



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PETROL VE TÜREVLERİ İLE KİRLENMİŞ
TOPRAKLARDAN AROMATİK
HİDROKARBONLARI VE PETROLÜ
PARÇALAYABİLEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ferhat KANTAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2019



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PETROL VE TÜREVLERİ İLE KİRLENMİŞ
TOPRAKLARDAN AROMATİK
HİDROKARBONLARI VE PETROLÜ
PARÇALAYABİLEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ferhat KANTAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

KIRŞEHİR / 2019

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Dr. Öğrt. Üyesi Aysel KEKİLLİOĞLU

Üye

Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

Üye

Doç Dr. Makbule ERDOĞDU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

30/07/2019

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ferhat KANTAR



.../.../.....tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek Lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ' ye büyük bir içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca izolatların mikroskopta fotoğrafların çekilmesindeki yardımlarından dolayı Doç.Dr. Makbule ERDOĞDU'ya teşekkürü bir borç bilirim.Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım Hülya AVŞAR'a, Deniz ŞANLI'ya ve M.Yunus Emre KARAMAN'a teşekkürlerimi sunarım. İzolatlarımızın teşhisinde bize destek veren T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkan V. Prof.Dr. Selçuk KILIÇ'a, Doç Dr. Serap SÜZÜK YILDIZ'a ve Dr. Kimyager Yasemin NUMANOĞLU ÇEVİK'e teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen aileme ve yakın arkadaşlarıma sonsuz sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri PYO-ZRT.A4.18.023 kapsamında desteklenmiştir.

Temmuz, 2019

Ferhat KANTAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
TABLO LİSTESİ	IX
RESİM LİSTESİ	XI
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	XV
ÖZET	XVII
ABSTRACT	XIX
1. GİRİŞ	1
1.1. Petrol ve Petrol Türevleri	2
1.2. Hidrokarbonlar	3
1.2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kaynakları	3
1.2.2. Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.	8
1.2.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kaynakları	10
1.2.4. Çevre Üzerinde PAH'ların Etkileri	10
1.3. Sürfektanlar	12
1.3.1. Biyosürfektanlar	12
1.3.2. Biyosürfektanların Yapı ve Fonksiyonları	13
1.3.3. Biyosürfektanların Sınıflandırılması	15
1.3.4. Biyosürfektan Üreten Mikroorganizmaları Belirleme Yöntemleri.....	16
1.3.4.1. Hemolitik Aktivite.....	17
1.3.4.2. CTAB (Setiltrimetilamonyum Bromid) Agar Testi	17
1.3.4.3. Antron Yöntemi.....	17
1.3.4.4. Drop-Collapse Yöntemi.....	18
1.4. Ağır Metaller	18
1.4.1. Ağır Metal Kaynakları.....	19
1.4.2. Ağır Metallerin Çevreye Olan Etkisi.....	20
1.4.3. Mikroorganizmalarda Metal Direnç Mekanizması.....	21
1.4.4. Çalışmada Kullanılan Ağır Metaller.....	24
1.4.4.1. Kobalt (Co).....	24
1.4.4.2. Civa (Hg).....	25

1.4.4.3. Mangan (Mn).....	25
1.4.4.4. Çinko (Zn)	26
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	28
3. MATERYAL VE METOD	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Materyal Örnekleri	42
3.1.2. Kontrol Suşu	44
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri.....	44
3.1.3.1. Nutrient Agar	44
3.1.3.2. Nutrient Broth.....	44
3.1.3.3. Tryptic Soy Agar (TSA).....	45
3.1.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB)	45
3.1.3.5 Zenginleştirilmiş Besiyeri (Ham Petrol İçeren).....	46
3.1.3.6. Mueller Hinton Agar	46
3.1.3.7. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyeri	46
3.1.3.8. Stok Besiyeri	47
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Boyalar.....	47
3.1.4.1. Kristal Viyole	47
3.1.4.2. Safranin.....	48
3.1.5. Tampon ve Çözeltiler	48
3.1.5.1. Lugol Çözeltisi (Gram İyot Çözeltisi)	48
3.1.5.2. KOH Çözeltisi (%3`lük).....	48
3.1.5.3. H ₂ O ₂ Çözeltisi (%3`lük)	49
3.1.5.4. Serum Fizyolojik	49
3.1.5.5. Gliserol	49
3.1.5.6. Mineral Yağ.....	49
3.1.6. Kullanılan Antibiyotikler.....	49
3.1.7. Çalışmada Kullanılan Ağır Metaller.....	49
3.2. Metod.....	56
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu	56
3.2.2. İzolatların Muhafaza Edilmesi.....	56
3.2.3. İzolatlara Uygulanan Morfolojik Testler	56
3.2.3.1. Kültür Özellikleri.....	56
3.2.3.2. Gram Boyama.....	57

3.2.3.3. KOH Testi (% 3 'lük)	57
3.2.3.4. Hareketlilik Testi	58
3.2.4. Bakterilerin Biyokimyasal Testleri.....	59
3.2.4.1. Katalaz Testi	59
3.2.4.2. Oksidaz Testi	59
3.2.5. MALDİ-TOF-MS Yöntemi	60
3.2.5.1. Direkt Transfer Örnek Hazırlama Yöntemi	60
3.2.5.2. Uygulama Alanı.....	60
3.2.5.3. Bruker HCCA Çözünme İşlemi.....	60
3.2.6. Antibiyotik Dirençlilik Testi	60
3.2.7. Ağır Metal Testi	61
3.2.8. İzolatların Biyosüpfektan Üretim Teteneklerinin Tesbiti İçin Ekim ve Kültürasyon	62
3.2.9. İzolatlarda Biyosüpfektan Varlığının Saptanması.....	62
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	63
4.1. İzolatların Elde Edilmesi	63
4.2. İzolatların Morfolojik Testleri	70
4.3. İzolatların Biyokimyasal Testleri	73
4.4. İzolatların Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi.....	77
4.5. Bakterilerin Ağır Metal Dirençliliği	85
4.6. İzolatlarda Biyosüpfektan Üretiminin Saptanması	103
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	106
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. PAH'ların çevredeki dağılımları	11
Şekil 1.2. a. Tekli yapıdaki biyosümfektan, b. Misel yapıdaki biyosümfektan, c. Silindirik yapıdaki biyosümfektan, d. Çift tabakalı biyosümfektan, e. Emülsiyon haldeki biyosümfektan	14
Şekil 1.3. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları	20
Şekil 3.1. Toprak Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırma Basamakları	56
Şekil 4.1. İzolatların çinko direnç yüzdeleri.....	86
Şekil 4.2. İzolatların mangan direnç yüzdeleri.....	90
Şekil 4.3. İzolatların civa direnç yüzdeleri.....	94
Şekil 4.4. İzolatların kobalt direnç yüzdeleri	98

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı.....	6
Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı.....	7
Tablo 1.3. Poliaromatik Hidrokarbonların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
Tablo 1.4. Mikrobiyal Sürfektanların Önemli Tipleri ve Mikrobiyal Kaynakları....	16
Tablo 1.5. Temel Endüstrilerden Çevreye Bırakılan Metal Türleri	19
Tablo 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı Bölgeler	43
Tablo 3.2. Kullanılan Antibiyotiklerin Grupları ve Etki Mekanizmaları	50
Tablo 3.3. Kullanılan Ağır Metallerin Moleküler Formülleri	51
Tablo 4.1. İzolatların Kültür Özellikleri	69
Tablo 4.2. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji, %3'lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları.....	70
Tablo 4.3. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji %3'lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları (Devamı).....	71
Tablo 4.4. İzolatların Katalaz ve Oksidaz Test Sonuçları	74
Tablo 4.5. İzolatların MALDI-TOF MS Biyotiplendirme Tablosu.....	75
Tablo 4.6. İzolatların MALDI-TOF MS Biyotiplendirme Tablosu(Devamı).....	75
Tablo 4.7. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Değerleri.....	81

Tablo 4.8. İzolatlarının Dirençli Oldukları Antibiyotik Sayısı.....	82
Tablo 4.9. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.....	83
Tablo 4.10. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları (Devamı)	84
Tablo 4.11. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Suşuna Ait Zon Çapları (mm)	85
Tablo 4.12. İzolatların Çinko Dirençlilikleri	87
Tablo 4.13. İzolatların Mangan Dirençlilikleri.....	91
Tablo 4.14. İzolatların Civa Dirençlilikleri	95
Tablo 4.15. İzolatların Kobalt Dirençliliği	99
Tablo 4.16. İzolatların Biyosülfektan Üretebilme Yetenekleri	104

RESİM LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 3.1. Petrol depolama alını dolmuş –boşaltım siloları çevresi	52
Resim 3.2. Ham petrol içeren steril besiyerleri.....	53
Resim 3.3. Toprak örneği ilave ham petrol içeren besiyerleri	53
Resim 3.4. Çalkalayıcı inkübatör (180 rpm`de 28 °C`de 72 saat inkübasyon).....	54
Resim 3.5. Steril taze besiyerlerine aktarım	54
Resim 3.6. Üçüncü inkübasyon sonucundaki besiyerleri.....	55
Resim 3.7. İzolasyon (Çizgi ekim).....	55
Resim 3.8. Saf kültür işlemi	55
Resim 3.9. Hareketlilik testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu.....	58
Resim 3.10. Drop Collapse testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu.....	62
Resim 4.1. <i>Staphylococcus hominis</i> (FH 1-1).....	63
Resim 4.2. <i>Bacillus mojavensis</i> (FH 1-2).....	63
Resim 4.3. <i>Bacillus horikoshii</i> (FH 1-3)	63
Resim 4.4. <i>Malikia spinosa</i> (FH 1-4).....	63
Resim 4.5. <i>Agromyces brachium</i> (FH1-5)	64
Resim 4.6. <i>Stenotrophomonas maltophila</i> (FH1-6)	64
Resim 4.7. <i>Enterobacter cloacae</i> (FH 3-3).....	64
Resim 4.8. <i>Bacillus licheniformis</i> (FH 3-4)	64
Resim 4.9. <i>Bacillus subtilis</i> (FH 3-5).....	64

Resim 4.10. <i>Stenotrophomonas maltophila</i> (FH 5-1)	64
Resim 4.11. <i>Ochrobactrum tritici</i> (FH 5-2)	65
Resim 4.12. <i>Citrobacter amalonaticus</i> (FH 5-3)	65
Resim 4.13. Tanımlanamadı	65
Resim 4.14. <i>Enterobacter cloacae</i> (FH 5-5)	65
Resim 4.15. <i>Streptomyces badius</i> (FH 5-6)	65
Resim 4.16. <i>Stenotrophomonas maltophila</i> (FH6-1)	65
Resim 4.17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FH 6-2)	66
Resim 4.18. <i>Cupriavidus necator</i> (FH7-2)	66
Resim 4.19. <i>Bacillus subtilis</i> (FH7-3).....	66
Resim 4.20. <i>Staphylococcus capitis</i> (FH 7-4)	66
Resim 4.21. <i>Enterobacter cloacae</i> (FH 8-2)	66
Resim 4.22. <i>Bacillus cereus</i> (FH 8-3).....	66
Resim 4.23. <i>Bacillus pumilus</i> (FH 8-5)	67
Resim 4.24. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FH 17-1)	67
Resim 4.25. <i>Acinetobacter baumannii</i> (FH 17-2)	67
Resim 4.26. <i>Bacillus licheniformis</i> (FH 17-5)	67
Resim 4.27. <i>Streptomyces lavendulae</i> (FH 17-6).....	67
Resim 4.28. <i>Esherichia coli</i> (FH 18-1)	67
Resim 4.29. <i>Stenotrophomonas maltophila</i> (FH 18-2).....	68
Resim 4.30. <i>Bacillus mojavensis</i> (FH18-3).....	68
Resim 4.31. <i>Staphylococcus aureus</i> (FH 18-4).....	68
Resim 4.32. <i>Enterobacter cloacae</i> (FH 18-5).....	68

Resim 4.33. <i>Bacillus cereus</i> (FH 18-6).....	68
Resim 4.34. İzolatların Gram boyama özelliklerinin mikroskopik görüntüleri.....	72
Resim 4.35. İzolat FH 6-1`in antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin).....	77
Resim 4.36. İzolat FH 6-1`in antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin).....	77
Resim 4.37. İzolat FH 7-3`ün antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)	78
Resim 4.38. İzolat FH 7-3`ün antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin).....	78
Resim 4.39. İzolat FH 17-4`ün antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)	79
Resim 4.40. İzolat FH 17-4`ün antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin).....	79
Resim 4.41. İzolat FH 18-2`nin antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)	80
Resim 4.42. İzolat FH 18-2`nin antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin).....	80
Resim 4.43. İzolat FH 6-1`in çinko direnci (5 mM, 10 mM).....	88
Resim 4.44. İzolat FH 6-1`in çinko direnci (15 mM, 20 mM).....	88
Resim 4.45. İzolat FH 17-1`in çinko direnci (5 mM, 10 mM).....	89
Resim 4.46. İzolat FH 17-2`nin çinko direnci (15 mM, 20 mM)	89
Resim 4.47. İzolat FH 1-1`nin mangan direnci (5 mM, 10 mM).....	92

Resim 4.48. İzolat FH 1-3`ün mangan direnci (5 mM, 10 mM).....	92
Resim 4.49. İzolat FH 1-4`ün mangan direnci (5 mM, 10 mM).....	93
Resim 4.50. İzolat FH 5-2`nin mangan direnci (15 mM, 20 mM).....	93
Resim 4.51. İzolat FH 1-1`in civa direnci (5 mM, 10 mM).....	96
Resim 4.52. İzolat YH 1-2`nin civa direnci (15 mM, 20 mM).....	96
Resim 4.53. İzolat FH 1-3`ün civa direnci (5 mM, 10 mM).....	97
Resim 4.54. İzolat FH 1-3`ün civa direnci (15 mM, 20 mM).....	97
Resim 4.55. İzolat FH 1-6`nin kobalt direnci (5 mM, 10 mM)	100
Resim 4.56. İzolat FH 1-6`nin kobalt direnci (15 mM, 20 mM)	100
Resim 4.57. İzolat FH 17-6`nin kobalt direnci (5 mM, 10 mM)	101
Resim 4.58. İzolat FH 17-6`nin kobalt direnci (15 mM, 20 mM)	101

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
dev/dak	Devir/Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Asitlik-Bazlık Birimi
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BS	Biyosürefektan
CAS	Chemical Abstracts Service- Amerikan Kimya Derneği'nin Bir Alt Bölümü
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromid
ÇAD	Çoklu antibiyotik dirençlilik
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPA	Enviromental Protection Agency- Çevre Koruma Kuruluşu
EPS	Ekzopolisakkarit
FTIR	Fourier Transform Infrared
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry-
LogKoc ³	Organik Karbon Üzerine Adsorblanma Potansiyeli
LogKow	Sudan Lipide Geçiş Potansiyeli
LPG	Sıvılaştırılmış Petrol Gazı
M.Ö.	Milattan Önce
MAH	Monosiklik Aromatik Hidrokarbon
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MIS	Mikrobiyal Tanılama Sistemi
MSM	Mineral Salt Medium Besiyeri
MTC	Maximum Tolerable Metal Concentrations
NA	Nutrient Agar
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

WHO

Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PETROL VE TÜREVLERİ İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDAN AROMATİK HİDROKARBONLARI VE PETROLÜ PARÇALAYABİLEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Ferhat KANTAR

**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

Bu çalışmada kullanılan toprak örnekleri, Mersin ilindeki Kazanlı ve Karaduvar rafineri bölgesinden petrol ve petrol türevlerini içeren alanlardan (doldur, boşalt ve depolama alanları) alınmıştır. Toprak örneklerinden toplam 36 bakteri izole edilmiştir. İzolatlar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS analizi sonuçlarına göre izolatların; *Staphylococcus hominis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus horikoshii*, *Malikia spinosa*, *Agromyces brachium*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Ochrobactrum tritici*, *Citrobacter amalonicus*, *Enterobacter cloacae*, *Streptomyces badius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus capitis*, *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptomyces lavendulae*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir.

İzolatların antibiyotik dirençlilikleri ve toplam antibiyotik direnç yüzdesi 10 farklı ticari antibiyotik kullanılarak belirlenmiştir. Toplam antibiyotik direnç yüzdesinin en yüksek %63.8 ile Nitrofurantoin'e, en düşük % 0 Imipenem'e ait olduğu tespit edilmiştir. Yine izolatların ağır metal dirençlilikleri; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve HgCl_2 ağır metallerinin 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20mM'lık konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiş ve en yüksek ağır metal dirençliliği hem 5 mM hemde 20 mM'lık mangan konsantrasyonlarında gözlenmiştir.

Ayrıca izolatların biyosümfektan üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla "Drop Collapse" metodu kullanılmış ve 7 izolatın biyosümfektan sentezleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda; petrol ve petrol türevlerini içeren alanlardan poliaromatik hidrokarbonları parçalayabilen, ağır metal ile antibiyotiklere karşı direnç gösteren ve biyosümfektan üretme yeteneği olan farklı bakteri türleri elde edilmiştir. Bu özelliklere sahip türlerin biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmasının ekosistemin dengesinin düzenlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Temmuz 2019, Sayfa 124

Anahtar Kelimeler: Petrol ve Petrol türevi, Biyosümfektan, Biyoremediasyon, Antibiyotik Dirençlilik, Ağır Metal Dirençlilik,

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE THESIS

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF AROMATIC HYDROCARBONES FROM PETROLEUM AND DERIVATIVES AND POLLUTED SOILS

Ferhat KANTAR

Kirsehir Ahi Evran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

In this study, soil samples were taken from areas containing petroleum and petroleum derivatives (fill, discharge and storage areas) from Kazanlı and Karaduvar refinery region in Mersin province. A total of 36 bacteria were isolated from soil samples. The isolates were identified by MALDI-TOF MS method as well as morphological, physiological and biochemical tests. According to the results of MALDI-TOF MS analysis; *Staphylococcus hominis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus horikoshii*, *Malikia spinosa*, *Agromyces brachium*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Ochrobactrum tritici*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Streptomyces badius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus capitis*, *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptomyces lavendulae*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus* species.

Antibiotic resistance and total antibiotic resistance percentage of the isolates were determined using 10 different commercial antibiotics. The highest antibiotic resistance percentage was found to be Nitrofurantoin with 63.8% and Imipenem with 0%. Again, the heavy metal resistance of the isolates; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and

HgCl₂ heavy metals were determined using 5 mM, 10 mM, 15 mM and 20 mM concentrations, and the highest heavy metal resistance was observed at both 5 mM and 20 mM manganese concentrations.

In addition, 'Drop Collapse' method was used to determine the ability of isolates to produce biosurfactants and it was found that 7 isolates were capable of synthesizing biosurfactants.

In the results of working; different bacteria species capable of degrading polyaromatic hydrocarbons, resistant to heavy metals and antibiotics and capable of producing biosurfactants were obtained from areas containing petroleum and petroleum derivatives. It is thought that the use of species with bioremediation studies will contribute to the regulation of the ecosystem balance.

July 2019, Page 124

Key Words: Oil and Oil Derivative, Biosurfactant, Bioremediation, Antibiotic Resistance, Heavy Metal Resistance,

1. GİRİŞ

Dünyadaki insan popülasyonunun artması ve sanayi devrimi sonunda petrol ve petrol türevi atıklarında oldukça fazla miktarda artışlar gözlenmiştir. Büyüyen sanayi ve endüstri çalışmaları teknolojinin gelişmesiyle daha fazla enerji gereksinimini doğurmuştur. Bu artan enerji talebi petrol ve petrol ürünlerinin kullanımını arttırarak, petrolün çıkarılmasını, işlenmesini ve nakliyesini gündeme getirmiştir. Bu nakliyeler sırasında ortaya çıkan kazalar, sızıntılar, dikkatsizlikler ise büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir.

Petrol ve petrol türevi içeren hammaddelerin yapıları incelendiğinde poliaromatik hidrokarbon olarak bilinen bileşenlerden oluştuğu görülmektedir. Bunlar yapılarında C ve H atomu içeren organik yapıdaki kararlı bileşikler olup iki ya da daha fazla benzen halkasına sahip hidrofobik karakterli organik bileşikler olup (Zhang ve diğ., 2006; Wcisło, 1998; Wang ve diğ., 2010) içerdiği benzen halkasından dolayı çevre için kirlilik tehdidi oluşturmakta ve benzen halkasının sayısı bu tehditin oranını da arttırmaktadır.

Yukarıda bahsedilen tehlikeye rağmen petrol ve petrol türevlerinden kaynaklanan kirliliğin giderilmesi konusunda kapsamlı çalışma ve bilimsel birikim yeterli değildir. Bu çoklu kirliliğin giderilmesi konusunda bazı araştırmaların yapılması ve uygun yöntemlerin geliştirilmesi günümüzde ihtiyaç haline gelmektedir.

Özellikle taşıma esnasındaki tanker kazalarının ve boru sızıntılarının gerçekleştiği alanlarda petrol ve petrol ürünlerini içeren zor parçalanabilir kompleks yapıdaki bileşikler ve ağır metaller toprakların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler açısından bozulmasına neden olmaktadır (Eraydın-Erdoğan, 2010).

PAH'lar canlıların bir kısmında toksik etki yaparken bazı canlıların besin maddesini oluşturmaktadır. Özellikle mikroorganizmalar bu kirlenici ajanları karbon kaynağı olarak kullanmakta ve metabolik faaliyeti için gerekli olan enerjide bunlardan elde etmektedir. Son yıllarda biyolojik iyileştirme çalışmalarında kullanılmaları oldukça önem kazanmış olup özellikle PAH'ları en iyi oranda parçalama özelliğine sahip yeni mikroorganizmaları araştırmaya yönelik çalışmalara dayoğunluk verilmiştir. Özellikle de doğal ortamlarından izole edilen mikroorganizmaların biyoremediasyon çalışmalarında kullanılması oldukça önemli hale gelmiştir.

Toprakta kirletici ajanların birikmesi o habitattaki canlıların faaliyetlerini etkilemekle birlikte besin zinciri yoluyla diğer canlıların ve dahası insanların sağlığını da tehdit eder hale gelmektedir. Biyoremediasyon yöntemi sayesinde PAH' larda dahil olmak üzere özellikle tehlikeli atıkların temizlenmesi sağlanmaktadır.

Bu çalışmada; Mersin İli Kazanlı Bölgesi Karaduvar-Kazanlı mevki rafineri depolama alanı ile doldur-boşalt istasyonu ve çevresinden poliaromatik hidrokarbonları parçalayabilme özelliğine sahip doğal bakteri türlerinin izolasyonu, tanımlanması, antibiyotik ile ağır metal dirençliliklerinin belirlenmesi ve biyosümfektan üretme yeteneklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede izolatların biyoremediasyon çalışmalarına dolayısıyla sürdürülebilir çevre çalışmalarına da ışık tutacağı düşünülmektedir.

1.1. Petrol ve Petrol Türevleri

Konut, ulaştırma, sanayi, endüstri, enerji ve tarımsal faaliyetlerde oldukça fazla kullanılan petrol kelimesi Yunanca'da taş anlamına gelen "petra" ile yağ anlamına gelen "oleum" terimlerinden meydana gelmiştir. Petrolün yapısı incelendiğinde; %85 karbon, %12 hidrojen, %3 oksijen, azot ve sülfür içeren organik birhidrokarbondan oluştuğu bilinmektedir. Petrol sıvı formda, genellikle koyu yeşil renkli, siyah veya kahverengi olup yanıcı özelliğe sahiptir. Ayrıca suda çözünmeyen ve yapışkan bir özellik gösterir. Petrolün farklı tipleri, içerisinde barındırdığı hidrokarbonların kimyasal yapılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Önertürk,1983; Faschchuk, 1991; Yalçın, 2008; Karaman, 2017).

Birçok kimyasal ürünün (boya, plastik, ve kozmetik) hammaddesi olan petrol ve petrol türevleri endüstride ve günlük hayatta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Ham petrolün işlenmesi sonucunda elde edilen ürünlerden olan normal benzin, uçak yakıtı, fuel oil, süper benzin, kurşunsuz benzin, motorin, sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG), nafta, solvent, gazyağı, asfalt, kalorifer yakıtı, madeni yağ günlük hayatta kullandığımız ihtiyaçlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Mazot, ham petrolün ilk damıtılması sonucu elde edilmiş günümüz koşullarında kullanımından ötürü önemli bir yakıttır bazı durumlarda taş kömürü yerine de kullanılabilir. Amonyak, metanol, etanol, propilen, benzen, gibi temel petrokimya ürünlerinin dışında 4000'in üzerinde petrokimya ürünü bulunmaktadır (Acun, 1949; Sevil, 2003; Yalçın, 2008).

Petrol ve petrol türevlerinin yapısında Poliaromatik hidrokarbon (PAH) olarak adlandırılan karmaşık yapılı hidrokarbonlar bulunmaktadır. Environmental Protection Agency- Çevre Koruma Kuruluşu (EPA) tarafından PAH'ların 16 tanesinin birincil seviyede kirletici ajan olduğu bildirilmiştir.

Poliaromatik hidrokarbonlar çevre kirliliğini oluşturmaları yönünden dünya gündeminde öncelikli hale gelen bileşikler olup petrol türevlerinin salınımları sonucu bulaşmaktadır. Petrol rafineri atıkları, petrol tankerlerinin kazaları, petrol taşıyan gemikazaları, petrol dolum boşaltım istasyonlarındaki sızıntılarve fosil yakıtların tamamının yanmadan atılmaları gibi sebeplerden dolayı ekosistemde petrol kirliliği oluşmaktadır. Bunlar sucul ve karasal ekosistemlerde uzun sürede yok olmayan çevresel bileşikleri oluşturmaktadır (Yalçın, 2008).

1.2. Hidrokarbonlar

Yapısında yalnızca hidrojen ve karbon atomu bulunduran bileşikler hidrokarbon olarak adlandırılır, aromatik ve alifatikhidrokarbonlar olmak üzere iki grupta incelenir.

Aromatik hidrokarbonlar; yapılarında bir veya daha fazla benzen halkası bulunduran bileşiklerdir. Benzen halkası karbon atomları arasında sırasıyla bir tekli ve bir çift bağ bulunduran en basit aromatik bir hidrokarbondur. Aromatik hidrokarbonlar ise monosiklik aromatik hidrokarbonlar (MAH) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır.

Alifatik hidrokarbonlar; yapısal olarak dallanmış yada düz zincirli, bağ sayısına göre ise doymamış yada doymuşolarak sınıflandırılmaktadır. Doymuş hidrokarbonların karbon atomları aralarında tekli hidrojen bağı mevcut iken doymamış hidrokarbonların karbon atomları arasında ise ikili veya üçlü hidrojen bağı bulunmaktadır. Alifatik hidrokarbonlar alkanlar, alkenler ve alkinler diye üç gruba ayrılır.

1.2.1.Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Petrol döküntüleri, fosil yakıtların tamamen yanmadan atılması, bunların kullanımı sırasındaki ihmal ve hatalardan kaynaklanan bulaşmalar, karasal ve sucul ekosistemlerde uzun süre kalan PAH'lar çeşitli çevrelere taşınarak ve birikerek ekolojik dengede tahribata neden olmakta olup bu sorunların hepsine tüm dünyada çözüm aranmaktadır (Karakaya, 2003; Yunker ve Macdonald, 2003; Martinez ve diğ., 2004; Kösel, 2008).

Genel olarak polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliaromatik hidrokarbonlar olarak da bilinmektedir. Bunlar iki yada daha çok benzen halkasından oluşmuş hidrobobik ve hidrofilik özellikler gösteren organik bileşiklerdir (Wcislo, 1998 ; Zhang ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2010; Alver ve diğ., 2012; Saygılı, 2012; Kılıç, 2015).

PAH'lar lipofilik yapıda olmaları nedeniyle yağda çözünme oranları yüksek olup bunun aksine hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlük oranları oldukça düşüktür. Bu özellikleri sebebi ile toprakta, sedimentlerde ve yağ içeren maddelerde hava ve suya oranla daha fazla bulunmaktadır (Saygılı, 2012).

Poliaromatik hidrokarbonlar geniş bir organik bileşik grubu oluştururlar. Dörtten az benzen halkası bulunduranlar hafif PAH, yapısında dört veya dörtten daha fazla benzen halkası bulunduranlar ağır PAH olarak gruplandırılırlar (Danyi ve diğ.,2009;Alver ve diğ., 2012; Kılıç, 2015).

Hafif PAH'lara nazaran ağır PAH'ların sudaki çözünürlükleri ve buhar basınçları daha düşüktür. Yapısında bulunan benzen halkalarının sayısı arttıkça çözünürlük oranları ve buhar basıncı azalmakta olup toksik ve kanserojenik özellikleri de artış göstermektedir (Wenzl ve diğ., 2006 ; Ferrarese ve diğ., 2008; Alver ve diğ., 2012; Kılıç, 2015).

Aynı zamanda poliaromatik hidrokarbonlar çevre kirliliği açısından oldukça önemli bir sınıfı oluşturmalarının yanısıra kanserojen, mutajen ve hücreler için toksik bir etki göstermektedirler (Kabadayı, 2003; Kalkan, 2012).

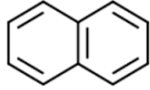
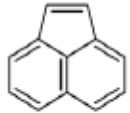
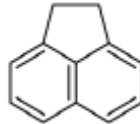
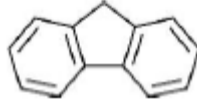
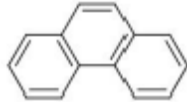
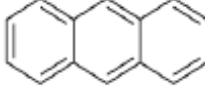
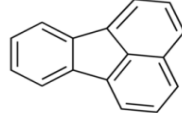
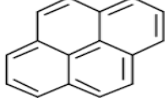
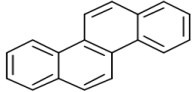
1775`de Londra`da bulunan St. Bartholomew`s Hospital`da cerrah olarak çalışan Percivall Pott baca temizlik işçilerinin derilerine bulaşan baca isinden kaynaklanan PAH'ların testis kanserine neden olduğu sonucuna ulaşmış olup, onun bu gözlemi kanserin çevresel faktörlerle oluştuğunun ilk kanıtı olarak kabul edilmiştir.Bundan yaklaşık 100 yıl sonra ise Almanya ve İskoçya`da parafin endüstrisinde çalışan işçilerde testis derisi kanseri Volkmann ve Bell tarafından tespit edilerek Pott`un bildirdiği sonuçlar doğrulanmıştır (Luch ve Baird, 2005).İlaveten kobaylarve insanlarla yapılan çalışmalarda benzo(a)pyrene içeren zengin PAH kaynağı olarak; özellikle yağ, katran, is ve duman gibi kimyasal maddeler bildirilmiştir (Douben, 2003; Alver ve diğ., 2012).

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry) `ne göre en basit yapıları PAH'lar olarak üç aromatik halkaya sahip phenanthrene ve anthracene bildirilmiştir. Benzen gibi daha küçük yapıdaki moleküller

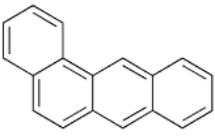
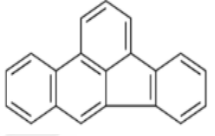
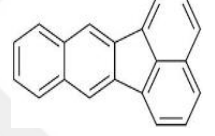
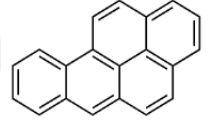
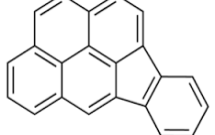
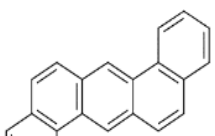
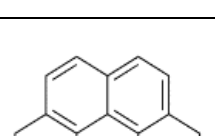
poliaromatik hidrokarbon sınıfında yer almamaktadır. EPA tarafından 16 adet PAH hem çevresel kirlilik hemde insan sağlığı açısından büyük önem taşıyan grup olarak belirlenmiştir (Saygılı, 2012).

evre Koruma Ajansı (EPA) tarafından temel kirletici olarak bildirilen 16 poliaromatik hidrokarbon; Naphthalene, Acenaphthene, Acenaphthylene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Chrysene, Benzo(a)anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Indeno(1,2,3-c,d)pyrene, Benzo(g,h,i)perylene ve Dibenzo(a,h)anthracene`dir. Bu kirleticileri içeren atıklar canlı ekosistemine oldukça zararlıdır (Garcia, 1999). Dünya Sağlık rgt (WHO) ve EPA`nın öncelikle bildirdiği 16 PAH türüne ait molekl şekilleri, yapısal formları, fiziksel ve kimyasal zellikleri Tablo 1.1. ve Tablo 1.2.`de özetlenmiştir (Karakaş ve Pekey, 2005; Kılıç, 2015).

Tablo 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesinde Yer Alan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenleri (Kılıç, 2015)

PAH	Molekül Formülü	Halka Sayısı	Yapısı
Naphthalene (NaP)	$C_{10}H_8$	2	
Acenaphthalene (Ace)	$C_{12}H_8$	3	
Acenaphthene (Act)	$C_{12}H_{10}$	3	
Fluorene (Fln)	$C_{13}H_{10}$	3	
Phenanthrene (Phe)	$C_{14}H_{10}$	3	
Anthracene (Ant)	$C_{14}H_{10}$	3	
Fluoranthene (FI)	$C_{14}H_{10}$	4	
Pyrene (Pyr)	$C_{16}H_{10}$	4	
Chrysene (Chr)	$C_{18}H_{12}$	5	

Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesinde Yer Alan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenleri (Kılıç, 2015) (Devamı)

PAH	Molekül Formülü	Halka Sayısı	Yapısı
Benzo(a)anthracene (BaA)	$C_{16}H_{10}$	4	
Benzo(b)fluoranthene (BbF)	$C_{18}H_{12}$	5	
Benzo(k)fluoranthene (BkF)	$C_{20}H_{12}$	5	
Benzo(a)pyrene (BaP)	$C_{20}H_{12}$	5	
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (InP)	$C_{22}H_{12}$	6	
Dibenzo(a,h)anthracene (DahA)	$C_{22}H_{14}$	5	
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	$C_{22}H_{12}$	6	

1.2.2. Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Saf bileşik formundaki PAH'lar; renksiz, beyaz, açık sarı-yeşil renkli, katı yapıda ve hafif bir hoş koku içermektedirler. Araştırma amacıyla üretilenler dışında bu bileşiklerin çoğunluğu kullanılmamaktadır. Ancak birkaç tanesi sağlık sektöründe, pestisit, boya yada plastik sanayinde kullanılmaktadır (ATSDR, 1995; Douben, 2003). PAH'lar kükürt dioksit ve sülfürik asit ile reaksiyona girdiğinde sülfürik ve sülfonik asit formlarını, azot oksit ve nitrik asit ile reaksiyona girerek de nitro türevlerini oluşturmaktadırlar (WHO, 1998; Marce ve Borroll, 2000). Bunun yanı sıra ozon ve hidroksil radikalleri ile de reaksiyona girerler (Douben, 2003; Alver ve diğ., 2012).

PAH'ların sudaki çözünürlükleri, CAS kodları, bileşik formülleri, molekül ağırlıkları, renkleri, erime noktaları, buharlaşma noktaları, yoğunlukları, Henry sabiti, buhar basınçları, LogK_{ow} ve LogK_{oc3} değerleri Tablo 1. 3.'de verilmektedir. Tabloda yer alan CAS numarası, bilinen tüm kimyasal bileşikleri tanımlamak için Amerikan Kimya Derneği'nin (American Chemical Society) bir alt bölümünde yer alan "Chemical Abstracts Service" (CAS), tarafından verilmiştir. Bileşiğin sudan lipide geçiş potansiyelini LogK_{ow} göstermektedir. Bileşiğin toprakta yer alan organik karbon üzerine adsorblanma potansiyelini ise LogK_{oc3} göstermektedir. Denge durumundaki bir bileşiğin suda ve havada bulunan derişimlerini açıklayan ve bu kimyasalın uçuculuk potansiyeli hakkında bilgi veren değere ise Henry Sabiti denilmektedir (Alver ve diğ., 2012).

Tablo 1.3. Poliaromatik Hidrokarbonların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Esen, 2006)

Bileşik	CAS-Kod	Formül	Molekül Ağırlığı	Renk	Erime Noktası °C	Buharlaştırma Noktası °C	Buhar Basıncı Pa 25°C	Yoğunluk (g/cm ³)	Çözünürlük 25 °C suda µg/litre	Henry Sabiti 25 °C (kPa)	Log Kow	Log Koc ³
Acenaphthylene (ACE)	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152,2	-	92-93	265-275	2,9x10 ⁻² mm-Hg (20 °C)	-	3,93 x 10 ³	1,45 x 10 ⁻³ (atm-m ³ /mol) ²	4,07	1,40
Acenaphthene (ACT)	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154,2	Beyaz	95	279	2,9 x 10 ⁻¹	1,024	3,93 x 10 ³	1,48 x 10 ⁻²	3,92	3,66
Fluorene (FLN)	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166,2	Beyaz	115-116	295	8 x 10 ⁻²	1,203	1,98 x 10 ³	1,01 x 10 ⁻²	4,18	3,86
Anthracene (ANT)	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178,2	Renksiz	216,4	342	8 x 10 ⁻⁴	1,283	73	7,3 x 10 ⁻²	4,5	4,15
Phenanthrene (PHE)	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	178,2	Renksiz	100,5	340	1,6 x 10 ⁻²	0,98	1,29 x 10 ³	3,98 x 10 ⁻³	4,6	4,15
Fluoranthene (FL)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202,3	Mat sarı	108,8	375	1,2 x 10 ⁻³	1,252	260	6,5 x 10 ⁻⁴ (20 °C)	5,22	4,58
Pyrene (PY)	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202,3	Renksiz	150,4	393	6 x 10 ⁻⁴	1,271	135	1,1 x 10 ⁻³	5,18	4,58
Chrysene (CHR)	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228,3	Renksiz	253,8	448	8,4 x 10 ⁻⁵ (20 °C) ²	1,274	2,0	1,05x10 ⁻⁶ (atm-m ³ /mol) ²	5,91	5,30
Benz[a]anthracene (BaA)	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228,3	Renksiz	160,7	400	2,8 x 10 ⁻⁵	1,226	14	1x10 ⁻⁶ (atm-m ³ /mol) ²	5,61	5,30
Benzo[b]fluoranthene (BbF)	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Renksiz	168,3	481	6,7 x 10 ⁻⁵ (20 °C) ²	-	1,2 (20 °C)	5,1 x 10 ⁻⁵	6,12	5,74
Benzo[k]fluoranthene (BkF)	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Mat sarı	215,7	480	1,3 x 10 ⁻⁴ (20 °C) ²	-	0,76	4,4 x 10 ⁻⁵ (20 °C)	6,84	5,74
Benzo[a]pyrene (BaP)	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Sarımsı k	178,1	496	7,3 x 10 ⁻⁷	1,351	3,8	3,4 x 10 ⁻⁵	6,50	6,74
Benzo[ghi]perylene (BghiP)	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	276,3	Mat sarı- yeşil	278,3	545	1,4 x 10 ⁻⁴	1,329	0,26	2,7 x 10 ⁻⁵ (20 °C)	7,1	6,20
Dibenz[a,h]anthracene (DahA)	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278,4	Renksiz	262	-	1x10 ⁻¹⁰ mm-Hg (20 °C)	1,282	0,5	7,3 x 10 ⁻⁴ (atm-m ³ /mol) ²	6,84	6,52
Indeno[1,2,3-cd]pyren (I123-cdP)	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276,3	Sarı	163,6	536	1,3 x 10 ⁻⁴	-	62	2,9 x 10 ⁻⁵	6,58	6,20

1.2.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kaynakları

PAH'lar kaynaklarına göre; doğal kaynaklı ve antropojenik kaynaklı olarak iki gruba ayrılır. Doğal kaynaklı olanlar; volkanik patlamalar, orman ve çayırların yanması gibi doğal olaylar sonucu oluşurken; antropojenik kaynaklı olanları endüstriyel kaynaklar, motorlu taşıtlar ve sigara kullanımı oluşturmaktadır. Endüstriyel kaynakları ise; petrol rafinerileri, çöp yakma üniteleri, çimento fabrikaları, kok ve asfalt üretim tesisleri, alüminyum ve demir çelik fabrikaları oluşturmaktadır. Ayrıca ısınma ve enerji elde etme amacıyla kullanılan kömür ve odun gibi katı ve fosil yakıtlar da PAH oluşumundan sorumludur (Kalkan, 2012).

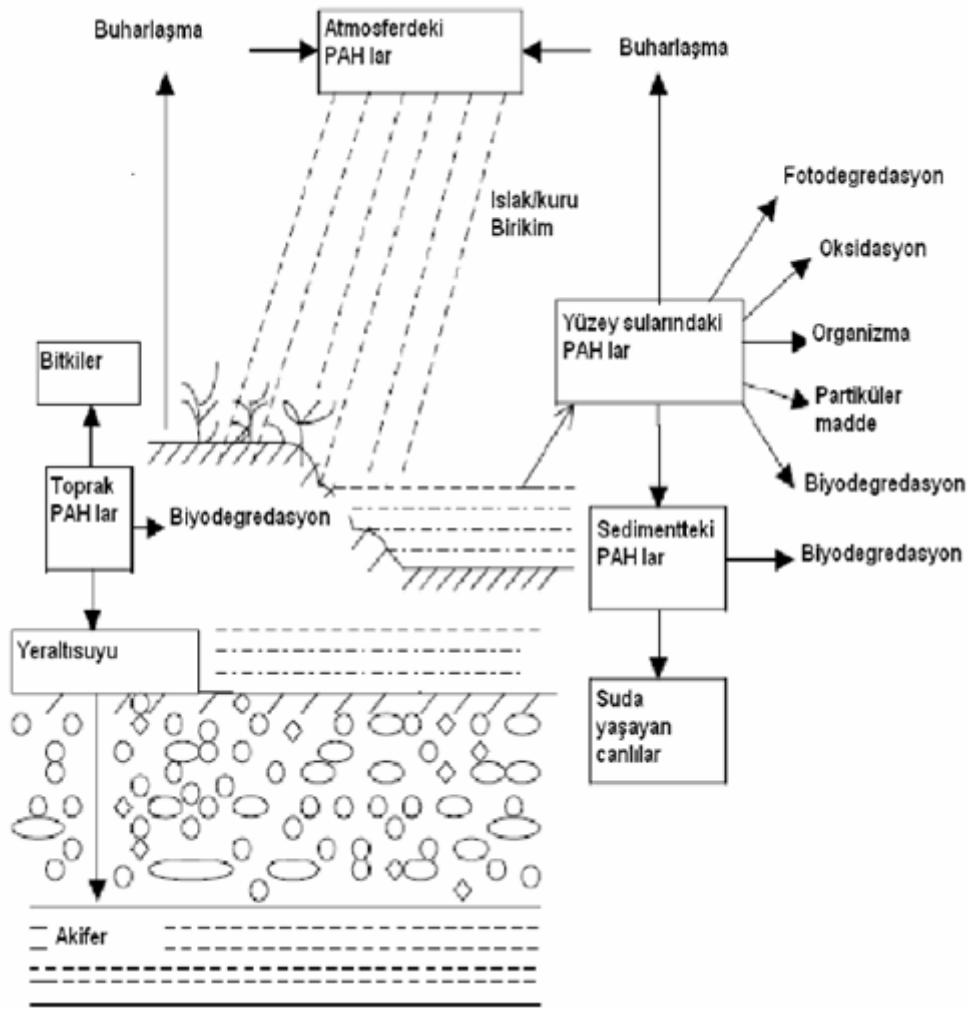
PAH'ların ekosistemlere taşınması genel olarak atmosfer aracılığıyla olmaktadır. Gaz ve aerosol fazda olan PAH'lar uzak mesafelere taşınabilmeleri ve bozunmaya karşı direnç göstermelerinden dolayı kentsel ve endüstriyel alanlarda geniş kaynaklara sahip olmalarına rağmen kırsal ve uzak alanlarda yüksek derişimlerde bulunurlar. Aynı zamanda PAH'lar kentsel ve endüstriyel alanlardan atmosfer aracılığıyla kıyılara ve karasal yüzey sularına da taşınmaktadır (Manoli ve Samara, 1999; Kalkan, 2012).

1.2.4. Çevre Üzerinde PAH'ların Etkileri

PAH'ların sudaki çözünürlükleri düşük olup küçük partiküller veya gaz formunda olduklarından uzak mesafelere kolaylıkla taşınabilirler. Bunun sonucunda atmosferden kuru ve yağ çökme olayları aracılığıyla toprağa, bitkilerin üzerine ve su kütlelerine düşmektedirler. PAH bileşikleri atmosfere salınmalarından sonra buradaki partikül formunda olan maddeler ile birleşirler. Ayrıca hava şartları, partiküllerin çapları ve atmosferdeki maddelerle olan etkileşimi bunların değişik yerlere taşınma süresini etkilemektedir. Yine bunların atmosferde bulunan küçük partiküllere tutunması sonucunda atmosferde yer alan ozon ve diğer oksidanlar tarafından fotodegradasyon süresi daha büyük bir partiküllere tutunan PAH bileşiğiyle kıyaslandığında uzun sürede gerçekleşmektedir. Örnek verecek olursak PAH bileşiğinin tutunduğu partikülün çapı 1 µm'den düşük olduğunda fotodegradasyon süresi birkaç gün ile altı hafta arasında olur iken daha büyük bir partikül de ise süreç birkaç güne kadar düşebilmektedir (Köseler, 2008; Kalkan, 2012).

Yüzey sularında yer alan PAH'ların çoğunluğu katı parçacıklara tutunup nehir yada göllerin dip kısmında çökelti oluştururken bir kısmı atmosfere buharlaşmaktadır. Ayrıca

toprakta yer alan PAH'ların bir kısmı atmosfere buharlaşırken bir kısmı ise yeraltı sularına karışır ve oradan akifere ulaşırlar. Su ve kara ekosistemlerinde yaşamını sürdüren bitki ve hayvanların üzerinde yer alan PAH derişimlerinin, toprak ve suda bulunan derişimlerinden çok fazla olduğu bildirilmektedir. Ayrıca poliaromatik hidrokarbonların yapısı güneş ışığı ve atmosferde bulunan kimyasallar aracılığıyla bozulabilir (ATSDR, 1995; Kalkan, 2012).



Şekil 1.1. PAH'ların çevredeki dağılımları (Kalkan, 2012)

Lehndorff ve Schwark (2004) Almanya'nın Cologne Bölgesi'nde yaptıkları bir çalışmada; yerleşim bölgesi, havaalanı, park ve şehir kenarı gibi 43 farklı yerden çam yapraklarından örnekler alarak analiz yapmışlardır. Çam yaprakları üzerindeki PAH derişimlerini 51-410 ng/g arasında değiştirdiğini, phenanthrene, fluoranthene ve pyrene'in ise baskın PAH bileşikleri olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar PAH'ların hayvanlar üzerinde dekarsinojenik ve mutajenik etkilerinin yanısıra toksik etkilerinin de olduğunu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Castellano ve diğ., 2003; Kalkan, 2012).

Aynı zamanda atmosferden sucul ekosisteme geçiş yapan PAH'ların özellikle deniz ekosisteminde yaşamını sürdüren kabuklular ve balıkların bünyesinde birikmesi sonucunda besin zinciri yoluyla insanlara da ulaştığı belirlenmiştir (Golomb ve diğ., 1997; Kalkan, 2012).

1.3. Sürfektanlar

Sürfektan kelimesinin anlamı "yüzeyi saran" olarak ifade edilmektedir. Sürfektanlar hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahip olmalarından dolayı yüzey gerilimini azaltan veya iki farklı fazda olan yüzeyler arasında etkilerini göstererek yüzeyler arası gerilimi düşüren maddelerdir (Desai ve Banat, 1997; Nitschke, 2004; Yılmaz, 2008).

Sürfektanlar; birisi doğal olarak diğeri ise yapay olmak üzere iki türlü elde edilmektedir. Doğal olan biyosürfektanların üretimi mikroorganizmalar sayesinde gerçekleşmektedir. Suda çözünmeyen substratlarda mikroorganizmaların gelişmelerine bakıldığında genellikle aerob şartlarda sürfektan oluşturdukları görülmüştür (Uysal ve Türkman, 2004). Yapay olarak üretilen sürfektanlar; bitkisel ve hayvansal yağların, yağ asitlerinin, petrol türevlerinin ve alkollerin bir dizi kimyasal süreçten geçmesi sonucunda üretilirler. Doğal özelliklerde mikroorganizmalar tarafından üretilen sürfektanlar günümüzde önem kazanarak sentetik sürfektanların yerine geçmektedir (Singh ve diğ., 2006; Yılmaz, 2008).

1.3.1. Biyosürfektanlar

İlk defa Gorin ve arkadaşları tarafından 1961 yılında *Torulopsis magnoliae* türünün hücre dışına sentezlediği glikolipidlerin belirlenmesi ile bulunmuştur (Gorin, ve diğ., 1961; Çelikdemir, 2012). Daha sonra ise bu çalışmadaki mikroorganizmanın yanlış olduğu belirlenerek aslında bu türün *Torulopsis apicola* olduğu belirtilerek güncellenmiştir (Tulloch ve Spencer, 1968; Çelikdemir, 2012).

Genel olarak baktığımızda; mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, emülsifikasyon yetisine sahip, güçlü bir şekilde yüzey aktivasyonu sergileyebilen bileşenlere biyosürfektan ismi verilmektedir (Banat ve diğ., 2000; Çelikdemir, 2012). Mikroorganizmalar; yağları, karbonhidratları ve hidrokarbonları karbon kaynağı olarak kullanıp oksijenli solunum

sayesinde biyosürefektanların sentezlenmesini gerçekleştirmektedir (Uysal ve Türkman, 2004; Yılmaz, 2008).

Biyosürefektanların yapay sürefektanlardan avantajlı olduğu durumlar aşağıda sıralanmıştır;

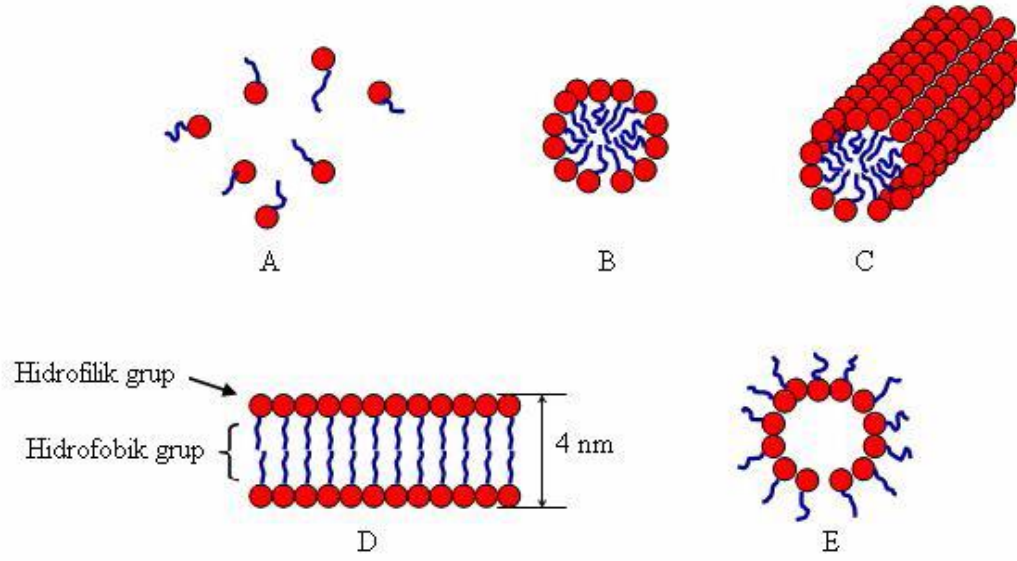
- Biyolojik yollarla parçalanabilme özelliğindedirler.
- Çoğunlukla düşük toksik etki göstermektedirler.
- Canlı dokularda zararlı etkiye sahip olmadıklarından kozmetik, gıda ve ilaç üretiminde katkı maddesi amacı ile kullanabilmektedirler.
- Üretimleri amacıyla mikroorganizmalara hammaddeler (karbonhidratlar, yağlar, hidrokarbonlar veya bileşimleri) substrat olarak direkt verilebilmektedir. Bundan dolayı da üretimlerinin maliyeti daha düşüktür.
- Çevresel kirliliğinin kontrol edilmesinde; atık maddelerin detoksifikasyonunda, petrol ve petrol türevleri ile kirlenmiş toprakların biyoremediasyonunda ve yağ atıklarının kontrol edilmesinde kullanımları oldukça uygundur.
- Özel yapılarından dolayı spesifik (yapılarında kompleks organik moleküllerden oluşan özel işlevsel gruplar bulunduğundan) etki gösterirler.
- Özellikle aşırı sıcaklık, pH ve tuzluluk koşullarına toleranslı olmalarından dolayı oldukça etkindirler (Kosaric, 2001; Kaya, 2008).

Yukarıda belirtilen özelliklere ilaveten biyosürefektanlar metaller ile bağ kurma eğilimine yatkın olduklarından dolayı özellikle ağır metaller ile kontamine olan suların ve toprakların arıtılmasında da son yıllarda yoğun olarak kullanımı tercih edilmektedir (Rodrigues ve diğ., 2006; Yılmaz, 2008).

1.3.2. Biyosürefektanların Yapı ve Fonksiyonları

Yüzey aktif ve amfipatik karakter gösteren biyosürefektanlar çok değişik yapısal özelliğe sahip olmaları dolayısıyla oldukça farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Biyosürefektanların hidrofilik grubunu; peptitler, katyonlar, anyonlar, aminoasitler ve polisakkarit grupları oluşturur iken, hidrofobik grubunu ise yağ asitleri, doymuş ve doymamış yağlar oluşturmaktadır. Biyosürefektanların sınıflandırılması hidrofilik ve hidrofobik gruplarının içerdiği yapılara göre yapılmaktadır. Aynı zamanda biyosürefektanlar sıvı çözeltiler içerisinde konsantrasyonlara bağlı olarak farklı şekillerde bulunmaktadır (Şekil1.2.). Düşük konsantrasyonlarda tekli ya da lineer yapıda bulunur iken yüksek

konsantrasyonlarda ise misel ve silindirik yapıda buldukları bildirilmektedir(Lang ve Wagner, 1987; Desai ve Desai, 1993; Yalçın, 2008).



Şekil 1.2. a. Tekli formda biosürfektan, b. Misel formda biosürfektan, c. Silindirik formda biosürfektan, d. Çift tabakalı biosürfektan, e. Emülsiyon formda biosürfektan (Yalçın, 2008)

Genel olarak bakıldığında; mikroorganizmaların substrata erişmesinin kolaylaşması ve mikrobiyal gelişmenin çabuklaşma sebebi, biosürfektanların yüzey gerilimini azaltmaları, düşük kritik misel konsantrasyonu sağlamaları, emülsiyonları stabil hale getirmeleri ve köpürmeyi düzenlemeleri gibi özelliklerden oluşmaktadır (Cerniglia, 1981; Poeton ve diğ., 1999; Yalçın, 2008). Biosürfektanların yüzey gerilimini değiştirme (düşürme) özellikleri dolayısı ile petrol ve türevlerinin, suda çözünmeyen hidrofobik yapıdaki maddelerin çözünürlüğünü kolaylaştırmakta ve ayrıca biyodegradasyonun oluşmasına da yardımcı olmaktadır (Neu ve Marshall, 1990; Banat ve diğ., 2000; Demirdöğen, 2012).

Doğal çevrelerdeki hidrokarbonların temizlenmesi amacı ile kullanılan süर्फektanlardan kaynaklanan yan ürünler çevrenin kirlenmesine neden olmaktadır. Ancak biosürfektanlar çevrede kirlilik oluşturan maddeleri parçalarken bu arada kendileride biyolojik yolla parçalanabilmektedir. Bu bağlamda biosürfektan üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalar özellikle PAH'lar ile kirlenmiş alanların biyodegradasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Rosenberg, 1999). Aynı şekilde özellikle petrol-

yağbiyodegradasyonunda da kullanılabilirler (Shulga ve diğ., 1999). Ayrıca biyosürfektanlar; seramik, herbisid ve pestisid formülasyonu, deterjan üretimi, sağlık hizmetleri, kozmetik, selüloz – kağıt sanayi, kömür, tekstil, gıda sanayi ve maden işletmeciliği gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Banat ve diğ., 2000; Ron ve Rosenberg, 2001). Yine biyosürfektan üretme yeteneği olan çok sayıdaki bakteri ve maya türü, karbon kaynağı olarak hidrokarbonları kullandığında yüzey gerilimini değiştirebilme özelliğinde olan glikolipid, fosfolipid ve lipopeptid vb. gibi biyosürfektanlar üretebilmektedirler (Banat, 1995). Üretilen biyosürfektanlar hidrokarbonları emülsiyeye etmekte ve parçalanmış hidrokarbonların hücre içine taşınması işlemine yardımcı olmaktadır (Desai ve Banat, 1997; Yılmaz, 2008).

1.3.3. Biyosürfektanların Sınıflandırılması

Biyosürfektanlar; aminoasitler, peptid anyonları veya katyonları; mono-, di-, veya polisakkaritlerden oluşan hidrofilik kısım ile doymuş ya da doymamış yağ asitleri barındıran hidrofobik gruptan oluşmuştur. Kimyasal yöntemlerle sentezlenen sürfektanlardan biyosürfektanların farklılığı kimyasal yapıları ve mikrobiyal orijinlerinin farklı olmasıdır (Desai ve Desai, 1993; Desai ve Banat, 1997; Yalçın, 2008).

Biyosürfektanlar mikrobiyal temelleri göz önüne alındığında fungal, maya ve bakteriyel sürfektanlar olarak üç sınıfta incelenmektedir. Bakteriyel biyosürfektanlar; *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi cinsler tarafından üretilmiş olan ramnolipidler, trehaloz lipidler, aminoasit içeren lipidler ve hidrofobik proteinlerdir. Maya biyosürfektanları; *Candida*, *Endomycopsis* ve *Torulopsis* cinslerinin ürettiği mannosileritritol lipidler ve soforoz lipidleri kapsamaktadır. Fungal biyosürfektanlar ise; *Ustilago* cinslerinden elde edilen ustilajik asit ve *Shizonella*'nın ürettiği mannosileritritol lipidlerdir (Desai ve Desai, 1993).

Kimyasal kompozisyonlarına göre biyosürfektanlar; lipidler, lipopeptit/lipoproteinler, glikolipidler, partiküller ve polimerler olarak beş grupta incelenirler (Tablo 1.4) (Desai ve Desai, 1993; Desai ve Banat, 1997; Yalçın, 2008).

Mikrobiyal sürfektanlar ve onların ürettiği biyosürfektan çeşitleri Tablo 1.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 1.4. Mikrobiyal Sürfektanların Tipleri ve Kaynakları (Kaya, 2008)

Biyosürfektan	Mikroorganizma
1) Glikolipidler	
Glikoz Lipidler	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Alcanigenes</i> sp.
Ramnolipidler	<i>Pseudomonasaeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Trehalozlipidler	<i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.
Soforozlipidleri	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> , <i>T. petrophilum</i>
Hüresel lipidler	<i>Ustilago zae</i> , <i>U. maydis</i>
2) Lipopeptidler ve lipoproteinler	
Ornitin lipidler	<i>Myroides</i> sp. SM1
Peptid-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Viskosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Sürfektin & Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramisidinler	<i>Bacillus brevis</i>
Polimiksinler	<i>Bacillus polymyxa</i>
3) Yağ asitleri, nötral lipidler ve fosfolipidler	
Yağ asitleri	<i>Corinebacterium lepus</i>
Nötral lipidler	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipidler	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
4) Polimerik sürfektanlar	
Emülsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Mannan-lipid-protein	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Karbohidrat – protein – lipid	<i>P. nautica</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Yarrowina lipolytica</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>
Protein PA	<i>P. aeruginosa</i>
5) Partiküler biyosürfektanlar	
Vesiküller ve fimbria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Bütün hücre	Çeşitli bakteriler

1.3.4. Biyosürfektan Üreten Mikroorganizmaları Belirleme Yöntemleri

Biyosürfektan üretme yeteneği olan mikroorganizmaları belirlemek amacıyla birçok yöntem tespit edilmiş olup bunlar ile biyosürfektanın yapısı ve fonksiyonu ön plana alınır iken diğer taraftan hücreden dışarıya salıverilen biyosürfektanların hücre dışındakispesifik davranışları da dikkate alınmıştır. Örnek verecek olursak Drop Collapse yöntemi; süpernatant damlacığının mineral yağ üzerine bırakılmasından sonra bu damlacığın davranışına göre gözlemlenen kantitatif bir metottur. Başka bir belirleme

yöntemi olan Du Nouy Ring metodunda ise, yüzey geriliminin değişimi gözlenerek yapılmaktadır (Bento ve diğ., 2005; Tuğrul ve Cansunar, 2005; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.1. Hemolitik Aktivite

Hemolitik aktiviteyi belirleme testleri iki çeşittir. Bunlardan birincisi; kanlı agar besiyerine ekilen bakterilerin besiyerinde oluşturdukları zonların belirlenmesidir. Bu metotta; kanlı agar besiyerinde bakteri üremesi sonucu alyuvarlar parçalanır ve sonuçta oluşan zon bakterilerin β - hemolitik aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Burada hemoglobin moleküllerinin parçalanması sonucunda oluşan yeşil zonlar ise α -hemolitik aktivitenin olduğu kanıtı olarak kabul edilmektedir (Siegmond ve Wagner, 1991; Çelikdemir, 2012).

İkinci metotta ise; 540 nm'de eritrosit süspansiyonunun absorbansının okunması ile hemolitik aktivite belirlenir (Johnson ve Boese-Marrazzo, 1980). Bu test sonucunda elde edilen pozitif sonucun hücrelerin sahip olduğu enzimlerden kaynaklanabileceği varsayıldığından ikinci bir testin uygulanması tavsiye edilmektedir. Bu yüzden hemolitik aktivite metodunun biyosümfektan üretiminin belirlenmesinde spesifik olamayacağı araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (Heyd ve diğ., 2008; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.2. CTAB (Setiltrimetilamonyum Bromid) Agar Testi

Metilen mavisi ile katyonik bir sümfektan olan setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) içeren agarlı besiyerinde yapılmaktadır. Bu test ramnolipidler gibi anyonik sümfektan varlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ortamda yer alan katyonik biyosümfektan olan CTAB anyonik bir biyosümfektanla reaksiyona girer ve metilen mavisinin rengini açarak şeffaf zon oluşturur. Bunun sonucunda bakterinin anyonik bir sümfektan ürettiği kantitatif olarak tesbit edilmiş olur. Bu yöntem ideal olmasına rağmen sınırlı sayıda bir grubu belirlediğinden dolayı tüm biyosümfektanların tesbitinde kullanılamamaktadır (Siegmond ve Wagner 1991; Perfumo ve diğ., 2006; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.3. Antron Yöntemi

Bu metod spektrofotometre ile ölçümünün yapıldığı kolorimetrik bir yöntemdir. Güçlü bir asit olan antron ramnoz ile ısıtılarak (9,10-dihidro-9-oksoantrasen) reaksiyona girmesiyle renk oluşumu gözlenir. 625 nm'de spektrofotometrede spektrumun okunması ve kayıt altına alınması ile sonuçlar elde edilir (Helbert ve Brown, 1957; Hodge ve Hofreiter, 1962).

Maliyeti oldukça düşük olan bu yöntem 20 mg/L'nin altındaki düşük ramnolipid derişiminin belirlenmesinde de kullanılabilmektedir (Noordman, 2000; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.4. Drop-Collapse Yöntemi

Bu metod; hidrofobik bir sıvı üzerine biyosürefektan yapısındaki madde damlatıldığında damlacığın yayılması veyastabil halde kalabilme davranışına göre değerlendirilmesi yapılan bir yöntemdir. İnkübasyon işleminden sonra örneğin santrifüjlenmesisonucunda elde edilen biyosürefektan içeren süpernatantın üzerine mineral yağ damlatıldığında damlacık yayılma özelliği gösterir iken sadece besiyeri damlatılan mineral yağda ise damlacık besiyerinin hidrofilik olmasından dolayı damla halinde kalmaktadır. Bu yöntemde; negatif kontrol olarak steril besiyeri ve su, pozitif kontrol olarak Tween 80 ve sodyum dodesil sülfat gibi yüzey aktif özellikte olan maddeler kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu yöntem, diğer metotlara göre kapsamlı ve genel amaçlı olduğu için araştırmacıların da daha çok tercih etmesine neden olmaktadır(Jain ve diğ., 1991; Çelikdemir, 2012).

1.4. Ağır Metaller

Fiziksel özellikleri incelendiğinde 5 g/cm^3 ($\rho > 5 \text{ g/cm}^3$)'ten daha yüksek yoğunluğa olan metallere ağır metal adı verilmektedir (Sevgi, 2007).Kurşun, çinko, molibden, krom, demir, kadmiyum, bakır, nikel, kobalt, vanadyum, alüminyum, arsenik, kalay ve mangan gibi 60 taneden daha fazla metal içeren geçiş elementleri periyodik cetvelde en geniş grup olarak yer almaktadır. Bu ağır metaller doğada kararlı bileşikler olan silikat, oksit, karbonat ve sülfür halinde yada silikatlar içerisine hapsedilmiş olarak bulunmaktadır. Metallerin yoğunluk değerleri göz önüne alınarak ekolojikdengedeoluşturdukları etkileri tahmin edilmeye çalışılsa bile, metallerin biyolojik etkileri ile yoğunlukları arasında bir ilişki bulunmadığı bildirilmektedir(Yücel, 2010; Çay, 2014).

Canlılar yaşamlarını sürdürmek için iz elementlere ihtiyaç duymakta olup bu iz elementlerin içerisinde bulunan ağır metallere esansiyel ağır metaller adı verilmektedir. Yine canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olmayan ağır metallere ise nonesansiyel ağır metal adı verilmektedir (Gohre ve Paszkowski, 2006; Sanchez-Chardi ve diğ., 2009; Çay, 2014). Nikel (Ni),mangan (Mn), demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko(Zn) gibi esansiyel metaller canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olduğu halde bunların yüksek konsantrasyonlarda bulunması ise toksik etki göstermesine

nedenolmaktadır(Demirezen ve Aksoy, 2004). Bunun dışında kurşun(Pb), krom (Cr), civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi esansiyel olmayan ağır metaller düşük miktarlarda bulunsa bile canlılarda toksik etki göstermektedir (Market, 1993; Altay, 2016).

1.4.1. Ağır Metal Kaynakları

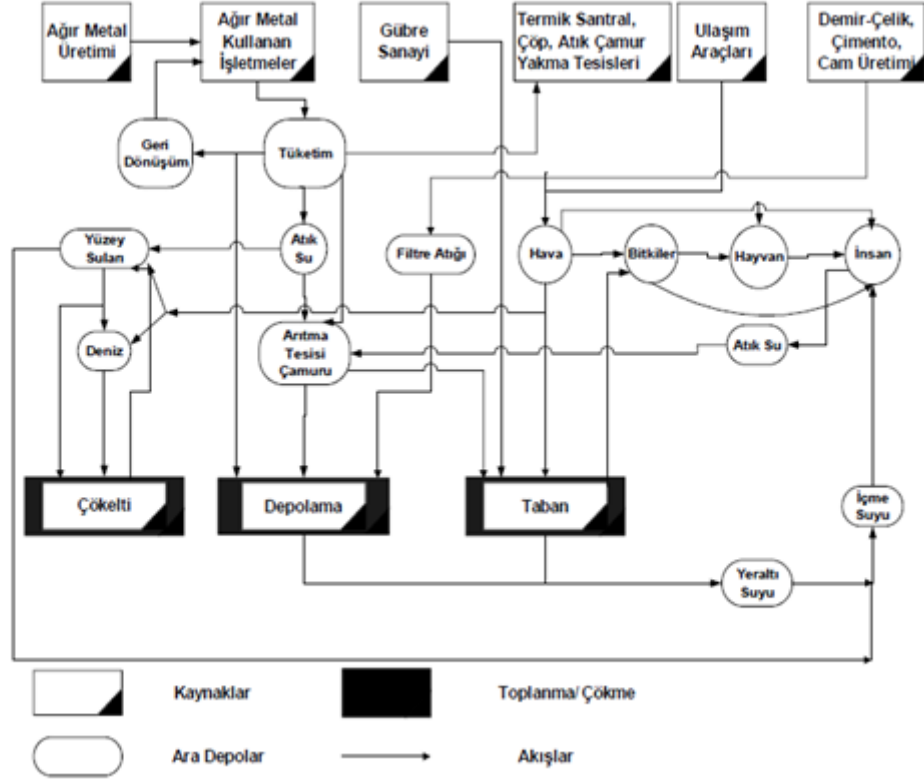
Ağır metaller kayaçların ve bundan oluşan toprakların doğal bileşenleri olup, toprak bileşimlerine bağlı olarak farklı miktarlarda ve yapılarda ağır metal içerirler. Ağır metallerin çevredeki jeolojik nedenlerle oluşan doğal dağılım yapısının son yıllarda insanların etkisi ile büyük oranda değişmeye başladığı gözlemlenmiştir (Baskaya ve Teksoy, 1997; Kocaer ve Baskaya, 2003; Özdemir, 2008).

Çevreye ağır metallerin bulaşma süreçleri iki şekilde olmaktadır; doğal kaynaklı ve insan kaynaklı (antropojenik). Doğal kaynaklı bulaşmalar; minerallerin hava, rüzgar ile aşınması, erozyon ve volkanik patlamalar şeklindedir. Antropojenik kaynaklı yollar ise, madencilik, termik santraller, evsel ısınma sistemleri, motorlu taşıtlar, gübreler, pestisitler, demir-çelik, şeker, çimento, petrokimya ve metal endüstrileridir (Chehregani ve Malayeri, 2007; Sabiha-Javied ve diğ., 2009; Çay, 2014). Temel endüstrilerden doğaya salınan ağır metal çeşitleri Tablo 1.5.'de verilmiştir.

Tablo 1.5. Temel Endüstrilerden Doğaya Salınan Ağır Metal Çeşitleri (Çay, 2014)

Endüstri Tipi	Co	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Sn	Zn	Fe	As	Al	Mn	Mo	V
<i>Kağıt</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petrokimya</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Klor-alkali</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Gübre Sanayi</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Demir-çelik</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enerji Üretimi</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Çevreye salınan ağır metallerin yayınımları gözlemlendiğinde ise çok farklı işletmelerden bir dizi süreçler sonucunda atmosfere salınımının olduğu belirlenmiştir. Şekil 1.3.'de ağır metallerin atmosfere farklı sektörlerden yayınımları şematik olarak ifade edilmiştir (Kahvecioğlu ve diğ., 2007).



Şekil 1.3. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları (Kahvecioğlu ve diğ.,2007)

1.4.2. Ağır Metallerin Çevreye Olan Etkileri

Ağır metallerin ve metaloidlerin büyük bir kısmı toksik olduğu için çok düşük konsantrasyonlarda dahi zehirlenmelere neden olmaktadır (Kara, 2005; Arora ve diğ., 2008). Ağır metallerin etkileri toprakta ve canlılarda kısa zamanda gözlemlenemediğinden devamlı olarak ağır metal birikimi tespit edilerek kontrol edilmelidir (Çay, 2014).

İnsan faaliyetlerinin çevredeki ağır metallerin dağılımına etkisi oldukça fazladır (Facchinelli ve diğ., 2001). Bunlar; çimento sanayii, cam sanayii, ev aletleri üretim sektörü, demir çelik sanayi, termik santraller, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, tekstil endüstrisi kuruluşları, rafineri ve endüstriyel faaliyetler (Market, 1993). İlave olarak biyosferdeki duman ve partiküllerin kaynağını fosil yakıtlar ve taşıtlar oluşturur iken toprakta bulunan ağır metal kaynaklarını ise atıklar, pestisidler ve gübrelerin oluşturduğu bildirilmektedir (Demirezen ve Aksoy, 2004; Altay, 2016).

Ağır metaller topraktaki başka maddeler ile tepkimeye girdiği için toprakta doğrudan tespiti zor olmaktadır. Ayrıca ağır metal kirliliği suların kalitesini bozmakla birlikte yeraltı sularına karışıp mikroorganizmalara da zarar vermekte, bitkilerin yapılarına girmekte en

son aşamada ise besin zinciri yoluyla insana ulaşarak ciddi boyutlara ulaşmakta ve tehlikeli bir hal almaktadır (Çay, 2014).

Ağır metallerin serbest radikal formları oksidatif stresin oluşmasına neden olmakta (Mudipalli, 2008) ve kararsız yapıdaki bu serbest radikaller kararlı bir hale geçmek amacıyla canlı hücrelerine saldırarak zarar vermektedirler (Krystofova ve diğ., 2009). Canlılar ağır metallere çok fazla maruz kaldığında serbest radikaller enzim ve pigmentlerdeki temel elementlerin yerine geçerler ve canlılık fonksiyonlarını bloke ederler (Ali ve diğ., 2013; Çay, 2014). Ağır metaller mikroorganizmaların membran fonksiyonlarını engellemeleri, nükleik asitlerine zarar vermeleri ve enzimatik aktivitelerini engellemelerinden dolayı toksik olmaktadır (Gadd, 1992; Doelman ve diğ., 1994; Freedman, 1995; Akkan, 2009).

Biyosferde yer alan ağır metaller yağmur gibi atmosferik olaylar sonucunda suya geçebilmektedir (Hornbuckle ve diğ., 1993; Jeremiason ve diğ., 1994; Taşdemir, 1997; Akkan, 2009).

1.4.3. Mikroorganizmalarda Metal Direnç Mekanizması

Ağır metaller periyodik cetvelin geçiş elementlerinde bulunmasının nedeni d- orbitallerinin yeterli sayıda elektrona sahip olmamasındandır. Bu ise ağır metallerin farklı elementlerle tepkimeye girmesini kolay hale getirmektedir. Yine bu özelliklerinden dolayı ağır metaller iz element olarak çok sayıdaki biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadırlar (Nies, 1999; Dülger, 2012).

Bruins ve diğ., (2000)'nin bildirdiğine göre; mikroorganizmalar hayati faaliyetlerini devam ettirebilmek için ağır metallere iz miktarda bile ihtiyaç duymaktadırlar. Bu iz elementler; potasyum, kalsiyum, bakır, magnezyum, kobalt, nikel, krom, çinko, manganez, demir ve sodyum vb. bazı metallerdir. Canlıların hayatsal faaliyetlerinde gerekli olmayan metaller ise altın, civa, gümüş, kurşun, kadmiyum ve alüminyum gibi elementlerdir. Esansiyel metaller çeşitli hayatsal faaliyetlerde önemli rol oynamakta olup bunlar; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizması olarak sıralanabilir. Bunlardan demir, bakır ve nikel gibi esansiyel geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol oynarken, magnezyum ve çinko gibi esansiyel metaller (elektrostatik güçleri sayesinde) farklı

enzimleri ve DNA'yı stabilize ederler. Demir, nikel, magnezyum ve kobalt ise kompleks moleküllerin yapısında düzenleyicilik görevini üstlenmişlerdir (Dülger, 2012).

Mikroelementer V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo ve W makro elementlere göre daha az oranda bulunmalarına rağmen hayat için zaruriyet gösterirler ve çoğunlukla buldukları ortamlardan temin edilirler. Bu şekildeki metallere zorunlu (esansiyel) metaller adı verilmiş olup kofaktör şeklinde kullanılmalarından dolayıda ihtiyaç duyulmaktadır (Bruins ve diğ. 2000). Bunlar proteinlerin, enzimlerin yapılarında bulununur katalitik reaksiyonlarda görev yapar. Elektron transferinde ve osmotik dengenin kurulmasında, bakteri hücrelerinin enzimlerinininde yapısında yer almaktadırlar (Wackett ve diğ. 2004). Ayrıca günümüzde çok sayıdaki metalin hala biyolojik olarak rolleri tam olarak bilinmemektedir. Bu metaller ağır metaller veya zehirleyici etkiye sahip (toksik) metallerdir (Al, Au, Ag, Bi, Cd, Cr, Hg, Sn, Pb ve Tl'dir (Torabi, 2013).

Prokaryotik canlıların ortaya çıkmasıyla birlikte metallere karşı direnç sistemleride belirgenleşmeye başlamıştır (Sevgi, 2007). Toksik özellikteki metallere direnç oluşturulması mikroorganizmaların yaşadığı bölgede zehirleyici etkiye sebep olan metallerin bulunması ve bu metallerin mikroorganizmada oluşturduğu olumsuz etkidir (Guzzo ve diğ., ; 1999; Gülcan, 2006; Dülger, 2012).

Bakterilerin yaşamında görülen stres; dış etkilere oluşan, bakterinin gelişme hızını azaltan veya ölümüne sebep verecek şekilde hücresel fizyolojiyi ya da metabolik olarak düzensizlik veya karışık bir durum olarak ifade edilebilir. Sıcak soğuk şoku, asit, osmotik ve oksidatif stres gibi durumlara bakterilerin göstermiş olduğu tepkiler olarak gibi farklı şekillerde karşımıza çıkmaktadır. Metallerin mikrobiyal beslenmede nasıl bir rol aldığı tam olarak bilinmesede strese neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca toksik yapıdaki metallerin hücrede bulunması strese sebep olurken, ihtiyaç duyulan metal iyonlarının gereğinden fazla bulunması ya da bulunmamasından kaynaklı da stres de oluşabilir (Torabi, 2013).

Bakterilerde metal iyonlarına karşı direnç sistemi ile kodlanmış genler çoğunlukla plasmid ve transpozon adı verilen hareket halindeki genetik özellikteki yapılarda bulunmaktadır ve bu metal iyonlarına yanıt oluşturan regülatörler ise sitoplazmada yer almaktadır. Aslında bakteriler fiziki şartlarda değişiklikler ile karşılaştıklarında buna hızlı bir şekilde yanıt sağlayabilirler veya hayatlarını yitirirler. Bu değişiklikler; anaerobik ortamdan aerobik ortama geçiş, sıcaklık değişimleri, pH, iyonik güç, osmolarite, su aktivitesi, besin

kaynakları eldesi için rekabet, metal iyonlarına ve toksik kimyasal maddelere maruz kalma olarak sıralanabilir. Bakterilerde bunlara bağlı zararlarda süratli bir şekilde algılama gerçekleşmelidir ki bu olaylara bağlı olarak metal iyonu atılmasında, metal iyonu zararının bertaraf edilmesi için ihtiyaç duyulan proteinlerin aktif olmaları ile gerçekleşebilir (Torabi, 2013).

Bilim insanları, ağır metallerin bakteri suşları için MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerlerini farklı doğal habitatlarda araştırmış ve bakterilerde direnç mekanizmasının yayılmasının nedenini ise değişen çevre şartlarına adaptasyonlarını sağlayan plazmidler olarak bildirmişlerdir. Yine araştırmacılar, değişik yaşam koşullarında gerçekleştirilen denemelerde metallere dirençlilikte etkili olan genlerin, konjugatif plazmidler ve konjugatif transpozonlar gibi yapısal elemanlar üzerinde kodlu olduğunu belirlemişlerdir (Sandaa ve diğ., 1992; Scott, 1992; Davies, 1994; Doelman ve diğ., 1994; Saylers ve Shoemaker, 1994; Arvanitidou ve diğ., 1997; Akkan, 2009).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde; mikroorganizmalarda özellikle de bakterilerde ağır metaller ile antibiyotiklere karşı gösterilen direnç mekanizmaları arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir. Aslında bu iki mekanizmada da mikroorganizmalar arasında konjugasyon ya da transdüksiyon ile genetik madde aktarımı olmaktadır. Bir kısım mikroorganizmalarda bu iki dirençlilik genleri aynı plazmid üzerinde de bulunabilmektedir. Yine araştırmacılar bakterilerde gerçekleşen metal direnç mekanizmasının antibiyotik kullanımından daha önce gözlemlendiği tespit etmişlerdir (Sevgi, 2007).

Mikroorganizmaların metallere karşı gösterdikleri direnç mekanizmaları;

- Metallerin hücreden dışarıya aktif transportu
- Metalin proteine bağlanarak hücre içerisinde alıkonulması
- Ekstraselüler alıkonulma
- Metallerin daha az toksik formlara dönüştürülmesi (enzimatik detoksifikasyon)
- Metallerin etkili olduğu hücresel komponentlerin metallere hassasiyet özelliğinin azaltılması
- Geçirgenlik bariyeri oluşturularak metallerin hücre dışında tutulması (Sevgi, 2007).

1.4.4. Çalışmada Kullanılan Ağır Metaller

1.4.4.1. Kobalt (Co)

Kobalt adı; kalay ve kurşun üretiminde erimeyen ve metalin kullanılmasına engel olan katı yapısından dolayı maden ruhu, şeytan manasında kullanılan “kobold” kelimesinden gelmektedir. M.Ö. 2000’li yıllarda kobalt bileşikleri cam ve emayede mavi boya şeklinde kullanılmış ve 1742’de İsveç’li bilim insanı G. Brant kobaltı yeni tespit edilen bir metal olarak bilim dünyasına kazandırmıştır. Daha sonraları ise Tobern Bergman (1780) kobaltın element olarak tanımlamasını yapmıştır (Habashi, 1997; Özdemir, 2008).

Kobalt, savunma ve endüstriyel sanayinde süper alaşım olarak jet motor turbünlerinde kullanılmaktadır. Yine kesici uçlarda ve elmas takımlarında alaşım elementi şeklinde, korozyonu engelleme amacıyla ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi şeklinde alaşımlarda, takım çeliklerinde, yüksek hız elde etmek amacıyla kullanılan çeliklerde kullanılır. Ayrıca kobalt bileşikleri; vernik ve mürekkeplerde kurutma maddesi amacı ile boyalarda renk pigmenti şeklinde, petrol ve seramik sanayisinde katalizör olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında kayıt cihazlarında, pillerin elektrot kısımlarında ve manyetik özellikli malzemelerde kullanımı da mevcuttur (Özdemir, 2008).

Kobalt ve ürünleri kanserojen olarak tanımlanmamasına rağmen kanserojen bir madde gibi görülmektedir. Ancak kobaltın kullanıldığı implantlarda o bölgede tümör oluşumu gözlenmiş ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda kobalt sülfidin tek zincir DNA kırıklarına sebep olduğu bildirilmiştir (Kawanishi ve diğ.,1994). Aynı zamanda kobaltın, indirekt yol ile oksidatif stres oluşumuna neden olarak reaktif oksijen gruplarının birikmesine sebebiyet verdiği de belirlenmiştir (Freeman ve diğ., 2005; Özdemir, 2008).

Canlıların diyetinde kobalt çok az bir yere sahip gibi görünse de kırmızı kan hücrelerinin üretiminde ve sinir sisteminde kullanılan B12 vitaminin (yorgunluk, sindirim kolaylığı ve kas problemlerinin giderilmesi) bileşiminde yer almaktadır. Vücudumuzda yapı taşı olarak görev alırken anemiye engellediği bilinmektedir. Ayrıca kobalt yetersizliğinde pernisiyöz (zararlı) anemi ve sinir bozukluğu vb. sıkıntılar görülmekte olup yeterli B12 vitamini alındığında ise bu problemler görülmeyebilir (Kawanishi ve diğ., 1994; Özdemir, 2008).

1.4.4.2. Civa (Hg)

İnsanoğlunun bildiği en eski metallere birisi olan civa oda sıcaklığında sıvı formda bulunur. Yoğunluğu 14.06 g/cm^3 olan civa periyodik cetvelin 2B grubunda yer alan bir geçiş elementidir. Yine incelemeler sonucunda; yerkabuğunda ortalama 0.08 ppm, deniz suyunda ise 3×10^{-5} ppm miktarında bulunduğu belirlenmiştir. İlave olarak doğal civa içeriğinin havada $0.005 - 0.06 \text{ ng/m}^3$; bitkilerde $0.001 - 0.3 \text{ } \mu\text{g/g}$ (genelde $< 0.01 \text{ } \mu\text{g/g}$) oranında bulunduğu bildirilmektedir (Güven, 2009).

Civanın kullanım alanlarına bakıldığında hem metalik olarak hemde organik ve inorganik civa bileşikleri olarak; ilaç sanayinde, diş tedavilerinde dolgu materyali şeklinde, termometrelerde, bazı metallere üretim prosesinde, laboratuvar çalışmalarında, boya ve kağıt sanayinde yoğun olarak yer aldığı bilinmektedir. Son yıllarda civanın tüm formlarının flora ve fauna için zararlı olduğunun belirlenmesinden dolayı kullanımı oldukça azaltılmış hatta bazı endüstriyel alanlarda kullanımına yasak getirilmiştir (Habashi, 1997; Bingham ve diğ., 2001). Ayrıca civa yüksek buhar basıncına sahip olmasından dolayı da oda ısısında dahi kısmi olarak buharlaşma gösteren bir metaldir. Tüm bu özelliklere ilave olarak; madencilik sektöründe civa bulunduran kayaçların parçalanması, fosil yakıtların kullanımı sonucu, civa prosesi sırasında, katı atık depo alanlarından sızıntılar, pillerin kontrolsüz çevreye atılması, diş dolgu maddesi olarak kullanılan amalgam ve ev eşyalarında civa barındıran malzemelerin deformasyonu sonucunda civanın açığa çıkması gibi olaylar sonucunda (insanların çalışmaları) hava ve sularda miktarının artmasına yol açmaktadır. Ayrıca metilciva da başka bir kirletici kaynak olarak karşımıza çıkmakta olup suya karışan civanın bakteriler ve çeşitli organizmalar aracılığıyla metilcivaya çevrilmesi sonucu oluşmaktadır. Daha sonraki aşamalarda ise planktonlar, onları tüketen küçük balıklar ve midyeler, küçük balıkları yiyen büyük balıklar ve son olarakta deniz memelileri aracılığı ile besin zincirine karışarak döngüyü oluştururlar (Güven, 2009).

1.4.4.3. Manganez (Mn)

C.W. Scheele ve diğ. manganezi ilk olarak tespit etmişler ancak 1774 yılında J.G. Gahn tarafından serbest metal olarak ayrıştırılarak bilim dünyasına kazandırılmış ve ismini ise ilk bulunduğu manyetik kayadan almıştır. Yerkabuğunda bulunan en yaygın 12. elementtir. Serbest metal olarak bulunmayan manganez 100'den fazla mineral ile bileşik halde bulunur iken % 7-27 oranında ise denizlerin tabanında bulunan nodüllerde de görülmektedir (Liu ve diğ., 2005).

Manganın; fungusit olarak, camlarda, seramiklerde, boyalarda, kuru hücre pillerinde, pigmentlerde, gıda katkı maddelerinde ve tıpta uzun yıllar boyunca kullanıldığı bilinmektedir. Yine manganın %90'dan fazlası demir ve çelik prosesinde ve demirsiliko mangan alaşımlarının yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca korozyonu azaltmak amacıyla bakır veya alüminyum alaşımı olarak, permanganat ile yapılan alaşımlarının da kimya endüstrisinde oksidasyon reaksiyonlarında kullanımı tercih edilmektedir (Gerber ve diğ., 2002; Özdemir, 2008).

Yukarıda bahsedilen özelliklerine ilaveten esansiyel bir element olarak mangan antioksidant savunma sisteminde oldukça etkindir. Ayrıca kanser hücrelerini modifiye etme özelliği de bulunan süperoksit dismutazın'ın (MnSOD) yapısının bir bölümünde yer alır (Parker ve diğ., 1987; Liu ve diğ., 2005; Özdemir, 2008).

Manganın bakterilerdeki dozunun artması DNA'nın replikasyonunu ve onarımına etki etmektedir. Mutajeniteyi belirlemek amacıyla uygulanan AMES testinde özellikle mangan sorumlu olmadığı halde mikroorganizmalarda ve memeli hücrelerinde DNA zararlarına ve kromozom kırılmalarına sebep olduğu bilinmektedir. Mangan miktarının canlıda artması memelilerde verimliliği olumsuz olarak etkilerken embriyo ve fetüs üzerinde zehir etkisi göstermektedir (Domingo, 1994). Manganın kansere sebebiyet verdiği ile ilgili veri sayısı çok azdır ve inorganik manganın karsinojenik özelliği de bildirilmemiştir (Gerber ve diğ., 2002; Özdemir, 2008).

1.4.4.4. Çinko (Zn)

Üretimi hakkında net bir bilgiye sahip olunmasa da M:Ö 1000 yıllarında Çinliler, 14. yüzyılda ise Hintlilerin metalik çinko üretmiş oldukları ifade edilmektedir. Kesin kayıtlara bakıldığında ise ilk kez Avrupa'da Löhynns Goslar'da bu metali tanımlamış (1617) ve adını da koymuştur (Özdemir, 2008).

Çinko korozyondan korunmayı iyi derecede sağlamaktadır. Çinko demir konstrüksiyon malzemelerine oranla daha fazla elektronegatif özellik göstermesinden dolayı, çinko kaplamalar çelik inşaatlar için korozyondan korunmayı gerçekleştirir ve bu yapısı da çinkonun en önemli kullanım alanını belirlemektedir. Çinko oksit (ZnO), çinko beyazı yada Çin beyazı olarak ifade edilir ve boya pigmenti olarak kullanılmaktadır. İlaveten çinkonun; bronz, demir, cam, kağıt yapımı, fungusitler, akü ve kauçuk-lastik sektörlerinde de kullanıldığı görülmektedir. Tıp alanında; kozmetik ürünler, antiseptikler ve insülin

preparatlarının hazırlanmasında da aktif olarak kullanıldığı bilinmektedir (Vural, 1993; Özdemir, 2008).

1869'da Raulin tarafından yapılan çalışma sonucunda çinkonun *Aspergillus niger*'in büyümesi için gerekli olduğunu ilk olarak ifade edilmiştir. Ayrıca çinkonun mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların büyümesini gelişmesini ve farklılaşmasını sağlayan zorunlu bir element olduğu bildirilmiştir (McCall ve diğ., 2000; Choudhury ve Srivastava, 2001).

Ayrıca çinkonun canlının gelişimi, yumurta olgunlaşması, deri fonksiyonu, yara iyileşmesi, bağışıklık gücü ve protein, karbohidrat, yağ, nükleik asit sentezi ya da degradasyonu gibi çok sayıda görevleri olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda karbonik anhidraz, alkol dehidrojenaz, ve karboksipeptidaz gibi 70'den fazla metaloenzim fonksiyonu için koenzim bileşeni olarak görev yapmakta, DNA bağlı proteinlerin de temel bileşenini oluşturmakta ve tRNA sentetaz da çinkoya bağımlıdır. Fizyolojik oranlarda bulunan çinko ise Cd, Hg, Pb ve Sn gibi diğer ağır metal iyonlarının toksik etkilerini azaltmada önemli rol oynamaktadır (Glasfeld ve Schimmel, 1997; Özdemir, 2008).

Çinkonun yüksek miktarları birden çok önem arz eden fonksiyonları etkisi altına alan inhibitördür. Aynı zamanda çinko bakteri ve mitokondrilerin elektron taşıma sisteminin potansiyel inhibitörüdür. Yine toksik etkisinde Cd, Hg, Pb, Cu, Ni ve Co gibi diğer metallerle kıyaslandığı zaman daha düşük olduğu bildirilmektedir (Choudhury ve Srivastava, 2001; Özdemir, 2008).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

“Petrol ve Türevleri İle Kirletmiş Topraklardan Aromatik Hidrokarbonları ve Petrolü Parçalayabilen Bakterilerin İzolasyonu ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tezimde faydalandığım ulusal ve uluslararası literatürden çalışma konumuzla yakından ilgili olan araştırmalar tarih sırasına göz önüne alınarak aşağıda özetlenmiştir.

Christova ve diğ., (2004) hidrokarbonun kirletmiş olduğu endüstri alanlarında yapmış oldukları bir çalışmada; bakterinin izole edilmesinde tek karbon kaynağı %2 n-hekzadekan içeren mineral salt besiyerini tercih etmişlerdir. Saflaştırma işleminden sonra tek koloniler 100 ml'lik erlenlerin içinde zenginleştirici olarak %2 n-hekzadekan yada n-parafin içeren 10 ml'lik besiyerlerine aktarılıp inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışma sonucunda yeni bir suş olarak bildirilen *Renibacterium salmoninarium* 27BN VİTEK sistemi, biyokimyasal ve fizyolojik testler ile tanımlaması yapılmış olup biyosüpfektan üretebildiği de belirlenmiştir. Üretilen biyosüpfektanın ise *Pseudomonas aeruginosa* suşu için spesifik özellikte olan RLL ve RLLL iki ramnolipitini ürettiği kromotografi ve kızılötesi spektrofotometre analizleri sonucunda belirlendiği bildirilmiştir.

Mersin ilinde bulunan rafineri alanlarından alınan toprak örnekleri M9 minimal besiyerinde (zenginleştirilerek) inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda *Pseudomonas* (ARP) cinsine ait olduğu belirlenen 50 alt türün izolasyonu gerçekleşmiştir. Bu çalışmada MM9 agar besiyerinde en iyi üreyen ARP26 ve ARP28 numaralı suşlar biyodegradasyon testlerinde kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada; phenantrene'nin yedi günlük üremesinin sonunda ARP26 no'lu suşta %93, ARP28 no2lu suşta %98 oranında ayrışmasının (parçalanma) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ARP26 ve ARP28 no'lu izolatların herikisinde de 26kb'lık phenanthrene degradasyonundan sorumlu bir plazmidin bulunduğu tespit edilmiştir (Coral ve Karagöz, 2005).

Yapılan araştırmalar incelendiğinde; Drop Collapse metodu biyosüpfektan üretimini tespit etmek için hızlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmacılar Drop Collapse yöntemini *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'in biyosüpfektan üretimlerini göstermek amacıyla kullanmıştır. Drop Collapse yöntemi sıvı kültürde ramnolipit varlığını belirlemek uygulanmıştır. Bu yöntemde; mikrolate kuyucukları mineral yağ ile kaplandıktan sonra eklenen süpernatantda biyosüpfektan üretimi var ise mineral yağ çözülerek süpernatantın kuyucukta yayıldığı görülür ancak süpernatant

biyosürefektan bulundurmuyorsa mineral yağın çözülmediği süpernatantın ise damla halinde kadığı bildirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* suşlarının süpernatantlarının yayıldığı görülmüştür. Bu yayılmanın ise biyosürefektan varlığını belirlediği ifade edilmiştir (Tuğrul ve Cansuar, 2005).

Hunterve diğ., (2005) tarafından üç ve daha fazla benzen halkası içeren pyrene (Pyr) ve benzo[a]pyren (BaP) gibi moleköl ağırlığı yüksek poliaromatik hidrokarbonları parçalama özelliği gösteren bakterilerin izolasyonu araştırılmıştır. PAH'ın bulaşmış olduğu topraklardan *Bacillus subtilis* türü izole edilmiş ve yağ asidi metil ester analizi ile teşhisi yapılmıştır. Ayrıca izolatın biyodegradasyon kapasitesini belirlemek amacı ile pyrene, 1-aminopyrene ve 1-hidroksipyrene`in her birinin 33µg/ml`lik konsantrasyonundaki gelişimi gözlenmiştir. Sonuç olarak; pyrene yada benzo[a]pyrene`in 20µg/ml`sinde 30 °C` de 4 günlük üremesi takibinde *Bacillus subtilis`in* pyrene`i % 40 ve benzo[a]pyrene`i %50 oranında parçalayabildiği tespit edilmiştir. Yapılan araştırma *Bacillus subtilis`in* poliaromatik hidrokarbonları parçalaması ile ilgili ilk olma özelliğindedir. Çalışma sonucunda dönüßen ara ürünlerin bileşiklere oranla zehirli (toksik) olup olmadığını yanısıra *Bacillus subtilis`in* pyrene veya benzo[a]pyrene`i karbondioksit ve suya kadar parçalayabilme özelliğininde belirlenmeye çalışılmıştır

Das ve Murkherjee (2007) tarafından Kuzey Doğu Hindistan`da petrol ile kirletilmiş topraklardan alınan örneklerle yapılmış olan bir incelemede sonucunda; *Bacillus subtilis* DM-04, *Pseudomonas aeruginosa* M ve *Pseudomonas aeruginosa*NM suşları izole edilmiş ve bu izolatların ham petrol hidrokarbonlarını kullanabilme yeteneklerinin olduğuda tespit edilmiştir. Yine *Pseudomonas aeruginosa* M, *Pseudomonas aeruginosa* NM ve *Bacillus subtilis* suşları ham petrolle bulaşmış toprak ile muamele edilerek 120 günlük inkübasyon süresinin akabinde kontrol toprağı ile kıyaslama yapıldığında bakterilerle bulaştırılan toprakta toplam petrol hidrokarbonları seviyesinde düşüş olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir. Ayrıca *Bacillus subtilis* suşuna göre *Pseudomonas* suşlarının besiyerindeki toplam petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğinin fazla olduğu ilaveten de izolatların biyosürefektan üretme kapasitesinin de olduğu tespit edilmiştir. Çalışma neticesinde araştırmacılar; *Bacillus subtilis* DM-04 ve *Pseudomonas aeruginosa* M ve NM suşlarının doğal ortamlarda biyoremediasyonda etkin olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Cd, Co, Cu, Mn, Zn ve Ni`e elementlerine karşı termofilik yapıdaki *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus*, *Bacillus thermantarcticus*, *Anoxybacillus amylolyticus* ve *Geobacillus*

thermoleovorans sub.sp. *stromboliensis* türlerinin toleranslarını belirlemek amacıyla minimum inhibisyon konsantrasyonlarının ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan metal konsantrasyonları (mM) olarak belirlenmiştir ve 72 saatlik üreme (inkübasyon) sonrasında minimum inhibisyon yoğunlukları belirlenerek kaydedilmiştir. Çalışma neticesinde; bakterileri metal dirençlikleri açısından değerlendirildiğinde her bir metal için en direnç olanda en duyarlı olana doğru sıralama şu şekilde bir sıralama yapılmıştır; *Bacillus thermoantarcticus* için; Mn>Co>Cu>Ni>Zn>Cd, *Anoxybacillus amylolyticus* için; Mn>Co>Zn>Ni>Cu>Cd, *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. *stromboliensis* için; Mn>Ni>Cu>Co>Zn>Cd ve *Geobacillus toebii* sub.sp. *decanicus* için; Mn>Ni>Cu>Zn>Co>Cd (Özdemir, 2008).

Diğer bir çalışmada ise Yılmaz (2008); süt fabrikasının atık sularından 5 farklı türde bakteri izolasyonuyapmış ve bu izolatlardan 3 tanesinin biyosümfektan ürettiğini gözlemlemiştir. Elde edilen izolatların biyosümfektan üretme yeteneğini Drop Collapse metodu ile belirlemiş ve bu özellikteki bakteriler ise *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* olarak teşhis edilmiştir. Bu türlerden elde edilen biyosümfektanlar sırasıyla BS-I, BS-II ve BS-III şeklinde isimlendirilmiştir. Daha sonraki aşamada ise bu izolatlardan elde edilen biyosümfektanları bitki patojeni olan *Fusarium* cinsine ait *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 ve *Fusarium heterosporium* ATCC 15625 türleri üzerinde antifungal etkileri görmek amacıyla da kullanmıştır. Çalışma sonunda biyosümfektanların funguslara karşı antifungal etkiye sahip oldukları belirlenmiş ve en fazla fungal etkiyi BS-III numaralı biyosümfektanın gösterdiği tespit edilmiştir.

Rafineri bölgesindeki atık sularından izole edilen bakteriler ile Yalçın (2008) tarafından yapılan bir araştırmada biyosümfektan üretimi ve hidrokarbon degradasyonu çalışılmıştır. Elde edilen izolatların *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* şeklinde tanısı yapılmıştır. Drop Collapse metodu ile izolatların biyosümfektan üretme yeteneği araştırılmış ve tümünün biyosümfektan ürettikleri gözlemlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* türlerinin ürettiği biyosümfektanlar BS-I, BSII, BS-III ve BS-IV şeklinde isimlendirilmiştir. Çalışmada biyosümfektan üretiminde rafineri atık suyu hidrokarbon kaynağı olarak kullanılmış olup; biyosümfektan üretiminde uygun olan şartların ayarlanması amacıyla da pH, azot kaynağı, karbon kaynağı ve EDTA varlığının etkisi de belirlenmiştir. İzolatlar üretmiş oldukları BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV

biyosümfektanlarının yapısı FTIR analizi, karbonhidrat, protein ve lipid testleri ile birlikte emülsiyon testi, yüzey gerilimi, antimikrobiyal ve hemoliz aktivite testleri yapılmıştır. Elde edilen suşlar rafineri atık suyu ile 10 gün 35⁰C`de inkübe edilmiş bu esnada belirli aralıklarla alınan numunelerde biyosümfektan üretimi ve hidrokarbon parçalaması gözlenmiştir. İnkübasyon sonrasında BS-I, BS II, BS-III ve BS-IV için sırası ile 712, 536, 448 ve 356 mg/L`lik biyosümfektan üretimi tespit edilmiştir. Rafineri atık su içeriğinde yer alan hidrokarbonların biyodegradasyonunda *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* türleri kullanılmış ve sırasıyla%79.2, %54.0, %69.5 ve %40.2 oranlarında parçalanmanın olduğu bildirilmiştir.

Kaya (2008) yapmış olduğu çalışmada; Tekirdağ ilinde endüstriyel atıkla kirlenmiş Çorlu deresinden ve Batman ilinde petrole kirlenmiş topraklardan toplam 26 adet bakteri izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Daha sonraki aşamada ise; izolatlara 5⁰C ve 42⁰C`de gelişme, denitrifikasyon, oksidaz, jelatin ve nişasta hidrolizi, pigmentasyon testleri uygulanmış ve izolatların protein profilleri çıkarılarak benzerlik oranları tespit edilmiştir. Ayrıca Basal Mineral Salt Medium besiyerinde üreterek izolatların biyosümfektan üretme yetenekleri araştırmış ve en yüksek miktarda ramnolipit üreten *P. aeruginosa* 78 ve 99 suşları ile, 393 mg/mL ile yüksek miktarda ekzopolisakkarit (EPS) üreten *P. stutzeri* T3 türünü çalışmalarda kullanmak amacıyla belirlemiştir. Yine ramnolipit üreten *P. aeruginosa* 78 ve *P. aeruginosa* 99 suşlarının kritik misel yoğunluk miktarlarını 115 mg/L ve 130 mg/L olarak tespit etmiştir. pH ve sıcaklıktaki değişimlerde ramnolipitlerin etkinliklerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda ramnolipid üreten suşların EPS üretimlerinde yüksek olduğunu fakat EPS üretimi en yüksek olan *P. stutzeri* T3 suşunun ramnolipid gibi yüzey aktif bir madde üretmediği tespit bildirilmiştir. Son olarak da EPS`nin besiyerinin yüzey gerilimini etkilemediği belirlenmiştir.

Liu ve diğ., (2005), tarafından yapılan çalışmada, dizel atıkları parçalayabilme yeteneğine sahip üç bakteri suşu (*Alcaligenes piechaudii* CC-ESB2, *Gordonia hirsuta* CC-GH1 ve *Rhodococcus ruber* CC-RR1) petrol kontamine olmuş bir bölgeden izole edilmiş ve hidrokarbonları parçalama özellikleri test edilmiştir. İzolatların petrol parçalayıcı özelliklerinin araştırılması amacıyla; oksijen ihtiyacı, tuzluluk toleransı, yüzey aktivitesi, yüzey hidrofobik özelliği, emülsifikasyon aktivitesi, yüzey geriliminin azaltılması gibi çeşitli özellikleri de araştırılmıştır.

Zhao ve Wong (2009) termofilik bir bakteri olan *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 suşunu petrol ile kirlenmiş topraktan izole ettikleri çalışmalarında karbon kaynağı olarak naphthalene yada hexadecane içeren Bushnell Hass besiyeri kullanmıştır. Elde edilen izolatin biyosümfektan üretimi, onun yüzey gerilimi üzerine etkisi araştırılmış ve ham biyosümfektanın Du-Nouy Tensiometer cihazıyla ölçümü yapılmıştır. Neticede üretilen biyosümfektanın poliaromatik hidrokarbonların parçalama oranını arttırma potansiyeline sahip olduğunun gözlemlendiği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada ise; Katar'ın Umm-Saied kentinde bulunan sanayii bölgeleri civarından elde edilen toprak numunelerinden poliaromatik hidrokarbon parçalayabilme özelliği gösteren bakterilerin izolasyonu yapılmıştır. Zenginleştirme maddesi olarak tek karbon ve enerji kaynağı naphthalene, phenanthrene ya da anthracene içeren besiyeri kullanılarak izolasyon yapılmış ve elde edilen bakteri izolatları morfolojik, fenotipik ve moleküler metodlar ile tanımlanmıştır. PAH bileşiklerinin konsantrasyonlarına göre izolatların büyüme gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların büyümeleri sırasında ortam renginde farklılıklar gözlenmiş ve bu durumun izolatların farklı metabolitler üretmesi sonucunda gerçekleşebileceği yorumunu yapmışlardır. Yine izolatların araştırması yapılan üç farklı poliaromatik hidrokarbonuda parçalayabileceği bildirilmiştir. 16S rDNA gen sekansına dayanan tanımlarına göre izolatların; *Pseudomonas geniculata* ve *Achromobacter xylosoxidans* olduğubelirlenmiştir. Poliaromatik hidrokarbonlarla kirlenmiş topraklarda bunları parçalayabilen bakterilerin çeşitli popülasyonlarının bulunduğu ve toprakta yer alan bakterilerin bu kirlenmiş alanların biyoremediasyonu amacı ile kullanılabilceği ifade edilmiştir (Al-Thani ve diğ., (2009).

Sevgi ve diğ., (2010) tarafından Mersin ili Kazanlı endüstri bölgesinden alınan toprak örneklerinden 272 adet *Pseudomonas* spp. ve 161 *Bacillus* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan toprak analizlerinde örneklerde Cr, Cu, Ni, Co, Cd ve Zn gibi altı çeşit ağır metale rastlanılmıştır. İzolasyonu yapılan bakterilerin %73,9'u Cr'a, %26'sı Ni'e, %18,4'ü Zn'ya, %11,5'i Cd'a, % 9,2'si Co'a ve %7,3'ü Cu'a karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada yüksek MTC oranları (Maximum tolerable metal concentrations); Cr için 2mM, Ni için 3mM ve Zn ile Cu için 5mM olarakbelirlenmiştir. Aynı zamanda Cu, Cr, Zn ve Ni'e karşı dirençli olan *Pseudomonas* spp. izolatlarında 1,8, 2,1 ve 28kb büyüklüğünde olan ortak plazmidlerin bulunduğubildirilmiştir.

Petrol rafinerisinin ham petrole kirletilmiş bölgelerinden alınan toprak örnekleri 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT) ile zenginleştirilen MM9 besiyerinde inkübasyona bırakılmış ve 15 adet bakteri izole edilmiştir. 10 gün 30 °C`de inkübasyon süresi sonrasında en iyi şekilde üreyen izolatın 16S rRNA/DGGE metodu kullanılarak identifikasyonu yapılmış ve bu izolat *Arthrobacter chlorophenolicus* olarak belirlenmiştir (Küce, 2010).

Eraydın-Erdoğan (2010) tarafından yapılan çalışmada; Batman, Adana ve Adıyaman`nın petrol ile kirlenmiş topraklardan alınan örneklerden 33 adet bakteri izole edilmiş ve bunların ön tanımlaması, taksonomik sınıflaması, Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS) analizi, oksidaz ve %3 KOH testleri uygulanmıştır. Ham petrol içeren besiyerinde hem iyi üreme gösteren hemde ham petrolü parçalama yeteneği yüksek olan 6 bakteri izolatu belirlenmiştir. Tanılama sonucunda izolatların; *Pseudomonas aeruginosa* (2suş), *Pseudomonas putida biotype A* (2suş), *Citrobacter amalonaticus-GC subgroup A*, *Acinetobacter genomospecies* türleri olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise besi ortamında en iyi gelişmeyi gösteren 6 adet bakteri suşu petrol ile kirlenmiş toprağa aşılanarak 120 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda uygulanan toprakta izolatların % 56 oranında petrolü ayrıştırdığının tespit edildiği bildirilmiştir.

Hindistan`ın Himachal Pradesh kentinde beş farklı akaryakıt istasyonundan petrole kirlenmiş topraklardan izole edilen bakterilerin anthracene parçalama yeteneklerine bakılmış ve bunun için % 0,1 anthracene ve % 0,5 pepton ile zenginleştirilmiş Basal Salt Medium besiyeri kullanılmıştır. Pepton miktarı 0,25g ve 0,1g`dan 0,0 grama kadar düşürülmüş ve bu besiyerinden 76 adet bakteri izole edilmiş bunlardan 5 adetinin ise anthracene direnç yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir. Tanımlaması yapılan *Pseudomonas* sp. türünün anthracene parçalayabilme kapasitesi % 74,8 olarak saptanmış ve bu izolatın cefadroxil ve ampicilline antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu da belirlenmiştir (Kumar ve diğ., 2010).

Mirdamadian ve diğ., (2010) tarafından petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* genuslarına ait türlerden, petrol ve bazı aromatik hidrokarbonların varlığında büyüme yeteneği gösteren 5 tanesi belirlenmiştir. Biyodegradasyon yetenekleri ve büyüme oranları; ham petrol, hafif yağ, anilin+katekol, naftalin ve toluen ilaveli zenginleştirilmiş besiyerinde belirlenmiş ve neticede bu türlerin çevrede zehir etkisi gösteren çeşitli aromatik hidrokarbonları parçalayabildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu türlerin plazmit profilleri belirlenerek

bunların farklı kültürlerde biyodegradasyon yapma yeteneğine sahip olan plazmidler ile ilgili olduğuda bildirilmiştir.

Chile'nin Valparaiso bölgesinden ham petrol ile kirletilmiş topraklardan alınan örneklerden hidrokarbon parçalayan bakterilerin izolasyonu, tek karbon kaynağı olarak ham petrol ile zenginleştirilmiş Bushnell Haas besiyeri kullanılarak yapılmıştır. İzolatların biyokimyasal ve 16S rRNA gen sekans analizlerine göre; *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Kocuria* genusuna ait türler olduğu belirlenmiştir. Yine çalışmada toluen/ksilen bozunma yolu catechol 2,3-dioxygenase enzimini kodlayan xyIE geni *Acinetobacter*, *Kocuria* ve *Pseudomonas* genuslarında tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Acinetobacter radioresistens* ve *Acinetobacter calcoaceticus* suşlarının tek karbon kaynağı olarak n-hexadecane'ı substrat olarak tercih ettiği *Pseudomonas stutzeri* türünün ise naphthalene'de iyi bir şekilde geliştiği gözlenmiştir. Bunun dışında izolatların nikel, civa, kurşun, bakır ve kadmiyum metallerine karşı bakteriyal tolerans kabiliyetleri belirlenmiş ve *A. radioresistens* ve *A. calcoaceticus* türlerinin hidrokarbon ile kirlenmiş alanlarla yoğun olarak bulunan bakır ve kadmiyum metallerine karşı dirençli oldukları belirtilmiştir. Çalışma sonuçları incelendiğinde ise; *Acinetobacter* türlerinin hidrokarbonları parçalamada oldukça önem arzeden suşlar olduğu ve ağır metallere karşı da direnç yeteneğine sahip olduğunun saptandığı bildirilmektedir (Mendez ve diğ., 2010).

Hidrokarbonla kirletilmiş bölgelerden izolasyonu yapılan bakterilerden biyosümfektan üretme yeteneği bulunanlar Ramos ve diğ., (2010) tarafından belirlenmiştir. Yine izolatların biyosümfektan üretebilme yetenekleri "Drop Collapse" yöntemi ile belirlenmiş ve toplam 324 adet izolattan 17 tanesinin biyosümfektan ürettiği gözlemlenmiştir. Biyosümfektan üretme yeteneği belirlenen 3 izolat dışında diğerlerinin *Pseudomonas* cinsine ait olduğu diğer üç izolatın *Acinetobacter*, *Bacillus* ve *Rhodococcus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonunda; mikrobiyal biyosümfektanlar arasındaki moleküler yapı farklılığı değerlendirildiğinde biyosümfektanların biyoremediasyon, çözünebilir deterjan yada endüstride farklı uygulama alanlarında kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Hemalatha ve Veeraminakan (2011), Hindistan'ın Tamil Nadu bölgesinin Chennai şehrinde petrol ile kirlenmiş alanlarından aldıkları toprak örneklerinden *Flavobacterium* spp. ve *Pseudomonas* spp. türlerinin izolasyonunu yapmışlardır. İzolatların benzen, heksan, naftalin ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonları parçalama yetenekleri ve parçalama sırasında uygun pH ve optimum üreme sıcaklıkları belirlenmiştir. Araştırmacılar;

Flavobacterium spp. 2, *Pseudomonas* spp. 1 & 2 için optimum Ph'yı 7 olarak belirlerken *Flavobacterium* spp. 1 & 2 ve *Pseudomonas* spp. 1 & 2 için optimum sıcaklığı ise 40°C ile 45 °C olarak tespit etmişlerdir.

Escherichia fergusonii KLU01 suşunun petrol ile kirlenmiş topraklardan izolasyonu Sriram ve diğ., (2011) tarafından yapılmıştır. Dizel yakıtı tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak güçlü lipopeptit karakterde biyosüpfektan üretebilen, hidrokarbonları parçalayabilen, ağır metal direnci olan bir tür olarak tespit edilmiştir. Ürettiği biyosüpfektanın minimum aktif dozu ve kritik misel konsantrasyonu sırasıyla 0,165 ± 0,08 µg ve 36 mg/ L dir ve iyi bir çözücü olmasına rağmen ekstrem sıcaklık, pH ve NaCl, CaCl₂, ve MgCl₂'nin değişik yoğunluklarında kararlı bir yapı sergilediği gözlenmiştir. Yine çalışmada bakterinin demir, manganez, nikel, kurşun, çinko ve bakır elementlerine karşı direnç göstermesinin yanında bu suşun potansiyel çevresel endüstri çalışmalarında, genellikle hidrokarbon parçalama ve ağır metal biyoremediasyonunda, biyosüpfektan üreticilerinin yeni bir sınıfını ortaya çıkardığı gözlenmiştir.

Çin'in Shandong eyaletinde Jinan Petrol Rafinerisinde kirlenmiş topraklardan poliaromatik hidrokarbonları parçalayan JY3A kodlu bakteri izole edilmiş ve izolatın 16S rDNA sekans analizi, DNA-DNA ilişkisi ve yağ asidi analizlerine ek olarak fizyolojik özelliklerinin incelenmesi sonucu *Bacillus vallismortis* türü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu türün Gram pozitif, endospora sahip olduğu, hareketli, aerob, katalaz ve oksidaz pozitif, hücrelerin ise 0,8-1,0 µm genişliğinde ve 2,0-2,5 µm uzunluğunda, tek veya çift bazı zamanlarda ise zincir şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırmaya göre; *B. vallismortis* JY3A suşunun tek karbon kaynağı olarak phenanthrene, naphthalene, anthracene, fluorene, pyrene, benzene, toluene, methanol, phenol, ethanol, Tween 80, cyclohexane yada catechol'u kullandığı belirtilmiştir. Aynı zamanda bu suşun tek başına % 0,5 (w/w) Tween 80'de 15 gün süresince 150 ppm olan başlangıç konsantrasyonunda pyrenin %90,5 'lik kısmını degrade ettiği bildirilmiştir (Ling ve diğ., 2011).

Cezayir'de ham petrol ile kirlenmiş topraklardan biyosüpfektan üretme yeteneği olan *Staphylococcus* sp. 1E suşunun Eddouaouda ve diğ., (2011) tarafından izolasyonu yapılmıştır. Biyosüpfektan üretimi yüzey gerilimi ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Bu tür için en iyi substratın ham petrol olduğu bildirilmiştir. Yine bu türün ürettiği biyosüpfektanın besiyeri yüzey gerilimini 30 dynes cm⁻¹ aşağıya çektiği ifade edilmiş ve bu biyosüpfektanın *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve

Bacillus subtilis gibi hastalık yapıcı bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesinin olduğu gözlemlendiği bildirilmiştir. Neticede üretilen biyosüpfektanın hidrokarbonla kirletilmiş alanların biyoremediasyonunda kullanılabilir özellikte olduğu araştırmacılar tarafından tavsiye edilmektedir.

Çelikdemir (2012), Eskişehir`de hidrokarbonlar ile kirlenmiş sanayi bölgesinden alınan toprak örneklerinden 70 adet bakterinin izolasyonunu yapmıştır. Ayrıca izolatların biyosüpfektan üretme özellikleri Drop Collapse metodu tespit edilmiştir. Bu çalışmada izolasyonu yapılan bakterilerden 33 tanesinin biyosüpfektan üretebildiği görülmüştür. Biyosüpfektan üreten en iyi 5 izolatının Mineral Salt Medium besiyerinde inkübasyonu yapıldıktan sonra yüzey gerilimlerine bakılmış ve 71,1 mN/m yüzey gerilimindeki saf su kontrolüne göre 33,6 mN/m olarak ölçülen yüzey gerilimi değeri ile D1 kodlu izolat etkin üretici olarak tespit edilmiştir. Biyosüpfektan üreten bu izolat için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve uygun karbon kaynağı glikoz derişiminin 20g/L, azot kaynağının NH₄Cl ve azot miktarının 25 g/L, etkin C:N oranının ise 2:2,5 (w/w) olduğu belirlenmiştir. Son olarak 16S rRNA sekans sonuçlarına göre biyosüpfektan üreten bu izolatın %99 benzerlik oranıyla *Gordonia amicalis* olduğu kanısına varılmıştır.

Barauni petrol rafinerisinden alınan toprak örneklerinden BP10, NJ2 ve P2 olarak isimlendirilmiş 3 farklı suşun izolasyonu Singh ve diğ., (2013) tarafından yapılmıştır. İzolatların MSM besiyerinde pyrene`in biyolojik parçalama kapasitelerine bakılmıştır. Çalışmada, 50µg/ml pyrene içeren MSM besiyerinde 8 günlük inkübasyon sonucunda gelişen izolatlar arasında NJ2 adlı izolat %60 pyrene parçalama oranı ile iyi parçalayıcı olduğu görülmüş ve onu %44 parçalama oranı ile BP10`un takip ettiği belirlenmiştir. En düşük parçalama oranı ise %42 ile P2 olarak kodlanan izolata aittir.

Uçucu petrol hidrokarbonları, toplam petrol hidrokarbonları, toplam alkil benzenler ve poliaromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş topraklardan Benedek ve diğ., (2013) tarafından örnekler alınarak bakteriyal popülasyonların uzun süreçteki etkileri tespit edilmiştir. Bu araştırmada poliaromatik hidrokarbonların miktarının artması sonucu hydrocarbonoclastic bakterilerin çeşitliliğinin fazlaştığı bildirilmiştir. Bu veri α -, β -, γ - Proteobakterler, Aktinobakterler, Flavobakterler ve Bacil sınıflarının bulunup tanımlanmasıyla da destek bulmuştur. Uçucu petrol hidrokarbonları ve toplam alkil benzenlerinin yüksek konsantrasyonlarının Aktinobakter izolatlarının baskın olarak bulunmasında etkili olduğu varsayılmaktadır. Netice itibariyle poliaromatik hidrokarbonların bulaştığı topraklarda

bunların konsantrasyonlarının bakteri türlerinin çeşitliliği ile negatif bir korelasyonun olduğu ifade edilmiştir. Yoğun miktarda poliaromatik hidrokarbonlarla kirlenmiş topraklarda β -, γ - Proteobakterleri ve Aktinobakterleri temsil eden türlere rastlanıldığı bildirilmektedir.

Valsala ve diğ., (2014) tarafından yapılan çalışmada dizel yakıt ile kirlenmiş topraklardan numuneler alınmış ve 50mg/L pyrene içeren zenginleştirilmiş Basal Salt Medium besiyerinde izolasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatın 16S rRNA gen sekans sonucuna göre; *Staphylococcus nepalensis* olduğu tespit edilmiştir. Yine izolatın pyrene parçalanmasında aşamasında kullanılacak pH, sıcaklık ve temas süresi gibi çeşitli değişkenlerin optimizasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar ayrıca pyrene'in parçalanma hızını arttırmak için farklı yoğunluklarda glukoz ve sukroz gibi karbon kaynaklarını denemişler ve *S. nepalensis*'in 30 °C ve pH:8'de beş günlük inkübasyonu neticesinde en yüksek oranda parçalandığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; besi ortamına %4 glukoz ve %2 sukroz eklendiğinde bakterinin en yüksek oranda çoğaldığı ve pyrene'nin parçalanma veriminde yüksek olduğu bildirilmiştir.

Poliaromatik hidrokarbonları parçalayabilme yeteneğine sahip mikrobiyal birliğin 3, 4 ve 5 benzen halkasına sahip poliaromatik hidrokarbonlar üzerindeki toleransları Zafra ve diğ., (2014) tarafından araştırılmıştır. Yapılan incelemede ham petrol ile kirlenmiş topraklardan mantar ve bakteri türleri izole edilmiş ve bunların morfolojik ve moleküler tanıları sonucunda; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Scedosporium*, *Acremonium* mantar genusları ile *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Kocuria* ve *Delftia* genuslarına ait türler olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda izolatların phenantrene, pyrene ve benzo[a]pyrene gibi değişik poliaromatik hidrokarbonlara karşı toleransları incelenmiştir. İzolatların 0-6000 mg/L'ye kadar poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonlarındaki üreme ve çoğalma yetisi de gözlemlenmiştir. *Trichoderma asperellum* H15, *Aspergillus nomius* H7, *Aspergillus flavus* H6, *Pseudomonas aeruginosa* B7, *Klebsiella* sp. B10 ve *Stenotrophomonas maltophilia* B14 no'lu izolatların poliaromatik hidrokarbonların 6000mg/L yoğunluğuna kadar oldukça toleranslı davrandıkları saptanmıştır. PAH tolerans yeteneğine sahip toplam 12 adet sahip mantar ve bakteri türünün 14 gün inkübasyonu sonucunda phenantrene'in %87,76'sını, pyrene'in %48,18'ini ve benzo[a]pyrene'in %56,55' ini kirlenmiş topraklarda ayrıştırdığı saptanmıştır. Çalışma sonunda biyoremediasyon için yüksek bir potansiyele sahip olan mikrobiyal parçalama birliğinin yüksek molekül ağırlığına sahip poliaromatik

hidrokarbonlar ile kirletilmiş alanların arındırılmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma, düşük konsantrasyonlar ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında poliaromatik hidrokarbon bileşiklerinin ekstrem konsantrasyonlarına oldukça fazla toleranslı olan ilk mikrobiyal birlik (bakteri ve fungus) çalışması olma özelliği taşımaktadır.

Prakash ve diğ., (2014) tarafından yapılan araştırmada; Hindistan'ın Meerut bölgesinde petrol ile kirlenmiş topraklardan petrol hidrokarbonlarını parçalayabilme yeteneğine sahip bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve değerlendirilmesi yapılmış ve bu alanlardan elde edilen türlerin biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi sonucunda *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., ve *Micrococcus* sp. cinslerine ait olduğu bildirilmiştir. Yine araştırmaları sonucunda; izolatların dizel, benzen, anthracene, toluen ve naphthalene gibi petrol hidrokarbonlarını parçalama özelliği gösterdiğini de belirlemişlerdir. Aynı zamanda bunlar arasından seçilen türler ile bir bakteri birliği hazırlanmış ve bu karışımın petrol hidrokarbonlarını parçalama potansiyeli tespit edilmiş ve izolatlardan *Pseudomonas* sp. APHP9'in diğer suşlara oranla daha iyi parçalama performansının olduğu saptanmıştır. Benzen ve toluenin ise en iyi bakteri birliği tarafından parçalandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda; *Bacillus* sp. APHP6, *Pseudomonas* sp. APHP9, *Pseudomonas* sp. APBP1, *Micrococcus* sp. APIO4 ve bakteriyal birliğin benzen yoğunluklarında sırasıyla %54.8, %60.2, %40.9, %32.5 ve %66.2 parçalanma sağladığı ve dizel konsantrasyonunda ise sırasıyla %61.2, %68.4, %53.7, %39.3 ve %75.5 oranlarında parçalanmanın olduğu belirtilmiştir.

Mujahid ve diğ., (2015) tarafından Karachi bölgesinden petrol ile kirlenmiş toprak örneklerinden izole edilen bakteriler incelenmiştir. Hidrokarbonları parçalayabilme yeteneğine sahip bu bakterilerin naphthalene, xylene, phenanthrene, anthracene ve biphenyl vb. aromatik hidrokarbonları da parçalayabildikleri görülmüştür. Bu çalışmada, ham petrol içeren zenginleştirilmiş Bushnell Hass besiyeri kullanılarak 12 adet bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve tamamının hidrokarbonları parçalayabildikleri ifade edilmiştir. Bu türlerden özellikle *Pseudomonas* sp.SA044'ün kullanılan beş hidrokarbonuda parçalayabildiği tespit edilmiştir. Bu araştırma sonucunda elde edilen *Burkholderia* sp., *Ralstonia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Micrococcus* sp. ve *Staphylococcus* sp. türlerinin üç yada daha fazla aromatik hidrokarbonu parçalayabildikleri bildirilmiştir.

Hindistanın Sivasagar şehrinde Lakowa petrol alanından Patowary ve diğ., (2015) ham petrol ile kirlenmiş toprak örnekleri alınarak bakteri izolasyonu yapılmış ve 16S rDNA gen sekans analizine göre izolat *Pseudomonas aeruginosa* KS3 olarak teşhis edilmiştir. Yine bu suşun poliaromatik hidrokarbonları parçalama kapasitesine bakılmış ve biyosürefektan üretebilme yeteneği de besiyerinin yüzey gerilimi ölçülerek belirlenmiştir. Çalışma sonucunda; yerli ve biyosürefektan üretme yeteneğine sahip olan bu türün toplam petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında oldukça yüksek bir potansiyelin olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten bu türün ham petrol örneğinde bulunan 16 PAH arasından 8 tanesini de parçalayabildiğinin tespit edildiği belirtilmiştir. Ayrıca bu tür tarafından üretilen biyosürefektanın biyokimyasal ve FTIR analizi neticesinde glikolipit yapıda olduğu ifade edilmiştir.

Gupta (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise; petrol ile kirlenmiş topraklardan MJAG1501, MJAG1502, MJAG1503, MJAG1504 ve MJAG1505 kodları verilen 5 bakterinin izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar 10 gün boyunca %5 oranında motor yağı içeren Mineral Salt Medium besiyerinde inkübe edilmiş ve büyümeleri, petrol parçalama potansiyelleri ile protein profilleri belirlenmiştir. Bu izolatlardan sadece MJAG1505 kodlu olan inkübasyon süresince en fazla büyümeyi sağlamış ve protein konsantrasyonunda oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine çalışmada kullanılmış motor yağının karbon ve enerji kaynağı olarak denenmesi sonucunda MJAG1505 kodlu izolatın bunu parçaladığı saptanmıştır. Ayrıca Bergey's Manual'e göre bu izolatın *Bacillus megaterium* olduğu ifade edilmiştir.

Phenanthrene parçalayan *Massilia* sp. WF1 suşu Wang ve arkadaşları tarafından (2016) poliaromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş topraklardan izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu izolatın 20-35 °C sıcaklık ve pH 5,0-8,0'de 25-400 mg/L oranında phenanthrene'i parçalayabildiği bildirilmiştir. İlaveten bu suş 28 °C sıcaklık ve pH 6'da uygun koşullarda iki gün inkübe edildiğinde phenanthrene'nin 100 mg/L'sini parçaladığı görülmüştür. Netice itibariyle phenanthrene parçalamada kullanılan laktik asit ile inhibe edildiği fakat karbon ve hidrojen kaynağı olarak verilen glikoz, sitrik asit ve süksinik asit tarafından desteklendiği gözlenmiştir. *Massilia* sp WF1 tarafından salisilik asit ve ftalik asitin kullanılmadığı ve phenanthrene parçalamasına belirli bir şekilde etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Sadece iki metabolit olan 1-hidroksi-2-naftoik asit ve ftalik asitin phenanthrene bozunmasında tanımlanması yapılmıştır. Phenanthrene'nin yaklaşık % 27,7'si 1-hidroksi-2-naftoik asite dönüşürdüğü ve ayrıca 1-hidroksi-2-naftoik asitin % 30,3'ünün ise ftalik

asite metabolize edildiğinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Sonuç olarak ftalik asit metabolik yolu bozulmuş olduğu ve salisilik asit metabolik yolunun ise *Massilia* sp. WF1 tarafından phenantrene bozunma sırasında dikkate alınmadığı belirtilmektedir.

Nkem ve diğ., (2016) Malezya'da Rhu Sepuluh'da bulunan Tarball bölgesinden iki yerli hidrokarbon parçalayan bakteri izole etmişlerdir. Fizyolojik özellikleri ve 16S rRNA gen dizisi analizi sonucunda bu bakterilerin *Cellulosimicrobium cellulans* DSM 43879 ve *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ile %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türlerin hidrokarbonları parçalayabilme yetenekleri tek karbon kaynağı olarak mazot yağı kullanılarak test edilmiştir. Minimal salt besiyerinde 32⁰ C'de 10 gün boyunca inkübasyondan sonra GC – MS kullanılarak yapılan analizler sonucunda *C. cellulans*'ın dizel yağ alkanlarının %64.4' ünü ve *A. baumannii*'nin ise %58.1'ini parçalayabildiği ve ortamın optik yoğunluğunun 0.967 (*C. cellulans*) ve 1.515 (*A. baumannii*) olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda Tarball'dan elde edilen her iki yerli suşun buradaki hidrokarbon bozundurucu bakterileri popülasyonunun bir parçası olduğunu ve suları kirleten petrol atıklarının biyodegradasyonunda da kullanılabilme potansiyelinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Joy ve diğ., (2017) tarafından yapılan çalışmada; toplam 47 bakteri izole edilmiş ve Drop Collapse(DCM) ve yağ yayma (OSM), yönteminin kullanıldığı ilk tarama sonucunda 11 tane güçlü yüzey aktif madde (biyosümfektan) üreten izolat belirlenmiştir. Hemolitik testi (HA), setil trimetil amonyum bromür (CTAB) deneyi, yüzey gerilimi (ST), emülsiyonlaşma endeksi (E24) ve emülsiyonlaştırma aktivitesi (EA) 16S-rRNA dizilimi ve filogenetik analizi içeren ikinci tarama sonucunda izolatların; *Achromobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* ve *Pseudomonas* cinslerine ait olduklarının belirlendiği bildirilmiştir. Yine aynı araştırmacılar TLC, FT-IR ve GC-MS kromatogramları sonuçlarına göre; *Achromobacter*, (PS1) (ilk kez gözlemlendi) ve *Bacillus* (SLDB1) cinslerinin glikolipid ürettiklerinin tespit edildiğini de bildirmişlerdir.

Kaabi ve arkadaşları (2018); hava ve toprak koşullarının sıcaklık, UV radyasyonu ve tuzluluk açısından aşırı olduğu petrol ile kirlenmiş üç endüstri bölgesinde yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus*'un bakteri popülasyonuna hâkim olduğunu ancak popülasyonun küçük bir kısmını ise *Bacillus sonorensis* ve *Pseudomonas stutzeri* türlerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yine altı izolatın MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile tanımlandığı ve *Bacillus sonorensis*'in moleküler teknikler kullanılarak ribotiplleme ile de

doğrulandığı belirtilmiştir. Sonuçların, zellikle Arap körfezinde petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonunda yani arındırılmasında (yerli izolataların kullanılmasının) uygulama bağlamında kilit öneme sahip olduğu bildirilmiştir.

Hindistan'ın Mathura petrol rafinerisi ve Mathura lastik atığı p sahasından (Qaiser Bagh, Lucknow, India) potansiyel PAH parçalayıcı bakterilerin bulunabileceği toprak örneklerinden Kumaria ve arkadaşları (2018) tarafından örnekler alınarak izolasyon yapılmıştır. Bu alışmada, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas mendocina*, *Microbacterium esteraromaticum* ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri çoklu polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalamak (PAH's) ham petrol içerisinde inkübe edilmiştir. Araştırcılar sonuç olarak; gelişmiş bakteri konsorsiyumunun PAH'ların temizlenmesinde (remediasyonu) nemli bir potansiyele sahip olduğunun saptandığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmanın deney aşamasında aşağıda belirtilen materyaller kullanılmıştır.

3.1.1. Materyal Örnekleri

Araştırmada kullanılan toprak örnekleri 5-6 Şubat 2015 tarihinde; Mersin ili Kazanlı Bölgesi Karaduvar-Kazanlı mevki Rafineri depolama alanından ve çevresinden alınmıştır. Bu bölgelerdeki petrol ve petrol türevi atıklarla kirlenmiş alanlardan alınan toprak örneklerinden bakteriler izole edilmiştir.



Tablo3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı Bölgeler

Toprak Örnekleri	İzolat No	Alınan Bölge
1. Örnek	FH 1-1, FH 1-2, FH 1-3, FH 1-4, FH 1-5, FH 1-6	Petrol doldurma boşaltma sahasından alınan numuneler
3. Örnek	FH 3-3, FH 3-4, FH 3-5, FH 3-7	Petrol doldurma boşaltma sahası kapı önü kısmından alınan numuneler
5. Örnek	FH 5-1, FH 5-2, FH 5-3, FH 5-4, FH 5-5, FH 5-6	Petrol doldurma boşaltma sahası vana altı birikim kısmından alınan numuneler
6. Örnek	FH 6-1, FH 6-2	Petrol doldurma boşaltma sahası vana altı kenar kısmından alınan numuneler
7. Örnek	FH 7-2, FH 7-3, FH 7-4,	Petrol doldurma boşaltma sahası eski silo kısmından alınan numuneler
8. Örnek	FH 8-1, FH 8-2, FH 8-3, FH 8-5	Kazanlı rafineri bölgesi hammadde depolama alanından alınan numuneler
17. Örnek	FH 17-1, FH 17-2, FH 17-4, FH 17-5, FH 17-6	Eski Petrol boru hattı vana altı kısmından alınan numuneler
18. Örnek	FH 18-1, FH 18-2, FH 18-3, FH 18-4, FH 18-5, FH 18-6	Eski Petrol boru hattı tarla kısmından alınan numuneler

Ham Petrol

Çalışmada kullanılan ham petrol İzmir Aliğa Tüpraş Petrol Rafineri'sinden temin edilmiştir.

3.1.2. Kontrol Suşu

Çalışmada kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no'lu strain kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1. Nutrient Agar

Alınan örneklerden bakterilerin izolasyonu ve +4 °C de stoklanması için gerekli olan yatkın agar besiyerinin hazırlamasında kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone	5,0
Meat ekstrakt	3,0
Agar-Agar	12,0

Çalışmada hazır besiyeri kullanılmış olup besiyerinden 20 gram alınarak 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri otoklavda (Nüve OT 40L) steril edilmiş ve aseptik şartlarda steril petrilere dökülüp soğumaya bırakılmıştır. Akabinde besiyerlerinin kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla bir gece 37°C de etüvde (Nüve EN 500) inkübe edilmiştir.

3.1.3.2. Nutrient Broth

Bakteri izolatlarının aktifleştirilmesi amacıyla kullanılan besiyeridir.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone	5,0
Meat ekstrakt	3,0

Hazır olan besiyerinden 8 gram alınarak 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra hazırlanan besiyerideney tüplerine eşit miktarlarda dağıtımı sağlanmıştır. Daha sonra besiyeri deney tüplerinin içerisinde otoklavdasteril edilmiştir.

3.1.3.3. Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptic Soy Agar (TSA), az üreyen bakteri izolatlarının daha iyi bir üreme sağlayabilmesi amacıyla kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone from casein	15,0
Peptone from soymeal	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar-Agar	15,0

Yapılan çalışmada hazır besiyeri kullanılmış olup, besiyerinden 40 gram alınarak 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri otoklavda steril edilmiştir. Steril edilen besiyeri aseptik şartlarda steril petrilere dökülerek kontaminasyonu kontrol etmek için amacıyla bir gece 37⁰C`de etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB)

Bakteri izolatlarının zenginleştirilmesi amacıyla ve aynı zamanda az üreme gösteren izolatların daha iyi gelişebilmesi için kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone from casein	17,0
Peptone from soymeal	3,0
D (+) Glucose monohydrate	2,5
Sodium chloride	5,0
di-Potasyum hidrojen phosphate	2,5

Çalışma sırasında hazır besiyerinden 30 gram alınarak 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri deney tüplerine dağıtılarak otoklavdasteril edilmiştir.

3.1.3.5. Zenginleştirilmiş Besiyeri (Ham Petrol İçeren)

Alınan toprak örnekleri ham petrol ile zenginleştirilmiş besiyerine eklenerek, ham petrolü karbon kaynağı olarak kullanabilen bakterilerin izolasyonu yapılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
KNO ₃	1,0
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	1,0

Yukarıda verilen içerik 1 litre distile su ile çözülerek bu besiyerine %1 oranında Ham petrol:Triton-X-100 emülsiför (1:1) eklenmiştir. Bu besiyeri otoklavda steril edildikten sonra içerisine ham petrol ilave edilmiştir (Rojas ve diğ., 1999; Eraydın-Erdoğan, 2010).

3.1.3.6. Mueller Hinton Agar

İzolatların ağır metal ve antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Infusion from meat	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar-Agar	13,0

Hazır besiyerinden 34 gram alınarak 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra steril edilerek aseptik şartlarda petrilere dökülüp soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla bir gece 37⁰C`de etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.3.7. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyeri

Mikroorganizmaların biyosümfektan üretime yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla Zhang ve arkadaşları tarafından önerilen Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanılmıştır (Zhang

ve Miller, 1992; Zhang ve Miller, 1994). Mineral Salt Medium bileşenlerinin içeriği aşağıda belirtilmiştir (Yalçın, 2008).

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaNO ₃	4,0
NaCl	1,0
KCl	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ NPO ₄ .12H ₂ O	3,0
MgSO ₄	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,75
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,08
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,075
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5
H ₃ BO ₃	0,15
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05

MSM besiyeri pH: 6.8 (Hanna HI 2211) olarak ayarlanmış ve 121⁰C`de 30 dakika otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.3.8. Stok Besiyeri

Çalışmada elde edilen izolatların uzun süre muhafaza edilmesi amacıyla %20 oranında gliserol içeren TSB (Tryptic Soy Broth) hazırlanarak ağzı kapaklı eppendorf tüplerine yaklaşık 1.5 ml aktararak 121⁰C`de 15dk. otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Boyalar

3.1.4.1. Kristal Viyole

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Kristal Viyole	2,0

Amonyum Oksalat	0,8
Etil Alkol (% 95)	20 ml
Distile Su	80 ml

İzolatların boyanması amacıyla, 2g kristal viyole ve 20ml % 95`lik etil alkol içerisinde çözdürülmüştür. Ayrıca 0,8g amonyum oksalat 80 ml distile suda çözdürülmüş ve bu iki çözelti karıştırılarak kullanılmıştır (Temiz 2010).

3.1.4.2. Safranin

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Safranin	0,5
Etil Alkol (% 95)	10 ml
Distile Su	100 ml

Araştırmada kullanılan Safranin etil alkol içerisinde eritildikten sonra distile suda çözülmüştür (Temiz 2010).

3.1.5. Tampon ve Çözeltiler

3.1.5.1. Lugol Çözeltisi (Gram İyot Çözeltisi)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
İyot	5,0
Potasyum iyodit	10,0
Distile Su	100 ml

30 ml distile su içerisinde potasyum iyodit çözüldükten sonra çözeltilere iyot eklenerek çözelti hacmi 100 ml`ye tamamlanmıştır (Temiz, 2010).

3.1.5.2. KOH Çözeltisi (%3`lük)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
KOH	3,0
Distile Su	100ml

KOH distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.5.3. %3'lük H₂O₂ Çözeltisi

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
% 30`luk H ₂ O ₂	10 ml
Distile Su	90 ml

Konsantre hidrojen peroksit solüsyonundan (%30`luk) 10ml alınarak 90 ml distile su ile %3 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.1.5.4. Serum Fizyolojik

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	9,0
Distile Su	1000 ml

Serum fizyolojik hazırlamak amacıyla;9 gram sodyum klorür, 1000 ml distile su içerisinde çözdürülmüş ve otoklavda steril edildikten sonra steril tüplere dağıtılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.5.5. Gliserol

Elde edilen izolatların uzun süreli muhafazasını sağlamak amacıyla stok besiyerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.5.6. Mineral Yağ

İzolatların biyosürefktan üretme yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.6. Kullanılan Antibiyotikler

İzolatların antibiyotik dirençlilik seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan antibiyotikler Bioanalyse markası olup kısaltılmış adları, antibiyotik isimleri ve grupları, içerisinde bulunan antimikrobiyal madde oranı ile etki mekanizmaları Tablo 3.2`de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Antibiyotiklerin Grupları ve Etki Mekanizmaları (Akkan, 2009)

Kısaltma İsmi	Antibiyotikler	Grubu	Etki Mekanizması
NA, 30 µg	Nalidixic Acid	Kinolin	DNA giraz (topoizomerez II) enzimi inhibitörüdür.
IPM, 10 µg	Imipenem	Karbapenem	Bakteri duvarındaki penisilin bağlayan proteinlerden PBP- 1 ve PBP- 2'ye bağlanırlar. En geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiktirler.
CTX, 30 µg	Cefotaxime	Sefalosporin 3	Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.
GM, 10 µg	Gentamicin	Aminoglikozit	Protein sentezini inibe eder.
E, 15 µg	Erythromycin	Makrolid	Bakteri ribozomlarının 50S alt birimindeki 23S tRNA bağlanarak, aynı yere tRNA'nın bağlanmasını ve dolayısıyla peptid yan zincirin uzamasını önlerler.
TE,30 µg	Tetracycline	Tetrasiklin	30S alt birimine bağlanarak tRNA'nın bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önlerler.
CIP, 5 µg	Ciprofloxacin	Florokinolin	DNA giraz enzimini inhibe ederler.
C,30 µg	Chloramphenicol	Kloramfenikol	50S ribozomunu etkileyerek peptidil transferaz etkinliğini azaltırlar.
AM, 10 µg	Ampicilin	Aminopenisilin	Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.
F/M, 300 µg	Nitrofurantoin	Nitrofurantoin	Bakteride piruvattan asetilkoenzim A oluşmasına engel olurlar.

3.1.7. Çalışmada Kullanılan Ağır Metaller

Araştırmada kullanılan tüm ağır metallerin 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, konsantrasyonları hazırlanarak sterilizasyon işlemi 0,2µm çapında steril filtre ile yapılmıştır. Ağır metal dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılan metallerin moleküler formülleri aşağıda verilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Ağır Metallerin Moleküler Formülleri

Ağır Metal Tuzları	
CoCl ₂ 6H ₂ O	MnCl ₂ 2H ₂ O
ZnSO ₄ 7H ₂ O	HgCl ₂

3.2. Metod

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Toprak örnekleri Mersin ili Kazanlı bölgesi, Karaduvar mevki petrol depolama alanı ve çevresinden alınmıştır. Bakterileri izole etmek amacıyla; alınan 10 gr toprak örneği, (1 g KNO₃, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl₂, 1 g K₂HPO₄ içeren) 1 L besiyerine %1 oranında ham petrol: Triton-X-100 emülsiför (1:1) ilave edilerek zenginleştirilmiş besiyeri hazırlanmıştır. Daha sonra toprak örnekleri, hazırlanan 100 ml'lik besiyerlerinde 3 gün süre ile 28⁰C`de 180 dev/dak.`da çalkalayıcı inkübatörde (MAXQ 4450) inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü gün sonunda ise bu besiyerlerinden 10 ml alınarak tekrar taze besiyerlerine aktarılma işlemi yapılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır (toplam 3 inkübasyon). En son inkübasyon örneklerinden 0,1ml alınarak nutrient agar içeren petrilere ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda üreyen plaklar binoküler mikroskop (Novex P-20) ile incelenerek değişik koloni yapısı sergileyen bakteri izolatları seçilmiş ve saflaştırma işlemi yapılmıştır. En son aşamada ise elde edilen izolatlar tanımlamada ve sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla stoğa alınmıştır (Rojas-Avelizapa ve diğ., 1999; Eraydın-Erdoğan, 2010).



Resim 3.1. Petrol depolama alanı, dolum-boşaltım siloları çevresi



Resim 3.2. Ham petrol içeren steril besiyerleri



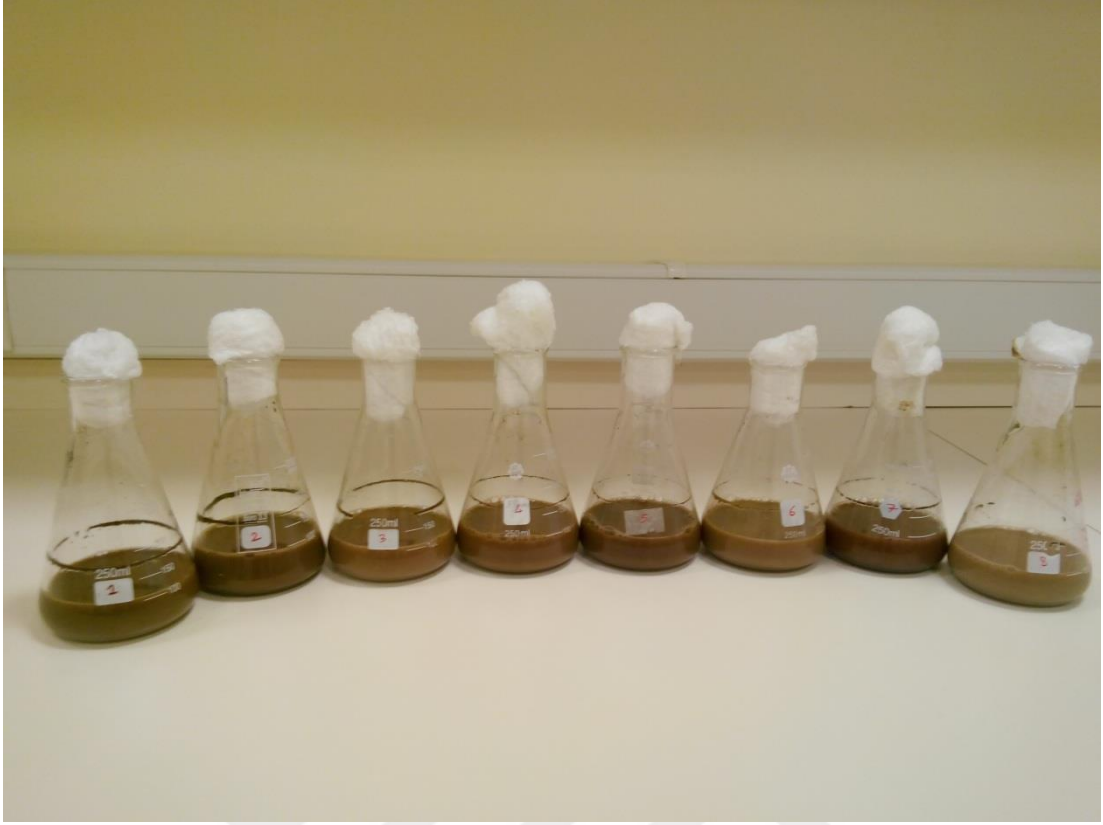
Resim 3.3. Toprak rneği ilave edilmiş ham petrol ieren besiyerleri



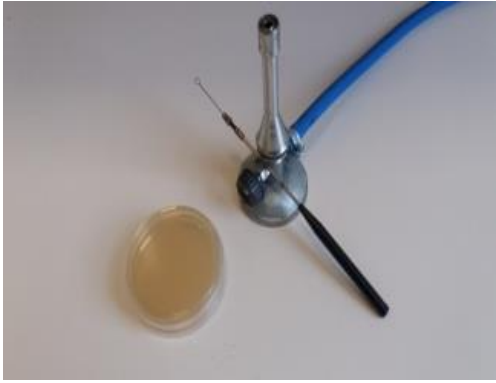
Resim 3.4. alkalayıcı inkübatör



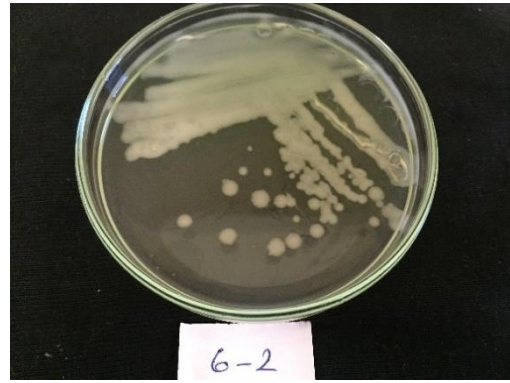
Resim 3.5. Steril taze besiyerlerine aktarım



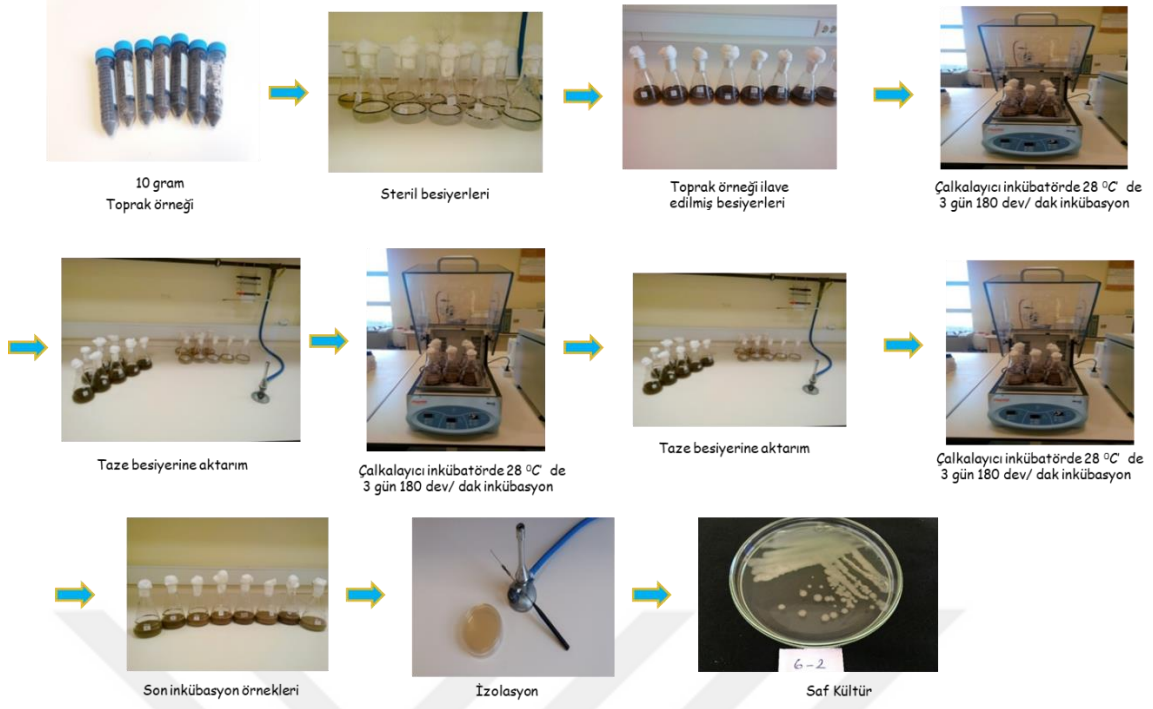
Resim 3.6. Üçüncü inkübasyon işlemi sonrasındaki besiyerleri



Resim 3.7. İzolasyon işlemi (çizgi ekim)



Resim 3.8. Saf kültür işlemi



Şekil 3.1. Toprak Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırma Basamakları

3.2.2. İzolatların Muhafaza Edilmesi

Aktifleştirilmesi amacıyla Nutrient broth besiyerinde 18 saat inkübe edilen izolatlar daha sonra Nutrient agar besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C`de 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyerlerinde gelişen kültürlerden birer koloni alınarak %20`lik gliserol içeren TSB`li besiyerine ekim yapılmıştır.

Bu stok tüpleri -80°C`de (Nüve DF 490) muhafaza edilmiş ve izolatlar altı ayda bir aktifleştirilerek tekrarmuhafaza edilmiştir.

3.2.3. İzolatlara Uygulanan Morfolojik Testler

3.2.3.1. Kültür Özellikleri

Bakteriler gelişimlerini sağlayacak besin ve mineral madde içeriğine sahip katı besiyerlerinde geliştirildiklerinde kendilerine özgü koku, renk ve şekillerde gelişim gösterme yeteneğine sahiptirler. Bu özellikler mikroorganizmaların genetik kontrolü altında kalıtılmakta olup türün özelliğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çıplak gözle görülen gelişim özellikleri mikroorganizmaların mikroskop kullanılmadan

tanınmasının ve tanılanmasının ilk basamağını oluşturmasından dolayı önem arz etmektedir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001; Bal, 2012) .

Elde edilen izolatlarının kültürel özelliklerini belirlemek amacıyla katı besiyerlerindeki saf kültürler kullanılmıştır. Kültür özelliklerin belirlenmesi amacıyla izolatlar katı besiyerlerine 3-4 faz çizgi ekim yapılarak inkübasyona bırakılmış ve koloni oluşumları gözlemlenmiştir. Daha sonra oluşan bu koloniler binoküler mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, koloni yüksekliği, koloni kenar şekilleri ve koloni rengi belirlenmiştir (Temiz, 2010; Barış, 2008; Orhan, 2013).

3.2.3.2. Gram Boyama Özellikleri

Gram boyama yöntemi ile bakterilerin hücre duvarlarındaki farklılığın ortaya çıkarılmasının sağlanması amaçlanmıştır. Gram boyama işlemi yapmak için 18-24 saat boyunca Nutrient agarda üreyen kültürlerden preparatlar hazırlanmıştır (yaşlı kültürlerden yanlış sonuçlar alınabileceğinden; Gram pozitif bakteriler Gram negatifmiş gibi değerlendirilebilir). Hazırlanan bu preparatlar kurutulup fikse edildikten sonra kristal viyole ile muamele edilmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda bol saf su ile kristal viyole yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu basamakta ise yıkanan preparatlar lugol (Gram iyot çözeltisi) solüsyonu ile kaplanarak 1 dakika süre ile muamele edilmiştir (iyot mordant olarak görev yapmaktadır). Bir sonraki aşamada lügol solüsyonu akıtılmış ve preparat bol su ile yıkanmıştır. Elde edilen preparatın % 96'lık etil alkol ile muamele edilerek 10-15 saniye boyunca alkolde boya giderimi gerçekleştirilmiştir. Preparatlar ardından saf su ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra preparatlar safranin boyası ile muamele edilerek 30-45 saniye beklemeye bırakılmıştır. Bu sürenin bitiminde preparatlar saf su ile yıkanmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra preparatlar kurutma kağıdı kullanılarak kurutulmuştur. En son aşamada ise ışık mikroskopunun 100x objektifi (preparatlar üzerine immersiyon yağı damlatılarak) ile bakteriler incelenmiştir. Mikroskop ile yapılan inceleme sonucunda mor renkte görülen bakteriler Gram pozitif olarak değerlendirilir iken pembe renkte görülen bakteriler ise Gram negatif olarak belirlenmiştir (Temiz, 2010).

3.2.3.3. KOH Testi (%3'lük)

Bu test Gram boyama yöntemini desteklemek amacıyla yapılmaktadır. Bu yöntem; Gram (-) bakterilerin %3'lük KOH muamelesi ile hücre duvarının parçalanması sonucunda

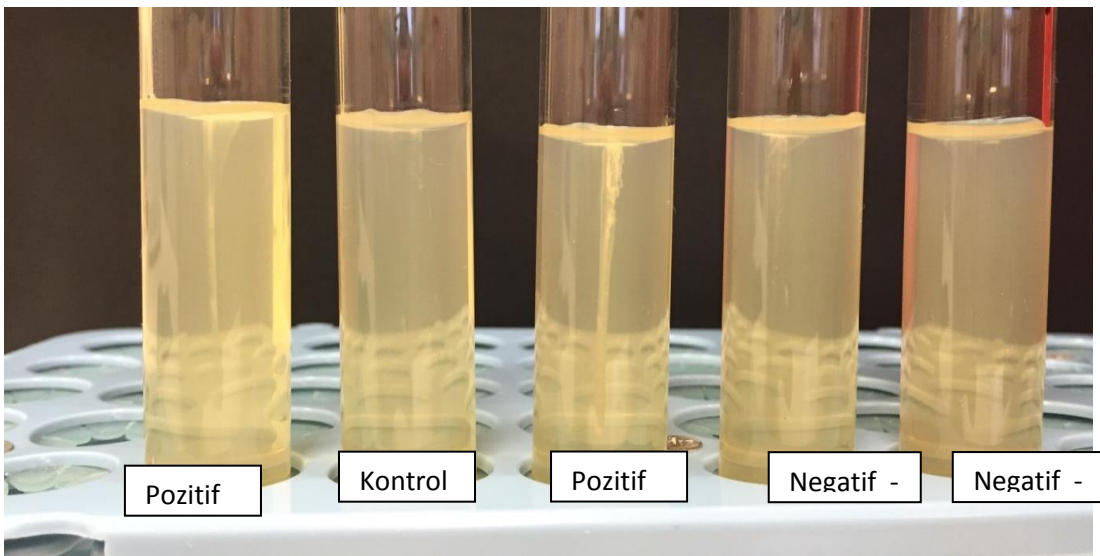
sitoplazma ve DNA'nın açığa çıkmasından dolayı viskoz yapının oluşması esasına dayanır (Sezen, 2015).

Steril bir lam üzerine 1 damla %3'lük potasyum hidroksit çözeltisi damlatılarak üzerine Nutrient agar da geliştirilen 24 – 48 saatlik bakteri kültürlerinden bir öze dolusu alınarak konulur ve bir cam çubuk yardımıyla homojenize edilir. Bu oluşan süspansiyonda cam çubuğu çekince bir uzama gözleniyor ise KOH pozitif, uzama gözlenmiyor ise KOH negatif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak uzama gözlemlenen izolatların Gram (-) olduğu kabul edilmiştir (Bal, 2012; Orhan, 2013; Hündür, 2015).

3.2.3.4. Hareketlilik Testi

Bakterilerin bazıları flagella olarak bilinen organelleri yardımıyla aktif olarak hareket etme yeteneğindedirler. Ancak hareketin belirlenmesi daha çok flagella yapısının tesbiti ile değil de hareketin gözlenmesi ile olmaktadır (İpek-Erbey, 2015).

Çalışmamızda hareketin belirlenmesi yarı katı besiyeri kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla; cam tüplerin içerisinde %0,4–0,5 agar içeren nutrient agar besiyerine iğne uçlu öze kullanılarak dik bir şekilde dibine kadar düz bir hat boyunca ekim yapılarak 24-48 saat 32 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonucunda, inokülasyon yapılan hattın sağa ve sola doğru bir dallanma var ise yada agarın içine doğru bir yayılma söz konusu ise bakteri hareketli, besiyerinin yüzeyinde ve inokülasyon hattı boyunca bir üreme gözlemlenir ise, sağa ve sola doğru bir dallanma yok ise bakteri hareketsiz olarak kabul edilmiştir (Çelebi, 2012; Öğütçü ve Algur, 2014).



Resim 3.9. Hareketlilik testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu

3.2.4. Bakterilerin Biyokimyasal Testleri

3.2.4.1. Katalaz Testi

Çoğunlukla aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerde bulunankatalaz enzimi, ortamda bulunan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalamaktadır. Katı veya sıvı besiyerinde üretilen bakteri kültürüne H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları şeklinde gözlemlenmesi, hidrojen peroksitin ayrıştığını buradan yola çıkarak da ortamdaki bakteride katalaz enziminin varlığını göstermektedir (Temiz, 2010).

Çalışmamızda yatık nutrient agar`da 30°C`de 24 saat üretilmiş kültürlerin üzerine %3` lük 1ml H₂O₂ çözeltisi damlatılmış ve gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı kontrol edilmiştir. Sonuçta gaz kabarcıklarının çıkması pozitif olarak kabul edilmiştir (Gerhardt, 1981; Tamer ve diğ. 1989; Temiz, 1994).

3.2.4.2. Oksidaz Testi

Bu test ile bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları tespit edilmiştir. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum mekanizmasında görev yapmakta ve elektron transfer sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla hücrel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır. Test aslında bakterinin sitokrom-c oksidaz enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması esasına göre çalışmaktadır. Eğer bakteride sitokrom c proteini var ise substrat ile reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumu gözlemlenir (Harley and Prescott, 2002; Adıgüzel, 2006).

Bu enzimin belirlenmesi amacı ile bir parça filtre kağıdı Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür`ün %1`lik solüsyonundan birkaç damla ile ıslatılmıştır. Daha sonra24 saatlik nutrient agar kültüründen bir öze dolusu bakterialınarak filtrekağıdının üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Sonuç olarak 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu gözleniyor ise test pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu testte kullanılan solüsyon günlük olarak hazırlanmıştır (Gerhardt, 1981).

3.2.5. MALDI-TOF-MS Yöntemi

İzolatların tür tayinleri; T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları'nda yaptırılmıştır.

3.2.5.1. Direk Transfer Örnek Hazırlama Yöntemi

1. Biyolojik madde (örneğin: tek bir bakteri kolonisi) ince bir film olarak, doğrudan MALDI plakası üzerindeki spota aktarılmıştır.
2. Örnek olarak 1µL Bruker HCCA solüsyonu ile kaplanmıştır.
Not: Bruker HCCA içeren kapaklı tüpün, kullanımından sonra, solvent buharlaşmasını en aza indirmek için sıkıca kapatıldığından emin olunmalıdır.
3. Matris kaplanmış olan örnek oda sıcaklığında kurutulur. Sonuçta homojen bir preparasyon gözlenmelidir.

3.2.5.2. Uygulama Alanı

Bruker HCCA, HCCA matris solüsyonlarının kolay ve uygun biçimde hazırlanmasını imkan verir. Matris, standart solventte çözünür, kullanımı kolay ve 0,7'den 20kDa'na kadar peptitler ve proteinlerin yüksek hassasiyetle MALDI-TOF MS ile ölçümüne imkan verir.

3.2.5.3. Bruker HCCA Çözünme İşlemi

Gerekli Kimyasallar ve Malzemeler

Bruker HCCA'nın çözünmesi için tavsiye edilmiş olan Sigma-Aldrich (≠19182)'den standart solvent (asetonitril %50, su %47.5 ve trifloroasetik asit %2.5) kullanılmıştır.

3.2.6. Antibiyotik Dirençlilik Testi

İzolatların antibiyotik dirençliliği; Mueller Hinton besiyerinde disk difüzyon yöntemi ile 10 farklı antibiyotik kullanılarak belirlenmiştir.

Yöntemde kullanılan antibiyotikler; Ampicilin (AM, 10 µg), Nalidixic acid (NA, 30 µg), Chloramphenicol (C, 30 µg), Tetracycline (TE, 30 µg), Nitrofurantoin (F/M, 300 µg), Gentamicin (GM, 10 µg), Imipenem (IPM, 10 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Cefotaxime (CTX, 30 µg) ve Erythromycin (E, 15 µg)'dir.

Bu testte referans suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 kullanılmıştır (NCCLS, 1997).

Nutrient broth besiyerlerinde aktifleştirilmiş izolatlar 0,5 McFarland`a ayarlanarak Mueller Hinton agara yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra antibiyotik diskleri pens kullanılarak ekim yapılan besiyeri üzerine belirli aralıklarla yerleştirme işlemi yapılmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra petriyerler 24 saat 37⁰C`de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra antibiyotik disklerinin etrafında oluşmuş olan zonların çapları ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.7. Ağır Metal Dirençlilik Testi

İzolatların ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde well-difüzyon yöntemi kullanılarak oluşan zon çapları belirlenmiştir (Nithya ve diğ., 2011). Yapılan ön çalışmada düşük konsantrasyonlarda iyi sonuç alınmadığı için ağır metal konsantrasyonları 5mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olarak tesbit edilmiştir. Belirtilen metallerin sulu çözeltileri steril filtreden (PTFE 0, 2 µm çapında) geçirildikten sonra besi ortamına eklenmiştir. Kullanılan metallerin molekül formülleri CoCl₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, MnCl₂.2H₂O ve HgCl₂` dir. Aynı zamanda kontrol amacıyla mikroorganizma olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart suşu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda izolatların kontrol suşunun direnç değerinden daha yüksek oranda direnç değeri göstermeleri dirençli olarak kabul edilmiştir.

İzolatların ağır metal dirençliliğini belirlemek amacıyla bakteri izolatları ekilmiş Mueller Hinton Agarlı besiyerlerinde steril içi boş 6 mm ağız çapında küçük bir metal aparat kullanılarak kuyucuklar açılmıştır. Kullanılan metal aparatın ilk olarak ağız kısmı etil alkol ile muamele edilmiş sonrasında alevden geçirilerek sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Sonrasında aparat dik bir şekilde besiyerinin dibine kadar daldırılarak kendi eksenine etrafında hafif bir şekilde sağa sola döndürülmüş ve agarlı besiyeri dairesel şekilde kesilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra kesilen agarlı besiyeri aparatın içine geçer ve aparat ile uzaklaştırılarak besiyerinde kuyucukların açılma işlemi tamamlanır (Temiz, 2010).

Petriyerlerdeki besiyerinde ortada kontrol ve yanlarında ikişer paralel olmak üzere 5 adet kuyucuk açılmıştır. Kuyucukların her ikisine aynı madde konularak çalışma ikişerli tekerrür halinde devam etmiştir. Bir numara ile belirtilen plağa 5mM ve 10 mM ağır metal solüsyonları ile kontrol amaçlı çözücü madde konulmuştur. İkinci numaralı plağa ise 15mM ve

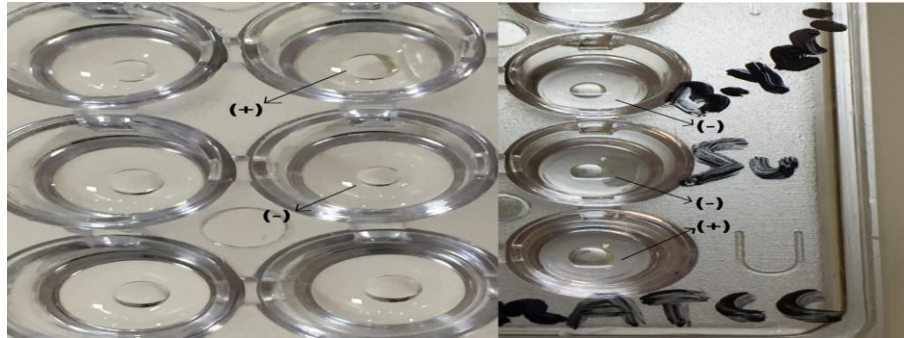
20mM ağır metal solüsyonları konulmuş ve yine aynı şekilde orta kısmına kontrol amaçlı çözücü madde eklenmiştir. Bu işlemden sonra plaklar 37⁰C`de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda oluşan zon çapları ölçülerek tesbit edilmiştir.

3.2.8. İzolatların Biyosüpfektan Üretme Yeteneklerinin Tesbiti İçin Ekim ve Kültürasyon

Biyosüpfektan üretimini tesbit etmek için modifiye edilmiş bir yöntemle ekim ve kültürasyon gerçekleştirilmiştir. Stok olarak hazırlanmış kültürlerden Tryptic Soy Broth besiyerine ekim yapılarak kültürler tekrar aktifleştirilmiştir. Aktifleştirmiş olan izolatlar Mineral Salt Medium besiyerine 1/20 (v/v) oranında olacak şekilde sterilkoşullarda ekim yapılmıştır. İzolatların inkübasyonu 35⁰C` de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (Thermo MAXQ 4450) tamamlanmıştır (Yalçın, 2008).

3.2.9. İzolatlarda Biyosüpfektan Varlığının Belirlenmesi

İzolatların biyosüpfektan üretme yeteneklerinin belirlenmeside Bodour ve Miller, (1998) tarafından kullanılan Drop Collapse yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu plate (microwell plate) kullanılmış ve kültürler 10000 rpm`de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir (Micro CL 17). Santrifüjlemeden elde edilen süpernatatn Millipore Filtrasyon sistemi (PTFE 0,2 µm) ile filtre edilerek elde edilen son filtrat biyosüpfektan varlığının tesbitinde test sıvısı, steril su ve ekim yapılmamış besiyeri ise kontrol sıvısı amacıyla kullanılmıştır. Drop Collapse yöntemini uygulamak amacıyla öncelikle kuyucuklar 7 µl mineral yağ ile kaplanmış ve bir gün oda sıcaklığında bırakılmıştır. Sonraki aşamada ise test ve kontrol sıvılarından 25µl örnek alınarak 45°C`lik açı ile kuyucuklara damlatma işlemi gerçekleştirilmiştir. En son aşamada ise yağ ile kaplanankuyucuklardakidamların çökme, yayılma veya sabit kalabilme özellikleri gözlemlenerek biyosüpfektan varlığı tesbit edilmiştir (Yalçın, 2008).

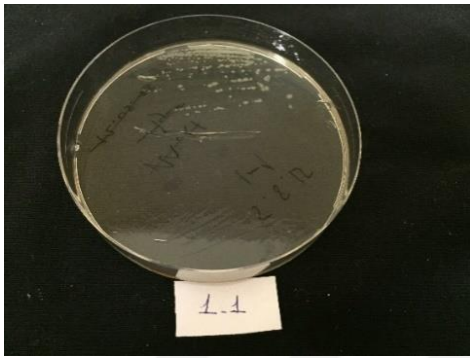


Resim 3.10. Drop Collapse testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu

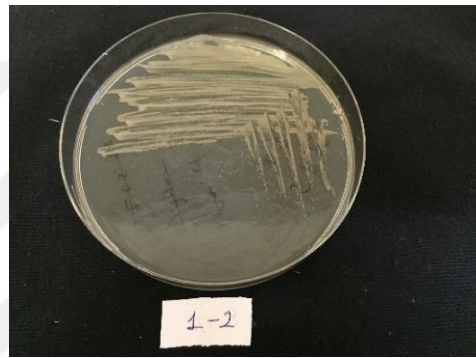
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İzolatların Elde Edilmesi

Araştırmada kullanılan toprak örnekleri 5-6 Şubat 2015 tarihinde; Mersin İli Kazanlı Bölgesi Karaduvar - Kazanlı mevki Rafineri depolama alanı ile doldur boşalt istasyonu ve çevresinden alınmıştır. Çalışmada yukarıda belirtilen 8 farklı bölgeden alınan toprak örneklerinden 36 adet bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatların TSA besiyerindeki gelişmelerinin fotoğrafları Resim 4.1. -Resim 4.33.`de görünmektedir.



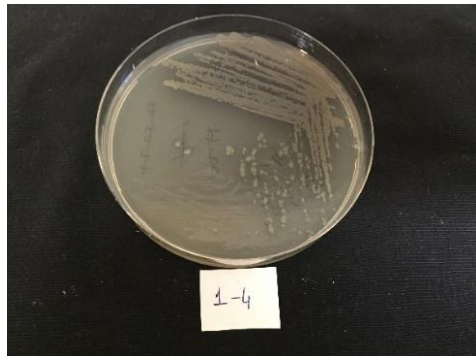
Resim 4.1. *Staphylococcus hominis* (FH 1-1)



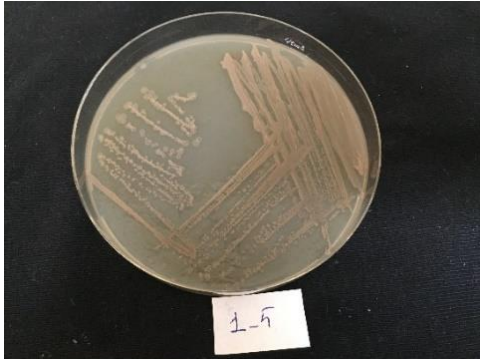
Resim 4.2. *Bacillus mojavensis* (FH 1-2)



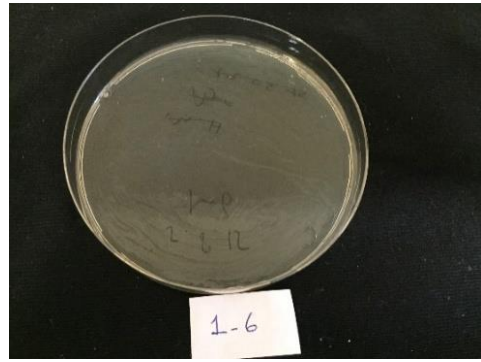
Resim 4.3. *Bacillus horikoshii* (FH 1-3)



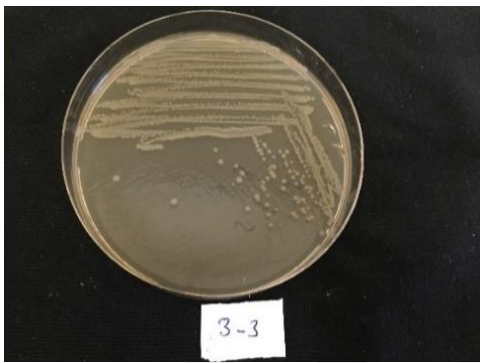
Resim 4.4. *Malikia spinosa* (FH 1-4)



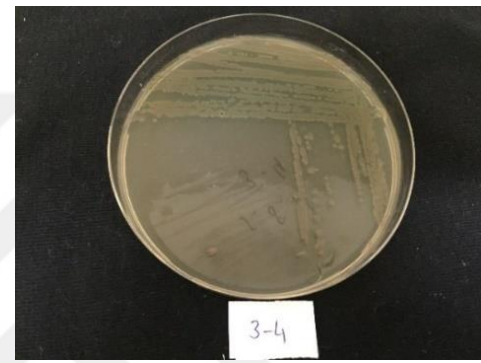
Resim 4.5. *Agromyces brachium* (FH1-5)



Resim 4.6. *Stenotrophomonas maltophila* (FH1-6)



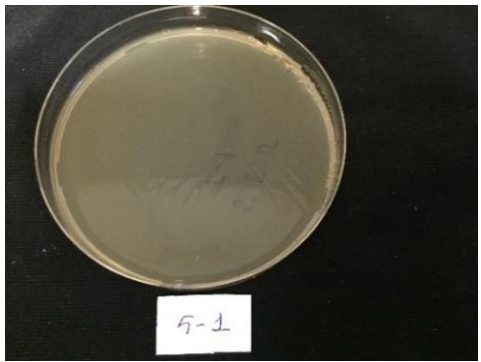
Resim 4.7. *Enterobacter cloacae* (FH 3-3)



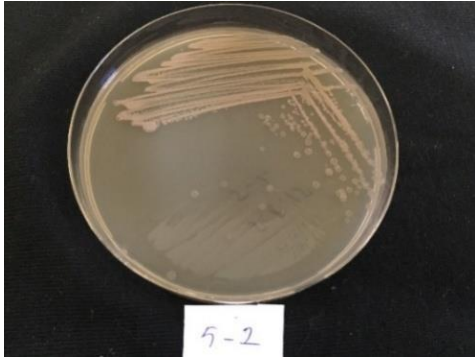
Resim 4.8. *Bacillus licheniformis* (FH 3-4)



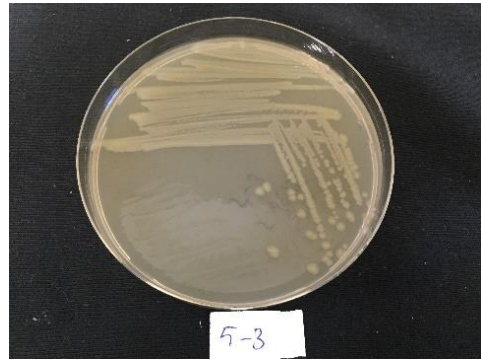
Resim 4.9. *Bacillus subtilis* (FH 3-5)



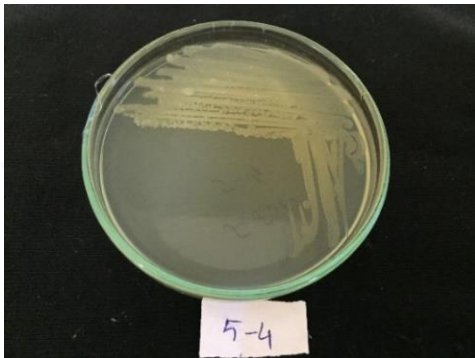
Resim 4.10. *Stenotrophomonas maltophila* (FH 5-1)



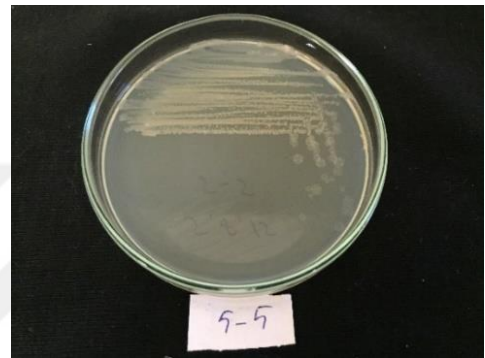
Resim 4.11. *Ochrobactrum tritici* (5-2)



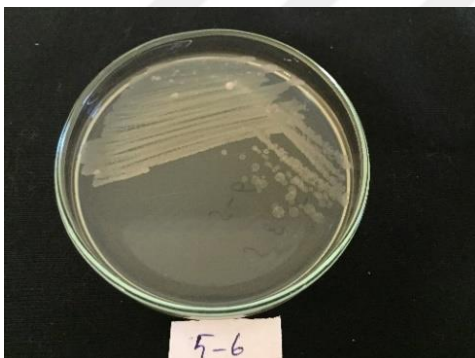
Resim 4.12. *Citrobacter amalonaticus* (FH 5-3)



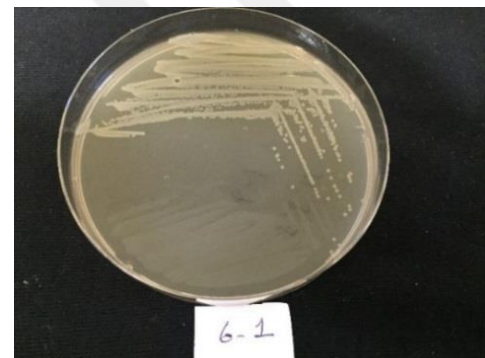
Resim 4.13. Tanımlanamadı (FH 5-4)



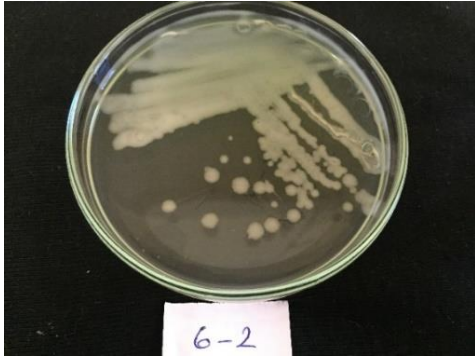
Resim 4.14. *Enterobacter cloacae* (FH 5-5)



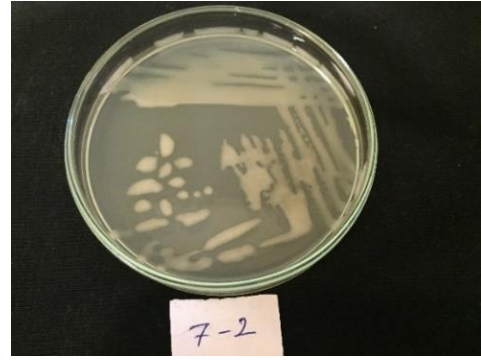
Resim 4.15. *Streptomyces badius* (FH 5-6)



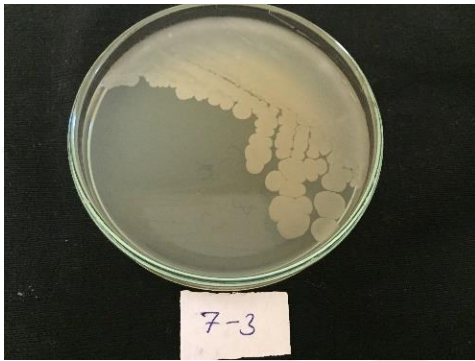
Resim 4.16. *Stenotrophomonas maltophilia* (FH6-1)



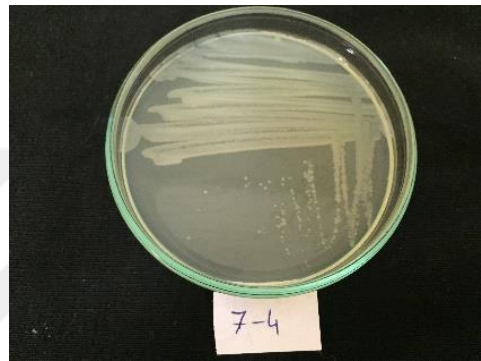
Resim 4.17. *Pseudomonas aeruginosa* (FH 6-2)



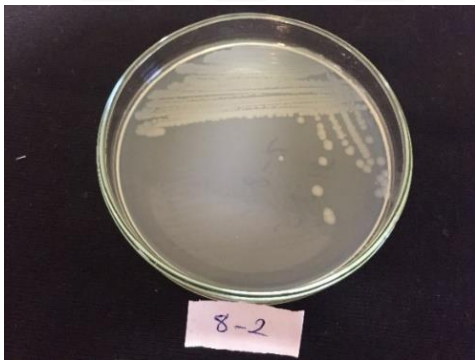
Resim 4.18. *Cupriavidus necator* (FH7-2)



Resim 4.19. *Bacillus subtilis* (FH7-3)



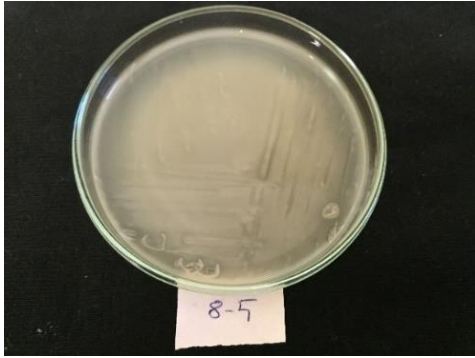
Resim 4.20. *Staphylococcus capitis* (FH 7-4)



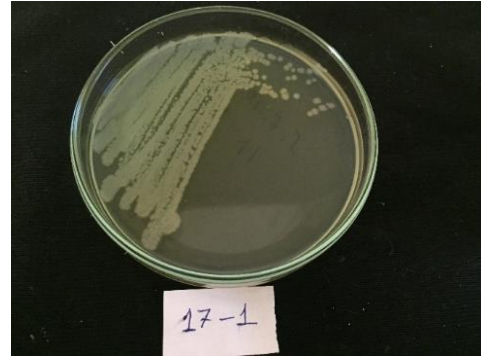
Resim 4.21. *Enterobacter cloacae* (FH 8-2)



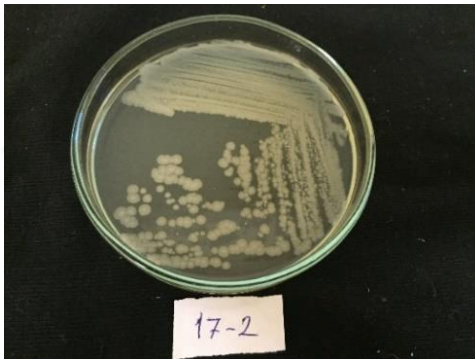
Resim 4.22. *Bacillus cereus* (FH 8-3)



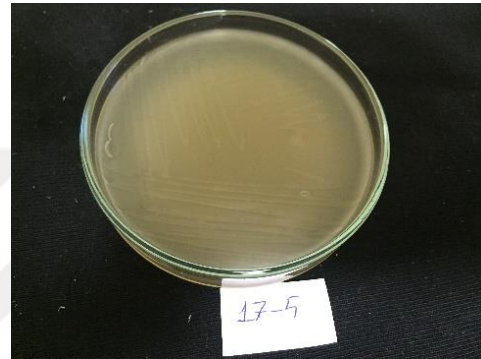
Resim 4.23. *Bacillus pumilus* (FH 8-5)



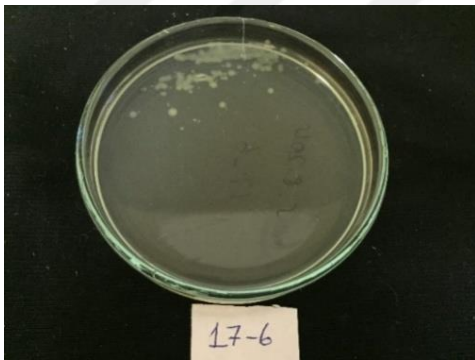
Resim 4.24. *Pseudomonas aeruginosa* (FH 17-1)



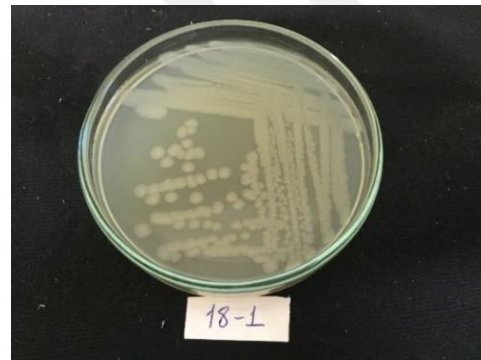
Resim 4.25. *Acinetobacter baumannii* (17-2)



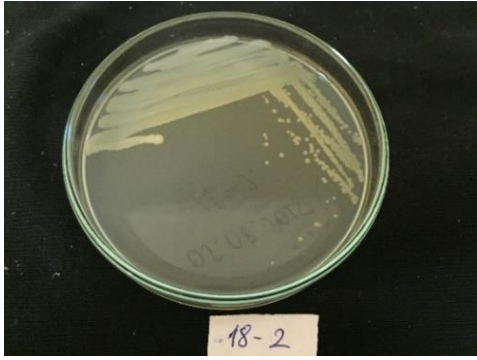
Resim 4.26. *Bacillus licheniformis* (FH 17-5)



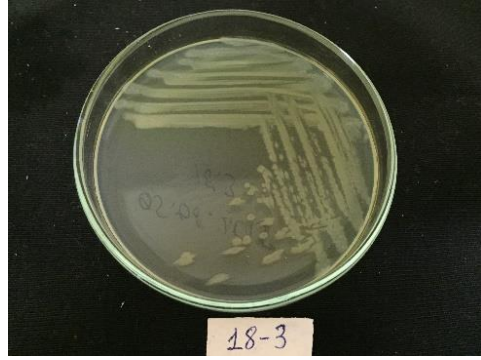
Resim 4.27. *Streptomyces lavendulae* (FH 17-6)



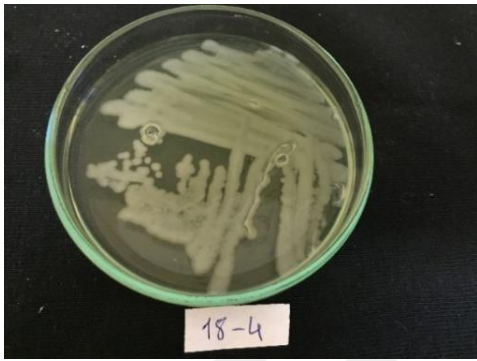
Resim 4.28. *Escherichia coli* (FH 18-1)



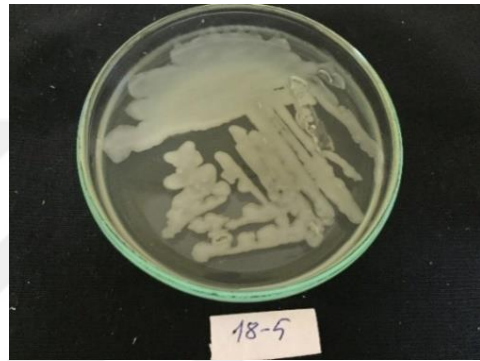
Resim 4.29. *Stenotrophomonas maltophilia*(FH18-2)



Resim 4.30. *Bacillus mojavenensis* (FH18-3)



Resim 4.31. *Staphylococcus aureus* (FH 18-4)



Resim 4.32. *Enterobacter cloacae* (FH 18-5)



Resim 4.33. *Bacillus cereus* (FH 18-6)

4.2. İzolatların Morfolojik Testleri

Elde edilen izolatların koloni renk ve şekilleri Tablo 4.1.`de gösterilmektedir. Tablo 4.1.`deki sonuçlara göre; 27 adet S tip koloni, 9 adet R tip koloni gözlemlendiği tesbit edilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların Kültür Özellikleri

İzolat			İzolat		
Numarası	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Numarası	Koloni Rengi	Koloni Şekli
FH1-1	Krem Rengi	S Tip	FH7-3	Beyaz	S Tip
FH1-2	Krem Rengi	R Tip	FH7-4	Krem Beyaz	S Tip
FH1-3	Beyaz	S Tip	FH8-1	Açık Sarı	S Tip
FH1-4	Mavi	S Tip	FH8-2	Beyaz	S Tip
FH1-5	Kırmızı	S Tip	FH8-3	Beyaz	S Tip
FH1-6	Şeffaf	S Tip	FH8-5	Beyaz	R Tip
FH3-3	Krem-Beyaz	S Tip	FH17-1	Yeşil	R Tip
FH3-4	Yeşil	S Tip	FH17-2	Beyaz	S Tip
FH 3-5	Krem Rengi	S Tip	FH 17-4	Krem Sarı	R Tip
FH 3-7	Krem Rengi	S Tip	FH 17-5	Krem Rengi	S Tip
FH5-1	Krem Rengi	S Tip	FH17-6	Beyaz	R Tip
FH5-2	Pembe	S Tip	FH18-1	Krem Beyaz	S Tip
FH5-3	Açık Sarı	S Tip	FH18-2	Sarı	S Tip
FH5-4	Açık Sarı	R Tip	FH18-3	Yeşil	S Tip
FH5-5	Krem Rengi	S Tip	FH18-4	Yeşil	R Tip
FH5-6	Krem Rengi	S Tip	FH18-5	Beyaz	R Tip
FH 6-1	Açık krem	S Tip	FH 18-6	Beyaz	S Tip
FH 6-2	Yeşil	S Tip			
FH 7-2	Beyaz	R Tip			

Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.`te görüldüğü üzere; izolatların 11 tanesinin Gram pozitif ve 25 tanesinin ise Gram negatif özellikte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Gram negatif özellikteki bakterilerin Gram boyama özelliklerini desteklemek amacıyla uygulanan %3`lük KOH testi sonucunda 25 adet izolatın pozitif, 11 adet izolatında negatif sonuç verdiği tesbit edilmiştir. İlâveten izolatlardan 19 adedinin hareketli, 17adedinin ise hareketsiz olduğu gözlemlenmiştir.

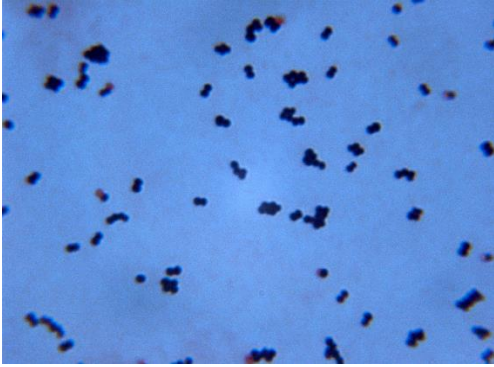
Tablo 4.2. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji, %3'lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları

İzolat Numarası	Gram Boyama	Morfoloji	%3'lük KOH	Hareketlilik
FH 1-1	Gram (-)	Basil	+	-
FH 1-2	Gram (-)	Basil	+	-
FH 1-3	Gram (+)	Basil	-	+
FH 1-4	Gram (-)	Basil	+	+
FH 1-5	Gram (-)	Basil	+	-
FH 1-6	Gram (-)	Basil	+	-
FH 3-3	Gram (-)	Kokobasil	+	++
FH 3-4	Gram (-)	Basil	+	+
FH 3-5	Gram (+)	Basil Endosporlu	-	+
FH 3-7	Gram (-)	Kokobasil	+	+
FH 5-1	Gram (-)	Basil	+	+
FH 5-2	Gram (-)	Basil	+	+
FH 5-3	Gram (+)	Kok	-	-
FH 5-4	Gram (-)	Basil	+	-
FH 5-5	Gram (-)	Basil	+	-
FH 5-6	Gram (-)	Basil	+	-
FH 6-1	Gram (-)	Basil	+	-
FH 6-2	Gram (-)	Basil	+	-
FH 7-2	Gram (-)	Kokobasil	+	+
FH 7-3	Gram (+)	Basil Endosporlu	-	+

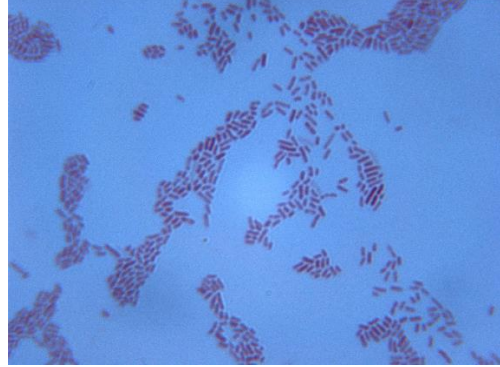
Tablo 4.3. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji %3'lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları (Devamı)

<i>İzolat Numarası</i>	<i>Gram Boyama</i>	<i>Morfoloji</i>	<i>%3'lük KOH</i>	<i>Hareketlilik</i>
FH 7-4	Gram (-)	Basil	+	-
FH 8-1	Gram (+)	Basil	-	+
FH 8-2	Gram (+)	Basil	-	+
FH 8-3	Gram (+)	Basil	-	+
FH 8-5	Gram (+)	Basil	-	-
FH 17-1	Gram (-)	Basil	+	-
FH 17-2	Gram (+)	Kok	-	+
FH 17-4	Gram (-)	Basil	+	-
FH 17-5	Gram (+)	Basil Endosporlu	-	+
FH 17-6	Gram (-)	Basil	+	+
FH 18-1	Gram (-)	Kokobasil	+	+
FH 18-2	Gram (-)	Basil	+	-
FH 18-3	Gram (-)	Basil	+	-
FH 18-4	Gram (-)	Basil	+	-
FH 18-5	Gram (-)	Basil	+	+
FH 18-6	Gram (+)	Basil	-	+

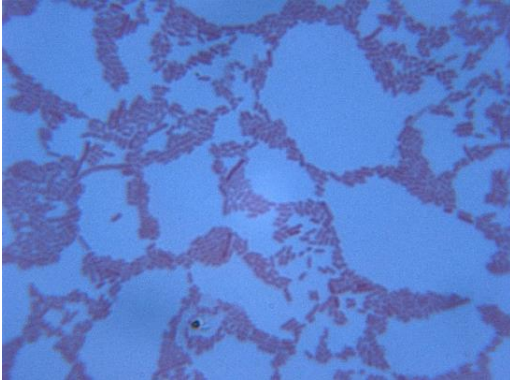
İzolatların Gram boyama özelliklerinin mikroskopik görüntüleri Resim 4.34'de verilmiştir.



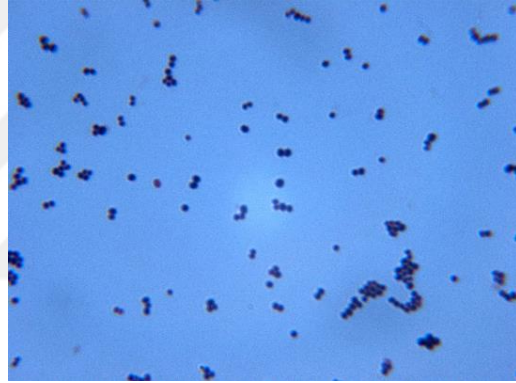
a. *Bacillus mojavensis* (FH 1-2)



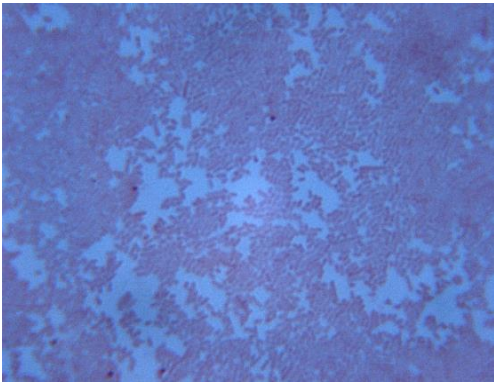
b. *Enterobacter cloacae* (FH 3-3)



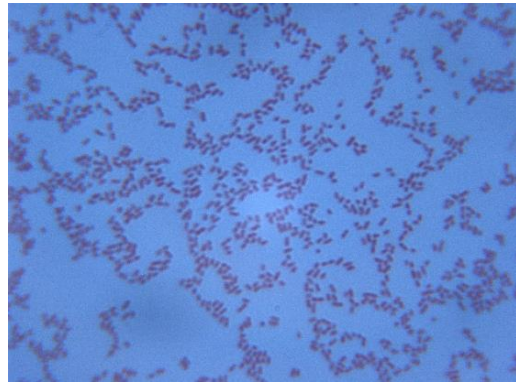
c. *Stenotrophomonas maltophilia* (FH 5-1)



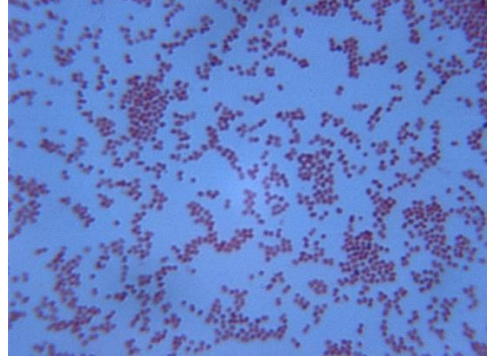
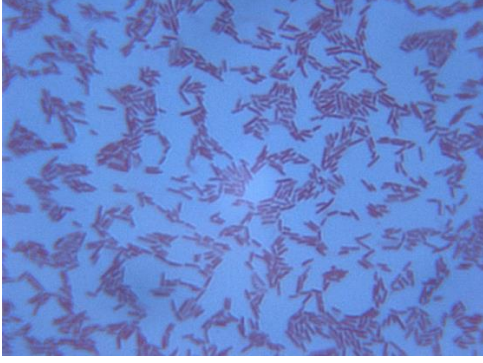
d. *Citrobacter amalonaticus* (FH 5-3)



e. *Enterobacter cloacae* (FH 8-2)



f. *Bacillus pumilus* (FH 8-5)



g. *Pseudomonas aeruginosa* (FH 17-1)

h. *Acinetobacter baumannii* (FH 17-2)

Resim 4.34. İzole edilen bakterilerin Gram boyama görüntüleri (100x)

4.3. İzolatların Biyokimyasal Testleri

Elde edilen izolatlardan 33 tanesinin hidrojen peroksiti serbest oksijene ayrıştırıp gaz kabarcıkları oluşturduğu dolayısıyla pozitif sonuç verdiği, 3 tanesinin ise Katalaz negatif olduğu belirlenmiştir. Oksidaz testi sonucunda 33 izolatın p-amino dimetilanilin ayırıcını oksidaz enzimi varlığında okside edip mor-mavi renk oluşturarak pozitif sonuç verdiği bunun aksine 3 izolatın ise negatif sonuç verdiği gözlemlenmiştir.

Tablo 4.4. İzolatların Katalaz ve Oksidaz Test Sonuçları

<i>İzolat</i> <i>Numarası</i>	<i>Katalaz</i>	<i>Oksidaz</i>	<i>İzolat</i> <i>Numarası</i>	<i>Katalaz</i>	<i>Oksidaz</i>
FH 1-1	+	+	FH 7-2	+	+
FH 1-2	+	+	FH 7-3	-	+
FH 1-3	+	+	FH 7-4	+	-
FH 1-4	+	+	FH 8-1	+	+
FH 1-5	+	+	FH 8-2	+	+
FH 1-6	+	+	FH 8-3	-	+
FH 3-3	+	+	FH 8-5	+	+
FH 3-4	+	+	FH 17-1	+	+
FH 3-5	+	+	FH 17-2	+	-
FH 3-7	+	+	FH 17-4	+	+
FH 5-1	+	+	FH 17-5	+	+
FH 5-2	+	+	FH 17-6	+	+
FH 5-3	+	+	FH 18-1	+	+
FH 5-4	+	+	FH 18-2	+	+
FH 5-5	-	+	FH 18-3	+	+
FH 5-6	+	+	FH 18-4	+	+
FH 6-1	+	+	FH 18-5	+	-
FH 6-2	+	+	FH 18-6	+	+

Tablo 4.5. İzolatların MALDI-TOF MS Biyotiplendirme Tablosu

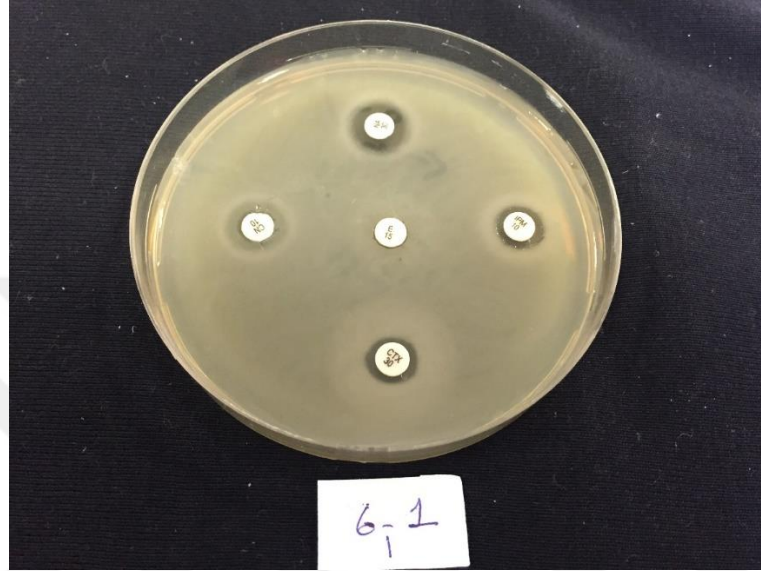
İzolat Numarası	Muhtemel tür	Skor
FH 1-1	<i>Staphylococcus hominis</i>	1.776
FH 1-2	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.082
FH 1-3	<i>Bacillus horikoshii</i>	1.466
FH 1-4	<i>Malikia spinosa</i>	1.448
FH 1-5	<i>Agromyces brachium</i>	1.341
FH 1-6	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	1.710
FH 3-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.185
FH 3-4	<i>Bacillus licheniformis</i>	1.276
FH 3-5	<i>Bacillus subtilis</i>	1.968
FH 3-7	Tanımlanamadı	-
FH 5-1	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	2.168
FH 5-2	<i>Ochrobactrum tritici</i>	1.442
FH 5-3	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.136
FH 5-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.017
FH 5-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	1.666
FH 5-6	<i>Streptomyces badius</i>	1.557
FH 6-1	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	2.032
FH 6-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.178
FH 7-2	<i>Cupriavidus necator</i>	1.756
FH 7-3	<i>Bacillus subtilis</i>	2.057

Tablo 4.5. İzolatların MALDI-TOF MS Biyotiplendirme Tablosu (Devamı)

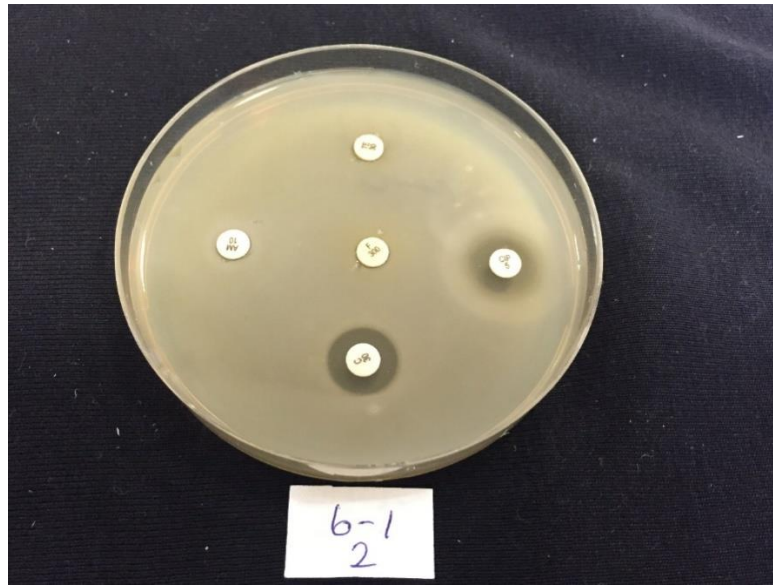
İzolat Numarası	Muhtemel tür	Skor
FH 7-4	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.733
FH 8-1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.406
FH 8-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.489
FH 8-3	<i>Bacillus cereus</i>	1.794
FH 8-5	<i>Bacillus pumilus</i>	1.740
FH 17-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.256
FH 17-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.898
FH 17-4	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	2.028
FH 17-5	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.140
FH 17-6	<i>Streptomyces lavendulae</i>	1.380
FH 18-1	<i>Esherichia coli</i>	2.489
FH 18-2	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	1.715
FH 18-3	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.755
FH 18-4	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.415
FH 18-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.341
FH 18-6	<i>Bacillus cereus</i>	2.246

4.4. İzolatların Antibiyotik Dirençlerinin Tesbiti

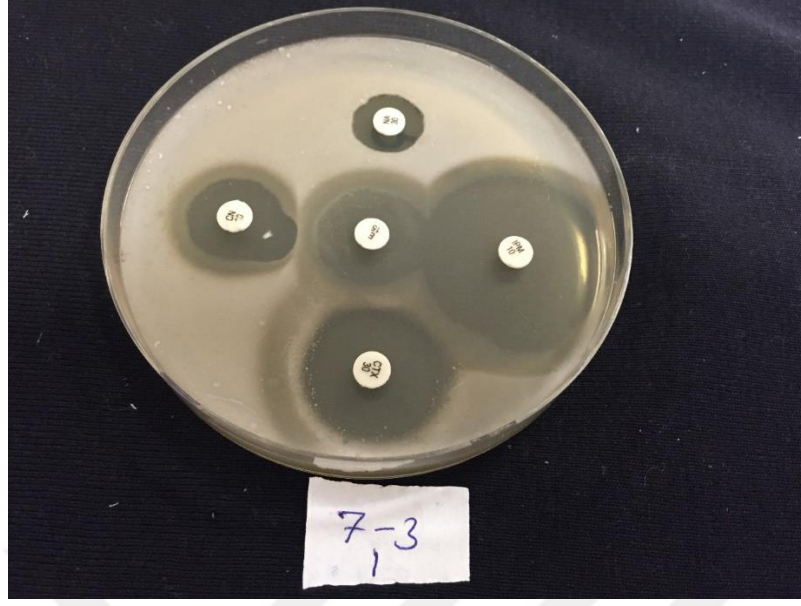
İzolatların antibiyotiklere duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları Resim 4.35, Resim 4.36, Resim 4.37, Resim 4.38, Resim 4.39, Resim 4.40, Resim 4.41, Resim 4.42’de görülmektedir.



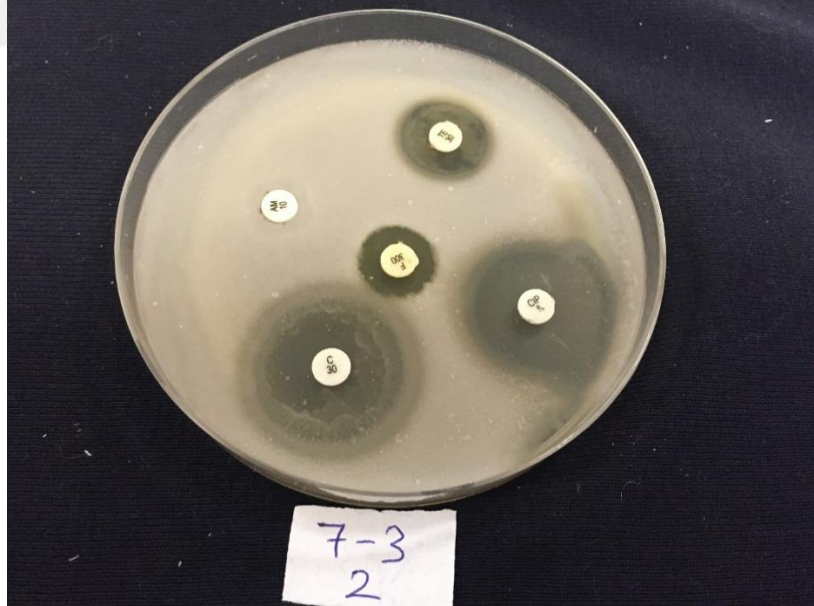
Resim 4.35. İzolat FH 6-1`in antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)



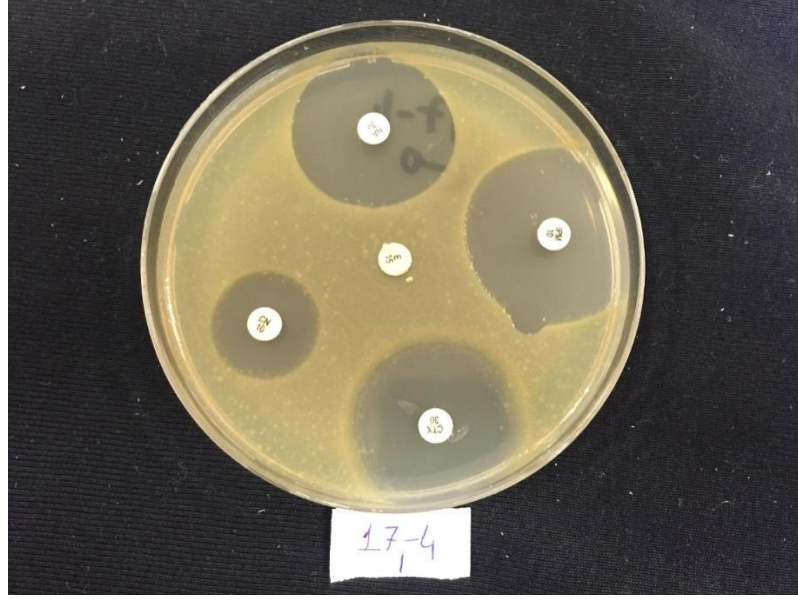
Resim 4.36. İzolat FH 6-1`in antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)



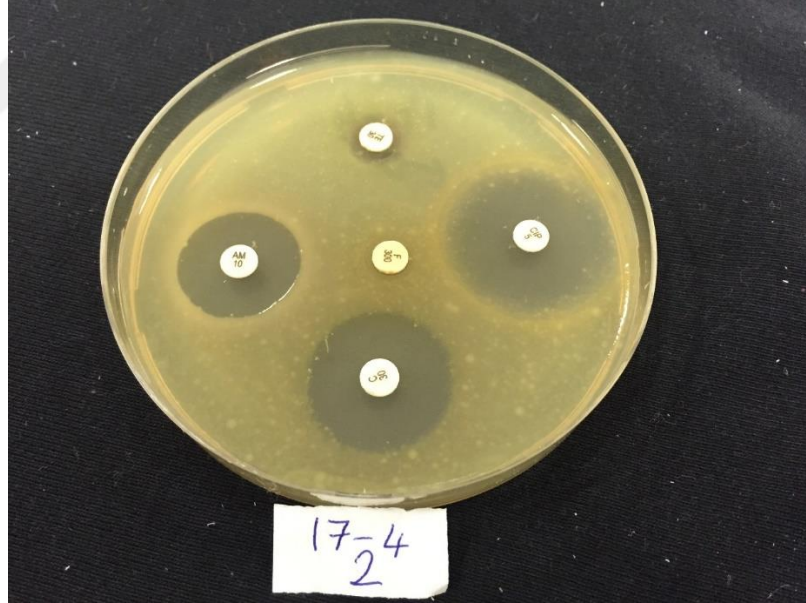
Resim 4.37. İzolat FH 7-3`ün antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)



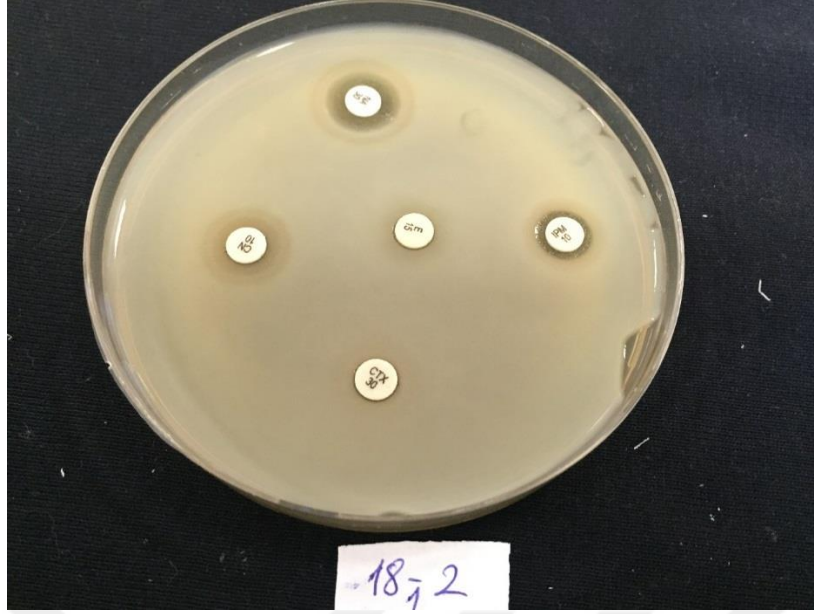
Resim 4.38. İzolat FH 7-3`ün antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)



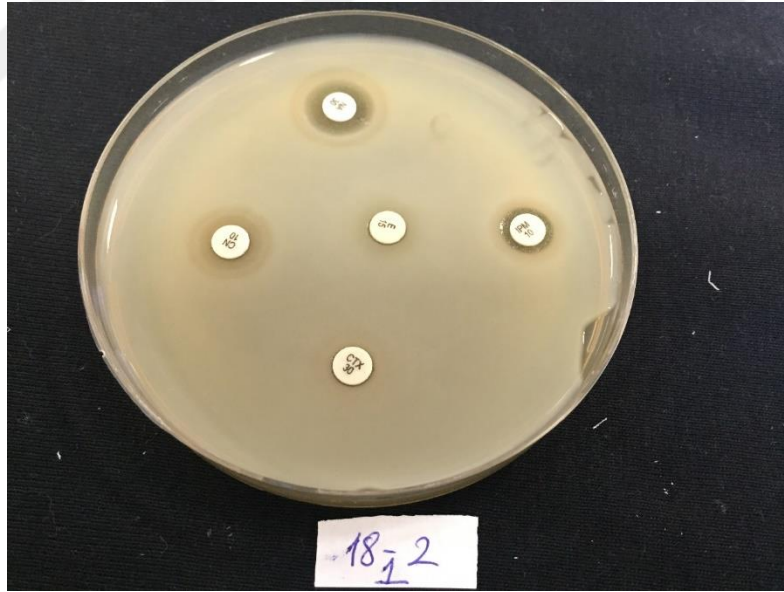
Resim 4.39. İzolat FH 17-4'ün antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)



Resim 4.40. İzolat FH 17-4'ün antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)



Resim 4.41. İzolat FH 18-2'nin antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)



Resim 4.42. İzolat FH 18-2'nin antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)

İzolatların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç oranları kullanılarak toplam direnç yüzdeleri hesaplanmıştır. İzolatların %8`inin Nalidixic Acid (NA, 30µg)`e, %0`ının Imipenem (IPM, 10 µg)`e, %25`inin Cefotaxime (CTX, 30 µg)`e, % 11.11`inin Gentamicin (GM, 10 µg)`e, %58.3`ünün Erythromycin (E, 15 µg)`e, %25`inin Tetracycline (TE, 30 µg)`e, %2.7`sinin Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)`e, %16.6`sının Chloramphenicol (C, 30 µg)`a, %61.1`inin Ampicilin (AM, 10 µg)`e ve %63.8`inin Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)`e dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7.). Bu bağlamda Tablo 4.7.incelendiğinde en yüksek toplam direnç değeri %63.8 olarak Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)de gözlenirken en düşük değer ise %0 ile Imipenem (IPM, 10 µg)`de gözlenmiştir.

İzolatların antibiyotik dirençlilikleri CLSI 2015 prosedürüne göre belirlenerek toplam yüzdelik dirençlilik oranları Tablo 4.7.`de sunulmuştur.

Tablo 4.7. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Değerleri

Kullanılan Antibiyotikler	İzolatların Antibiyotik Direnç Değer Yüzdeleri (%)
<i>Nalidixic Acid (NA, 30µg)</i>	% 8.3
<i>İmipenem (IPM, 10 µg)</i>	% 0
<i>Cefotaxime (CTX, 30 µg)</i>	% 25
<i>Gentamicin (GM, 10 µg)</i>	% 11.11
<i>Erythromycin (E, 15 µg)</i>	% 58.3
<i>Tetracycline (TE, 30 µg)</i>	% 25
<i>Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)</i>	% 2.7
<i>Chloramphenicol (C, 30 µg)</i>	% 16.6
<i>Ampicilin (AM, 10 µg)</i>	% 61.1
<i>Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)</i>	% 63.8

Tablo. 4.8. İzolatların Dirençli Oldukları Antibiyotik Sayıları

Antibiyotik Sayısı (10)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dirençli Bakteri Sayısı	1	9	8	10	3	1	3	1	1	0	0

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin sayısı ve antibiyotiklere dirençli olan izolatların sayısı Tablo 4.8.`de özetlenmiştir. Tablo incelendiğinde antibiyotiklerin bir tanesine direnç göstermeyen 1 izolatın olduğu görülmüştür. Yine tablo incelendiğinde; izolatlardan; 1 tanesinin 8 antibiyotiğe, 1 tanesinin 7 antibiyotiğe, 1 tanesinin 5 antibiyotiğe, 3 tanesinin 6 antibiyotiğe, 3 tanesinin 4 antibiyotiğe, 9 tanesinin 1 antibiyotiğe, 10 tanesinin 3 antibiyotiğe, 8 tanesinin 2 antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği tesbit edilmiştir.

Ayrıca izolatların antibiyotiklere dirençlilik değerleri Tablo 4.9. ile Tablo 4.10.`da belirtilmiştir.

İskenderun Körfezi`nde 3 farklı bölgeden 356 Gr (-) bakterinin izole edildiği bir çalışmada antibiyotik direncinin en yüksek 1 ve 3 numaralı bölgelere ait izolatların olduğu ve aynı zamanda izolatların %94.9'unun Eritromisine dirençli oldukları belirtilmektedir (Akkan (2009).

Torabi (2013),arseniğe dirençli izolatlarla yaptığı bir çalışmada bu izolatlardan %60'ının Sefoksitin'e, %40'ının ise Terimetoprim, Nalidiksilik asite ve Streptomisin'e duyarlı olduğunu belirlemiştir. Yine %20 oranında Eritromisin, Kloramfenikol, Pensilin ve Tetrasiklin antibiyotiklerine dirençlilik belirlerken, Amoksisilin, Genatmisin, Kanamisin ve Netilmisin`e karşı herhangi bir direncin olmadığını tesbit etmiştir.

Tablo 4.9. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Dirençlilikleri

<i>Numune Numarası</i>	<i>Nalidixic Acid (NA, 30 µg)</i>	<i>İmipenem (IPM, 10 µg)</i>	<i>Cefotaxime (CTX, 30 µg)</i>	<i>Gentamicin (GM, 10 µg)</i>	<i>Erythromycin (E, 15 µg)</i>
FH 1-1	R*	S*	R	S	R
FH 1-2	S	S	S	S	R
FH 1-3	S	S	R	S	S
FH 1-4	S	S	R	S	R
FH 1-5	S	S	S	S	R
FH 1-6	S	S	S	S	R
FH 3-3	S	S	R	R	R
FH 3-4	S	S	S	S	S
FH 3-5	S	S	S	S	S
FH 3-7	S	S	R	S	R
FH 5-1	S	S	S	S	R
FH 5-2	S	S	S	S	S
FH 5-3	R	S	S	S	S
FH 5-4	S	S	S	S	R
FH 5-5	S	S	S	S	R
FH 5-6	S	S	S	S	S
FH 6-1	S	S	S	S	S
FH 6-2	S	S	S	S	S
FH 7-2	S	S	S	R	S
FH 7-3	S	S	S	S	S
FH 7-4	R	S	R	R	R
FH 8-1	S	S	S	S	R
FH 8-2	S	S	S	S	R
FH 8-3	S	S	R	S	R
FH 8-5	S	S	R	S	S
FH 17-1	S	S	S	S	R
FH 17-2	S	S	S	S	S
FH 17-4	S	S	S	S	R
FH 17-5	S	S	S	S	S
FH 17-6	S	S	R	S	S
FH 18-1	S	S	S	S	R
FH 18-2	S	S	R	R	R
FH 18-3	R	S	S	S	R
FH 18-4	S	S	S	S	R
FH 18-5	S	S	S	S	R
FH 18-6	S	S	S	S	S

*S= Duyarlı (Sensitive), *R=Resistance (Dirençli)

Tablo 4.10. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Dirençlilikleri (Devamı)

<i>Numune Numarası</i>	<i>Tetracycline (TE, 30 µg)</i>	<i>Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)</i>	<i>Chloramphenicol (C, 30 µg)</i>	<i>Ampicilin (AM, 10 µg)</i>	<i>Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)</i>
FH 1-1	R*	S*	R	R	R
FH 1-2	S	S	R	R	R
FH 1-3	S	S	S	S	S
FH 1-4	R	S	S	R	R
FH 1-5	S	S	S	S	R
FH 1-6	R	S	S	S	R
FH 3-3	R	R	R	R	R
FH 3-4	R	S	S	R	R
FH 3-5	S	S	S	R	S
FH 3-7	S	S	S	R	R
FH 5-1	S	S	S	R	R
FH 5-2	S	S	S	S	R
FH 5-3	S	S	S	R	S
FH 5-4	S	S	S	R	R
FH 5-5	S	S	S	S	R
FH 5-6	S	S	S	S	R
FH 6-1	S	S	S	S	S
FH 6-2	R	S	S	R	R
FH 7-2	S	S	S	R	S
FH 7-3	S	S	S	R	S
FH 7-4	R	S	S	S	R
FH 8-1	S	S	S	R	R
FH 8-2	S	S	S	S	S
FH 8-3	S	S	S	R	S
FH 8-5	S	S	R	S	S
FH 17-1	S	S	S	R	R
FH 17-2	S	S	R	R	R
FH 17-4	S	S	S	S	R
FH 17-5	S	S	R	S	S
FH 17-6	S	S	S	R	R
FH 18-1	S	S	S	S	S
FH 18-2	R	S	S	R	R
FH 18-3	S	S	S	S	R
FH 18-4	R	S	S	R	R
FH 18-5	S	S	S	R	S
FH 18-6	S	S	S	R	S

*S= Duyarlı (Sensitive), *R=Resistance (Dirençli)

Çalışmamızda en yüksek antibiyotik direnç oranı belirlenerek izolatlardan %63.8'inin Nitrofurantain'e karşı direnç gösterdiği saptanmış olup izolatlardan %58.3'ünün ise Erythromycin'e dirençli olduğu tesbit edilmiştir. Aynı zamanda 1 tane izolatin 8 farklı antibiyotiğe, 1 tane izolatin ise 7 farklı antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında sonuçlarımız incelendiğinde izolatlarımızın büyük bir çoğunluğunun antibiyotiklere direnç gösterdiği tesbit edilmiş olup daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.7. ve Tablo 4.8.).

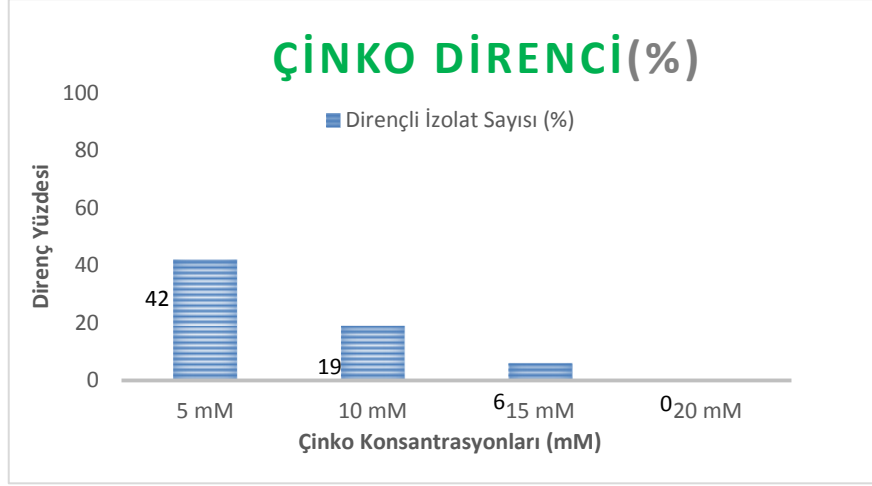
4.5. Bakterilerin Ağır Metal Dirençliliği

Çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 27853 izolatların ağır metallere direnç yeteneklerinin belirlenmesinde kontrol suşu amacıyla kullanılmıştır. Yine kullanılan ağır metal konsantrasyonlarının tamamı ‘mM’ cinsinden hesaplanmış ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun zon çapları Tablo 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4. 11. *P.aeruginosa* ATCC 27853 Suşuna Ait Zon Çapları (mm)

<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	5mM	10mM	15mM	20mM
CoCl ₂ 6H ₂ O	12	13	14	16
ZnSO ₄ 7H ₂ O	-	12	14	15
MnCl ₂ 2H ₂ O	-	-	-	13
HgCl ₂	20	22	23	24

Şekil 4.2'de izolatların çinko ağır metaline karşı göstermiş oldukları direnç oranları (%) incelendiğinde; izolatların %40'ının 5 mM'a, %27,5'inin 10mM'a, %22,5'inin 15mM'a ve % 20'sinin de 20mM'a direnç gösterdiği gözlemlenmiştir.



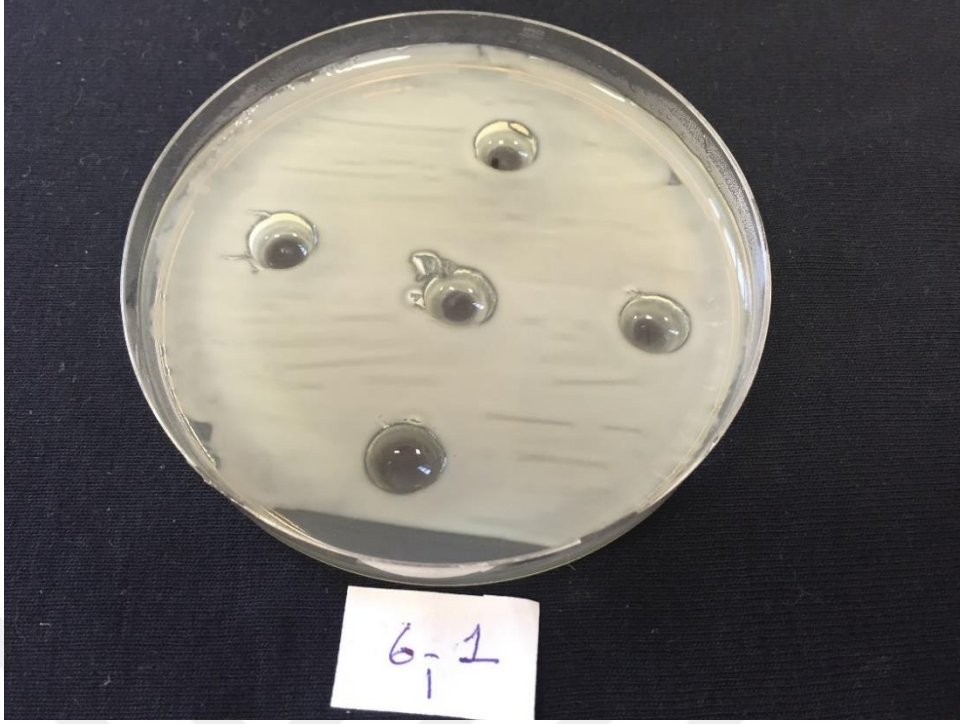
Şekil 4.1. İzolatların çinko direnç yüzdeleri

Tablo 4.13'deki veriler incelendiğinde; çinkonun tüm konsantrasyonlarına dirençli 1 adet izolat tesbit edilirken uygulanan farklı konsantrasyonlara duyarlı 15 adet izolat (FH 1-4, FH5-1, FH6-1, FH 7-4, FH 8-2, FH 8-3, FH8-5 , FH 17-1, FH 17-2, FH 18-1, FH 18-2, FH 18-3, FH 18-4, FH 18-5, FH 18-6) belirlenmiştir. Bunların dışındaki izolatların tamamının farklı konsantrasyonlara karşı dirençli veya duyarlı oldukları görülmüştür.

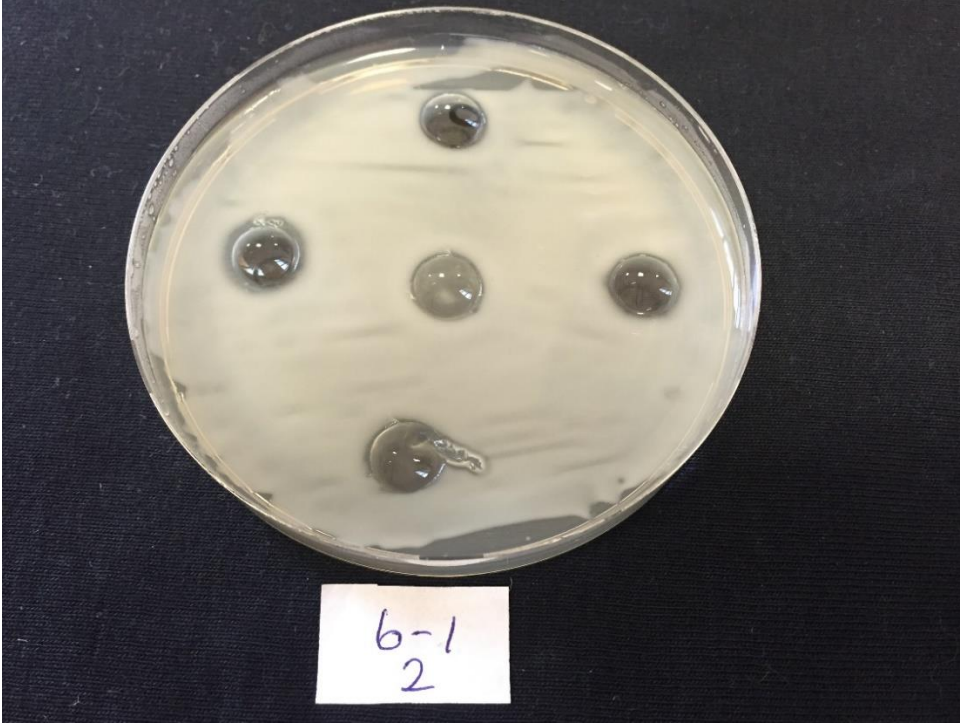
Tablo 4.12. İzolatların Çinko Dirençlilikleri

ZnSO ₄ 7H ₂ O	5mM	10mM	15mM	20mM
FH 1-1	S*	S	S	S
FH 1-2	S	S	S	S
FH 1-3	S	S	S	S
FH 1-4	R*	R	S	S
FH 1-5	S	S	S	S
FH 1-6	S	S	S	S
FH 3-3	S	S	S	S
FH 3-4	S	S	S	S
FH 3-5	S	S	S	S
FH 3-7	S	S	S	S
FH 5-1	R	S	S	S
FH 5-2	S	S	S	S
FH 5-3	R	R	S	S
FH 5-4	S	S	S	S
FH 5-5	S	S	S	S
FH 5-6	S	S	S	S
FH 6-1	R	R	R	S
FH 6-2	S	S	S	S
FH 7-2	S	S	S	S
FH 7-3	S	S	S	S
FH 7-4	R	S	S	S
FH 8-1	S	S	S	S
FH 8-2	R	S	S	S
FH 8-3	R	R	S	S
FH 8-5	R	S	S	S
FH 17-1	R	R	S	S
FH 17-2	R	S	S	S
FH 17-4	R	S	S	S
FH 17-5	R	R	R	R
FH 17-6	S	S	S	S
FH 18-1	R	S	S	S
FH 18-2	R	R	S	S
FH 18-3	R	R	S	S
FH 18-4	R	R	R	S
FH 18-5	R	S	S	S
FH 18-6	R	S	S	S

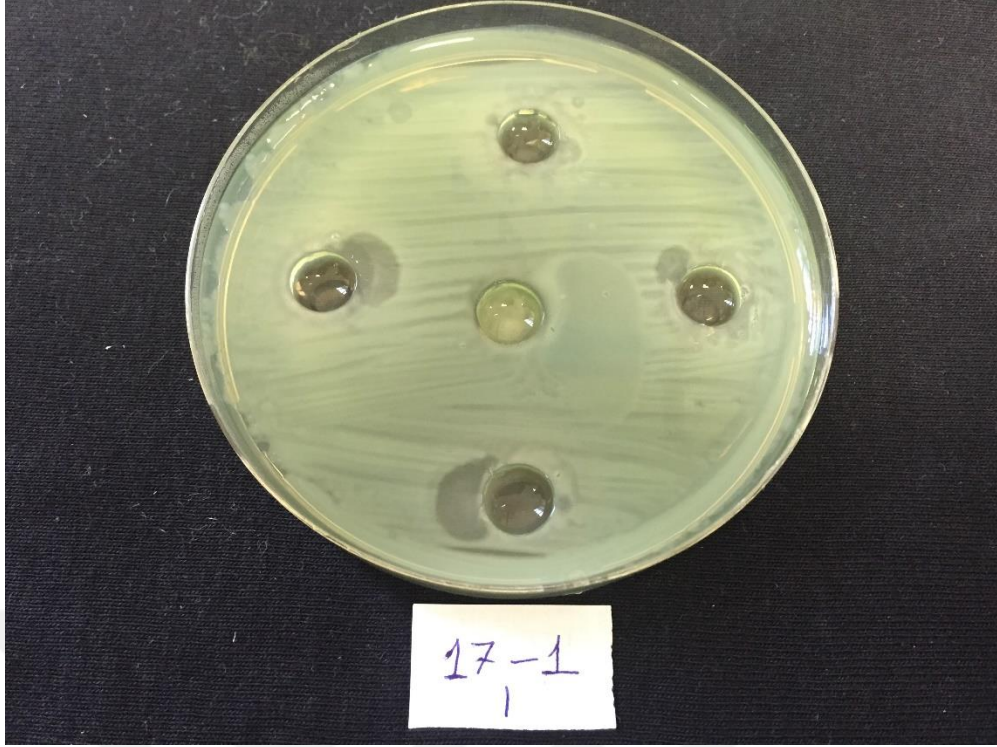
*S= Duyarlı (Sensitive), *R=Resistance (Dirençli)



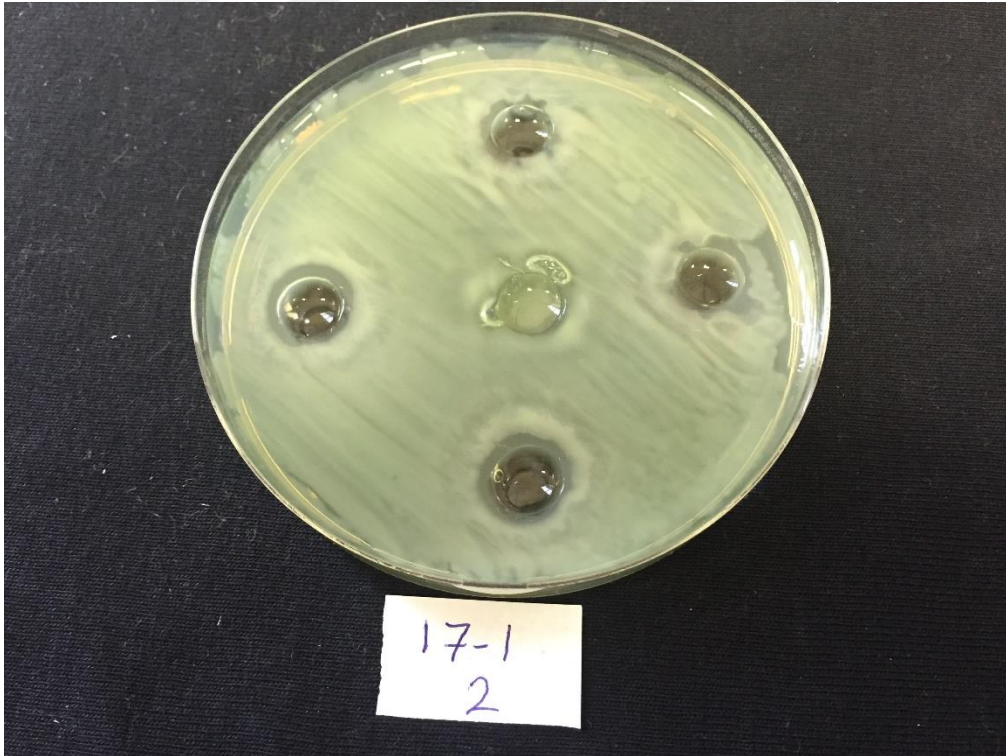
Resim 4.43. İzolat FH 6-1`in çinko direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.44. İzolat FH 6-1`in çinko direnci (15 mM, 20 mM)

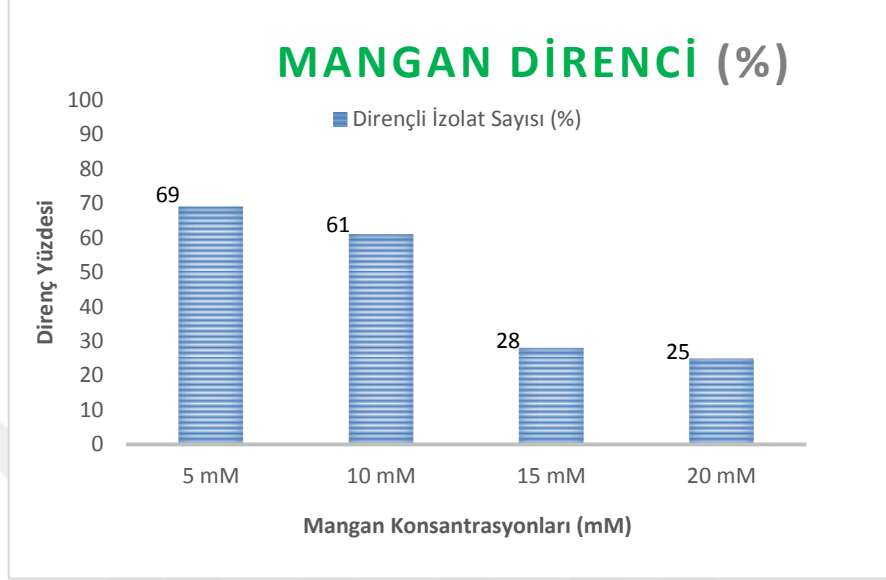


Resim 4.45. İzolat FH 17-1`in çinko direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.46. İzolat FH 17-2`nin çinko direnci (15 mM, 20 mM)

Şekil 4.2’de izolatların mangana karşı gösterdikleri direnç oranlarına bakıldığında; izolatların %69’unun 5mM’a, %61’inin 10mM’a, %28’inin 15mM’a ve %25’inin de 20mM’a direnç gösterdikleri belirlenmiştir.



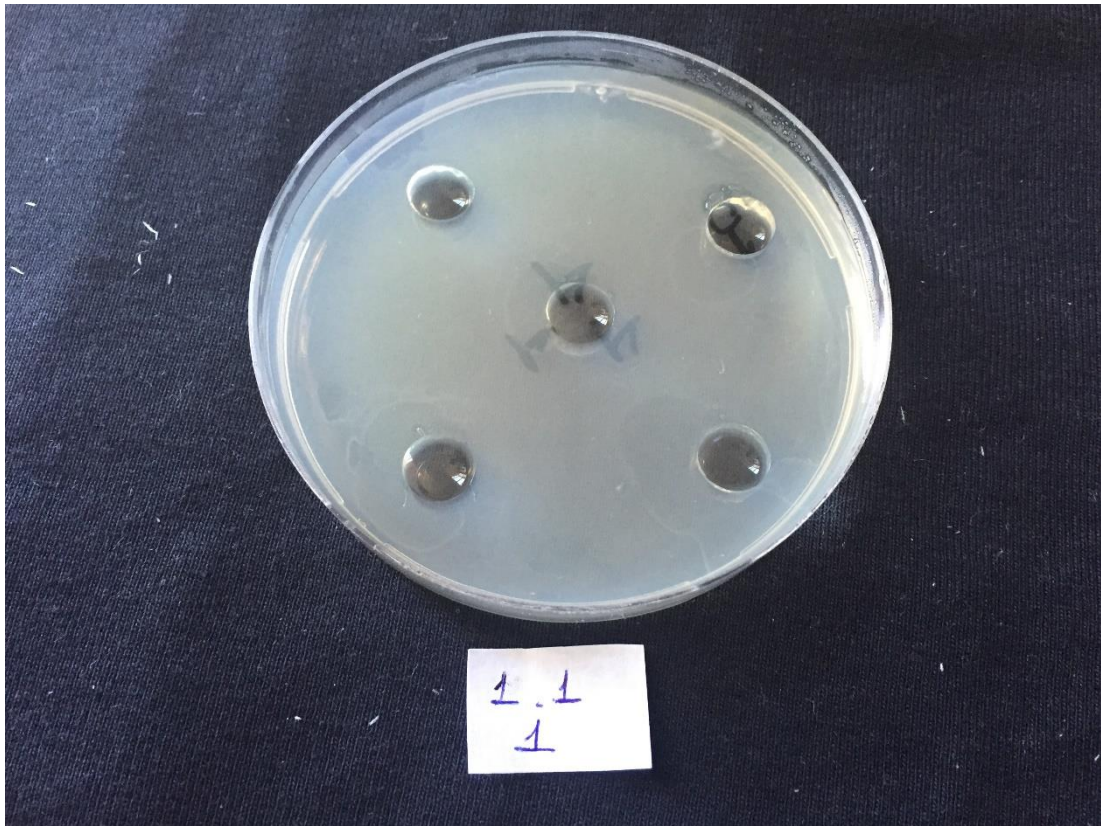
Şekil 4.2. İzolatların mangan direnç yüzdeleri

Yine tablo 4.13’deki veriler incelendiğinde; manganın farklı konsantrasyonlara dirençlilik gösteren toplam 22 adet izolat (FH 1-1, FH 1-2, FH1-5, FH 1-6, FH 3-4, FH 3-5, FH 3-7, FH 5-1, FH 6-1, FH 6-2, FH 7-2, FH 7-3, FH 7-4, FH 17-1, FH 17-2, FH 17-4, FH 17-5, FH 17-6, FH 18-1, FH 18-2, FH 18-5 ve FH 18-6) belirlenirken tüm konsantrasyonlara duyarlı 9 adet izolat (FH 1-3, FH 1-4, FH 3-3, FH 5-3, FH 8-3, FH 8-5, FH 18-3 ve FH 18-4) tespit edilmiştir. Bunların dışındaki izolatlarda herhangi bir direnç gözlenmemiştir.

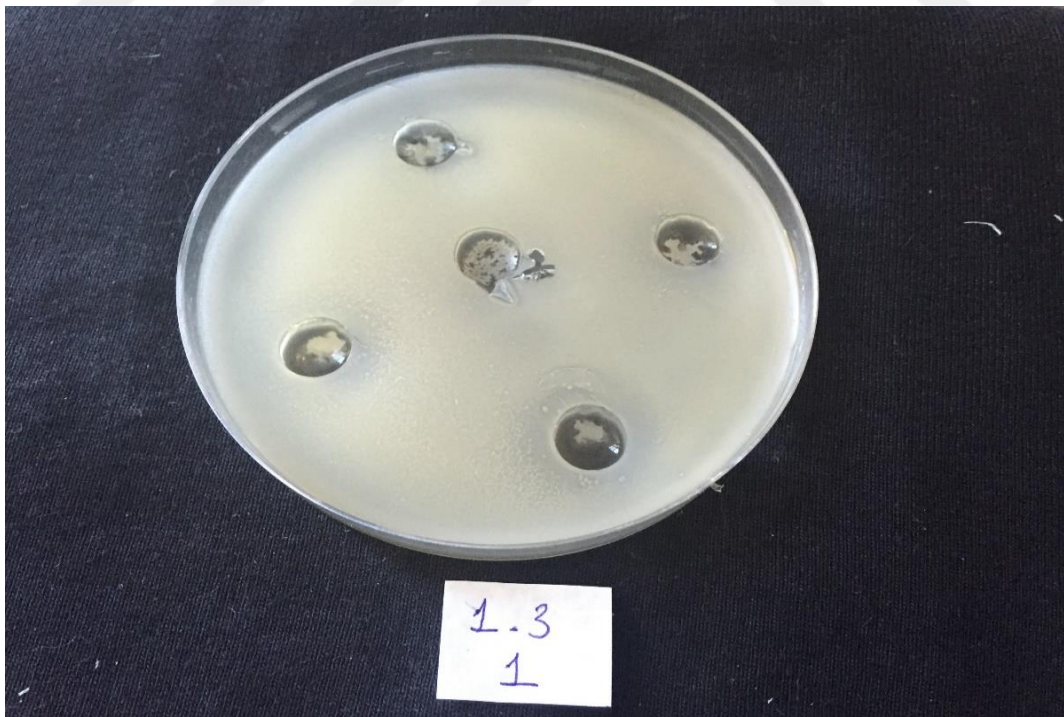
Tablo 4.13. İzolatların Mangane Dirençlilikleri

MnCl ₂ 2H ₂ O	5mM	10mM	15mM	20mM
FH 1-1	R*	R	S*	S
FH 1-2	S	S	S	S
FH 1-3	R	R	R	R
FH 1-4	R	R	R	R
FH 1-5	S	S	S	S
FH 1-6	R	S	S	S
FH 3-3	R	R	R	R
FH 3-4	R	R	S	S
FH 3-5	R	R	S	S
FH 3-7	S	S	S	S
FH 5-1	R	R	S	S
FH 5-2	S	S	S	S
FH 5-3	R	R	R	R
FH 5-4	S	S	S	S
FH 5-5	S	S	S	S
FH 5-6	S	S	S	S
FH 6-1	R	R	S	S
FH 6-2	R	R	S	S
FH 7-2	R	R	S	S
FH 7-3	R	S	S	S
FH 7-4	R	S	S	S
FH 8-1	S	S	S	S
FH 8-2	R	R	R	R
FH 8-3	R	R	R	R
FH 8-5	R	R	R	R
FH 17-1	R	R	S	S
FH 17-2	R	R	S	S
FH 17-4	S	S	S	S
FH 17-5	S	S	S	S
FH 17-6	R	S	S	S
FH 18-1	R	R	S	S
FH 18-2	R	R	S	S
FH 18-3	R	R	R	R
FH 18-4	R	R	R	R
FH 18-5	S	S	S	S
FH 18-6	R	R	R	S

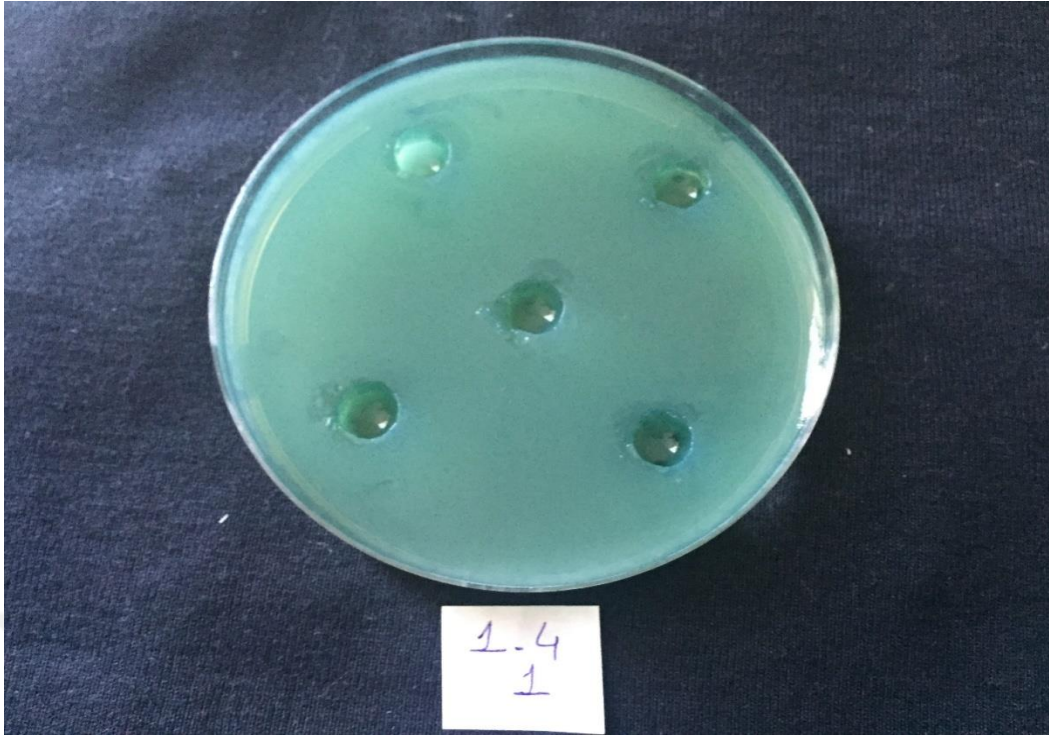
S= Duyarlı (Sensitive), R=Resistance (Dirençli)



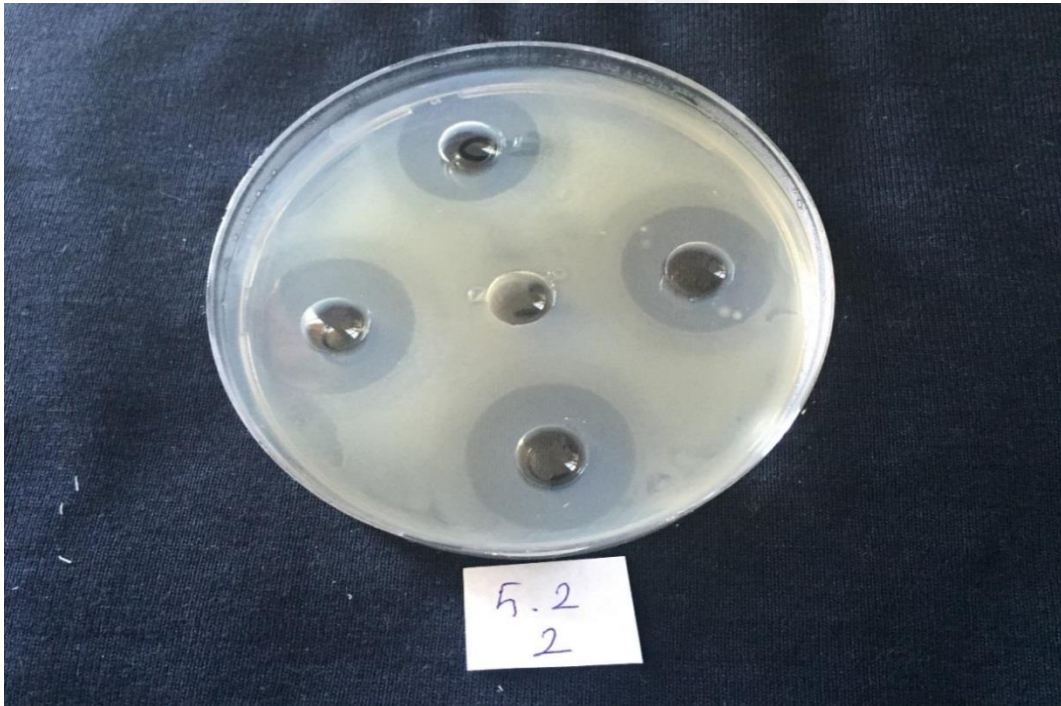
Resim 4.47. İzolat FH 1-1`nin mangan direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.48. İzolat FH 1-3`ün mangan direnci (5 mM, 10 mM)

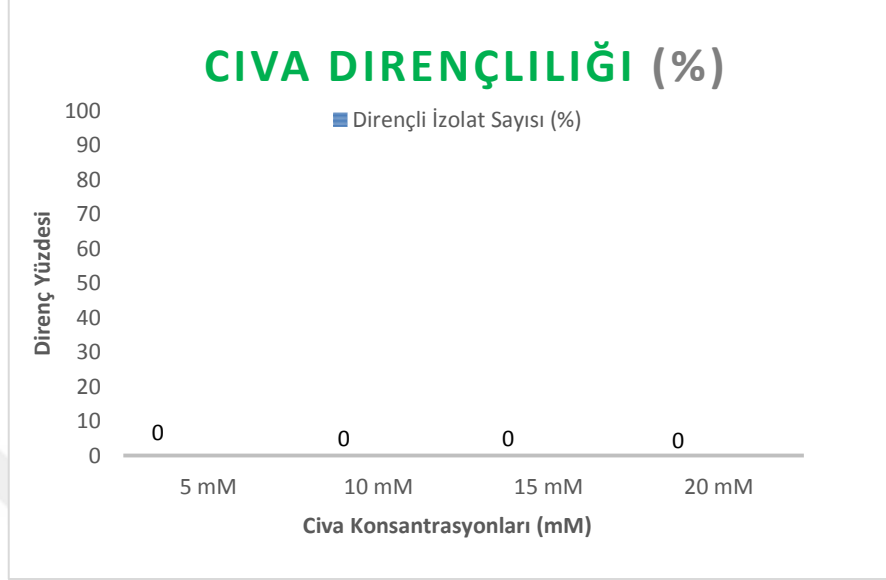


Resim 4.49. İzolat FH 1-4`ün mangan direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.50. İzolat FH 5-2`nin mangan direnci (15 mM,20 mM)

İzolatlarnıuygulanan cıva konsantrasyonlarına karşı direnç oranları (%) bakıldığında hiçbir izolattın bu ağır metale dirençli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



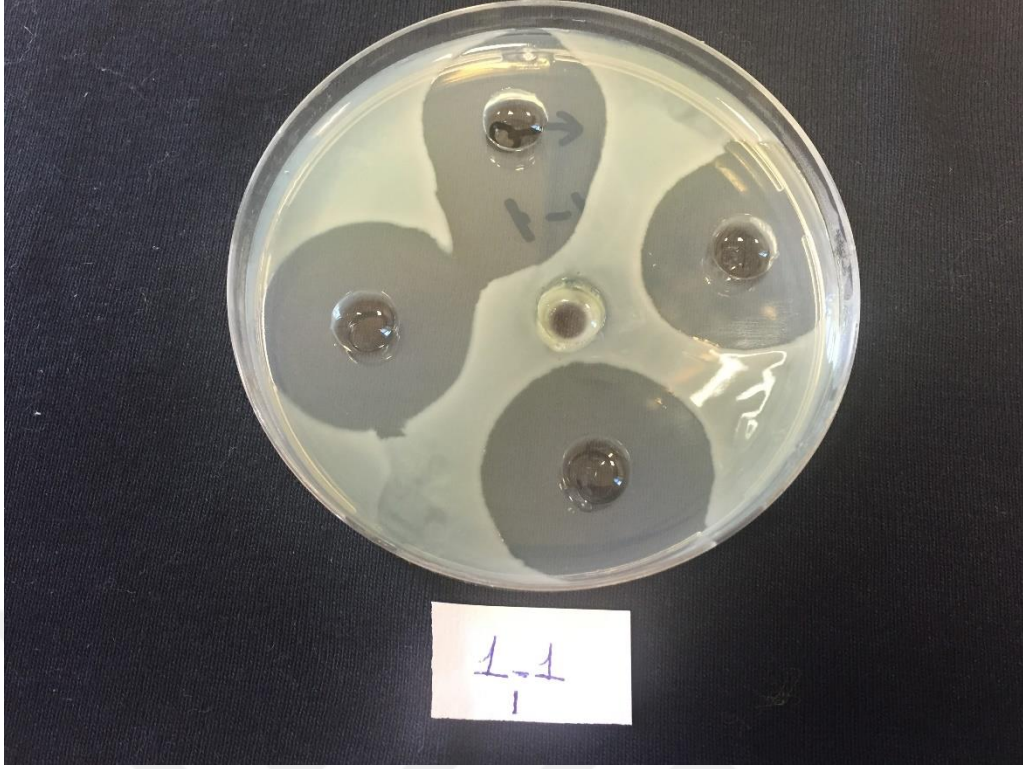
Şekil 4.3. İzolatların cıva direnç yüzdeleri

İzolatlarnı cıvaya karşı gösterdikleri direnç özelliğine bakıldığında; uygulanan tüm konsantrasyonlardirençli olan hiçbir izolat tespit edilememiştir (Tablo 4.14).

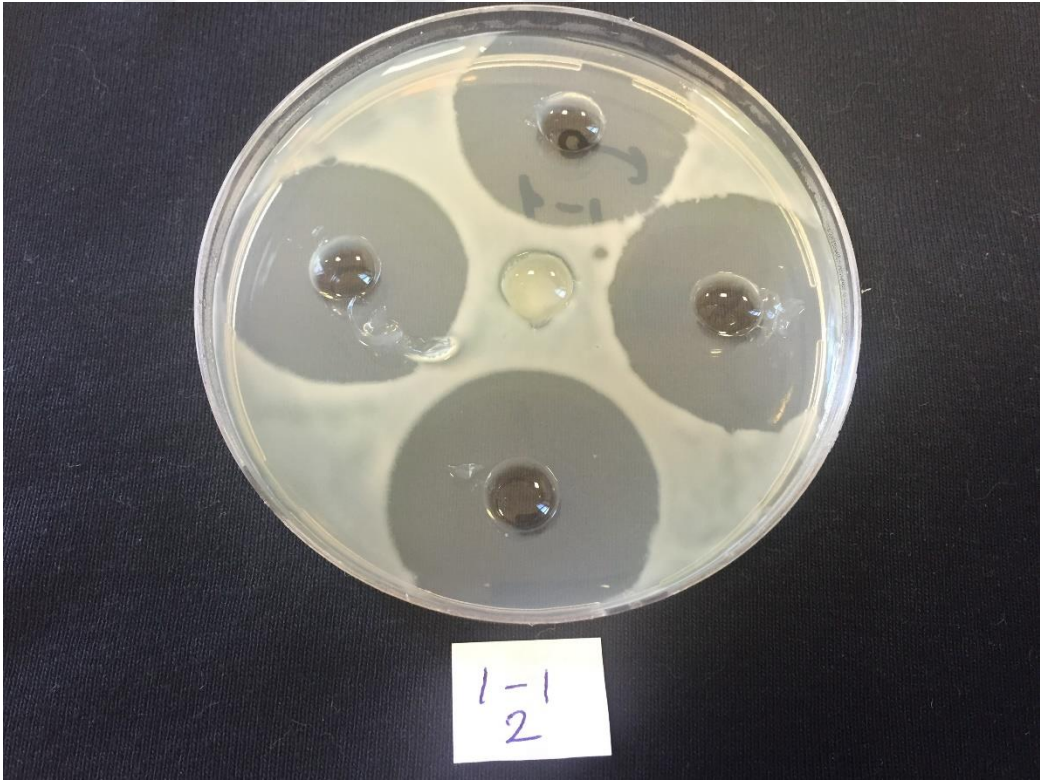
Tablo 4.14. İzolatların Civa Dirençliliği

HgCl ₂	5mM	10mM	15mM	20mM
FH 1-1	S*	S	S	S
FH 1-2	S	S	S	S
FH 1-3	S	S	S	S
FH 1-4	S	S	S	S
FH 1-5	S	S	S	S
FH 1-6	S	S	S	S
FH 3-3	S	S	S	S
FH 3-4	S	S	S	S
FH 3-5	S	S	S	S
FH 3-7	S	S	S	S
FH 5-1	S	S	S	S
FH 5-2	S	S	S	S
FH 5-3	S	S	S	S
FH 5-4	S	S	S	S
FH 5-5	S	S	S	S
FH 5-6	S	S	S	S
FH 6-1	S	S	S	S
FH 6-2	S	S	S	S
FH 7-2	S	S	S	S
FH 7-3	S	S	S	S
FH 7-4	S	S	S	S
FH 8-1	S	S	S	S
FH 8-2	S	S	S	S
FH 8-3	S	S	S	S
FH 8-5	S	S	S	S
FH 17-1	S	S	S	S
FH 17-2	S	S	S	S
FH 17-4	S	S	S	S
FH 17-5	S	S	S	S
FH 17-6	S	S	S	S
FH 18-1	S	S	S	S
FH 18-2	S	S	S	S
FH 18-3	S	S	S	S
FH 18-4	S	S	S	S
FH 18-5	S	S	S	S
FH 18-6	S	S	S	S

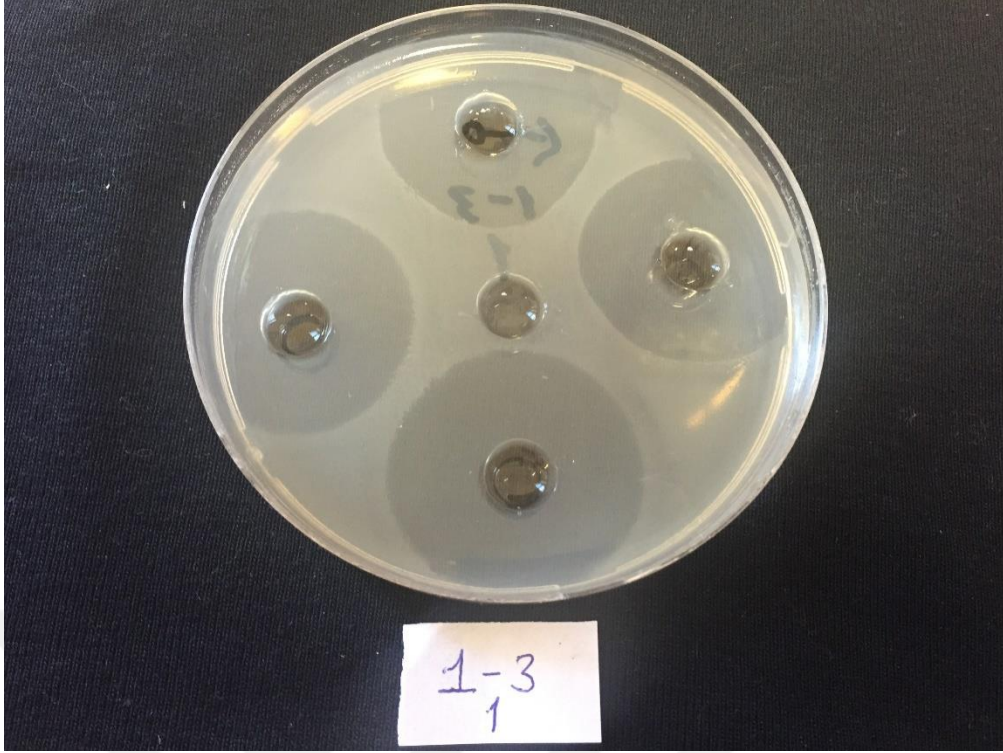
*S= Duyarlı (Sensitive), R=Resistance (Dirençli)



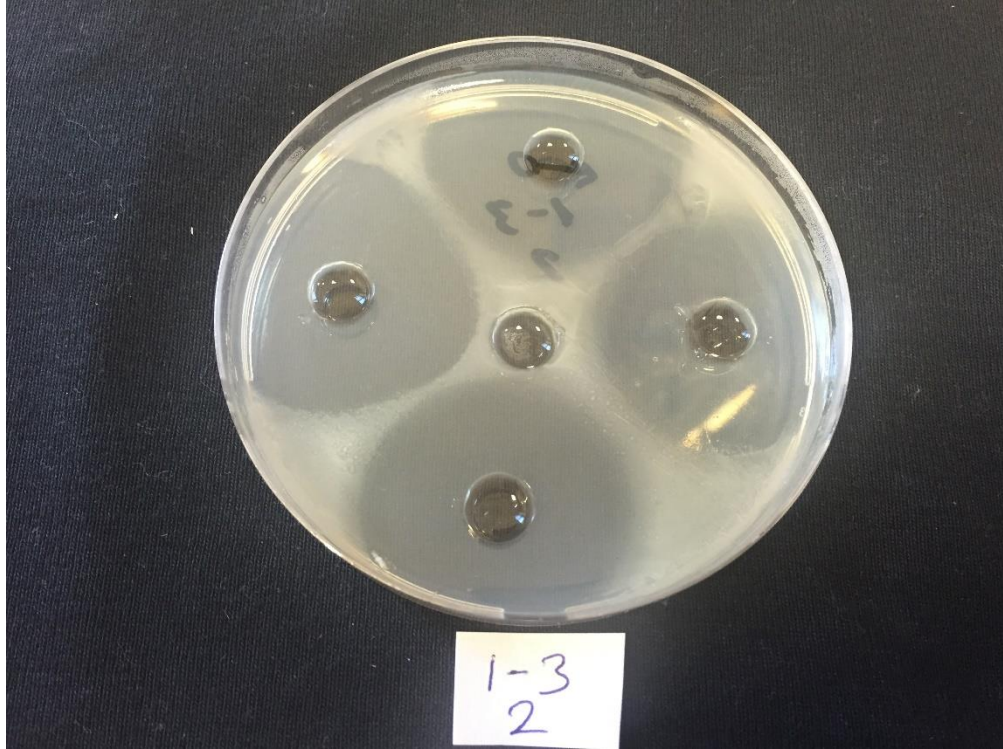
Resim 4.51. İzolat FH 1-1`in civa direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.52. İzolat YH 1-2`nin civa direnci (15 mM, 20 mM)

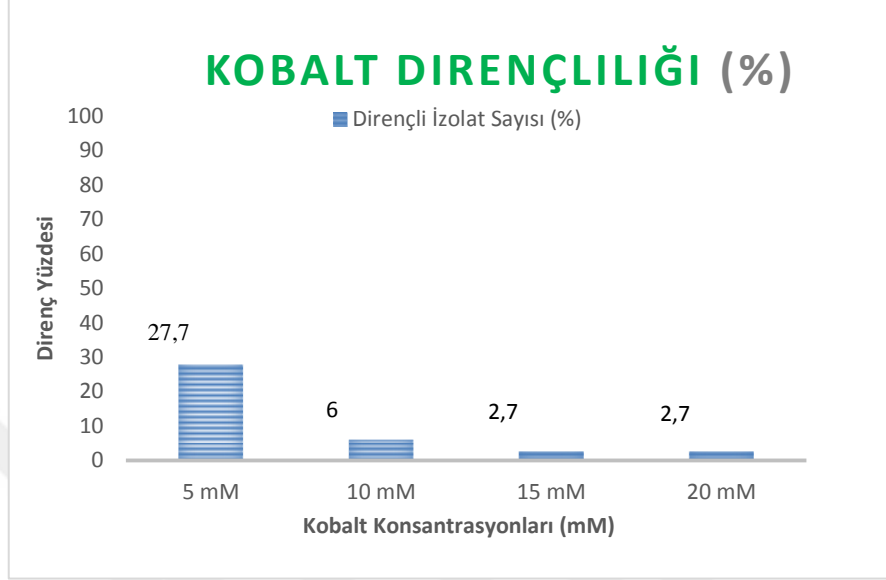


Resim 4.53. İzolat FH 1-3`ün civa direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.54. İzolat FH 1-3`ün civa direnci (15 mM, 20 mM)

Elde edilen İzolatların kobalta karşı gösterdikleri (%) direnç oranlarına bakıldığında; toplam izolatlardan %27,7'sinin 5mM'a, %5,5'inin 10 mM'a, %2,7'sinin 15mM'a ve %2,7'sinin ise 20 mM'a dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.)



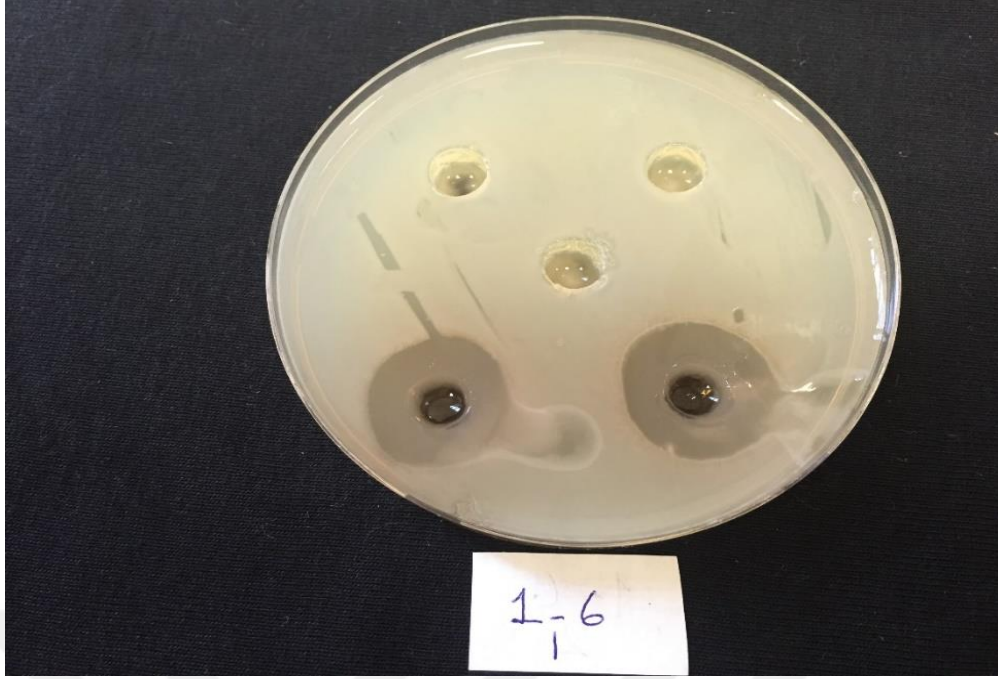
Şekil 4.4. İzolatlara ait kobalt direnç yüzde değerleri

Tablo 4.15`de görüldüğü üzere; tüm kobalt konsantrasyonlarına dirençli olan bir adet izolat (FH 17-6) tespit edilirken duyarlı olan 25 adet izolat (FH 1-1, FH 1-2, FH 1-3, FH 1-5, FH 3-3, FH 5-1, FH 5-2, FH 5-4, FH 5-5, FH 5-6, FH 6-2, FH 7-2, FH 8-1, FH 8-2, FH 8-5, FH 17-1, FH 17-2, FH 17-4, FH 17-6, FH 18-1, FH 18-2, FH 18-3, FH 18-4, FH 18-5) saptanmıştır. Kalan 10 adet izolattın ise farklı konsantrasyonlara karşı duyarlılık ve dirençlilik gösterdikleri belirlenmiştir.

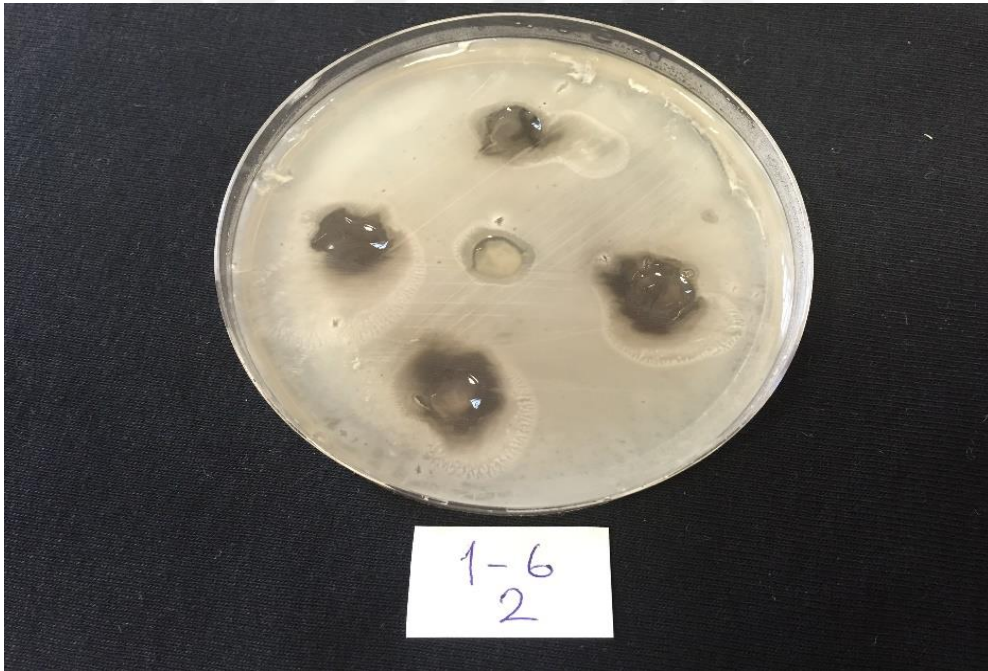
Tablo 4. 15. İzolatların Kobalt Dirençlilikleri

<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	<i>5mM</i>	<i>10mM</i>	<i>15mM</i>	<i>20mM</i>
FH 1-1	S*	S	S	S
FH 1-2	S	S	S	S
FH 1-3	S	S	S	S
FH 1-4	S	S	S	S
FH 1-5	S	S	S	S
FH 1-6	R*	S	S	S
FH 3-3	S	S	S	S
FH 3-4	S	S	S	S
FH 3-5	R	S	S	S
FH 3-7	R	S	S	S
FH 5-1	S	S	S	S
FH 5-2	S	S	S	S
FH 5-3	R	S	S	S
FH 5-4	S	S	S	S
FH 5-5	S	S	S	S
FH 5-6	S	S	S	S
FH 6-1	R	S	S	S
FH 6-2	S	S	S	S
FH 7-2	S	S	S	S
FH 7-3	R	S	S	S
FH 7-4	R	S	S	S
FH 8-1	S	S	S	S
FH 8-2	S	S	S	S
FH 8-3	R	R	S	S
FH 8-5	S	S	S	S
FH 17-1	S	S	S	S
FH 17-2	S	S	S	S
FH 17-4	S	S	S	S
FH 17-5	S	S	S	S
FH 17-6	R	R	R	R
FH 18-1	S	S	S	S
FH 18-2	S	S	S	S
FH 18-3	S	S	S	S
FH 18-4	S	S	S	S
FH 18-5	S	S	S	S
FH 18-6	S	S	S	S

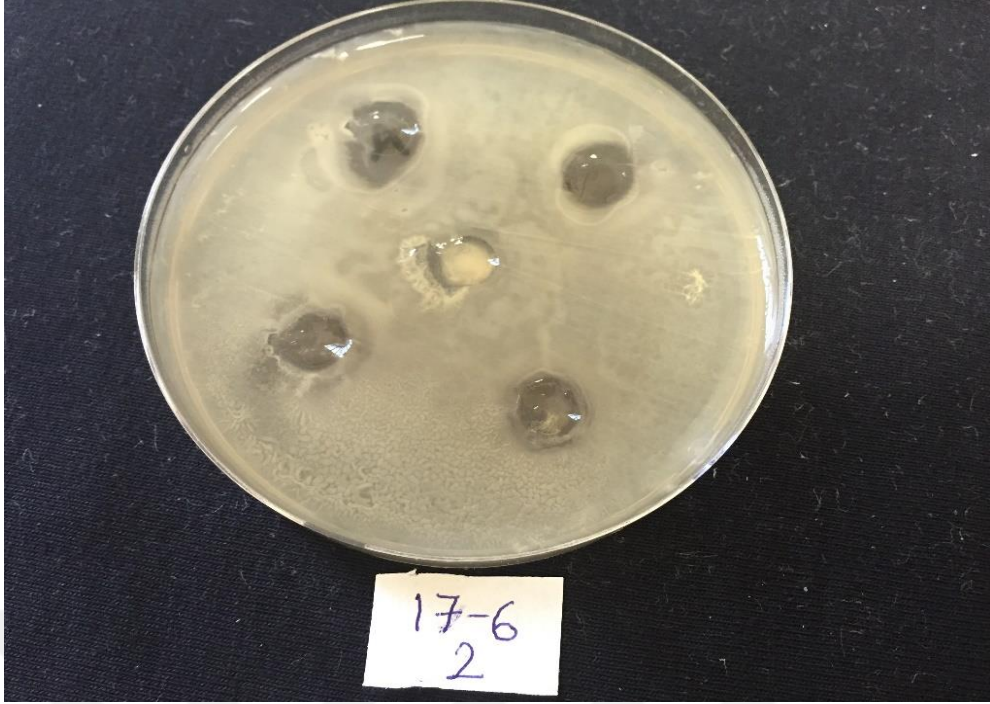
*S= Duyarlı (Sensitive), R=Resistance (Dirençli)



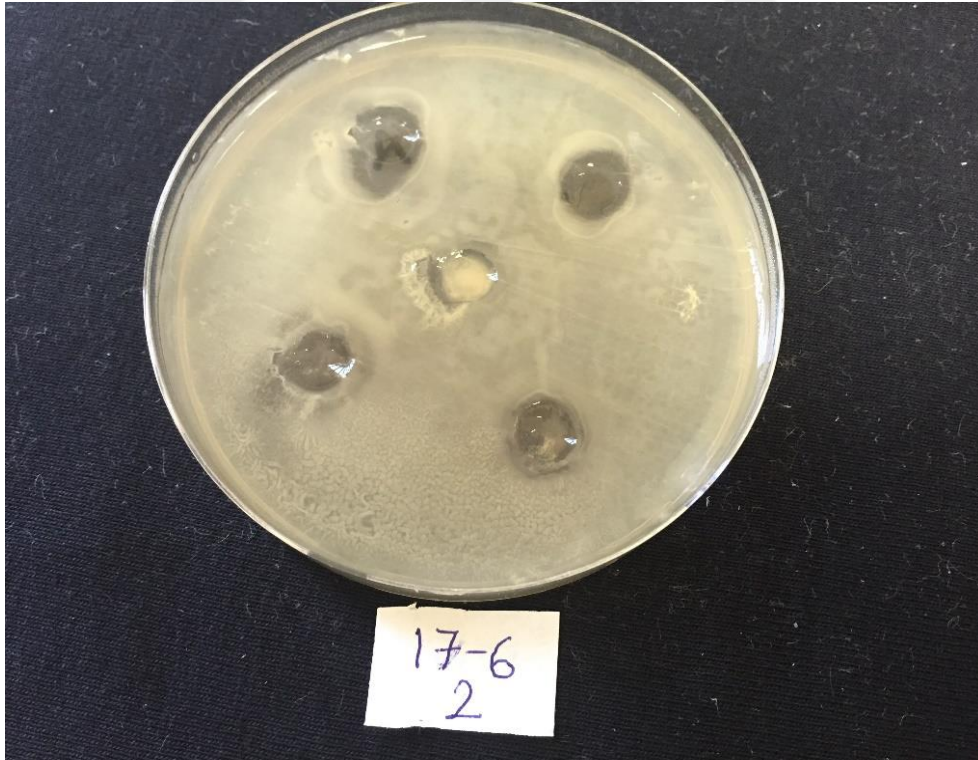
Resim 4.55. İzolat FH 1-6'nin kobalt direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.56. İzolat FH 1-6'nin kobalt direnci (15 mM, 20 mM)



Resim 4.57. İzolat FH 17-6'nin kobalt direnci (5 mM, 10 mM)



Resim 4.58. İzolat FH 17-6'nin kobalt direnci (15 mM, 20 mM)

Canlıların yaşamlarını sürdürdükleri çevrede ağır metallerin jeolojik olaylar sonucu oluşan doğal dağılımının son yıllarda insanoğlunun çeşitli aktiviteleri ile büyük oranda değişmeye başladığı gözlenmektedir. Ağır metallerin çevreye bulaşması ya doğal kaynaklar ile yada antropojenik (insan) kaynaklı olmakta ve yayıldıkları ortamlardaki canlıların yaşam döngüsüne karışarak etkilerini göstermektedirler. Yoğun ağır metal içeren topraklarda yaşamını sürdüren ve bu arada da metal direncine sahip organizmaların gelişmelerinde; dikey gen transferi (reproduction), yatay gen transferi (transpozonlar ve plazmid), kendiliğinden oluşmuş mutantlar üzerinde bulunan seçicistresin etkin rol oynadığı belirtilmektedir. Burada rolü olan faktörlerden birisi de metallere karşı dirençliliğidir. Araştırmacılar, bakterilerin yaşamlarını sürdürdükleri bölgelerde çok sayıda ağır metal bulunduğundan prokaryotların ortaya çıkmasından sonraki süreçlerde özellikle ağır metallere karşı direnç mekanizmalarının hızlı bir şekilde geliştirildiği bildirmişlerdir (Ji ve Silver, 1995; Torabi, 2013).

Aslında antibiyotik dirençliliği ile ağır metal dirençliliği arasında ki ilişki yıllardır araştırılmakta olup bu iki mekanizmanın birbiriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Harnett ve Gyles, 1984; McEntee ve diğ., 1986). Plazmidlerde, transpozonlarda ve integronlarda çok sayıda antibiyotik direnç geni bulunmakta ve filogenetik olarak birbirinden oldukça uzak olan bakteri türleri arasında bunlar horizontal gen transferi yoluyla aktarılabilir. Hareket halindeki bu genetik elemanlar; ağır metal dirençlilik genlerini, çoklu antibiyotik dirençlilik genlerini ve çeşitli toksik bileşiklere dirençlilik genlerini de taşımaktadırlar. Yine araştırmacılar ağır metal dirençlilik geni ile antibiyotik dirençlilik geninin aynı plazmid üzerinde bulunabileceğini belirtmektedir (Sevgi, 2007).

Yukarıda bahsedilen özellikler göz önüne alındığında bakterilerin büyük bir kısmının; Sb^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} , AsO_2^{-} , AsO_4^{-3} , Bi^{+3} , BO_3^{-3} , Cd^{+2} , Co^{+2} , CrO_4^{-2} , Cu^{+2} , Pb^{+3} , TeO_3^{-2} , Zn^{+2} , Tl^{+} gibi metallere karşı direnç yeteneklerinin olduğu belirlenmiş olup bunun ise özellikle çeşitli kimyasallara ve bazı ilaçlara karşı gösterilen spesifik bir özellik olduğu bildirilmektedir (Wiener ve diğ., 2003). Aslında bu özelliklerin genetik faktörlerle kontrol edildiği ve direnç yeteneklerinin ise plazmid ve transpozonlar üzerinde bulunduğu belirtilmektedir (Sevgi, 2007; Özdemir, 2008; Sevgi ve diğ., 2010; Mendez ve diğ., 2010; Sriram ve diğ., 2011).

Araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda; ağır metal ve antibiyotik direnç yeteneklerinin beraber gözlemlendiğinden bahsetmektedirler. Bu hipotezi doğrulayan bir

çalışmada; bazı hastalardan elde edilen klinik izolatlarda antibiyotik direnç ile civa direnç yeteneğinin birlikte olduğu tespit edilmiş ve *Staphylococcus aureus* (MRSA) da metisilin kodlu genlerin bazı antibiyotiklerin yanısıra civa ve kadmiyuma da dirençli olduğu saptanmıştır (Silver ve Phung, 1996).

Başka bir bakış açısıyla ise; antibiyotik dirençliliklerinin ortaya çıkmasını bakterilerdeki bulunan dirençlilik mekanizmalarının antibiyotikler ve metaller tetiklediği görüşüdür. Bu görüşü destekleyen bir çalışmada; hidrokarbonlarla kirlenmiş alanlardan alınan örneklerde kinolon direncinin olduğu belirtilmiştir (Torabi, 2013).

Yine ağır metal dirençliliğini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada; petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen *Escherichia fergusonii* KLU01 suşunun demir, manganez, çinko, nikel, kurşun ve bakıra karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Sriram ve diğ., 2011).

Benzer bir çalışmada ise; Mersin ili Kazanlı endüstri bölgesinden 272 adet *Pseudomonas* spp. ve 161 *Bacillus* spp. izole edilmiş ve izolatlardan %26'sı Ni'e, %73,9'u Cr'a, %18,4'ü Zn'ya, %9,2'si Co'a, %11,5'i Cd'a ve %7,3'ü Cu'a karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Sevgi ve diğ., 2010).

Çalışmanın ağır metallere direnç yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yaptığımız kısmı incelendiğinde; izolatlardan %27,7'sinin kobalta, %42'sinin çinkoya, %69'unun mangana ve %0'ının ise civanın 5mM'lik konsantrasyonuna dirençli oldukları tespit edilmiştir. Buna karşın ağır metallerin 20 mM'lik konsantrasyona olan dirençlilik oranları incelendiğinde ise; izolatların %2,7'sinin kobalta, %25'inin mangana dirençli olduğu belirlenir iken civave kobaltın bu konsantrasyonuna dirençli olan hiçbir izolat saptanamamıştır (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

Tüm bu bilgiler ve çeşitli araştırmacıların yaptıkları araştırma bulgularında da görüldüğü kadarıyla aslında birbirine oldukça benzeyen habitatlardaki sonuçlarla bizim bulgularımız oldukça fazla uygunluk göstermektedir.

4.6. İzolatlarda Biyosümfektan Üretiminin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların biyosümfektan üretebilme yeteneklerini tespit etmek için kullanılan Drop Collapse yöntemine göre; 36 izolatın 7 tanesinin (FH 1-1, FH 1-4, FH 1-6, FH 5-1, FH 8-1, FH 17-1, FH 18-3) biyosümfektan üretme yeteneğine sahip olduğu ancak diğer 29

adet izolatin ise biyosürefektan üretme yeteneğine sahip olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.16.).

Tablo 4.16. İzolatların Biyosürefektan Üretme Yetenekleri

İzolat Numarası	Sonuç	İzolat Numarası	Sonuç
FH 1-1	+	FH 7-2	-
FH 1-2	-	FH 7-3	-
FH 1-3	-	FH 7-4	-
FH 1-4	+	FH 8-1	+
FH 1-5	-	FH 8-2	-
FH 1-6	+	FH 8-3	-
FH 3-3	-	FH 8-5	-
FH 3-4	-	FH 17-1	+
FH 3-5	-	FH 17-2	-
FH 3-7	-	FH 17-4	-
FH 5-1	+	FH 17-5	-
FH 5-2	-	FH 17-6	-
FH 5-3	-	FH 18-1	-
FH 5-4	-	FH 18-2	-
FH 5-5	-	FH 18-3	+
FH 5-6	-	FH 18-4	-
FH 6-1	-	FH 18-5	-
FH 6-2	-	FH 18-6	-

Yüzey aktif maddeler olan biyosürefektanlar çok farklı alanlarda başta tıp, eczacılık, tarım ve gıda sektörü olmak üzere yoğun olarak kullanımının artması nedeniyle özellikle de biyoteknolojik çalışmalarda oldukça fazla tercih edilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında; Mersin ilinin petrol depolama alanlarından, doldur- boşalt istasyonlarından özellikle de petrol türevi hidrokarbonlar bakımından zengin olduğu tahmin edilen topraklardan örnekler alınmıştır. Klasik mikrobiyolojik izolasyon yöntemleri kullanılarak birbirinden farklı olan koloniler seçilerek 36 farklı bakteri türü izole edilmiştir. Bu izolatların biyosürefektan üretme yetenekleri hızlı ve pratik bir yöntem olan Drop-Collapsemetodu kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntemde mikrowell plate kullanılmakta ve plate bulunan kuyucuklar dairesel yapıda olduğundan damlacıkların yağlı yüzeydeki hareketleri engelenerek sonuçta damlacıkların şekli sabit kalmaktadır. Çok sayıda araştırmacı

bu yöntemi kullanarak bakterilerin biyosümfektan üretimini belirlemişlerdir (Tuğrul ve Cansuar, 2005; Yılmaz, 2008; Kaya, 2008; Joy ve diğ., 2017).

Drop Collapse yönteminin biyosümfektanların kantitatif tayininde kullanımının uygun olduğunu Bodour ve Miller (1998) bildirmişlerdir. Petrolün bulaşmış olduğu topraklardan Plaza ve diğ., (2006) 16 izolat elde ederek biyosümfektan varlığını bu yöntemle saptamışlardır.

Bu amaçla yapılan başka bir çalışmada; Ramos ve diğ., (2010) 324 adet bakteri türünü hidrokarbon ile kirlenmiş alanlardan izole etmişler ve bunlardan 17 tanesinin biyosümfektan üretme yeteneğine sahip olduğunu Drop Collapse yöntemine kullanarak belirlemişlerdir.

Yapılan literatür incelemesinde; su içerisinde çözünemeyen yağ ve hidrokarbon türevleri gibi bileşikler içerisinde barındıran toprak ve su habitatlarında biyosümfektan üreten mikroorganizmaların bulunabilme sıklığının oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir (Çelikdemir, 2012). Bu bilgiler çerçevesinde çalışmamızdan elde edilen bulguların bu görüşü doğrular nitelikte olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; biyosümfektanların metal bileşiklerle kompleks yapılar meydana getirme eğilimlerinin olması nedeniyle ağır metallerin yoğun olarak bulunduğu daha doğrusu bunlarla kirlenmiş toprak ve su habitatlarının temizlenmesinde kullanılabileceği tavsiye edilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak mevcut tez çalışmasında; hidrokarbonla kirlenmiş doğal alanlardan bakterilerin izolasyonu, tanılanması, antibiyotik ve ağır metal direnç yetenekleri ile biyosümfektan üretme özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen hedef doğrultusunda yapılan araştırma sonucuna göre; biyosümfektan üretebilen, ağır metal ve antibiyotiklerin çoğunluğuna dirençli olan 6 izolat tespit edilmiştir (FH 1-1, FH 3-4, FH 8-2, FH 18-2, FH 18-3, FH 18-4).

Yaptığımız araştırma verilerine göre; elde edilen 36 izolattan sadece 7 tanesinin biyosümfektan üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular çerçevesinde, hidrokarbonlarla kirlenmiş topraklarda biyosümfektan üretme yeteneğine sahip yerel bakteri türlerinin bulunma olasılığının oldukça yüksek olduğu hipotezini doğrular niteliktedir.

Nitekim; petrol ve petrol türevlerini yapısında barındıran topraklardan yerel bakteri türlerinin izole edilerek bunlardan biyosümfektan elde edilmesi hem endüstriyel açıdan hemde bilimsel yönden oldukça büyük bir önem arz etmektedir.

Özellikle 18. yüzyıl ve sonrası süreçte sanayi başdöndürücü şekilde gelişmekte ancak bununla birlikte endüstriyel kirlilikte hızla artmakta olup busoruna çözüm üretmek adına ekosistemi olabildiğince koruma günümüz insanının öncelikleri arasında yerini almıştır. Bu çerçevede özellikle de petrol ve petrol türevinden kaynaklanan atık maddeler ve bulaşmalar belirtilen kirlilik nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu hidrokarbonların doğaya bulaşıp yayılmasında ise petrol kazaları, tanker sızıntıları ve fabrika atıkları vb. faktörler oldukça etkili olmakta ancak bu PAH ve türevleri doğada kendi başlarına parçalanamadıklarından buldukları habitatda yaşamını sürdüren canlılara zarar vermektedir.

PAH ve türevlerini bulduran atıklarla kirlenmiş habitatlarda çok farklı mikroorganizmalar özellikle de yerel türler bulunmaktadır. Literatür araştırması sonucunda; PAH'ların mikroorganizmalar tarafından parçalanarak çevresel kirliliğin yok edilmesinde etkili olacağı görülmektedir.

Aynı zamanda metallerin yoğun olarak bulunduğu topraklardan izolasyonu yapılan bakterilerde ağır metallere karşı gösterilen tolerans aslında çevrenin bu ajanlarla kirlenmiş olduğunun bir belirtisidir. Tüm bu nedenler göz önüne alındığında ağır metal direnç

yeteneğine sahip olan bakterilerin özellikle bu tür bölgelerde biyodegradasyonda (biyoparçalamada) tercih edilebileceği kanısına varılmaktadır.

Ayrıca yapılan çalışma sonucunda elde edilen yerel izolatların özellikle petrol ve türevlerinin yapısında yer alan hidrokarbonların çok yoğun bir şekilde bulunduğu alanlarda tek veya komünite yani karışık kültür olarak biyoremediasyon çalışmalarında kullanımının ve performansının oldukça iyi olabileceği düşünülmektedir.

Son olarak; tez çalışmasında elde edilen izolatların tür tanımlamaları MALDI-TOF MS kullanılarak yapılmış olup bu araştırma özellikle petrol ve petrol atıklarından izole edilen bakterilerin tanımlamasında bu yöntemin kullanıldığı ilk çalışma niteliğini de taşımaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Acun, N., 1949, *Dünya Petrol Tarihi ve Türk Petrolü*, Şaka Matbaası, İstanbul.
- [2] Adıgüzel, A., 2006, *Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-123.
- [3] Akkan, T., 2009, *İskenderun Körfezi`ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1-77.
- [4] Ali, H., Khan E., Sajad M.A., 2013, *Phytoremediation of Heavy Metals-Concepts and Applications*, Chomesphere, 91, 869-881.
- [5] Altay, Ö., 2016, *Niğde İli Topraklarının Ağır Metal İçeriğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 1-39.
- [6] Al-Thani, R.F., Abd-El-Haleem, D.A.M., Al-Shammri, M., 2009, *Isolation and Characterization of Polyaromatic Hydrocarbons-Degrading Bacteria from Different Qatari Soils*, African Journal of Microbiology Research, 3(11), 761-766.
- [7] Alver, E., Demirci, A., Özçimder, M., 2012, *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri*, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 3(1), 45-52.
- [8] Arora, M., Kiran B., Rani S., Rani A., Kaur B.,Mittal N., 2008, *Heavy Metal Accumulation in Vegetables Irrigated With Water from Different Sources*, FoodChemistry, 111, 811-815.
- [9] Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, 1997, T.C., Katsouyannopoulos, V.C. *Transferable Antibiotic Resistance Among Salmonella Strains Isolated from Surface Waters*, Wat.Res., 31, 1112- 1116.
- [10] ATSDR, 1995, *Formation in Induced Carcinogenesis, Agency For Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs)*, Department of Health And Human Services, Public Health Service, USA,65–79.
- [11] Bal, T., 2012, *Aşkale Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,Erzurum,1-102.
- [12] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000, *Potential Commercial Applications of Microbial Surfactans*, Applied Microbiology and Biotechnology, 53, 495-508.
- [13] Banat, I.M., 1995, *Biosurfactant Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation*,Biores. Technol.,51, 1-12.

- [14] Barış, Ö., 2008, *Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-135.
- [15] Baskaya, H.S. ve Teksoy, A., 1997, *Topraklarda Ağır Metaller ve Ağır Metal Kirliliği*, I. Uludağ Çevre Mühendisliği Sempozyumu, Bursa, 763-771.
- [16] Benedek, T., Vajna, B., Ta'Ncsics, A., Marialigeti, K., La'Nyi, S., 2013, *The Remarkable Impact of Pahs And Tphs on The Richness And Diversity of Bacterial Species in Surface Soils Exposed to Long-Term Hydrocarbon Pollution*, World J Microbiol Biotechnol, DOI 10.1007/S11274-013-1362-9.
- [17] Bento, F.M., Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C., Franberger Jr, W.T., 2005, *Diversity of Biosurfactant Producing Microorganisms Isolated from Soils Contaminated with Diesel Oil*, Microbiological Research, 160, 249-255.
- [18] Bingham, E., Cohrssen, B., Powell, C. H., 2001, *Patty's Toxicology (5th Edition) Toxicological Issues Related to Metals Neurotoxicology and Radiation Metals and Metal Compounds*, John Wiley & Sons, VolIII, ISBN: 0-471-31943-0.
- [19] Bodour, A.A., Miller, R.M., 1998, *Application of A Modified Drop-Collapse Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms*, Journal of Microbiological Methods, 3, 32, 273-280.
- [20] Bruins, M.R., Kapil S., Oehme, F.W., 2000, *Microbial Resistance to Metals in the Environment*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 45: 198-207.
- [21] Bruno, M.N., Normala, H., Fatimah, M.Y., Wan L., Wan, J., Mohamad, P., Zakaria, S.R.M, Narayanan, K., 2016, *Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of Cellulosimicrobium cellulans and Acinetobacter baumannii from tarball at Terengganu beach*, Malaysia Marine Pollution Bulletin 107, 261-268
- [22] Castellano, A.V., Cancio, J.L., Aleman, P.S., Rodriguez, J.S., 2003, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Air Particle in The City of Las Palmas De Gran Canaria*, Environment International, 29, 475-480.
- [23] Cerniglia, C.E., 1981, *Aromatic Hydrocarbons Metabolism By Bacteria, Fungi and Algae*. E., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (Ed.), Reviews in Biochemical Toxicology, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York, 321-361.
- [24] Chehregani, A., Malayeri B.E., 2007, *Removal of heavy metals by native accumulator plants*, International Journal of Agriculture and Biology, 9, 462-465.
- [25] Choudhury, R., Srivastava S., 2001, *Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria*, Curr. Sci. 81, 768- 775.
- [26] Christova, N., Tuleva, B., Lalchev, Z., Jordanova, A., Jordanov, B., 2004, *Rhamnolipid Biosurfactants Produced by Renibacterium Salmoninarum 27bn During Growth on N Hexadecane*, Verlag Der Zeitschrift Für Naturforschung. 59,70-74.

- [27] Coral, G., Karagöz, S., 2005, *Isolation and Characterization of Phenanthrene-Degrading Bacteria from A Petroleum Refinery Soil*, Annals of Microbiology, 55, 255-259.
- [28] Çay, S., 2014, *Ağır Metal İyonlarıyla Kirletilmiş Toprakların Karadeniz Bölgesinde Yetişen Bazı Süs Bitkileri Kullanılarak Temizlenebilirliğinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 1-130.
- [29] Çelebi, Ö., 2012, *Eurygaster integriceps (Put.) (Hemiptera: Scutelleridae)'in Bakteriyal Florasının ve Mikrobiyal Mücadele Etmenlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 1-83.
- [30] Çelikkdemir, M., 2012, *Hidrokarbon Kirliliği Bulunan Topraklardan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosüpfektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1-126.
- [31] Danyi, S., Brose, F., Brasseur, C., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Scippo M.L., 2009, *Analysis of EU Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Supplements Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to an Ultraviolet, Diode Array or Fluorescence Detector*, Analytica Chimica Acta, 633, 293–299.
- [32] Das, K., Mukherjee, A.K., 2007, *Crude Petroleum-Oil Biodegradation Eyciency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil from North-East India*, Bioresource Technology, 98, 1339-1345.
- [33] Davies, J., 1994, *Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes*, Science, 264, 375-381.
- [34] Demirdöğen, E., 2012, *Tekstil Fabrikası Atık Sularından Mikroorganizma İzolasyonu ve Biyosüpfektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 1-54.
- [35] Demirezen, D. ve Aksoy, A., 2004, *Accumulation of Heavy Metals in Typha Angustifolia (L.) and Potamogeton Pectinatus (L.) Living in Sultan Marsh*, Chemosphere, 56, 85-96.
- [36] Desai, J.D., Banat, I.M., 1997, *Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential*, American Society for Microbiology, 61, 47–64.
- [37] Desai, J.D., Desai, A.J., 1993, *Production of Biosurfactants in Biosurfactants - Production, Properties, Applications of Biosurfactants, Surfactant Science Series*, Marcel Dekker, Inc., New York, 48, 65-98.
- [38] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van, T.M., 1994, *Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Diversity and Activity as Shown by The Sensitivity-Resistance Index, an Ecologically Relevant Parameter*, Biology Fertility of Soils, 17, 177-184.
- [39] Domingo, J.L., 1994, *Metal-Induced Developmental Toxicity in Mammals*, J., Toxicol Environ. Health, 42, 123–41.

- [40] Douben, P.E.T., 2003, *PAH's; An Ecotoxicological Perspective*. Introduction, 1–6.
- [41] Dülger, G., 2012, *Termik Santral Bölgesindeki (Çan-Çanakkale) Topraklardan Ağır Metale Karşı Dirençli Bakterilerin İzolasyonu, Tanılanması ve Plazmid Profillerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 1-91.
- [42] Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S. B., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M., Sayadi, S., 2011, *Characterization of A Novel Biosurfactant Produced by Staphylococcus sp. Strain IE with Potential Application on Hydrocarbon Bioremediation*, Journal of Basic Microbiology, 51, 1–11.
- [43] Eraydın-Erdoğan, E., 2010, *Petrol İle Kirlenmiş Toprakların Biyolojik Olarak İyileştirilmesinin Laboratuvar Koşullarında Denenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-236.
- [44] Esen, F., 2006, *Bursa Atmosferindeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (Pah`ların) Gaz/Partikül Konsantrasyon Dağılımları ve Kuru Çökeltme Miktarları*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa 1-158.
- [45] Facchinelli, A., Sacchi, E., Mallen, L., 2001, *Multivariate Statistical and GIS-Based Approach to Identify Heavy Metal Sources in Soils*, Environ. Pollut, 114, 313–324.
- [46] Faschchuk, D. Y., 1991, *Forms of Anthropogenic Impact on The Black Sea Ecosystem and Modern State*, Ekologia Morya, Kiev, Naukova Dumka, 38, 19- 27.
- [47] Ferrarese, E., Andreottola, G., Oprea, I. A., 2008, *Remediation of PAH-Contaminated Sediments by Chemical Oxidation*, Journal of Hazardous Materials, 152(1), 128–139.
- [48] Freedman, B., 1995, Environmental Ecology, *The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses*, Academic Press, San Diego, CA.
- [49] Freeman, J.L., Persans M.W., Nieman K., Salt D.E., 2005, *Nickel and Cobalt Resistance Engineered in Escherichia coli by Over-expression of Serine Acetyltransferase from the Nickel Hyperaccumulator Plant Thlaspi goesingense*, Appl. And Envir. Microbiol, 71, 8627-8633.
- [50] Gadd, G.M., 1992, *Microbial Control of Heavy Metal Pollution*. Cambridge Press, Cambridge, 59–88.
- [51] Garcia, T., 1999, *Polycyclic Hydrocarbons from Coal Atmospheric Fluidised Bed Combustion*, Organic Atmospheric Pollutants, (AFBC), 1(2), 111–119.
- [52] Gerber, G.B., Leonard A., Hantson P.H., 2002, *Carcinogenicity, Mutagenicity and Teratogenicity of Manganese Compounds*, Critical Reviews in Onc. 42, 25–34.
- [53] Gerhardt, P., 1981, *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 791.

- [54] Glasfeld, E., Schimmel P., 1997, *Zinc-Dependent Trna Binding by A Peptide Element Within A Trna Synthetase*, *Biochemistry*, 36, 6739–6744.
- [55] Gohre, V., Paszkowski U., 2006, *Contribution of The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis to Heavy Metal Phytoremediation*. *Planta*, 223, 1115-1122.
- [56] Golomb, D., Ryan, D., Underhill, J., Wades, T., Zemba, S., 1997, *Atmospheric Deposition of Toxics Onto Massachusetts Bay-İ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, *Atmospheric Environment*, 31, 1361-1368.
- [57] Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., 1961, *Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose from Torulopsis magnoliae*, *Can J Chem*, 39, 846–855.
- [58] Gupta, A., 2016, *Studies on Oil Degradation Potential of Bacillus megaterium; Cloning and Expression of Oil Degradation Gene İnto E. coli*, *International Journal of Biotechnology and Allied Fields*, 4(5), 277-284.
- [59] Guzzo, J., Diorio D.C., Alexander D.C., DuBow M.S., 1999, *Toward Understanding Metal Stres in Environment Microbial Flora*, *Proceedings of the 8th International Symposiumon Microbial Ecology*, Canada, 277-284.
- [60] Gülcan, S., 2006, *Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye, 1-80.
- [61] Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Timur, S., 2009, *Metallerin Çevresel Etkileri –III*, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü.
- [62] Habashi, F., 1997, *Handbook of Extractive Metallurgy*, Wiley-Vch, Germany, 2, 892-922.
- [63] Harley, J.P. ve Prescott, L.M., 2002, *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 1-466.
- [64] Harnett, N.M., Gyles, C. L., 1984, *Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine Escherichia coli Strains*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 930-945.
- [65] Hasenekoğlu, İ., Yeşilyurt, S., 2001, *Mikrobiyoloji*, Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, 1-692.
- [66] Helbert, J.R., Brown, K.D., 1957, *Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids*, *Analytical Chemistry*, 29, 1464.
- [67] Hemalatha, S., Veeramanikanda, P., 2011, *Characterization of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petroleum Contaminated Sites*, *Journal of Environmental Protection*, 2, 243-254.

- [68] Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T.H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M., Berensmeier, S., 2008, *Development and Trends of Biosurfactant Analysis and Purification Using Rhamnolipids as an Example Anal Bioanal Chem*, 391, 1579–1590.
- [69] Hodge, J.E., Hofreiter, B.T., 1962, *Whistler RL, Wolfrom ML (Eds) Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol 1. Academic., New York*, 380.
- [70] Hornbuckle, K.C., Achman, D.R., Eisenreich, S. J., 1993, *Over-Water and Over-Land Polychlorinated Bipheyls in Green Bay, Lake Michigan*, Environmental Science and Technology, 5, 87-98.
- [71] Hunter, R. D., Ekunwe, S. I. N., Dodor, D. E., Hwang, H. M., Ekunwe, L., 2005, *Bacillus subtilis is a Potential Degradator of Pyrene and Benzo[A]Pyrene*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 2(2), 267–271.
- [72] Hündür, S., 2015, *Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin ve Küfrelerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-119.
- [73] İpek-Erbey, Y., 2015, *Bazı Curculonidae (Coleoptera) Familyası Bireylerinin Sindirim Sistemlerindeki Bakteri Florasının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 1-63.
- [74] Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T., 1991, *A Drop-Collapsing Test for Screening Surfactant Producing Microorganisms*, Journal of Microbiological Methods, 13, 271–279.
- [75] Jeremiason, J.D., Hornbuckle, K.C., Eisenreich, S.J., 1994, *PCBs in Lake Superior, 1978-1992: Decreases in Water Concentrations Reflect Loss by Volatilization*, Environmental Science and Technology, 28 (5), 903-914.
- [76] Ji, G. ve Silver, S., 1995, *Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concern*, J. Ind. Microbiol., 14, 61-168.
- [77] Johnson, M.K. ve Boese-Marrazzo, D., 1980, *Production and Properties of Heat-Stable Extracellular Hemolysin from Pseudomonas aeruginosa*, Infect Immun, 29, 1028-1033.
- [78] Kabadayı, F., 2003, *Sigara İzmarit Zifiri ve Isıl İşlem Görmüş Çeşitli Yiyeceklerdeki Bazı PAH'ların Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-82.
- [79] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2007, *Metallerin Çevresel Etkileri–I*, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü.
- [80] Kalkan, S.T., 2012, *PAH Analizine Yönelik Optik Sensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-73.

- [81] Kara, Y., 2005, *Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the Wastewater by Treated Nasturtium officinale*, International Journal of Environmental Science and Technology, 2, 63-67.
- [82] Karakaş, D., Pekey B., 2005, *Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of İzmit Bay*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Turkey, 85(7), 433–442.
- [83] Karakaya, A., 2003, *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Maruz Kalan Bir Grup İşçide Hücresel İmmün Fonksiyonların İncelenmesi*, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu.
- [84] Karaman, 2017, *Endüstriyel Atıklarla Kirlenmiş Alanlardan Petrol Türevi Hidrokarbonların Biyodegradasyonunu Yapan Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [85] Kawanishi, S., Inoue S., Yamamoto K., 1994, *Active Oxygen Species in DNA Damage Induced by Carcinogenic Metal Compounds*, Env. Health Persp., 102, 17- 20.
- [86] Kaya, T., 2008, *Çeşitli Endüstriyel Atık Maddelerde Bazı Mikroorganizmaların Yüzeysel Aktif Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-110.
- [87] Kılıç, S., 2015, *İstanbul Haliç'i Midye ve Sediment Örneklerinde PAH Düzeylerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 1-100.
- [88] Kocaer, F.O. ve Baskaya, H.S., 2003, *Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Uygulanan Teknolojiler*, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 8,121-131.
- [89] Kosaric, N., 2001, *Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation*, Food Technol. Biotechnol, 39 (4), 295–304.
- [90] Köşeler, M. D., 2008, *Büyükçekmece Gölü'nde Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) Konsantrasyonunun Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 1-74.
- [91] Krystofova, O., Shestivska V., Galiova M., Novotny K., Kaiser J., Zehnalek J., Babula P., Opatrilova R., Adam V., Kizek R., 2009, *Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions*, Sensors, 9, 5040-5058.
- [92] Kumar, G., Singla, R., Kumar, R., 2010, *Plasmid Associated Anthracene Degradation by Pseudomonas sp. Isolated from Filling Station Site*, Nature and Science, 8(4), 89-94.
- [93] Küce, P., 2010, *2,4-Dinitrotoluen'in Bir Arthrobacter chlorophenolicus Suşu ile Biyodegradasyonu ve İlgili Katabolik Genlerin Fish Tekniği ile Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 1-75.

- [94] Lang, S., Wagner, F., 1987, *Structure and Properties of Biosurfactants, Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 21-45.
- [95] Lehndorff, E., Schwark, L., 2004, *Biomonitoring of Air Quality in The Cologne Conurbation Using Pine Needles as A Passive Sampler - Part II: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)*, Atmospheric Environment, 38, 3793-3808.
- [96] Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J., Zhang, C., 2011, *Isolation and Characterization of A Novel Pyrene-Degrading Bacillus vallismortis Strain JY3A*, Science of The Total Environment, 409, 1994–2000.
- [97] Liu, Y., Borchert G.L., Donald S.P., Surazynski A., Hu C., Weydert C.J., Oberley L.W., Phang J.M., 2005, *MnSOD Inhibits Proline Oxidase-Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells*, Carcinogenesis, 26, 1335-1342.
- [98] Luch, A. and Baird, W.M., 2005, *Carcinogenic Effects Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Metabolic Activation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Imperial College Pres, USA, 19–96.
- [99] Manoli, E. and Samara C., 1999, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Natural Waters, Sources, Occurrence and Analysis*, Trends in Analytical Chemistry, 18(6), 417-428.
- [100] Marce, R.M. ve Borrull, F., 2000, *Solid Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Compounds*, Journal of Chromatography A, 885, 273–290.
- [101] Market, B., 1993, *Plant as Biomonitors, Indicators for Heavy Metals in The Terrestrial Environment*, VCH Publisher, Weinheim, 644.
- [102] Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D., 2004, *Simplified Procedures For The Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water, Sediments and Mussels*, Journal of Chromatography A, 1047, 181–188.
- [103] Mccall, K.A., Huang C., Fierke C.A., 2000, *Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes*, Journal of Nutrition, 130, 1437-1446.
- [104] McEntee, J.D., Woodrow, J.R., Quirk, A.V., 1986, *Investigation of Cadmium Resistance in Alcaligenes sp.*, Appi. Environ. Microbiol., 51, 515-520.
- [105] Mendez, V., Fuentes, S., Hernandez, M., Morgante, V., Gonzalez, M., Seeger, M., 2010, *Isolation of Hydrocarbon-Degrading Heavy-Metal-Resistant Bacteria from Crude Oil-Contaminated Soil in Central Chile*, Special Abstracts/ Journal of Biotechnology, 150, 1–576.
- [106] Mirdamadian, S.H., Emtiazi, G., Golabi, M.H., Ghanavati, H., 2010, *Biodegradation of Petroleum and Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Isolated from Petroleum-Contaminated Soil*, Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 1, 2-5.
- [107] Mudipalli, A., 2008, *Metals (Micro Nutrients or Toxicants) and Global Health*, Indian Journal of Medical Research, 128, 331–334.

- [108] Mujahid, T.Y., Wahab, A., Padhiar, S. H., Subhan, S. A., Baloch, M. N., Pirzada, Z. A., 2015, *Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petrol Contaminated Soil*, Journal of Basic & Applied Sciences, 11, 223-231.
- [109] Nasser Al-Kaabia, Mohammad A., Al-Ghoutia, Meriam, O., Mohammad, Y.M., Aziza A.N., Theis I.S., Noora A.S., Nabil, Z., 2018, *A MALDI-TOF study of bio-remediation in highly weathered oilcontaminated soils*, Journal of Petroleum Science and Engineering 168, 569–576.
- [110] NCCLS., 1997, *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Approved Standards M2 A6, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6th edn., NCCLS., Wayne, Pennsylvania.
- [111] Neu, T.R., Marshall, K.C., 1990, *Bacterial Polymers: Physicochemical Aspects of Their Interactions at Interfaces*. J. Biomater. Appl., 5, 107-33.
- [112] Nies, D.H., 1999, *Microbial Heavy-Metal Resistance*, Appl. Microbiol Biotechnol., 51, 730-750.
- [113] Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Pandian, S.K., 2011, *Assessment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment Bacteria*, Marine Environmental Research, 71, 283-294.
- [114] Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, M., 2004, *Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes*, Brazilian Journal of Microbiology, 35, 81-85.
- [115] Noordman, W.H., Brusseau, M.L., Janssen, D.B., 2000, *Adsorption of A Multicomponent Rhamnolipid Surfactant to Soil*, Environmental Science & Technology, 34, 832-838.
- [116] Orhan, F., 2013, *Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-201.
- [117] Ögütçü, H., Algur, Ö. F., 2014, *Yabani Baklagil Bitkilerinden, Mikrobiyal Gübre Olarak Kullanılan Rhizobium spp. Bakterilerinin İzolasyonu*, Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2(4), 181-184.
- [118] Önertürk, F., 1983, *Petrol ve Ekonomisi Üzerine*, Maliye Bakanlığı Yayınları, Ankara, 1-259.
- [119] Özdemir, S., 2008, *Ağır Metallerin Değişik Termofilik Bakterilerdeki Akümüasyonu, Biyosorpsiyonu ve Çevre Biyoteknolojisinde Kullanımı Üzerine Çalışmalar*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 1-198.
- [120] Parker, M.W., Blake, C.C., Barra, D., Bossa, F., Schimna, M.E., Bannister, W.H., Bannister, J.V., 1987, *Structural Identity Between The Iron and Manganesecontaining Superoxide Dismutases*, Protein Engineering, 1, 393-397.

- [121] Patowary, K., Kalita, M.C., Deka, S., 2015, *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Employing Biosurfactant Producing Pseudomonas aeruginosa KS3*, Indian Journal of Biotechnology, 14,208-215.
- [122] Perfumo, A., Banat, I., Canganella, F., Marchant, R., 2006, *Rhamnolipid Production by A Novel Thermophilic Hydrocarbon-Degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1*, Appl. Microbiol Biotechnol,72, 132-138.
- [123] Plaza, G. A., Zjawiony, I., Banat, I. M., 2006, *Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated and Bioremediated Soils*,Journal of Petroleum Science and Engineering, 50, 71-77.
- [124] Poeton, T., Stensel, H., Strand, S., 1999, *Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons By Marine Bacteria; Effect of Solid Phase on Degradation Kinetics*, Water Res., 33, 868-880.
- [125] Prakash, A., Bisht, S., Singh, J., Teotia, P., Kela, R., Kumar, V., 2014, *Biodegradation Potential of Petroleum Hydrocarbons by Bacteria and Mixed Bacterial Consortium Isolated from Contaminated Sites*, Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences, 38, 41-50.
- [126] Ramos, S.V., Ruiz, M.C.P., Casarrubias, M.L.B., Muñoz, J.V.T., Chavira, B. E.R., Moorillón, G.V.N., 2010, *Selection of Biosurfactant/Bioemulsifier-Producing Bacteria from Hydrocarboncontaminated Soil*,Brazilian Journal of Microbiology, 41, 668-675.
- [127] Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Oliveira, R., 2006, *Low-Cost Fermentative Medium for Biosurfactant Production by Probiotic Bacteria*,Biochemical Engineering Journal, 32, 135-142.
- [128] Rojas-Avelizapa, N.G., Rodriguez-Vazquez R., Enriquez-Villanueva F., Martinez-Cruz J., Poggi-Varaldo, H. M., 1999, *Transformer Oil Degradation by An Indigenous Microflora Isolated from A Contaminated Soil*,Resources, Conservation and Recycling, 27, 15-26.
- [129] Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001, *Biosurfactants and Oil Bioremediation*,Environ. Microbiol., 13, 249–252.
- [130] Rosenberg, E., Ron, E. Z., 1999, *High- and Low Molecular-Mass Microbial Surfactants*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 154-162.
- [131] Sabiha-Javied, M.T., Tufai M., Irfan N., 2009, *Heavy Metal Pollution from Phosphate Rock Used for The Production of Fertilizer in Pakistan*,Microchemical Journal, 91, 94-99.
- [132] Sanchez-Chardi, A., Ribeiro C.A.O., Nadal, J., 2009, *Metals in Liverand Kidneys and The Effects of Chronic Exposure to Pyrite Mine Pollution in The Shrew Crocidura russula Inhabiting The Protected Wetland of Donana*,Chemosphere, 76, 387-394.

- [133] Sandaa, R.A., Torsvik, V.L., Goksøy, J., 1992, *Transferable Drug Resistance in Bacteria from Fish Farm Sediments*, Can J Micro-Biol., 38, 1061-1065.
- [134] Sam Joy, Pattanathu K.S.M., Rahman B, Shashi Sharma, 2017, *Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments* Chemical Engineering Journal 317, 232–241
- [135] Saygılı, B., 2012, *Asenaften ve Floren Biyoparçalama Kapasitesindeki Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Parçalama Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-81.
- [136] Saylers, A.A., Shoemaker, N.B., 1994, *Broad Host Range Gene Transfer: Plasmids and Conjugative Transposons*, FEMS Microbiol Ecol, 15, 15-22.
- [137] Scott, J.R., 1992, *Sex and The Single Circle: Conjugative Transposition*, J. Bacteriol, 174, 6005-6010.
- [138] Sevgi, E., 2007, *Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-115.
- [139] Sevgi, E., Coral, G., Gizir, A. M., Sangün, M. K., 2010, *Investigation of Heavy Metal Resistance in Some Bacterial Strains Isolated from Industrial Soils*, Turk. J. Biol. (Tübitak), 34, 423-431.
- [140] Sevil, Y., 2003, *Dünyada ve Türkiyede Petrol*, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Ekonomik Araştırmalar ve Değerlendirme Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara.
- [141] Sezen, S., 2005, *Afşin-Elbistan Linyit Madeninden Linyit İyileştirme Teknolojisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-90.
- [142] Shulga, A., Karpenko, E., Vildanova-Martsishin, R., Turovsky, A., Soltys, M., 1999, *Biosurfactant Enhanced Remediation of Oil-Contaminated Enviroments*, Adsorpt. Sci. Technol., 18, 171–176.
- [143] Siegmund, I., Wagner, F., 1991, *New Method for Detecting Rhamnolipids Excreted by Pseudomonas Species During Growth on Mineral Agar*, Biotechnol. Tech., 5, 265-268.
- [144] Silver, S., Phung, L.T., 1996, *Bacterial Heavy Metals Resistance: New Surprises*, Annu. Rev. Microbiol., 50, 753-789.
- [145] Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P., 2006, *Surfactants in Microbiology and Biotechnology*, Part 2, Application Aspects.
- [146] Singh, S.N., Kumari, B., Upadhyay, S.U., Mishra, S., Kumar, D., 2013, *Bacterial Degradation of Pyrene in Minimal Salt Medium Mediated by Catechol Dioxygenases:*

Enzyme Purification and Molecular Size Determination, Bioresource Technology, 133, 293–300.

[147] Sriram, M.I., Gayathiri, S., Gnanaselvi, U., Jenifer, P.S., Jenifer, S.M., Gurunathan, S., 2011, *Novel Lipopeptide Biosurfactant Produced by Hydrocarbon Degrading and Heavy Metal Tolerant Bacterium Escherichia fergusonii Klu01 as A Potential Tool for Bioremediation*, Bioresource Technology, 102, 9291–9295.

[148] Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989, *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, FenFakültesi, Teksirler Serisi No:55, İzmir, 260.

[149] Taşdemir, Y., 1997, *Modification and Evaluation of a Water Surface Sampler to Investigate the Deposition and Air Water Exchange of Polychlorinated Bipheyls (PCBs)*, Doktora Tezi, Illinois Institute of Technology.

[150] Temiz, A., 1994, *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 266.

[151] Temiz, A., 2010, *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hatipoğlu Yayıncılık, Ankara, 277.

[152] Torabi, S.F., 2013, *Ağır Metal Dirençli Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-81.

[153] Tuğrul, T., Cansunar, E., 2005, *Detecting Surfactant-Producing Microorganisms by The Drop Collapse Test*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 851–853.

[154] Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T., 1968, *Fermentation of Long-Chain Compounds by Torulopsis apicola IV. Products From Esters And Hydrocarbons with 14 and 15 Carbon Atoms and from Methyl Palmitolate*, Can J Chem, 46, 1523-1528.

[155] Uysal, A., Türkman, A., 2004, *Klorofenollü Bileşiklerin Ayrışabilirliğinin Biosürfektan Kullanımı ile Hızlandırılması*, SKKD, 14,23-30.

[156] Valsala, H., Prakash, P., Elavarasi, V., Pugazhendhi, A., Thamaraiselvi, K., 2014, *Isolation of Staphylococcus nepalensis for Degradation of Pyrene from Diesel Contaminated Site*, International Journal of Computer Applications (IJCA), 975 – 8887.

[157] Vural, H., 1993, *Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler*, Çevre Dergisi, 8, 3-8.

[158] Wackett, L.P., Dodge, A.G., Ellis L.B.M., 2004, *Microbial Genomics and The Periodic Table*, Appl Environ Microbiol, 70, 647-655.

[159] Wang, H., Lou, J., Gu, H., Luo, X., Yang, L., Wu, L., Liu, Y., Wu, W., Xu, J., 2016, *Efficient Biodegradation of Phenanthrene by A Novel Strain Massilia sp. WF1 Isolated from A PAH Contaminated Soil*, Environ Sci Pollut Res, 23, 13378–13388.

- [160] Wang, X. Y., Li, Q. B., Luo, Y. M., Ding, Q., Xi, L. M., Ma, J. M., Cheng, C. L., 2010, *Characteristics and Sources of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Shanghai*, Environmental Monitoring and Assessment, China, 165(1-4), 295–305.
- [161] Wcislo, E., 1998, *Soil Contamination with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Poland - A Review*, Polish Journal of Environmental Studies, 7(5), 267–272.
- [162] Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E., Kleiner, J., 2006, *Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food and The Environment Needed for New Food Legislation in The European Union*, Trac - Trends in Analytical Chemistry, 25(7), 716–725.
- [163] WHO, 1998, *Selected Non Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Environmental Health Criteria, International Programme on Chemical Safety*, World Health Organisation, Geneva, 202.
- [164] Wiener, P., Müller-Graf, C., Barcus, V., 2003, *Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research*, Reviews in Undergraduate Research, 2, 1-6.
- [165] World Health Organization, 2000, *Air Quality Guidelines –Second Edition, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 288.
- [166] Yalçın, E., 2008, *Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosürefektan Eldesi ve Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması*, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 1-136.
- [167] Yılmaz, F., 2008, *Süt Fabrikası Atık Sularından Mikroorganizma İzolasyonu ve Biyosürefektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 1-120.
- [168] Yunker, M.B., Macdonald, R.W., 2003, *Petroleum Biomarker Sources in Suspended Particulate Matter and Sediments from The Fraser River Basin and Strait of Georgia*, Organic Geochemistry, Canada, 34, 1525– 1541.
- [169] Yücel, D., 2010, *Sakarya İli Sanayi Bölgesinin Yakın Çevresinde ve Şehir Merkezinde Oluşturduğu Atmosferik Ağır Metal Birikim Seviyelerinin Bir Biyomonitör Karayosunu (Hypnum cupressiforme Hedw.) ve Toprak Örnekleri Üzerinden Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, 1-103.
- [170] Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M.D.C., Cortés-Espinosa, D.V., 2014, *Isolation and Selection of A Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils*, Water Air Soil Pollut, 225, 1826-1844.
- [171] Zhang, Y., Miller, R.M., 1992, *Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant)*, Appl. Environ. Microbiol, 58, 3276-3282.

[172] Zhang, Y, Miller, R.M., 1994, *Effect of A Pseudomonas Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2101-2106.

[173] Zhang, J.L.G., Li, X.D., Qi, S.H., Liu, G.Q., Peng, X. Z., 2006, *Source Seasonality of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Subtropical City*, *Science of The Total Environment*, Guangzhou, South China, 355(1-3), 145–155.

[174] Zhao, Z., Wong, J. W. C., 2009, *Biosurfactants from Acinetobacter calcoaceticus Bu03 Enhance The Solubility and Biodegradation of Phenanthrene*, *Environmental Technology*, 30(3), 291-299.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ferhat KANTAR
Doğum Yeri	Çorum
Doğum Tarihi	18.09.2074
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05465471933
E-Posta Adresi	kantar.f@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Selçuk Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	1999

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Yüksek Lisans
Mezuniyet Tarihi	2019

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	Program Adı
Mezuniyet Tarihi	

Makale ve Bildiriler	
<i>Uluslararası Hakemli Dergilerde Makaleler</i>	
<p>1. Oğutcu, H., Kantar, F., Karaman, M.Y.E., 2017. Heavy Metal Resistance of Microorganisms from Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils Located in Mersin, Turkey. Journal of Biotechnology Volume 256, S61-S62.</p>	
<p>2. Oğutcu, H., Karaman, M.Y.E., Kantar, F., Avsar, H., Altundas, A., 2016. Isolation and Heavy Metal Resistance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Contaminated Areas with Industrial Wastes. International Journal of</p>	

Uluslararası ve Ulusal Konferans ve Sempozyumlar

1. Ogutcu, H., Basyigit, A., Karaman, M.Y. E., Avsar, H., **Kantar, F.**, 2016. Isolation and Phenotypic Characterization of Rhizobium Spp. Bacteria of Wild Leguminous Plants Collected from Kirsehir, 8th International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICCEES'2016), Jan. 12-13, Dubai (UAE).

2. Ogutcu, H., Karaman, M.Y.E., **Kantar, F.**, Avsar, H., Altundas, A., 2016. Isolation and Heavy Metal Resistance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Contaminated Areas with Industrial Wastes, ISER – 3rd International Conference on Agricultural and Biological Science (ICABS), January 31th, Lisbon, Portugal.

3. Ogutcu, H., Sener, O., Hayvalı, Z., **Kantar, F.**, 2016. Synthesis and Investigation of Antimicrobial Activity Against A Pathogenic Strains of New Crown Ethers, International Conference on Biological Sciences (ICBS), October 21-23, Konya, Turkey.

4. Ogutcu, H., Karaman, M. Y. E., Avsar H., **Kantar, F.**, Karadayı, M., Gulluce, M., 2017. Characterization And Isolation of Bacteria That Biodegrade Hydrocarbons Derived From Petroleum In Areas Contaminated With Industrial Waste, International DNA Day and Genome Congress, April 24-28, Kırşehir, Turkey.

5. Ogutcu, H., **Kantar, F.**, Karaman, M. Y. E., Algur, Ö. F., 2017. Isolation and Molecular Characterisation of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petroleum-Contaminated Soils Located In Mersin, Turkey, International DNA Day and Genome Congress, April 24-28, Kırşehir, Turkey.

6. Kocoglu, S., Ogutcu, H., Hayvalı, Z., **Kantar, F.**, 2017. Antimicrobial Activities Against a Pathogenic Strains of New 3- Hydroxypyridine Substituted Crown Ether

Ligand and Complexes, International DNA Day and Genome Congress, April 24-28, Kırşehir, Turkey.

7.Kantar, F., Ögütçü, H., Karaman., M.Y.E., Avşar, H., Erbey, Y., 2015. Petrol ile Kontamine Olmuş Topraklardan Petrol Hidrokarbonlarını Degrade Edebilen Bakterilerin İzolasyonu, Ekoloji Sempozyumu, 6-9 Mayıs, Sinop.

8.Ögütçü, H., Avşar, H., Başığit, A., Erbey, Y., Karaman., M.Y.E., **Kantar, F.**, 2015. Yabani Baklagil Bitkilerinden İzole Edilen *Rhizobium* sp. Türlerinin PHB (Poli- β - hidroksibütirat) Üretim Potansiyellerinin Araştırılması, Ekoloji Sempozyumu, 6-9 Mayıs, Sinop.

9. Karaman., M.Y.E., Ögütçü, H.,**Kantar, F.**, Avşar, H., Erbey, Y., 2015. Endüstriyel Atıklarla Kirlenmiş Alanlardan Petrol Türevi Hidrokarbonların Biyodegradasyonunu Yapan Bakterilerin İzolasyonu, Ekoloji Sempozyumu, 6-9 Mayıs, Sinop.

10.Ögütçü H., Karaman, M.Y. E., **Kantar F.**, Güllüce M., Karadayı M., Altundaş A., 2016. Krom Fabrikası Çevresinden Alınan Toprak Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 5-9 Eylül, Gaziantep.

11. Ögütçü, H.,**Kantar, F.**, Karaman, M.Y.E., 2016. Poliaromatik Hidrokarbonlar ile Kontamine Olmuş Topraklardan (Mersin, Kazanlı) Bakterilerin İzolasyonu ve Ağır Metal Dirençliliklerinin Belirlenmesi,3. Ulusal Çevre Kongresi, 24-28 Eylül, Marmaris, Muğla.