

**HAM PETROL, SONDAJ ÇAMURU VE ÇAMUR ÇUKURUNDAN İZOLE
EDİLEN MİKROORGANİZMALAR İLE PETROL BİYİYİKİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PETROLEUM BIODEGRADATION BY
MICROORGANISMS ISOLATED FROM CRUDE OIL, DRILLING
FLUIDS AND MUD PIT**

SEZEN BİLEN ÖZYÜREK

DOÇ. DR. İŞİL SEYİS BİLKAY

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

SEZEN BİLEN ÖZYÜREK' in hazırladığı "Ham Petrol, Sondaj Çamuru ve Çamur Çukurundan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

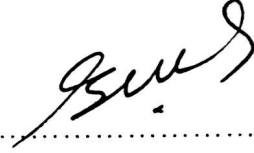
Prof. Dr. Aysun ERGENE

Başkan



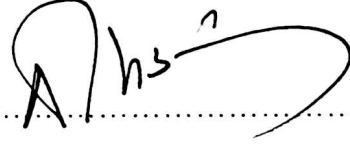
Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Danışman



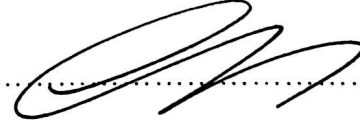
Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Üye



Prof. Dr. Güven URAZ

Üye



Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye



Bu Tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitü Müdür

*GÖKYÜZÜNDEKİ ÜÇ MELEĞİME,
ANNEM' E, ANNEANNEME VE DAYIMA...*

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgileri ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserler bilimsel ve normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/12/2016



SEZEN BİLEN ÖZYÜREK

ÖZET

HAM PETROL, SONDAJ ÇAMURU VE ÇAMUR ÇUKURUNDAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALAR İLE PETROL BİYYOYIKIMININ ARAŞTIRILMASI

Sezen BİLEN ÖZYÜREK

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Aralık, 2016, 103 Sayfa

Bu çalışmada, ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurunda bulunan mikroorganizmaların izole edilmesi, tanımlanması ve bu mikroorganizmaların kullanımı ile petrol biyoyikımı amaçlandı. Ham petrolden *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*; çamur çukurundan *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*; sondaj çamurundan ise *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Enterobacter cloacae* suşlarının izole edildikleri belirlendi. İzole edilen ve tanımlanan tüm mikrobiyal türlerin petrol biyoyikım oranları karşılaştırıldı. Bu bağlamda; petrol biyoyikımındaki en etkili suşların % 59,5 ile *K. pneumoniae* ve % 50,5 ile *B. axarquiensis* olduğu belirlenerek, çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçildi. Her iki tür için petrol biyoyikımının en etkin olduğu fizyolojik koşulların pH 7' de, % 1 (v/v) petrol konsantrasyonunda, % 2 kültür konsantrasyonunda, 150 rpm çalkalama hızında, 25 °C' de ve 7 günde olduğu belirlendi. Uygun fizyolojik koşulların tamamlanması ile *K. pneumoniae* için % 66,5; *B. axarquiensis* için % 65,0 petrol biyoyikım oranları elde edildi. Petrolün besiyerindeki emülsiyonunu arttıran çeşitli sürfektan (Triton X:100, Tween 80, Tween 20) kaynaklarının petrol biyoyikımına etkisi incelendiğinde; sürfektan kaynağı olarak Triton X:100' ün bulunduğu ortamda *K. pneumoniae'* nin petrol biyoyikımı % 68 iken

B. axarquiensis' in % 66 olduğu belirlendi. Buna ek olarak, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarında biyosürefektan üretimi daralma-yayıma ve petrol yer değiştirme yöntemleri ile belirlendi. Ayrıca üretim ortamına ilave edilen farklı karbon kaynaklarından (glukoz, laktoz, maltoz, sukroz), glukozun *K. pneumoniae*' nin petrol biyoyıkımını % 71' e; maltozun *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını % 73' e yükselttiği belirlendi. İlaveten, üretim ortamına farklı azot kaynaklarının eklenmesiyle (maya ekstraktı, üre, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$); maya ekstraktının *K. pneumoniae*' nin petrol biyoyıkımını % 72,5' e; NaNO_3 ' ün *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını % 74' e yükselttiği belirlendi. Karışık kültürün petrol biyoyıkımına etkisi incelendiğinde; *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* karışık kültürünün petrol biyoyıkımında (% 74) önemli bir artış sağlamadığı saptandı. Ham petrolden izole edilen mikroorganizmalara ait karışık kültürün petrol biyoyıkım oranının (% 21,5) oldukça düşük olduğu belirlenirken; çamur çukurundan ve sondaj çamurundan izole edilen mikroorganizmalara ait karışık kültürlerin petrol biyoyıkım oranlarının sırasıyla % 68 ve % 73 olduğu belirlendi. % 1 oranında petrol içeren toprak örneklerindeki petrol biyoyıkımı değerlendirildiğinde; *K. pneumoniae* için steril toprakta % 46, steril olmayan toprakta % 61,5; *B. axarquiensis* için steril toprakta % 32, steril olmayan toprakta % 57,5; söz konusu türlerin karışık kültürü için steril toprakta % 50,5, steril olmayan toprakta % 78,5 petrol biyoyıkımı elde edildi. % 1 oranında petrol içeren deniz suyu örneklerindeki petrol biyoyıkımı değerlendirildiğinde, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile etkin bir biyoyıkım elde edilmezken suşların üreme yoğunluklarının da oldukça düşük olduğu saptandı. Çalışmamızın son aşamasında, *K. pneumoniae* suşuna ait petrol biyoyıkımı gaz kromatografisi (GC) analizi ile incelendiğinde; özellikle C_{10} ve C_{20} aralığındaki hidrokarbonları % 90 ve C_{20} ve C_{22} aralığındaki hidrokarbonları % 75' in üzerinde biyoyıkıma uğrattığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis*, petrol, biyoyıkım, hidrokarbon, sondaj çamuru, çamur çukuru

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PETROLEUM BIODEGRADATION BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM CRUDE OIL, DRILLING FLUIDS AND MUD PIT

SEZEN BİLEN ÖZYÜREK

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Işıl SEYİS BİLKAY

December, 2016, 103 Pages

In this study, the aim was the isolation, identification and biodegradation of petroleum by microorganisms which exist in crude oil, drilling fluid and mud pit as well as petroleum biodegradation with these strains. It was determined that *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* were isolated from crude oil; *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* were isolated from mud pit and *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Enterobacter cloacae* strains were isolated from drilling fluid. Petroleum biodegradation rates of microorganisms, which were isolated and identified, were compared. In this regard, *K. pneumoniae* with 59.5 % and *B. axarquiensis* with 50.5 % were identified as the most effective stains in petroleum biodegradation and selected to be used in continuation of this study. For both strains, most effective physical conditions for petroleum biodegradation were determined as pH 7, petroleum concentration 1 % (v/v), culture concentration 2 %, rotation speed 150 rpm, at 25 °C and 7 days. Biodegradation rates of 66.5 % for *K. pneumoniae* and 65.0 % for *B. axarquiensis* were obtained under the above-mentioned physical conditions. When the effect of several surfactants (Triton X:100, Tween 80, Tween 20), which increase

emulsification of petroleum in the medium, on petroleum biodegradation were investigated, in the presence of Triton X:100 as surfactant source, biodegradation rates of 68 % for *K. pneumoniae* and 66 % for *B. axarquiensis* were determined. In addition, biosurfactant production was determined in *K. pneumoniae* and *B. axarquiensis* strains with drop-collapse and oil displacement methods. Also, with addition of different carbon sources (glucose, lactose, maltose, sucrose), it was determined that glucose increased petroleum biodegradation of *K. pneumoniae* to 71 % and maltose increased petroleum biodegradation of *B. axarquiensis* to 73 %. Furthermore, with addition of nitrogen sources (yeast extract, urea, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$); yeast extract increased petroleum biodegradation of *K. pneumoniae* to 72.5 % and NaNO_3 increased petroleum biodegradation of *B. axarquiensis* to 74 %. When effect of mixed culture on petroleum biodegradation was investigated, it was determined that mixed culture of *K. pneumoniae* and *B. axarquiensis* did not have significant effect on petroleum biodegradation (74 %). Low biodegradation rate (21.5 %) was determined for mixed culture of strains isolated from crude oil; biodegradation rates of 68 % and 73 % were determined for mixed cultures of strains isolated from mud pit and drilling fluid, respectively. When biodegradation of petroleum in soil samples with 1 % crude oil was investigated, petroleum biodegradations were; for *K. pneumoniae* 46 % in sterile soil and 61.5 % in nonsterile soil; for *B. axarquiensis* 32 % in sterile soil and 57.5 % in nonsterile soil and mixed culture of these strains 50.5 % in sterile soil and 78.5 % in nonsterile soil. When petroleum biodegradation in seawater samples including 1 % petroleum was investigated; efficient biodegradation was not obtained and very low growth densities were determined for *K. pneumoniae* and *B. axarquiensis*. In last stage of our study, when petroleum biodegradation of *K. pneumoniae* was investigated with gas chromatography (CG) analysis, biodegradation rates above 90 % for hydrocarbons ranging from C_{10} and C_{20} and biodegradation rates above 75 % for hydrocarbons ranging from C_{20} and C_{22} , were determined.

Keywords: *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis*, petroleum, biodegradation, hydrocarbons, drilling fluid, mud pit

TEŞEKKÜR

Tüm lisans, yüksek lisans ve doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince başarabileceğime her zaman gönülden inanarak beni yüreklendiren ve bu günlere gelmemi sağlayan çok değerli hocam ve tez danışmanım sayın Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY' a,

Tüm tez çalışmalarım boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile desteğini hiçbir zaman esirgemedi; hep yanımda olduğunu hissettiren çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ' e,

Tüm tez çalışmalarım boyunca bilgi, deneyimleri ve sonsuz anlayışı ile yanımda olan çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Güven URAZ'a,

Yüksek lisans ve doktora öğrenim hayatım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR' e,

Bilgi ve tecrübelerinin yanında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Okan BİLKAY' a, analizlerimin gerçekleştirilmesi ve yorumlanması sürecine çok büyük katkı sağlayan sayın Volkan KARCI' ya,

Tüm tez çalışmalarım boyunca sonsuz özveriyle çalışan çok değerli özel çalışma öğrencilerim Merve DİZEMEN' e, Selin YİĞİT' e ve Özgür ÖZDEMİREL' e,

Şevkatiyle her daim sarıp sarmalayan ve desteği ile beni hep ayağa kaldıran Dr. Neslihan İDİL' e, manevi desteği ile her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan Dr. Hande AVCIOĞLUN' a, desteklerini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşlarım Dr. Gülcan ŞAHAL' a, Dr. Doruk ARACAGÖK' e, Kübra ERKAN TÜRKMEN' e ve Hasan AKYIL' a, hayatımın en zor günlerinde beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan dostuma, okuldaki aileme, Sinem DİKEN GÜR' e,

Yolumu her daim aydınlatan ışığım annem Nilgün BİLEN' e, en büyük dayanağım, yıkılmaz çınarım babam Kadir Bülent BİLEN' e, ailemden kalan en büyük mirasım, kıymetlim, ablam Ahsen TUĞRUL' a, can kardeşim Yusuf TURHAN' a,

Varlığıyla varlığima güç katarak hayatımın her anında beni sonsuz şevkat ve sevgisiyle ayakta tutan, sırdaşım, hayat arkadaşım, canım eşim Yasin ÖZYÜREK' e,

Hayatımın en soğuk kış günlerinde kalbimde açan çiçeğim, kardelenim, oğlum, Sarp Yiğit ÖZYÜREK' e

Sonsuz TEŞEKKÜRLER' imi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Petrol.....	4
2.2. Petrolün Temel Bileşimi.....	4
2.2.1. Petrolün Element Bileşimi.....	4
2.2.2. Petrolün Kimyasal Bileşimi.....	4
2.2.3. Petrolün Fiziksel Bileşimi.....	8
2.2.3.1. Yoğunluk ve Özgül Ağırlık.....	8
2.2.3.2. Viskozite (Akmazlık).....	9
2.2.3.3. Uçuculuk.....	9
2.3. Sondaj Çamuru.....	10
2.4. Çamur Çukuru.....	11
2.5. Petrol Kirliliğinin Çevreye Etkisi.....	12
2.6. Petrol Kirliliğinin Çevreden Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler.....	13
2.6.1. Fiziksel Yöntemler.....	13
2.6.1.1. Yakma.....	13
2.6.1.2. Yıkama.....	14
2.6.1.3. Petrol Bariyerleri.....	14

2.6.1.4. Sorbent Malzemeler.....	14
2.6.1.5. Petrol Sıyırıcılar.....	15
2.6.2. Kimyasal Yöntemler.....	15
2.6.3. Biyolojik Yöntemler.....	16
2.6.3.1. Ex-Situ (Doğal Yeri Dışında) Temizleme Yöntemi.....	16
2.6.3.2. In-Situ (Yerinde) Temizleme Yöntemi.....	17
2.7. Biyoremediasyon.....	19
2.7.1. Biyoremediasyonun Avantajları ve Dezavantajları.....	19
2.8. Mikrobiyal Yıkım (Biyodegradasyon).....	21
2.8.1. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Fiziksel Faktörler.....	22
2.8.1.1. Sıcaklık.....	22
2.8.1.2. Oksijen.....	22
2.8.1.3. pH.....	23
2.8.1.4. Basınç.....	23
2.8.1.5. Petrolün Yapısı ve hidrokarbon Bileşimi.....	23
2.8.1.6. Besin ve Tuz.....	24
2.8.2. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Biyolojik Faktörler.....	24
2.9. Biosürefektanlar.....	26
2.9.1. Biosürefektanların Avantajları.....	27
2.10. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	28
2.10.1. <i>Bacillus axarquiensis</i>	28
2.10.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Çalışmada Kullanılacak Numunelerin Toplanması.....	30
3.2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Saklanması.....	30
3.3. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları.....	30
3.3.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim.....	30

3.3.2. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	30
3.3.3. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların Tanımlanması.....	31
3.3.4. Petrol Biyoyıkımında Kullanılacak Mikroorganizmaların Hazırlanması.....	31
3.3.5. Petrol İçeren Besiyerine Ekim ve Üretim.....	31
3.3.6. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi.....	32
3.4. Petrol Biyoyıkımının Ölçülmesi.....	32
3.4.1. Petrol Biyoyıkımının Kolorimetrik Yöntem ile Ölçülmesi.....	32
3.4.2. Petrol Biyoyıkımının Spektrofotometrik Yöntem ile Ölçülmesi.....	32
3.4.3. Petrol Biyoyıkımının Gravimetrik Yöntem ile Ölçülmesi.....	33
3.5. Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi.....	34
3.6. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizmaların Seçilmesi.....	34
3.7. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Uygun Fiziolojik Koşulların Araştırılması.....	35
3.7.1. Uygun Başlangıç pH Değerinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	35
3.7.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	35
3.7.3. Petrolün Farklı Konsantrasyonlarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	35
3.7.4. Kültürlerin Farklı Konsantrasyonlarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	36
3.7.5. Uygun Sıcaklık Değerinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	36
3.7.6. İnkübasyon Süresinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	36
3.8. Farklı Petrol Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Biyoyıkımlarının Araştırılması.....	37
3.9. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Sürfektan Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	37
3.10. Biyosürfektan Üretiminin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Araştırılması.....	37

3.11. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	38
3.12. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Azot Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	38
3.13. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> Karışık Kültürünün Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	38
3.14. Ham Petrol, Çamur Çukuru ve Sondaj Çukuru Numunelerinden İzole Edilen Mikroorganizmalara Ait Karışık Kültürlerin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	39
3.15. Toprak ve Deniz Suyu Ortamlarında <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması.....	39
3.16. Gaz Kromatografisi (GC) ile Detaylı Hidrokarbon Analizi.....	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması.....	42
4.2. Petrol Biyoyıkımı için Uygun Mikroorganizmaların Belirlenmesi.....	45
4.3. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması.....	51
4.3.1. Uygun Başlangıç pH Değerinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	51
4.3.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	54
4.3.3. Petrolün Farklı Konsantrasyonlarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	56
4.3.4. Kültürlerin Farklı Konsantrasyonlarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	58
4.3.5. Uygun Sıcaklık Değerinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	60
4.3.6. İnkübasyon Süresinin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	63
4.4. Farklı Petrol Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Biyoyıkımlarının Araştırılması.....	64
4.5. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Sürfektan Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	66
4.6. Biosürfektan Üretiminin <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Araştırılması.....	69

4.7.	Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	72
4.8.	Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Azot Kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	74
4.9.	<i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> Karışık Kültürünün Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	77
4.10.	Ham Petrol, Çamur Çukuru ve Sondaj Çukuru Numunelerine Ait Karışık Kültürlerin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	78
4.11.	Toprak ve Deniz Suyu Ortamlarında <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması.....	81
4.12.	Gaz Kromatografisi ile Detaylı Hidrokarbon Analizi.....	83
5.	YORUM.....	86
	KAYNAKLAR.....	91
	ÖZGEÇMİŞ.....	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hidrokarbonların sınıflandırılması.....	5
Çizelge.2.2. Öncelikli kirletici olarak değerlendirilen polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri.....	8
Çizelge 4.1. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan mikroorganizmalar.....	44
Çizelge 4.2. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların petrol içeren ortamdaki üreme yoğunlukları.....	46
Çizelge 4.3. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların kolorimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımı.....	47
Çizelge 4.4. Deniz suyu ortamında <i>K. pneumoniae</i> , <i>B. axarquiensis</i> ve türlere ait karışık kültürün üreme yoğunlukları	82
Çizelge 4.5. Gaz kromatografisi analizi ile petrol biyoyıkımının detaylı hidrokarbon sonucu.	84
Çizelge 4.6. Gaz kromatografisi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ile petrol biyoyıkım oranları.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Metanın Yapısı.....	6
Şekil 2.2. Siklobütanın Yapısı.....	6
Şekil 2.3. Alkenlerin yapısı.....	6
Şekil 2.4. Benzenin yapısı.....	7
Şekil 2.5. Naftalenin temel yapısı.....	7
Şekil 2.6. Krizenin temel yapısı.....	7
Şekil 2.7. Sondaj çamuru.....	11
Şekil 2.8. Çamur çukuru.....	11
Şekil 2.9. Toprak ve denizde petrol kirliliği.....	12
Şekil 2.10. Petrol yakma.....	13
Şekil 2.11. Petrol bariyerleri.....	14
Şekil 2.12. Sürfektanların petrol ile etkileşim mekanizması.....	16
Şekil 2.13. Genel biyosürfektan yapısı.....	26
Şekil 2.14. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Şekil 3.1. DCPIP Redoks İndikatörü.....	33
Şekil 3.2. İnkübasyon sonunda üremeleri uzaklaştırılmış kültürlerin DCM ile ekstraksiyonu..	34
Şekil 4.1. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel suşlara ait filogenetik analizi.....	44
Şekil 4.2. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel suşların spektrofotometrik yöntem ile petrol biyoyıkımları.....	49
Şekil 4.3. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların gravimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımı.....	49
Şekil 4.4. Farklı başlangıç pH değerlerinin <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkım ve üreme.....	53
Şekil 4.5. Farklı başlangıç pH değerlerinin <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımına ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	53

Şekil 4.6. Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	55
Şekil 4.7. Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	55
Şekil 4.8. Petrol konsantrasyonunun <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	57
Şekil 4.9. Petrol konsantrasyonunun <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	57
Şekil 4.10. <i>K. pneumoniae</i> 'ye ait 7 günlük inkübasyon sonucu.....	59
Şekil 4.11. Kültür konsantrasyonunun <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	59
Şekil 4.12. Kültür konsantrasyonunun <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	60
Şekil 4.13. 25 °C' de 7 günlük inkübasyon sonunda <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı...61	
Şekil 4.14. Farklı inkübasyon sıcaklık değerlerinin <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	62
Şekil 4.15. Farklı inkübasyon sıcaklık değerlerinin <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	62
Şekil 4.16. Farklı inkübasyon süresinin <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	63
Şekil 4.17. Farklı inkübasyon süresinin değerlerinin <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	64
Şekil 4.18. Farklı petrol numuneleri.....	65
Şekil 4.19. Farklı petrol kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> ile biyoyıkımı...66	
Şekil 4.20. Farklı sürfektan kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	68
Şekil 4.21. Farklı sürfektan kaynaklarının <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	68
Şekil 4.22. Daralma-Yayıma yöntemi ile biyosürfektan varlığının belirlenmesi.....	70
Şekil 4.23. Petrol yayılma yöntemi ile biyosürfektan varlığının belirlenmesi.....	71

Şekil 4.24. Farklı karbon kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	73
Şekil 4.25. Farklı karbon kaynaklarının <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	74
Şekil 4.26. Farklı azot kaynaklarının <i>K. pneumoniae</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	75
Şekil 4.27. Farklı azot kaynaklarının <i>B. axarquiensis</i> ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi.....	76
Şekil 4.28. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>B. axarquiensis</i> türleri ve <i>K. pneumoniae</i> - <i>B. axarquiensis</i> karışık kültürü ile petrol biyoyıkımı.....	78
Şekil 4.29. Ham Petrol, Çamur Çukuru ve Sondaj Çukuru Numunelerinden İzole Edilen Mikroorganizmaların Karışık Kültürlerinin Petrol Biyoyıkımı ve Üremeye Etkisi.....	79
Şekil 4.30. Toprak ortamlarında <i>K. pneumoniae</i> , <i>B. axarquiensis</i> ve türlerin karışık kültürleri ile petrol biyoyıkımının araştırılması	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°F	Fahrenayt Derece
°C	Santigrat Derece
ppm	Milyonda Bir
ppb	Milyarda Bir
mm	Milimetre
cm	Santimetre
mg	Miligram
O ₂	Oksijen
CO ₂	Karbon Dioksit
H ₂ O	Su
C	Karbon
He	Helyum
N	Azot
P	Fosfor
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyumdihidrojen Fosfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
NH ₄ NO ₃	Amonyum Nitrat
FeCl ₃	Demir Klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat

NaNO₃

Sodyum Nitrat

KNO₃

Potasyum Nitrat

(NH₄)₄HPO₄

Amonyum Hidrojen Fosfat

NH₄H₂PO₄

Amonyum Dihidrojen Fosfat

Kısaltmalar

PAH:

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

API:

Amerikan Petrol Enstitüsü

(American Petroleum Institute)

MEOR:

Mikroorganizmalar Aracılığıyla

Geliştirilmiş Petrol İyileştirmeleri

(Microbial Enhanced Oil Recovery)

OD:

Optik Dansite

BTEX:

Benzen, Toluen, Etilen, Ksilen

BHI:

Beyin Kalp İnfüzyonu

(Brain Heart Infusion)

EMB:

Eozin Metilen Mavisi

(Eosin Methylene Blue)

RNA:

Ribonükleik Asit

DCPIP:

2,6-diklorofenol İndofenol

rpm:

Rotation Per Minute

v/v:

Hacim/Hacim

cfu:

Koloni Oluşturan Birim

Kp:

Klebsiella pneumoniae

Ba:

Bacillus axarquiensis

Kp+Ba:

Klebsiella pneumoniae ve *Bacillus axarquiensis*' in Karışık Kültürü

GC:

Gaz Kromatografisi

ATCC:

Amerika Tipi Kùltür Koleksiyonu
(American Type Culture Collection)

SÇ:

Sondaj Çamuru

ÇÇ:

Çamur Çukuru

P:

Petrol



1. GİRİŞ

Petrol, yer altında tortul kayalar içinde doğal olarak meydana gelen, rengi kahverengiden siyaha değişebilen yanıcı özellikteki sıvı maddedir. Petrol temel olarak farklı oranlardaki karbon ve hidrojen atomlarının yanında; azot, sülfür ve oksijen ile % 1' den (v/v) daha az oranda fosfor ile çeşitli ağır metallere oluşmuş heterojen sıvı olarak bilinmektedir [1, 2, 3]. Petrol, topraktaki tarımsal verimliliğin düşüşünün yanında yer altı sularında neden olduğu organik kirlenme ile ekonomik kayıplar oluşturmaktadır [4]. Petrol ve doğal gaz boru hatları ve petrol kuyularında meydana gelen sızıntılar, petrol atıklarının ortadan kaldırılmasında uygulanan yanlış yöntemler ile çeşitli insan faaliyetleri ve kaza sonucunda oluşan petrol dökülmeleri gibi farklı şekillerde oluşmuş petrol kirlilikleri söz konusudur [5]. Bunlara ilave olarak; petrolün üretimi, sondaj operasyonları ve uygunsuz şekilde bırakılmış petrol kuyuları da toprak, yüzey ve yeraltı sularındaki petrol kontaminasyonlarının en önemli kaynaklarıdır [6].

Petrol kirliliğinin çevreden uzaklaştırılmasında kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanında biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) en çok tercih edilen yöntemlerin başında yer almaktadır. Biyoremediasyon; petrol gibi toksik organik kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından CO₂, H₂O ve inorganik bileşikler gibi zararsız ürünlere dönüştürüldüğü, çevre ile dost ve düşük maliyetli bir süreçtir. Petrol ile kontamine alanların yaklaşık % 25'i doğal remediasyon yöntemleri ile temizlenmektedir [7]. Petrol kirliliğinin giderilmesinde biyolojik arttırma (biyoaugmentasyon) ve biyolojik stimülasyon (biyostimülasyon) olmak üzere iki temel yaklaşım bulunmaktadır [8]. Bu bağlamda, petrol kirleticilerinin çevreden uzaklaştırılmasında çeşitli mikroorganizmalar önemli rol oynamaktadır. *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Moraxella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, ve *Proteus sp.* en sık karşılaşılan Gram negatif; *Bacillus sp.*, *Moraxella sp.* ve *Actinomycesler* en sık karşılaşılan Gram pozitif bakteriler arasında yer almaktadır [9, 10]. Mikroorganizmaların petrol hidrokarbonlarına karşı olan biyoyıkım etkinlikleri farklılık göstermekle birlikte biyoyıkım spesifik enzim sistemleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bunun yanında, mikrobiyal hücrelerin substratlara tutuklanması ve biyosüperfektan üretimi petrol biyoyıkımını arttıran diğer mekanizmalar arasında yer almaktadır [8]. Biyoremediasyonu hedef alan biyoyıkım sürecinde uygun mikroorganizmanın ve yöntemin seçilmesi ile beraber

koşulların optimize edilmesi, biyoyıkım sürecinin gelişmesi ve biyoyıkım oranının artırılması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır [11, 12].

Bu çalışmada, aynı petrol sahasına ait ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamuru gibi üç farklı numuneden farklı bakteriyel türlerin izole edilerek tanımlanması ve söz konusu bu bakteriyel suşların petrol biyoyıkımında kullanılması amaçlandı. Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukuru gibi ortamlardan izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması, biyolojik iyileştirme çalışmaları ve petrol endüstrisine katkı sağlaması açısından önemlidir. Söz konusu suşların petrol biyoyıkımları kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemler ile incelendi. *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus axarquiensis* suşlarının petrol biyoyıkımları gaz kromatografisi (GC) analizi ile desteklenerek söz konusu suşların petrol biyoyıkımını en etkin şekilde gerçekleştiren bakteriyel türler olduğu belirlendi. Çalışmamızın devamında kullanılmak üzere seçilen iki farklı tür (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Bacillus axarquiensis* NR104919) ile en uygun fizyolojik koşullar araştırılarak, petrol biyoyıkımının artırılması amaçlandı. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanında mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliği farklı olan çeşitli petrol kaynaklarının biyoyıkımı *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ile araştırıldı. Farklı sürfektan kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının petrol biyoyıkımı üzerine etkileri belirlendi. Petrol biyoyıkımında biyosürfektanların Triton X:100, Tween-80 ve Tween-20 gibi sürfektanlara göre daha etkili olması nedeniyle, söz konusu türler ile biyosürfektan üretimi araştırıldı. Petrol biyoyıkımında karbon azot dengesinin önemli olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda üretim ortamına ilave edilen farklı karbon ve azot kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerine etkileri incelenerek petrol biyoyıkımında artışa neden olan karbon ve azot kaynakları saptandı. Petrol biyoyıkımında karışık kültürün avantajlı olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, petrol biyoyıkımında etkin olan *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının karışık kültürü ile ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurundan izole edilen mikroorganizmaların karışık kültürlerinin petrol biyoyıkım oranları belirlendi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ve suşların karışık kültürlerinin petrol ile kontamine olmuş toprak ve deniz suyu ortamlarındaki petrol biyoyıkımları incelenerek, çalışmamız in-situ biyoremediasyon sürecinde kullanılabilirliği açısından da değerlendirildi. Çalışmamızın son aşamasında *Klebsiella pneumoniae*' nin petrol biyoyıkım sonucu gaz kromatografisi ile gerçekleştirilen detaylı hidrokarbon analizi ile desteklendi.

Çalışmamızda; özellikle petrol sahasında bulunan ham petrol ve sondaj çamuru numunelerinde bulunan mikroorganizmaların izole edilmesi ve tanımlanması biyoremediasyon açısından oldukça önemlidir. Bunun yanında, petrol ve doğal gaz endüstrisi açısından bakıldığında, yüksek maliyete sahip sondaj çamuru ile önemli bir enerji kaynağı olan petrolün mikroorganizmalar tarafından biyoyıkıma uğratılabilmesi büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda da petrol sahasından izole edilen suşların tanımlanması petrol endüstrisi açısından oldukça önemlidir. Tanımlanan tüm mikroorganizmalara karşı uygun bakterisidal ajanların geliştirilmesi ve kullanılması, söz konusu ekonomik kayıpların önüne geçecektir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, petrol biyoyıkımında kullanılmasını önerdiğimiz *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları, petrol biyoyıkımını amaçlayan biyoremediasyon çalışmalarına; tanımlanan tüm suşlar ise enerji sektörünün yanında farklı çevre biyoteknolojisi araştırmalarına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1.Petrol

Petrol, latince taş anlamına gelen 'petra' ile yağ anlamına gelen 'oleum' kelimelerinden oluşmuştur. Doğal olarak yer altında bulunan petrol, çeşitli hidrokarbonların bileşiminden meydana gelmiştir. Yoğun, yanıcı özellikte ve genellikle koyu renkte olan petrol doğal veya rafineri yakıt ürünü olarak kullanılmaktadır [13]. Fosil yakıtların arasında yer alan petrol en önemli enerji kaynağı olmasının yanında, küresel çevre kirleticilerinin de başında yer almaktadır. Petrol hidrokarbonlarının sahip olduğu çeşitli toksik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle ciddi oranda ekolojik sorunlara yol açmaktadır [14]. Petrol, genellikle fiziksel özellikleri (yoğunluk, akma noktası) ve kimyasal bileşimi (yüzdesel hidrokarbon miktarı ve sülfür miktarı) ile tanımlanmaktadır.

2.2. Petrolün Temel Bileşimi

Petrol hidrokarbonları; karbon ve hidrojen bileşiklerinin yanında nitrojen, oksijen, sülfür ve metal bileşiklerinin karışımı olarak tanımlanır. Petrolün temel bileşimi; element, kimyasal ve fiziksel bileşimleri olarak üç ana başlık altında incelenebilir.

2.2.1. Element Bileşimi

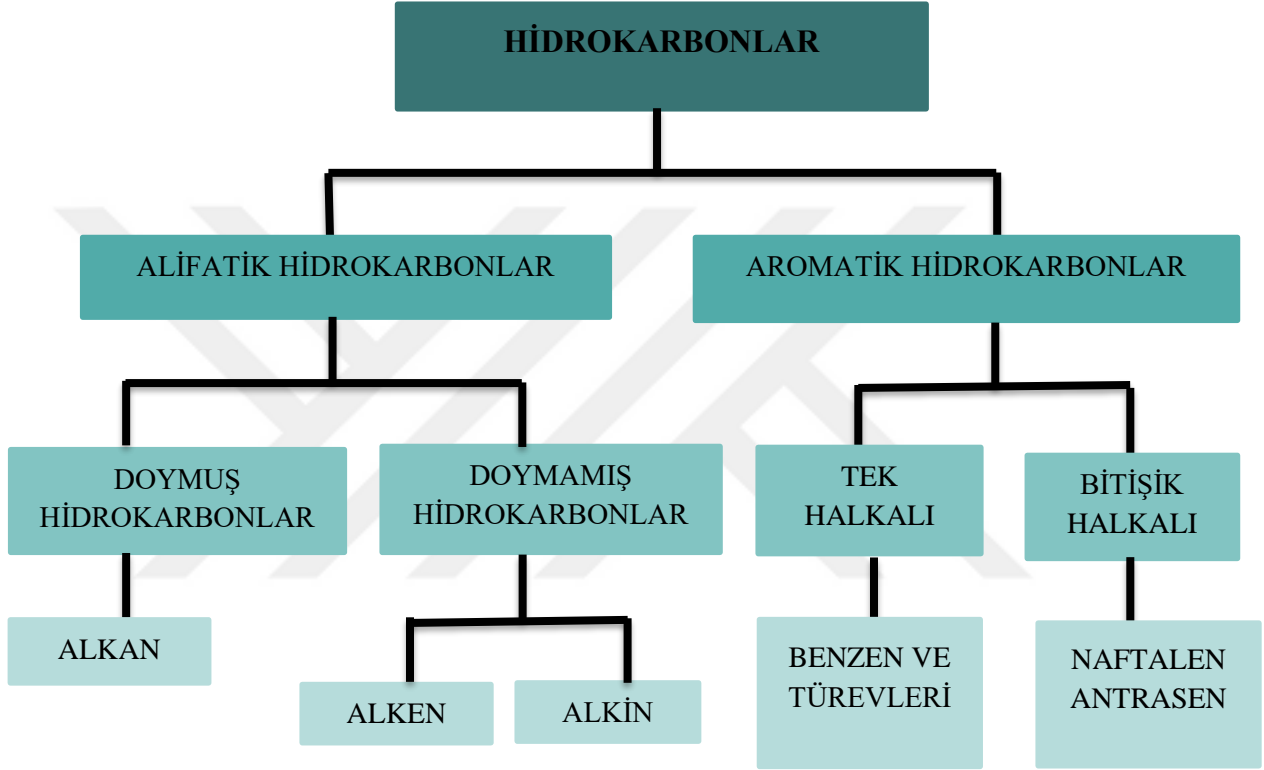
Petrolün element bileşimi petrolün kaynağına göre büyük farklılıklar göstermesine karşın; temel olarak petrolün % 75'inden fazlasını hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Petrol; % 82 – % 87 karbon, % 11 - % 15 hidrojen, % 0 - % 8 sülfür, % 0 - % 1 nitrojen ve % 0 - % 0,5 oksijen olmak üzere temel olarak 5 ana elementi içermektedir. Çeşitli elementlerin karbon atomuna olan oranı (H/C, N/C, O/C ve S/C) hammaddenin (petrol) genel karakterinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir [15].

2.2.2. Kimyasal Bileşimi

Hidrokarbonlar temel olarak alifatik ve aromatik hidrokarbonlar olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir (Çizelge 2.1.) Hidrokarbonların yalnızca karbon ve hidrojen atomlarından oluştuğu bilinmekle beraber, petrol çeşitlerine göre hidrokarbon miktarı da farklı olabilir. Aynı zamanda hidrokarbon bileşimi kimyasal yapı ve moleküler ağırlık açısından önemli

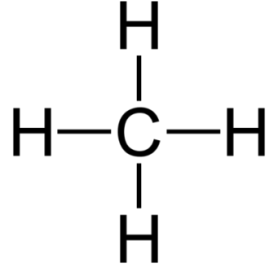
varyasyonlar gösterebilir. Böylece, petrolün kaynak ve karakterine göre değişiklik gösteren petrol bileşenleri beş ana grupta incelenebilir (Çizelge 2.1) [15].

Çizelge 2.1. Hidrokarbonların sınıflandırılması [16].

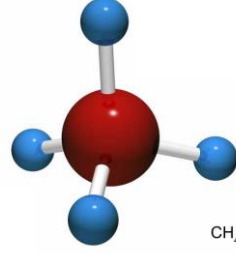


a. Alkanlar (Parafin, n-parafin): Karbon ve hidrojen elementlerinin tekli bağ yaptığı doğrusal (dallanmamış) veya doğrusal olmayan (dallanmış) yapıdaki organik bileşiklerdir. Alkanlarda tüm atomların tekli bağ ile birbirlerine bağlandıkları ve karbon atomunun bağlayabileceği en fazla sayıdaki hidrojen atomuyla bağlaması ile doymuş hidrokarbonlar grubunda yer almaktadır. Alkanların genel formülü C_nH_{2n+2} şeklindedir (Şekil 2.1)[15, 17].

b. Sikloalkanlar (Sikloparafinler, Naftenler): Karbon atomları arasında bir ya da daha fazla sayıda kapalı halka varlığı ile karakterize edilmektedir. Sikloalkanların genel formülü $C_nH_{2(n+1-g)}$ şeklindedir. Formüldeki "n" harfi karbon atomunun sayısı, "g" harfi bileşikteki halka sayısını göstermektedir (Şekil 2.2) [15, 17].



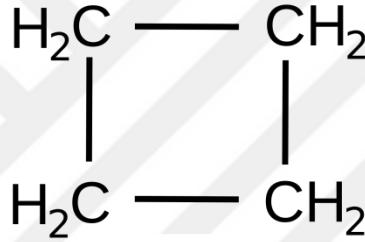
(a)



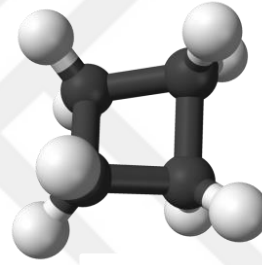
(b)

Şekil 2.1. Metanın Yapısı

(a) Temel yapısı (b) Üç boyutlu yapısı [18]



(a)

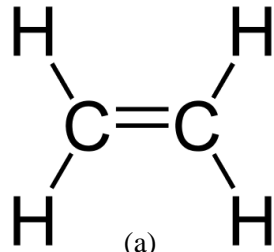


(b)

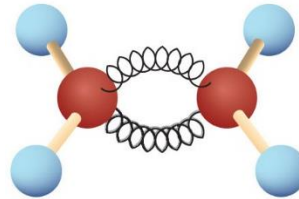
Şekil 2.2. Siklobütanın Yapısı

(a) Temel yapısı [19] (b) Üç boyutlu yapısı [20].

c. Alkenler (Olefinler): Doğrusal (dallanmamış) veya doğrusal olmayan (dallanmış) yapıdaki karbon atom zincirlerindeki karbon atomları arasında çift bağ içermeleri ile karakterize edilirler. Doymamış alkan analogları olan alkenler petrol içeriğinde nadir olarak bulunsa da, bazen rafineri petrol ürünü olarak karşımıza çıkarlar (Şekil 2.3) [1].



(a)

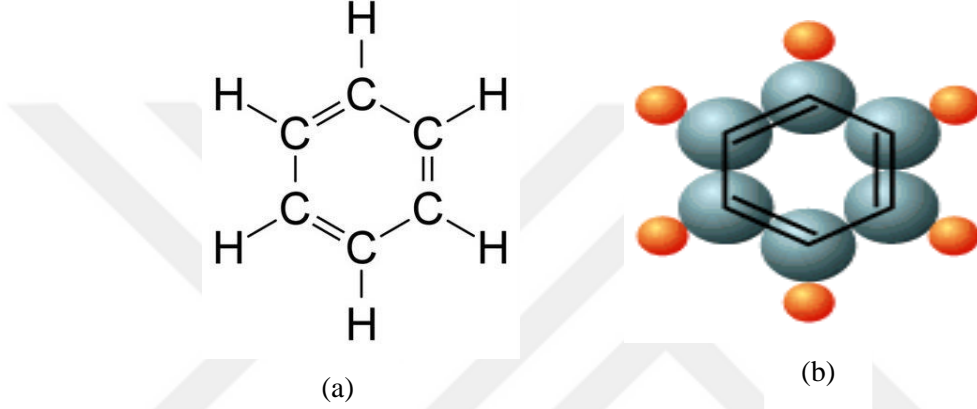


(b)

Şekil 2.3. Alkenlerin yapısı

(a) Temel yapısı (b) Üç boyutlu yapısı [16]

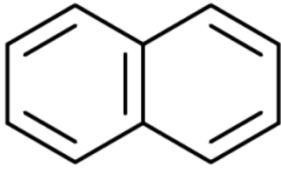
d. Tek Halkalı Aromatikler: Aromatik hidrokarbonlar fiziksel açıdan diğer hidrokarbonlara benzemekle beraber büyük çoğunlukla petrol ve kömürden elde edilmektedirler. Aromatik hidrokarbonlar, karbon atomları arasında tekli ya da çift bağ ile bağlı halkasal yapıdaki hidrokarbonlardır. Altı karbon atomundan oluşan tek bir aromatik halka içermeleri ile karakteristik bir yapıya sahiptirler. Benzen, altı karbon atomundan oluşan en basit yapıdaki tek halkalı aromatik hidrokarbondur (Şekil 2.4) [15, 17].



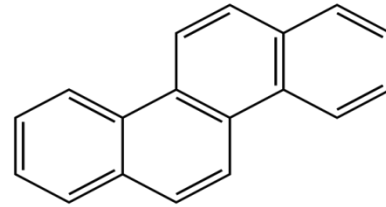
Şekil 2.4. Benzenin yapısı

(a) Temel yapısı (b) 3 boyutlu yapısı [16]

e. Bitişik Halkalı Aromatikler: Petrol ve petrol türevleri olan polisiklik (çok halkalı) aromatik hidrokarbonlar (PAH), petrol dökülmesi ve fosil yakıtlarının tamamen yanmaması sonucu çevreye atılan, toksik, mutajenik ve karsinojenik organik kirleticilerdir [21]. İki ya da daha fazla benzen halkasına sahip hidrofobik karakterli organik bileşiklerdir [22, 23]. PAH' ların, hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlükleri oldukça azken, yüksek oranda lipofilik özelliğe sahiptirler. Yapısında dörtten az benzen halkası bulunduran PAH' lar düşük molekül ağırlıklı PAH, dört ve daha fazla benzen halkası bulunduran PAH' lar ise yüksek molekül ağırlıklı PAH olarak tanımlanır (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Çizelge 2.2) [24].



Şekil 2.5. Naftalenin temel yapısı [16]



Şekil 2.6. Krizenin temel yapısı [25]

Çizelge 2.2. Öncelikli kirletici olarak değerlendirilen polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri [26].

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)
Benzo[a]piren (BaP)	Dibenz[a,h]antrasen (DahA)
İndeno[1,2,3-cd]piren(IcdP)	Benzo[g,h,i]perilen (BghiPy)
Floranten (Flu)	Asenaftelen (Anp)

2.2.3. Fiziksel Bileşimi

Petrolün kimyasal özelliklerinin yanında fiziksel özelliklerinin de bilinmesi gerekmektedir. Petrol, genellikle fiziksel özellikleri (yoğunluk, akma noktası) ve kimyasal bileşimi (yüzdesel hidrokarbon miktarı, asfalt içeriği ve sülfür miktarı) ile tanımlanmaktadır. Bunun yanında; petrolün alevlenme noktası, yoğunluğu, viskozitesi, su içinde emülsiyon oluşturması ve toprağa karışımı gibi özellikleri de petrolün karakterizasyonu açısından oldukça önem taşır. Genellikle petrol ürünlerinin kaynama noktalarının $0\text{ }^{\circ}\text{C} - 565\text{ }^{\circ}\text{C}$; yoğunluklarının $0,6 - 1,3\text{ gr/cm}^3$; akma noktalarının $< 0\text{ }^{\circ}\text{C} - > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında değişim gösterdikleri bilinmektedir. Her ne kadar bu özellikler, petrol biyoremediasyonu açısından diğer parametreler ile karşılaştırıldığında daha az önemli gibi gözükse de; petrol ve petrol ürünlerinin buharlaşma oranı, su üzerinde yüzmeye yetenekleri, çeşitli sıcaklıklardaki akışkanlıkları ve hareket yeteneklerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir [17].

2.2.3.1. Yoğunluk ve Özgül Ağırlık

Yoğunluk bir maddenin belirli bir sıcaklıkta birim hacimdeki kütlesidir ve gr/cm^3 birimiyle tanımlanır. Petrolün yoğunluğu, $60\text{ }^{\circ}\text{F}$ ($15,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) sıcaklık ve 1 atmosfer basınç altındaki yoğunluğu olarak ifade edilmektedir. Ham petrolün yoğunluğu, petrolün kimyasal bileşiminden etkilenmektedir [27]. Özgül ağırlık; bir maddenin kütlesinin aynı birim

hacimdeki suyun kütlesine olan oranıdır. Yoğunluk ve özgül ağırlık kavramları petrol endüstrisinde oldukça büyük öneme sahiptir. Aynı zamanda yoğunluk, ham petrolün veya petrol ürünlerinin suyun yüzeyindeki davranışını dolayısıyla 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.

$$\text{API Yoğunluğu} = \frac{141,5}{60^{\circ}\text{F Özgül Ağırlık}} - 131,5$$

Petrolün özgül ağırlığı hafif ve ağır petrol için 0,8 (45,3 API); zift ve katran için 1 (10 API) civarında değişiklik göstermektedir. Petrolün yoğunluğu, özgül ağırlığı ve API yoğunluğu hidrometre ve pikometre kullanılarak ölçülebilir [15, 17].

2.2.3.2. Viskozite (Akmazlık)

Viskozite bir akışkanın üzerine uygulanan yüzey gerilimine karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. Viskozitesi yüksek olan sıvılar ağırlıklı olarak ifade edilir. Petrolün viskozitesi sıcaklık ve basınca bağlı olarak çok geniş bir aralıkta değişkenlik göstermektedir [17]. Sıvı formda bulunan tüm petrol fraksiyonları için önemli bir özellik olan viskozite, API gravitesinin azalmasıyla beraber artmaktadır. Viskozite, petrol için önemli bir fiziksel özellik olmasının yanında petrolün diğer fiziksel özelliklerinin belirlenmesine de katkı sağlamakta ve petrolün bileşimi ve niteliği hakkında bilgi vermektedir [28, 29].

2.2.3.3. Uçuculuk

Uçuculuk; bir sıvının veya sıvılaştırılmış gazın, sıvı halden gaz hale geçme eğilimi yani buharlaşma yatkınlığı olarak tanımlanmaktadır. Petrol ve petrol ürünlerinin buharlaşma yatkınlıkları, sıvı petrol yakıtlarının sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG), benzin, motorin, uçak yakıtı, fuel oil, kerosen, dizel yakıt) karakterizasyonuna göre değişkenlik göstermektedir [17]. Uçuculuk, kaynama noktası ve yoğunluk gibi fiziksel özellikler ile ilişkilidir. Daha düşük kaynama noktasına sahip olan hafif bileşiklerin uçuculuk özelliğinin yüksek olduğu

bilinmektedir. Örneğin propanın (C₃) kaynama noktası bütana (C₄) oranla daha düşük olması nedeniyle uçuculuğu daha yüksektir. Bu durumda propan uçuculuğu daha yüksek olan hafif bir bileşik olarak adlandırılırken bütan ağır bir bileşiktir. Uçuculuğu yüksek bileşiklerin ağır bileşiklere göre yanıcılığı daha yüksektir [29, 30].

2.3. Sondaj Çamuru

Petrol sahalarında, petrolün araştırılması ve uygun yöntemlerle çıkarılması sırasında sondaj çamurunun kullanıldığı geleneksel yöntemlerden yararlanılmaktadır. Sondaj çamuru; su bazlı, petrol bazlı, sentetik bazlı ve hava bazlı olmak üzere baz sınıflarına göre isimlendirilir. Su bazlı sondaj çamuruna ait sıvı fazda su bulunurken; petrol ve sentetik bazlı sondaj çamurlarına ait sıvı fazda ise kimyasal yapıda çeşitlilik gösteren çeşitli hidrokarbonlar bulunmaktadır. Petrolün sondajı sırasında sondaj matkabının soğutulması ve kayganlaştırılması, kuyudaki basınçla beraber kuyu da olası bir patlamanın engellenmesi ve sondaj kuyusunda tıkanmaya yol açabilecek çeşitli kesintilerin yüzeye getirilmesi amacıyla kullanılan sondaj çamuru, yüksek karbon içeriği ile mikrobiyal kontaminasyonun en önemli kaynaklarından. Mikroorganizmalar tarafından gerçekleşen petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı çevre kirliliğinin giderilmesi açısından oldukça önemli olmasına rağmen; petrol ve doğal gaz kuyularında kullanılan sondaj çamurunun mikroorganizmalar tarafından metabolize edilerek bozulması petrol endüstrisi açısından çok ciddi maliyet sorunları oluşturmaktadır. Sondaj çamuru; mikroorganizmalar tarafından karbon ve sülfat kaynağı olarak kullanılan barit, selüloz, lignosülfonat içeren önceden paketlenmiş toz halindeki karışımlar ile hazırlanmaktadır. Organik polimer bazlı bu çamurların diğer çamur tiplerine göre daha etkili, çevreye daha az toksik ve çevre dostu oldukları gösterilmiştir. Organik bileşikler içeren polimer bazlı sondaj çamuru bazı bakteri ve fungus grupları tarafından metabolize edilebilmektedir. Sondaj çamurunun mikroorganizmalar ile kontamine olması ve söz konusu çamurun mikrobiyal biyoyıkım etkinliği; sondaj çamurunun kimyasal yapısının yanında sıcaklık, pH gibi çevresel parametrelere de bağlıdır (Şekil 2.7) [31, 32, 33].



Şekil 2.7. Sondaj çamuru [34].

2.4. Çamur Çukuru

Sondaj çamuru, genel olarak petrol ve doğalgaz arama ve geliştirme kuyularında kullanılmaktadır. Sondaj süresince sondaj çamuru kuyu içerisinde devamlı olarak sirküle edilmekte ve bu süreçte bazı özellikleri değişim göstermektedir. Değişen bu özelliklerin istenilen seviyelere ulaşmasını sağlamak amacıyla sondaj çamuru düzenli olarak kontrol edilmekte ve gerekli müdahaleler yapılmaktadır. Sondaj çamuruna ait özellikler istenilen seviyeden çok uzaklaştığında veya özelliklerin hedeflenen seviyeye geri getirilmesi için gereken maliyet ekonomik sınırların dışına çıktığında, sondaj çamuru atık duruma gelmiş olur. Bu aşamadan sonra sondaj çamuru geçici olarak atık çamur çukurunda depolanır. Çamur çukurunda depolanan sondaj çamuru daha sonra atık arıtım tesislerine gönderilir. Petrol ve doğalgaz sondajı sırasında hazırlanan atık çamur çukuru, atık sondaj çamurunun dışında çeşitli makine yağları gibi farklı atıkları da içerebilir. Hazırlanan çamur çukurunun hacmi, sondaj yapılacak kuyunun derinliği ve sondaj süresinin uzunluğuna göre değişim göstermekle beraber ortalama bir çamur çukurunun hacminin 1000 m³ olduğu bilinmektedir (Şekil 2.8) [35].



Şekil 2.8. Çamur çukuru [36]

2.5. Petrol Kirliliğinin Çevreye Etkisi

Günümüzde petrol ve petrol ürünlerinin neden olduğu toprak kontaminasyonu tüm dünyayı ilgilendiren en önemli sorunların başında yer almaktadır [4]. Petrolün üretilmesi, işlenmesi, taşınması ve kullanımı farklı seviyelerde çevre kirliliğine neden olmaktadır. Petrol üretimi sırasında karadan üretim sürecinde olduğu kadar denizden üretim sırasında da sızıntılar ve petrol platformlarında meydana gelen çeşitli kazalar ile toprak kirliliği kadar deniz kirliliği de önemli olmaktadır (Şekil 2.9) [37]. 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 canlılardaki 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 canlılarında ppb düzeyine ulaştığı gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda, 10-30 ppb düzeyindeki petrol düzeyinin fitoplanktonlarda fotosentezi uyardığı ancak 60-200 ppb ve daha yüksek petrol oranlarının fotosentezi yavaşlattığı gösterilmiştir [38]. Petrol hidrokarbonlarının mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insan sağlığı üzerinde toksik etki gösterdiği kabul edilmiştir [4]. Petrol hidrokarbonlarının neden olduğu kontaminasyonlar çeşitli canlılar üzerinde karsinojenik, mutajenik ve nörotoksik etkilere yol açmaktadır. Petrol hidrokarbonlarının neden olduğu bu zararlı etkilerin azaltılması için yeni iyileştirme stratejileri geliştirilerek kontrol altına alınmalıdır [3, 39].



Şekil 2.9. Toprak ve denizde petrol kirliliği [40].

2.6. Petrol Kirliliğinin Çevreden Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Petrol ve petrol bazlı hidrokarbonlar ile oluşan kontaminasyonlar önemli çevresel ve sağlık sorunlarına yol açmakta; bu nedenle meydana gelen kontaminasyonların temizlenmesi için yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması için ilgi giderek artmaktadır [41]. Bu bağlamda; petrol kirliliğinin çevreden temizlenmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç farklı yöntem uygulanmaktadır.

2.6.1. Fiziksel Yöntemler: Çevrede meydana gelen petrol kirliliğinin fiziksel yöntemler ile çözümlenmesi temeline dayanmaktadır. Kirleticinin kontamine alandan uzaklaştırılarak, özellikle toprağın tekrar eski haline dönmesine imkân sağlamaktadır [42]. Deniz ve tatlı su ekosistemlerinde meydana gelen petrol dökülmelerinin temizlenmesinde tercih edilmektedir.

2.6.1.1. Yakma: Kıyı şeridinde çeşitli bitki örtüsü ve moloz yığınları gibi yanabilir özelliği yüksek ortamlarda meydana gelen petrol kirliliğinin giderilmesinde veya kıyıdan uzak bölgelerde denize dökülmüş olan petrolün uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Yöntemin etkin olabilmesi için, petrol tabakası kalınlığının 2-3 mm olması ve yangına dayanıklı bariyerler ile çevrelenerek petrolün yayılması engellenmelidir. Ancak bu yöntem önemli ölçüde hava kirliliğine yol açarak, bitki ve hayvanlarda ciddi tahribata neden olmaktadır (Şekil 2.10) [27, 43].



Şekil 2.10. Petrol yakma [44]

2.6.1.2. Yıkama: Kıyı şeridi boyunca meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde kullanılabilen bir yöntemdir. Yüksek basınç ve sıcak su kullanılması nedeniyle bu yöntemin

belirli verimli habitatlarda kullanımını uygun değildir. İnsan gücü gerektiren ve zaman alan bir yöntem olması gibi dezavantajlara sahiptir [43].

2.6.1.3. Petrol Bariyerleri: Deniz gibi sucul alanlarda meydana gelen petrol kirliliğinin belirli bir alanda sınırlandırılarak toplanması ve risk altındaki bölgelerin korunması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Suyun durgun olduğu liman ve kıyı bölgelerinde meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde kolaylıkla bu yöntem uygulanabilir. Gemi ve sıyırıcı ekipmanlar ile belirli bir alanda toplanan kirlilik kontrol altına alınmaktadır. Söz konusu bariyerler; kirli alanlarda toplanan petrolün daha kolay toplanabileceği alanlara yönlendirilmesi veya hassas alanların korunması amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 2.11) [27].



Şekil 2.11. Petrol bariyerleri [45].

2.6.1.4. Sorbent Malzemeler: Özellikle küçük miktarlardaki petrol birikimlerinin ortamdan uzaklaştırılmasında bariyerler, havlular, yastıklar ya da granüller gibi emici malzemeler kullanılabilir. Bu malzemeler polipropilenden (termoplastik polimer) yapılmış olup kendi ağırlıklarınının 15-20 katı emme kapasitesine ve batmadan yüzer durumda kalabilme özelliğine sahiptirler. Sünme özelliği yüksek olan bu emici özellikteki malzemeler ulaşımı zor olan alanlarda kullanılabilir. Büyük miktarlarda meydana gelen dökülmelerde asıl temizleme operasyonunun ardından küçük miktarlarda kalan kirliliğin giderilmesinde de kullanılabilir. Ancak yöntemin uygulanması için fazla miktarlarda emici malzemeye ve iş gücüne ihtiyaç duyulmaktadır [27, 43, 46].

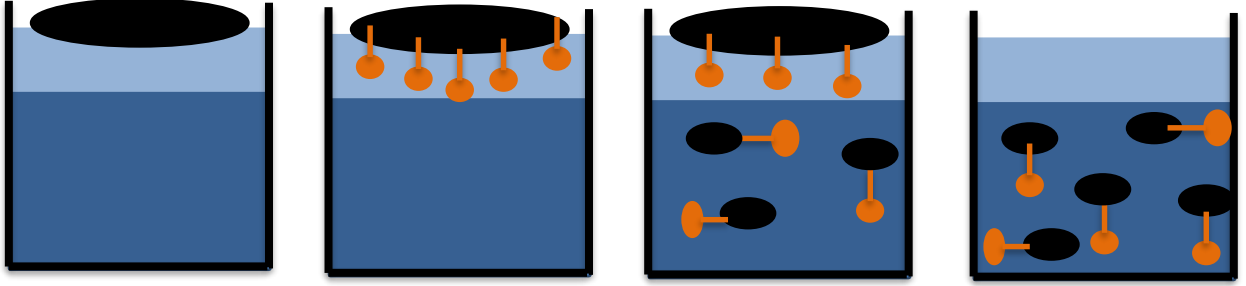
2.6.1.5. Petrol Sıyırıcılar: Petrol ve yağların kimyasal ya da fiziksel özelliklerini bozmadan, su yüzeyinden toplamak amacıyla tasarlanmış mekanik ekipmanlara sıyırıcı (skimmer) denir. Karasal ve sucul ekosistemlerde meydana gelen petrol dökülmelerinin temizlenmesi ve endüstriyel tesislerde üretim sırasında oluşan yağ içeren atık sulardan kazanım sağlanması amacıyla petrol sıyırıcılar kullanılmaktadır. Gemiye monte edilmiş bir toplama sistemi ile deniz yüzeyindeki petrolün mekanik olarak toplanması yoluyla yapılır. Özellikle durgun denizde etkilidir ve toplanan petrol tekrar kullanılabilir. Bir sıyırıcının kapasitesi, ortamın sıcaklığı (hava/su), su yüzeyindeki petrol tabakasının kalınlığına, petrolün viskozitesine ve sıyırıcının hızına göre değişmektedir. Ancak bu sistemin kolaylıkla tıkanabilmesi, bu yöntemin geniş petrol dökülmelerinin olduğu bölgelerde yeterli olamayacağını göstermektedir.

Diğer temizleme yöntemleri ile karşılaştırıldığında fiziksel temizleme yöntemlerinde kimyasal maddelerin kullanılmaması, çevreye zararın düşük düzeyde olması ve sahile vuracak petrol miktarının azaltılması açısından belirli avantajları olmasına karşın; yüksek maliyetli olması ve iş gücü gerektirmesi açısından da dezavantajlara sahiptir [27, 43].

2.6.2. Kimyasal Yöntemler: Organik kirleticilerin ortamdan tamamen uzaklaştırılmasında fiziksel yöntemlerin tam olarak yeterli olmadığı bazı koşullarda, farklı temizleme yöntemlerine de 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 parçalanarak yok edilmesi veya kirleticinin tam katı hâle gelip (plastik gibi) kolay bir şekilde toplanabilmesi prensibine dayanır. Çeşitli organik çözücüler veya alkali solüsyonların kullanıldığı bu yöntemde çoğunlukla seyrelticiler (dispersantlar) kullanılmaktadır. Sürfektanları da içeren dispersant ajanlar, petrolün yüzey gerilimini azaltarak su içinde küçük parçalar hâlinde dağılmasına neden olur. Dağılan petrol ise, organizmalar tarafından ve fotolitik olaylarla kolayca parçalanabilir (Şekil 2.12) [47].

Günümüzde karasal ve sucul ekosistemde meydana gelen petrol kirliliğinin giderilmesinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin oldukça pahalı sistemler olması ve kirleticilerin tamamen yıkıma uğratılamaması gibi dezavantajları vardır Bu nedenle daha uygun maliyetli,

daha az iş gücü gerektiren, güvenilir ve doğaya dost yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir [8, 43].



Şekil.2.12. Sürfektanların petrol ile etkileşim mekanizması [27].

2.6.3. Biyolojik Yöntemler

Biyolojik yöntemler karmaşık yapıdaki toksik organik kirleticilerin CO₂ ve H₂O gibi daha basit inorganik bileşiklere yıkıldığı biyolojik yıkım veya toksik organik kirleticinin toksik olmayan bileşiklere transforme olduğu biyolojik dönüştürme temeline dayanır [3, 48, 49]. Bu sürecin etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için; kontamine bölgenin analiz edilmesi, çevre için en uygun yöntemin belirlenmesi ve koşulların optimize edilmesi gerekir. Aerobik koşullarda daha etkin olduğu gözlenen iyileştirme süreci temel olarak yerinde (in-situ), ve doğal yeri dışında (ex-situ) temizleme yöntemlerini esas alır [11, 16].

2.6.3.1. Ex-Situ (Doğal Yeri Dışında) Temizleme Yöntemi

Çeşitli organik atıklar ile kontamine olmuş toprağın yerinden alınarak uygun alanlarda gerekli iyileştirme uygulamalarının yapıldığı önemli bir süreçtir. Bu yöntem, in-situ yöntemin uygulanamadığı yerleşim bölgeleri ve endüstriyel alanlarda meydana gelen küçük miktarlardaki toprak kontaminasyonları için uygulanabilir. Sıcaklık, pH, tuz ve nem gibi çok sayıda faktörün kontrol altında tutulabilmesi nedeniyle yüksek oranda iyileşme sağlanabilmektedir [38, 47, 50].

Arazi (Toprak) Tarımı: Arazi iyileştirme veya arazi uygulamaları olarak da bilinen bu yöntemde; toprak yüzeyindeki yüksek konsantrasyondaki organik kirleticinin biyoyıkım ile azaltılma esasına dayanan bir süreçtir. Bu yöntemde kontamine bölgeden alınan toprak en fazla 0.4 mm olacak kalınlıkta belirli bir yüzeye yayılmakta; havalandırma veya çeşitli

nütrientler ve nem desteği ile aerobik mikrobiyal aktivite desteklenmektedir. Arazinin yeterli olması durumunda etkin maliyetli ve uygun bir yöntemdir [11, 12].

Çürütme (Kompostlama): Kompostlama toksik organik katı atıkların biyokimyasal olarak ayrıştırılması temeline dayanmaktadır. Bu süreçte; termofilik koşullar altındaki (40 °C – 65 °C) mikroorganizmalar ile petrol hidrokarbonları, çeşitli çözücüler, klorofenoller, pestisitler, herbisitler, PAH ve nitro aromatik patlayıcılar ile kirlenmiş topraklardaki organik atıklar ayrıştırılır [12, 51, 52].

Biyoyığma (Biopiles): Arazi tarımı ve kompostalamanın bir arada kullanıldığı bir yöntemdir [12, 51]. Petrol ile kontamine toprak belirli bir alana yığılmakta, çeşitli besinler, mineraller ve nem gibi faktörler ile aerobik mikroorganizmaların etkinliği artırılmaktadır. Biyoyıkım etkinliğini arttırmak için sıcaklık ve pH kontrolleri sıklıkla yapılmalıdır. Bu yöntem, organik kirleticinin kısa zamanda etkin bir şekilde biyoyıkımına imkân sağlar. Organik kirleticinin % 95' den fazlasının biyoyıkımı gerçekleştirilebilirken; 50,000 ppm' den (parts per million - milyonda bir) daha yüksek petrol konsantrasyonlarında etkili değildir [53].

2.6.3.2. 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 durumlarda yüzey temizlenmesinden sorumludur. Yer altı biyoremediasyon sürecinde ise devamlı olarak besin ve oksijen ilavesi yapılması gerekir [38]. In-situ biyoremediasyon fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yetersiz kaldığı geniş alanlarda tercih edilmektedir. Bu yöntem; kirleticinin tamamen yıkımını sağlaması, çalışanlar için düşük risk oluşturması, daha az ekipman gerektirmesi ve daha düşük maliyetli olması açısından çeşitli avantajlara sahiptir [17]. In-situ biyoremediasyon süreci; biyostimülasyon ve bioaugmentasyon başta olmak üzere farklı yöntemi içermektedir.

Biyostimülasyon: Organik kirleticilerin biyoyıkımında görev yapan 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; iyileştirme yapılacak alandaki çevresel koşulların optimize edilmesi olarak ifade edilmektedir [3, 4, 8, 54].

Biyoaugmentasyon (Biyolojik Arttırma): Organik kirleticinin daha etkin ve hızlı parçalanması için biyoyıkım kapasitesine sahip spesifik veya genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kontamine bölgeye eklendiği önemli bir süreçtir [3]. Özellikle toprakta doğal olarak bulunan mikroorganizmaların tam olarak tanımlanmadığı veya iyileştirme sürecini gerçekleştirebilecek metabolik kapasiteye sahip olmadığı durumlarda oldukça etkindir [4].

Biyohavalandırma: Toprağın doymamış bölgesinde bulunan organik bileşenlerin endojen mikroorganizmalar aracılığıyla biyoyıkımına dayanır. Özellikle benzin, jet yakıt, kerosen gibi petrol ürünlerinin biyoremediasyonunda oldukça etkilidir [11, 12].

Biyodağıtma: Toprağın doymuş bölgesinde bulunan organik kirleticilerin biyoyıkımından sorumlu olan endojen mikroorganizmaların stimüle edildiği bir süreçtir. Kontamine bölgeye çeşitli borular aracılığıyla hava enjeksiyonu yapılarak çözünen oksijen miktarının dolayısıyla endojen mikroorganizmaların aktivitesinde artış sağlanmaktadır. Özellikle dizel yakıt gibi orta ağırlıktaki petrol ürünlerinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Yöntemin etkinliğinde toprağın geçirgenliği anahtar rol oynamaktadır [11, 12, 55].

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, kirleticinin konsantrasyonunun azaldığı veya kirleticinin toprak partiküllerine bağlanarak çevreye yayılımının engellendiği 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 parçalamakta veya daha az toksik veya toksik olmayan bileşiklere kadar yıkmaktadırlar [53].

2.7. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)

1960' lı yıllarda Kaliforniya' nın Santa Barbara kıyı şeridinde meydana gelen petrol kirliliğinin temizlenmesinde çeşitli mikroorganizmaların kullanıldığı bilinmektedir [54]. Biyoremediasyon, petrol gibi organik kirleticilerin çevreden uzaklaştırılmasında mikroorganizmaların ve onların ürünlerinin kullanıldığı oldukça önemli bir süreçtir [56, 57] 1980' li yıllardan bu yana petrol ve diğer zararlı organik atıkların biyolojik remediasyonu oldukça büyük önem kazanmıştır [54, 58]. Bu süreçte söz konusu organik kirleticiler CO₂, H₂O ve biyokütleye dönüştürülmektedir [11, 12]. 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 dönüştürülmelerinin ardından mikroorganizmaların sayıları normal popülasyon düzeyine ulaşır böylece ekolojik denge bozulmadan kalmış olur. Bazı durumlarda 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;

- Klor içermeyen (dehalojenize) fenolikler ve kresoller
- Dehalojenize aromatik bileşikler: Benzen, Toluen, Etil Benzen, Ksilen (BTEX)
- Polinükleer aromatik hidrokarbonlar (kresot yağı)
- Alkanlar ve alkenler (fuel oil)
- Azot içeren heterosiklikler (piridin)
- Klorlanmış çözücüler (kloroform)
- Poliklorlanmış bifeniller (triklorobifenil)
- Klorofenoller (pentaklorofenol)
- Herbisit ve pestisitler gibi çok sayıda organik kirleticinin çevreden uzaklaştırılması hedeflenmekle birlikte biyoremediasyonun ilk hedefi petrol ve petrol ürünleridir [38, 50].

2.7.1. Biyoremediasyonun Avantajları ve Dezavantajları

Toksik bileşiklerin, doğal olarak çevrede bulunan mikroorganizmalar tarafından toksik olmayan bileşiklere dönüştürüldüğü biyoremediasyon sürecine ait çok sayıda avantajın

olmasının yanında bazı dezavantajları da söz konusudur. Bu doğrultuda; toprak ve yer altı sularının iyileştirilmesi amacıyla uygulanan biyoremediasyon teknolojisi geliştirilmeye devam edilmektedir [3, 59].

Biyoremediasyonun Avantajları

- Çevreye dost, ekolojik olarak güvenli ve doğal bir süreçtir.
- Toksik bileşikler, zararlı olmayan CO₂, H₂O ve yağ asitlerine dönüştürülür.
- Sınırlandırılmış bir alanda direkt olarak uygulanabilir
- Diğer geleneksel yöntemler ile karşılaştırıldığında uygun maliyetlidir.
- Uygulamada kullanılacak ekipman basit ve kolay ulaşılabilir.
- Diğer yöntemlere kıyasla yüzey remediasyonu için gereken süre daha azdır.
- Atık ürün meydana gelmez
- Kirleticinin biyoyıkımını takiben kirleticinin bulunmasına bağlı olarak sayısal artış gösteren mikrobiyal popülasyonda doğal olarak düşüş meydana gelir.
- Biyoremediasyon alanında devam eden doğal işleyişte minimal düzeyde bozulmaya neden olur.
- Diğer remediasyon teknolojileri ile birleştirilerek biyoremediasyon etkinliği artırılabilir [3, 54, 60].

Biyoremediasyonun Dezavantajları

- Mikrobiyal etkinlik için gereken çevresel koşulların sürekli olarak muhafaza edilmesi gerekir.
- Düşük çözünürlüğe sahip organik kirleticilerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmaların biyoyararlanımı üzerinde toksik etki gösterir.

- Geçirgenliği yüksek toprak ve kanallarda uygulanabilirliği daha yüksekken, geçirgenliği düşük topraklar için uygun bir yöntem değildir [3, 54, 61].

Petrol kirliliğinin karasal ve sucul alanlardaki doğal yöntemlerle uzaklaştırılması sürecinde, petrolün hidrokarbon konsantrasyonunun azaltılması petrolün kimyasal kompozisyonunda değişime yol açmaktadır. Meydana gelen kimyasal değişim, petrolün organizmalar üzerindeki toksik etkisinde de azalmaya neden olmaktadır.

Doğal temizleme yöntemlerinin başında; hava akımının etkisi ile gerçekleşen; yayılma, buharlaştırma, dağılma, emülsiyonlaştırma, fotooksidasyon, sedimentasyon ile biyodegradasyon gelmektedir [43].

2.8. Mikrobiyal Yıkım (Biyodegradasyon)

Petrol hidrokarbonlarının çevreden uzaklaştırılmasında mikrobiyal yıkım (biyoyıkım) en önemli ve temel mekanizmaların başında yer almaktadır [8]. Biyoyıkım; mikroorganizmalar tarafından petrol hidrokarbonları gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin enerji, hücre kütlesi ve biyolojik ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır [62]. Yaklaşık 80 yıldan beri belirli enzimatik kapasiteye sahip mikroorganizmaların petrol ve petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak biyoyıkıma uğratabildikleri bilinmektedir [4]. Mikroorganizmalara ait saf kültürlerin, petrol gibi tek bir karbon kaynağı üzerinde gelişim göstermesi, mikroorganizmanın mikrobiyal yıkım yeteneğini işaret etmektedir [31].

Hidrokarbon biyoyıkımının ilk aşaması için oksijenaz dolayısı ile serbest oksijenin ortamda bulunması gerekir. Monooksijenaz aracılığı ile alkanlardan oluşan alkol, aldehite son olarak yağ asitlerine kadar oksitlenir. Bu aşamadan sonra yağ asitlerinin β -oksidasyon yolu ile yıkımı tamamlanır [1]. Biyoyıkım sürecinde oluşan asetil-koA TCA döngüsüne girerken, elektronlar ETS üzerinden son elektron alıcısına kadar aktarılır. Döngü hidrokarbonların CO₂'ye oksitlenmesine kadar devam eder. Benzen, toluen, naftalen ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonlar aerobik koşullarda biyoyıkıma uğrarlar. Bu süreçte, funguslarda karsinojenik etki gösteren yan ürünler oluşurken; bakterilerin aromatik hidrokarbonları detoksifiye edebilmeleri ve karsinojenik madde oluşturmamaları ile biyoyıkımdaki etkinlikleri gösterilmiştir [63, 64].

Hidrokarbon biyoyıkımı; petrolün hidrokarbon içeriğine, çevresel koşullara ve mikrobiyal topluluğa bağılı olarak gerçekleşmektedir [63]. Biyoyıkım sürecinin daha etkin ve hızlı gerçekleşebilmesi için; mikroorganizmalar için gerekli olan en uygun sıcaklık, basınç, besin, nem, oksijen ve pH gibi çevresel parametrelerin sağlanması gerekmektedir [3].

2.8.1. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Fiziksel Faktörler

2.8.1.1. 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 çözünebilirliği 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 olduğu belirlenmiştir. Hidrokarbon biyoyıkımı psikrofilik, mezofilik ve termofilik koşullar gibi geniş sıcaklık aralığında gerçekleşebilmektedir. Mezofilik mikroorganizmalar ile petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımına ait çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, psikrofilik koşullarda yaşayan mikroorganizmaların da biyoyıkımda rol oynadıkları belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, 70 °C gibi termofilik koşullarda hidrokarbon biyoyıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir [1, 8, 9, 63, 65, 66].

2.8.1.2. Oksijen

Petrol gibi organik kirleticilerin çoğunlukla hızlı bir şekilde biyoyıkıma uğratıldığı süreç aerobik koşullarda gerçekleşmektedir [8]. 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 redükleyen bakteriler gibi çeşitli inorganik bileşikleri

son elektron alıcısı olarak kullanan anaerobik bakteriler tarafından katalizlenmektedir. Aerobik koşullarda gerçekleşen biyoyıkım süreci oldukça hızlı ilerlemesine rağmen; özellikle yer altı suları ve çamurlu alanlar gibi oksijenin yetersiz olduğu çevre koşullarının temizlenmesinde anaerobik biyoyıkım süreci büyük önem taşımaktadır [63, 64].

2.8.1.3. pH

Mikrobiyal biyoyıkım sürecindeki önemli parametrelerin başında yer almaktadır. Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı genellikle nötral pH aralığında gerçekleşmesine karşın; organik kirleticileri içeren asidik pH koşullarında da biyoyıkımın gerçekleştiği gösterilmiştir. Özellikle, heterotrofik asidofil mikroorganizmaların, petrol ile kontamine olmuş asidik drenaj suları gibi ağır metal ve çeşitli organik kirletici içeren çevre koşullarında oldukça etkin oldukları belirlenmiştir [16, 67].

2.8.1.4. Basınç

Biyoyıkım sürecinde basıncın artması, mikroorganizmaların substrattan biyoyararlanımlarının artmasına dolayısıyla biyoyıkım oranlarının artmasına katkı sağlamaktadır. 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 yayılır. Bu durum, fazlar arasındaki temas yüzeyinin artmasına ve petrolün mikrobiyal yıkıma elverişli hale gelmesine katkı sağlar [68].

2.8.1.5. Petrolün yapısı ve hidrokarbon bileşimi

Petrolün yapısı ve hidrokarbon içeriği de bir diğer önemli parametrelerin başında yer almaktadır [8]. Petrolün yapısında bulunan hidrokarbonlar; alkanlar (normal ve izo), sikloalkanlar ve aromatikler olarak yapısal açıdan sınıflandırılabilir [1]. Petrolün temel yapısını oluşturan bu hidrokarbonların mikrobiyal biyoyıkıma karşı duyarlılıkları sıralandığında düz alkanlar > dallı alkanlar > küçük aromatikler > siklik alkanlar şeklindedir. Özellikle kısa ve uzun zincirli alkanlar (C₁₀ ve C₂₀-C₄₀) ile PAH'ların biyoyıkımı oldukça zordur [9, 69]. 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 [70].

2.8.1.6. Besin ve Tuz

Karbon canlı organizmaların ihtiyaç duyduğu en temel besin maddelerindedir. Buna ek olarak; bakteriler petrol hidrokarbonlarının etkin biyoyıkımı için azot ve fosfor gibi makrobesinlere de ihtiyaç duymaktadır. Hidrokarbon biyoyıkımı için gerekli olan optimal besin dengesi C:N:P = 100:10:4 olmalıdır [4]. Besinlerin mikroorganizma için gerekli miktarlarda ortama eklenmesi biyoyıkım etkinliğini artırırken; aşırı dozdaki besin konsantrasyonunun biyoyıkımı inhibe ettiği bilinmektedir [8]. Tuzluluk oranının mikrobiyal biyoyıkım üzerine etkisinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmasına karşın, besiyerindeki yüksek tuz konsantrasyonunun, bakterinin normal hücrel aktivitesinde ve üremesinde düşüşe yol açtığı belirlenmiştir [71].

2.8.2. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Biyolojik Faktörler

Petrol hidrokarbonları; bakteri ve funguslar başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından biyoyıkıma uğratılabilmektedir [72]. Benzer şekilde siyanobakterilerin de biyoyıkımda rol oynadıkları bildirilmiştir [1]. 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 [73].

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.*, [31, 71], *Marinobacter sp.*, *Alcanivorax sp.*, *Microbulbifer sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Dietzia sp.*, *Gordonia sp.* gibi cinslerin etkili oldukları gösterilmiştir [1]. Yapılan araştırmalarda; *B. megaterium*, *P. putida*, *M. luteus*, *B. brevis*, *B. pumilus* ve *E. aerogenes*' in de hidrokarbon biyoyıkımında etkin türler oldukları gösterilmiştir [74, 75].

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 [76].

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 belirlenmiştir. 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 [54]. 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 [77, 78]. 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 [6, 75, 79, 80].

Çevrede meydana gelen petrol kirliliğinin ardından, toprakta biyoyıkımda görev yapan ve plazmit genlere sahip endojen bakteri popülasyonunda önemli ölçüde artış meydana gelmektedir. Bütün canlılarda olduğu gibi bakterilerde de genetik bilgi DNA' da depolanmıştır. 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 sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Moraxella sp.* ve *Arthrobacter sp.* gibi cinslerde katabolik plazmitin varlığı

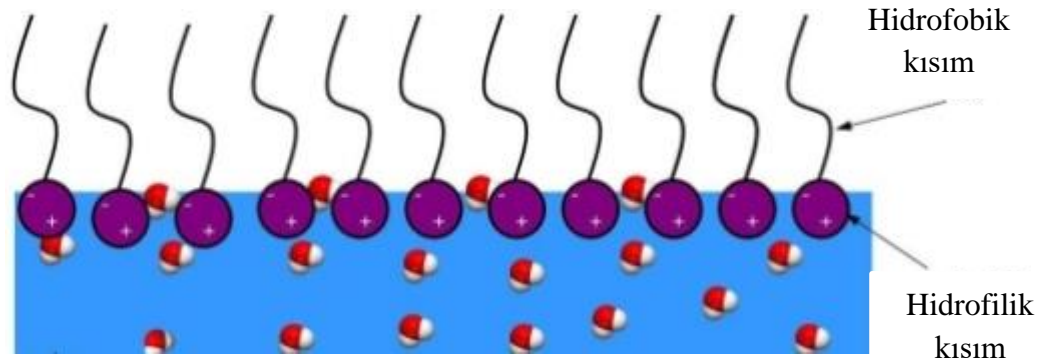
gösterilmiştir. Plazmitler, özellikle biyoyıkım kapasitesi artırılmış rekombinant veya genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların geliştirilmesinde oldukça önemlidir [81].

Bakteriler ürettikleri biosurfektanlar ve çeşitli emülsifiye edici maddeler ile petrolün hücreye alınımını ve biyoyıkımını kolaylaştırmaktadır [77].

2.9. Biosurfektanlar

Mikroorganizmalar, su ve toprak gibi çeşitli ekosistemlerde kontaminasyonlara neden olan hidrofobik yapıdaki organik bileşikleri biyoyıkıma uğratmaktadırlar. Biosurfektanlar, özellikle petrol gibi hidrofobik yapıdaki çözünmeyen substratların hücre membranından geçişini kolaylaştırarak; mikrobiyal üreme ve biyoyıkımını önemli ölçüde desteklemektedir. Biosurfektanlar; çeşitli bakteri, maya ve filamentöz funguslar tarafından hücre membranının bir parçası veya hücre dışı olarak üretilen amfipatik yapıdaki bileşiklerdir. Söz konusu maddeler, karbonhidrat, hidrokarbon, yağ ve petrol gibi karbon kaynaklarının bulunduğu sıvı ortamlarda çeşitli aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Molekülün hidrofobik kısmı uzun zincirli yağ asitleri, hidroksil yağ asitleri ve alkil yağ asitlerinden oluşurken, suda çözünen hidrofilik kısmı ise karbonhidrat, amino asit, siklik peptit, fosfat, karboksilik asit ve alkolden oluşmaktadır [82, 83]. Biosurfektanlar, kimyasal konfigürasyonlarına göre; glikolipitler, lipopeptitler, liposakkaritler ve oligosakkaritler şeklinde sınıflandırılır (Şekil 2.13).

- Düşük ağırlıklı surfektanlar: glikolipitler, lipopeptitler ve fosfolipitler
- Yüksek ağırlıklı surfektanlar: polimerik ve partikül surfektanlar



Şekil 2.13. Genel biosurfektan yapısı [82]

Amfipatik yapıdaki bu bileşikler; farklı polarite özellikleri gösteren sıvıların birbirleri ile etkileşimleri (petrol/su) ile hidrofobik substratların hücreye girişini sağlamalarının yanında yüzey-ara yüzey geriliminin azaltılması açısından da önemlidirler. Buna ek olarak, biyosümfektanlar hidrokarbon gibi suda çözünmeyen bileşiklerin temas yüzeyi ile beraber mikrobiyal üremeyi, biyoyaralanımı ve biyoyıkımı artırması açısından da önem taşımaktadır. Biyosümfektanlar, sucul ve karasal alanlarda meydana gelen kontaminasyonların iyileştirilmesinde sıklıkla kullanılmasının yanında; ekstraksiyon, taşıma ve depolama gibi petrol üretim zincirinin temel aşamalarında da kullanım alanlarına sahiptir. Sentetik sümfektanlar ile karşılaştırıldığında sahip olduğu avantajları ile biyosümfektanlara olan ilgi giderek artmaktadır. Ayrıca biyosümfektanların üretim sürecinde, tarım sanayi atık ürünlerinin substrat kaynağı olarak kullanılması da üretim maliyetinde azalmaya neden olmaktadır [82, 84].

2.9.1. Biyosümfektanların Avantajları

- Sahip oldukları basit kimyasal yapıları ile biyoparçalanabilirlik,
- Düşük toksisite,
- Spesifik fonksiyonel gruplar ile yüksek seçicilik,
- Ekstrem sıcaklık, pH ve tuzluluk koşullarında etkinlik,

Biyosümfektanlar; kozmetik, ilaç ve gıda endüstrilerinde; deterjan, sağlık hizmeti ve çevre uygulamalarının yanında mikroorganizmalar aracılığıyla geliştirilmiş petrol iyileştirilmeleri (MEOR-Microbial Enhanced Oil Recovery) ile petrol endüstri süreçlerinde de büyük öneme sahiptir. Özellikle *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* ve *Candida sp.*, gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektanların çeşidi, üretim süreçleri ve endüstriyel uygulamaları oldukça önem taşımaktadır [82, 85]. Literatürde *Pseudomonas sp.*' nin yüksek miktarda glikolipid (ramnolipid), *Rhodococcus erythropolis* ve *Arthrobacter sp.* tarafından trehaloz, *Acinetobacter sp.* tarafından fosfolipid ve *B. subtilis* tarafından lipopetid ve *Candida bombicola* tarafından saporolipid yapıdaki biyosümfektanların üretimini gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Son zamanlarda sümfektan üreten mikroorganizmaların izole edilmesi, sümfektan maddenin karakterizasyonu ve remediasyon çalışmalarındaki kullanımı geniş araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır [14, 85].

2.10. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

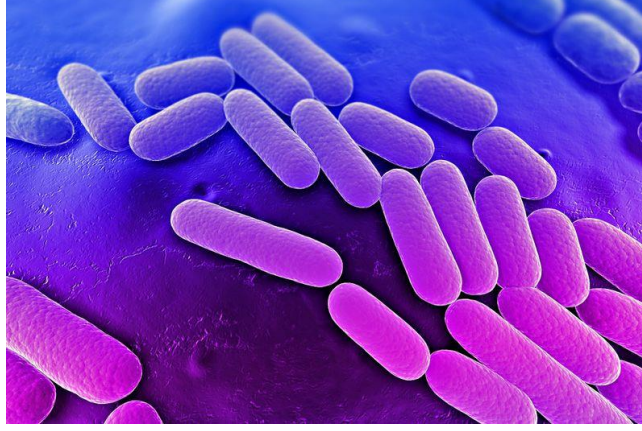
2.10.1. *Bacillus axarquiensis*

Bacillaceae familyasında yer alan *Bacillus* cinsi Gram pozitif, basil morfolojisinde, peritriş flagellaları ile hareketli, kemoheterotrofik aerobik veya fakültatif anaerobik özellikte ve endospor oluşturma özelliğinde olan mikroorganizmalardır. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar sahip oldukları endosporları ile olumsuz çevre koşullarına karşı direnç gösterir ve ürettikleri çeşitli metabolitler ile diğer mikroorganizmalar üzerinde antagonistik etki gösterirler. Böylece doğada özellikle toprakta geniş yayılım gösteren baskın türler arasında yer alırlar ve ekolojik öneme sahiptirler [86]. Özellikle son on yıldır *Bacillus sp.*' nin biyoteknolojik ve ekonomik önemi dikkat çekmektedir. *Bacillus sp.*' nin tıbbi, zirai, ilaç ve endüstriyel ürünlerin sentezinde geniş kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. *Bacillus sp.*' nin endüstriyel alandaki uygulamalarına vitamin ve ribonükleotitler gibi ürettikleri birincil metabolitleri ve bakteriyosin, biyosürefektanlar gibi ikincil metabolitleri örnek olarak verilebilir. İlave olarak, *Bacillus sp.*' nin ürettiği amilaz, lipaz, proteaz ve selülaz gibi enzimlerinin gıda, ilaç, tekstil, kağıt, deri ve endüstriyel alanlarda geniş kullanım alanlarına sahip olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak; söz konusu bu cinsin karotenoid pigment ve biyopolimerler gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek çeşitli kimyasalları da ürettikleri bilinmektedir [87, 88].

Bacillus cinsine ait *Bacillus axarquiensis* türü Gram pozitif, basil morfolojisinde, aerobik özellikte ve peritriş flagellaları ile hareketli mikroorganizmalardır. Sporları elipsoidal yapıda ve subterminal pozisyonadadır. 15 °C – 45 °C arası gibi geniş sıcaklık aralığında ve pH 5 – pH 10 aralığı gibi geniş pH aralığında üreyebilmektedir. Optimum üreme 32 °C, pH 7.2 ve % 0.5 deniz tuzunda gerçekleşmektedir [89].

2.10.2. *Klebsiella pneumoniae*

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Klebsiella pneumoniae* türü, Gram negatif basil morfolojisinde, hareketsiz ve fakültatif anaerobik özelliktedir. Katı besiyerindeki 3-4 mm' lik mukoid koloniler oluşturur. Tanımlanmasında Gram boyama ve çeşitli biyokimyasal testler uygulanmaktadır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. *Klebsiella pneumoniae* [90]

K. pneumoniae' in çeşitli çevresel kaynaklarda gerçekleşen biyokimyasal ve jeokimyasal süreçlerde oldukça etkin olduğu bilinmektedir. Sahip oldukları çeşitli metabolik özellikleri ile *Klebsiella sp.* türleri biyoremediasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [91, 92]. Özellikle hidrokarbon ile kontamine olmuş topraklarda biyosümfektan üreten *K. pneumoniae* türlerinin biyoremediasyondaki etkinlikleri gösterilmiştir [93]. Söz konusu türün, oldukça toksik bir bileşik olan siyanürün biyoyıkımında da oldukça etkili olduğu belirlenmiştir [94]. Bunlara ek olarak; piren ve benzo[a]piren gibi mikrobiyal yıkıma direnç gösteren çeşitli PAH' ların biyoyıkımında da rol oynadıkları bildirilmiştir [95]. *K. pneumoniae*' nin; oksitleyici özellikte, yüksek çözünürlüğe sahip ve biyolojik membranlara sızabilme özelliğindeki tehlikeli bir mutajen olan altı bileşikli krom bileşiklerinin etkinliğinin azaltılmasında kullanılmaktadır [96]. Söz konusu bakteriyel türün ürettiği uçucu yapıdaki organik bir bileşiğin civanın biyoremediasyonda etkin olduğu gösterilmiştir [97].

K. pneumoniae' nin biyoremediasyon çalışmalarının yanında; kozmetik, gıda ve ilaç gibi endüstriyel alanlarda kullanılan bazı polimerleri üretme yeteneğinde olduğu gösterilmiştir [98].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılacak Numunelerin Toplanması

Çalışmamızda 2,5 L ham petrol, 1 L sondaj çamuru ve 1 L atık çamur çukuru örnekleri petrol sahasında bulunan steril kaplara alınarak Hacettepe Üniversitesi Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarına ulaştırıldı. Söz konusu numuneler oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda saklandı.

3.2. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Saklanması

Çalışmamızda kullanılacak mikroorganizmalar, ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukuru numunelerinden izole edildi. İzole edilen bu mikroorganizmalar % 10 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon (BHI - Brain Heart Infusion) sıvı besiyerine ekilerek 37 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 24 saat üretildi. Elde edilen kültürler +4 °C' de buzdolabında ve -20 °C' de derin dondurucuda saklandı. 1 ay arayla mikroorganizmaların pasajlama işlemleri gerçekleştirildi.

3.3. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları

3.3.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim

Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımında rol oynayan mikroorganizmaların zenginleştirilmesi, aerobik koşullarda ve tek karbon kaynağı olarak petrol bulunan ortamda gerçekleştirildi. Bu amaçla; ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukuru numunelerinden 1 ml örnek alınarak, içinde % 1 oranında (v/v) petrol, % 1 oranında Triton X:100 bulunan 50 ml' lik Bushnell-Hass (Sigma-Aldrich) besiyerine ekilerek 37 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde 3 gün üretime bırakıldı. Üretimin ardından zenginleştirme amacıyla kültürlerden 1 ml alınarak taze Bushnell-Hass besiyerine ekildi ve aynı koşullarda tekrar üretime bırakıldı.

3.3.2. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu

Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukuru numunelerinden alınan örneklerin Bushnell-Hass besiyerinde zenginleştirilmesi sonrası kültürlerin izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla; her bir numuneden 0.1 ml örnek alınarak nutrient agara ekildi ve 37 °C' de 24 saat üretildi [79]. Üretimin ardından, nutrient agarda üreyen kültürlerden farklı morfolojideki koloniler alınarak, saf kültür elde etmek amacıyla nutrient agara tek koloni ekimleri yapıldı. Saf kültür elde edene

kadar aynı işlem tekrar edildi. İzole edilen mikroorganizmaların koloni morfolojileri makroskopik olarak incelenirken, Gram boyama yöntemi ile mikroskopik incelemeleri gerçekleştirildi. Saf kültür olduğu düşünülen kültürlerin sırasıyla Nutrient Agar ve Eozin-Metilen Mavisini agar (EMB – Eosin Metylene Blue) besiyerlerine tek koloni yöntemiyle ekimleri sonrası, 37 °C’ de, 24 saat üretimleri gerçekleştirildi.

3.3.3. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların Tanımlanması

Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurunda izole edilen söz konusu tüm suşların tanımlanması 16S ribozomal RNA analizi ile Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. tarafından yapıldı.

3.3.4. Petrol Biyoyıkımında Kullanılacak Mikroorganizmaların Hazırlanması

Saf kültür olarak elde edilen mikroorganizmalardan alınan örnekler nutrient brotha ekilerek, 30 °C’ de, 150 rpm sabit çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 18 saat üretime bırakıldı. Üretim sonrası tüm kültürler, 4000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5810R). Hücre peleti steril % 0.9’ luk NaCl çözeltisi ile muamele edilerek santrifüj işlemi tekrar edildi. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Son olarak elde edilen pelet kısmı steril distile su ile süspanse edildi. Yıkama işlemi gerçekleştirilen tüm suşların bulanıklıkları 0.8 OD’de 10^8 cfu/ml (colony forming unit - koloni oluşturan birim) olacak şekilde, 600 nm’ ye ayarlanmış olan spektrofotometrede köre karşı okundu (Shimadzu UV-1700) [99].

3.3.5. Petrol İçeren Besiyerine Ekim ve Üretim

Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurundan izole edilen mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımının belirlenmesi amacıyla tek karbon ve enerji kaynağı olarak ham petrolü içeren Bushnell-Hass besiyeri (g/L olarak: 0,2 MgSO₄, 0,02 CaCl₂, 1 KH₂PO₄, 1 K₂HPO₄, 1 NH₄NO₃, 0,05 FeCl₃) hazırlanarak ortam pH’ sı 7,0 olarak ayarlandı. 250 ml’ lik erlenmayerlerde % 1 oranında Triton X:100 içeren ve son hacimi 50 ml olacak şekilde hazırlanan söz konusu besiyerleri, 121 °C’ de 15 dakika sterilizasyona tabii tutuldu. Sterilizasyon işleminin tamamlanmasının ardından 45 °C’ ye kadar soğutulan besiyerlerine, 0.22 µm por çaplı CA (Selüloz asetat) şırınga filtre (Millipore) ile steril edilen petrolden % 1 (v/v) oranında ilave edildi. Hazırlanan besiyerlerine mikroorganizmaların % 1 oranında

ekimleri gerçekleştirildi. Tüm suşların üretimi 30 °C' de, 150 rpm çalkalama çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde, karanlık koşulda, 7 günde gerçekleştirildi [100].

3.3.6. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi

Çalışmamızda, petrol içeren ortamlardaki üreme miktarı Garapati et. al. [101] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek saptandı. Ham petrollü besiyerlerinde üretim süreci tamamlanan tüm kültürler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj (Eppendorf 5810R) edilerek, elde edilen pelet steril distile su ile yıkandı. Hücre süspansiyonları 8000 rpm' de 10 dakika santrifügasyonun (Eppendorf 5417C) ardından aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Elde edilen hücre süspansiyonlarındaki üreme miktarları 600 nm' ye ayarlanmış spektrofotometre de köre karşı okundu (Shimadzu UV-1700).

3.4. Petrol Biyoyıkımının Ölçülmesi

Petrol biyoyıkımı; kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik olmak üzere sırasıyla üç farklı yöntem ile değerlendirilerek, petrol biyoyıkımında kullanılabilecek en etkin yöntem araştırıldı.

3.4.1. Petrol Biyoyıkımının Kolorimetrik Yöntem ile Ölçülmesi

Petrol biyoyıkımının kolorimetrik yöntem ile belirlenmesi Selvakumar et. al. [78] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek saptandı. Redoks indikatör çözeltisi, 1 gr 2,6-dikloro fenol indofenol (DCPIP) (Fluka) 1 L distile su içinde çözünerek hazırlandı (Şekil. 3.1). Bu doğrultuda, % 1 petrol ve % 1 redoks indikatörü içeren Bushnell-Hass besiyerinde üretilen tüm mikroorganizmalara ait kültürler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek pelet kısmı uzaklaştırıldı (Eppendorf 5810R). Mavi renkli redoks indikatöründe meydana gelen renk değişikliği 600 nm' ye ayarlanmış spektrofotometrede köre karşı okundu (Shimadzu UV-1700).

3.4.2. Petrol Biyoyıkımının Spektrofotometrik Yöntem ile Ölçülmesi

Petrol biyoyıkımının spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi Hassanshahian et. al. [102] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek saptandı. Bu doğrultuda, % 1 petrol içeren Bushnell-Hass besiyerinde üretilen tüm mikroorganizmalara ait kültürler, 4000 rpm' de 10

dakika santrifüj edilerek pelet kısmı uzaklaştırıldı (Eppendorf 5810R). Elde edilen süpernatant kısmına diklorometan (DCM) (1:2) eklenerek sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Ortamda bulunan petrol ve Triton X:100, DCM içinde çözünerek alt faza geçerken, üst faz alt fazdan ayrılarak uzaklaştırıldı. Ekstakte edilen petrol, 420 nm' ye ayarlanmış olan spektrofotometrede köre karşı okundu (Shimadzu UV-1700). Petrolün başlangıç ve son absorbans değerleri arasındaki farkın yüzdesi % biyoyıkım olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. DCPIP Redoks İndikatörü

3.4.3. Petrol Biyoyıkımının Gravimetrik Yöntem ile Ölçülmesi

Petrol biyoyıkımının gravimetrik yöntem ile belirlenmesi Aparna et al. [103] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek saptandı. Kültür ortamından DCM ile gerçekleşen ekstraksiyonun ardından, içinde petrol + DCM bulunan erlenmayerler 80 °C' deki su banyosunda (Mommert) 1 saat bırakılarak DCM' nin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Böylece petrolün başlangıç ve son ağırlık değerleri arasındaki farkın yüzdesi % biyoyıkım olarak değerlendirildi (Şekil 3.2.).

Kalan petrolün ağırlığı=Ekstakte edilen petrolü içeren erlenmayerin ağırlığı - Boş erlenmayer ağırlığı

Toplam petrol biyoyıkımı= Besiyerine eklenen petrolün ağırlığı - Besiyerinde kalan petrolün ağırlığı

% Biyoyıkım= Biyoyıkılan petrolün miktarı/Besiyerine eklenen petrol miktarı X 100



Şekil 3.2. İnkübasyon sonunda üremeleri uzaklaştırılmış kültürlerin DCM ile ekstraksiyonu

3.5. Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi

K. pneumoniae ve *B. axarquiensis* suşları ile petrol biyoyıkımlarının gaz kromatografisi analizi ile belirlenmesi amacıyla, petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının ayrı ayrı ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 gün olacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası petrol DCM (1:2) ile kültür ortamından ekstrakte edildi. GC Analizi Encon Çevre ve Danışmanlık Ltd. Şti. tarafından, 15m x 0,530mm x 0,15mm kapiller kolonun (Agilent Technologies HP1/SIMDIST) takıldığı gaz kromatografisi cihazı (Agilent Technologies 7890B) ile gerçekleştirildi. 1 ml numune GC cihazına enjekte edilerek, taşıyıcı gaz Helyum (He) 7,4 mL/dk; enjeksiyon sıcaklığı 300 °C; dedektör sıcaklığı 300 °C olacak şekilde ayarlandı. Kolon fırını sıcaklık programı: başlangıç, 1,5 dakika süreyle 40 °C, 5 °C/dakika artış ile 5 dakikada 60 °C, 15 °C/dakika artış ile 10 dakika 300 °C olacak şekilde analiz tamamlandı.

3.6. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizmaların Seçilmesi

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar petrol biyoyıkımlarının değerlendirilmesi amacı ile petrol içeren Bushnell-Hass besiyerine ekildi. Bu mikroorganizmaların, 30 °C' de, 150 rpm

çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde, 7 günde üretimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası tüm suşların üreme miktarları belirlenirken; petrol biyoyıkları kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemler ile değerlendirildi. Sonuçların karşılaştırılması ile petrol biyoyıkımındaki en etkin suşlar belirlendi.

3.7. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması

3.7.1. Uygun Başlangıç pH Değerinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Üretim ortamına ait başlangıç pH değerinin petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla pH 5,0 ile 8,0 arasında değişen pH' larda hazırlanan petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ayrı ayrı ekildi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının üretimleri statik ve 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörlerde 30 °C' de, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.3. Petrolün Farklı Konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Farklı petrol konsantrasyonlarının petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla % 0,25 - % 2 arasında değişen oranlarda petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür

ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.4. Kültürlerin Farklı Konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Kültürlerin farklı konsantrasyonlarının petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla % 1 petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarına ait kültürler % 1 - % 3 arasında değişen oranlarda ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.5. Uygun Sıcaklık Değerinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

İnkübasyon sıcaklık değerinin petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla % 1 petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 20 – 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.6. İnkübasyon Süresinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

İnkübasyon süresinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ile petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ayrı ayrı ekildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 ve 14 gün olacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.8. Farklı Petrol Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Biyoyıkımlarının Araştırılması

K. pneumoniae ve *B. axarquiensis* türleri ile farklı petrol kaynaklarının biyoyıkımlarının araştırılması amacıyla çalışmada kullanılan Busshnell-Hass besiyerine % 1 oranında farklı petrol kaynakları (Petrol 1, Petrol 2, Petrol 3, Petrol 4, Petrol 5) ayrı ayrı ilave edildi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının söz konusu ortamlara ekilmelerinin ardından, suşların üretimi 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlendi.

3.9. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Sürfektan Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Üretim ortamına ilave edilen farklı sürfektanların *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ile petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine % 1 oranında farklı sürfektan maddeler (Triton X:100, Tween-80, Tween-20) ilave edildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.10. Biosürfektan Üretiminin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Araştırılması

Bodour & Miller-Maier [104] tarafından tanımlanan daralma-yayıma (drop collapse) yöntemi ile Morikawa et. al. [105] tarafından önerilen petrol yayılma (oil spreading) yöntemleri modifiye edilerek biosürfektan üretimi araştırıldı. Biosürfektan üretiminin araştırılması % 1 glukoz içeren Busshnell-Hass besiyerinde, 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda tüm kültürler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj (Eppendorf 5810R) edilerek, pelet kısmı uzaklaştırıldı. Ardından kültür süpernatanı 8000 rpm' de 10 dakika santrifügasyon (Eppendorf 5417C) işlemine tabi tutularak olası hücreler uzaklaştırılmış oldu. Daralma-yayıma yönteminde; 96 kuyucuklu mikrolatelere 5µl mineral yağ eklenerek iki saat oda sıcaklığında beklendi. Ardından 5 µl kültür süpernatanından eklendi ve bir dakika içerisinde damlada meydana gelen değişim izlendi. Damlada meydana gelen yayılma biosürfektan üretiminin pozitif olduğunu

gösterirken, damlanın yayılmadan yuvarlak kalması negatif sonuç olarak yorumlandı [85]. Petrol yayılma yönteminde ise; 50 µl distile su içeren petri kabına 20 µl petrol eklendi. Ardından hücreden tamamen arındırılmış kültür süpernatantından 20 µl ilave edildi. Böylece petrol-su ara yüzeyinde meydana gelen şeffaf zon ile kültürlerdeki biyosüperfektan üretimi belirlenmiş oldu. Her iki yöntemde de pozitif kontrol grubu olarak Triton X:100, negatif kontrol grubu olarak distile su kullanıldı.

3.11. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Üretim ortamına ilave edilen farklı karbon kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ile petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine % 1 oranında farklı karbon kaynakları (glukoz, laktoz, maltoz, sukroz) ilave edildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.12. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Azot Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Üretim ortamına ilave edilen farklı azot kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ile petrol biyoyıkımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine % 1 oranında farklı azot kaynakları (maya ekstraktı, üre, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, KNO₃, NH₄H₂PO₄) ilave edildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.13. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* Karışık Kültürünün Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

K. pneumoniae ve *B. axarquiensis* türlerine ait karışık kültürün petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell Hass besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarına ait kültürlerin 1:1 (v/v) oranında karıştırılması ile oluşan karışık

kültür ile suşların ayrı ayrı kültürlerinin 1:1 (v/v) oranında ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.14. Ham Petrol, Çamur Çukuru ve Sondaj Çukuru Numunelerine Ait Karışık Kültürlerin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukuru numunelerinden izole edilen mikroorganizmalara ait karışık kültürlerin petrol biyoyıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine her üç numuneye ait tüm suşlar 1:1 (v/v) oranında ekildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.15. Toprak ve Deniz Suyu Ortamlarında *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması

% 1 oranında petrol içeren steril ve steril olmayan toprak ile % 1 petrol ve % 1 glukoz içeren deniz suyu ortamları laboratuvar koşullarında hazırlanarak, *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve *K. pneumoniae* – *B. axarquiensis* karışık kültürlerinin petrol biyoyıkım oranları araştırıldı. Hazırlanan ortamlara ayrı ayrı *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve *K. pneumoniae* – *B. axarquiensis* karışık kültürleri ekildi. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası kültür ortamlarında petrol biyoyıkımı gravimetrik olarak belirlenirken, suşların deniz suyu ortamındaki üreme miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.16. Gaz Kromatografisi (GC) ile Detaylı Hidrokarbon Analizi

K. pneumoniae ile petrol biyoyıkımının detaylı hidrokarbon analizi ile araştırılması amacıyla petrol içeren Busshnell-Hass besiyerine *K. pneumoniae* suşunun ekimi yapıldı. İnkübasyon 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde, 7 gün olacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası petrol DCM (1:2) ile kültür ortamından ekstrakte edildi. GC analizi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Petrol Araştırma Merkezi tarafından, 30m x 0,25 mm x 0,25 um (Uzunluk x çap x film kalınlığı) kolonun takıldığı gaz kromatografisi cihazı (TRB-1 Shimadzu

GCMS-QP-2020) ile gerçekleştirildi. 1 µl numune GC cihazına enjekte edilerek, enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Sıcaklık programı: 40 °C 5 dakika bekledi, dakikada 8 °C artışla 180 °C' ye çıktı ve 5 dakika bekledi, dakikada 10 °C artışla 320 °C' ye çıktı ve 16 dakika bekledi.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Günümüzde petrol hidrokarbonları en önemli çevre kirleticilerinin başında yer almaktadır. Petrol ve petrol ürünlerinin araştırılması, üretimi, rafine edilmesi, taşınması ve depolanması sırasında meydana gelen çeşitli sızıntılar ve dökülmeler, ekosistem için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Her yıl 200.000 - 2.000.000 ton arasında değişmekle birlikte ortalama 600.000 tonluk saf petrol sızıntısı olduğu bilinmektedir [102, 106]. İnsan faaliyetleri ya da kaza sonucu meydana gelen bu petrol sızıntıları su ve toprakta meydana gelen kontaminasyonların en önemli nedenlerinin başında yer almaktadır. Özellikle toprağın petrol hidrokarbonları ile kontamine olması neticesinde çeşitli hayvanlarda ve bitkilerde ölüm ya da mutasyonlar gibi çok ciddi hasarlar meydana gelmektedir [8]. İnsan vücudunun uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlarda petrole maruz kalması da, karaciğer ve böbrek hastalıklarının gelişmesine, muhtemel kemik iliği hasarına ve kanser riskinin artmasına neden olmaktadır [78]. Bu nedenle petrol gibi organik kirleticilerin çevreden uzaklaştırılmasında; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere çeşitli teknolojik temizleme yöntemleri bulunmaktadır. Ancak bu teknolojik yöntemlerin bir kısmı oldukça pahalı, zaman alan ve kirleticinin eksik biyoyıkımına neden olan süreçlerdir. Özellikle son yıllarda polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ile kontamine olmuş alanların, gelişen biyoteknolojik yöntemler ile detoksifiye edilmesi büyük önem kazanmıştır. Kontamine olmuş bölgelerin temizlenmesinde mikrobiyal dönüşüm veya mikrobiyal biyoyıkıma dayalı olan biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) süreci en etkili yöntemlerin başında yer alır [107]. Biyoremediasyon; diğer remediasyon teknolojileri ile karşılaştırıldığında, farklı metabolik özelliklere sahip mikroorganizmalar ile özellikle petrol endüstrisi ürünlerini içeren çok sayıda organik kirleticinin CO₂, su ve metana kadar biyoyıkıma uğratıldığı uygun maliyetli önemli bir süreçtir [108].

Petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak, biyoyıkım gerçekleştirebilen mikroorganizmalar oldukça geniş çeşitliliğe sahiptir. Petrol veya petrol ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen mikroorganizmaların çeşitliliği; bölgenin coğrafik ve ekolojik şartlarına göre değişiklik göstermektedir. Çok sayıda araştırmacı bölgeye özgü mikroorganizmaların petrol kirleticilerinin biyoyıkımında daha etkili olduklarını göstermişlerdir [109]. Bu doğrultuda, çalışmamızda, petrol sahasına ait ham petrol, sondaj çamuru ve atık çamur çukurunda bulunan çeşitli mikroorganizmaların izolasyonu ve

tanımlanması amaçlandı. İzolasyonu gerçekleştirilen söz konusu bu mikroorganizmaların petrol biyoyıkımları karşılaştırılarak en etkili bakterilerin belirlenmesi ve bu bakteriler ile petrol biyoyıkımının veriminin artırılması hedeflendi. Bunlara ek olarak, laboratuvar koşullarında gerçekleşen bu çalışmanın çevreye uygulanabilirliğinin gösterilmesi açısından, toprak ve deniz gibi doğal ortamlardan alınan numunelerde de petrol biyoyıkımları araştırıldı.

4.1. Çalışmada Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması

Petrol ile kontamine alanlardan izole edilen endojen mikroorganizmalar sahip oldukları çevresel adaptasyonlar sebebiyle petrol ile ilişkili kontaminasyonların biyoremediasyonunda oldukça önemli bir role sahiptirler. Literatürde, *Pseudomonas sp.* [110], *Pseudomonas aeruginosa* [72], *Bacillus sp.*, *Moraxella sp.* [111], *K. pneumoniae* [79], *Corynebacterium sp.* [6], *Micrococcus sp.* [80], *Flavobacterium sp.* [112], *Alcaligenes sp.* [71], *Chromobacterium sp.* [113], *Bacillus lichneniformis* [77], *Acinetobacter calcoaceticus* [102], *Bacillus cereus* [114], *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* [81] gibi çeşitli bakteriler ile *Aspergillus niger* [115], *Phanerochaete sp.* [116] gibi çeşitli fungusların petrol ve petrol ile kontamine olmuş sucul ve karasal ekosistemlerden izole edildikleri belirtilmektedir.

Çalışmamızda aynı petrol sahasına ait ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen mikroorganizmalardan 8 farklı bakteri türü ve 1 alt tür olmak üzere toplam 12 bakteriyel tür 16S ribozomal RNA analizi ile genotipik olarak tanımlandı. Söz konusu türlerin referans oldukları ATCC suşlarına % 99 oranında benzerlikleri Çizelge 4.1' de, bakteriyel türler arasındaki filogenetik ilişki Şekil 4.1' de gösterildi.

Petrol, mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen zengin hidrokarbon içeriğine sahip ve karmaşık yapıdaki organik bir bileşiktir. Bu bağlamda, çalışmamızda; mikrobiyal izolasyon amaçlı kullanılan petrol numunesinden *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* *Bacillus subtilis* ve *Enterococcus faecalis* olmak üzere dört farklı bakteriyel tür izole edilerek tanımlandı. Atık çamur çukuru; atık sondaj çamuru, çeşitli makine yağları ve petrol sahasına ait diğer atıkların geçici olarak depolandığı büyük hacimli alanlardır. Çalışmamızda; *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* suşları atık çamur çukurundan izole edilerek tanımlanan mikroorganizmalar arasındadır. Sondaj çamuru, mikroorganizmalar tarafından karbon ve sülfat kaynağı olarak kullanılan

zengin içeriğe sahip ve önceden paketlenmiş toz halindeki karışımlardır. Çalışmamızda sondaj çamurundan *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Enterobacter cloacae* olmak üzere beş farklı tür izole edilerek tanımlandı. Çalışmamızda, her üç numuneden izole edilen mikroorganizmalar incelendiğinde *Bacillus sp.*'nin oldukça baskın olduğu belirlendi. Literatürde, Gram pozitif bakterilerden *Bacillus sp.*'nin yüksek oranda petrol ile kontamine olmuş topraklarda oldukça baskın olmasının, hidrokarbonların toksik etkilerine karşı dirençli olmasını sağlayan endosporları üretme yeteneğinden kaynaklandığı belirtilmektedir [78].

Petrol sahalarında, yüksek maliyete sahip sondaj çamuru ile günlük ve endüstriyel yaşamda önemli bir enerji kaynağı olan petrolün mikroorganizmalar tarafından bozunması petrol ve doğaz gaz endüstrisi açısından büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Petrol sahalarında, çeşitli bakterisidal ajanların gerekli mikrobiyolojik analizler yapılmadan kullanımı, petrol ve sondaj çamurunda istenmeyen mikrobiyal bozunmanın önüne geçmemektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda petrol sahasının farklı kısımlarından izole edilen suşların tanımlanması petrol endüstrisi açısından da oldukça önemlidir. Tanımlanan tüm mikroorganizmalara karşı uygun bakterisidal ajanların geliştirilmesi ve kullanılması, söz konusu ekonomik kayıpların önüne geçecektir.

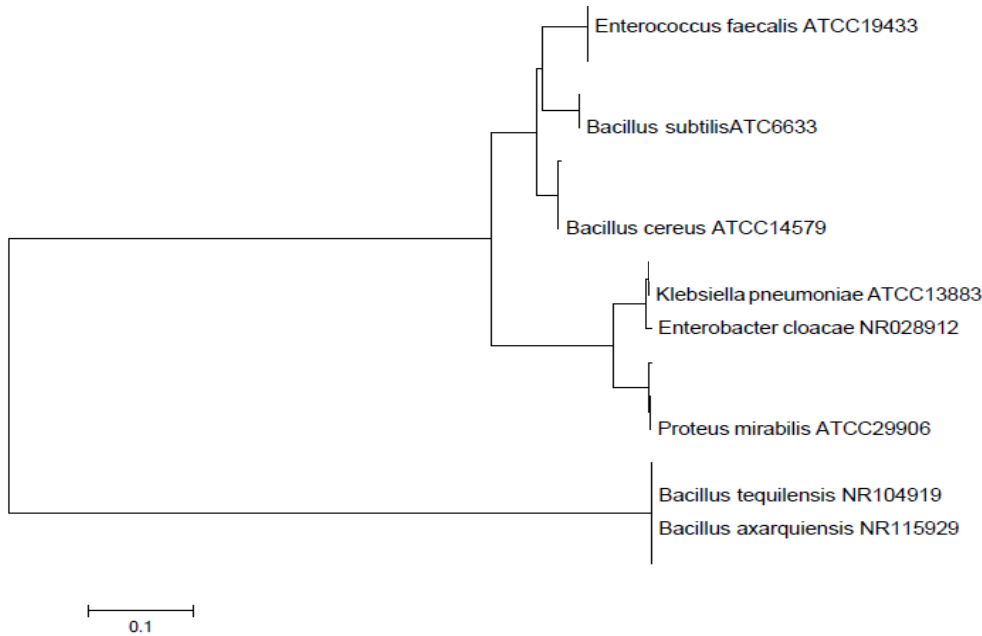
İzole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel türler ayrı ayrı incelendiğinde, özellikle Gram pozitif bakteri popülasyonunun Gram negatif bakteri popülasyonuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi. Literatürde, Gram pozitif bakterilerin kompleks yapıdaki hidrokarbonlara ait oksidasyon ürünlerinin biyoyıkımında oldukça etkin oldukları belirtilmektedir [79]. Gram pozitif bakterilerin sahip olduğu güçlü yapıdaki hücre duvarı ile yüksek sıcaklık ve ozmotik basınç gibi olumsuz çevre koşullarına, Gram negatif bakterilere kıyasla daha kolay adapte olabilirler [117]. Ancak literatürde, çeşitli petrol ve petrol ürünlerinden izole edilen mikroorganizmalardan, Gram negatif veya Gram pozitif bakterilerin baskın olduğu farklı çalışmalar belirlendi [118].

Çalışmamızda; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının ham petrol ve çamur çukuru numunelerinden; *Proteus mirabilis* türünün ham petrol ve sondaj çamuru numunelerinden ortak izole edilen bakteriyel suşlar olduğu belirlendi. *Klebsiella*

pneumoniae, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis* ve *Enterobacter cloacae* suşlarının ise yalnızca sondaj çamuru numunesinden izole edildikleri tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan mikroorganizmalar

Suş numarası	Mikroorganizmalar	İzole edildiği numune	Referans Suşlar
P1	<i>Bacillus cereus</i>	Petrol	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579
P2	<i>Proteus mirabilis</i>	Petrol	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC29906
P3	<i>Bacillus subtilis</i>	Petrol	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633
P4	<i>Enterococcus faecalis</i>	Petrol	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433
ÇÇ1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	Çamur çukuru	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC19433
ÇÇ2	<i>Bacillus cereus</i>	Çamur çukuru	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579
ÇÇ3	<i>Enterococcus faecalis</i>	Çamur çukuru	<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC19433
SÇ1	<i>Proteus mirabilis</i>	Sondaj çamuru	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC29906
SÇ2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sondaj çamuru	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883
SÇ3	<i>Bacillus tequilensis</i>	Sondaj çamuru	<i>Bacillus tequilensis</i> NR104919
SÇ4	<i>Bacillus axarquiensis</i>	Sondaj çamuru	<i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929
SÇ5	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sondaj çamuru	<i>Enterobacter cloacae</i> NR028912



Şekil 4.1. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel suşlara ait filogenetik analizi

Literatürde, petrol biyoyıkımının araştırılmasında kullanılan mikroorganizmaların genellikle petrol ile kontamine olmuş toprak ve deniz gibi çeşitli karasal ve sucul ekosistemlerden izole edildiği belirlendi. Çalışmamızda ise benzer çalışmalardan farklı olarak, petrol sahasında bulunan ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamuru olmak üzere üç farklı numuneden izole edilerek tanımlanan bakteriyel türler ile petrol biyoyıkımının araştırılması hedeflendi. Çok sayıda farklı bakteriyel türün izole edildiği söz konusu bu numunelerin biyoremediasyon çalışmalarında mikroorganizmaların izolasyonu için kullanılan petrol ile kontamine topraklara alternatif olabileceği sonucuna varıldı. Çalışmamızda çok sayıda farklı tür ile çalışılmasının, petrol biyoyıkımının artırılması açısından avantajlı olacağı öngörüldü.

4.2. Petrol Biyoyıkımı için Uygun Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Petrol, alifatik ve aromatik fraksiyonlardan oluşmuş hidrokarbon karışımıdır [119]. Hidrokarbonlar, ağır metaller, herbisitler ve pestisitler en önemli çevre kirleticilerinin başında gelmektedir [78]. Petrolün çevreden uzaklaştırılmasında; fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal yöntemler organik kirleticilerin tamamen ayrışmasına olanak sağlamamalarının yanında oldukça maliyetli yöntemlerdir. Ancak biyolojik iyileştirme; petrol endüstrisi ürünleri dâhil çok sayıdaki çevre kirleticisinin farklı metabolik kapasitelere sahip mikroorganizmalar ile tamamen ortadan kaldırıldığı ya da toksik olmayan ürünlere dönüştürüldüğü oldukça uygun maliyetli önemli süreçlerdir [71]. Petrol, farklı çevresel koşullara adapte olmuş çeşitli mikroorganizmalar tarafından biyoyıkıma uğratılabilmektedir [31]. Bakteriler, petrol biyoyıkımındaki en etkili ajanlar olmasına karşın; fungusların da rekalsitrant polimerler ve ksenobiyotik maddelerin geri dönüşümünde anahtar rol oynadıkları bilinmektedir [63].

Literatürde, çeşitli petrol ile kontamine olmuş bölgelerden; *Klebsiella pneumoniae* [79, 108, 120], *Pseudomonas putida* [119], *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* [31], *Enterococcus faecalis* [75], *Bacillus cereus* [121], *Bacillus licheniformis* [77], *Bacillus pumilus* [120], *Enterobacter aerogenes* [81], *Bacillus subtilis* [114], *Acinetobacter calcoaceticus* [102], *Acinetobacter lwoffii* [72] gibi çeşitli bakteriyel türler ile *Aspergillus versicolor* [101] ve *Penicillium sp.* [122] gibi çeşitli fungusların izole edildikleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamurundan uygun koşullarda izolasyonu gerçekleştiren ve tanımlanan tüm bakteriyel suşların biyoyıkım etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla farklı yöntemler bir arada kullanıldı. Bu bağlamda; kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemlerin yanından bakterilerin petrol içeren ortamlardaki üreme yoğunlukları belirlendi. Çok sayıdaki çalışmada, mikroorganizmaların hidrokarbon parçalama yeteneklerinin belirlenmesinde üremeler göz önüne alınmaktadır [108]. Çalışmamızda mikrobiyal biyoyıkımın ön araştırılmasında kolorimetrik yöntem kullanılırken, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemler ile petrol biyoyıkımları desteklendi.

Ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan suşların öncelikle petrol içeren ortamlardaki üreme yoğunlukları incelendiğinde, *K. pneumoniae* (SÇ2), *B. tequilensis* (SÇ3), *B. axarquiensis* (SÇ4), *E. cloacae* (SÇ5), ve *E. faecalis* (P4, ÇÇ3)' in yüksek üreme yoğunluklarına sahip oldukları belirlendi (Çizelge 4.2). Literatürde, özellikle petrol biyoyıkım kapasitesine sahip olan bakterilere ait hücre sayısındaki artışın petrol biyoyıkımı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir [78].

Çizelge 4.2. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların petrol içeren ortamdaki üreme yoğunlukları

Üreme	OD (600nm)	Suşlar	Üreme oranları
Yüksek Üreme	≥1.0	<i>Enterococcus faecalis</i> (P4, ÇÇ3) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (SÇ2) <i>Bacillus tequilensis</i> (SÇ3) <i>Bacillus axarquiensis</i> (SÇ4) <i>Enterobacter cloacae</i> (SÇ5)	% 50
Orta Üreme	0.5 – 1.0	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizeni</i> (ÇÇ1)	% 8.4
Düşük Üreme	0.1 – 0.5	<i>Proteus mirabilis</i> (P2, SÇ1) <i>Bacillus subtilis</i> (P3)	% 25
Üreme Yok	0	<i>Bacillus cereus</i> (P1,ÇÇ2)	% 16.6

P: Petrol, ÇÇ: Çamur Çukuru, SÇ: Sondaj Çamuru

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır.

Tüm bakteriyel suşlara ait üreme yoğunluklarının belirlenmesinin ardından, bakterilerin petrol biyoyıkımlarının ön araştırılmasında 2,6-dikloro fenol indofenol (DCPIP) redoks indikatörü kullanıldı. DCPIP redoks indikatörü ve petrol içeren üretim ortamında meydana gelen renk değişikliği veya renksizleşme, bakterinin petrol veya çeşitli hidrokarbonları biyoyıkıma uğratma yeteneğini göstermektedir [78]. Bu bağlamda, çalışmamızda kolorimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımındaki en etkin suşların; petrol ve çamur çukurundan izole edilen *E. faecalis* (P4, ÇÇ3) ile sondaj çamurundan izole edilen *B. axarquiensis* (SÇ4) *Klebsiella pneumoniae* (SÇ2), *B. tequilensis* (SÇ3) ve *E. cloacae* (SÇ5) olduğu belirlendi. (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların kolorimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımı

Üreme	% Biyoyıkım	*Suşlar	Suşların petrol biyoyıkım oranları
Yüksek Biyoyıkım	% 30 - % 50	<i>Enterococcus faecalis</i> (P4, ÇÇ3) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (SÇ2) <i>Bacillus tequilensis</i> (SÇ3) <i>Bacillus axarquiensis</i> (SÇ4) <i>Enterobacter cloacae</i> (SÇ5)	% 50
Düşük Biyoyıkım	% 0 - % 10	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizeni</i> (ÇÇ1) <i>Proteus mirabilis</i> (P2, SÇ1) <i>Bacillus subtilis</i> (P3)	% 25
Biyoyıkım Yok	% 0	<i>Bacillus cereus</i> (P1,ÇÇ2)	% 25

P: Petrol, ÇÇ: Çamur Çukuru, SÇ: Sondaj Çamuru

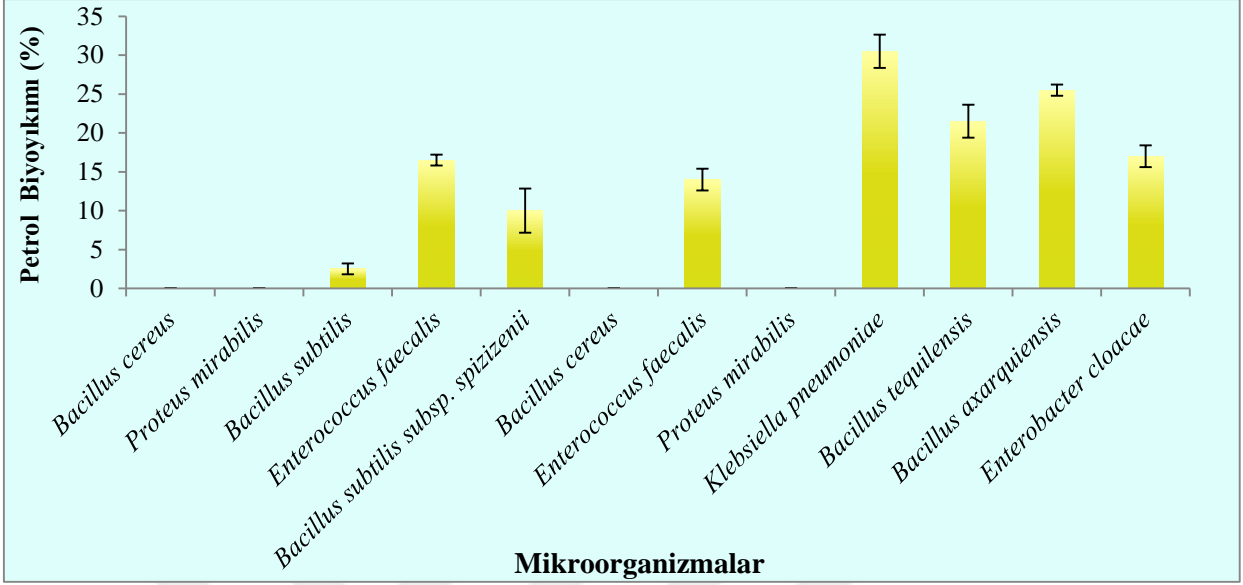
*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır.

Literatürde, benzer bir çalışmada hidrokarbon ile kontamine olmuş alanlardan izole edilen ve tanımlanan 17 bakteriyel türden yalnızca 6 türün, petrol ve dizel bulunan ortamdaki 5 günlük üretimleri sonunda DCPIP redoks indikatöründe renk değişimi meydana getirdikleri belirtilmektedir [123]. Bir diğer çalışmada ise, DCPIP redoks indikatöründe meydana gelen renk değişikliği ile 148 bakteri türünden 128 suşun dizel yakıtı ve 115 suşun fenantren

hidrokarbonunu biyoyıkıma uğratabildikleri gösterilmiştir [124]. Çalışmamızda, karbon kaynağı olarak yalnızca petrol bulunan üretim ortamında, suşların 7 günlük inkübasyon sonunda, DCPIP redoks indikatöründe meydana gelen renk değişiminin en fazla olduğu ve yüksek üreme oranına sahip bakteriyel suşun *B. axarquiensis* olması, söz konusu suşun petrol biyoyıkım çalışmalarında da etkin olabileceği belirlendi. Ek olarak, yüksek üreme yoğunluklarına sahip *E. faecalis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* ve *B. tequilensis* suşlarının üretim ortamlarında meydana getirdikleri renk değişimleri ile bu suşların da petrol biyoyıkımında etkili olabilecekleri saptandı.

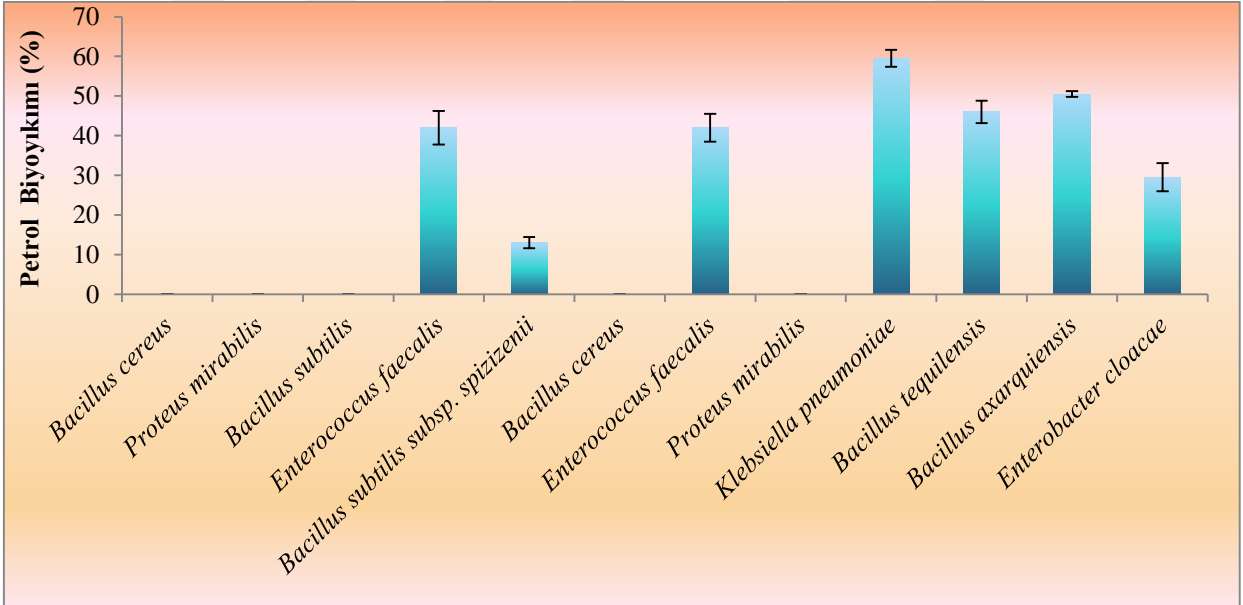
Tüm suşların petrol içeren ortamdaki üreme yoğunluklarının belirlenmesi ve petrol biyoyıkımlarının kolorimetrik yöntem ile ön değerlendirilmesinin ardından; suşların petrol biyoyıkımları spektrofotometrik yöntem ile araştırıldı. Bu yöntem ile en yüksek petrol yıkımının sondaj çamurundan izole edilen *K. pneumoniae*' ye ait olduğu belirlenirken; *B. axarquiensis*, *Bacillus tequilensis*, *E. cloacae*, *E. faecalis*, ve *B. subtilis* gibi tüm mikroorganizmaların farklı oranlardaki petrol biyoyıkımları belirlendi (Şekil 4.2). İzole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel suşların % 65' inden fazlası ile farklı oranlarda petrol biyoyıkımı belirlendi. Literatürde; petrol ile kontamine olmuş topraktan izole edilen mikroorganizmalara ait karışık kültürün 20 günlük üretimi sonunda spektrofotometrik analiz ile % 78 oranında petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri belirlendi [112].

Tüm bakteriyel suşlara ait petrol biyoyıkım oranlarının kolorimetrik ve spektrofotometrik yöntemler ile belirlenmesinin ardından, suşların petrol biyoyıkım oranları gravimetrik yöntem ile de değerlendirildi. Spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemlerin kullanıldığı mikrobiyal biyoyıkım çalışmalarında, her iki yöntem ile gerçekleştirilen biyoyıkım sonuçlarında küçük oranlarda farklılıklar görülmesi, söz konusu yöntemlerin farklı hassasiyetlerde olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, her iyi yönteme ait sonuçlarda % 10 ve üzerinde bir farkın olması olası bir sonuç olarak değerlendirilmektedir [125]. Kolorimetrik ve spektrofotometrik sonuçlara paralel olarak gravimetrik yöntem ile en yüksek biyoyıkım oranları; sondaj çamurundan izole edilen *K. pneumoniae* (% 59,5), *B. axarquiensis* (% 50,5), *B. tequilensis* (% 46), *E. cloacae* (% 29,5) ile ham petrol ve atık çamur çukurundan izole edilen *E. faecalis* (% 42) ile elde edildi (Şekil 4.3.). Bakterilerin petrol biyoyıkımlarındaki farklılık, sahip oldukları biyoyıkım metabolizmasında rol oynayan farklı enzimlerden kaynaklanmaktadır [113, 117].



Şekil 4.2. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan tüm bakteriyel suşların spektrofotometrik yöntem ile petrol biyoyıkımları

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Ham petrol, atık çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan bakteriyel suşların gravimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımı

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

Petrol biyoyıkımının belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntemin, çalışmamız kapsamında kullanılan petrol numunesinin viskozitesinden olumsuz yönde etkilendiği, bu

nedenle çalışmamızın devamında kullanılmak üzere farklı bir yöntemin seçilmesinin uygun olacağı sonucuna varıldı. Sonuç olarak; kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemler ile tüm bakteriyel suşların petrol biyoyıkım oranları değerlendirildiğinde; gravimetrik yöntemin petrol biyoyıkımında kullanılacak en etkin yöntem olduğu ve ileri optimizasyon çalışmalarına da bu yöntem ile devam edileceği belirlendi.

Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının petrol biyoyıkımlarının gaz kromatografisi (GC) analizi ile belirlenmesi amacıyla, söz konusu suşların petrol içeren ortamda 30 °C’ de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda kültür ortamından ekstrakte edilen petrol ile biyoyıkıma tabii tutulmamış 1. gün petrol numunesi uygun koşullarda GC cihazında (Agilent Technologies 7890B) analiz edildi. Böylece her iki suşa ait kültür ortamından ekstrakte edilen petrol oranı, 1. güne ait petrol oranı ile karşılaştırıldı. Bu doğrultuda; *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ile gerçekleştirilen 7 günlük inkübasyon sonunda petrolün içeriğini oluşturan hidrokarbonlarda meydana gelen % azalma belirlendi. Gravimetrik analiz sonucunda petrol biyoyıkımında etkili olduğu belirlenen *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarına ait gaz kromatografisi analiz sonuçları incelendiğinde *K. pneumoniae* için % 40 ve *B. axarquiensis* için % 41 oranında petrol biyoyıkım oranları belirlendi.

Üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım oranları incelenen tüm bakteriyel suşlar arasında, petrol biyoyıkımını en etkin şekilde gerçekleştiren suşların ham petrol ve çamur çukurundan izole edilen *E. faecalis* ile sondaj çamurundan izole edilen *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* olduğu belirlendi. Sondaj çamurunun içeriğini oluşturan çok çeşitli hidrokarbonlar ve sürfektanlar mikrobiyal popülasyonu ve mikroorganizmaların biyoyıkım etkinliklerini desteklenmektedir. Bu doğrultuda, diğer bakteriyel türlere göre sondaj çamurundan izole edilen mikroorganizmaların petrol biyoyıkımında neden daha etkin olduklarını açıkça göstermektedir [118]. Çok sayıda ve çeşitli hidrokarbonlardan oluşmuş karmaşık yapıdaki petrolde gravimetrik analiz ile % 50’ nin üzerinde biyoyıkım etkinliği gösteren *K. pneumoniae* (SÇ2) ve *B. axarquiensis* (SÇ4) türleri çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçildi. Seçilen suşların henüz optimize edilmemiş koşullar altında bile % 50’ den fazla biyoyıkım yeteneğine sahip olmaları dikkat çekti. Literatürde, *B. axarquiensis* (SÇ4) suşu ile

gerçekleştirilmiş petrol biyoyıkım çalışmasına rastlanmadığı göz önüne alındığında, söz konusu bakteriyel türün biyoremediasyon çalışmalarına alternatif olacağı sonucuna varıldı.

4.3. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması

Petrol önemli bir enerji kaynağı olmakla birlikte en önemli çevre kirleticilerinin de başında yer almaktadır. Özellikle sızıntıya neden olan petrol kuyuları, atık petrol ürünlerinin toplandığı alanlar, terk edilmiş petrol rafineri alanları, boru hatlarından meydana gelen çatlaklar, fosil yakıtların eksik yanması gibi yanlış uygulamalar ve ihmaller, petrol hidrokarbonlarının yüzey ve yer altı suları ile toprakta önemli oranda kirlenmeye yol açmaktadır. Oldukça geniş alanlara yayılan petrol bileşenlerinin toksik, mutajenik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle çevre ve canlılar açısından endişe uyandırmaktadır. Petrolün tamamen çevreden uzaklaştırılması, sınırlandırma veya toplanma gibi çeşitli geleneksel iyileştirme yöntemleri ile mümkün olmamaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal biyoyıkım petrol ile kontamine olmuş alanların temizlenmesindeki en önemli süreçtir. Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı; sıcaklık, pH, tuz, oksijen içeriği, petrol konsantrasyonu, besin konsantrasyonu, C/N oranı gibi çeşitli koşullara, mikroorganizmaların metabolik kapasitesi ve biyosürefektan üretme yeteneği gibi farklı parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [71, 111].

Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin en yüksek petrol biyoyıkımını gerçekleştirdikleri uygun fizyolojik koşulların belirlenmesi amacıyla; uygun başlangıç pH değeri, çalkalamalı ve statik inkübasyon koşulları, petrolün farklı konsantrasyonları, kültürlerin farklı konsantrasyonları, farklı sıcaklık değerleri ile farklı inkübasyon süreleri gibi çeşitli parametrelerin petrol biyoyıkımına etkileri araştırıldı.

4.3.1. Uygun Başlangıç pH Değerinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

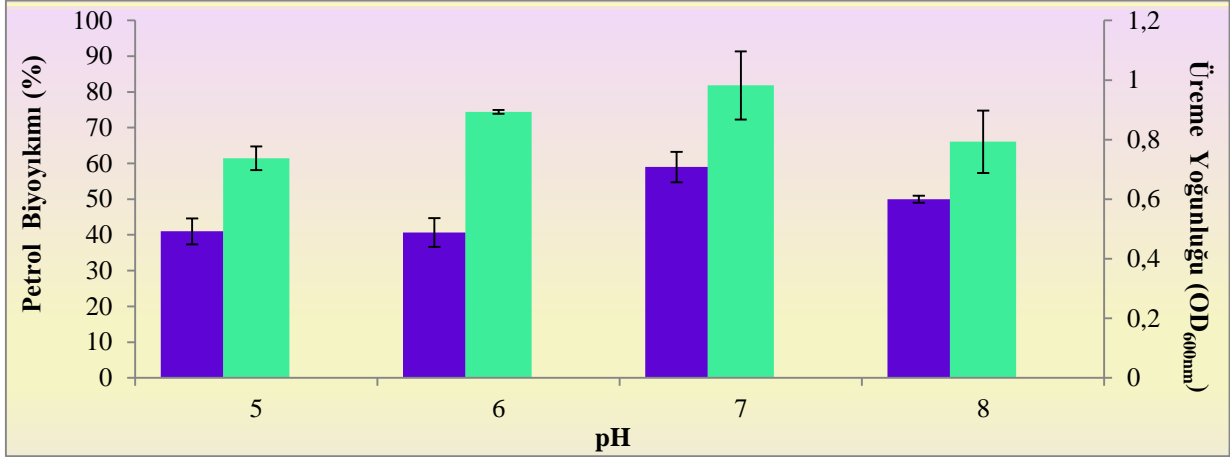
Petrol biyoyıkımı üzerinde etkili olan fiziksel faktörlerden biri olan pH oldukça önemli role sahiptir. Petrol biyoyıkımında heterotrofik bakterilerin çoğu ve funguslar nötral pH' yı tercih etmelerine rağmen, fungusların asidik koşullara daha toleranslı olduğu bilinmektedir. Özellikle ekstrem pH koşulları mikrobiyal popülasyonun petrol biyoyıkımına negatif etki göstermektedir [71]. Sucul sistemlerin aksine toprağın pH' sı oldukça geniş çeşitlilik

göstermektedir. Toprakta mikrobiyal aktivite için gerekli olan pH aralığının 5,5 - 8,8 arasında olduğu bilinmektedir. Petrol biyoyıkımı için ise gerekli olan optimal pH aralığının 6,5 - 8,0 olduğu belirtilmektedir [4].

Çalışmamızda, petrol biyoyıkımı için uygun başlangıç pH değerinin belirlenmesi amacıyla *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin 5,0 ve 8,0 arası değişen pH' larda hazırlanan ve petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin pH 5 ile pH 8 aralığında % 40 ve üzerinde petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri saptandı. Her iki tür için en yüksek petrol biyoyıkımının gerçekleştiği pH değerinin 7 olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). *K. pneumoniae* türünün pH 7' de % 59 oranında ve *B. axarquiensis* türünün % 55 oranında petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri belirlenmiş oldu. *K. pneumoniae*' ye ait üreme yoğunluğunun pH 7' de en yüksek olduğu bulunurken, söz konusu pH değerinin altındaki ve üstündeki pH değerlerinde ise üreme yoğunluklarında azalma görüldü (Şekil 4.4). *B. axarquiensis* için pH 5 ve pH 7 aralığında üreme yoğunluklarında önemli bir değişim gözlenmezken, pH 8 değerinde ise üreme yoğunluğunda azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.5). *B. axarquiensis*' in pH 7' de daha düşük üreme yoğunluğuna rağmen yüksek biyoyıkım gerçekleştirebiliyor olması, söz konusu türün hidrokarbon biyoyıkımında rol oynayan enzimlerinin pH 7' de aktif olabileceğini gösterdi.

Literatürde, çalışmamıza paralel olarak mikrobiyal petrol biyoyıkımının optimize edildiği farklı çalışmalarda; en etkin petrol biyoyıkımının *P. aeruginosa*, *B. cereus* ve *B. subtilis* türleri için pH 7' de [114], *P. putida* ve *A. lwoffii* için pH 6,5' da; [72], *Streptococcus sp.* ve *Micrococcus sp.* suşları için pH 8' de [126], *Dietzia cinnamomea* için pH 9' da [127] olduğu belirtilmektedir. Çalışmamıza ait sonuçlara paralel olarak literatürdeki çalışmalarda da mikrobiyal petrol biyoyıkım için asidik pH koşullarının uygun olmadığı belirlenirken, petrol ve petrol ürünlerine ait biyoyıkım oranlarının asidik pH' larda oldukça azaldığı gösterilmiştir. Düşük pH koşullarında hidrokarbonların zayıf çözünürlük göstermesinin biyoyıkımı etkilediği belirtilmiştir [128]. Literatürde, pH 7,5 bakteriler ve bakterilere ait karışık kültürler için en uygun pH olarak belirlenmiştir [112]. Çalışmamızda, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait

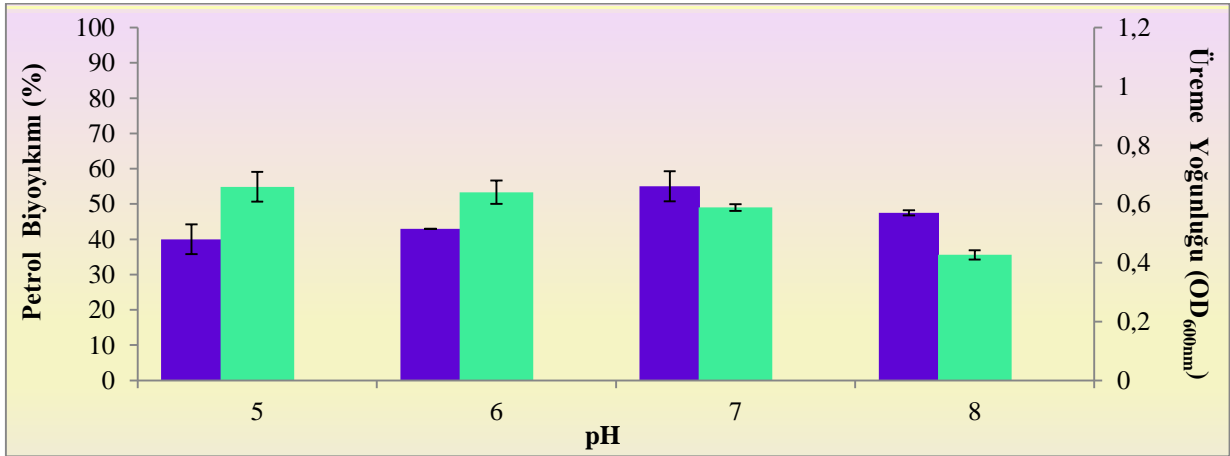
en yüksek üreme yoğunluğu ve petrol biyoyıkımının belirlendiği pH 7 ile ileri optimizasyon çalışmalarına devam edildi.



Şekil 4.4. Farklı başlangıç pH değerlerinin *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkım ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.5. Farklı başlangıç pH değerlerinin *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımına ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.

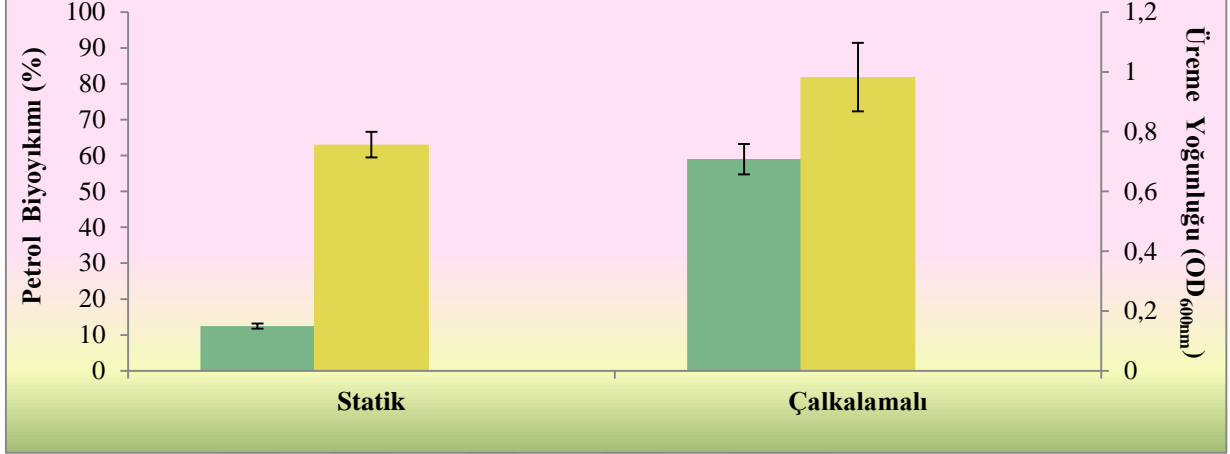
4.3.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı aerobik ve anaerobik koşullarda gerçekleşebilen oldukça önemli bir süreçtir. Ancak mikrobiyal biyoyıkım süreci temel olarak aerobik koşullarda gerçekleşmekle beraber anaerobik süreç ile meydana gelen biyoyıkım çoğunlukla göz ardı edilmektedir [129]. Çalışmamızda, aerobik ve anaerobik üretim süreçlerinin petrol biyoyıkımına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının petrol biyoyıkımına etkilerinin belirlenmesi amacıyla petrol içeren temel besiyerinde *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları, 30 °C’ de, statik ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörlerde üretildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım oranları belirlendi. Çalışmamızda kullanılan *K. pneumoniae*’ nin statik inkübasyon koşulunda % 12,5; çalkalamalı inkübasyon koşulunda % 59 petrol biyoyıkımı gerçekleştirdiği belirlendi. *B. axarquiensis*’ e ait petrol biyoyıkım oranları değerlendirildiğinde, statik inkübasyon sürecinde % 23, çalkalamalı inkübasyon sürecinde ise % 55 oranının petrol biyoyıkımı gerçekleştirildiği saptandı (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). İnkübasyon koşulunda türlerin petrol biyoyıkım oranlarının belirlenmesinin ardından söz konusu suşların aynı koşullardaki üreme yoğunlukları da belirlendi. Her iki türe ait üreme yoğunluklarının statik inkübasyon koşulunda daha düşük olduğu belirlendi. (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Statik inkübasyon koşulunda, *B. axarquiensis*’ e ait üreme yoğunluğundaki azalmaya paralel olarak petrol biyoyıkımının azaldığı gözlemlendi. Çalkalamalı inkübasyon sürecinde ise, her iki türe ait üreme yoğunluklarındaki artışa paralel olarak petrol biyoyoyıkımında da artış belirlendi. Benzer bir çalışmada da; petrol ile kontamine olmuş su örneğinde gerçekleşen aerobik biyoremediasyon hızının anaerobik sürece göre yüksek olduğu belirlenmiştir [129]. Çalkalamalı koşullarda, mikroorganizmanın biyoyıkım sürecinde oldukça önemli rol oynayan oksijenin çözünürlüğü ile mikroorganizmanın oksijeni kullanılabilirliğinin artışına bağlı olarak petrol biyoyıkım hızında artış olmaktadır [130].

Literatürde, çalışmamıza benzer bir çalışmada *K. pneumoniae* ile çalkalamalı inkübasyon sürecinde % 68, statik inkübasyon ile % 62 oranında fenantren hidrokarbonunun biyoyıkımı elde edilmiştir [130]. Bu bağlamda her iki tür için petrol biyoyıkımının belirlenmesinde

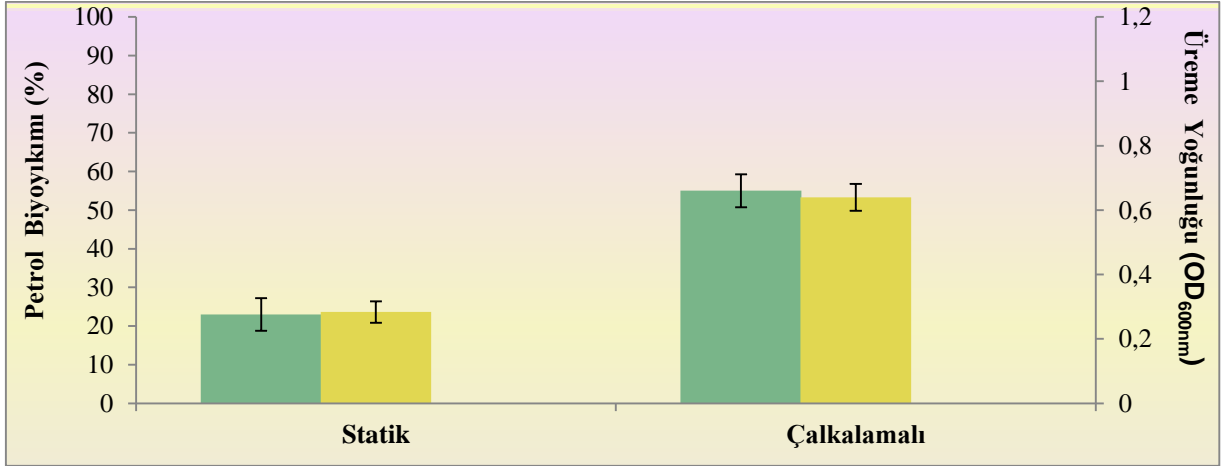
çalkalamalı inkübasyon koşulu tercih edilmelidir. Ancak çalkalamalı koşullarda her iki türe ait petrol biyoyıkım yüzdelerinin statik koşullara göre çok yüksek olduğu gözlenirken, statik koşullarda dahi biyoyıkım sürecinin devam ettiği saptandı.



Şekil 4.6. Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/2 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.7. Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/2 oranında sulandırıldı.

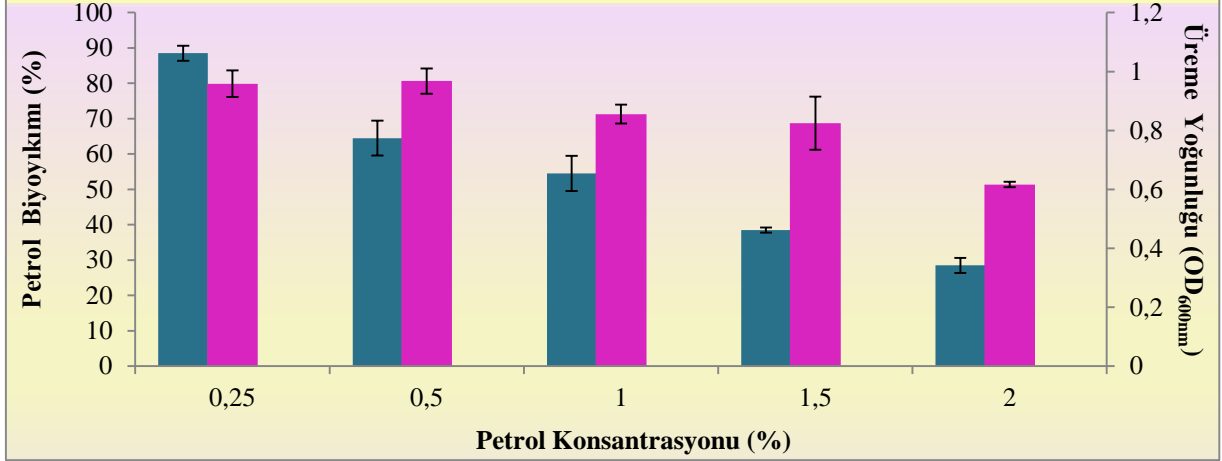
4.3.3. Petrolün Farklı Konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Mikroorganizmalar tarafından petrol hidrokarbonlarının biyoyıkım oranları, petrol gibi karmaşık yapıdaki bir organik substratın çözünebilirliğinin yanında konsantrasyonu ile de yakından ilişkilidir. Düşük konsantrasyonlar mikroorganizma için gerekli olan enerji ve karbon kaynağı açısından yetersiz kalmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki petrolün suda meydana getirdiği ağır ve dağılmayan yağ damlacıkları, mikroorganizmalar için gerekli olan besin ve oksijen sınırlanmasına böylece biyoyıkımında azalmaya neden olurlar [38, 71]. Petrol biyoyıkımının petrol konsantrasyonu ile ters orantı gösterdiği bilinmektedir [112]. Bu nedenle uygun petrol konsantrasyonunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ile petrol biyoyıkımı için en uygun petrol konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda, % 0,25 - % 2 arasında değişen konsantrasyonlarda petrol ilave edilerek pH 7' de hazırlanan temel besiyerinde, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin, 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri saptandı. *K. pneumoniae* için % 88,5 ve *B. axarquiensis* için % 73,5 oranındaki en yüksek biyoyıkım oranlarının % 0,25 petrol konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlendi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri için % 1,5 petrol konsantrasyonunda % 40 civarında petrol biyoyıkımı elde edilirken, söz konusu türlerin % 2 petrol konsantrasyonunda bile petrolü biyoyıkıma uğratabildikleri gösterildi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Özellikle *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' in düşük petrol konsantrasyonlarında oldukça yüksek biyoyıkım gerçekleştirmiş olmalarına rağmen, literatürdeki çalışmalara paralel olarak ileri optimizasyon çalışmalarımıza % 1 petrol konsantrasyonu ile devam edildi.

Üretim ortamlarına eklenen yüksek petrol konsantrasyonunun, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının biyoyıkım etkinliğinde azalmaya neden olmasının yanından söz konusu türlerin üreme yoğunluklarında da azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Özellikle yüksek konsantrasyondaki petrolün sudaki çözünürlüğünün azalması nedeniyle söz konusu türlerin üreme yoğunluklarında azalma gözlemlendi. Bu bağlamda, yüksek petrol konsantrasyonları mikroorganizmalar üzerinde toksik etki gösterebileceği öngörüldü.

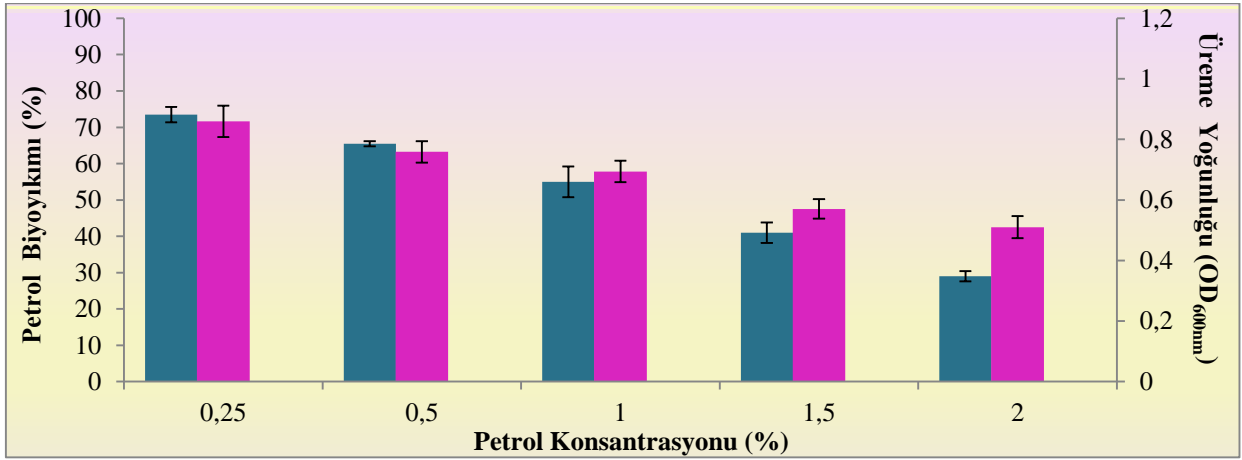
Çalışmamız sonuçlarına paralel olarak yapılan benzer bir çalışmada, yüksek petrol konsantrasyonlarının toprak mikroorganizmalarının metabolik aktivitesinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir [78].



Şekil 4.8. Petrol konsantrasyonunun *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C’ de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.9. Petrol konsantrasyonunun *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C’ de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/5 oranında sulandırıldı.

Petrol konsantrasyonunun biyoyıkım üzerine etkisinin araştırıldığı farklı çalışmalar incelendiğinde; *E. cloacea*' de % 0,25 petrol konsantrasyonunda % 76,3 oranında petrol biyoyıkımı belirlenirken [68] çalışmamızda aynı petrol konsantrasyonunda *K. pneumoniae* için % 88,5 ve *B. axarquiensis* için % 73,5 petrol biyoyıkımları elde edildi. Literatürde beş farklı bakteriden oluşan karışık kültür ile yapılan farklı bir çalışmada ise, üretim ortamındaki % 1 petrol konsantrasyonunun % 10' a arttırılması ile petrol biyoyıkımında azalma olduğu gösterilmiştir [112]. Diğer bir çalışmada ise, üretim ortamındaki petrol oranının % 1'den % 12' ye arttırılması ile mikrobiyal konsorsiyuma ait biyoyıkım oranının % 77' den % 45' e düştüğü belirlenmiştir [41].

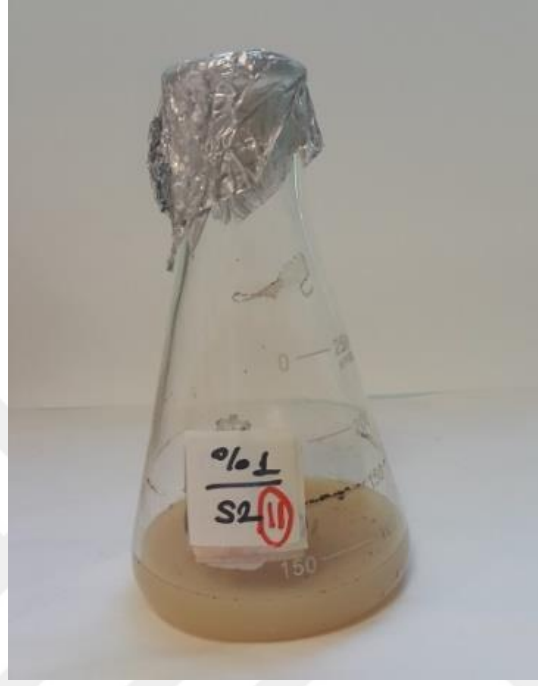
4.3.4. Kültürlerin Farklı Konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Biyolojik iyileştirme tekniğinin uygulanmasındaki en önemli şart, uygun metabolik aktiviteye sahip mikroorganizmaların ortamda bulunmasıdır [71]. Petrol hidrokarbonlarını enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilen ve doğada yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar petrofiller olarak adlandırılmaktadır. Petrofiller, geniş skaladaki hidrokarbonları doğal olarak biyoyıkıma uğratabilen eşsiz mikroorganizmalardır. Özellikle metabolik hızlarının yüksek olması ve çeşitli organik kirleticilerin biyoyıkımı için gerekli olan çok sayıda enzimatik yola sahip olmaları ile bakteriler petrol biyoyıkımında ilk sırada tercih edilmektedir [78]. Bu doğrultuda, çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* gibi bakteriyel türlere ait farklı konsantrasyonların petrol biyoyıkımı üzerine etkileri incelenerek petrol biyoyıkımı için en uygun kültür konsantrasyonun belirlenmesi amaçlandı.

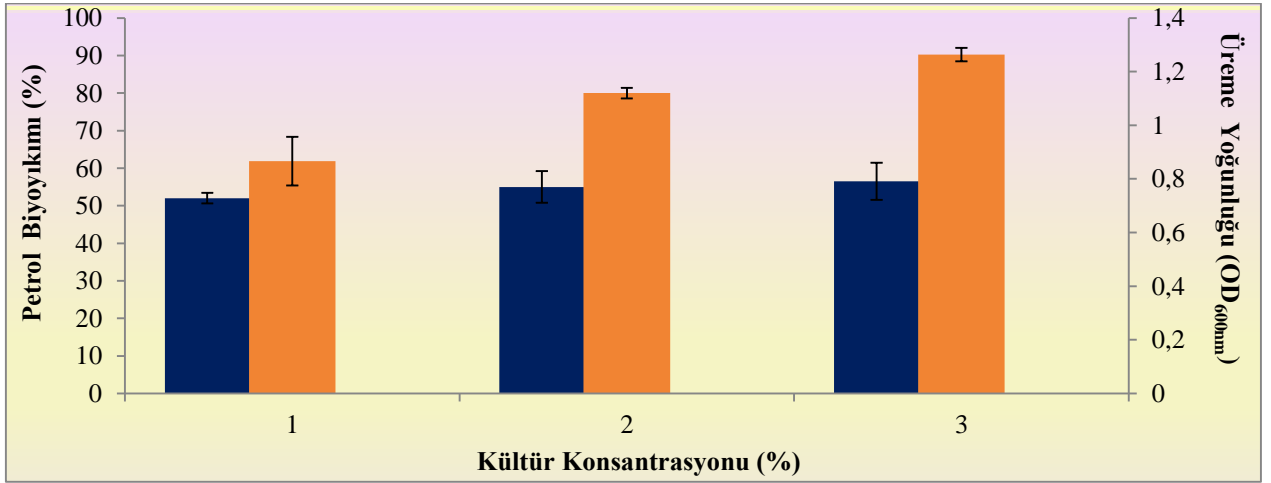
Çalışmamızda, % 1 petrol içeren temel besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait kültürlerin % 1, % 2 ve % 3 oranında ekimleri gerçekleştirilerek, 30 °C'de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi (Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

% 1 kültür konsantrasyonunda *K. pneumoniae* için % 52 ve *B. axarquiensis* için % 55 petrol biyoyıkım oranları elde edildi. Kültür konsantrasyonunun % 1' den % 2' ye arttırılması ile

petrol biyoyıkımında % 4 oranında artış görülürken; % 2 ve % 3 kültür konsantrasyonları arasında petrol biyoyıkımı açısından önemli bir fark görülmedi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



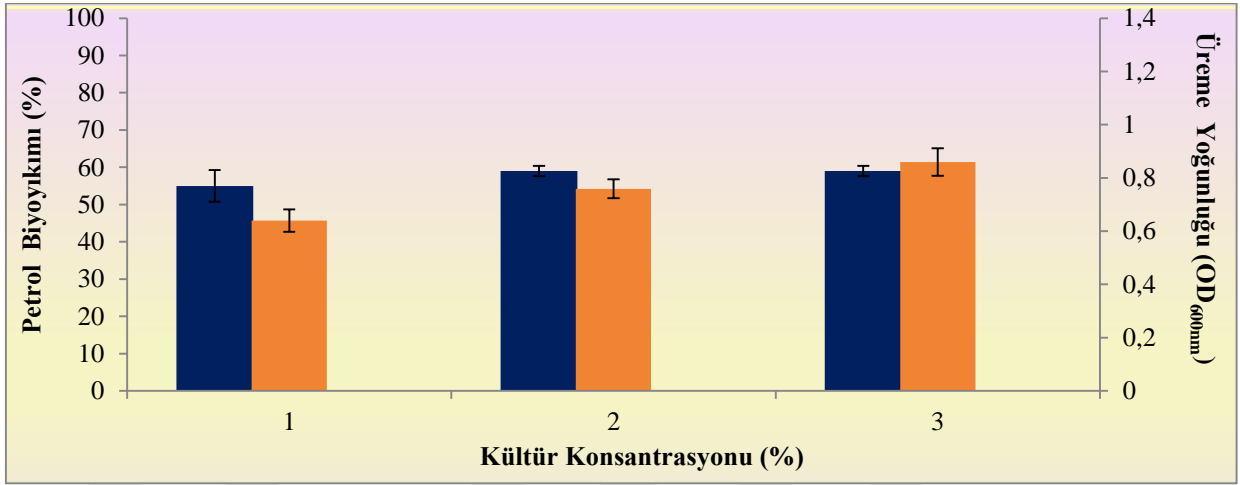
Şekil 4.10. *K. pneumoniae*' ye ait 7 günlük inkübasyon sonucu (% 1 kültür konsantrasyonu)



Şekil 4.11. Kültür konsantrasyonunun *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.12. Kültür konsantrasyonunun *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.

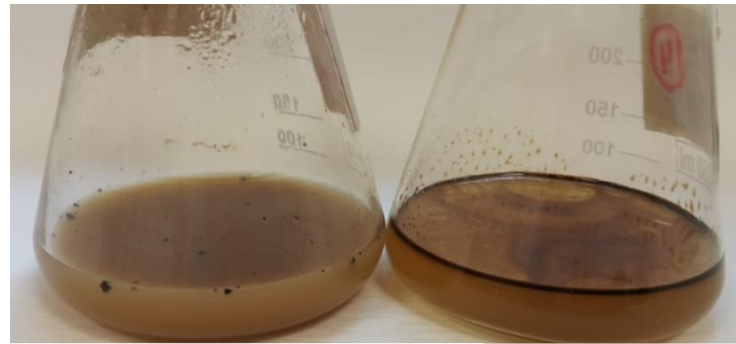
4.3.5. Uygun Sıcaklık Değerinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Sıcaklık, petrolün fiziksel ve kimyasal kompozisyonunu, mikroorganizmaların hidrokarbonları metabolize edebilme hızları ile mikrobiyal topluluğun bileşimi üzerine etki göstermektedir [101]. Sıcaklığın azalması ile petrol yoğunluğu artmakta, böylece düşük moleküler ağırlıklı toksik hidrokarbonların uçuculuğu azalması ile ve biyoyıkımın başlamasında gecikmeye neden olmaktadır. İlave olarak, petrolün sudaki çözünürlüğü ve biyoyararlanımı azalmaktadır. Hidrokarbon biyoyıkımı geniş sıcaklık aralığında gerçekleşmesine rağmen düşük sıcaklık ile beraber genellikle biyoyıkım hızında düşüş gözlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda ise mikrobiyal metabolizma hızı artmakta ve maksimum değere ulaşmaktadır. 30 °C' nin mikrobiyal üreme ve petrol hidrokarbonları biyoyıkımı için en uygun sıcaklık olduğu belirtilmiştir [68, 71].

Çalışmamızda inkübasyon sıcaklığının petrol biyoyıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla petrol içeren temel besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*'e ait kültürlerin ekimleri gerçekleştirilerek, 20 °C – 40 °C arası değişen sıcaklıklar değerlerinde, 150 rpm çalkalama

hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının 25 °C’ de % 65 ve üzerinde petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri belirlendi (Şekil 4.13). Buna ek olarak *K. pneumoniae* türünün 20 °C ile 35 °C aralığında % 55’ in üzerinde, *B. axarquiensis* türünün ise 20 °C ile 35 °C aralığında % 45’in üzerinde petrol biyoyıkım gösterdikleri saptandı. Doğada mezofilik bakteri grubunda yer alan *K. pneumoniae* türü için 40 °C’ de % 45 oranında petrol biyoyıkımı elde edilirken, aynı sıcaklıkta *B. axarquiensis* türünün biyoyıkım etkinliğinde düşüş saptandı. (Şekil 4.14 ve 4.15). Literatürde, optimal sıcaklıklardan daha yüksek sıcaklıklarda hidrokarbonların mikrobiyal membran üzerinde toksik etkiye neden olduğu ve yalnızca alkanları biyoyıkıma uğratabilen termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda etkili olabilecekleri belirtilmektedir [68].

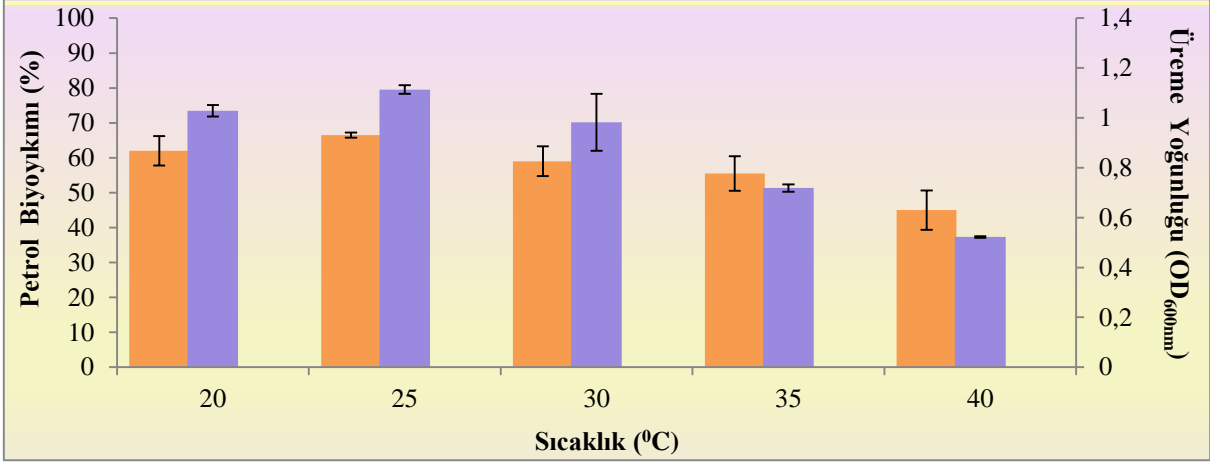
Çalışmada kullanılan *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri için belirlenen en uygun sıcaklık değerinin altındaki ve üstündeki sıcaklık değerlerinde petrol biyoyıkımının azalmasına bağlı olarak üreme yoğunluğunda da azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.14 ve 4.15). Mikroorganizmaların petrol içeren besi ortamına eklenmelerinin ardından üremelerini sürdürerek canlı kalabilmeleri, hidrokarbon biyoyıkımı açısından belirleyici rol oynar [131]. Literatürde çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalarda, optimal petrol biyoyıkım sıcaklıkları *Micrococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* ve *Flavobacterium sp.* türlerine ait karışık kültür için 30 °C [112], *B. cereus* ve *B. subtilis* için 20 °C ve 37 °C [114], bakteriyel konsorsiyum (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.*) için 35 °C [41] olarak belirlenmiştir.



A: İnkübasyon sonrası

B: İnkübasyon öncesi

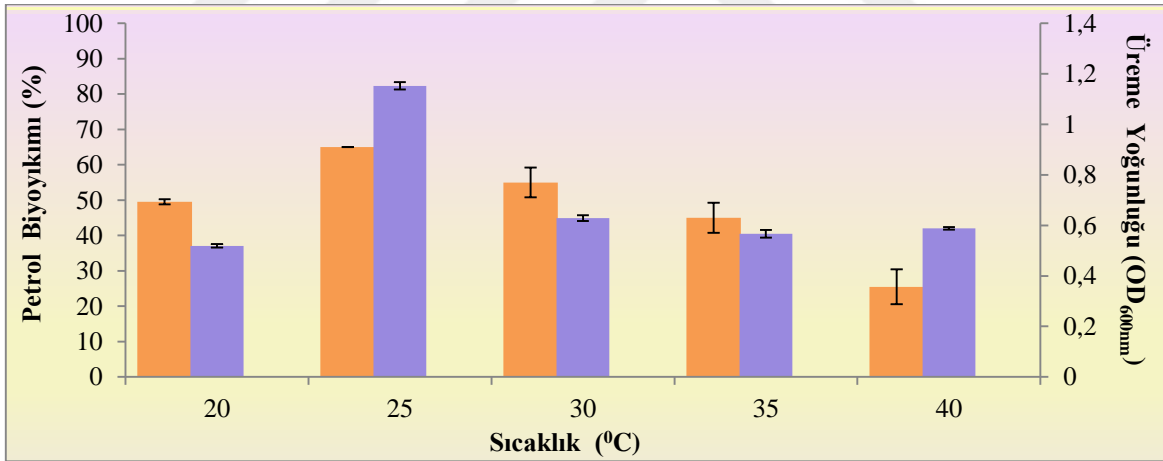
Şekil. 4.13. 25 °C’ de 7 günlük inkübasyon sonunda *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı



Şekil 4.14. Farklı inkübasyon sıcaklık değerlerinin *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.15. Farklı inkübasyon sıcaklık değerlerinin *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında sulandırıldı.

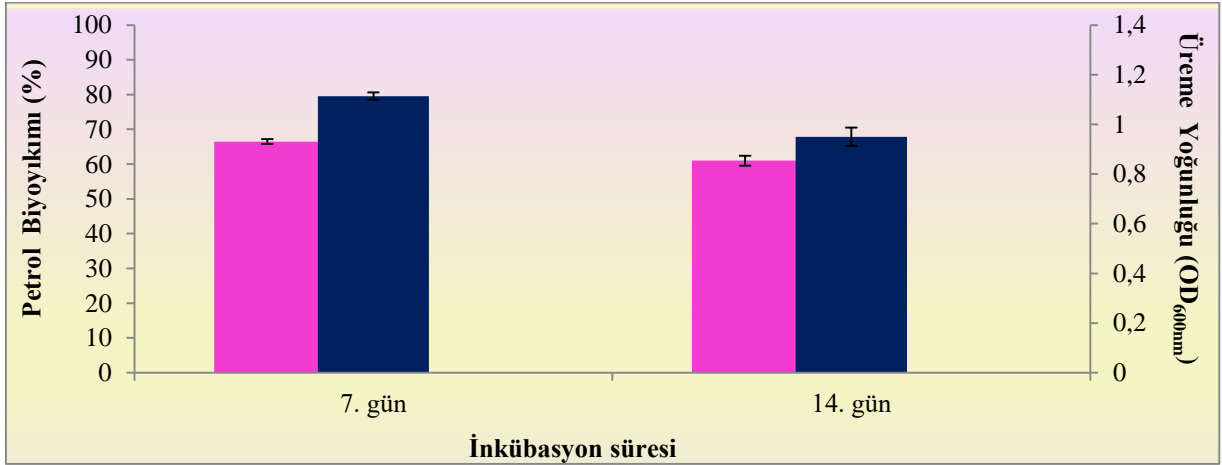
K. pneumoniae' nin 20 °C – 40 °C aralığında, *B. axarquiensis*' in 20 °C – 35 °C aralığında % 45 ve üzeri oranlarda petrol biyoyıkım etkinlikleri göstermeleri; söz konusu türlerin geniş

sıcaklık aralığında enzimatik aktivite gösterebildiklerini böylece doğada farklı sıcaklık koşullarına kolayca adapte olarak biyoremediasyonda etkin olabileceklerini işaret etmektedir.

4.3.6. İnkübasyon Süresinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Çalışmamızda inkübasyon süresinin petrol biyoyıkımına etkisinin belirlenmesi amacıyla petrol içeren temel besiyerine *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*'e ait kültürlerin ekimleri gerçekleştirilerek, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi.

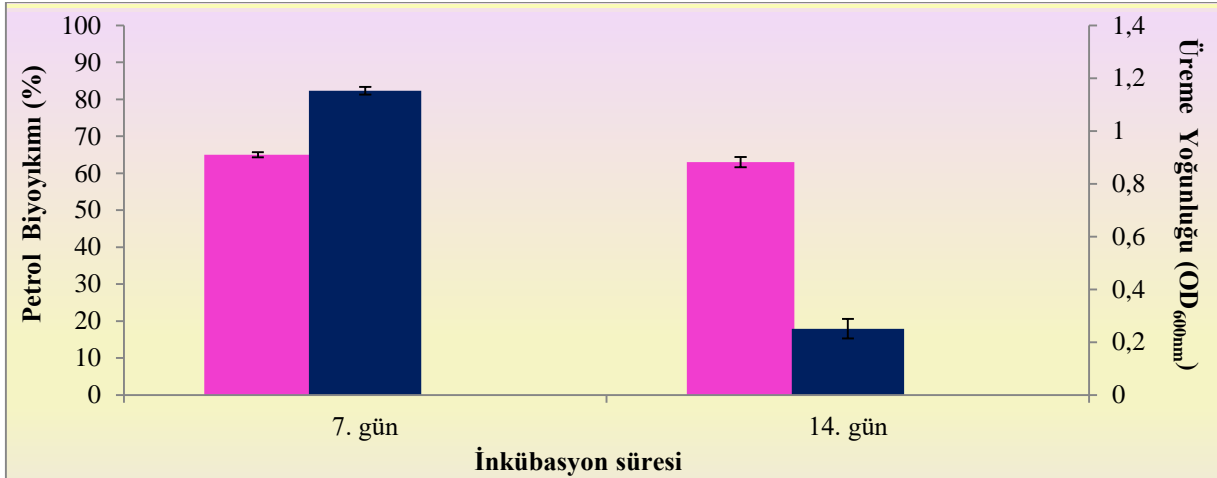
Çalışmamızda, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* için yüksek petrol biyoyıkım ve üreme yoğunluğu 7 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilirken, 14 günlük inkübasyon sonunda suşların petrol biyoyıkım etkinliğinde önemli bir artış saptanmadı. Buna bağlı olarak uzun inkübasyon süresi nedeniyle her iki mikroorganizmaya ait üreme yoğunluğunda da düşüş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Farklı inkübasyon süresinin *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/5 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.17. Farklı inkübasyon süresinin değerlerinin *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etki

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C’ de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/5 oranında sulandırıldı.

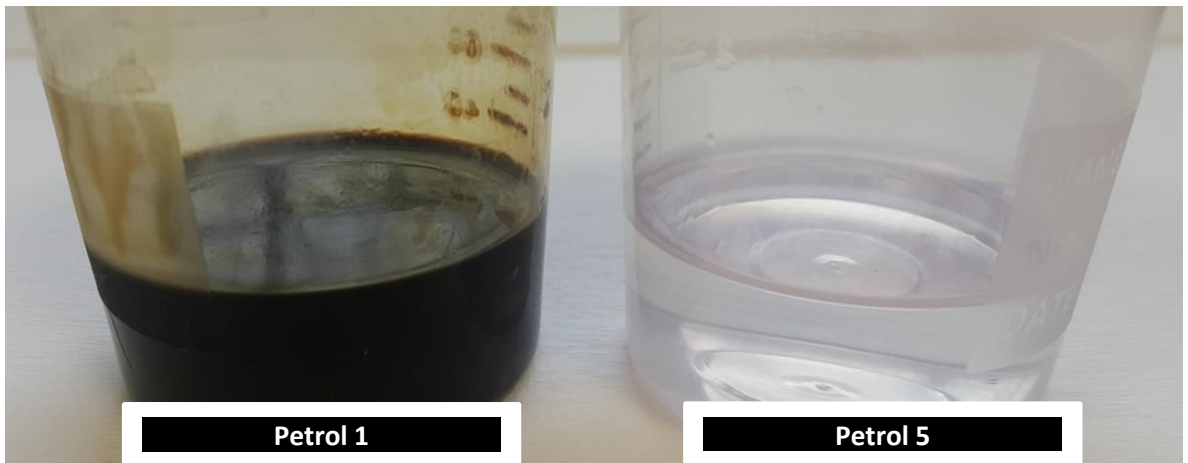
Literatürde *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada, hidrokarbon içeren ortamda *P. aeruginosa*’ nın 38 günlük inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada, 14. güne kadar popülasyon sayısında artış gözlenirken; 14. günden itibaren popülasyon sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise, topraktan izole edilen bakteri ve mayaların 20 günlük inkübasyon sonunda en yüksek biyoyıkım ve üremelerinin 12. – 16. günler arasında gerçekleştiği belirlenmiştir [6]. Uzun inkübasyon süresi ile beraber üreme yoğunluğunda meydana gelen düşüş, üretim ortamındaki kolay biyoyıkıma uğratılabilen bileşiklerin konsantrasyonlarında meydana gelen azalma ile ilişkilendirilmiştir [31].

4.4.Farklı Petrol Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Biyoyıkımlarının Araştırılması

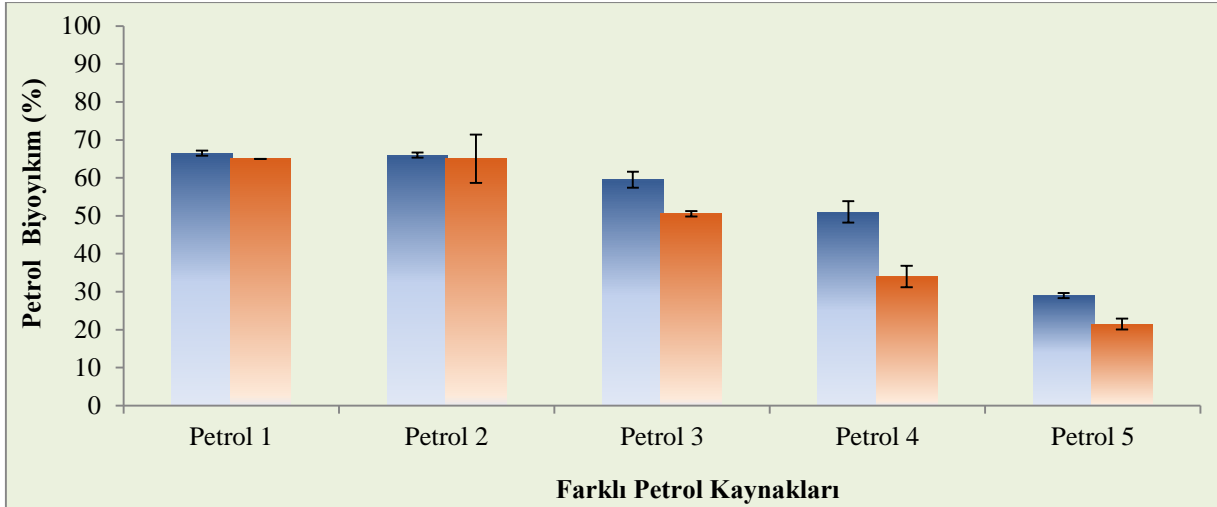
Her bir petrol numunesi kendine ait karakteristik bir kimyasal kompozisyona sahiptir. Mikrobiyal biyoyıkım petrolün içeriğinden etkilenmekte ve bazı hidrokarbonların daha kolay biyoyıkıma uğratılabildiği bilinmektedir [72]. Petrolün içeriği; petrol sahasının konumuna ve yılına göre de farklılık göstermektedir [1]. Bu doğrultuda, çalışmamızda farklı petrol

sahalarından alınarak, farklı fiziksel ve kimyasal kompozisyonlara sahip çeşitli petrol numunelerinin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ile biyoyıkım etkinliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda farklı petrol kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile gerçekleştirilen petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla, % 1 oranında farklı petrol numunelerini içeren temel besiyerlerinde 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde türlerin üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Çalışmamızda kullanılan *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri için en yüksek petrol biyoyıkımının petrol 1 ile gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Çalışmamızda kullanılan *K. pneumoniae*' nin farklı lokasyonlardan alınan çeşitli petrol numunelerinden petrol 1 ve petrol 2' yi % 65' in üzerinde; petrol 3 ve petrol 4' ü % 50' nin üzerinde biyoyıkıma uğrattığı belirlendi. *B. axarquiensis*' in petrol 1 ve petrol 2' yi % 65; petrol 3' ü ise % 50' nin üzerinde biyoyıkıma uğrattığı belirlendi. Petrol içeriğini oluşturan farklı yapıdaki ve moleküler ağırlıktaki hidrokarbonların farklı petrol numunelerinde farklı oranlarda bulunmaları, aynı mikroorganizmanın farklı petrol numunelerinde farklı biyoyıkım etkinliği göstermesine yol açmaktadır [68, 75, 114]. Çalışmamızda farklı petrol kaynaklarının söz konusu türler tarafından metabolize edilme oranları göz önüne alındığında; çalışmamızın bundan sonraki aşamalarına da petrol 1 ile devam edildi.



Şekil 4.18. Farklı petrol numuneleri



Şekil 4.19. Farklı petrol kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile biyoyıkımı

■: *K. pneumoniae*, ■: *B. axarquiensis*

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.5. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Sürfektan Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

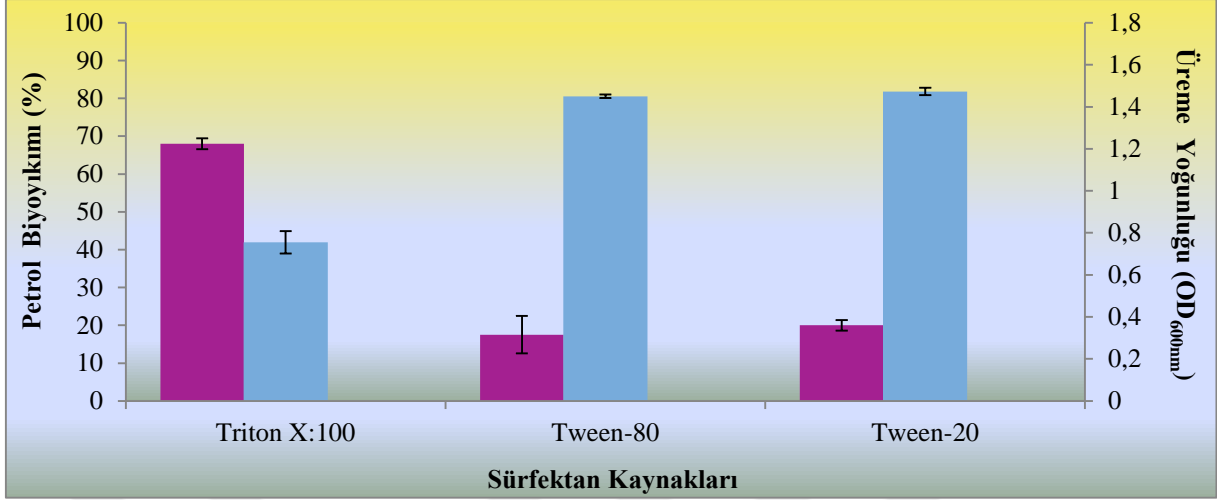
Sürfektanlar, petrol hidrokarbonların emülsiyonlaşmasını arttırmakta ve hücre yüzey özelliklerini desteklemektedir. Ekzojen faktör olarak ortama eklenen sürfektan madde, organik kirleticinin hücre membranından geçişini kolaylaştırarak biyoyararlanımı arttırmakta ve daha kolay biyoyıkıma uğratılabilir hale getirmektedir. Hücre yüzeyi ve sürfektan arasındaki ilişki sürfektan maddenin yapısına, konsantrasyonuna ve mikroorganizmanın cinsine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [132]. Bu bağlamda çalışmamızda, farklı sürfektan kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerine etkilerinin araştırıldı.

Çalışmamızda farklı sürfektan kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla, % 1 petrol içeren temel besiyerinde, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde türlerin üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Çalışmamızda kullanılan *K. pneumoniae*' nin sonuçları incelendiğinde; Triton X:100 içeren ortamda % 68, Tween 80 içeren ortamda % 17,5 ve Tween 20 içeren ortamda % 20 petrol biyoyıkım oranları elde edilirken; *B. axarquiensis*' e ait sonuçlar

değerlendirildiğinde Triton X:100 içeren ortamda % 66, Tween 80 içeren ortamda % 10 ve Tween 20 içeren ortamda % 29,5 petrol biyoyıkım oranları saptandı (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

Çalışmamızda farklı sürfektan kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerine ait petrol biyoyıkımına etkileri karşılaştırıldığında; söz konusu türler için, daha düşük üreme yoğunluklarına rağmen Triton X:100 içeren üretim ortamlarında, Tween 20 ve Tween 80' e kıyasla oldukça yüksek petrol biyoyıkım oranları elde edildi. Literatürde, kimyasal sürfektanların mikrobiyal üreme ve petrol biyoyıkımı üzerinde güçlendirici veya inhibe edici etkileri belirlenmiştir [68]. Literatürdeki benzer diğer çalışmalarda, Triton X:100' ün *Exiguobacterium aurantiacum* ve *Burkholderia cepacia* ile gerçekleştirilen dizel biyoyıkım hızını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir [133]. Farklı bir çalışmada, Triton X:100' ün üretim ortamında topaklanmayı azaltarak üremeyi desteklediği gösterilmiştir [132]. *P. stutzeri* ile yapılan benzer bir çalışmada ise; % 1 petrol + Tween 80 bulunan üretim ortamında % 96 oranında en yüksek biyoyıkım elde edilirken; % 1 petrol + Triton X:100 içeren ortamda % 76 oranında petrol biyoyıkımı elde edilmiştir. Ancak üretim ortamındaki petrolün % 2.5 oranına yükseltilmesi ile Tween 80 bulunan ortamda % 48; Triton X:100 bulunan üretim ortamında ise % 61 petrol biyoyıkımı elde edilmiştir. Özellikle yüksek petrol konsantrasyonunda Triton X:100' ün Tween 80' e göre daha etkin olduğu gösterilmiştir [134].

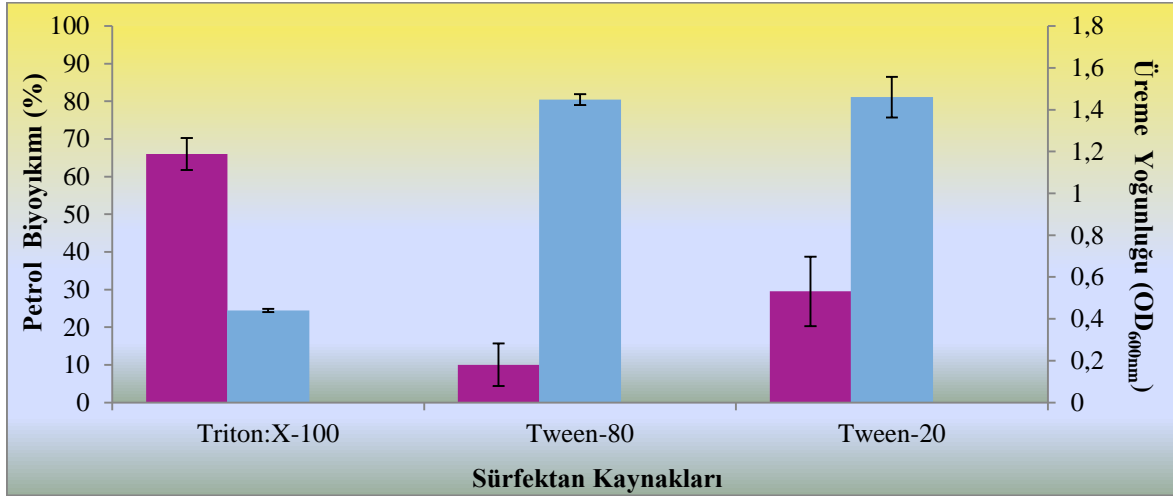
Non-iyonik sürfektanların başında gelen polisorbhatların (Tween 20 ve Tween 80) otooksidasyon ve hidroliz gibi metabolik yollar ile biyoyıkıma uğradıkları böylece üretim ortamlarındaki konsantrasyonlarında azalma meydana geldiği bilinmektedir [135]. Literatürde, *B. axarquiensis*' in özellikle biyosürfektan üretimi sırasında nişasta, Tween 80, Tween 20, DNA, jelatin, kazein, lektini hidroliz edebilme kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir [89]. Tween 20 ve Tween 80' in çalışmamız kapsamında kullanılan petrol kaynağının biyoyıkımını etkin bir şekilde desteklemediği ancak bu sürfektan maddelerin mikroorganizmalar tarafından kullanımı sonucu üreme yoğunluklarında artış olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda, söz konusu bu sürfektan maddeler biyohidrolize uğrayarak petrol biyoyıkımına etki edememektedirler.



Şekil 4.20. Farklı süfektan kaynaklarının *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/20 oranında sulandırılmıştır.



Şekil 4.21. Farklı süfektan kaynaklarının *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/20 oranında sulandırılmıştır.

4.6. Biosürefektan Üretiminin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Araştırılması

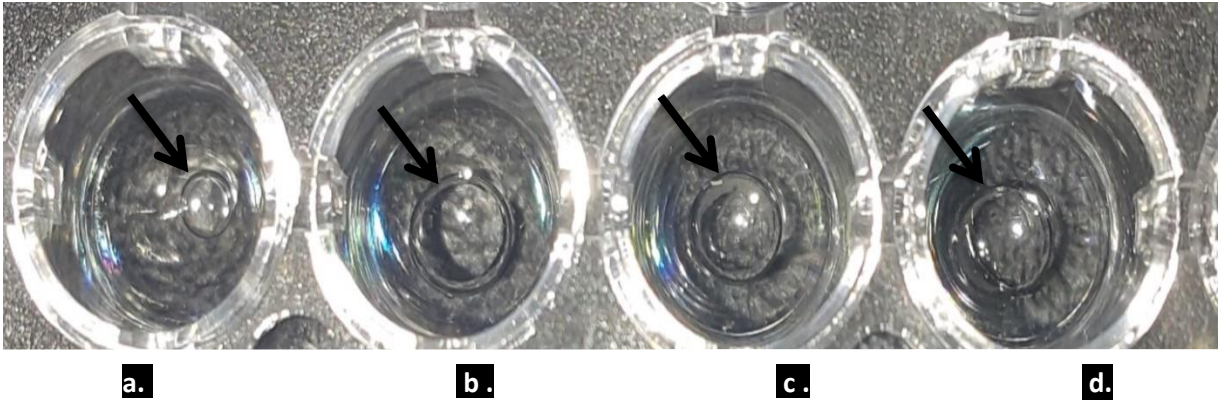
Su ve toprakta kontaminasyona neden olan petrol gibi hidrofobik yapıdaki organik bileşiklerin yıkıma uğratıldığı biyoremediasyon süreci oldukça önemlidir. Bu süreçte kullanılan kimyasal sürefektanlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen sürefektanlar ile karşılaştırıldığında; biosürefektanların petrolün çözünürlüğünün artırılmasında ve biyoyıkımında daha etkili oldukları gösterilmiştir [14, 68, 131]. Mikrobiyal yüzey aktif ajanı olan biosürefektanlar çeşitli endüstrilerde büyük uygulama alanlarına sahip biyoteknolojik ürünlerdir [84]. Özellikle gıda işleme, farmakoloji, kozmetik, petrol sondajı, çevre işletmesi ve tarım gibi çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır [93].

Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımında rol oynayan mikrobiyal topluluğun, biosürefektan üretimi açısından etkin olabilecekleri belirlenmiştir. Hidrokarbon biyoyıkımında *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Sphingomas sp.*, ve *Acinetobacter sp.*' nin toprakta ve çeşitli sedimentlerde; *Pseudooaltemonas sp.*, *Halomonas sp.*, *Alcanivorax sp.*, ve *Acinetobacter sp.*' nin deniz ekosisteminde en baskın cinsler olduğu belirlenmiştir. Aynı mikroorganizmaların biosürefektan veya biyo emülsifiye edici madde üretimlerinde de etkin oldukları gösterilmiştir [93]. Bu bağlamda çalışmamızda petrol biyoyıkımında etkin olan *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ile biosürefektan üretimi araştırıldı.

Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile biosürefektan varlığının araştırılması % 1 glukoz içeren temel besiyerinde, 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde türlerin üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerde yayılma-daralma (drop-collapse) ve petrol yayılma (oil displacement) yöntemleri ile biosürefektan varlığı belirlendi.

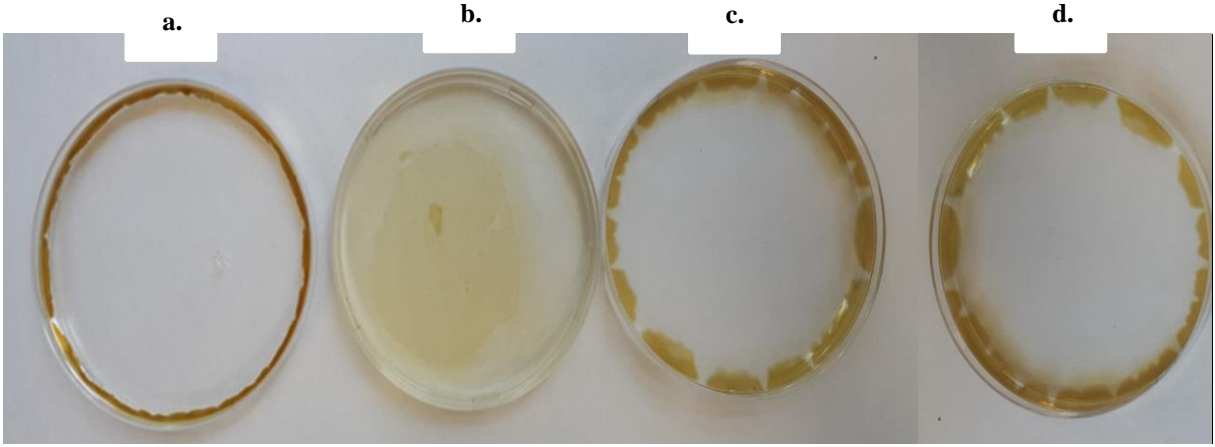
Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biosürefektan üretimi benzer çalışmalarda kullanılan çeşitli tarama yöntemleri ile araştırıldı [8, 93]. Daralma-yayılma (drop-collapse) yöntemi, biosürefektan üretiminin araştırılmasında kullanılan hassas ve kolay bir yöntemdir [136]. Çalışmamızda; daralma-yayılma yönteminde 96 kuyucuklu mikropklara eklenen *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait kültür süpernatantlarında meydana gelen değişim negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılırken, söz konusu türlerde biosürefektan varlığı tespit edildi (Şekil 4.22). Benzer bir çalışmada kullanılan daralma-yayılma testinde, *Bacillus*

sp.' ye ait kültür süpernatantının kuyucuklarda bulunan damlalarda yayılmaya yol açmıştır [85]. Farklı bir çalışmada, *Klebsiella sp.* Y6-1 tarafından üretilen biyosüpfektanın Tween 20 ve Triton X:100 gibi ticari süpfektanlar ile petrol biyoyıkımındaki etkinlikleri karşılaştırıldığında; biyosüpfektanın kimyasal süpfektanlara göre daha etkili oldukları gösterilmiştir [137]. Literatürde *B. axarquiensis* ile biyosüpfektan üretiminin gösterildiği benzer bir çalışmaya rastlanmamasına karşın; farklı *Bacillus sp.* türleri ile çeşitli biyosüpfektanların üretildiği farklı araştırmalar bulunmaktadır. *B. subtilis*, biyosüpfektan üretiminde sıklıkla kullanılan ve süpfektin ve subtilisin olarak adlandırılan lipopeptit yapıdaki yüzey aktif madde ürettiği bilinmektedir [82]. Daralma-yayılma yöntemi mikroorganizmalar tarafından üretilen düşük miktralardaki biyosüpfektanın belirlenmesinde petrol yayılma (oil displacement) yöntemi kadar hassas değildir. Bu amaçla; daralma-yayılma yöntemi ile biyosüpfektan varlığının belirlenmesinin ardından sonuçlarımız petrol yayılma yöntemi ile desteklendi (Şekil 4.23). Petrol yayılma yöntemi çeşitli mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyosüpfektan üretiminin belirlenmesinden kullanılmaktadır. Meydana gelen şeffaf zon, süpfektan miktarı (50/400 mg) ile doğru orantılı olarak artmaktadır [136]. Benzer bir çalışmada kullanılan petrol yer değiştirme yönteminde 5 cm' den büyük, geniş ve belirgin bir zon çapının, yeterli miktardaki biyosüpfektan üretimini işaret ettiği belirtilmiştir [85]. Petrol yüzeyinde meydana gelen şeffaf zon ölçülerek; zon çapı süpfektan aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir [93].



a. Negatif Kontrol-Su, b. Pozitif Kontrol-Triton X:100, c. *B. axarquiensis*' de pozitif biyosüpfektan varlığı
d. *K. pneumoniae*' de pozitif biyosüpfektan varlığı

Şekil 4.22. Daralma-Yayılma yöntemi ile biyosüpfektan varlığının belirlenmesi



a. Pozitif Kontrol-Triton X-100, b. Negatif Kontrol-Su, c. *K. pneumoniae*' de pozitif biosümfektan varlığı
d. *B. axarquiensis*' de pozitif biosümfektan varlığı

Şekil 4.23. Petrol yayılma yöntemi ile biosümfektan varlığının belirlenmesi

Glukoz, sukroz ve gliserol gibi suda çözünebilen bileşikler biosümfektan üretiminde sıklıkla kullanılan karbon kaynaklarıdır [83]. Çalışmamız kapsamında biosümfektan üretiminin araştırılmasında karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldı. Ancak literatürde farklı karbon kaynaklarını içeren ortamlarda çeşitli mikroorganizmalar aracılığıyla biosümfektan üretiminin gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir. Dizel ve petrol gibi organik bileşiklerin biosümfektan üretiminde kullanılan önemli karbon kaynakları oldukları bilinmektedir. Karbon kaynağı olarak kullanılan heksadekanın, *Gordonia amaroë*' in biosümfektan üretiminde rol oynadığı belirlenmiştir. Bunun yanında; petrol ile kontamine alandan izole edilmiş *Klebsiella sp. RJ-03*' e ait en yüksek biosümfektan üretimi karbon kaynağı olarak nişasta içeren ortamda gerçekleşmiştir [8, 138]. Petrolden izole edilen *Enterobacter cloacea*' nın karbon kaynağı olarak zeytinyağı içeren ortamda en yüksek biosümfektan üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir [68]. Hidrokarbon ile kontamine topraktan izole edilen *K. pneumoniae* IVN51' e ait maksimum biosümfektan üretimi dekstroz, maksimum üreme gliserol içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Söz konusu tür tarafından üretilen biosümfektanın fosfolipid grubunda yer aldığı belirlenirken; henüz tam olarak tanımlanmamıştır [93]. Biosümfektan üretiminde kullanılan farklı karbon kaynakları biosümfektanın kimyasal yapısı üzerinde etki göstermezken; yüzey gerilimi, viskozite, emülsiyonlaştırma, moleküler ağırlık, ısıya dayanıklılık gibi fiziksel özellikleri üzerinde etki göstermektedir [138].

Çalışmamızda, petrol biyoyıkımda metabolik etkinliği olan *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları ile biosümfektan üretimi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, % 1 petrol içeren

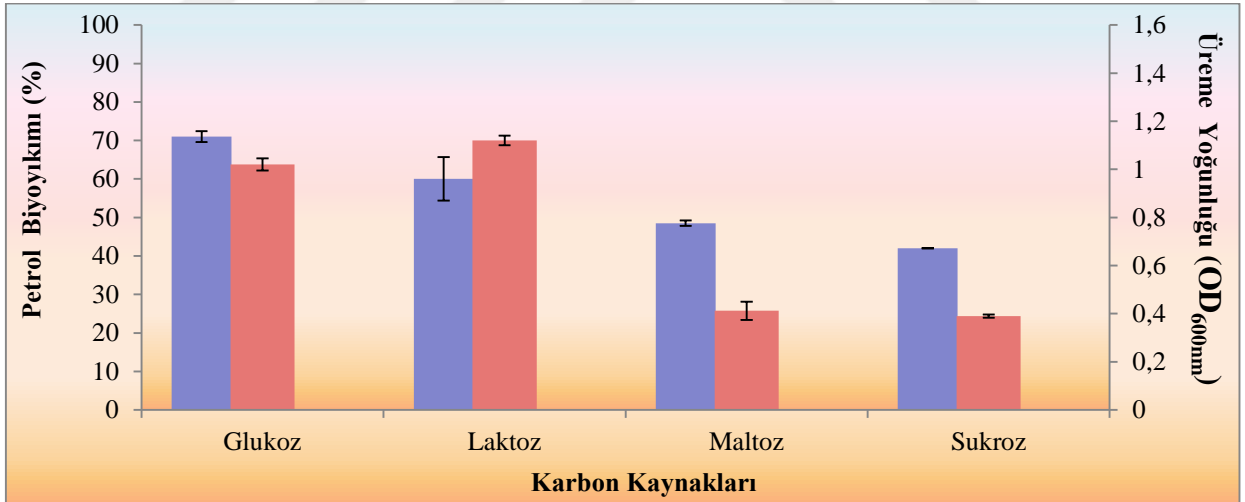
besi ortamında 50 mg biyosülfektanının petrol biyoyıkımını önemli derece arttırdığı gösterilmiştir [103, 139]. Benzer çalışmalarda; *Pseudomonas sp.* tarafından üretilen biyosülfektanın hekzadekan, petrol ve dizel biyoyıkımını [139, 140], *Brevibacterium sp.* tarafında üretilen biyosülfektanın fenantren, antrasen ve floren biyoyıkımını arttırdığı belirlenmiştir [141]. Kontamine toprağa eklenen biyosülfektanın hidrokarbon biyoyıkım oranını % 85' den % 97' ye arttırdığı gözlenmiştir [142]. Ramnolidler ve saponinler gibi biyosülfektanların, Triton X:100 ile karıştırıldığında hidrokarbon yıkımında daha etkili oldukları belirlenmiştir [132]. Metabolik olarak aktif olan endojen mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal sülfektanların, ekzojen olarak petrol ile kontamine toprağa eklenmesinin biyoremediasyon etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir [131]. Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan mikrororganizmaların ile gerçekleştirilen biyosülfektan üretimi petrol biyoyıkımında avanataj sağlayacaktır.

4.7. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Mikrobiyal üretim ve biyoyıkım sürecinde substrat kaynağı olarak kullanılan karbon en önemli sınırlayıcı faktörlerin başında yer almaktadır. Üretim ortamına eklenen alternatif karbon kaynakları, biyoyıkımı hedeflenen petrol gibi kimyasal maddelerin bakteriler tarafından metabolize edilme şansını arttırmaktadır. Tek bir organik substratın mikrobiyal yıkımı ortamda bulunan diğer organik substratların da biyoyıkımını etkilemektedir. Özellikle ilave karbon kaynağı olarak glukozun üretim ortamına eklenmesinin petrol biyoyıkım hızını arttırdığı gözlenmiştir [131, 138, 143]. Bu doğrultuda, çalışmamızda üretim ortamına eklenen farklı karbon kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda farklı karbon kaynaklarının (glukoz, laktoz, maltoz, sukroz) *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla, % 1 petrol içeren temel besiyerine farklı karbon kaynakları ilave edildi. 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 günde üretim gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Çalışmamızda *K. pneumoniae*' nin en yüksek petrol biyoyıkımının (% 71) glukoz içeren ortamda, *B. axarquiensis*' in yüksek petrol biyoyıkımının (% 73) maltoz içeren ortamda olduğu belirlendi (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).

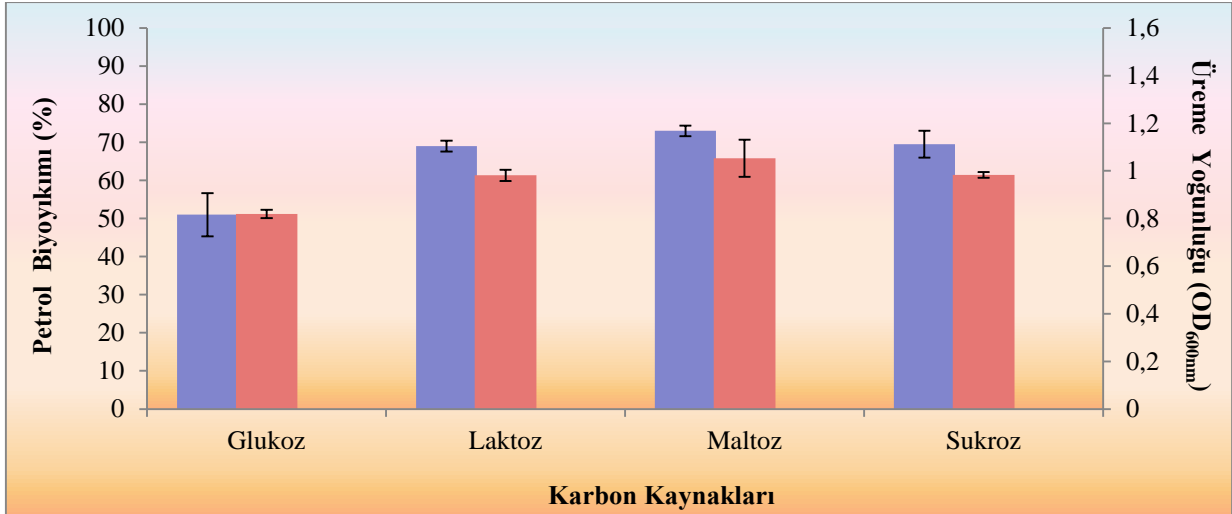
Çalışmamızda, ilave karbon kaynağı olarak glukozun bulunması *K. pneumoniae*' nin petrol biyoyıkımına paralel olarak üreme yoğunluğunda da artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 4.24). Mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla metabolize edilebilen organik bir bileşik olan glukozun rekalsitrant bileşiklerin biyoyıkımını arttırdığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Söz konusu çalışmalardan birinde; ilave karbon kaynağı olarak glukoz ve % 2 petrol içeren besiyerinde *C. aquaticum* ve *P. aeruginosa*' ya ait petrol biyoyıkım oranlarının sırasıyla % 89 ve % 83 olduğu belirtilmiştir [144]. *B. axarquiensis*' in maltoz içeren ortamda en yüksek biyoyıkım göstermesine paralel olarak yüksek üreme yoğunluğuna sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.25). Literatürde, *B. axarquiensis*' e ait farklı karbon kaynaklarının petrol biyoyıkımına etkisinin belirlendiği benzer bir çalışmaya rastlanmazken, maltozun *B. axarquiensis* tarafından etkin bir şekilde metabolize edilebildiği belirlendi [89]. Çalışmamıza farklı karbon kaynaklarının petrol biyoyıkım üzerine etkileri göz önüne alındığında; *K. pneumoniae*' ye ait üretim ortamına ilave karbon kaynağı olarak glukoz; *B. axarquiensis*' e ait üretim ortamına ilave karbon kaynağı olarak maltoz ile devam edildi.



Şekil 4.24. Farklı karbon kaynaklarının *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/20 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.25. Farklı karbon kaynaklarının *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ Biyoyıkım (%), ■ Üreme (OD)

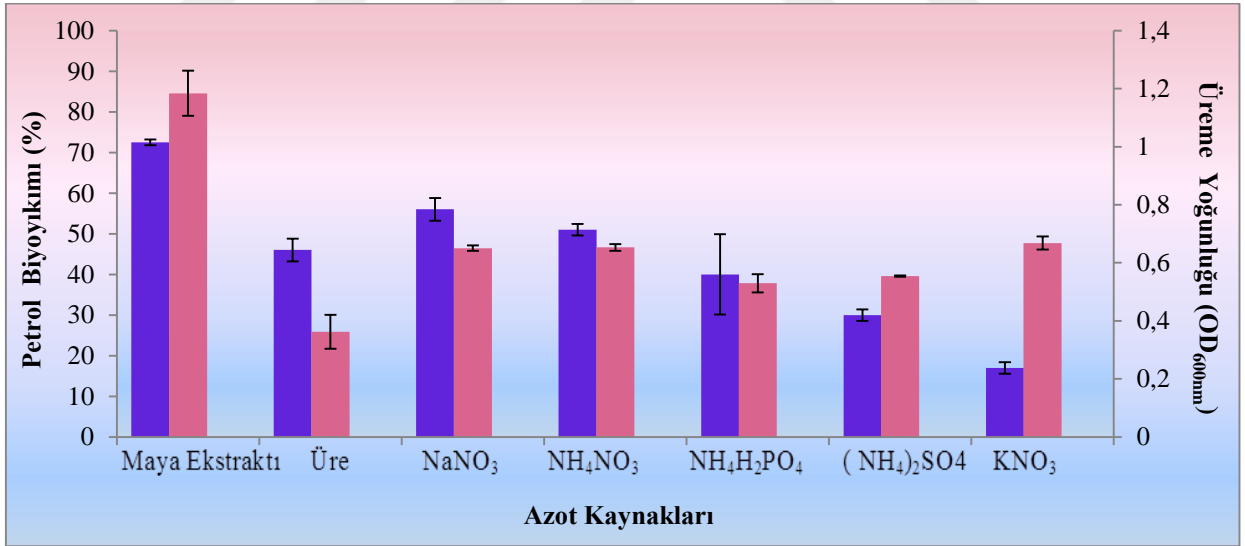
*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/20 oranında sulandırıldı.

4.8. Üretim Ortamına İlave Edilen Farklı Azot Kaynaklarının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Petrol kirliliğinin etkin bir şekilde çevreden uzaklaştırılmasında; azot, fosfor gibi nutrientler oldukça önemli rol oynamaktadır [8]. Petrol biyoyıkım hızı, düşük düzeydeki azot ve fosfor koşullarında sınırlı hale gelmektedir. Bu durum; üretim ortamına eklenen farklı azot kaynakları ile kontamine alanlardan izole edilen mikroorganizmaların üremesinin ve petrol biyoyıkım etkinliğinin artırılması açısından oldukça önemlidir [63, 120]. Bu bağlamda çalışmamızda, üretim ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda farklı azot kaynaklarının (maya ekstraktı, üre, NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KNO₃) *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile gerçekleştirilen petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla, % 1 petrol içeren temel besiyerine % 1 oranında farklı azot kaynakları ilave edildi. 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 günde üretim gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Çalışmamızda kullanılan

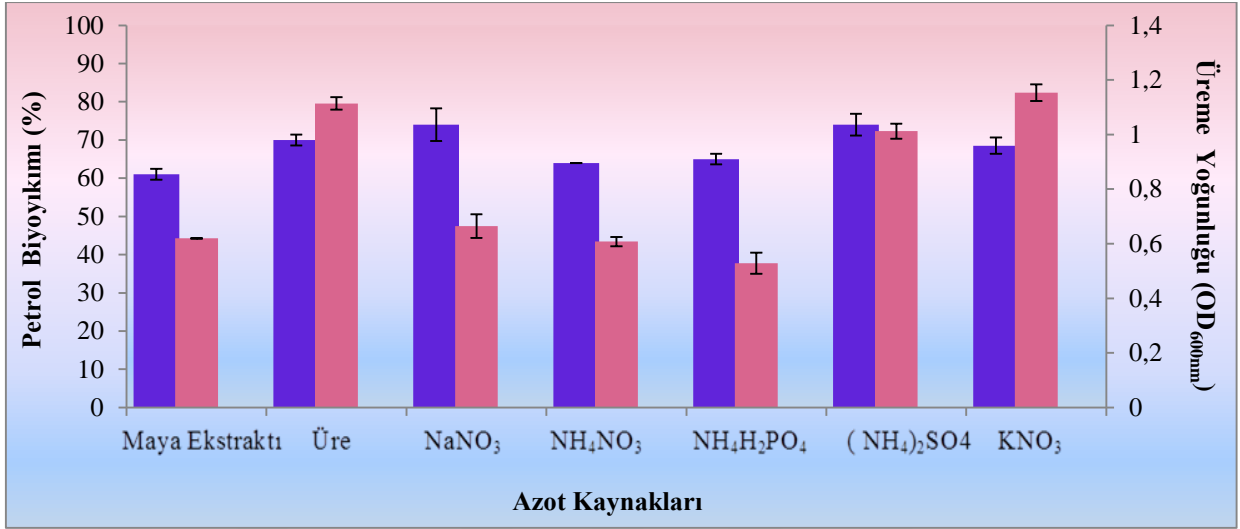
K. pneumoniae' nin petrol biyoyıkım oranları incelendiğinde; azot kaynağı olarak maya ekstraktı içeren ortamda % 72,5 oranında en yüksek petrol biyoyıkımı elde edilirken; *B. axarquiensis*' in NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' ün azot kaynağı olarak bulunduğu üretim ortamlarında % 74 oranında en yüksek petrol biyoyıkımı belirlendi. Söz konusu türlerin üreme yoğunlukları değerlendirildiğinde; *K. pneumoniae*' nin en yüksek petrol biyoyıkımı gösterdiği maya ekstraktı içeren ortamda yüksek üreme yoğunluğu gösterdiği belirlendi (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27). Organik azot kaynağı olarak maya ekstraktının *K. pneumoniae*' ye ait petrol biyoyıkımında etkili olmasına karşın çalışmada kullanılan diğer azot kaynaklarının biyoyıkım etkinliğini arttırmadığı belirlendi. Benzer bir çalışmada üretim ortamına eklenen maya ekstraktının ve triptonun üremeyi arttırdığı; ancak glisin ve NH_4NO_3 ' ün üremede önemli bir artışa neden olmadığı gösterilmiştir [72]. Bir diğer çalışmada, besiyerine azot ve vitamin kaynağı olarak eklenen maya ekstraktının mikrobiyal üremeyi ve petrol biyoyıkımını artırtıcı etkisi belirlenmiş ancak yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının petrol biyoyıkımı üzerinde inhibitörük etkiye neden olduğu gösterilmiştir [145].



Şekil 4.26. Farklı azot kaynaklarının *K. pneumoniae* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/5 oranında seyreltili.



Şekil 4.27. Farklı azot kaynaklarının *B. axarquiensis* ile petrol biyoyıkımı ve üreme yoğunluğuna etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/20 oranında seyreltildi.

Çalışmada kullanılan organik ve inorganik azot kaynaklarını içeren üretim ortamlarında mikroorganizmalara ait üreme yoğunlukları ve biyoyıkım oranları arasında paralellik gözlenirken yalnızca *K. pneumoniae*' ye ait KNO₃ içeren üretim ortamında yüksek üreme yoğunluğuna karşın oldukça düşük petrol biyoyıkımı elde edildi. Bu ortamda bulunan KNO₃' ün petrol biyoyıkımındaki enzimleri inhibe edebileceği belirlendi. Hidrokarbon biyoyıkımının araştırıldığı bir çalışmada; maya ekstraktının fenantren hidrokarbon biyoyıkımını desteklediği ancak KNO₃'ün söz konusu bu hidrokarbonun biyoyıkımında gecikmeye neden olduğu bildirilmiştir [146].

NaNO₃ ve (NH₄)₂SO₄ gibi inorganik azot kaynaklarının *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını arttırdığı belirlenirken; diğer azot kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerinde önemli bir etkisi belirlenmemiştir. Benzer bir çalışmada organik azot kaynaklarına alternatif olarak üretim ortamına eklenen (NH₄)₂SO₄ gibi inorganik azot kaynaklarının petrol biyoyıkımını arttırdığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada, *P. aeruginosa* için en iyi üreme NaNO₃ içeren üretim ortamında gerçekleştiği belirtilmiştir [120].

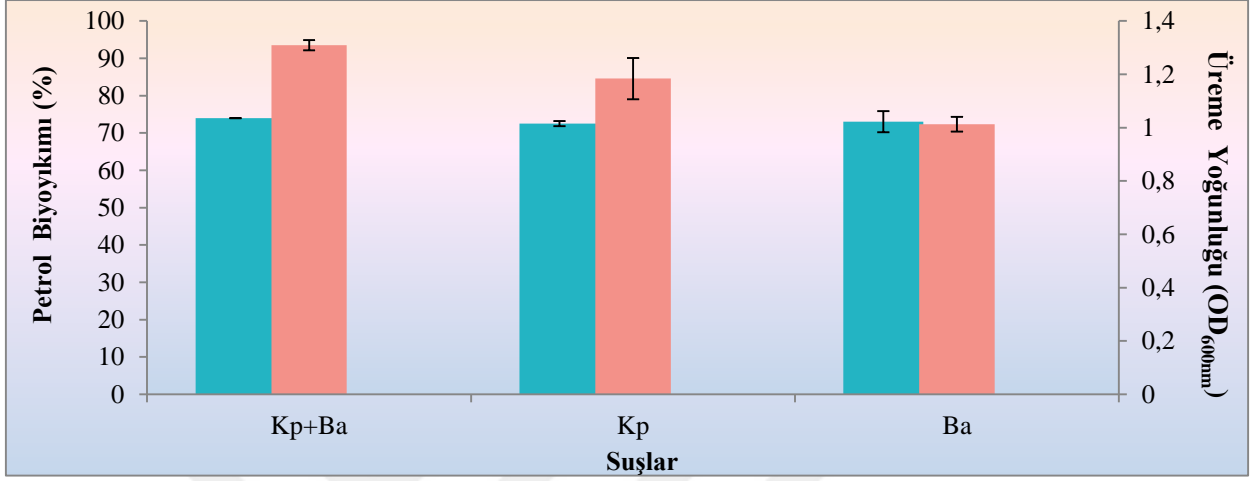
Bakteriyel petrol biyoyıkım etkinliği yüksek azot miktarına ihtiyaç duymaktadır [113]. Petrol biyoyıkımında kullanılan Busshnell-Haas temel besiyerinin içeriğinde azot kaynağı olarak NH_4NO_3 bulunurken, NH_4NO_3 ' ün ilave azot kaynağı olarak eklenmesinin petrol biyoyıkımında önemli bir artışa yol açmadığı belirlendi. İlave azot kaynaklarının *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını *K. pneumoniae*' nin biyoyıkımına göre daha yüksek oranda etkilediği saptandı. Bu bağlamda; çalışmamızda kullanılan ilave azot kaynaklarının petrol biyoyıkımı üzerine etkileri göz önüne alındığında; üretim ortamlarına azot kaynağı olarak *K. pneumoniae* için maya ekstraktı; *B. axarquiensis* için NaNO_3 ile devam edildi.

4.9. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* Karışık Kültürünün Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Doğada petrol biyoyıkımı, farklı enzimatik kapasiyete sahip çeşitli mikrobiyal popülasyonlar ile gerçekleşmektedir. Hiçbir mikrobiyal kültür petrol gibi oldukça karmaşık yapıdaki organik bir bileşiği tek başına biyoyıkıma uğratma kapasitesinde sahip değildir [6, 77]. Karışık kültür farklı çevresel koşullara adapte olmuş ve farklı biyoyıkım mekanizmalarına sahip çeşitli taksonomik gruplardan oluşmaktadır. Geniş biyoyıkım kapasitesi, sinerjik etki ve kometabolizma karışık kültürün avantajlarından [9, 112]. Bu kapsamda çalışmamızda, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait karışık kültürün petrol biyoyıkım etkinliği ile suşların ayrı ayrı gösterdikleri petrol biyoyıkım etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait karışık kültürlerin petrol biyoyıkımına etkisinin araştırılması amacıyla, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının 1:1 (v/v) oranında karıştırılması ile oluşan karışık kültür ile suşların ayrı ayrı kültürlerinin % 1 petrol içeren temel besiyerinde, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Karışık kültüre ait petrol biyoyıkımının, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin ayrı ayrı bulunduğu ortamdaki biyoyıkıma göre % 2 civarında artış gösterdiği buna bağlı olarak üreme yoğunluğunun da artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.28). Çalışmamızda iki farklı bakteriyel tür arasındaki sinerjik ilişkiye benzer olarak; *P. aeruginosa* ve *Bacillus sp.*' ye ait mikrobiyal konsorsiyumun petrol biyoyıkımında etkin olduğu gösterilmiştir [147]. *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Alcaligenes*

adorans' a ait karışık kültürlerin 15 günlük inkübasyon sonunda % 58 petrol biyoyıkımı belirlenmiştir [6].



(Kp+Ba: *K. pneumoniae*-*B. axarquiensis* karışık kültür, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Ba: *Bacillus axarquiensis*)

Şekil 4.28. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri ve *K. pneumoniae* - *B. axarquiensis* karışık kültürü ile petrol biyoyıkımı

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 30°C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında seyreltilmiştir.

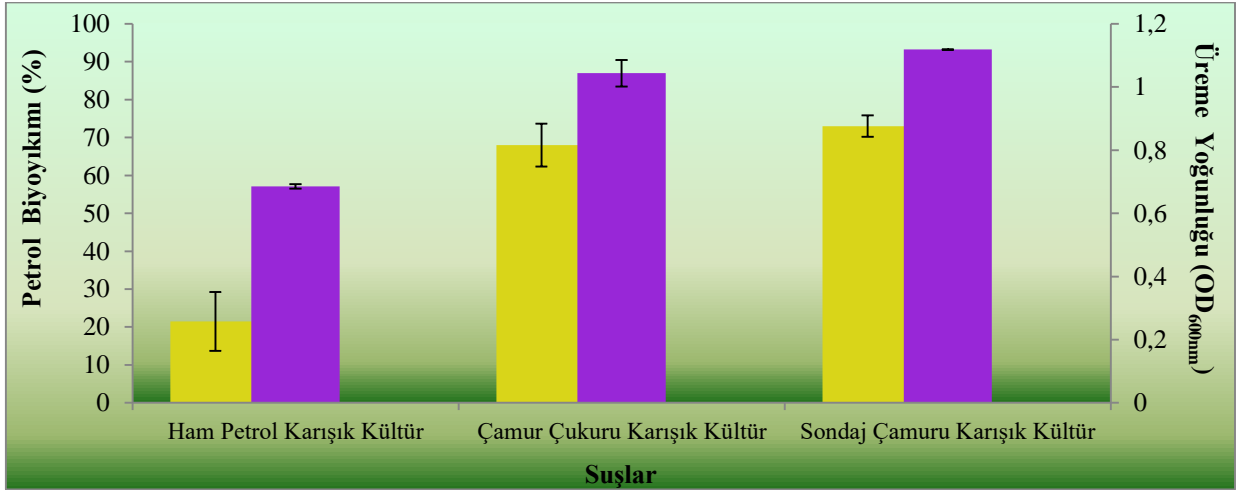
Literatürde, biyoyıkım kapasitesine sahip endojen mikroorganizmalara ait karışık kültürlerin oluşturulması ile daha yüksek petrol biyoyıkım oranlarının elde edilebileceği gösterilmiştir [111]. Bu bağlamda, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin bir araya gelmesinin türlerin petrol biyoyıkımı açısından sinerjik etki gösterdiği, bu nedenle petrol biyoyıkım süreçlerinde türlerin bir arada kullanılmasının avantajlı olabileceği saptandı.

4.10. Ham Petrol, Çamur Çukuru ve Sondaj Çukuru Numunelerine Ait Karışık Kültürlerin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Petrol sahip olduğu karmaşık yapısı nedeniyle, mikrobiyal konsorsiyumun tek bir mikrobiyal türe göre petrol biyoyıkımında daha etkin olduğu belirlenmiştir [117]. Tek bir mikrobiyal tür yalnızca sınırlı sayıdaki hidrokarbonu metabolize edebilmektedir. Petrol gibi oldukça karmaşık yapıdaki bileşiklerin biyoyıkıma uğratılması için geniş hidrokarbon aralığını

biyoyıkıma uğratabilen farklı bakteri gruplarına veya bakteriyel konsorsiyumlara ihtiyaç duymaktadır [121].

Çalışmamızda ham petrol (*Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) çamur çukuru (*Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) ve sondaj çukuru (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Enterobacter cloacae*) numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların karışık kültürlerinin petrol biyoyıkımına etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla; her numuneden izole edilen suşlardan hazırlanan karışık kültürlerin % 1 petrol içeren temel besiyerinde, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlerin üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Ham petrolden izole edilen suşlar ile oluşturulan karışık kültüre ait petrol biyoyıkımı dolayısı ile üreme yoğunluğu oldukça düşük bulundu (% 21,5). Çamur çukurundan izole edilen suşlar ile oluşturulan karışık kültüre ait petrol biyoyıkımının % 68; sondaj çamurundan izole edilen suşlar ile oluşturulan karışık kültüre ait petrol biyoyıkım oranının ise % 73 olduğu belirlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Ham Petrol, çamur çukuru ve sondaj çukuru numunelerine ait karışık kültürlerin petrol biyoyıkımı ve üremeye etkisi

■ : Biyoyıkım (%), ■ : Üreme (OD)

*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. Üremeler 1/10 oranında seyreltilmiştir.

Çalışmamızda, petrolden izole edilen mikroorganizmalardan *B. cereus*, *P. mirabilis* ve *B. subtilis*' in tek başına kültürlerinin petrol biyoyıkımında etkin olmadığı yalnızca *E. faecalis* ile % 42 oranında biyoyıkım olduğu belirlenmişti (Şekil 4.3). Ancak suşların bir araya gelmesi ile meydana gelen antagonistik etki nedeniyle % 42 biyoyıkım oranında düşüş meydana geldiği belirlendi. Literatürde de, karışık kültürler ile çoğunlukla daha etkin biyoyıkım sonuçları beklenmesine karşın bazı durumlarda saf kültürlerle göre biyoyıkımda düşüş gözlenmektedir [132]. Benzer bir çalışmada; dört farklı fungustan oluşan fungal konsorsiyumun petrol biyoyıkımını azalttığı gösterilmiştir [115].

Çalışmamızda çamur çamurundan izole edilen mikroorganizmalardan *Bacillus subtilis subsp. spizizeni* ile % 13, *E. faecalis* ile % 42 biyoyıkım etkinliği belirlenirken, *B. cereus*' un petrol numunemizde biyoyıkım etkinliği göstermediği belirlenmişti (Şekil 4.3). Ancak suşların bir araya gelmesi ile meydana gelen sinerjik etki ile % 42 oranındaki biyoyıkımın % 68' e yükseldiği belirlendi. Çalışmamıza benzer sinerjik etkinin görüldüğü bir çalışmada, *Pseudomonas sp.* gibi tek bir mikrobiyal türe ait petrol biyoyıkım oranı % 69 oranındayken, *Pseudomonas sp.*' nin de içinde bulunduğu bakteriyel konsorsiyuma ait petrol biyoyıkım oranının % 77' ye yükseldiği belirtilmektedir [41, 68]. *P. aeruginosa*, *A. lwoffii* ve *B. cereus*' a ait karışık kültüre ait petrol biyoyıkım oranı, türlerin ayrı ayrı biyoyıkım oranlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Daha öncede belirtildiği gibi petrol bileşenlerinin tümünü biyoyıkıma uğratabilecek bir mikroorganizma türü bulunmamaktadır [121]. Benzer şekilde; *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter sp.* ve *Corynebacterium sp.*' den oluşan karışık kültürün petrol biyoyıkımını kısa süre içerisinde gerçekleştirdikleri gözlenmiştir. Kompleks yapıdaki hidrokarbonların biyoyıkım süreci çok sayıda mikroorganizmanın işbirliğine ihtiyaç duymaktadır. *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.* ve *Pseudomonas sp.*' ye ait mikrobiyal konsorsiyumun % 90 oranında makine yağını ve % 80 oranında n-parafini biyoyıkıma uğrattıkları bilinmektedir [111].

Çalışmamızda sondaj çamurundan izole edilen tüm mikrobiyal türlere ait petrol biyoyıkımları, yüksek oranda petrolü biyoyıkıma uğratabilen suşlara (*K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*) ait petrol biyoyıkımları ile karşılaştırıldığında, biyoyıkımda önem bir artış gözlenmedi. Ancak; her üç numuneye ait karışık kültürlerin etkileri karşılaştırıldığında; sondaj çamuruna ait karışık kültürün, petrolden ve çamur çukurundan izole edilen suşlar ile oluşturulan karışık

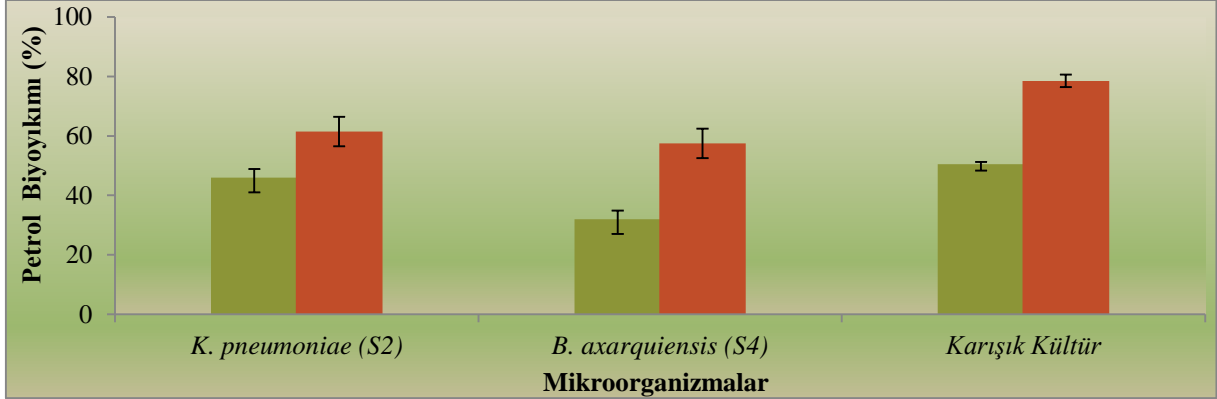
kültürlere kıyasla petrol biyoyıkımında daha etkin oldukları belirlendi. Sondaj çamuruna ait yüksek biyoyıkım oranınının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının biyoyıkım etkinliğinden kaynaklandığı sonucuna varıldı.

4.11. Toprak ve Deniz Suyu Ortamlarında *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması

Günümüzde petrol ve petrol ürünlerinin neden olduğu toprak kontaminasyonu tüm dünyayı ilgilendiren en önemli sorunların başında yer almaktadır [4]. Bölüm 2.5.' de daha önce belirtildiği gibi petrol üretimi sırasında, sızıntılar ve petrol platformlarında meydana gelen çeşitli kazalar ile toprak kirliliği kadar deniz kirliliği de söz konusu olmaktadır. Denizlerde petrolün araştırılması ve sondajı sırasında meydana gelen petrol kirliliği çevresel ve ekonomik sorunlara yol açmaktadır. Petrol hidrokarbonlarının neden olduğu bu zararlı etkilerin azaltılması için yeni iyileştirme stratejileri geliştirilerek petrol kirliliği kontrol altına alınmalıdır [3].

Çalışmamızda toprak ortamlarındaki petrolün *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlere ait karışık kültürler ile petrol biyoyıkımının araştırılması amacıyla, % 1 petrol içeren steril ve steril olmayan toprak ortamlarında, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde türlerin üretimleri gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlere ait petrol biyoyıkım yüzdeleri belirlendi. Çalışmamızda kullanılan *K. pneumoniae*' ye ait sonuçlar incelendiğinde; % 1 petrol içeren steril toprak ortamında % 46, steril olmayan toprak ortamında % 61,5 petrol biyoyıkımı elde edilirken; aynı koşullarda *B. axarquiensis* için % 1 petrol içeren steril toprak ortamında % 32, steril olmayan toprak ortamında % 57,5 petrol biyoyıkımı elde edildi (Şekil 4.30). Steril ve steril olmayan toprak koşullarında *K. pneumoniae*' ye ait petrol biyoyıkımının *B. axarquiensis*' e göre daha yüksek olduğu belirlendi. Her iki suş için de steril olmayan toprak koşullarında gerçekleşen petrol biyoyıkımının steril koşullara göre yüksek olduğu belirlendi. Buna paralel olarak, suşlara ait karışık kültürlerin steril olmayan toprak ortamında % 78,5 gibi oldukça oranda yüksek petrol biyoyıkımı elde edildi. Steril olmayan toprak içeriğinde bulunan dış kaynaklı mikroorganizmaların söz konusu türlere ait petrol biyoyıkım etkinliğini arttırıcı etki gösterdiği saptandı.

Çalışmamızda deniz suyu ortamlarındaki petrolün *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlere ait karışık kültürler ile petrol biyoyıkımının araştırılması amacıyla, türlerin üretimi karbon kaynağı olarak ayrı ayrı % 1 petrol ve % 1 glukoz içeren deniz suyu ortamlarında, 25 °C' de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonunda söz konusu türlere ait üreme yoğunlukları ve petrol biyoyıkımları belirlendi. *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlere ait karışık kültürlerin petrol içeren ortamda düşük üreme yoğunlukları göstermelerinin yanında, kolay biyoyıkıma uğratılabilir bir bileşik olan glukozun bulunduğu ortamda dahi söz konusu türlerin daha önceki çalışmalarımıza göre oldukça düşük yoğunlukta üreyebildikleri belirlendi (Çizelge 4.4.). Petrol içeren deniz suyu ortamında, *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlere ait karışık kültürlerin düşük üreme yoğunlukları ile beraber petrol biyoyıkımında da etkili olmadıkları saptandı.



Şekil 4.30. Toprak ortamlarında *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlerin karışık kültürleri ile petrol biyoyıkımının araştırılması

■ : Steril topraktaki biyoyıkım (%), ■ : Steril olmayan topraktaki biyoyıkım

*Suşların üretimi petrol içeren toprak ortamında, 25 °C' de 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 7 gün süresince gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Deniz suyu ortamında *K. pneumoniae*, *B. axarquiensis* ve türlere ait karışık kültürün üreme yoğunlukları

Mikroorganizmalar	% 1 petrol içeren deniz suyu içeren ortamdaki üreme yoğunlukları (OD600 _{nm})	% 1 glukoz içeren deniz suyu içeren ortamdaki üreme yoğunlukları (OD600 _{nm})
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.27	0.52
<i>Bacillus axarquiensis</i>	0.07	0.25
Karışık Kültür	0.17	0.46

4.12. Gaz Kromatografisi (GC) ile Detaylı Hidrokarbon Analizi

Çalışmamızda *K. pneumoniae*' ye ait petrol biyoyıkımının detaylı hidrokarbon analizi ile belirlenmesi amacıyla, optimize edilmiş koşullarda *K. pneumoniae* suşu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamından ekstrakte edilen petrol ile biyoyıkıma tabii tutulmamış ilk gün petrol numunesi GC cihazında (TRB-1 Shimadzu GCMS-QP-2020) analiz edildi. Böylece her iki petrol numunesine ait hidrokarbon içeriği karşılaştırıldı. Bu doğrultuda; *K. pneumoniae* suşu ile gerçekleştirilen 7 günlük inkübasyon sonunda petrolün içeriğini oluşturan hidrokarbonlarda meydana gelen azalma belirlendi.

Çalışmamızda, *K. pneumoniae* suşuna ait petrol biyoyıkımı detaylı hidrokarbon analizi ile incelendiğinde, suşların özellikle C₁₀ - C₂₀ aralığındaki hidrokarbonları % 90 ve C₂₀ - C₂₂ aralığındaki hidrokarbonları % 75' in üzerinde biyoyıkıma uğrattığı belirlendi (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) Sonuçlar detaylı incelendiğinde C₁₁, C₁₂ ve C₁₃' ü % 95 oranında; C₁₇' yi % 94 oranında; C₁₄ ve C₂₀' yi % 93 oranında; C₁₀, C₁₆ ve C₁₉' u ise % 92 oranında biyoyıkıma uğratabildikleri saptandı (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Orta zincirli n-alkanların (C₁₂ - C₁₈) uzun zincirli n-alkanlara göre yüksek oranda biyoyıkıma uğrattığı olmalarının, uzun zincirli n-alkanların düşük çözünürlükte olmalarından kaynaklandığı öngörüldü. Literatürde benzer bir çalışmada; petrolün içeriğini oluşturan hidrokarbonların C₁₀ ve C₂₄ arasında olduğu ve biyoyıkımın en yüksek olduğu aralığın C₁₃ ve C₁₈ olduğu belirlenmiştir [31]. *K. pneumoniae* AOR₂ ile yapılan benzer bir çalışmada ise; söz konusu bu suşun C₁₀ ve C₁₄ aralığındaki hidrokarbonları önemli ölçüde biyoyıkıma uğrattığı belirtilmiştir [120]. Bir diğer çalışmada ise; *P. aeruginosa* ve *P. putida*' nın C₁₀ ve C₁₄ aralığındaki hidrokarbonların tamamını metabolize edebildiği; C₁₅, C₁₇, C₁₉, C₂₀ hidrokarbon oranlarında ise önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir [119].

K. pneumoniae, C₃₄ ve C₄₀ aralığındaki hidrokarbonların biyoyıkımında etkili olmazken; uzun zincirli hidrokarbonlardan C₃₁ ve C₃₂' yi % 40' ın üzerinde biyoyıkıma uğratabildikleri belirlendi. Buna ek olarak, C₃₁ ve C₃₂ uzun zincirli hidrokarbonların, C₂₄ - C₂₈ aralığındaki hidrokarbonlara göre daha yüksek oranda biyoyıkıma uğrattığı belirlendi. Çalışmamıza benzer olarak, *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada da; C₁₆ - C₂₀ aralığındaki hidrokarbonlara ait pik yoğunluğunun biyoyıkım sonucunda azaldığı ancak C₂₀ - C₂₈ aralığındaki hidrokarbonlarda önemli oranda bir biyoyıkım elde edilmediği bildirilmiştir [148]. Çalışmamıza ait sonuçlar literatürdeki GC analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında C₁₀

ve C₂₀ aralığındaki hidrokarbonların yaklaşık tamamını metabolize edebildiği; bununla beraber biyoyıkıma dirençli olan uzun zincirli hidrokarbonları dahi (C₃₁ ve C₃₂) % 40' ın üzerinde biyoyıkıma uğratabildikleri belirlendi. Bu bağlamda, petrol biyoyıkımında *K. pneumoniae* suşunun kullanılmasının oldukça avantajlı olduğu saptandı.

Çizelge 4.5. Gaz kromatografisi analizi ile petrol biyoyıkımının detaylı hidrokarbon sonucu

PETROLÜN İÇERİĞİNİ OLUŞTURAN HİDROKARBONLAR	1. GÜN	7. GÜN
n-Dekan (C10), ppm	21,2	<1,69
n-Undekan (C11), ppm	29,7	<1,42
n-Dodekan (C12), ppm	37,4	2,01
n-Tridekan (C13), ppm	38,5	1,80
n-Tetradekan (C14), ppm	33,2	2,46
n-Pentadekan (C15), ppm	44,4	4,55
n-Hekzadekan (C16), ppm	26,7	2,07
n-Heptadekan (C17), ppm	30,7	1,80
n-Oktadekan (C18), ppm	23,0	<2,39
n-Nonadekan (C19), ppm	34,8	2,90
n-Eikosan (C20), ppm	18,5	1,24
n-Heneikosan (C21), ppm	18,9	2,37
n-Dokosan (C22), ppm	14,5	3,60
n-Trikosan (C23), ppm	14,8	7,17
n-Tetrakosan (C24), ppm	12,7	12,7
n-Pentakosan (C25), ppm	12,7	10,9
n-Hekzakosan (C26), ppm	10,3	9,72
n-Heptakosan (C27), ppm	7,44	6,14
n-Oktakosan (C28), ppm	6,84	4,85
n-Nonakosan (C29), ppm	5,13	3,22
n-Triakontan (C30), ppm	5,46	3,90
n-Hentriakontan (C31), ppm	4,11	2,21
n-Dotriakontane (C32), ppm	5,99	3,48
n-Tritriakontan (C33), ppm	3,48	<2,59
n-Tetratriakontan (C34), ppm	<2,73	<2,73
n-Pentatriakontan (C35), ppm	<3,77	<3,77
n-Hekzatriakontan (C36), ppm	<2,81	<2,81
n-Oktatriakontan (C38), ppm	<5,73	<5,73
n-Tetrakontan (C40), ppm	<6,93	<6,93

ppm: parts per million- milyonda bir

Çizelge 4.6. Gaz kromatografisi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ile petrol biyoyıkım oranları

PETROLÜN İÇERİĞİNİ OLUŞTURAN HİDROKARBONLAR	BİYOYOKIM ORANLARI
n-Dekan (C10)	% 92
n-Undekan (C11)	% 95
n-Dododekan(C12)	% 95
n-Tridekan (C13)	% 95
n-Tetradekan (C14)	% 93
n-Pentadekan (C15)	% 90
n-Hexadekan (C16)	% 92
n-Heptadekan (C17)	% 94
n-Octadekan (C18)	% 90
n-Nonadekan (C19)	% 92
n-Eikosan (C20)	% 93
n-Heneikosan (C21)	% 87
n-Dokosan (C22)	% 75
n-Trikosan (C23)	% 52
n-Pentakosan (C25)	% 14
n-Hekzakosan (C26)	% 6
n-Heptakosan (C27)	% 18
n-Oktokosan (C28)	% 29
n-Nonokosan (C29)	% 37
n-Triakontan (C30)	% 29
n-Hentriakontan (C31)	% 46
n-Dotriakontan (C32)	% 42
n-Tritriakontan (C33)	% 26

5. YORUM

Çevre kirleticilerinin başında yer alan petrol önemli sağlık ve çevre sorunlarına yol açmaktadır [4, 8, 37, 78]. Söz konusu petrol kirliliğinin giderilmesinde petrol ile kontamine olmuş su, toprak veya petrol sahası numunelerinde bulunan bölgeye adapte olmuş mikroorganizmaların daha etkili oldukları belirlenmiştir [109].

Petrol kirliliğinin, çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanında daha düşük maliyetli ve etkin bir yöntem olan biyolojik iyileştirme ile çevreden uzaklaştırılması tercih edilmektedir. Bu bağlamda, petrol biyoyıkımında rol oynayan mikroorganizmaların belirlenmesi ve söz konusu mikroorganizmalar ile petrolün biyoyıkımının araştırılması, petrolün çevreden uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Günümüzde petrolü tamamen biyoyıkıma uğratabilen tek bir mikrobiyal tür ile karşılaşılmazken, bu doğrultuda çalışmalar geliştirilerek devam edilmektedir.

Petrol biyoyıkımında rol oynayan mikroorganizmaların belirlenmesi biyoremediasyon açısından oldukça önemlidir. Bununla birlikte petrol ve doğal gaz endüstrisinde ürün, zaman ve maliyet kaybına neden olan söz konusu bu mikroorganizmaların tanımlanması ve bu mikroorganizmalara uygun antimikrobiyal ajanların kullanımı petrol sektörü açısından da büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda, belirli bir petrol sahasına ait ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamuru numuneleri kullanılmıştır. Bu kapsamda, çalışmamızda petrol sahasına ait üç farklı numunedan izole edilen ve tanımlanan çeşitli mikroorganizmalar ile söz konusu ile petrol biyoyıkımı araştırıldı.

Çalışmamızda, ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamurundan farklı bakteriyel türler izole edildi ve tanımlandı. Ham petrolde *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*; çamur çukurundan *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*; sondaj çamurunda ise *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Enterobacter cloacae* suşlarının bulunduğu belirlendi. Söz konusu türlerin petrol içeren ortamdaki üreme yoğunluklarının belirlenmesinin ardından, türlere ait petrol biyoyıkımları kolorimetrik, spektrofotometrik ve gravimetrik yöntemler ile tespit edildi. Petrol biyoyıkımı incelenen bu türlerden *Klebsiella pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' in optimize edilmemiş koşullarda dahi petrol gibi oldukça karmaşık yapıdaki

organik bir bileşigi gravimetrik analiz ile % 50' nin üzerinde biyoyıkıma uğratabildikleri belirlendi. *Klebsiella pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türleri için uygun fizyolojik koşulların pH 7' de, % 1 (v/v) petrol konsantrasyonunda, % 2 kültür konsantrasyonunda, çalkalamalı olarak 150 rpm' de, 25 °C' de ve 7 günde olduğu belirlendi.

Çevrede, petrol biyoyıkımı için ihtiyaç duyulan pH aralığının 6,5 - 8,0 olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin en yüksek petrol biyoyıkımını gerçekleştirdiği pH' nın 7 olması avantajlıdır. Buna ek olarak, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin pH 5 ile pH 8 aralığında % 40 ve üzerinde petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri saptanmıştır. Suşların geniş pH aralığında biyoyıkım etkinliği göstermesi biyoremediasyon süreci açısından büyük önem taşımaktadır. Biyoremediasyon sürecince kullanılacak mikroorganizmaların statik ve çalkamalı inkübasyon koşullarında petrol biyoyıkımları araştırılmalı ve kullanılacak yöntemler belirlenmelidir. *Klebsiella pneumoniae* ve *B. axarquiensis* türlerinin çalkalamalı koşulda % 55 ve üzerinde biyoyıkım gerçekleştirebiliyor olmalarına rağmen statik koşullarda dahi petrol biyoyıkımının devam ettiği belirlendi. Böylece suşların yerinde (in-situ) biyoremediasyon süreçlerinde farklı çevresel parametreler ile desteklenmeleri durumunda petrol biyoyıkımında daha etkin olabilecekleri öngörüldü. Çevre kontaminasyonlarına neden petrol doğada farklı oranlarda karışımına çıkmaktadır. Bu bağlamda; farklı konsantrasyonlarda petrol biyoyıkımı araştırıldığında, % 0,25 petrol konsantrasyonunda *K. pneumoniae*' nin % 85' in üzerinde; *B. axarquiensis*' in % 70' in üzerinde petrol biyoyıkımı gerçekleştirdikleri belirlendi. Söz konusu türler için % 1,5 petrol konsantrasyonunda % 40 civarında petrol biyoyıkımı elde edilirken, % 2 petrol konsantrasyonunda petrol biyoyıkımında meydana gelen azalmaya rağmen mikrobiyal yıkımın halen devam ettiği belirlendi.

Her iki türe ait % 1 kültür konsantrasyonunun % 2' ye artırılması ile petrol biyoyıkımında % 4 civarında bir artış olduğu belirlenirken; % 2 kültür konsantrasyonunun % 3 kültür konsantrasyonuna artırılması ile petrol biyoyıkımında önemli bir artış görülmediği saptandı. Biyoremediasyon çalışmalarında sıcaklığın petrolün fiziksel ve kimyasal yapısı üzerinde etkin olduğu dolayısıyla petrol biyoyıkımını etkilediği bilinmektedir. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları 25 °C' de % 65 ve üzerinde petrol biyoyıkımını gerçekleştirmektedirler. İlave olarak, *K. pneumoniae*' nin 20 °C – 40 °C aralığında, *B.*

axarquiensis' in 20 °C – 35 °C aralığında % 45 ve üzerinde petrol biyoyıkımı göstermeleri; söz konusu türlerin geniş sıcaklık aralığında biyoyıkımda etkili olabileceklerini göstermektedir. Böylece söz konusu suşların, farklı sıcaklıkların olduğu doğal koşullara daha kolay adapte olabileceklerini ve ileri biyoremediasyon çalışmalarında kullanılabilir olduklarını işaret etmektedir.

Oldukça karmaşık yapıdaki petrolün biyoyıkımı uzun zaman almakla beraber bu sürecin kısaltılmasının petrol biyoyıkımı açısından avantajlı olacağı düşünülmektedir. Bu doğrultuda, petrol biyoyıkım araştırmalarında inkübasyon süresi önemli bir kriter olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda, *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* için inkübasyon süresinin 7 günden 14 güne uzatılmasının petrol biyoyıkımında artışa yol açmadığı belirlenmiştir. Özellikle uzun inkübasyon süresi ile besiyerindeki N:P dengesinin bozulmasına, kolay biyoyıkıma uğratılabilen bileşiklerin azalmasına ve zaman içinde besiyerinde meydana gelen ürünlerin mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yaratmasına bağlı olarak suşların üreme yoğunluklarında da düşüş saptanmıştır.

Petrolün karakteristik özelliklerinin mikrobiyal yıkımı etkilediği bilinmektedir. Çalışmamızda 5 farklı petrol kaynağından düşük viskoziteye sahip petrol 1 ve 2' nin *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* tarafından % 65 ve üzerinde; viskozitesi daha fazla olan petrol 3 ve petrol 4' ü % 50' nin üzerinde biyoyıkıma uğratılabildikleri gösterilmiştir. Bu bağlamda petrol biyoyıkımında kullanımını önerdiğimiz mikroorganizmaların farklı petrol kaynaklarında da etkili olabildikleri belirlenmiştir. Sürfektanların, petrolün suda emülsiyonunu arttırdığı böylece mikroorganizmalar tarafından kullanımını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda Triton X:100' ün, Tween 80 ve Tween 20' ye göre biyoyıkımı arttırmasına karşın Tween 80 ve Tween 20' nin mikrobiyal üreme yoğunluğunda önemli derece artışa yol açtığı gözlemlenmiş ve bu durumun söz konusu süfektan maddelerin mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebildiğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Biyoteknolojik ürünlerin başında yer alan biosürfektanlar ise petrol ile kontamine alanların temizlenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu bağlamda çalışmamızda, yayılma-daralma ve petrol yayılma yöntemleri ile *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarında biosürfektan varlığının tespit edilmesi ile söz konusu suşların ileri biyoremediasyon çalışmalarında kullanılabilir oldukları gösterilmiştir.

Mikrobiyal biyoyıkımın arttırılmasında, üretim ortamına eklenen ilave karbon ve azot kaynaklarının etkisi büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda, karbon kaynağı olarak kolay metabolize edilebilen bir bileşik olan glukozun *K. pneumoniae*' nin, maltozun ise *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını arttırdığı böylece ortamda ilave karbon kaynaklarının petrol biyoyıkımını desteklediği belirlenmiştir. Benzer şekilde temel besiyerinde bulunan azot kaynağına ilaveten üretim ortamına ilave edilen farklı azot kaynaklarının petrol biyoyıkımında oldukça önemli olduğu ve maya ekstraktının *K. pneumoniae*' nin ve NaNO_3 ' ün *B. axarquiensis*' in petrol biyoyıkımını desteklediği gösterilmiştir.

Farklı çevresel koşullara adapte olmuş ve farklı metabolik etkinliklere sahip mikroorganizmaların bir arada bulunmasının petrol biyoyıkımını desteklediği bilinmektedir. Bu kapsamda, çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis*' e ait karışık kültürün petrol biyoyıkımını % 2 civarında arttırdığı böylece söz konusu türlerin bir arada kullanılmasının petrol biyoyıkımı açısından sinerjik etki gösterdiği ve biyoremediasyon sürecinde avantajlı olabileceği saptandı. Petrol gibi oldukça karmaşık yapıdaki organik bileşiklerin biyoyıkıma uğratılması için farklı biyoyıkım kapasitesine sahip farklı bakteri gruplarına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda ham petrolden izole edilen mikroorganizmaların bir arada bulunmasının antagonistik etkiye neden olduğu ve petrol biyoyıkımını azalttığı belirlenirken, çamur çukurundan izole edilen mikroorganizmaların bir arada kullanılmasının sinerjik etkiye yol açarak petrol biyoyıkımını arttırdığı belirlendi. Sondaj çamurunun zengin karbon ve sürfektan içeriği nedeniyle sondaj çamurundan izole edilen mikroorganizmalara ait karışık kültürün ham petrol ve çamur çukurundan izole edilen karışık kültürlerle göre petrol biyoyıkımında daha etkin olduğu belirlendi. Sondaj çamuruna ait yüksek biyoyıkım oranının *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının biyoyıkım etkinliğinden kaynaklandığı öngörüldü. Toprak ve denizde meydana gelen çevre kirliliğinin başında petrol ve çeşitli petrol kaynakları gelmekte ve kirliliğinin çevreden uzaklaştırılmasında mikrobiyal yıkımdan yararlanılmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* için petrol içeren steril toprakta % 30' un üzerinde; petrol içeren steril olmayan toprakta ise % 55' in üzerinde petrol biyoyıkımı elde edildiği ve çevre koşulların optimize edilmesi ile biyoyıkımda artış olacağı belirlendi. Her iki türe ait karışık kültürün petrol içeren steril olmayan toprak koşullarında petrol biyoyıkımını arttırdığı bu durumun toprakta bulunan dış kaynaklı mikroorganizmaların petrol biyoyıkımı üzerinde sinerjik etki göstermesinden kaynaklandığı

sonucuna varıldı. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* deniz suyu ortamında düşük üreme yoğunlukları ile beraber etkin bir biyoyıkım elde edilemediği saptandı. *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşlarının toprakta meydana gelen petrol kirliliğinin giderilmesinde kullanılabileceği ancak deniz suyunda kullanımının uygun olmadığı belirlendi. *K. pneumoniae*' nin petrol biyoyıkımı gaz kromatografisi ile detaylı hidrokarbon analizinde ayrıntılı olarak incelendiğinde; C₁₀ - C₂₀ aralığının % 90 ve üzerinde biyoyıkıma uğratabildiği belirlendi. Sonuçlar detaylı incelendiğinde C₁₁, C₁₂ ve C₁₃' ü % 95 oranında; C₁₇' yi % 94 oranında; C₁₄ ve C₂₀' yi % 93 oranında; C₁₀ ve C₁₆' yı ise % 92 oranında biyoyıkıma uğratabildikleri belirlendi. Bunlara ek olarak suşların C₂₀ - C₂₂ aralığındaki hidrokarbonları % 75' in üzerinde biyoyıkıma uğrattıkları belirlenirken uzun zincirli hidrokarbonlardan C₃₁ ve C₃₂' yi % 40' in üzerinde biyoyıkıma uğratabilecek enzim sistemlerine sahip oldukları belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda, doğal ortamlarından farklı koşullara adapte olmuş ham petrol, çamur çukuru ve sondaj çamurundan izole edilen ve tanımlanan tüm mikroorganizmalar farklı biyoremediasyon çalışmalarına katkı sağlayacaktır. Bunlara ek olarak bu mikroorganizmaların tanımlanması ve bu mikroorganizmalara uygun antimikrobiyal ajanların kullanımı ile mikroorganizmaların petrol sektöründe neden olduğu ekonomik kayıplara karşı alınacak önlemleri kolaylaştıracaktır.

Çalışmamızda, petrol biyoyıkım etkinliği belirlenen ve 2005 yılından bu yana literatürde çeşitli çalışmalarda kullanılan *Bacillus axarquiensis* türü ile petrol biyoyıkımının araştırıldığı benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda; *Bacillus axarquiensis* türü petrol biyoyıkımı için yeni bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuç olarak, çalışmamızda petrol sahasından izole edilen *K. pneumoniae* ve *B. axarquiensis* suşları, petrol biyoyıkımını hedefleyen biyoremediasyon çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Okoh, A.I., Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 38-50, **2006**.
- [2] Van Dayke, M.I., Fundamental of petroleum. 4th Edition, Petroleum Extension Services, University of Texas at Austin, Austin, TX, USA., **1997**.
- [3] Singh, K., Chandra, S., Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17, 1-8, **2014**.
- [4] 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**.
- [5] Amro, M.M., Treatment techniques of oil contaminated soil and water auifers. Proceedings of the 1st International Conference of Water Resources and Arid Environments, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, 1-11, **20014**.
- [6] Malik, Z.A., Ahmed, S., Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium, *African journal of Biotechnology*, 11, 650-658, 2012.
- [7] Fathepure, B.Z., Recent studies of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environment, *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-16, 2014.
- [8] Das, N., Chandran, P., Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 1-13, **2011**.
- [9] Dindar, E., Topaç Şağban, F.O., Başkaya, H.S., Bioremediation of petroleum contaminated soil, *Journal of Biological Environmental Science*, 7, 39-47, **2013**.
- [10] Parales, R.E., Bruce, C.N., Schmid, A., Wackett, L.P., Biodegradation, transformation and biocatalysis (B3), *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4699-4709, **2003**.
- [11] Mohapatra, P. K., Textbook of Environmental Microbiology, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, **2008**.
- [12] 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
- [13] <http://www.dictionary.com/browse/petroleum> (Kasım, 2016)
- [14] Sharma, D., Ansari, M.J., Al-Ghamdi, A., Adgaba, N., Khan, K.A., Pruthi, V., Al - Waili, N., Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical

- characterization, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17636-17643, 2015.
- [15] Speight, J.G., The Chemistry and Technology of Petroleum, 5th Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, **2007**.
- [16] Ball, D.W., Hill, J.W., Scott, R.J., Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological, **2011**.
- [17] Speight, J.G., Arjoon, K.K., (eds.), Energy and Environment: Bioremediation of petroleum and petroleum products. Somerset, NJ, USA, 2012.
- [18] <https://cage.uit.no/wp-content/uploads/methane-molecule-2-drsusanrubin-300x225.jpg>
- [19] <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cyclobutane-compressed.svg> (Ekim, **2016**).
- [20] <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclobutane#/media/File:Cyclobutane-buckled-3D-balls.png> (Ekim, 2016)
- [21] Demir, İ., Demirbağ, Z., Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Olarak Parçalanması, *Tübitak*, 23, 293-302, **1999**.
- [22] 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**.
- [23] Zhang, J.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**.
- [24] Danyi, S., Bose, F., Brasseur, 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**.
- [25] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chrysene_structure.png (Aralık, 2016).
- [26] 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**.
- [27] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Yüzeydeki Petrol Ürünlerini Temizleme, **2013**.
- [28] Denis, J., Briant, J. and Hipeaux, J.C., Lubricant Properties Analysis and Testing, Editions Technip, Paris, France, **1997**.
- [29] Riazi, M.R., Characterization and Properties of Petroleum Fractions, 1th Edition, West Conshohocken, USA, **2005**

- [30] Daubert, T.E. and Danner, R.E, API Technical Data Book--Petroleum Refining, 6th ed., American Petroleum Institute (API), Washington, DC, **1997**.
- [31] 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**.
- [32] Struchtemeyer, C. G., Davis, J.P., Elshahed, M.S., Influence of the drilling mud formulation process on the bacterial communities in thermogenic natural gas wells of the Barnett Shale. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4744-4753, **2011**.
- [33] Turkiewicz, A., The role of microorganisms in the oil and gas industry, *Rocznik Ochrona Srodowiska*, 227-240, **2011**.
- [34] <http://www.amsnodig.com/mud-recyclers.php> (Kasım, **2016**).
- [35] Avdalovic, J., Duric, A., Miletic, S., Ilic, M., Milic, J., Vrvic, M.M., Treatment of mud pit by bioremediation, *Waste Management & Research*, 34, 734-739, **2016**.
- [36] <http://www.ekomeri.com/wp-content/uploads/2015/03/reserve-pit.jpg> (Ekim, **2016**).
- [37] Kvendolven, K. A., Cooper, C.K., Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Marine Letters*, 23, 140-146, **2003**
- [38] Ceyhan ve Esmeray, P etrol kirliliği ve biyoremediasyon, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1), 95-101, **2012**.
- [39] 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**.
- [40] <http://www.hngn.com/articles/93624/20150520/breaking-pipeline-burst-in-california-spills-21-000-gallons-of-crude-oil-into-pacific-ocean.htm> (Aralık, **2016**).
- [41] 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**.
- [42] Tan, K.H., Environmental Soil Sciences, 3th Edition, Taylor&Francis Group, CRC Press, Florida, USA, **2009**.
- [43] 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**.
- [44] <https://www.bloomberg.com/news/articles/2013-10-03/in-mps-oil-spill-saga-a-courttriumph-it-might-regret> (Aralık, **2016**).

- [45] http://www.ecy.wa.gov/programs/spills/specialfocus/bplaoilspill/photogallery/oilcollection_boom.jpg (Kasım, **2016**).
- [46] The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF), Petrol Döküntüsüne Müdahalede Emici Maddelerin Kullanımı, Teknik Bilgi Kitapçıkları, Londra, İngiltere, **2012**.
- [47] Van Hamme, J.G., *Crude oil biodegradation by a mixed bacterial culture*, Doktora Tezi, University of Waterloo, Ontario, Canada, **2000**.
- [48] 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**.
- [49] Plaza, G., Ulfig, K., Hazen, T.C., Brigmon, R.L., Use of molecular techniques in bioremediation, *Acta Microbiologica Polonica*, 50, 205-218, **2001**.
- [50] Alexander, M., *Biodegradation and Bioremediation* second edition, academic Press New York, **1999**.
- [51] Barker, A.V., Bryson, G.m., Bioremediation of heavy metals and organic toxicants by composting, *The Scientific World Journal*, 2, 407-420, **2002**.
- [52] <http://web.deu.edu.tr/erdin/pubs/doc25.htm> (Aralık, **2016**).
- [53] Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., An overview and analysis of site remediation technologies, *Journal of Environmental Management*, 71, 95-122, **2004**.
- [54] 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**.
- [55] Vidali, M. Bioremediation, An overview, *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172, **2001**.
- [56] USEPA Mine Waste Technology Program, Activity III, Project 12: sulfatereducing bacteria reactive wall demonstration, **2002**.
- [57] Leung, M., Bioremediation techniques for cleaning up mess, *Journal of Biotechnology*, 2, 18-22, **2004**.
- [58] Shannon, M.J., Unterman, R., Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction, *Annual Review of Microbiology*, 47, 715-724, **1993**.
- [59] 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**.

- [60] 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**.
- [61] Akpor, O.B., Muchie, M., Bioremediation of polluted wastewater influent: phosphorus and nitrogen removal. *Scientific Research and Essays*, 5 (21), 3222-3230, **2010**.
- [62] 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**.
- [63] Ubalua, A.O., Bioremediation strategies for oil polluted marine ecosystem, *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 2, 160-168, **2011**.
- [64] Peixoto, R.S., Vermelho, A.B., Rosado, A.S., Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects, *Enzyme Research*, 1-17, **2011**.
- [65] Atlas, R.M., Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation, *Marine Pollution Bulletin*, 31, 178-182, **1995**.
- [66] Delille, D., Coulon, F., Pelletier, E., Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient amended hydrocarbon contaminated sub-Antartic soils, *Cold Regions Science and Technology*, 40, 61-70, **2004**.
- [67] 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**.
- [68] 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**.
- [69] 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**.
- [70] Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S., Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 15-25, **2003**.
- [71] 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**.
- [72] Hamzah, A., Rabu, A., Raja Azmy, R. F. H., Youssoff, N. A., Isolation and characterization of bacteria degrading Sumandak and South Angsi Oils, *Sains Malaysiana*, 39, 161-168, **2010**.

- [73] 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**.
- [74] Ojo, O.A., Petroleum- utilization by native bacterial population from wastewater carnal Southwest Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4): 333-337, **2006**.
- [75] 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**.
- [76] 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**.
- [77] 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**.
- [78] 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**.
- [79] Eraydin Erdogan 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**.
- [80] Latha R., Kalaivani R., Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3, 2789-2795, **2012**.
- [81] 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**.
- [82] Silva, F.S., Almeida, D.G., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 12523- 12542, **2014**.
- [83] Gakpe, E., Rahman, P.K.S.M., Hatha, A.A.M., Microbial biosurfactants: Review, *Journal of Marine and Atmospheric Research*, 3, 1-17, **2007**.
- [84] Khan, A., Butt, A., Biosurfactants and their potential applications for microbes and mankind: An overview, *Middle East Journal of Business*, 11, 9-18, **2016**.
- [85] Zhou, H., Chen, J., Yang, Z., Qin, B., Li, Y., Kong, X., Biosurfactant production and characterization of *Bacillus sp.* ZG0427 isolated from oil contaminated soil, *Annals of Microbiology*, 65, 2255-2264, **2015**.

- [86] Amin, M., Rakhisi, Z., Ahmady, A.Z., Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties, *Clinical microbiology and Infection*, 2 (1), 1-4, **2014**.
- [87] Nathaniel, A.L., Joshi, S.R., Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review, *Biology of Useful Plants and Microbes*, 33-43, **2014**.
- [88] Noura, R., Crotti, E., Rolli, E., Marasco, R., Fava, F., Daffonchio, D., *Bacillus thuringiensis* in biotechnology, *The Most Important Bacillus Species in Biotechnology*, Springer, Netherlands, **2012**.
- [89] Ruiz - Garcia, C., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., Bejar, V., *Bacillus axarquiensis* sp. nov. *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river mouth sediments in southern Spain, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1279-1285, **2005**.
- [90] https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Klebsiella_pneumoniae.jpg (Kasim, 2016).
- [91] Sikarwar, A.S., Batra, H.V., Identification of *Klebsiella pneumoniae* by capsular polysaccharide polyclonal antibodies, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2, 130-134, **2011**.
- [92] Brisse, S., Grimont, F., Grimont, P.A.D., The Genus *Klebsiella*, *Prokaryotes*, 6, 159-196, **2006**.
- [93] Nwaguma, I.V., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Isolation, characterization and application of biosurfactant by *Klebsiella pneumoniae* strain IVN51 isolated from hydrocarbon polluted soil in Ogoniland, Nigeria, *Biosources and Bioprocessing*, 3(40), 1-13, **2016**.
- [94] Avcioğlu, N.H., *Farklı Klebsiella Türleri ile Siyanür Biyoyıkımının Araştırılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [95] Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu, M., Tang, T., Li, Z., Zhao, H., Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumoniae* PL1 and its potential use in bioremediation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3819-3828, **2014**.
- [96] Lara, P., Morett, E., Juarez, K., Isolation and characterization of a Cr(VI)-reducing *Klebsiella pneumoniae* with potential application in bioremediation and waste water treatment, *Sociedad Mexicana de Biotecnología Bioingiería*, **2001**.
- [97] Wagner-Döbler, I., *Bioremediation of Mercury*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, **2013**.
- [98] Huang, H., Gong, C.S., Tsao, G.T., Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 687-698, **2002**.

- [99] Lily, M.K., Bahuguna, A., Dangwal, K., Garg, V., Degradation of Benzo[a] pyrene by a novel strains *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447), *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 884-892, **2009**.
- [100] Dasgupta, D., Ghosh, R. & Sengupta, T.K., Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. *ISRN Biotechnology*, 1-13, **2013**.
- [101] Garapati, V.K., Mishra, S., Hydrocarbon degradation using fungal isolate: nutrients optimized by combined grey relational analysis, *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2(2), 390-399, **2012**.
- [102] Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., Isolation and characterization of crude-oil degrading bacteria from the Persian Gulf and Capian Sea, *Marine Pollution Bulletin*, 64, 7-12, **2012**.
- [103] Aparna, A., Srinikethan, G., Hedge, S., Effect of addition biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* on biodegradation of crude oil, *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*, Singapore, **2011**.
- [104] Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 273-280, **1998**.
- [105] Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 211-218, **2000**.
- [106] Kvendolven, K.A., Cooper, C.K., Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Marine Letters*, 23, 140-146, **2003**.
- [107] Shafiee, P., Shojaosadati, S.A., Charkhabi, A.H., Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Aerobic Mixed Bacterial Culture Isolated from Hydrocarbon Polluted Soils. *Iran Journal Chemistry&Chemical Engineering*, 25(3), 73-78, **2006**.
- [108] Rahman, K. S. M., Banat, I. M., Thahira, J., Thayumanavan, T., Lakshmanaperumalsamy, P, Bioremediation of gasoline contaminated soil by bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant, *Bioresource Technology*, 81 (1), 25-32, **2002**.
- [109] Rizi, M.S, Sepahi, A.A., Tabatabaee, M.S., Crude oil biodegradation by soil indigenous *Bacillus sp.* Isolated from Lavan Island, *Bioremediation Journal*, 16(4), 218-224, **2012**.
- [110] Albokari, M., Mashhour, I., Alshehri, M., Bootman, C., Al - Enezi, M., Characterization of microbial communities in heavy crude oil from Saudi Arabia. *Annals of Microbiology*, 65, 95-104, **2015**.
- [111] Raza, C., Bilal, A. & Jahan, N., Evaluation of biodegradation potential of bacteria in crude oil contaminated soil. *Biologia*. 56, 1&2, pp. 77-85, **2010**.

- [112] Rahman, K. S .M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M., Towards efficient crude oil biodegradation by a mixed bacterial consortium, *Bioresource Technology*, 85, 257-261, **2002**.
- [113] Onuoha, S.C., Olugbue, V.U., Uraku, J.A., Uchendu, D.O., Biodegradation potentials of hydrocarbon degraders from waste lubricating oil-spilled in Ebonyi State, Nigeria, *International Journal of Agriculture & Biotechnology*, 13, 586-590, **2011**.
- [114] Jalilzadeh Yengejeh, R., Sekhavatjou, M.S., Maktabi, P., Arbab Soleimani, N, Khadivi, S. & Pourjafarian, V., The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, 8(2), 509-514, **2014**.
- [115] Al-Jawhari, I.F.H., Ability of some fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon, *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2 (2), 46-52, **2014**.
- [116] Steliga, T., Role of fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbons in drill waste, *Polish journal of Environmental Studies*, 21 (2), 471-479, **2012**.
- [117] 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 and Environmental*, 38, 41-50, **2014**.
- [118] Benka - Coker, M.O., Olumagin, A., Effects of waste drilling fluid on bacterial isolates from mangrove swamp oilfield location in the Niger Delta of Nigeria. *Bioresource Technology*, 55, 3, pp.175-180, **1996**.
- [119] Salam, L.B., Obayori, O.S., Akashoro, O.S., Okogie, G.O., Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil, *International Journal of Agriculture & Biology*, 13, 245-250, **2011**.
- [120] Afifi, A, Motamedi, H., Alizadeh, B. & Leilavi, H., Isolation and identification of oil degrading bacteria from oil sludge in Abadan oil refinery. *Environmental and Experimental Biology*, 13, 13-18, **2015**.
- [121] Al-Wasify, R.S., Hamed, S.R., Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates, *International Journal of Bacteriology*, 1-8, **2014**.
- [122] Vanishree, M., Thatheyus, A.J., Ramya, D., Biodegradation of petroleum using the fungus *Penicillium sp.*, *Science International*, 2 (1), 26-31, **2014**.
- [123] Prasthyusha, K., Jagan Mohan, Y.S.Y.V., Sridevi, S., Sandeep, B.V., Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam, *International Journal of Advanced Research*, 4 (3), 357-362, **2016**.
- [124] Nakamura, F.M., Germano, M.G., Tsai, S.M., Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon Dark Earth, *Diversity*, 6, 339-353, **2014**.

- [125] Mueller, J.H., A comparison of the results obtained by the colorimetric and gravimetric determinations of cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry*, 25, 549-560, **1916**.
- [126] Kumar, K. S., Dhanarani, T. S., Thamaraiselvi, K., Utilization of petroleum hydrocarbons by *Micrococcus* and *Streptococcus* spp. isolated from contaminated soil, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3 (1), 71-78, **2013**.
- [127] Kavynifard, A., Ebrahimipour, G., Ghasempour, A., Optimization of crude oil degradation by *Dietzia cinnamea* KA1, capable of biosurfactant production, *Journal of Basic Microbiology*, 56 (5), 566-575, **2015**.
- [128] Boszczyk-Maleszak, H., Zabost, A., Wolicka, D., Kaciszczenko, J., Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values, *Polish Journal of Microbiology*, 55 (1), 69-73, **2006**.
- [129] Efeovbokhan, V.E., Hymore, F.K., Ayoola, A.A., Adeeyo, O.A., Comparison of aerobic and anaerobic bioremediation of polluted water samples, *American International Journal of Contemporary Research*, 4 (4), 120-126, **2014**.
- [130] Hassan, S. E. D., Desouky, S.E., Fouda, A., El-Gamal, M.S., Alemam, A., Biodegradation of Phenanthrene by *Klebsiella* sp. isolated from organic contaminated sediment, *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 4 (4), 1-12, **2015**.
- [131] Das, K., Mukherjee, A.K., Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98, 7, pp. 1339-1345, **2007**.
- [132] Kaczorek, E., Olszanowski, A., Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the presence of biosurfactants: A cell surface modification, *Water Air Soil Pollution*, 214, 451-459, **2011**.
- [133] Mohanty, G., Mukherji, S., Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61 (3), 240-250, **2008**.
- [134] Yuvali Çelik, G., Aslim, B., Beyatli, Y., Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100, *Journal of Environmental Biology*, 29(6), 867-870, **2008**.
- [135] Kishore, R. S. K., Kiese, S., Fischer, S., Pappenberger, A., Grauschopf, U., Mahler, H.C., The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on stability of biotherapeutics, *Pharmaceutical Research*, 28, 1194-1210, **2011**.
- [136] Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., Michael, J.M. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347, **2004**.

- [137] Lee, S. C., Lee, S.J., Kim, S.H., Park, I.H., Lee, Y.S., Chung, S.Y., Choi, Y.L., Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella sp.* Y6-1 isolated from waste soybean oil, *Bioresource Technology*, 99, 2288-2292, **2008**.
- [138] Jain, R.M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., Jha, B., Production and structural characterization of biosurfactant produced by alkaliphilic bacterium *Klebsiella sp.*: Evaluation of different carbon sources, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 108, 199-204, **2013**.
- [139] Matvyeyeva, O. L., Vasylychenko, O. A., Aliieva, O. R., Microbial Biosurfactants role in oil products biodegradation, *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2, 69-77, **2014**.
- [140] Obayori, O. S., Ilori, M.O., Amund, O. O., Degradation of spiked pyrene and nonpyrene hydrocarbons in soil microcosms by *Pseudomonas* species isolated from petroleum polluted soil, *Petroleum Science and Technology*, 31, 1674-1680, **2013**.
- [141] Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G., Devi, P., Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Bravibacillus sp.* *Bioresource Technology*, 101, 7980-7983, **2010**.
- [142] Kang, S.W., Kim, Y.B., Shin, J.D., Kim, E.K., Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid, *Applied of Biochemistry & Biotechnology*, 160, 780-790, **2010**.
- [143] Khan, S.A., Hamayun, M., Khan, A.L., Ahmad, B., Ahmed, S., Lee, I-J., Influence of pH, temperature and glucose on biodegradation of 4-aminophenol by a novel bacterial strain, *Pseudomonas sp.* ST-4, *African Journal of Biotechnology*, 8 (16), 3827- 3831, **2009**.
- [144] Linda, A., Bouziane, A., Petroleum - oil biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the industrial rejection of the refinery of ARZEWi-Algeria, 18(8), *World Applied Science Journal*, 1119-1123, **2012**.
- [145] Berekeea, M.M., Towards efficient crude oil degradation by *Pseudomonas sp.* strain-O2: Application of Plackett-Burman design for evaluation of cultivation conditions, *African Journal of Microbiology Research*, 7(39), 4722-4729, **2013**.
- [146] Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed culture, *Chemosphere*, 41, 1463-1468, **2000**.
- [147] Salleh, A.B., Mohamad Ghazali, F., Abd Rahman, R.N.Z., Basri, M., Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution, *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 411-425, **2003**.
- [148] Yalçın, E., Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosümfektan Eldesi ve Hidrokarbon Degradasyonununun Araştırılması, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, **2008**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Ad-Soyad: Sezen BİLEN ÖZYÜREK

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: sbilen@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
Beytepe Kampüsü/ANKARA

Eğitim

Lise: Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, Ankara

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji
Anabilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-KPDS: (78)

İş Deneyimi

Eylül, 2010-.....: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Deneyim Alanları

Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından bütçesi 20294,03 TL olan FHD-2015-8871 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Ozyurek Bilen, S., Seyis Bilkay, I., Investigation of different microorganisms for biodegradation of petroleum hydrocarbons. European Biotechnology Congress, *Journal of Biotechnology*, 185, S22, 2014.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Ozyurek Bilen, S., Seyis Bilkay, I., Investigation of different microorganisms for biodegradation of petroleum hydrocarbons. *European Biotechnology Congress*, Lecce/Italy. (Sözlü Sunum)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 13/12/2016

Tez Başlığı / Konusu: Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurundan izole edilen mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımının araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 103 sayfalık kısmına ilişkin, 07/12/2016 tarihinde ~~gözetim~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4' tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Sezen BİLEN ÖZYÜREK
Öğrenci No: N10144617
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Biyoteknoloji
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

13.12.2016

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY