



**HAM PETROL KONTAMİNASYONUNUN
MİKROBİYAL OLARAK BİYOREMEDİASYONU**

Mustafa Özkan BALTACI

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2020
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HAM PETROL KONTAMİNASYONUNUN MİKROBİYAL
OLARAK BİYOREMEDİASYONU**

Mustafa Özkan BALTACI

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2020**

Her hakkı saklıdır

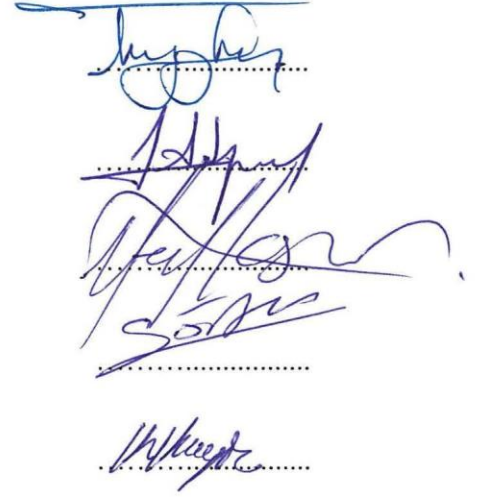
T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**HAM PETROL KONTAMİNASYONUNUN MİKROBİYAL OLARAK
BİYOREMEDİASYONU**

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Mustafa Özkan BALTAÇI tarafından hazırlanan bu çalışma, 13/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji & Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
Atatürk Üniversitesi
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
Atatürk Üniversitesi
Jüri Üyesi: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN
Atatürk Üniversitesi
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ
Erzurum Teknik Üniversitesi
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ
İbrahim Çeçen Üniversitesi



Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım. **20.02.2020 / 08-83**

Unvan Ad SOYAD

Enstitü Müdürü


Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

HAM PETROL KONTAMİNASYONUNUN MİKROBİYAL OLARAK BİYOREMEDİASYONU

Mustafa Özkan BALTACI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışması kapsamında, Akdeniz, Karadeniz, Ege ve Marmara denizlerinden alınan su örneklerine tek karbon kaynağı olarak ham petrol ilave edilerek, biyoremediasyon potansiyeline sahip 12 bakterinin saf kültürleri elde edilmiştir. Daha sonra yüksek parçalanma aktivitesi gösteren 4 izolat seçilerek, moleküler karakterizasyonu (16S rRNA sekans analizi) gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon sonucunda ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların; *Pseudomonas sabulinigri* (2), *Rhodococcus qingshengii* (1) ve *Alcanivorax venustensis* (1) türlerine ait suşlar oldukları belirlenmiştir. Ardından izolatların biyodegradasyon kapasitelerini arttırmak amacıyla ko-kültür, azot kaynağı, inkübasyon süresi ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. Küçük hacimlerde, *Alcanivorax venustensis* ve *Rhodococcus qingshengii* bakterilerinin ko-kültürlerinin, 2 g/L amonyum sülfat varlığında, 25°C'de, 12 günde ham petrolü maksimum seviyede parçaladığı gözlemlenmiştir. Son olarak optimize edilen koşullar altında ham petrolün biyodegradasyonu GC-MS analizleriyle doğrulanmıştır. Yapılan GC-MS analizleri sonucunda, PB6 ve PB4 kodlu izolatların ko-kültürlerinin optimize koşullar altında, C9-C12 ve C16-C29 hidrokarbonlarının %100'ünü, C13-C15 hidrokarbonlarının ise %85'ine yakınına degradasyona uğrattığı tespit edilmiştir.

2020, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: İzolasyon, Moleküler karakterizasyon, biyoremediasyon, Ham petrol

ABSTRACT

Doctora Thesis

MICROBIAL BIOREMEDIATION OF CRUDE OIL CONTAMINATION

Mustafa Özkan BALTACI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Within the scope of this study, pure cultures of 12 bacteria which have biodegradation potential were obtained by adding crude oil as the sole carbon source to water samples taken from the various seas including Mediterranean, Black Sea, Aegean and Marmara. Afterwards, 4 isolates with high degradation activity were selected and molecular characterization (16S rRNA sequence analysis) was performed. As a result of characterization, it was determined that microorganisms breaking down crude oil would be the strains belonging to *Pseudomonas sabulinigri* (2), *Rhodococcus qingshengii* (1) and *Alcanivorax venustensis* (1) species. Then, the optimization study of co-culture, nitrogen source, incubation time and temperature parameters was carried out in order to enhance the biodegradation capacities of the isolates. In small volumes, it was observed that the co-cultures of the bacteria *Alcanivorax venustensis* and *Rhodococcus qingshengii* degraded crude oil at maximum level in the presence of 2 g/L ammonium sulfate, at 25 °C and for 12 days. Finally, biodegradation of crude oil under optimized conditions was confirmed by GC-MS analysis. As a consequence of the GC-MS analysis, it was detected that co-cultures of isolates coded with PB6 and PB4 degraded 100% of C9-C12 and C16-C29 hydrocarbons, and approximately 85% of C13-C15 hydrocarbons

2020, 77 pages

Keywords: Isolation, Molecular characterization, Bioremediation, Crude oil

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans, doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince başarabileceğime her zaman gönülden inanarak beni yüreklendiren ve bu günlere gelmemi sağlayan, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, bu tezin hazırlanması sırasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, stresli tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a

Hem sevincimi hem de hüznümü paylaştığım laboratuvar arkadaşlarım, Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU, Sayın Arş. Gör. Elanur TUYSUZ ve Şeyda ALBAYRAK'a

Doktora eğitimim sırasında manevi desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN ve Arş. Gör. Sümeyya AKBULUT'a

Mustafa Özkan BALTACI

Şubat, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Petrol	1
1.2. Petrolün Temel Bileşimi.....	2
1.2.1. Element bileşimi.....	2
1.2.2. Kimyasal bileşimi.....	2
1.2.3. Fiziksel bileşimi	6
1.2.3.a. Yoğunluk ve özgül ağırlık	7
1.2.3.b. Viskozite (akmazlık)	7
1.2.3.c. Uçuculuk.....	8
1.3. Petrol Kirliliğinin Çevreye Etkisi.....	8
1.4. Petrol Kirliliğinin Çevreden Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler	10
1.4.1. Fiziksel yöntemler	10
1.4.1.a. Yakma.....	11
1.4.1.b. Yıkama	11
1.4.1.c. Petrol bariyerleri	12
1.4.1.d. Petrol sıyrıcılar	12
1.4.2. Kimyasal yöntemler	13
1.4.3. Biyolojik yöntemler.....	14
1.4.3.a. Ex-Situ (doğal yeri dışında) temizleme yöntemi.....	14
1.4.3.b. In-Situ (yerinde) temizleme yöntemi	15
1.5. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme).....	17
1.5.1. Biyoremediasyonun avantajları ve dezavantajları.....	18
1.6. Mikrobiyal Yıkım (Biyodegradasyon)	19

1.6.1. Petrol biyoyıkımını etkileyen fiziksel faktörler.....	20
1.6.1.a. Sıcaklık	20
1.6.1.b. Oksijen.....	21
1.6.1.c. pH	21
1.6.1.d. Basınç	21
1.6.1.e. Petrolün yapısı ve hidrokarbon bileşimi	22
1.6.2. Petrol biyoyıkımını etkileyen biyolojik faktörler	22
2. KURAMSAL TEMELLER.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.2. Çözeltiler	30
3.1.3. Besiyerleri	32
3.1.4. Kitler.....	33
3.1.5. Cihazlar	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Örnek toplanması	34
3.2.2. Ham petrolü parçalayan bakterilerin izolasyonu.....	35
3.2.3. İzolatların ham petrolü parçalama miktarlarının belirlenmesi	35
3.2.4. En yüksek ham petrol degradesyonu gösteren izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması.....	36
3.2.4.a. Gram boyama	36
3.2.4.b. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi.....	36
3.2.4.c. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	37
3.2.4.d. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi	37
3.2.4.e. Oksidaz testi	37
3.2.4.f. Katalaz testi.....	38
3.2.5. Ham petrolü parçalayan bakterilerin moleküler identifikasyonu	38
3.2.5.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması	38
3.2.6. Ham petrolü parçalayan bakterilerin optimizasyon çalışmaları	42
3.2.6.a. Mikroorganizmaların ko-kültürlerinin ham petrolün biyodegradesyonuna olan etkisinin araştırılması	42

3.2.6.b. Farklı azot kaynaklarının ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisinin araştırılması	43
3.2.6.c. Sıcaklığın ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisinin araştırılması	43
3.2.6.d. İnkübasyon süresinin ham petrol degradasyonuna etkisinin araştırılması	43
3.2.7. Büyük ve küçük hacimlerde petrol parçalanma oranlarının karşılaştırılması ..	44
3.2.8. İzolatların GC-MS analizleri	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. Ham Petrolü Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu	46
4.2. İzolatların Farklı Deniz Sularında Ham Petrol Degradasyon Miktarlarının Belirlenmesi	47
4.3. Ham Petrolü Parçalayan Mikroorganizmaların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	48
4.4. Ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların moleküler identifikasyonu.....	49
4.4.1. İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu	49
4.4.2. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....	50
4.4.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizlerine göre benzerlik oranları.....	51
4.5. İzolatların Ko-Kültürlerinin Ham Petrolü Parçalama Potansiyellerinin Belirlenmesi	52
4.6. Farklı Azot Kaynaklarının Ham Petrolün Parçalama Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	53
4.7. Sıcaklığın Ham Petrolün Parçalanma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	54
4.8. İnkübasyon Süresinin Ham Petrolün Parçalanma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	55
4.9. Büyük ve Küçük Hacimlerde Petrol Parçalanma Oranlarının Karşılaştırılması	56
4.10. GC-MS Analizleri	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovin Serum Albumin
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
gr	: Gram
IPTG	: İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
M	: Molar
mM	: Milimolar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Metanın kimyasal yapısı	3
Şekil 1.2. Etilen kimyasal yapısı	4
Şekil 1.3. Asetilenin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.4. Benzenin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.5. Naftalenin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.6. Exxon Valdez (1989) kazası sonrası karaya vuran büyük deniz canlısı.....	9
Şekil 1.7. Deep Water Horizon (2010) kazası sonrası bir kuş görüntüsü	10
Şekil 1.8. Denizlerde meydana gelen ham petrol kirliliğinin yakma yöntemiyle giderilmesi	11
Şekil 1.9. Petrol bariyerleri	12
Şekil 1.10. Petrol sıyırıcı.....	13
Şekil 4.1. Bazı izolatlara ait petri görüntüleri	47
Şekil 4.2. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.3. Mavi-beyaz tarama	51
Şekil 4.4. Bazı izolatların koloni-PCR sonuçları	51
Şekil 4.5. İzolatların ko-kültürlerinin ham petrolü parçalama potansiyelleri	53
Şekil 4.6. Farklı azot kaynaklarının ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisi	54
Şekil 4.7. Sıcaklığın ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisi	55
Şekil 4.8. İnkübasyon süresinin ham petrol biyodegradasyonuna etkisi	55
Şekil 4.9. Büyük hacimlerde optimize koşullar altında ham petrol biyodegradasyonu..	56
Şekil 4.10. Küçük hacimlerde optimize koşullar altında ham petrol biyodegradasyonu.....	56
Şekil 4.11. Büyük ve küçük hacimlerde ham petrolün degradasyon miktarlarının karşılaştırılması	57
Şekil 4.12. Bakteri inokülasyonu yapılmamış örneğin GC-MS sonuçları.....	59
Şekil 4.13. PB6 kodlu izolatın ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları.....	60
Şekil 4.14. PB4 ve PB6 kodlu izolatların ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları.....	61
Şekil 4.15. PB4, PB6 ve PB7 kodlu izolatların ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Hidrokarbonların genel sınıflandırılması.....	3
Çizelge 1.2. Öncelikli kirletici olarak bilinen polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri	6
Çizelge 3.1. Ülkemizi çevreleyen denizlere ait su örneklerinin özellikleri	30
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	34
Çizelge 4.1. İzolatların farklı deniz sularında ham petrol degradasyon miktarları.....	48
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	49
Çizelge 4.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizlerine göre benzedikleri türler ve benzerlik oranları.....	52

1. GİRİŞ

Petrol, yüzyıllardır dünyanın en önemli enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Petrole alternatif yeni enerji kaynakları bulunmadığı sürece, bu öneminin devam edeceği aşikârdır. Bu yönüyle de petrol dünya siyasetinde ve ekonomisinde tartışılmaz bir öneme sahiptir. Stratejik önemin yanı sıra, petrolün taşınımı, üretimi ve kullanımı sırasında meydana gelen kazalar, çevre açısından önemli problemlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Petrol ve ürünleri hidrokarbon tabiatında olduğundan, denizin doğal yapısını bozmaktadır. Bu hidrokarbonlar, toksik etkileri sebebiyle denizde yaşayan canlılara zarar vermekte, ayrıca rüzgârın ve akıntının da etkisiyle hızla yayılabilmektedir. Ham petrolün çevreden tamamen temizlenebilmesi hemen hemen imkânsızdır. Özellikle, denize sızan petrolün yayılımı, önleyici tedbirlerle giderilirken, doğaya vereceği tahribat ise mevcut fiziksel ve kimyasal yöntemlerle tamamen elemine edilememektedir. Petrolün kirlettiği alanların temizlenmesinde fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanı sıra, biyoremediasyon en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Biyoremediasyon; petrol gibi toksik kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından kullanılarak, H₂O, CO₂ ve zararsız inorganik bileşikler gibi ürünlere dönüştürülmesi esasına dayanan, çevre dostu ve maliyeti düşük olan bir yöntemdir.

Bu çalışmada amacımız; denizel ortamlarda, tanker kazaları sonucu ya da yapılan sondaj çalışmaları sırasında meydana gelen ham petrol sızıntılarının oluşturduğu kirliliğin, mikroorganizmalar yardımıyla giderilmesidir.

1.1. Petrol

Petrol, Latince sırasıyla taş ve yağ anlamlarına gelen anlamına gelen 'petra' ve 'oleum' kelimelerinin biraraya gelmesinden oluşmaktadır. Doğal olarak yer altında bulunan petrol, birçok hidrokarbonun birleşiminden oluşmuştur. Yanıcı özellikte, yoğun

ve genellikle koyu renge sahip olan petrol, doğal veya rafineri yakıt ürünü olarak kullanılmaktadır. Fosil yakıtlar arasında en önemli enerji kaynağı olmasının yanı sıra, küresel çevre kirleticilerinin de başında yer almaktadır. Ham petrolün yapısında bulunan hidrokarbonlar, kanserojen ve toksik özellikleri nedeniyle ciddi ekolojik problemlere yol açmaktadır (Sharma *et al.* 2015).

1.2. Petrolün Temel Bileşimi

Petrol hidrokarbonları; karbon, hidrojen atomlarının yanı sıra oksijen, azot, sülfür ve metal bileşiklerin bir araya gelmesiyle oluşur. Fiziksel, kimyasal ve element olmak üzere 3 temel bileşenden meydana gelir.

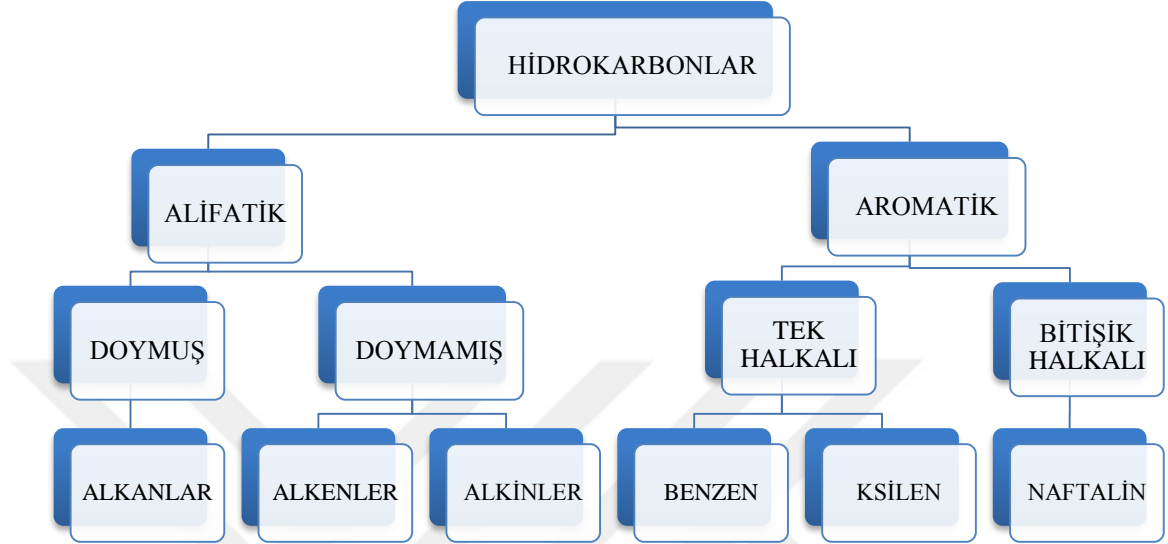
1.2.1. Element bileşimi

Petrolün element bileşimi, petrolün kaynağına göre büyük farklılıklar göstermesine rağmen; temel olarak %75'inden fazlasını hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Petrol; %82 – %87 oranında karbon, %11 - %15 oranında hidrojen, %0 - %8 oranında sülfür, %0 - %1 oranında azot ve %0 - %0,5 oranında oksijen olmak üzere 5 temel elementi bünyesinde barındırmaktadır. Bu elementlerin karbon atomuna oranları (N/C, H/C, O/C ve S/C), ham petrolün genel karakterinin belirlenmesinde rol oynamaktadır (Speight 2007).

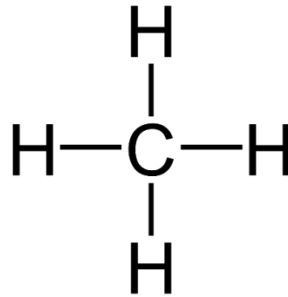
1.2.2. Kimyasal bileşimi

Hidrokarbonlar adlarından anlaşılacağı üzere yalnızca hidrojen ve karbon atomlarından oluşmakta olup, temelde aromatik ve alifatik olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Hidrokarbonların genel sınıflandırılması (Ozyurek 2016)



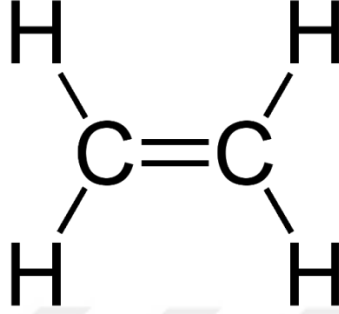
a. Alkanlar: Tüm karbon atomlarının hidrojen elementleriyle tekli bağ yaptığı dallanmış ya da dallanmamış yapıya sahip organik bileşiklerdir. Alkanlarda, karbon atomu maksimum miktarda hidrojeni bağladığı, için doymuş hidrokarbonlar grubunda yer almaktadır. Genel formülleri ise, C_nH_{2n+2} şeklindedir (Şekil 1.1) (Speight 2007; Speight and Arjoon 2012).



Şekil 1.1. Metanın kimyasal yapısı (Speight 2007)

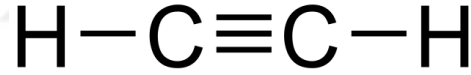
b. Alkenler (Olefinler): Dallanmış ya da dallanmamış yapıdaki karbon atomları arasında, çift bağ içermeleri ile karakterize edilirler. Doymamış alkan analogları olan

alkenler, petrol içeriğinde çok nadir yer alırlar (Okoh 2006). Genel formülleri C_nH_{2n} 'dir (Şekil 1.2).



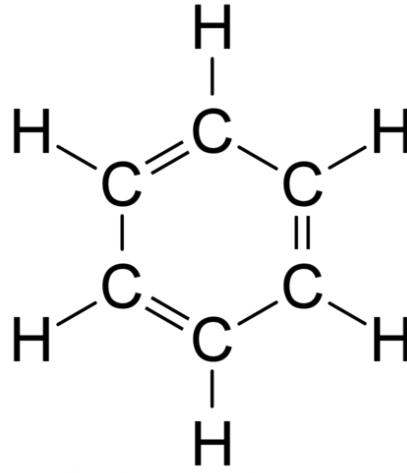
Şekil 1.2. Etilen kimyasal yapısı (Speight 2007)

c. **Alkinler (Asetilenler):** Genel formülleri C_nH_{2n-2} olup, yapılarında en az bir tane üçlü bağ bulunur (Speight 2007; Speight and Arjoon 2012).



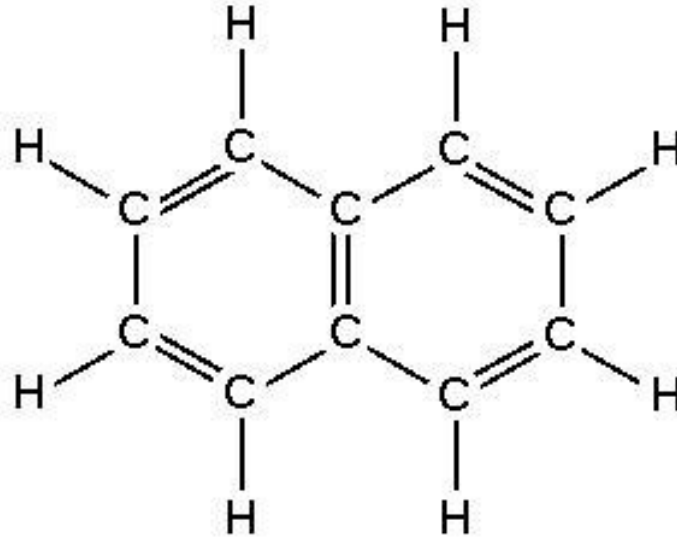
Şekil 1.3. Asetilenin kimyasal yapısı (Speight 2007)

d. **Tek Halkalı Aromatikler:** Fiziksel açıdan diğer hidrokarbonlara benzemekle beraber, büyük çoğunlukla petrol ve kömürün yapısını oluşturur. Tek halkalı aromatik hidrokarbonlar, altı karbon atomundan oluşan, tek bir aromatik halka içermeleri ile karakterize edilirler. En basit yapıya sahip tek halkalı aromatik hidrokarbon ise, benzendir (Şekil 1.4) (Speight 2007; Speight and Arjoon 2012).



Şekil 1.4. Benzenin kimyasal yapısı (Speight 2007)

e. Bitişik Halkalı Aromatikler: Petrol ve petrol türevleri olan çok halkalı aromatik hidrokarbonlar (PAH); mutajenik, toksik ve karsinojenik özelliğe sahip organik kirleticilerdir (Demir ve Demirbağ 1999). En az iki benzen halkasına sahip olan PAH'lar, hidrofobik karakterdedir (Zhang *et al.* 2006; Varjani and Upasanai 2013). PAH'ların, bu özelliklerinden dolayı suda çözünürlükleri oldukça az olup, yüksek oranda lipofilik özelliğe sahiptirler. Yapısında dörtten az benzen halkası bulunduran PAH'lar, düşük molekül ağırlıklı, dört veya daha fazla benzen halkası içeren PAH'lar ise yüksek molekül ağırlıklı çok halkalı aromatik hidrokarbonlar olarak adlandırılır (Şekil 1.5) (Çizelge 1.2) (Danyi *et al.* 2009).



Şekil 1.5. Naftalenin kimyasal yapısı (Bourotte *et al.* 2009)

Çizelge 1.2. Öncelikli kirletici olarak bilinen polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri (Bourotte *et al.* 2009).

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)	
Naftalen (Np)	Fenantren (Phe)
Asenaften (Ane)	Antrasen (An)
Floren (Flr)	Piren (Py)
Benzo[a]antrasen (BaA)	Krisen (Chr)
Benzo[b]floranten (BbF)	Benzo[k]floranten (BkF)
Floranten (Flu)	Asenaftelen (Anp)
Benzo[a]piren (BaP)	Dibenz[a,h]antrasen (DahA)

1.2.3. Fiziksel bileşimi

Petrolün kimyasal özelliklerinin yanısıra fiziksel özellikleri de bilinmelidir. Petrol, genellikle fiziksel özellikleri (yoğunluk, akma noktası) ve kimyasal bileşimi (yüzdesel

hidrokarbon miktarı, asfalt içeriği ve sülfür miktarı) ile tanımlanmaktadır. Bunun yanında; petrolün yanma noktası, viskozitesi, su içinde emülsiyon oluşturması ve toprağa karışımı gibi özellikleri de petrolün karakterizasyonu açısından oldukça önem arz etmektedir. Genel olarak petrol ürünlerinin akma noktalarının $< 0^{\circ}\text{C} - > 100^{\circ}\text{C}$, kaynama noktalarının $0^{\circ}\text{C} - 565^{\circ}\text{C}$; yoğunluklarının $0,6 - 1,3 \text{ gr/cm}^3$; arasında değişim gösterdikleri bilinmektedir. Her ne kadar bu özellikler, ham petrolün biyoremediasyonu bakımından diğer parametrelere oranla daha az önemli gibi gözükse de; petrol ve petrol ürünlerinin buharlaşma oranı, çeşitli sıcaklıklardaki akışkanlık değerleri, su üzerinde yüzme yetenekleri ve hareket kabiliyetlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir (Speight and Arjoon 2012).

1.2.3.a. Yoğunluk ve özgül ağırlık

Bir maddenin belirli bir sıcaklıkta ki birim haciminin kütlesine yoğunluk denir ve gr/cm^3 birimiyle tanımlanır. Petrolün yoğunluğu, 60°F ($15,5^{\circ}\text{C}$) sıcaklık ve 1 atmosfer basınç altındaki yoğunluğu olarak ifade edilmektedir. Ham petrolün yoğunluğu, petrolün kimyasal bileşiminden etkilenmektedir. Özgül ağırlık; bir maddenin kütlesinin aynı birim hacimdeki suyun kütlesine olan oranıdır. Yoğunluk ve özgül ağırlık terimlerinin petrol endüstrisinde büyük önemi vardır. Aynı zamanda ham petrolün yoğunluğu, su yüzeyindeki davranışını etkilediğinden, atmosferik oksidasyona maruz kalma durumunu belirler. Ancak yoğunluk ve özgül ağırlık kavramları geniş kullanım alanına sahip olsa da; API (Amerikan Petrol Enstitüsü) yoğunluğu genel olarak referans almaktadır. Petrolün özgül ağırlığı hafif ve ağır petrol için 0,8 (45,3 API); zift ve katran için 1 (10 API) civarında değişiklik göstermektedir. Petrolün özgül ağırlığı, yoğunluğu ve API değerleri hidrometre ve pikometre kullanılarak belirlenebilir (Speight 2007; Speight and Arjoon 2012).

1.2.3.b. Viskozite (akmazlık)

Bir akışkanın üzerine uygulanan yüzey gerilimine karşı gösterdiği dirence viskozite denir. Ham petrolün viskozitesi sıcaklık ve basınca bağlı olarak geniş bir aralıkta

değişkenlik göstermektedir (Speight and Arjoon 2012). Sıvı formda bulunan tüm petrol fraksiyonları için önemli bir özellik olan viskozite, API değeriyle ters orantılıdır yani API değerinin azalmasıyla beraber viskozite artmaktadır (Denis *et al.* 1997; Riazi 2005).

1.2.3.c. Uçuculuk

Bir sıvının, sıvı halden gaz hale geçme eğilimine ya da başka bir deyişle buharlaşma yatkınlığına uçuculuk denir. Petrolün buharlaşma yatkınlığı, sıvı petrol yakıtlarının (benzin, LPG, kerosen, uçak yakıtı, fuel oil, dizel yakıt ve motorin) karakterizasyonuna göre değişmektedir (Speight and Arjoon 2012). Uçuculuk, yoğunluk ve kaynama noktası gibi fiziksel özelliklere bağlıdır. Düşük kaynama noktasına sahip ve yoğunluğu az olan moleküllerin uçuculukları fazladır. Örnek olarak etanın (C2) kaynama noktası, propana (C3) göre düşük olduğu için, etanın uçuculuğu propandan daha fazladır. Uçuculuğu fazla olan hafif moleküllerin, uçuculuğu düşük olan ağır moleküllere göre yanıcılığı daha yüksektir (Daubert and Danner 1997; Riazi 2005).

1.3. Petrol Kirliliğinin Çevreye Etkisi

Günümüzde ham petrol ürünlerinin sebep olduğu kara ve denizlerde neden olduğu kontaminasyon tüm dünyayı ilgilendiren sorunların başında yer almaktadır (Thapa *et al.* 2012). Petrolün taşınması, üretilmesi, işlenmesi ve kullanımı farklı seviyelerde çevre kirliliğine neden olmaktadır (Kvendolven and Cooper 2003). Denizlerde petrolün araştırılması ve sondajı sırasında meydana gelen petrol kirliliği, çevresel ve ekonomik sorunlara yol açmaktadır. Kirliliğin ileri boyutlara ulaştığı kıyı kesimlerinde yaşayan canlılarda, önemli oranda hidrokarbon birikimi olduğu belirlenirken, açık denizlerde yaşayan canlılarda ise birikimin ppm (parts per million - milyonda bir) veya ppb (parts per billion - milyarda bir) düzeyinde olduğu gösterilmiştir. Deniz suyunda ppm düzeyinde bulunan petrolün besin zinciri yoluyla deniz canlılarına geçtiğinde ppb düzeyine ulaştığı gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda, 10-30 ppb seviyesindeki petrolün fitoplanktonlarda fotosentezi uyardığı, 60-200 ppb ve daha yüksek düzeylerde

ise yavaşlattığı gösterilmiştir (Ceyhan ve Esmeray 2012). Petrol hidrokarbonları, karsinojenik, mutajenik ve nörotoksik etkilerinden dolayı mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerinde toksik etkiye sahiptir. Bu zararlı etkilerin azaltılması için yeni iyileştirme stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Biodia *et al.* 2010; Thapa *et al.* 2012; Singh *et al.* 2014).



Şekil 1.6. Exxon Valdez (1989) kazası sonrası karaya vuran büyük deniz canlısı



Şekil 1.7. Deep Water Horizon (2010) kazası sonrası bir kuş görüntüsü

1.4. Petrol Kirliliğinin Çevreden Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Petrol ve petrol bazlı hidrokarbonlardan kaynaklanan kontaminasyonlar, önemli çevre ve sağlık sorunlarına yol açmakta; bu nedenle meydana gelen kontaminasyonların elemine edilmesi için, yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması gereksinimi ortaya çıkmaktadır (Sathiskumar *et al.* 2008). Bu bağlamda; petrol kontaminasyonunun giderilmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç farklı yaklaşım bulunmaktadır.

1.4.1. Fiziksel yöntemler

Çevrede meydana gelen petrol kirliliğinin, fiziksel yöntemler ile giderilmesi temeline dayanmaktadır. Bu işlem esnasında, kirleticinin kontamine alandan uzaklaştırılması, sağlanmaktadır (Tan 2009). Bu yöntem yaygın olarak deniz ve tatlı su ekosistemlerinde meydana gelen petrol kontaminasyonunun temizlenmesinde tercih edilmektedir.

1.4.1.a. Yakma

Kıyı şeridinde çeşitli bitki örtüsü ve moloz yığınları gibi yanabilir özelliği yüksek ortamlarda meydana gelen petrol kirliliğinin giderilmesinde veya kıyıda uzak bölgelerde denize dökülmüş olan petrolün uzaklaştırılmasında bu yöntem kullanılmaktadır. Prosesin etkin uygulanabilmesi için, petrol tabakası kalınlığının 2-3 mm olması ve yangına dayanıklı bariyerler ile çevrelenerek, petrolün yayılımının engellenmesi gerekmektedir. Ancak bu yöntem, önemli ölçüde hava kirliliğine yol açarak, bitki ve hayvanlara ciddi zarar vermektedir. (Şekil 1.8) (Kulkarni *et al.* 2012).



Şekil 1.8. Denizlerde meydana gelen ham petrol kirliliğinin yakma yöntemiyle giderilmesi

1.4.1.b. Yıkama

Kıyı şeridi boyunca meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde kullanılmakta olup, yüksek basınç ve sıcak su uygulaması nedeniyle verimli habitatlarda tatbik edilmesi uygun değildir. İnsan gücü gerektiren ve zaman alan bir yöntem olması gibi dezavantajları da söz konusudur (Kulkarni *et al.* 2012).

1.4.1.c. Petrol bariyerleri

Deniz gibi sucul ortamlarda meydana gelen petrol kirliliğinin belirli bir alanda sınırlandırılması, toplanması ve risk altındaki bölgelerin korunması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Suyun durgun olduğu liman ve kıyı bölgelerinde meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde, kolaylıkla uygulanabilir. Bu yöntem gemi ve sıyrıcı ekipmanlar ile hassas alanlarda biriken kirlilik ajanlarının toplanması esasına dayanır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Petrol bariyerleri

1.4.1.d. Petrol sıyrıcılar

Petrol ve yağların kimyasal ya da fiziksel özelliklerini bozmadan, su yüzeyinden toplamak amacıyla tasarlanmış mekanik ekipmanlara sıyrıcı (skimmer) denir. Deniz ekosistemlerde meydana gelen petrol sızıntılarının temizlenmesinde sıyrıcılar kullanılmaktadır. Gemiye monte edilmiş bu sistem sayesinde durgun deniz yüzeyindeki petrolün mekanik olarak toplanması sağlanmaktadır. Bir sıyrıcının kapasitesi, su

yüzeyindeki petrol tabakasının kalınlığına, ortamın sıcaklığına, sıyrıcının hızına ve petrolün viskozitesine göre değişmektedir. Ancak bu sistemin kolaylıkla tıkanabilmesi, geniş petrol kontaminasyonlarının olduğu bölgelerde, etkin bir şekilde kullanımının önünü kesmektedir. Diğer temizleme yöntemlerine oranla, fiziksel temizleme yöntemleri, kimyasal maddelerin kullanılmaması, çevreye zararın düşük düzeyde olması ve sahile vuracak petrol miktarının azaltılması açısından belirli avantajları olmasına karşın; yüksek maliyet içermesi ve yoğun iş gücü gerektirmesi açısından da dezavantajları bulunmaktadır (Kulkarni *et al.* 2012).



Şekil 1.10. Petrol sıyrıcı

1.4.2. Kimyasal yöntemler

Organik kirleticilerin ortamdaki tamamen uzaklaştırılmasında fiziksel yöntemlerin yeterli olmadığı durumlarda, farklı temizleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu

yöntemlerden bir diğeri de, kimyasal yöntemlerdir. Açık denizlerde ve dalgalı koşullarda kullanılabilen bir yöntem olan kimyasal yöntemler; sentetik temizleyici maddeler aracılığıyla, kirleticinin tamamen parçalanması veya tam katı hâle getirilerek (plastik gibi) kolay bir şekilde toplanabilmesi prensibine dayanır. Çeşitli organik çözücüler veya alkali solüsyonların kullanıldığı bu yöntemde çoğunlukla seyrelticiler (dispersantlar) tercih edilmektedir. Sürfaktanları da içeren dispersant ajanlar, petrolün yüzey gerilimini azaltarak, su içinde küçük parçalar hâlinde dağılmasına neden olur. Dağılan petrol ise, organizmalar tarafından, fotolitik olaylarla kolayca parçalanabilir (Van Hamme 2000). Günümüzde karasal ve sucul ekosistemde meydana gelen petrol kirliliğinin gideriminde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin oldukça pahalı olması, kirleticilerin tamamen yıkıma uğratılamaması ve dispersantların canlılara zarar vermesi gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle daha uygun maliyetli, az iş gücü gerektiren, güvenilir ve doğaya dost yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Das and Chandran 2011; Kulkarni *et al.* 2012).

1.4.3. Biyolojik yöntemler

Biyolojik yöntemler; karmaşık yapıdaki toksik organik kirleticilerin CO₂ ve H₂O gibi daha basit inorganik bileşiklere yıkılması biyolojik yıkım veya toksik organik kirleticinin toksik olmayan bileşiklere dönüşümü esasına dayanır (Semple *et al.* 2001; Plaza *et al.* 2001; Singh and Chandra 2014). Bu sürecin etkin bir şekilde işlemesi için; kontamine bölgenin analiz edilmesi, çevre için en uygun yöntemin belirlenmesi ve koşulların optimize edilmesi gerekir. Aerobik şartlarda daha etkin olduğu gözlenen iyileştirme süreci temel olarak in-situ (yerinde) ve ex-situ (doğal yeri dışında) temizleme yöntemlerini esas alır (Mohapatra 2008; Ball *et al.* 2011).

1.4.3.a. Ex-Situ (doğal yeri dışında) temizleme yöntemi

Çeşitli organik atıklar ile kontamine olmuş toprağın yerinden alınarak uygun alanlarda gerekli iyileştirme uygulamalarının gerçekleştiği bir süreçtir. Ex-situ metodu, in-situ yöntemin uygulanamadığı yerleşim bölgeleri ve endüstriyel alanlarda meydana gelen

küçük miktarlardaki toprak kontaminasyonları için uygulanabilir. Bu yöntemde sıcaklık, pH, tuz ve nem gibi çok sayıda faktör kontrol altında tutulabildiği için yüksek oranda iyileşme sağlanabilmektedir (Alexander 1999; Van Hamme 2000; Ceyhan ve Esmeray 2012).

1.4.3.b. In-Situ (yerinde) temizleme yöntemi

Toprak ve yer altı sularında meydana gelen kontaminasyonun temizlenmesini hedefleyen bir yöntemdir. Bu yöntem, özellikle petrol kontaminasyonunun yoğun olduğu 15-30 cm toprak derinliğinde ve doğal olarak petrol parçalama kapasitesine sahip mikroorganizmaların bulunduğu ortamlarda yüzey temizlenmesinden sorumludur. Yer altı biyoremediasyon sürecinde ise, devamlı olarak besin ve oksijen ilavesi yapılması gerekir (Ceyhan ve Esmeray 2012). In-situ biyoremediasyon fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yetersiz kaldığı geniş alanlarda tercih edilmektedir. Bu yöntem; kirleticinin tamamen parçalanması, çalışanlar için düşük risk oluşturması, daha az ekipman gerektirmesi ve düşük maliyetli olması açısından çeşitli avantajlara sahiptir (Speight and Arjoon 2012). In-situ biyoremediasyon süreci; biyostimülasyon ve biyoaugmentasyon, biyohavalandırma, biyodağıtma ve doğal biyoremediasyon gibi farklı yöntemler içermektedir.

Biyostimülasyon: Organik kirleticilerin biyoyıkımında görev alan endojen mikroorganizmaların üremelerinin ve metabolik aktivitelerinin, çeşitli nütrientler, e⁻ alıcıları, pH, sıcaklık, nem ve O₂ gibi parametreler ile stimüle edildiği önemli bir süreçtir. Temel olarak bu yöntem, iyileştirme yapılacak alandaki çevresel koşulların optimize edilmesi olarak esasına dayanmaktadır (Das and Chandran 2011; Thapa *et al.* 2012; Singh and Chandra 2014; Adams *et al.* 2015).

Biyoaugmentasyon (Biyolojik Arttırma): Organik kirleticilerin daha hızlı ve etkin parçalanması amacıyla, biyoyıkım kapasitesine sahip spesifik ya da genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kontamine olan bölgeye eklendiği önemli bir prostestir (Singh and Chandra 2014). Özellikle toprakta doğal olarak bulunan mikroorganizmaların, tam

olarak tanımlanmadığı veya iyileştirme sürecini gerçekleştirebilecek metabolik kapasiteye sahip olmadığı durumlarda bu yöntemin kullanılması oldukça avantajlıdır (Thapa *et al.* 2012).

Biyohavalandırma: Organik bileşenlerin, endojen mikroorganizmalar aracılığıyla biyoyıkımı temeline dayanır. Özellikle kerosen, jet, benzin ve yakıt gibi petrol ürünlerinin biyoremediasyonunda oldukça etkin bir şekilde kullanılırlar (Mohapatra 2008; Das and Adholye 2012).

Biyodağıtma: Sulak topraklarda bulunan organik kirleticilerin biyoyıkımından sorumlu olan endojen mikroorganizmaların tetiklendiği bir süreçtir. Kontamine bölgeye çeşitli borular aracılığıyla hava enjeksiyonu yapılarak (çözünen oksijen miktarı yükseltilerek) endojen bakterilerin üreme hızı artırılmaktadır. Özellikle dizel yakıt gibi orta ağırlıktaki petrol ürünlerinin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntemin etkinliği, toprağın geçirgenliğine bağlıdır (Vidali 2001; Mohapatra 2008; Das and Adholye 2012).

Doğal Biyoremediasyon (Biyolojik Atenüasyon)

In-situ biyoremediasyon kapsamında; biyolojik atenüasyon, pasif remediasyon, doğal remediasyon veya biyolojik zayıflatma gibi farklı isimlendirmeler ile bilinen bu yöntem organik kirleticinin doğal koşullarda çevreden uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde çevresel koşullara herhangi bir müdahale gerçekleşmez. Organik kirleticinin tamamen yıkıma uğratıldığı ve ya kirleticinin konsantrasyonunun azaldığı bir süreçtir. Toprak ve yer altı sularında doğal olarak bulunan mikroorganizmalar, petrol bileşiklerini birincil enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Biyoyıkım sürecinde; ortamda doğal olarak bulunan bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalar, doğal koşullarda organik kirleticileri tamamen parçalayarak, daha az toksik veya toksik olmayan bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır (Khan *et al.* 2004).

1.5. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)

1960'lı yıllarda Kaliforniya'nın Santa Barbara kıyı şeridinde meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde, çeşitli mikroorganizmaların kullanıldığı bilinmektedir (Adams *et al.* 2015). Biyoremediasyon, petrol gibi organik kirleticilerin çevreden uzaklaştırılmasında mikroorganizmaların ve onların ürünlerinin kullanıldığı oldukça önemli bir süreçtir (Leung 2004) 1980'li yıllardan bu yana petrol ve diğer zararlı organik atıkların biyolojik remediasyonu oldukça büyük önem kazanmıştır (Shannon and Unterman 1993; Adams *et al.* 2015). Bu süreçte söz konusu organik kirleticiler, CO₂, H₂O ve biyokütleye dönüştürülmektedir (Mohapatra 2008; Das and Adholye 2012). Aynı zamanda biyoremediasyon; özellikle toprakta doğal olarak bulunan mikroorganizmaların aktive edildiği veya biyoyıkımda rol oynayabilecek metabolik kapasiteye sahip mikroorganizmaların ortama aktarıldığı önemli bir süreçtir. Bu süreçte, toksik organik bileşiklerin toksik olmayan yan ürünlere dönüşümüyle birlikte, mikroorganizmaların sayıları normal populasyon düzeyine ulaşmakta ve buda ekolojik dengenin bozulmadan kalmasını sağlamaktadır. Bazı durumlarda ise, ortaya çıkan bu toksik olmayan yan ürünlerden geri kazanım sağlanabilir. Özellikle uygun biyokimyasal parametrelerin sağlandığı anaerobik arıtım teknolojisinde; metan bakterilerinin organik atıklardan, metan gazı ürettikleri bilinmektedir Biyoremediasyon sürecince,

- ✓ Petrol ve türevleri
- ✓ Klor içermeyen (dehalojenize) fenolikler ve kresoller
- ✓ Dehalojenize aromatik bileşikler: Benzen, Toluen, Etil Benzen, Ksilen (BTEX)
- ✓ Polinükleer aromatik hihrokarbonlar (kresot yağı)
- ✓ Alkanlar ve alkenler (fuel oil)
- ✓ Azot içeren heterosiklikler (piridin)
- ✓ Klorlanmış çözücüler (kloroform)
- ✓ Polikolorlanmış bifeniller (triklorobifenil)
- ✓ Klorofenoller (pentaklorofenol)

✓ Herbisit ve pestisitler gibi çok sayıda organik kirleticinin mikroorganizmalar kullanılarak farklı habitatlardan eliminasyonu hedeflenmektedir (Alexander 1999; Ceyhan ve Esmeray 2012).

1.5.1. Biyoremediasyonun avantajları ve dezavantajları

Toksik bileşiklerin, doğal ortamda bulunan mikroorganizmalar tarafından toksik olmayan bileşiklere dönüştürüldüğü biyoremediasyon sürecinin önemli avantaj ve dezavantajları vardır. Bu doğrultuda; toprak ve yer altı sularının iyileştirilmesi amacıyla uygulanan biyoremediasyon teknolojisi alanında yapılan çalışmalar, prosesin etkin bir şekilde uygulanabilmesinin önünü açmaktadır (Milic *et al.* 2009; Singh and Chandra 2014).

Biyoremediasyonun Avantajları

- ✓ Çevreye dost, ekolojik olarak güvenli ve doğal bir süreçtir.
- ✓ Toksik bileşikler, zararlı olmayan CO₂, H₂O ve yağ asitlerine dönüştürülür.
- ✓ Sınırlanmış bir alanda direkt olarak uygulanabilir
- ✓ Diğer geleneksel yöntemler ile karşılaştırıldığında uygun maliyetlidir.
- ✓ Uygulamada kullanılacak ekipmana ulaşım oldukça kolaydır.
- ✓ Diğer yöntemlere kıyasla yüzey remediasyonu için gereken süre daha azdır.
- ✓ Atık ürün ya çok az oluşur ya da hiç oluşmaz.
- ✓ Kirleticinin biyoyıkımını takiben besin miktarının azalmasına paralel olarak mikrobiyal popülasyonda da düşüşler meydana gelir.
- ✓ Biyoremediasyon alanında devam eden doğal işleyişte minimal düzeyde bozulmaya neden olur.
- ✓ Diğer remediasyon teknolojileri ile birleştirilerek biyoremediasyon etkinliği artırılabilir (Sebiomo *et al.* 2011; Singh and Chandra 2014; Adams *et al.* 2015).

Biyoremediasyonun dezavantajları

- ✓ Süreç esnasında, çevresel koşulların stabilizasyonu gereklidir.
- ✓ Düşük çözünürlüğe sahip organik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında mikrobiyal etkinlikte azalma gözlemlenebilir.
- ✓ Geçirgenliği yüksek toprak ve kanallarda uygulanabilirliği daha yüksekken, geçirgenliği düşük topraklar için uygun bir yöntem değildir.

1.6. Mikrobiyal Yıkım (Biodegradasyon)

Petrol hidrokarbonlarının çevreden uzaklaştırılmasında, mikrobiyal yıkım (biyoyıkım) en önemli ve temel mekanizmaların başında yer almaktadır (Das and Chandran 2011). Biyoyıkım; mikroorganizmalar tarafından petrol hidrokarbonları gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin enerji, hücre kütlesi ve biyolojik ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır (Zhang *et al.* 2005). Yaklaşık 80 yıldır belirli enzimatik kapasiteye sahip mikroorganizmaların, petrol ve petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak biyoyıkıma uğratabildikleri bilinmektedir (Thapa *et al.* 2012). Mikroorganizmalara ait saf kültürlerin, petrol gibi tek bir karbon kaynağı üzerinde gelişim göstermesi, mikroorganizmanın mikrobiyal yıkım yeteneğini işaret etmektedir (Agwu *et al.* 2013). Hidrokarbon biyoyıkımının ilk aşaması için oksijenazın, dolayısıyla serbest oksijenin ortamda bulunması gerekir. Monooksijenaz aracılığı ile alkanlardan oluşan alkol ilk önce aldehite son olarak yağ asitlerine kadar oksitlenir. Bu aşamadan sonra yağ asitleri β -oksidasyon yolu ile tamamen yıkılır (Okoh 2006). Biyoyıkım sürecinde oluşan asetil-CoA, sitrik asit (TCA) döngüsüne girerken, elektronlar ETS üzerinden son elektron alıcısına aktarılır. Döngü hidrokarbonların CO₂'ye oksitlenmesine kadar devam eder. Benzen, toluen, naftalen ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonlar aerobik koşullarda biyoyıkıma uğrarlar. Funguslar bu süreçte, karsinojenik etki gösteren yan ürünlerin oluşumuna sebep olurken, bakteriler ise aromatik hidrokarbonları detoksifiye edebilmeleri ve karsinojenik madde oluşturmamalarından dolayı biyoyıkımda daha etkin olarak tercih edilirler (Ubalua 2011; Peixoto *et al.* 2011).

Hidrokarbon biyoyıkımı; petrolün hidrokarbon içeriğine, çevresel koşullara ve mikrobiyal topluluğa bağlı olarak gerçekleşmektedir (Ubalua 2011). Biyoyıkım sürecinin daha etkin ve hızlı gerçekleşebilmesi için; mikroorganizmalar için optimal sıcaklık, basınç, besin, nem, oksijen ve pH gibi çevresel parametrelerin sağlanması gerekmektedir (Singh and Chandra 2014).

1.6.1. Petrol biyoyıkımını etkileyen fiziksel faktörler

1.6.1.a. Sıcaklık

Sıcaklık, petrolün fiziksel yapısı, petrolde bulunan hidrokarbonların bileşimi, mikrobiyal popülasyonun çeşitliliği ve mikroorganizmaların hidrokarbonları metabolize etme hızları üzerinde etki göstermektedir. Sıcaklık aynı zamanda petrol hidrokarbonlarının çözünürlüğü üzerine de etkilidir. Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı geniş sıcaklık aralığında gerçekleşebilmesine karşın, sıcaklığın düşmesi ile beraber biyoyıkım hızında da genellikle düşüş gerçekleşmektedir. Özellikle düşük sıcaklıklarda petrolün viskozitesi artmakta, toksik yapıdaki düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonların uçuculuğu azalmakta bu durum mikroorganizmalar için toksik etki yaratmaktadır. Böylesi toksik bileşiklerin petrolün içeriğinde bulunması, petrol biyoyıkımının başlamasında gecikmeye neden olmaktadır. En yüksek biyoyıkımın toprakta 30 - 40°C'de, tatlı sularda 20 - 30°C'de ve deniz suyunda 15 - 20°C'de gerçekleşmektedir. Hidrokarbon biyoyıkımı psikrofilik, mezofilik ve termofilik koşullar gibi geniş sıcaklık aralığında meydana gelmektedir. Mezofilik mikroorganizmalar tarafından petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonuna ait çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, psikrofilik koşullarda yaşayan mikroorganizmaların da biyoyıkımda rol oynadıkları bilinmektedir. Bu bilgilere ek olarak, 70°C gibi termofilik koşullarda hidrokarbon biyoyıkımının gerçekleştiği ortaya konulmuştur (Atlas 1995; Okoh 2006; Das and Chandran 2011; Ubalua 2011; Dindar vd 2013; Delille *et al.* 2014).

1.6.1.b. Oksijen

Petrol gibi organik kirleticilerin çoğunlukla hızlı bir şekilde biyoyıkıma uğratıldığı süreç, aerobik koşullarda gerçekleşmektedir (Das and Chandran 2011). Moleküler oksijenin anahtar rol oynadığı aerobik koşullarda gerçekleşen biyoyıkım süreci substratın oksijenaz ile oksitlenmesi ile başlar. Hidrokarbonların aerobik katabolizması, oksijenin son elektron alıcısı olarak bulunması nedeniyle oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Aerobik biyoyıkım süreci kadar etkili olmayan anaerobik biyoyıkım süreci ise, sülfat indirgeyen bakteriler gibi çeşitli inorganik bileşikleri son elektron alıcısı olarak kullanan anaerobik bakteriler tarafından katalizlenmektedir. Aerobik koşullarda gerçekleşen biyodegradasyon süreci oldukça hızlı ilerlemesine rağmen; özellikle çamurlu alanlar ve yer altı suları gibi oksijenin yetersiz olduğu çevre koşullarının temizlenmesinde anaerobik biyoyıkım süreci büyük önem taşımaktadır (Ubalua 2011; Peixoto *et al.* 2011).

1.6.1.c. pH

Mikrobiyal biyoyıkım sürecindeki önemli parametrelerin başında pH gelmektedir. Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı genellikle nötral pH aralığında gerçekleşmesine rağmen, organik kirleticileri içeren asidik pH koşullarında da bu prosesin gerçekleştiği bilinmektedir. Özellikle, heterotrofik asidofil mikroorganizmaların, petrol ile kontamine olmuş asidik drenaj suları gibi ağır metal ve çeşitli organik kirleticileri içeren çevre koşullarında da, oldukça etkili oldukları gösterilmiştir (Ball *et al.* 2011; Qin *et al.* 2012).

1.6.1.d. Basınç

Biyoyıkım sürecinde basıncın artması, mikroorganizmaların substratı kullanma potansiyelini arttırmakta bu da, biyoyıkım oranının yükselmesine sebep olmaktadır. Özellikle sucul ortamda bulunan ağır petrol (viskozitesi yüksek), hafif petrol (viskozitesi düşük) petrol kadar petrol-su ara yüzeyine tamamen yayılamaz. Bu durum iki faz arasındaki temas yüzeyinin az olmasına neden olmaktadır. Ancak ortamda artan

basınç ile beraber, petrol akuatik faz yüzeyine ince bir tabaka şeklinde yayılmakta, bu da, fazlar arasındaki temas yüzeyinin artmasına ve petrolün mikrobiyal yıkıma elverişli hale gelmesine neden olmaktadır (Darvishi *et al.* 2011).

1.6.1.e. Petrolün yapısı ve hidrokarbon bileşimi

Petrolün yapısı ve hidrokarbon içeriği de bir diğer önemli parametredir (Das and Chandran 2011). Petrolün yapısında bulunan hidrokarbonlar; alkanlar (normal ve izo), sikloalkanlar ve aromatikler olarak sınıflandırılırlar (Okoh 2006). Petrolün temel yapısını oluşturan bu hidrokarbonların mikrobiyal biyoyıkıma karşı duyarlılıkları düz alkanlar > dallı alkanlar > küçük aromatikler > siklik alkanlar olarak sıralanmaktadır. Özellikle kısa ve uzun zincirli alkanlar (C10 ve C20-C40) ile PAH'ların biyoyıkımı oldukça zordur (Yuste *et al.* 2000). Düşük molekül ağırlıklı PAH'lar uçucu, çözünebilir ve yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere göre daha kolay yıkıma uğratılabilir özelliktedirler. Birçok bakteri, düşük moleküler ağırlığa sahip PAH'ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilir. Yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar ise toprağa ve çeşitli sedimentlere sıkı bir şekilde bağlanarak mikrobiyal yıkıma karşı direnç gösterirler. Böylece doğada uzun süre yıkılmadan kalabilirler. PAH'lar yüksek molekül ağırlıkları ve hidrofobik yapıları nedeniyle tüm hücrelere toksik etki göstermektedir (Mrozik *et al.* 2003).

1.6.2. Petrol biyoyıkımını etkileyen biyolojik faktörler

Petrol hidrokarbonları; bakteri ve funguslar başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından biyoyıkıma uğratılabilmektedir (Hamzah *et al.* 2010) Benzer şekilde siyanobakterilerin de biyoyıkımda rol oynadıkları bilinmektedir (Okoh 2006). Petrol gibi çeşitli kimyasal organik kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından hücreye alınma ve metabolize edilme derecesi olarak ifade edilen biyoyararlanım; diğer fiziksel ve biyolojik faktörlere bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir (Harms *et al.* 2010). Petrol biyoyıkımında; *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp.,

Achromobacter sp., *Rhodococcus* sp., *Alcaligenes* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Marinobacter* sp., *Alcanivorax* sp., *Microbulbifer* sp., *Sphingomonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Dietzia* sp. ve *Gordonia* sp. gibi cinslerin etkili oldukları gösterilmiştir (Okoh 2006). Yapılan araştırmalarda; *Bacillus. megaterium*, *Pseudomonas. putida*, *Micrococcus luteus*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus pumilus* ve *E. aerogenes*'in de hidrokarbon biyoyıkımında etkin türler oldukları gösterilmiştir (Ojo 2006; Boboye *et al.* 2010; Agwu *et al.* 2013; Sawadogo *et al.* 2014).

Petrol biyoyıkımında etkin rol oynayan fungusların başında; *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Amorphoteca* sp., *Neosartorya* sp., *Paecilomyces* sp., *Talaromyces* sp., *Graphium* sp., *Candida* sp., *Yarrowia* sp. ve *Pichia* sp. cinsleri gelmektedir (Chaillana *et al.* 2004). Sahip oldukları farklı metabolik özellikler ile bakteriler, petrol kirliliğinin çevreden uzaklaştırılmasındaki en etkin ajanların başında yer almaktadır. 175'den fazla bakteri cinsinin yalnızca hidrokarbonları veya farklı besinler ile karmaşık halde bulunan hidrokarbonları biyoyıkıma uğratabildikleri bildirilmiştir. Bakteriler özellikle petrolün yapısında bulunan hidrokarbonları; toksik, tehlikeli olmayan son ürünlere kadar metabolize edebilme kapasitesine sahiptirler. Petrol kirliliğinin biyoremediasyonunda, uygun metabolik kapasiteye sahip mikroorganizmaların ortamda bulunması biyoyıkım için ilk şarttır. Doğal koşullarda hidrokarbon etkisine maruz kalmış ve adapte olmuş mikroorganizmaların çok kısa sürede yüksek biyoyıkım etkinliği gösterdikleri bilinmektedir (Adams *et al.* 2015). Petrol ile kontamine olmuş topraklarda bulunan endojen bakterilerin, petrol ile kontamine olmamış topraklarda doğal olarak yaşayan bakterilere göre petrol biyoyıkım kapasitesinin çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Selvakumar *et al.* 2014; Al-Sayegh *et al.* 2015). Petrol ile kontamine olmuş topraktan izole edilen bakterilerin başında; *Bacillus* sp., *Lactobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Nocardia* sp., *Mycobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Zoopage* sp. ve *Articulosporium* sp. suşları gelmektedir (Boboye *et al.* 2010; Eraydin vd 2012; Latha and Kalaivani 2012).

Çevrede meydana gelen petrol kirliliğinin ardından, toprakta biyodegradasyonda rol oynayan genlere sahip plazmitleri içeren, endojen bakteri popülasyonunda ciddi artışlar gözlemlenmektedir. Bütün canlılarda olduğu gibi bakterilerde de genetik bilgi DNA'da depolanmaktadır. Ancak bakterilerde genetik bilgi kromozomal ve plazmit olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Plazmitler, biyoremediasyon sürecinde çeşitli metabolik yolların aktivasyonu için gerekli olan enzimleri kodlayan genleri içermektedir. Toleun, naftalen, salisilik asit ve oktan gibi çeşitli hidrokarbonların biyoyıkımında rol oynayan enzimlerin plazmit tarafından kodlandığı gösterilmiştir. Böylece katabolik etkinliğe sahip bu plazmitler, bakterilerin belirli organik bileşikleri biyoyıkıma uğratma yeteneğine sahip olması açısından önemlidir. *Klebsiella*., *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Moraxella* ve *Arthrobacter* gibi cinslerde katabolik plazmitin varlığı gösterilmiştir. Plazmitler, özellikle biyoyıkım kapasitesi artırılmış rekombinant veya genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Akpe *et al.* 2013). Bakteriler ürettikleri biyosümfektanlar ve çeşitli emülsifiye edici maddeler ile petrolün hücreye alınımını ve biyoyıkımını kolaylaştırmaktadır (Al-Sayegh *et al.* 2015).

2. KURAMSAL TEMELLER

Bu tez çalışması kapsamında faydalanılan ulusal ve uluslararası literatürden konumuzla yakından ilgili olan araştırmalar tarih sırasına göz önüne alınarak aşağıda özetlenmiştir.

Das ve Murkherjee (2007) tarafından Kuzey Doğu Hindistan`da petrol ile kirletilmiş topraklardan alınan örneklerle yapılmış olan bir inceleme sonucunda; ham petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneği olan 3 bakteri (*Bacillus subtilis* DM-04, *Pseudomonas aeruginosa* M ve *Pseudomonas aeruginosa* NM) izole etmişlerdir. Bu 3 bakteri, ham petrol bulaşmış toprak ile muamele edilerek 120 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda petrol hidrokarbonları seviyesinde ciddi bir düşüşün meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışma neticesinde araştırmacılar; *Bacillus subtilis* DM-04 ve *Pseudomonas aeruginosa* M ve NM suşlarının doğal ortamlarda biyoremediasyonda etkin olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Mirdamadian *et al.* (2010) tarafından petrol ile kontamine topraklardan izole edilen *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* cinslerine ait türlerin, petrol ve bazı aromatik hidrokarbonların varlığında büyüme yetenekleri belirlenmiştir. Ayrıca izolatların çevreye toksik etki gösteren çeşitli aromatik hidrokarbonları parçalayabildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu türlerin plazmit profilleri belirlenerek bu plazmitlerin hidrokarbon degradasyonunu etkileyebileceği bildirilmiştir.

Prakash *et al.* 2014 tarafından yapılan araştırmada; Hindistan`ın Meerut bölgesinde petrol ile kontamine olmuş topraklardan ham petrolü degrades edebilme yeteneğine sahip bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış olup, bu alanlardan elde edilen türlerin *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, ve *Micrococcus sp.* olduğu bildirilmiştir. Yine araştırmaları sonucunda; izolatların dizel, benzen, anthracene, toluen ve naphthalene gibi petrol hidrokarbonlarını parçalama özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca izolatların ko-külterleri hazırlanmış ve bu karışımın petrol hidrokarbonlarını parçalama potansiyeli belirlenmiştir. Buna göre, *Pseudomonas sp.* APHP9`ın diğer suşlara oranla

daha iyi parçalama performansına sahip olduğu saptanmıştır. Benzen ve toluenin ise izolatların üçlü ko-kültürleri tarafından maksimum düzeyde parçalandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda; *Bacillus sp.* APHP6, *Pseudomonas sp.* APHP9, *Pseudomonas sp.* APBP1, *Micrococcus sp.* APIO4 ve üçlü ko-kültürün, benzen içeren besi ortamlarında sırasıyla %54.8, %60.2, %40.9, %32.5 ve %66.2 parçalama sağladığı ve dizel içeren ortamlarda ise sırasıyla %61.2, %68.4, %53.7, %39.3 ve %75.5 oranlarında parçalanmanın olduğu belirtilmiştir.

Kavynifard *et al.* (2016), Dagang Petrol Sahası'ndaki ham petrole kirlenmiş topraklardan izole ettikleri Y-1 kodlu bakterinin, ham petrolün biyolojik parçalanmasındaki potansiyel etkisini araştırmışlardır. 16S rRNA dizilerinin analizine göre, Y-1 suşu, *Bacillus licheniformis* olarak tanımlanmıştır. Ardından pH, sıcaklık ve tuzluluk gibi büyüme parametreleri optimize edilmiş ve 5 gün içinde ham petrolün uzaklaştırılmasında %60,2 oranında bir bozulma gözlenmiştir. Y-1 suşu, yüksek tuzluluk, alkalilik ve sıcaklığa güçlü tolerans göstermiş, bu nedenle de, Y-1 suşunun 55°C'de ham petrol kirlenici biyolojik ıslah alanında önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Gupta (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise; petrol ile kirlenmiş topraklardan MJAG1501, MJAG1502, MJAG1503, MJAG1504 ve MJAG1505 kodları verilen 5 bakterinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlar 10 gün boyunca %5 oranında motor yağı içeren Mineral Salt Medium besiyerinde inkübe edilmiş ve petrol parçalama potansiyelleri belirlenmiştir. Buna göre MJAG1505 kodlu izolatın en yüksek parçalama aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda MJAG1505 kodlu izolatın *Bacillus megaterium* olduğu ifade edilmiştir.

Frometa *et al.* (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, Deep Water Horizon kazasının meydana getirdiği kirliliğin temizlenmesinde kullanılan dispersantların, bir deniz bitkisi olan *Swiftia exserta* üzerine toksik etkisi araştırılmıştır. 96 saatlik toksisite deneyleri sonrasında, Corexit ve CEWAF dispersantlarının derin su bitkileri üzerine toksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Tian *et al.* 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada, petrol kirliliği olan Çin'in Bohai Körfezi'nden, su arıtımı için hidrokarbonları parçalayan altı tane bakterileri izole etmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda bu bakterilerin *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait olduklarını bildirmişlerdir.

Godini *et al.* (2018) İran'daki petrol ihracatı için en önemli limanlardan biri olan Kharg Adası'ndan toplanan örneklerden ham petrolü degrade etme yeteneğine sahip bakterilerin, izolasyonu gerçekleştirmiştir. İzolatları karakterize etmek için hem biyokimyasal testler hem de 16S rRNA gen sekans analizi yapılmıştır. Deneyle, tek karbon olarak %2 ham petrol içeren bir mineral tuz ortamında yapılmış olup, izole edilen suşların *Brevibacillus* sp., *Microbacterium oxydans*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus warneri*, *Methylobacterium persicinum* ve *Achromobacter xylosoxidans* olarak tanımlanmıştır. İzolatların OD₆₀₀ değerlerine bakılarak büyüme oranları belirlenmiştir. Buna göre *Pseudomonas* sp.'nin en yüksek büyüme oranına (OD₆₀₀: 0,8) sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bacosa *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada, Deep Water Horizon (DWH) patlaması sonucunda, Meksika Körfezi'ne salınan 200 milyon galonluk petrolün %4,9'unun deniz tabanında biriktiğini bildirmişlerdir. DWH sahasından topladıkları örneklerden, ham petrolün bozulma potansiyelini ve bakteri topluluklarında meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Yapılan metagenomik çalışmalara göre, hidrokarbonların bozunmasıyla, *Colwelliaceae*, *Alteromonadaceae*, *Methylococcales*, *Alcanivorax*, *Bacteriovorax* ve *Phaeobacter* cinslerinin dikkat çekici bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ham petrolü parçalayan bakteriler petrolün kimyasını değiştirdikçe, *Colwelliaceae* cinsinin sayısı azalırken, *Alcanivorax* ve *Metilococcales* cinslerinin miktarının önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir.

Kumari *et al.* (2018), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas mendocina*, *Microbacterium esteraromaticum* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ın ham petrolde bulunan çoklu polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) parçalama yeteneğinin olduğunu bildirmişlerdir. Hindistan'ın Digboi petrol

rafinerisinden alınan ham petrol örnekleri kullanarak, hazırlanan besiyerlerinde öncelikle bu mikroorganizmaların tekli kültürleri, daha sonra ko-kültürleri denenmiş olup, ko-kültürdeki parçalanmanın %10 daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Elumalai *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada, Bushnell Haas Broth besiyerinde karbon kaynağı olarak sadece ham petrol kullanarak, *Bacillus* ve *Geobacillus* cinslerine ait dokuz bakteri izole etmişlerdir. Bunlardan en yüksek biyodegradasyon etkinliği gösteren izolatların, MN6 (%82), IR4 (%94) ve IR2 (%87) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin alkan hidroksilaz, alkol dehidrojenaz ve lipaz gibi katabolik enzimleri ürettikleri tespit edilmiştir. Bu enzimlerin ham petrol biyodegradasyonda rol aldığı gözlemlenmiştir.

Strelitz *et al.* (2019), 2010 yılında meydana gelen Deepwater Horizon petrol kazasından kaynaklanan kimyasal, fiziksel ve psikolojik stres faktörlerine maruz kalan insanlarda koroner kalp hastalığının (KKH) geliştiğini bildirmişlerdir. Meksika Körfezi'ne yakın yerleşim yerlerinde yaşayan insanların uzun süreli takibi sonucunda petrol sızıntısı çalışanları arasında meydana gelen KKH değerlendirilmiştir. 5 yıl boyunca süren takip sonucunda petrol sızıntısına yakın yerlerde yaşayan ve temizlenmesinde çalışan insanların, sızıntının uzağındakilere oranla kalp hastalık riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Fakhrzadegan *et al.* (2019), yapmış oldukları çalışmada, Mangrovların kara, deniz ve nehirler arasındaki geçiş bölgelerinde bulduklarını bildirmiş olup, petrol en yaygın çevresel kirletici olan petrol hidrokarbonları ve petrol döküntülerinin mangrov ormanları için büyük bir tehlike oluşturduğunu vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada Basra körfezinde bulunan Mangrov ekosisteminden örnekler (bitki, tortu ve deniz suyu) toplanarak ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların izolasyonunu gerçekleştirilmiştir. Ham petrol degradasyonu gösteren bakterilerin, bitki köklerinde, torul ve deniz suyuna oranla daha fazla olduğunu tespit edilmiştir. Yapılan 16S rRNA sekans analizleri sonucunda izole edilen bakterilerin, *Vibrio sp.* NW4, *Idiomarina sp.*

BW32, *Kangiella sp.* DP40, *Marinobacter sp.* DW44, *Halomonas sp.* BS53 ve *Vibrio sp.* DS35 olduğu bildirilmiştir.

Omarova *et al.* 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada, petrolün deniz bakterileri tarafından biyolojik olarak parçalanması, petrol kirliliğinin giderilmesinin önemli bir yolu olduğunu bildirmişlerdir. *Alcanivorax borkumensis* bakterisinin ham petrol biyodegradasyon miktarını optik ve yüksek çözünürlüklü kriyojenik tarama elektron mikroskobu kullanarak analiz etmişlerdir. 3 gün boyunca inkübe edilen bakteri kültürünün, ham petrol tabakalarını orta derecede (%40-50) dağıtabildiğini ve bu nedenle petrol sızıntılarına karşı bu mikroorganizmanın kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ticari dispersant olan Corexit 9500A'nın dispersiyon etkinliğinin, bir mikrobiyal biyofilm varlığında yaklaşık %25 azaldığını tespit etmişlerdir. Mikrobiyal kültür tarafından heksadekanın yaklaşık %90'ının 5 günlük sürede degrede olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, ham petrol kirliliğinin temizlenmesinde, dispersantlar yerine bakteriyel kültürün kullanılması çevresel açıdan çok daha sürdürülebilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Batman Petrol Rafinerisi'nden alınan ham petrol örnekleri ile Akdeniz, Karadeniz, Ege ve Marmara'dan temin edilen su örnekleri kullanılmıştır. Alınan örnekler uygun koşullar altında laboratuvara getirildi ve pH değerleri ölçülerek kullanılmaya kadar oda sıcaklığında saklandı. Örnekleme yapıldığı denizlerimize ait sıcaklık pH ve tuzluluk oranları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ülkemizi çevreleyen denizlere ait su örneklerinin özellikleri

	Sıcaklık (°C)	pH	Tuzluluk (%)	Alındığı şehir
Akdeniz	30-16,5	8,2-8,4	3,9	Antalya
Karadeniz	27-12	7,8-8,4	2,5	Samsun
Ege	29-16	7,98-8,3	3,8	İzmir
Marmara	26-10	6,8-8,1	3,5	İstanbul

3.1.2. Çözeltiler

1XTAE Tamponu

Agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere, 100 ml 10XTAE tamponundan alındı ve hacmi saf su 1000 ml'ye tamamlandı.

Kalsiyum Klorür Çözeltisi (100 mM)

Kalsiyum klorür, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere, 100 mM olacak şekilde (1,11 gr CaCl₂, 100ml saf su içinde çözülür) hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin ağzı

pamukla kapatılarak otoklavlandı ve kullanılmaya kadar buzdolabında (+4°C) bekletildi.

Amfisilin Çözeltisi

Amfisilin, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere, 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek, steril edildi. Daha sonra bu çözelti kullanılmaya kadar, -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal Çözeltisi

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere, 40 mg X-gal tartılıp, 1 ml dimetilformamid içerisinde çözüldü. Ardından ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak, -20°C'de kullanılmaya kadar bekletildi.

IPTG Çözeltisi

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere 23,8 mg/ml IPTG tartılarak, steril saf su ile çözünmesi sağlandı. Daha sonra 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek, çözelti kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Lugol Çözeltisi

Bakterilerin gram özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere; 1 gr iyot ve 2 gr KCl tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Safranin Çözeltisi

Bakterilerin gram özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere; 1 gr safranin öncelikle 10 ml %96'lık EtOH'da çözüldü ve son hacim 100 ml olana kadar saf su ilave edildi.

Kristal Violet Çözeltisi

Bakterilerin gram özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere; 2 gr kristal violet öncelikle 20 ml %96'lık EtOH'da çözüldü ve son hacim 100 ml olana kadar saf su eklendi.

%0,9'luk NaCl Çözeltisi

Bakterilerin izolasyonu aşamasında kullanılmak üzere, NaCl (0,9 g) tartılıp, 100 ml saf su içerisinde çözünmesi sağlandı.

3.1.3. Besiyerleri**Triptic Soy Agar (TSA) (Oxoid CM0131)**

TSA besiyerinden 40 gr tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı. Bir miktar soğuduktan sonra, steril kabinde petrilere döküldü.

Triptic Soy Broth (TSB) (Oxoid CM0129)

TSB besiyerinden 25 gr tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Luria Bertani (LB) Broth (Sigma L2542)

Luria Bertani Broth besiyerinden 20 gr tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Luria Bertani (LB) Agar (Sigma L2897)

Luria Bertani Agar besiyerinden 35 gr alınıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

3.1.4. Kitler

Çalışması kapsamında, pGEM-T Easy Vector System: (Promega-A1360); Wizard Plus SV minipreps DNA purification System: (Promega-A1330); Promega Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (A2360) kitleri kullanılmıştır.

3.1.5. Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka/Model
İnkübatör	Thermo
Çalkalamalı inkübatör	Zhicheng - ZHWY2102C
Santrifüj	Hettich Mikro 220 R
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNB14
Mikroskopik Görüntüleme Sistemi	Lecia – Samsung
-86°C Dondurucu	Glacier Ultralow Freezer's
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	mpMiniPure DestUp
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU-730
Nanodrop	Thermo – MultiscanGo
PCR Cihazı	Senso Quest-Labcyler
Jel Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT-Quantum
pH Metre	Mettler Toledo - SevenCompact
Hassas Terazı	Shimadzu – ATX 224
Kar Makinası	Scotsman – AF80

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek toplanması

Batman petrol rafinerisinden alınan ham petrol örnekleri ile deniz suyu (Akdeniz, Karadeniz, Ege ve Marmara) numuneleri temin edildi. Deniz suları laboratuvar ortamına

getirilir getirilmez pH değerleri ölçülerek, kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.2.2. Ham petrolü parçalayan bakterilerin izolasyonu

Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımında rol oynayan mikroorganizmaların izolasyonu, aerobik koşullarda ve tek karbon kaynağı olarak ham petrol bulunan ortamda gerçekleştirildi. Bu amaçla; 100 ml deniz suyu numunelerinin üzerine 3 ml ham petrol eklenerek, besiyerleri hazırlandı ve 20°C’de, 10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. 10 günün sonunda dilüsyon serileri hazırlanarak, bakterilerin saf kültürleri elde edildi (Çalışmalar doğal ortamına uygun olarak gerçekleştirildiği için hazırlanan besiyerleri hiçbir sterilizasyon işlemine tabii tutulmadı).

3.2.3. İzolatların ham petrolü parçalama miktarlarının belirlenmesi

İzole edilen 12 bakterinin ham petrol parçalama miktarlarının belirlenmesi amacıyla, her bir bakteri için Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz deniz suyu örneklerinden 100’er ml alınarak üzerlerine 3 ml ham petrol ilave edildi. Ardından izolatların önkültürleri TSB besiyerlerinde hazırlandı. Bu önkültürlerden (OD₆₀₀ değerleri 1 olduktan sonra) 1,5 ml alınarak farklı deniz suları ve ham petrol içeren besiyerlerine inoküle edildi. 20°C’de 10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Ardından ham petrolün biyodegradasyon miktarları Tao *et al.* (2017) bildirdiği metoda göre 225 nm’de spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

3.2.4. En yüksek ham petrol degradasyonu gösteren izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması

3.2.4.a. Gram boyama

İzolatların Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Gram boyama işlemi yapıldı. Bu için bakteriler, TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı (yaşlı kültürlerden yanlış sonuç alınabileceğinden dolayı, çalışmalar genç kültürler ile yapıldı). Büyüyen bakterilerin preparatları hazırlanarak, fikse edildi ve kristal viyole boyası ile 1 dk muamele edildi. Ardından saf su ile yıkanarak fazla kristal viyole boyası uzaklaştırıldı (Bu aşamada hem gram negatif, hem de gram pozitif özellikteki bakteriler mavi-mor renge boyandı). Daha sonra preparatlar lügol solüsyonu ile kaplanarak, 1 dk bekletildi ve saf su ile yıkandı (lügol, kristal viyolenin bakterilere nüfuz etmesini sağlar). Yıkama işleminin ardından preparatlar %96 etil alkol ile 15-20 saniye muamele edildi (Bu basamakta gram pozitif bakteriler mavi, gram negatif bakteriler ise renksiz olur). Son olarak preparatların üzerine safranin boyası dökülerek 30-45 saniye bekletildi ve fazla saf su ile yıkandı. Tamamlanan boyama işleminin ardından preparatlar ışık mikroskobu altında 40x'lik objektif kullanılarak incelendi. Gram pozitif bakterilerin mavi-mor, gram negatiflerin ise kırmızı-pembe renkte olduğu gözlemlendi (Temiz 2010).

3.2.4.b. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri tuz aralığının belirlenmesinde; farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10, %12, %14 ve %16) sahip TSB besiyeri kullanıldı. Test suşları, ilgili besiyerine inoküle edildikten sonra, 20°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakterilerin üyebildikleri minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometre ile (OD_{600}) tespit edildi.

3.2.4.c. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

Bakterilerin büyüme sıcaklıklarının belirlenmesinde TSB besiyerleri kullanıldı. Bu amaçla, bakteriler besiyerlerine inoküle edildi ve farklı sıcaklıklarda (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C) inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda spektrofotometrede (OD₆₀₀) ölçümler gerçekleştirilerek, izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.d. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesinde; farklı pH değerlerine (pH:3-13) sahip TSB besiyerleri kullanıldı. Test suşları, TSB besiyerlerine inoküle edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, spektrofotometrede (OD₆₀₀) yapılan ölçümler sonucunda, izolatların büyüebildikleri maksimum, minimum ve optimum pH aralıkları tespit edildi (Dülger 1997).

3.2.4.e. Oksidaz testi

Bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle belirlendi. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum olayında görev almakta ve elektron transfer sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla, hücresel enerji oluşumuna sebep olmaktadır. Bu yöntem, organizmanın oksidaz enzimine sahip olması durumunda, mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu test için ticari olarak satın alınan kitler kullanıldı. TSA besiyerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültürünün üzerine 1 damla oksidaz çözümü damlatıldı ve mavi bir renk oluşumu oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişiminin görülmemesi ise oksidaz negatif olarak kaydedildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Acar 2009).

3.2.4.f. Katalaz testi

İzole edilen bakterilerin, katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile gözlemlendi. Bu enzim, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayıp, H_2O ve O_2 gazına dönüştür ve O_2 gazının oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlenmektedir. Bu amaçla TSA besiyerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen, bir öze dolusu alınarak, lam üzerine konuldu ve üzerine bir damla %3'lük H_2O_2 damlatıldı. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirildi (Baltacı 2015).

3.2.5. Ham petrolü parçalayan bakterilerin moleküler identifikasyonu

3.2.5.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

1. Genomik DNA izolasyonu

Yüksek ham petrol biyodegradasyonu gösteren izolatlar, TSA besiyerinde $20^\circ C$ 'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Petrilere gelişen organizmalardan tek koloni alınıp, TSB besiyeri içeren 100 ml'lik flasklara inoküle edildi. Kültürler çalkalamalı inkübatörde $20^\circ C$ 'de, 150 rpm'de 2 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gelişen bakterilere ait DNA örnekleri, Promega Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (A2360) protokolüne uygun olarak izole edildi.

2. 16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA bölgesi bakteri sistematığı ve evrimsel açıdan korunmuş bölge olma özelliği nedeniyle, bu gen bölgesinin sekans analizi karakterizasyon çalışmaları için oldukça önemlidir. İzolatların 16S rRNA gen bölgeleri evrensel primerler kullanılarak, *in vitro* koşullar altında PCR ile çoğaltıldı. Bu amaçla, her bir örnek için, 30 μl 'lik reaksiyon hazırlandı. Reaksiyon tüpüne, 13,1 μl ddH₂O, 3 μl 10X PCR tamponu, 1,8 μl MgCl₂, 1,2

μ l DMSO, 0,6 μ l dNTP, 3 μ l (5 μ M) evrensel primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 3 μ l (5 μ M) primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 0,3 μ l Taq DNA polimeraz ve 4 μ l kalıp DNA ilave edildi.

PCR programı: Hazırlanan reaksiyon tüpleri PCR cihazına konarak; ön denatürasyon için 94°C'de 2 dk ve 36 döngü olacak şekilde; denatürasyon basamağında 94°C'de 1 dk, bağlanma basamağında 52°C'de 1 dk ve uzama basamağında ve 72°C'de 2 dk olmak üzere, programlandı. 36 döngünün sonunda ise son uzama basamağı 72°C'de 5 dk olacak şekilde programlanarak, 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı (Adıgüzel 2006).

3. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR sonucunda amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgelerinin kontrol edilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için, 0,9 gr agaroz tartılıp, üzerine 90 ml 1XTAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar bekletildi. Ardından etidyum bromür ilavesi için, karışım bir müddet soğumaya bırakıldı (kaynar halde etidyum bromür ilave edilirse, kanserojen olan etidyum bromür buharlaşır ve solunur). 50°C'ye kadar soğuyan karışıma etidyum bromür ilave edildi ve jel, içerisinde tarak bulunan olan elektroforez küvetine yavaşça döküldü. Jelin donmasının ardından taraklar dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel içerisinde 1XTAE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin ilk çukuruna 5 μ l markır ve diğer çukurlarına ise 6X yükleme boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan örnekler yüklendi. Elektroforez jel düzeneğinin artı (+) ve eksi (-) kutupları dikkatlice yerleştirildi ve örnekler, 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü. DNA bantları jel dökümantasyon sistemi (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edildi (Baltacı 2015).

4. Kompetent hücrenin hazırlanması

İzolatlar ait 16S rRNA gen bölgeleri PCR ile amplifiye edildikten sonra bu sekans dizilerinin eldesi için klonlama işlemine tabii tutuldu. Bu amaçla, klonlamanın ilk

basamağı olan kompetent hücre hazırlama aşamasına geçildi. Bunun için, *Escherichia coli* JM101 suşu LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle aktarılarak, 1 gece süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilerden tek bir koloni seçilip, LB broth besiyerine inoküle edildi ve ön kültür hazırladı. Ardından bu kültürden, 1ml alınarak LB sıvı besiyerine inokülasyon gerçekleştirildi ve belirli aralıklarla OD₆₀₀ değerine bakılarak, bu değer 0,4-0,6 olması sağlandı (Baltacı 2015, Akbulut 2017). Daha sonra hücreler çöktürülerek CaCl₂ ile muamele edilerek kompetent hale getirildi (Ca⁺² iyonları bakterilerin hücre duvarını sararak, artı (+) yük ile yükler ve böylece eksi (-) yüke sahip olan DNA'nın bakteri hücrelerine girişini kolaylaştırır).

5. Ligasyon işlemi

PCR ile amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Bu amaçla,

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T₄ DNA ligaz

Yukarıdaki miktarlar 0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilerek karışım hazırlandı ve 16°C'de 14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

6. Transformasyon işlemi

Bu tez çalışmasında transformasyon işlemi, ısı şok yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla önceden hazırlanan ligasyon ürünleri ile kompetent bakteriler bir araya getirildi. Önce 30 dk buz üzerinde, sonrada 2 dk 42°C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Bu şok bakterilerin hücre duvar yapılarındaki porların açılmasına ve dolayısıyla ligasyon ürünlerinin bakteri hücrelerinin içine girmesine imkan vermektedir. Isı şokunun ardından mikroorganizmalar 2 saat süre ile

LB sıvı besiyerinde büyütüldü. Daha sonra bakteriler, içerisinde X-gal, IPTG ve amfisilin bulunan LB agar plaklarına yayma ekim yöntemiyle yayılarak 37°C'de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

7. Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

İnkübasyon sonunda petriler, inkübatörden çıkarılarak, mavi kolonilerin belirgenleşmesi amacıyla +4°C'de bir gece bekletildi. 16S rRNA geninin insert olmadığı kolonilerde mavi renk, olduğu kolonilerde ise beyaz renk oluşumu gözlemlendi.

8. Koloni PCR İçin Hazırlık ve PCR reaksiyonu

Tüm beyaz kolonileri, pozitif olarak değerlendirmek yanlış olacağından, koloni PCR ile doğrulama prosesi gerçekleştirildi. Bu amaçla pozitif olduğu düşünülen beyaz renkli koloniler bir kürdan yardımıyla seçilerek, aşağıda verilen reaksiyon karışımına aktarıldı. 19,1 µl dH₂O, 3 µl tampon (MgCl₂'li), 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl MgCl₂ (25mM), 2 µl 5 µM T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') primer, 2 µl 5 µM SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') primer, 0,3 µl *Taq* DNA polimeraz, 1,2 µl DMSO ve kalıp DNA olarak ise beyaz renkli koloniler kullanıldı.

PCR programı: Denatürasyon; 94°C 2 dk, amplikasyon; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 dk 35 döngü, sonlanma; 72°C 10 dk olacak şekilde PCR cihazı ayarlandı. EtBr ilaveli %1'lik agaroz jelde yürütülerek istenen geni taşıyan koloniler, seçilerek plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a ekildi.

9. Plazmitlerin izolasyonu, kontrol edilmesi ve konsantrasyonlarının ölçülmesi

Plazmit izolasyonu, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330) kiti ile, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Plazmitlerin kontrol edilmesi amacıyla, örnekler *Eco*RI ile kesime tabi tutuldu ve agaroz jelde

yürütüldü. Uygun bant profiline sahip olan plazmitlerin konsantrasyonları, nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) ile >100 ng/ μ l olarak ayarlandı ve bu tüplerden 30-50 μ l alınarak, sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

10. DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi ve değerlendirilmesi

Firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları, BioEdit programı ile analiz edilerek, FASTA formatına çevirildi. Ardından sekanslar ortak bölgelerinden çakıştırılarak, yaklaşık 1500 bç'lik dizi elde edildi. Daha sonra anlamlı hale getirilen sekans verileri http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak izolatlar tür düzeyinde tanılandı.

3.2.6. Ham petrolü parçalayan bakterilerin optimizasyon çalışmaları

İzole edilen bakterilerin ham petrolü parçalama potansiyellerinin artırılması amacıyla, ko-kültürasyon, sıcaklık, azot kaynağı ve inkübasyon süresi parametreleri optimize edildi.

3.2.6.a. Mikroorganizmaların ko-kültürlerinin ham petrolün biyodegradasyonuna olan etkisinin araştırılması

İzole edilen 12 bakteriden 4'ünün yüksek ham petrol degradasyonu gösterdiği ve bu dört bakteriden ikisinin aynı tür olduğu belirlendikten sonra, farklı türlere ait olan izolatların ham petrolü parçalama kapasitelerinin arttırılabilmesi amacıyla ko-kültürleri yapıldı. Bu amaçla mikroorganizmaların ön kültürleri TSB besiyerinde 20°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀ değerleri 1 olunca, inkübasyona bu ön kültürlerden alınarak (tekli kültürler için 1,5 ml, ikili kültürler için 0,75 ml ve üçlü kültürler için 0,5 ml) içerisinde ham petrol + deniz suyundan oluşan besiyerine inoküle edildi ve 10 gün süre ile 20°C'de inkübe edildi. Süre sonunda erlenler

inkübatörden çıkarıldı ve santrifüj edilerek mikroorganizmalar uzaklaştırıldı. Ardından bakterilerin ham petrol degradasyon miktarları Tao *et al.* (2017) bildirdiği metoda göre 225 nm'ye ayarlı spektrofotometrede tespit edildi.

3.2.6.b. Farklı azot kaynaklarının ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisinin araştırılması

Ham petrol biyodegradasyonunu en iyi gerçekleştiren ko-kültür kombinasyonu belirlendikten sonra, optimizasyon çalışmalarına bu mikroorganizmalar üzerinden devam edildi. Besiyeri ortamına ilave edilen farklı azot kaynaklarının petrol biyodegradasyonu üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, ham petrol ve deniz suyu içeren besiyeri ortamına farklı konsantrasyonlarda (0-4 g/L) farklı azot kaynakları (amonyum sülfat, üre, amonyum fosfat, potasyum nitrat ve sodyum nitrat) ilave edildi. İnkübasyon 20°C'de 10 gün süre ile gerçekleştirildi ve ham petrolün biyodegradasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.6.c. Sıcaklığın ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisinin araştırılması

Maksimum ham petrol biyodegradasyonunun gerçekleştiği, ko-kültür kombinasyonu ve azot kaynağı belirlendikten sonra, sıcaklık parametresinin ham petrolün parçalanması üzerine olan etkisi araştırıldı. Bu amaçla, ham petrol + denizsuyu + 2g/L amonyum sülfat içeren besiyeri ortamına PB4 ve PB6 izolatları inoküle edilerek, farklı sıcaklık değerlerinde (15, 20, 25, 30 ve 35°C) ham petrolün biyodegradasyon miktarları, spektrofotometrik olarak tespit edildi.

3.2.6.d. İnkübasyon süresinin ham petrol degradasyonuna etkisinin araştırılması

Ham petrol biyodegradasyonunun en iyi düzeyde gerçekleştiği ko-kültür kombinasyonu, azot kaynağı ve sıcaklık parametleri optimize edildikten sonra son olarak optimum inkübasyon süresi belirlendi. Bu amaçla, ham petrol + deniz suyu + 2 g/L amonyum sülfat içeren besiyeri ortamına, PB4 ve PB6 kodlu izolat inoküle edilerek, 25°C'ye

ayarlı inkübatörde farklı sürelerde (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ve 16 gün) inkübasyona bırakıldı. İki günde bir örnek alınarak periyotlarında spektrofotometrik olarak ham petrol biyodegradasyonu belirlendi.

3.2.7. Büyük ve küçük hacimlerde petrol parçalanma oranlarının karşılaştırılması

Bu amaçla 14 litrelik plastik kaba deniz suyu konulup, üzerine yüzeyi kaplayıncaya kadar ham petrol eklendi. PB6+PB4 kodlu izolatların ko-kültürleri, bu kaba inoküle edilip 4 gün aralıklarla ham petrol degradasyon miktarları ölçülülerek, flasklarda gerçekleşen parçalanma oranlarıyla karşılaştırıldı.

3.2.8. Ham petrolün parçalanmasından sonra izolatların kontrolü

Ko-kültür halinde inokülasyonu gerçekleştirilen PB6+PB4 kodlu izolatların 12 gün süre ile inkübasyonunun ardından dilüsyon serileri hazırlanarak, 10^{-6} kat seyreltilen petrilere koloniler seçildi. Daha sonra seçilen kolonilerin sekans analizleri yapıldı.

3.2.9. İzolatların GC-MS analizleri

İzolatların optimizasyon çalışmalarının ardından, spektrofotometrik olarak belirlenen ham petrol biyodegradasyonunun desteklenmesi ve parçalanma ürünlerinin tespit edilmesi amacıyla GC-MS analizleri yapıldı. Kültür örnekleri santrifüj edilerek, içerisinde bulunan mikroorganizmalar uzaklaştırıldı. Ardından 20 ml süpernatant alınarak aynı hacimde hekzan ilave edildi. Ardından 3 dk süre ile vortekslenip, üstte kalan hekzan fazı yeni bir falkon tüpüne aktarıldı. Yeni falkon tüpünde kültür ortamından kaynaklı su olabileceğinden, Na_2SO_4 ile susuzlaştırma işlemi gerçekleştirildi ve örneklerden 1'er ml alınarak GC-MS analizleri için Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (DAYTAM) gönderildi. GC-MS, 30 mm x 0,25 mm x 0,25 μm (Uzunluk x çap x film kalınlığı) kolonun takıldığı gaz kromatografisi cihazı (Shimadzu QP2010 ULTRA) ile gerçekleştirildi. 1 μl numune GC cihazına enjekte edilerek, enjeksiyon sıcaklığı 250°C olarak ayarlandı. Daha sonra 40°C 'de 5

1 dakika, 180°C’de 5 dakika ve son olarak dakikada 10°C artışla cihazın sıcaklığı 320°C’ye çıkartılarak, numune 16 dk süre ile bekletildi. Elde edilen piklere göre, Hidrokarbonların miktarı tespit edildi.

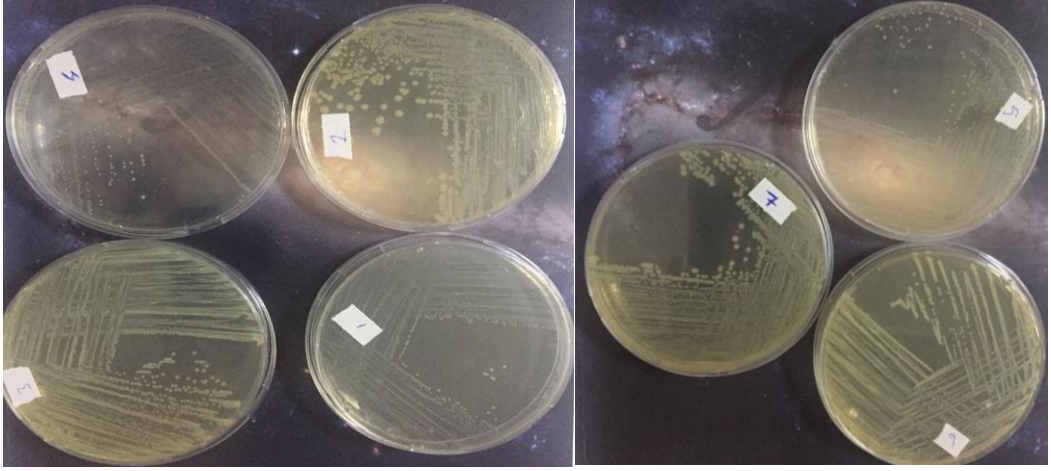


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, tanker kazaları, sondaj çalışmaları ve ya herhangi bir sebeple denizlere sızan ham petrolün oluşturduğu kontaminasyonun mikroorganizmalar yardımıyla büyük ölçüde giderilmesi sağlandı. Bu amaçla Akdeniz, Karadeniz, Ege ve Marmara denizlerinden alınan deniz suyu örneklerine tek karbon kaynağı olarak ham petrol ilave edilerek, ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi ve ardından 16S rRNA gen sekans analizi yapılarak moleküler düzeyde karakterize edildi. Daha sonra izolatların ham petrolü parçalama yeteneklerini arttırmak amacıyla, ko-kültürasyon, sıcaklık, azot kaynağı ve inkübasyon süresi parametreleri optimize edildi. Son olarak GC-MS analizi ile ham petrol biyodegradasyon miktarı saptandı.

4.1. Ham Petrolü Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu

Ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla 4 farklı denizden toplanan deniz suyu örneklerinden 100 ml alınıp üzerlerine, 3 ml ham petrol ilave edilerek, 20°C’de 10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda dilisyon serileri hazırlanarak farklı olduğu düşünülen koloniler saflaştırıldı. Ham petrolü parçalama yeteneğine sahip Ege denizinden 4 adet (PB1, PB2, PB3 ve PB4) Akdenizden 3 adet (PB5, PB6 ve PB7), Marmara’dan 3 adet (PB8, PB9 ve PB10) Karadenizden 2 adet (PB11 ve PB12) olmak üzere toplam 12 adet bakteri izole edildi. Ardından mikroorganizmalar stok tüplerine alınarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 80°C’de muhafaza edildi.



Şekil 4.1. Bazı izolatlara ait petri görüntüleri

4.2. İzolatların Farklı Deniz Sularında Ham Petrol Degredasyon Miktarlarının Belirlenmesi

Farklı denizlere (Akdeniz, Karadeniz, Marmara ve Ege) ait su örneklerinin ham petrol degradasyonuna etkileri Çizelge 4.1’de verildi. Materyal ve metotta belirtildiği gibi her bakterinin petrol parçalama potansiyeli 4 farklı denizde test edildi. Deneyler sonucunda, 4 deniz suyu örneğinde de maksimum petrol parçalanmasının PB6 ve bunun ardından da PB4 izolatı ile başarıldığı gözlemlendi. PB6 için Akdeniz, Ege denizi, Marmara ve Karadeniz örneklerinde ki parçalanma oranları ($OD_{225\text{ nm}}$) sırasıyla 0,88, 0,85, 0,81 ve 0,81, PB4 için ise 0,77, 0,72, 0,69 ve 0,74 olarak tespit edildi. Ayrıca, PB1 ve PB7 kodlu izolatlarında 4 deniz örneğinde de, yüksek parçalama potansiyeline sahip olduğu belirlendi. Diğer izolatlar, bu bakterileri oranla ham petrolü daha az parçaladıkları için, çalışmaya PB6, PB4, PB7 ve PB1 kodlu izolatlar ile devam edildi.

Çizelge 4.1. İzolatların farklı deniz sularında ham petrol degradasyon miktarları

İzolasyon Yeri	İzolat Kodu	Ege	Akdeniz	Marmara	Karadeniz
Ege	PB1	0,61	0,64	0,56	0,57
	PB2	0,39	0,41	0,39	0,32
	PB3	0,45	0,43	0,48	0,46
	PB4	0,72	0,77	0,69	0,74
Akdeniz	PB5	0,43	0,37	0,45	0,36
	PB6	0,85	0,88	0,81	0,81
	PB7	0,63	0,63	0,61	0,65
Marmara	PB8	0,3	0,25	0,32	0,34
	PB9	0,15	0,21	0,19	0,12
	PB10	0,26	0,29	0,21	0,26
Karadeniz	PB11	0,24	0,23	0,28	0,21
	PB12	0,32	0,3	0,33	0,28

4.3. Ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Maksimum ham petrol degradasyonu gösteren izolatar belirlendikten sonra, bu bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri test edildi (Çizelge 4. 2). Yapılan deneyler sonucunda, PB1, PB4 ve PB7 kodlu izolatların gram negatif, PB6 kodlu bakterinin ise gram pozitif olduğu belirlendi. Buna ek olarak tüm bakterilerin katalaz pozitif, PB1, PB4 ve PB7 kodlu mikrroorganizmaların oksidaz pozitif olduğu tespit edildi.

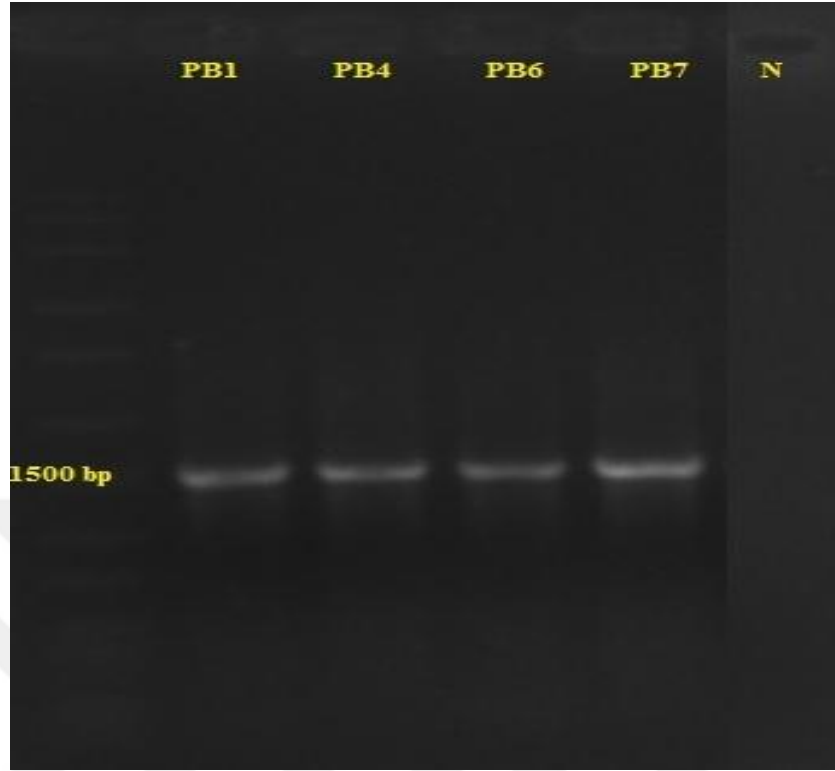
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

	PB1	PB4	PB6	PB7
Gram	-	-	+	-
Oksidaz	+	+	-	+
Katalaz	+	+	+	+
pH	5-10	6-9	6-10	5-10
Tuz (%)	0-10	0-15	0-12	0-8
Sıcaklık (°C)	10-35	5-40	10-40	10-35

4.4. Ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların moleküler identifikasyonu

4.4.1. İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu

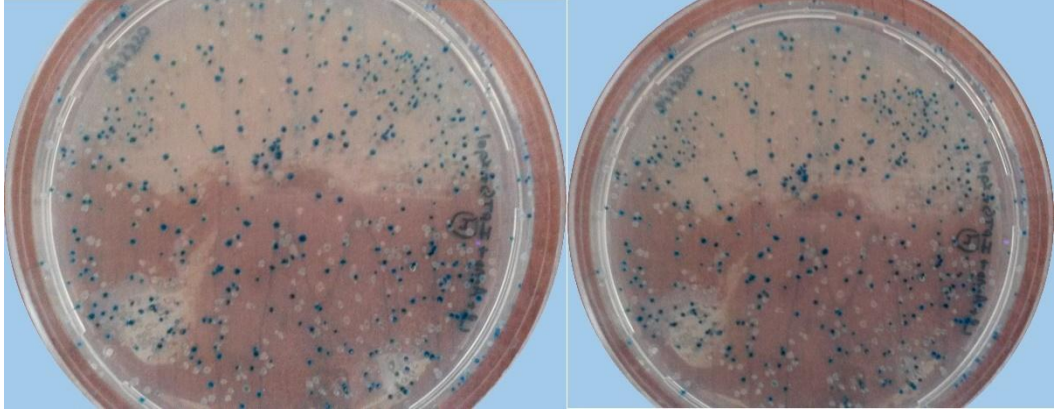
İzolatların DNA'ları ekstrakte edildi ve evrensel primer seti (27F-1492R) kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Sonuçta tüm izolatların 1500 bp büyüklüğünde tek bir bant içerdiği tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü

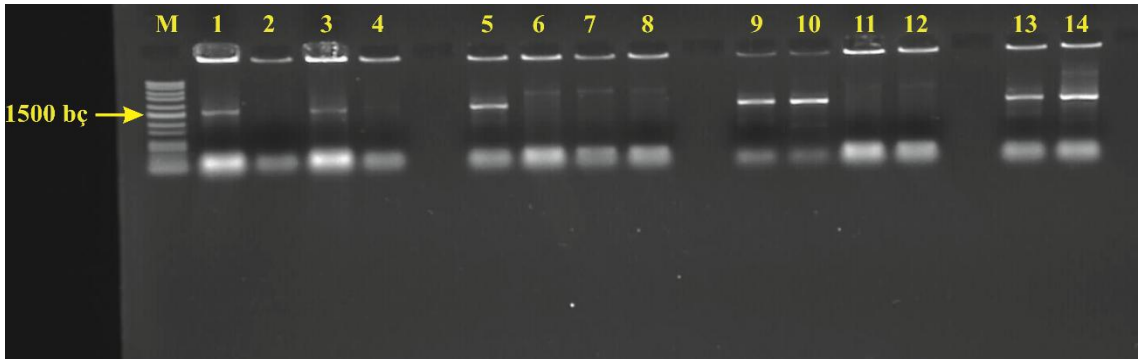
4.4.2. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid dizisinin analizinin büyük oranda belirlenebilmesi için klonlama çalışması oldukça önemli olup, bu amaçla, ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Ardından bakteriler, amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayılıp, inkübasyona bırakıldı ve sonuçta, mavi, beyaz kolonilerin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.3. Mavi-beyaz tarama

Beyaz koloniler, genimizin insert olduğunu düşündüğümüz koloniler olup, her beyaz koloni kesinlikle pozitif değerlendirilmediğinden bunun kontrolü için koloni PCR yapıldı. 1500 bç'lik DNA markır hizasında bant veren koloniler seçilip (Şekil 4.4), plazmit izolasyonu için antibiyotikli besiyerine aktarıldı. Pozitif sonuç veren izolatların plazmitleri izole edilip, sekansa gönderildi (Macrogen, Hollanda).



Şekil 4.4. Bazı izolatların koloni-PCR sonuçları

4.4.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizlerine göre benzerlik oranları

Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA dizisinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımındır. Bu amaçla ilk olarak, izole edilen 7 adet bakterinin 16S rRNA genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank'ta var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen

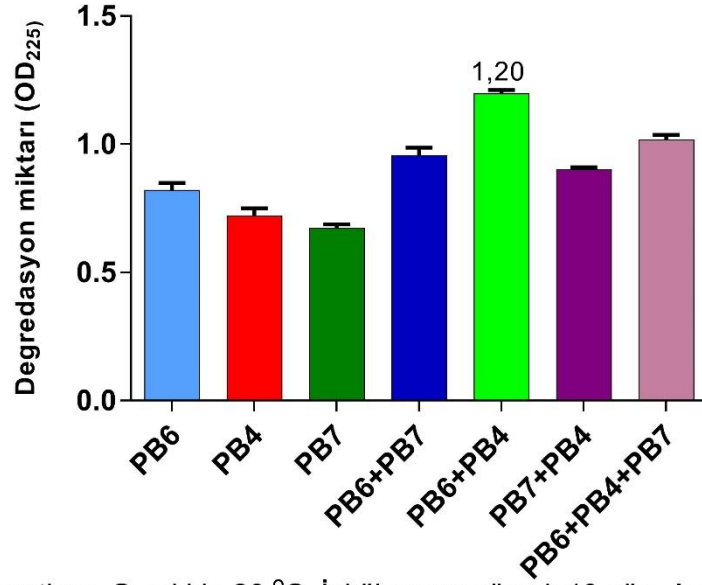
dizileri ile karşılaştırıldı. Bunun sonucunda izole edilen bakterilerin türleri ve benzerlik oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizlerine göre benzedikleri türler ve benzerlik oranları

İzolat Kodu	Benzediği tür	Benzerlik oranı
PB1	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	%99
PB4	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	%99
PB6	<i>Alcanivorax venustensis</i>	%99
PB7	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	%99

4.5. İzolatların Ko-Kültürlerinin Ham Petrolü Parçalama Potansiyellerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, izolatların tek başına ve ya ko-kültür olarak petrol parçalamasında kullanılabilirliği test edilmiştir. Petrol parçalanma oranı için akdeniz su örneği, kullanılmıştır. Deneyle sonucunda tek başına kullanıldıklarında, maksimum petrol parçalanması PB6 (OD₂₂₅:0,83), PB4(OD₂₂₅: 0,72) ve PB7(OD₂₂₅:0,67) izolatlarıyla başarılı olduğu görülmüştür. Test edilen ko-kültürler arasında ise maksimum parçalanma (OD₂₂₅:1,20) PB6+PB4 birlikteliğiyle sağlanmıştır. İkinci en yüksek parçalanma oranı (OD₂₂₅:1,01) üç izolatın ko-kültürüyle başarılmıştır. Deneyle sonucunda izolatların tek başına uygulanmasına oranla ko-kültürlerinin daha yüksek parçalanma potansiyeline sahip olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

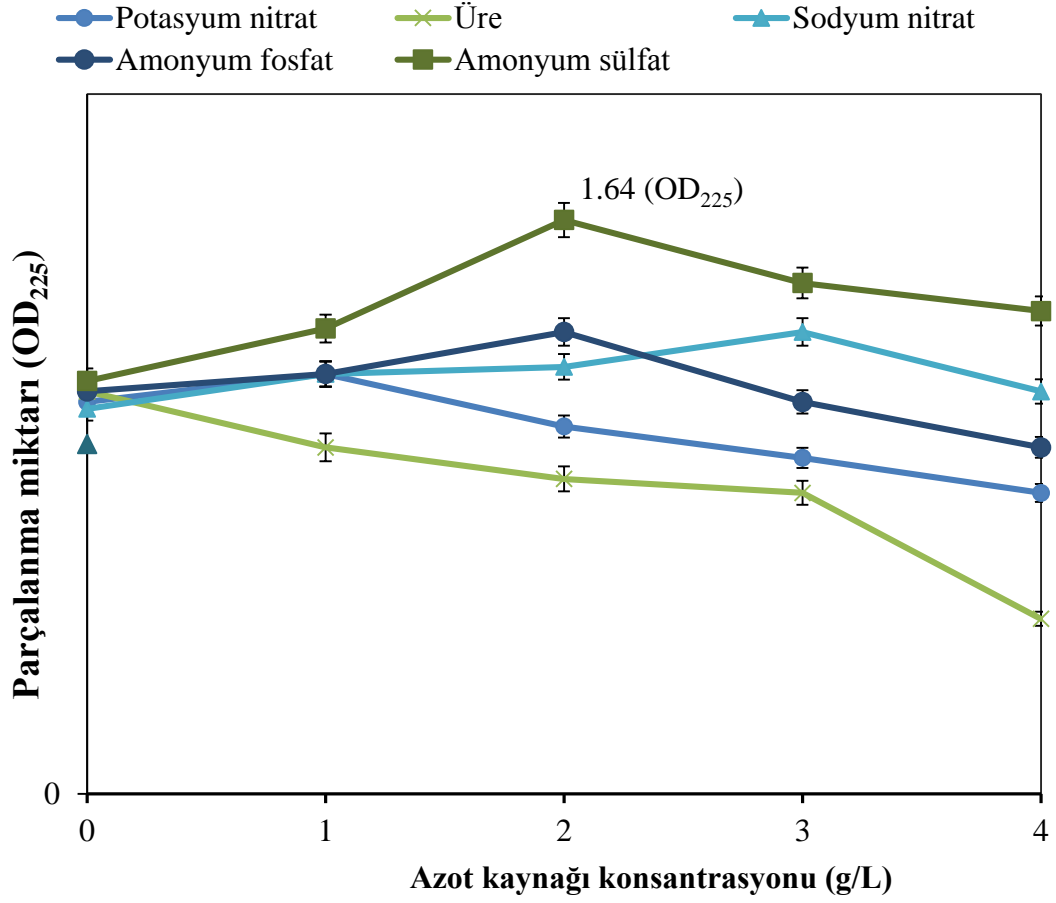


* Ortam şartları: Sıcaklık; 20 °C, İnkübasyon süresi; 10 gün, Azot kaynağı ; Yok

Şekil 4.5. İzolatların ko-kültürlerinin ham petrolü parçalama potansiyelleri

4.6. Farklı Azot Kaynaklarının Ham Petrolün Parçalama Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

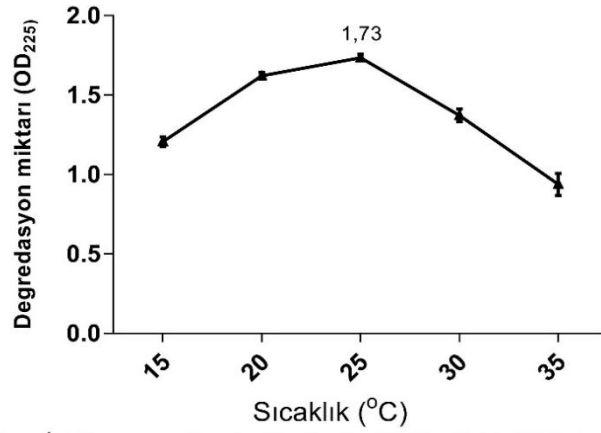
Ham petrolün biyodegradasyonun arttırabilmek amacıyla üre, amonyum sülfat, sodyum nitrat, potasyum nitrat ve amonyum fosfat gibi azot kaynakları farklı konsantrasyonlarda (0-4 g/L) besiyerine ilave edildi ve biyodegradasyon miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yapılan analizler sonucunda ürenin bütün konsantrasyonları kontrole oranla parçalanma miktarını düşürdüğü gözlemlendi. Potasyum nitratın 1 g/L konsantrasyonu kontrole oranla petrol parçalanmasını arttırırken, daha yüksek konsantrasyonları azaltmıştır. Diğer üç azot kaynağının ise bütün konsantrasyonlarının kontrole oranla petrol parçalanmasını arttırdığı tespit edildi. Bu üç azot kaynağı arasında da maksimum petrol parçalanması amonyum sülfatın ile başarılı. Amonyum sülfatın test edilen konsantrasyonları arasında ise maksimum petrol parçalanması (OD₂₂₅:1,64) 2 g/L'lik konsantrasyonda gerçekleşti. Hiçbir azot kaynağı eklenmeyen kontrolde ki parçalanma oranı 1,18 olarak ölçüldüğü için 2 g/L amonyum sülfat eklenmesinin parçalanmayı yaklaşık olarak %39 oranında arttırdığı hesaplandı.



Şekil 4.6. Farklı azot kaynaklarının ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisi
(Ortam şartları: Sıcaklık; 20°C, İnkübasyon süresi; 10 gün, ko-kültür; PB4+PB6)

4.7. Sıcaklığın Ham Petrolün Parçalanma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

PB6+PB4 ko-kültürünün amonyum sülfat varlığında ham petrolü parçalama yeteneklerinin arttığı belirlendikten sonra sıcaklığın ham petrol biyodegradasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla farklı sıcaklıklarda (15-35°C), ko-kültür 2 g/L amonyum sülfat varlığında 10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında izolatların geniş bir sıcaklık aralığında petrolü paçalayabildiği tespit edilirken, maksimum parçalamanın (OD₂₂₅:1,73) 25°C'de başarıldığı kaydedilmiştir (Şekil 4.12).

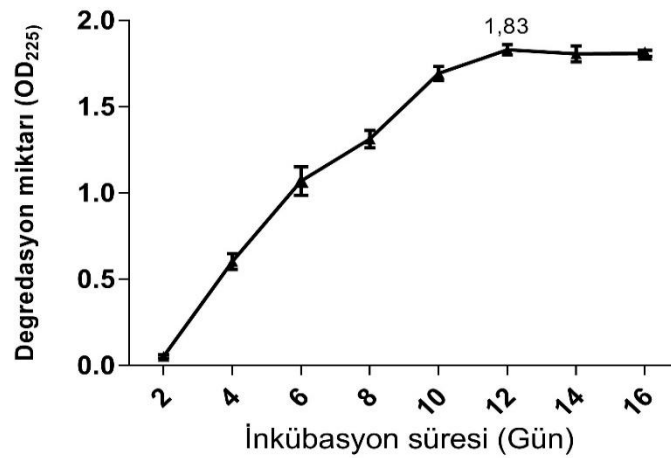


*Ortam şartları: İnkübasyon süresi; 10 gün, ko-kültür; PB4+PB6, Azot kaynağı; 2 g/L amonyum sülfat

Şekil 4.7. Sıcaklığın ham petrol biyodegradasyonuna olan etkisi

4.8. İnkübasyon Süresinin Ham Petrolün Parçalanma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin ham petrolün biyodegradasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla PB6 ve PB4 kodlu izolatların, 25°C'de 2 g/L amonyum sülfat içeren besiyerlerinde 16 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Ham petrol biyodegradasyonunun 12. günde maksimum düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 4.13).



*Ortam şartları: Sıcaklık; 25 °C, ko-kültür; PB4+PB6, azot kaynağı; 2g/L amonyum sülfat

Şekil 4.8. İnkübasyon süresinin ham petrol biyodegradasyonuna etkisi

4.9. Büyük ve Küçük Hacimlerde Petrol Parçalanma Oranlarının Karşılaştırılması

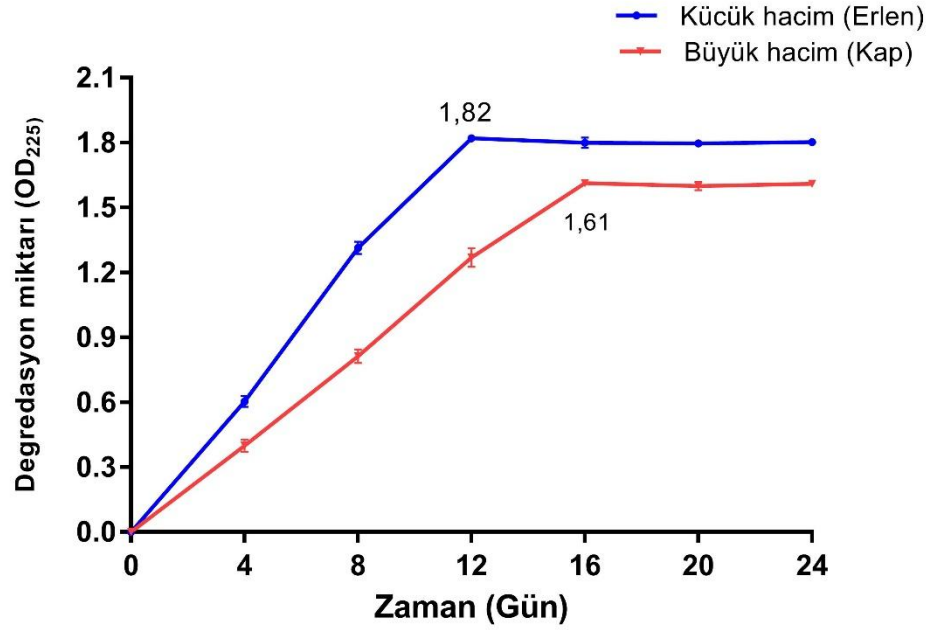
Materyal ve metot da belirtildiği gibi ko-kültür, optimal sıcaklık, pH, amonyum sülfat konsantrasyonlarında, daha yüksek deniz suyu hacminde şeffaf bir plastik kap içerisinde petrol parçalanmasında test edilmiştir. Petrol ortamına ko-kültür inokülasyonu ve amonyum sülfat ilavesi gerçekleştirildikten sonra, plastik kap, üstü açık çalkalayıcıya yerleştirilerek 50 rpm’de, 4 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Ortamdan 4 gün arayla alınan örneklerdeki parçalanma oranı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Büyük hacimlerde optimize koşullar altında ham petrol biyodegradasyonu



Şekil 4.10. Küçük hacimlerde optimize koşullar altında ham petrol biyodegradasyonu



Şekil 4.11. Büyük ve küçük hacimlerde ham petrolün degradasyon miktarlarının karşılaştırılması

4.10. Ham petrolün parçalanmasından sonra izolatların kontrolü

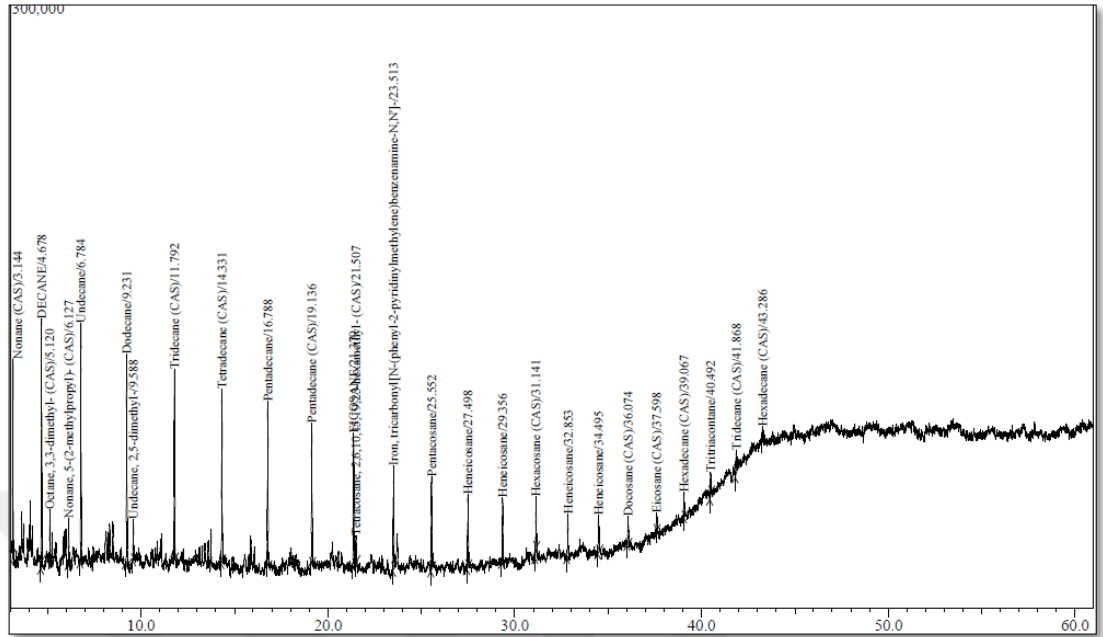
Optimize koşullar altında 12 gün süre ile inkübasyona bırakılan PB6 ve PB4 kodlu izolatların ko-kültürlerinin dilüsyonu yapıldı. Dilüsyon sonucunda 16 koloni gözlemlendi. Bu koloniler seçilerek 16S Rna sekans analizleri gerçekleştirildi. Sekans analizleri sonucunda 6 koloninin *Alcanivorax venustensis*, 6 koloninin *Rhodococcus qingshengii*, 2 koloninin *Cobetia amphilecti* ve diğer 2 koloninin ise *Pseudomonas sabulinigri* oldukları tespit edildi.

4.11. GC-MS Analizleri

Optimizasyon şartlarının belirlenmesinin ardından, Optimum koşullar altında ham petrolün biyodegradasyon ürünleri ve miktarları GC-MS analizleriyle belirlendi. Bakteri inokülasyonu yapılmamış petrol ve deniz suyu içeren besiyerleri kontrol olarak kullanıldı ve buna kıyasla bakterilerin tekli ve ko-kültürlerinin degradasyon miktarları

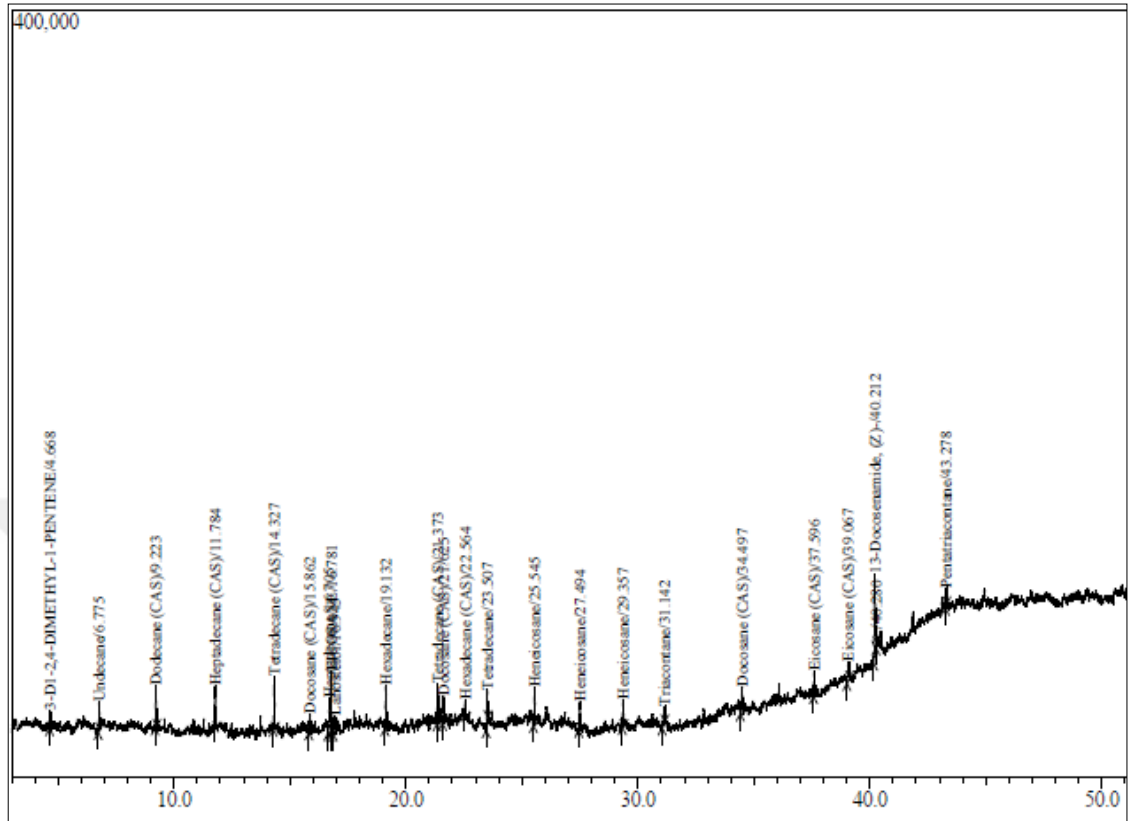
saptandı. Yapılan GC-MS analizleri sonucunda kontrol olarak belirlenen numunenin 26 tane hidrokarbon içerdiği tespit edildi. Bu hidrokarbonların C9-C36 (Şekil 4.13) arasında uzunluğa sahip oldukları belirlendi. PB6 kodlu izolatin tekli kültürlerinin GC-MS sonucu incelendiğinde piklerin alanlarında ciddi azalmalar görülse de hidrokarbonların tamamen parçalanmadığı C5-C35 arası 24 tane hidrokarbonun ortamda bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.14). PB6 ve PB4 kodlu izolatlardan ko-kültürlerinin GC-MS analizlerine bakıldığında hidrokarbonların çoğunu tamamen parçaladığı, kalanları da %85'lere varan oranda azalttığı tespit edildi (Şekil 4.15).





Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Name
1	3.144	130822	4.97	95781	Nonane (CAS)
2	4.678	226530	8.60	120991	DECANE
3	5.120	42190	1.60	25045	Octane, 3,3-dimethyl- (CAS)
4	6.127	42147	1.60	23230	Nonane, 5-(2-methylpropyl)- (CAS)
5	6.784	232929	8.84	118014	Undecane
6	9.231	219869	8.35	103229	Dodecane
7	9.588	38559	1.46	20052	Undecane, 2,5-dimethyl-
8	11.792	194686	7.39	91123	Tridecane (CAS)
9	14.331	194564	7.39	84947	Tetradecane (CAS)
10	16.788	185664	7.05	80128	Pentadecane
11	19.136	155342	5.90	68783	Pentadecane (CAS)
12	21.379	163268	6.20	66390	EICOSANE
13	21.507	37980	1.44	13009	Tetracosane, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl- (CAS)
14	23.513	129933	4.93	51357	Iron, tricarbonyl[N-(phenyl-2-pyridinylmethyl)benzenamine-NNT]-23.513
15	25.552	119408	4.53	45796	Pentacosane
16	27.498	94140	3.57	35691	Heneicosane
17	29.356	79524	3.02	32286	Heneicosane
18	31.141	63483	2.41	26687	Hexacosane (CAS)
19	32.853	58296	2.21	22187	Heneicosane
20	34.495	53070	2.01	18323	Heneicosane
21	36.074	38908	1.48	13638	Docosane (CAS)
22	37.598	16316	0.62	7980	Eicosane (CAS)
23	39.067	30838	1.17	12142	Hexadecane (CAS)
24	40.492	33205	1.26	11613	Tritriacontane
25	41.868	32938	1.25	11174	Tridecane (CAS)
26	43.286	19853	0.75	7179	Hexadecane (CAS)
		2634462	100.00	1206775	

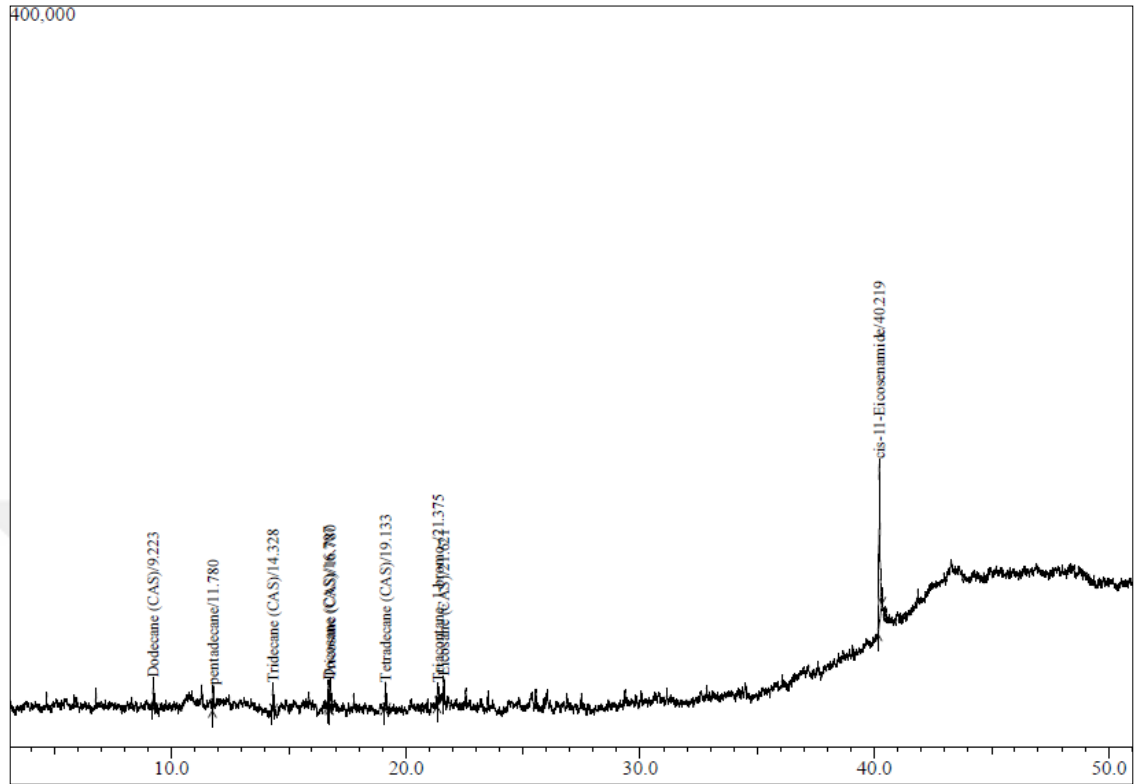
Şekil 4.12. Bakteri inokülasyonu yapılmamış örneğin GC-MS sonuçları (Kontrol)



Peak Report TIC

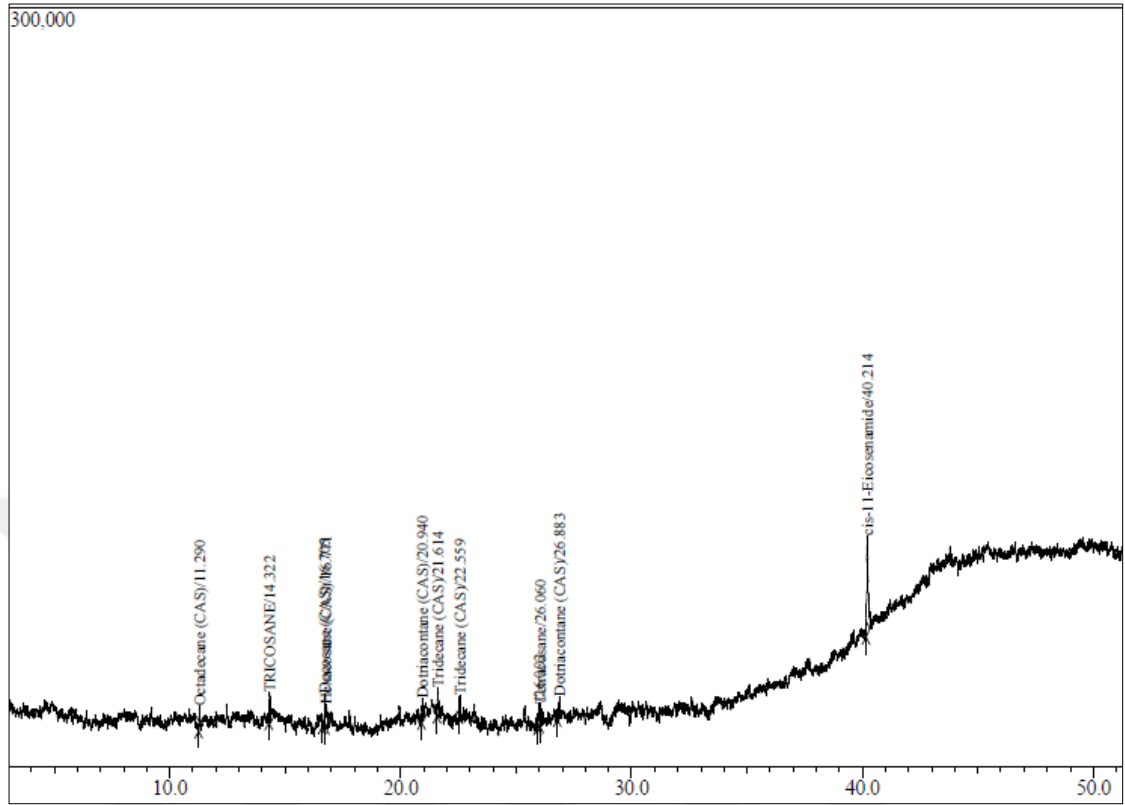
Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Name
1	4.668	18477	0.95	9744	3-DI-2,4-DIMETHYL-1-PENTENE
2	6.775	31868	1.63	15032	Undecane
3	9.223	42647	2.19	21344	Dodecane (CAS)
4	11.784	47133	2.42	21294	Heptadecane (CAS)
5	14.327	63509	3.25	27762	Tetradecane (CAS)
6	15.862	29672	1.52	10044	Docosane (CAS)
7	16.705	50999	2.61	18243	Heptadecane
8	16.781	102067	5.23	32510	EICOSANE
9	16.945	38049	1.95	9581	Lanosterol
10	19.132	58910	3.02	22785	Hexadecane
11	21.373	68054	3.49	20679	Tetradecane (CAS)
12	21.625	35381	1.81	14508	Docosane (CAS)
13	22.564	17004	0.87	9138	Hexadecane (CAS)
14	23.507	41335	2.12	17313	Tetradecane
15	25.545	51444	2.64	19286	Heneicosane
16	27.494	38592	1.98	15115	Heneicosane
17	29.357	37172	1.90	14559	Heneicosane
18	31.142	24003	1.23	8687	Triacotane
19	34.497	55281	2.83	14383	Docosane (CAS)
20	37.596	30330	1.55	12940	Eicosane (CAS)
21	39.067	32329	1.66	10134	Eicosane (CAS)
22	40.212	147706	7.57	42774	13-Docosenamide, (Z)-
23	40.280	13750	0.70	8951	
24	43.278	23640	1.21	9658	Pentatriacontane

Şekil 4.13. PB6 kodlu izolatın ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları



Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Name
1	9.223	28743	1.82	14938	Dodecane (CAS)
2	11.780	29271	1.85	12673	pentadecane
3	14.328	30915	1.96	14179	Tridecane (CAS)
4	16.707	36977	2.34	14466	Docosane (CAS)
5	16.780	39313	2.49	16220	Tricosane (CAS)
6	19.133	37563	2.38	14397	Tetradecane (CAS)
7	21.375	28148	1.78	11846	Triacotane, 1-bromo-
8	21.621	26260	1.66	12673	Eicosane (CAS)
9	40.219	304673	19.29	87691	cis-11-Eicosenamide
10	53.624	1017850	64.43	131067	Silane, diethylheptyloxyoctadecyloxy-
		1579713	100.00	330150	

Şekil 4.14. PB4 ve PB6 kodlu izolatların ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları



Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Name
1	11.290	13901	1.14	7717	Octadecane (CAS)
2	14.322	28303	2.32	12017	TRICOSANE
3	16.705	35883	2.95	13264	Docosane (CAS)
4	16.771	30577	2.51	9023	Hexacosane (CAS)
5	20.940	26496	2.18	9143	Dotriacontane (CAS)
6	21.614	33766	2.77	11513	Tridecane (CAS)
7	22.559	16619	1.36	8557	Tridecane (CAS)
8	26.002	32021	2.63	9583	
9	26.060	26180	2.15	8454	Tetraacosane
10	26.883	24104	1.98	8827	Dotriacontane (CAS)
11	40.214	174796	14.36	38961	cis-11-Eicosenamide
12	53.615	774908	63.64	98699	Silane, diethylheptyloxyoctadecyloxy-

Şekil 4.15. PB4, PB6 ve PB7 kodlu izolatların ko-kültürlerinin GC-MS sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gelişen ekonomilerin ihtiyaç duyduğu enerji çeşitli yollardan karşılanırsa da, endüstriyel gelişim için petrol ihtiyacı günden güne artırmaktadır. Petrol, dünyanın belirli bölgelerinde rezervler halinde bulunduğu için, güvenli bir şekilde taşınmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Petrolün dünya için önemini ifade etmek gerekirse, 2010 yılında dünya enerji ihtiyacının %34'ünün ham petrolden karşılandığı bilinmektedir. Yine 2010 yılı için yaklaşık olarak 1,8 milyar ton ham petrol (dünya ham petrol üretiminin %45'i) tankerlere yüklenerek deniz yoluyla dünyanın çeşitli bölgelerine taşınmıştır. Durum böyle iken tankerlerin yol açabileceği çevre riskleri de aynı oranda artmaktadır (Birleşmiş Milletler Ticaret ve Kalkınma Konferansı 2011; Küçükyıldız 2013).

Denizde petrol kirliliği; tankerlerden, deniz yatağında yapılan petrol arama ve çıkarma çalışmalarından, rafinerilerden, gemi kazalarından (karaya oturma, çatışma, batma, yan yatma) ve endüstrilerden kaynaklanmaktadır. Dünyada yaklaşık 1 milyon ton/yıl petrol ve petrol türevlerinin, denizlere karıştığı tahmin edilmektedir. Bu karışım sonucu sudan hafif olan petrol yüzeyde ince bir film tabakası meydana getirmekte, hızlı bir şekilde yayılmakta ve böylece geniş bir alanı etkilemektedir (Onay 2016). Ham petrol, gerek yapısında bulunan maddelerin toksik etkileriyle, gerekse de denizin yüzeyini kaplayıp güneş ve oksijen girişinin engellenmesiyle çevreye, deniz canlılarına ve bu kirliliğin temizlenmesinde rol oynayan çalışanlara ciddi zararlar vermektedir. Ham petrolün bu zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla kullanılan mevcut fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yetersizliğinden dolayı bilim dünyası petrol hidrokarbon kirleticilerini çevreden temizleyebilecek en önemli ve nihai doğal mekanizmanın mikrobiyal biyodegradasyon olduğunu bildirmişlerdir (Atlas 1992; Lal and Khanna 1996; Das and Chandran 2011). Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışması kapsamında, ülkemizin 4 farklı denizine ait su örneklerine ham petrol ilave edilerek non-steril koşullarda hazırlanan besiyerilerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi ve bu bakterilerin ham petrolü parçalama yeteneklerinin artırılması amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Literatür verileri incelendiğinde izole edilen bakterilerin ham petrolü parçalama kapasiteleri belirlenirken, Busnell Haas Medium, Marine Salt Medium gibi ticari besiyerleri ya da mineraller kullanılmış ve ardından sterilizasyon yapılmıştır (Mandri and Lin 2007; Hassanshahian *et al.* 2012; Shahriari 2014; Bayat *et al.* 2015; Tian *et al.* 2019). Tanker kazaları ya da sondaj çalışmaları sırasında meydana gelen bir petrol kirliliğinin temizlenmesi aşamasında, doğal ortamın mümkün olduğunca taklit edilmesi gerekmektedir. Bu yönüyle yukardaki çalışmalarda laboratuvar ortamında alınan sonuçların, doğal ortamda aynı etkiyi göstermesi beklenmemektedir. Örneğin laboratuvar ortamında küçük bir hacmin pH'sı, sıcaklığı ve çalkalanma hızı rahatlıkla kontrol edilebilirken, çok büyük su hacimlerine sahip olan denizler ve okyanuslarda bu parametreler rahatlıkla kontrol altına alınamayacaktır. Örneğinin laboratuvarda petrol parçalanması için, bir erlenin çalkalanması 150 rpm'de çalkalanırken büyük hacimlerdeki okyanuslarda istenilen oranda çalkalama hızı sağlanamayacaktır.

Ayrıca araştırmacılar laboratuvar ortamlarında petrol degradasyonu çalışırken besiyerlerini steril etmektedir. Sterilizasyon işleminin ise deniz ya da okyanuslara uygulanması mümkün görülmemektedir. Diğer taraftan araştırmacılar besiyerinde petrol parçalanmasını arttırmak için ortama maya ekstraktı ve pepton gibi pahalı bileşenleride katmaktadırlar. Kısacası laboratuvar ortamlarında elde edilen sonuçlar gerçek deniz ve okyanus şartlarına uyarlanamamaktadır. Bu eksiklikler göz önüne alınarak, mevcut çalışmada doğrudan okyanus ve deniz ortamlarında petrol biyodegradasyonunda kullanılabilecek olan bir biyoproses geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda da çalışmada kullanılacak olan bakterilerin izolasyonu bizzat deniz ortamından gerçekleştirilmiş olup, izole edilen bakterilerle steril olmayan koşullar altında, sınırlı besin şartlarında ve deniz suyunun doğal dalgalanma oranını taklit edecek şekilde çok düşük çalkalanma hızında (50 rpm) deneyler gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sırasında doğrudan deniz sularından bakterileri izole etmek yerine, ilk önce %3 oranında petrol eklenmiş ve deniz suyu içeren erlenler 10 gün süre ile durağan şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sayede petrolü parçalama yeteneğine sahip olan bakterilerin hayatta kalması ve zayıf olanların ise elemine edilmesi amaçlanmıştır. Zaten sonuçlarda da belirtildiği gibi petrol ilavesi yapılmadan inkübe edilen erlenlerden çok sayıda bakteri

izole edilirken, petrol ilave edilmiş olanlardan bu sayı toplamda 12'ye kadar düşmüştür. Bu sonuçta yine petrolün zayıf bakteriler üzerinde daha çok toksik etki yaptığını ortaya çıkarmıştır.

Sonuçlarda da belirtildiği gibi 4 farklı denizden toplamda 12 bakteri izole edilmiştir. Bu bakteriler steril olmayan dört deniz suyu ortamında ayrı ayrı ilave edilmiş ve petrol parçalama yetenekleri karşılaştırılmıştır. Bakteri inokülasyonu sırasında da bakteriler doğrudan petrol tabakasının üzerine yayılmış ve ilave bir karıştırma işlemi yapılmamıştır. 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda dört tane bakterinin ham petrolü yüksek oranda parçalama kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden sadece bu bakterilerin teşhisi gerçekleştirilmiştir.

Doetsch (1973), *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* ve *Micrococcus* cinslerine ait türlerinin hidrokarbon içeren ortamlarda gelişebildiklerini rapor etmiştir. Okereke *et al.* (2007) *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* ve *Actinomyces* bakterileri ile *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* mantarlarının hidrokarbon ile kontamine olmuş toprak örneklerinde yaşayabildiklerini bildirmişlerdir. Brooijmans *et al.* (2009), *Rhodococcus*. ve *Alcanivorax* cinslerinin tanker kazası olan denizlerde biyoremediasyondan sorumlu olduklarını tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada da en iyi petrol degradasyonu yapan dört izolattan iki tanesi *Pseudomonas sabulinigri*, bir tanesi *Alcanivorax venustensis* ve diğer bir tanesinde *Rhodococcus qingshengii* olarak teşhis edilmiştir. Bu sonuçlar da *Pseudomonas*, *Rhodococcus* ve *Alcanivorax* cinslerinin ham petrol biyodegradasyonu yapabildiğini gösteren önceki çalışmalardakilere paralellik göstermektedir. Çalışmada iki izolattan (PB7 ve PB1) petrol degradasyon yetenekleri birbirine benzer olması ve bu iki izolatta aynı tür olarak teşhis edilmesinden dolayı takip edilen aşamalarda bu türlerden sadece bir tanesi seçilmiştir. Kısaca, bir sonraki adım için üç izolat (PB6, PB4 ve PB7) seçilmiştir.

İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde maksimum ham petrol biyodegradasyonu gösteren izolatlardan PB6'nın %0-12 tuz, pH 6-10 ve 10-

40°C sıcaklık, PB4'ün ise %0-15 tuz, pH 6-9 ve 5-40°C sıcaklık değerlerinde gelişebildiği gözlemlenmiştir. Bu yönüyle elde edilen sonuçlar literatür verileriyle uyuşmaktadır (Fernández *et al.* 2003; Xu *et al.* 2007). Ayrıca izolatların geniş tuz ve sıcaklık değerlerinde üreyebilmesi, onların farklı deniz ve okyanuslarda meydana gelen petrol kontaminasyonunun gideriminde kullanılma potansiyelini arttırmaktadır.

Bakteri suşlarının petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında kullanılabileceğine dair farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Al-Dhabaan 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada *Bacillus subtilis* bakterisinin 14. günün sonunda sıvı ortamda ve toprakta bulunan hidrokarbonları sırasıyla %38 ve %30 oranında parçaladığını göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada, termofilik *Bacillus* olan NG80-2 suşunun sadece C15-C36 alkanları parçaladığı, C8-C14 ve C36'dan uzun zincirli alkanları parçalayamadığı tespit edilmiştir (Sorkhoh *et al.* 1993). Yine Gutierrez *et al.* 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada *Alteromonas* sp. TK-4 suşunun yalnızca C12-C15, *Cycloclasticus* sp. TK-8 suşunun ise C14-C15 hidrokarbonlarını parçaladığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, kompleks hidrokarbonların biyoremediasyonu için tek bir bakteri suşunun kullanımının yeterli olmadığını göstermektedir.

Birçok bilim adamı, toprak, (Bartha and Bossert 1984; Das and Chandran 2011) tatlı su (Cooney 1984; Das and Chandran 2011) ve deniz ortamlarındaki ham petrol (Floodgate 1984; Atlas 1985; Das and Chandran 2011; Ghorbannezhad *et al.* 2018) gibi karmaşık hidrokarbon karışımlarının biyodegradasyonu için geniş enzimatik kapasiteye sahip karışık kültür populasyonlarının gerekli olduğunu bildirmiştir. Bu bilgiler ışığında, bakterilerin tek başına ve ya ko-kültürler halinde ham petrolü parçalama potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda test edilen bütün ko-kültürlerin, tekli kullanıma oranla daha yüksek ham petrol biyodegradasyonu gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle en yüksek ham petrol biyodegradasyonu PB6 ve PB4 kodlu izolatların ko-kültürüyle başarılmıştır. Bu sonuçlara dayalı olarakta, çalışmanın takip eden aşamalarında PB6 + PB4 ko-kültürü kullanılmıştır.

Araştırmacılar, ham petrolün başarılı bir şekilde parçalanması için azot kaynağının cinsi ve konsantrasyonunun da çok önemli olduğunu belirmişlerdir (Cooney 1984; *Roslee et al.* 2019). Das and Chandran (2011) tatlı su ve denizel ortamlarda büyük bir petrol döküntüsü meydana geldiğinde, karbon kaynağı miktarının önemli ölçüde arttığını ve petrolün mikrobiyal olarak parçalanabilmesi için ortama azot ilavesi gerektiğini bildirmişlerdir (C/N oranını azaltmak maksadıyla). Bu bilgi göz önüne alınarak, mevcut çalışmada, 5 farklı azot kaynağının ham petrol biyodegradasyonu üzerine olan etkiside araştırılmıştır. Bu azot kaynakları da doğrudan petrol tabakası üzerine serpilerek azotun olabildiğince petrolün içerisinde kalması sağlanmıştır. Bu sayede denizel ortama verilecek olan azot kaynağının deniz ortamında yayılmasının önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Mevcut deneyler, maksimum parçalanmanın, 2 g/L amonyum sülfat ilavesi yapılan deniz suyu ortamında başarıldığını ortaya çıkarmıştır. Ham petrolün parçalanmasında kullanılan bakterinin türüne göre besiyerine ilave edilen azot kaynakları değişkenlik gösterse de amonyum sülfatın ham petrol biyodegradasyonunu arttırdığına yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Ozyurek ve Bilkay 2018; Gao *et al.* 2019; Roslee *et al.* 2019). Ürenin bütün konsantrasyonları ve potasyum nitratın yüksek konsantrasyonlarında kontrole oranla ham petrol parçalanmasını azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun ilk olası açıklaması bu azot kaynaklarının hücre büyümesini ve/ve ya parçalamada görev alan enzimleri inhibe etmesi olabilir. Diğer bir olası açıklama ise, deneyler non-steril kültür şartlarında gerçekleştiği için deniz suyunun içerisinde mevcut olan ancak parçalamaya yeteneği bulunmayan bazı bakterilerin bu azot kaynaklarını çok daha iyi kullanarak baskın hale gelmesidir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonunda sıcaklığın önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Ibrahim *et al.* 2020). Sıcaklık kirleticilerin kimyasını doğrudan etkileyerek ve aynı zamanda mikrobiyal floranın fizyolojisini ve çeşitliliğini değiştirerek hidrokarbonların biyodegradasyonunda önemli bir role sahiptir (Ibrahim *et al.* 2020). Das and Chandran 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada, düşük sıcaklık değerlerinin, ham petrolün viskozitesini arttırdığını, toksik olan ve düşük moleküler ağırlığına sahip hidrokarbonların uçuculuğunu azalttığını ve biyo-bozunmayı geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada (Venosa and Zhu

2003), ham petrol ile kontamine olmuş toprakların maksimum biyodegradasyonu için optimum sıcaklık değerinin 30-40°C ve denizel ortamlarda ise 20-30°C'de olduğunu gözlemlemişlerdir. Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada sıcaklığın ham petrolün parçalanması üzerine etkili olduğunu ve maksimum parçalanmanın literatür verilerine paralel olarak 25°C'de gerçekleştiğini tespit ettik. Bu yönüyle sonuçlarımız literatür verileriyle uyumaktadır. Her ne kadar maksimum parçalanma 25°C'de gerçekleşse de 15-30°C aralıklarında da izolatlarımızın yüksek ham petrol biyodegradasyonunu gerçekleştirdiği görülmektedir. Ayrıca ülkemizde bulunan denizlerin su sıcaklıkları mevsimlere göre değişiklik göstermekle beraber, bu değerler Akdeniz için; 30-16,5°C, Karadeniz için; 27-12°C, Ege denizi için; 29-16°C ve Marmara için 26-10°C aralığındadır (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı ve Tübitak MAM 2016). Bu yönüyle de denizlerimizde meydana gelecek bir ham petrol kontaminasyonunda, tez çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin kullanılabilirliği aşırıdır.

Denizlerde meydana gelen ham petrolün kısa sürede temizlenmesi, ortaya çıkacak ekonomik ve sağlık problemlerinin asgariye çekilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla, çalışmamızda inkübasyon süresinin optimizasyonu yapılmıştır. Analizler sonucunda, erlenlerde (küçük hacimlerde) maksimum parçalanmanın 12 günde yapıldığı saptanmıştır. Bu parametre için literatür verileri incelendiğinde bir çok farklı sonuca rastlanmaktadır. Bizim verilerimize paralel olarak, Ibrahim *et al.* 2020 yapmış oldukları çalışmada, *Halobacillus* cinsine ait bir türün, ticari Busnell Haas Medium ve %1 ham petrol içeren besiyerinde 12 günde maksimum parçalama gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın doğal ortama uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, büyük hacimlerde ham petrolün parçalanma miktarı test edilmiştir. Bunun için, ağzı açık büyük bir plastik kaba deniz suyu dolduruldu (25 L) ve üzerine 450 ml ham petrol ilavesi yapıldı. Bakteri inokülasyonu ve amonyum sülfat ilavesi gerçekleştirildikten sonra, 4'er gün aralıklarla örnek alınıp parçalanma miktarı analiz edildi. Erlenlerdeki ortamının aksine (12 gün), plastik kap ortamında maksimum parçalanma oranına 16. günde ulaşılmış daha uzun inkübasyon süresinin ise degradasyon miktarını arttırmadığı tespit edilmiştir.

Erlen ortamına oranla daha büyük hacimdeki deniz suyu ortamında %15 daha az biyodegradasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, büyük hacimde elde edilen parçalanma oranında yüksek olduğu görülmektedir. Bu yüzden, yöntemimizin doğal ortamlarda uygulanabilir olduğu düşünülmektedir.

Yapılan GC-MS analizleri sonucunda, bakterilerin ko-kültürlerinin, tekli kültürlerine göre daha yüksek oranda ham petrolün biyodegradasyonunu gerçekleştirdiği saptanmıştır. PB6 ve PB4 kodlu izolatların ko-kültürlerinin optimize koşullar altında C9-C12, ve C16-C29 hidrokarbonlarının %100'ünü, C13-C15 hidrokarbonlarının ise %85'ine yakınına parçaladığı tespit edilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde Ibrahim *et al.* 2020 *Halomonas* sp. izolatıyla yapmış oldukları çalışmada, C14-C28 hidrokarbonlarının %47'sinin parçalandığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada (Tian *et al.* 2019), ise *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. izolatlarıyla BHM ilaveli besiyerinde, 30°C'de, 14 gün süre ile, 170 rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmış, C9-C20 hidrokarbonlarının %72'sini, C21-C26 hidrokarbonlarının %82'sini ve C27-C39 hidrokarbonlarını %74'ünü parçaladığını gözlemlemişlerdir. Mevcut çalışma literatür verileriyle kıyaslandığında, BHM, MSM gibi ticari tuzların kullanılmaması ve çalkalamanın 50 rpm olmasına rağmen, yüksek biyodegradasyon miktarlarına ulaşılması, prosesimizin diğer araştırmalara göre üstün olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak;

- Ham petrol kirlilikleri, çok ciddi ekolojik, ekonomik ve sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Buna karşın, mevcut fiziksel ve kimyasal temizleme yöntemleriyle, bu sorunların çözülmesi mümkün görülmemektedir. Tez çalışması ile, fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif, onların dezavantajlarını büyük ölçüde ortadan kaldıran, çevreye dost, maliyeti ve iş gücü düşük olan, etkin bir biyoremediasyon yöntemi önerilmiştir.
- *Alcanivorax* ve *Rhodococcus* cinslerinin, ham petrolün parçalanmasında etkin rol oynadığı bilinse de, *Alcanivorax venustensis* ve *Rhodococcus qingshengii* türlerinin ko-kültürlerinin biyodegradasyon özellikleri ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

- Yapılan deneylerde, mümkün oldukça doğal ortam koşulları korunmaya çalışılmıştır. Ticari besiyerleri yerine direkt deniz suyu kullanmış olup, büyük hacimlerde ağzı açık kaplarda ham petrol biyodegradasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yönüyle mevcut tez çalışmasından elde edilen sonuçların, doğal ortamlara uygulanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I., Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A review, *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3, 28-39, 2015.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Agwu, O.A., Ilori, M. O., Nwachukwu, S.U. Utilization of drilling fluid base oil hydrocarbons by microorganisms isolated from diesel polluted soil. *Soil and Sediment Contamination*, 22, 817-828, 2013.
- Akpe A.R., Ekundayo A.O., Esumeh F.I., Degradation of crude oil bacteria: a role for plasmid borne genes. *Global Journal of Science Frontier Research Biological Science*, 13, 20-26, 2013.
- Al-Dhabaan, F. A. 2018. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Alexander, M., Biodegradation and Bioremediation second edition, academic Press New York, 1999.
- Al-Sayegh, A., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Joshi, S., Microbial enhanced heavy crude oil recovery through biodegradation using bacterial isolates from an Omani oil field, *Microbial Cell Factories*, 14, 141-152, 2015.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46: 548s.
- Atlas R. M., "Effects of hydrocarbons on micro-organisms and biodegradation in Arctic ecosystems," in *Petroleum Effects in the Arctic Environment*, F. R. Engelhardt, Ed., pp. 63–99, Elsevier, London, UK, 1985
- Atlas R. M., "Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 30, no. 3, pp. 396–403, 1975.
- Atlas R. M., "Petroleum microbiology," in *Encyclopedia of Microbiology*, pp. 363–369, Academic Press, Baltimore, Md, USA, 1992.
- Atlas R. M., Ed., pp. 399–434, Macmillan, New York, NY, USA, 1984
- Atlas, R.M., Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation, *Marine Pollution Bulletin*, 31, 178-182, 1995.
- Bacosa, H. P., Erdner, D. L., Rosenheim, B. E., Shetty, P., Seitz, K. W., Baker, B. J., & Liu, Z. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. *The ISME journal*, 12(10), 2532.
- Ball, D.W., Hill, J.W., Scott, R.J., Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological, 2011.
- Bartha R. and Bossert, I. "The treatment and disposal of petroleum wastes," in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 553–578, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Hesni, M. A. (2015). Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 85-91.
- Bilen Ozyurek S, Seyis Bilkay I. Biodegradation of petroleum by *Klebsiella pneumoniae* isolated from drilling fluid. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2018;15(10):2107-16
- Biodia, E. D., Montagnolli, R. N., Lopes, P.R.M., Microbial Biodegradation Potential of Hydrocarbons Evaluated by Colorimetric Technique: A Case Study, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, (eds: Mendez-Vilas, A.). Vol. 2. FORMATEX, Badajoz, Spain, 1277-1288, 2010.
- Boboye, B., Olukunle, O.F., Adetuyi, F.C., Degradative activity of bacteria isolated from hydrocarbon polluted site in Ilaje, Ondo State, Nigeria, *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2484-2491, 2010.
- Bourotte, C., Forti, M.C., Lucas, Y., Melfi, A.J., Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in urban and natural forest soils in Atlantic Forest, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 81, 127-136, 2009.
- Brooijmans, R. J., Pastink, M. I., & Siezen, R. J. (2009). Hydrocarbon- degrading bacteria: the oil- spill clean- up crew. *Microbial biotechnology*, 2(6), 587-594.
- Ceyhan ve Esmeray, P etrol kirliliği ve biyoremediasyon, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1), 95-101, 2012.
- Chaillana, F., Fiecheb, A., Burya, E., Phantavonga, Y., Saliot, A., Oudot, J., Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms, *Research Microbiology*, 155 (7), 587-595, 2004.
- Cooney J. J., (1984) "The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems," in *Petroleum Microbiology*, Danyi, S., Bose, F., Basseur, C., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta*, 633, 293-699, 2009.
- Darvishi, P., Mowla, D., Ayatollahi, S., Niazi, A., Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPP1-1, *Desalination and Water Treatment*, 28, 46-54, 2011.
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007, Crude Petroleum-Oil Biodegradation Eyciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil from North-East India, *Bioresource Technology*, 98, 1339-1345.
- Das, M., Adholye, A., Role of microorganisms in remediation of contaminated soil. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, (eds: Satyanarayana, T., Johri, B.N., Prakash, A.), *Springer Science & Business Media*, London, Newyork, 81-111, 2012
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*.
- Daubert, T.E. and Danner, R.E, API Technical Data Book--Petroleum Refining, 6th ed., American Petroleum Institute (API), Washington, DC, 1997

- Delille, D., Coulon, F., Pelletier, E., Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient amended hydrocarbon contaminated sub- Antarctic soils, *Cold Regions Science and Technology*, 40, 61-70, 2004
- Demir, İ., Demirbağ, Z., Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Olarak Parçalanması, *Tübitak*, 23, 293-302, 1999.
- Denis, J., Briant, J. and Hipeaux, J.C., *Lubricant Properties Analysis and Testing*, Editions Technip, Paris, France, 1997.
- Elumalai, P., Parthipan, P., Narenkumar, J., Anandakumar, B., Madhavan, J., Oh, B. T., & Rajasekar, A. (2019). Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, 9(3), 79.
- Eraydin E., Sahin F., Karaca A., Determination of petroleum degrading bacteria isolated from crude oil contaminated soil in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 11, 4853-4859, 2012.
- Fakhrzadegan, I., Hassanshahian, M., Askari Hesni, M., & Saadatfar, A. (2019). A study of crude oil- degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf. *Marine Ecology*, 40(2), e12544.
- Fernández-Martínez, J., Pujalte, M. J., García-Martínez, J., Mata, M., Garay, E., & Rodríguez-Valera, F. (2003). Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178T (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 331-338.
- Floodgate, G. "The fate of petroleum in marine ecosystems," in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 355–398, Macmillan, New York, NY, USA, 1984
- Frometa, J., DeLorenzo, M. E., Pisarski, E. C., & Etnoyer, P. J. (2017). Toxicity of oil and dispersant on the deep water gorgonian octocoral *Swiftia exserta*, with implications for the effects of the Deepwater Horizon oil spill. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 91-99.
- Gao, H., Lai, H., Zhang, J., & Xue, Q. (2019). Adding available nitrogen and carbon can improve the efficiency of oil displacement with indigenous bacterial flooding. *Sustainable Energy & Fuels*, 3(9), 2298-2311.
- Ghorbannezhad, H., Moghimi, H. & Dastgheib, S. M. M. 2018 Evaluation of heavy petroleum degradation using bacterial-fungal mixed cultures. *Ecotoxicol Environ Saf* 164, 434–439.
- Godini, K., Samarghandi, M. R., Zafari, D., Rahmani, A. R., Afkhami, A., & Arabestani, M. R. (2018). Isolation and identification of new strains of crude oil degrading bacteria from Kharg Island, Iran. *Petroleum Science and Technology*, 36(12), 869-874.
- Gupta, A., 2016, Studies on Oil Degradation Potential of *Bacillus megaterium*; Cloning and Expression of Oil Degradation Gene Into *E. coli*, *International Journal of Biotechnology and Allied Fields*, 4(5), 277-284.
- Gutierrez, T., Morris, G., Ellis, D., Bowler, B., Jones, M., Salek, K., Mulloy, B. & Teske, A. 2018 Hydrocarbon-degradation and MOS-formation capabilities of the dominant bacteria enriched in sea surface oil slicks during the Deepwater

- Hamzah, A., Rabu, A., Raja Azmy, R. F. H., Youssoff, N. A., Isolation and characterization of bacteria degrading Sumadak and South Angsi Oils, *Sains Malaysiana*, 39, 161-168, 2010.
- Harms, H., Smith, K.E.C., Wick, L.Y., Problems of Hydrophobicity/Bioavailability, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, (eds: Timmis, K.N.), Springer, Berlin, 2010.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), 7-12.
- Ibrahim, I. M., Konnova, S. A., Sigida, E. N., Lyubun, E. V., Muratova, A. Y., Fedonenko, Y. P., & Elbanna, K. (2020). Bioremediation potential of a halophilic Halobacillus sp. strain, EG1HP4QL: exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance. *Extremophiles*, 24(1), 157-166
- Kavynifard, A., Ebrahimipour, G., & Ghasempour, A. (2016). Optimization of crude oil degradation by *Dietzia cinnamea* KA1, capable of biosurfactant production. *Journal of basic microbiology*, 56(5), 566-575
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., An overview and analysis of site remediation technologies, *Journal of Environmental Management*, 71, 95-122, 2004.
- Kulkarni, S. V., Palande, A.S., Deshpande, M.V., Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soils. Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment, (eds: Satyanarayana, T., Johri, B.N., Prakash, A.), Springer Science & Business Media, London, Newyork, 2012.
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource technology*, 254, 174-179.
- Küçükıldız, M. Ç., (2013) Petrol Tankeri Kazalarının Deniz Çevresine Etkileri Ve Tazmin Sistemi. Yüksek lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fenbilimleri enstitüsü, Ankara.
- Kvendolven, K. A., Cooper, C.K., Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Marine Letters*, 23, 140-146, 2003
- Lal B. and Khanna, S. "Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 81, no. 4, pp. 355-362, 1996.
- Latha R., Kalaivani R., Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3, 2789-2795, 2012.
- Li, C., Zhou, Z. X., Jia, X. Q., Chen, Y., Liu, J., & Wen, J. P. (2013). Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain Rhodococcus sp. JZX-01. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(7), 1715-1725.
- Mandri, T., & Lin, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African journal of Biotechnology*, 6(1).
- Milic, J. S., Beskoski, V. P., Ilic, M.V., Ali, S.A.M., Gojgic-Cvijovic, G.D., Vrvic, M.M., Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium, *Journal of Serbian Chemical Society*, 74, 455-460, 2009.
- Mirdamadian, S.H., Emtiazi, G., Golabi, M.H., Ghanavati, H, Biodegradation of Petroleum and Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Isolated from Petroleum

- Contaminated Soil, *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 1, 2-5, 2010.
- Mohapatra, P. K., Textbook of Environmental Microbiology, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 2008.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S., Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 15-25, 2003.
- Ojo, O.A., Petroleum- utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4): 333-337, 2006.
- Okoh, A.I., Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 38-50, 2006.
- Omarova, M., Swientoniewski, L. T., Mkam Tsengam, I. K., Blake, D. A., John, V., McCormick, A., ... & Bose, A. (2019). Biofilm Formation by Hydrocarbon-Degrading Marine Bacteria and Its Effects on Oil Dispersion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(17), 14490-14499.
- Ozyurek, S. B., (2016) Ham Petrol, Sondaj Çamuru Ve Çamur Çukurundan İzole Edilen Mikroorganizmalar İle Petrol Biyoyıkımının Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fenbilimleri enstitüsü, Ankara.
- Peixoto, R.S., Vermelho, A.B., Rosado, A.S., Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects, *Enzyme Research*, 1-17, 2011.
- Plaza, G., Ulfig, K., Hazen, T.C., Brigmon, R.L., (2001). Use of molecular techniques in bioremediation, *Acta Microbiologica Polonica*, 50, 205-218.
- Prakash, A., Bisht, S., Singh, J., Teotia, P., Kela, R., Kumar, V. Biodegradation Potential of Petroleum Hydrocarbons by Bacteria and Mixed Bacterial Consortium Isolated from Contaminated Sites, *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 38, 41-50, 2014.
- Qin, X., Tang, J.C., Li, D.S., Zhang, Q.M., Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil, *Letters in Applied Microbiology*, 55, 210-217, 2012.
- Riazi, M.R., Characterization and Properties of Petroleum Fractions, 1th Edition, West Conshohocken, USA, 2005
- Roslee, A. F. A., Zakaria, N. N., Convey, P., Zulkharnain, A., Lee, G. L. Y., Gomez-Fuentes, C., & Ahmad, S. A. (2019). Statistical optimisation of growth conditions and diesel degradation by the Antarctic bacterium, *Rhodococcus* sp. strain AQ5 07. *Extremophiles*, 1-15
- Sathiskumar, M., Binupriya, A.R., Baik, S.H., Yun, S.E., Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean Journal*, 36 (1), 92-96, 2008.
- Sawadogo, A., Harmonie, O.C., Sawadogo, J.B., Kabore, A., Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso, *Journal of Environmental Protection*, 5, 1183-1196, 2014.
- Sebiomo, A., Awosanya, A. O., Awafodu, A. D., Utilization of crude oil and gasoline by ten bacterial and five fungal isolates, *Journal of Microbiology Antimicrobials*, 3, 55-63, 2011.

- Selvakumar, S., Sekar, P., Rajakumar, S., Ayyasamy, P.M., Rapid screening of crude oil degrading bacteria isolated from oil contaminated areas, *The Scitech Journal*, 1, 24-27, 2014.
- Semple, K. T., Redi, B.J., Fermor, T.R., Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112, 269-283, 2001.
- Shahriari Moghadam, M., Ebrahimipour, G., Abtahi, B., Khazaei, N., & Karbasi, N. (2014). Statistical optimization of crude oil biodegradation by *Marinobacter* sp. isolated from Qeshm Island, Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(1), 35-41.
- Shannon, M.J., Unterman, R., Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction, *Annual Review of Microbiology*, 47, 715-724, 1993.
- Sharma, D., Ansari, M.J., Al-Ghamdi, A., Adgaba, N., Khan, K.A., Pruthi, V., Al - Waili, N., Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DSV20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17636-17643, 2015.
- Singh, K., Chandra, S., Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17, 1-8, 2014.
- Speight, J.G., Arjoon, K.K., (eds.), *Energy and Environment: Bioremediation of petroleum and petroleum products*. Somerset, NJ, USA, 2012.
- Speight, J.G., *The Chemistry and Technology of Petroleum*, 5th Edition, CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, Florida, 2007.
- Strelitz, J., Keil, A. P., Richardson, D. B., Heiss, G., Gammon, M. D., Kwok, R. K., & Engel, L. S. (2019). Self-Reported myocardial infarction and fatal coronary heart disease among oil spill workers and community members 5 years after Deepwater horizon. *Environmental research*, 168, 70-79.
- Tan, K.H., *Environmental Soil Sciences*, 3th Edition, Taylor&Francis Group, CRC Press, Florida, USA, 2009.
- T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Yüzeydeki Petrol Ürünlerini Temizleme, 2013.
- Tao, K., Liu, X., Chen, X., Hu, X., Cao, L., & Yuan, X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource technology*, 224, 327-332.
- Temiz, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Yayıncılık, Ankara, 27, 2010.
- Thapa, B., Kumar, A., Ghimire, A., A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants on soil, *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8, 167-170, 2012.
- Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science and Technology*, 78(12), 2626-2638
- Ubalua, A.O., Bioremediation strategies for oil polluted marine ecosystem, *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 2, 160-168, 2011.

- United Nations Conference on Trade and Development, "Review of Maritime Transport", *UNCTAD, Geneva and New York*, 7-13 (2011).
- Van Dayke, M.I., *Fundamental of petroleum*. 4th Edition, Petroleum Extension Services, University of Texas at Austin, Austin, TX, USA., 1997.
- Van Hamme, J.G., *Crude oil biodegradation by a mixed bacterial culture*, Doktora Tezi, University of Waterloo, Ontario, Canada, 2000.
- Varjani, S.J., Upasanai, V.N., Comparative Studies on Bacterial Consortia for Hydrocarbon Degradation. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2, 5377-5383, 2013.
- Vidali, M. Bioremediation, An overview, *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172, 2001
- Xu, J. L., He, J., Wang, Z. C., Wang, K., Li, W. J., Tang, S. K., & Li, S. P. (2007). *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2754-2757.
- Yuste, L., Corbella, M.E., Turiegano, M.J., Karlson, U., Puyet, A., Rojo, F., Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing, *FEMS Biology*, 61, 1699- 1705, 2000.
- Zhang, G., Wu, Y., Qian, X., Meng, Q., Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids, *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (8), 725-730, 2005.
- Zhang, L.G., Li, X.D., Qi, S.H., Liu, G.Q., Peng, X.Z., Source seasonality of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subtropical city, Guangzhou, South China. *Science of the Total Environment*, 355, 145-15, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2009 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2015 yılında yüksek lisans öğrenimi bitirerek aynı yıl doktora öğrenimine başladı. Halen Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.