

**KARIŞIK MİKROBİYAL KÜLTÜR İLE PETROL  
BİYİYİKİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PETROLEUM BIODEGRADATION  
BY MIXED MICROBIAL CULTURE**

**CANSU KÖTEN**

**PROF. DR. İŐIL SEYİS BİLKAY**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıŐtır.

2023

*Sevgili aileme...*

## ÖZET

### KARIŞIK MİKROBİYAL KÜLTÜR İLE PETROL BİYOYIKIMININ ARAŞTIRILMASI

**Cansu KÖTEN**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY**

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve petrol sahasından izole edildiği bilinen *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 suşları ile petrol biyoyıkımının araştırılması amaçlandı. *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 için %85, *Bacillus axarquiensis* NR115929 için %81, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 için %80 ve *Bacillus tequilensis* NR104919 için %65 petrol yıkımı belirlendi. Söz konusu suşlar çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçildi. Petrol biyoyıkımının artırılması amacıyla bu potent suşlar ikili ve üçlü gruplar halinde bir araya getirilerek on farklı konsorsiyum grubu oluşturuldu. Söz konusu

konsorsiyumlardan beş farklı konsorsiyumun %75'in üzerinde petrol biyoyıkımı yaptığı saptandı. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 suşlarının bir araya geldiği konsorsiyumun en yüksek petrol biyoyıkımı (%88) belirlendi. Potent konsorsiyum ile petrol biyoyıkımında optimal fizyolojik koşulların belirlenmesi amacıyla, farklı pH, inkübasyon koşulları, sıcaklık ve inkübasyon süresi parametreleri araştırıldı ve pH 7.0, 150 rpm çalkalama hızı, 25°C sıcaklık ve 7 gün inkübasyon optimize koşullarda maksimum petrol biyoyıkımı elde edildi. Ayrıca, 4,0-8,0 pH aralığında ve 25-35°C sıcaklık aralığında %78'in üzerinde petrol biyoyıkımı yapıldığı gözlemlendi.

Çalışmamızın devamında, Buna ek olarak, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 konsorsiyumu belirlenen optimal koşullarda inkübasyona bırakılması ardından elde edilen kültür süpernatanı ile daha kısa sürede ve yüksek petrol biyoyıkımı amaçlandı. Bu amaçla, farklı süpernatan konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde petrol biyoyıkımları araştırıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kültür süpernatanı konsantrasyonunun artması ile petrol biyoyıkımında önemli artışı olmadığı gözlemlendi. Bu bağlamda, %20 süpernatan konsantrasyonunda dahi etkili petrol biyoyıkımı gözlemlendi. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 konsorsiyumunun petrol biyoyıkımı ile farklı konsantrasyondaki kültür süpernatanı petrol biyoyıkımları karşılaştırıldı. Bu bağlamda, söz konusu konsorsiyum ile 7 gün sonunda elde edilen petrol biyoyıkımının, %30 süpernatan konsantrasyonu ile 60 saat sonunda elde edilen petrol biyoyıkımına benzer olduğu belirlendi.

Çalışmanın son aşamasında, maksimum petrol biyoyıkımı görülen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 konsorsiyumu ve kültür süpernatanlarına ait petrol biyoyıkımları GC analizi ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, potent konsorsiyum ile 7 gün sonunda %87, %50 süpernatan konsantrasyonu ile 84 saat sonunda %84 ve %30 süpernatan konsantrasyonu ile 60 saat sonunda %75 petrol biyoyıkımı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoremediasyon, petrol biyoyıkımı, mikrobiyal konsorsiyum, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus axarquiensis*, *Pannonibacter phragmitetus*

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF PETROLEUM BIODEGRADATION BY MIXED MICROBIAL CULTURE**

**Cansu KÖTEN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY**

This study aimed petroleum biodegradation with *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 and *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 strains from Hacettepe University Environmental Biotechnology Laboratory Culture Collection, which were isolated from an oil field. Petroleum biodegradation rates were determined to be 85% for *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, 81% for *Bacillus axarquiensis* NR115929, 80% for *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and 65% for *Bacillus tequilensis* NR104919. The mentioned strains were selected for the continuation of the study. In order to increase petroleum biodegradation, these strains were brought together in double and triple groups to form ten different consortium groups. It was determined that five of these consortia had

petroleum biodegradation rate above 75%. The consortium of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 had the highest petroleum biodegradation rate (88%). In order to determine the optimal physiological conditions for petroleum biodegradation for the potential consortium, effect of different pH, incubation conditions, temperature and incubation time were investigated and it was determined that maximum petroleum biodegradation was obtained with pH 7.0, 150 rpm shaking speed, 25°C temperature and 7 days of incubation. Furthermore, above 78% petroleum biodegradation rate was observed in the pH range of 4.0-8.0 and the temperature range of 25-35°C.

In the continuation of the study, higher petroleum biodegradation rate in a shorter time was aimed with the culture supernatant obtained using determined optimal conditions from *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 consortium. For this purpose, petroleum biodegradation was investigated at different supernatant concentrations and incubation times. It was observed that there was no significant increase in petroleum biodegradation with an increase in the concentration of culture supernatant. In this regard, effective petroleum biodegradation was observed even at 20% supernatant concentration. Petroleum biodegradation rates of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 consortium and culture supernatant in different concentrations were compared. In this respect, it was determined that the petroleum biodegradation obtained with this consortium after 7 days was comparable to the petroleum biodegradation obtained with 30% supernatant concentration after 60 hours.

In the last stage of the study, the maximum petroleum biodegradation of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 consortium and culture supernatants were determined by GC analysis. When the results obtained were evaluated, 87% petroleum biodegradation after 7 days with the potential consortium, 84% after 84 hours with 50% supernatant concentration and 75% after 60 hours with 30% supernatant concentration was observed.

**Keywords:** Bioremediation, petroleum biodegradation, microbial consortium, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus axarquiensis*, *Pannonibacter phragmitetus*



## TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca bilgi birikimi ve deneyimiyle yanımda olan, çalışmalarına katkı sağlayan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a,

Yüksek lisans öğrenimim sırasında verdiği derslerle ufkumu genişleten, bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yardımları ve bilgisi ile bana destek olan hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Neslihan İDİL ve Dr. Öğretim Üyesi Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ'ye,

Tez çalışmalarımı sürdürdüğüm süre boyunca öncelikle manevi desteğiyle birlikte bilgi ve tecrübesiyle de her an yanımda olan çok kıymetli hocam Dr. Sezen BİLEN ÖZYÜREK'e,

Henüz lisans eğitimimin başında bana biyolojiyi sevdiren ve akademik çalışmalara teşvik eden Dr. Sinem DİKEN GÜR'e ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı üyeleri değerli hocalarım, Dr. Gülcan ŞAHAL ÖZBAKIR, Dr. Nermin Hande AVCIOĞLU, Dr. Doruk ARACAGÖK'e,

Tez çalışmalarım sırasında yardımları ve bilgileriyle bana destek olan çalışma arkadaşım Kaan SOYUER ve tez sürecimde bana yardımcı olan arkadaşlarım Cansu ve Ahmet'e,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, bu günlere gelmemi sağlayan canım aileme,

Her zaman sevgiyle yanımda olan ve bana manevi destek sağlayan tüm arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ .....	4
2.1. Petrol Ürünleri ve Kullanım Alanları .....	4
2.2. Petrol Kirliliği ve Etkileri .....	4
2.3. Petrol Kirliliğinin Gideriminde Kullanılan Yöntemler.....	7
2.3.1. Fiziksel Yöntemler.....	7
2.3.2. Kimyasal Yöntemler .....	10
2.3.3. Biyolojik Yöntemler .....	10
2.3.3.1. Ex-situ (Doğal Yerin Dışında) Temizleme Yöntemleri.....	11
2.3.3.2. İn-situ (Yerinde) Temizleme Yöntemleri .....	11
2.4. Biyoremediasyon .....	13
2.5. Mikrobiyal Biyoyıkım (Biyodegradasyon).....	13
2.6. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Faktörler.....	15
2.6.1.Sıcaklık .....	15
2.6.2. Oksijen .....	15
2.6.3. pH.....	16

2.6.4. Basınç.....	16
2.6.5. Besin ve Tuz .....	16
2.7. Petrol.....	17
2.7.1. Petrolün Kimyasal Özellikleri .....	17
2.7.1. Petrolün Fiziksel Özellikleri .....	21
2.8. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	22
2.8.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
2.8.2. <i>Bacillus axarquiensis</i> .....	24
2.8.3. <i>Pannonibacter phragmitetus</i> .....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	27
3.1.Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	27
3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları.....	27
3.2.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim .....	27
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Saklanması .....	27
3.2.3. Petrol Biyoyıkımında Kullanılan Mikroorganizmaların Hazırlanması .....	27
3.2.4. Petrol İçeren Besiyerine Ekim ve Üretim .....	28
3.3. Petrol Biyoyıkımının Araştırılması.....	28
3.3.1. Petrol Biyoyıkımının Gravimetrik Yöntem ile Belirlenmesi.....	28
3.4. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizmaların Seçimi .....	29
3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Farklı Konsorsiyumlar ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması .....	29
3.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ile Petrol Biyoyıkımı Uygun Fizyolojik Koşullarının Araştırılması .....	30
3.6.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması ...	31
3.6.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması .....	31
3.6.3. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması... 31	

3.6.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	31
3.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyuma ait Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması.....	32
3.8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyum ve Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi .....	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizma Seçimi.....	35
4.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Farklı Konsorsiyumlar ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması .....	37
4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ile Petrol Biyoyıkımı Uygun Fizyolojik Koşullarının Araştırılması .....	43
4.3.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması ...	44
4.3.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması .....	45
4.3.3. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması...	47
4.3.4 Farklı İnkübasyon Sürelerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması.....	49
4.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyuma ait Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması.....	51
4.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyum ve Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi .....	55
5.YORUM .....	59
6. KAYNAKLAR.....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Ham Petrol Endüstrisi Aşamaları.....	5
Şekil 2. 2. Denizde Petrol Kirliliği.....	6
Şekil 2. 3. Petrol Hidrokarbonlarına Kısa ve Uzun Süreli Maruz Kalmanın Sağlığa Etkileri .....	7
Şekil 2. 4. Petrol Kirliliğinin Bariyerler ile Kontrol Altına Alınması.....	8
Şekil 2. 5. Fiziksel Yöntemlerde Kullanılan Farklı Skimmer Yüzeyleri .....	9
Şekil 2. 6. Petrol Kirliliğinde Yapılan Yakma İşlemi .....	9
Şekil 2. 7. Petrolün Ana Bileşenleri .....	18
Şekil 2. 8. Metanın Yapısı.....	18
Şekil 2. 9. Siklopentan Yapısı .....	19
Şekil 2. 10. Benzen, Tolüen, Etilbenzen, Ksilen (BTEX) Monosiklik Aromatik Bileşikleri .....	20
Şekil 2. 11. Öncelikli Kirlletici Olarak Belirlenen Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar.....	20
Şekil 2. 12. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	23
Şekil 2. 13. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Mukoid Koloni .....	23
Şekil 2. 14. <i>Bacillus axarquiensis</i> .....	25
Şekil 2. 15. <i>Pannonibacter phragmitetus</i> .....	26
Şekil 4. 1. Farklı Mikroorganizmaların Petrol Biyoyıkımları.....	37
Şekil 4. 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyumların Petrol Biyoyıkımları .....	43

<b>Şekil 4. 3.</b> Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisi.....	45
<b>Şekil 4. 4.</b> İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisi .....	47
<b>Şekil 4. 5.</b> İnkübasyon Sıcaklığının Petrol Biyoyıkımına Etkisi.....	49
<b>Şekil 4. 6.</b> İnkübasyon Süresinin Petrol Biyoyıkımına Etkisi .....	50
<b>Şekil 4. 7.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum Kültür Süpernatanı ile Farklı Konsantrasyon ve İnkübasyon sürelerinde Petrol Biyoyıkımı .....	54
<b>Şekil 4. 8.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ve Süpernatanına Ait Örneklerin GC Analizi ile Kalan Petrol Miktarları .....	57
<b>Şekil 4. 9.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 ve <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ve Süpernatanına Ait Örneklerin Petrol Biyoyıkımının GC Analizi Sonuçları .....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3. 1.</b> Seçilen Farklı Mikroorganizmalar ile Oluşturulan Konsorsiyumlar.....	30
<b>Çizelge 4. 1.</b> Seçilen Mikroorganizmalar ile Oluşturulan Konsorsiyumlar ve Gram Özelliklerine göre Gruplandırılması.....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°F	Fahrenayt derece
°C	Santigrat derece
m	Metre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
g	Gram
L	Litre
C	Karbon
N	Azot
P	Fosfor
He	Helyum
H <sub>2</sub> O	Su
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit



CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen Fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Amonyum Nitrat
FeCl <sub>3</sub>	Demir Klorür
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum Sülfat

### **Kısaltmalar**

BTEX	Benzen, Tolüen, Etilbenzen ve Ksilen
PVC	Polivinil Klorür
PU	Poliüretan/Polivinil
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
MAH	Monosiklik Aromatik Hidrokarbonlar
USEPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
A.P.I.	Amerikan Petrol Enstitüsü
GC	Gaz Kromatografisi
EPA	Çevre Koruma Ajansı
ATCC	Amerika Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
v/v	Hacim/Hacim
DCM	Diklorometan

BH

Bushnell-Haas

rpm

Rotation Per Minute

OD

Optik Dansite

cfu

Koloni Oluşturan Birim

# 1. GİRİŞ

Son yıllarda hızla artan nüfusa paralel olarak petrolün kullanım alanları ve petrol endüstrisi genişlemiştir. Petrol, rafinerilerde ve petrokimya endüstrilerinde akaryakıt, sentetik polimerler ve petrokimyasallar gibi çeşitli ürünler için hammadde ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [1]. Petrol döküntüleri, fosil yakıtların tamamen yanmadan atılması, petrol taşınması sırasında meydana gelen kazalar, petrol arama ve çıkarma faaliyetleri gibi sebeplerle çevreye petrol hidrokarbonları yayılmaktadır. Bu şekilde çeşitli ortamlara taşınması ve birikmesi sonucu ekolojik dengeyi bozmaktadır. Çevre Koruma Ajansı (EPA), çevreye yayılan zehirli kimyasal kaynakları arasından, petrol endüstrisinin ilk 10' da olduğunu bildirmiştir. Ayrıca petrol içeriğindeki polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) 16 tanesi Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından öncelikli kirleticiler olarak belirlenmiştir [2].

Petrol hidrokarbonlarının çevreden uzaklaştırılması oldukça önemli olup fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak farklı yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemler, kimyasal maddelerden, enerjiden ve maliyet açısından tasarruf sağladığı için diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Biyoventilasyon, biyoagmentasyon, biyostilüstasyon ve biyoremediasyon gibi biyolojik yöntemler bulunmaktadır [3,4]. Petrol gibi organik kirleticilerin, mikroorganizmalar yardımıyla zararsız veya daha az zararlı bileşiklere dönüştürmesi biyoremediasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu bağlamda, biyoremediasyonda petrol kirliliğinin giderimi için çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır. *Acinetobacter* sp., *Alcanivorax* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Sphingomonas* sp. ve *Moraxella* sp. en sık kullanılan mikroorganizmalardır [5]. Toprak, tatlı su, deniz ekosistemi gibi farklı ortamlarda gerçekleşen petrol kirliliği için değişen çevre koşullarına uygun mikroorganizmaların seçilmesi petrol biyoyıkım verimi açısından oldukça önemlidir.

Biyoremediasyon çalışmalarında petrol biyoyıkımını gerçekleştirecek uygun mikroorganizmalar bir arada kullanılabilir. Birbirleriyle sinerjistik etkisi olan mikroorganizmalar ile oluşturulan konsorsiyumların petrol biyoyıkımını arttırdığı bilinmektedir [6]. Petrol sahasından izole edilmiş suşların bu ortama adapte olması ve petrolü karbon kaynağı olarak kullanabilmesi nedeni ile verimli petrol biyoyıkımını gerçekleştirmektedirler. Bu bağlamda, çalışmamızda petrol sahasından izole edilen

mikroorganizmalar kullanılarak verimli petrol biyoyıkımı eldesi amaçlandı. Çalışmamızda, tek mikroorganizma ve ikili, üçlü mikroorganizma konsorsiyumları araştırılıp karşılaştırılarak petrol biyoyıkımında kullanıma önerilecek özgün mikroorganizma karışımlarının saptanması hedeflendi. Bu doğrultuda çalışmamızda öncelikle mikroorganizmalar arasından en yüksek petrol biyoyıkımı yapabilen suşların saptanması ve bu mikroorganizmalar ile farklı konsorsiyumlar oluşturularak biyoyıkım verimlerinin artırılması planlandı. Çalışmamızın diğer bir amacı, farklı petrol biyoyıkım ortamlarında konsorsiyumun kullanılabilme potansiyellerinin araştırılmasıydı. Bu bağlamda, en yüksek verimle petrol biyoyıkımı yapan konsorsiyumun saptanması ardından farklı fizyolojik koşullarda konsorsiyumun petrol biyoyıkımına etkisi araştırılması ile farklı petrol biyoyıkım ortamlarında bu konsorsiyumun kullanılabilme potansiyelleri belirlenerek değerlendirildi. Yerinde biyoremediasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmaların çoğunun aerobik olmasından dolayı petrol ile kirlenen ortamın havalandırılması veya oksijen enjeksiyonu işlemleri uygulanarak mikroorganizma için uygun koşulların sağlanması maliyeti arttırmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda oluşturduğumuz konsorsiyum ile bu maliyeti azaltmak amacıyla ortamın havalandırılması veya oksijen enjeksiyonu kullanılmadan statik koşullarda petrol biyoyıkımı ile çalkalamalı inkübasyon koşuluyla karşılaştırılarak araştırıldı.

Çalışmamızın bir diğer amacı petrol kirliliğinin daha kısa sürede ve etkili uzaklaştırılmasını sağlamak için kültür süpernatanı ile petrol yıkımının araştırılmasıydı. Bu bağlamda, oluşturduğumuz konsorsiyumun kültür süpernatanı ile mikrobiyal ekim ve üretim yapılmadan petrol biyoyıkımı araştırıldı. Petrol kirliliği olan ortamda, öncelikle kolay parçalanabilen bileşiklerin tükenmesi sonucu kalan bileşiklerin toksisitesi artarak, mikroorganizmaların aktivitesini düşürmekte ve çevreye zarar vermeye devam etmektedir. Bu sebeple, petrol biyoyıkımının kısa sürede verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, elde edilen kültür süpernatanlarının farklı konsantrasyonları ve farklı inkübasyon sürelerinde yapılan petrol biyoyıkım çalışmaları ile petrol biyoyıkımının iyileştirilmesi hedeflendi. İleride yapılacak çalışmalarda, süpernatan içerisindeki enzimlerin araştırılması ve saflaştırılması sonucunda petrol kirliliğinin çevreye ve canlılara olan etkisinin kısa sürede önüne geçilerek biyoremediasyon çalışmalarına katkı sağlanacaktır. Çalışmamızda araştırdığımız ve verimli bulunan diğer konsorsiyumlarda petrol biyoyıkım çalışmalarına

yeni alternatifler oluşturacaktır. Özellikle bu konsorsiyumların süpernatanları da farklı araştırma alanları oluşturabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Petrol Ürünleri ve Kullanım Alanları

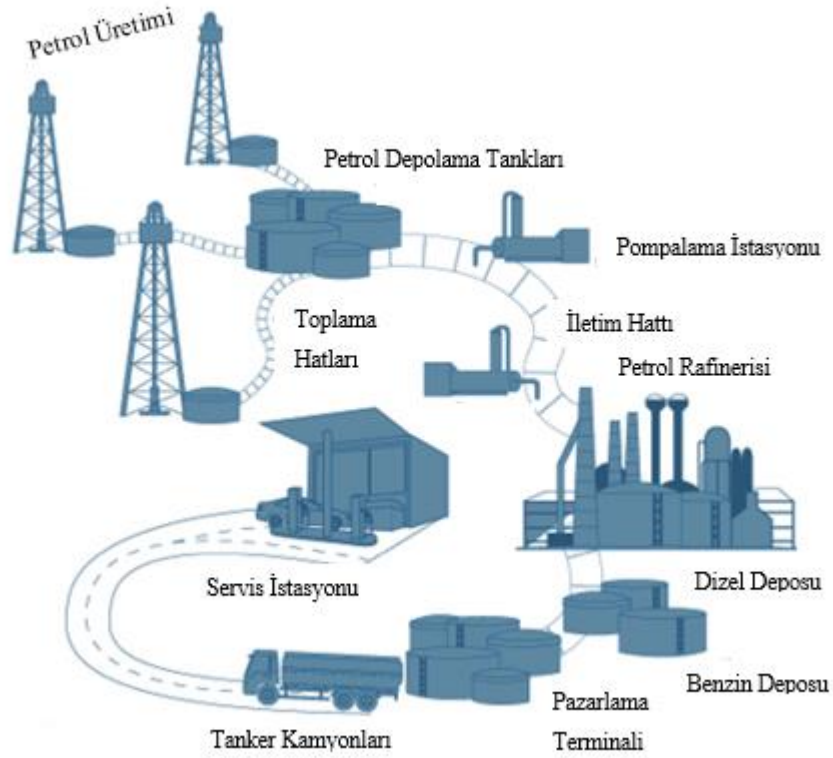
Petrol, çeşitli yakıtlar, ev ve sanayi ürünleri, ilaçlar ve plastikler gibi çoğu alanda bulunmaktadır. Petrol ürünleri, petrol rafinerisinden elde edilen ürünler veya türetilmiş ürünler olmak üzere farklı alanda özelleşmiş tesislerde üretilen ürünlerden oluşur. Petrol ürünlerinin özellikleri, ham petrol kaynağı, kaynama aralığı, proses geçmişi ve diğer faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir [7]. Petrolün yakıt olarak kullanılması temel kullanım alanlarından biridir. Bu şekilde, ısınma, aydınlatma ve hareket için bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Motorlu taşıtların ortaya çıkmasıyla petrolün yakıt olarak kullanımını artırmıştır [8].

Petrol, organik bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır. 1965 yılına kadar dünyadaki organik bileşiklerin %80'i petrolden sentezlenmiştir. Bu oran 2000'lerde %99'a yükselmiştir. Ticari açıdan önemli petrol ürünleri benzin ve gazyağıdır [8]. Petrolden elde edilen diğer ürünler; vazelin, bulaşık deterjanı, deodorant, mürekkep, boya kalemi, plak, lastik ve amonyaktır [9].

### 2.2. Petrol Kirliliği ve Etkileri

Petrol endüstrisi, petrolün araştırılması, çıkarılması, üretilmesi, rafineri operasyonları ve dağıtımını olarak bölümlere ayrılmaktadır [10] (Şekil 2.1). Petrol üretimi ve rafinajı sırasında çevre için tehdit oluşturan tonlarca petrol içeren atık ortama yayılmaktadır [11]. Petrol, taşınması sırasında gerçekleşen kazalarla veya boru hattındaki sızıntılardan kaynaklanarak toprak ve suya karışmaktadır. Petrol kontamine ettiği topraklarda, bitki büyümesini ve gelişimini etkilemekte ve toprak özelliklerini de etkileyerek toprak florasının bozulmasına neden olmaktadır [12]. Buna ilave olarak, karasal ortama bulaşan petrol hidrokarbonlarının, yeraltı sularına kadar yayıldığı bilinmektedir [13]. Su ortamına bulaşan petrol ise yüzeyde yüzme eğilimindedir ve su üzerinde ince bir tabak oluşturur. Dalga, rüzgâr, suyun akışı gibi çevresel faktörler ile denizdeki petrol kirliliği kıyıya kadar

ilerleyebilmektedir. Bu şekilde, daha fazla ortama yayılan petrol kirliliğinin çevreye ve canlılara verdiği zarar artmaktadır [14].



**Şekil 2. 1.** Ham Petrol Endüstrisi Aşamaları [15]

Her yıl 1.5-10 milyon ton petrol hidrokarbonu denizlere dökülerek, deniz ekosistemi için tehlike oluşturmaktadır [16] (Şekil 2.2). Suyun yüzey gerilimi ve dökülen petrolün viskozitesine bağlı olarak deniz suyu üzerinde petrol yayılması gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalarda, uzun süreli petrol kirliliği sonucunda kirliliğe maruz kalan balıkların daha yavaş hareket ettiği, denge ve stabilite kaybı yaşadıkları belirtilmiştir [17]. Ayrıca petrol kirliliği balık ve amfipod popülasyonlarında ölümlere de neden olmaktadır [18]. İnsanlarda, bu petrol kirliliğine maruz kalan deniz canlılarının tüketilmesi çeşitli tümörlere sebep olmaktadır.



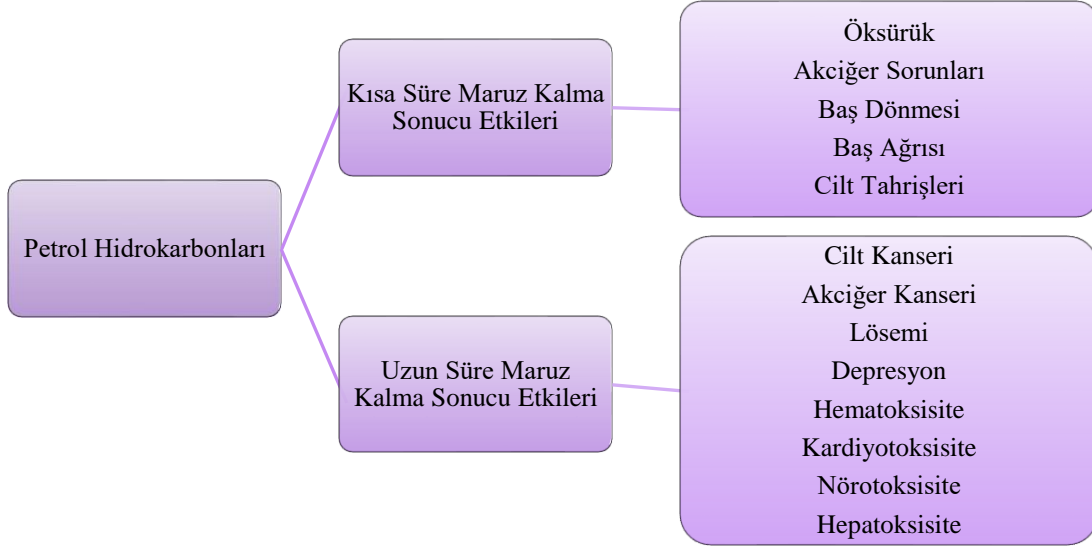
**Şekil 2. 2.** Denizde Petrol Kirliliği [19]

Petrol, bileşimine, konsantrasyona ve hidrokarbonlarına maruz kalma süresine bağlı olarak canlılar üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. İlave olarak petrolün, cilt ile teması, yutulması veya solunması durumlarına göre canlılara etkileri değişmektedir. Petrol içeriği değerlendirildiğinde, içerisinde bulunan Benzen, Tolüen, Etilbenzen ve Ksilen'e (BTEX) düşük konsantrasyonlarda uzun süreli maruz kalmak canlılarda çeşitli etkiler göstermektedir. Bu söz konusu kimyasallar arasında en toksik olanı Benzen olarak kabul edilmektedir. Benzen, kan hücresi üretimini engelleyerek nekroz, ödem, kanama, kemik iliği hasarı, lösemi ve karaciğer kanserine sebep olmaktadır [20]. Buna ilave olarak, yüksek benzen konsantrasyonlarına maruz kalan kadınlar ile yapılan bir çalışmada regl anomalileri, yumurtalık boyutunda anomaliler ve doğurganlıkta düşüş görüldüğü belirtilmiştir [21]. Tolüen ise, insan için orta derece toksisite göstermektedir. Tolüenin yutulması halinde gastrointestinal sistem tarafından emilmekte ve metabolize edilerek idrar ile atılmaktadır. Ancak tolüenin solunması merkezi sinir sistemi için tehlikelidir. Bunlara ilave olarak Tolüen canlılarda titreme, konvülsiyonlar, depresyon gibi belirtiler gösterir. Tolüen canlılarda elektrolit anomalilerine, metabolik asidoza, aritmilere, kas güçsüzlüğüne, karaciğer enzim aktivite bozukluğuna, böbrek sorunlarına da neden olabilmektedir [22]. Benzen ve Tolüen'e göre toksisitesi düşük olan Etilbenzen ve Ksilen'in neredeyse çoğu metabolize edilerek idrar ile atılabilmektedir. Ancak bu kimyasalların teması halinde cilt ve mukozada tahrişler oluşturmaktadırlar [23].

Petrolün kısa ve uzun süreli maruz kalınması sonucunda oluşacak etkileri Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Petrol kirliliğinin bunlar gibi birçok hastalıklara ve çevresel problemlere neden olmasıyla kirliliğin engellenmesi ve temizlenmesi oldukça önemlidir.



Bu sebeple, petrol iyileştirilmesi katkı sağlayacak yeni yöntemlere yönelik arayışlar artmaktadır.



**Şekil 2. 3.** Petrol Hidrokarbonlarına Kısa ve Uzun Süreli Maruz Kalmanın Sağlığa Etkileri [24]

### 2.3. Petrol Kirliliğinin Gideriminde Kullanılan Yöntemler

Petrol hidrokarbonlarının çevre ve insan sağlığı üzerinde büyük bir etkisi olmasıyla, bu kirleticilerin uygun ve sürdürülebilir iyileştirme teknikleriyle temizlenmesi ve uzaklaştırılması gerekmektedir. Kirleticinin bileşimi ve türü, çevre koşulları, zaman ve maliyet unsurlarına dikkat edilerek petrol hidrokarbonlarının ortamdaki uzaklaştırılması için uygun yöntem seçilmelidir [14]. Bu bağlamda, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanmaktadır.

#### 2.3.1. Fiziksel Yöntemler

Petrol hidrokarbonlarının toprak ve su gibi ortamlardan ayrıştırmak ve uzaklaştırmak için kullanılan yöntemlerdir. Çoğunlukla, kirliliğin bulunduğu çevrede yerinde iyileştirme yapılır. Kimyasal kullanılmaması, çevreye zararının minimum olması gibi avantajları bulunurken, yüksek maliyetli olması açısından dezavantajlı yöntemlerdir [25].

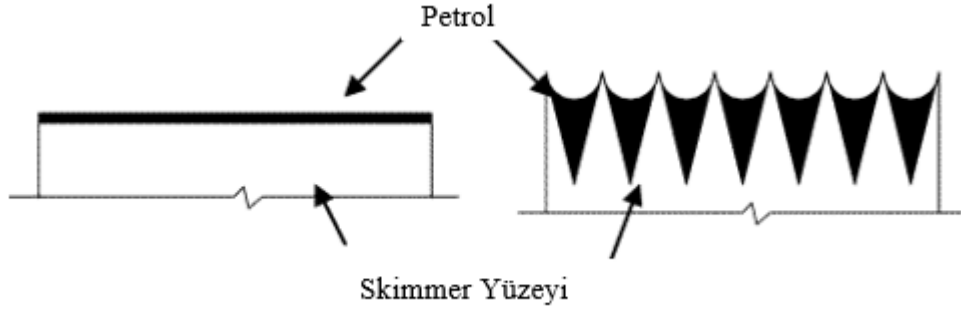
**Petrol Bariyerleri:** Petrolün bulaştığı ortamlarda yayılmayı engellemek, petrol birikintilerini toplamak ve risk altındaki alanlara geçişini engellemek amacıyla kullanılan

bariyerlerdir. Durgun sularda, kaldırma kuvvetinden yararlanarak kullanılmaktadır. Kendinden şişirilebilir bariyerler, kıyı koruma bariyerleri ve yangın bariyerleri olarak çeşitleri bulunmaktadır [3]. Yangın bariyerleri, petrol kirliliğinde kullanılan fiziksel yöntemlerden yakma işlemiyle birlikte kullanılarak etrafa yangının yayılmasını engellemektedir. Bariyer malzemelerinden polivinil klorür (PVC), poliüretan/polivinil (PU) ve kauçuk kaplama (Neopren) en yaygın kullanılanlarıdır. Kirliliğin kaynağından yayılmasının önlenmesi, kontrol altına alınması, çevredeki alanların korunması, akıntıya bağlı yayılma yönünün değişmesiyle kolay toplanabilecek alanlara yönlendirilmesi amaçlarıyla kullanılır [3] (Şekil 2.4).



**Şekil 2. 4.** Petrol Kirliliğinin Bariyerler ile Kontrol Altına Alınması [19]

**Petrol Sıyırıcılar:** Petrol sıyırıcılar, yağların ve petrolün özelliklerinin bozulmadan su yüzeyinden toplanmasını sağlar. Bu sıyırıcılar özellikle durgun sularda etkilidir. Bu amaçla kullanılan ekipmanlara sıyırıcı (skimmer) denmektedir. Sıyırıcılar petrolü geri kazanma amaçlı bir yöntem olmasıyla avantajlıdır [3]. Petrol geri kazanımını ve çevredeki petrolün temizlenmesini arttırmak amacıyla farklı skimmer yüzeyleri geliştirilerek bu yöntem verimli hale getirilmektedir (Şekil 2.5). Ancak bu yöntem maliyetinin fazla olması ile dezavantajlıdır [26].



**Şekil 2. 5.** Fiziksel Yöntemlerde Kullanılan Farklı Skimmer Yüzeyleri [26]

**Yakma:** Bu yöntem genellikle açık deniz ve okyanuslar gibi su yüzeylerinde ve karada kullanılır. Tutuşturucular ile gerçekleştirilen yakma işleminde, katı yakıcılar, jel şeklinde kerosen küpleri ve reaktif kimyasallar kullanılmaktadır [3] (Şekil 2.6). Yakma işleminin etkili olması için petrolün dökülmesinden kısa bir süre sonra yapılması gerekmektedir. Petrol içerisindeki asıl yanıcı olan uçucu bileşikler zaman geçtikçe azalacak ve yakma işlemi etkili olmayacaktır. Bu işlem, sıcaklığın düşük olmasıyla uçucu bileşikler buharlaşmadığından Kuzey Kutbu bölgelerinde kullanılması avantajlı olmaktadır. Ayrıca, bu işlemin yapılabilmesi için yerleşim yerlerinden, yanıcı nesnelere, kıyılardan ve canlı organizmaların bulunduğu habitattan uzak olunması gerekmektedir [27]. Yangının çevreye yayılmaması için yangına dayanıklı bariyerler ile önlem alınmalıdır. Düşük maliyetli ve kısa sürede gerçekleşmesi avantajlı olsa da yakma işleminin sonucunda oluşan zehirli yanma ürünleri çevre için tehdit oluşturmaktadır [3].



**Şekil 2. 6.** Petrol Kirliliğinde Yapılan Yakma İşlemi [19]

Fiziksel yöntemler petrol kirliliğinin tamamının giderilmesinde yeterli bir yöntem değildir. Mekanik sistemler olmasından kaynaklı petrol sızıntıları olmaktadır. Bu gibi durumlarda ortamda kalan petrol için ek yöntemler kullanılması gerekmektedir.

### **2.3.2. Kimyasal Yöntemler**

Kimyasal yöntemler, mikroorganizmaların yardımı olmadan moleküler oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz yoluyla petrolün parçalanmasını sağlar [28, 29]. Bu amaçla, kimyasal yöntemlerde tolüen, n-heptan gibi organik çözücüler, kalsiyum hidroksit gibi alkali solüsyonlar ve çoğunlukla seyrelticiler (dispersantlar) kullanılmaktadır. Dispersantlar, petrolün yüzey gerilimini düşürmesiyle su içerisinde parçalara ayrılmasını sağlar. Bu şekilde parçalara ayrılan petrolün, fotolitik veya organizmalar tarafından parçalanmasına yardımcı olur [3].

Kimyasal yöntemlerden mineral adsorbanlar, karada bulunan petrol kirliliği için kullanılmaktadır. Bu söz konusu mineral adsorbanlar, toz veya granül formda bulunup ortamdaki petrolü içine emmesi ile kirliliği temizlemektedir. Ancak bu yöntemde, toz oluşumu riskine karşı açık alanlarda uygulanırken solunum için koruyucu ekipmanlar kullanılmalıdır. Bu mineral adsorbanlar, petrol döküntüsünün bulunduğu alanın üzerine dökülür ve tüm alana yayılması sağlanır. Adsorbanların petrolü emmesinin ardından ortamdan toplanarak geri dönüşüm için transferi gerçekleştirilir. Yukarıda belirttiğimiz gibi karada bulunan petrol kirliliği için kullanılan adsorbanlar, su yüzeyinde batacağından deniz, tatlı su gibi ortamlara dökülen petrolün uzaklaştırılması için uygun değildir [30].

### **2.3.3. Biyolojik Yöntemler**

Biyolojik yöntemlerde, mikroorganizmalar yardımıyla oldukça toksik olan petrol hidrokarbonlarının zararsız veya daha az zararlı bileşiklere yıkımı gerçekleştirilir. Bu biyolojik işlemler, kirlitici farklı bir ortama taşınarak (ex-situ) veya bulaştığı alanlarda (in-situ) yapılabilmektedir. Biyolojik iyileştirme yöntemlerinde, kirleticilerin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamak için gereken süre yöntemlere göre değişmektedir [31].

### 2.3.3.1. Ex-situ (Doğal Yerin Dışında) Temizleme Yöntemleri

Bu yöntemlerde, petrol biyoyıkımı kirli toprağın çıkarılması ve uygun ortamlara alınmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntem, petrol yıkımı için uygun sıcaklık, pH, tuz ve nem gibi şartlar oluşturulduğundan verimli bir yöntemdir. Ancak bu yöntemlerde toprağın yerinden başka bir alana taşınmasından dolayı maliyetli ve uzun süren işlemlerdir [4].

**Kompostlama:** Bu yöntemde yerinden kazılarak çıkarılan toprak, organik katkı maddesi ve hacim arttırıcı malzemeler ile karıştırılarak işleme hazırlanır. Kullanılan malzemelere örnek olarak odun parçacıkları, saman, bitki atıkları, gübre verilebilir. Bu malzemeler ile karıştırılan toprak uygun alana serilerek biyolojik bozunma gerçekleşmesi için karıştırılır ve nem oranı ayarlanır. Bu işlem ile maksimum verim, oksijen devamlılığına, gerekli sulama yapılmasına ve nem sağlanmasına bağlı olarak elde edilir. Ancak bu yöntem, uzun süre gerektiren ve yüksek maliyetli bir yöntemdir [32-34].

**Arazi Tarımı:** Bu yöntemde, kirlenmiş toprak yerinden kazılarak çıkarılır ve yalıtımlı zemin yatağına alınır. Buradaki toprağı havalandırmak için düzenli periyotlarda ters yüz edilir. Uygulama öncesinde kirleticinin toksisitesi, toprağın su tutma kapasitesi, besin içeriği, mikroorganizma yoğunluğu gibi veriler incelenmelidir. Bu tip bir sistemde kirleticinin yıkımı için sıcaklık yağış gibi şartlar kontrol edilmemesinden kaynaklı işlemin süresi uzamaktadır. Hafif ve uçucu hidrokarbonlar için bu yöntem kullanılır [35].

**Biyolojik Bulamaç:** Bu yöntemde, kirlenmiş toprak yerinden kazılarak çıkarılır ve bu yöntemin gerçekleştirileceği biyoreaktöre getirilir. Bu yöntemde, kontamine olan toprağın biyoreaktörlerde işlenmesi sonucu petrol yıkımı sağlanır. Bu süreçte, kirleticilerin parçalanması için mikrobiyal aktiviteyi arttırmak amacıyla ortama besinler eklenir. Bu söz konusu yöntemde maksimum petrol yıkım verimi sağlanması amacıyla, sıcaklık, karıştırma ve besin maddelerinin eklenmesi ile işlem düzenlenir [36, 37].

### 2.3.3.2. İn-situ (Yerinde) Temizleme Yöntemleri

Bu yöntemler, kirleticilerin çıkarılmasını ve taşınmasını önlemek amaçlı kirliliğin olduğu alanda yapılır. Böylece, ex situ yöntemlere göre daha düşük maliyetli olmasıyla en çok tercih edilen yöntemlerdir.

**Biyoventilasyon:** Bu yöntemde, toprakta bulunan mikroorganizmalar için oksijen sağlayarak, aerobik olarak yıkıma uğrayabilen bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması

sağlanır. Burada iki önemli kriter vardır. İlki toprakta yeterli konsantrasyonda petrol parçalayabilen mikroorganizmaların bulunması diğer kriter ise yeterli havalandırmanın sağlanmasıdır. Bunlara ek olarak toprak yapısı da parçalanmayı ve mikrobiyal aktiviteyi etkileyen bir faktördür. Petrol hidrokarbonları için kullanılan bu yöntem klor içermeyen çözücüler, pestisitler ve organik kimyasallar ile oluşan toprak kirliliği için de kullanılabilir. Kirleticinin türüne ve miktarına bağlı yerinde gerçekleştirilen bu yöntemin süresi uzamaktadır [3].

**Biyostimülasyon:** Bu yöntemde, ortamdaki petrol hidrokarbonlarını kullanabilen mikroorganizmaların mikrobiyal üremesini ve enzimatik aktivitelerini arttırarak petrol parçalanmaktadır. Biyostimülasyonda uyarıcı olarak çevresel değişiklikler yapılır. Bu bağlamda, fosfor, oksijen, nitrojen veya karbon gibi farklı türde besin ve elektron eklenilebilir. Ayrıca ortamdaki pH, sıcaklık, oksijen gibi koşullar da uygun hale getirilir. Toprakta petrol giderimi için uygun bir yöntemdir [31,38-40].

**Biyoaugmentasyon (Biyolojik Arttırma):** Bu yöntemde, kirlenmiş alanlardaki kirleticileri parçalayabilen mikroorganizmaların popülasyonlarını arttırmak amaçlanmaktadır. Petrol biyoyıkımını gerçekleştirebilen mikroorganizmalar kirlenmiş ortama eklenir [41]. Ek olarak, özellikle genetik açıdan modifiye edilen mikroorganizmaların kirlenmiş toprağa eklenmesi ile petrol biyoyıkımının iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Özellikle toprakta bulunan mikroorganizmalar yeterli olmadığı ve tam olarak metabolik etkisinin bilinmediği durumlarda başarılı bir yöntemdir [4]. Biyolojik olarak petrol yıkımı hedeflenen bir araştırmada, ortama eklenen *Cycloclasticus sp.*, *Alcanivorax dieselolei*, *Thalassolituus oleivorans*, *Alcanivorax borkumensis* ve *Marinobacter hydrocarbonoclastikus* konsorsiyumu ile yapılan biyoaugmentasyon sonucu %79 verim elde edilirken, ortama maya ekstraktı eklenerek yapılan biyostimülasyon sonucunda %73 verim elde edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre biyoaugmentasyon, biyostimülasyona göre petrol kirliliğinde kullanılan daha başarılı bir yöntemdir [41].

**Biyosparj (Biyo-serpme):** Bu yöntemde, kirleticileri parçalamak için ortamdaki mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerini uyarmak amacıyla yeraltı suyu oksijen konsantrasyonunu arttırmak için basınç altında oksijen ve besin enjeksiyonu gerçekleştirilir. Bu işlem ise yeraltı suyunda çözünmüş petrol hidrokarbonlarının

yıkımını arttırmak için kullanılır. Bu işlemin verimi, toprak geçirgenliğine ve kirleticinin parçalanabilirliğine bağlı olarak değişmektedir [42-45].

## **2.4. Biyoremediasyon**

Biyoremediasyon, mikroorganizmalar ile petrol gibi organik kirleticilerin çevreden uzaklaştırılması, ayrıştırılması ve daha az zararlı bileşiklere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır [46]. Bu yöntem karasal ve sucul sistemlerde bulunan petrol hidrokarbon kirliliğinin temizlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [47, 48]. Biyoremediasyon teknikleri doğal süreçleri göz önünde bulundurur. Bu söz edilen biyoremediasyon yöntemleri çevre dostu teknikler olmaları, çevre ve insanlar üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip olmaları, düşük maliyetli olmaları, daha az yan ürün üretmeleri ve iyi performans göstermeleri nedeniyle kimyasal ve fiziksel tekniklerden daha fazla avantaja sahiptir [49]. Biyoremediasyonun, toprak geçirgenliğine bağlı olarak petrol giderim veriminin değişmesi, çevresel koşullara duyarlı olması, ağır metalleri parçalayamaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır [50].

Biyoremediasyon yapabilen ilk bakteri 1970 yılında Chakrabarty ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Bu araştırmacılar, petrol ile kirlenmiş topraktan izole ettikleri *Pseudomonas* suşları ile naftalen, oktan ve ksilen gibi organik bileşiklerin biyoyıkımının gerçekleştiğini saptamışlardır [51]. 1989'da gerçekleşen Alaska'daki Exxon Valdez'in Bligh Resifi'ne çarpması sonucu 41 milyon litre petrolün denize dökülmesi ile petrol biyoremediasyonu uygulamaları önem kazanmış ve yaygınlaşmıştır [52].

Biyoremediasyon yöntemleri in-situ, ex-situ, fitoremediasyon gibi farklı tekniklere ayrılmaktadır. İn-situ biyoremediasyon yöntemlerinden biri mikrobiyal biyoyıktır.

## **2.5. Mikrobiyal Biyoyıkım (Biyodegradasyon)**

Mikrobiyal biyoyıkım, mikroorganizmaların organik kirletici maddeleri enzimatik süreçler yoluyla daha az zararlı veya tehlikesiz maddelere dönüştürdüğü bir işlemdir [53]. Organik maddeler, aerobik ve anaerobik olarak iki biyolojik mekanizma ile biyoyıkıma uğrayabilir. Anaerobik süreçler, anaerobik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. Göz ardı edilen anaerobik biyoyıkım, kirletici alan koşulları ve hızla tükenen oksijen konsantrasyonu ile son zamanlarda daha fazla araştırılmaktadır. Anaerobik biyoyıkım,

mikroorganizmalar tarafından kullanılan farklı elektron alıcılarına bağı olarak farklı biyokimyasal yollar bulundurur [54].

Petrol ile kirlenmiş alanlardaki mikroorganizmalar ortama uyum sağlayarak hidrokarbonları parçalayabilmektedir. Bu alanlardan izole edilen mikroorganizmaların bu sebeple daha verimli petrol biyoyıkımı yapmasından dolayı çoğunlukla petrol biyoyıkım çalışmalarında kullanılmaktadır [55]. Bu mikroorganizmalar, petrolün karmaşık bir yapıda olmasından dolayı belirli bileşenlerini biyoyıkıma uğratabilmektedir. Literatürde, petrol hidrokarbonlarından alifatik bileşikleri parçalayabilen mikroorganizmaların *Acinetobacter* sp., *Alcanivorax* sp. *Micrococcus* sp, *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Aspergillus* sp.; monoaromatikleri parçalayabilen *Acinetobacter* sp., *Sphingobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Halomonas* sp. ve poliaromatikleri parçalayabilen *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. oldukları belirlenmiştir [56-61]. Bu mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımı aerobik koşullarda gerçekleşmektedir.

Mikroorganizmalar enerji elde etmek amacıyla hidrokarbonları katabolize etmektedir. Petrol içerisindeki basit bileşikler mikroorganizmalar tarafından kolay biyoyıkıma uğrarken PAH'lar gibi karmaşık bileşikler daha zor biyoyıkıma uğramaktadır. Yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarında, petrolün tamamının biyoyıkımı için oluşturulan konsorsiyumların daha etkili oldukları belirlenmiştir [62]. Mikroorganizmalar arasındaki sinerjistik etkileşim ile daha fazla ara ürün parçalanabilmektedir. Petrol kirleticilerinin biyoyıkımı, mikroorganizmaların farklı enzimleri ile gerçekleşen reaksiyonları içerir. Konsorsiyum içerisindeki mikroorganizmaların farklı enzimleri ile daha fazla substrat biyoyıkıma uğramaktadır [63]. Mikroorganizmalar arasında gerçekleşen antagonistik etkileşim ise bir mikroorganizmanın ürettiği bazı metabolitlerin antimikrobiyal etkisi ile diğer mikroorganizmanın üremesini ve enzimatik olarak etki göstermesini baskılamaktadır [64]. Ayrıca, ortamdaki kısıtlı besin kaynağı, aynı substratı kullanan mikroorganizmalar için rekabet oluşturacak ve üremesini engelleyerek antagonist etkileşime sebep olacaktır. Birbirleriyle antagonist etkileşim görülen mikroorganizmalardan oluşturulan konsorsiyumlar, aralarında sinerjistik etkileşim görülen mikroorganizmalardan oluşturulan konsorsiyumlara göre daha az petrol biyoyıkımı yapmaktadır [65].



## 2.6. Petrol Biyoyıkımını Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmaların üremesi ve enzimatik aktivasyonu için çevre şartları oldukça önemlidir. Uygun koşullar sağlanmadığı takdirde mikrobiyal üreme azalarak biyoyıkım verimi düşecektir. Bu sebeple mikroorganizmalar için uygun sıcaklık, oksijen, pH, basınç ve tuzluluk gibi faktörlerin sağlanması gerekmektedir [66].

### 2.6.1.Sıcaklık

Sıcaklık, PAH'ların çözünürlüğünü, dağılımını ve biyoyararlanımını etkileyen önemli bir faktördür [67]. Sıcaklığın düşük veya yüksek olması petrol yıkımını farklı etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda, petrol viskozitesindeki artıştan dolayı biyoyıkım azalmaktadır. Ayrıca, petrol içerisindeki uçuculuğun azalmasına ve sudaki çözünürlüğün azalmasına neden olmaktadır [68]. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda gerçekleşen petrol kirliliğinin iyileştirilmesi zaman almaktadır. Çok yüksek sıcaklıklarda ise mikrobiyal üremeyi engelleyip protein ve enzimlerin denatüre olmasına sebep olmaktadır. Petrol biyoyıkımı yapabilen çoğu mikroorganizmanın ise mezofilik olmasıyla en fazla biyoyıkım mezofilik sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Düşük ve yüksek sıcaklıklarda petrol biyoyıkımı yapabilen termofilik ve psikrofilik bakteriler de bulunmaktadır. Örneğin *Bacillus sp.* ve *Thermus sp.* ile 0°C'de deniz suyunda ve 70°C'de petrol biyoyıkımlarının gerçekleştiği belirtilmiştir [69, 70].

### 2.6.2. Oksijen

Petrol dahil olmak üzere organik kirleticilerin biyolojik yıkımı aerobik ve anaerobik koşullarda gerçekleşmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda aerobik ortamda PAH'ların biyoyıkımının daha hızlı olduğunu belirlenmiştir. PAH'ların aerobik parçalanmasında, aromatik halkaların ilk oksidasyonunda monooksijenaz ve dioksijenaz enzimlerinin aktivitesi için oksijen gereklidir. Yerde yapılan biyoremediasyon çalışmalarında petrol biyoyıkımının gerçekleşebilmesi için ortama oksijen enjeksiyonu yapılmaktadır [71]. Anaerobik ortamda gerçekleşen petrol biyoyıkımında, mikroorganizmalar sülfat, nitrat, demir, manganez veya karbondioksit gibi alternatif elektron alıcıları enerji elde edebilmek için kullanırlar [72]. Yapılan anaerobik petrol biyoyıkım çalışmasında, alkanların sülfat indirgeyen mikroorganizmalardan *Desulfovibrio salexigens* tarafından parçalanabildiği belirlenmiştir [73].

### 2.6.3. pH

Mikroorganizmaların üremesinde pH oldukça önemli bir faktördür. Çoğu bakteri nötr pH koşullarını tercih etmektedir. Petrol kirliliğinin yaşanmasıyla ortamdaki pH değişmekte ve mikrobiyal üremeyi de etkilemektedir. Literatürde yapılan çalışmada, petrol ile kirlenmiş toprağın pH 3.0-9.0 aralığında olduğu tespit edilmiştir [74]. Mikroorganizmaların, üremesi ve yüksek enzim aktivitesi gösterebilmesi için optimal pH değerleri değişmektedir. *Sphingomonas olei* ve *Acinetobacter radioresistens* ile yapılan petrol biyoyıkımı çalışmalarında nötr pH'da maksimum biyoyıkım görülmüştür [75]. Yapılan bir başka çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa*'nın pH 8.0'da en verimli petrol biyoyıkımı yaptığı belirlenmiştir [76].

### 2.6.4. Basınç

Petrol sızıntılarının %3-31'i deniz tabanına çökelmektedir. Bu alan, mikroorganizmalar için yüksek basınç (100 metrede 10 bar) ve düşük sıcaklıklarda olduğundan biyoyıkımın azaldığı bilinmektedir. Deniz yüzeyindeki PAH'ların biyoyıkımı derin sulardaki biyoyıkıma göre daha fazladır. Basınç mikrobiyal aktivite için önemli bir etkidir. Basıncın artmasıyla mikrobiyal aktivite ters orantılıdır. Yapılan petrol biyoyıkımı çalışmasında, karışık mikrobiyal kültür ile hegzadekanın 1 bar basınç altında 8 hafta sonunda %94 biyoyıkımı gerçekleşip basınç 500 bar olarak değiştirildiğinde benzer bozulma 40 hafta sürmektedir [41]. Literatürde, basıncı tolere edebilen mikroorganizmalar olduğunu belirtilmiştir [77]. *Rhodococcus* ile yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarında 400 – 600 bar gibi basınçlarda üreme ve petrol biyoyıkımı gerçekleştirildiği saptanmıştır [78].

### 2.6.5. Besin ve Tuz

Fosfor, azot, karbon, oksijen, hidrojen, kükürt gibi besinler mikroorganizmaların enerji üretmesi ve üremesi için gereklidir. Petrolün ortama dökülmesiyle bu besin elementlerindeki denge kaybolmaktadır [79]. Petrol içeriğinde bol karbon kaynağı bulunmasına rağmen fosfor ve nitrojen oldukça düşüktür [80]. Bu da mikroorganizmaların üremesine engel oluşturmaktadır. Karbon:azot:fosfor (C:N:P) oranları mikrobiyal üreme için uygun olmadığında besinlerin ortama eklenmesiyle (biyostimülasyon yöntemi) ile mikroorganizmalar için gerekli ortam sağlanmış olacaktır. Petrol biyoyıkımı için mikroorganizmaların üremesine uygun ortamdaki besin

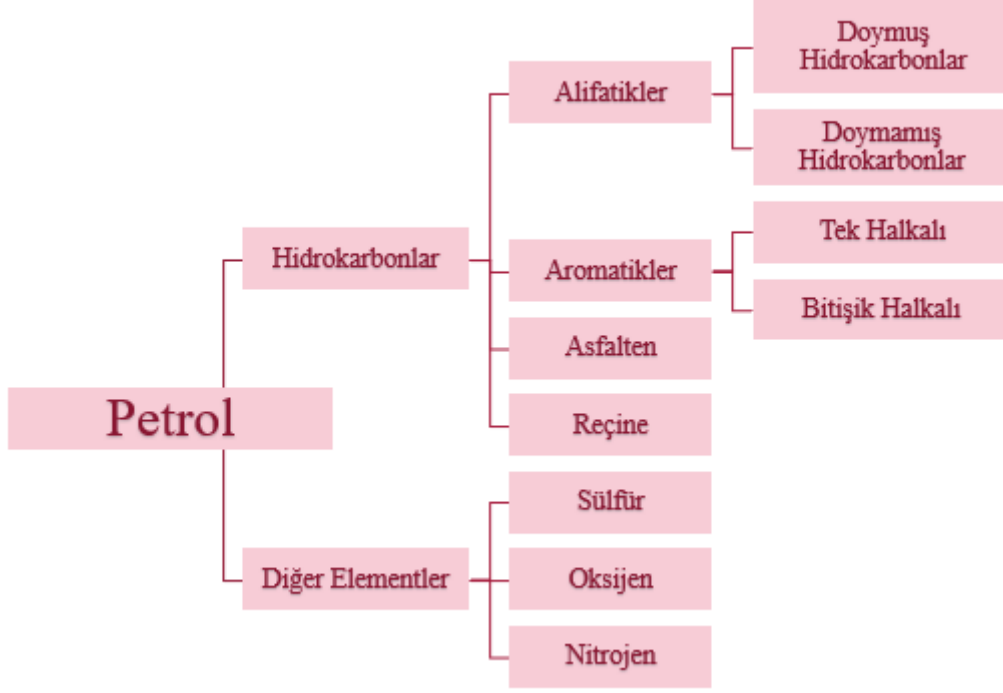
değerlerinin C:N:P için 100:10:4 olması gerektiği belirlenmiştir [81]. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5), PAH biyoyıkımı yapan mikroorganizmaların aktivitesinin düştüğü belirtilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan petrol biyoyıkımı çalışmasında optimum tuz oranınının 35g/L olduğu saptanmıştır [82]. Ortamdaki yüksek tuz konsantrasyonu ozmotik basıncın artmasına, buna bağlı olarak hücre zarı parçalanmasına neden olmaktadır [83].

## **2.7. Petrol**

Petrol, Latince 'de taş yağı anlamına gelen koyu kıvamlı, yapışkan, viskoz özellikte bir sıvıdır [84]. Doğal olarak yeraltında bulunan petrol, organik maddelerin bozunması ile oluşmaktadır. Petrol içerisinde bulunan çeşitli hidrokarbonlar, önemli bir enerji kaynağı ve birçok endüstri için hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu hidrokarbonlar oldukça toksik, karsinojenik ve mutajenik olmasıyla çevre ve canlılar için oldukça zararlıdır. Petrolün fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişen bileşimi ile toksisitesi ve özellikleri farklılık göstermektedir [5].

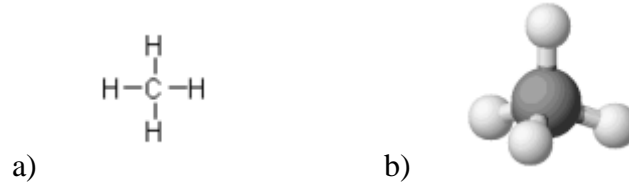
### **2.7.1. Petrolün Kimyasal Özellikleri**

Petrol, yapısında temel olarak karbon ve hidrojen elementleri ile eser miktarda sülfür, oksijen ve nitrojenden oluşmaktadır (Şekil 2.7). İçerisindeki elementlerin oranlarına göre petrolün yapısı ve özellikleri değişmektedir. Petrol bileşimi açısından, hafif, orta ve ağır yoğunlukta olabilmektedir. Petrol yoğunluğuna bağlı çevreye etkisi değişmektedir. Kaynağına bağlı ham petrol %82–85 karbon, % 10–14 hidrojen, %0.01–7 kükürt, %0.02–2 nitrojen ve %0.1–1 oksijenden oluşur [85]. Karbon ve hidrojenlerin bileşiminden oluşan hidrokarbonlar, petrolün %75'inden fazlasını oluşturmaktadır. Literatürde, ham petrolde, 17.000'den fazla kimyasal bileşiğin olduğu belirtilmiştir [1, 86]. Petrol bileşikleri genel olarak dört fraksiyona ayrılmaktadır. Bunlar; alifatikler, aromatikler, asfaltin ve reçinedir.



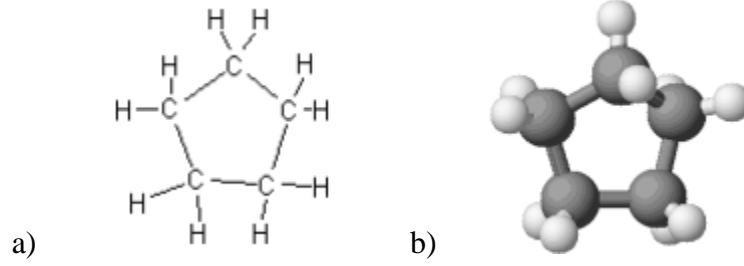
**Şekil 2. 7.** Petrolün Ana Bileşenleri

**Alifatik hidrokarbonlar:** Alifatik hidrokarbonlar Alkanlardan oluşan fraksiyondur. Alkanlar, karbon ve hidrojen bağları doğrusal veya dallanmış olarak bulunan organik bileşiklerdir. Kısa zincirli alkanlar, genellikle dökülmeden kısa süre sonra uçucu olmalarından dolayı buharlaşırlar. Fakat C20-C40 aralığında uzun zincirli alkanların çözünürlükleri düşük olmasıyla buharlaşmaz. Doğrusal ve dallanmış şekilde bulunun tekli karbon-hidrojen bağı yapan alkanlar doymuş hidrokarbonlardır [87] (Şekil 2.8). Doymamış hidrokarbonlar, alken ve alkinler olarak isimlendirilip, karbon- hidrojen arasında ikili ve üçlü bağlar bulunmaktadır. Petrolde doymamış alifatikler nadir görülmekte olup, bazı rafine ürünlerde bulunmaktadır. Ayrıca, siklopentan ve sikloheksan petrol içerisinde en yaygın olan sikloalifatiklerdendir [88] (Şekil 2.9).



**Şekil 2. 8.** Metanın Yapısı

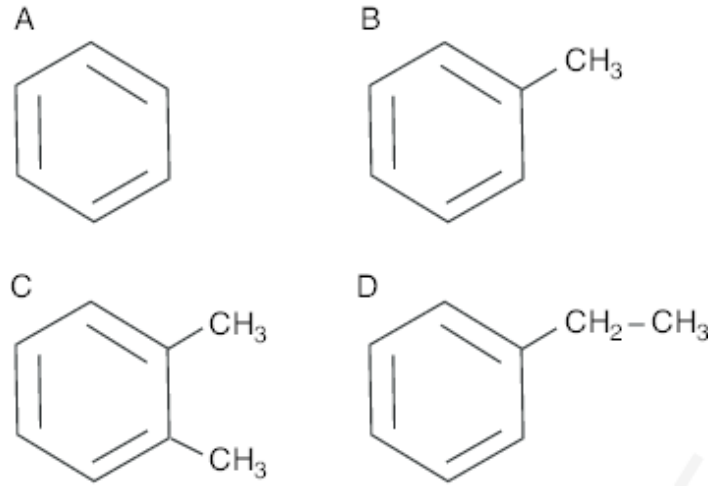
a) Açık Formülü, b) Molekül Modeli [89]



**Şekil 2. 9.** Siklopentan Yapısı

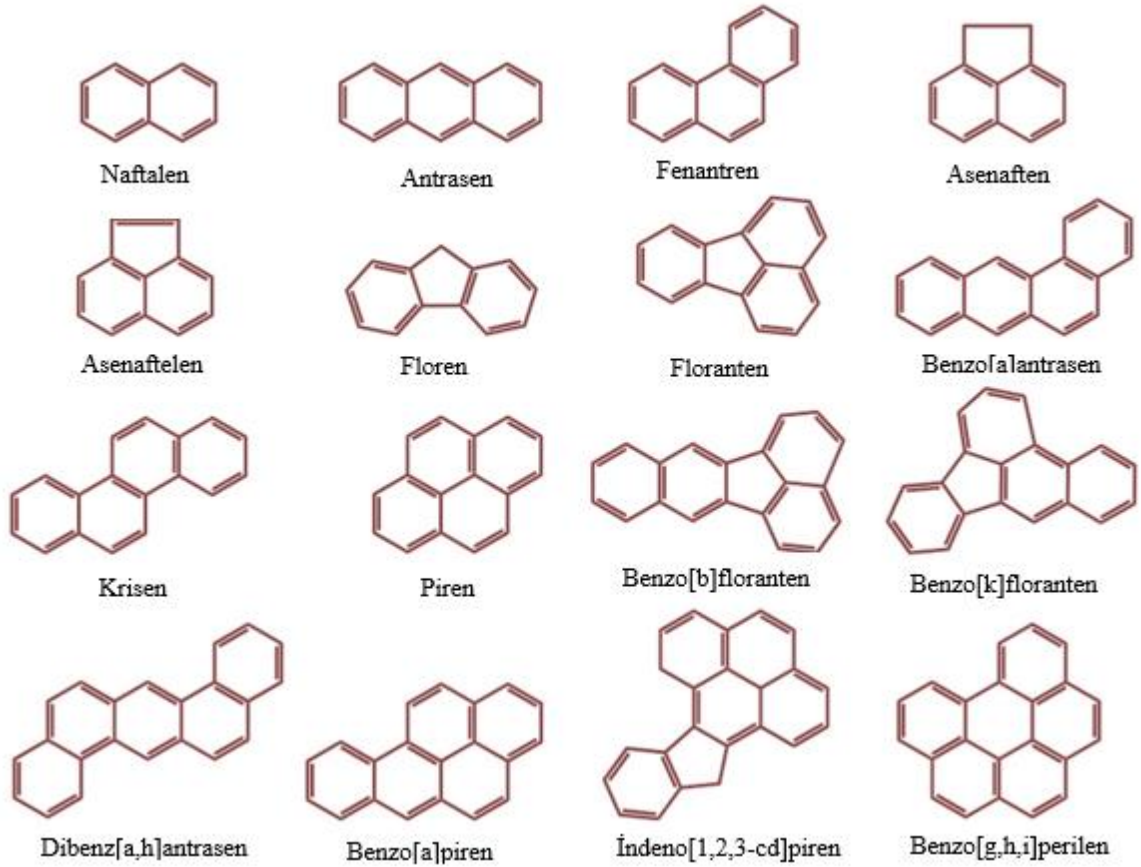
a) Açık Formülü, b) Molekül Modeli [89]

**Aromatik Hidrokarbonlar:** Aromatik Hidrokarbonlar, tek (monosiklik) ve bileşik (polisiklik) halkalı hidrokarbonlardan oluşan fraksiyondur. Monosiklik aromatik hidrokarbonlar (MAH), Benzen, Tolüen, Etilbenzen, Ksilen (BTEX) bileşikleridir [90, 91] (Şekil 2.10). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), birden fazla benzen halkası içeren bileşiklerdir. PAH'lar, ikili benzen halkası içeren Naftalen, üçlü benzen halkası içeren Fenantren ve Antrasen gibi bileşiklerdir [60, 92]. Benzen halkalarının sayılarına göre bu molekülerin yoğunlukları belirlenmektedir. Dört ve fazlası benzen halkası içerdiğinde yüksek moleküler yoğunluklu PAH, dördün altında benzen halkası içerdiğinde ise düşük moleküler ağırlıklı PAH olarak adlandırılmaktadırlar [90, 91]. Artan moleküler ağırlığıyla PAH'ların toksisitesi artmaktadır. Ayrıca, karsinojenik ve mutajenik özelliklerinin de olduğu bilinen PAH'ların sudaki düşük çözünürlüklerinden dolayı daha az biyoyıkıma uğramaktadırlar. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından 16 PAH öncelikli kirletici olarak listelenmiştir [93] (Şekil 2.11).



**Şekil 2. 10.** Benzen, Tolüen, Etilbenzen, Ksilen (BTEX) Monosiklik Aromatik Bileşikleri [94]

\* A Benzen, B Tolüen, C Ksilen, D Etilbenzen bileşikleridir.



**Şekil 2. 11.** Öncelikli Kirletici Olarak Belirlenen Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar [93]

**Asfalten ve Reçine:** Asfalten ve Reçine petrol içerisindeki alifatik ve aromatik bileşiklerin içinde koloidal olarak dağılmış karmaşık bileşiklerdir. Bu bileşikler, nitrojen, oksijen ve sülfür içerirler. Asfaltenler genellikle, n-alkanlarda (Pentan, Heptan, Hekzan) çözünmezken, Tolüen veya Benzen gibi aromatik bileşiklerde çözünürler. Buna bağlı olarak, asfaltenler yüksek moleküler ağırlıklı petrol bileşenidir. Bu bileşikler, petrol boru hatlarında, kuyularında ve rezervuarlarında birikintiler oluşturarak üretim ve işleme esnasında sorunlara sebep olurlar [95]. Reçineler, genellikle düşük moleküler ağırlıklı hidrokarbonlarda (n-alkanlar) çözünürler [96]. Asfaltenler ve reçineler, genellikle mikroorganizmalar tarafından biyoyıkıma uğraması zor olan bileşiklerdir [97-99].

### 2.7.1. Petrolün Fiziksel Özellikleri

Petrolün fiziksel özellikleri kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu özellikler, petrolün bileşimine, hidrokarbon dağılımına, özellikle rezervuar sıcaklık ve basıncına göre değişmektedir. Petrolün yoğunluğu, viskozitesi, alevlenme noktası, bulunduğu çevreye karışması, su içerisinde emülsiyon oluşturması gibi özelliklerinin belirlenmesi yapısının açıklanması açısından önemlidir.

**Yoğunluk:** Yoğunluk, belirli bir sıcaklıkta maddenin birim hacimdeki kütlesidir, birimi  $\text{gr/cm}^3$ 'tür. Petrolün yoğunluğu,  $60^\circ\text{F}$  ( $15.5^\circ\text{C}$ ) sıcaklık ve 1 atm basıncı altındaki yoğunluğu olarak belirtilir. Petrol,  $0.65\text{--}0.87 \text{ g/cm}^3$  hafif yoğunluklu,  $0.87\text{--}0.91 \text{ g/cm}^3$  orta yoğunluklu ve  $0.91\text{--}1.05 \text{ g/cm}^3$  ise ağır yoğunlukla olarak sınıflandırılmaktadır [85]. Petrolün işlenmesi açısından yoğunluğunun bilinmesi gerekmektedir. Petrolün yoğunluğunu ölçmek için A.P.I. (Amerikan Petrol Enstitüsü) yoğunluğu ölçeği kullanılarak ölçülür. Petrolün A.P.I. yoğunluğu, petrolün bileşimine bağlıdır. Petrol içerisindeki hidrokarbonların yüzdesi, reçine ve asfaltenlerin oranı, sıcaklık gibi faktörler yoğunluğu etkilemektedir. Yüksek miktarda çözünebilir bileşiklerden oluşan petrolün yoğunluğu azdır. Bu nedenle hafif olarak sınıflandırılır ve yüksek A.P.I. yoğunluğuna sahiptir. Bunlar, genellikle doymuş hidrokarbonca zengin petrolerdir. Düşük miktarda çözünebilir bileşiklerden oluşan petrol ise yoğunluğu fazla olup düşük A.P.I. yoğunluğuna sahiptir. Petrolün, A.P.I. yoğunluğu rezervuarın derinliği arttıkça artmaktadır [100].

$$\text{A.P.I. Yoğunluğu} = \frac{141.5}{60^{\circ}\text{F Özgöl Ağırlık}} - 131.5$$

**Viskozite:** Viskozite, akışkan bir maddenin yüzey gerilime karşı gösterdiği dirence denilmektedir. Yüksek viskoziteli sıvılar ağıdalı olarak tanımlanmaktadır. Petrolün viskozitesi sıcaklık ve basınca göre değişmektedir. Petrolün A.P.I. yoğunluğu ile ters orantılı olup A.P.I. yoğunluğu azaldıkça, viskozitesi yükseltmektedir. Petrol, içerdiği yüksek moleküler ağırlıklı hidrokarbonlar arttıkça viskozitesi artmaktadır. Yüksek viskoziteli petrol taşınması ve üretilmesi açısından zorluk oluşturmaktadır [100].

Petrolün değişen fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımı gerçekleşmektedir. Verimli petrol biyoyıkımı için petrolün bu özelliklerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Petrol biyoyıkım çalışmalarında, bu süreci daha verimli hale getirebilmek için alternatif araştırmalar yapılmaktadır.

## 2.8. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Petrol biyoyıkım çalışmamızda petrol sahasından izole edildiği bilinen, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus axarquiensis* ve *Pannonibacter phragmitetus* ile oluşturulan konsorsiyum kullanıldı.

### 2.8.1. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* familyasında yer almaktadır. *Klebsiella pneumoniae* Gram negatif, 1-2 µm boyunda, 0.5-0.8 µm eninde basillerdir. Bu mikroorganizmalar; hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerobik özelliktedir. Bu türe ait mikroorganizmaların polisakkarit yapıda kapsülleri bulunmaktadır. Bu kapsüller sebebiyle, katı besiyerinde mukoid koloniler oluştururlar (Şekil 2). *Klebsiella pneumoniae* bakterileri kuruluğa ve soğuğa karşı dirençlidir, fakat ısıya karşı dayanıksızdır. Bu bakterilerin polisakkarit yapıda somatik ve kapsül antijenleri vardır. Bakteriyosin üretmeleriyle bu bakteriler diğer mikroorganizmalar için antagonistik etki gösterirler [101, 102].

*Klebsiella* türleri, D-glukoz, laktoz ve sükrozu fermente edebilmektedir. Ayrıca, laktoz fermantasyonu sonucu gaz oluşturmaktadır. Bu türe ait bakteriler malonat ve sitratı



karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. *Enterobacteriaceae* familyasındaki diğer bakterilerde olduğu gibi bu mikroorganizmalar da oksidaz negatiftirler. *Enterobacteriaceae* familyasında *Klebsiella* türlerinin ayrımı hareket özellikleri ve deoksirübönükleaz enzim aktivitesi ile yapılmaktadır. *Klebsiella* türlerinde, deoksirübönükleaz enzim aktivitesi bulunmamaktadır. Ayrıca, *Klebsiella* cinsine ait mikroorganizmalarda ornitin dekarboksilaz negatif ve lizin dekarboksilaz pozitif olmasıyla da *Enterobacteriaceae* familyasındaki diğer bakterilerden ayrılmaktadır. *Klebsiella pneumoniae*, ile yapılan biyokimyasal testler ile Metil kırmızısı ve İndol testleri negatif iken Voges-Proskauer ve Sitrat testleri pozitif olduğu görülmektedir [102].



**Şekil 2. 12.** *Klebsiella pneumoniae* [103]



**Şekil 2. 13.** *Klebsiella pneumoniae* Mukoid Koloni

\*Fotoğraf Cansu Köten tarafından cep telefonu ile çekildi.

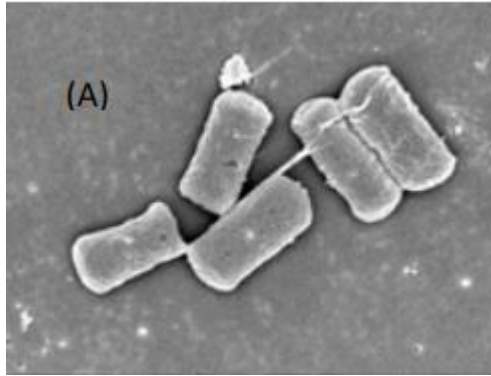
Petrol sahasından izole edilerek etkili petrol biyoyıkımı yapabildiği belirlenmiştir [104]. *Klebsiella pneumoniae*, çevreci bir yakıt olan biyo-hidrojen üretiminde ve sahip olduğu çeşitleri metabolitler ile biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmaktadır [104, 105]. *Klebsiella pneumoniae*, fermantasyon ile 1,3-propandiol (PDO) ve 2,3-bütandiol (BDO) biyosentezinde de kullanılmaktadır. Bu suşlardan üretilen PDO ve BDO, biyopolimerler, solventler ve yakıtlar gibi endüstriyel öneme sahip ürünlerde bulunmaktadır. İlave olarak, PDO biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin sentezinde kullanılmaktadır [106, 107]. *Klebsiella pneumoniae*'nin kozmetik ve ilaç gibi endüstriyel alanlarda kullanıldığı belirtilmiştir [108, 109].

### 2.8.2. *Bacillus axarquiensis*

*Bacillus axarquiensis*, *Bacillaceae* familyasında yer almaktadır. *Bacillus* cinsine ait olan bu tür Gram pozitif, basil morfolojisinde, peritriş flagellara sahip olduklarından hareketli yapıdadırlar. Bu mikroorganizmalar; kemoheterotrofik aerobik veya fakültatif anaerobik özelliktedirler. Endospor oluşturabilme özellikleriyle *Bacillus* türleri olumsuz çevre koşullarına direnç gösterebilen bakterilerdir. Bu türe ait mikroorganizmalar çöl kumları, kaplıcalar ve kutup toprakları gibi birçok ekstrem ortam dahil olmak üzere çeşitli çevrelerde bulunmaktadır. *Bacillus* cinsi, termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik, halotolerant veya halofilik olmalarıyla çok geniş pH ve sıcaklık aralığında ve yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalabilen bakterilerdir. *Bacillus* türlerinden bazıları antimikrobiyal metabolitler sentezlemeleri ile diğer mikroorganizmalar için antagonistik etki göstermektedirler. Ayrıca, *Bacillus* türleri ile ilaç endüstrisi için önemli olan antibiyotiklerin üretimi yapılmaktadır ve ürettikleri bu antibiyotiklerin çoğu gram pozitiflere karşı etkilidir [110]. Antibiyotik üretimine ek olarak enzim ve toksik üretimi yapılan *Bacillus* cinsi endüstriyel öneme sahiptir. Bunların ürettiği proteaz,  $\alpha$ -amilaz, hidroksilaz, alkol dehidrogenaz, kazeinaz, keratinaz, lipaz gibi enzimler gıda, tekstil, deri, kâğıt ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır [111-115]. Ayrıca *Bacillus* türlerinden çoğu böcek larvalarına patojenik etki etmesinden dolayı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır [116].

*Bacillus axarquiensis*, Gram pozitif, basil morfolojisinde, peritriş flagellalı, aerobik mikroorganizmalardır. Bunların endosporları, subterminal pozisyonda olup elipsoidal yapıdadır. Bu bakteriler, optimum üreme 32°C, pH 7.2 ve %0.5 deniz tuzunda

gerçekleşip, 15-45°C arası sıcaklıklarda ve pH 5.0-10.0 aralığında üreyebilmektedir [117].



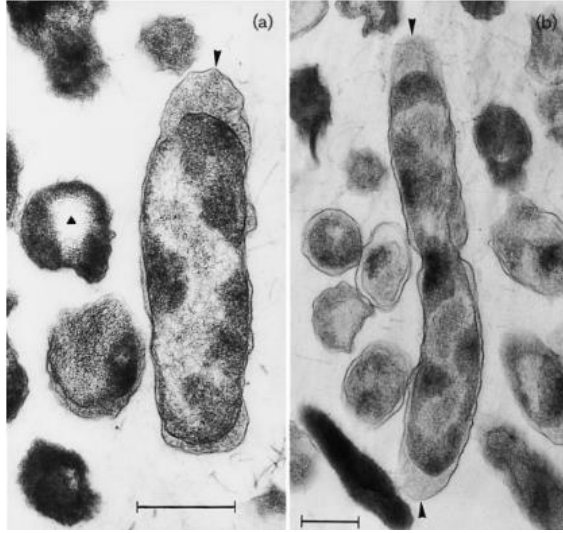
Şekil 2. 14. *Bacillus axarquiensis* [118]

### 2.8.3. *Pannonibacter phragmitetus*

*Pannonibacter phragmitetus*, *Proteobacteria* familyasında yer almakta ve Gram negatif, düz veya hafif kavisli basil morfolojisinde, flagellalı olmasıyla hareketli bir yapıdadır. Bu bakterinin kolonileri dairesel, opak ve beyazımsı bej rengindedir. Bu mikroorganizma endospor üretmez. *Pannonibacter phragmitetus*, fakültatif anaerobik ve kemoheterotrofik özelliktedir. Bu türe ait mikroorganizmaların optimum üremesi 22-28°C sıcaklıkta, 9.0-10.0 pH aralığında görülmektedir. Bununla birlikte bu bakteriler, sıcaklık 10-37°C aralığında, pH 7.0-11.0 aralığında ve %5 NaCl konsantrasyonunda üreme göstermektedir [119].

*Pannonibacter phragmitetus*, bakterilerinin biyokimyasal testlerinden Oksidaz ve Katalaz testleri pozitif, Voges-Proskauer ve Metil Kırmızısı testi negatiftir. Bu türe ait bakterilerde, fenilalanin deaminaz enzimleri bulunmazken, fosfataz ve üreaz enzim aktivitesi pozitifdir [119, 120].

*Pannonibacter phragmitetus*, birçok biyoremediasyon çalışmasında kullanılmaktadır. Sezen Bilen Özyürek'in Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'mızda yapılan bir çalışmada, petrol sahasından izole ettiği *Pannonibacter phragmitetus*'un petrol biyoyıkımı yapabildiği saptanmıştır [121]. Bu bakteri ağır metaller ile kirlenmiş suların arıtımında kullanılmaktadır [122]. Sağlık için oldukça toksik olan arsenit ile kirlenmiş bir dereden izole edilen *Pannonibacter phragmitetus* arsenik gideriminde kullanıldığı bilinmektedir [123].



Şekil 2. 15. *Pannonibacter phragmitetus* [119]

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1.Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Yapılan çalışmada petrol sahasından izole edilip tanımlanmış Hacettepe Üniversitesi Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 kullanıldı [55, 104, 121, 124].

#### 3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları

##### 3.2.1. Zenginleştirme Besiyerine Ekim ve Üretim

Petrol sahasından izole edildiği bilinen mikroorganizmaların zenginleştirilmesi, aerobik koşullarda ve tek karbon kaynağı petrol olan besiyerinde gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan petrol Diyarbakır'daki petrol sahasından getirilmiştir.

Bu amaçla; bakteri suşlarından örnek alınarak içinde %1 oranında (v/v) petrol, %1 oranında Triton X:100 bulunan 50 ml' lik Bushnell-Haas (BH) besiyerine ekilerek 30°C ve 150 rpm' de 3 gün üretime bırakıldı. Üretimin ardından zenginleştirme amacıyla kültürlerden 1 ml örnek alınarak taze Bushnell-Haas besiyerine ekimi yapıp aynı koşullarda tekrar üretime bırakıldı. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi.

##### 3.2.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Saklanması

Zenginleştirme yapılmasının ardından bakteri suşlarının bulunduğu numuneden 0.1 ml örnek alınıp Nutrient Agar besiyerine ekilerek, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üretilen bakteriyel suşlar +4°C'de buzdolabında saklandı. Suşların canlılığının korunması amacıyla 1 ay arayla bakterilerin pasajlama işlemleri gerçekleştirildi.

##### 3.2.3. Petrol Biyoyıkımında Kullanılan Mikroorganizmaların Hazırlanması

Bakteriyel suşlar Nutrient Broth'a ekilerek 30°C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlayarak 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından, tüm örnekler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre peleti steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl çözeltisi) ile muamele edilip yeniden santrifüj işlemine tabi

tutuldu. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra hücre peleti distile su ile süspanse edildi. Yıkama işlemi gerçekleştirilen tüm bakteriyel 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 (distile su) karşı okundu.

### **3.2.4. Petrol İçeren Besiyerine Ekim ve Üretim**

Tek karbon ve enerji kaynağı olarak ham petrol bulunan Bushnell-Haas besiyeri (g/L olarak: 0.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.02 CaCl<sub>2</sub>, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.05 FeCl<sub>3</sub>) içerisine %1 oranında Triton X:100 eklenerek 250 ml'lik erlenmayerlere 50 ml olacak şekilde besiyerleri hazırlandı. 121°C'de 15 dakika sterilizasyona bırakılıp sonrasında soğuması beklendi. Hazırlanan besiyerine 0.22 µm por çaplı selüloz asetat (CA) şırınga filtre ile steril edilen petrolden %1 (v/v) oranında ilave edildi. Ardından, hazırlanan bu besiyerine ayrı ayrı mikroorganizmaların %1 oranında ekimleri gerçekleştirilerek 30°C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde, karanlık koşulda 7 gün inkübasyona bırakıldı.

### **3.3. Petrol Biyoyıkımının Araştırılması**

#### **3.3.1. Petrol Biyoyıkımının Gravimetrik Yöntem ile Belirlenmesi**

Bakteriyel suşlar, içerisinde petrol bulunan Bushnell-Haas besiyerine ekimleri yapılarak uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, kültür ortamından diklorometan (DCM) ile petrol ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ardından, 90°C' de 1 saat su banyosunda bırakılarak DCM'in ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Başlangıç ve kalan petrolün ağırlığı arasındaki farkın yüzdesi belirlenerek % biyoyıkım olarak değerlendirildi.

**Kalan petrolün ağırlığı**=Ekstrakte edilen petrolü içeren erlenmayerin ağırlığı- Boş erlenmayer ağırlığı

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

**% Biyoyıkım**= Biyoyıkımı gerçekleştiren petrolün miktarı/Besiyerine eklenen petrol miktarı X 100

### **3.4. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizmaların Seçimi**

İçerisinde petrol ve %1 Triton X:100 bulunan Bushnell-Haas besiyerine ekimi yapılan suşlar 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından gravimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımı bakılarak en yüksek petrol biyoyıkım gerçekleştiren mikroorganizmalar potent suşlar olarak seçildi.

### **3.5. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Farklı Konsorsiyumlar ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması**

Gravimetrik yöntemle en yüksek petrol biyoyıkımı yaptığı belirlenen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus axarquiensis* NR115929 ve *Bacillus tequilensis* NR104919 ile 2' li ve 3' lü kombinasyonlarda farklı konsorsiyumlar oluşturuldu (Çizelge 3.1). Söz konusu konsorsiyumların petrol biyoyıkımının uygun koşullarda belirlenmesinin ardından en yüksek petrol biyoyıkım gerçekleştiren konsorsiyum seçilerek ileri optimizasyon çalışmalarında kullanıldı.

**Çizelge 3. 1.** Seçilen Farklı Mikroorganizmalar ile Oluşturulan Konsorsiyumlar

Oluşturulan Konsorsiyumlar	Mikroorganizmaların Ekim Oranları (ml)
<p><b>2 Mikroorganizma Bulunan Konsorsiyumlar</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919</li><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929</li><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1</li><li><i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919</li><li><i>Bacillus tequilensis</i> NR104919, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1</li><li><i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1</li></ol>	0.5:0.5
<p><b>3 Mikroorganizma Bulunan Konsorsiyumlar</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919</li><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919</li><li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929</li><li><i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919</li></ol>	0.35:0.35:0.35

**3.6. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ile Petrol Biyoyıkımı Uygun Fizyolojik Koşullarının Araştırılması**

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyum ile petrol biyoyıkımında farklı fizyolojik koşulların etkisi ayrıntılı olarak araştırıldı. Bu bağlamda, farklı başlangıç pH değerlerinin, inkübasyon koşullarının, inkübasyon sıcaklığının ve inkübasyon sürelerinin petrol biyoyıkımına etkisi incelenerek petrol biyoyıkımı için optimal fizyolojik koşullar belirlendi



### **3.6.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

4.0 ile 9.0 arasında değişen pH'larda hazırlanan Bushnell-Haas besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun ekimleri yapıp 30°C ve 150 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından petrol biyoyıkımları gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.6.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

Bushnell-Haas besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun belirlenen koşullarda ekimi yapılarak statik ve çalkalamalı olarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından petrol biyoyıkımları gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.6.3. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

Bushnell-Haas besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun uygun koşullarda ekimi yapılarak 20°C ile 35°C arasında değişen sıcaklıklarda ve 150 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından petrol biyoyıkımları gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.6.4. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

Bushnell-Haas besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun belirlenen optimal koşullarda ekiminin yapılmasının ardından 7, 14, 21 ve 28 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından petrol biyoyıkımları gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.7. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyuma ait Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması**

Petrol içeren Bushnell-Haas sıvı besiyerinde *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyum 25°C'de 150 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilerek dibe çöken mikroorganizmalar ile üst kısımdaki süpernatan fazı ayrıldı. Elde edilen kültür süpernatanı besiyerine eklenmeden önce 0.22 µm por çaplı şırınga filtreden geçirildi. Bushnell-Haas besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyuma ait kültür süpernatanı %10 ile %50 arasında değişen konsantrasyonlarda ekimleri yapıp 12, 36, 60 ve 84 saat boyunca 25°C'de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petrol biyoyıkımı gravimetrik yöntemle belirlendi.

### **3.8. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyum ve Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi**

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyum ve konsorsiyumun kültür süpernatanı ile petrol biyoyıkımının gaz kromatografisi analizi için petrol içeren Bushnell-Haas besiyerine potent konsorsiyum ekimi ve %50 ile %30 konsantrasyonundaki konsorsiyum kültür süpernatanın ilavesi yapıldı. Potent konsorsiyum optimal koşullarda inkübasyona bırakıldı. %50 konsantrasyondaki kültür süpernatanı 84 saat, %30 konsantrasyondaki kültür süpernatanı ise 60 saat 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrol DCM (1:2) ile ekstrakte edildi. GC analizi Encon Çevre Danışmanlık Laboratuvarı tarafından, 15m x 0.530mm x 0.15µm (uzunluk x çap x film kalınlığı) kolonunun takıldığı gaz kromatografisi cihazı (Agilent Technologies 7890B GC System) 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.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Artan dünya nüfusu ve bununla birlikte gelişen sanayi ile petrol bazlı ürünlerin kullanım alanları genişlemiştir. Petrol endüstrisinin yayılmasıyla çevreye petrol hidrokarbonlarının bulaşması da artmıştır. Petrol üretimi, arama, taşıma ve depolama gibi faaliyetler ile toprak, su ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olmaktadır [125]. Petrol kirliliğinin; tüm canlılara toksik, mutajenik ve kanserojenik etkiler yarattığı bilinmektedir [126]. Bu kirliliğin büyük bir kısmı da yaşanan kazalar ile olmuştur. Meksika Körfezi'ndeki Deep Water Horizon petrol kulesi 2010 yılında havaya uçarak körfeze yaklaşık 5.000.000 varil petrol bulaşmasına sebep olmuştur. 1967'de Torrey Kanyonu'nun yıkılması, 1969'da Santa Barbara kanal platformu patlaması, 1989 Exxon Valdez sızıntısı, 1999'da Fransa'da Erika sızıntısı gibi birçok kaza yaşanmıştır. Bu kazaların dışında petrol kuyularında meydana gelen sızıntılar da toprağa karışarak ekosistemin dengesini bozmaktadır. Yaşanan bu dökülmeler için tek bir çözüm yoktur. Dökülen petrol ve türü, dökülen yüzeyin özelliği, iklim koşulları gibi kriterlere bağlı olarak temizleme yöntemi seçilmelidir [127]. Kimyasal ve fiziksel olarak bu kirliliğin temizlenmesi fazlaca maliyetli ve kontaminasyonu tamamen temizleyebilen yöntemler değildir. Biyoremediasyon ise petrol bulaşmış su ve toprağın temizlenmesinde çevre dostu ve düşük maliyetli bir yöntemdir [128]. Bu temizleme yöntemi, çevreye bulaşmış zararlı maddeleri zararsız veya daha az zararlı maddelere mikroorganizmaların yardımıyla parçalayarak dönüştürülmesidir. Ayrıca biyoremediasyon kirliliğin olduğu alanda yapıldığından başka bir yere taşınma ve nakliye sırasında oluşabilecek tehditleri de önlemektedir [129].

Doğada birçok mikroorganizma enerji sağlamak için petrol içeriğindeki PAH'ları karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir [130]. Literatürde, petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı için mikroorganizmalarla pek çok çalışma yapılmaktadır [131-137]. Çalışmamızda, petrol ile kontamine olmuş alanlardan izole edildiği bilinen mikroorganizmaların petrol biyoyıkımları araştırıldı. Bu bağlamda, çalıştığımız mikroorganizmalardan en etkili biyoyıkım yapan suşların seçilmesi ve bu suşlarla farklı konsorsiyumların oluşturulması ile petrol biyoyıkım verimliliğinin artırılması amaçlandı.

#### 4.1. Petrol Biyoyıkımı İçin Uygun Mikroorganizma Seçimi

Petrol dört farklı fraksiyondan oluşan karmaşık yapıda bir bileşiktir. Bu bileşikler doğaya sızdığı anda ortamdaki mikroorganizmalar tarafından karbon ve hidrojen kaynağı olarak kullanılabilir. Petrol biyoyıkımını gerçekleştirebilen bu mikroorganizmalar doğal ortamlarda petrol bulaşmasıyla çoğalacak ve kirletici parçalandığında normal miktarına dönecektir. Bu yüzden biyoremediasyon çevreye dost bir yöntem olarak son derece önemlidir.

Çalışmamızda kullanılan *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1'in gravimetrik yöntem ile petrol biyoyıkımları araştırıldı. Tek karbon kaynağı petrol olan besiyerine mikroorganizmaların ekimi gerçekleştirildi. 7 günlük inkübasyon sonrasında diklorometan (DCM) ile ekstraksiyon yapıldı.

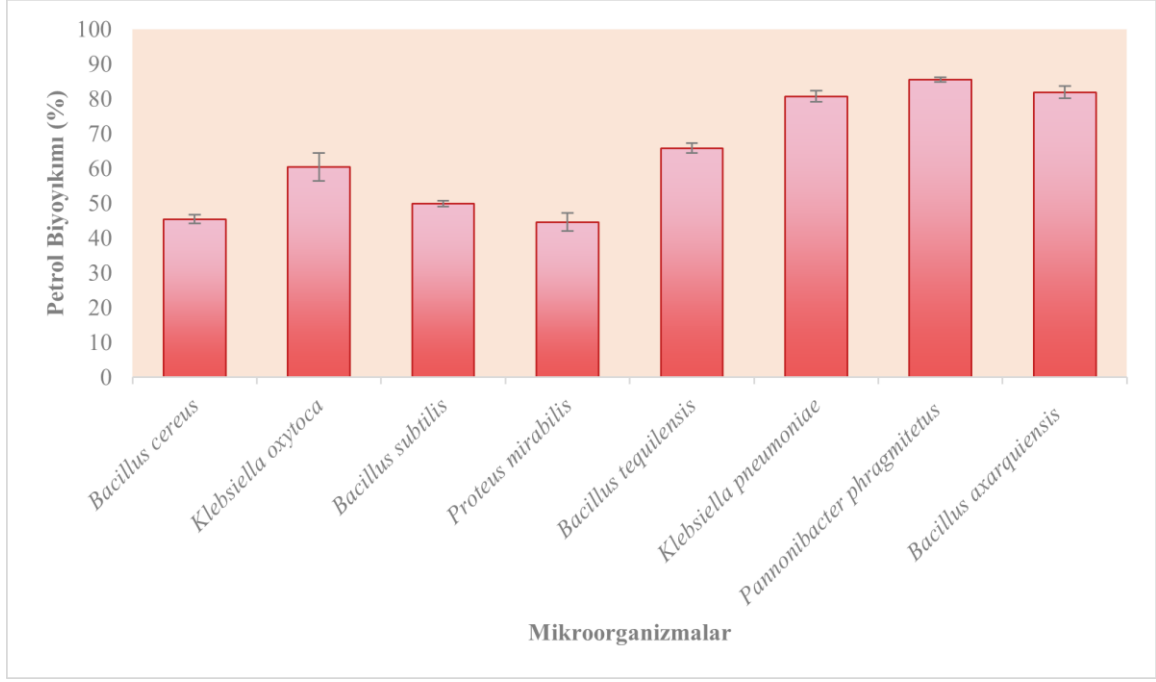
Petrol biyoyıkım sonuçları değerlendirildiğinde gram pozitif olan *Bacillus axarquiensis* NR115929 ve *Bacillus tequilensis* NR104919, gram negatif olan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 en yüksek petrol biyoyıkım yapan mikroorganizmalar olduğu belirlendi ve oluşturulacak konsorsiyumlarda kullanılmak üzere seçildi (Şekil 4.1). *Bacillus cereus* ATCC 14579 ve *Proteus mirabilis* ATCC 29906 %45 civarında petrol biyoyıkımı yaparken, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşlarının %50'nin üzerinde petrol biyoyıkımı yaptığı saptandı (Şekil 4.1). Çalışmamızda, gram özellikleri açısından mikroorganizmaları değerlendirdiğimizde petrol biyoyıkımlarında büyük bir fark görülmedi.

Literatürde, petrol sahasından izole edilen bakterilerde gram pozitiflerin baskın olduğu görülmektedir. Gram pozitiflerin olumsuz şartlara uyum sağlayabilmesinin sebebi güçlü hücre duvarı bulundurmasıdır. Bu şekilde yüksek sıcaklık, basınç gibi koşullara dayanıklıdır [138]. Gram pozitif bakterilerin olumsuz koşullara dayanıklı olması petrol biyoyıkımını daha verimli yapabileceğini düşündürmektedir. Fakat yapılan benzer bir çalışmada, gram pozitif *Bacillus subtilis* ve *Bacillus halotolerans*'tan oluşan konsorsiyum, gram negatiflerden oluşan konsorsiyum ve gram pozitif ile gram

negatiflerin birlikte bulunduğu konsorsiyumların üreme yoğunlukları ölçüldüğünde, gram pozitiflerden oluşan konsorsiyumdaki üreme yoğunluğunun yüksek olduğu saptanmıştır. Bu konsorsiyumların petrol biyoyıkları değerlendirildiğinde ise gram pozitiflerin bulunduğu konsorsiyumun diğer iki konsorsiyuma göre biyoyıklarının düşük olduğu belirtilmiştir [121]. Bu bağlamda, ortamda üreme yoğunluğu fazla olan gram pozitiflerin daha verimli petrol biyoyıkımı yapılabildiği değerlendirmesi doğru olmayacaktır.

Gram negatif olan *Pannonibacter phragmitetus*, alkali ve yüksek tuzlu ortamlara dayanıklıdır. Ağır metal ve PAH ile kirlenmiş ortamlara da uyum sağlayabilmesiyle biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmaktadır [139]. Çalışmamızda, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 %85 gibi yüksek bir oranda petrol biyoyıkım gerçekleştirildiği görüldü (Şekil 4.1).

Yapılan benzer diğer bir çalışmada, Gram pozitif *Bacillus axarquiensis* ve *Bacillus tequilensis*; gram negatif *Klebsiella pneumoniae*, sondaj sıvısından izole edilmiştir. Aynı çalışmada *Klebsiella pneumoniae*'nin %60, *Bacillus axarquiensis*'in ise %51 petrol biyoyıkımı yaptığı sonucuna varılmıştır [55]. Çalışmamızda ise *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile %80 oranında petrol biyoyıkımı gerçekleştirdiği görüldü (Şekil 4.1).



**Şekil 4. 1.** Farklı Mikroorganizmaların Petrol Biyoyıkımları

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

\**Bacillus cereus* ATCC 14579, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 suşları kullanılmıştır.

#### **4.2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Farklı Konsorsiyumlar ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması**

Toprak ve su ortamlarında en bol bulunan kirleticiler petrol hidrokarbonlarıdır. Petrol hidrokarbonlarından olan PAH’lardan 16 tanesi Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından öncelikli kirleticiler arasında listelenmiştir [93]. Petrol hidrokarbonlarının toksisitesi maruz kalma zamanı ve konsantrasyonu ile bağlantılı olarak değişmektedir [140]. Bazı uçucu petrol hidrokarbonlarına kısa sürede yüksek miktarda maruz kalınır ise merkezi sinir sistemi etkilenerek baş dönmesi ve baş ağrısına sebep olabilmektedir. Yerinde yakma, kimyasal dağıtıcılar ve sorbentler, klorlama gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler petrol hidrokarbon kirliliği için kullanılır. Maliyetinin fazla olması ve çevreye vereceği zararlardan dolayı dezavantajlı

yöntemlerdir. Biyoremediasyon, doğal ortamın yeniden oluşması için mikroorganizmalarla kirleticileri zararsız veya daha az zararlı bileşiklere dönüştürür. Bu şekilde kirleticilerin hareketliliğini ve göçünü azaltır buna bağlı olarak kirlenmemiş alanlara da yayılmasını engeller [128]. Petrol kirliliğinin temizlenmesinde biyoremediasyon kullanılan yöntemlerdendir. Petrol hidrokarbonlarının içerdiği karmaşık bileşiklerden dolayı biyoyıkımları için karışık kültürler saf kültürlere göre daha etkilidir [141]. Karışık mikrobiyal kültürler metabolik açıdan çok yönlülük gösterdikleri için saf kültürlerin tek başına parçalayamadığı ürünleri aralarında sinerjistik etki oluşturarak parçalayabilmektedir. Bu karışık kültürlerde her bir mikroorganizmanın rollerini anlamak zordur.

Saf kültür halindeki mikroorganizmaların petrol biyoyıkımlarına bakılarak seçilen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ile 2'li ve 3'lü olacak şekilde konsorsiyumlar oluşturuldu (Çizelge 4.1). Bu konsorsiyumlar ile saf kültürlerle oranla daha yüksek verimde petrol biyoyıkımı amaçlandı. Yapılan deney sonucunda *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 suşlarından oluşturulan konsorsiyumun saf kültürle ve oluşturulan diğer konsorsiyumların petrol biyoyıkımları ile karşılaştırıldığında en yüksek petrol biyoyıkımını gerçekleştirdiği görüldü (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Literatürde, gram negatif *Klebsiella pneumoniae* ve *Pannonibacter phragmitetus* ile oluşturulan konsorsiyumunun %77 petrol biyoyıkımı yaptığı belirlenmiştir [121]. Çalışmamızda, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1'den oluşan konsorsiyum ile %83 petrol biyoyıkımı görüldü. Bu konsorsiyuma gram pozitif olan *Bacillus axarquiensis* NR115929 eklenilmesiyle bu verimin %88'e çıktığı saptandı (Şekil 4.2).

Literatürde, *Bacillus axarquiensis* ile petrol biyoyıkım çalışmaları yaygın olmamakla birlikte [142]; çalışmamızda saf kültür olarak %80 civarında petrol biyoyıkımı yaptığı görüldü (Şekil 4.1). Konsorsiyumlar ile yapılan petrol biyoyıkım çalışmamızda ise en yüksek verimin olduğu konsorsiyumda bulunmaktadır. Bu bağlamda, tek başına ve konsorsiyum ile yüksek petrol biyoyıkımı yapan *Bacillus axarquiensis* NR115929'un ileri biyoremediasyon çalışmalarında kullanılabileceği gösterilmiştir.



Literatür araştırıldığında, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'ten oluşan çalışmamız için seçtiğimiz konsorsiyum ile petrol biyoyıkım çalışmalarında rastlanılmadı. Bu bağlamda, yüksek biyoyıkım yapan bu konsorsiyum literatüre ve ileriki çalışmalara katkı sağlayacaktır.

**Çizelge 4. 1.** Seçilen Mikroorganizmalar ile Oluşturulan Konsorsiyumlar ve Gram Özelliklerine göre Gruplandırılması

	<b>Gram Özellikleri</b>	<b>Oluşturulan Konsorsiyumlar</b>
<b>İki Mikroorganizma ile Oluşturulan Konsorsiyumlar</b>	Gram pozitif Gram pozitif	1. <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919
	Gram negatif Gram negatif	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1
	Gram pozitif Gram negatif	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 3. <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1 4. <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1
<b>Üç Mikroorganizma ile Oluşturulan Konsorsiyumlar</b>	İki Gram negatif Bir Gram pozitif	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929
	İki Gram pozitif Bir Gram negatif	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919 2. <i>Pannonibacter phragmitetus</i> NR_028009.1, <i>Bacillus axarquiensis</i> NR115929, <i>Bacillus tequilensis</i> NR104919

Çalışmamızda, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan petrol biyoyıkımı için seçtiğimiz konsorsiyuma benzer olarak ancak *Bacillus axarquiensis* NR115929 yerine *Bacillus tequilensis* NR104919 eklenerek kurulan konsorsiyum en düşük petrol biyoyıkımını gerçekleştirdi. İki bakteri de *Bacillus* türünden olmasına rağmen *Bacillus axarquiensis* NR115929'in bulunduğu konsorsiyum en yüksek petrol biyoyıkımı yaparken *Bacillus tequilensis* NR104919'un bulunduğu konsorsiyum en düşük petrol biyoyıkımı yaptığı görüldü (Şekil 4.2).

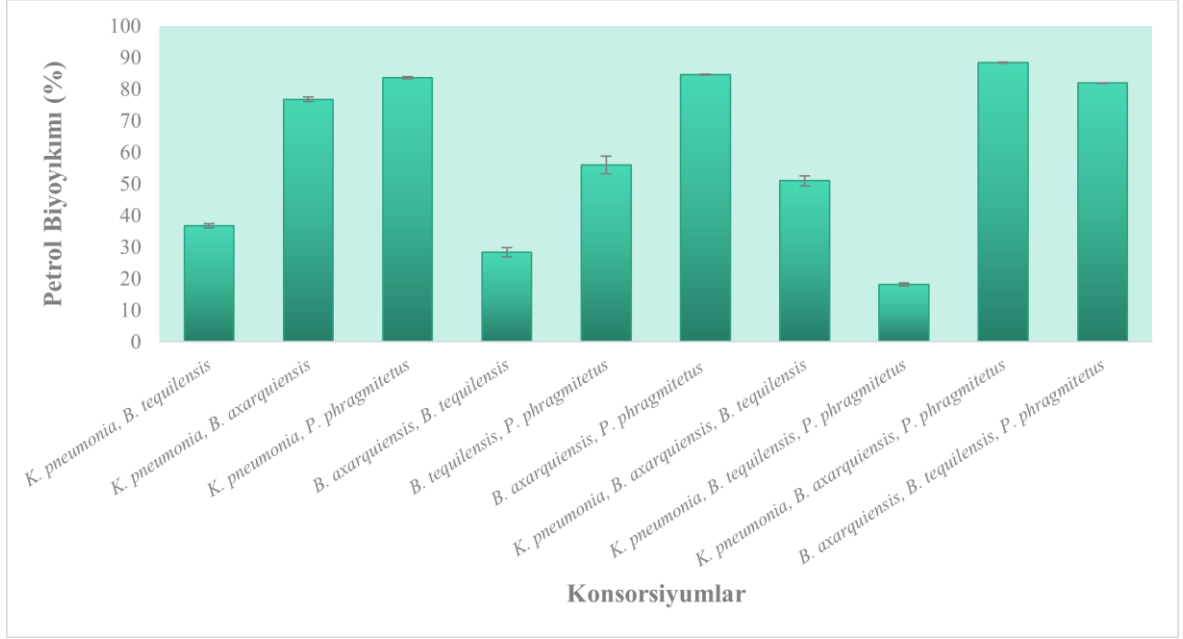
*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus tequilensis* NR104919'dan oluşan konsorsiyum %18 petrol biyoyıkım yaparken, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1'in bulunduğu iki bakteriden oluşan konsorsiyum %83 petrol biyoyıkımı gerçekleştirdi (Şekil 4.2). *Bacillus tequilensis* NR104919'in bu petrol biyoyıkımını düşürmesinin sebebi sınırlı sayıdaki karbon kaynağı için rekabet ve antagonistik etkiler olabilmektedir. Bazı *Bacillus* suşları tarafından üretilen sekonder metabolitlerin diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki göstermesi antagonistik etkilerini açıklamaktadır [65]. Mikroorganizmalar arası sinerjistik etkileşimler ise yapılan çalışmalarda, mikroorganizmaların farklı hidrokarbonları parçalayabilmesiyle aralarında rekabet oluşmaması ve elde edilen ara ürünlerin de mikroorganizmaların parçalayabileceği ürünler olması sebebiyle gerçekleştiğini bildirmiştir [64]. Bu bağlamda, *Bacillus axarquiensis* NR115929'in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 suşları arasında sinerjistik etkileşim olduğu değerlendirildi.

İki mikroorganizmadan oluşan konsorsiyumlara baktığımızda, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ile *Bacillus axarquiensis* NR115929'un petrol biyoyıkımlarının *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ile *Bacillus tequilensis* NR104919'dan yüksek olduğu, aynı şekilde *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ile *Bacillus axarquiensis* NR115929'in, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ile *Bacillus tequilensis* NR104919'ten yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Buna bağlı olarak, *Bacillus axarquiensis* NR115929; petrol yıkımı için *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ile sinerjik etki gösterirken, *Bacillus*

*tequilensis* NR104919 bu mikroorganizmalar ile petrol yıkımı için antagonist etki gösterdi.

Gram pozitif olan *Bacillus axarquiensis* NR115929 ve *Bacillus tequilensis* NR104919 ile kurulan ikili konsorsiyum ile çok düşük petrol yıkımı gerçekleşti. Bu iki gram pozitif olan mikroorganizma ile kurulan konsorsiyum literatüre benzer olarak birbirleriyle antagonistik etkileri sonucunda saf kültür olarak gerçekleştirebildiği petrol biyoyıkımından daha az biyoyıkım yaptığı görüldü [121] (Şekil 4.2). Bu ikili mikroorganizmadan oluşan konsorsiyuma eklenen *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ile oluşturulan konsorsiyum ile petrol biyoyıkımının oldukça yükseldiği görüldü. *Bacillus axarquiensis* NR115929 ve *Bacillus tequilensis* NR104919 ikili konsorsiyumunun petrol biyoyıkımı %18 iken *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 eklenerek üçlü oluşturulan konsorsiyumun biyoyıkımı %81'dir. Yapılan çalışmalara baktığımızda çoğunlukla gram pozitif ve gram negatif karışık mikroorganizmaların yüksek oranda biyoyıkım yapabildikleri belirtilmiştir. Gram pozitif ve gram negatif suşlar arasındaki sinerjik etkileşim ile kirleticilerin neredeyse tamamının parçalanması sağlanmaktadır [133, 138, 143].

Çalışmamızın devamında kullanılacak olan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşturulan konsorsiyuma alternatif olarak yüksek biyoyıkım görülen dört konsorsiyum daha bulunmaktadır. Bunlar, ikili konsorsiyumlardan *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumlar, üçlü olanlardan ise *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919'dan oluşan konsorsiyumlardır. Bu konsorsiyumlarda sırasıyla %84, %83, %76, %81 petrol biyoyıkımı görüldü (Şekil 4.2). Oldukça verimli petrol biyoyıkımı gerçekleştiren bu konsorsiyumlar da ileri çalışmalar ile araştırılarak farklı petrol biyoyıkım çalışmalarına katkı sağlayabilecektir.



**Şekil 4. 2.** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyumların Petrol Biyoyıkımları

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

\**Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 suşları kullanıldı.

#### **4.3. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929’den Oluşan Konsorsiyum ile Petrol Biyoyıkımı Uygun Fizyolojik Koşullarının Araştırılması**

Petrol hidrokarbonları organik maddelerin eksik yanması, petrol kuyularındaki sızıntılar, boru hatlarındaki hasarlar ve çeşitli ihmaller ile çevreye yayılarak kirlilik oluşturmaktadır. Karsinojenik, mutajenik ve toksik etkileri olduğu bilinen petrol hidrokarbonları tüm canlılar için risk oluşturur. Bunların çevreden uzaklaştırılması fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler ile sağlanabilmektedir. Bu yöntemlerden kirlilik üretmeden PAH’ları H<sub>2</sub>O ve CO<sub>2</sub> ‘ye dönüştürebilen biyoremediasyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoremediasyonun başarılı olması mikroorganizmaların performanslarına bağlıdır. Bu yüzden mikroorganizmaların üremesini etkileyen

faktörlerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu faktörler, pH, sıcaklık, oksijen varlığı, tuzluluk olarak gibi parametrelerdir [144].

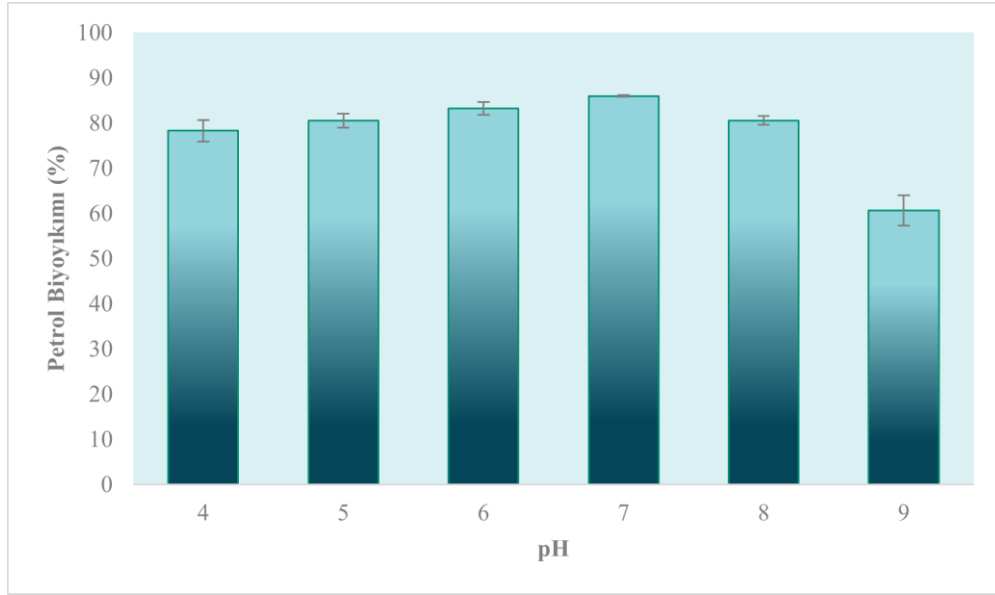
Çalışmamızda, en yüksek biyoyıkımı gösteren *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyum için uygun fizyolojik koşulların belirlenmesi amaçlandı. Başlangıç pH değerleri, inkübasyon koşulları, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi parametreleri çalışılarak petrol biyoyıkımına etkileri araştırıldı.

#### 4.3.1. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Mikroorganizmaların ve enzimlerinin çalışabilmesi için pH değeri önemlidir. Besin maddelerini kullanımında, mikrobiyal adsorbsiyonda, hücre dışı enzimlerin çalışmasında etkilidir [144]. Literatürde petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen çoğu bakteri için optimal pH aralığı 6.5–8.0 olarak belirlenmiştir [81]. *Sphingomonas olei* ve *Acinetobacter radioresistens* ile yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarında nötr pH'da en yüksek biyoyıkımı yaptığı belirlenmiştir [137]. Alkali veya asidik ortamlar biyoyıkım için gerekli olan çoğu enzimin aktivitesini düşürmektedir [145]. Literatürde, *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. ile oluşturulan konsorsiyum için optimal pH'nın 8–10 arasında olduğu görülmüştür [146]. Buna bağlı olarak bu konsorsiyumun alkali koşulları tercih ettiği söylenebilir. Fungusların ise asidik ortamları tercih ettikleri bilinmektedir. *Aspergillus flavus* ile yapılan bir çalışmada ise optimal pH 5.5 olarak saptanmıştır [147].

Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum için uygun başlangıç pH değerini belirlemek amacıyla, petrol içeren besiyerleri 4.0 ile 9.0 arasında değişen pH'larda hazırlanarak konsorsiyum ekimleri gerçekleştirildi. 30°C'de 150 rpm çalkalama hızı ile 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanmasıyla gravimetrik olarak petrol biyoyıkımı belirlendi. Çalışmamızda en yüksek biyoyıkım pH 7.0'de %85 olarak gözlemlenip, pH 4.0 ve 8.0 arasında da bu değere yakın yüksek petrol biyoyıkımları görüldü (Şekil 4.3). pH 9.0'da petrol biyoyıkım yüzdesi düşmüş olsa da %60 civarında petrol biyoyıkımı gerçekleşti. Yapılan bir çalışmada, kirliliğin bulunduğu toprağın pH'sı 5.2 olduğu belirlenip, sonrasında bu pH 7.0'ye çıkarılarak ortamdaki petrol biyoyıkım oranları karşılaştırılmıştır ve pH 7.0'a

çıkarılmasıyla petrol biyoyıkımının arttığı belirlenmiştir [148]. Çalışmamızda ise oluşturduğumuz konsorsiyumun petrol biyoyıkımının pH 7.0'da en yüksek olmasına rağmen pH 4.0 ve 8.0 arasında da pH 7.0'daki biyoyıkım değerine yakın yüksek petrol biyoyıkımları göstermesi bu konsorsiyumun kullanım alanını genişletmektedir. Petrol ile kirlenmiş toprağın pH'sı araştırıldığında pH değerlerinin 3.0-9.0 aralığında olduğu görülmektedir [149]. Sonuç olarak, geniş pH aralığında yüksek biyoyıkım görülmesiyle petrol biyoyıkımında oluşturduğumuz konsorsiyumun kullanımı avantajlı olacaktır.



**Şekil 4. 3.** Başlangıç pH Değerlerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisi

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

#### **4.3.2. Farklı İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

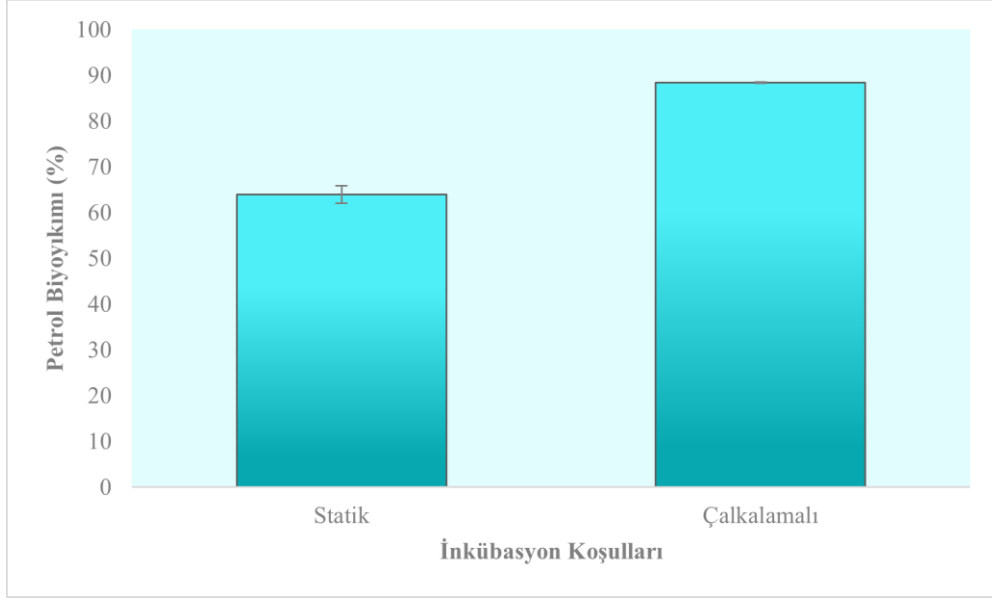
Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımı çoğunlukla aerobik olarak gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarda bulunan oksijenaz, dioksijenaz, monooksijenaz gibi çeşitli enzimler ile bu süreçler gerçekleşmektedir [150]. Anaerobik olarak da petrol biyoyıkımı gerçekleşebilir. Benzil süksinat sentaz, naftoil-CoA redüktaz, karboksilaz, naftil-2-metil-süksinat sentaz gibi enzimler anaerobik biyoyıkımda görev alan bazı enzimlerdir [151-153]. Alkanlar, petrol hidrokarbonlarından aerobik ve anaerobik olarak en kolay biyoyıkıma uğrayabilen formudur [154].

Çalışmamızda, statik ve çalkalamalı koşullarda petrol biyoyıkım verimi araştırılması amaçlandı. Çalkalamalı koşulda, sudaki oksijen çözünürlüğü artarak mikroorganizmalar için gerekli havalandırma sağlanmaktadır. Statik koşullarda ise yüzeydeki oksijen miktarı yüksek olmasıyla erlenin diplerine doğru içerisindeki çözünmüş oksijen miktarı azalmaktadır.

Çalışmamızda statik ve çalkalamalı koşullarda petrol biyoyıkımını araştırmak amacıyla *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun petrol içeren besiyerine ekimi yapıldı. 150 rpm çalkalama hızında ve statik koşullarda 30°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gravimetrik olarak petrol biyoyıkımı ölçüldü. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyumun, çalkalamalı koşulda %88 petrol biyoyıkımı yaptığı saptandı (Şekil 4.4). Literatürde yapılan petrol biyoyıkımı çalışmalarında 150-200 rpm arası değişen çalkalama hızları kullanılmıştır [138, 155-157]. 150 rpm çalkalama hızının mikroorganizmalar için gerekli havalandırmayı sağlayarak en yüksek petrol biyoyıkımını gerçekleştirdiği belirtilmiştir [158]. Yapılan benzer bir çalışmada, deney sonuçlarımızla paralel olarak ortamın oksijenlendirilmesiyle biyoyıkımın verimli hale geldiği belirtilmiştir [159]. Oksijenin bulunmadığı bir ortamda yapılan petrol biyoyıkım çalışmasında ise %25 civarında oldukça düşük petrol biyoyıkımı gerçekleştiği saptanmıştır [160].

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyumda, statik koşulda besiyeri içerisindeki çözünmüş oksijen miktarının az olmasına rağmen %63 biyoyıkım saptandı (Şekil 4.4). Petrol biyoyıkımı hedeflendiğinde yerinde biyoremediasyon yöntemi ile statik olan petrol sahasının havalandırılması ekstra maliyet oluşturmaktadır. Harcanacak maliyet göz önüne alındığında, statik olarak petrol biyoyıkımı gerçekleştirilmesi mümkün olan suşlarla çalışılması daha avantajlı olacaktır. Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda statik ve 150 rpm çalkalama olan bu iki inkübasyon koşulu arasında petrol biyoyıkımında %25 gibi bir fark bulunmaktadır. (Şekil 4.4) Bu bağlamda oluşturduğumuz konsorsiyumun avantajlı olduğu görülmektedir. Statik ortamda %63 petrol biyoyıkımı oldukça yüksek olup, derin sular gibi oksijenin az olduğu ortamlarda da kullanımı uygun olacaktır.





**Şekil 4. 4.** İnkübasyon Koşullarının Petrol Biyoyıkımına Etkisi

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

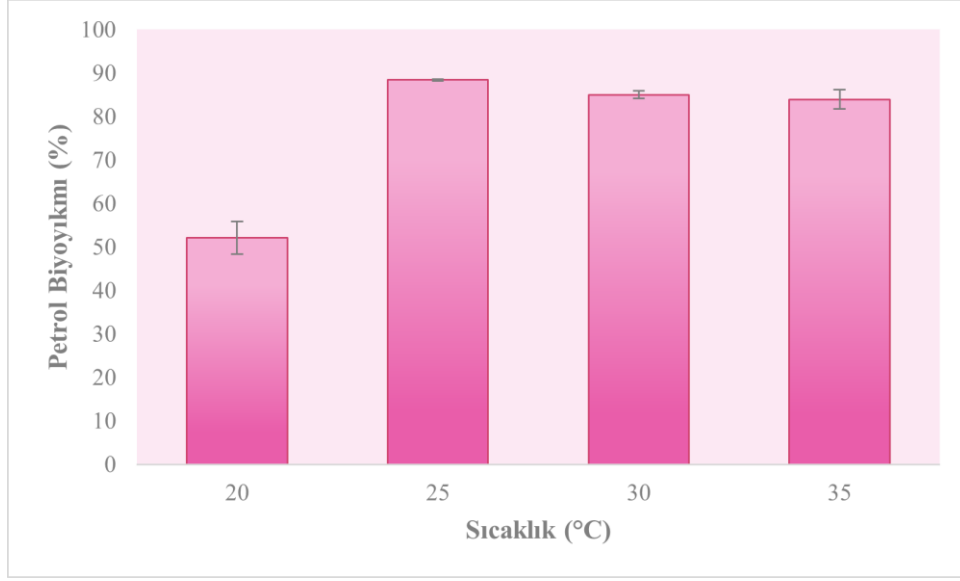
#### **4.3.3. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması**

Petrol hidrokarbonlarının biyoremediasyonu için sıcaklık önemli bir çevresel faktördür [67]. Mikrobiyal üremeyi, gaz çözünürlüklerini, toprak matrisini, mikroorganizmaların metabolizmasını, kirleticilerin fiziksel ve kimyasal yapısını etkilemektedir [161]. Düşük sıcaklıklar petrol içeriğindeki uçuculuğunun azalmasına, viskozitesindeki artış ile biyobozunma aktivitesinin azalmasına ve çözünürlüğünün azalmasına neden olur [146]. Sıcaklığın yükselmesiyle petrol çözünürlüğü artmakta ve biyoyıkımında yer alan mikroorganizmaların enzim aktivitesi artışıyla biyoyıkımı iyileştirmektedir. Fakat çok yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmaların üremesini engellediğinden biyoyıkımı düşürmektedir. Bu sebeple mezofilik sıcaklıklarda biyoyıkım daha hızlı gerçekleşmektedir [68].

Çalışmamızda inkübasyon sıcaklığının petrol biyoyıkımına etkisini belirlemek için tek karbon kaynağı petrol olan besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun ekimi yapıldı. 20°C ile 35°C arası değişen sıcaklıklarda 150

rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. 7 günün sonunda gravimetrik yöntemle petrol biyoyıkımlarına bakıldı. Literatürde, farklı ortamlarda en yüksek petrol biyoyıkımı için optimal sıcaklıkların değiştiği belirlenmiştir. Toprakta 30-40°C, tatlı suda 20-30°C ve deniz ekosisteminde 15-20°C’de en yüksek petrol biyoyıkımı görülmektedir [162, 163]. Toprakta petrol biyoyıkımı yapan mikroorganizmalar *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ve *Pseudomonas*; tatlı suda *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* ve *Enterobacter*; deniz ekosisteminde *Oleiphilus*, *Cycloclasticus*, *Alcanivorax*, *Neptunomonas* ve *Marinobacter* örnek verilebilir [164-166]. Çalışmamızda 20°C’de %50’nin üzerinde görülen petrol biyoyıkımı ile düşük sıcaklıktaki ortamlarda, oluşturduğumuz konsorsiyumun kullanışlı olacağı değerlendirildi (Şekil 4.5). Yapılan bir çalışmada, aktif çamurda bulunan mikroorganizmalar ile 30-40°C aralığında en yüksek petrol biyoyıkımı elde edilmiştir. Aktif çamurun içerisindeki mikroorganizmalar saflaştırıldığında baskın olarak *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Flavobacterium* olduğu bulunmuştur [133]. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum için optimal sıcaklık olarak 25°C belirlendi (Şekil 4.5). Çalışmamızın sonuçları literatürle uyumlu olduğu görülmektedir [76].

Mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen petrol biyoyıkımında, petrolün farklı ortamlara yayılmasıyla çalışılacak ortamların sıcaklıkları değişkenlik gösterecektir. Mikroorganizmaların tüm bu farklı ortam sıcaklıklarına adapte olabilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyumun 25-35°C’deki geniş sıcaklık aralığında verimli petrol biyoyıkımı yapabilmesi avantaj oluşturmaktadır.



**Şekil 4. 5.** İnkübasyon Sıcaklığının Petrol Biyoyıkımına Etkisi

\*Suşların üretimi petrol içeren besiyerinde, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

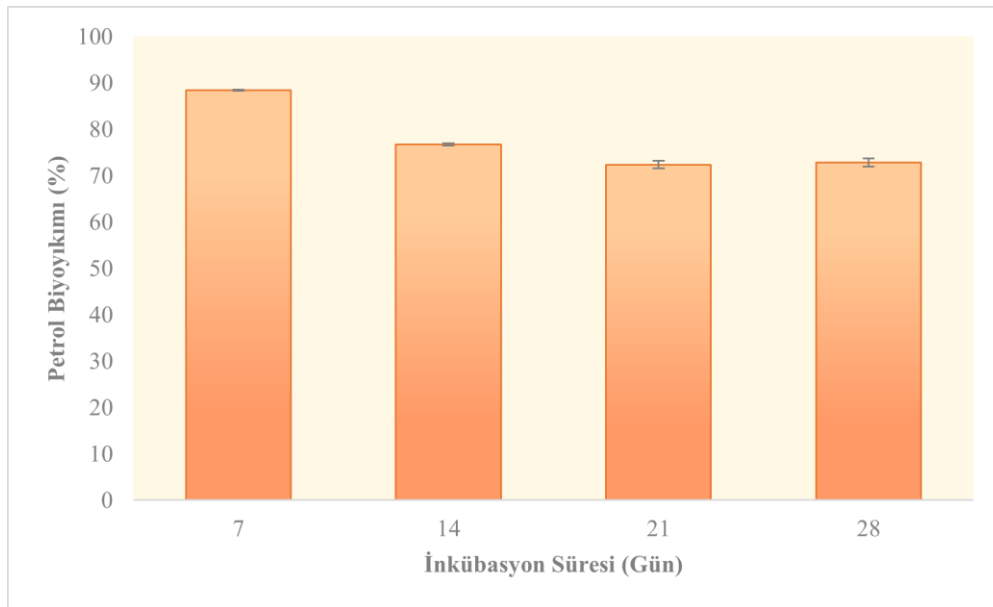
#### 4.3.4 Farklı İnkübasyon Sürelerinin Petrol Biyoyıkımına Etkisinin Araştırılması

Çalışmamızda petrol biyoyıkımına inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi için petrol içeren besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun ekimi yapıldı. 7,14,21 ve 28 gün olmak üzere 25°C’de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda petrol biyoyıkımı belirlendi.

Sonuçlara baktığımızda, en yüksek petrol biyoyıkımı 7 gün sonunda elde edildi (Şekil 4.6). 14 günlük inkübasyon süresinin sonrasında petrol biyoyıkımının artmadığı ve aynı seviyede kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.6). *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada, petrol hidrokarbonlarından kısa ve orta zincirli alkanların 1 haftanın sonunda neredeyse tamamının, uzun zincirli alkanların ise %15’inin biyoyıkıma uğradığı gösterilmiş ve 10 günün ardından petrol biyoyıkımının artmadığı belirtilmiştir [167]. Yapılan bir çalışmada petrol biyoyıkımı ile eş zamanlı olarak ortamdaki bakterilerin üreme yoğunlukları da ölçülmüştür. Buna bağlı olarak, inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte mikroorganizmaların üremesinin azaldığı tespit edilmiştir [168]. Bu bağlamda,

çalışmamızda, 7 günde kullandığımız konsorsiyum ile petrol hidrokarbonlarından daha kolay biyoyıkıma uğrayanların biyoyıkımının gerçekleştiği ve 14 günden sonra ortamda parçalanması zor hidrokarbonların kalması ile petrol biyoyıkımında bir artış görülmediği değerlendirildi.

Literatürde, *Bacillus tropicus*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* ile bir konsorsiyum kurularak optimum petrol biyoyıkımın 18 günde olduğu ve %74 petrol biyoyıkımı yaptığı belirtilmiştir [169]. *Aspergillus flavus* ile yapılan bir diğer çalışmada maksimum petrol biyoyıkımın 15. günde %82 olduğu belirtilmiştir [170]. Fungusların salgıladıkları hücre içi ve hücre dışı enzimler ile bakterilerden daha avantajlı oldukları bilinmektedir [171]. Bakteriler ve funguslar ile yapılan petrol biyoyıkım deneyleri değerlendirildiğinde, sırasıyla %74 ve %82 petrol biyoyıkımını 18 ve 15 günde gerçekleştirilmektedir [169, 170]. Çalışmamızda ise *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum ile 7 günde %88 petrol biyoyıkımı gerçekleştirdi (Şekil 4.6). Bu literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 konsorsiyumu ile daha kısa sürede ve daha verimli biyoyıkım yaptığı saptanmıştır.



**Şekil 4. 6.** İnkübasyon Süresinin Petrol Biyoyıkımına Etkisi

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

#### **4.4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyuma ait Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Araştırılması**

Petrol biyoyıkımında mikroorganizmaların kullanılması fiziksel ve kimyasal yöntemler göre avantajlıdır. Mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımında ise öncelikle mikroorganizmaların üremesi gerektiğinden ortamının çeşitli parametrelerinden oldukça etkilenmesi ise bu yöntemin dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal üretime ihtiyaç olmadan sadece süpernatan ile petrol biyoyıkımı etkili alternatif bir yöntemdir. Literatürde, mikrobiyal enzimler ile pek çok petrol biyoyıkım çalışmaları yapılmaktadır. Petrol hidrokarbonlarının biyoyıkımında birçok enzimin görev aldığı bilinmektedir. Bunlara metan monooksijenaz, alkan monooksijenaz, alkol dehidrojenaz ve lakkaz örnek verilebilir [112, 172, 173].

Çalışmamızda, ortamda mikroorganizmalar olmadan süpernatan ile petrol biyoyıkımını araştırmak amacıyla ilk olarak petrol içeren besiyerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun ekimi gerçekleştirildi. 7 gün boyunca 25°C’de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Üremesi gerçekleşen mikroorganizmaların ortamdan uzaklaştırıp, kültür süpernatanı fazını ayırmak için 4000rpm’de 20 dakika boyunca santrifüj edilip, 0.22 µm por çaplı şırınga filtreden geçirildi. Elde ettiğimiz kültür süpernatantları, %10 ile %50 arasında farklı konsantrasyonlarda petrol içeren besiyerlerine eklendi. 25°C’de 150 rpm çalkalama hızında 12, 36, 60 ve 84 saat süren inkübasyonun ardından petrol biyoyıkımları gravimetrik yöntemle belirlendi.

Amacımız, öncelikle mikrobiyal üretim olmadan petrol biyoyıkımını sağlamak ve mikroorganizmalar ile 7 günde gerçekleşen petrol biyoyıkım süresini kısaltarak, süpernatandaki enzimler ile daha verimli petrol biyoyıkımı gerçekleştirmektir. Çalışmamızın bu aşamasında *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyuma ait kültür süpernatanı ile elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm konsantrasyonlarda 12 saat sonunda oldukça az görülen petrol biyoyıkımı 36 saatten itibaren tüm konsantrasyonlarda artmıştır. (Şekil 4.7). Araştırılan tüm süpernatan konsantrasyonları için maksimum petrol biyoyıkımı 84 saatin sonunda elde edildi (Şekil 4.7). Bu 84 saatlik petrol biyoyıkımının tüm süpernatan konsantrasyonlarının sonuçları

36 saatlik petrol biyoyıkımının tüm süpernatan konsantrasyonlarının sonuçları ile karşılaştırdığımızda sadece %5-10 arasında küçük bir fark olduğu görüldü. 36 saat sonunda %10 süpernatan konsantrasyonunda %62, %50 süpernatan konsantrasyonunda %67 petrol biyoyıkımı elde edildi (Şekil 4.7).

Konsorsiyumun kültür süpernatanının konsantrasyonlarını arttırdığımızda bu konsantrasyon artışına bağlı petrol biyoyıkımında önemli bir artış olmadığı saptandı. Bu bağlamda %20 süpernatan konsantrasyonunun bile petrol biyoyıkımında oldukça etkili olduğu belirlendi. 60 saatin sonunda %20 ve üzeri süpernatan konsantrasyonları için %80 civarında petrol biyoyıkımı gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.7). 7 günde *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyuma ait petrol biyoyıkımı %88'di (Şekil 4.6). Sonuçları değerlendirdiğimizde, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun petrol biyoyıkımı ile aynı konsorsiyumdan elde edilen süpernatan ile gerçekleştirilen petrol biyoyıkımı benzer olup 7 gün yerine 60 saat sonucunda gerçekleşti. Bu bağlamda, kısa sürede elde edilen petrol biyoyıkımı ile mikroorganizmalar yerine kültür süpernatanı kullanılması avantajlı olacaktır. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun kültür süpernatanı içerisinde mikrobiyal birçok enzim bulunmaktadır. Süpernatan içerisindeki bu enzimlerin saflaştırılmasıyla, kültür süpernatanından elde ettiğimiz petrol biyoyıkımından daha kısa sürede ve daha verimli biyoyıkım gerçekleştirilebilir.

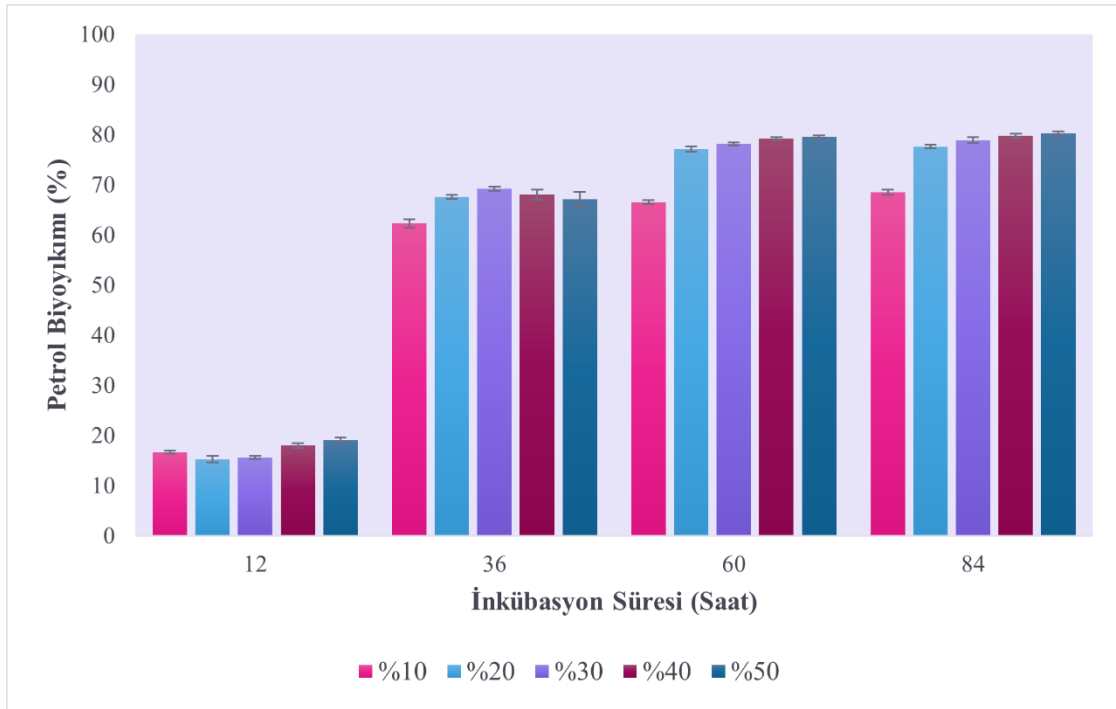
Klinik *Klebsiella sp.* suşları ile yapılan çalışmamıza benzer bir çalışmada, kültür süpernatanı ile yüksek petrol biyoyıkımı elde edilmesi ve hastalık yapan bu suşların çevreye yayılmaması açısından süpernatan kullanılmasının önemi belirtilmiştir [132]. Çalışmamızda kullandığımız suşlar petrol sahasından alınan örnekten saflaştırılmış olup klinik suşlar olmamasına rağmen klinik suşlardan gen transferi ile genetik materyalin değişimi sonucu ortamdaki diğer bakterilere de sahip olduğu zararlı özellikleri geçebilmektedir. Örneğin, antibiyotik direnci bulunan bakterilerden gen transferi sonucu diğer bakterilerde de antibiyotik direnci oluşmasına sebep olacaktır [174].

Literatürde, %3 oranında ekimi yapılan *Alcanivorax borkumensis*'in inkübasyonu sonucunda elde edilen süpernatan ile petrol hidrokarbonlarından olduğu bilinen BTEX'in

(benzen, toluen, etilbenzen, ksilen) biyoyıkları araştırılmıştır. 3 gün sonunda %70-80 arasında BTEX hidrokarbonlarının biyoyıkıma uğradığı belirtilmiştir. Ayrıca süpernatanı kullanılacak mikroorganizmanın üretiminde inokülasyon miktarının değişimiyle elde edilen süpernatan içerisindeki enzim konsantrasyonunun değişeceğini bildirmiştir [175]. Buna bağlı olarak, değişen enzim konsantrasyonu ile hidrokarbonların biyoyıkım verimi de etkilenecektir. Çalışmamızda, %1 oranında ekim yapılan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun inkübasyonu ardından elde edilen süpernatan ile 60 saat sonunda %20 ve üzeri süpernatan konsantrasyonlarında gerçekleşen petrol biyoyıkları %80 civarında olup yapılan çalışma ile karşılaştırdığımızda daha kısa sürede benzer verimde biyoyıkım yapıldığı görüldü (Şekil 4.7). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşturduğumuz konsorsiyumun ekim oranı değiştirilerek yapılacak çalışmalarda petrol biyoyıklarının daha verimli hale getirilebilecektir. Ancak yukarıda belirttiğimiz üzere süpernatan içerisindeki enzimlerin saflaştırılması sonrası enzimlerin daha konsantre edilmesi ile daha kısa sürede daha verimli petrol biyoyıkımı elde edilecektir.

*Pseudomonas*'ın iki suşu kullanılarak yapılan benzer bir çalışmada, *Pseudomonas synxantha* ve *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen ksilen monooksijenaz ve katekol 2,3-dioksijenaz enzimleri ile petrol hidrokarbonlarından p-ksilenin biyoyıkımı araştırılmıştır. Ksilen monooksijenaz ve katekol 2,3-dioksijenaz enzimleri ayrı ayrı ve iki enzimin karışımı ile p-ksilen biyoyıkım verimlerine bakıldığında, Ksilen monooksijenazın tek başına 30 saat sonunda %90 p-ksilen biyoyıkımı yaptığı elde edilmiştir. En yüksek p-ksilen biyoyıkımı, 1:1.5 oranında (Ksilen monooksijenaz: katekol 2,3-dioksijenaz) enzim karışımı ile 48 saat içerisinde p-ksilenin tamamının biyoyıkımı gerçekleşmiştir [176]. Buna bağlı olarak, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyumun süpernatanı ile 60 saat sonunda %20 ve üzeri süpernatan konsantrasyonlarında elde ettiğimiz maksimum petrol biyoyıkımı, süpernatan içerisindeki enzimler saflaştırılarak ve bunların birbirleriyle olan etkileşimlerinin araştırılmasıyla daha verimli hale getirilebilecektir.

Enzimler ile yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarında, serbest ve immobilize enzim biyoyıkım verimleri karşılaştırıldığında, immobilize enzimin çevre şartlarından daha az etkilenmesi ile daha uzun süre aktif kalabilmesi ve tekrar kullanılabilirliği ile serbest enzimlerin petrol biyoyıkımlarına göre daha verimli olduğu belirlenmiştir [177]. *Klebsiella pneumonia*, *Pannonibacter phragmitetus* ve *Bacillus axarquiensis* ile oluşturduğumuz konsorsiyuma ait süpernatant içerisindeki enzimlerin immobilizasyonu ile petrol biyoyıkım çalışmalarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



**Şekil 4. 7.** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum Kültür Süpernatantı ile Farklı Konsantrasyon ve İnkübasyon sürelerinde Petrol Biyoyıkımı

\*Farklı konsantrasyonlardaki kültür süpernatantı, petrol içeren besiyerinde 25°C'de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



#### **4.5. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile Oluşturulan Konsorsiyum ve Kültür Süpernatanı ile Petrol Biyoyıkımının Gaz Kromatografisi (GC) Analizi ile Belirlenmesi**

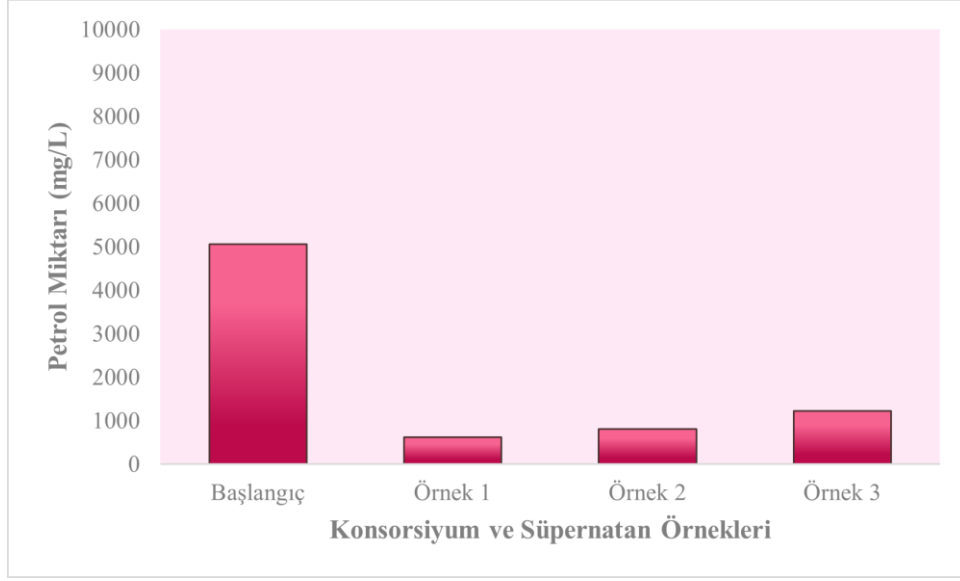
Çalışmamızda gravimetrik yöntemle petrol biyoyıkımının belirlenmesine ek olarak en verimli bulunan potent konsorsiyumun ve bu konsorsiyumun kültür süpernatanının petrol biyoyıkımı GC analiziyle de belirlendi. Bu amaçla, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun ekimleri yapıldı. 25°C'de 150rpm çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun petrol biyoyıkımını belirlemek amacıyla ekstraksiyonu gerçekleştirildi ve bu 1. Örnek olarak isimlendirildi. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun ekimleri yapıp 7 gün boyunca 25°C'de 150rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kültür süpernatanını ayırmak için 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından 0.22 µm por çaplı şırınga filtreden geçirildi. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyuma ait elde edilen bu kültür süpernatanı ile çalışmamızın daha önceki aşamasında ulaşılan maksimum biyoyıkım 84 saat sonucunda %50 oranında kültür süpernatanı konsantrasyonunda görüldüğünden GC analizine gönderilecek 2. Örnek için %50 oranında kültür süpernatanı kullanıldı ve 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla 84 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.7). Kültür süpernatanı konsantrasyonu artışı ile petrol biyoyıkımı çok yüksek olmadığından 3. örnek, %30 kültür süpernatanı konsantrasyonu ile hazırlanarak 60 saat 25°C'de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan örneklerin inkübasyon sürelerinin dolmasıyla ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bu üç örneğin petrol biyoyıkım yüzdesinin belirlenebilmesi amacıyla, biyoyıkıma uğramamış başlangıç petrol miktarı ve hazırlanan örneklerdeki petrol miktarları GC cihazında (Agilent Technologies 7890B GC System) analiz edildi (Şekil 4.8).

Yapılan analiz sonucunda başlangıç petrol miktarı ile inkübasyonun ardından kalan petrol miktarları karşılaştırılarak petrol biyoyıkım yüzdeleri elde edildi (Şekil 4.9.). Sonuçlar

gravimetrik yöntemle benzer olarak en yüksek petrol biyoyıkım verimi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyum ile optimal koşullar altında gerçekleşti. Sonrasında en yüksek verim sırasıyla %50 ve %30 oranında kültür süpernatanı ile optimal koşullar altında 84 ve 60 saatlik inkübasyon sonunda görüldü. Bu bağlamda *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumun petrol biyoyıkım oranı ile bu konsorsiyumun kültür süpernatanının petrol biyoyıkım oranı arasında büyük bir fark olmadığı ve daha kısa süre içerisinde gerçekleştiği belirlendi.

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumunun petrol biyoyıkımı gravimetrik yöntemle %88 iken, GC analizi sonucunda petrol biyoyıkımının %87 olduğu belirlendi (Şekil 4.6, Şekil 4.9). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyumu kültür süpernatanına ait %50 konsantrasyonda 84 saatlik petrol biyoyıkımı gravimetrik yöntem ile % 80 iken GC analizi sonucunda %84 olduğu görüldü (Şekil 4.7, Şekil 4.9). Aynı konsorsiyuma ait %30 konsantrasyonundaki kültür süpernatanı 60 saatlik petrol biyoyıkımı gravimetrik yöntemle %78 olduğu GC analizi sonucunda ise %75 olarak görüldü (Şekil 4.7, Şekil 4.9). Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde petrol biyoyıkımında gravimetrik yöntem ile GC analizi sonuçlarının benzer olduğu görüldü.

Mikrobiyal üreme yerine daha kısa sürede benzer petrol biyoyıkımı için kültür süpernatanı kullanılabileceği GC analizi ile de belirlendi. Mikrobiyal enzimler ile 60 saat sonunda %30 süpernatan konsantrasyonu ile elde edilen %75 petrol biyoyıkımı, kültür süpernatanı içerisindeki enzimlerin araştırılıp petrol biyoyıkımının daha verimli olacak şekilde karışık enzimler hazırlanabilir. İleride kültür süpernatanı içerisindeki enzimlerin immobilizasyonu ile tekrar kullanımı ve çevresel şartlara daha dayanıklı olmasıyla enzimleri uzun süre aktivasyon gösterebilmesi petrol biyoyıkımında daha verimli bir yöntem olacaktır.

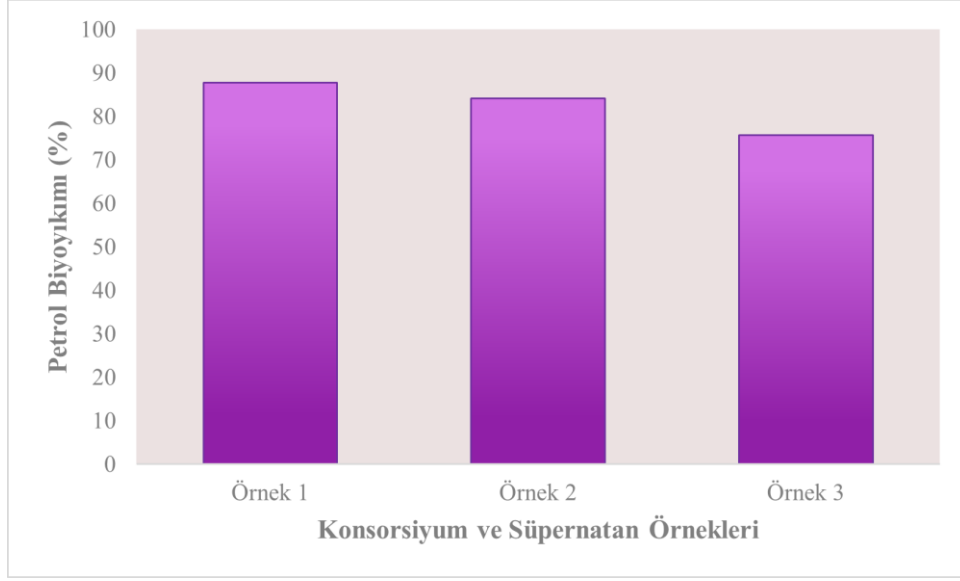


**Şekil 4. 8.** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ve Süpernatantına Ait Örneklerin GC Analizi ile Kalan Petrol Miktarları

\***Örnek 1** Potent konsorsiyumun optimal koşullarda inkübasyonu sonucunda kalan petrol miktarı.

**Örnek 2** %50 oranında kültür süpernatantının, 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla 84 saat inkübasyonu sonucunda kalan petrol miktarı.

**Örnek 3** %30 oranında kültür süpernatantının, 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla 60 saat inkübasyonun sonucunda kalan petrol miktarı.



**Şekil 4. 9.** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan Oluşan Konsorsiyum ve Süpernatantına Ait Örneklerin Petrol Biyoyıkımının GC Analizi Sonuçları

\***Örnek 1** Potent konsorsiyumun optimal koşullarda inkübasyonu sonucunda petrol biyoyıkım yüzdesi.

**Örnek 2** %50 oranında kültür süpernatantının, 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla 84 saat inkübasyonu sonucunda petrol biyoyıkım yüzdesi.

**Örnek 3** %30 oranında kültür süpernatantının, 25°C'de 150 rpm çalkalama hızıyla 60 saat inkübasyonun sonucunda petrol biyoyıkım yüzdesi.

## 5.YORUM

Petrol hidrokarbonları, en yaygın görülen çevre kirleticileri arasındadır. Petrol, arama, çıkarma, taşıma gibi faaliyetler sırasında karasal ve sucul ekosistemlere karışarak ortamda bulunan canlılar için büyük tehlike oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak petrol kirliliğinin iyileştirilmesi ve engellenmesi oldukça önemlidir.

Petrol kirliliği, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler ile temizlenebilmektedir. Biyolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha az maliyetli ve çevre dostu olmasıyla en çok uygulanan yöntemlerdir. Biyolojik yöntemlerden olan biyoyıkım, mikroorganizmalar ile yerinde (in-situ) olarak petrol hidrokarbonlarının daha az zararlı veya zararlı olmayan bileşiklere parçalanmasıdır. Kirliliğin olduğu alanlardaki mikroorganizmaların ortama adapte olarak petrol hidrokarbonlarını daha etkili parçalayabildikleri bilinmektedir. Bu sebeple petrol biyoyıkım çalışmalarında genellikle ortamdan izole edilen mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

Çalışmamızda petrol sahasından izole edildiği bilinen *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 mikroorganizmaları ile petrol biyoyıkımları araştırıldı. Söz konusu mikroorganizmalar içerisinde petrol bulunan besiyerine ekimleri yapıp 7 gün 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında DCM ile ekstraksiyonu yapılan petrolün gravimetrik yöntemle biyoyıkımları belirlendi. Petrol biyoyıkımları araştırılan bu sekiz suştan %50'nin üzerinde petrol biyoyıkımı yapabilen *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus tequilensis* NR104919, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 suşları olduğu belirlendi. Bu suşların gram özelliklerine bakıldığında, üç gram pozitif, üç gram negatif bakteri olarak eşit dağıldığı görüldü.

Tek mikroorganizma ile petrol biyoyıkımı yerine oluşturulan konsorsiyumların petrol biyoyıkımında daha etkili olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, oluşturulan konsorsiyumdaki suşların birbirleriyle sinerjistik etkileşim göstermesi ile petrol biyoyıkım verimi artmaktadır. Literatürde, sinerjistik etkileşimin mikroorganizmaların farklı hidrokarbonları parçalayabilmesiyle aralarında rekabet oluşmaması ve elde edilen

ara ürünlerin de mikroorganizmaların parçalayabileceği ürünler olması sebebiyle gerçekleştiği açıklanmıştır [178]. Bu sebeple çalışmamızda en yüksek petrol biyoyıkımı yapan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 suşları olduğu belirlendi. Bu seçilen suşlar ile ikili ve üçlü olacak şekilde oluşturulan farklı konsorsiyum grupları ile tek mikroorganizmanın yapabildiği petrol biyoyıkım veriminin artırılması amaçlandı. Bu amaçla ikili konsorsiyum grupları, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Bacillus tequilensis* NR104919, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1; *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, üçlü konsorsiyum grupları, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus axarquiensis* NR115929; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919 şeklinde oluşturuldu. Bu konsorsiyumların gravimetrik yöntemle petrol biyoyıkımları belirlendiğinde %75'in üzerinde petrol biyoyıkımı yapabilen beş konsorsiyum olduğu görüldü. Bu konsorsiyumlar ikili gruplardan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1; *Bacillus tequilensis* NR104919, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, üçlü gruplardan ise *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919; *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Bacillus tequilensis* NR104919 konsorsiyumlarıdır. Çalışmamızın devamında kullanılmak üzere belirlediğimiz *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus axarquiensis* NR115929, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 konsorsiyumunun %88 petrol biyoyıkımı yapabildiği görüldü. Diğer konsorsiyumların da seçtiğimiz konsorsiyuma benzer olarak oldukça yüksek petrol biyoyıkımı yapabilmesiyle araştırılması literatüre katkı sağlayacaktır.

Literatürde en fazla petrol biyoyıkımının gram pozitif ve gram negatif karışık konsorsiyumlarında yapıldığı belirtilmiştir [121]. Bu bağlamda, çalışmamızın devamında kullanılmak üzere seçtiğimiz konsorsiyum iki gram negatif, bir gram pozitif bakteriden oluşmaktadır. Petrol biyoyıkımında yüksek verim görülen diğer dört konsorsiyumdan bir tanesi gram negatif bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1'den oluşan konsorsiyum diğerleri ise gram pozitif ve gram negatif karışık konsorsiyumlarıdır. Gram negatif bakterilerden oluşan konsorsiyumun yüksek petrol biyoyıkımı yapabilmesine karşın en düşük petrol biyoyıkımının gram pozitif *Bacillus tequilensis* NR104919 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929'dan oluşan konsorsiyum olduğu görüldü. Bu suşlar ayrı ayrı oldukça yüksek petrol biyoyıkımı yaparken, birlikte bir konsorsiyum oluşturulduğunda düşen petrol biyoyıkımına bağlı olarak iki *Bacillus* suşu arasında antagonistik etki olduğu değerlendirildi.

Mikroorganizmaların üremesinin çevre koşullarından etkilendiği bilinmektedir. Petrolün farklı ortamlara bulaşmasıyla, yerinde yapılacak biyoremediasyon için çevre koşulları da çeşitlilik göstermektedir. Bu sebeple, petrol biyoyıkımı için kullanılacak mikroorganizmaların farklı pH, sıcaklık gibi koşullara adapte olabilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum için optimal fizyolojik koşullar ve bu fizyolojik koşulların değişmesi ile petrol biyoyıkımının nasıl etkileneceği araştırılmıştır.

Seçtiğimiz konsorsiyum ile yaptığımız fizyolojik koşulların optimizasyon çalışmaları sonucunda, inkübasyon koşullarının petrol biyoyıkımına etkisinin fazla olduğu görüldü. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturulan konsorsiyumun 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen inkübasyonu sonucu %88 petrol biyoyıkımı elde edilirken, statik koşullarda gerçekleştirilen inkübasyonu sonucunda petrol biyoyıkımı %60 olmaktadır. Oksijenin az bulunduğu ortamlarda petrol biyoyıkımı gerçekleşmesi için mikroorganizmaların oksijen ihtiyacını karşılamak amacıyla ortamı havalandırmak ekstra maliyete sebep olmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum ile statik koşullara rağmen %60 petrol biyoyıkımı yapabilmesiyle oldukça avantaj sağlayacaktır.

Petrol, birçok sebeple çevreye yayılmasıyla ortamın pH'sını değiştirmektedir. Petrol ile kirlenmiş toprağın pH 3.0-9.0 aralığında olduğu belirtilmiştir. Buna bağlı olarak, bu geniş pH aralığında petrol biyoyıkımı gerçekleşebilmesi için mikroorganizmaların değişen pH'lara uyum sağlaması gerekmektedir. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum pH 7.0'da maksimum petrol biyoyıkımı yaparken, 4.0-8.0 arasındaki geniş pH aralığında da yüksek petrol biyoyıkımı yapabildiği saptandı. Bu açıdan çeşitli pH'lardaki ortamlarda kullanılabilir.

Petrol biyoyıkımında etkili parametrelerden olan sıcaklık mevsimsel olarak sürekli değişmektedir. Sıcaklıktaki bu düşüş ve yükselişlere adapte olabilecek mikroorganizmalar ile verimli petrol biyoyıkımı gerçekleştirilebilmektedir. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum 20°C'de %50 petrol biyoyıkımı yapabilmektedir. Ayrıca 25-35°C geniş sıcaklık aralığında maksimum petrol biyoyıkımı gerçekleştirmesiyle farklı sıcaklıklardaki ortamlarda kullanılması avantajlı olacaktır.

Petrolün çevrede kaldığı sürece zararlı etkileri devam etmektedir. Bu yüzden kısa bir süre içerisinde müdahale edilmesi oldukça önemlidir. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyum ile yapılan çalışma sonucunda 7 günlük inkübasyon sonunda en yüksek petrol biyoyıkımı elde edildi. İnkübasyon süresi uzadıkça, kolay parçalanabilen petrol hidrokarbonlarının tükenmesiyle geriye kalan ürünlerin toksik etkisi zamanla arttığından mikroorganizmaların aktivitesi azalacaktır. Buna bağlı olarak, artan inkübasyon süresiyle petrol biyoyıkımında artış görülmedi.

Mikroorganizmalar ile yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarında, ortam koşullarının mikroorganizmaların üremesine olan etkisiyle petrol biyoyıkımı da etkilemektedir. Bu sebeple, mikroorganizmalar yerine kültür süpernatanı ile daha kısa sürede verimli petrol biyoyıkımı elde etmek için araştırmalar yapılmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyuma ait süpernatanı ile %10-50 arasında süpernatan konsantrasyonlarında 12-84 saat aralığında inkübasyona bırakarak petrol biyoyıkımları araştırıldı. Yapılan çalışma sonucu maksimum petrol biyoyıkımının %50 süpernatan



konsantrasyonda 84 saat sonunda ulaşıldığı belirlendi. Artan kültür süpernatanı konsantrasyonu ile petrol biyoyıkımında önemli bir artış olmadığı saptandı. Buna bağlı olarak, %20 süpernatan konsantrasyonun dahi etkili petrol biyoyıkımı yaptığı görüldü. 84 saat sonunda ulaşılan %20 ve üzeri süpernatan konsantrasyonları ile 36 saat sonunda görülen aynı süpernatan konsantrasyonlarındaki petrol biyoyıkımı karşılaştırıldığında çok düşük bir fark olduğu görüldü. 60 saat sonunda %30 süpernatan konsantrasyonunda görülen petrol biyoyıkımı ile mikroorganizmalar ile 7 gün sonunda elde ettiğimiz petrol biyoyıkımı veriminin benzer olduğu görüldü. Bu bağlamda, benzer petrol biyoyıkım verimini kültür süpernatanı ile daha kısa sürede yapılmasıyla mikroorganizmalar yerine kullanılmasının daha avantajlı olduğu belirlendi. Kültür süpernatanı ile yapılacak ileriki çalışmalarda içerisindeki enzimlerin saflaştırılmasıyla petrol biyoyıkımının artacağı düşünülmektedir. Ayrıca immobilize hale getirilen enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve çevrenin olumsuz koşullarından daha az etkilendiği bilinmektedir. Süpernatan içerisindeki enzimlerin saflaştırılmasının ardından yapılacak immobilizasyon ile petrol biyoyıkım çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Yüksek verimde petrol biyoyıkımı yapan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR115929 ile oluşturduğumuz konsorsiyumun 25°C'de 150 rpm çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmasının ardından GC analizi ile petrol biyoyıkımı belirlendi. Gravimetrik yöntemle belirlenen petrol biyoyıkımına benzer olarak %87 petrol biyoyıkımı yapabildiği görüldü. Ayrıca bu petrol biyoyıkımına yakın biyoyıkım gerçekleştirilen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR11592'den oluşan konsorsiyumun %50 ve %30 süpernatan konsantrasyonlarının sırasıyla 84 saat ve 36 saat sonundaki petrol biyoyıkımları GC analizi ile belirlendi. Gravimetrik yöntemle %50 süpernatan konsantrasyonunda 84 saat sonunda belirlenen petrol biyoyıkımı %80 iken GC analizi sonucu %84 olduğu belirlendi. %30 süpernatan konsantrasyonunda 36 saat sonunda petrol biyoyıkımı GC analizi sonucunda %75 olarak saptandı. GC analizi sonucunda da kültür süpernatanı ile mikroorganizmalara kıyasla daha kısa sürede benzer petrol biyoyıkımı gerçekleştirildiği belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda, gravimetrik yöntemle ve GC analizi sonucunda mikroorganizmalar ile elde edilen petrol biyoyıkımının mikrobiyal enzimleri içeren

süpernatant ile daha kısa sürede benzer biyoyıkım oranında yapılabileceği belirlendi. İlerideki bu konsorsiyum kullanılarak yapılan petrol biyoyıkım çalışmalarıyla süpernatantın daha konsantre hale getirilmesiyle süpernatandaki enzimlerin saflaştırılıp kullanılması ile petrol biyoyıkımı artacaktır. Ayrıca saflaştırılan mikrobiyal enzimlerin immobilizasyonu ile aktivitesi uzun süreli ve tekrar kullanılabilir olacaktır. Bu bağlamda, kültür süpernatantı ile yapılacak çalışmalar petrol biyoremediasyon yöntemlerine katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pannonibacter phragmitetus* NR\_028009.1 ve *Bacillus axarquiensis* NR11592 ile benzer oranda petrol biyoyıkımı yapabilen konsorsiyumlar da belirlendi. İleride yapılacak çalışmalarda hem bu konsorsiyumlar hem de bu konsorsiyumlardan elde edilecek kültür süpernatantı sayesinde petrol biyoyıkımı konusunda yeni alternatifler oluşturulabilecektir. Bu bağlamda, elde ettiğimiz sonuçlar petrolün sebep olduğu kirliliği verimli bir şekilde iyileştirilmek için yapılacak pek çok çalışmaya katkı sağlayabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., Upasani, V. N., Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 116-124, **2015**.
- [2] Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P., Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102(5), 4111-4116, **2011**.
- [3] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Yüzeydeki Petrol Ürünlerini Temizleme, **2013**.
- [4] Ajona, M., Vasanthi, P., Bioremediation of petroleum contaminated soils–A review. *Materials Today: Proceedings* , 45 , 7117-7122, **2021**.
- [5] Varjani, S. J., Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology* , 223 , 277-286, **2017**.
- [6] Kweon, O., Kim, S. J., Holland, R. D., Chen, H., Kim, D. W., Gao, Y., Cerniglia, C. E., Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of bacteriology*, 193(17), 4326-4337, **2011**.
- [7] Seymour, F. K., Henry, J. A., Assessment and Management of Acute Poisoning by Petroleum Products. *Human & Experimental Toxicology* , 20 (11), 551-562, **2001**.
- [8] Eneh, O. C., A review on petroleum: source, uses, processing, products, and the environment. *Journal of Applied Sciences* , 11 (12), 2084-2091, **2011**.

- [9] U.S. Department of Energy, Environmental benefits of advanced oil and gas exploration and production technology, **1999**.
- [10] D. Høivik, B.E. Moen, K. Mearns and K. Haukelid, Safety Science, 47, 992-1001, **2009**.
- [11] E.R. Shperber, T.N. Bokovikova and D.R. Shperber, Chemistry and Technology of Fuels and Oils, 47(3), 237-241, **2011**.
- [12] Lin, Q., Mendelssohn, I. A., Graham, S. A., Hou, A., Fleeger, J. W., Deis, D. R., Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. Science of the Total Environment, 557, 369-377, **2016**.
- [13] Banerji, S. K., Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors. US Army Engineer Waterways Experiment Station, **1995**.
- [14] Ambaye, T. G., Chebbi, A., Formicola, F., Prasad, S., Gomez, F. H., Franzetti, A., Vaccari, M., Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons, and their reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. Chemosphere , 133572, **2022**.
- [15] Abudu, H., Sai, R., Examining prospects and challenges of Ghana's petroleum industry: A systematic review. Energy Reports, 6, 841-858, **2020**.
- [16] Mihankhah, T., Saeedi, M., Karbassi, A., Contamination and cancer risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban dust from different land-uses in the most populated city of Iran. Ecotoxicology and environmental safety, 187, 109838, **2020**.
- [17] Podlesińska, W., Dąbrowska, H., Amphipods in estuarine and marine quality assessment—a review. Oceanologia, 61(2), 179-196, **2019**.

- [18] Incardona, J. P., Gardner, L. D., Linbo, T. L., Brown, T. L., Esbaugh, A. J., Mager, E. M., Scholz, N. L., Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), E1510-E1518, **2014**.
- [19] Yalçın Erik, N., Petrol tankeri kazaları ve neden olduğu çevre kirliliği. *Mavi Gezegen* (20) , 1-11, **2015**.
- [20] Cazarin, G., Augusto, L. G. D. S., Melo, R. A. M., Doenças hematológicas e situações de risco ambiental: a importância do registro para a vigilância epidemiológica. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 10, 380-390, **2007**.
- [21] Machado, C. F., Exercício prático de avaliação e gerenciamento de riscos: O caso dos trabalhadores expostos ao benzeno no Brasil. OPS, Brasília, **2000**.
- [22] Asimiea, O. A., Sam-Wobo, S. O., The impact of hydrocarbon waste from Brass Oil terminal on the phytoplankton and periphyton communities of the Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 2(5), 729-733, 2011.
- [23] World Health Organization, WHO., Guidelines for drinking-water quality (Vol. 1). World Health Organization, **2004**.
- [24] Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., Hamid, F. S., Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526, **2020**.
- [25] Abdelhafeez, I., El-Tohamy, S., Abdel-Raheem, S., El-Dars, F., A review on green remediation techniques for hydrocarbons and heavy metals contaminated soil. *Current Chemistry Letters*, 11(1), 43-62, 2022.
- [26] Broje, V., Keller, A. A., Improved mechanical oil spill recovery using an optimized geometry for the skimmer surface. *Environmental science & technology*, 40(24), 7914-7918, **2006**.

- [27] Bandura, L., Wozzuk, A., Kołodyńska, D., Franus, W., Application of mineral sorbents for removal of petroleum substances: a review. *Minerals* , 7 (3), 37, **2017**.
- [28] Almutairi, M. S., Determination of total petroleum hydrocarbons (TPHs) in weathered oil contaminated soil. *Environmental Engineering Research*, 27(5), **2022**.
- [29] Cabral, L., Giovanella, P., Pellizzer, E. P., Teramoto, E. H., Kiang, C. H., Sette, L. D., Microbial communities in petroleum-contaminated sites: structure and metabolisms. *Chemosphere*, 286, 131752, **2022**.
- [30] Wahi, R., Chuah, L. A., Choong, T. S. Y., Ngaini, Z., Nourouzi, M. M., Oil removal from aqueous state by natural fibrous sorbent: an overview. *Separation and Purification Technology*, 113, 51-63, **2013**.
- [31] Lim, M. W., Von Lau, E., Poh, P. E., A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—present works and future directions. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 14-45, **2016**.
- [32] Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Wang, J., Peng, B., The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste management*, 72, 138-149, **2018**.
- [33] Saum, L., Jiménez, M. B., Crowley, D., Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil. *International journal of phytoremediation*, 20(1), 54-60, **2018**.
- [34] Cai, D., Yang, X., Wang, S., Chao, Y., Morel, J. L., Qiu, R., Effects of dissolved organic matter derived from forest leaf litter on biodegradation of phenanthrene in aqueous phase. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 516-525, **2017**.
- [35] Adedeji, J. A., Tetteh, E. K., Opoku Amankwa, M., Asante-Sackey, D., Ofori-Frimpong, S., Armah, E. K., Chetty, M., Microbial Bioremediation and Biodegradation of Petroleum Products—A Mini Review. *Applied Sciences* , 12 (23), 12212, **2022**.

- [36] Megharaj, M., Naidu, R., Soil and brownfield bioremediation. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1244-1249, **2017**.
- [37] Azubuike, C. C., Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1-18, **2016**.
- [38] Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Chen, L., Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164, **2016**.
- [39] Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I., Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39, **2015**.
- [40] Molina-Barahona, L., Rodríguez-Vázquez, R., Hernández-Velasco, M., Vega-Jarquín, C., Zapata-Pérez, O., Mendoza-Cantú, A., Albores, A., Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, 27 (2), 165-175, **2004**.
- [41] Hazaimah, M. D., Ahmed, E. S., Bioremediation perspectives and progress in petroleum pollution in the marine environment: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (39), 54238-54259, **2021**.
- [42] Singh, S., Application of bioremediation on solid waste management: a review. *SOLID WASTE MANAGEMENT*, 143, **2014**.
- [43] Coste, A., Micle, V., BÄ, C. S., Study on the in-situ bioremediation techniques applicable for soils contaminated with petroleum products. *ProEnvironment Promediu*, 6(14), **2013**.
- [44] Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Krivoruchko, A. V., Elkin, A. A., Makarov, S. O., Cunningham, C. J., Philp, J. C., Oil spill problems and sustainable response strategies

- through new technologies. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(7), 1201-1219, **2015**.
- [45] Kao, C. M., Chen, C. Y., Chen, S. C., Chien, H. Y., Chen, Y. L., Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. *Chemosphere*, 70(8), 1492-1499, **2008**.
- [46] Patowary, R., Patowary, K., Kalita, M. C., Deka, S., Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 50-60, **2018**.
- [47] Varjani S. J. and Upasani V. N., Characterization of hydrocarbon utilizing *Pseudomonas* strains from crude oil contaminated samples *Int. J. sci. Comput.* 6(2) 120-127, **2012**.
- [48] Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M. and Naidu R., A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria *Appl. Biochem. Biotechnol* 1-30, **2015**.
- [49] Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., Daffonchio, D., Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms. *Trends in biotechnology*, 35(9), 860-870, **2017**.
- [50] Thamer, M., Al-Kubaisi, A. R., Zahraw, Z., Abdullah, H. A., Hindy, I., Abd Khadium, A., Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq, **2013**.
- [51] Thieman W. J., Palladino M. A., *Biyoteknolojiye Giriş (çev: Tekeoğlu M.)*, Palme Yayıncılık, Ankara, **2013**.
- [52] Santos, H. F., Carmo, F. L., Paes, J. E., Rosado, A. S., Peixoto, R. S., Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216 (1), 329-350, **2011**.



- [53] Ahmed, F., & Fakhrudin, A. N. M., A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* , 11 (3), 1-7, **2018**.
- [54] Maletić, S., Dalmacija, B., Rončević, S., Petroleum hydrocarbon biodegradability in soil implications for bioremediation. *Hydrocarbon* , 43, **2013**.
- [55] Ozyurek, S. B., Bilkay, I. S., Determination of petroleum biodegradation by bacteria isolated from drilling fluid, waste mud pit and crude oil. *Turkish Journal of Biochemistry* , 42 (6), 609-616, **2017**.
- [56] Mittal, A., Singh, P., Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills, **2009**.
- [57] Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A., Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), 205-214, **2004**.
- [58] Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M., Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61-67, **2004**.
- [59] Janbandhu, A., Fulekar, M. H., Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of hazardous materials*, 187(1-3), 333-340, **2011**.
- [60] Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T., Rabus, R., Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 138-151, **2016**.
- [61] Widdel, F., Rabus, R., Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259-276, **2001**.
- [62] Patel, A. B., Mahala, K., Jain, K., Madamwar, D., Development of mixed bacterial cultures DAK11 capable for degrading mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresource technology*, 253, 288-296, **2018**.

- [63] Silva, Í. S., dos Santos, E. D. C., de Menezes, C. R., de Faria, A. F., Franciscon, E., Grossman, M., Durrant, L. R., Bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100 (20), 4669-4675, **2009**.
- [64] Balaji, V. and Ebenezer, P., Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation, *Indian Journal of Science and Technology*, 1: 1-8, **2008**.
- [65] Podile, A. R., Prakash, A. P., Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(6), 533-538, **1996**.
- [66] Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., Ahn, Y., Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in microbiology*, 1369, **2016**.
- [67] Margesin, R., Schinner, F., Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83, **2001**.
- [68] Sharma, P., Schiewer, S., Assessment of crude oil biodegradation in arctic seashore sediments: effects of temperature, salinity, and crude oil concentration. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14881-14888, **2016**.
- [69] Brakstad, O. G., Bonaunet, K., Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0–5°C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation*, 17(1), 71-82, **2006**.
- [70] Feitkenhauer, H., Müller, R., Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation*, 14(6), 367-372, **2003**.
- [71] Bewley, R. J., Webb, G., In situ bioremediation of groundwater contaminated with phenols, BTEX and PAHs using nitrate as electron acceptor. *Land Contamination & Reclamation*, 9(4), 335-347, **2001**.

- [72] Foght, J., Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Microbial Physiology*, 15(2-3), 93-120, **2008**.
- [73] Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F., Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of microbiology*, 156(1), 5-14, **1991**.
- [74] Pawar, R. M., The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(3), 291-304, **2015**.
- [75] Koolivand, A., Abtahi, H., Parhamfar, M., Didehdar, M., Saeedi, R., Fahimirad, S., Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. *Journal of Environmental Management*, 248, 109228, **2019**.
- [76] Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., Ma, F., Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71-76, **2018**.
- [77] Grossi, V., Yakimov, M. M., Al Ali, B., Tapilatu, Y., Cuny, P., Goutx, M., Tamburini, C., Hydrostatic pressure affects membrane and storage lipid compositions of the piezotolerant hydrocarbon-degrading *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain, 5. *Environmental microbiology*, 12(7), 2020-2033, **2010**.
- [78] Heald, S. C., Brandão, P. F., Hardicre, R., Bull, A. T., Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80 (2), 169-183, **2001**.
- [79] Abdel-Aziz, S. M., Gupta, V. K., Sukmawati, D., Fadel, M. 7 Role of nutrient in microbial developments and microbial metabolic diversity, **2016**.

- [80] Varjani, S. J., Upasani, V. N., A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83, **2017**.
- [81] Thapa, B., Kc, A. K., Ghimire, A., A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu university journal of science, engineering and technology*, 8(1), 164-170, **2012**.
- [82] Minai-Tehrani, D., Minoui, S., Herfatmanesh, A., Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82(2), 179-184, **2009**.
- [83] Qin, J., Lin, C., Almebayedh, H., Albader, M., Decomposition of long-chain petroleum hydrocarbons by Fenton-like processes: effects of ferrous iron source, salinity and temperature. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 764-769, **2019**.
- [84] Vieira, P. A., Vieira, R. B., De França, F. P., Cardoso, V. L., Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1-2), 52-59, **2007**.
- [85] Stepanova, A. Y., Gladkov, E. A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V., Tereshonok, D. V., Bioremediation of soil from petroleum contamination. *Processes*, 10(6), 1224, **2022**.
- [86] Mohammadi, L., Rahdar, A., Bazrafshan, E., Dahmardeh, H., Susan, M., Hasan, A. B., Kyzas, G. Z., Petroleum hydrocarbon removal from wastewaters: a review. *Processes*, 8(4), 447, **2020**.
- [87] Guo, L. G., Liang, S. K., Lu, J. R., Yang, S. M., Su, R. G., Chen, Y., Evaluation on biodegradability of hydrocarbon biomarkers in two crude oils under laboratory conditions. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 31(8), 1897-1903, **2010**.
- [88] Morgan, P., Watkinson, R. J., Biodegradation of components of petroleum. In *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 1-31). Springer, Dordrecht, **1994**.

- [89] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Alifatik Hidrokarbonlar, **2012**.
- [90] Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource technology*, 99(13), 5296-5308, **2008**.
- [91] Costa, A. S., Romão, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski Jr, A., Alexandre, M. D. R., Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, 105, 31-39, **2012**.
- [92] Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology*, 63(2), 417-431, **2013**.
- [93] Keith, L., Telliard, W., ES&T special report: priority pollutants: Ia perspective view. *Environmental science & technology*, 13(4), 416-423, **1979**.
- [94] Barton, L. L., Fauque, G. D., Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate reducing bacteria. *Advances in applied microbiology* , 68 , 41-98, **2009**.
- [95] Perelo, L. W., In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 81-89, **2010**.
- [96] He, L., Lin, F., Li, X., Sui, H., Xu, Z., Interfacial sciences in unconventional petroleum production: from fundamentals to applications. *Chemical Society Reviews*, 44(15), 5446-5494, **2015**.
- [97] Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., Lal, B., Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), 1675-1681, **2001**.

- [98] Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., Brown, R. J., A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80, **2013**.
- [99] Sihag, S., Pathak, H., Jaroli, D. P., Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(3), 185-202, **2014**.
- [100] Chinenyeze, M. A. J., Ekene, U. R., Physical and chemical properties of crude oils and their geologic significances. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(6), 1514-1521, **2017**.
- [101] Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri ed. Prof. Dr. Osman Şadi Yenen. Nobel tıp Kitabevi, **2015**.
- [102] Kırac E., Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, **2011**.
- [103] Cho, J. H., Rathnasingh, C., Song, H., Chung, B. W., Lee, H. J., Seung, D., Fermentation and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* on the production of 2, 3-butanediol. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(7), 1081-1088, **2012**.
- [104] Bilen Ozyurek, S., Seyis Bilkay, I., Biodegradation of petroleum by *Klebsiella pneumoniae* isolated from drilling fluid. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(10), 2107-2116, **2018**.
- [105] Liu, F., Fang, B., Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(3), 374-380, **2007**.
- [106] Sun, Y. Q., Shen, J. T., Yan, L., Zhou, J. J., Jiang, L. L., Chen, Y., Xiu, Z. L., Advances in bioconversion of glycerol to 1, 3-propanediol: prospects and challenges. *Process Biochemistry*, 71, 134-146, **2018**.

- [107] Jung, S. G., Jang, J. H., Kim, A. Y., Lim, M. C., Kim, B., Lee, J., Kim, Y. R., Removal of pathogenic factors from 2, 3-butanediol-producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related wabG gene. Applied microbiology and biotechnology, 97(5), **2013**.
- [108] Johnson, P.A., Bebington, G.B., Landa, A.S.M., Anthony, S. ve Mckay, V.A., Deodorant products. US patent no. 6: 490, **2003**.
- [109] Erdem B., Mikrobiyal Sideroforlar ve Biyoteknolojideki Uygulama Alanları, Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Sciences 3(8):77-88, **2013**.
- [110] Awais, M., Shah, A. A., Hameed, A., Hasan, F., Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp. Pakistan Journal of Botany, 39(4), 1303, **2007**.
- [111] Hanlon, G. W., Hodges, N. A., Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. Journal of Bacteriology, 147(2), 427-431, **1981**.
- [112] Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K., Murugan, K., Rajasekar, A., Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. Frontiers in microbiology, 8, 193, **2017**.
- [113] Palomba, R., Formisano, G., Arrichiello, A., Auriemma, G., Sarubbi, F., Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. Food chemistry, 221, 1637-1641, **2017**.
- [114] Saranya, P., Sukanya Kumari, H., Prasad Rao, B., Sekaran, G., Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. Environmental science and pollution research, 21(5), 3907-3919, **2014**.

- [115] Agrahari, S., Wadhwa, N., Isolation and characterization of feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site. *Applied biochemistry and microbiology*, 48(2), 175-181, **2012**.
- [116] Rosovitz, M., Voskuil, M., Chambliss, G., *Bacillus*. *Systematic bacteriology*, **1998**.
- [117] 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**.
- [118] Lan, G., Li, G., Hong, X., Chen, C., Yan, J., Liang, Q., DU, G., Bio-Removal of Cr (VI) From Aqueous Solution By *Bacillus* EW1 Isolated From Electroplated Industrial Wastewater. *FEB-FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 3970, **2017**.
- [119] Borsodi, A. K., Micsinai, A., Kovacs, G., Toth, E., Schumann, P., Kovacs, A. L., Marialigeti, K., *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2), 555-561, **2003**.
- [120] <https://bacdiv.dsmz.de/strain/13692>
- [121] Bilen Ozyurek, S., Seyis Bilkay, I., Comparison of petroleum biodegradation efficiencies of three different bacterial consortia determined in petroleum-contaminated waste mud pit. *SN Applied Sciences*, 2(2), 1-12, **2020**.
- [122] Wang, Y., Peng, B., Yang, Z., Tang, C., Chen, Y., Liao, Q., Liao, Y., Treatment of Cr (VI) contaminated water with *Pannonibacter phragmitetus* BB. *Environmental Earth Sciences*, 71(10), 4333-4339, **2014**.
- [123] Yılmaz, E. S., Ömeroğlu, E. E., Karaboz, İ., Arsenic Methylating Microorganisms in Waters, Health Threatening Features and Biotechnological Importance. *International Journal of Environmental Trends (IJENT)*, 2(2), 96-105, **2018**.



- [124] Avcioglu, N. H., Bilkay, I. S., Microbial Removal of Cyanide Compounds and Soil Cyanide by *Klebsiella oxytoca*, **2017**.
- [125] Strong, P. J., Burgess, J. E., Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. *Bioremediation journal*, 12(2), 70-87, **2008**.
- [126] Y. Wang, C. C. Shen, Z. Y. Shen, D. Zhang and J. Crittenden, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 17(7), 1340–1347, **2015**.
- [127] Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R., Hossain, M. E., A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of environmental management*, 113, 213-227, **2012**.
- [128] Borah, D., Yadav, R. N. S., Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 181-188, **2017**.
- [129] Jabbar, N. M., Alardhi, S. M., Mohammed, A. K., Salih, I. K., Albayati, T. M., Challenges in the implementation of bioremediation processes in petroleum-contaminated soils: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 18, 100694, **2022**.
- [130] Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., Throne-Holst, M., Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1209-1221, **2007**.
- [131] Koolivand, A., Abtahi, H., Parhamfar, M., Saeedi, R., Coulon, F., Kumar, V., Bagheri, F., The effect of petroleum hydrocarbons concentration on competition between oil-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms in petroleum sludge bioremediation. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102319, **2022**.
- [132] Bilen Ozyurek, S., Avcioglu, N. H., Comparison of the petroleum removal efficiencies and plasmid profiles of clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae* strains. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(10), 9791-9800, **2022**.

- [133] Cui, J., Chen, H., Sun, M., Wen, J., Comparison of bacterial community structure and function under different petroleum hydrocarbon degradation conditions. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43(2), 303-313, **2020**.
- [134] Al-Dossary, M. A., Abood, S. A., Al-Saad, H. T., Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. *Remediation Journal*, 30(4), 17-25, **2020**.
- [135] Ozyurek, S. B., Avcioglu, N. H., The role of *Aspergillus parasiticus* NRRL: 3386 strain on petroleum biodegradation and biosorption processes. *European Journal of Biology*, 79(2), 144-150, **2020**.
- [136] Shi, K., Xue, J., Xiao, X., Qiao, Y., Wu, Y., Gao, Y., Mechanism of degrading petroleum hydrocarbons by compound marine petroleum-degrading bacteria: surface adsorption, cell uptake, and biodegradation. *Energy & Fuels*, 33(11), 11373-11379, **2019**.
- [137] Koolivand, A., Abtahi, H., Parhamfar, M., Didehdar, M., Saeedi, R., Fahimirad, S., Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. *Journal of Environmental Management*, 248, 109228, **2019**.
- [138] Prakash, A., Bisht, S., Singh, J., Teotia, P., Ritu, K. E. L. A., Kumar, V., Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. *Turkish journal of Engineering and Environmental sciences*, 38(1), 41-50, **2014**.
- [139] Zhou, Y., Jiang, T., Hu, S., Wang, M., Ming, D., Chen, S., Genomic insights of *Pannonibacter phragmitetus* strain 31801 isolated from a patient with a liver abscess. *Microbiologyopen*, 6(6), e00515, **2017**.

- [140] Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., Nishigaki, I., Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3), 182-189, **2015**.
- [141] Rathi, V., Yadav, V., Oil degradation taking microbial help and bioremediation: a review. *J Bioremed Biodegr*, 10, 460, **2019**.
- [142] Mehetre, G. T., Dastager, S. G., Dharne, M. S., Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of The Total Environment*, 679, 52-60, **2019**.
- [143] Gojgic-Cvijovic, G. D., Milic, J. S., Solevic, T. M., Beskoski, V. P., Ilic, M. V., Djokic, L. S., Vrvic, M. M., Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation*, 23(1), 1-14, **2012**.
- [144] Shen, T., Pi, Y., Bao, M., Xu, N., Li, Y., Lu, J., Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(12), **2015**.
- [145] Geng, S., Cao, W., Yuan, J., Wang, Y., Guo, Y., Ding, A., Dou, J., Microbial diversity and co-occurrence patterns in deep soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110931, **2020**.
- [146] Patel, V., Jain, S., Madamwar, D., Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresource technology*, 107, 122-130, **2012**.
- [147] Rousk, J., Brookes, P. C., Bååth, E., Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1589-1596, **2009**.
- [148] Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B., Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and

- survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 359-362, **1998**.
- [149] Mohd Kami, N. A. F., Tao, W., Hamzah, N., Establishing the order of importance factor based on optimization of conditions in PAHs biodegradation. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1-15, **2020**.
- [150] Omrani, R., Spini, G., Puglisi, E., Saidane, D., Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. *Biodegradation*, 29(2), 187-209, **2018**.
- [151] Boll, M., Fuchs, G., Heider, J., Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current opinion in chemical biology*, 6(5), 604-611, **2002**.
- [152] Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, P. C., Weyrauch, P., Himmelberg, A. M., Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 92-118, **2016**.
- [153] Annweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H. H., Michaelis, W., Meckenstock, R. U., Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5329-5333, **2000**.
- [154] Davidova, I. A., Marks, C. R., Suflita, J. M., Anaerobic hydrocarbon-degrading *Deltaproteobacteria*. *Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes*, 207-243, **2019**.
- [155] Moussa, L. A., Azeiz, A. Z. A., Hassanien, S. E., Microbial biodegradation of crude petroleum oil as affected by salinity. *Environ. Sci*, 12(1), 545-558, **2017**.
- [156] Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A. K., Choi, M. M., Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122, 140-148, **2014**.

- [157] Khan, S. R., Nirmal, J. I., Kumar, R. N., Patel, J. G., Biodegradation of kerosene: Study of growth optimization and metabolic fate of *P. janthinellum* SDX7. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 397-406, **2015**.
- [158] Sharma, S.L. Pant, A., Crude oil degradation by marine actinomycete *Rhodococcus* sp. *Indian Journal of Marine Sciences* 30: 146-150, **2001**.
- [159] Fritsche, W., Hofrichter, M., Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology set*, 144-167, **2001**.
- [160] Naseri, M., Barabadi, A., Barabady, J., Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(19), 11250-11265, **2014**.
- [161] Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment international*, 37(8), 1362-1375, **2011**.
- [162] Das, N., Chandran, P., Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, **2011**.
- [163] Atlas, R. M., Effects of hydrocarbons on microorganisms and petroleum biodegradation in arctic ecosystems. *Petroleum effects in the arctic environment*, 63-100, **1985**.
- [164] Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., Hijri, M., Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 48-57, **2017**.
- [165] Amran, R. H., Jamal, M. T., Pugazhendi, A., Al-Harbi, M., Ghandourah, M., Al-Otaibi, A., Haque, M. F., Biodegradation and Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems by Microorganisms: A Review. *Nature Environment & Pollution Technology*, 21(3), **2022**.

- [166] Nrior, R. R., Odokuma, L. O., Tete, E., Ultimate biodegradation of industrial detergent used in the upstream sector of the Nigeria petroleum industry in freshwater, brackish and marine water. *International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology*, 2(4), 134-144, **2017**.
- [167] Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I., Okuyama, H., Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 40-43, **2007**.
- [168] Varjani, S. J., Upasani, V. N., Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology*, 222, 195-201, **2016**.
- [169] Sayed, K., Baloo, L., Kutty, S. R. B., Al Madhoun, W., Kankia, M. U., Jagaba, A. H., Singa, P. K., Optimization of palm oil mill effluent final discharge as biostimulant for biodegradation of tapis light crude petroleum oil in seawater. *Journal of Sea Research*, 188, 102268, **2022**.
- [170] Al-Dossary, M. A., Abood, S. A., Al-Saad, H. T., Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. *Remediation Journal*, 30(4), 17-25, **2020**.
- [171] Al-Hawash, A. B., Alkooranee, J. T., Zhang, X., Ma, F., Fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Pure App Biosci*, 6(2), 8-24, **2018**.
- [172] Parthipan, P., Elumalai, P., Sathishkumar, K., Sabarinathan, D., Murugan, K., Benelli, G., Rajasekar, A., Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *3 Biotech*, 7(5), 1-17, **2017**.
- [173] Mishra, S., Singh, S. N., Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresource Technology*, 111, 148-154, **2012**.

- [174] Kaplan, T., The role of horizontal gene transfer in antibiotic resistance. *Eukaryon*, 10, 80-81, **2014**.
- [175] Kadri, T., Magdouli, S., Rouissi, T., Brar, S. K., Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 279-287, **2018**.
- [176] Miri, S., Davoodi, S. M., Brar, S. K., Rouissi, T., Sheng, Y., Martel, R., Psychrozymes as novel tools to biodegrade p-xylene and potential use for contaminated groundwater in the cold climate. *Bioresource Technology*, 321, 124464, **2021**.
- [177] Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9, **2013**.
- [178] Macaulay, B. M., Understanding the behaviour of oil-degrading micro-organisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum. *Applied ecology and environmental research*, 13(1), 247-262, **2015**.