

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MARMARA DENİZİ VE KARADENİZ'DEN
İZOLE EDİLEN BAKTERİLER YARDIMIYLA
PETROL VE PETROL TÜREVLERİNİN
BİYOREMEDİASYONUNA YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

**SELÇUK TAŞDAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2015**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA DENİZİ VE KARADENİZ'DEN
İZOLE EDİLEN BAKTERİLER YARDIMIYLA
PETROL VE PETROL TÜREVLERİNİN
BİYOREMEDİASYONUNA
YÖNELİK ÇALIŞMALAR

SELÇUK TAŞDAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. YOSUN MATER

GEBZE
2015

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

STUDIES ON THE BIOREMEDIATION OF
OIL AND OIL DERIVATIVES
USING THE BACTERIA
ON THE MARMARA AND THE BLACK SEAS

SELÇUK TAŞDAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. YOSUN MATER

GEBZE
2015



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/06/2015 tarih ve 2015/41 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/10/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Selçuk TAŞDAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER

ÜYE

: Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Kirletici özelliklerinden dolayı canlılığı önemli ölçüde etkileyen, ham petrol ve türevlerinin doğal kaynaklardan uzaklaştırılması çok önemlidir. Son yıllarda bu amaçla yapılan mikrobiyoloji çalışmaları arasında, bakteriler vasıtasıyla kirleticilerin ortamlardan uzaklaştırılması ve/veya daha az toksik/toksik olmayan formlara dönüştürülmesi yani “Biyoremediasyon” çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır.

Bu çalışmada, Marmara Denizi ve Karadeniz'den 2005-2008 yılları arasında izole edilmiş 698 bakteri arasından literatürlere bağlı olarak seçilmiş izolatların petrol ve petrol türevlerini parçalama yeteneklerinin taranması ve bu yeteneğe sahip bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, ilk olarak, mikropalak testiyle küçük ölçeklerde ve farklı konsantrasyonlarda ham petrole maruz bırakılarak izolatların minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) tespit edilmiştir. Mikropalak testiyle petrol parçaladığı belirlenen ve seçilen 7 izolat, daha büyük ölçeklerde ve yine farklı konsantrasyonlarda ham petrole 30 gün boyunca inkübe edilmiş, petrol tabakası kalınlığı milimetrik olarak her gün ölçülmüş ve görülen fiziksel ve morfolojik değişiklikler ile birlikte not edilmiştir. 30 gün sonunda deneme ortamları filtrasyon sistemleri yardımıyla süzölmüş, bakterilerden arındırılan deneme sıvıları Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi (GC-MS) analizine alınmıştır. Çalışılan deneme ortamlarının tamamında, ham petrolün alkan birimlerinden daha küçük olan ve ham petrolde bulunmayan, Kuinolin (C₉H₇N) adı verilen heterosiklik aromatik organik bir azotlu birimin varlığı tespit edilmiştir. Membran filtrasyon işleminde kullanılan selüloz filtreler üzerinde kalan bakteriler yeniden uygun besiyerlerine ekilerek bakterilerin canlılığı ve geri kazanımı sağlanmıştır. Çalışmanın son aşamasında 7 izolat tür düzeyinde tanımlanma için VITEK 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Sistemi ile test edilmiştir. Bunlardan 5 tanesi *Serratia plymuthica*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Staphylococcus lentus* ve *Staphylococcus sciuri* olarak tanımlanmıştır. İki tanesi ise tanımlanamamış ve yeni tür olması olasılığını düşündürmüştür.

Bu çalışma genel olarak, “Biyoremediasyon” denemeleri adına ölkemizde yapılan özgün ve öncü çalışmalardan birini oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoremediasyon, Deniz Mikrobiyolojisi, Petrol Kirliliği.

SUMMARY

Decontamination of oil and oil derivatives, which cause environmental pollution and effect biological equilibrium dramatically, has also great significance for natural resources and applied microbiology. Removal or be converted to less toxic or non-toxic different forms of oil hydrocarbons via bacteria and known as "Bioremediation" has become an important issue.

In this study, the aim was to scan crude oil and oil derivatives degradation ability of selected isolates through 698 bacteria were isolated between 2005-2008 from Sea of Marmara and Black Sea and identification of these degradative bacteria at the species level. In this context, firstly, by testing crude oil at different concentrations on the isolates, their minimum inhibitory concentrations are detected. Oil degrading 7 isolates, which determined and selected with microplate test, are incubated for 30 days at different concentrations and bigger scales in crude oil and necessary measurements are recorded. After that 30 days period, samples are filtrated through membrane filtration system, obtained liquids are prepared for gas chromatography-mass spectrometry analysis. Degraded hydrocarbon compound, Quinoline is defined with GC-MS analysis in all isolates. Remaining bacteria on cellulose filters that are used for membrane filtration are cultivated again appropriate medium for recovery of bacteria. In the last phase of our studies, bacteria were taken at the species level to be defined by the VITEK 2 Compact Automatic Identification System. Five of the seven bacterial samples have been identified as *Serratia plymuthica*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Staphylococcus lentus* and *Staphylococcus sciuri* by VITEK 2 compact automatic identification system. The remaining two of them could not be identified of species.

Our thesis study is used to with the source and the methods, on the "Bioremediation" conducted experiments on behalf of our country is one of the original and pioneering work.

Key Words: Bioremediation, Marine Microbiology, Oil Pollution.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin oluşturulmasında, deneylerimin düzenlenmesi ve gerçekleştirilmesinde hep yanımda olan ve benimle beraber çalışan değerli hocam Yrd. Doç Dr. Yosun MATER' e saygı ile teşekkür ediyorum.

Deney çalışmalarında kullanılan ham petrol numunesinin teminini sağlayan Tüpraş-İzmit Rafinerisi'ne ve VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Cihazı'nın kullanımı konusunda gösterdikleri anlayış ve ilgiden dolayı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Personeli'ne teşekkür ediyorum.

Gaz kromatografisi ve Kütle spektrometresi (GC-MS) analizlerinde yardımlarını ve yol göstericiliğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Pınar ERGENEKON'a ve GTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü Enstrümantal Analiz Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Gerek lisans gerekse de yüksek lisans eğitimimde maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme sevgi ile teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması GTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2012-A-02 no'lu BAP projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Petrol ve Petrol Türevleri ile Çevre İlişkisi	1
1.2. Tez Çalışmasının Amacı, Bilime Katkısı ve İçeriği	10
2. GENEL KISIMLAR	12
2.1. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)	13
2.1.1. Petrolün Biyodegradasyonu	18
2.1.1.1 Hidrokarbonların Oksidasyonu	20
3. GEREÇLER	22
3.1. Kullanılan Bakteri İzolatları	22
3.2. Kullanılan Ham Petrol Numunesi	23
3.3. Kimyasal Maddeler	23
3.4. Besiyerleri	23
3.5. Cihaz ve Diğer Malzemeler	23
4. YÖNTEMLER	25
4.1. Kullanılacak İzolatların Seçilmesi	25
4.2. Seçilen İzolatların Üretimi	25
4.3. Seçilen İzolatların Ham Petrol Toleranslarının İrdelenmesi	26
4.4. Seçilen İzolatların Stoklarının Atılması	27
4.5. MIC Testi Mantığı ile Seçilen İzolatların Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Kontrolü	27
4.6. Belirlenen İzolatların Petrol Parçalama Testi	28

4. 7. Büyük Ölçekli Çalışmanın Sonlandırılması, Bakterilerin Deneme Ortamından Uzaklaştırılmaları ve Çalışma Sonrası Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesi	32
4. 8. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizleri	33
4. 9. İzolatların VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemiyle Tür Düzeyinde Tanımlanması	34
5. BULGULAR	38
5. 1. Ham Petrolde Yaşayabilen İzolatların Mikroplaklarda Seçilimine Ait Bulgular	38
5. 2. Seçilen İzolatların Büyük Ölçekli Çalışma Öncesi Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesine Ait Bulgular	40
5. 3. Seçilen İzolatlarla Gerçekleştirilen Büyük Ölçekli Çalışmaya Ait Bulgular	44
5. 4. Seçilen İzolatların Büyük Ölçekli Çalışma Sonrası Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesine Ait Bulgular	51
5. 5. Büyük Ölçekli Çalışmada Kullanılan İzolatların GC-MS Analizlerine Ait Bulgular	55
5. 6. Çalışmada Kullanılan İzolatların VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanmasına Ait Bulgular	59
6. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	: Celcius derece
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
km	: Kilometre
ml	: Mililitre
rpm	: Dakikadaki dönüş/devir sayısı
UV	: Ultraviyole
C	: Karbon
CH ₄	: Metan
C ₆ H ₆	: Benzen
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
Fe ²⁺	: Demir
H	: Hidrojen
H ₂ S	: Hidrojen sülfid
N	: Azot
Ni	: Nikel
NO ₃ ⁻	: Nitrat
O	: Oksijen
S	: Kükürt
SO ₃ ²⁻	: Sülfid
BaP	: Benzo[a]piren
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
ITOPF	: Uluslararası Tanker Sahipleri Kirlilik Federasyonu
İK	: İzmit Körfezi
K	: Karadeniz
LPG	: Likit Petrol Gazı
M	: Marmara Denizi

MIC	:	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
OD	:	Optik yoğunluk
PAH	:	Poliaromatik hidrokarbonlar
TSA	:	Triptik Soy Agar
TSB	:	Triptik Soy Broth
TÜDAV	:	Türk Deniz Araştırmaları Vakfı
US-EPA	:	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Hidrokarbonların sınıflandırılması.	3
1.2: Aromatik hidrokarbonların halka yapısı.	4
1.3: Hidrokarbonların deniz organizmaları üzerindeki etkisi.	8
2.1: Petrol dökülmeleriyle deniz ortamında oluşan süreçler.	12
2.2: Organik kirleticilerin parçalanması.	18
2.3: Mikrobiyal hidrokarbon kullanımı alternatifleri.	19
2.4: Monooksijenaz aktivitesi.	20
2.5: Aromatik bileşiklerin katabolizmasında oksijenazların rolü.	21
3.1: Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonların dağılımı.	22
4.1: Literatürlerdeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) testi mantığı ile mikroplaklarda gerçekleştirilen ham petrolde yaşayabilen izolatların seçilimi.	27
4.2: Büyük ölçekli çalışma için %5, %25, %50 ve %75 ham petrol konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin sadece besiyeri ve ham petrol içeren (-) kontrol erlenleri ile görüntüleri.	30
4.3: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi.	36
4.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile İzolatların Tanımlanmasında İzlenen Basamaklar.	37
5.1: Farklı mikroplaklarda gerçekleştirilmiş ham petrol içinde yaşayabilen izolatların seçilimi ve (→) işaretli seçilmiş örneklerin görüntüsü.	40
5.2: İzolat İK1-81 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	44
5.3: İzolat İK2-114 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	45
5.4: İzolat İK2-140 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	46
5.5: İzolat İK3-331 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	47

5.6:	İzolat İK3-33 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	48
5.7:	İzolat K-A23 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	49
5.8:	İzolat K-A87 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.	50

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: US-EPA tarafından öncelikli kirletici olarak değerlendirilen 16 PAH bileşigi.	5
1.2: İstanbul Boğazi'nda görülen önemli kazalar ve dökülen petrol miktarları.	7
2.1: Petrol kirliliğinin uzaklaştırılmasında dünyada kullanılan yöntemler	14
2.2: Petrol degradasyonuna katılan bakteri ve funguslardan başlıca örnekler.	15
2.3: Biyoremediasyon yönteminin avantaj ve dezavantajları.	17
4.1: Seçilen izolatlar.	25
4.2: Ham petrolün 6 farklı dilüsyonu.	26
4.3: Deney düzeneklerinin kurulması.	29
4.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sisteminin tanımlama güvenilirliği tablosu.	35
5.1: Çalışmada kullanılmak üzere seçilen bakteri örneklerine uygulanan Gram boyamayı takiben, mikroskop yardımıyla elde edilen bazı morfolojik ve mikrobiyolojik özelliklere ait sonuçlar.	40
5.2: Çalışmada kullanılmak üzere seçilen bakteri örneklerinin 30 günlük ham petrolde yaşatılma denemesini takiben uygulanan Gram boyamaya ve mikroskopik incelemeleri ile elde edilen bazı morfolojik ve mikrobiyolojik özelliklere ait sonuçlar.	52
5.3: Ham petrolün deniz bakterileri ile biyoremediasyonuna yönelik büyük ölçekli çalışma sonucunda elde edilen süzüntülerinin GC-MScihazı kullanılarak, kapiler kolon (HP-5ms, 15 m, 0.25 mm, 0.25 µm) yardımıyla, farklı fırınlama sıcaklıkları ve süreleri ile analiz sonuçları.	56
5.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemine göre tür seviyesinde tanımlanmış izolatlar.	60

1. GİRİŞ

Çağımızın en büyük sorunlarından biri çevre kirliliğidir. Çevre kirliliği; canlıları tehdit eden, cansız varlıkların niteliğini değiştiren, zararlı maddelerin hava, su ve toprak gibi alıcı ortamlara yoğun bir biçimde karışması olayıdır. Bu olay sonucunda alıcı ortamların fiziksel, kimyasal ya da biyolojik özellikleri değişmekte ve doğal dengeleri bozulmaktadır. Hava kirliliği, su kirliliği, toprak kirliliği, gürültü kirliliği ve nükleer kirlilik, çevre kirliliği çeşitlerine örnek olarak verilebilir. Doğal hayata zarar vermesi nedeniyle, çevre kirliliği dünyada ve ülkemizde çözümü aranan önemli bir sorundur [Ceyhan ve Esmeray, 2012].

Su kürenin (hidrosfer) başlıca bölümleri içerisinde denizler önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan araştırmalara göre beşeri faaliyetler sonucu denizlerin giderek kirlenmekte olduğu ortaya çıkmıştır. Denizyolu ulaşımı, ulusal savunma faaliyetleri, balıkçılık, deniz ürünleri yetiştiriciliği, turizm, sualtı sondajı, kıyı endüstrileri gibi faaliyetler değişen oranlarda katı, sıvı ya da gaz halinde mineral, organik, kimyasal ve radyoaktif döküntüye sebep olurlar. Deniz kirliliği; canlılara ve deniz yaşamına zarar veren, insan sağlığına tehlike oluşturan, balıkçılık ve diğer yasal deniz kullanım şekilleri gibi deniz faaliyetlerini engelleyen, deniz suyu kalitesini bozan ve denizin sağladığı imkânları kısıtlayan maddelerin ya da enerjinin insanlar tarafından dolaylı olarak ya da doğrudan deniz ortamına sokulmasıdır [Web 1, 2015]. Birçok zararlı organik, inorganik, radyoaktif ve/veya biyolojik madde ve materyal deniz kirliliğine neden olmaktadır [Aras, 2000]. Bunların en önemlilerinden birisi petrol ve türevlerinin oluşturduğu kirliliktir [Hun, 1997], [Ceyhan ve Esmeray, 2012].

1.1. Petrol ve Petrol Türevleri ile Çevre İlişkisi

İnsanlığın en önemli ve vazgeçilmez gereksinimlerinden birisi enerjidir. Enerjinin üretilmesinde kullanılan kaynakların başında fosil yakıtlar gelmektedir. Fosil yakıtların başlıcaları; petrol, kömür ve doğal gazdır [DPT, 2001]. Dünyada birincil enerji tüketimini oluşturan üç fosil yakıt; petrol, doğalgaz ve kömür; enerji eldesinde %90'a ulaşan bir paya sahiptir. Sadece petrolün enerji tüketimindeki payı %36,84'tür. Enerji üretimini sağlayan kaynakların kullanımı sıralamasında petrolü,

kömür %27.17, doğalgaz %23.69, hidroelektrik %6.19, nükleer %6.10 oranlarında izlemektedir [DPT, 2006].

Petrol ve petrol türevleri, endüstriyel ve günlük hayatta enerji ihtiyacı için temel kaynaklardan biri olmanın yanında plastikler, boyalar ve kozmetik ürünler gibi pek çok kimyasal ürünün de ham maddesi olarak kullanılmaktadır [Harayama et al., 1999]. Yirminci yüzyılın sonlarından itibaren artan dünya nüfusunun enerji ihtiyaçlarının karşılanması için dünyanın mevcut kaynakları hızla tüketilmiş ve bu nedenle çok geniş bir kullanım yelpazesine sahip petrolün tüketimi de katlanarak artmıştır. Bu noktada insanoğlunun karşılaştığı en büyük sıkıntı, tüketim alanındaki bu artışa bağlı olarak petrol ve petrol ürünlerinin kullanımı esnasında ortaya çıkan atıkların geri kazanımının oldukça zor olması nedeniyle hava, su ve toprak gibi hayati doğal kaynakların hızla kirlenmesine neden olmasıdır. Petrol ve petrokimyasal türevlerinin atıkları çevre kirliliğinde dünyadaki en ciddi problemlerdendir. Sağlık ve ekosistem açısından tehlike oluşturmaktadır [Öztürk vd., 2004].

• Petrolün Kimyasal Yapısı

Genel olarak petrolün, milyonlarca yıl önce yaşamış bitki ve hayvan kalıntılarının denizlerde biriken çökelti katmanları içerisinde, oksijensiz bir ortamda çürüyerek, belirli bir basınç ve sıcaklık altında ayrışmasından oluştuğu varsayılmaktadır [DPT, 2006].

Petrol, temelde sadece karbon ve hidrojen elementlerinden oluşan hidrokarbonlardan meydana gelir. Bununla beraber, bu iki element çok çeşitli ve karmaşık molekül yapıları oluştururlar. Yani, petrolün her zaman sabit bir kimyevî bileşimi yoktur. Çıkarıldığı bölgeye göre kimyasal açıdan değişiklik gösterebilir. Buna göre elde edilen petrol yapısında hidrokarbonların yanı sıra, daha düşük oranlarda, ancak malzemenin yapısını etkileyebilecek kadar da etkili miktarlarda azot, kükürt, oksijen ve metal elementleri (vanadyum, nikel, vb.) bulundurur. Petrol içerisinde elementlerin yüzdeler dağılımı kabaca şu şekilde verilmektedir:

- Karbon (C): % 83,0- 87,0
- Hidrojen (H): % 10,0- 14,0
- Azot (N): % 0,1- 2,0
- Oksijen (O): % 0,05- 1,50

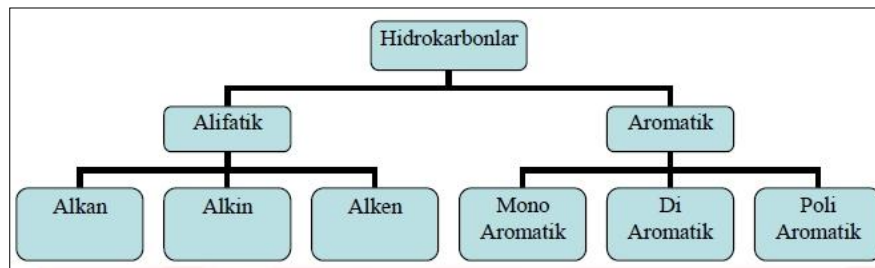
- Kükürt (S): % 0,05- 6,0
- Nikel (Ni), Vanadyum (V): % 0,1 (<1000 ppm)

şeklinde petrolün yapısında bulunur [Uysal, 2006].

Hidrokarbonların yanı sıra petrolün yapısında düşük içerikte bulunan hetero-bileşikler (kükürt, azot, oksijen ve metaller) çoğu zaman zararlı etkilerinden dolayı rafinasyon sırasında uzaklaştırılırlar. Kükürt hem zehirleyici özelliği, hem de araba motorlarında korozif etkileri nedeniyle petrolde istenmeyen bir elementtir. Ayrıca petrolün yanması ile yapısındaki azot ve kükürt bileşikleri, doğaya zararlı nitrik ve sülfürik aside dönüşür ve bu asitler de asit yağmurlarına sebep olur [Uysal, 2006], [Web 2, 2013].

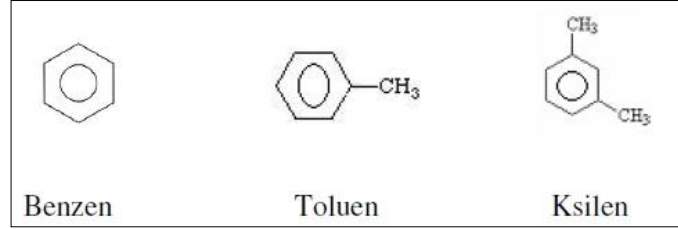
Petrol denilince benzin, gazyağı veya dizel gibi belirli bir yakıt değil; genellikle doğal halde bulunan ve yer altından çıkartılan ham petrol kastedilmektedir [Turgay, 2005]. Yerküre içerisinde organik materyalin başkalaşım geçirmesiyle meydana gelmiş ve gözenekli kayalar içerisinde depolanmış sıvı haldeki hidrokarbonlara “ham petrol” adı verilir. Rafine edilmiş petrolden ayırt etmek için ham petrol diye isimlendirilen sıvı petrol, ticari açıdan en önemli olanıdır. Ham petrol rafinelerde bileşenlerine ayrıştırılarak, günlük yaşamda kullanılan pek çok madde ve akaryakıt elde edilmektedir [Uysal, 2006].

Petrol rezervlerinden çıkan ham petrolün içinde binlerce farklı tip hidrokarbon bulunmaktadır. Hidrokarbonlar ham petrolün %55-98'ini oluşturmaktadır. Genel formülleri $[C_xH_y]$ 'dir ve en hafif üyesi metan (CH_4) gazıdır. Petroldeki hidrokarbonlar aşağıda resmedildiği alifatik ve aromatik olmak üzere iki ana gruba ayrılır [Erol, 2010].



Şekil 1.1: Hidrokarbonların sınıflandırılması.

Bünyesinde bir ya da daha fazla benzen halkası bulunduran halka yapılı bileşiklere “Aromatik Hidrokarbon” adı verilir [Uysal, 2006]. En basit üyesi benzen [C_6H_6]’dir. Benzen, toluen ve ksilen gibi monoaromatik hidrokarbonlar, Şekil 1.2’de görüldüğü üzere bir tane aromatik halka içerirler [Nesimigil, 2006].



Şekil 1.2: Aromatik hidrokarbonların halka yapısı.

Poliaromatik Hidrokarbonlar (PAH), petrol bileşenlerinin en inatçısı olup 2 veya daha fazla benzen halkası içeren hidrofobik bileşiklerdir. Hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlükleri oldukça azdır. Toksik, mutajenik ve kanserojenik oldukları bilinmektedir. Doğal ya da antropojenik kaynaklı olarak organik maddelerin tam yanmaması sonucu oluşurlar. Doğal kaynaklı oluşumları orman yangınları ve volkanik patlamalar sonucu gerçekleşirken, antropojenik kaynaklı oluşumları ise petrol ve kömür gibi fosil yakıtların ve odun gibi katı yakıtların ısınma ve/veya enerji amaçlı kullanılması sonucu meydana gelmektedir. PAH’lar belirli bir amaç için üretilmemektedir. Kömür, fuel oil, akaryakıt, odun gibi maddelerden enerji elde edilirken yanma ya da tam yanamama sonucu oluştukları için atmosferde sürekli bulunurlar. Yağmur ve erozyon gibi doğa olayları ile karaya, denize ve sedimentlere ulaşırlar. Ancak araştırma amaçlı üretilen PAH’lar da vardır. Bunlar sağlık alanında, pestisit, boya ve plastik yapımında kullanılmaktadır [Alver vd., 2012].

Doğada 100’den fazla PAH bileşiğinin bulunduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir [Falco et al., 2003], [Moret et al., 2010], [Martorell et al., 2010]. Ancak Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi (United States Environmental Protection Agency, US-EPA) tarafından bunların 16 tanesi toksik, mutajenik veya kanserojenik potansiyellerinden dolayı öncelikli kirleticiler arasında sayılmıştır ve Tablo 1.1’de sıralanmıştır [US-EPA, 1999].

Tablo 1.1: US-EPA tarafından öncelikli kirletici olarak değerlendirilen 16 PAH bileşiği.

* Antrasen (An)	* Dibenzo[a,h]antrasen (DahA)
* Asenaften (Ane)	* Fenantren (Phe)
* Asenaftelen (Anp)	* Floranten (Flu)
* Benzo[a]antrasen (BaA)	* Floren (Flr)
* Benzo[a]piren (BaP)	* İndeno[1,2,3-cd]piren (IcdP)
* Benzo[b]floranten (BbF)	* Krisen (Chr)
* Benzo[g,h,i]perilen (BghiPy)	* Naftalin (Np)
* Benzo[k]floranten (BkF)	* Piren (Py)

PAH bileşikleri içerisinde en tehlikelisi Benzo[a]piren (BaP)'dir. BaP, DNA gibi hücrel makromoleküllerle bağ kurarak canlı bünyesinde kanserojenik ve mutajenik etki gösterir [Mastral et al., 2003]. Yine, BaP kanser araştırmalarında model bileşik olarak kabul edilmiştir [Alver vd., 2012]. Sucul canlılar üzerine yapılan bir çok araştırmada, canlıların dokularında PAH'ların, özellikle de BaP'in mevcut olduğu gösterilmiştir [Bedding et al., 1985]. Yapılan bir diğer bazı araştırmada da Kanada ve ABD'nin Pasifik sahili boyunca deniz midyelerindeki BaP konsantrasyonu ile endüstrileşme, kentleşme ve sahil suyunun rekreasyonel kullanımı arasında oldukça sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [Üstün vd., 2003].

• Petrol ve Deniz Kirliliği

Dünyadaki petrol kaynaklarının büyük bir hızla tükeneceği ve en iyimser tahminle ancak bir yüzyıl daha yeteceği söylenmektedir. Buna karşın, petrol ürünleri ile denizlerin son yıllardaki kirleniliş oranları ve çevre sağlığına olan etkilerinin yüzyıllar boyu görüleceği öne sürülmektedir [Aras, 2000].

Her yıl yaklaşık olarak altı milyon ton petrol (Dünyadaki petrol üretiminin yaklaşık %0,25'i) doğal ve antropojenik kaynaklardan deniz ve okyanuslara giriş yapmaktadır [Üstün ve Büyükgüngör, 2007]. Denizlerdeki petrol kirliliğinin doğal kaynakları; sediment erozyonları, doğal sızıntılar ve denizlerdeki mikroorganizmalar tarafından yapılan biyosentez süreçleridir. Denizlerdeki antropojenik petrol kirliliğinin kaynakları ise petrolün aranması, çıkarılması, üretilmesi, işlenmesi, taşınması ve kullanılması sırasında büyük miktarlarda petrol ve petrol türevi

maddelerin kazayla, ihmalle veya yasadışı olarak deniz ortamına girmesidir. Denizlerdeki petrol kirliliğine neden olan antropojenik kaynakları sıralarsak:

- Deniz yatağında yapılan petrol arama ve çıkarma çalışmaları (sondajlama, boşaltma, vb.),
- Denizden üretim sürecinde sızmalar ve petrol platformlarında meydana gelen çeşitli kazalar,
- Gemilerin limanlarda yükleme ve boşaltma işlemleri sırasında meydana gelen kirlilik,
- Gemilerde, yasal olmamasına rağmen, yağlı balast tanklarının yıkanması, sintine sularının denize boşaltılması ve çöplerin denize dökülmesi,
- Denizlerde sürdürülen askeri faaliyetler ve savaşlar,
- Atmosferik partiküllerin çökmesi,
- Evsel ve endüstriyel atıkların deşarjı,
- Tanker kazaları,

sık karşılaşılanlarıdır [Turgay, 2005].

Petrol ve petrol ürünlerinin toplam enerji talebinin karşılanmasındaki payı sanayileşmenin ve şehirleşmenin etkisiyle artmaktadır. Giderek artan tüketim, petrolün çıkarıldığı ve işlendiği bölgelerden çok daha uzaktaki noktalara taşınmasını bir gereklilik haline getirmektedir. Petrol taşımacılığının büyük bir kısmı, maliyetlerinin görece düşük olması nedeniyle deniz yolu ile tankerler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir [Bilgin, 2003].

Petrol ihtiyacının tamamına yakını ithal etmekte olan ve coğrafi konumu gereği ve boru hatları vasıtasıyla Rus ve Hazar petrolünün çıkış kapısı konumunda olan Türkiye dünyadaki en önemli petrol transfer güzergâhlarından birinin üzerindedir. Bu nedenle Türkiye'nin karasularında yoğun bir tanker trafiği yaşanmaktadır. Özellikle, küresel petrol üretiminde ciddi bir rol üstlenen Rusya; petrolünü Karadeniz ve Baltık Denizi üzerinden dünyaya dağıtmaktadır. Rusya petrolünün yarısına yakın bölümü Karadeniz, Türk Boğazları ve Ege Denizi üzerinden Güney Avrupa ülkelerine sevk edilmektedir. Ülkemizin konumunun stratejik önemi, ekonomimize büyük katkılar sağlamasına rağmen, kazalara maruz

kalındığı takdirde kara ve deniz ekosistemleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ülkemizde Boğazlar Bölgesi başta olmak üzere karasularımızın bir bölümü ciddi bir petrol kirliliği riski ile karşı karşıyadır [Baylan, 2011].

Her yıl binlerce ton petrol çeşitli nedenler sonucunda denize dökülür ve canlıların hayatını tehdit eder. Bu nedenlerin başında tanker kazaları gelmektedir. Ülkemizde petrol tankeri kazalarından oldukça etkilenmektedir. Bunun sebebi; ülkemizin deniz ticareti yolları üzerinde bulunması ve iki önemli geçiş noktası İstanbul ve Çanakkale Boğazlarına sahip olmasıdır. Özellikle İstanbul Boğazında her yıl farklı sayıda tanker kazaları meydana gelmekte ve binlerce ton petrol denize dökülmektedir. İstanbul Boğazı'nda meydana gelen en önemli tanker kazaları ve bu kazalar sonucu dökülen petrol miktarları Tablo 1.2'de verilmiştir [Güven ve Öztürk, 2005], [Demiray, 2006], [Barış, 2011], [Baylan, 2011].

Tablo 1.2: İstanbul Boğazı'nda görülen önemli kazalar ve dökülen petrol miktarları.

TARİH	KAZA YAPAN TANKERLER	DÖKÜLEN PETROL MİKTARI (~)
14.12.1960	World Harmony	22.000 ton
15.11.1979	Independenta	95.000 ton
1982	Unirea	66.400 ton
29.03.1990	Jambur & Datongsham	2.600 ton
13.23.1994	Nassia	20.000 ton
13.02.1997	TPAO	1.500 ton
07.11.1999	Semele & Şipka	10 ton
29.12.1999	Volganef 248	1.500 ton
06.10.2002	Gotia	25 ton
11.11.2003	Svyatov Panteleymon	500 ton
19.01.2010	Orçun C	125 ton

• Petrol Kirliliğinin Canlılar Üzerindeki Etkisi

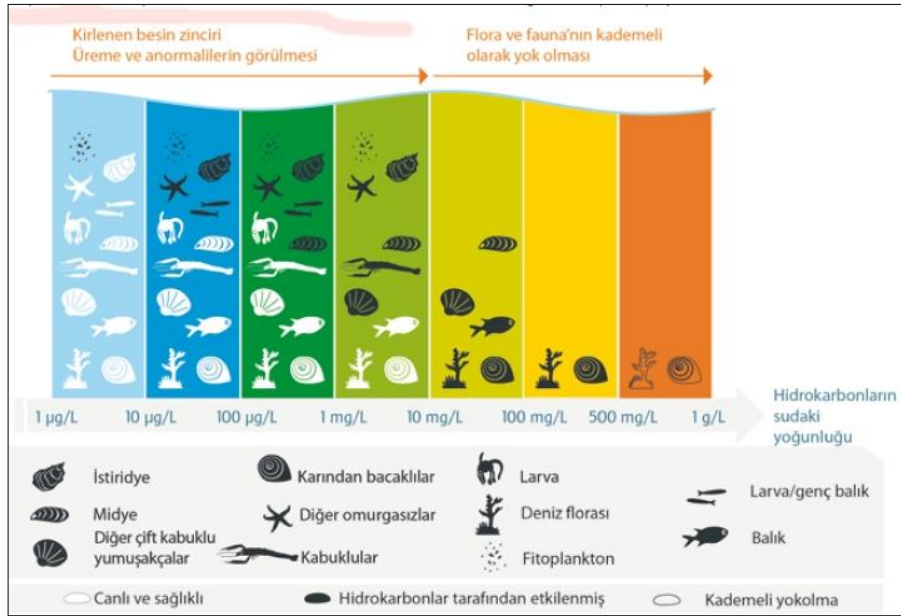
Hemen hemen hiçbir deniz bölgesi antropojenik kaynaklı petrol kirliliğinin etkisinden kurtulamamıştır. Bu nedenle petrol ve petrol türevlerinin deniz ekosisteminde kısa veya uzun vadeli zararlara sebep olmaktadır.

Bu zararlar arasında ilk olarak deniz yüzeyinde oluşan petrol filminin etkisini ele alalım. Denize dökülen petrolün yüzeyde oluşturduğu film, atmosfer ve deniz arasındaki gaz alışverişini engelleyerek sudaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunun

düşmesine neden olur. Ayrıca ışık geçirgenliğini azaltarak deniz ortamındaki yaşam için çok önemli olan fotosentez olayını engeller.

Diğer bir etken her türlü deniz taşıma araçlarının sintine ve balast sularından, rafineri ve petrokimya komplekslerinin atık sularından, petrol dolun ve boşaltım tesislerinden ve tanker trafiğinden kaynaklanan petrol kirliliğini ele aldığımızda denizlerdeki besin zincirinin tüm halkaları üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu görüyoruz. Petrolün bileşimindeki mikro kirleticiler (PAH'lar) tek hücreli organizmalardan başlayarak balıklara ve son olarak da insana kadar ulasan besin zinciri yoluyla taşınırlar. Deniz suyunda ppb (milyarda bir) oranındaki hidrokarbon yoğunluğu, birikim (biyo-akümülyasyon) sonucu, denizel organizmalarda ppm (milyonda bir) düzeylerine ulaşmaktadır. Diğer bir deyişle bu zehirli hidrokarbon bileşiklerinin deniz canlılarındaki oranı 1000 kat artmaktadır [MBB, 1991].

Deniz ortamında yaşayan değişik canlı türlerinin petrol bileşiklerine karşı duyarlılıkları da farklıdır. Bu bileşikler deniz canlıları üzerinde, sudaki hidrokarbon yoğunluğuna bağlı olarak, toksik etki yaratıp Şekil 1.3'te gösteriliği şekilde flora ve faunanın kademeli olarak yok olmasına neden olabilir [Web 1, 2015].



Şekil 1.3: Hidrokarbonların deniz organizmaları üzerindeki etkisi.

Petrol ürünlerinin canlılarda doğrudan yarattığı toksik etkilerin yanı sıra, dolaylı neden olduğu fizyolojik etkileri de söz konusudur. Örneğin, petrol ürününün canlıların beslenmesinde yaşamsal rol oynayan kemo-reseptörlerin (kimyasal

algılayıcılar) üzerini kapatarak organizmanın beslenme olanağını ortadan kaldırdığı saptanmıştır. Buna ek olarak, bazı canlılarda üremeyi gerçekleştiren mekanizmalar arasında önemli rol oynayan feromonların, yani karşı cinsi çekmek için organizma tarafından salgılanan kimyasal maddelerin maskelenmesidir. Örneğin, ıstakozlarda çiftleşmenin gerçekleşebilmesi için dişi tarafından feromonların salgılanması gerekir. Feromonların petrol ürünlerince maskelenmesi, dişi ve erkek fertlerin, dolayısıyla sperm ve yumurtaların üreme için bir araya gelmelerini zorlaştırmaktadır. Bu durum, türün üremesini, dolayısıyla varlığını sürdürmesini etkiler. Özellikle yumurtalar, larvalar ve yeni doğan bireylerden oluşan hassas deniz canlıları, çok seyreltilmiş olsa da toksik özellikteki PAH bileşiklerinden etkilenebilir. Özetle, petrol ve türevlerinden kaynaklanan toksik etkiler en dayanıklısından en hassasına tüm deniz canlıları üzerinde etkilidirler. Bu durum ekolojik dengenin bozulmasını ve çok uzun yıllar boyunca düzelememesine yol açabilir. Fizyolojik olarak petrol, balıkların beslenme, hareket ve üreme gibi işlevlerinde; tat, koku, renk gibi ekonomik değerlerinde olumsuz etkiler yaratabilir [MBB, 1991].

Yaşam süreçlerinin büyük bölümünü deniz dibi zemini üzerinde veya zemini oluşturan sedimentler içerisinde gömülü olarak geçiren bentik organizmalar (Yumuşakçalar, Kabuklular, Derisidikenliler, Kurtlar, Solenteratlar ve Hidroidler) genellikle suyu filtre eden veya sediment içerisinde çökelmiş olarak bulunan maddeleri süzen canlılar olarak bilinirler. Bu yaşam düzenlerine bağlı olarak kirleticileri vücut dokularında biriktirmeye açıktırlar [MBB, 1991]. Suyun filtrasyonu sürecinde farklı şekillerde petrolü alabilirler. Petrol hassas epitel dokuları (solungaç, mukoza vs.) üzerinde birikebilir, onların dokularını tıkayabilir ve buna bağlı olarak filtreleme sistemlerinin bozulmasına sebep olabilir. Filtreleme mekanizmaları bu şekilde etkilenen bentik organizmalar hem beslenemezler hem de zehirli maddelerin etkisiyle zarar görür ve yapılarında petrol içerirler [Web 1, 2015].

Suyun hareketine bağlı olarak, diğer bir deyişle pasif hareket eden planktonik organizmalar, özellikle de yüzey su tabakasında yer alan planktonik türler, petrol kirlenmesinden en fazla etkilenen canlı grubunu oluştururlar. Dolayısıyla yüzen petrol kütleleri ve filmleri ile bulaşa maruz kalmaları ve/veya beslenme, ozmos gibi fizyolojik işlevleri sonucunda hücrelerine petrol alınması, bu organizmalar için ölümcül olacağı gibi bazı durumlarda ve miktarına bağlı olarak akut veya kronik, subletal etkiler gösterebilirler.

Planktonik organizmalar denizel ortamlardaki besin zincirinde, özellikle de ototrof olan fitoplankton türleri nedeni ile çok önemli bir yere sahiptirler. Petrol ve türevlerinden kaynaklanan toksik etkenlerin bunlar üzerindeki etkisi, söz konusu bölgelerdeki deniz prodüksiyonunu olumsuz etkiler. Deniz yüzeyine yayılan petrol filmi, güneş ışınlarının su içersinde ilerlemesini kısıtlayarak, fitoplanktonlarca yapılan fotosentezi engelleyebilmektedir.

Denizde yaşayan organizmaların yanı sıra, su yüzeyini kullanan bazı deniz kuşu türleri de yüzeyde oluşan petrol filmi tabakasından etkilenirler. Deniz kuşları hayatlarını sürdürürebilmek diğer bir deyişle deniz yüzeyiyle yiyecek bulmak ve uçuşları sırasında dinlenmek için ilişki halindedirler. Kuşlar avlanma amacı ile suya dalışları sırasında yüzeyde film oluşturmuş petrolü yutabilir, soluyabilir ve/veya tüyleri petrole bulanabilir. Kuş tüylerinin petrole bulanması kuşların termal yalıtımını, su üstünde batmadan yüzmesini ve havalanma yeteneklerini kaybetmelerine neden olabilir. Ayrıca, derileri ile temas eden petrolden zehirlenebilirler. Bu nedenle hemen her büyük tanker kazasından sonra martı, karabatak ve benzeri deniz kuşlarının kitleler halinde öldükleri gözlenmiştir [MBB, 1991]. Buna dair bir örnek olarak; 2002 yılında İspanya açıklarında, Galiçya'nın Atlantik okyanusu kıyısında meydana gelen Prestige isimli petrol tankeri kazası sonrası İspanya ve Fransa'da yüzlerce kilometrelik sahil şeridinin kirlendiği ve kuş popülasyonlarının zarar gördüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde 2003 Şubat ayında 71 farklı türden 20.000'den fazla kuşun (%75'ten fazlası ölü olarak) zarar gördüğü tespit edilmiştir. Bu kazada en ağır etkilenen kuş türü ise Guillemot türüdür (*Uria aalge*). Bu türe ait 11.000'den fazla kuş ölü bulunmuştur [EEA, 2003].

Deniz kuşlarında gözlenen duruma benzer şekilde deniz memelileri de petrol ve türevlerinin oluşturduğu yüzey filmi tabakası nedeniyle nefes alma aşamasında su yüzeyine çıktıklarında olumsuz şartlarla karşılaşmaktadırlar. Bu durum balina, yunus ve fok gibi deniz memelilerinin avının azalmasına neden olduğu gibi, petrole bulanmış gıdaları yemelerinden dolayı bedenlerine bulaşan atıklar nedeniyle bu canlılara zarar vermektedir [Web 1, 2015].

1.2. Tez Çalışmasının Amacı, Bilime Katkısı ve İçeriği

Kirletici, toksik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinden dolayı biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen petrol ve petrol türevlerinden kaynaklanan kirlenmeye karşı doğanın temizlenmesi, bu amaçla doğal kaynakların ve uygulamalı mikrobiyoloji çalışmalarının kullanılması oldukça önemlidir.

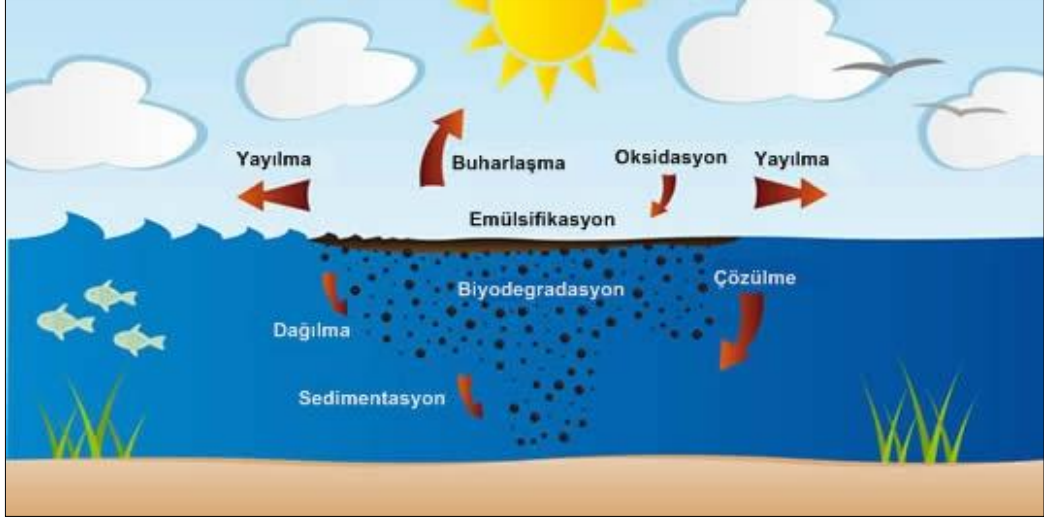
Birçok alanda kullanılan petrol ve ürünleri, her süreçte sucul ve karasal ekosistemlerde kirlenmelere sebep olmaktadır. Mikroorganizmaların, petrol ve petrol türevleriyle kirlenmiş ortamlarda yaşayabildiği ve dolayısıyla biyokimyasal süreçlerle petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği bilinmektedir. Son yıllarda bu amaçla yapılan mikrobiyoloji çalışmaları arasında, bakteriler aracılığı ile kirleticilerin ortamlardan uzaklaştırılması ve/veya daha az toksik/toksik olmayan formlara dönüştürülmesi yani “Biyoremediasyon” (biyolojik iyileştirme) çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır.

Dünya’daki önemli ham petrol transfer güzergâhlarından biri olarak ülkemiz karasularında yoğun bir tanker trafiği yaşanmaktadır. Özellikle Marmara Denizi, sahip olduğu İstanbul ve Çanakkale Boğazları nedeniyle tanker kazası riski ile her an karşı karşıyadır. Marmara denizi; Karadeniz kökenli ve gemi taşımacılığı kaynaklı pek çok kirletici etkenle yüz yüzedir. Buna ek olarak, İstanbul ve Kocaeli gibi büyük şehirlerin evsel ve endüstriyel atıklarından da yoğun olarak etkilenmektedir. Benzer şekilde petrol tankerlerinin olası kazalarına da şahit ve açık olan bu denizler, risk altında olan bir bölge olması ile bakteri-petrol ilişkisini inceleyebileceğimiz özgün bir araştırma alanı oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında; çevre kirliliğine yol açan etmenlerin başında gelen petrol ve petrol türevlerinin çevresel zararlarının, biyolojik yöntemler kullanılarak ucuz ve hızlı bir şekilde en aza indirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada kendi denizlerimizden (Marmara Denizi ve Karadeniz) izole edilen bakteri türlerinin, önemli bir ekolojik kaynak olduğu düşünülmüştür. Bu çalışma ile petrol ve petrol türevlerinin biyoremediasyonunda kendi kaynaklarımızın değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş, kendi denizlerimize ait türlerin varlığı irdelenmiş, böylece öncelikle kendi deniz ticaret yollarımızın ve denizlerimizin, dolayısıyla doğal kaynaklarımızın korunması ve gerekirse çevresel kirleticilere karşı temizleyici ajan olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Çeşitli kaynaklardan denizlere ulaşan petrol ve petrol türevleri sulu bir sisteme girdiklerinde; fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin etkisiyle Şekil 2.1'de gösterilen bazı süreçler geçirirler [Web 3, 2013].



Şekil 2.1: Petrol dökülmeleriyle deniz ortamında oluşan süreçler.

Petrol deniz ortamına girdikten sonra; su yüzeyine yayılma, buharlaşma, çözülme, emülsiyon haline gelme (Emülsifikasyon), dağılma, dipteki sedimentlerde toplanma (Sedimentasyon), canlı organizmalarla oksitlenme ve parçalanma (Biyodegradasyon), fotolitik olarak oksitlenme (Fotooksidasyon) şeklindeki olaylarla değişime uğrar [Atlas, 1975], [Dibble and Bartha, 1979], [Atlas, 1981], [Leahy and Colwell, 1990], [Atlas and Bartha, 1993], [Demir ve Demirbağ, 1999], [US-EPA, 2001], [Rahman et al., 2002], [Web 3, 2013].

Genelde herhangi bir nedenden dolayı denize dökülen hidrofobik özellikli petrol ve petrol türevi kirleticiler suda çözünmezler. Yüzey akıntısı ve rüzgârın etkisiyle kilometrelerce büyüklükteki alanlara yayılarak bileşimindeki uçucu kısımları buharlaşır. Rüzgâr ve dalgalar da buharlaşmayı artırır. Buharlaşma miktarı; kirleticinin uçuculuğu, ortam sıcaklığı, kirleticinin dağıldığı yüzey alanı ve kirleticinin kalınlığı ile doğru orantılıdır [Ünsan, 1999]. Deniz yüzeyine düşen petrolün yaklaşık %25'i bir gün içinde buharlaşır [Demir ve Demirbağ, 1999]. Kirleticilerden kalan %75'lik bölümün büyük bir kısmı deniz yüzeyinin farklı

bölgelerinde ve değişik kalınlıklarda yağ/su emülsiyonları haline dönüşür. Yüzeiden kopan yağ damlacıkları su kütesinde kısmen çözünür. Çözünmeyecek kadar ağır kısımlar ise, yapışan organik maddeler ve ısı değişimleri ile küresel biçimlerini koruyarak dibe çökelirler. Çökelme sırasında çarpıp bir araya gelerek ağırlıkça büyüyen bu küreler, dip akıntılarıyla hareket ederek sedimentleri kaplamaktadırlar. Petrolün bir kısmı emülsiyon haline gelmeden fotolitik olarak, bir kısmı da mikroorganizmalar tarafından parçalanır. Yağ tabakası üzerine düşen güneş ışınları, petroldeki hidrokarbon moleküllerinin yapısını değiştirecek olan fotooksidasyon tepkimelerine yol açar [Baylan, 2011]. Deniz suyunda yaşayan mikroorganizmalar (özellikle bakteriler) petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak biyodegradasyon sürecini gerçekleştirirler [Demir ve Demirbağ, 1999], [Altuğ, 2005], [Web 1, 2015].

Petrol biyodegradasyonu, kirliliğin uzaklaşmasında primer mekanizma olarak doğada kendiliğinden 5-10 sene sürede olur. Ortama nutrient veya bakteri ilavesi ile müdahale edilerek yapılan biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme) çalışmalar ile bu kirliliğin uzaklaştırılması 2-5 sene gibi daha kısa bir sürede olabilmektedir. Yani biyodegradasyon, kirliliğin uzaklaştırılmasında doğanın izlediği mekanizmadır. Biyoremediasyon ise doğal ortama nutrient ve bakteri ilavesiyle dışarıdan müdahale edilerek hızlandırılmış bir biyodegradasyon mekanizmasıdır [Altuğ, 2005].

2. 1. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)

Biyoremediasyon, kontamine olmuş bir doğal ortamın (toprak, sediment, hava, su) iyileştirilmesi veya temizlenmesi amacıyla mikroorganizmaların veya onlardan elde edilen ürünlerin, söz konusu ortama aktarılması ya da çevresel koşulların ayarlanmasıyla endojen faunanın yıkım oranının arttırılması gibi işlemleri kapsayan bir yöntemdir [Savaş, 2010]. Biyoremediasyon yönteminde, kontaminant maddeleri parçalayabilen ve onları daha az toksik veya toksik olmayan yan ürünlere dönüştürebilen mikroorganizmaların büyümeleri teşvik edilerek mikroorganizmaların doğal olan yaşama proseslerinden yararlanılır [Alexander, 1999], [Kavamura and Esposito, 2010].

Petrol hidrokarbonları kökenli çevresel kirlilik kaynaklarının tüm dünyada artış göstermesi, bunların doğal ortamdan uzaklaştırılmalarına yönelik tekniklerin

geliştirilmesi zorunluluğunu getirmiştir. Deniz kıyıları ve tatlı su ekosistemlerine dağılan/yayılan petrol ve türevi kirleticilerin kontrolü için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik teknolojiler geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan kıyı temizleme seçenekleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir [US-EPA, 2001].

Tablo 2.1: Petrol kirliliğinin uzaklaştırılmasında dünyada kullanılan yöntemler.

Doğal Yollar	<ul style="list-style-type: none"> * Buharlaşıma * Fotooksidasyon * Biyodegradasyon 	
Fiziksel Yollar	<ul style="list-style-type: none"> * Bariyerleme ve Sıyırma * Emici Maddelerle Temizleme * Mekanik Ekipmanlarla Toplama ve Kaldırma * Yıkama * Sediment Relokasyonu ve İşlenmesi * Yerinde Yakma 	
Kimyasal Yollar	<ul style="list-style-type: none"> * Seyreltici Ajanlar * Emülsiyon Kırıcılar * Katılaştırıcı Kimyasallar * Yüzey Filmi Kimyasalları 	
Biyolojik Yollar	<ul style="list-style-type: none"> * Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme) 	<ul style="list-style-type: none"> ** Gübreleme (Fertilizasyon) ** Tohumlama (Seeding)

Biyoremediasyon yönteminin diğer yöntemlere göre birçok avantajı vardır. Bunların başında uygulama maliyetinin düşük olması, kullanım kolaylığı, organik kirleticilerin tamamen parçalanması, çevre dostu bir yöntem oluşu ve yan etkilerinin olmayışı en önemlileri arasında sayılabilir [Ekici, 2011].

Biyoremediasyon yönteminin uygulanışı gübreleme (fertilizasyon) ve tohumlama (seeding) olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Gübreleme; ortamdaki yerel mikroorganizmaları etkin duruma getirmek ve büyümelerini hızlandırmak amacıyla azot ve fosfor gibi besin tuzlarının ortama ilavesi şeklinde olur. Tohumlama ise kirli alanlara mikroorganizma ilavesi şeklinde gerçekleşir. Bazı durumlarda kirlenmiş bir alanda kirletici faktörün parçalanması için ihtiyaç duyulan

biyolojik aktivite o alanda elde edilemeyebilir. Bu durumda parçalama yeteneği daha önceden belirlenmiş ve başka bölgelerden izole edilen mikroorganizmalar kirlenmiş alana eklenebilirler. Bu mikroorganizmalar “ekzogenus mikroorganizma” olarak tanımlanır. Ekzogenus mikroorganizmaların parçalama olayını gerçekleştirebilmesi için yeni bölgedeki çevresel koşulların izole edildiği bölgeye uygun olmasının sağlanması başarıya ulaşmak için önemlidir [OTA, 1991].

Biyoremediasyonda rol oynayan mikroorganizmalar arasında funguslar, mayalar ve bakteriler yer alır [US-EPA, 2000], [Strong and Burgess, 2008]. Örneğin, petrol ve petrol türevlerinin biyolojik dengeyi önemli ölçüde ve olumsuz olarak etkileyen polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) bileşenlerinin parçalanmasında bakteriler önemli rol oynarlar. Bakterilerin, deniz ortamındaki mikrobiyal topluluk içerisinde baskın hidrokarbon parçalama özelliği gösteren elementler oldukları düşünülmektedir [Demir ve Demirbağ, 1999]. Petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen 70’den fazla mikrobiyal cins bilinmektedir [OTA, 1991]. Floodgate [Floodgate, 1984] hidrokarbon parçalayabilen 25 bakteri ve 27 fungus cinsini Tablo 2.2’de listelemiştir.

Tablo 2.2: Petrol degradasyonuna katılan bakteri ve funguslardan başlıca örnekler.

BAKTERİLER		FUNGUSLAR	
<i>Achromobacter</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Allescheria</i>	<i>Oidiodendrum</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Paecylomyces</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Candida</i>	<i>Rhodospiridium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Spherotilus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Saccharomycopsis</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Coryneforms</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Xanthomyces</i>	<i>Gonytrichum</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Hansenula</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Klebsiella</i>		<i>Helminthosporium</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Lactobacillus</i>		<i>Mucor</i>	

Leahy ve Colwell [Leahy and Colwell, 1990] hem toprak hem de deniz ortamında bulunan en önemli hidrokarbon parçalayan bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* ssp. ve *Coryneforms* olduklarını tespit etmiştir.

Yapılan birçok çalışmada *Cycloclasticus* ve *Altererythrobacter* türlerinin aromatik hidrokarbon bileşiklerini parçalayabildiği ve petrol kirliliğine maruz kalmış deniz ortamlarının biyoremediasyon ile ıslahında önemli bakteriler olduğu bildirilmiştir. Özellikle *Cycloclasticus pugetii* naftalen, fenantren, antrasen, piren ve toluen gibi aromatik hidrokarbonları etkin bir şekilde parçalayabilmektedir [Kasai et al., 2002], [Staley, 2010], [Teramoto et al., 2010].

20 Nisan 2010 tarihinde Meksika Körfezi'ndeki British Petrol'e (BP) ait petrol platformunda meydana gelen patlama sonrası milyonlarca litrelik ham petrolün okyanusa yayılması yakın zamandaki en büyük petrol kazalarından biridir. Burada ortamdaki petrol kirliliğinin giderilmesinde deniz sularında doğal olarak bulunan *Alcanivorax borkumensis* isimli bakteriden faydalanılmıştır. Meksika Körfezi'ndeki mevcut oksijenin %30 oranında azalmasına karşın bu bakterilerin hızlı bir şekilde çalıştığı gözlenmiştir [Ekici, 2011]. Benzer şekilde rapor edilmiş bazı çalışmalar da *Alcanivorax borkumensis*'in kozmopolit bir deniz bakterisi olduğu ve yeterli miktarda azot ve fosfor gibi besin takviyelerinin yapılmasıyla bu bakterinin baskın bir şekilde petrol hidrokarbonlarını, özellikle alkan yapısında olan birimlerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmak üzere parçaladığı bildirilmiştir [Yakimov et al., 1998], [Kasai et al., 2002], [Hara et al., 2003], [Schneiker et al., 2006], [Martins dos Santos et al., 2010].

Petrol biyoremediasyonunda çeşitli faktörlerin etkisi söz konusudur. Bu faktörler ayrı ayrı önemli olmakla beraber, faktörlerin birbiriyle ilişkileri de biyoremediasyon hızını etkiler. Bu faktörleri şu şekilde özetleyebiliriz:

- Ortamdaki bakterilerin petrol hidrokarbonlarını tüketme kapasiteleri,
- Bakterilerin karbon, azot ve fosfor gibi besin istekleri ve bu besinlerin kirlenmiş ortamlardaki varlığı,
- Ortamlarda yer alan oksijen ve sıcaklık gibi çevresel şartlar,
- Petrol ve türevlerinin konsantrasyonu, kimyasal yapısı, çözünürlüğü, toksisitesi ve metabolik dekompozisyon farklılıkları,

- Su kütlesinde farklı çeşitlerde karbon kaynaklarının bulunuşu (Örneğin bitkisel metabolizma veya çürüme ürünleri),
- Mikroorganizmaların aktivitesini inhibe edecek toksik şartların bulunması,

şeklinde sayılabilir [Leahy and Colwell, 1990], [Alexander, 1999], [Demir ve Demirbağ, 1999], [Altuğ, 2005], [Uysal, 2006].

Biyoremediasyon yönteminde kirlı ortamların temizlenmesi için kullanılan yöntemi bakterilerin metabolik aktiviteleri belirler [Watanabe, 2001]. Çünkü bakteriler petrol hidrokarbonlarını, karbon ve enerji ihtiyacını karşılamak için kullanabilirler. Bu teknoloji dünyanın her yerinde uygulanan, başarısı ortamın özelliklerini tanımlayarak kazanılan deneyim ve bilgiye bağılı olarak değışebilen bir yöntemdir. Biyoremediasyon yönteminin kirleticilerin uzaklaştırılmasında önemli ve büyük bir güce sahip olduğu iyi bilinmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar ile bu yöntemin prensipleri ve teknikleri üzerinde geliştirme ve çeşitlendirme çalışmaları sürmektedir [Vidali, 2001]. Biyoremediasyon ile iyileştirme çalışmalarının bazı avantaj ve dezavantajları aşağıdaki tabloda sıralanmıştır [OTA, 1991], [Vidali, 2001], [Erdoğan and Karaca, 2011].

Tablo 2.3: Biyoremediasyon yönteminin avantaj ve dezavantajları.

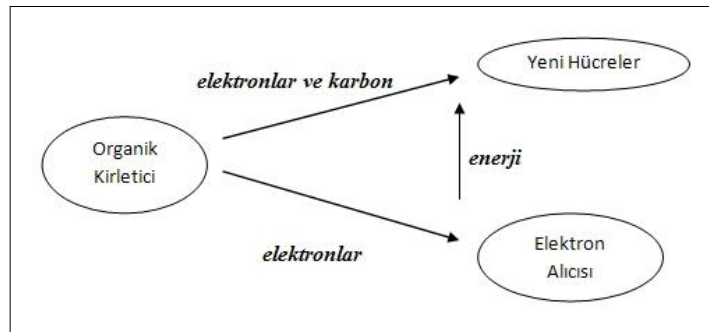
AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
* Uygulandığı alanlarda önemsiz fiziksel bozulmalar meydana getirmesi	* Petrol dökülmelerinin pek çok tipi için bu yöntemin etkilerinin tanımlanmamış olması
* Doğru kullanıldığında önemli bir negatif etkisinin olmaması	* Açık denizler için uygun olmaması
* Petrolün toksik bileşenlerinin uzaklaştırılmasında yardımcı olması	* Başarılı sonucun alınmasında zamana ihtiyaç duyulması
* Mekanik teknolojilerden daha basit ve mükemmel çözümler sunması	* Her kirlenmiş alan için yöntemin ortam şartlarına göre özelleştirilmesi gerekliliği
* Diğer teknolojilerden daha ucuz olması	* Diğer tekniklerden daha uzun sürmesi
* Diğer tekniklerle beraber uygulanabilmesi	* Bilinmeyen yan ürünlerin üretilebilme olasılığı
* Taşıma maliyetinin olmaması	* Kapsamlı izleme gerekliliğidir.

2. 1. 1. Petrolün Biyodegradasyonu

Hidrokarbonlar ile kirlenmiş çevrelere uygulanan fiziksel ve kimyasal metotlar tam ve etkili bir çözüm getirmekten uzaktır. Bu yüzden son yıllarda biyokimyasal metotların potansiyel kullanılabilirliği araştırılmıştır. Özellikle bu maddeleri ortamdaki uzaklaştırmak veya daha zararsız bileşiklere dönüştürmek ve/veya parçalamak için gerekli olan gen sistemleri ile donatılmış çeşitli bakteri türlerinin alternatif olabileceği belirlenmiştir [Kahraman ve Geckil, 2005].

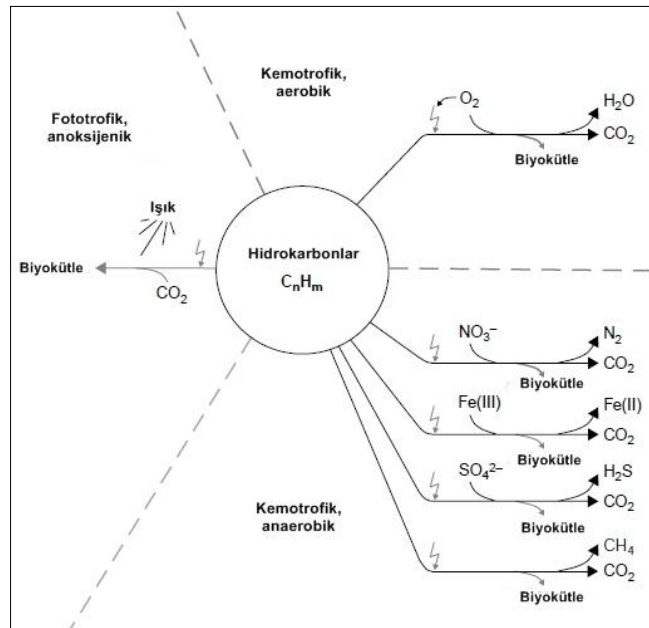
Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi, deniz ekosisteminde metabolik işleyişin aydınlatılmasını ve bakterilerin metabolik yollardaki rolünün daha net ortaya konmasını sağlamıştır. Deniz mikrobiyolojisi ve ekoloji çalışmalarında kaydedilen gelişmeler, besin zincirindeki karbon ve enerji akışında bakterilerin aktif rolünü tanımlamıştır [Altuğ vd., 2007]. Yapılan farklı çalışmalarda birçok akuatik bakteri türlerinin petrol hidrokarbonlarını biyodegradasyona uğrattığı bildirilmiştir [Floodgate, 1984], [Leahy et al., 1990], [Kasai et al., 2002], [Hara et al., 2003], [Kahraman ve Geckil, 2005], [Çiftçi, 2008], [Martins dos Santos et al., 2010].

Bakterilerin büyümeleri ve yeniden çoğalmaları için enerjiye ihtiyaçları vardır. Bakteriler organik kirleticilerdeki karmaşık kimyasal bağları, enzimleri vasıtasıyla kırarak, kirleticilerden elektronları Şekil 2.2'de görüldüğü gibi transfer ederler ve böylece yaşamaları için gerekli enerjiyi sağlarlar. Bu proses sırasında kırılan bağlardan açığa çıkan enerji, dolayısıyla organik kirleticilerden elde edilen elektronlar ve karbon daha fazla hücre üretmek için kullanılır. Karbon, yeni hücre bileşenlerinin temel bloklarından biridir [Uysal, 2006].



Şekil 2.2: Organik kirleticilerin parçalanması.

Bakterilerin enerji kazanımı sağladığı bu kimyasal reaksiyonlar, yükseltgenme-indirgenme (redoks) reaksiyonları olarak bilinir. Elektronları veren organik kirletici yükseltgenirken, elektronları alan maddeler ise indirgenir. Elektron alıcıları ortamın aerobik ya da anaerobik oluşuna göre değişkenlik gösterir. Çoğu bakteri oksijeni (O_2) elektron alıcısı olarak kullanırlar. Oksijenin yardımı ile organik bileşikler parçalama yöntemi oksijenli solunum adını alır. Oksijenli solunumda bakteriler organik kirleticideki karbonu parçalayıp karbondioksite (CO_2) yükseltmek için oksijeni kullanır. Bunun sonucunda oksijen indirgenerek, ortamdaki H_2 ile birleşir ve suyu oluşturur. Oksijenli solunumun ana ürünleri arasında karbondioksit, su ve artan biyokütle yer alır. Bazı bakteriler ise oksijensiz ortamlarda nitrat (NO_3^-), sülfat (SO_4^{2-}), demir (Fe^{2+}) gibi inorganik bileşikler elektron alıcısı olarak kullanarak organik kirleticileri parçalarlar. Bu olay oksijensiz solunum olarak adlandırılır. Oksijensiz solunum sonucu, yeni hücrelere ek olarak, azot gazı (N_2), hidrojen sülfat (H_2S), metallerin indirgenmiş halleri ve metan gazı (CH_4) açığa çıkar. Şekil 2.3'te gösterilen Widdel'in çalışmasında [Widdel and Rabus, 2001] hidrokarbonların anaerobik parçalanmasının çoğunlukla denitrifikasyonun gerçekleştiği ya da ortamda sülfatın indirgendiği şartlarda meydana geldiği bildirilmektedir. Dolayısıyla parçalanma ortamında yoğun bir sülfür kokusu yer alır.

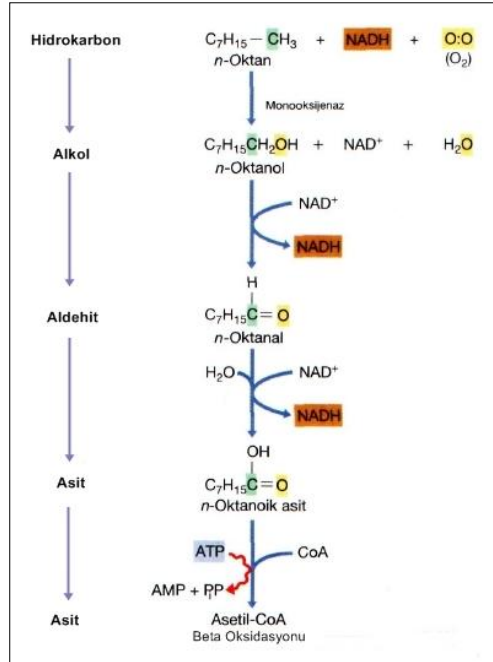


Şekil 2.3: Mikrobiyal hidrokarbon kullanımı alternatifleri.

2. 1. 1. 1. Hidrokarbonların Oksidasyonu

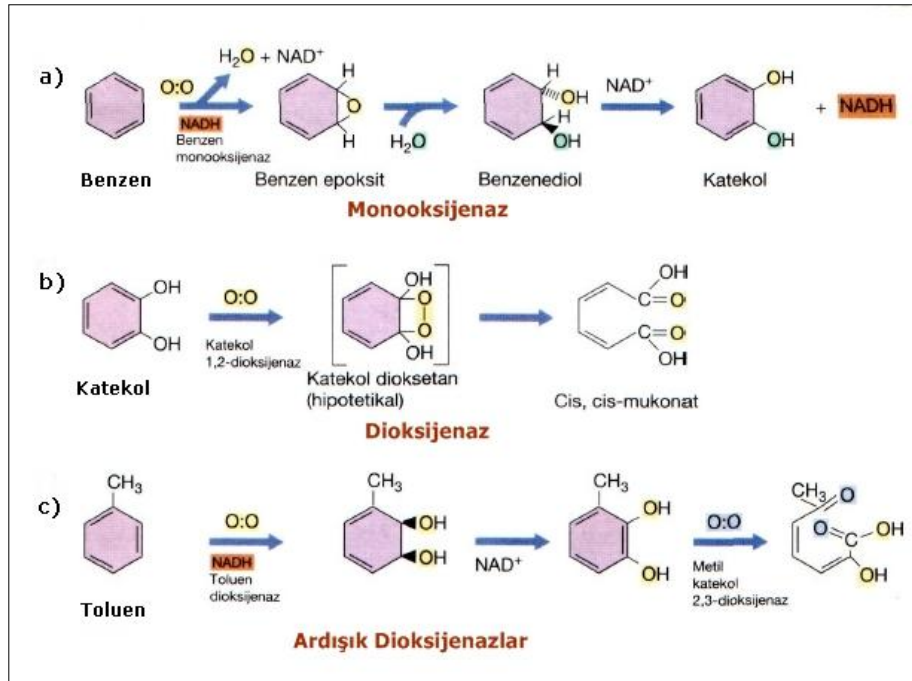
Petrol hava ve neme maruz kaldığında, yapısını oluşturan temel taşları olan hidrokarbon bileşenlere aerobik koşullarda birçok bakteri kolaylıkla saldırabilmektedir. Hidrokarbon oksidasyonunda, hidrokarbona oksijen atomlarını katan oksijenaz enzimlerinin önemli rolü vardır. Oksijenazlar, O_2 'den organik bileşiklerin içerisine oksijen atomunun katılmasını katalizleyen enzimlerdir. İki oksijenaz sınıfı vardır: Her iki O_2 atomunu da molekülün yapısına katan dioksijenaz ve iki O_2 atomundan sadece birini molekülün yapısına aktarabilen ve diğer atomu suya indirgeyen monooksijenaz yapısındadır [Madigan and Martinko, 2006].

Alifatik hidrokarbonlar düz zincirli, doymuş ya da doymamış bileşiklerdir. Doymuş alifatik hidrokarbonların oksidasyonunun ilk basamağı, reaktant olarak moleküler oksijen (O_2) gerektirir ve oksijen molekülünün atomlarından biri tipik olarak okside edilmiş hidrokarbonun son karbon atomu ile birleştirilir. Bu reaksiyon, monooksijenaz tarafından gerçekleştirilir ve tipik reaksiyon düzeni Şekil 2.4'te görülmektedir. Hidrokarbon ilk olarak alkole parçalanır, sonra da yağ asitlerine dönüşür. Beta-oksidasyon olarak bilinen reaksiyon dizisinin son ürünü asetil-CoA olup bu ürün sitrik asit döngüsünde katabolize edilir [Madigan et al., 2010].



Şekil 2.4: Monooksijenaz aktivitesi.

Birçok aromatik hidrokarbon bakteriler tarafından aerobik ortamda elektron vericisi olarak kullanılabilir. Tipik olarak bu bileşiklerin metabolizmasında, Şekil 2.5'te görüldüğü gibi, ilk aşamada oksijenazlar vasıtasıyla katekol veya yapısal olarak bununla ilgili olan bileşikler oluşur. Bu tek halkalı bileşikler başlangıç substratları olarak kabul edilir, çünkü oksidatif katabolizma yalnızca büyük aromatik moleküllerin, daha basit formdaki bu tek halkalı moleküllere dönüştürülmesinden sonra ilerleyebilir. Katekolden daha ileriye ulaşan degradasyonlar vasıtasıyla/aracılığıyla sitrik asit döngüsüne girebilen süksinat, asetil-CoA ve pirüvat gibi bileşiklerden oluşturulur. Böylece hidrokarbonların oksidasyonu gerçekleşmiş ve tamamlanmış olur [Madigan et al., 2010].

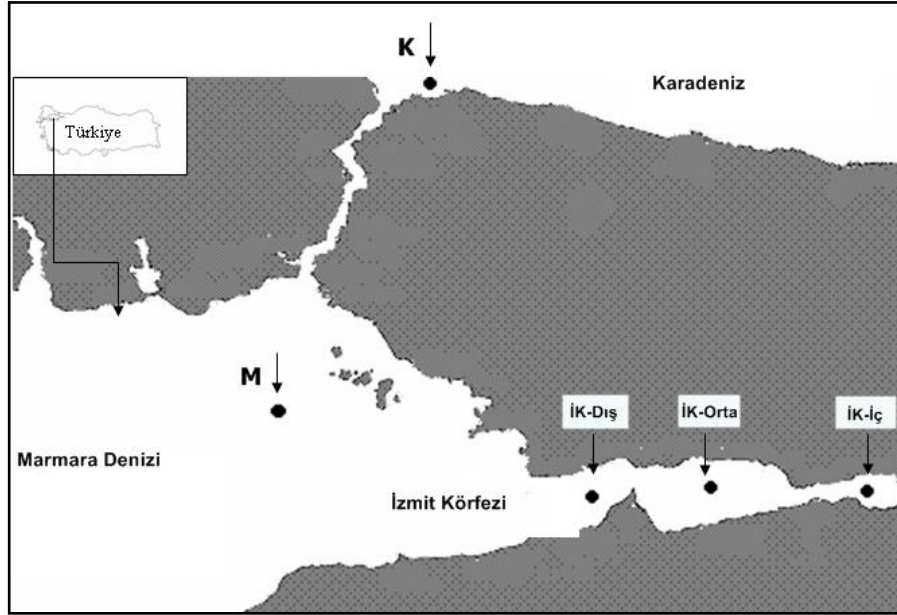


Şekil 2.5: Aromatik bileşiklerin katabolizmasında oksijenazların rolü. a) Monooksijenazla katekolun hidroksilasyonu. b) Katekolun, bir dioksijenazla cis, cis-mukonata parçalanışı. c) Toluenin parçalanmasında toluen dioksijenaz ve metil katekol 2,3-dioksijenaz aktivitesi.

3. GEREÇLER

3. 1. Kullanılan Bakteri İzolatlarının Seçilmesi

Çalışmada kullanılan bakteriler, geçmiş yıllarda yapılmış Gebze Teknik Üniversitesi (GTÜ) 2006-A-02 ve 2008-A-15 no'lu bilimsel araştırma projeleri (BAP) ile desteklenen, 2005-2009 yılları arasında devam eden ve tamamlanan doktora tezi çalışması [Şeker, 2009] kapsamında; Marmara Denizi (M), Karadeniz (K) ve İzmit Körfezi (İK)'ni temsil eden, şehir ve ev deşarjı almayan, Şekil 3.1'de gösterilen istasyonlardan, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü R/V Arar gemisi tarafından alınan deniz suyu örneklerinden izole edilmiş toplam 698 deniz bakteri izolatu arasından seçilmiştir.



Şekil 3.1: Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonların dağılımı.

Çalışmaya ait örneklerin ön seçiminde, petrol biyoremediasyonu yapan bakterilere ait referanslarda geçen genel biyokimyasal özelliklere göre 698 deniz bakterisi izolatu içerisinde 31 aday izolat belirlenmiştir. Daha sonra izolat sayısı Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (Minimum Inhibition Concentration, MIC) testi mantığıyla yapılan mikropalak denemeleriyle 7'ye indirilmiş ve çalışmada bu izolatlar kullanılmıştır.

3. 2. Kullanılan Ham Petrol Numunesi

Çalışmada kullanılan ham petrol numunesi, GTÜ 2012-A-02 no'lu BAP projesi kapsamında Tüpraş-İzmit Rafinerisi'nden özel izinler ile alınmıştır. Rafineriden alınan ham petrol numuneleri özel şişeleri içerisinde, +4 °C soğuk odada saklanarak korunmuştur. Denemeler aşamasında kullanılan bu ham petrol, özel şişede ve aynı sıcaklıktaki buzdolabı ortamında korunarak kullanılmıştır.

3. 3. Kimyasal Maddeler

Etil Alkol (Merck, 1.00983) , Gliserol (Merck, 1.04092), Gram Boyama Seti (Merck, 1.11885), İmmersiyon Yağı (Merck, 1.04699), Ksilen (Riedel-de Haën, 16446), Toluen (Riedel-de Haën, 32249), Triptik Soy Agar (Merck, 1.05458), Triptik Soy Broth (Merck, 1.04459), Zefirolum Fort Çözelti (Kimpa).

3. 4. Besiyerleri

- Triptik Soy Agar: 40 g/l tartıldı. 121 °C'ta 20 dk. otoklavlandı.
- Triptik Soy Broth: 30 g/l tartıldı. 121 °C'ta 20 dk. otoklavlandı.

3. 5. Cihaz ve Diğer Malzemeler

-20 °C Derin Dondurucu (Regal, Türkiye), +4 °C Buzdolabı (Regal, Türkiye), Bek alevi, Buz Makinesi (Brema, İtalya), Cam Mezürler (ISOLAB, Almanya), Cam Petri Kapları, Cam Pipetler-Dereceli (ISOLAB, Almanya), Cam Tüpler (ISOLAB, Almanya), Çalkalayıcı (INFORS HT Labotron, İsviçre), Çalkalayıcı (Wisd Wise Shake SHO-2D, Kore), Çeker Ocak, Elektrikli Pipet Pompası (ISOLAB, Almanya), Eldiven-Kimyasal Dayanıklı (ISOLAB, Almanya), Erlenler (ISOLAB, Almanya), Etüv (Binder, ABD), Floresan/Işık Mikroskop (Nikon ECLIPSE 80i, Japonya), Gaz Kromatografisi (Agilent 6890N), Gaz Maskesi (Ekastu, Almanya), Hassas Terazî (Sartorius BL 3100, Almanya), Kütle Spektrometresi (Agilent 5975C, inert MSD),

Lam (ISOLAB, Almanya), Lamel (ISOLAB, Almanya), Manyetik Balık, Manyetik Balık Tutucu (ISOLAB, Almanya), Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı (Heidolph, Almanya), Mikroplaklar (Greiner Bio-One, Avusturya), Otoklav (Hirayama Hiclave, Japonya), Otomatik Pipetler (Gilson Pipetman Classic, ABD), Özeler, Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, ABD), Petri Kapları (FıratMed, Türkiye), Petri Kapları (ISOLAB, Almanya), Pipet Uçları (Axygen, ABD), Santrifüj Tüpleri-Vidalı Kapaklı (ISOLAB, Almanya), Selüloz Nitrat Filtreler-0.45 µm Por Çaplı (Sartorius AG, Almanya), Sıcak Oda (+30 ve +37 °C), Soğuk Oda (+4 °C), Spektrofotometre (Bio-Rad SmartSpec 3000, ABD), Spektrofotometre Küvetleri, Steril Kabin (Nüve MN 090, Türkiye), Şişeler (ISOLAB, Almanya), Vakum Filtre Sistemi (ISOLAB, Almanya), VITEK 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Sistemi (bioMérieux, Fransa), VITEK Test Kartları (bioMérieux, Fransa).

4. YÖNTEMLER

4. 1. Kullanılacak İzolatların Seçilmesi

Şeker'in [Şeker, 2009] doktora tez çalışması kapsamında; Marmara Denizi (M), Karadeniz (K) ve İzmit Körfezi (İK)'ni temsil eden, şehir ve ev deşarjı almayan istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilmiş 698 deniz bakterisi izolatu içerisinde tez çalışmamızda kullanılacak örnekler seçildi. Bu seçimde literatür bilgilerine bağlı olarak, petrol ve türevlerini parçalayabilen bakterilerin ekseriyetle gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif özelliklerde olduklarının işaret edilmesi temel alındı [MacNaughton et al., 1999], [Peressutti et al.,2003], [Mashreghi and Marialigeti, 2005]. Bu bilgiler ışığında elimizdeki saf bakteri izolatları tarandı ve bu biyokimyasal özelliklerde olanlar aşağıdaki gibi seçildi.

Tablo 4.1: Seçilen izolatlar.

İSTASYON ADI	ÖRNEK NO
İzmit Körfezi - İç (İK 1)	20, 22, 42, 44, 46, 64, 79, 80, 81
İzmit Körfezi - Orta (İK 2)	110, 114, 140, 163, 188, 201
İzmit Körfezi - Dış (İK 3)	299, 301, 330, 331, 333
Karadeniz (K)	A22, A23, A87, A89
Marmara (M)	A118, A150, A154, A185, A218, A221, A222

4. 2. Seçilen İzolatların Üretimi

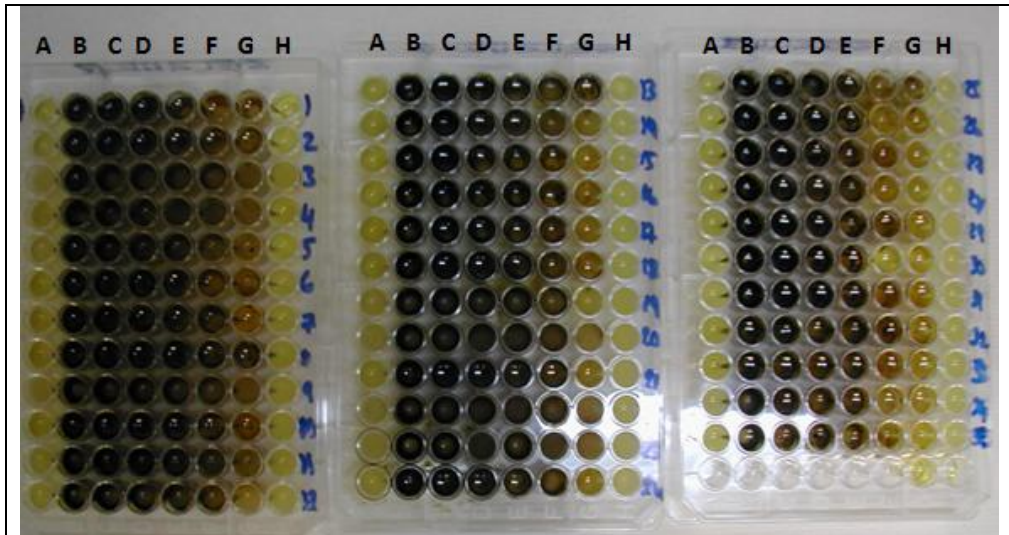
Derin dondurucuda (-20 °C) saklanan, istenen özelliklere sahip izolatlar çalışma için sıvı izolasyon besiyerine (TSB: Triptik Soy Broth) aktarıldı. Seçilmiş her bir izolat 2'şer ml TSB besiyeri içeren steril tüplere 100'er µl olacak şekilde inoküle edildi. Sıvı besiyerinden kaynaklanabilecek herhangi bir kontaminasyonun takip edilmesi amacıyla bir adet kontrol tüpü de her üretim aşamasına dâhil edildi. Ekim yapılan tüpler 30 °C sıcak odada çalkalayıcı üzerinde 200 rpm'de çalkalanarak 24 saat büyümeye bırakıldı. Süre sonunda tüplerdeki üremeler kontrol edildi. Bu işleme tüm izolatlarda üreme görülünceye kadar devam edildi.

4. 3. Seçilen İzolatların Ham Petrol Toleranslarının İrdelenmesi

Seçilen izolatların ham petrole toleransını irdelemek için çalışmamızın literatürlerinde de sıklıkla kullanılan Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) testi mantığı ile klasik, steril mikropaklar (96 kuyucuklu, 8x12 cm) kullanıldı. Her bir plakta 12 farklı izolat, toplamda 31 izolat test edildi. Her bir izolat için aynı anda ham petrolün 6 farklı dilüsyonu (%0,5, %1, %5, %10, %25 ve %50 ham petrol) test edildi. Ayrıca, her bir izolat için (+) ve (-) kontroller de oluşturuldu. Mikropakların kuyucuklarına yüklenen içerikler ve konsantrasyonları aşağıda gösterildi.

Tablo 4.2: Ham petrolün 6 farklı dilüsyonu.

A	B	C	D	E	F	G	H
Besiyeri + Bakteri	%50 Besiyeri	%75 Besiyeri	%90 Besiyeri	%95 Besiyeri	%99 Besiyeri	%99.5 Besiyeri	Sadece Besiyeri
(+) Kontrol	+ %50 Ham Petrol	+ %25 Ham Petrol	+ %10 Ham Petrol	+ %5 Ham Petrol	+ %1 Ham Petrol	+ %0,5 Ham Petrol	(-) Kontrol



Şekil 4.1: Literatürlerdeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) testi mantığı ile mikropaklarda gerçekleştirilen ham petrolde yaşayabilen izolatların seçilimi.

İnokülasyon işleminden sonra mikroplaklar topluca 30 °C sıcak odada 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucuklarda parçalanma olup olmadığı kontrol edildi. Kuyucukların ortasında beyaz ve/veya krem rengi oluşumlar bakterilerin petrolü parçaladığını gösterdi ve pozitif sonuç olarak değerlendirildi [Geiselbrecht et al., 1996], [Rahman et al., 2002].

Farklı petrol konsantrasyonlarında kuyucuklarda renk açılması gösterebilen izolatlar tez çalışmasının örnekleri olarak seçildi. Seçilen 7 örnek; İK1-81, İK2-114, İK2-140, İK3-331, İK3-333, K-A23 ve K-A87 kodları ile tanımlanan izolatlar olarak belirlendi. Böylece başlangıçta 698 olan izolat sayısı önce 31'e, daha sonra da 7'ye indirgenmiş oldu.

4. 4. Seçilen İzolatların Stoklarının Atılması

Seçilen izolatlar, Bölüm 4.2'de anlatıldığı şekilde, uygun miktarda TSB içinde, %1'lik inokulasyon miktarı esas alınarak ekildi ve 30 °C sıcak odada çalkalayıcı üzerinde 200 rpm'de çalkalanarak 24 saat büyümeye bırakıldı. Bu süre sonunda kültürler, içerisinde steril %80 gliserol bulunan Eppendorf tüplerine aktarıldı ve -20 °C derin dondurucuda stoklandılar.

4. 5. MIC Testi Mantığı ile Seçilen İzolatların Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Kontrolü

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) testiyle ham petrolü parçalama olasılığı olan ve seçilen izolatlar büyük ölçekli denemeye alınmadan önce bir dizi mikrobiyolojik teste tabi tutuldular. Bunlardan ilki saflıklarının kontrolü olarak belirlendi. Bu amaçla TSB besiyerinde korunan izolatlar önce Triptik Soy Agar (TSA) katı besiyerine damla yayma yöntemi ile ekilerek 30 °C sıcak odada 24 saat inkübasyon kaldırıldı. Sonra her bir izolat için üreme gösteren petrilere öze ile örnekler alınarak saflık kontrolü için ikinci kez TSA besiyerine kesişen çizgi ekim yöntemi ile inokulum yapıldı. Benzer inkübasyon basamaklarını (30 °C, 24 saat) takiben, her bir izolat için tek düşen koloniler büyük ölçekli çalışmada kullanılmak üzere TSA besiyerlerine tekrardan ekildi ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanıldı.

Her bir izolat için saf kültür olduğu kesinleşen izolatlara Gram Boyama uygulandı. Gram Boyama sonucu hazırlanan preparatlar mikroskopta gözlemlendi, morfolojileri incelendi ve mikrografları alınarak Tablo 5.1'de gösterildi.

4. 6. Belirlenen İzolatların Petrol Parçalama Testi

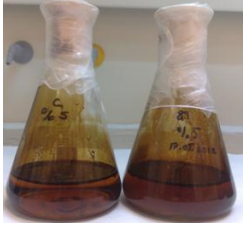
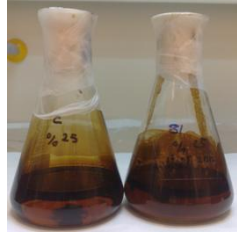





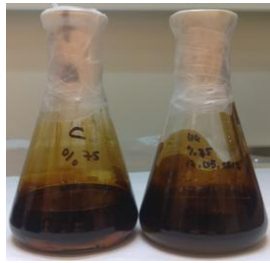

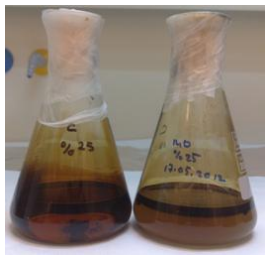

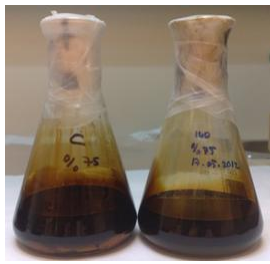
Mikroplaklarda farklı ham petrol konsantrasyonlarında denemeye alınan ve seçilen 7 tane izolat, büyük ölçekli çalışmada kullanılmak üzere çoğaltıldı. Buna göre; Bölüm 4.2 ve 4.4'te anlatıldığı şekilde ön kültürleri önce 2 ml TSB içinde ve daha sonra 10 ml TSB içinde çoğaltıldı. Hazırlanan örnekler yine 30 °C sıcak odada çalkalayıcı üzerinde 200 rpm'de çalkalanarak 24 saat büyümeye bırakıldı.

Büyük ölçekli çalışmada bütün örneklerin aynı yoğunlukta bakteri içermesi ve bakterilerin petrol parçalamaya aynı şartlarda başlaması için optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümleri yapıldı. OD₆₀₀ 'leri eşitlenerek her bir 250 ml erlene ekim yapıldı. Denemede her bir izolat için bu sefer ön denemeden farklı olarak %5, %25, %50 ve %75 petrol oranı içeren deney düzenekleri kuruldu. Her bir dilüsyon için birer tane de (+) ve (-) kontrol erleni hazırlandı. Erlen içerikleri ile görselleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.2'de gösterildi.

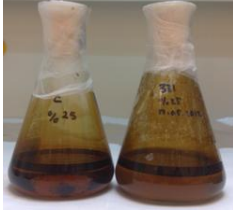
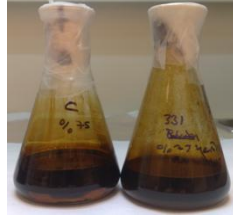
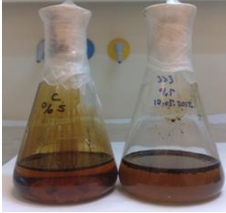


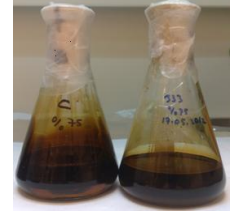

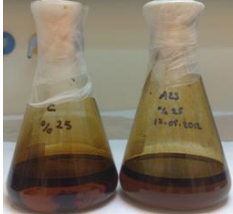


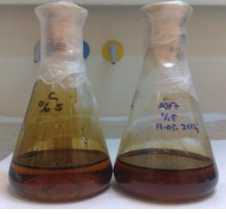
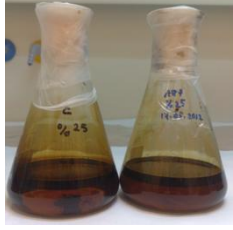


Tablo 4.3: Deney düzeneklerinin kurulması.

Erlen Hacmi: 250 ml. Havalandırma Oranı: 3/5 100 ml. → Bakteri&Besiyeri + Petrol 150 ml. → Havalandırma								
	%5		%25		%50		%75	
Kontrol	Petrol	5 ml.	Petrol	25 ml.	Petrol	50 ml.	Petrol	75 ml.
	Bakteri	-	Bakteri	-	Bakteri	-	Bakteri	-
	Besiyeri	95 ml.	Besiyeri	75 ml.	Besiyeri	50 ml.	Besiyeri	25 ml.
Örnek	Petrol	5 ml.	Petrol	25 ml.	Petrol	50 ml.	Petrol	75 ml.
	Bakteri	10 ml.	Bakteri	10 ml.	Bakteri	10 ml.	Bakteri	10 ml.
	Besiyeri	85 ml.	Besiyeri	65 ml.	Besiyeri	40 ml.	Besiyeri	15 ml.

Erlenler, ham petrol likit petrol gazı da (LPG) içerdığı için, çeker ocak içine yerleştirildi. İlk 5 gün çalkalayıcılar üzerinde 150 rpm'de, kalan 25 gün 22-25 °C oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve her 24 saate bir kez (mümkünse aynı saatte) besiyeri yüzeyindeki petrol tabakası kalınlığı milimetrik (mm) olarak ölçüldü ve kaydedildi [Rahman et al., 2002]. Buna ek olarak görülen bütün fiziksel değişiklikler (koloni özellikleri, renk değişimleri, köpüklenmeler, sıvılaşmalar, tabakalaşmalar, partikül, çökelme oluşumları ve yoğunlaşmaları vb.) not edildi. Bunlara yönelik sonuçlar irdelendi ve grafiklere aktarıldı.

İzolat Kodu	%5 Ham Petrol + %95 Besiyeri	%25 Ham Petrol + %75 Besiyeri	%50 Ham Petrol + %50 Besiyeri	%75 Ham Petrol + %25 Besiyeri
İK1-81				
İK2-114				
İK2-140				

Şekil 4.2: Büyük ölçekli çalışma için %5, %25, %50 ve %75 ham petrol konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin sadece besiyeri ve ham petrol içeren (-) kontrol erlenleri ile görüntüleri.

İzolat Kodu	%5 Ham Petrol + %95 Besiyeri	%25 Ham Petrol + %75 Besiyeri	%50 Ham Petrol + %50 Besiyeri	%75 Ham Petrol + %25 Besiyeri
İK3-331	YOK		YOK	
İK3-333				
K-A23				
K-A87				

Şekil 4.2: Devam.

4. 7. Büyük Ölçekli Çalışmanın Sonlandırılması, Bakterilerin Deneme Ortamından Uzaklaştırılmaları ve Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesi

Mikroplaklarda ön denemesi yapılarak seçilen ve daha sonra son derece toksik bir madde olan ham petrolün %5, %25, %50 ve %75 konsantrasyonları içeren erlenlerde, 30 gün boyunca, 22-25°C oda sıcaklığında, petrol katmanı kalınlığı ölçümleri alınması ile gerçekleştirilen büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon denemesinin tamamlanmasını takiben, bakterilerin ayrılması ve kalan içerikteki petrol bileşenlerinin irdelenmesi için süzme işlemi yapıldı. Çalışma sonunda kıvamı oldukça değişen deney ortamlarında ilk olarak kaba süzme (ön filtrasyon) işlemi gerçekleştirildi. Bu kaba süzme işlemi için filtre kâğıdı kullanıldı. Süzülen örnekler 100-150 ml hacimli steril erlenlere aktarıldı. Erlenlerin ağzı parafilm ile kapatılıp, etiketlenerek +4 °C 'ta buzdolabında korumaya alındı. Böylece büyük partiküller elemine edildi. Böylece ikinci süzme aşamasında bakterilerin ortamdan rahat alınması için gereken kaba temizlik yapılmış oldu.

İkinci süzme işlemi her parçası otoklavlanarak steril edilmiş vakum pompalı membran filtre düzeneği yardımıyla 0,45 µm por çaplı Sartorius selüloz filtreler kullanılarak yapıldı. Bu süzme işlemi sonunda elde edilen sıvılar steril falkon tüplere aktarıldı, etiketlenip parafilm ile sarılarak +4 °C 'ta saklandı. Elde edilen süzüntüler Toplam Petrol Hidrokarbon (TPH) analizlerinin Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi (GC-MS) ile yapılabilmesi için GTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü'ne gönderildi.

Bu aşamada selüloz filtrelerde kalan deneme bakterileri ise son derece toksik bir madde olan ham petrolden ne kadar etkilendi diye görmek için yeniden bir dizi mikrobiyolojik teste alındılar. Bakterileri çalışma ortamından ayıran, süzme işlemi sırasında kullanılan selüloz filtrelerin her biri, TSA içeren steril petrilere, steril bir pens yardımıyla yerleştirildi. Petriler 30 °C sıcak odada 24 saat inkübasyona bırakıldı. Membran filtre düzeneğinin her parçası, her süzme işlemi öncesinde ayrı ayrı steril edilerek kullanılmış, böylece kontaminasyon engellenmiştir. Sıcak odada büyümeye bırakılan örnek petrileri 24 saat sonunda incelendi ve üremeler tespit edildi. Yoğun üreyen bakterilerin saf olarak elde edilmesi için TSA içeren petrilere öze ile kesişen çizgi yöntemi ile yeniden ekimler yapıldı.

Böylece 1 aylık deneme sonucu bakterilerde olan değişiklerin gözlenmesi planlanmış, alınan örnekler tek koloni olarak uygun şartlar ve sürede elde edilmiştir. Çalışma boyunca tüm ekimler steril çalışma akışına uygun şekilde, yüzey sterilizasyonu yapılmış steril kabin içerisinde, UV ile steril edilen izolasyon odasında, ateş yanında ve alevde steril edilmiş öze yardımı ile yapılmıştır.

Bu adımı takiben, çalışmada kullanılan 7 izolatın TSA içeren besiyerlerine ekimleri yapıp 30 °C sıcak odada 24 saat inkübasyona kaldırıldıktan sonra, üreyen bakterilerin koloni morfolojileri ve Gram boyamaları yeniden yapıldı. Elde edilen sonuçlar, deneme öncesi sonuçlar ile karşılaştırılarak irdelendi. Bu aşamada Gram boyama için klasik uygulama basamakları takip edildi. Buna göre, bakterilerin her biri ateşte steril edilmiş öze yardımı ile üzerinde bir damla steril su bulunan lamlara yayıldı. Steril kabin içinde kurutulan lamlara, sırasıyla; kristal viyole, lügol ve safranin boyaları önerilen sürelerde uygulandı. Örnekler boyama basamakları arasında distile su ile yıkandı. Boyamayı takiben kuruyan örnekler Nikon ECLIPSE 80i ışık mikroskopunda immersiyon yağı eklenerek, 100X objektifte incelendi ve fotoğrafları alındı. Gram boyama sonuçlarına göre kırmızı-pembe boyalı izolatlar Gram negatif, menekşe rengi-mor boyalı örnekler Gram pozitif olarak kayıt edilerek Tablo 5.2'de gösterildi.

Katı besiyerinde tek koloni halinde elde edilen örnekler Bölüm 4.2 ve 4.4'teki aynı koşullar esas alınıp çoğaltılarak VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi yardımı ile cins ve tür düzeyinde tanımlanmak üzere +4 °C 'ta koruma altına alındılar.

4. 8. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizleri

Örneklerin ham petrolü parçalayıp parçalamadığının tespiti için deneme sonrasında elde edilen, bakteriden arındırılmış süzüntüler Toplam Petrol Hidrokarbon (TPH) analizi için (-) kontrol olan besiyeri ve (+) kontrol olan Ham petrol ile birlikte Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi (GC-MS) Analizleri'ne alındılar. Buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilen örnekler soğuk zincir ile kromatografik analizler için GTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü'ne gönderildiler ve burada analiz edildiler.

- TPH Analiz Yöntemi ve GC/MS Fırınlama Şartları

Soğuk zincirde gelen örnekler, getirildikleri kapaklı schott şişelerden, 20 ml örnek ayırma şişesine alındı. HCl ile pH'ı 2'ye ayarlandı. Üzerine 30 ml hexan eklenip çalkalandı. Temiz faz bir vialle alınıp, her bir örneğe 20 ml daha hexan eklenip aynı işlem tekrarlandı. Florisil kolonundan geçirilip üzerine içinde mevcut suyu tutsun diye sodyum sülfat eklendi. Sayısal değer bakılmadığı için normalde yapılması gereken rotary evaporatörde 5 ml'ye düşürüp azot gazı ile 1 ml'ye uçurma işlemi yapılmadı. Ancak örneklerin seyrelme yüzdelerine göre tüm örneklerin aynı miktarlarda olması için hacim ayarlaması yapıldı. Örneğin; %5 seyrelmiş örnek, %50 seyrelmiş örneğe göre 10 kat daha fazla yoğunlaştırıldı. Bunun amacı en son GC/MS'te elde edilen kromatogramı üst üste bindirerek kıyaslama olanağı sağlanmasını mümkün kılmaktır.

Örneklerin GC/MS analiz basamakları ise aşağıda özetlenmiştir. Buna göre; örnekler Gaz Kromatografisi (Agilent 6890N) Kütle Spektrometresi (Agilent 5975C, inert MSD) cihazı kullanılarak analiz edildi. Kapiler kolon (HP-5ms, 15 m, 0.25 mm, 0.25 µm) kullanıldı. Fırın 40 °C 'de iken analize başlanmış sonra 20 °C /dak ile 180 °C'ye çıkarılıp 2 dakika bekletildikten sonra 10 °C/dak ile 310 °C'ye çıkarıldı ve o sıcaklıkta 4 dakika bekletilerek analiz sonlandırıldı.

4. 9. İzolatların VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanması

VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi, çevresel ve endüstriyel mikrobiyolojide mikroorganizmaların tür düzeyinde 5-10 saat arasında belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Üzerinde farklı biyokimyasal, karbon ve enzim testleri ile ilgili 60-65 arasında farklı testi içeren ve sonuçlarını kalorimetrik kartlar sayesinde gösteren, dünya çapında pek çok saygın kuruluşta kabul gören bir mikroorganizma tanımlama sistemidir. Bu sistemde farklı kart tipleri kullanılır. Bunlar arasında en çok kullanılanları Gram negatif (GN) ve Gram pozitif (GP) fermentasyon yapan ve/veya yapmayan bakteri kartları, Maya ve Maya benzeri mikroorganizmaları (YST) tanımlayan kartlar ve Gram pozitif spor içeren basil formu bakteri (BCL) kartlarıdır. Sistemin veri bankası iyi karakterize edilmiş mikroorganizma verilerine dayanır. Bu bilgiler Amerikan Hücre/Kültür Tiplendirme

(koleksiyon) merkezi (ATCC) ve saygın üniversitelerin doğrulanmış verilerine dayandırılarak oluşturulmuştur. Hemen her yıl güncellenmektedir.

GN kartları ile 160'dan fazla mikroorganizma taxa'sı ve 562'den fazla izolatu; GP kartları ile 120'den fazla taxa, ortalama 457 türü, YST kartları ile 54'ten fazla taxa, 623'ten fazla maya ve maya benzeri mikroorganizma türünü 64 farklı biyokimyasal, karbon ihtiyacı, azot ve enzim testi yardımıyla tanımlanmaktadır. BCL kartları ile 42 taxa ve yaklaşık 436 türü, 63 farklı test yardımı ile cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmek mümkündür. Sonuçlar bilinen, iyi karakterize edilmiş kütüphane türlerinin kalorimetrik kart sonuçlarının, bilinmeyen türün kart sonuçları ile bilgisayar ortamında karşılaştırılması ve yüzdeler değeri ile tanımlanır [Web 4, 2013]. Tanımlama olasılıkları ve güvenilirlik dereceleri Tablo 4.4'te görülmektedir.

Tablo 4.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sisteminin tanımlama güvenilirliği tablosu.

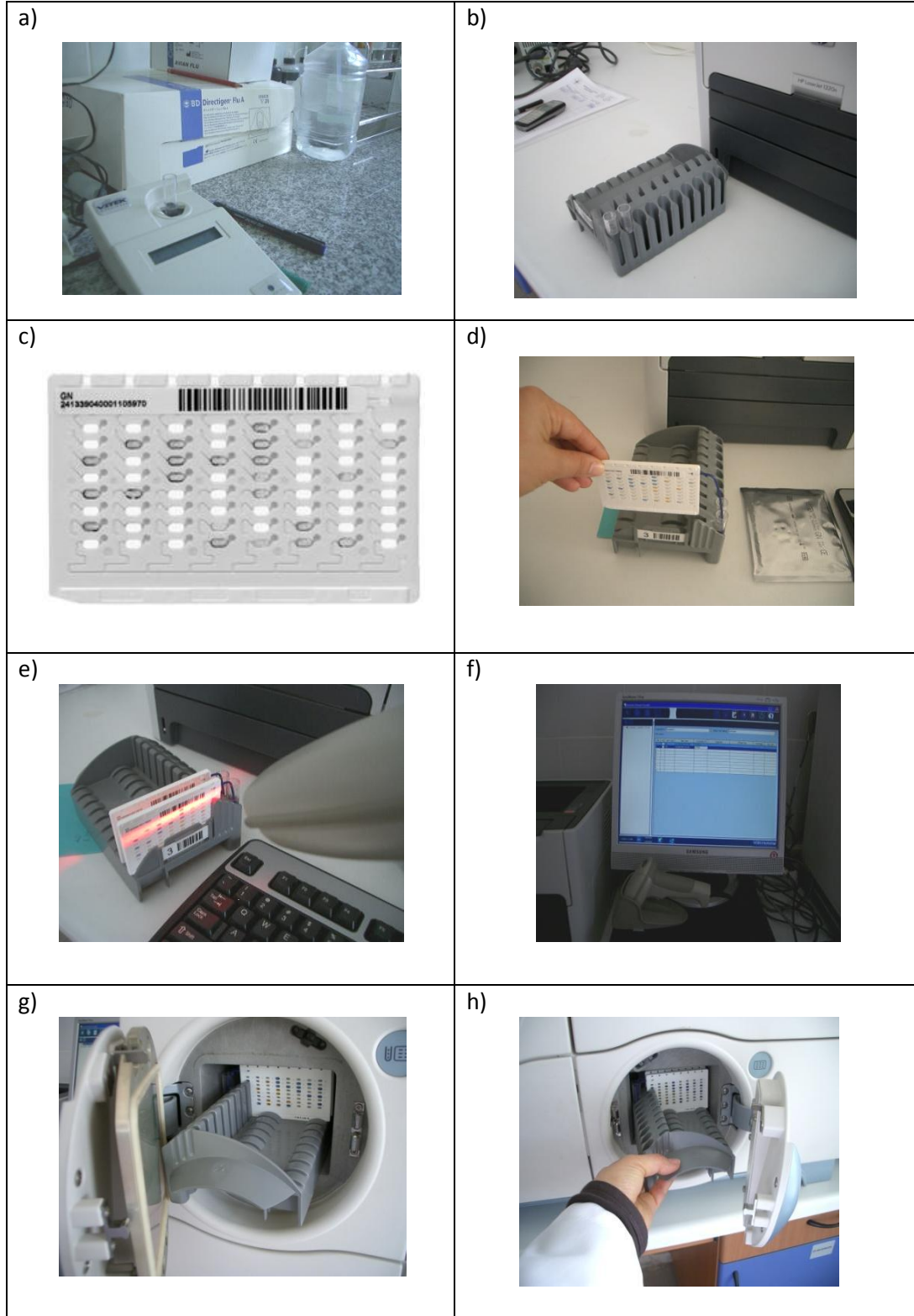
Tanımlamanın Güvenilirlik Karşılığı	Tercih	% Olasılığı	Yorumlar
Excellent / Mükemmel	1	96'dan 99'a	N/A
Very Good / Çok iyi	1	93'ten 95'e	N/A
Good / İyi	1	89'dan 92'ye	N/A
Acceptable / Kabul edilebilir	1	85'ten 88'e	N/A
Low Discrimination / Zayıf Tanımlama	2'den 3'e	Sonuçların toplamı kesin bir taxa'yı vermemiştir.	2 veya 3 taxa'nın temel özelliklerini gösteriyordur.
Unidentified Organism / Tanımlanamamış Organizma	>3 veya 0	N/A Belirgin bir özellik göstermemiştir.	Ya 3'ten fazla taxa'nın temel özelliklerini gösteriyordur ya da henüz tanımlanamamış türdür.

Çalışmada kullanılan ve Gram boyaması yapılan 7 örnek, kontaminasyon kontrolü ekimleri takiben, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde bulunan ve Şekil 4.3'te gösterilen VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile tanımlanmaya alındı.



Şekil 4.3: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi.

Tanımlanacak bakterilerin TSA besiyerinde 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerden steril kabin içerisinde, tek kullanımlık plastik steril öze yardımıyla örnekler alınarak içinde steril tuzlu su (Saline Solution) bulunan VITEK Kompakt tüplerine aktarıldı ve süspansiyonun yoğunluğu Şekil 4.4.a)'da resmedilen yoğunluk ölçme cihazı yardımı ile 0,45-0,60 aralığındaki McFarland değerlerine ayarlandı. Bu tüpler Şekil 4.4.b)'deki cihazın kendine ait kasetine yerleştirildi. Cihaza tanımlama yapmak üzere izolatların yüklenme basamağında, Şekil 4.4.c)'de resmedilen ve Gram boyama sonuçlarına göre seçilen uygun kartlar (Gram Negatif kartı/GP-21341 ve Gram Pozitif kartı/GP-21342) kullanıldı. Gram boyanma özelliği net belirlenemeyen örnekler için hem Gram pozitif hem de Gram negatif kartlar uygulandı. Kartlar, Şekil 4.4.d)'deki kasetlere tüplerdeki sıraya uygun olarak yerleştirildi. Ardından Şekil 4.4.e)'deki gibi cihazın işletim sistemine bağlı olarak kartların üzerindeki barkotların okunması ile tanımlanmaya başlandı. Doğru okuma sonucunun alınması için örneklerin çalışma kodları cihaza el ile girildi ve örnekler Şekil 4.4.f)'te olduğu gibi sisteme tanıtıldı. Cihaz, Şekil 4.4.g)'de gösterilen uygun bölmesine yerleştirilen bu kartlara, tüplerden dolum yaptı. Kartların izolat süspansiyonu ile doldurulmasını takiben kartları taşıyan kaset bu sefer cihazın başka bir bölümünde bulunan ve kartların cihaz tarafından kabul edilerek inkübasyona alındığı bölme Şekil 4.4.h)'deki gibi yerleştirildi. İnkübasyondan sonra sonuçlar otomatik olarak yazıcıdan çıktı olarak alındı. Tanımlama basamağının bitiminde işi biten kartlar atık kutusunda toplanarak imha edildi.



Şekil 4.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile İzolatların Tanımlanmasında İzlenen Basamaklar. a) McFarland Densitometre cihazı. b) VITEK kompakt tüplerinin yerleştirildiği kaset. c) VITEK kartı. d) VITEK kartının kasete yerleştirilmesi. e) Kart barkotlarının okutulması. f) Örneklerin cihaza el ile tanıtımı. g) Kartların örnek süspansiyonu ile doldurulması için cihaz haznesine yerleştirilmesi. h) Kartların tanımlanmak üzere inkübasyon bölmesine yerleştirilmesi.

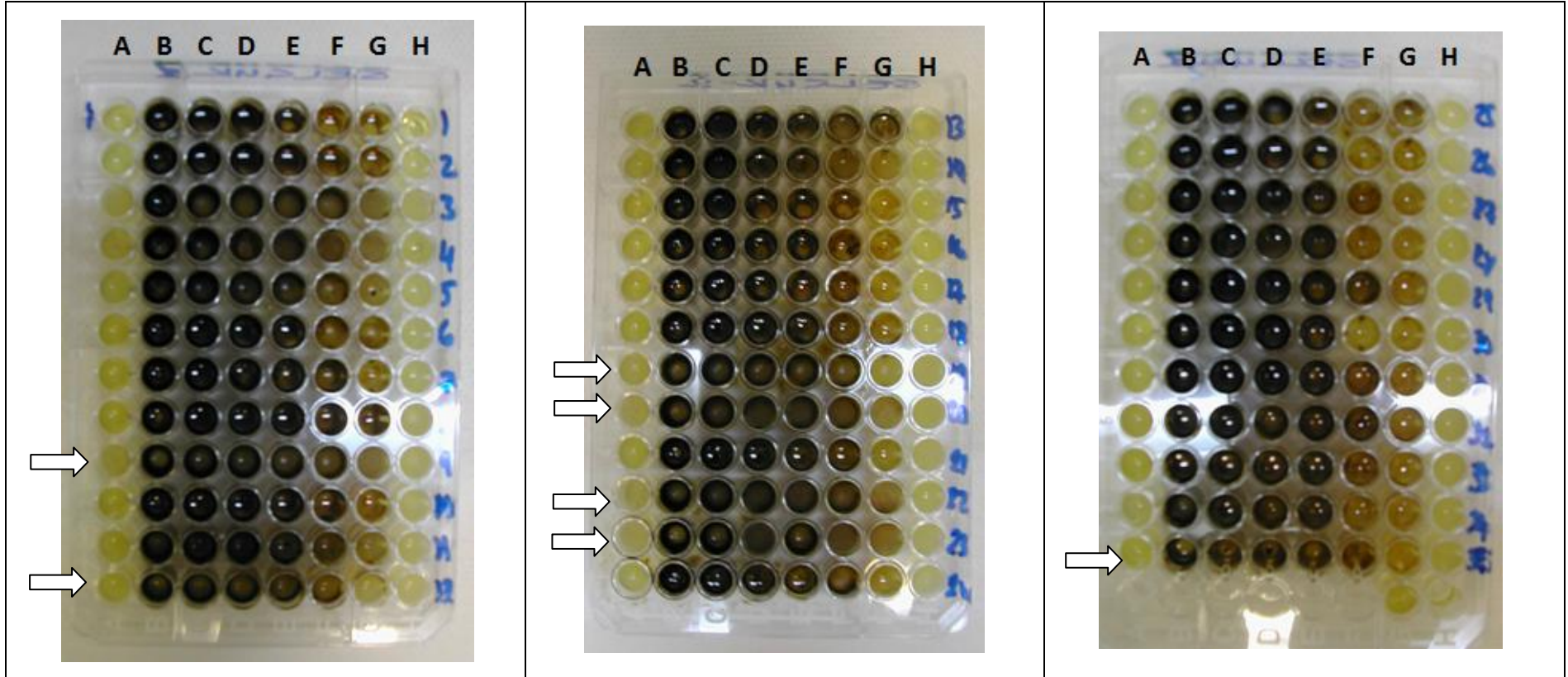
5. BULGULAR

5. 1. Ham Petrolde Yaşayabilen İzolatların Mikroplaklarda Seçilimine Ait Bulgular

Petrolün bileşimindeki PAH'lar tek hücreli organizmalardan başlayarak balıklara ve son olarak da insanlara kadar besin zinciri yoluyla taşınırlar [Artüz, 1991]. Farklı ekosistemlerde yaşayan değişik canlı türlerinin petrol bileşiklerine karşı duyarlılıkları da farklıdır. Bu bileşikler deniz canlıları üzerinde toksik etki yaratıp flora ve faunanın kademeli olarak yok olmasına neden olur [Web 1, 2015].

Bu mantıktan yola çıkarak çalışmanın başında elimizdeki deniz bakterisi izolatlarının ham petrole toleransı irdelendi. Şeker'in [Şeker, 2009] doktora tez çalışması kapsamında; Marmara Denizi (M), Karadeniz (K) ve İzmit Körfezi (İK)'ni temsil eden, şehir ve ev deşarjı almayan istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilmiş 698 deniz bakterisi izolatu içerisinde literatür bilgileri ışığında (gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif) tez çalışmamızda kullanılacak örneklerin seçilimi için bir ön eleme yapıldı. Ardından bu özelliklere sahip, belirlenen 31 adet deniz bakterisinin saflığı kontrol edildikten sonra ham petrole karşı toleranslarının test edilmesi için mikroplak testine geçildi.

Mikroplak testi; literatürlerde de sıklıkla kullanılan Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) testi mantığı ile gerçekleştirildi. Bu mikroplak ile seçim denemesi; ham petrolün canlılar için çok toksik bir madde olması nedeniyle ya bakterilerin aşırı toleranslı olarak bu ortamda yaşaması ya da ham petrolden etkilenmemesi ve/veya bir şekilde onun zararlı etkilerini engelleyecek metabolik bir proses içermesi gerektiği mantığına dayanarak kurgulandı ve uygulandı. İnkübasyon adımını takiben %50 ham petrol + %50 besiyeri içeren B kuyucuklarında en fazla renk açılması görülen 7 bakteri izolatu, büyük ölçekli ve daha uzun süreli esas tez denemesinde kullanılmak üzere Şekil 5.1'de görüldüğü gibi seçildi. Bu örnekler; İK1-81, İK2-114, İK2-140, İK3-331, İK3-333, K-A23 ve K-A87 olarak belirlendi.

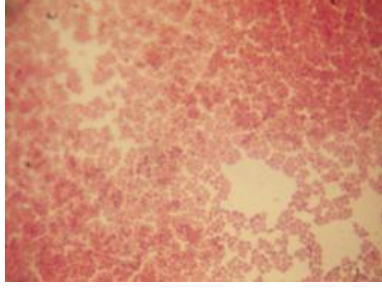


Şekil 5.1: Farklı mikroplaklarda gerçekleştirilmiş ham petroliçinde yaşayabilen izolatların seçilimi ve (→) işaretli seçilmiş örneklerin görüntüsü.


5. 2. Seçilen İzolatların Büyük Ölçekli Çalışma Öncesi Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesine Ait Bulgular

Mikroplaklarda farklı ham petrol konsantrasyonlarıyla denemeye alınan ve %50 ham petrol içeren kuyucuklarda parçalanma ve renk açılması sonuçlarına göre seçilen 7 tane izolatın, büyük ölçekli (250 ml) erlen çalışmasına alınmadan önce Gram Boyamaları yapıldı, bazı temel mikrobiyolojik ve mikroskopik hücresel özellikleri incelendi. Mikrografları alınarak Tablo 5.1'de gösterildi.

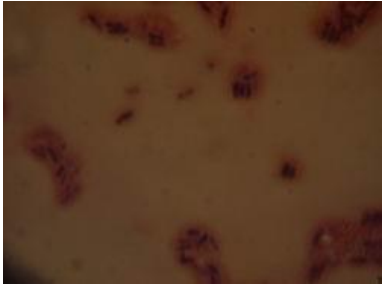
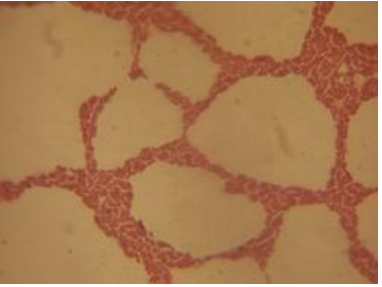
Tablo 5.1: Çalışmada kullanılmak üzere seçilen bakteri örneklerine uygulanan Gram boyamayı takiben, mikroskop yardımıyla elde edilen bazı morfolojik ve mikrobiyolojik özelliklere ait sonuçlar.

İzolat No: İK1-81	
Mikrografı:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	İkili kok (diplokok) veya diplokokobasil.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	++
Koloni Görünümü:	Dairesel, sarımsı koloniler.
Koloni Kenarı:	Düz
Koloni Yüksekliği:	Yüksek konveks
Koloni yüzeyi:	Düz parlak

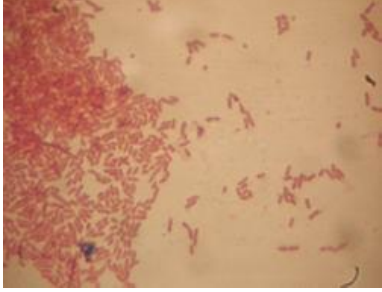
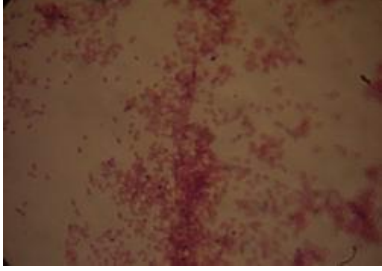
Tablo 5.1: Devam.

İzolat No: İK2-114	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	İkili kok (diplokok) veya diplokokobasil, ince küçük basil yapılı.
Oksidaz Testi:	+/-
Katalaz Testi:	++
Koloni Görünümü:	Parlak, beyaz, yüzeye düzensiz yayılmış koloniler.
Koloni Kenarı:	Dalgalı
Koloni Yüksekliği:	Düz-yüksek
Koloni yüzeyi:	Düz-parlak
İzolat No: İK2-140	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	İkili kok (diplokok) veya diplokokobasil, ince küçük basil yapılı.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	++
Koloni Görünümü:	Mat, beyaz, yaygın koloniler.
Koloni Kenarı:	-
Koloni Yüksekliği:	Yüksek-konveks
Koloni yüzeyi:	Noktalı-parlak

Tablo 5.1: Devam.

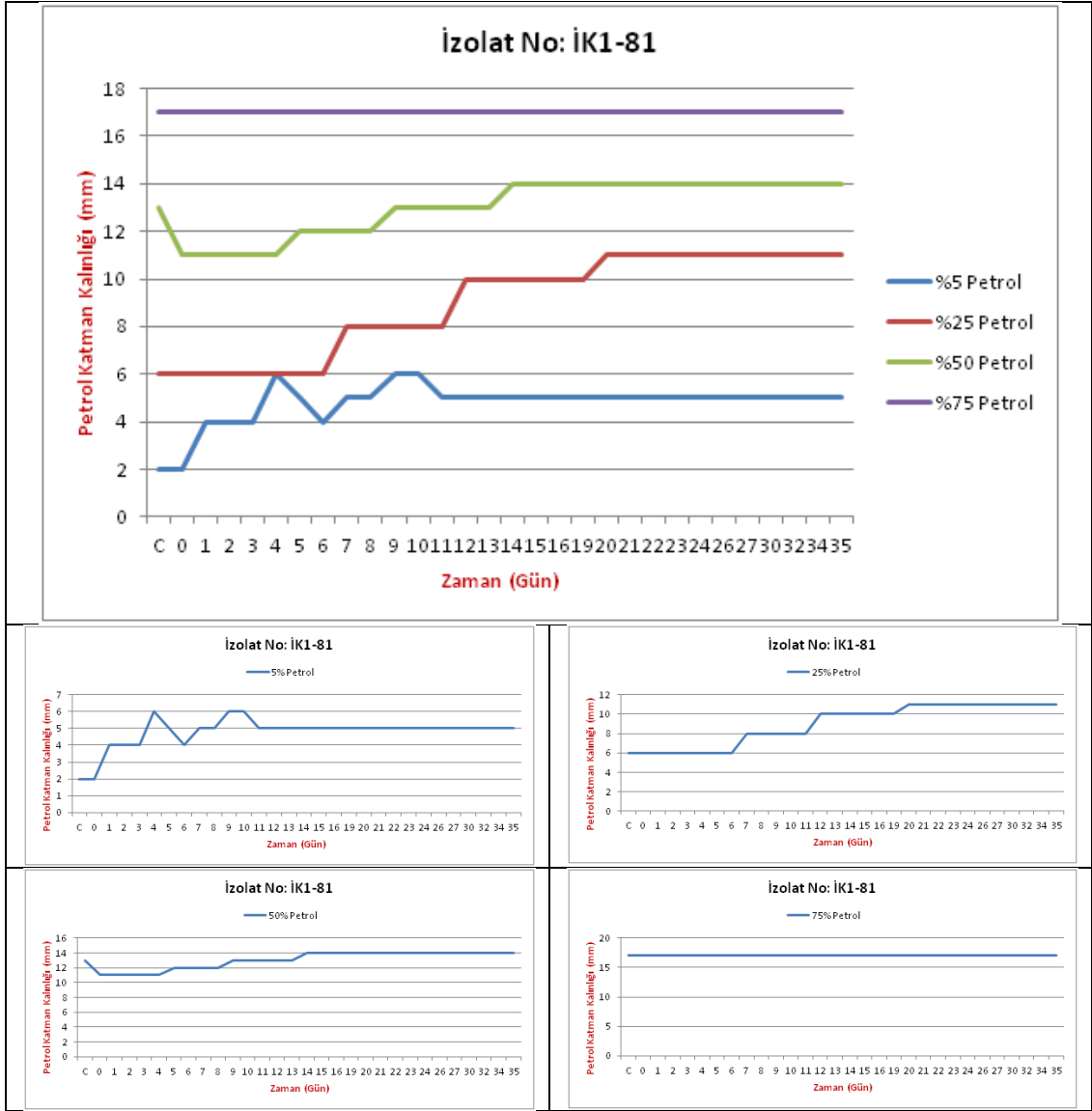
İzolat No: İK3-331	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Basil, mukozal madde üretimi var gibi.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	++++
Koloni Görünümü:	Düzensiz koloniler.
Koloni Kenarı:	Flamentli-loblu
Koloni Yüksekliği:	Yastıksı
Koloni yüzeyi:	Dalgalı
İzolat No: İK3-333	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Basil, mukozal madde üretimi var gibi.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	++++
Koloni Görünümü:	Düzensiz koloniler.
Koloni Kenarı:	Loblu-dalgalı
Koloni Yüksekliği:	Yüksek
Koloni yüzeyi:	Pürüzlü, mat, parlak.

Tablo 5.1: Devam.

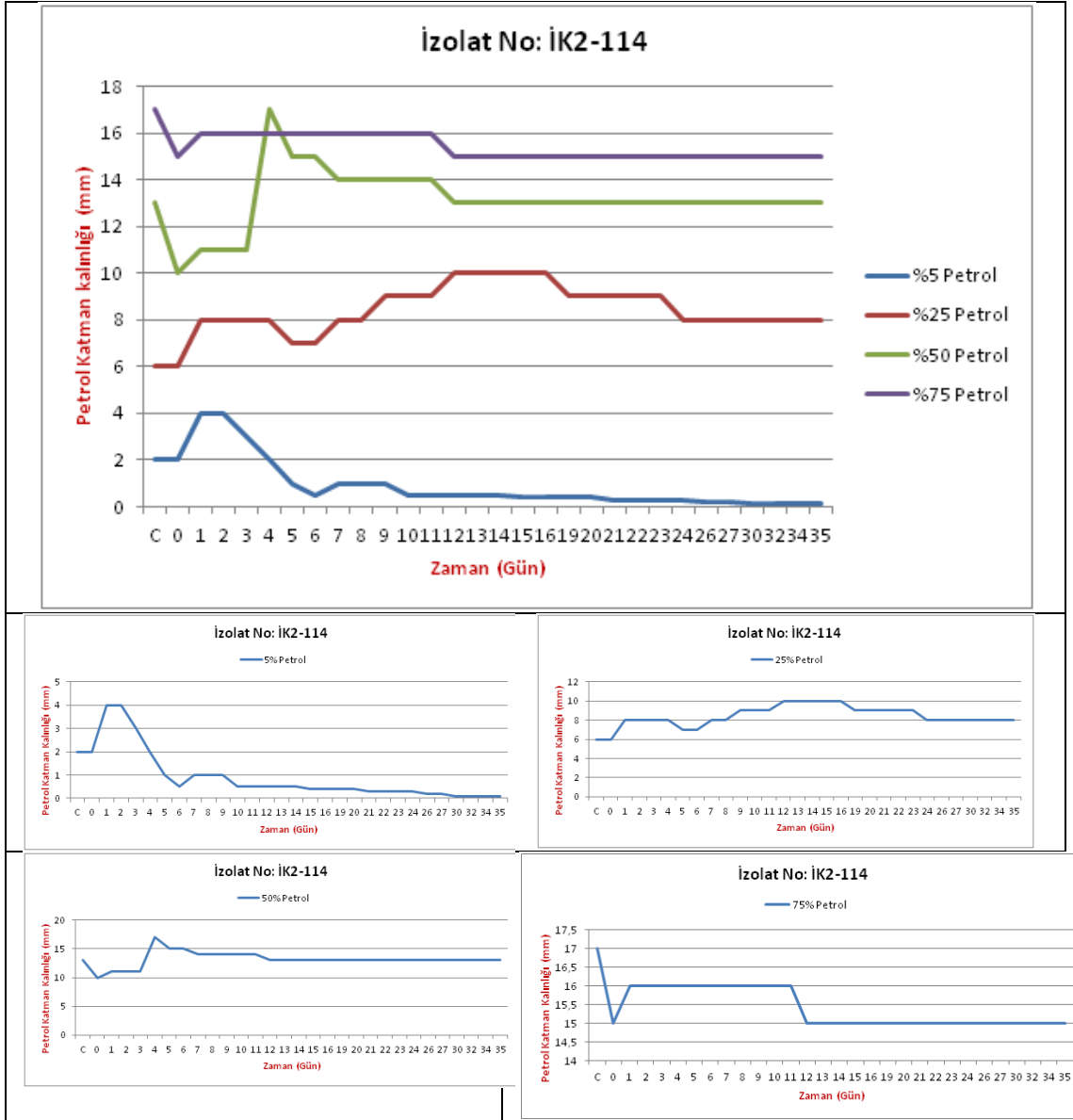
İzolat No: K-A23	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Basil yapılı
Oksidaz Testi:	+/-
Katalaz Testi:	+/-
Koloni Görünümü:	Noktalı, koyu sarı pigmentli, tüm petriye dağılmış.
Koloni Kenarı:	Düz
Koloni Yüksekliği:	Konveks
Koloni yüzeyi:	Kuru, tozumsu.
İzolat No: K-A87	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Kok, kokobasil yapılı.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	++++
Koloni Görünümü:	Noktalı, sarı-beyaz, tüm petriye yayılmış.
Koloni Kenarı:	?
Koloni Yüksekliği:	Düz-yüksek
Koloni yüzeyi:	Tozumsu-parlak

5. 3. Seçilen İzolatlarla Gerçekleştirilen Büyük Ölçekli Çalışmaya Ait Bulgular

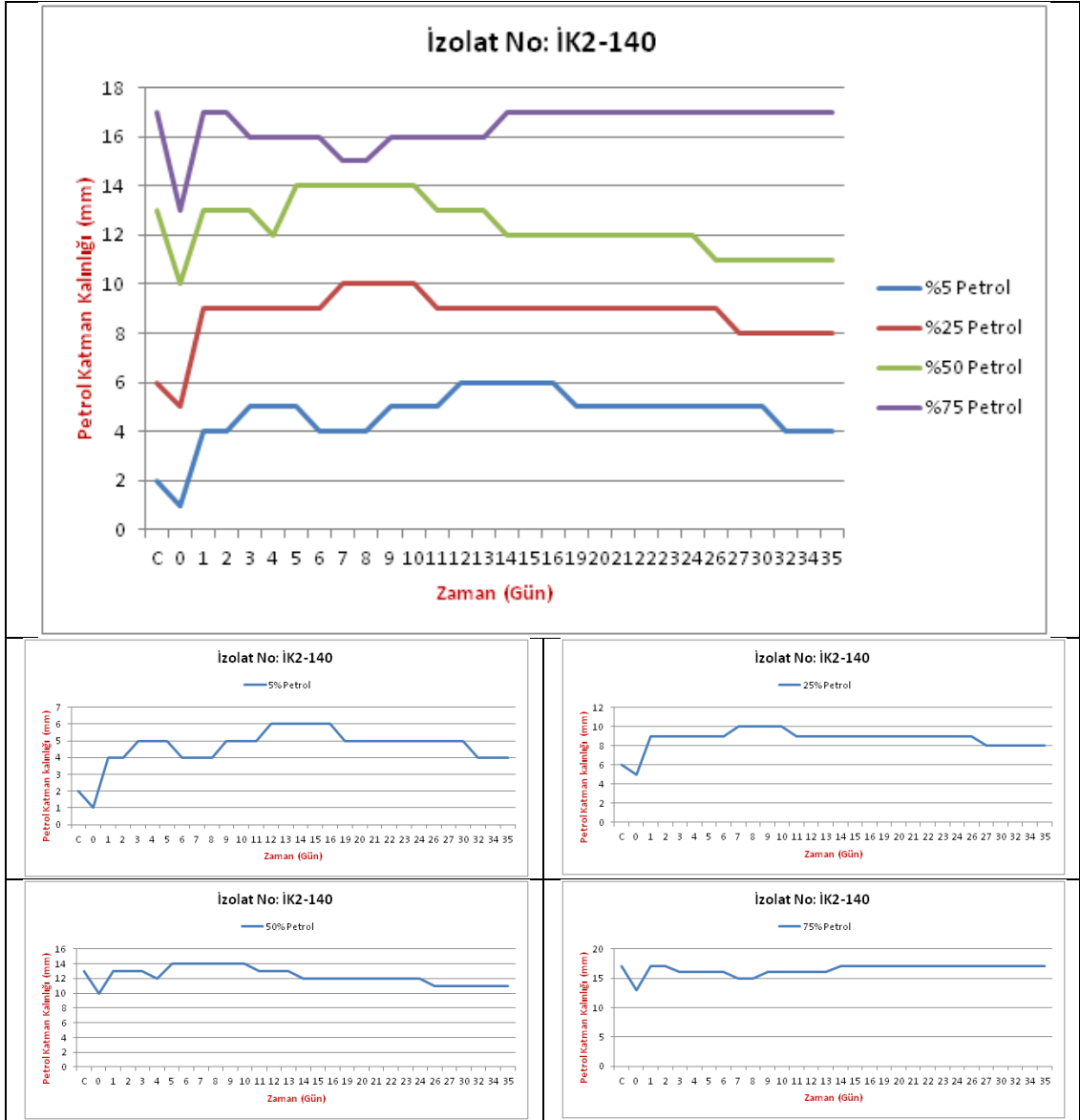
Mikroplaklarda farklı ham petrol konsantrasyonlarında denemeye alınan ve seçilen 7 tane izolat, “Ham petrole toleranslı mı? Yoksa gerçekten metabolik olarak ham petrolü işleyebiliyor mu?” sorusunu aydınlatmak için 250 ml büyük ölçekli erlenlerde, %5, %25, %50 ve %75 ham petrol konsantrasyonlarıyla, 22-25 °C oda sıcaklığında, bir (1) ay süreyle denemeye alındılar. Her gün besiyeri yüzeyindeki petrol tabakası kalınlığı milimetrik (mm) olarak ölçüldü ve grafikler yardımıyla aşağıdaki şekillerde gösterildi.



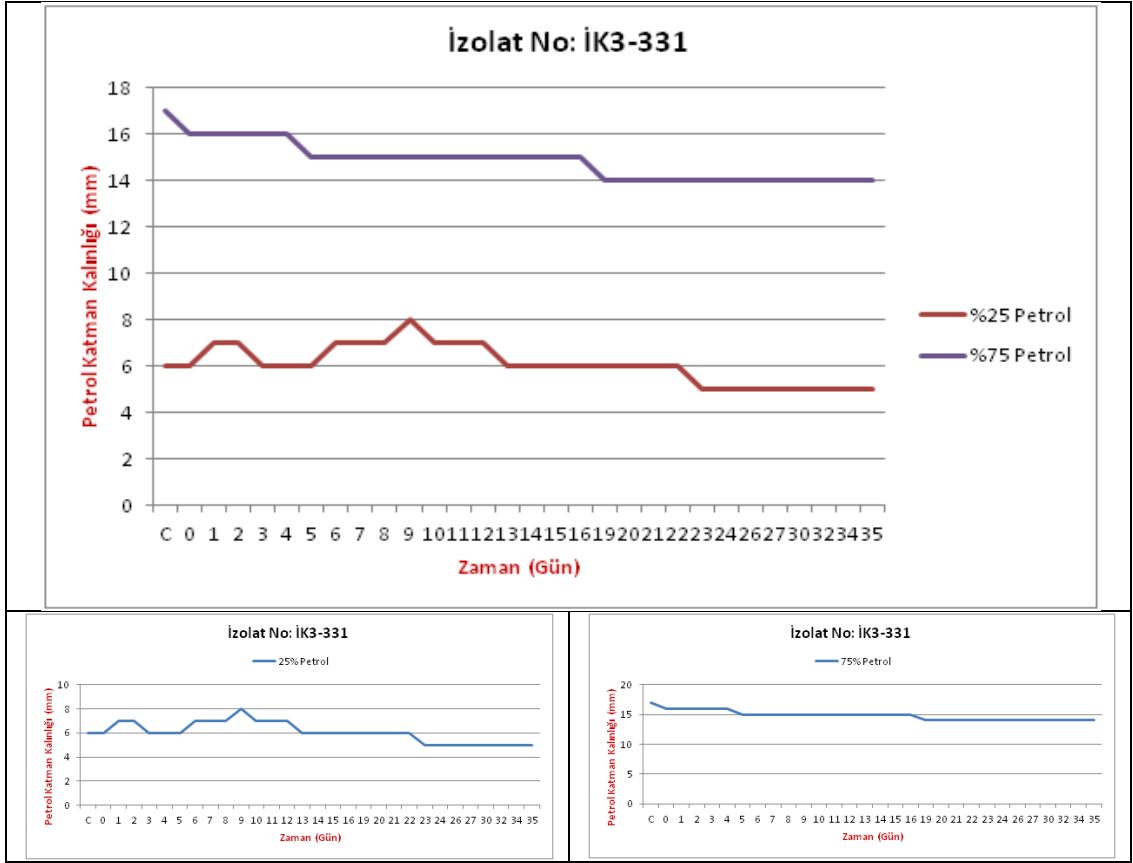
Şekil 5.2: İzolat İK1-81 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



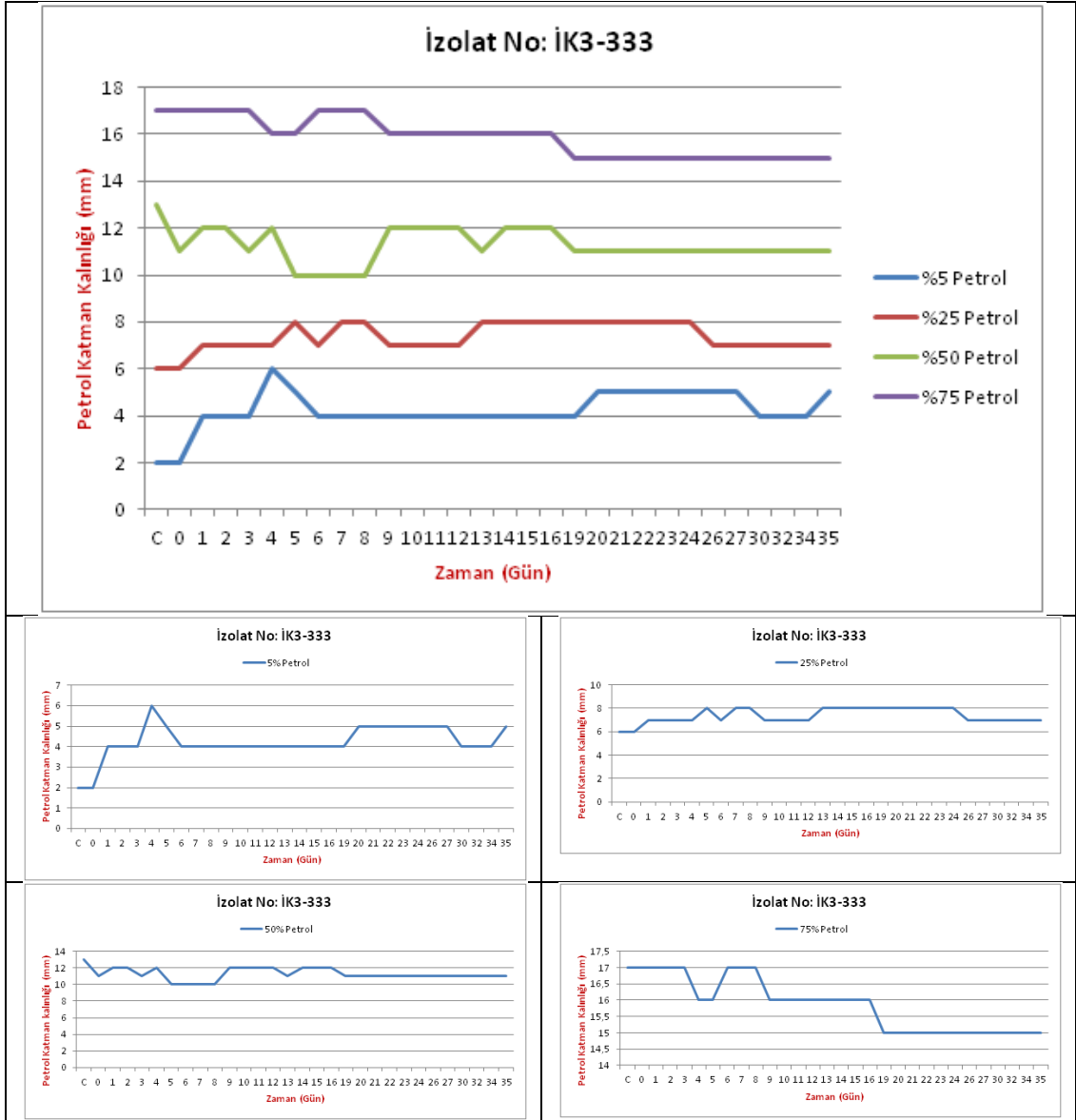
Şekil 5.3: İzolat İK2-114 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



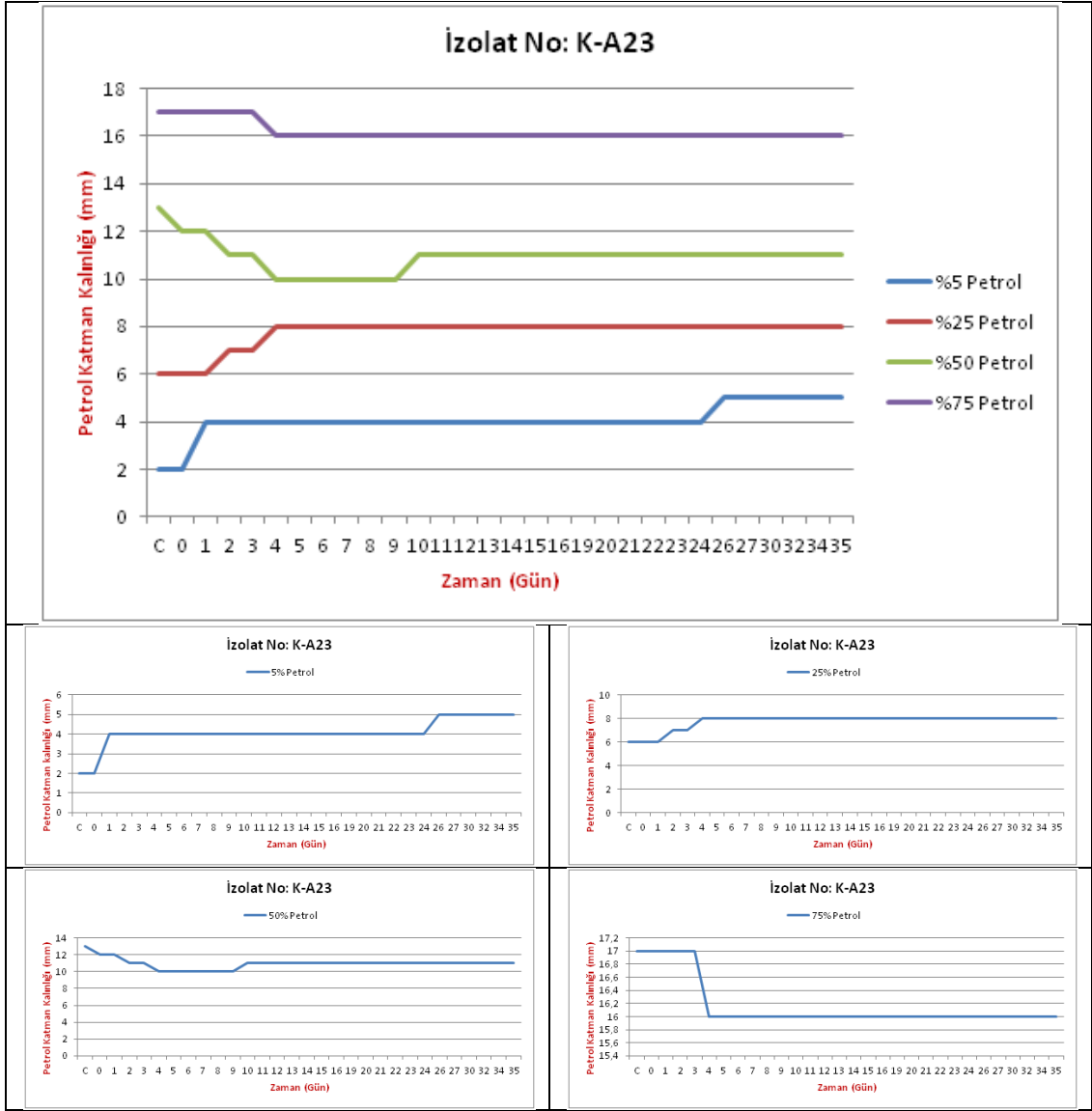
Şekil 5.4: İzolat İK2-140 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



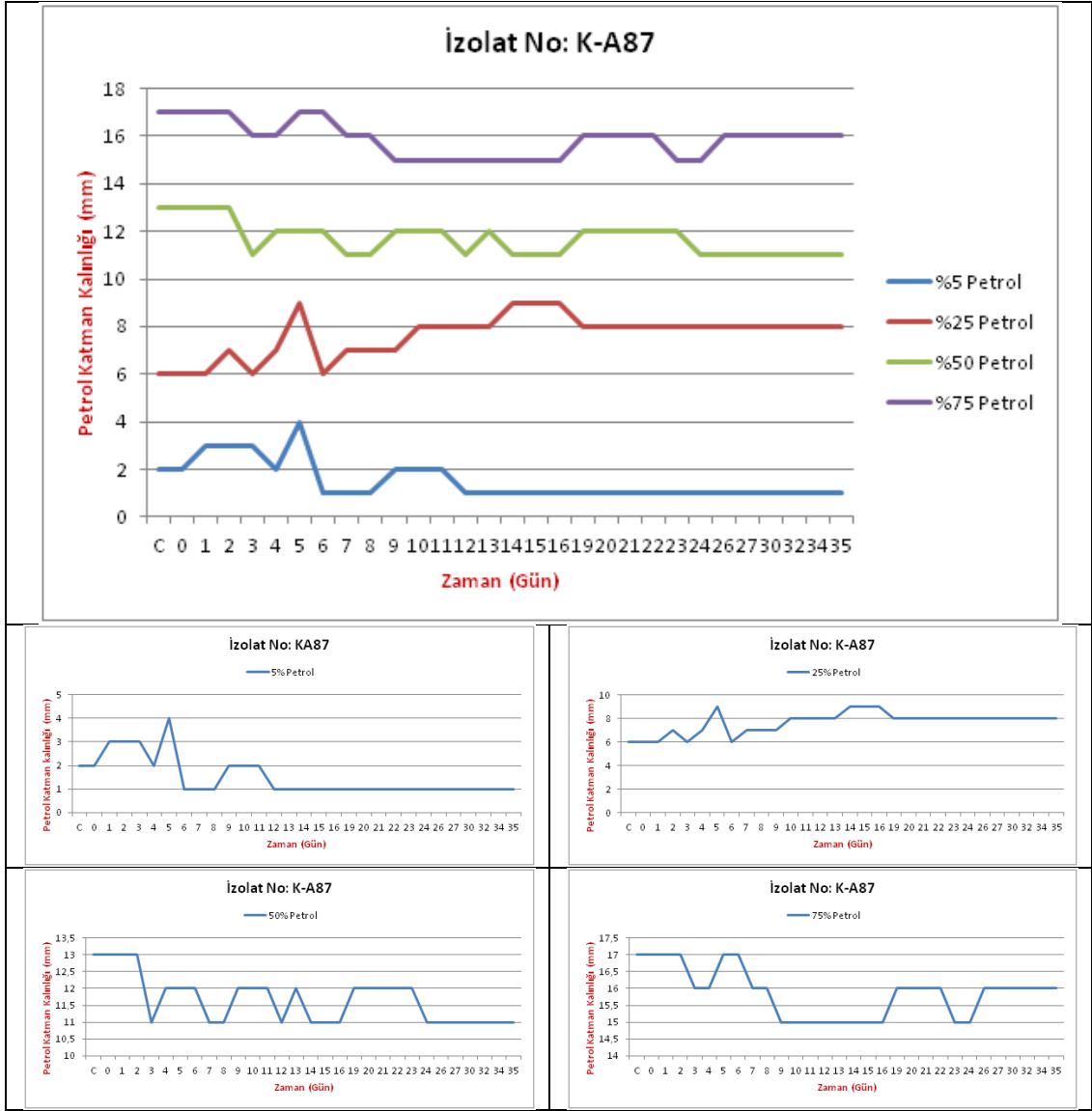
Şekil 5.5: İzolat İK3-331 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



Şekil 5.6: İzolat İK3-333 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



Şekil 5.7: İzolat K-A23 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.



Şekil 5.8: İzolat K-A87 için büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon çalışması ölçüm sonuçları.

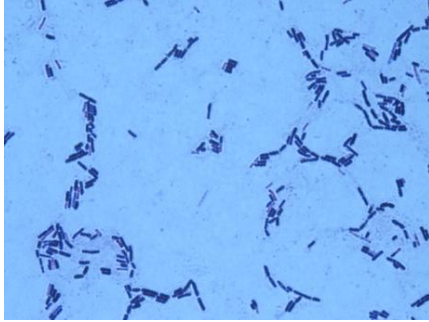
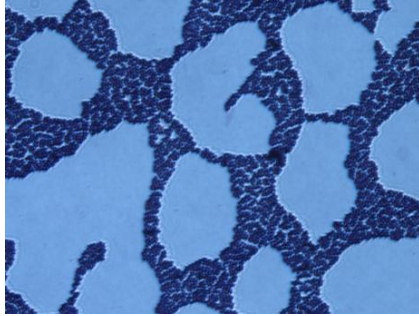
Bu grafikler incelediğinde 30 günlük deneme boyunca tüm erlenlerde kontrolden farklı olarak petrol tabakalarında zaman zaman yoğunlaşmalar ve kalınlaşmalar görülmüş, zaman zamanda parçalanmalar tespit edilmiştir.

İzolatlara ait günlük ölçümler ile oluşturulan Şekil 5.2-5.8 kapsamındaki grafiklerde, her bir izolat ve her bir konsantrasyonu açısından, farklı sonuçlar gözlenmektedir. İzolat İK1-81 için %75'lik konsantrasyonda ham petrol katmanı kalınlığında bir değişiklik olmazken, %5, %25 ve %50'lik konsantrasyonlarda ciddi artışlar görülmektedir. İzolat İK2-114 için %5 ve %75'lik konsantrasyonlarda ham petrol katmanında azalma ve olasılıkla parçalanma görülmüş, tam tersi %25'lik konsantrasyonda oldukça, %50'lik konsantrasyonda da belli belirsiz bir artma gözlenmiştir. İzolat İK2-140 için %5 ve %25'lik konsantrasyonlarda artma, %50'lik konsantrasyonda dikkat çekici ve %75'lik konsantrasyonda ise belli belirsiz bir azalma gözlenmiştir. İzolat İK3-331'e bakıldığında, sadece %25 ve %75'lik konsantrasyonları çalışılan bu organizmanın her iki konsantrasyonunda da, özellikle %75'lik konsantrasyonda çok ciddi, ham petrol tabakası kalınlığında azalmalar görülmüştür. İK3-333 ve K-A23 izolatlarının her ikisinin de %5 ve 25'lik konsantrasyonlarında artmalar, %50 ve 75'lik konsantrasyonlarında ise dikkat çekici miktarda azalmalar görülmüştür. Son olarak izolat K-A87'de ise %5, %50 ve %75'lik konsantrasyonlarda azalmalar, %25'lik konsantrasyonda ise artma gözlenmiştir.

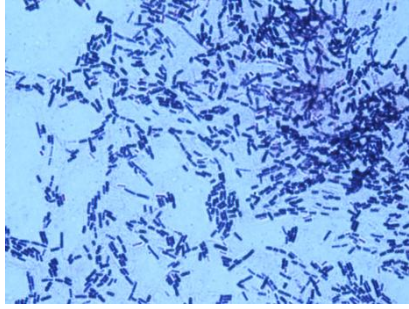
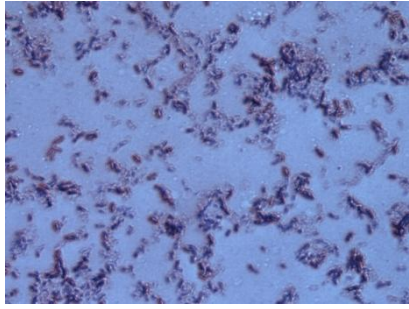
5. 4. Seçilen İzolatların Büyük Ölçekli Çalışma Sonrası Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İrdelenmesine Ait Bulgular

Büyük ölçekli ham petrol biyoremediasyon denemesinin tamamlanmasını takiben, izolatlar bazı temel mikrobiyolojik özellikleri açısından kontrol edildi ve yeniden değerlendirildi. Bu amaçla izolatlara yeniden Gram Boyama yapıldı, mikroskopik olarak hücresel özellikleri gözden geçirildi ve mikrografları alınarak Tablo 5.2'de şematize edildi. Morfolojik, fizyolojik ve mikroskopik bir farklılığın oluşup oluşmadığı, Tablo 5.1'de gösterilen büyük ölçekli deneme öncesi özellikleri ile karşılaştırılarak irdelendi. Herhangi bir farklılık olmadığı belirlendi.

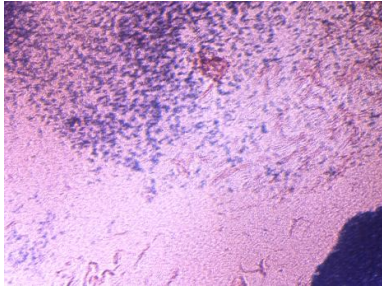
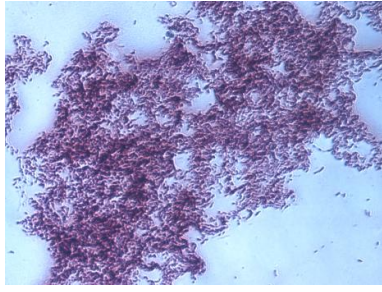
Tablo 5.2: Çalışmada kullanılmak üzere seçilen bakteri örneklerinin 30 günlük ham petrolde yaşatılma denemesini takiben uygulanan Gram boyamaya ve mikroskopik incelemeler ile elde edilen bazı morfolojik ve mikrobiyolojik özelliklere ait sonuçlar.

İzolat No: İK1-81	
Mikrografı:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	İkili kok (diplokok) veya diplokokobasil.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	+
Açıklama:	Basil ya da diplokok, diplokokobasil şeklinde, yerfistiğine benziyor. Yuvarlak sarımsı koloniler var.
İzolat No: İK2-114	
Mikrografı:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	Kok (Stafilokok).
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	+
Açıklama:	Düzensiz üzüm salkımı şeklinde, mukozal madde üretiyor olabilir.

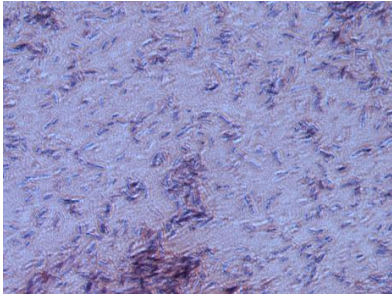
Tablo 5.2: Devam.

İzolat No: İK2-140	
Mikrografı:	 <p>(100x)</p>
Gram Boyama:	Gr (-)
Hücre Şekli:	Basil, kokobasil.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	+
Açıklama:	İK1- 81'e benziyor. Yuvarlak, mat koloniler var.
İzolat No: İK3-331	
Mikrografı:	 <p>(100x)</p>
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Basil.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	+/-
Açıklama:	Yüzeyde kalın 3 boyutlu bir mukus/kapsül tabaka gözüküyor. Düzensiz, beyaz koloniler var.

Tablo 5.2: Devam.

İzolat No: İK3-333	
Mikrografi:	 (40x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Küçük kısa basil.
Oksidaz Testi:	-
Katalaz Testi:	+
Açıklama:	Tüm petri yüzeyini kaplayan çok yoğun bir mukus tabakası var.
İzolat No: K-A23	
Mikrografi:	 (40x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Basil, kokobasil, kok.
Oksidaz Testi:	+/-
Katalaz Testi:	+/-
Açıklama:	Tüm petriye yayılmış, sarımsı-beyaz, mukozal koloniler var.

Tablo 5.2: Devam.

İzolat No: K-A87	
Mikrografi:	 (100x)
Gram Boyama:	Gr (+/-)
Hücre Şekli:	Kok.
Oksidaz Testi:	+/-
Katalaz Testi:	+/-
Açıklama:	İK3- 331'e benziyor. Kısa streptokoklar. Mukus tabakası var

5. 5. Büyük Ölçekli Çalışmada Kullanılan İzolatların GC-MS Analizlerine Ait Bulgular

Büyük ölçekli çalışmada kullanılan İK1-81, İK2-114, İK2-140, İK3-331, İK3-333, K-A23 ve K-A87 kodlu 7 izolat, “Ham petrolü parçalayabiliyor mu?” sorusuna açıklık getirmek için kimyasal olarak da irdelendiler. Bu amaçla, çalışmada kullanılan erlenler içindeki materyal, bir dizi filtreleme (steril kalın filtre kağıtları ve 0,45 µm por çaplı filtreler vasıtasıyla) aşaması ile süzüldü. Bu şekilde bakterilerden ayrılmış olarak elde edilen sıvılar/süzüntüler daha küçük steril schott şişelere toplandılar. Bu aşamayı takiben, elimizdeki örnekler GTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü’nde bulunan Gaz Kromatografisi (Agilent 6890N) Kütle Spektrometresi (Agilent 5975C, Inert MSD) cihazı kullanılarak analiz edildi. Cihazda ham petrol içeren örneklerin çalışılmasında kapiler kolon (HP-5ms, 15 m, 0.25 mm, 0.25 µm) kullanıldı, sonuçlar her izolat için açığa çıkan bileşenlere göre ayrıldı ve Tablo 5.3'te gösterildi.

Tablo 5.3:Ham petrolün deniz bakterileri ile biyoremediasyonuna yönelik büyük ölçekli çalışması sonucunda elde edilen süzüntülerinin GC-MS cihazı kullanılarak, kapiler kolon (HP-5ms, 15 m, 0.25 mm, 0.25 µm) yardımıyla, farklı fırınlama sıcaklıkları ve süreleri ile analiz sonuçları.

Kalma Süresi	7.494-8	8,007	9.537-9.57	11.192-11.284	11,507	12,249	12,256	12,262	13,175
Bileşik	Thiourea, tetramethyl	Heptadecanoic acid,ethyl ester	Cyclohexasiloxane	Quinoline	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione	3-Buten-1-amine, N-ethyl-N-methyl-Thiazole	Dimethyl Carbamothioicacid	3-Undecanone	Hexadecane
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
81 (%5)	86,4			13,6					
81 (%25)	84		4,2	11,8					
81 (%50)	84,89			15,11					
81 (%75)	85,27			14,73					
114 (%5)	86,33			13,67					
114 (%25)	100								
114 (%50)	71,59		8,12	20,29					
114 (%75)	77,27		6,21	16,53					
140 (%5)	71,51		5,76	13,57				6,19	
140 (%25)	84,28		15,72						
140 (%50)					0,46				
140 (%75)	78,75			13,05					
333 (%5)	86,65			13,35					
333 (%25)	86,66			13,34					
333 (%50)	83,36			16,64					
333 (%75)	86,77			13,23					
A23 (%5)	85,89			14,11					
A23 (%25)	87,22			12,78					
A23 (%50)	82,23			17,77					
A23 (%75)	28,92	48,53		11,35			6,25		
A87 (%5)	85,13			14,87					
A87 (%25)	87,02			12,98					
A87 (%50)	88,85			11,15					
A87(%75)	86,2			13,08					
331(%25)	86,75			13,25					
331(%75)	82,24		6,72	11,04					
Saf Petrol									1,33
Kalış Süresi	6,201	7,711	9,182	10,587	11,92	13,188	14,593	15,322	15,506
Saf Petrol	Undecane	Dodecane	Tridecane	Tetradecane	Penatadecane	Hexadecane	Heptadecane	Octadecane	Octadecane

Tablo 5.3: Devam.

Kalma Süresi	15,513	17.214-17.358 (18.153)	17.417-18.737	17.214-17.358 (18.153)	17.417-18.737	17,923	18.737-19.998
Bileşik	Octadecane	Nonadecane	Eicosane	Nonadecane	Eicosane	N-Methyl-N-propargyl-4,4-dimethyl-2-pyrrolidinocyclopent-1-enecarbox amide	Heneicosane
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
81 (%5)							
81 (%25)							
81 (%50)							
81 (%75)							
114 (%5)							
114 (%25)							
114 (%50)							
114 (%75)							
140 (%5)			2,97		2,97		
140 (%25)							
140 (%50)	0,09	17,3(4,56+4,73+5,92+1,09)	28,46	17,3(4,56+4,73+5,92+1,09)	28,46	2,26	9,14
140 (%75)			8,2		8,2		
333 (%5)							
333 (%25)							
333 (%50)							
333 (%75)							
A23 (%5)							
A23 (%25)							
A23 (%50)							
A23 (%75)			4,96		4,96		
A87 (%5)							
A87 (%25)							
A87 (%50)							
A87 (%75)							
331(%25)							
331(%75)							
Saf Petrol	6,23(1,47+1,48+1,75+1,53)	20,17(7,13+13,04)	21,19(20,47+8,72)	20,17(7,13+13,04)	21,19(20,47+8,72)		24,18
Kalış Süresi	15,913	16,018	17,181	16,018	17,181	17,227	17,371
Saf Petrol	Octadecane	Octadecane	Nonadecane	Octadecane	Nonadecane	Undecane	Nonadecane

Tablo 5.3: Devam.

Kalma Süresi	19,295	20,451	22,178	25,232-27,891	29,251	29,73	29,98
Bileşik	Benzocyclopentene, 4,6,7-triethyl 1-methyl-5-vinyl-	Tetracosamethyl-cyclododecasiioxane	4-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-1-(4-nitrophenyl)-3-phenyl-2-pyrazolin-5-one	Iron, monocarbonyl	4-Methyl-E-9-octadecene	6-Hydroxy-powelline-N-nitroso, aldehyde	Isorhamnetin
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
81 (%5)							
81 (%25)							
81 (%50)							
81 (%75)							
114 (%5)							
114 (%25)							
114 (%50)							
114 (%75)							
140 (%5)							
140 (%25)							
140 (%50)	2,35	1,25	0,66	2,07(0,63+0,69+0,75)	0,79	35,13	0,04
140 (%75)							
333 (%5)							
333 (%25)							
333 (%50)							
333 (%75)							
A23 (%5)							
A23 (%25)							
A23 (%50)							
A23 (%75)							
A87 (%5)							
A87 (%25)							
A87 (%50)							
A87(%75)							
331(%25)							
331(%75)							
Saf Petrol							
Kalış Süresi	18,645	18,73	19,978	20,451	21,206		
Saf Petrol	Eicosane	Eicosane	Heneicosane	Tetracosamethyl-cyclododecasiioxane	Docosane		

Ham petrolün biyoremediasyonuna yönelik olarak çalışılan tüm izolatlarla ait süzölmüş örneklere ve bu örneklere her konsantrasyonunda, ham petrolün alkan birimlerinin, Kuinolin [Quinoline, (C₉H₇N)] adı verilen heterosiklik aromatik organik bir azotlu birime kadar parçalandığı görölmüştür. Bu birim aynı işlemden geçen ham petrolde görölmemiştir. Bu durum Kuinolin biriminin ham petrolün içinde bulunan bir birim değil, ancak ham petrolün bir aşamaya kadar parçalanması ile ortaya çıkan, ham petrol alkanlarından daha küçük bir birim olduğunu göstermektedir. Bu, bakterilerimizin deneme süresi boyunca (30 gün), bir aşamaya kadar ham petrolü parçaladığının kimyasal bir kanıtı/doğrulmasıdır. Kuinolin nadiren bitkilerde de bulunabilen bir yapıdır [Web 5, 2015].

Bakteri izolatlarına tek tek bakıldığında İK1-81, İK2-114, İK3-333, K-A23 için %50, K-A87 için %5, İK3-331 için ise %25 (bu örnek için %5 ve %50'lik konsantrasyon çalışılmamıştır) petrol konsantrasyonu içeren erlenlerde daha fazla Kuinolin'e parçalanma görölmüştür. İK2-140 için ise %5 ile %75'lik konsantrasyonlar arasında belirgin bir fark görölmemiştir (bu örnek için %25 ve %50'lik konsantrasyon çalışılmamıştır).

Genel sonuca bakıldığında ise tüm izolatlar içinde en fazla ham petrolü Kuinolin'e kadar parçalayan İK2-114 kodu ile tanımlanan bakteri örneği olmuştur.

5. 6. Büyük Ölçekli Çalışmada Kullanılan İzolatların VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanmasına Ait Bulgular

Çalışmanın son aşamasında petrol kirliliği riskini fazlaca taşıyan, İzmit Körfezi ile İstanbul Boğazı'nın Marmara Denizi ve Karadeniz çıkışlarının kentsel atık, organik ve kimyasal kirlilik almamış seçilen istasyonlarından, belli derinliklerde alınmış ve laboratuvarımızda saflaştırılmış 698 izolatın içinden ön denemelerle seçilen ve ana çalışmada kullanılan 7 tane izolatın (İK1-81, İK2-114, İK2-140, İK3-331, İK3-333, K-A23 ve K-A87) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ndeki VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile tür düzeyinde tanımlanması yapıldı. Bu uygulama sonucunda en az %86 doğrulukta olmak üzere tanımlamalar gerçekleşti ve örneklerden 2 tanesi tanımlanamadı. Sonuçlar Tablo 5.4'te gösterildi.

Tablo 5.4: VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemine göre tür seviyesinde tanımlanmış izolatlar.

İzolat Adı	VITEK Tanısı	Tanımlamanın Doğruluk Yüzdesi	Tanımlamanın güvenilirlik karşılığı*
İK1-81	Tanımlanamadı (Unidentified Organism)	-	N/A
İK2-114	Tanımlanamadı (Unidentified Organism)	-	N/A
İK2-140	<i>Serratia plymuthica</i>	%86	Kabul edilebilir tanımlama
İK3-331	<i>Enterococcus faecalis</i>	%94	Çok iyi tanımlama
İK3-333	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	%92	Çok iyi tanımlama
K-A23	<i>Staphylococcus lentus</i>	%97	Mükemmel tanımlama
K-A87	<i>Staphylococcus sciuri</i>	%89	İyi tanımlama
<p>* Mükemmel tanımlama (Excellent identification) % 96-99, Çok iyi tanımlama (Very good identification) % 92-95, İyi tanımlama (Good identification) % 89-91, Kabul edilebilir tanımlama (Acceptable identification) % 85-88.</p>			

Bu sonuç tanımlanamayan örneklerin yeni tür olmak olasılığını gündeme getirmektedir.

6. TARTIŞMA

Petrol ve petrol türevleri, endüstriyel ve günlük hayatta enerji ihtiyacını karşılamanın yanında kimya sanayisi (plastikler, boyalar ve kozmetik ürünler), ulaşım, madencilik ve tarım sektörlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu kullanım sonucu her yıl tonlarca petrol ve petrol ürünü çevreye yayılmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle sosyal ve ekonomik yaşamın vazgeçilmezi haline gelen bu ürünler, özellikle su ekosistemlerinde oldukça ciddi tahribatlara yol açmakta; balıklar, planktonlar, larva ve algler gibi su canlılarının biyolojik yaşamlarında da olumsuz etkiler meydana getirmektedir.

Petrol, temelde sadece karbon ve hidrojen elementlerinden oluşan hidrokarbonlardan meydana gelir. Hidrokarbonlar ham petrolün %55-98'ini oluşturmaktadır. Ham petrol içerisinde hidrokarbonların yanı sıra düşük oranda, ancak yapısını etkileyebilecek kadar yüksek oranlarda azot, kükürt, oksijen ve metal elementleri (vanadyum, nikel, vb.) bulunur. Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), petrol bileşenlerinin en inatçısıdır. Toksik, mutajenik ve kanserojenik oldukları bilinmektedir. Kirletici özelliklerinden dolayı biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen PAH'lardan çevrenin temizlenmesi, çevre ve uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemlidir [Demir ve Demirbağ, 1999]. Hidrokarbon kirliliğini azaltmak için fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan temizleme işlemleri de vardır. Ancak biyoremediasyon yöntemleri petrol hidrokarbonlarının elemine edilmesinde çevre dostu uygulama içermesi ve daha ekonomik alternatifler sunması nedeniyle giderek ön plana çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında kendi denizlerimizden (Marmara Denizi ve Karadeniz) izole edilmiş 698 deniz bakterisi izolatu içerisinde, literatürlerde işaret edilen (gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif) özelliklerde 31 örnek seçilmiştir. Sonraki aşamada bu örnekler, yine literatürler doğrultusunda, mikropalak yöntemi ile 6 farklı ham petrol konsantrasyonu ile yüzleştirilmiş ve ham petrolü parçalama kabiliyeti olan 7 izolat belirlenmiştir. Çalışma daha büyük ölçeğe taşımadan önce, seçilen örnekler bazı temel mikrobiyolojik boyama, koloni morfolojisi ve mikroskopik incelemelere tabi tutulmuştur. Bu incelemelerin aynısı büyük ölçekli çalışma sonrasında da yapılarak, son derece toksik bir madde olan ham petrolün büyük ölçekli ve uzun süreli uygulanmasında bakterilerde temel bir fizyolojik ve morfolojik

değişiklik oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Büyük ölçekli çalışmamıza geçildiğinde izolatların farklı ham petrol konsantrasyonlarında (%5, %25, %50 ve %75) hayatta kalabilme yeteneği, biyoremediasyon kabiliyeti ve sonrasında bu izolatların tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. Büyük ölçekli çalışmada, izolatlar 250 ml hacimli erlenler içerisinde belirli konsantrasyonlarda ham petrol ile 30 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve her 24 saatte petrol katmanı kalınlıkları mm olarak ölçülüp kaydedilerek grafiklere aktarılmıştır. Bu aşamada ortam sıcaklığı ve erlenlerde görülen çeşitli morfolojik ve fizyolojik değişiklikler de yine günlük olarak not edilmiştir. 30 günün sonunda 7 izolata ait her bir konsantrasyondaki erlen içerikleri membran filtrasyon sisteminde süzölmüştür. Bu aşamadan sonra iki farklı irdeleme yapılmıştır. Bunlardan ilki hücresel boyuttur. Bu bağlamda öncelikle bakterilerin geri kazanımı sağlanmış, ardından temel mikrobiyolojik boyamalar yeniden yapılarak morfolojik, fizyolojik ve mikroskopik bir farklılığın oluşup oluşmadığı büyük ölçekli çalışma öncesi elde edilen verilerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Diğeri ise ham petrolün kimyasal yapısında değişiklik olup olmadığının, yani diğeri bir değışle ham petrolün parçalanıp parçalanmadığının kimyasal olarak irdelenmesidir. Bu amaçla öncelikle elde edilen ve bakterilerden tamamen ayrılmış süzöntüler Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi (GC-MS) analizine alınmıştır. Son aşamada ise tür düzeyinde tanımlamaya geçilmiş ve bu amaçla izolatlar Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde bulunan VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ile tanımlanmaya alınmıştır.

Yapılan farklı çalışmalarda birçok akuatik bakteri türünün petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp biyodegradasyona uğrattığı bildirilmiştir [Floodgate, 1984], [Leahy et al., 1990], [Song et al., 1990], [Demir ve Demirbağ, 1999], [Kasai et al., 2002], [Hara et al., 2003], [Altuğ, 2005], [Kahraman ve Geckil, 2005], [Çiftçi, 2008], [Martins dos Santos et al., 2010]. Bundan yola çıkarak, tezimizde öncelikli amacımız kendi denizlerimizden izole ettiğimiz, gerçek deniz bakterilerinin petrol biyoremediasyonu için kullanılabilirliğinin belirlenmesi olmuştur.

Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, MIC testi sonuçlarına göre seçilen ve büyük ölçekli çalışmaya alınan 7 izolatın tamamının ham petrolü kullanarak, Kuinolin [Quinoline, (C₉H₇N)] adı verilen ve ham petrol alkanlarından daha küçük olan heterosiklik aromatik organik bir azotlu birime kadar kimyasal olarak parçalandığı görölmüştür. Bu birim aynı işlemde geçen ham petrolde

gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu sonuç Kuinolin biriminin ham petrolün içinde bulunan bir birim değil, ancak ham petrolün bir aşamaya kadar parçalanması ile ortaya çıkan, ham petrol alkanlarından daha küçük bir birim olduğunu göstermektedir. Bu sonuç açıkça bakterilerimizin deneme süresi boyunca (30 gün), bir aşamaya kadar ham petrolü parçaladığının kimyasal bir kanıtı/doğrulmasıdır.

Kuinolin nadiren bitkilerde de bulunabilen bir yapıdır [Web 5, 2015]. Bu veri bize Kuinolin'in canlılarda bulunabilen ve kesinlikle ham petrolden daha az zararlı/toksik bir kimyasal yapı olduğunu göstermektedir. Bu da bakterilerimizin ham petrolü en azından kısmen, canlılara daha az zararlı bir birime çevirdiğini göstermekte ve kanıtlamaktadır.

İzolatlar içinde ham petrolü en fazla Kuinolin'e parçalayan İK2-114 kodu ile tanımlanan bakteri örneği olarak tespit edilmiştir.

30 gün süren büyük ölçekli deneme boyunca tüm erlenlerde kontrolden farklı olarak petrol tabakalarında zaman zaman yoğunlaşmalar ve kalınlaşmalar görülmüş, zaman zaman da parçalanmalar tespit edilmiştir. İzolatlara ait günlük ölçümler ile oluşturulan Şekil 5.2-5.8 kapsamındaki grafiklerde, her bir izolat ve her bir konsantrasyonu açısından, farklı sonuçlar gözlenmektedir. İzolat İK1-81 için %75'lik konsantrasyonda ham petrol katmanı kalınlığında bir değişiklik olmazken, %5, %25 ve %50'lik konsantrasyonlarda ciddi artışlar görülmektedir. İzolat İK2-114 için %5 ve %75'lik konsantrasyonlarda ham petrol katmanında azalma ve olasılıkla parçalanma görülmüş, tam tersi %25'lik konsantrasyonda oldukça, %50'lik konsantrasyonda da belli belirsiz bir artma gözlenmiştir. İzolat İK2-140 için %5 ve %25'lik konsantrasyonlarda artma, %50'lik konsantrasyonda dikkat çekici ve %75'lik konsantrasyonda ise belli belirsiz bir azalma gözlenmiştir. İzolat İK3-331'e bakıldığında, sadece %25 ve %75'lik konsantrasyonları çalışılan bu organizmanın her iki konsantrasyonunda da, özellikle %75'lik konsantrasyonda çok ciddi, ham petrol tabakası kalınlığında azalmalar görülmüştür. İK3-333 ve K-A23 izolatlarının her ikisinin de %5 ve 25'lik konsantrasyonlarında artmalar, %50 ve 75'lik konsantrasyonlarında ise dikkat çekici miktarda azalmalar görülmüştür. Son olarak izolat K-A87'de ise %5, %50 ve %75'lik konsantrasyonlarda azalmalar, %25'lik konsantrasyonda ise artma gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre ham petrol tabakasının kalınlığının en çok arttığı %5'lik konsantrasyon için 3 mm'lik artışla İK1-81, K-A23, İK3-333 no'lu izolatlarını, %25'lik konsantrasyon için 5 mm'lik bir artışla İK1-81 no'lu izolatını ve %50'lik

konsantrasyon için 1 mm'lik artışla yine İK1-81 no'lu izolatını görüyoruz. Buna karşın %75'lik ham petrol konsantrasyonlarında ham petrol katman kalınlığının arttığı izolat yoktur.

İzolatlar içinde ham petrol tabakasının kalınlığının en çok azaldığı örnekler bakıldığında %5'lik ham petrol konsantrasyonu için 2 mm'lik azalışla tabakayı ölçülemeyecek kadar azaltan, neredeyse sıfırlayan izolat İK2-114 ve 1 mm azaltıp yarıya indiren K-A87 izolatu görülüyor. %25'lik ham petrol konsantrasyonu için ise 1 mm'lik azaltma ile İK3-331 izolatu göze çarpmaktadır. %50'lik ham petrol konsantrasyonuna bakıldığında İK2-140, İK3-333, K-A23 ve K-A87 izolatları 2 mm'lik azaltmalar göstermektedir. %75'lik ham petrol konsantrasyonunda İK3-331 izolatu 3 mm'lik azaltma ile en fazla azalmayı göstermektedir. Onu takiben 2 mm'lik azaltma ile İK2-114 ve İK3-333 izolatları; 1mm'lik azaltma ile de K-A23 ve K-A87 izolatları görülüyor.

Bu veriler bize 7 izolatin hepsinin petrolle karşılaştığında yoğunluğuna bağlı olarak farklı davranışlar sergilediğini gösteriyor. Burada petrol tabakasının azalmasını biyoremediasyon yeteneği olarak algıladığımızda en dikkat çekici örnekler, özellikle %75'lik konsantrasyonda ham petrol tabakasında azaltma dolayısıyla ham petrolü parçalama etkisi olan izolatlar olarak İK2-114 ve İK3-333 (2'şer mm) izolatları ile İK3-331 izolatını (3 mm) öne çıkartmaktadır. Tüm sonuçlara bakıldığında İK2-114, İK3-331 ve İK3-333 dikkat çekici izolatlar olarak görülmektedir. Bu izolatların bir arada kullanıldığı karışımların denenmesi belki de her konsantrasyonda parçalayıcı olan bir bakteri karışımının ve/veya hibrit bakterinin ortaya çıkmasına yol açabilir.

Çalışmamızın sonuçları, çeşitli çalışmalarda petrolün bakteriler tarafından daha az toksik veya toksik olmayan yan ürünlere dönüştürüldüğünü, hatta bazı bakterilerin degradasyonu CO₂ çıkışı ve H₂O oluşumuna kadar devam ettirebildiğini gösteren çalışmaları [Atlas and Bartha, 1992], [Obire, 1998], [Alexander, 1999], [Kavamura and Esposito, 2010] desteklemiştir.

Bakterilerin degradasyon prosesleri ve mikrobiyal varlıkları; (biyokütle konsantrasyonu, populasyon çeşitliliği, enzim aktiviteleri) substratların (fizikokimyasal karakteristikler, molekül yapısı ve konsantrasyon) ve çevresel faktörlerin (pH, sıcaklık, nem içeriği, yarayışlı karbon ve enerji kaynakları) oranına bağlıdır. Bu parametreler substratlardaki mikroorganizmaların ortama alışma ve yaşama periyotlarını etkiler [Boopathy, 2000].

Bu verilerden yola çıkarak farklı ham petrol yüzdeleri içeren deneme erlenlerinden bakterilerimiz 30 günlük inkübasyon periyodundan sonra canlı olarak geri kazanılabilmektedir. Ortamdaki besiyeri içeriğinin sınırlı bir süre bakteriye besin kaynağı olacağını düşünürsek, bu durum bakterilerimizin petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiğinin ve petrolün veya içerdiği PAH'ların toksisitesinden kısmen veya tamamen etkilenmediğinin göstergesidir. Buna ek olarak, ham petrolün büyük fraksiyonlarından olan PAH'ların, önemli organik kirleticiler olduğu ve organizmalar üzerinde yüksek ölçüde toksik, mutajenik ve kanserojenik etkileri olduğu düşünüldüğünde bakterilerimizin deneme süresince (30 gün) farklı petrol parçalama yetenekleri sergilemesi önemli bir sonuçtur.

Literatürlere göre mikrobiyal komünitelerdeki metabolik aktivitelerin değişimlerinin genellikle kimyasal ve fiziksel strese tepki olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir [Mills and Wassel, 1980] ve bu görüş daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir [Atlas, 1991]. Bu veriler ışığında, çalışmamızda kullanılan bakterilerin zaman zaman durağan faza geçse de hayatını sürdürebildiği, canlı ve saf kültür halinde elde edilebildiği görülmüştür ve bu sonuç literatürlerle uyumludur. Bu durum şöyle açıklanabilir; petrolün degradasyonundan sonra ortamda hidrokarbon miktarının artmasıyla, bu hidrokarbonlar mikroorganizmalara karbon ve enerji kaynağı teşkil etmek suretiyle destek olmuş ve mikrobiyal kütle artmasına neden olmuş olabilir. Bu durum başlangıçta ilk 1-5 gün içerisinde bakterilerin strese girmesine, ortalama 5-15 gün içinde uyum sağlayarak petrolden karbon ve enerji kaynağı olarak yararlanmasına ve buna bağlı olarak enzim salgılarının artmasına neden olmuş görülmektedir. Yine 5-15 gün içerisinde artan ya da azalan petrol katmanı kalınlıklarının farklı yönde değişmesi veya sabitlenmesi, petrol ayrışmasının sürekli olmadığını ve bazı durağan dönemleri olduğunu göstergesi olabilir.

Yine literatürlerde bakteri-organik madde etkileşimi ve bakteriyel kapsüller polisakkarit sentezi bildirilmektedir [Azam et al., 1999]. Tez çalışmamızda bakterilerimizde görülen morfolojik ve koloniyal şekil farklılaşmaları, adaptasyon yeteneğine bağlı olarak gelişmiş olabilir. Buna göre çalışmamızın ilerleyen günlerinde deneme erlenlerinde tespit edilen veriler ile desteklenebilir. Çalışma boyunca tüm erlenlerdeki besiyerleri üzerinde yer alan petrol katmanının alt kısmında petrolün habbeler ve yumaklar şeklinde toplanmış olduğu ve petrol katmanının yüzeyinde açılmaların (özellikle İK1-81 ve İK3-333 erlenlerinde 5. günden itibaren) meydana geldiği görülmüştür. Toplanmaların ve yüzeydeki

açılmaların yanı sıra İK1-81, İK2-140, İK2-333 ve K-A23 erlenlerindeki petrol katmanı miktarlarında (mm cinsinden) artışlar görülürken; İK2-114, İK3-331 ve K-A87 erlenlerinde azalmalar (bazen de artış dalgalı) gözlenmiştir. Artan ya da azalan petrol katmanı kalınlıklarının farklı yönde değişmesi veya sabitlenmesi, petrol ayrışmasının sürekli olmadığını ve bazı durağan dönemleri olduğunu işaret etmekte ve meydana gelen bu değişiklikler petrolün bir şekilde bakterilerce degradasyona uğratıldığını göstermektedir.

Buna ek olarak tüm erlenlerde oluşan bu petrol habbelerini ve yumaklarını içine hapseden müsilaj yapılar ve petrol katmanının alt kısmında bakteri kolonisi gibi (gün geçtikçe kümelenmeye de başlayan) beyaz renkli yuvarlak şekilli yapılar da gözlenmiştir. Bu müsilaj yapıların, ham petrolün bakteriler tarafından degrade edilmesinde açığa çıkan bileşenler olabileceği gibi, bakteriler tarafından oluşturulmuş müsilaj bir kılıf olduğu da düşünülebilir. Bu habbelenmelerin, petrolün fiziksel olarak toplanmasını sağlayıp deniz yüzeyinden dar ve ince gözlü ağlar ile toplanıp uzaklaştırılmasında yardımcı olabilecek gibi görülmektedir.

Benzer olarak çalışmamızın ilerleyen günlerinde İK3-333 erleninde petrol katmanı yüzeyinde açılmaların yanı sıra, yüzeyi zar görünümünde sarmaya başlayan ve gün geçtikçe daha çok yayılan müsilajımsı-köpüksü tabakalaşmalar ile müsilaj adacık oluşumları da gözlenmiştir. Bu oluşumlar bakteri-organik madde etkileşimleri ve bakteriyel kapsüller polisakarit sentezi ile ilişkilendirilebilir. Yapılan literatür taramasında İK3-333'ün kapsül oluşturan bir bakteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sonuç, Azam ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma [Azam et al., 1999] ile son derece uyumlu görülmektedir ve yukarıda bahsetmiş olduğumuz yapısal değişiklikler ile petrolün fiziksel olarak deniz yüzeyinden uzaklaştırılmasını kolaylaştırabileceği sonuçlarını desteklemektedir.

Son olarak VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi sonucunda ham petrolü parçalayabilen ve/veya ham petrolün farklı konsantrasyonlarını içeren ortamda yaşamını devam ettirebilen 7 izolatımızdan 5 tanesi; İK2-140: *Serratia plymuthica* (% 86), İK3-331: *Enterococcus faecalis* (% 94), İK3-333: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (% 92), K-A23: *Staphylococcus lentus* (% 97), K-A87: *Staphylococcus sciuri* (% 89) olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 2 izolatımız (İK1-81 ve İK2-114) ise tanımlanamamıştır.

Sonuçlara göre İK2-114, İK3-331 ve İK3-333 izolatlarının tanımlanması, tanımlanmalarının kontrolü için 16S rRNA düzeyinde moleküler tiplendirmeye

alınması ve tür düzeyinde tanımlanması ve/veya belirlenen tanımlamanın kontrolü çok elzem görülmektedir. Çalışmamızın ileriki aşamalarında bunun ivedilikle yapılması ve çalışmanın geliştirilerek özellikle bu 3 izolat için daha detaylandırılması sonucunda, kendi denizlerimizden izole ettiğimiz ve petrol parçalama özelliği olan bu bakterilerin patentlendirilmesi ve ülkemiz için önemli bir biyoremediasyon materyali olması mümkündür.

Ham petrol ve türevleri kaynaklı deniz kirliliğinde, petrol hidrokarbonlarının ortamdaki hızla ve minimum zararla uzaklaştırılmasında, o ortamın yerli bakterilerinin kullanılması, çevre şartlarına adapte bakteriler olması nedeni ile sürecin hızlı gerçekleşmesi açısından son derece önemlidir ve önerilen bir metottür. Çalışmamızda kendi denizlerimizden izole edip tanımladığımız bakteriler, kendi doğal kaynaklarımızı oluşturmaktadır. Bu değerli kaynaklar petrol kirliliği bulunan veya kirlilik tehdidi altında olan denizlerimizdeki toksik maddelerin biyoremediasyonu adına kullanılmaya adaydır.

Çalışmamızın, üç tarafı denizlerle çevrili bir ülke olarak, sahip olduğumuz kaynakların değerlendirilmesinde önemli bir adım olduğu düşünüyoruz. Bu çalışmada tanımlanan/tanımlanamayan petrol parçalayıcı bakterilerin var olan ve yeni ortaya konmuş bazı özelliklerinin, yeni araştırma projeleri için başlangıç ve/veya biyolojik materyal olma potansiyelleri bulunmaktadır. Buna ek olarak genetik modifikasyonlarla bu özellikleri daha da geliştirip yeni suşların ortaya çıkarılması mümkündür ve yukarıda da belirtildiği gibi, bu kaynaklar patentlendirildiği takdirde ülkemize maddi olarak da kaynak sağlayabilir.

Yine, dünyada petrol biyoremediasyonu üzerine yapılan çalışmaların çoğu toprak bakterileri üzerinedir. Genellikle bakteriler petrol sahalarındaki topraklardan izole edilmekte ve bu amaçla kullanılmaktadırlar. Ülkemizde ve dünyada, denizlerdeki petrol kirliliğine dair bakteri çalışmaları ise genellikle organik atık ve/veya liman, tersane gibi kimyasal ve atık alan bölge izolatlari ile yapılmakta ve biyoremediasyon çalışmaları için bunlar kullanılmaktadır. Bu durum, sonrasında kirlilik göstergesi olan bu bakterilerinde ortamdaki uzaklaştırılması zorunluluğu nedeni ile fazladan bir maliyet getirmektedir. Bizim çalışmamızda ise bunlardan tamamen farklı bir bakteri kaynağı kullanılmıştır. Bakterilerimiz, organik ve şehir dışarı almayan bölgelerden, yani tamamen temiz deniz suyu kabul edilebilecek bölgelerden ve farklı derinliklerden izole edilmiş deniz bakterileridir. Biyoremediasyon çalışmalarında kullandıklarında ortamdaki uzaklaştırılmalarına

gerek kalmaz. Bu durum önemli ve kullanım maliyetlerini çok azaltabilecek bir avantajdır.

Son olarak, ülkemizde bu konuya yönelik çalışmalarda Deniz Mikrobiyolojisi dalında benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda bu tez çalışması özgün bir çalışma olup, pek çok yeni araştırma konusuna öncülük edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Alexander M., (1999), "Biodegradation and Bioremediation", 2nd Edition, Academic Press.

Altuğ G., (2005), "Bakteriyolojik Deniz Kirliliği", Deniz Kirliliği Analiz Yöntemleri İlgili Uluslar Arası Sözleşmeler, Editörler: Güven K. C., Öztürk B., 1. Baskı, TÜDAV Yayınları.

Altuğ G., Çardak M., Çiftçi P. S., Gürün S., (2007), "Petrol Hidrokarbonlarının Ölüdeniz Lagünü ve Marmara Denizi'nden İzole Edilen Bazı Bakteriler Üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MIC)", Ulusal Su Günleri, 761-766, Antalya, Türkiye, 16-18 Mayıs.

Alver E., Demirci A., Özcimder M., (2012), "Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri", Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3 (1), 45-52.

Aras O. N., (2000), "Petrol Üretimine Deniz Kirliliğine Etkisi ve Kontrolü", İnsan ve Felaketler Uluslararası Konferansı, 401-406, Bakü, Azerbaycan, 17-18 Eylül.

Atlas R. M., (1975), "Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation", Applied Microbiology, 30 (3), 396-403.

Atlas R. M., (1981), "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective", Microbiological Reviews, 45 (1), 180-209.

Atlas R. M., Bartha R., (1993), "Microbial Ecology: Fundamentals and Applications", 1st Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company.

Barış E., (2011), "Türkiye ve Dünya'daki Önemli Deniz Kazaları", T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Ankara.

Baylan Ü., (2011), "Deniz Ulaşımında Petrol Kirliliğine Müdahale Sistemi: Türkiye ve Avrupa Uygulamaları", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.

Bedding N. D., Taylor P. N., Lester J. N., (1985), "Physicochemical Behaviour of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Primary Sedimentation", I. Bath Studies, Environmental Technology, 16, 801-812.

Bilgin C., (2003), "Gemi Kökenli Petrol Kirliliğinin Biyolojik Yöntemlerle Giderilmesi", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.

Ceyhan N., Esmeray E., (2012), "Petrol Kirliliği ve Biyoremediasyon", Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5 (1), 95-101.

Çiftçi P. S., (2008), “Marmara Denizi’nden İzole Edilen Bakterilerin Polisiklik Aromatik Hidrokarbonları (PAH) Parçalama Yeteneklerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

Demir İ., Demirbağ Z., (1999), “Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Olarak Parçalanması”, Turkish Journal of Biology, 23, 293-302.

Demiray N., (2006), “Sintine Sularından Kaynaklanabilecek Deniz Kirliliğinin Değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.

Dibble J. T., Bartha R., (1979), “Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge”, Applied and Environmental Microbiology, 37 (4), 729-739.

DPT, (2001), “Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı: Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Enerji Hammaddeleri Alt Komisyonu: Petrol ve Doğalgaz Çalışma Grubu Raporu”, Devlet Planlama Teşkilatı.

DPT, (2006), “Dokuzuncu Kalkınma Planı (2007-2013): Petrol ve Petrol Ürünleri Sanayii Özel İhtisas Komisyonu Raporu”, Devlet Planlama Teşkilatı.

Dyksterhouse S. E., Gray J. P., Herwiq J. C., Lara P. R., Staley J. T., (1995), “*Cycloclasticus Pugetii* Gen. Nov., Sp. Nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments”, International Journal of Systematic Bacteriology, 45 (1), 116-23.

EEA, (2003), “Mapping The Impacts of Recent Natural Disasters and Technological Accidents in Europe”, Environmental Issue Report No: 35, ISBN: 92-9167-630-6, European Environment Agency, Denmark.

Ekici Ö. K., (2011), “Mikroorganizmaların Çevreye Hizmeti”, 523. Sayı, TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi.

Erdogan E., Karaca A., (2011), “Bioremediation of Crude Oil Polluted Soils”, Asian Journal of Biotechnology, 3 (3), 206-213.

Erol Ç., (2010), “Petrol Hidrokarbonları ile Kirlenen Toprakların Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Kullanılarak Fitoremediasyonu”, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.

Falco G., Domingo J. L., Llobet J. M., Teixido A., Casas C., Müller L., (2003), “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Human Exposure Through The Diet in Catalonia, Spain.”, Journal of Food Protection, 66 (12), 325–2331.

Floodgate G. D., (1984), “The Fate of Petroleum in Marine Ecosystems”, In: R. M. Atlas, Editor, “Petroleum Microbiology”, Macmillan Publishers Limited.

Geiselbrecht A. D., Herwig R. P., Deming J. W., Staley J. T., (1996), "Enumeration and Phylogenetic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Marine Bacteria from Pudget Sound Sediments", *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9), 3344–3349.

Güven K. C., Öztürk B., (2005), "Deniz Kirliliği Analiz Yöntemleri İlgili Uluslar Arası Sözleşmeler", 1. Baskı, TÜDAV Yayınları.

Hara A., Syutsubo K., Harayama S., (2003), "Alcanivorax Which Prevails in Oil-contaminated Seawater Exhibits Broad Substrate Specificity for Alkane Degradation", *Environmental Microbiology*, 5 (9), 746-53.

Harayama S., Kishira H., Kasai Y., Shutsubo K., (1999), "Petroleum Biodegradation in Marine Environments", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1 (1), 63-70.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H., Staley, J. T., Williams S. T., (1994), "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 9th Edition, Williams & Wilkins.

Hun E., (1997), "Canlı Çevrenin Dünü, Bugünü ve Yarını", İnsan Çevre Toplum, 2. Baskı, İmge Kitabevi.

Kahraman H., Geckil H., (2005), "Benzoik Asidin *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni Aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa* Tarafından Yıkımı", Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17 (2), 342-348.

Kasai Y., Kishira H., Sasaki T., Syutsubo K., Watanabe K., Harayama S., (2002), "Predominant Growth of Alcanivorax Strains in Oil-contaminated and Nutrient-supplemented Seawater", *Environmental Microbiology*, 4 (3), 141-47.

Kasai Y., Kishira Y., Harayama S., (2002), "Bacteria Belonging to the Genus *Cycloclasticus* Play a Primary Role in the Degradation of Aromatic Hydrocarbons Released in a Marine Environment", *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11), 5625–5633.

Kavamura V. N., Esposito E., (2010), "Biotechnological Strategies Applied to the Decontamination of Soils Polluted with Heavy Metals", *Biotechnol Advences*, 28 (1), 61-69.

Leahy J. G., Colwell R. R., (1990), "Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment", *Microbial Reviews*, 53 (3), 305-315.

MacNaughton S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y. J., White D. C., (1999), "Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill", *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8), 3566-3574.

Madigan M. T., Martinko J. M., (2006), "Brock: Biology of Microorganisms", 11th Edition, Pearson-Prentice Hall.

Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P., (2010), "Brock: Biology of Microorganisms", 13th Edition, Pearson-Prentice Hall.

Martins dos Santos V., Sabirova J., Timmis K. N., Yakimov M. M., Golyshin P. N., (2010), "*Alcanivorax borkumensis*". In: K. N. Timmis, Editor, "Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology", Springer.

Martorell I., Perelló G., Martí-Cid R., Castell V., Llobet J.M., Domingo J.L., (2010), "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Foods and Estimated PAH Intake By The Population of Catalonia, Spain: Temporal Trend.", *Environment International*, 36, 424–432.

Mashreghi M., Marialigeti K., (2005), "Characterization of Bacteria Degrading Petroleum Derivatives Isolated from Contaminated Soil and Water", *Journal of Sciences*, 16 (4), 317-320.

Mastral A. M., Lopez J. M., Callen M. S., Garcia T., Murillo R., Navarro, M. V., (2003), "Pollution Control Technology for Atmospheric PAH.", *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2 (2), 5.

MBB, (1991), "Petrol Kirlenmesi Açısından Denizlerimizde Durum", Marmara Belediyeler Birliği.

Moret S., Purcaro G., Conte S.L., (2010), "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Levels in Propolis and Propolis-based Dietary Supplements from The Italian Market.", *Food Chemistry*, 122, 333–338.

Nesimigil F., (2006), "Sedimentte Petrol Kirliliği Tayininde Ekstraksiyon Tekniğinin Rolü", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

Peressutti S. R., Alvarez H. M., Pucci O. H., (2003), "Dynamics of Hydrocarbon-degrading Bacteriocenosis of an Experimental Oil Pollution in Patagonian Soil", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 21-30.

Rahman K. S. M., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. M., (2002), "Towards Efficient Crude Oil Degradation by a Mixed Bacterial Consortium", *Bioresource Technology*, 85, 257-261.

OTA, (1991), "Bioremediation for Marine Oil Spills", OTA-BP-O-70, United States Congress, Office of Technology Assessment.

Öztürk F., Babaoğlu S., Açıık L., (2004), "Bakteriler Aracılığı ile Ham Petrol ve Türevlerinin Biyodegradasyonu", *Türk Biyokimya Dergisi*, 29 (1), 1-176.

Savaş Ü., (2010), "Çok Kopyalı Polifosfat Kinaz ve Ekzopolifosfataz Genlerinin Potansiyel Ekspresyonunun *Streptomyces Coelicolor*' ın Ağır Metal Toleransına ve Fosfat Depolamasına Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Schneiker S., (2006), "Genome Sequence of the Ubiquitous Hydrocarbon-degrading Marine Bacterium *Alcanivorax Borkumensis*", *Nature Biotechnology*, 24 (8), 997-1004.

Staley J. T., (2010), "Cycloclasticus: A Genus of Marine Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria", In: K. N. Timmis, Editor, "Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology", Springer.

Strong P. J., Burgess J. E., (2008), "Treatment Methods for Wine-related and Distillery Wastewaters: A Review. *Bioremediation Journal*, 12 (2), 70-87.

Şeker M. G., (2009), "Marmara Denizi ve Karadeniz'den İzole Edilen Bakterilerin Saflaştırılması ve Tanımlanması", Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Turgay O. C., (2005), "Petrol Suyu Sızıyor.", 137. Sayı, Popüler Bilim Dergisi.

Teramoto M., Suzuki M., Hatmanti A., Harayama S., (2010), "The Potential of *Cycloclasticus* and *Altererythrobacter* Strains for Use in Bioremediation of Petroleum-aromatic-contaminated Tropical Marine Environments", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110 (1), 48-52.

US-EPA, (1999), "Compendium Method TO-13A", United States Environmental Protection Agency.

US-EPA, (2000), "The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-Contaminated Sites", United States Environmental Protection Agency.

US-EPA, (2001), "Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands", United States Environmental Protection Agency.

Uysal A., (2006), "Ham Petrol Fraksiyonlarının Biyolojik Bozunma Sonrası Fizikokimyasal Özelliklerinin Değişimi", Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.

Ünsan Y., (1999), "Denizden Yağ Toplama Teknikleri ve Yeni Geliştirilen Bir Yöntem", Gemi İnşaatı ve Deniz Teknolojisi Teknik Kongresi Bildiri Kitabı, 280-294, İstanbul, Türkiye, 2-3 Aralık.

Üstün S., Yücel S., Akbal F., Orhan Y., Büyükgüngör H., (2003), "Orta Karadeniz Kıyı Şeridinde Biyomonitör Organizma Kullanılarak Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Kirliliğinin Belirlenmesi", XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 145-150, Çanakkale, Türkiye, 25-29 Ağustos.

Üstün K. S., Büyükgüngör H., (2007), "Kızılırmak Deltası Kıyı Şeridinde Su ve Midye Örneklerinde PAH Kirliliğinin Araştırılması", İTÜ Dergisi, Su Kirlenmesi Kontrolü, 17(2), 15-22.

Vidali M., (2001), "Bioremediation: An Overview", *Pure and Applied Chemistry*, 73 (7), 1163-1172.

Watanabe K., (2001), "Microorganisms Relevant to Bioremediation", Current Opinion in Biotechnology, 12, 237-241.

Widdel F., Rabus R., (2001), "Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hydrocarbons", Current Opinion in Biotechnology, 12 (3), 259-276.

Yakimov M. M., Golyshin P. N., Lang S., Moore E. R. B., Abraham W. R., Lünsdorf H., Timmis K., (1998), "*Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, Hydrocarbon-degrading and Surfactant-producing Marine Bacterium", International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 339-348.

Web 1, (2015), <http://www.marees-noires.com/medias/pdf/version-turque.pdf>, (Erişim Tarihi: 06/12/2015).

Web 2, (2013), <http://www.tudav.org>, (Erişim Tarihi: 21/09/2013).

Web 3, (2013), <http://www.itopf.com/marine-spills/fate/weathering-process/>, (Erişim Tarihi: 14/08/2013).

Web 4, (2013), https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf, (Erişim Tarihi: 20/09/2015).

Web 5, (2015), <https://en.wikipedia.org/wiki/Quinoline>, (Erişim Tarihi: 01/10/2015).

ÖZGEÇMİŞ

Selçuk TAŞDAN 1982 yılında İstanbul'da doğdu. 2002 yılında başladığı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü 2007 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Marmara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'nda başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2009-2013 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı'na bağlı liselerde ve çeşitli kolej ve dershanelerde Biyoloji Öğretmenliği yaptı. 2010 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılından bu yana Kalite Sistem Merieux Nutrisciences Holding'de Mikrobiyoloji Uzmanı olarak çalışmaktadır.