biyosümfektanların üretimi indüksiyon, represyon ve çok değerlikli katyonların etkisi olmak üzere üç mekanizma ile düzenlenmektedir. *Torulopsis magnoliae*<sup>(108)</sup> kültür ortamına yağ asitlerinin, hidrokarbonların ya da gliseritlerin eklenmesi ile sophorolipidlerin sentezinin; *Pseudomonas aeruginosa* SB-30<sup>(109)</sup> besiyerine alkanların eklenmesi ile glikolipid sentezinin indüklendiği rapor edilmiştir. Ayrıca lipopeptit yapıdaki biyosümfektanların sentezinde de indüksiyonun önemli bir etkisi olduğu rapor edilmiştir<sup>(110)</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa* kültür ortamına glukoz, asetat ve trikarboksilik asit ilave edilmesi ile ramnolipid sentezinin baskılanması katabolik represyona güzel bir örnektir<sup>(111)</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*'nın besi ortamına azot kaynağı ilavesi biyosümfektan sentezini engellemektedir<sup>(76)</sup>. Guerra-Santos ve arkadaşları, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 kültür ortamında magnezyum, kalsiyum, potasyum ve sodyum tuzlarının sınırlandırılması ile ramnolipid üretiminin arttığını rapor etmişlerdir<sup>(82)</sup>. Kültür ortamlarında demir miktarının sınırlandırılması *Pseudomonas fluorescens*<sup>(112)</sup> ve *Pseudomonas aeruginosa*<sup>(82)</sup> bakterilerinin biyosümfektan sentezini stimüle ederken, *Bacillus subtilis*<sup>(113)</sup> ve *Rhodococcus* sp.<sup>(114)</sup> türlerinde biyosümfektan üretimini azalttığı rapor edilmiştir.

### **1.1.12. Biyosümfektanların Uygulama Alanları**

Biyosümfektanlar, farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlendiklerinden çok farklı kimyasal yapı ve yüzey özelliklerine sahiptir. Bu nedenle, bu moleküllerin doğal rolleri hakkında genelleme yapmak oldukça güçtür<sup>(115)</sup>. Biyosümfektanlar

emülsiyonlaştırıcı, seyreltici, ıslatma, köpürtme, solubilizasyon ve dispersiyon, paslandırmayı önleme ve akışkanlığı azaltma, deterjan ve işlevsel gıda maddeleri olabilme özelliklerinden dolayı petrol, petrokimya, çevre yönetimi, ilaç, kozmetik, kişisel bakım ürünleri, gıda-içecek sanayi, tarım uygulamaları, madencilik, seramik, inşaat sektörü, boya sanayi, metal endüstrisi ve deri işletmesi gibi birçok alanda kullanılabilirler (Çizelge 1.3). Terapotik ve biyomedikal özellikleri ile biyosürefektanlar tıp alanında da geniş uygulama alanı bulmaktadır. Antibakteriyel, antifungal, antiviral özellikleri sayesinde immun sistemin güçlendirilmesinde ve düzenlenmesinde de kullanılabilirler. Doğada, biyosürefektanlar hidrofobik moleküllerin biyolojik kullanılabilirliğini arttırmada, biyofilm oluşturmada, mikroorganizmaların bir araya gelme hareketini sağlamada ve hücrel fizyolojik proseslerde de rol oynamaktadır. Ayrıca fibrin oluşumu ve çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı anti-adhesiv aktivite sergilemektedirler<sup>(116)</sup>.

#### **1.1.12.1. Endüstriyel ve Çevresel Uygulamalar**

Tüm dünyada biyosürefektan endüstrisi hızla gelişmektedir ve özellikle 1972-1982 yılları arasında bu endüstrinin gelişimi çok hızlı olmuştur. Bu gelişim, biyosürefektanların sunduğu ucuz substrat, düşük maliyet, yüksek verim ve düşük toksisite avantajları ile daha fazla artış göstermektedir. Mikrobiyal sürefektanların gündeme gelmesi ile petrol ürünlerinden türetilen kimyasal sürefektanların kullanımı azalmıştır. Çoğu kimyasal sürefektan doğal ekosistemlerde birikerek ciddi problemlere yol açmaktadır. Bu nedenle biyosürefektanlar açıkça görünen avantajlarından dolayı pek çok alanda kimyasal sürefektanların yerini almaktadır. Biyosürefektanlar endüstriyel temizlik, kağıt, metal, tekstil, kozmetik, ilaç,

petrokimya endüstrileri ile tarım ve inşaat gibi çeşitli alanlarda pek çok uygulamalarda yer almaktadır<sup>(76,77)</sup>.

**Çizelge 1.3.** Biyosürfektanların uygulama alanları ve uygulama şekilleri<sup>(107)</sup>

Uygulama Alanı	Uygulama şekli
<u>Petrol</u>	
Rafine ürünler	Emülsifikasyon
Geri kazanım	Degradasyon
Akışkanlar	
Tanklar	
<u>Metal Endüstrisi</u>	Köpüklenme
Levha kaplamalar	Islatma
Biçimlendirme	Korozyon inhibisyonu
Paslanma	Emülsifikasyon
<u>Kağıt Endüstrisi</u>	Yıkama
Kağıt hamuru	Köpük giderimi
Kağıt makineleri	Islatma
<u>Tekstil Endüstrisi</u>	Islatma
Boyama	Yumuşatma
Basma	Yağlama
İplik	Penetrasyon
<u>Tarımsal uygulamalar</u>	Emülsifikasyon
Gübreleme	Koruma
Arındırma	Giderme
<u>Gıda endüstrisi</u>	Stabilizasyon
Yağlar	Katkı maddesi
Bitkiler	Kıvam ayarlama
Meyve ve sebzeler	Koruma
Ekmek	Raf ömrünü uzatma

Kıyı ve denizlerde tanker boşaltımı, kazalar veya petrol işlenmesi sonrasında sucul ortama yayılan aromatik hidrokarbon içerikli petrol kirliliği tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli problemler arasındadır. Biyosümfektanların denizlerdeki bu petrol kirliliğinin giderilmesinde kullanıldığı çoğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. 1990’da yaşanan Exxon Valdez kazasında denize yayılan petrolün temizlenmesinde biyosümfektan uygulaması gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar koşullarında da biyosümfektan üreten mikroorganizmaların çok miktarda petrol bulunan ortamlarda doğal olarak degradasyon yapabildikleri gözlenmiştir<sup>(77,100)</sup>.

Biyosümfektanlar petrol ve türevlerinin yüzeyler tarafından emilimlerini kolaylaştırmakta ve biyodegradasyon yapan mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliklerini arttırmaktadır. Biyosümfektanlar topraktaki petrol tabakalarının gideriminde de kullanılabilirliklerini arttırmaktadır<sup>(115)</sup>. Oberbremer ve arkadaşları, topraktaki hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin bakteriler tarafından 114 saatte %81 oranında yıkılabilirken, ortama biyosümfektan ilavesi sonrasında hidrokarbon yıkımının 79 saate %90 oranında tamamlandığını rapor etmişlerdir<sup>(116)</sup>.

Biyosümfektan uygulamalarının önemli oranda kullanım potansiyeli, petrolün mikrobiyal geri kazanımı üzerinedir. Geri kazanımda yüzeyler arası gerilimin düşürülmesi amacı ile depolara inoküle edilen mikroorganizma biyosümfektan üretmesi için indüklenmektedir. Petrolün mikrobiyal geri kazanımı için üç farklı yöntem baz alınarak çeşitli modifikasyonlarla uygulanabilmektedir. Bu yöntemler; i. endüstriyel koşullar altında kesikli ve devamlı mikroorganizma kültürlerinin rezerve içerisine inoküle edilmesi, ii. mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektanların rezerve penetrasyonunun sağlanması, iii. indirgen biyosümfektan



üretebilen mikroorganizmaların rezerv içerisine besin enjeksiyonu ile üretilmesi, şeklinde sıralanabilmektedir<sup>(76,77)</sup>.

Biyosürefektanlar emülsifikasyon özellikleri ile petrol hattı ve taşımacılık alanlarında da kullanılmaktadır. Banat ve arkadaşları, biyosürefektanların petrol depolayan tankları temizliğinde kullanılabildiğini ve emülsifiye ettiği çamurdan hidrokarbonların geri kazanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca iki ton biyosürefektan içeren hücre kültürünün 850 m<sup>3</sup> petrol tankını temizlemek için kullanıldığını, yaklaşık olarak % 91 (tankın 744 m<sup>3</sup> 'lük alanı) oranında verim elde edildiğini ve petrolün yeniden satılabilir halde geri kazanıldığını rapor etmişlerdir<sup>(76,77)</sup>.

Biyosürefektanların ağır metal kirliliğinin gideriminde kullanılması da çevresel uygulamalardan biridir. Ramnolipid uygulaması ile topraktan kadmiyum, kurşun ve çinko metallerinin uzaklaştırılabildiği tespit edilmiştir ve ramnolipidin yüksek konsantrasyonlarda uygulanması ile kadmiyumun toksisitesinin tamamen giderildiği, eşit konsantrasyonlarda eklendiğinde ise kadmiyum toksisitesinin azaldığı rapor edilmiştir. Ramnolipid, kadmiyumun hücre yapısına alınımı değiştirmek için hücre yüzeyiyle etkileşime girmektedir. Surfaktinin glutamat kısımları Mg, Mn, Ca, Ba, Li, Rb gibi metalleri bağlayabilmektedir. % 0,25 oranında surfaktin ile yıkanmış topraktan %70 oranında Cu ve %22 oranında Zn uzaklaştırılmıştır<sup>(76,117,118)</sup>. Literatürde mikroorganizmalar, algler, bitkiler, aktifleştirilmiş kömür ve çok farklı yapıda kimyasal bileşen ve polimerlerle ağır metal giderimi çalışılmıştır. Fakat biyosürefektanlarla ağır metal giderim konusundaki çalışmalar sınırlıdır ve henüz istenilen noktaya ulaşılmamıştır. Mikroorganizmalar kullanılarak ağır metallerin biyolojik olarak iyileştirilmesi (biyoremediasyon) sadece

bilimsel gelişme açısından değil çevresel uygulanabilirlik açısından da son yıllarda büyük ilgi görmektedir.

#### 1.1.12.2. Biyomedikal Uygulamalar

Biyosürfektanlar, terapötik ve farmakolojik alanlarda da oldukça dikkat çeken ajanlardır ve biyomedikal alanlardaki uygulamaları Çizelge 1.4'te özetlenmiştir. Bilinen ilk biyosürfektanlardan olan surfaktinin pek çok farmakolojik uygulamalarda kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu uygulamalardan bazıları fibrin pıhtısının önlenmesi, hemoliz, antitümör, antiviral ve antifungal aktivite, iyon kanalları formasyonu ve gastrik ülserle karşı koruma olarak sayılabilir. Bazı lipopeptit yapıdaki biyosürfektanlar granülosit-makrofaj kolonilerinin oluşumunu stimüle eden faktörleri arttırmaktadır. Glikolipid yapıdaki bileşiklerin enfeksiyon bölgesine ilaç taşınımını kolaylaştırdığı da belirtilmektedir<sup>(76,77)</sup>. Biyosürfektanların, lökositlerde HIV virüsünün gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir<sup>(119)</sup>. Haferburg ve arkadaşları, %12'lik ramnolipid emülsiyonunun *Nicotiana glutinosa* yapraklarını enfekte eden tütün mozaik virüsünün gelişimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir<sup>(120)</sup>.

Biyosürfektanların antimikrobiyal ve antifungal özellikleri de çoğu araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. *Bacillus subtilis*'in sentezlediği siklik lipopeptit (surfaktin veya subtilisin), *Bacillus brevis*'in sentezlediği siklosimetrik dekapeptit olan gramisidin S ve *Bacillus polymyxa*'nın sentezlediği polimiksin biyosürfektanlarının antibiyotik özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir<sup>(121,122)</sup>. *Pseudomonas aeruginosa AT10*' dan elde edilen ramnolipidin; *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Alcaligenes faecalis* (32 mg/mL), *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* (16 mg/mL) ve *Staphylococcus epidermidis* (8 mg/ mL) bakterilerine karşı mükemmel

antimikrobiyal özellik sergilediği, *Aspergillus niger* (16 mg/mL), *Chaetium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans* (32 mg/mL) funguslarına ayrıca *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani* (18 mg/mL) bitki patojenlerine karşı inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir<sup>(122)</sup>.

**Çizelge 1.4.** Biyosürefektanlar ve biyomedikal uygulamaları

Mikroorganizma	Biyosürefektan	Aktivite/Uygulamalar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnoflipid	- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivite
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfaktin	-Antimikrobiyal ve antifungal aktivite -Hemolitik aktivite -Antitümör aktivite
<i>Bacillus subtilis</i>	İturin	-Antimikrobiyal ve antifungal aktivite -Hücre membranında iletkenlik artışı
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenisin	-Antibakteriyel aktivite -Hücre zarı bütünlüğünde bozulma
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalose lipid	-HSV ve influenza virusüne karşı antiviral aktivite
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Glikolipid	-Mayalarda yüzeye bağlanmada azalma
<i>Lactobacillus</i>	Surlaktin	-Enterik bakterilerde yüzeye bağlanmada azalma
<i>Bacillus pumilus</i>	Pumilasidin	-HSV'ye karşı antiviral aktivite

Sophorolipidler ve ramnolipidlerin bitki ve tohum patojeni funguslara karşı etkili antifungal ajanlar olduğu ifade edilmiştir ve 200 mg/L ramnolipid ile 500 mg/L sophorolipidin *Phytophthora* sp.'nin miselyum gelişimini % 80 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir<sup>(123)</sup>. Ramnolipidler, bakteriyel membran lipopolisakaritlerinin yıkımına sebep olarak membran bütünlüğünü bozmakta ve bu fonksiyonu ile antibiyotik özelliği göstermektedir. Bu avantajlardan faydalanılarak antibiyotik tedavilerinde gerekli görülen dozların azaltılması mümkündür<sup>(124,125)</sup>.

### 1.1.12.3. Gıda Teknolojisi Uygulamaları

Biyosürefektanlar gıda endüstrisinde özellikle emulsifiyer, köpürtme, ıslatma ve çözücü, antiadhesiv and antimikrobiyal ajanlar olarak yararlı özellikler sergilemektedirler<sup>(76,77)</sup>. Biyosürefektanlar, gıda endüstrisinde gıda katkı maddesi olarak birçok uygulamalara sahiptir. Lesitin ve türevleri, gliserol, sorbitol içeren yağ asidi esterleri veya son zamanlarda sentezle birleştirilen oligopeptit içeren monogliseridlerin etilen glikol ve etil oksitlenmiş türevleri dünya genelinde emulsifiyer olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunlar kıvam ve yoğunluk ayarlamalarında veya değişik fazların dağıtımında çoğunlukla tercih edilmektedir. Ayrıca fırıncılık ve et ürünlerinde, kısmen parçalanmış yağların emülsifikasyonunda kullanılmaktadırlar<sup>(122)</sup>. *Candida utilis* tarafından üretilen biyosürefektan yeni ve potansiyel emulsifiyer olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır<sup>(126)</sup>. Bu tür biyosürefektanların yağ damlalarının bir araya toplanmasının kontrolü, havalandırılmış sistemleri stabilize etme, sıvıların kıvamını ayarlama, nişasta içeren ürünlerin raf ömrünü uzatma, yağlı ürünlerin kıvamını ve yoğunluğunu düzenleme gibi işlevleri vardır<sup>(127)</sup>. Ramnolipid ilavesiyle hamur stabilitesinde, kıvamında,

hacminde ve unlu mamüllerin korunmasında bir gelişme elde edilmiştir<sup>(128)</sup>. Fırıncılıkta ve dondurma yapımında biyosürefektanlar kıvamı ayarlama, bayatlamayı geciktirmede ve tat vermek için katılan yağların çözünürlüğünde etkilidirler. Hatta yağ stabilizatörü ve yağların sıçramalarını engelleyici ajan olarak da kullanılmaktadır<sup>(129)</sup>.

#### **1.1.12.4. Kozmetik Sanayi Uygulamaları**

Biyosürefektanlar kozmetik sanayinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yüze aktif özellikteki biyosürefektanlar cilt bakım ürünlerinde ve şampuanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır<sup>(125)</sup>. Biyosürefektanlar nemlendirici ve cilde uygunluk gibi özelliklerinden dolayı kişisel bakım ürünlerinde de yerini almaktadır<sup>(76)</sup>. 1 mol sophorolipid ve 12 mol propilen glikol içeren ürünler yüksek biyoyoumluluk ve nemlendirici özelliği sergilemektedirler<sup>(92)</sup>.

#### **1.1.12.5. Tarım Uygulamaları**

Biyosürefektanlar tarımsal alanlarda gübre ve pestisitlerin eşit dağılımında, hidrokarbon yapıdaki organik kimyasalların çözünmesinde ve topraktaki ağır metallerin hidrofilizasyonunda kullanılmaktadır. Bu uygulamalar yanında endüstriyel kirliliğin ve pestisitlerin giderilmesinde de kullanılmaktadır. Poliaromatik hidrokarbonlar, trikloretilen, dioksin gibi endüstriyel kirleticiler; kerosen, dizel, benzen gibi rafineri atıklar; kadmiyum, kurşun gibi ağır metaller ve çok çeşitli pestisitler biyosürefektanlar ile tarımsal alanlardan rahatlıkla uzaklaştırılabilmektedir.

Ayrıca biyosüpfektanlar, bitki korumada, toprağın geliştirilmesinde, hayvanlarda yavrulamada ve gübrelemede de sıkça kullanılmaktadır<sup>(63,64)</sup>.

#### **1.1.12.6. Diğer Uygulama Alanları**

Farklı moleküler yapıları ve yüzey özellikleri sayesinde biyosüpfektanlar çok farklı alanlarda ve farklı şekillerde kullanılmaktadır. Madencilik alanında inorganik minerallerin dispersiyonunda, kömürün işlenmesinde, kireçtaşı flokülasyonunda; kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, inşaat sektörü, boya, deri ve metal endüstrilerinde de biyosüpfektan kullanımına rastlanmaktadır. *Macrocystis pyrifera* ve *Azotobacter vinelandii* tarafından sentezlenen D-mannuronik asit ve D-glukuronik asit içeren heteropolisakkaritler seramik endüstrisinde dispersan olarak kullanılmaktadır<sup>(64, 130)</sup>.

#### **1.1.13. Biyosüpfektanların Ticari Üretimi**

Son yıllarda biyosüpfektanların ticari olarak üretimi yoğun olarak çalışılmaktadır. Üretimi, özellikleri ve türleri ile ilgili birçok veri bulunmaktadır fakat öncelikli hedef büyük ölçekte üretmek ve geri kazanmaktır. Her mikrobiyal metabolitin üretim ekonomisi başlangıçtaki ham madde maliyeti, uygun kullanım ve iyileştirme prosedürü ve sentezleyen mikroorganizmaların üretme verimi olmak üzere üç temel faktörle yönetilmektedir. Böylece biyosüpfektan üretimi ile ilgili ekonomik kısıtlamalar ışığında, üç temel stratejinin üretim maliyetini daha ucuz hale getirdiği kabul edilmiştir. Atık substratları kullanarak maliyeti düşürmek, maksimum ürün ve etkili iyileştirme yapabilmesi için uygun kültür koşullarını içeren

biyoprosesleri geliştirmek, verimi arttırmak için mutant ve rekombinant bakterileri fazlaca üretmek biyosürefektan verimini arttıran faktörlerdir<sup>(131)</sup>. Üretim maliyetini azaltmak için ürün verimini ve üretim hızını arttırmak, ekonomik yöntemler geliştirmek, mikroorganizmaların gelişmesi ve sürefektan üretimi için ucuz, yenilenebilir kaynaklar kullanmak gibi farklı yollar araştırılmaktadır. Ucuz ham madde seçeneği, kapsamlı ekonomik işlemlerde oldukça önemlidir. Ham madde miktarı ve cinsi üretim maliyetini büyük ölçüde etkilemektedir. Ham maddelerin biyoteknolojik proseslerde %10–30 oranında toplam üretim maliyetinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Bitkisel yağlar, yağ fabrikası atıkları, melas, hayvansal yağlar, petrol atıkları, kızartma yağları ve süt endüstrisi atık suları çeşitli ucuz ham maddeler olup mikroorganizmaların gelişmesi ve biyosürefektan üretiminde büyük bir potansiyele sahiptir<sup>(16,131)</sup>.

Literatürde çok farklı ham madde seçenekleri ile biyosürefektan üretimi rapor edilmektedir. Bednarski ve arkadaşları, zeytinyağı fabrikası atık suyu ile zenginleştirilmiş besi ortamlarında *Candida apicola* ve *Candida antarctica* ile glikolipid yapıda biyosürefektan madde üretimini çalışmışlardır<sup>(132)</sup>. Deshpande ve Danieli, besiyerinde karbon kaynağı olarak hayvansal yağların kullanılması ile *Candida bombicola*'dan sophorolipid biyosürefektan madde üretimini (12 g/L) rapor etmişlerdir<sup>(133)</sup>. Hayvansal ve bitkisel yağlar ile nişastaca zengin posalar ve melas kullanılarak biyosürefektan eldesi de çoğu araştırıcı tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde ise bu konuda yapılan çalışmalar sınırlıdır. Sıdal ve arkadaşları, zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile biyosürefektan üretimini çalışmışlardır<sup>(134)</sup>. Bu araştırıcılar biyosürefektan üretimi üzerine çeşitli parametrelerin (pH, zaman, karbon ve azot kaynağı) etkisini incelemişler ve maksimum biyosürefektan üretimini 0.875 g/l olarak rapor etmişlerdir. Melas, hayvansal ve

bitkisel yağlar, nişastaca zengin posalar gibi karbon kaynakları besleyici özelliğe ve ekonomik değere sahip olduklarından çeşitli endüstri kollarında değerlendirilebilmektedirler.

Organik kirleticiler içeren endüstriyel veya kentsel atıkların biyosüpfektan üretimi için substrat olarak kullanılması hem ülke ekonomisine hem de çevre kirliliğinin giderimine önemli katkılar sağlayacaktır ve iki kat kazanç elde edilecektir. Bu yolla hem atıkların işlenmesi ve iyileştirilmesi hem de değerli bir ürün olan biyosüpfektan üretimi sağlanmış olacaktır. Bu yaklaşım atık suların işleme maliyetini azaltmakta ve biyosüpfektan üretimi sayesinde olası bir kazanç oluşturmaktadır<sup>(129)</sup>.

## **1.2.Çalışmanın Amacı**

Bu çalışmada, rafineri atık sulardan izole edilen farklı mikroorganizmalar ile biyosüpfektan eldesi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Biyosüpfektanlar çoğu mikroorganizma tarafından üretilerek ortamdaki hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak çalışma devamında izole edilen mikroorganizmalar ile hidrokarbon yapıdaki petrol ve türevlerini içeren rafineri atığının biyolojik olarak arıtılması araştırılmıştır. Bu amaçla atık su ile izolatlar etkileştirilerek hidrokarbon degradasyonu incelenmiştir.

Literatürde ticari besiyerleri, çeşitli besleyici özelliği olan yağlar ve şeker pancarı atıkları kullanılarak biyosüpfektan eldesi rapor edilmektedir. Bu çalışmada biyosüpfektan eldesi için rafineri atık suyu temel besiyeri olarak kullanılmıştır. Bu yolla hem sucul ortamın arıtılması hemde biyosüpfektan madde üretimi



gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen biyosürefektanların yapısal ve fonksiyonel özellikleri de incelenmiştir. FTIR analizi, karbonhidrat, protein ve lipid testleri ile biyosürefektanların yapısı; hemoliz testi, emülsiyon indeksi, antimikrobiyal aktivite, yüzey gerilimi ve ağır metal tutma kapasitesi çalışmaları ile fonksiyonel özellikleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında biyosürefektan madde üretiminde optimum koşullar (pH etkisi, NaNO<sub>3</sub> konsantrasyonu, karbon kaynağı etkisi, EDTA varlığı) araştırılmış ve belirlenen bu koşullar ile rafineri atık suyu modifiye edilmiştir. Biyosürefektan üretiminde optimum koşulların araştırılması ile üretim veriminin artırılması amaçlanmış, temel besiyeri olarak rafineri atık sularınının kullanılması ile de sistem maliyetinin azaltılması hedeflenmiştir. Bu yolla düşük maliyetle yüksek verim elde edilmiş olacaktır.

Biyosürefektan üretimi ve karakterizasyonu çalışmaları sonrasında, izolatlar ile hidrokarbon degradasyonu araştırılmıştır. Kızılırmak Nehri aktığı hat boyunca rafineri atıksu deşarjlarına maruz kaldığı için çeşitli PAH türevlerini içermektedir. Bu nedenle ilk olarak Kızılırmak üzerinde Kırıkkale Rafineri Endüstrisi atığı ile kontamine olmuş istasyonlardan alınan su örnekleri PAH içeriği bakımından analiz edilmiştir. Daha sonra atık su örnekleri biyosürefektan üretimi için optimum koşullarla modifiye edilmiş ve izolatlarla etkileştirilerek belirli zaman aralıklarda alınan örneklerde hidrokarbon degradasyonu araştırılmış ve izolatların degradasyon etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Petrol degradasyonunun analitik olarak doğrulanmasının tespiti GC analizleri ile takip edilmiştir. Degradasyon süresince biyosürefektan üretimi de takip edilmiş ve degradasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Ülkemizde biyosüpfektan üretimi konusunda yapılan çalışmalar biyosüpfektanın üretimi ile sınırlı kalmış ve ticarileştirme boyutuna ulaşılammıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların ticarileştirilme potansiyeli bulunmaktadır ve bu yolla süpfektan maddelerinin ticari alınımı konusunda Türkiye'nin yurt dışına bağımlılığının azaltılacağı düşüncesindeyiz. Bu yolla çalışmada elde edilen biyosüpfektanlar malzeme, teknoloji veya teoride mevcuda göre iyileştirme veya ilerleme yönünden önemli katkılarda bulunacaktır.

Ortamdan petrol hidrokarbonlarının bakteriler yoluyla uzaklaştırılmasının o ortamın doğal bakterileri ile yapılması biyolojik iyileştirmeyi kolaylaştıran ve hızlandıran bir metottur. Bu yüzden sucul ekosistemlerden izole edilen bakterilerin ülkemizdeki olası biyolojik iyileştirme çalışmalarında kullanılmak üzere tanımlanması önem taşımaktadır. Bakteriler ile petrol hidrokarbonları gibi bazı kirleticilerin giderilmesinde biyodegradasyon gibi doğal mekanizmaların kullanılması ile potansiyel sekonder kirliliklerin önüne geçileceği düşüncesindeyiz.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, Kızılırmak üzerinde Kırıkkale Rafineri Endüstrisi atığı ile kontamine olmuş istasyonlardan alınan su örneklerinden izole edilmiştir. Örnekler steril şişeler içerisinde laboratuvar ortamına getirilmiştir. Su örneklerinden alınan 0.1 ml örnek, Nutrient agar besiyerine aktarılmış ve 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Nüve ES 110). İnkübasyon sonrasında gelişimi gözlenen mikroorganizmalar ile tek koloni oluşana dek çizgi ekimleri gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerlerinde gelişen bakterilerin koloni morfolojisi, gram boyama özelliği, oksidaz testi ve pigment durumları incelenerek, identifikasyonları BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System kitleri ve Analitik Profil İndeks (API) kitleri ile VITEK 2 cihazı (Biomerieux) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm izolatların stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Tüm ekim ve pasajlama işlemleri steril kabinde (Holten Laminair Model 1,2) gerçekleştirilmiştir.

### 2.2. Mikroorganizmaların Üretilmesi

Mikroorganizma üretimi için Zhang ve arkadaşları, tarafından önerilen Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanılmıştır<sup>(67,73)</sup>. Mineral Salt Medium bileşenleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. MSM besiyerinin pH'ı 6.8 olarak ayarlanmış (Hanna Ins.) ve 121°C'de 1 atm basınç altında 30 dakika otoklavda (Nüve OT 020) steril edilerek kullanılmıştır.

**Çizelge 2.1.** MSM besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	Miktar (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	4.0
NaCl	1.0
KCl	1.0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3.0
MgSO <sub>4</sub>	0.2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.001
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.008
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.75
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.08
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.075
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05

### 2.3. Ekim ve Kültürasyon

Daha önce hazırlanan stok kültürleri kullanılarak mikroorganizmalar steril MSM kültürlerine aktarılmıştır. Bu amaçla tüm izolatlardan Mc Farland 2 (%1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinden 9.8 ml + %1'lik BaCl<sub>2</sub> çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklıkta steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ilave edilerek homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan MSM besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon,

35°C’de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde ( Heidolph Ins., Unimax 1010) gerçekleştirilmiştir.

#### **2.4. Kültürlerde Biosürefektan Varlığının Saptanması**

Mikroorganizma kültürlerinde biosürefektan üretiminin belirlenmesi için Bodour ve arkadaşlarının rapor ettiği “drop collapse” yöntemi kullanılmıştır<sup>(135)</sup>. Bu yöntem için 96 kuyucuğa (microwell plate) sahip bir platform kullanılmıştır. Kültürler 10000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiş (Eppendorf Ins.) santrifüjleme sonrasında süpernant Millipore Filtrasyon sistemi (Sigma Chem.) ile filtre edilmiştir. Elde edilen son filtrat biosürefektan varlığı için test sıvısı, steril su ve ekim yapılmamış besiyeri ise kontrol sıvısı olarak kullanılmıştır. Drop collapse yöntemi için ilk olarak kuyucuklar 7 µl mineral yağ ile kaplanmıştır ve bir gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Test ve kontrol sıvılarından alınan 25µl’lik örnekler 45°C’lik açı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma yada stabil kalma durumları gözlenerek biosürefektan varlığı değerlendirilmiştir.

#### **2.5. Kültürlerde Biosürefektan Miktarının Ölçülmesi**

Kültürlerde biosürefektan miktarı, Zhang ve arkadaşlarının önerdiği fenol sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir<sup>(67,73)</sup>. İlk olarak kültürler 10000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernantlar Millipor seti ile filtre edilmiştir. Filtratlarda biosürefektan miktarının tayini için 1.0 ml örnek, 1.0 ml fenol (%5) ve 3.0 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%98) vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır.

Oluşan renkli (sarı-turuncu) bileşik spektrofotometrik olarak 480nm’de ölçülmüştür. Biyosürefektan madde miktarının belirlenmesinde standart L-Ramnoz çözeltileri (0.1-1.0g/L) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

## **2.6. Optimizasyon Çalışmaları**

Maksimum biyosürefektan üretimi elde edebilmek için çeşitli sistem parametrelerinin biyosürefektan üretimi üzerine etkisi incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. İzolatlar ile en uygun biyosürefektan üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla, pH, karbon kaynağı etkisi, azot kaynağı etkisi ve EDTA etkisi gibi parametreler incelenmiştir.

### **2.6.1. Biyosürefektan Üretimi Üzerine pH Etkisi**

Biyosürefektan üretimi üzerine pH etkisini belirlemek için MSM besiyerinin pH’ı 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir izolat MSM besiyerlerine inoküle edilerek 35°C’de 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pH etkisi, biyosürefektan miktarının ölçülmesi ile belirlenmiştir.

### **2.6.2. Biyosürefektan Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi**

Biyosürefektan üretiminde, bakteriyel kültür içerisinde kullanılan karbon kaynakları hidrokarbonlar, karbonhidratlar ve bitkisel yağlar olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır. Biyosürefektan üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi glukoz, mannitol, naftalen, mineral yağ, parafin, ksilen, kerosen ve toluen kaynakları ile test edilmiştir. Bu amaçla temel besiyerine ilgili karbon kaynağı %1 (w/v, v/v) oranında

ilave edilmiştir. 35°C’de 10 gün süre ile inkübasyon sonrasında karbon kaynaklarının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi, farklı karbon kaynağı içeren kültürlerde biyosülfektan miktarının ölçümü ile belirlenmiştir.

### **2.6.3. Biyosülfektan Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi**

Ramnolipid üretiminde rol oynayan azot kaynağı türleri Ramana ve Karanth’a göre belirlenmiştir<sup>(136)</sup>. Buna göre azot kaynağı olarak sıvı besi yerlerine %0.1 (w/v) oranında  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$  ilave edilmiştir. Maksimum biyosülfektan üretiminin sağlandığı azot kaynağı ile 0.1-4.0g/L aralığında konsantrasyon taraması yapılmıştır.

### **2.6.4. Biyosülfektan Üretimi Üzerine EDTA Etkisi**

Metal iyonlarını yapısında tutan ve hücre geçirgenliğini etkilediği düşünülen EDTA ajanının biyosülfektan üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla, besi ortamına 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.2 g/L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda EDTA eklenmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir izolata ait kültür ortamında biyosülfektan miktarı ölçülerek EDTA etkisi belirlenmiştir.

## **2.7. Rafineri Atığından Biyosülfektan Eldesi**

Rafineri atığından biyosülfektan eldesi için, Kırıkkale rafineri sanayiden temin edilen rafineri atık su örneği temel besiyeri olarak kullanılmıştır. Rafineri atık suyu ilk olarak Millipor Filtrasyon sistemi ile steril edilmiş ve daha önceki aşamalarda belirlenen optimum biyosülfektan üretim koşulları ile modifiye edilmiştir.

Mikroorganizmalar, 35°C'de 10 gün süre ile rafineri atık suyu içeren besiyerinde inkübe edilmiş, kültürlerde biyosülfektan miktar tayini fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Kültür ortamından biyosülfektanın izolasyonu için, kültürler 10000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve biyosülfektan presipitasyonu için santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant, 5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çözelti pH'ı 2.0 noktasına ulaşılan dek asidifiye edilmiştir. Karışım 24 saat süre ile +4°C'de bekletilmiş ve oluşan çökelti kloroform/metanol (1:1, v/v) karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Evaporatör ile çözücünün ortamdan uzaklaştırılması sağlanarak, elde edilen ekstraktlar oda sıcaklığında kurutulmuş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

## **2.8. Biyosülfektan Karakterizasyonu**

İzolatlar tarafından üretilen biyosülfektanlarının yapısı ve özellikleri çeşitli testlerle aydınlatılmaya çalışılmıştır. FTIR analizi ve protein, karbonhidrat, lipid testleri ile biyosülfektanların yapısı; yüzey gerilimi, emülsiyon testi, antimikrobiyal ve hemoliz aktivite testleri, ağır metal giderim çalışmaları ile biyosülfektanların özellikleri incelenmiştir. Bu yolla çalışmamızda elde ettiğimiz biyosülfektanların yapısı ve potansiyel kullanım alanları da açıklık kazanmış olacaktır.

### **2.8.1. FTIR Analizi**

İzolatlar tarafından üretilen biyosülfektanların yapısını aydınlatmaya yönelik uygulanan ilk test FTIR analizidir. FTIR analizi ile biyosülfektan yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kuru biyosülfektan



örnekleri (1.0mg), KBr (0.1g) ile karıştırılarak pellet hale getirilmiş ve FTIR spektrumları alınmıştır. FTIR spektrumları 400-4000 dalga boyu aralığında Perkin Elmer Paragon 1000 cihazı ile elde edilmiştir.

### **2.8.2. Karbonhidrat, Protein ve Lipid Analizleri**

Biyosürefektanların yapısındaki karbonhidrat analizi molish testleri<sup>(137)</sup>, total protein analizi biüret ve ninhidrin testleri<sup>(138)</sup>, total lipid analizi ise fosfovanilin yöntemi<sup>(139)</sup> ile belirlenmiştir.

### **2.8.3. Yüzey Gerilimi**

Biyosürefektanın yüzey gerilimi üzerine etkisini belirlemek üzere kültürlerden elde edilen süpernatant sıvılarının yüzey gerilimi K6 tensiyometre (Krüss GmbH, Hamburg, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol sıvısı olarak ekimi yapılmamış besiyeri ve su kullanılmıştır. Her uygulamanın üç paraleli de aynı şekilde sürdürülmüş ve ortalama değerler alınmıştır.

### **2.8.4. Emülsiyon Testi**

Emülsifiyer ajan olarak kabul edilen biyosürefektanın emülsiyon indeksinin ( $E_{24}$ ) belirlenmesi için 2.0 ml süpernatant ve 3.0 ml mineral yağ, kerosen, naftalen, parafin, heksadekan, gliserol, toluen ve ksilen bir vorteks yardımıyla 2 dakika süre ile karıştırılmıştır. 24 saat bekletilen çözeltinin toplam yüksekliği ve emülsiyon tabakasının yüksekliği belirlenerek Eşitlik 1'den biyosürefektanın emülsiyon indeksi

hesaplanmıştır. Her uygulamanın üç paraleli aynı şekilde yapılarak ortalama değerler alınmıştır.

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{Emülsiyon tabakasının yüksekliği}}{\text{Çözeltilinin toplam yüksekliği}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.8.5. Antimikrobiyal Aktivite

Biyosürefektanlar bakteriyel membran bütünlüğünü bozarak antimikrobiyal aktivite sergilemektedirler<sup>(125)</sup>. İzolatlara ait biyosürefektanların antibakteriyel aktiviteleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen (*Escherichia coli* DM, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Klebsiella pneumonia* FMC 5) mikroorganizma suşları ile disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir<sup>(140)</sup>. Bakteri ( $10^7$ - $10^8$  adet/ ml) suşları Mueller Hinton Agara homojen bir şekilde aşılınmıştır. Kloroformda çözünen biyosürefektan örnekleri (20 mg/mL) mikropipet ile 6 mm çapındaki boş steril antibiyotik disklere (20 µl/disk) emdirilmiştir. Ekimi yapılan bakteri kültürleri üzerine biyosürefektan emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C' de 1 saat bekletildikten sonra 37±0.1 °C de 18-24±2 saat süre ile inkübe edilmiştir<sup>(141,142)</sup>. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir.

Biyosürefektanların antifungal aktiviteleri *Candida albicans* FMC 17 ve *Candida krusei* (ATCC 6258) maya türleri ile *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* bitki patojenlerine karşı test edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla maya suşları ( $0.5$ - $2.5 \times 10^6$  adet/ml) Sabouraud

Dextrose Agara homojen bir şekilde aşılanmıştır. Ekimi yapılan maya kültürleri üzerine biyosümfektan emdirilmiş (20 mg/mL, 20 µl/disk) diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4 °C’ de 1 saat bekletildikten sonra 25±0.1 °C de 24-37 saat süre ile inkübe edilmiştir<sup>(141,142)</sup>. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir.

Antifungal çalışma kapsamında biyosümfektanların *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium*’un misel gelişimlerine karşı etkileri Potato Dekstroz Agar ortamında belirlenmiştir. Bu amaçla kloroform içerisinde çözünen ve Milipor sisteminden filtre edilen biyosümfektan örnekleri Potato Dekstroz Agar ortamına (%5) ilave edilmiştir. Kontrol grupları ise biyosümfektan ilave edilmemiş besiyerlerinde test edilmiştir. Daha önce hazırlanan 7 günlük *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* kültürlerin dış yüzeyinden 5 mm genişliğinde kesilen diskler her petri kutusuna ayrı ayrı ters çevrilerek yerleştirilmiş ve 28°C’de 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Misel gelişimleri koloni çapı ölçülerek belirlenmiş ve misel inhibisyonu yüzde olarak hesaplanmıştır<sup>(143)</sup>. Her uygulamanın üç paraleli de aynı şekilde sürdürülmüş ve ortalama değerler alınmıştır.

#### **2.8.6. Hemolitik Aktivite**

Hemolitik aktivite testi için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından temin edilen kan örnekleri (10mL) her bir izolata ait biyosümfektan (25 µg/mL) ile 37°C’de 12 saat süre ile etkileştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında kan örnekleri 1000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantta hemoglobin analizi Heco cihazı ile belirlenmiştir.

### **2.8.7. Ağır Metal Giderimi**

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektan maddeler ağır metal kontaminasyonunun giderilmesinde de önemli bir role sahiptir<sup>(76,144)</sup>. Mikroorganizmalardan elde edilen biyosümfektanların ağır metal tutma kapasitesi farklı ağır metal çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılan civa, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve çinko gibi metaller (60 mg/L) ile biyosümfektan madde (1g/L) beş saat süre ile etkileştirilmiştir. Her bir süspansiyon orbital karıştırıcıda (Nuve SL 350) 200 rpm'de karıştırılmış ve süre sonunda örnekler 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant 0,45 m filtre kağıdından filtre edilmiştir. Filtrat biyosümfektan tarafından tutuklanan metal miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Her bir ağır metal ile 20-60 mg/L derişimlerinde çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Etkileşim öncesi ve sonrasında çözeltideki civa, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve çinko metal derişimleri Atomik Adsorpsiyon Spektrofotometre (ATI Unicam 929 AAS) kullanılarak belirlenmiştir. Bu yolla çalışmamızda saflaştırılan biyosümfektanın ağır metal kirliliğinin giderilmesindeki performansı test edilmiştir.

### **2.9. Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması**

Optimum koşullarla modifiye edilmiş rafineri atık suyu ve her bir izolata ait hücre kültürünün 10 gün 35°C'de etkileştirilmesi ile degredasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde biyosümfektan üretimi ve hidrokarbon degredasyonu araştırılmıştır. Kültürde biyosümfektan üretimi daha önce belirtilen fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Hidrokarbon

degradasyonu ise gaz kromatografisi ile incelenmiştir. Bu amaçla su örneklerindeki PAH bileşiklerinin ekstraksiyonu sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle yapılmıştır. Su örneklerinin ekstraksiyonu için ayırma hunileri kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrar edilmiş ve her bir ekstraksiyon sonucu elde edilen fazlar birleştirilmiştir. Ekstraktlar ilk olarak evaporatörde 15 mL'ye azaltılmış, daha sonra buharlaştırma hunilerinde alınarak su banyosu içerisinde hacmi 2 mL'ye düşürülmüştür. Bu yolla hazırlanan ekstraktlar gaz kromatografisine (GC) enjekte edilmiştir<sup>(145)</sup>. Hidrokarbon degradasyonu, DB-1 (J&W Scientific, CA) kapiler kolon ve alev iyonizasyon detektörüne sahip Hitachi G-3500C 2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Su örneklerinin analizinde referans örnek olarak hekzan kullanılmıştır. Kromatogram sonucunda iç standart piki görülerek geri alım verimi de hesaplanmıştır. Geri alım verimleri de göz önünde bulundurularak atık su örneklerinde PAH konsantrasyonu Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$D = \frac{H \times C \times V \times 1000}{H_s \times V_{enj} \times M \times R} \quad (2)$$

Eşitlikte; D: atık su örneklerinde PAH konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/L}$ ), H: uygulanan örneklerin pik alanını, V: toplam hacmi (L), C: enjekte edilen standart miktarını ( $\mu\text{g}$ ), R: geri alım verimi, M: ekstrakte edilen örnek miktarını (L),  $H_s$ :standarta ait pik alanını,  $V_{enj}$ :enjekte edilen örnek hacmini ( $\mu\text{L}$ ) ifade etmektedir. PAH ve türevlerinin GC analiz koşulları Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.2.** PAH ve türevlerinin analizinde kullanılan GC koşulları

Kolon	DB-1 CA kapiler kolon
Dedektör	Alev İyonizasyon Detektör
Taşıyıcı Gaz	Azot, 1 mL/dak
Analiz Süresi	70 dak.
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Fırın Sıcaklığı	40° C (1 dak.) 4°C/dak.-200°C(10 dak.)

### **2.10. İstatistiksel Analiz**

Çalışmalarda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde SPSS (Version,11.0) paket programı kullanılmıştır. Aritmetik ortalamalar,  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Yüzey gerilimindeki değişimlerin anlamlı olup olmadığını belirlemek için pearson korelasyon testleri kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Kırıkkale Rafineri Endüstrisi atığı ile kontamine olmuş istasyonlardan alınan su örneklerinden dört farklı koloni tipi ayırt edilmiştir. Kolonilerden alınan örneklerden saflaşana dek çizgi ekimler yapılmış ve elde edilen izolatların biyokimyasal, koloni ve gram boyama özellikleri incelenmiştir. Bu veriler kullanılarak tam identifikasyon VITEK 2 cihazı ile API kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İdentifikasyon sonrasında izolatlar *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmıştır. Dört izolata ait biyokimyasal ve morfolojik özellikler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Tüm izolatların stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1.** İzole edilen mikroorganizmalar ve biyokimyasal özellikleri

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Hücre morfolojisi	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Gram	-	-	-	-
Reaksiyon				
Oksidaz	+	+	+	+
42°C’de üreme	+	-	-	+/-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	+/-
İndol	-	-	-	-

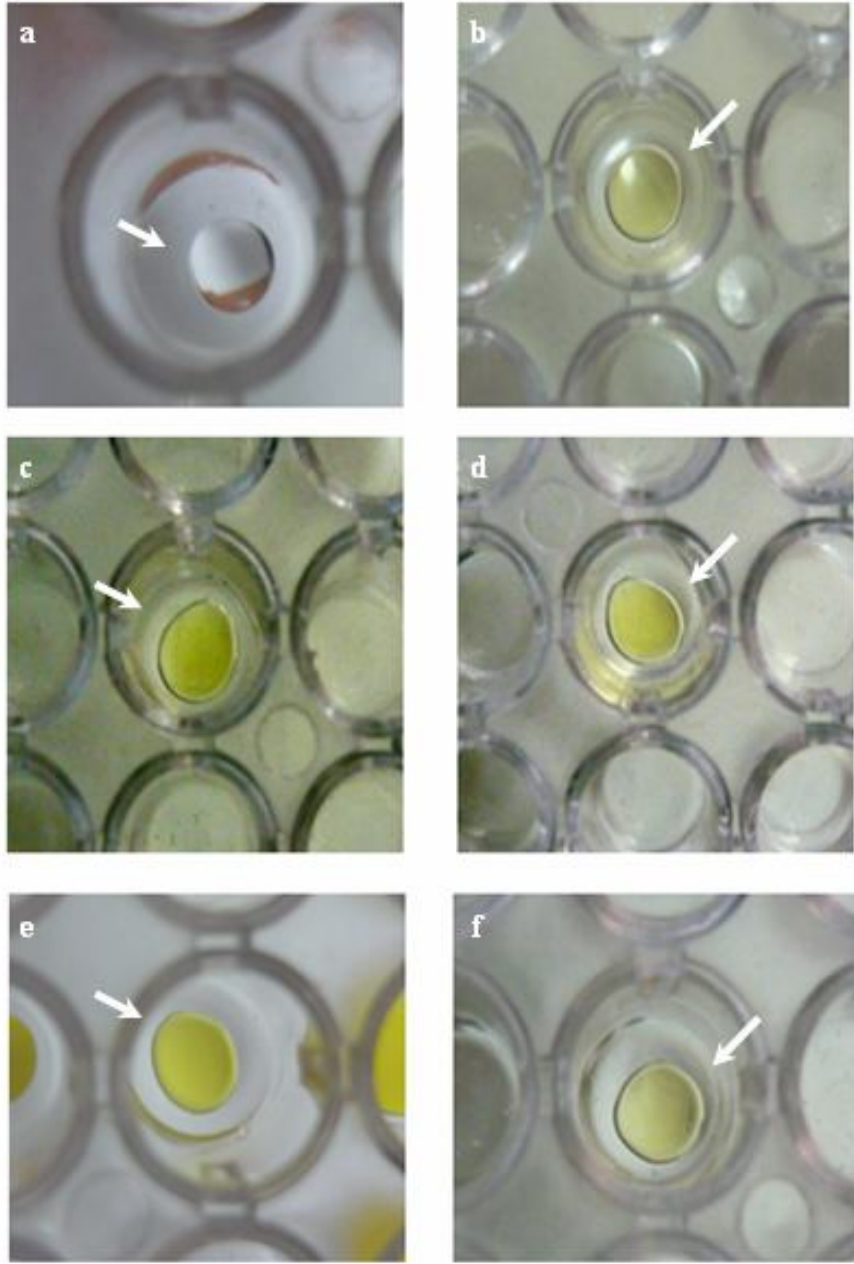
### 3.2. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Varlığının Saptanması

Mikroorganizmalar tarafından ùretilen biyosùrfektan varlığının saptanması için MSM besiyerinde ùretilmiř *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* kùltùrleri 20 dakika sùre ile 10000 rpm'de santrifùjlenmiřtir. Elde edilen supernatantlar, su ve ekim yapılmamış besiyeri òrnekleri mineral yağ ile kaplanmış microwell plate içerisindeki kuyucuklara enjekte edilmiştir. Su ve ekim yapılmamış besiyeri òrneklerinin sabit kaldığı ve yayılmadığı, izolatlara ait kùltür òrneklerinde ise kuyucuklardaki damlaların yayıldığı ve genişlediği gözlenmiştir (şekil 3.1). İzolatlar tarafından biyosùrfektan ùretiminin saptanması sonrasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* tarafından ùretilen biyosùrfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV olarak kodlanmıştır.

### 3.3. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Miktarının Òlçùlmesi

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* mikroorganizmaları tarafından biyosùrfektan ùretiminin saptanması sonrasında kùltùrlerdeki biyosùrfektan miktarı belirlenmiştir. Temel MSM besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* mikroorganizmaları tarafından ùretilen biyosùrfektan miktarı sırası ile 843, 623, 741 ve 559 mg/L bulunmuştur. Bu verilerden en yùksek biyosùrfektan ùretiminin *Pseudomonas aeruginosa* ile en dùřùk ùretim ise *Burkholderia cepacia* ile elde edildiği belirlenmiştir.





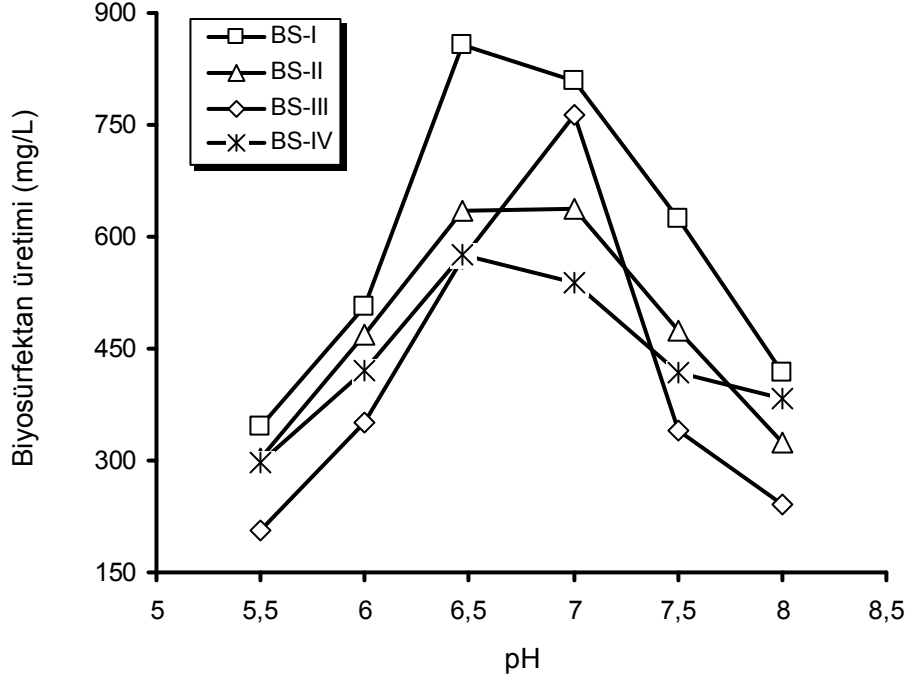
**Şekil 3.1.** Kontrol sıvıları ve biyosürfektan içeren sıvıların microwell plate kuyucuklarında dağılımı (a: su; b: ekim yapılmamış besiyeri; c: *Pseudomonas aeruginosa* kültürü d: *Pseudomonas putida* kültürü; e: *Pseudomonas fluorescens* kültürü; f: *Burkholderia cepacia* kültürü

### 3.4. Optimizasyon Çalışmaları

Rafineri atık suları ile biyosülfektan üretimine geçmeden önce biyosülfektan üretiminde yüksek performans elde edebilmek için pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve EDTA varlığının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve biyosülfektan üretiminde optimum koşullar belirlenmiştir. Biyosülfektan üretiminde optimum koşulların araştırılması ile tek seferde yüksek üretim kapasitesinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

#### 3.4.1. Biyosülfektan Üretimi Üzerine pH Etkisi

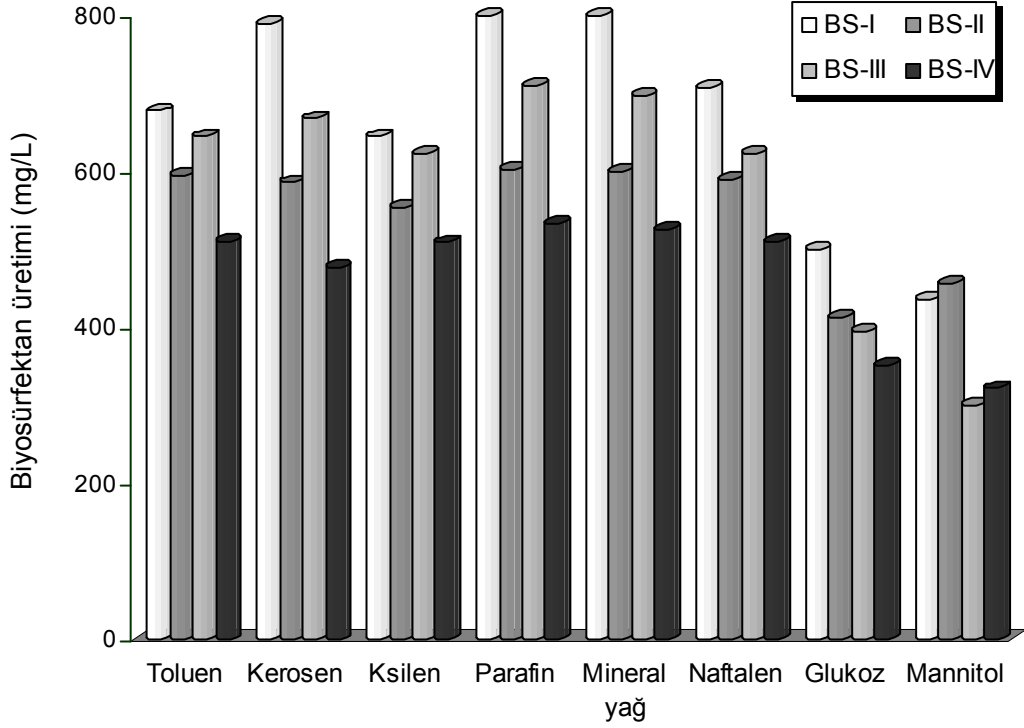
Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları için besin ortamının pH'ı önemli bir parametredir. Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH 'sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yaklaştıkça üreme azalır ve durur. Bakterilerin optimal pH limitleri oldukça değişiktir. Her mikroorganizma belirli bir pH aralığında optimum gelişme ve ürün sentezi göstermektedir. Tüm izolatlar için biyosülfektan üretimi üzerine pH etkisi 5.5-8.0 aralığında incelenmiştir ve bütün izolatların 5.5-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük biyosülfektan üretimi gösterdiği, pH 6.5-7.0 aralığında ise yüksek biyosülfektan üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* için en yüksek biyosülfektan üretimi pH 6.5'te sırası ile 856 ve 575 mg/L olarak gözlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* için ise maksimum biyosülfektan üretiminin pH 7.0'de sırası ile 638 ve 764 mg/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu sonuçlardan izolatların nötral ve nötrale yakın pH değerlerini tercih ettikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Biosürfektan üretimi üzerine pH etkisi

### 3.4.2. Biosürfektan Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi

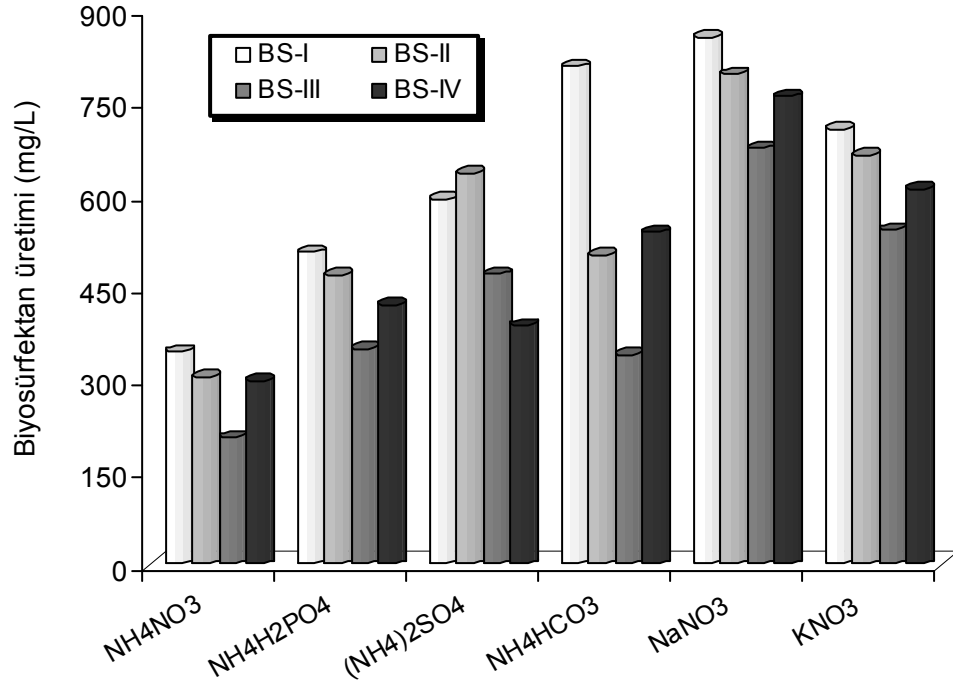
Biosürfektan üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi glukoz, mannitol, naftalen, mineral yağ, parafin, ksilen, kerosen ve toluen kaynakları ile test edilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* için kültürlerde biosürfektan üretiminin mineralyağ>naftalen>parafin>toluen>kerosen>ksilen>mannitol>glukoz şeklinde bir sıralama izlediği gözlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* için en yüksek üretim mineral yağ içeren besiyerinde 819 mg/L olarak, en düşük ise glukoz ve mannitol içeren besiyerlerinde sırası ile 504 ve 435 mg/L olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatlarının en yüksek biosürfektan üretimini parafin içeren besiyerinde, en düşük üretimi ise mannitol içeren besiyerinde gerçekleştirdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Farklı karbon kaynaklarının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi

### 3.4.3. Biyosülfektan Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi

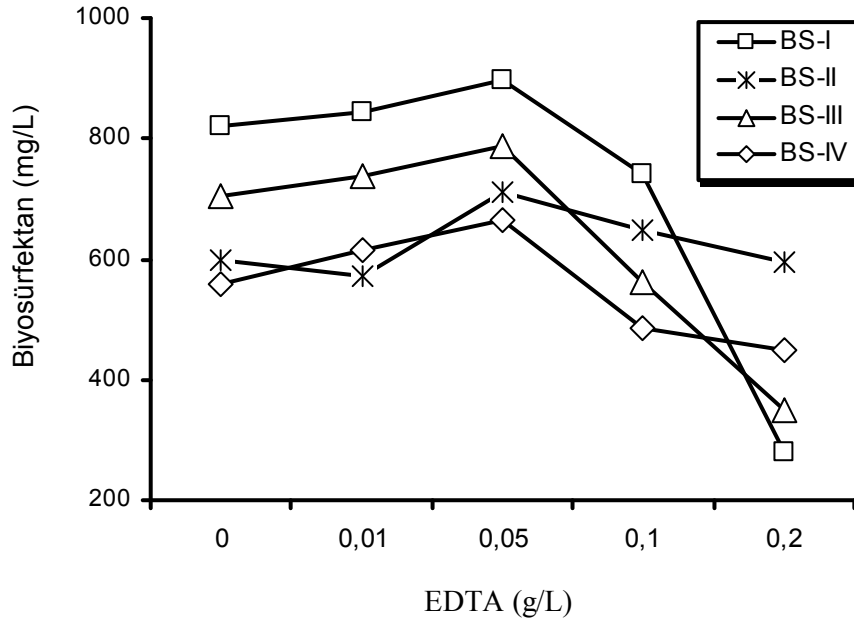
Azot kaynağının biyosülfektan üretimi üzerine etkisini belirlemek için temel besiyeri bileşimine  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$  azot kaynakları ilave edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları için diğer azot kaynaklarına kıyasla  $\text{NaNO}_3$  içeren besiyerinde biyosülfektan üretimi açısından daha yüksek verim elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Optimum azot kaynağı konsantrasyonunu tespit etmek için farklı oranlarda (0.1-4.0g/L)  $\text{NaNO}_3$  besiyerine ilave edilmiş ve en iyi sonuç 1g/L' lik derişimde bulunmuştur.



Şekil 3.4. Farklı azot kaynaklarının biyosümfektan üretimi üzerine etkisi

#### 3.4.4 Biyosümfektan Üretimi Üzerine EDTA Etkisi

Hücre duvarı geçirgenliğini arttırdığı düşünülen EDTA ajanının biyosümfektan üretimi üzerine etkisi Şekil 3.5'te verilmiştir. 0.01-0.05 g/L aralığındaki düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığının biyosümfektan üretimini artırdığı, 0.1 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarında ise bakteri gelişiminin ve buna bağlı olarak biyosümfektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Test edilen konsantrasyonlarda en yüksek biyosümfektan üretimi 0.05g/L EDTA konsantrasyonunda gözlenmiştir ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* için sırası ile 897, 711, 789 ve 664 mg/L olarak bulunmuştur.



Şekil 3.5. Biosurfektan üretimi üzerine EDTA etkisi

### 3.5. Rafineri Atığından Biosurfektan Eldesi

Biosurfektan üretiminin optimum olduğu sistem parametrelerinin (pH, karbon kaynağı, azot kaynağı gibi) belirlenmesi sonrasında, rafineri atık su örnekleri temel besiyeri olarak biosurfektan üretiminde kullanılmıştır. İlk olarak rafineri atık suyu içerik bakımından incelenmiş ve veriler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Rafineri atık su içeriği

Parametre	Miktar
Al	0.89 ppm
Fe	11.7 ppm
Mn	0.4 ppm
Pb	0.03 ppm
Zn	1.67 ppm
Cu	0.02 ppm
TPH*	152 mg/L
pH	9.2

\*TPH:Toplam Poliaromatik Hidrokarbon

Elde edilen veriler sonrasında rafineri atık su pH'sı optimizasyon çalışmalarında her bir izolata ait elde edilen optimum pH'a göre ayarlanmıştır. Ayrıca atık su örneklerine 0.05g/L EDTA ve 1.0 g/L NaNO<sub>3</sub> ilave edilmiş, rafineri atık suyunda hidrokarbon yapıda bileşiklerin saptanması ile karbon kaynağı olarak herhangi bir ilave yapılmamıştır. Mikroorganizmalar, 35°C'de 10 gün süre ile rafineri atık suyu içeren besiyerinde inkübe edilmiş ve kloroform/metanol ekstraksiyonu sonrasında biyosümfektan katı halde elde edilmiştir. Mikroorganizmalar tarafından temel MSM besiyerinde üretilen biyosümfektan miktarına kıyasla rafineri atık su içeren besiyerinde BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV üretim miktarının sırası ile 1.28, 1.44, 1.42 ve 1.61 kat azaldığı belirlenmiştir.

### **3.6. Biyosümfektan Karakterizasyonu**

İzolalar tarafından üretilen BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosümfektanlarının yapısı FTIR analizi ve protein, lipid, karbonhidrat testleri ile, özellikleri ise yüzey gerilimi, emülsiyon testi, ağır metal giderimi, antimikrobiyal ve hemoliz aktivite testleri ile aydınlatılmıştır.

#### **3.6.1. FTIR Analizi**

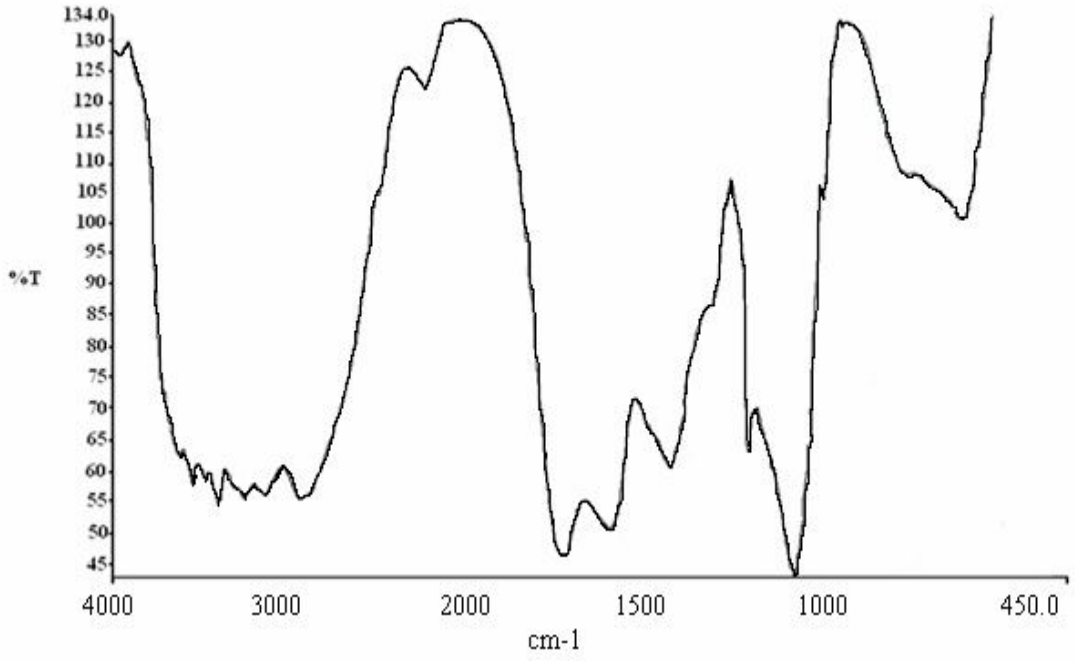
İzolalara ait biyosümfektanların karakterizasyon çalışmalarında BS-I biyosümfektanına ait FTIR spektrumunda gözlenen 1645 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler -C=O bağlarını, 3400cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler -OH bağlarını, 3000 cm<sup>-1</sup> civarında görülen sık titreşimler ise -CH<sub>2</sub> zincirlerini göstermektedir (Şekil 3.6). BS-II biyosümfektanına ait spektrumda 3200-3500 cm<sup>-1</sup> aralığındaki sık titreşimler -CH<sub>2</sub>

ve –OH gruplarının varlığına işaret etmektedir. Aynı spektrumda –CH<sub>3</sub> alifatik zincirlerden kaynaklı 2960 cm<sup>-1</sup>'de titreşimler ve –C=O bağlarından kaynaklı 1650 cm<sup>-1</sup> de titreşimler de gözlenmiştir (Şekil 3.7). BS-III biyosürefektanına ait spektrumda ise 3401 cm<sup>-1</sup>'de –OH gruplarından, 2966 cm<sup>-1</sup>'de –CH<sub>3</sub> zincirlerden, 1539 cm<sup>-1</sup>'de –C-N bağlarından ve 1659 cm<sup>-1</sup>'de –C=O bağlarından kaynaklanan titreşimler gözlenmiştir (Şekil 3.8) . BS-IV biyosürefektanı ile elde edilen spektrumda 1648 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler –C=O bağlarının, 1537cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler –C-N bağlarının, 3320 cm<sup>-1</sup> civarında görülen sık titreşimler –NH bağlarının ve 2965 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler ise –CH<sub>3</sub> zincirlerinin varlığına işaret etmektedir (Şekil 3.9).

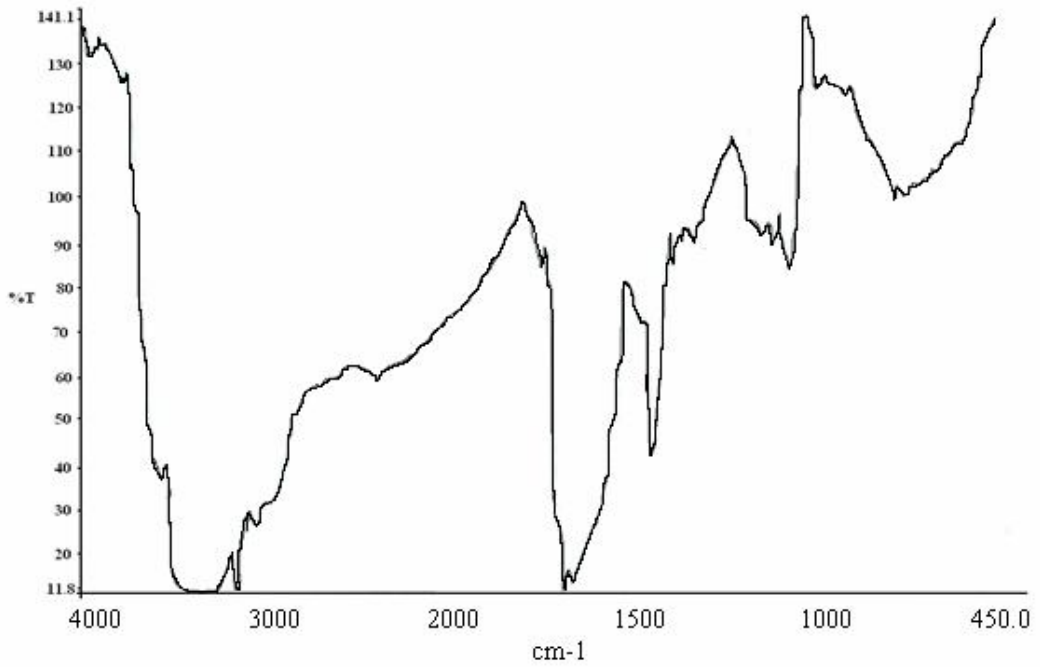
### 3.6.2. Karbonhidrat, Protein ve Lipid Analizleri

Tripeptitler ve proteinler biüret reaktifi ile renk oluşturarak pozitif sonuç vermektedir. Ninhidrin reaksiyonu ise aminoasitlerin amino grubunun ninhidrin ile reaksiyon vererek mavi-mor renkli ürün oluşumu prensibine dayanmaktadır. BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının biüret ve ninhidrin testleri ile negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. BS-IV biyosürefektanının ise biüret reaktifi ile renk oluşturduğu ve ninhidrin reaksiyonu ile pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Molish testi karbonhidratların tayininde kullanılan bir yöntemdir ve bu yöntemle BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının pozitif, BS-IV biyosürefektanının ise negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Fotometrik bir metot olan fosfovanilin yöntemi, lipidlerin fosforik asit ve sülfirik asitli sıcak ortamda vanilin ile pembe renk oluşturma esasına dayanmaktadır ve bu yöntemle BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosürefektanlarının pembe renk oluşturduğu ve pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir.

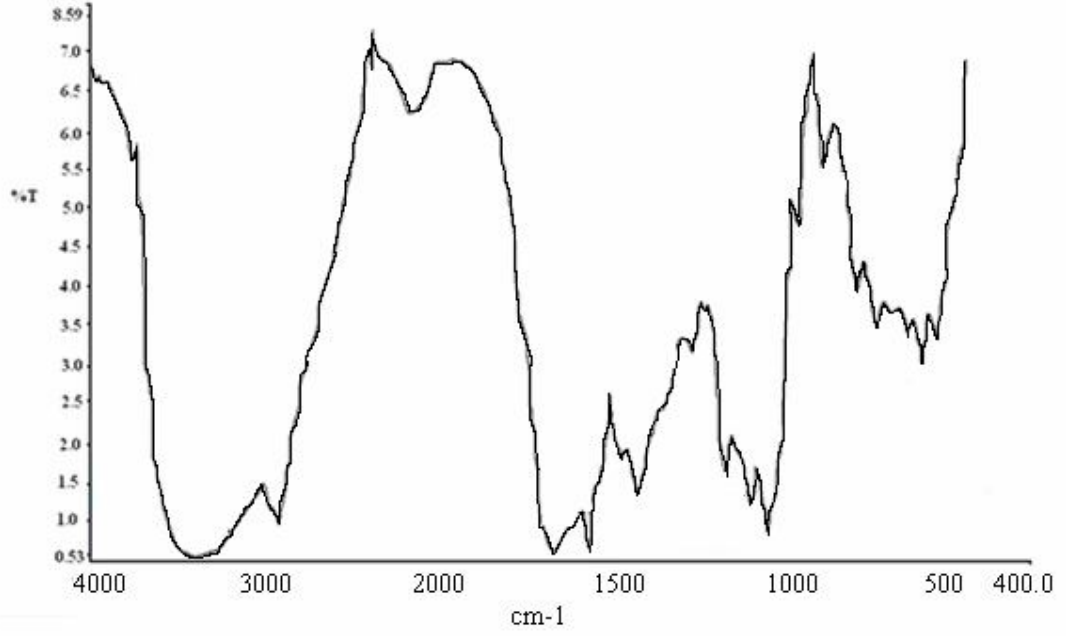




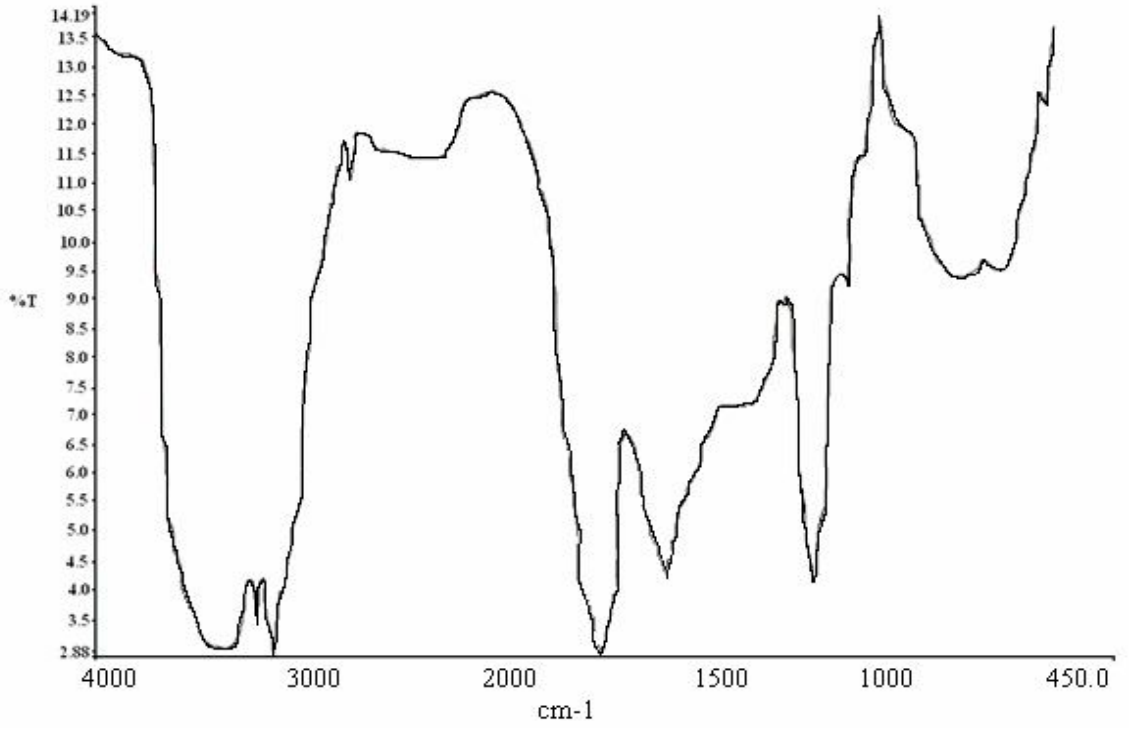
Şekil 3.6. BS-I biosürfektanına ait FTIR spektrumu



Şekil 3.7. BS-II biosürfektanına ait FTIR spektrumu



**Şekil 3.8.** BS-III biosürfektanına ait FTIR spektrumu



**Şekil 3.9.** BS-IV biosürfektanına ait FTIR spektrumu

### 3.6.3. Yüzey Gerilimi

İzolatlara ait kültürlerde yüzey gerilimindeki değişimler incelenmiş ve test edilen tüm kültürlerde yüzey geriliminin ekim yapılmamış besiyerine kıyasla önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Yüzey geriliminde en belirgin azalma *Pseudomonas aeruginosa* kültüründe gözlenirken, en düşük değişim *Pseudomonas fluorescens* kültüründe gözlenmiştir. Tüm izolatlara ait kültürlerde yüzey geriliminde gözlenen azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Çizelge 3.3.** İzolatlara ait kültürlerde yüzey gerilimi

Test sıvısı	Yüzey gerilimi (mN/m <sup>-1</sup> )	Yüzey gerilimini azaltıcı Etki (%)
Su	73.1±0.13	-
Ekim yapılmamış besiyer ortamı	67.3±0.85	-
<i>Pseudomonas putida</i> kültürü	49.2±0.53	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kültürü	35.9±0.24	46
<i>Pseudomonas fluorescens</i> kültürü	51.6±0.79	23
<i>Burkholderia cepacia</i> kültürü	45.7±0.43	32

### 3.6.4. Emülsiyon Testi

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları tarafından üretilen biyosüpfektanların mineral yağ, kerosen, naftalen, toluen, ksilen, gliserol, heksadekan ve parafin hidrokarbonlarına karşı gösterdiği emülsifikasyon özelliği Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Biyosüpfektan ile hidrokarbonların karıştırılması sonrasında ara fazda bir emülsiyon tabakası oluşmaktadır ve bu tabakanın yüksekliği hidrokarbon türüne göre çeşitlik göstermektedir. BS-I, BS-II ve BS-III biyosüpfektanların kısa zincirli

hidrokarbonlara kıyasla uzun zincirli hidrokarbonlara karşı yüksek emülsifikasyon özelliği sergilediği belirlenmiştir. BS-IV biyosüpfektanın emülsifikasyon aktivitesinin ise hidrokarbon yapısı ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir.

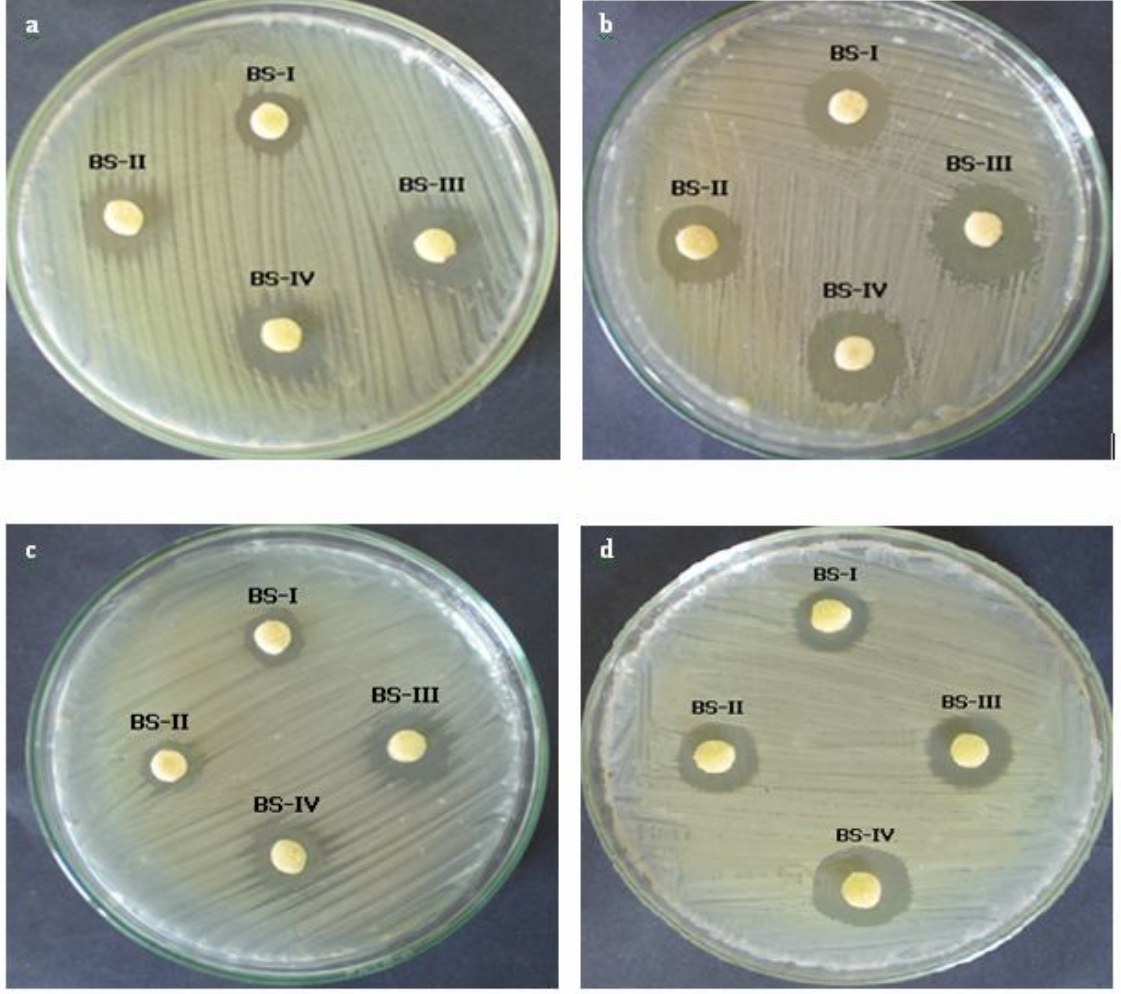
**Çizelge 3.4.** Biyosüpfektanlara ait emülsiyon indeksi

	Emülsiyon indeksi (%)			
	BS-I	BS-II	BS-III	BS-IV
Mineral yağ	69.7±0.32	57.2±0.71	61.0±0.45	55.2±0.81
Kerosen	55.6±0.56	65.4±0.34	59.2±0.39	61.3±0.45
Naftalen	65.4±0.43	62.5±0.88	64.5±0.76	45.6±0.33
Toluen	55.3±0.32	58.9±0.56	45.8±0.51	30.8±0.29
Ksilen	49.1±0.67	53.8±0.79	36.9±0.72	50.4±0.56
Gliserol	37.2±0.51	44.2±0.63	42.6±0.65	44.1±0.68
Hekzadekan	61.4±0.32	51.5±0.31	54.3±0.89	52.7±0.73
Parafin	75.3±0.43	69.3±0.42	70.2±0.61	58.0±0.55

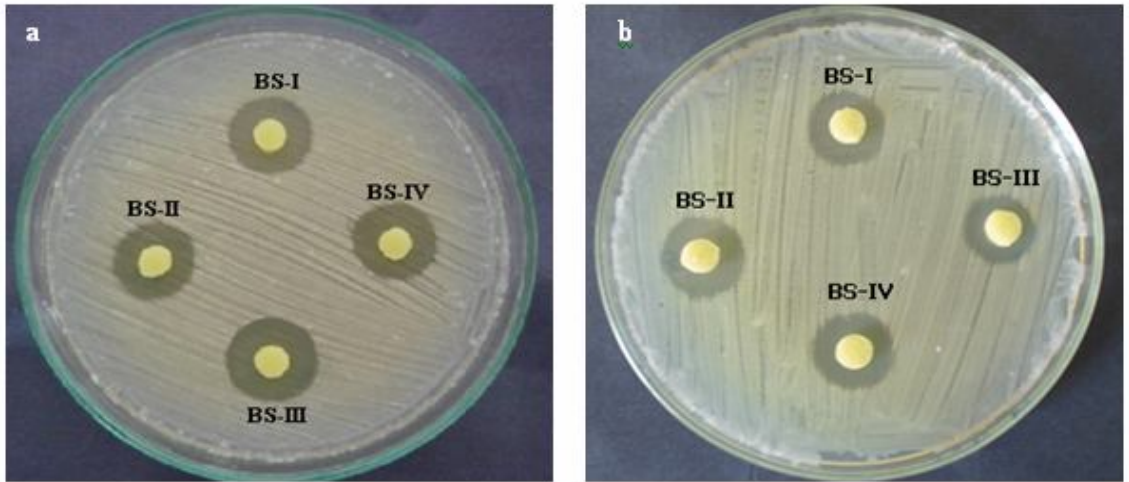
### 3.6.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosüpfektanlarının çalışmada kullandığımız bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları Şekil 3.10.'de verilmiştir. Herbir biyosüpfektan örneğinin test edilen bakteriler üzerine farklı oranlarda inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. BS-I biyosüpfektanının en fazla etkiyi 14 mm'lik inhibisyon zonu ile *E.coli*'ye karşı gösterirken, BS-II biyosüpfektanı 16 mm'lik inhibisyon zonu ile *K. pneumoniae*'e karşı göstermiştir. Test mikroorganizmalarından *K. pneumoniae*'ye karşı en etkili biyosüpfektanın BS-III olduğu gözlenmiştir. BS-IV ise en fazla etkiyi 19 mm'lik inhibisyon zonu ile *E.coli*'ye karşı gösterirken, en düşük etkiyi 12 mm'lik inhibisyon zonu ile *S. aureus*'a karşı göstermiştir (Çizelge 3.5).

Çalışma kapsamında izolatlara ait biyosüpfektanların antifungal etkileri *C.albicans* ve *C. krusei*'ye karşı test edilmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.10.** İzolatlara ait biyosümfektanların antibakteriyel etkileri; a. *P. aeruginosa*, b. *K. pneumoniae*, c. *S.aureus*, d. *E. coli*



**Şekil 3.11.** İzolatlara ait biyosümfektanların a. *C. krusei*, b. *C. albicans* üzerine antifungal etkileri

*C.krusei*'ye karşı BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosüpfektanlarının sırası ile 15, 14, 17 ve ve 14mm'lik inhibisyon zonu meydana getirdiği belirlenmiştir. BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosüpfektanlarının *C.albicans*'a karşı ise sırası ile 13, 14, 12 ve 13mm'lik inhibisyon zonu meydana getirdiği gözlenmiştir. BS-II biyosüpfektanının her iki mantar türüne eşit derecede etki ettiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.5.** İzolatlara ait biyosüpfektanların antimikrobiyal etkinlikleri

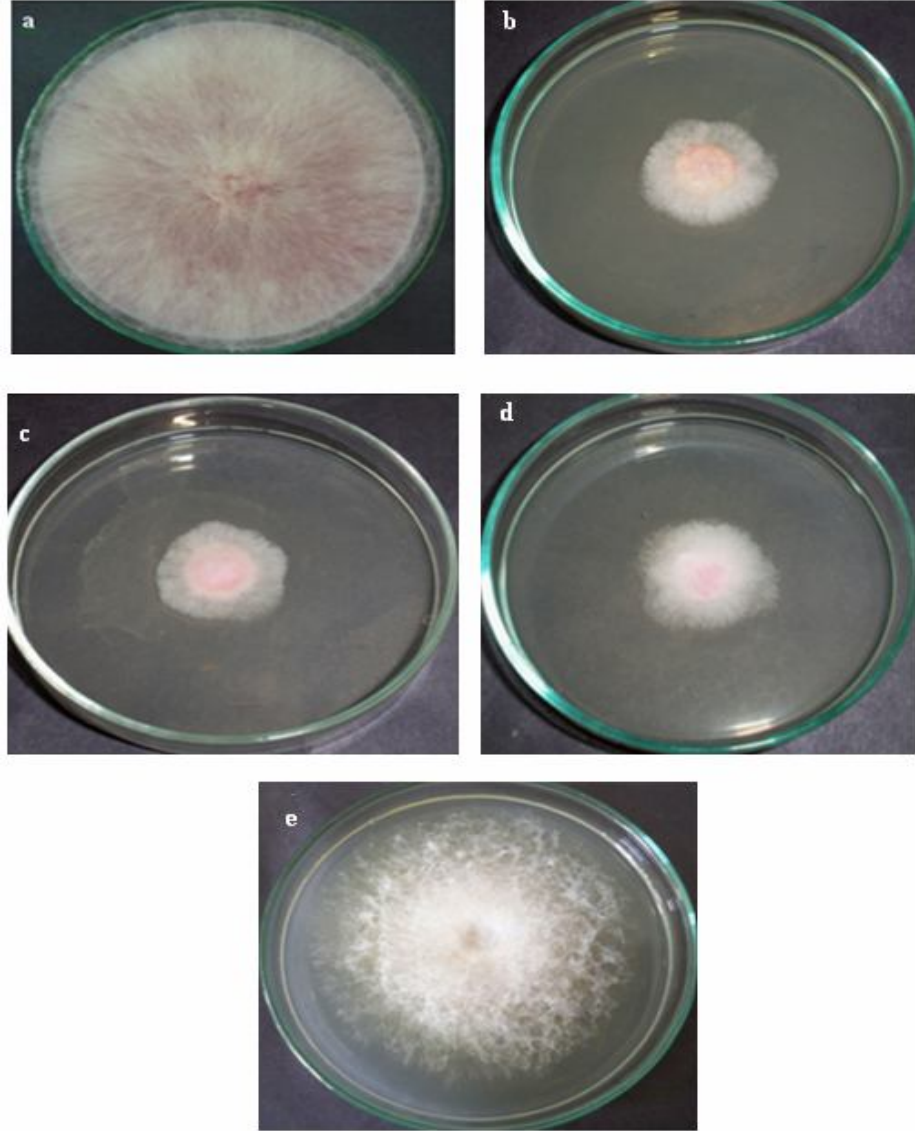
Mikroorganizmalar	İnhibisyon zonu (mm)			
	BS-I	BS-II	BS-III	BS-IV
<i>E. coli</i>	14	15	15	19
<i>P. aeruginosa</i>	12	13	15	14
<i>S. aureus</i>	10	9	15	12
<i>K. pneumoniae</i>	13	16	20	19
<i>C. albicans</i>	13	14	12	13
<i>C. krusei</i>	15	14	17	14

Antifungal çalışmaların devamında biyosüpfektanların küf yapısındaki *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* patojenlerine karşı etkisi de incelenmiştir. İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* bitki patojenleri üzerine antifungal aktivitesi Çizelge 3.6'da verilmiştir. Her bir biyosüpfektan ile misel gelişimi inhibisyonu açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Antifungal çalışma kapsamında, *Fusarium graminearum*'un misel gelişimi biyosüpfektan uygulanan gruplarda kontrole kıyasla önemli derecede inhibe olmuştur. İnkübasyon süresince *Fusarium graminearum*'un BS-IV'e kıyasla BS-I, BS-II ve BS-III biyosüpfektanlarına karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12). BS-I ve BS-II biyosüpfektanları, *Fusarium inflexum*'da misel gelişimini eşit derecede inhibe ederken, en düşük inhibisyon oranını BS-IV

biyosürefektanı göstermiştir (Şekil 3.13). *Fusarium heterosporium* 'un misel gelişimi üzerine en yüksek inhibisyonu BS-I biyosürefektanı ve en düşük inhibisyon oranını BS-III biyosürefektanı göstermiştir (Şekil 3.14). BS-I ve BS-III biyosürefektanlarının varlığında *Fusarium avenaceum* 'un misel gelişiminin sırası ile %50 ve %72 oranında inhibe olduğu, BS-II ve BS-IV biyosürefektanlarına karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15).

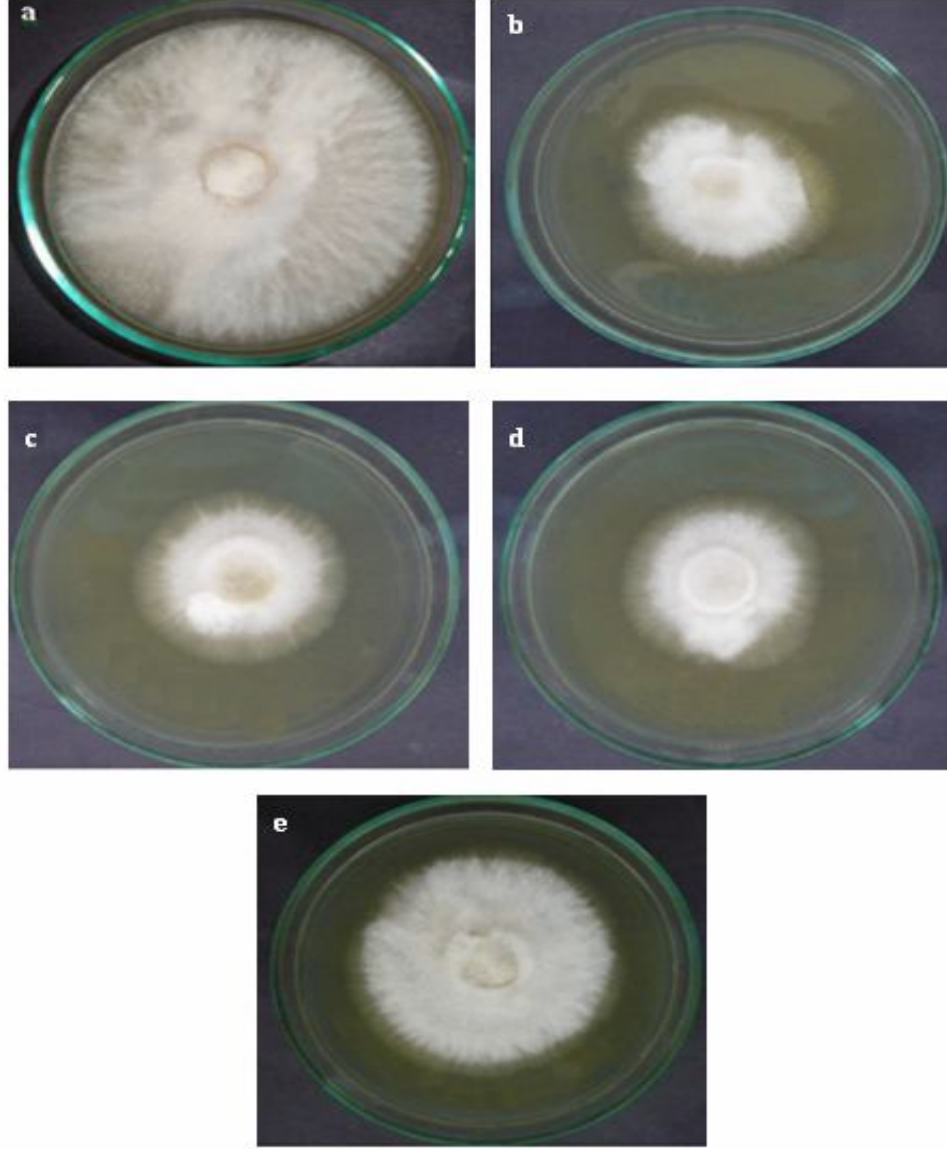
**Çizelge 3.6.** Biyosürefektanların *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* 'un misel gelişimleri üzerine etkileri

Patojenler	İnhibisyon (%)			
	BS-I	BS-II	BS-III	BS-IV
<i>Fusarium graminearum</i>	65	61	66	27
<i>Fusarium avenaceum</i>	50	38	72	33
<i>Fusarium inflexum</i>	52	52	50	28
<i>Fusarium heterosporium</i>	73	66	56	60

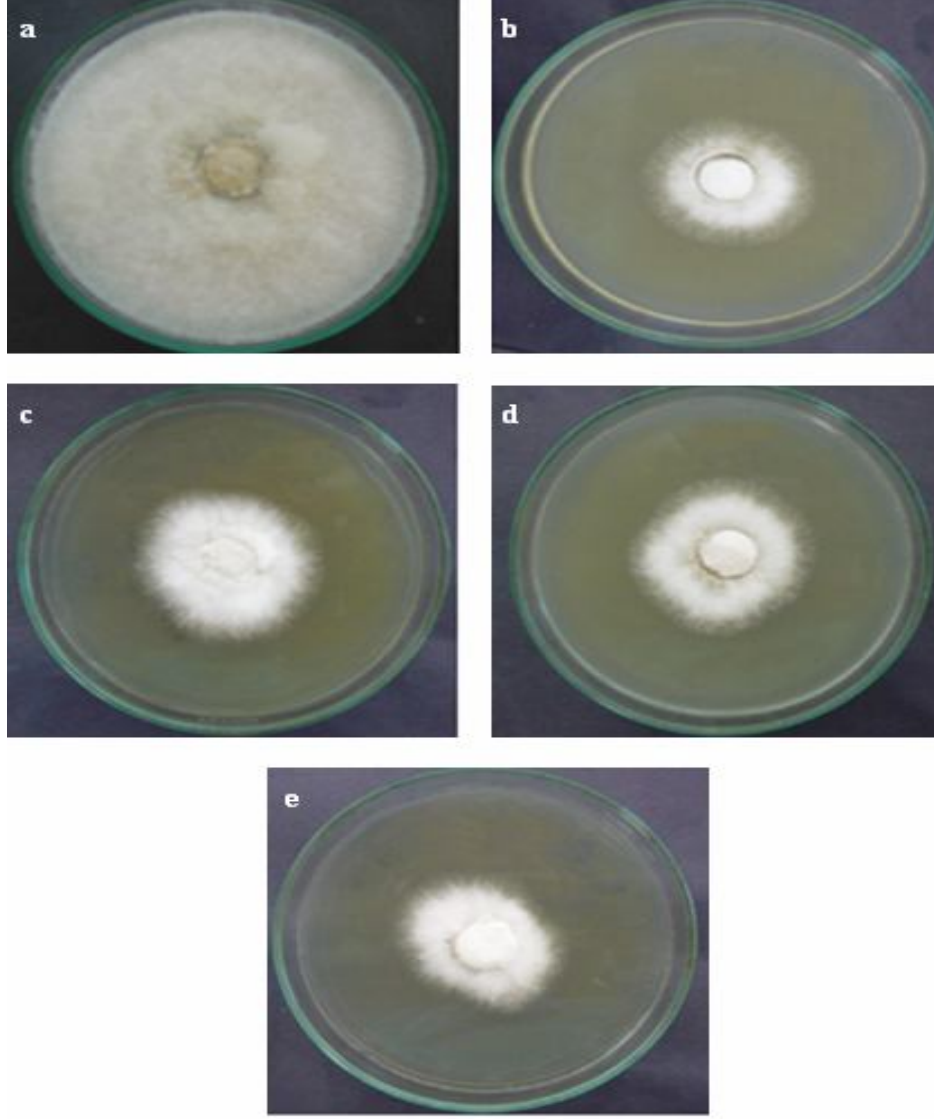


**Şekil 3.12.** İzolatlara ait biyosümfektanların *Fusarium graminearum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a.Kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III, e. BS-IV

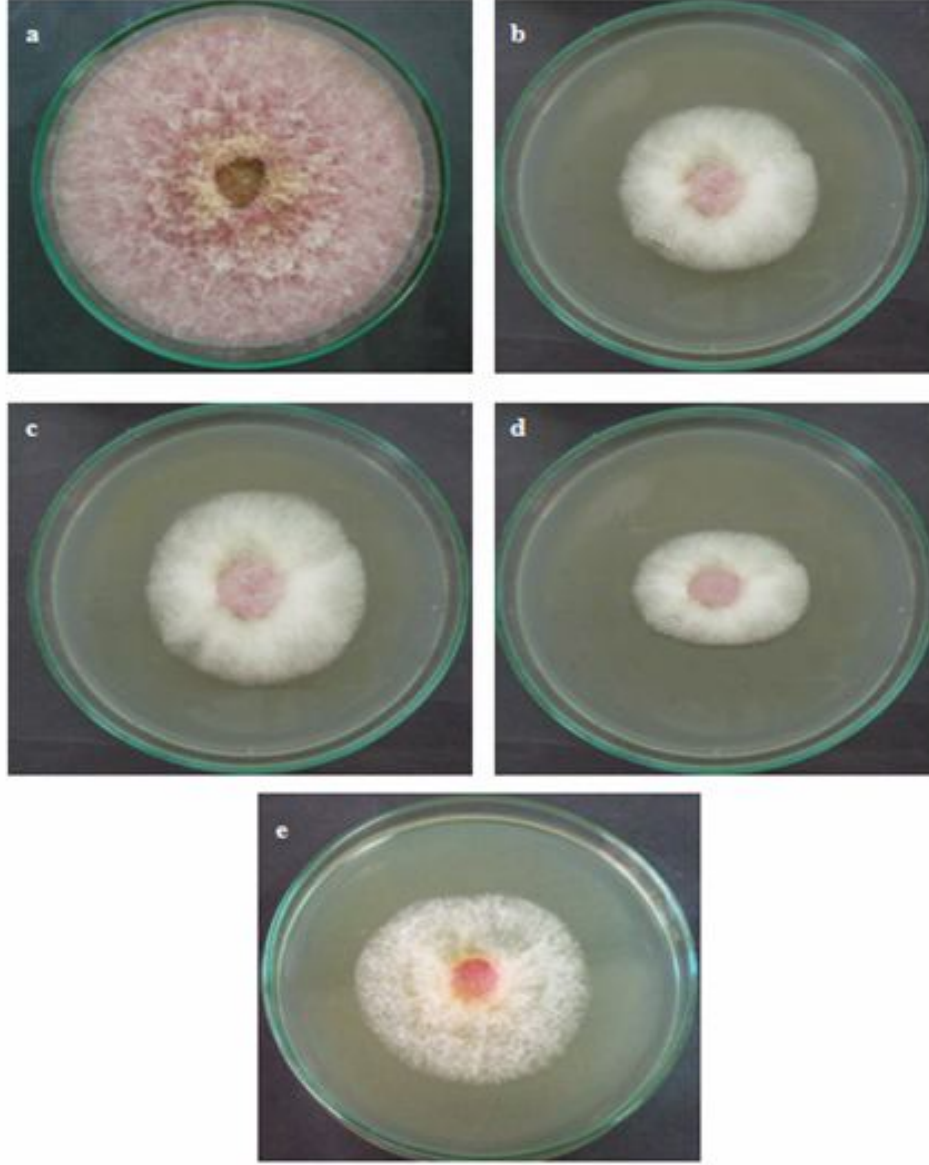




**Şekil 3.13.** İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium inflexum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a.Kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III, e. BS-IV



**Şekil 3.14.** İzolatlara ait biyosümfektanların *Fusarium heterosporium*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a.Kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III, e. BS-IV



**Şekil 3.15.** İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium avenaceum*'un misel gelişimi üzerine etkisi; a.Kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III, e. BS-IV

### 3.6.6. Hemolitik Aktivite

İzolatlara ait biyosürefektanların hemoliz aktiviteleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi biyosürefektanlar yüksek derecede hemolitik aktiviteye sahiptir. Biyosürefektan içermeyen kültürasyon süresince çok düşük miktarda hemoglobinin (0.1g/dL) seruma geçtiği gözlenmiştir. Biyosürefektan içeren kan kültürlerinde ise yüksek derecede hemoliz sonucu hemoglobin moleküllerinin seruma geçtiği belirlenmiştir. En yüksek hemolitik aktivite *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen BS-I biyosürefektanında gözlenmiştir. En düşük hemolitik aktivite ise *Pseudomonas putida* tarafından üretilen BS-III biyosürefektanı ile elde edilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Biyosürefektanların hemolitik aktiviteleri

Uygulama	Hemoglobin(g/dL)
Kontrol	0.1±0.11
BS-I	5.6±0.24
BS-II	3.9±0.16
BS-III	3.5±0.35
BS-IV	5.1±0.24

### 3.6.7. Ağır Metal Giderimi

Biyosürefektanlar ağır metallerin biyoremediasyonunda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla çalışma kapsamında endüstriyel atık sularda sıklıkla bulunan civa(II), kurşun(II), bakır(II), kadmiyum(II), çinko(II) ve demir(III) metallerinin biyosürefektanlarla uzaklaştırılması çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8'de özetlenmiştir. BS-I ve BS-II biyosürefektanları ile en yüksek giderim Cu(II) metal iyonlarında, en düşük giderim ise Hg(II) metal iyonlarında elde

edilmiştir. BS-III biyosümfektanı için Cu(II) metal iyonları ile en yüksek giderim oranına ulaşılırken Fe(III) metal iyonları ile en düşük giderim sağlanmıştır. Diğer biyosümfektanlardan farklı olarak BS-IV biyosümfektanının ağır metal tutma kapasitesi en yüksek Pb(II) iyonlarına karşı gözlenmiş, en düşük ise Hg(II) iyonları ile elde edilmiştir. Tüm biyosümfektanlar birlikte değerlendirildiğinde baskın olarak Cu(II) gideriminde yüksek performans elde edilmiş, Hg(II) giderimi düşük oranlarda sağlanmıştır.

**Çizelge 3.8.** Biyosümfektanlara ait ağır metal giderim oranları

	Giderim oranı (%)					
	Hg(II)	Pb(II)	Cu(II)	Cd(II)	Zn(II)	Fe(III)
BS-I	28.9	52.3	64.0	48.7	33.4	31.5
BS-II	25.6	54.9	65.0	50.2	31.2	29.7
BS-III	31.5	56.7	68.9	53.4	39.8	26.4
BS-IV	23.0	61.2	59.8	49.7	30.9	27.3

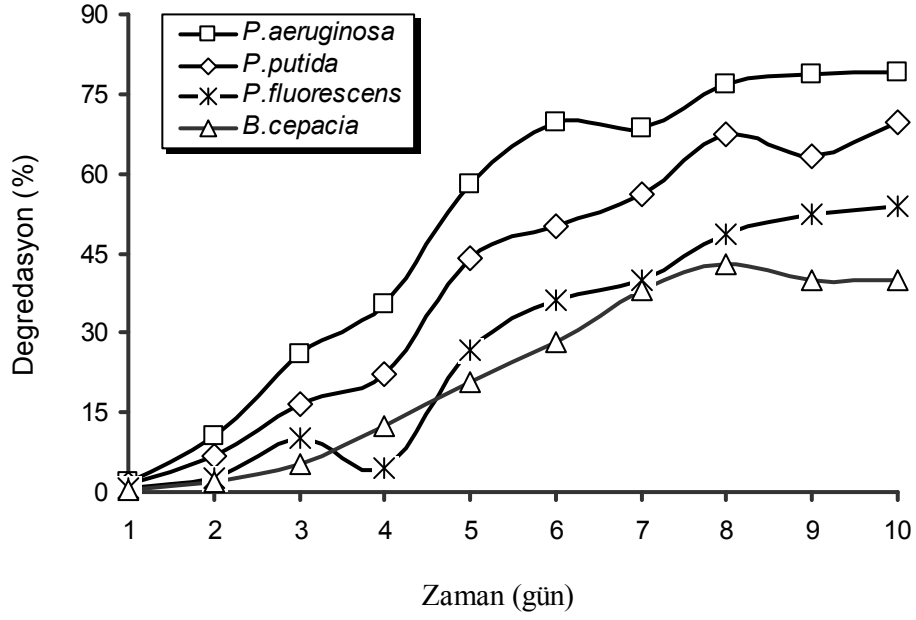
### 3.7. Hidrokarbon Degredasyonu

İzolatlardan biyosümfektan eldesi ve karakterizasyonu çalışmalarının tamamlanması sonrasında tüm izolatlarla hidrokarbon degradasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak rafineri atık su örnekleri Milipor sisteminden geçirilerek steril edilmiştir. Atık su örnekleri hidrokarbon içeriği bakımından analiz edilmiş toplam poliaromatik hidrokarbon (TPH) içeriği 152 mg/L olarak belirlenmiştir. Atık su örnekleri her bir izolat için optimum pH, EDTA ve azot kaynağı ile modifiye edilmiştir. Tüm izolatlarda birinci gün hidrokarbon degradasyonunun oldukça düşük olduğu, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları için sırası ile %1.8, %1.4, %0.9 ve %0.7

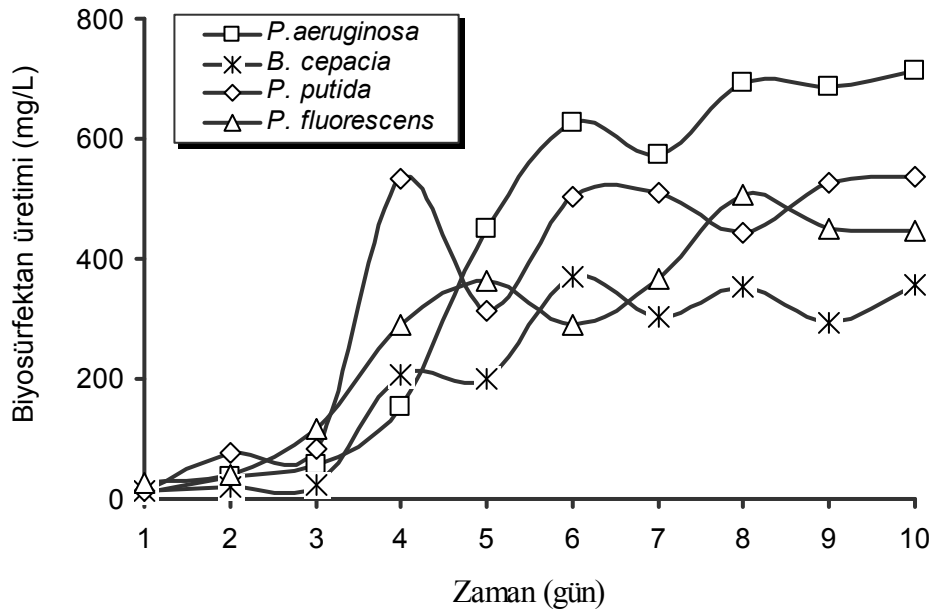
degradasyon oranı saptanmıştır (Şekil 3.16). Aynı gün için kültür ortamında üretilen BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV miktarları ise sırasıyla 28.3, 17.2, 19.3 ve 13.6 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 3.17). Degradasyonun ve biyosürefektan üretiminin kültürasyonun 4. ve 5. güne kadar sabit oranlarda ve düşük seviyelerde devam ettiği belirlenmiştir. Kültürasyonun özellikle beşinci gününde degradasyon oranının önemli bir şekilde arttığı ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* için sırası ile %58.2, %26.2, %44.3 ve %19.18 degradasyon oranına ulaşıldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde izolatların biyosürefektan üretiminde özellikle dördüncü günde önemli bir artış kaydedilmiştir. Bu artışın degradasyon oranına da yansıdığı açıktır ve degradasyon oranında sırası ile 32, 18, 48 ve 27 kat arttığı saptanmıştır. Tüm izolatlar için degradasyon süresi arttıkça degradasyon oranının da arttığı belirlenmiştir. Degradasyon 10 gün süre ile devam ettirilmiş ve %79.2 olarak en yüksek degradasyon oranına *Pseudomonas aeruginosa* ile ulaşılmıştır. Kültürasyon süresi sonunda *Pseudomonas fluorescens* ile %54.0, *Pseudomonas putida* için %69.5 ve *Burkholderia cepacia* ile %40.2 hidrokarbon degradasyon oranlarına ulaşılmıştır. Biyosürefektan üretimi ise onuncu gün sonunda BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV için sırası ile 712, 536, 448 ve 356 mg/L olarak belirlenmiştir.

GC analizleri sonrasında elde edilen kromatogramda pik yoğunluğundaki değişimler hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin degradasyonunu doğrulamaktadır (Şekil 3.18). Kromatogramda izolatların kısa zincirli hidrokarbonların degradasyonunda daha başarılı olduğu görülmektedir. C16-C20 uzunluğundaki hidrokarbonlara ait pik yoğunluğunun degradasyon sonrasında oldukça azaldığı belirlenmiştir. C20-C28 uzunluğundaki hidrokarbonlara ait pik yoğunluğunun ise yaklaşık olarak sabit kaldığı

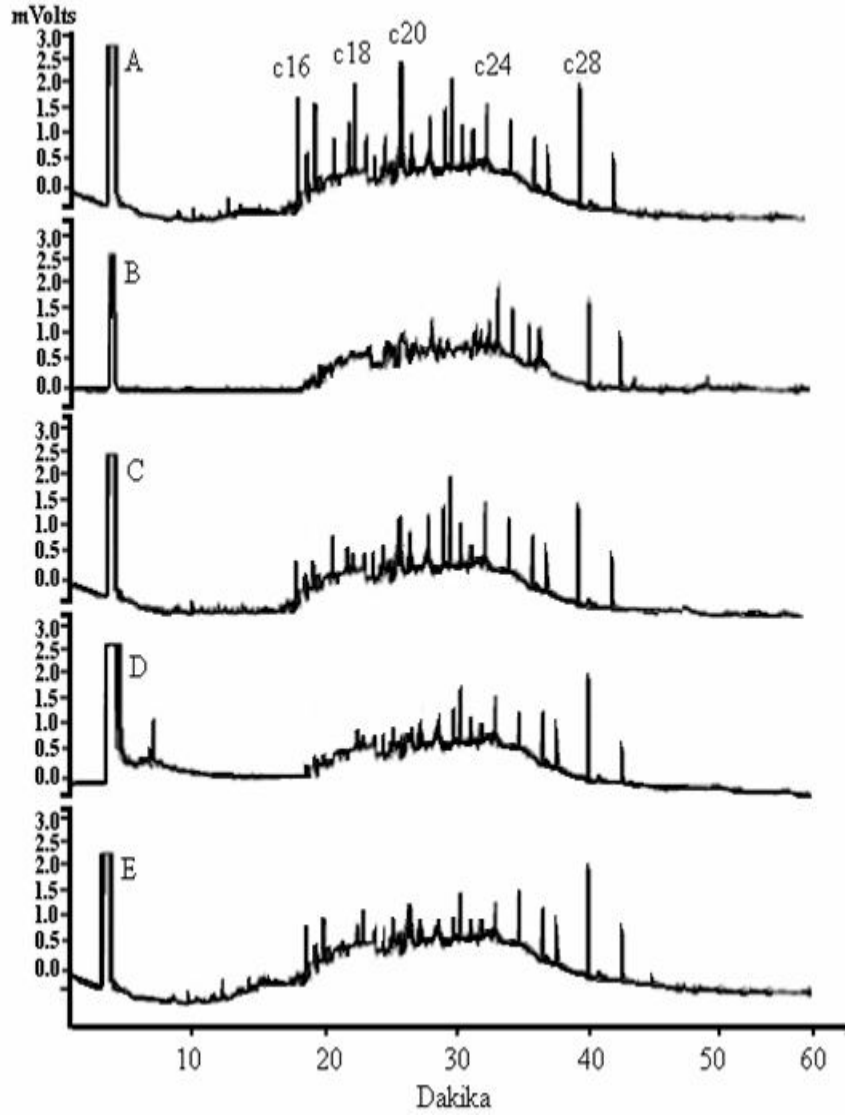
yalnızca *Pseudomonas aeruginosa* ile bu aralıktaki pik yoğunluğunda çok düşük bir azalma olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.16. İzolatlar tarafından TPH degradasyonu



Şekil 3.17. TPH degradasyonu süresince biyosülfektan üretimi



**Şekil 3.18.** TPH degradasyonuna ait GC kromatogramı, a. Degradasyon öncesi TPH kromatogramı, b. *Pseudomonas aeruginosa*, c. *Pseudomonas fluorescens*, d. *Pseudomonas putida*, e. *Burkholderia cepacia* ile degradasyon sonrası TPH kromatogramları



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

PAH kontaminasyonu sonrasında sucul sistemdeki doğal florada değişiklikler oluşabilmektedir ve PAH degradasyonu yapabilen türler baskın hale geçebilmektedir<sup>(146)</sup>. Wemedo ve arkadaşları, kerosen ile kontamine olmuş toprak örneklerinde fungal flora kapsamında *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* ve *Mucor* cinsine ait türleri izole etmişlerdir<sup>(147)</sup> ve *Rhizopus* ile *Aspergillus* cinsine ait türlerin kerosenli ortama çok çabuk adapte olduğu, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* ve *Saccharomyces* cinsine ait türlerin ise büyüme grafiklerinde yavaşlama olduğu gözlenmiştir. Doetsch, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligen*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* ve *Micrococcus* cinslerine ait türlerinin hidrokarbon içeren ortamlarda gelişebildiklerini rapor etmiştir<sup>(148)</sup>. Okereke ve arkadaşları ise *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* ve *Actinomycetes* bakterileri ile *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* mantarlarının hidrokarbon ile kontamine olmuş toprak örneklerinde yaşayabildiklerini rapor etmişlerdir<sup>(149)</sup>. Petrol ve türevlerini içeren endüstriyel atıklarla kontamine olmuş doğal ortamlarda farklı mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Batista ve arkadaşları, REGAP-Gabriel Passos Rafinerisi (Brezilya) atık suları ile kontamine olmuş istasyonlardan bakteri ve mantarlardan oluşan farklı mikrobiyal koloniler izole etmişlerdir<sup>(150)</sup>. Bakteriyel izolatların %44 oranında gram negatif oldukları ve toplam bakterilerde 19 izolatın biyosümfektan ürettiğini drop collapse yöntemi ile belirlediklerini rapor etmişlerdir. Plaza ve arkadaşları, Czechowice Rafinerisi (Polonya) atıkları ile kontamine olmuş toprak örneklerinde on altı bakteriyel izolata ulaşmışlardır ve her bir izolatın biyosümfektan

üretim özelliğini çalışmışlardır<sup>(151)</sup>. Her iki çalışmada da bakterilerin izolasyonu tamamlanmış fakat çalışma kapsamında bakterilerin identifikasyonuna yer verilmemiştir. Jacques ve arkadaşları, petrol atıkları ile kontamine olmuş toprak örneklerinden yirmi altı izolatu tespit etmişlerdir ve üç mikroorganizmanın *Pseudomonas* cinsine ait olduğunu rapor etmişlerdir<sup>(152)</sup>. Bhattacharya ve arkadaşları ise benzer şekilde kontamine olmuş toprak örneklerinde hidrokarbon parçalama özelliğine sahip *Pseudomonas citronellolis* bakterilerinin yaygın olduğunu belirtmişlerdir<sup>(153)</sup>.

Rafineri atık sularından biyosüfektan üretimini amaçlayan bu çalışmada Kızılırmak üzerinde Kırıkkale Rafineri Endüstrisi atığı ile kontamine olmuş farklı istasyonlardan alınan su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik ve biyokimyasal testler sonucunda atık sulardan dört farklı mikroorganizma identifikasyonu sağlanmıştır. Bu izolatların *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* olduğu ve biyosüfektan sentezleme yeteneğine sahip oldukları drop collapse yöntemi ile tespit edilmiştir.

Biyosüfektan madde üretiminin saptanması amacıyla pekçok çalışmada drop collapse yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem biyosüfektan varlığının saptanmasında oldukça hızlı sonuç veren, kolay, ekonomik bir tekniktir ve çok düşük miktarda örneklerle çalışılabilmektedir. Bu yöntemde kullanılan microwell plate düzeneğindeki kuyucuklar daieresel bir yapıdadır ve bu sayede damlacıkların yağlı yüzeyde hareketi engellenerek damlacık şeklinin sabit kalması sağlanmaktadır<sup>(53)</sup>. Bodour ve Miller, biyosüfektanların kantitatif analizinde drop-collapse yönteminin rahatlıkla uygulanabileceğini belirtmişlerdir<sup>(135)</sup>. Youssef ve arkadaşları ise bu

yöntemi elde edilen biyosürefektanların kalitatif analizinde kullandıklarını rapor etmişlerdir<sup>(154)</sup>. Plaza ve arkadaşları, petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinden onaltı tür izole etmişlerdir ve biyosürefektan varlığını drop-collapse yöntemi ile test etmişlerdir<sup>(151)</sup>. Bu çalışmada elde edilen izolatlar için kültürlerde biyosürefektan madde varlığının belirlenmesi amacıyla drop collapse yöntemi kullanılmış, ekim yapılmamış besiyeri ve su örneklerinde damlacıkların boncuk şeklinde sabit kaldığı belirlenmiştir. Su ve kontrol sıvısına kıyasla biyosürefektan içeren tüm kültürlerde kuyucuklar içerisinde belirgin bir yayılma olayı gözlenmiştir. Bu yayılma damlacık çaplarında değişimlere sebep olmuştur ve damlacık çaplarındaki en fazla artış BS-I içeren örneklerde gözlenmiştir. Benzer şekilde biyosürefektan miktarı arttıkça damlacık çapının arttığı Bodour ve Miller tarafından da rapor edilmiştir<sup>(135)</sup>. Biyosürefektan varlığında, mineral yağdan oluşan hidrofobik yüzey ile örnek çözeltiler arasındaki yüzeyler arası gerilim azalmaktadır. Kültür ortamındaki biyosürefektanın hidrofobik gruplarının mineral yağ ile hidrofilik gruplarının ise ortamdaki su molekülleri ile etkileşime girmesi ile yağ/su ara yüzeyinde bir tabaka oluşmakta ve yüzeyler arasında keskin bir şekilde belirgin olan sınırlar zayıflamaktadır. Kuyucuklara eklenen damlaların genişlemesi ya da yayılması yağ /su arayüzeyindeki yüzeyler arası gerilimin azalması ile açıklanabilir<sup>(135)</sup>.

İzolatların biyosürefektan madde sentezleme yeteneğine sahip oldukları belirlendikten sonra MSM kültür ortamında *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları tarafından üretilen biyosürefektan maddeler BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV olarak kodlanmış ve izolatların biyosürefektan üretim miktarları fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem oldukça basit, kullanışlı ve ekonomiktir. BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV için üretim miktarları sırası ile 856, 638, 764, 575 mg/L olarak

bulunmuştur. Bu sonuçlardan en yüksek biyosüpfektan üretiminin *Pseudomonas aeruginosa* ile elde edildiği ve üretim kapasitesi bakımından izolatların *Pseudomonas aeruginosa*>*Pseudomonas putida*>*Pseudomonas fluorescens*>*Burkholderia cepacia* şeklinde sıralandığı belirlenmiştir. Sıdal ve arkadaşları, zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile 0.875 g/L seviyesinde biyosüpfektan üretimini rapor etmişlerdir<sup>(134)</sup>. Nitschke ve arkadaşları, atık sulardan izole edilen *Bacillus subtilis* ile 48 saatlik inkübasyon sonunda 3.0g/L'lik biyosüpfektan üretimini rapor etmişlerdir<sup>(155)</sup>. Moraes ve arkadaşları, *Pseudomonas aeruginosa* LBI izolatının ticari beirtamında 5mg/L seviyesinde biyosüpfektan ürettiğini rapor etmişlerdir<sup>(156)</sup>. Benincasa ve arkadaşları *Pseudomonas aeruginosa* ile 15.9 g/L ramnolipid üretimini rapor etmişlerdir<sup>(157)</sup>. Literatür bilgilerinden hareketle bu çalışmada üretilen biyosüpfektan miktarı açısından ulaştığımız verim literatür ile kıyaslanabilir derecededir.

Besiyeri pH'sı mikroorganizma üretiminde etkili olan önemli bir çevresel parametredir. Mikrobiyal metabolizmayı önemli derecede etkileyen pH'nın biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi farklı pH değerlerinde incelenmiş ve tüm izolatlar için maksimum biyosüpfektan üretimi pH 6.5-7.0 aralığında gözlenmiştir. Bu aralığın altında ve üzerindeki pH değerlerinde biyosüpfektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* için en yüksek biyosüpfektan üretimi pH 6.5'te, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* için ise maksimum biyosüpfektan üretimi pH 7.0'de elde edilmiştir. Mikroorganizmaların buldukları ortamdaki hidrojen iyonları yoğunluğunun derecesi özellikle enzimatik etkinlikler için büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin bazı metabolizma ürünlerini sentezlenmesinde besiyerinin pH'sı oldukça önemlidir ve pH değişimlerine karşı hassas olan mikroorganizmalarda metabolizma olumsuz

yönde etkilenmektedir. pH, moleküllerin bağlanması ve etkileşimi gibi mekanizmalarda önemli bir faktör olan iyonizasyon üzerine oldukça etkilidir. Örneğin mikroorganizmalar için iz element olan bazı metaller farklı pH değerlerinde farklı iyonizasyon derecelerine sahiptir ve bu derece metalin mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğini de etkilemektedir. pH, bakterinin ihtiyaç duyduğu çoğu moleküllerin çözünürlüğünü de etkilemektedir. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilerek dış ortama salınan ekstrasellüler enzimler de besiyerinin pH'sından etkilenmektedirler. pH'a bağlı olarak enzim molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi için gerekli olan konformasyonel yapı meydana gelmekte ve substratla-enzim etkileşimi gerçekleşmektedir. Ortam pH'sındaki değişimler enzim yüklenmesi üzerinde farklılıklara neden olacağından enzim-substrat etkileşimi azalacak ve bakteriyel metabolizmada aksamalar meydana gelecektir. Tüm bu sebeplerden dolayı besiyerinin pH'sı mikrobiyal büyümede ve metabolit üretiminde oldukça önemlidir. Literatürde de çalışma kapsamında elde ettiğimiz verileri destekleyici pek çok çalışma mevcuttur. Cooper ve Goldenberg, pH 6.5-7.0 aralığında *Bacillus* sp. tarafından üretilen biyosüpfektan miktarının arttığını, pH 5.5'e inildiğinde ise azaldığını rapor etmişlerdir<sup>(113)</sup>. Tuleva ve arkadaşları, *Pseudomonas putida* ile ramnolipid üretiminin pH 7.2'de maksimuma ulaştığını<sup>(158)</sup>, Arino ve arkadaşları ise *Pseudomonas* sp. ile en iyi ramnolipid üretiminin pH 6.8'de elde edildiğini ve bu değer altında üretilen biyosüpfektan miktarının azaldığını belirtmişlerdir<sup>(159)</sup>.

Biyosüpfektan üretiminde, bakteriyel kültür içerisinde kullanılan karbon kaynakları hidrokarbonlar, karbonhidratlar ve bitkisel yağlar olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada farklı örnekler karbon kaynağı olarak kullanılmış ve biyosüpfektan üretimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Karbonhidratlardan glukoz ve mannitol, hidrokarbonlardan ise naftalen, mineral yağ, parafin, ksilen, kerosen ve toluen karbon kaynağı olarak test edilmiş ve en yüksek biyosümfektan üretimi test edilen hidrokarbonlarda, en düşük üretim ise karbonhidratlarda gözlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* için biyosümfektan üretiminin en yüksek mineral yağ içeren besiyerinde, en düşük ise glukoz ve mannitol içeren besiyerlerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. BS-II için maksimum biyosümfektan üretimi mineral yağ içeren besiyerinde gözlenmiştir. BS-I için en düşük üretim mannitol içeren ortamda 435 mg/L olarak gözlenirken, BS-II için en düşük üretim glukoz içeren ortamlarda 412 mg/L seviyelerinde gerçekleşmiştir. BS-III ve BS-IV için en yüksek üretimin parafin içeren besiyerinde, en düşük üretimin ise mannitol içeren besiyerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. İzolatlar için biyosümfektan üretimine göre karbon kaynakları sıralanacak olursa yaklaşık olarak mineral yağ>parafin>naftalen>toluen>kerosen>ksilen>mannitol=glukoz şeklinde bir sıralama elde edilmektedir. Bu sonuçlar, suda çözünebilen karbon kaynakları varlığında mikroorganizmanın substrata ulaşımı kolay olduğundan biyosümfektan üretiminin azalması, hidrofobik yapıda suda çözünürlüğü düşük olan substratların varlığında ise erişilebilirliğinin artırılabilmesi için biyosümfektan salımının artması ile açıklanabilir. Hidrokarbon yapıdaki bileşikler bir yüzeye bağlandıklarında biyolojik olarak parçalanabilirlikleri kısıtlanmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektanlar yüzeylere bağlanan substratları desorbe ederek çözünürlüğü arttırmaktadır. Bazı çalışmalarda da suda çözünürlüğü düşük olan hidrokarbonlar varlığında biyosümfektan üretiminin azaldığı rapor edilmiştir. Bazı araştırmacılar ise besiyerinde kullanılan karbon kaynağının sadece sentezlenen biyosümfektanın kimyasal yapısı üzerine etkili olduğunu, biyosümfektan üretimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir<sup>(81)</sup>. Başka bir çalışmada ise glukoz içeren

kültür ortamına hegzadekan ilavesi sonrasında *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 tarafından üretilen biyosüpfektan miktarında önemli derecede artış olduğu belirlenmiştir<sup>(160)</sup>. Duvnjak ve Kosaric, hegzadekan içeren kültür ortamında *Corynebacterium lepus* tarafından biyosüpfektan salımının arttığını belirtmişlerdir<sup>(161)</sup>. Benzer bir çalışmada ise yalnızca glukoz içeren ortamlar yerine bitkisel yağlarla karışım halindeki kültür ortamlarının kullanılması ile biyosüpfektan üretiminin daha yüksek değerlerde olduğu vurgulanmıştır<sup>(162)</sup>.

Farklı karbon kaynaklarının biyosüpfektan üretimine etkisinin incelendiği çalışmamızda karbon kaynağı olarak mineral yağ ve parafin içeren kültür ortamlarının biyosüpfektan verimi diğer karbon kaynaklarını içeren kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Literatürde de pek çok çalışmada farklı karbon kaynakları kullanılarak biyosüpfektan üretimi çalışılmıştır. Deziel ve arkadaşları, mannitol ve naftalen kullanarak *Pseudomonas* sp. ile biyosüpfektan üretimini çalışmışlardır<sup>(68)</sup>. Cameotra ve arkadaşları, *Bacillus subtilis* ile sukroz içeren besiyerinde biyosüpfektan üretimini çalışmışlardır<sup>(163)</sup>. Gunther ve arkadaşları, *Pseudomonas chlororaphis* ile glukoz içeren besiyerinde ramnolipid üretimini çalışmışlardır ve 0.355 g/L oranında üretim kapasitesini rapor etmişlerdir<sup>(164)</sup>. Sim ve arkadaşları, ramnolipid üretiminde karbon kaynağı olarak kanola yağı ve glukoz kullandıklarını belirtmişlerdir<sup>(165)</sup>. Rashedi ve arkadaşları ise karbon kaynağı olarak n-hegzadekanın kullanılması ile *Pseudomonas aeruginosa*'dan 138 mg/L seviyelerinde biyosüpfektan üretimini bildirmişlerdir<sup>(166)</sup>. Langer ve arkadaşları, *Tsukamurella* sp. DSM 44370 ile ayçiçeği yağı kullanarak glikolipid yapıda biyosüpfektan elde ettiklerini rapor etmişlerdir<sup>(167)</sup>. Bu tür çalışmalarda kullanılan ve ticari olarak elde edilebilen glukoz, mannitol, kanola yağı, hegzadekan maliyetleri oldukça yüksek karbon kaynaklarıdır ve bu durum endüstriyel uygulamalar için

kullanımı kısıtlamaktadır. Bu nedenle bu tür uygulamalarda maliyeti yüksek ortamlar yerine mikroorganizmaların karbon kaynağı olarak kullanılabileceği atık suların biyosüpfektan üretiminde kullanılması oldukça avantajlıdır<sup>(82)</sup>. Sıdal ve arkadaşları, zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile biyosüpfektan üretimini çalışmışlardır ve maksimum biyosüpfektan üretimini 0.875 g/L olarak rapor etmişlerdir<sup>(134)</sup>. Bednarski ve arkadaşları, zeytinyağı fabrikası atık suyu ile zenginleştirilmiş besi ortamlarında *C. apicola* ve *C. antarctica* ile glikolipid yapıda biyosüpfektan madde üretimini çalışmışlardır<sup>(132)</sup>. Patel and Desai, şeker fabrikası atıkları olan melası kullanarak *Pseudomonas aeruginosa* GS3 ile ramnolipid üretimini çalışmışlardır<sup>(168)</sup>. Nitschke ve Pastore, nişastaca zengin atıklar kullanarak *B. subtilis* ATCC 21332 ile 2.2 g/L'lik biyosüpfektan üretimini rapor etmişlerdir<sup>(155)</sup>. Haba ve arkadaşları ise karbon kaynağı olarak kızartma yağı atıkları ile biyosüpfektan çalışmaları gerçekleştirmişlerdir<sup>(169)</sup>. Nişastaca zengin posalar, melas ve kızartma yağı gibi atıklar kullanılarak biyosüpfektan eldesi de çoğu araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Karbon kaynağı olarak kullanılan bu tür atıklar, besleyici özelliğe ve ekonomik değere sahip olduklarından çeşitli endüstri kollarında değerlendirilebilmektedir. Özellikle melas ve nişastaca zengin posalar hayvan yemi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte melas kömürün tek başına briketlenme özelliğinin kötü olması nedeniyle briketleme işlemlerinde de kullanılmaktadır. Atık bitkisel yağlar ise biyodizel ve biyogaz için önemli hammaddelerdir<sup>(170)</sup>. Bu nedenle bu tür kaynaklar yerine karbon kaynağı olarak kullanılabilir ve bir sanayi kolunda girdi olarak kullanılmayacak kaynakların kullanılması daha avantajlı ve ekonomik olacaktır. Das ve arkadaşları, petrol ile kontamine olmuş toprakların *B. subtilis* ile biyosüpfektan üretimi ve biyodegradasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir ve biyosüpfektan varlığında toprağın petrol içeriğinin 84 g/kg'dan 39 g/kg'a azaldığını



rapor etmişlerdir<sup>(171)</sup>. Benincasa ve arkadaşları, petrol atıkları ile kontamine olmuş toprak örneklerinden (Barcelona/Spain) izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* ile 15.9g/L'lik bir biyosüpfektan üretim kapasitesine ulaştıklarını belirtmişlerdir<sup>(157)</sup>. Bu çalışmada biyosüpfektan üretimi, besleyici değeri yüksek kaynaklarla değil atık sulardaki petrol türevleri kullanılarak sağlanmıştır. Bu yolla maliyeti düşük karbon kaynakları kullanılarak ekonomik değeri yüksek ürünler elde edilmiştir.

Biyosüpfektan üretiminde kültür ortamına ilave edilen azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla; farklı azot kaynakları,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$ , temel besi yerine ilave edilmiştir. Tüm izolatlarda en yüksek biyosüpfektan verimi  $\text{NaNO}_3$  (sodyum nitrat) kullanılan ortamda elde edilirken, en düşük verim ise  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  içeren ortamda saptanmıştır. Bu sonuçlar nitrat azotunun amonyum azotundan daha iyi metabolize edildiğini göstermektedir. Ramana ve Karanth<sup>(136)</sup>, Mulligan ve Gibbs<sup>(118)</sup> de nitrat azotunun amonyum azotundan daha iyi metabolize edildiğini ve biyosüpfektan fermentasyonunda azot kaynağı olarak  $\text{NaNO}_3$  kullandıklarını rapor etmişlerdir. Azot kaynağı kadar azot kaynağı konsantrasyonu da biyosüpfektan sentezini etkileyen önemli bir faktördür. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda  $\text{NaNO}_3$  ile deneysel aşamalar tekrar edilmiş ve en yüksek biyosüpfektan üretimi 1.0 g/L  $\text{NaNO}_3$  kullanılan ortamda elde edilmiştir. Bu sonuçlar azot limitasyonunun biyosüpfektan üretiminde arttırıcı etki göstermesi, yüksek konsantrasyonlardaki azotun ise mikroorganizma üremesinde inhibisyona neden olması ile açıklanabilir<sup>(172,173)</sup>.

Hücre büyümesiyle bağlantılı olarak etambutol ve EDTA gibi hücre duvarı geçirgenliğini arttıran yada alkanlar, kerosen ve EDTA gibi hücre duvarı bağlarında etkili olan ajanların kullanımı ile biyosüpfektan üretiminin artırılması mümkündür

<sup>(174)</sup>. Çalışmamızda test edilen 0.01-0.05 g/L aralığındaki düşük EDTA konsantrasyonlarında, biyosürefektan üretiminin arttığı, 0.1 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarında ise bakteri gelişiminin ve buna bağlı olarak biyosürefektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Test edilen konsantrasyonlarda en yüksek biyosürefektan üretimi 0.05g/L EDTA konsantrasyonunda gözlenmiştir ve bu konsantrasyonda BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV üretiminde sırası ile 1.06, 1.14, 1.06, 1.11 kat artış belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığı ile biyosürefektan üretiminin artması hücre geçirgenliğinin artması, besinlerin hücre içerisine daha kolay alınması ve daha çok metabolit üretilmesi ile açıklanabilir. *Pseudomonas* hücrelerine ait dış membranlar Mg (II) iyonları ve lipopolisakkaritlerin kovalent olmayan çapraz bağlarla etkileşimi ile stabil hale gelmektedir. Düşük miktarlarda EDTA Mg (II) iyonları ile etkileşime girerek dış membran akıcılığında ve bütünlüğünde değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişimler dış membranın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır<sup>(175)</sup>. Besiyortamında EDTA miktarının artırılması ile biyosürefektan üretiminin azalması, MSM besiyeri bileşiminde bulunan ve mikroorganizmaların üremesi için gerekli Mn(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II) ve Co(III) metallerinin EDTA ile kompleks oluşturması ile açıklanabilir. EDTA, yapısında dört karboksilat ve iki amin grubu içermektedir ve bu gruplar EDTA'nın metallerle kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. EDTA özellikle Mn(II), Cu(II), Fe(III), Pb (II) ve Co(III) metal iyonları ile güçlü kompleksler oluşturmaktadır<sup>(176)</sup>. EDTA-metal kompleksinin oluşması ile mikroorganizmaların bu metallere erişimi kısıtlanmakta, mikroorganizma metabolizmasında ve metabolit üretiminde aksamalar meydana gelmektedir. Mikroorganizmalar tarafından ihtiyaç duyulan bu metaller biyokimyasal reaksiyonların katalizasyonunda, bazı enzimlerin ve kofaktörlerin yapısında yer almaktadırlar. Ortamda çok az bulunan ve hücreler tarafından da çok az miktarda

ihtiyaç duyulan böyle elementler, iz elementler olarak tanımlanmaktadır. Bu elementlerin noksanlığı veya azlığı bakterilerin üremelerini ve gelişmelerini olumsuz yönde etkilemektedir. İz elementlerden, demir, elektron transport mekanizması ve sitokrom sentezi için önemlidir. Nitratların redüksiyonunda ve melanin sentezinde bakır önemli bir role sahiptir. Manganez nitrat redüksiyonları için, çinko ise alkol dehidrogenaz aktivitesi ve sitokrom-c'nin sentezi için gereklidir<sup>(174-176)</sup>. Mikrobiyal metabolizmada farklı yollarda işlev gören bu elementlerin EDTA ile uzaklaştırılması ya da maskelenmesi, ilgili yollarda aksamalara neden olacaktır ve bu yolla metabolit üretiminde azalacaktır. Hua ve arkadaşları, düşük miktarlarda besiortamına ilave edilen EDTA ile *Pseudomonas aeruginosa* tarafından ortama salınan lipopolisakkaritlerin arttığını rapor etmişlerdir<sup>(177)</sup>. Bu sonucun EDTA ilavesi ile mikroorganizmanın hücre yüzey potansiyelinin (zeta potansiyel) artması ile ilgili olduğunu rapor etmişlerdir. Zeta potansiyel, taneler arasındaki itme veya çekme değerinin bir ölçümüdür. Moleküllerin polar sıvılar içerisindeki davranışları üzerine zeta potansiyel değerinin önemli bir etkisi vardır. Besiortamına EDTA ilavesi ile lipopolisakkarit üretiminin artması, hücrenin zeta potansiyel değerinde ve dolaylı olarak hücre yüzeyi ile hidrokarbonların etkileşiminde meydana gelebilecek değişimlerle açıklanabilir<sup>(177)</sup>. Redy ve arkadaşları, düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığının emülsifiye edici faktör üretimi üzerinde olumlu etkileri olduğunu rapor etmişlerdir<sup>(178)</sup>. Tuğrul, yüksek konsantrasyonlarda EDTA'nın *Pseudomonas aeruginosa* üremesini inhibe ettiğini belirtmiştir<sup>(179)</sup>. Bu noktadan hareketle çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin literatür tarafından da desteklendiğini söyleyebiliriz.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda çeşitli sistem parametrelerinin biyosüperfektan üretimi üzerine etkileri incelenmiş ve pH 6.5-7.0 aralığında, karbon

kaynağı olarak mineral yağ ya da parafin, 0.05g/L EDTA ve 1.0 g/L NaNO<sub>3</sub> içeren ortamlarda maksimum verim elde edildiği belirlenmiştir. Rafineri atık suyu belirlenen optimum koşullarla modifiye edilerek biyosürefektan üretimi çalışmaları her bir izolat için tekrar edilmiştir. Rafineri atık suları ile tekrar edilen çalışmalarda biyosürefektan üretiminin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Bu sonucun rafineri atık su içeriğinde bulunan ağır metaller ve hidrokarbon yapıdaki bileşikler ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Rafineri atık su analizlerinden Al ve Pb gibi canlı organizmalar için toksik metallerin bulunması ve bu metallerin çeşitli metabolizmalar üzerinde olumsuz etkilerinin olması biyosürefektan üretiminin azalması ile ilişkili olabilecek ilk durumdur. Ayrıca biyosürefektan üretiminde karbon ve enerji kaynağı olarak poliaromatik hidrokarbonlar içeren atık suların kullanımı sisteme daha fazla enerji girdisi gerektirmektedir. Kültürasyon aşamasında daha fazla reaksiyon enerjisinin tüketilmesi, yeterli dispersiyon için karmaşık mekanizmaların gerekliliği ve mikroorganizmaların hidrofobik kaynağa erişiminin arttırılmasının gerekliliği biyosürefektan üretiminde süreyi uzatmaktadır. Bu noktada hidrofobik substrat içeren ortamlarda mikroorganizmaların bir adaptasyon sürecini atlattıktan sonra biyosürefektan üretimine başladıkları düşünölebilir. Mikrobiyal bir kommünitenin, hidrokarbon-okside etme potansiyelinde artış meydana getiren olay adaptasyon olarak bilinir. Adaptasyon süresince spesifik enzimlerin uyarılmaları ve/veya baskılanmaları, yeni metabolik özellikler ile sonuçlanan genetik değişiklikler ve ilgili bileşiklerin trasform olabildiği organizmaların seçici olarak zenginleştirilmesi gibi bazı metabolik yollar aktif hale gelmektedir<sup>(82)</sup>. Biyosürefektan üretimindeki azalmanın muhtemel sebeplerinden biri de mikroorganizmaların hidrokarbon yapıdaki kaynakları kullanabilmesi için geçen bu adaptasyon süresi olabilir.

İzolatlara ait biyosümfektanların karakterizasyon çalışmalarında BS-I biyosümfektanına ait FTIR spektrumunda gözlenen  $1645\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen titreşimler  $\text{-C=O}$  bağlarını,  $3400\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen titreşimler  $\text{-OH}$  bağlarını,  $3000\text{ cm}^{-1}$  civarında görülen sık titreşimler ise  $\text{-CH}_2$  zincirlerini göstermektedir. BS-II biyosümfektanına ait spektrumda  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki sık titreşimler  $\text{-CH}_2$  ve  $\text{-OH}$  gruplarının varlığına işaret etmektedir. Aynı spektrumda  $\text{-CH}_3$  alifatik zincirlerden kaynaklı  $2960\text{ cm}^{-1}$ 'de titreşimler ve  $\text{-C=O}$  bağlarından kaynaklı  $1650\text{ cm}^{-1}$  de titreşimler de gözlenmiştir. BS-III biyosümfektanına ait spektrumda ise  $3401\text{ cm}^{-1}$ 'de  $\text{-OH}$  gruplarından,  $2966\text{ cm}^{-1}$ 'de  $\text{-CH}_3$  zincirlerden,  $1539\text{ cm}^{-1}$ 'de  $\text{-C-N}$  bağlarından ve  $1659\text{ cm}^{-1}$ 'de  $\text{-C=O}$  bağlarından kaynaklanan titreşimler gözlenmiştir. Her üç spektrumda da  $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  aralığında  $\text{-C-O}$  bağlarından kaynaklanan titreşimler mevcuttur. BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanlarına ait spektrumlarda karboksil, hidroksil grupları ile alifatik zincirlerin baskın olması bu biyosümfektanların glikolipid yapıdaki ramnolipidler ile benzer yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Ramnolipidler, ramnoz halkaları ve uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşmaktadır. BS-I, BS-II ve BS-III'e ait FTIR spektrumlarında gözlenen  $\text{-OH}$  ve  $\text{-C-O}$  bağları ramnoz halkalarına,  $\text{C=O}$  bağları ile alifatik zincirler ise hidrokarbon yapıya işaret etmektedir. Ayrıca BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanlarının biüret ve ninhidrin reaksiyonu ile sonuç vermemesi peptit içermemesi ile ilişkilidir. BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanlarının molish testi ile pozitif sonuç verdiği, fosfovanilin yöntemi ile biyosümfektan yapısındaki lipidlerin fosforik ve sülfirik asitli sıcak ortamda pembe renk oluşturduğu ve pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Tüm bu analizler BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanlarının glikolipid yapıya sahip olduğunu doğrulamaktadır. BS-IV biyosümfektanı ile elde edilen spektrumda  $1648\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen titreşimler  $\text{-C=O}$  bağlarının,  $1537\text{cm}^{-1}$ 'de

gözlenen titreşimler –C-N bağlarının, 3320 cm<sup>-1</sup> civarında görülen sık titreşimler –NH bağlarının ve 2965 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen titreşimler ise –CH<sub>3</sub> zincirlerinin varlığına işaretler. BS-IV biyosüpfektanında ise karboksil ve alifatik zincirlere ilave olarak amin grupları ile –C-N bağları da gözlenmiştir. Özellikle amin grupları peptit varlığına işaret etmektedir ve BS-IV biyosüpfektanı ile biüret reaksiyonunun pozitif sonuç vermesi yapıda peptit bağlarının olduğunu güçlendirmektedir. Ninhidrin reaksiyonu ile sonuç vermemesi peptidin N-terminal ucunun bloke olduğuna, fosfovanilin testinde benzer şekilde renk oluşumunun gözlenmesi ve testin pozitif olarak değerlendirilmesi yağ asiti zincirlerinin varlığına işaret etmektedir. Bu sonuçlardan BS-IV biyosüpfektanının lipopeptit yapıda olabileceği düşünülmektedir.

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatlarına ait besiyerinde kültürasyon sonrasında yüzey geriliminin azaldığı belirlenmiştir. Su, ekim yapılmamış besiyeri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* kültürleri için yüzey gerilimi sırası ile 73.1, 67.3, 49.2, 35.9, 51.6 ve 45.7 mN/m olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan ilk göze çarpan nokta su ve ekim yapılmamış, biyosüpfektan içermeyen besiyeri arasındaki yüzey gerilimi farklılığıdır. Bu sonuç kültür ortamına ilave edilen çeşitli karbon kaynağı, azot kaynağı ve elementlerin yüzey gerilimini düşürücü etki göstermesi ile açıklanabilir. Yüzey geriliminde en belirgin azalma *Pseudomonas aeruginosa* kültüründe gözlenmiştir. İzolatlar tarafından üretilen biyosüpfektan miktarları kıyaslandığında da *Pseudomonas aeruginosa*'nın diğer izolatlarla kıyasla daha yüksek üretim yaptığı test edilmiştir. Hem yüzey gerilimi sonuçları hem de biyosüpfektan üretim sonuçları birbirini desteklemektedir ve her iki analizden biyosüpfektan miktarının artması ile yüzey gerilimini düşürücü etkinin arttığı sonucu çıkarılabilir. Biyosüpfektanlar

sistemdeki serbest enerjiyi azaltarak yüzey gerilimini düşürmektedirler. Biosüperfektanlardan dolayı yüzey geriliminin düşmesi ile hidrodinamik değişimler için oksijen transferinin de arttığı belirlenmiştir. Yüzey gerilimindeki azalma büyük köpük oluşumlarını azaltarak difüzyon için geniş yüzey alanına izin vermektedir ve bu yolla oksijen transferi ve besin sağlamada kolaylık sağlanmış olmaktadır. Sisteme giren biosüperfektan molekülleri ilk olarak yüzeylerde akümüle olmaktadır ve tüm yüzey biosüperfektanla kaplanmaktadır. Biosüperfektanların hidrofilik kısımları su ile dipol-dipol ve hidrojen bağları ile etkileşirken, hidrofobik kısımları ise arayüzeydeki diğer çözücü ile etkileşime girmektedir. Biosüperfektan ilavesi hidrojen bağlarının yüzeylerarası gerilime olan katkısını azaltarak yüzey gerilimini düşürmektedir.<sup>(180,181)</sup> Distile suyun yüzey geriliminin süperfektan eklenmesi ile 72mN/m'den 30mN/m'ye düştüğü, yüzeyler arası gerilimin ise 43mN/m'den 1mN/m'ye kadar azaldığı görülmüştür<sup>(118)</sup>. Rashedi ve arkadaşları, *P. aeruginosa* ile biosüperfektan üretimi sonucunda kültür ortamı yüzey geriliminin 73 mN/m'den 32mN/m'ye azaldığını rapor etmişlerdir<sup>(166)</sup>. Plaza ve arkadaşları, petrol ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen mikroorganizmalar ile yüzey geriliminde 35 mN/m'lik bir azalma gözlediklerini belirtmişlerdir<sup>(151)</sup>. Bu çalışma kapsamında izolatlara ait biosüperfektanların %27-46 oranında yüzey gerilimini azalttığı ve sonuçların literatür bilgileri ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Emülsiyonlar, birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Biosüperfektanların emülsiyon aktivitesi, kararlı emülsiyon oluşturabilme özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bazı araştırmalarda emülsiyon aktivitesinin test edilen hidrokarbonların zincir uzunluğu ile ilgili olduğu belirtilmiştir<sup>(114)</sup>. Biosüperfektanların hidrokarbonlar, yağ asitleri ve bitkisel yağlarla emülsiyon

oluşturma özellikleri gıda endüstrisi, temizlik ve biyoremediasyon proseslerinde potansiyel uygulama alanları oluşturmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları tarafından üretilen biyosüpfektanların mineral yağ, kerosen, naftalen, toluen, ksilen, gliserol, hegzadekan ve parafin hidrokarbonlarına karşı emülsifikasyon özelliği test edilmiştir. BS-I ve BS-II biyosüpfektanları için en yüksek emülsiyon indeksi parafin ile, en düşük ise gliserol ile elde edilmiştir. BS-III biyosüpfektanında ise benzer şekilde en yüksek emülsiyon indeksi parafin ile elde edilirken en düşük indeks ksilen ile elde edilmiştir. BS-IV biyosüpfektanının en yüksek emülsiyon oluşturma özelliği kerosen ile en düşük toluen ile gözlenmiştir. Emülsiyon indeksi testinde kullandığımız sıvıların zincir uzunluğu parafin>mineral yağ>hegzadekan>kerosen>naftalen>ksilen>toluen>gliserol şeklinde bir sıra izlemektedir. Bu veri ışığında BS-I, BS-II ve BS-III biyosüpfektanların kısa zincirli hidrokarbonlara kıyasla uzun zincirli hidrokarbonlara karşı daha yüksek emülsifikasyon özelliği sergilediği söylenebilmektedir. BS-IV biyosüpfektanın emülsifikasyon aktivitesinin ise hidrokarbon yapısı ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir. Ilori ve arkadaşları, *Aeromonas* sp. tarafından üretilen biyosüpfektan ile en yüksek emülsiyon indeksine (E24 = 65) diesel ile en düşük indekse (E24 = 22) ise hekzan ile ulaşıldığını rapor etmişlerdir<sup>(182)</sup>. Moraes ve arkadaşları, *Pseudomonas aeruginosa* LBI tarafından üretilen biyosüpfektanı benzen, kerosen, mineral yağ, isopropil palmitat ve toluen sıvılarına karşı test etmiş ve sırası ile 60.0, 50.0, 41.6, 73.3 ve 33.0 emülsiyon indeksi değerlerine ulaştıklarını bildirmişlerdir<sup>(156)</sup>.

Son yıllarda antibiyotik-dirençli enfeksiyonlardaki artıştan dolayı bu enfeksiyonlarla mücadelede yeni ilaçların araştırılmasına yönelik çalışmalar büyük bir hız kazanmıştır. Bu açıdan biyosüpfektanların antimikrobiyal aktiviteleri büyük



bir öneme sahiptir ve henüz bu konudaki çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu çalışmada elde edilen biyosümfektanların farklı bakteri, mantar ve küf yapıdaki bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri de test edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen BS-I biyosümfektanı en fazla 14 mm'lik inhibisyon zonu ile *E.coli*'ye karşı etkili olmuştur. *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'ye karşı sırası ile 12, 10 ve 14mm'lik inhibisyon zonu meydana getirmiştir. BS-I biyosümfektanın antimikrobiyal aktivitesi test edilen mikroorganizmalar için *E.coli*>*K. pneumoniae*>*P. aeruginosa*> *S. aureus* şeklinde bir sıralama göstermiştir. *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen BS-II biyosümfektanı ise en fazla 16 mm'lik inhibisyon zonu ile *K. pneumoniae* üzerine etkisini gösterirken, *E.coli*'ye karşı 15mm, *P. aeruginosa*'ya karşı 13 mm, *S. aureus* 'a karşı ise 9 mm'lik inhibisyon zonu göstermiştir. BS-II biyosümfektanı için antimikrobiyal etki sırası *K. pneumoniae*> *E.coli*> *P. aeruginosa*> *S. aureus* şeklindedir. Her iki biyosümfektan en düşük antimikrobiyal etkiyi *S. aureus*' da göstermiştir. *Pseudomonas putida* tarafından üretilen BS-III biyosümfektanı ile antimikrobiyal çalışmalarında gözlenen en yüksek inhibisyon zonu *K. pneumoniae* ile 20 mm olarak elde edilmiştir. BS-III, test edilen diğer üç bakteri türü üzerine eşit etki göstermiştir. *Burkholderia cepacia* tarafından üretilen BS-IV biyosümfektanı en fazla 19 mm'lik inhibisyon zonu ile *E.coli* ve *K. pneumoniae*'ye karşı etkili olmuştur. *P. aeruginosa* ve *S. aureus* karşı sırası ile 14 ve 12mm'lik inhibisyon zonu meydana getirmiştir. BS-IV biyosümfektanın antimikrobiyal aktivitesi test edilen mikroorganizmalar için *E.coli*=*K. pneumoniae*>*P. aeruginosa*>*S. aureus* şeklinde bir sıralama göstermiştir. Test edilen mikroorganizmalar arasında tüm biyosümfektanlara karşı *S. aureus* 'un daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Durak ve arkadaşları, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S.aureus* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı ofloxacin

antibiyotiğinin etkinliğini test etmişlerdir ve sırası ile 20, 21, 16 ve 15 mm'lik inhibisyon zonu elde ettiklerini belirtmişlerdir<sup>(183)</sup>. Duman ve arkadaşları, sefadroksil antibiyotiğinin *E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı sırası ile 13, 25 ve 17 mm'lik bir etki alanı oluşturduğunu rapor etmişlerdir<sup>(184)</sup>. Hastalıkların tedavisinde yaygın bir şekilde uygulanan bu antibiyotiklerin etkisi ile biyosümfektanların etkisi kıyaslandığında, biyosümfektanların düşük dozlarda yüksek etkinlik gösterdiği rahatlıkla söylenebilir.

Antifungal çalışma kapsamında BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosümfektanlarının *C. krusei*'ye karşı sırası ile 15, 14, 17 ve 14mm'lik inhibisyon zonu meydana getirdiği belirlenmiştir. BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosümfektanlarının *C. albicans*'a karşı sırası ile 13, 14, 12 ve 13mm'lik inhibisyon zonu meydana getirmiştir. BS-II biyosümfektanının her iki mantar türüne eşit derecede etki ettiği gözlenmiştir. Duman ve arkadaşları, nistasin antibiyotiğinin *Candida krusei*'ye karşı 17 mm'lik bir inhibisyon zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir<sup>(184)</sup>. Nistasin, *Candida* hastalıklarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve bu çalışmada test edilen biyosümfektanların etkinliği nistasinin etkinliği ile yaklaşık değerler göstermektedir.

Tahıllar, yeryüzünde ekiliş ve üretim düzeyi en yüksek olan ürün grubudur. Bunun nedenlerinden biri tahılların insan beslenmesinde doğrudan ve dolaylı olarak kullanılan temel ürünlerden olmasıdır. Diğer bir nedeni de insan beslenmesinde olduğu kadar hayvan yemi ve çeşitli endüstri alanlarında kullanılıyor olmalarıdır. Yüksek nem ve yüksek sıcaklığa sahip tarla ve depo koşulları, tahılların çeşitli mikroorganizmalar tarafından istilasına neden olarak, ürünün ve tohumun kalitesinde önemli kayıplar oluşturmaktadır. Bu organizmaların içinde en önemli grubu

funguslar oluşturmaktadır. Funguslar geliştikleri üründe çeşitli metabolitler üreterek insan ve hayvanlarda hastalık ve zehirlenmelere yol açmaktadır. *Fusarium* cinsine ait türler tohumlara hasattan önce bulaşan ve uygun koşullarda depoda da zararını devam ettiren funguslardır. Toprakta ve bitkide bulunan filamentöz fungus olan *Fusarium* türleri genel kontaminant ve bitki patojeni olarak bilinmekle beraber insanlarda da çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Birçok bitki hastalığı, çok yaygın olan *Fusarium* küfünün çeşitlerinden kaynaklanmaktadır ve *Fusarium* 20'nin üzerinde tür içermektedir<sup>(185)</sup>. Bu çalışmada antifungal deneyleri devamında biyosürefektanların *Fusarium* cinsine ait türler üzerine etkileri de incelenmiştir. İnkübasyon süresince *Fusarium graminearum*'un misel gelişimi üzerine BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosürefektanlarının inhibe etkisi sırası ile %65, %61, %66 ve %27 olarak belirlenmiştir. *Fusarium inflexum*'da misel gelişimini %52 inhibisyon oranı ile BS-I ve BS-II biyosürefektanlarının eşit derecede inhibe ettiği gözlenmiştir. BS-III ve BS-IV biyosürefektanlarının inhibisyon oranları ise sırası ile %50 ve %28 olarak belirlenmiştir. *Fusarium heterosporium*'un misel gelişimi üzerine BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosürefektanlarının inhibisyon oranları sırası ile %73, %66, %56 ve %60 olarak tespit edilmiştir. BS-I ve BS-III biyosürefektanlarının varlığında *Fusarium avenaceum*'un misel gelişimi sırası ile %50 ve %72 oranında inhibe olurken, BS-II ve BS-IV biyosürefektanlarına karşı daha dirençli olarak sırası ile %38 ve %33 oranında misel gelişimi inhibe olmuştur. Test edilen biyosürefektan örneklerinin hiçbiri tamamen inhibisyon sağlamamıştır. Test edilen küfler için en yüksek inhibisyon oranı %73 ile BS-I biyosürefektanında elde edilmiştir. BS-I ve BS-II biyosürefektanı için misel inhibisyon sıralaması *Fusarium heterosporium*>*Fusarium graminearum*>*Fusarium inflexum*>*Fusarium avenaceum* olarak bulunmuştur. BS-III için *Fusarium avenaceum*>*Fusarium graminearum*>*Fusarium*

*heterosporium*>*Fusarium inflexum*, BS-IV için *Fusarium heterosporium*>*Fusarium avenaceum*>*Fusarium inflexum*>*Fusarium graminearum* olarak bulunmuştur.

Antibakteriyel ve antifungal çalışmaları sonuçlarından izolatlara ait biyosümfektanların antibakteriyel ve antifungal özellik sergilediği belirlenmiştir. Biyosümfektanların antimikrobiyal özellik sergilemeleri bakteriyel hücrede oluşturdukları yapısal değişikliklerle açıklanabilir. Biyosümfektanlar hücre zarını aşarak küçük veziküller, membran arasında partiküller ve çeşitli büyüklükte agregatlar oluşturarak hücre bütünlüğünü bozmaktadır. Bakteriyel hücre içerisine giren biyosümfektanlar proteinler, enzimler, mineraller ve iz elementler gibi sitoplazmik moleküllerle etkileşerek çeşitli metabolik faaliyetlerde aksamalara neden olmaktadır. İturin biyosümfektanının maya hücrelerinde hücre morfolojisi ve membran yapısını bozarak antifungal etki sergilediği belirtilmektedir. Benzer şekilde surfaktin biyosümfektanının membran bütünlüğünü bozduğu rapor edilmektedir. Ayrıca biyosümfektanlar mikroorganizmanın lipid tabakasının çözünürlüğünü arttırarak da membran bütünlüğünü bozmaktadır<sup>(121)</sup>.

Biyosümfektanların antimikrobiyal, antifungal özellikleri ve medikal alanlarda uygulanabilirliği pek çok çalışmada irdelenmiştir. Rhamnolipid biyosümfektanlarının; *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı mükemmel antifungal özellik sergilediği, *Aspergillus niger*, *Chaetium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans* funguslarına, ayrıca *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani* bitki patojenlerine karşı inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir<sup>(122)</sup>. Rhamnolipidler, bakteriyel membran lipopolisakkaritlerinin yıkımına sebep olarak membran bütünlüğünü bozmakta ve bu fonksiyonu ile antibiyotik özelliği

göstermektedir. Benzer çalışmalarda 200 mg/L ramnolipid ile 500 mg/L sophorolipidin *Phytophthora* sp. ve *Pythium* sp.'nin miselyum gelişimini % 80 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir<sup>(123)</sup>. *C. antarctica*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* tarafından üretilen biosüpfektanların da antimikrobiyal özellik sergilediği belirtilmiştir<sup>(121)</sup>. Gerard ve arkadaşları, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipidin *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir<sup>(186)</sup>. Rodrigues ve arkadaşları, *L. lactis* 53 tarafından üretilen biosüpfektanın ancak 25 mg/mL ve üzerindeki derişimlerde kullanıldığında *Staphylococcus aureus* üzerine antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir<sup>(121)</sup>. Literatürde rastlanan bu sonuçlar, BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biosüpfektanlarının uygun doz ayarlaması ile antibiyotik tedavilerinde kullanılabilirliğini desteklemektedir. Bununla birlikte biosüpfektanların kullanımı ile antibiyotik tedavilerinde gerekli görülen dozların azaltılması da mümkündür<sup>(124)</sup>. Biosüpfektanların tıp, farmakoloji ve eczacılık alanlarında potansiyel kullanılma yönlerinin araştırılması tıp ve ekonomik açıdan oldukça yararlıdır.

Endüstriyel atıksular içerdikleri ağır metal iyonları ile günümüzde en önemli çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Ağır metallerin atık sularla alıcı ortamlara ulaşması sucul yaşamı olumsuz yönde etkilemektedir. Ağır metallerin parçalanabilir özelliğe olmaması, bu tür kirliliklerin giderilmesini de zorlaştırmaktadır. Yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren endüstriyel atıksuların arıtımında nötralizasyon ve kimyasal çökeltim, adsorpsiyon, sorpsiyon, iyon değiştirme, ters ozmoz, buharlaştırma ve membran teknolojisi yöntemleri uygulanabilmektedir<sup>(187)</sup>. Bu anlamda mikroorganizmaların ve mikrobiyal ürünlerin kullanımı yüksek performans ve düşük maliyet nedeniyle cazip alternatif olarak görülmektedir. Endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılan ve atık

sularla alıcı ortamlara aktarılan civa, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve çinko metallerinin biyosümfektanlarla giderimi test edilmiştir. BS-I biyosümfektanı için giderim oranı Hg(II), Pb (II), Cu (II), Cd (II), Zn (II) ve Fe(III) (%) sırası ile 28.9, 52.3, 64.0, 48.7, 33.4 ve 31.5 olarak, BS-II biyosümfektanı için aynı sıralama 25.6, 54.9, 65.0, 50.2, 31.2 ve 29.7 olarak bulunmuştur. BS-III biyosümfektanı için Hg(II), Pb (II), Cu (II), Cd (II), Zn (II) ve Fe(III) giderim oranları (%) sırası ile 31.5, 56.7, 68.9, 53.4, 39.8 ve 26.4 olarak, BS-IV biyosümfektanı için aynı sıralama 23.0, 61.2, 59.8, 49.7, 30.9 ve 27.3 olarak bulunmuştur. Karboksil ve hidroksil grupları metaller ile kompleks oluşumunda önemli fonksiyona sahiptir. FTIR sonuçlarından tüm biyosümfektanların karboksil ve hidroksil gruplarını içerdiği belirlenmiştir. Negatif yüklü bu gruplar ile katyonik özellikteki metaller arasındaki etkileşim biyosümfektanlar ile ağır metal giderimini açıklamaktadır. Literatürde biyosümfektanlar ile ağır metal giderimi konusunda çalışmalar oldukça azdır ve yapılan çalışmalar yaygın olarak toprak ve sedimentlerdeki ağır metal kirliliğinin giderimine yöneliktir. Ramnolipidin kontamine olmuş topraklardan kadmiyum gideriminde kullanımı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir<sup>(188)</sup>. Mulligan ve arkadaşları, ağır metallerle kontamine olmuş sedimentlerden ağır metal uzaklaştırmak için *Bacillus subtilis*'ten surfaktin, *Pseudomonas aeruginosa*'dan ramnolipid ve *Torulopsis bombicola*'dan elde edilen sophorolipidler ile bakır ve çinko giderimi çalışmışlardır. Ramnolipid ile %65 oranında bakır, %18 oranında çinko uzaklaştırıldığını, sophorolipid ile %25 oranında bakır, %60 oranında çinko uzaklaştırıldığını, surfaktin ile %15 oranında bakır, %6 oranında çinko uzaklaştırıldığını rapor etmişlerdir<sup>(118)</sup>. Mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi literatürde oldukça geniş yer bulmuştur fakat mikrobiyal metabolitler ile bu konudaki çalışmalar henüz istenilen noktaya ulaşmamıştır. Bu bakımdan çalışmamızda

biyosürefektanlar ile ağır metal giderimine de yer verilmiş, düşük dozda uygulanan biyosürefektanlar ile giderim açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca gerekli doz ayarlamasının yapılarak giderim oranının daha yüksek boyutlara ulaşabileceği düşüncesindeyiz.

Biyosürefektanların kan hücreleri ile etkileşimi yapısal özellik, konsantrasyon ve saturasyon gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu çalışmada da izolatlara ait biyosürefektanların hemolitik etkileri test edilmiştir ve biyosürefektanların yüksek derecede hemolitik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Biyosürefektan içermeyen kültürasyon süresince çok düşük miktarda hemoglobinin (0.1g/dL) seruma geçtiği gözlenmiştir. Biyosürefektan içeren kan kültürlerinde ise yüksek derecede hemoliz sonucu hemoglobin moleküllerinin seruma geçtiği belirlenmiştir. En yüksek hemolitik aktivite *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen BS-I biyosürefektanında gözlenmiştir. En düşük hemolitik aktivite ise *Pseudomonas putida* tarafından üretilen BS-III biyosürefektanı ile elde edilmiştir. McClure ve arkadaşları, ramnolipidlerin 12-26 µg/mL konsantrasyonlarında kırmızı kan hücreleri üzerine hemolitik, farklı hayvan hücreleri üzerine 100 µg/mL derişiminde ise saniyeler içerisinde litik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir<sup>(189)</sup>. Noudeh ve arkadaşları ise *Bacillus subtilis* tarafından üretilen surfaktinin yüksek derecede hemoliz aktivitesi sergilediğini rapor etmişlerdir<sup>(190)</sup>. Biyosürefektanlar hücre zarında genişlemelere yol açarak litik etki göstermektedir. Lipid yapıdaki biyosürefektanlar membran yapısına katılarak membran büyüklüğünü arttırmakta ve baloncuk oluşumuna neden olmaktadır. Hücre zarında oluşabilecek böyle bir değişiklik hücre zarı, iskeleti ve stoplazma arasındaki etkileşimde aksamalara neden olmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin lökositlerde kemotaksisi, degranülasyonu inhibe ettiği ve hücre içerisinde önemli değişimlere neden olduğu

rapor edilmiştir. Uzun zincirli yağ asitlerinin makrofaj hücreleri ile etkileşimi sonrasında hücrenin plazma zarı ile iletişimde aksamalar olduğu belirtilmiştir. Biyosümfektanlara ait yağ asidi kuyruklarının hücre membranı yapısına girmesi ile membran bütünlüğünün bozulması söz konusudur. Hücrelerin ramnolipide maruz kalması, anormal stoplazma genişlemesine, membran-hücre iskeleti etkileşiminin bozulmasına ve lizise yol açmaktadır. Ayrıca ramnolipid ve sentetik deterjanların hücre zarı yapısındaki fosfolipid tabakaları üzerine etkileri incelenmiş ve ramnolipidin sentetik formlarına kıyasla fosfolipid tabakanın bozunmasında ve çözünmesinde daha etkili olduğu görülmüştür. Biyosümfektanların eritrosit hücre zarında misel oluşturması zar esnekliğine, geçirgenliğin artmasına ve ani ozmotik lizise yol açmaktadır<sup>(189)</sup>.

Hidrokarbon içeren atık suların mikroorganizmalar tarafından kullanılarak biyosümfektan elde edilmesi ve aynı zamanda bu tür atıkların arıtılması sadece bilimsel gelişme açısından değil endüstriyel uygulanabilirlik açısından da oldukça önemli bir sonuçtur. Petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında görev alan bakterilerin özellikle kirlilik uzaklaştırma çalışmalarında kullanılacak sahanın doğal izolatları olması, bu uygulanabilirliği önemli derecede arttırmaktadır. Bu çalışmada biyosümfektan üretme özelliği saptanan izolatların hidrokarbon yapıdaki bileşikleri parçalama etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla her bir izolat için optimum koşullarla modifiye edilen rafineri atık su örnekleri ile izolatlar on gün süre ile inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla alınan örneklerde hidrokarbon degradasyonu ve biyosümfektan üretimi test edilmiştir. Tüm izolatlarda başlangıç hidrokarbon degradasyonunun oldukça düşük olduğu, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* izolatları için sırası ile %1.8, %1.4, %0.9 ve %0.3 başlangıç degradasyon oranı saptanmıştır. Kültür



ortamında üretilen BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV miktarları ise sırasıyla 28.3, 17.2, 19.3 ve 13.6 mg/L olarak belirlenmiştir. Kültürasyonun beşinci gününde degradasyon oranının önemli bir şekilde arttığı ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* için sırası ile %58.2, %26.2, %44.3 ve %20.18 degradasyon oranına ulaşıldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde izolatların biyosüpfektan üretiminde özellikle dördüncü günde önemli bir artış kaydedilmiştir. Tüm izolatlar için degradasyon süresi arttıkça degradasyon oranının da arttığı belirlenmiştir. Degradasyon 10 gün süre ile devam ettirilmiş ve %79.2 olarak en yüksek degradasyon oranına *Pseudomonas aeruginosa* ile ulaşılmıştır. Kültürasyon süresi sonunda *Pseudomonas fluorescens* ile %54.0, *Pseudomonas putida* için %69.5 ve *Burkholderia cepacia* ile %40.2 hidrokarbon degradasyon oranlarına ulaşılmıştır. Biyosüpfektan üretimi ise onuncu gün sonunda BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV için sırası ile 712, 448, 536 ve 356 mg/L olarak belirlenmiştir. Das ve Mukherjee, petrol ve türevleri ile kontamine olmuş bölgelerden izole ettikleri *Bacillus subtilis* DM-04 ve *Pseudomonas aeruginosa* M türleri ile topraktaki hidrokarbon kirliliğinin sırası ile %53 ve %75 oranında giderildiğini belirtmişlerdir<sup>(171)</sup>. Zhang ve arkadaşları ise *Pseudomonas aeruginosa* ile %58 oranında hidrokarbon degradasyonunu rapor etmişlerdir<sup>(73)</sup>.

Biyodegradasyon hidrokarbon yapıdaki kontaminantlar gibi kimyasal bileşiklerin enerjiye, hücre kütesine ve metabolitlere dönüşümünü sağlamaktadır. Hidrokarbon degradasyonu süresince izolatlar tarafından biyosüpfektan üretildiği ve kültür ortamına salınan biyosüpfektan miktarının artması ile hidrokarbon degradasyonunun da önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç biyosüpfektanların hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek çözünemeyen bileşiklerin yüzey alanlarını arttırması ile açıklanabilir. Bu yolla bu tür

bileşiklerin biyolojik kullanılabilirmeleri ve biyodegradasyonu kolaylaşmaktadır<sup>(66)</sup>. Ayrıca biyosürefektan salınımı ile hücre zarı yapısındaki lipopolisakkaritlerin ekstrakte olması hücre yüzey hidrofobisitesini arttırmakta ve hücre ile hidrokarbon etkileşime girerek degradasyon oranı artmaktadır<sup>(73)</sup>. Bardi ve arkadaşları, nitrobenzenin 100 saat içerisinde %52 oranlarda degrade edilirken, b-siklodekstrin ilavesi sonrasında 100 saatte degradasyon oranının %96'ya ulaştığını rapor etmişlerdir. Dodekanın ise benzer şekilde 9 gün yerine biyosürefektan ilavesi ile 4 günde degrade edildiğini rapor etmişlerdir<sup>(191)</sup>. Zhang ve arkadaşları, *Pseudomonas* tarafından üretilen ramnolipidin oktadekan dispersiyonunu ve biyodegradasyonunu hızlandırdığını ve 1L ramnolipid çözeltisinde bulunan oktadekanın % 20'sinin 84 saat içinde mineralize olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca kültür ortamına 0.22 g/L ramnolipid ilavesi ile biyodegradasyon oranının %58'e ulaştığını belirtmişlerdir<sup>(73)</sup>.

İzolatlar tarafından hidrokarbon biyodegradasyonunda 3-4 günlük bir durgunluk fazı saptanmıştır. Bu faz süresince biyosürefektan üretiminin de düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç rafineri atık sularındaki karbon kaynaklarının kullanılabilirliğinin düşük olması ile mikrobiyal metabolizma için gerekli enerjinin sağlanamaması ile açıklanabilir. Belirli bir adaptasyon süresi sonunda biyosürefektan üretiminin de artmasının etkisiyle hidrokarbon çözünürlüğünün ve mikroorganizmaların üremesi için gerekli besin kaynağına ulaşılabilirliğin artması degradasyon oranını da arttırmaktadır. Mikroorganizmaların hidrokarbonlara adaptasyonunda; (i) spesifik enzimlerin uyarılmaları ya da baskılanmaları, (ii) yeni metabolik özellikler ile sonuçlanan genetik değişiklikler ve (iii) hidrokarbon kullanabilen mikroorganizmaların seçici olarak çoğalması olmak üzere üç mekanizma baskın olarak gerçekleşmektedir. Benzer şekilde Walker<sup>(40)</sup> ve Floodgate<sup>(39)</sup> mikroorganizmaların kısa bir adaptasyon süresi sonrasında degradasyon

performanslarında artış gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Hidrokarbon yapıdaki bileşiklere adaptasyon süresince mikroorganizmalarda amplifikasyon, gen transferi ve plazmit aktarımı gibi genetik mekanizmaların gerçekleştiği belirlenmiştir. Hidrokarbon degradasyon genlerini taşıyan plazmid DNA'ları adaptasyonda önemli role sahiptir. Naftalen, ksilen ve salisilat metabolik yollarının *Pseudomonas* sp.'de plazmidte kodlandığı belirtilmiştir. Ayrıca doğal mikrobiyal populasyonların hidrokarbonlara maruz kalması sonrasında tüm populasyonda plazmid sıklığının arttığı belirlenmiştir<sup>(38)</sup>. Hada ve Sizemore, Meksika Körfezi'nde aktif petrol bölgelerinden alınan örneklerde 440 *Vibrio* izolatı tayin etmiş ve bu izolatların yüksek sıklıkta plazmid taşıdıklarını rapor etmiştir<sup>(192)</sup>.

Rafineri atık sularında bulunan hidrokarbonlar farklı zincir uzunluğuna sahip kompleks bir karışımdan oluşmaktadır. İzolatların hidrokarbon degradasyonuna ait GC kromatogramlarında gözlenen pik yoğunlukları değerlendirildiğinde düşük zincirli hidrokarbon degradasyonunun daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Hidrokarbonlar mikrobiyal erişim bakımından n-alkanlar>dallanmış alkanlar>düşük moleküler ağırlıklı aromatikler>siklik alkanlar olarak sıralanmaktadır. Alkanlar ve düşük moleküler ağırlıklı hidrokarbonların karbondioksit kadar yıkılabildiği, yüksek moleküler ağırlıklı aromatik hidrokarbonların ise genellikle mikrobiyal degradasyona karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir<sup>(43,193,194)</sup>. Heitkamp ve arkadaşları, üç aromatik halka içeren düşük moleküler ağırlıklı PAH'ların çoğu mikroorganizma tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilirdiğini fakat yüksek moleküler ağırlıklı hidrokarbon kullanımının kısıtlı olduğunu belirtmişlerdir<sup>(195)</sup>. Rahman ve arkadaşları, *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp. ve *Pseudomonas* sp.'den oluşan bir populasyon ile 8–11 karbon zincirli

hidrokarbonlarla %100, 12-21 uzunluğundaki hidrokarbonlara %83-98, 22-31 karbon zincirli hidrokarbonlarla ise %85 biyodegradasyon oranına ulaşmışlardır<sup>(196)</sup>.

Sonuç olarak çevresel kontaminant olan poliaromatik hidrokarbonların biyolojik olarak iyileştirilmesinde mikroorganizmaların kullanılması, gelişen endüstri içinde meydana gelebilecek atıkların yok edilmesinde veya bu bileşiklerin ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılabilecek uygun bir yöntem olabileceği belirlenmiştir. Petrol ve türevlerini içeren atık suların mikroorganizmalar tarafından kullanılarak biyosümfektan elde edilmesi ve aynı zamanda bu tür atıkların arıtılması sadece bilimsel gelişme açısından değil endüstriyel uygulanabilirlik açısından da oldukça önemli bir sonuçtur. PAH ile kirlenmiş ortamlardan izole edilecek PAH parçalayan bakterilerin, kontamine olmuş ortamlara ekilmeleri, ekosistem dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacaktır. Bu çalışma ile poliaromatik hidrokarbonlardan kaynaklanan çevre kirliliği ile mücadele etmek ve toplumların hayat kalitesini iyileştirmek amacıyla pahalı teknikler ve prosesler yerine, doğadaki mevcut biyolojik sistemlerin kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca doğal olarak mevcut biyolojik sistemlerin yanı sıra, biyolojik materyallerden elde edilen biyosümfektanların da biyolojik iyileştirmede göz ardı edilemeyecek bir etkinliğe sahip oldukları saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Oil in the Sea-inputs, Fates and Effects. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C., 1985.
2. Ö. Egemen, Çevre ve Su Kirliliği, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, **42**, 21(1999).
3. W. W. Eckenfelder, Industrial Water Pollution Control, McGraw-Hill International Editions, 1989.
4. A. K. Halkman ve M. Atamer, Endüstri ve Çevre İlişkileri, <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/5tk02/44.pdf> (erişim tarihi 15.05.2007)
5. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı, Küçük Sanatlar ve Sanayi Bölgeleri ve Siteleri Genel Müdürlüğü, KSS ve OSB Sanayi Bölgeleri İstatistikleri, 2004.
6. U. Altınbaş, S. Dökmeci ve A. Barıştıran, Environmental Technology, **16**, 389(1995).
7. I. Demir ve Z. Demirbağ, Tr. J. of Biology, **23**, 293(1999).
8. R. S. Makkar and K. J. Rockne, Environmental Toxicology and Chemistry, **22**, 2280(2003).
9. DİE, Yıllık Sanayi ve Çevre İstatistikleri, 2000.
10. H. Doğanay, Enerji Kaynakları, Şafak Yayınevi, Erzurum, 1998.

11. E. M. Kamil, Uluslararası Petrol Arama ve Üretim Yatırımlarının Yapısı ve Finansal Yönden İncelenmesi, Ankara: Turkish Petroleum International Co. Lim. Ya. Eğitim Yayınları, 1996.
12. F. Önertürk, Petrol ve Ekonomisi Üzerine, Ankara: Maliye Bakanlığı Yayınları, 259(1983).
13. İ. Artüz, Gemi Kökenli Deniz Kirlenmesi, İTÜ Gemi İnşaatı Teknik Kongresi Bildiri Kitapçığı, **295**, 301(1989).
14. D. Y. Faschchuk, Ekologia Morya, Kiev, Naukova Dumka, **38**, 27(1991).
15. Y. Sevil, Dünyada ve Türkiyede Petrol, Ankara: T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Ekonomik Araştırmalar ve Değerlendirme Genel Müdürlüğü Yayınları, 2003.
16. N. Acun, Dünya Petrol Tarihi Ve Türk Petrolü, Şaka Matbaası Yayın Yeri: İstanbul, 1949.
17. Ş. Üşümezsoy ve Ş. Şen, Yeni Dünya Petrol Düzeni ve Körfez Savaşları, İstanbul: İnkilap Yayınları, 2003.
18. F. Yönsel, Deniz ulaşımı ve deniz kirliliği, <http://www.turkishpilots.org/cevre/denizkirliligi/fyonsel.html> (erişim tarihi 02.05.2008).
19. İ. Talınlı ve K. Sarıöz, Marmara Kıyı Alanında Petrol Dökülmesine Bağlı Çevresel Hasar Değerlendirmesi (<http://www.ins.itu.edu.tr/cevre/personel/talinli/>) (erişim tarihi 02.05.2008).
20. A. Kocataş, Research on the effects of pollutants on Marine communities and ecosystems (MED POL V) MAP Techn. Rep. Ser. No.5 UNEP, Athens, 1986.

21. F. Baykut, G. Yurder ve N. Çalışkan, Marmara denizinin Kirlenme etüdü. I.Ü.Çevre Sorunları Araştırma Merkezi, İstanbul, 1984.
22. M. L. Artüz, Changes in production and diversity in the Marmara Region. In Sea Disposal of Wastes rom Small and Mediumsized Communities. I.T.U. and WHO, Ankara, 1977.
23. M. L. Artüz, Petrol kirlenmesi açısından denizlerimizde durum, M.B.B. Natural Resources, **12**, 1(1991).
24. M. I. Artüz, F. Baykut, Marmara Denizinin Hidrografisi ve Su Kirlenmesi Açısından Bilimsel Etüdü, I.Ü. Çevre sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, 1986.
25. C. E. Zobell, The occurance, effect and fate of the oil Polluting the Sea, Adv. Water Pollution Res., **1**, 85(1964).
26. O. G. Miranov, The effect of oil pollution on flora and fauna of the Black and its effects on the living resources and fishing, FAO. Roma, 1970.
27. NAS. Petroleum in Marine Environment. Washington D.C. National Acad. of Sc., Washington, 1975.
28. S. Nelson, Oil Pollution and Marien Ecology, Elek. Science, London, 1972.
29. O. H. Oren, Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters, MAP Techn Rep. Ser. No.1. UNEP Athens, 1986.
30. H. Timur ve U. Altınbaş, Environmental Technology, **18**, 339(1997).
31. Ö. Y. Emcet, Pis Su Arıtma Tesisleri, İller Bankası Yayınları, Ankara, **15**, 24(1976).

32. D. A. Feriello, J. R. Mylroie, D. T. Gibson, J. E. Rogers and A. M. Chakrabarty, *J. Bacteriol.*, **127**,1217(1976).
33. H. Kanemitsu, M. Fukuda and K. Yano, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 175(1980).
34. K. Yano and T. Nishi, *J. Bacteriol.*, **145**, 552(1980).
35. J. I. Davies and W. C. Evans, *J. Biochem.*, **91**, 251(1964).
36. H. Kiyohara, K. Nagao and R. Nomi, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1075(1976).
37. C. E. Cerniglia, Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York, 1984.
38. J. G. Leahy and R.R. Covell, *Microbiol. Rev.*, **54**, 305(1990).
39. G. Floodgate, The fate of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmilan Publishing Co., New York, 1984.
40. J. D. Walker, R. R. Colwell, Z. Vaituzis and S. A. Meyers, *Nature*, **254**, 423(1975).
41. J. M. Thomas, J. R. Yordy, J. A. Amador, and M. Alexander, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 290(1986).
42. P. Fusey and J. Oudot, *Mar. Pollut. Bull.*, **15**, 136(1984).
43. R. M. Atlas and R. Bartha, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1851(1972).



44. C. F. Gibbs, K. B. Pugh and A. R. Andrews, Quantitative studies on marine biodegradation of oil. II. Effect of temperature, Proc. R. Soc., London, Ser. B, **188**, 83(1975).
45. M. E. Singer and W. R. Finnerty, Genetics of hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: Atas, R.M. (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York, U.S.A., 1984.
46. J. J. Perry, Microbial metabolism of cyclic alkanes. In: Atas, R.M. (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing co., New York, 1984.
47. G. A. Hambrick, R. D. DeLaune and W. H. Patrick, Appl. Environ. Microbiol., **40**, 365(1980).
48. M. P. Shiaris and D. Jambard-Sweet, Polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbour. Massachusetts, U.S.A. Mar. Pollut. Bull., **17**, 469(1986).
49. D. Ward and T. D. Brock, Appl. Environ. Microbiol., **35**, 353(1978).
50. J. T. Dibble and R. Bartha, Appl. Environ. Microbiol., **37**, 729(1979).
51. W. Verstraete, R. Vanlooche, R. DeBorger and A. Verlinde, Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers, Proceeding of the 3rd International Biodegradation Symposium Applied Science Publishers Ltd., London, 1976.
52. G. A. Hambrick, R. D. DeLaune and W. H. Patrick, Appl. Environ. Microbiol., **40**, 365(1980).
53. D. K. Jain, D. L. Collins-Thompson, H. Lee and J. T. Trevors, Journal of Microbiological Methods, **13**, 271(1991).

54. T. Neu, K. C. Marshall, *J Biomat Appl.*, **5**, 107(1990).
55. I. M. Banat, R. S. Makkar and S. S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 495(2000).
56. R. Miller and R. Bartha, *Appl Environ Microbiol.*, **55**, 269(1989).
57. C. Schippers, K. Gessner, T. Mueller and T. Scheper, *J Biotechnol.*, **83**, 189(2000).
58. W. Tang, J. White and M. Alexander, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 117(1998).
59. T. Poeton, H. Stensel and S. Strand, *Water Res.*, **33**, 868(1999).
60. C. E. Cerniglia, Aromatic hydrocarbons: Metabolism by bacteria, fungi, and algae. In: Hodgson, E., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (ed.), *Reviews in Biochemical Toxicology*, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York, 1981.
61. S. Lang and F. Wagner, Structure and properties of biosurfactants, *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1987.
62. J. D. Desai and A. J. Desai, Production of biosurfactants, *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
63. A. Uysal ve A. Türkman, Klorofenollü Bileşiklerin Ayrışabilirliğinin Biyosürefektan Kullanımı ile Hızlandırılması, *SSKD*, **14**, 23(2004).
64. I.M. Banat, *Biores. Technol.*, **51**, 1(1995).
65. R. S. Makkar and S. S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 428(2002)

66. S. Barathi, N. Vasudevan, *Environ. Intl.*, **26**, 413(2001).
67. Y. Zhang and R. M. Miller, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3276(1992).
68. E. Deziel, G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine and J. Bisailon, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1908(1996).
69. J. Zhang, A. Gorkovenko, R. A. Gross, A. L. Allen and D. Kaplan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **20**, 9(1997).
70. A. Casariego, B.W.S. Souza, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, L. Cruz and R. Díaz, *Food Hydrocolloids*, **22**, 1452(2008).
71. E.Z. Ron and E. Rosenberg, *Environ. Microbiol.*, **3**, 229(2001).
72. T. R. Neu and K. Poralla, *Microbiological Review*, **60**, 151(1996).
73. Y. Zhang and R. M. Miller, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2101(1994).
74. E. Rosenberg, C. Rubinovitz, A. Gottlieb, S. Rosenhak and E. Z. Ron, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 317(1998).
75. M. Rosenberg and E. Rosenberg, *J. Bacteriol.*, **148**, 51(1981).
76. J. D. Desai and I. M. Banat, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 47(1997).
77. J. D. Desai and A. J. Desai, *Production of biosurfactants, Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
78. S. Lang, *Biological amphiphiles (microbial biosurfactants), current Opinion in Colloid and Interface Science*, **7**, 12(2002).

79. F. G. Jarvis and M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4124(1949).
80. S. Itoh and T. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2233(1972).
81. C. Syldatk, S. Lang and F. Wagner, *Z. Naturforsch.*, **40**, 51(1985).
82. L. H. Guerra-Santos, O. Kappeli and A. Flechter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 443(1986).
83. C. Asselineau and J. Asselineau, *Prog. Chem. Fats Lipids*, **16**, 59(1978).
84. D. G. Cooper, S. N. Liss, R. Longay and J. E. Zajic, *J. Ferment. Technol.*, **59**, 97(1989).
85. Z. Li, S. Lang, F. Wagner, L. Witte, V. Wray, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 610(1984).
86. D. G. Cooper and D. A. Paddock, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 173(1984).
87. D. G. Cooper and D. A. Paddock, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1426(1983).
88. P. Tulloch, A. Hill and J. F. T. Spencer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1967**, 584(1967).
89. M. Marahiel, W. Denders, M. Krause and H. Kleinkauf, *Eur. J. Biochem.*, **99**, 49(1977).
90. T. Suzuki, K. Hayashi, K. Fujikawa and K. Tsukamoto, *J. Biol. Chem.*, **57**, 226(1965).
91. H. W. Knoche and J. M. Shiveley, *J. Biol. Chem.*, **247**, 170(1972).
92. T. Yamane, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **64**, 1657(1987).

93. Y. Tahara, Y. Yamada and K. Kondo, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 243(1976).
94. Y. Tahara, K. Shinmoto, Y. Yamada and K. Kondo, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1447 (1978).
95. K. Arima, A. Kakinuma and G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 488(1968).
96. M. J. McInerney, M. Javaheri and D. P. Nagle, *Ind. Microbiol.*, **5**, 95(1990).
97. M. C. Cirigliano and G. M. Carman, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 846(1985).
98. O. Kappeli and W. R. Finnerty, *J. Bacteriol.*, **140**, 707(1979).
99. A. Kretschmer, H. Bock and F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 864(1982).
100. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 402(1979).
101. A. Zukerberg, A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick and E. Rosenberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 414(1979).
102. E. Rosenberg, C. Rubinovitz, R. Legmann and E. Z. Ron, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 323(1988).
103. A. J. Desai, K. M. Patel and J. D. Desai, *Curr. Sci.*, **57**, 500(1988).
104. M. Singh and J. D. Desai, *Indian J. Exp. Biol.*, **27**, 224(1989).
105. A. Fattom and M. Shilo, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 3(1985).

106. M. Roggiani and D. Dubnau, *J. Bacteriol.*, **175**, 3182(1993).
107. N. Kosaric, *PureAppl Chem.*, **64**, 1731(1992).
108. A. P. Tulloch, J. F. T. Spencer and P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.*, **40**, 1326(1962).
109. A. M. Chakrabarty, *Trends Biotechnol.*, **3**, 32(1985).
110. F. Besson and G. Michel, *Biotechnol. Lett.*, **14**, 1013(1992).
111. G. Hauser and M. L. Karnovsky, *J. Biol. Chem.*, **233**, 287(1958).
112. A. Persson, G. Molin and C. Weibull, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 686(1990).
113. D. G. Cooper, C. R. MacDonald, S. J. B. Duff and N. Kosaric, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 408(1981).
114. A. S. Abu-Ruwaida, I. M. Banat, S. Haditirto and A. Khamis, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 53(1991).
115. E. Z. Ron and E. Rosenberg, *Current Opinion Biotechnol.*, **13**, 249(2002).
116. A. Oberbremer, R. Muller-Hurtig and F. Wagner, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 485(1990).
117. L. Thimon, F. Peypoux and G. Michel, *Biotechnol Lett.*, **14**, 713(1992).
118. C. N. Mulligan, R. N. Yongand, B. F. Gibbs, *Environ Sci. Technol.*, **33**, 3812(1999).

119. D. Kitamoto, H. Yanagishita, T. Shinbo, T. Nakane, C. Kamisawa and T. Nakahara, *J. Biotechnol.*, **29**, 91(1993).
120. D. Haferburg, R. Hommel, H. P. Kleber, S. Klug, G. Schuster and H. J. Zchienger, *Acta Biotechnol.*, **7**, 353(1987).
121. L. Rodrigues, *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**, 609(2006).
122. A. Abalos, A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. Garcia and A. Manresa, *Langmuir*, **17**, 1367(2001).
123. D. S. Yoo, B. S. Lee and E. K. Kim, *Journal of Microbiology & Biotechnology*, **15**, 1164(2005).
124. T. Rogers, J. Neilson and R. Maier, Department of Soil, Water and Environmental Science, university of Arizona, AZ, [www.blc.arizona.edu/ubrp](http://www.blc.arizona.edu/ubrp), 2002.
125. A. Fiechter, *Trends in Biotechnology*, **10**, 208(1992).
126. R. Shephord, J. Rockey, I. W. Shutherland and S. Roller, *J. Biotechnol.*, **40**, 207(1995).
127. T. Kachholz and M. Schlingmann, Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. In N. Kosaric, W. L. Carns, & N. C. C. Gray (Eds.), *Biosurfactants and biotechnology* (pp. 183-210). New York: Marcel Dekker, 1983.
128. V. Haesendonck, I. P. H., and E.C. Vanzeveren, Rhamnolipids in bakery products. W.O. 2004/040984, International application patent (PCT), 2004.
129. N. Kosaric, *Food Technology and Biotechnology*, **39**, 295(2001).

130. A. Passeri, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 281(1992).
131. S. Mukherjee, P. Das, R. Sen, *Trends Biotechnol*, **24**, 509(2006).
132. W. Bednarski, J. Adamczak, J. Tomasik and M. Plaszczyk, *Bioresource Tech.*, **95**, 15(2004).
133. M. Deshpande and L. Daniels, *Bioresource Technol.*, **54**,143(1995).
134. U. Sidal, N. Kolonkaya, C. Kutronur, *Turk J Biol.*, **24**,611 (2000)
135. A.A. Bodour and R. M. Miller, *Journal of Microbiological Methods*, **32**, 273(1998).
136. K.V. Ramana and N.G. Karanth, *J. of Chem. Tech. and Biotech.*, **45**, 249(1989).
137. R. G. Spiro, *Methods Enzymol.*, **8**, 7(1966).
138. J. D. Fontenot, *Peptide Research*, **4**, 194 (1991).
139. J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane-Stanley, *J. Biol Chem.*, **226**, 497(1957).
140. C. M. Collins and P.M. Lyne, *Microbiological Methots Buttermorths&Co (publishers) Ltd. London* **450**, 1987.
141. A.P. David and J.P. McCuen, *Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. Sixth Edition, U.S.A*, 67-72, 1988.
142. L.J. Bradshaw, *Laboratory Microbiology. Fourth Edition. Printed in U.S.A.* 435, 1992.



143. S. G. Deans and K.P. Svoboda, The microbial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil, *Flavour Fragr. J.*, **5**, 187(1990).
144. L. Thimon, F. Peypoux and J. Wallach, *FEMS Microbiol Lett*, **128**, 101(1995).
145. A IOC, Manuel for monitoring oil and dissolved/disperced petroleum hydrocarbons in marine waters and on beaches, Intergovernmental Oceanographic Commission, 1989.
146. M. M. Brinton and L. Warren L, *Petroleum Microbiology. Industrial Microbiology*, Elsevier press, New York. pp. 17-23, 1976.
147. S. A. Wemedo, O. Obire and D. A. Dogubo, *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, **6**, 14(2002).
148. R. N. Doetsch, *Bacteria as environmental determinants. Introduction to bacteria and their Ecobiology* Elsevier press, New York. pp. 326-328, 1973.
149. J. N. Okereke, S. O. Obiekezie and K. O. Obasi, *African Journal of Biotechnology*, **6**, 991(2007).
150. S.B. Batista, A.H. Mounteer, F.R. Amorim and M.R. Totola, *Bioresource Technology*, **97**, 868(2006).
151. G. A. Plaza, I. Zjawiony and I. M. Banat, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **50**, 71(2006).
152. R. J.S. Jacques, E. Santosa, F. M. Bentoa, M. C.R. Peralbab, P. A. Selbacha, E.L.S. Saa and F.A.O. Camargo, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **56**, 143(2005).

153. D. Bhattacharya, P. M. Sarma, S. Krishnan, S. Mishra, and B. Lal, *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1435(2003).
154. N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp and M. J. McInerney, *Journal of Microbiological Methods*, **56**, 339(2004).
155. M. Nitschke and G. Maria Pastore, *Bioresource Technology*, **97**, 336(2006).
156. I. O. Moraes, R. M. Benincasa and R. M. Alegre, *Braz. J. Food Technol.*, **5**,145(2002).
157. M. Benincasa, J. Contiero, M.A. Manresa and I.O. Moraes, *Journal of Food Engineering*, **54**,283(2002).
158. B. K. Tuleva, G.R. Ivanov and N. E. Christova, *Z. Naturforsch*, **57**, 356(2002).
159. S. Arino, R. Marchal and J. P. Vandecasteele, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 162(1996).
160. W. R. Finnerty and M. E. Singer, *Dev. Ind. Microbiol.* **25**,31(1985).
161. Z. Duvnjak, and N. Kosaric, *Biotechnol. Lett.*, **7**, 793(1985).
162. M. E. Mercadé and M. A. Manresa, *J of the Am. Oil Chem. Society.*, **71**, 61(1994).
163. S. S. Cameotra, and R. S. Makkar, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**, 520(1988).
164. N. W. Gunther, N. Alberto, F. William and K. Y. Daniel, *Applied And Environmental Microbiology*, **22**, 88(2005).

165. L. Sim, O.P. Ward, Z. Y. LI, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **19**, 232(1997).
166. H. Rashedi, E. Jamshidi, M. Mazaheri Assadi and B. Bonakdarpour, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **2**, 121(2005).
167. O. Langer, O. Palme, V. Wray, H. Tokuda and S. Lang, *Process Biochemistry*, **41**, 2138 (2006).
168. R. M. Patel and A. J. Desai, *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**, 91(1997).
169. E. Haba, M. J. Espuny, M. Busquets and A. Manresa, *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 379(2000).
170. O. G. Beker, O. Kural and M. Dağalp, *Kömürün briketlenmesi, Kömür Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri, Üzgün Ofset Matbaacılık, İstanbul: 453 (1998).*
171. K. Das and K. Mukherjee, *Bioresource Tech.*, **98**, 1339(2006).
172. Y. Lee, S.Y. Lee and J.W. Yang, *Biotechnology and Biochemistry*, **63**(5), 946(1999).
173. C. Chayabutra, J. Wu and L.K. Ju, *Biotechnology and Bioengineering*, **72**, 25(2001).
174. A. Margaritis, K. Kennedy, J.E. Zajic and D.F. Gerson, *Developments in industrial Microbiology*, **20**, 621(1979).
175. R. E. W. Hancock and P. G. W. Wongantı, *Microbial Agents and Chemotherapy*, **26**, 48(1984).

176. A. F. Holleman, E. Wiberg, Inorganic Chemistry. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-352651-5, 2001.
177. Z. Hua, R. Song, G. Dua, H. Li and J. Chen, Biochemical Engineering Journal, **36**, 66(2006).
178. P. G. Reddy, H. D. Singh, M. G. Pathak, S.D. Bhagat and J. N. Baruah, Biotechnology and Bioengineering, **25**, 387(1983).
179. T. Tuğrul, *Pseudomonas aeruginosa*'dan Biyosurfektan Madde Sentezini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Araştırılması, Bilim Uzmanlığı Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2003.
180. W.B.D. Thomas and D.J. Hall, J. Colloid and Interface Sci., **51**, 328(1975).
181. F. W. Pierson and S. Whitaker, J. Colloid and Interface Sci., **54**, 219(1976).
182. M.O. Ilori, C.J. Amobi and A.C. Odocha, Chemosphere, **61**, 985(2005).
183. Y. Durak, M. Kır, B. Özkalp ve M. O. Aladağ, Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, **2**, 4(2007).
184. R. Duman, H. H. Doğan ve A. Ateş, SÜ Fen Ed Fak Fen Derg., **22**,19(2003).
185. A. Ciegler, R.W. Detroy and F.B. Lileho, Patulin, Penicillic asid and other Carcinogenic Lactones. Microbial. Toxins., Fungal Toxins, 1971.
186. J. Gerard, R. Lloyd and T. Barsby, J Nat Prod., **60**, 223(1997).
187. D. Marani, G. Macci and M. Pagano, Water Research, **29**,1085(1995).

188. F. J. Ochoa-Loza, J. F. Artiola and R. M. Maier, *J. Environ. Qual.*, **30**, 19(2001).
189. D. Carol McClure, N. L. Schiller, *Journal of Leukocyte Biology*, **51**, 23(1992).
190. G. Dehghan-Noudeh, M. Housaindokht and B. S. Bazzaz, *Journal of Microbiology*, **43**, 272(2005).
191. L. Bardi, A. Mattei, S. Steffan and M. Marzona, *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 709(2000).
192. H. S. Hada and R.K.Sizemore, R.K., *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 199(1981).
193. Thomas, J. M., J. R. Yordy, J. A. Amador, and M. Alexander, *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 290(1986).
194. Traxler, R. W., and L. S. Bhattacharya, Effect of a chemical dispersant on microbial utilization of petroleum hydrocarbons, p. 180-187. In L. T. McCarthy, Jr., G. P. Lindblom, and H. F. Walter (ed.), *Chemical dispersants for the control of oil spills*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979.
195. M.A. Heitkamp and C. E. Cerniglia, *Applied And Environmental Microbiology*, **1968**(1989).
196. K.S.M. Rahman, I.M. Banat, T.J. Rahman, T. Thayumanavan, and P. Lakshmanaperumal, *Bioresource Technol.*, **81**, 25(2002).

## ÖZGEÇMİŞ

15.05.1979 tarihinde Kırıkkale’de doğdu. Orta ve lise öğrenimini Kırıkkale Anadolu Lisesinde tamamladı. 2001’de Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2002’de Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2003 yılında Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak “L-Histidin İçeren p(HEMA-MAH) Hidrojellerinin İnsan Serumundan İmmunoglobulin-G Saflaştırılmasında Kullanılması ve İmmunoglobulin-G'nin Saflık Derecesinin YBSK ile Tayini” başlıklı çalışma ile yüksek lisansını; 2008’de aynı Enstitü’ye bağlı olarak “Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar İle Biyosülfektan Eldesi ve Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması” konulu çalışma ile doktorasını tamamladı. Halen Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.