

**T.C.**  
**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANA BİLİM DALI**

**HAM PETROL İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDAN PETROL PARÇALAYAN  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
PETROL BOZUNMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS**

**SABİNA TAGHIYEVA**

**Haziran 2026**  
**GÜMÜŞHANE**



**T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANA BİLİM DALI**

**HAM PETROL İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDAN PETROL PARÇALAYAN  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
PETROL BOZUNMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

**ISOLATION OF OIL DEGRADING BACTERIA FROM OIL  
CONTAMINATED SOILS THEIR MOLECULAR CHARACTERISATION AND  
DETERMINATION OF THEIR OIL DEGRADATION POTENTIALS**

**YÜKSEK LİSANS**

**SABİNA TAGHIYEVA**

**Haziran 2026  
GÜMÜŞHANE**



**GÜMÜŞHANE  
ÜNİVERSİTESİ**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**T.C.**

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANA BİLİM DALI**

**HAM PETROL İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDAN PETROL PARÇALAYAN  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
PETROL BOZUNMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

**ISOLATION OF OIL DEGRADING BACTERIA FROM OIL  
CONTAMINATED SOILS THEIR MOLECULAR CHARACTERISATION AND  
DETERMINATION OF THEIR OIL DEGRADATION POTENTIALS**

**YÜKSEK LİSANS**

**SABİNA TAGHIYEVA**

**DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ İMDAT AYGÜL**

**Haziran 2026  
GÜMÜŞHANE**

## KABUL VE ONAY

**Dr. Öğr. Üyesi İmdat AYGÜL** danışmanlığında, **Sabina TAGHIYEVA** tarafından hazırlanan “**Ham Petrol ile Kirlenmiş Topraklardan Petrol Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu Moleküler Karakterizasyonu ve Petrol Bozunma Potansiyellerinin Belirlenmesi**” isimli bu çalışma, 25/06/2026 tarihinde yapılan lisansüstü tez savunma sınavı sonucunda **Oy Birliği** ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.....  
**Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif ÖMEROĞLU (Başkan)**

.....  
**Dr. Öğr. Üyesi İmdat AYGÜL (Danışman)**

.....  
**Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI (2. Danışman)**

.....  
**Prof. Dr. Çiğdem Saydam EKER (Üye)**

.....  
**Dr. Öğr. Üyesi Tuba Eda ARPA ZEMZEMOĞLU (Üye)**

Lisansüstü tez savunma sınavında başarılı bulunarak kabul edilen bu tezin ciltlenmiş hali, ..... /..... /..... tarihli ve ..... / ..... sayılı Enstitü Yönetim Kurulu toplantısında görüşülmüş ve tez yazım kılavuzuna uygun bulunarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Duygu ÖZDEŞ**  
Enstitü Müdürü

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI**

**Yüksek Lisans Tezi** olarak hazırlamış olduğum “**Ham Petrol ile Kirlenmiş Topraklardan Petrol Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu Moleküler Karakterizasyonu ve Petrol Bozunma Potansiyellerinin Belirlenmesi**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, danışmanımın sorumluluğunda hazırladığımı, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

**25/06/2026**

.....

**Sabina TAGHİYEVA**

## TEŞEKKÜR

Ders aşamasından ve tez çalışma konumun belirlenmesinden yazılmasına kadar geçen tüm süreçlerde bilgi birikimi ve deneyimlerinden çok istifade ettiğim Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü ve Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi tez danışmanı hocam Dr. Öğr. Üyesi Sayın İmdat AYGÜL'e desteklerinden, ilgi alaka, güler yüzlü yaklaşımı ve mütevazı davranışlarından dolayı çok teşekkür ederim.

İkinci danışmanım olarak özellikle laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Fen Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sayın Mustafa Özkan BALTACI'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca ders döneminde aldığım derslerle değerli bilgilerinden yararlandığım Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak bu güne kadar beni yetiştiren, maddi ve manevi olarak her konuda beni destekleyen, eğitim hayatımda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman arkamda hissettiğim çok kıymetli ve saygıdeğer anneciğim Nergiz TAGHİYEVA'ya da çok teşekkür eder sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Sabina TAGHİYEVA**  
**GÜMÜŞHANE-2026**

## ÖZET

Bu çalışma, ham petrol ile kirlenmiş topraklardan petrol parçalayan bakterilerin izolasyonu, moleküler düzeyde karakterizasyonu ve petrol bozunma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Toprak örnekleri, Azerbaycan'dan temin edilerek ham petrol ile kontamine edildikten sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar çalışmalarıyla bakteri izolasyonu prosedürüne uygun çalışmalarla izole edilen bakteriler, morfolojik ve biyokimyasal analizlerin ardından moleküler tanımlama amacıyla DNA izolasyonu ve PCR teknikleri ile incelenmiştir. Ayrıca bakterilerin petrol bozunumu üzerindeki etkileri spektrofotometrik ölçümler ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, ekolojik açıdan sürdürülebilir biyoremediasyon yaklaşımlarında bu bakterilerin potansiyelini ortaya koymaktadır. Çalışmalar neticesinde biyoremediasyon potansiyeline sahip 5 bakterinin saf kültürleri elde edilmiştir. Karakterizasyon sonucu ham petrolü parçalayan mikroorganizmaların, *pseudomonas neustonica*, *bacillus licheniformis*, *corynebacterium stations*, *sphingobactrium soli*, *lysiniabacillus fusiformis* türlerine ait suşlar olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bakteri suşlarının petrol degradasyon etkisini görmek amacıyla GC-MS analizleri yapıldı. Analizler sonucunda örneklerde toplam 10 farklı bileşik elde edilmiştir. Bu bileşikler arasında alifatik alkoller, ketonlar ve kısa zincirli karboksilik asitler yer almaktadır. Elde edilen Kovats indeks değerleri 810-1813 aralığındadır. Bu sonuçların literatürdeki referans değerlerle büyük ölçüde uyumlu olduğu belirlenmiştir. C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> aralığındaki kısa zincirli organik asitlerin mikrobiyal metabolizmaya işaret ettiği anlaşılmıştır. *Pseudomonas neustonica* bakterisinin 99,79'luk benzerlik oranına göre petrol biyodegradasyonunda daha baskın bir rol oynadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteri izolasyonu, Biyoremediasyon, Bozunma, Kirlenmiş toprak, Petrol

## ABSTRACT

This study was conducted to isolate petroleum degrading bacteria from crude oil contaminated soils, characterise them at the molecular level, and determine their petroleum degradation potential. Soil samples were obtained from Azerbaijan, contaminated with crude oil, and then studied. Bacteria isolated using laboratory procedures appropriate for bacterial isolation were examined using DNA isolation and PCR techniques for molecular identification following morphological and biochemical analyses. Furthermore, the effects of the bacteria on petroleum degradation were evaluated using spectrophotometric measurements. The findings reveal the potential of these bacteria in ecologically sustainable bioremediation approaches. As a result of the studies, pure cultures of five bacteria with bioremediation potential were obtained. Characterisation revealed that the microorganisms capable of degrading crude oil belonged to the strains *Pseudomonas neustonica*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium stations*, *Sphingobacterium soli*, and *Lysinibacillus fusiformis*.

GC-MS analyses were performed to observe the petroleum degradation effect of the obtained bacterial strains. As a result of the analyses, a total of 10 different compounds were obtained in the samples. These compounds include aliphatic alcohols, ketones, and short-chain carboxylic acids. The obtained Kovats index values range from 810 to 1813. These results were found to be largely consistent with reference values in the literature. In particular, it was understood that short-chain organic acids in the C<sub>2</sub>–C<sub>5</sub> range indicate microbial metabolism. Based on a similarity ratio of 99.79%, the *Pseudomonas neustonica* bacterium was found to play a more dominant role in petroleum biodegradation.

**Keywords:** Bacterial isolation, Bioremediation, Degradation, Contaminated soil, Petroleum

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                                             | III  |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....                                             | IV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                   | V    |
| ÖZET.....                                                                       | VI   |
| ABSTRACT.....                                                                   | VII  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                | VIII |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                            | X    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                            | XI   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                             | XII  |
| 1. GİRİŞ.....                                                                   | 1    |
| 1.1. Petrolün Önemi ve Kullanım Alanları.....                                   | 1    |
| 1.2. Petrolün Çevreye Zararları.....                                            | 2    |
| 1.3. Petrol Kirliliğine Karşı Alınan Önlemler.....                              | 3    |
| 1.4. Bakterilerin Petrol Parçalanmasındaki Yeri ve Önemi.....                   | 3    |
| 1.5. Biyoremediasyon.....                                                       | 5    |
| 1.6. Petrol Kökenli Hidrokarbonların Mikroorganizmalarla Mineralizasyonu.....   | 5    |
| 1.7. Petrol Hidrokarbonlarının Yapısı ve Çevresel Davranışı.....                | 6    |
| 1.8. Çevresel İzolatlardan Elde Edilen Bakterilerin Önemi.....                  | 7    |
| 1.9. Petrol Parçalayan Bakteriler.....                                          | 7    |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                         | 8    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                      | 10   |
| 3.1. Çalışma Alanı ve Numune Toplama.....                                       | 10   |
| 3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri.....                                 | 11   |
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....                                         | 12   |
| 3.4. Petrol ile Zenginleştirme İşlemi .....                                     | 12   |
| 3.5. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi.....                                         | 13   |
| 3.6. Genomik DNA İzolasyonu.....                                                | 13   |
| 3.7. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....                          | 14   |
| 3.8. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroföresi ile Görüntülenmesi .....          | 15   |
| 3.9. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Analizi için Numune Hazırlığı..... | 15   |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                    | 17   |
| 4.1. Bakteriyel İzolasyon ve Saf Kültürlerin Elde Edilmesi Sonuçları.....       | 17   |

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Spektrofotometrik Büyüme Analiz Sonuçları.....                    | 18 |
| 4.3. PCR Amplifikasyon ve Moleküler Tanımlama Sonuçları.....           | 19 |
| 4.4. GS-MS Analiz Sonuçları.....                                       | 21 |
| 4.5. Çalışmanın Biyoremediasyon Açısından Önemi.....                   | 30 |
| 4.6. Petrol Parçalayan Bakterilerin Çevresel ve Endüstriyel Önemi..... | 30 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....                                           | 31 |
| KAYNAKÇA.....                                                          | 33 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                          | 38 |

## **TABLÖLAR DİZİNİ**

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....                             | 12 |
| Tablo 2. İzolatların büyüme performansları.....                                | 18 |
| Tablo 3. İzolatların moleküler tanımlanmasına ait dizi analizi sonuçları ..... | 20 |
| Tablo 4. GC-MS analiz sonuçları .. .....                                       | 27 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Petrol ve toprak numunesinin alındığı bölge.....          | 10 |
| Şekil 2. Saflaştırılmış bakterilerin görseli.....                  | 17 |
| Şekil 3. İzolatların ölçülen optik yoğunluk (OD600) değerleri..... | 19 |
| Şekil 4. İzolatların 16S rRNA jel elektroforez görüntüsü.....      | 21 |
| Şekil 5. <i>Corynebacterium</i> GC-MS kromatogramı.....            | 22 |
| Şekil 6. <i>Lysinibacillus</i> GC-MS kromatogramı.....             | 23 |
| Şekil 7. <i>Pseudomonas</i> GC-MS kromatogramı.....                | 24 |
| Şekil 8. <i>Bacillus Licheniformis</i> GC-MS kromatogramı.....     | 25 |
| Şekil 9. <i>Sphingobacterium Soli</i> GC-MS kromatogramı.....      | 26 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|       |                                            |
|-------|--------------------------------------------|
| °C    | :Santigrat derece                          |
| %     | :Yüzde                                     |
| DNA   | :Deoksiribonükleik Asit                    |
| g     | :Gram                                      |
| GC-MS | :Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi |
| KI    | :Kovats İndeksi                            |
| mg    | :Miligram                                  |
| mL    | :Mililitre                                 |
| µL    | :Mikrolitre                                |
| nm    | :Nanometre                                 |
| OD    | :Optik Yoğunluk                            |
| OD600 | :600 nm’de ölçülen optik yoğunluk          |
| PCR   | :Polimeraz Zincir Reaksiyonu               |
| rpm   | :Dakikadaki devir sayısı                   |
| RT    | :Retention Time (Alıkonma Zamanı)          |
| TAE   | :Tris-Asetat-EDTA tamponu                  |
| TSA   | :Tryptic Soy Agar                          |
| TSB   | :Tryptic Soy Broth                         |
| UV    | :Ultraviyole                               |
| V     | :Volt                                      |

## 1. GİRİŞ

Petrol, keşfedildiği dönemden itibaren küresel ekonomi üzerinde belirleyici bir rol oynamış ve enerji talebinin en önemli unsurlarından biri haline gelmiştir. Özellikle 20. yüzyıl boyunca petrol kaynaklarına erişim, uluslararası güç dengelerini ve enerji politikalarını şekillendiren temel faktörlerden biri olmuştur. I. ve II. Dünya Savaşları sırasında petrolün askeri lojistik ve sanayinin sürdürülebilirliği açısından stratejik önemi daha belirgin hale gelmiştir (Painter, 2014).

Sanayi Devrimi ile birlikte hız kazanan endüstriyel gelişmeler, üretim alanlarında sağlanan verim artışı ve kentleşmenin kısa sürede büyük ivme kazanması, doğal kaynaklar üzerinde yoğun bir baskı oluşturmuş ve bunun sonucunda önemli çevresel problemler ortaya çıkmıştır. Günümüzde çevresel tahribatın başlıca kaynaklarından biri petrol ve petrol türevleridir. Petrol endüstrisinin dünya genelinde yaygınlaşması; taşıma ve depolama süreçlerinde meydana gelen sızıntılar, tanker atıkları ve işletme sırasında yaşanan kazalar nedeniyle hidrokarbonların çevresel ortamlara karışmasını artırmaktadır (Ceyhan ve Esmeray, 2019).

Araştırmalar, kirliliğin yoğun olduğu kıyı bölgelerinde yaşayan organizmalarda hidrokarbonların yüksek oranlarda biriktiğini göstermektedir. Bununla birlikte, açık denizlerde yaşamını sürdüren canlılarda da petrol türevlerinin ppm ya da ppb düzeylerinde tespit edilebildiği bildirilmektedir. Deniz suyunda çok düşük (ppb) konsantrasyonlarda bulunan hidrokarbonlar, biyolojik birikim (biyoakümülyasyon) süreci sonucunda denizel canlıların dokularında ppm seviyelerine kadar ulaşabilmektedir. Bu durumun temel nedeni, hidrokarbonların besin zinciri boyunca taşınarak organizmalarda artan oranlarda birikmesi, yani biyomagnifikasyona uğramasıdır (Taşkın, 2010).

Bu çalışma, ham petrol ile kirlenmiş olan topraklardan petrol parçalayıcı bakterilerin izole edilmesi, moleküler yöntemlerle karakterize edilmesi ve bu bakterilerin ham petrol bozunma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

### 1.1. Petrolün Önemi ve Kullanım Alanları

1228 yılında Bağdat'ta, neft dolu cam balonların savaş sırasında askeri ihtiyaçları karşılamak amacıyla kullanıldığı kaydedilmiştir (Forbes, 1958). Petrolün stratejik önemini fark eden ilk girişimciler, imparatorlar kadar güçlü, bu alanda kurdukları şirketler ise devletler kadar zengin hale gelmişlerdir (Berreby, 1959).

Enerji, toplumsal yaşamlarımızı sürdürebilmemiz için gerekli olan hemen hemen tüm süreçler için vazgeçilmez bir girdi olup; sanayi, ulaştırma, konut ve ticarethane alt sektörlerinde kullanılmaktadır. Dünya’da enerji üretim rakamları incelendiğinde % 60 ile en büyük payı fosil yakıtların aldığı görülmektedir (Kumbur, 2005).

Petrol, özellikle ulaştırma sektörünün temel enerji kaynağı olarak, dünya birincil enerji tüketimi içinde en büyük paya sahiptir. Petrolü takip eden doğal gaz ve kömür ise büyük ölçüde elektrik üretiminde kullanılmaktadır. 2015 yılı ilk verileri itibariyle petrol, dünya enerji talebinin %32,6’sını, doğal gaz ise %23,7’sini karşılamıştır. Bugüne kadar, çeşitli uluslararası kurum ve kuruluşlar tarafından (Uluslararası Enerji Ajansı, ABD Enerji İdaresi, BP, Exxon Mobil vb.) yapılan çeşitli projeksiyonlara göre, petrol ve doğal gazın birincil enerji tüketimi içindeki payları uzun dönemde de koruyacakları öngörülmektedir (BP, 2016).

## **1.2. Petrolün Çevreye Zararları**

Yirminci yüzyıl boyunca küresel ticaret sisteminin merkezinde yer alan ham petrol ve doğal gaz gibi fosil enerji kaynaklarının açık denizlerde aranması, üretimi ve özellikle deniz yoluyla taşınması, dünya genelinde önemli çevresel sorunların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Günümüzde de uluslararası siyasal ilişkilerin ve silahlı çatışmaların temel belirleyicileri arasında bulunan bu enerji kaynakları, alternatif enerji kaynakları yeterli düzeyde yaygınlaşmıyaya kadar devletler açısından stratejik bir güç unsuru olma özelliğini sürdürecektir.

Petrol ve türevlerinin kullanımı sonucu oluşan çevresel zararların yanı sıra, deniz taşımacılığı sırasında yaşanan büyük ölçekli tanker kazaları ve deniz üstü üretim tesislerinde meydana gelen olaylar, ekosistemler üzerinde kalıcı tahribatlara yol açabilmektedir. Bu tür çevresel felaketlerin tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmamakla birlikte, risklerin azaltılması ve meydana gelen kirliliğin giderilmesine yönelik önleyici ve iyileştirici yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar aralıksız şekilde devam etmektedir. Gemilerden, özellikle de petrol taşıyan tankerlerden kaynaklanan petrol kirliliği genellikle iki temel süreç sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki, sefer sırasında geminin dengesini sağlamak amacıyla alınan balast (safra) suyunun denize boşaltılmasıdır. İkincisi ise yük tankları ile yakıt tanklarının temizlenmesi sırasında oluşan atıkların deniz ortamına karışmasıdır. Ancak bu tür rutin operasyonlardan kaynaklanan kirlilik, tanker kazaları ve petrol platformlarında meydana gelen olaylarla karşılaştırıldığında oldukça sınırlı kalmaktadır. Günümüzde tankerlerin taşıma kapasitelerinin artması, olası kazaların çevresel etkilerini daha da ağırlaştırmakta

ve uygulanan güvenlik önlemlerine rağmen bu tür büyük çaplı deniz kirliliği olayları halen yaşanmaya devam etmektedir.

Günümüzde petrol, en önemli enerji kaynakları arasında yer almakla birlikte, çevre üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler nedeniyle ciddi bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

Petrolün rafinasyon süreci sırasında açığa çıkan gazlar doğrudan atmosfere yayılarak hava kalitesini düşürmekte; üretim, taşıma ve kullanım aşamalarında ise toprak ve su kaynaklarının kirlenmesine neden olmaktadır. Özellikle deniz yoluyla taşınan ham petrolün tankerlerden sızması, su ekosistemlerini olumsuz etkilemekte ve canlıların yaşamını tehdit eden sonuçlar doğurmaktadır. Su ortamına karışan organik ve inorganik maddeler, suyun fiziksel ve kimyasal yapısını bozarak su kirliliğine yol açmaktadır (Doğanay, 1998).

Sosyo-ekonomik kalkınma, politik değişimler, kentleşme süreci, nüfus artışı ve teknolojik ilerlemelerle birlikte enerjiye olan ihtiyaç her geçen gün daha da yükselmektedir. Bu artan talep, yaşam çevresinde çeşitli yapısal ve çevresel dönüşümlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Söz konusu süreçler doğal dengenin bozulmasına yol açmakta ve ekosistem içinde yer alan canlılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. (Doğan, 2011).

### **1.3. Petrol Kirliliğine Karşı Alınan Önlemler**

Petrol kirliliğiyle mücadelede giderek önem kazanan bir diğer yaklaşım ise biyolojik iyileştirme yöntemleridir. Biyoremediasyon olarak adlandırılan bu yöntemde, petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğine sahip mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmakta ve sonuçta daha basit, çevre açısından daha az zararlı bileşikler oluşmaktadır (Atlas ve Hazen, 2011).

Biyoremediasyon uygulamaları doğal veya desteklenmiş biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Doğal biyoremediasyonda ortamda zaten bulunan mikroorganizmaların faaliyetleri izlenirken, desteklenmiş biyoremediasyonda besin elementleri eklenerek veya özel bakteri kültürleri kullanılarak parçalanma süreci hızlandırılmaktadır (Güneş, 2019).

### **1.4. Bakterilerin Petrol Parçalanmasındaki Yeri ve Önemi**

Petrol kirliliği, çevresel sistemlerde uzun süre kalıcılığını koruyabilen ve ekolojik dengeyi çok yönlü biçimde etkileyen önemli bir çevre sorunu olarak

değerlendirilmektedir. Petrolün yapısında bulunan alifatik, aromatik ve kompleks hidrokarbon bileşikler, doğal koşullar altında fiziksel ve kimyasal süreçlerle sınırlı ölçüde parçalanabilmektedir. Bu nedenle petrolün çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılmasında biyolojik süreçler özel bir önem taşımaktadır. Bu biyolojik süreçlerin merkezinde ise bakteriler yer almaktadır (Zobell, 1946).

Petrol parçalanma süreci, bakteriler tarafından gerçekleştirilen çok aşamalı biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte bakteriler tarafından sentezlenen özel enzimler, büyük ve karmaşık hidrokarbon moleküllerini daha küçük ve daha az toksik bileşiklere dönüştürmektedir. Bu dönüşüm, petrolün çevrede kalıcılığını azaltmakta ve kirlenmiş ortamların zamanla doğal dengesine yaklaşmasına katkı sağlamaktadır (Bossert ve Bartha, 1984).

Bakterilerin petrol parçalama yeteneği yalnızca oksijenli ortamlarda sınırlı değildir. Yapılan araştırmalar, oksijenin sınırlı olduğu veya hiç bulunmadığı ortamlarda da bazı bakteri gruplarının hidrokarbonları metabolize edebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, petrol kirliliğinin yalnızca yüzey sularında değil, derin sedimentlerde ve toprak katmanlarında da biyolojik olarak dönüşüme uğrayabileceğini göstermektedir (Lovley vd., 1995).

Denizel ve karasal ekosistemlerde gerçekleştirilen çalışmalar, petrol kirliliği sonrası mikrobiyal topluluk yapısında belirgin değişimler meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Bu süreçte hidrokarbonları parçalayabilen bakterilerin sayısında artış gözlenmekte, mikrobiyal çeşitlilik petrol varlığına bağlı olarak yeniden şekillenmektedir. Bu durum bakterilerin yalnızca kirleticileri azaltmakla kalmadığını, aynı zamanda ekosistemin yeniden yapılandırılmasında da rol oynadığını göstermektedir (Yakimov vd., 2007).

Petrol parçalayabilen bakterilerin çevresel önemi, yalnızca doğal iyileşme süreçleri ile sınırlı değildir. Bu mikroorganizmalar, petrol kirliliğiyle mücadelede geliştirilen biyolojik temelli yöntemlerin de temelini oluşturmaktadır. Bakterilerin kontrollü biçimde kullanılmasıyla gerçekleştirilen biyoremediasyon uygulamaları, günümüzde çevreye zarar vermeden kirliliğin azaltılmasını amaçlayan sürdürülebilir yaklaşımlar arasında değerlendirilmektedir (Margesin ve Schinner, 2001). Bakterilerin petrol parçalanmasındaki önemi yalnızca çevresel temizlik açısından değil, aynı zamanda ekosistem sağlığının yeniden kazanılması bakımından da değerlidir. Petrol kirliliği sonrası bozulan toprak yapısı, mikrobiyal aktivitenin artmasıyla birlikte zamanla biyolojik işlevlerini yeniden kazanmaya başlamaktadır. Bu süreç bitki gelişiminin desteklenmesine, besin zincirinin yeniden kurulmasına ve ekosistem dengesinin kademeli olarak onarılmasına katkı sağlamaktadır (Margesin ve Schinner, 2001).

### 1.5. Biyoremediasyon

Biyoremediasyon, mikroorganizmaların kullanılması yoluyla zararlı maddelerin toksik olmayan bileşiklere dönüştürüldüğü bir arıtma sürecidir ve kimyasal sıvılar ile tehlikeli atıkların giderilmesinde umut vadeden yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu süreçte bakteriler, zararlı atıkları çevre için güvenli yan ürünlere dönüştürdükten sonra ya yaşamlarını sonlandırır ya da doğal popülasyon seviyelerine geri dönerler. Bu sayede ekosistemin dengesi korunmuş olur. Ayrıca, toprakta mevcut olan mikroorganizma türlerinin belirlenmesiyle, toprak rehabilitasyonu için en uygun mikrobiyal bileşim oluşturulabilmektedir. Bazı uygulamalarda ise atıkların parçalanması sırasında görev alan mikroorganizmaların oluşturduğu yan ürünler ekonomik değere sahip olabildiğinden, geri kazanım imkânı da sağlanmaktadır. Anaerobik arıtma teknolojisi bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Organik madde içeriği yüksek atık sulara sahip endüstriyel tesislerde kullanılan bu yöntemde, uygun biyokimyasal koşulların sağlandığı reaktörler tercih edilmektedir. Bu reaktörlerde, anaerobik ortamda faaliyet gösteren metanojen bakteriler organik atıkları parçalayarak kirliliği azaltırken aynı zamanda metan gazı üretir. Elde edilen metan gazı elektrik enerjisine dönüştürülerek işletmeye ek bir enerji kaynağı kazandırılır. Özellikle gıda ve kâğıt sanayi gibi sektörler, bu teknoloji için oldukça elverişlidir (Alexander, 1999).

Ham petrol, organik bileşenler açısından oldukça karmaşık ve bileşimi değişken olan bir karışımdır. Yer kabuğunun derinliklerinde biriken organik maddeler, uzun jeolojik zaman dilimleri boyunca yüksek sıcaklık ve basınç etkisi altında, mikroorganizmaların anaerobik parçalanması sonucunda doğal gaz, sıvı ham petrol, kaya petrolü ve asfalt benzeri maddelere dönüşmektedir. Ham petrolün temel bileşenlerini hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Bu bileşikler arasında metan, alifatik n-alkanlar ile pentan, hekzan ve heptan gibi düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlar; sikloparafinik yapılar; benzen ve toluen gibi tek halkalı aromatikler; naftalin ve fenantren gibi çok halkalı aromatik hidrokarbonlar yer almaktadır. Bunlara ek olarak, kükürt ve azot içeren heterosiklik bileşikler, ağır metaller ile zift ve katran benzeri yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlar da ham petrolün bileşiminde bulunmaktadır (Mrozik, 2003).

### 1.6. Petrol Kökenli Hidrokarbonların Mikroorganizmalarla Mineralizasyonu

*Alkanlar:* Aerobik koşullarda doymuş alifatik fraksiyon, genellikle uç alkan monooksijenazları (AlkB) veya uzun zincir alkan mono-oksijenazları (LadA) ile terminal/ subterminal hidroksilasyona uğrar; alkol → aldehit → yağ asidine oksitlenir ve β-oksidasyon ile asetil-KoA'ya parçalanır (Rojo, 2009; Vanbeilen ve Funhoff, 2007).

*Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* ve *Bacillus* türleri, çoklu alkan hidroksilaz setleriyle geniş zincir aralıklarında aktivite gösterebilir (Head vd., 2006; Rojo, 2009).

*Aromatikler ve PAH'lar*: Monosiklik aromatikler (toluene, xylene vb.) ve PAH'lar (naftalen, fenantren, piren aerobik olarak çoğunlukla halkaya ilk saldırıyı gerçekleştiren ring-hydroxylating dioksijenazlar (RHD) ile cis-dihidrodiol ara ürünlerine oksitlenir; bunu dehidrojenazlar izler ve katekol veya protokatekuat gibi merkezi ara ürünler oluşur (Haritash ve Kaushik, 2009). Sonraki aşamada katekol 1,2-dioksijenaz (ortho-yol) veya katekol 2,3-dioksijenaz (meta-yol) halka kırılmasını katalizler; ürünler asetil-KoA/süksinil-KoA üzerinden TCA döngüsüne girer (Das ve Chandran, 2011; Haritash ve Kaushik, 2009). Naftalen için nah gen kümesi, toluen için tod/tbu, piren/fenantren için çeşitli PAH-RHD kümeleri karakterizedir (Haritash ve Kaushik, 2009; Kimes vd., 2014).

Biyoyararlanım ve yüzey süreçleri. Hidrofobik substratlara erişimde biosürfaktanlar (örn. rhamnolipid, trehalose-lipidler) ve EPS-zengin biyofilmler damlacık arayüzünü stabilize ederek kütle taşınımını artırır; düşük kritik misel konsantrasyonları (CMC) sayesinde petrol fazını emülsifiye ederek hücre-substrat teması sağlar (Das ve Chandran, 2011; Płociniczak vd., 2011). Bu etki özellikle yüksek molekül ağırlıklı PAH'larda hız sınırlayıcı basamağı kısaltır (Haritash ve Kaushik, 2009).

Oksijensiz koşullarda kimyasal aktivasyon farklıdır; alkan ve aromatiklerin ilk adımı çoğu kez fumarata eklenme mekanizmasıyla radikal üretimine dayanır. Benzil süksinat sentaz (BSS; bss/ass/mas genleri) toluen gibi alkil aromatikleri benzilsüksinata dönüştürür; alkanlarda alkil-fumarat oluşur ve ardışık  $\beta$ -oksidasyon benzeri adımlarla asetil-KoA'ya parçalanır (Meckenstock vd., 2016; Widdel ve Rabus, 2001). Elektron alıcıları olarak nitrat/ nitrit, demir(III), sülfat ve karbondioksit (metanojenik konsorsiyumlar) görev yapabilir (Head vd., 2006; Meckenstock vd., 2016). Anaerobik PAH bozunması yavaş olsa da sahadaki anoksik sedimanlarda uzun vadeli kaderi belirleyen ana süreçlerden biridir (Meckenstock vd., 2016).

### **1.7. Petrol Hidrokarbonlarının Yapısı ve Çevresel Davranışı**

Petrol hidrokarbonları; alifatik hidrokarbonlar, aromatik bileşikler, reçineler ve asfaltlenlerden oluşan karmaşık bir karışımdır. Bu bileşenlerin çevredeki kalıcılığı kimyasal yapılarına ve ortam koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Kısa zincirli alifatik hidrokarbonların biyolojik olarak daha hızlı parçalanabildiği, çok halkalı aromatik hidrokarbonların ise çevrede daha uzun süre kalabildiği bildirilmektedir (Atlas, 1981; Das ve Chandran, 2011).

Teknolojik olarak gelişmiş proses algoritmalarının modellenmesi ve işletilmesi için teknoloji geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalara dayanarak, termal kontrol yöntemlerinin faydalılığı ve yüksek maliyeti hakkında sonuçlar çıkarılmıştır.

### **1.8. Çevresel İzolatlardan Elde Edilen Bakterilerin Önemi**

Bacillus türleri gibi termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklık ve pH koşullarında büyüebilme yeteneğine sahip olup, endüstriyel öneme sahip enzimlerin üretiminde büyük rol oynamaktadır. Bu enzimler, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenerek sıcak suyla yapılan temizlikte etkinliği artırmaktadır (Fritze, 1996).

### **1.9. Petrol Parçalayan Bakteriler**

Petrolü parçalayan bakteriler, hidrokarbon bileşiklerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen mikroorganizmalardır. Bu bakteriler, petrolün yapısında bulunan alifatik ve aromatik hidrokarbonları çeşitli enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla daha basit bileşiklere dönüştürerek parçalayabilmektedir. Bu biyolojik süreç, petrol kirliliğinin doğal yollarla azaltılmasında önemli bir mekanizma olup biyoremediasyon uygulamalarının temelini oluşturmaktadır (Atlas, 1981). Petrolle kirlenmiş ortamlarda hidrokarbonları parçalayabilen çok sayıda bakteri cinsi tanımlanmıştır. Bunlar arasında *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* ve *Flavobacterium* cinsleri önemli bir yere sahiptir. Özellikle *Pseudomonas* türleri, geniş hidrokarbon yelpazesini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmeleri, çevresel koşullara kolay uyum sağlamaları ve yüksek biyodegradasyon kapasiteleri nedeniyle petrol kirliliğinin giderilmesine yönelik çalışmalarda sıklıkla araştırılmaktadır (Das ve Chandran, 2011).

Petrol ile kirlenmiş topraklar, hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip çok sayıda mikroorganizmaya doğal yaşam alanı oluşturmaktadır. Bu ortamlardan izole edilen bakteriler, ham petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmeleri sayesinde biyoremediasyon çalışmalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Türkiye'de petrol ile kirlenmiş bölgelerden izole edilen bakteriler üzerinde yapılan araştırmalarda, özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Citrobacter amalonaticus* ve *Acinetobacter* türlerinin ham petrolü parçalama açısından yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Erdoğan vd., 2013).

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2010 yılında meydana gelen Deepwater Horizon petrol sızıntısı, biyoremediasyon potansiyelinin anlaşılmasında kritik bir vaka olmuştur. Bu olaydan sonra yapılan metagenomik analizlerde, deniz ortamında *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter* ve *Colwellia* gibi bakterilerin hızlı şekilde çoğaldığı, alkan ve aromatik hidrokarbonların parçalanmasında etkin rol oynadığı belirlenmiştir (Atlas ve Hazen, 2011; Kimes vd., 2014).

Hindistan'da yapılan pek çok çalışmada, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Rhodococcus* türlerinin alifatik ve aromatik hidrokarbonları parçalayabildiği rapor edilmiştir. Özellikle Gujarat bölgesindeki petrol rafinerisi atıklarından izole edilen bakterilerin, laboratuvar ortamında naftalen ve fenantren gibi PAH'ları %70'in üzerinde mineralize edebildiği gösterilmiştir (Das ve Chandran, 2011).

Avrupa çalışmaları. Rusya ve Doğu Avrupa'da yapılan saha uygulamalarında, petrol ile kontamine olmuş topraklarda biyostimülasyon (N-P gübre takviyesi) ve bioaugmentasyon (özel bakteri konsorsiyumu ekimi) yöntemlerinin kombine edilmesiyle %60–80 oranında hidrokarbon giderimi sağlanmıştır (Meckenstock vd., 2016).

Tuzcul ortamlarda gerçekleşen petrol kirliliklerinde, halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların biyodegradasyon sürecinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. *Halomonas*, *Marinobacter* ve bazı arkeal gruplara ait türlerin, yüksek tuzluluk koşullarında dahi petrol hidrokarbonlarını parçalayabildiği gösterilmiştir (Garcia vd., 2005).

Ayrıca *Bacillus* cinsine ait türlerin, özellikle *Bacillus licheniformis*'in biyosüpfaktan üretimi ve çevresel koşullara dayanıklılığı nedeniyle petrol biyoremediasyonunda etkili olduğu rapor edilmiştir (Bento vd., 2005; Koshlaf ve Ball, 2017).

Petrol kaynaklı hidrokarbonların hidrofobik yapısı, mikroorganizmaların bu bileşiklere erişimini sınırlandırarak biyodegradasyon sürecini zorlaştırabilmektedir. Degradasyon sırasında oluşan ara metabolitlerin ortamda birikmesi ise ana parçalayıcı bakteriler üzerinde baskı oluşturabilmektedir. Bu noktada *Corynebacterium*, *Lysinibacillus* ve *Sphingobacterium* gibi destekleyici bakteriler, ara ürünlerin metabolize edilmesine ve hidrokarbonların biyoyararlanımının artırılmasına katkı sağlayarak mikrobiyal konsorsiyumun etkinliğini artırmaktadır (İcgen ve Yılmaz, 2016).

Petrol ve petrol türevleri ile kirlenmiş topraklardan izole edilen bakteriler üzerine yapılan çalışmalar, hidrokarbon degradasyonunun farklı bakteri türlerinin birlikte oluşturduğu mikrobiyal topluluklar aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Aromatik hidrokarbonlar ve petrol bileşenleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, toprak ortamından izole edilen bakteriler arasında özellikle *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait türlerin öne çıktığı rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, petrol degradasyonunda doğrudan rol oynayan bakterilerin yanı sıra, degradasyon sürecinde oluşan ara ürünlerin metabolizmasına katkı sağlayan destekleyici bakteriyel grupların da önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu bulgular, petrol biyodegradasyonunun tek bir bakteri türü ile sınırlı olmadığını, aksine mikrobiyal konsorsiyumlar aracılığıyla daha etkin bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Dindar, 2014).

Bakteri izolatlarının güvenilir biçimde tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve dizi analizi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yaklaşım, izolatların taksonomik konumlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Clarridge, 2004; Janda ve Abbott, 2007). Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında klasik fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerin yanı sıra moleküler yaklaşımların kullanılması, bakterilerin daha güvenilir ve ayrıntılı şekilde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle 16S rRNA gen dizilemesi, PCR tabanlı yöntemler ve DNA profillemeye teknikleri, laktik asit bakterilerinin tür ve alt tür düzeyinde ayırımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu moleküler yöntemlerin, geleneksel biyokimyasal testlerle birlikte uygulanmasının yanlış tanımlamaların azaltılmasına ve bakteriyel çeşitliliğin daha doğru belirlenmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Temmerman vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada izole edilen 146 izolat, enzimleri açısından taranmış ve iki izolat amilaz üreticisi, 17 izolat ise proteaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. 17 izolat arasından en kısa sürede en iyi alkalin proteaz üreticisi izolat (22 numaralı izolat) belirlenmiş ve *B. clausii* olarak tanımlanmıştır (Bal, 2005).

Yüzeysel kirliliğin etkisini en aza indirmek ve mikrobiyal aktivitenin daha yoğun olduğu katmanları temsil etmek amacıyla, numuneler toprak yüzeyinin yaklaşık 5–10 cm altından alınmıştır. Numune alma işlemi steril spatül yardımıyla gerçekleştirilmiş ve her bir örnek, çapraz bulaşmayı önlemek amacıyla ayrı ayrı toplanmıştır. Alınan toprak örnekleri, hava ile temas etmeyecek şekilde steril ve kapaklı polipropilen numune kaplarına aktarılmıştır. Numuneler, örnekleme işleminin ardından soğuk zincir koşulları altında laboratuvara taşınmış ve deneysel analizler yapılana kadar +4 °C’de muhafaza

edilmiştir. Bu koşullar, örnek içerisindeki doğal mikrobiyal popülasyonun korunması ve mikrobiyal faaliyetlerin kontrol altına alınması amacıyla tercih edilmiştir.

Numuneler laboratuvara ulaştırıldıktan sonra, bakteriyel izolasyon ve diğer deneysel çalışmalar başlatılana kadar aynı koşullarda saklanmıştır. Numune alma, taşıma ve saklama aşamalarında, dış çevreden kaynaklanabilecek kontaminasyonların önlenmesi amacıyla gerekli tüm hijyen ve sterilizasyon önlemleri titizlikle uygulanmıştır. Böylece çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği sağlanmıştır. Alınan toprak örnekleri, hava ile temas etmeyecek şekilde steril ve kapaklı polipropilen numune kaplarına aktarılmıştır. Numuneler, örnekleme işleminin ardından soğuk zincir koşulları altında laboratuvara taşınmış ve deneysel analizler yapılana kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu koşullar, örnek içerisindeki doğal mikrobiyal popülasyonun korunması ve mikrobiyal faaliyetlerin kontrol altına alınması amacıyla tercih edilmiştir.

### **3.2. Kullanılan Kimyasal ve Besiyerleri**

Bu çalışmada petrol ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen bakterilerin zenginleştirilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi ve moleküler analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla çeşitli besiyerleri ve kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar ve besiyerleri, mikrobiyolojik çalışmalar için uygun saflıkta seçilmiş ve deneysel süreç boyunca steril koşullar altında kullanılmıştır.

Bakterilerin çoğaltılması ve genel büyüme özelliklerinin incelenmesi amacıyla Tryptic Soy Broth (TSB) ve Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerlerinden yararlanılmıştır. TSB, bakterilerin sıvı ortamda homojen şekilde çoğalmasını sağladığı için özellikle zenginleştirme aşamasında ve saf kültürlerin çoğaltılmasında tercih edilmiştir. TSA ise katı besiyeri olarak koloni morfolojisinin gözlemlenmesi, çizgi ekim yöntemiyle saf kültürlerin elde edilmesi ve koloni özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Cappuccino ve Welsh, 2017).

Ayrıca PCR ve jel elektroforezi aşamalarında nükleazsız su, agaroz, TAE/TBE tampon çözeltileri, dNTP karışımları, Taq DNA polimeraz, PCR Master Mix ve 16S rRNA genine özgü primerler kullanılmıştır. DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla DNA boyama ajanları (örneğin etidyum bromür veya güvenli alternatif boyalar) tercih edilmiştir. Petrol degradasyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan ölçümlerde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiş ve bu süreçte gerekli tampon çözeltiler ile ekstraksiyon kimyasalları kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001; Weisburg vd., 1991).

Ayrıca petrol bileşenlerinin tanımlanması için yapılan GC-MS analizlerinde, numune hazırlama aşamasında n-heksan ve sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gibi ekstraksiyon ve kurutma amaçlı kimyasallardan yararlanılmıştır. Tüm besiyerleri ve çözeltiler deney öncesinde uygun sıcaklık ve sürelerde sterilize edilmiş; çalışma süresince çapraz kontaminasyonu önlemek amacıyla aseptik tekniklere titizlikle uyulmuştur. Kullanılan kimyasallar ve besiyerleri, çalışmanın güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini sağlamak açısından önemli bir rol oynamıştır (Wang ve Fingas, 2003).

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullandığımız cihaz isimleri ve marka-modelleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

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

### 3.4. Petrol ile Zenginleştirme İşlemi

Toprak örneğinde bulunan potansiyel petrol parçalayıcı mikroorganizmaların aktif hale getirilebilmesi için 1 g toprak ve 1 mL ham petrol, 50 mL TSB içeren erlenlere aseptik koşullarda eklenmiştir. Burada TSB, mikroorganizmaların büyümesini destekleyen bir besiyeridir. Hazırlanan karışımlar çalkalamalı inkübatörde 37 °C

sıcaklıkta ve 150 rpm hızında 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zenginleşen kültürlerden 0.1 mL alınarak TSA besiyerine yayma ekimi yapılmıştır. Yayma ekimi yapılan plaklar tekrar 37 °C’de inkübe edilir. Bu süreç, her bir bakterinin ayrı bir kolonide çoğalmasını sağlar, böylece petrolü parçalayan organizmalar saf bir şekilde elde edilir.

### **3.5. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi**

Petrol ile kontamine örneklerden elde edilen zenginleştirme kültürlerinde bakteri gelişiminin gözlenmesinin ardından, izolatların saflaştırılması amacıyla sıvı besiyerlerinden katı besiyerlerine aktarım yapılmıştır. Bu amaçla, bakteri gelişimi sağlanan Tryptic Soy Broth (TSB) ve Bushnell–Haas Broth (BSB) ortamlarından alınan örnekler, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine aktarılmıştır.

Aktarım işlemleri steril koşullar altında gerçekleştirilmiş ve ekimler, bakterilerin optimum gelişim gösterebileceği sıcaklık olan 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda TSA besiyerinde gelişen koloniler morfolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Morfolojik olarak farklılık gösteren koloniler seçilerek saf kültür elde edilmesi amacıyla ardışık ekim işlemleri uygulanmıştır.

Bu işlemler, tek tip koloni morfolojisi elde edilinceye ve kontaminasyon bulunmadığı doğrulanıncaya kadar tekrarlanmıştır. Elde edilen saf bakteri kültürleri, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar, spektrofotometrik ölçümler, moleküler tanımlama ve biyolojik değerlendirmelerde kullanılmıştır.

### **3.6. Genomik DNA İzolasyonu**

İzolasyon işlemi, üretici firmanın önerdiği basamaklar temel alınarak, ancak çalışmanın özelliklerine uygun şekilde optimize edilmiştir. DNA izolasyonu üç temel aşamadan oluşmuştur: hücre lizisi, protein ve diğer hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması ve DNA’nın safsızlaştırılarak çöktürülmesi. Öncelikle TSB’de 18–24 saat inkübe edilmiş saf kültürlerden 1 mL alınmış ve 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra pelet, kitin sağladığı Cell Lysis Solution ile iyice süspanse edilmiştir. Bu aşamada hücre duvarının parçalanması ve DNA’nın ortama serbest bırakılması için tüpler 65 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Lizis sonrası örnekler oda sıcaklığına getirilmiş ve hücresel proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla Protein Precipitation Solution eklenmiştir. Çözelti hızla vortekslenmiş ve yeniden

santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan yoğun protein çökeltisi tüpün dibinde toplanmış, üstte kalan berrak DNA içeren süpernatant yeni bir tüpe dikkatlice alınmıştır.

DNA'nın çöktürülmesi için süpernatanta soğuk izopropanol eklenmiş ve tüpler hafifçe ters çevrilerek karıştırılmıştır. Oluşan DNA flokülleri 4 °C'de kısa süre bekletilmiş ve ardından tekrar santrifüj edilerek DNA peleti elde edilmiştir. Pelet, kalan tuz ve safsızlıklardan arındırılması için %70'lik etanol ile yıkanmış, kurutulduktan sonra kitin sağladığı DNA Rehydration Solution ile çözündürülmüştür. Elde edilen genomik DNA oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra homojen yapı kazanıncaya kadar hafifçe karıştırılmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

İzolasyon sonrası DNA'nın saflık ve konsantrasyon değerleri spektrofotometre ile A260/A280 oranı temel alınarak belirlenmiştir. Oranın 1.8–2.0 aralığında olması, elde edilen DNA'nın protein ve organik çözücü kalıntılarından büyük ölçüde arındırıldığını göstermiştir. Kaliteli DNA örnekleri, çalışmanın devamında PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır.

### **3.7. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması**

Bakteriyel izolatların moleküler düzeyde tanımlanabilmesi amacıyla 16S rRNA gen bölgesi PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. 16S rRNA geninin bakteriler arasında yüksek derecede korunmuş olması, bu bölgenin filogenetik analizler ve tür tanımlaması açısından yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır (Sambrook ve Russell, 2001; Weisburg vd., 1991).

PCR reaksiyonları her bir örnek için 30 µL toplam hacimde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; steril nükleazsız su, 10X PCR tamponu, MgCl<sub>2</sub>, dNTP karışımı, evrensel primerler (27F ve 1492R), Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA içerecek şekilde düzenlenmiştir. Evrensel primerler, bakteriyel 16S rRNA geninin korunmuş bölgelerini hedef alacak şekilde seçilmiştir. Hazırlanan PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır:

Ön denatürasyon 94°C'de 2 dakika, ardından 36 döngü olacak şekilde; denatürasyon 94°C'de 1 dakika, primer bağlanması 52°C'de 1 dakika, uzama basamağı ise 72°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Döngülerin tamamlanmasının ardından son uzama basamağı 72°C'de 5 dakika uygulanarak PCR işlemi sonlandırılmıştır.

PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünler, analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır: ön denatürasyon 94°C'de 2 dakika, ardından 36 döngü olacak şekilde; denatürasyon 94°C'de 1 dakika, primer bağlanması

52°C’de 1 dakika, uzama basamağı ise 72°C’de 2 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Döngülerin tamamlanmasının ardından son uzama basamağı 72°C’de 5 dakika uygulanarak PCR işlemi sonlandırılmıştır. PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünler, analiz edilinceye kadar –20°C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi**

PCR amplifikasyonunun doğrulanması amacıyla PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu amaçla %1 oranında agaroz jel hazırlanmış ve jel 1X TAE tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Jel içerisine DNA’nın görüntülenmesini sağlamak amacıyla uygun bir DNA boyası eklenmiştir (Sambrook ve Russell, 2001; Weisburg vd., 1991).

Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilmiş, PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırılarak jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez işlemi yaklaşık 90 V gerilim altında yürütülmüş ve bantların ayrılması sağlanmıştır. Elektroforez sonrası DNA bantları UV transillüminatör altında görüntülenmiş ve uygun büyüklükteki bantların varlığı kontrol edilmiştir.

### **3.9. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Analizi için Numune Hazırlığı**

Bu çalışmada, izole edilen bakterilerin ham petrol degradasyon potansiyelinin belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi–kütle spektrometrisi (GC-MS) analizleri gerçekleştirilmiştir (Wang ve Fingas, 2003). GC-MS analizleri için, petrol ile zenginleştirilmiş sıvı kültür ortamlarında inkübe edilen bakteriyel örnekler kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler santrifüj edilerek hücresel biyokütle ortamdan uzaklaştırılmış ve süpernatant kısmı analiz için ayrılmıştır. Bakteriyel hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla, petrol kökenli bileşiklerin daha net bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan örnekler, petrol bileşenlerinin tür ve dağılımlarının belirlenmesi amacıyla GC-MS analizleri için ilgili laboratuvara gönderilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları kullanılarak, örneklerde bulunan hidrokarbon bileşenleri tanımlanmış ve petrol degradasyonu sırasında meydana gelen değişimler değerlendirilmiştir. GC-MS analizleri, bakterilerin petrol kökenli bileşikleri parçalaması sonucu ortaya çıkan ara ürünlerin ve kalan hidrokarbon fraksiyonlarının belirlenmesi açısından kullanılmıştır. Bu analizler sayesinde bakterilerin ham petrol üzerindeki biyodegradasyon etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Petrol degradasyon potansiyelinin belirlenmesi amacıyla seçilen bakteriyel izolatlar, sıvı besiyerinde ham petrol varlığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda

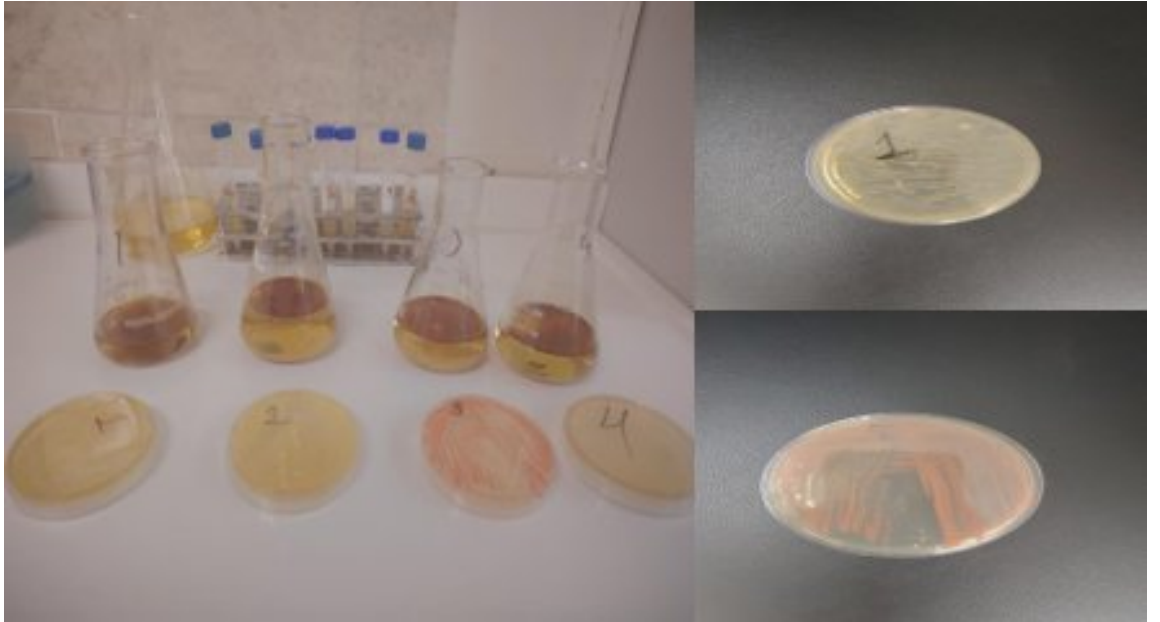
kültürlerden belirli hacimlerde örnekler alınarak GC–MS analizine hazırlanmıştır. Analiz öncesinde, bakteriyel biyokütlenin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla kültür örnekleri santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında üst sıvı faz dikkatlice ayrılmıştır. Ortamdaki petrol hidrokarbonlarının ekstraksiyonu amacıyla üst sıvı faza uygun bir organik çözücü eklenmiş ve karışım, hidrokarbonların organik faza geçişini sağlamak için homojen şekilde karıştırılmıştır. Faz ayrımının ardından elde edilen organik faz, nemden arındırılarak GC–MS analizine uygun hale getirilmiştir. Gerekli görülen durumlarda örnekler analiz için uygun konsantrasyona seyreltilmiştir. Hazırlanan GC–MS numuneleri, analizlerin gerçekleştirilmesi amacıyla Gümüşhane Üniversitesi merkezi araştırma laboratuvara gönderilmiştir. GC–MS analizleri, bu laboratuvarın mevcut cihaz altyapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları yardımıyla örneklerde bulunan petrol kökenli hidrokarbon bileşenleri belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında, beş farklı bakteri izolatından elde edilen kültürler kullanılarak toplam 10 adet GC–MS numunesi hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, bakterilerin petrol degradasyon potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ham petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinden petrol parçalayıcı bakterilerin izolasyonu, büyüme özelliklerinin belirlenmesi, moleküler tanımlanması ve petrol degradasyon potansiyellerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda elde edilen bulgular, izolasyon ve saflaştırma, spektrofotometrik analizler, PCR ve dizi analizleri ile GC-MS sonuçları başlıkları altında değerlendirilmiştir.

##### 4.1. Bakteriyel İzolasyon ve Saf Kültürlerin Elde Edilmesi Sonuçları

Ham petrol içeren TSB ortamlarında gerçekleştirilen zenginleştirme kültürleri sonucunda bakteriyel gelişim gözlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda TSA besiyerine yapılan ekimler neticesinde morfolojik olarak birbirinden farklı koloni tipleri oluşmuştur. Kolonilerin renk, şekil ve yüzey özellikleri dikkate alınarak toplam 5 farklı bakteri izolatu saflaştırılmıştır. TSB ortamında büyütülen sıvı kültürlerde, ortamın bulanıklığında ve petrol fazının dağılımında gözlenen değişimler, bakterilerin ortama adapte olduğunu ve aktif metabolik faaliyet gösterdiğini ortaya koymuştur. Saflaştırılmış bakterilere ait görsel Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Saflaştırılmış bakteriler

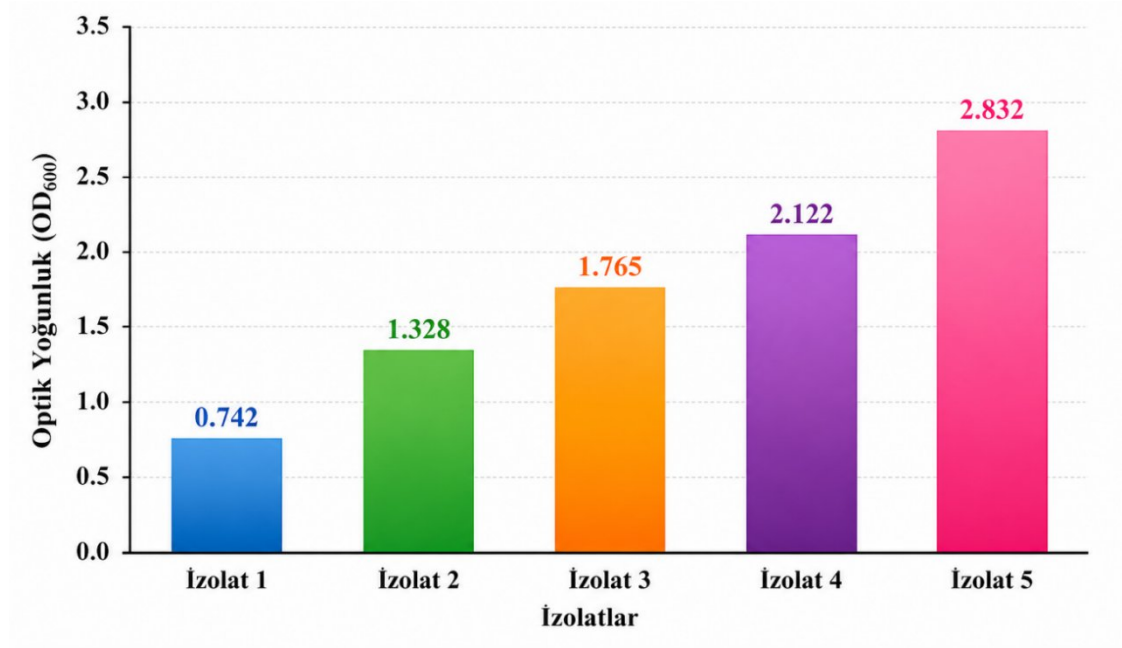
#### 4.2. Spektrofotometrik Büyüme Analiz Sonuçları

Saflaştırılan bakteri izolatlarının sıvı kültür ortamındaki büyüme performansları, 600 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle değerlendirilmiştir. Ölçümler sonucunda izolatlar arasında optik yoğunluk ( $OD_{600}$ ) değerleri bakımından belirgin farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bazı izolatların daha yüksek  $OD_{600}$  değerlerine ulaşması, bu bakterilerin besiyerine daha hızlı adapte olduğunu ve daha yoğun hücresel çoğalma gerçekleştirdiğini göstermektedir. Buna karşılık, bazı izolatlarda daha düşük optik yoğunluk değerleri ölçülmüş ve büyümenin sınırlı olduğu belirlenmiştir. İzolatların büyüme performanslarını ifade eden  $OD_{600}$  değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. İzolatların büyüme performansları

| İzolatlar | $OD_{600}$ değerleri |
|-----------|----------------------|
| İzolat-1  | 0,742                |
| İzolat-2  | 1,328                |
| İzolat-3  | 1,765                |
| İzolat-4  | 2,122                |
| İzolat-5  | 2,832                |

Bu tablodaki sonuçlara göre izolat-5’in  $OD_{600}$  değeri en yüksek olup bulunduğu besiyer ortamına daha fazla adapte olduğunu ve hücresel olarak daha çok çoğaldığını göstermektedir. İzolat-1 ise en düşük  $OD_{600}$  değerine sahiptir. Bu da bize bu bakterinin ortamda daha az çoğaldığını göstermekte olup aynı zamanda diğerlerine göre adaptasyonunun daha düşük olduğunu göstermektedir. İzolatların optik yoğunluğu grafiksel olarak Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. İzolatların ölçülen optik yoğunluk (OD600) değerleri

#### 4.3. PCR Amplifikasyon ve Moleküler Tanımlama Sonuçları

Saf kültürlerden izole edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonuçlarında tüm izolatlarda yaklaşık 1500 bp uzunluğunda belirgin bantlar gözlenmiştir. Bu durum, 16S rRNA gen bölgesinin başarıyla çoğaltıldığını ve moleküler tanımlama için uygun kalitede DNA elde edildiğini göstermektedir.

PCR ürünlerine ait dizi analizleri sonucunda izolatların tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır. GenBank veri tabanı ile gerçekleştirilen karşılaştırmalar sonucunda izolatların *Pseudomonas neustonica*, *Sphingobacterium soli*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* ve *Corynebacterium stationis* türleri ile %99'un üzerinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen baz uzunluklarının 1412–1511 bp aralığında değiştiği saptanmıştır. Baz uzunluğu en uzun olan izolata 99,59 luk benzerlik oranı ve 1511 baz uzunluğuyla *Lysinibacillus fusiformis* izolatu, baz uzunluğu en kısa ve 99,64 benzerlik oranıyla, 1412 baz uzunluğuyla *Sphingobacterium soli* bakterisi olduğu belirlenmiştir. İzolatların moleküler tanımlanmasına ait dizi analizleri sonuçları Tablo 3 de gösterilmiştir.

Çalışmada 16S rRNA gen dizi analizleri sonucunda izolatların *Pseudomonas neustonica*, *Bacillus licheniformis*, *Sphingobacterium soli*, *Lysinibacillus fusiformis* ve *Corynebacterium stationis* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu türlerin büyük bir kısmı, daha önce petrol ile kirlenmiş toprak ve su ortamlarından izole edilen ve hidrokarbon

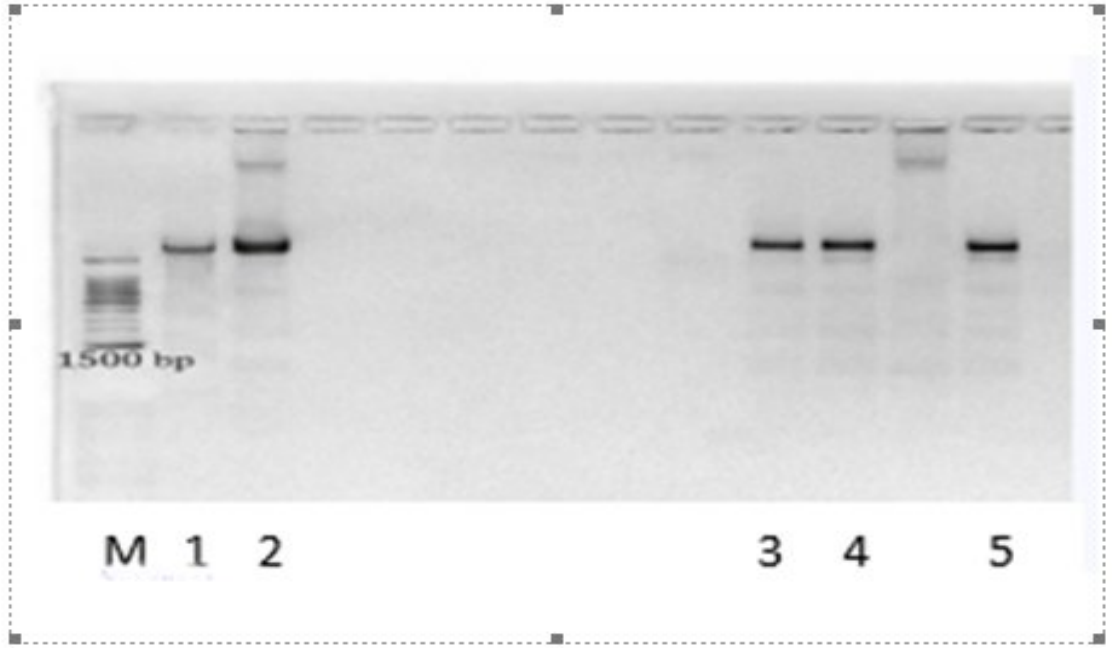
parçalayıcı özellikleriyle bilinen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. İzolatların moleküler tanımlanmasına ait dizi analizi sonuçları Tablo 3’de gösterilmiştir.

Clarridge (2004) 16S rRNA gen dizileme yönteminin klasik biyokimyasal testlere kıyasla daha yüksek doğruluk sağladığını ve özellikle çevresel örneklerden izole edilen bakterilerin tanımlanmasında vazgeçilmez bir araç olduğunu belirtmektedir.

Tablo 3. İzolatların moleküler tanımlanmasına ait dizi analizi sonuçları

| Bakteri Kodu | Benzediği Tür                    | Benzerlik Oranı | Baz Sayısı (bp) |
|--------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1            | <i>Corynebacterium stations</i>  | 99,31           | 1492            |
| 2            | <i>Lysinibacillus fusiformis</i> | 99,59           | 1511            |
| 3            | <i>Pseudomonas neustonica</i>    | 99,79           | 1503            |
| 4            | <i>Bacillus licheniformis</i>    | 99,37           | 1427            |
| 5            | <i>Sphingobacterium soli</i>     | 99,64           | 1412            |

İzole edilen bakterilere ait genomik DNA örneklerinden 16S rRNA gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Agaroz jel elektroforezi sonucunda tüm izolatlarda yaklaşık 1400–1500 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Bu durum PCR amplifikasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. İzolatlara ait Jel elektroforez görüntüsü Şekil 4’de gösterilmiştir.

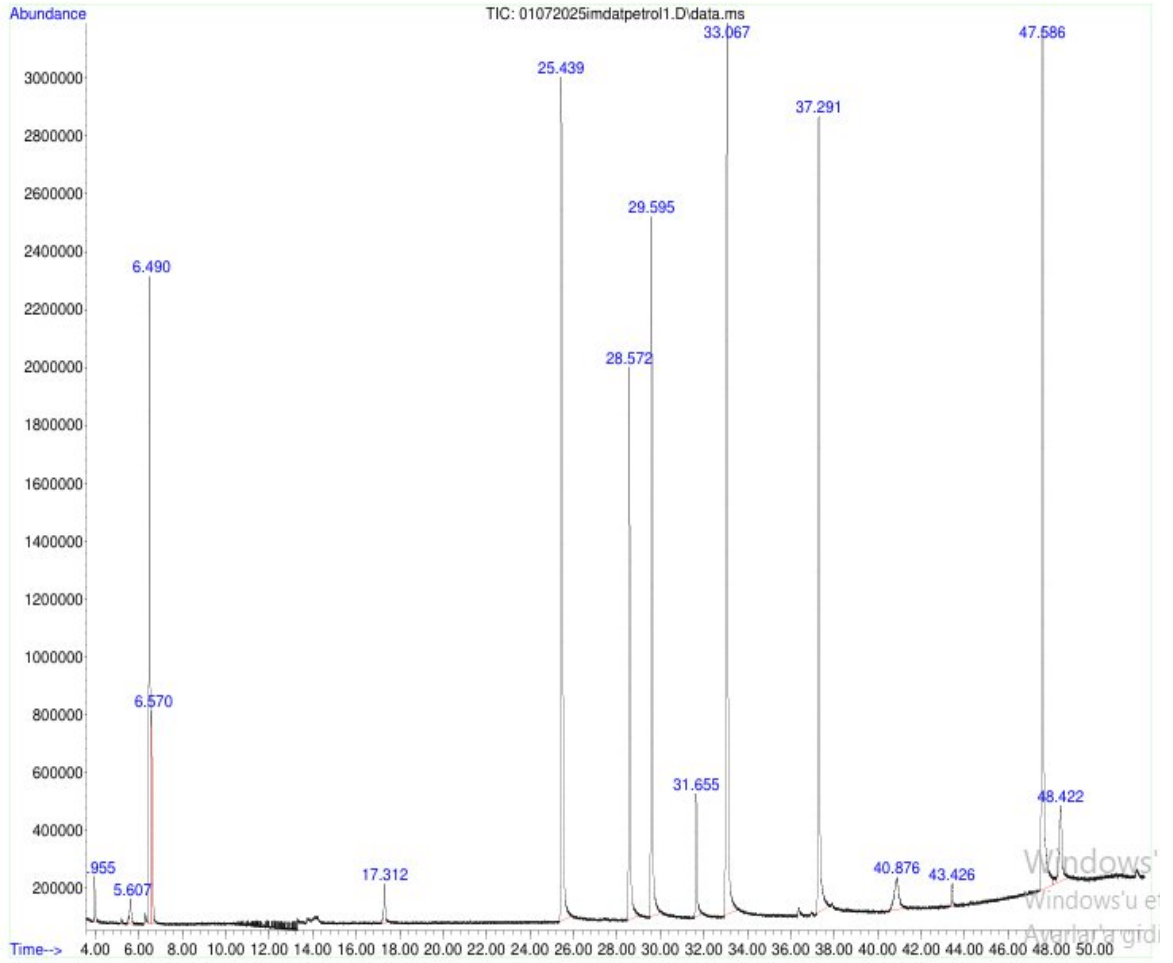


Şekil 4. İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: DNA marker, 1-5: bakteri izolatları

#### 4.4. GC-MS Analiz Sonuçları

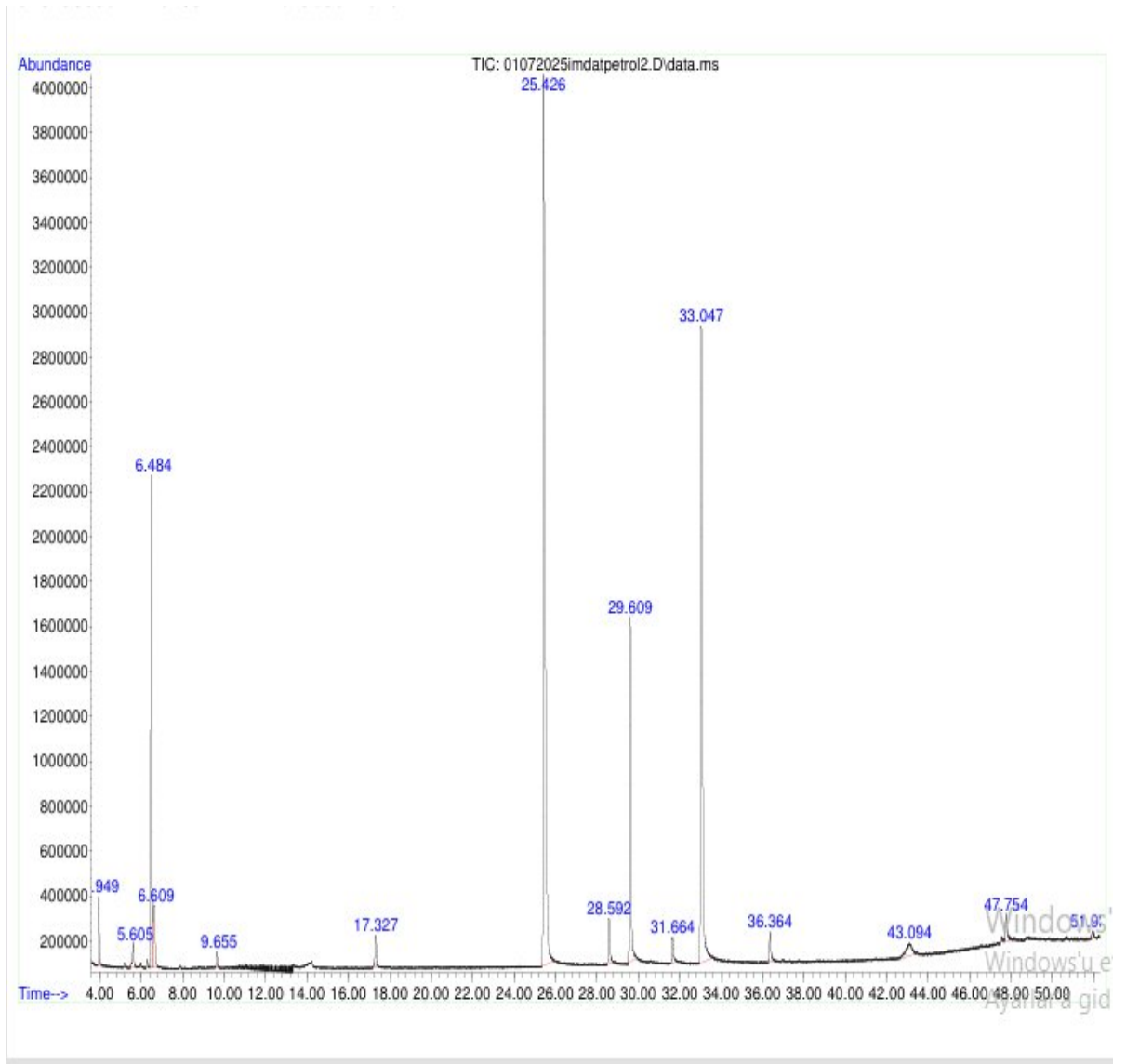
Ham petrol kaynaklı çevresel kirliliğin biyolojik yollarla azaltılmasına yönelik olarak yürütülen araştırma kapsamında, petrolü karbon kaynağı olarak kullanabilen mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiş, ardından 16S rRNA gen dizileme analizi ile moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

Son aşamada ise izolatların ham petrol üzerindeki biyodegradasyon etkileri GC-MS yöntemi ile değerlendirilmiş ve petrol bileşenlerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir (Şekil 5-9).



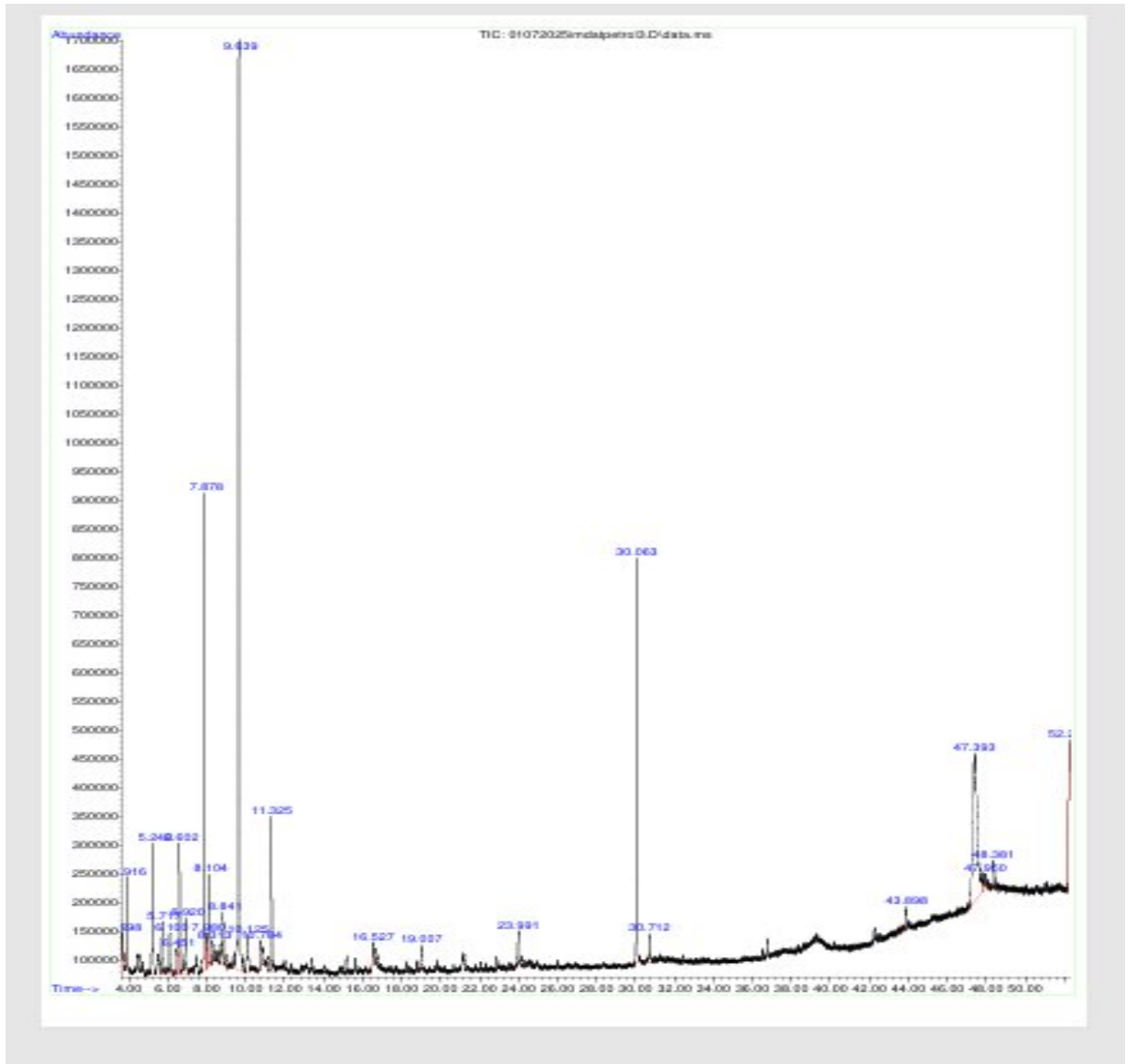
Şekil 5. *Corynebacterium stations'* a ait GC-MS kromatogramı

*Corynebacterium spp.* izolatına ait GC-MS kromatogramında farklı alkonma zamanlarında çok sayıda pik tespit edilmiştir. Kromatogramda en yüksek pikler 25,439; 33,067; 37,291 ve 47,586 dakika alkonma zamanlarında gözlenmiştir. Piklerin yoğunluklarının farklı olması, örnekte farklı miktarlarda organik bileşiklerin bulunduğunu göstermektedir. Daha düşük yoğunluklu pikler ise daha düşük konsantrasyonda bulunan bileşikleri temsil etmektedir. Elde edilen kromatogram, *Corynebacterium spp.* izolatına ait örneğin karakteristik GC-MS profilini ortaya çıkarmıştır.



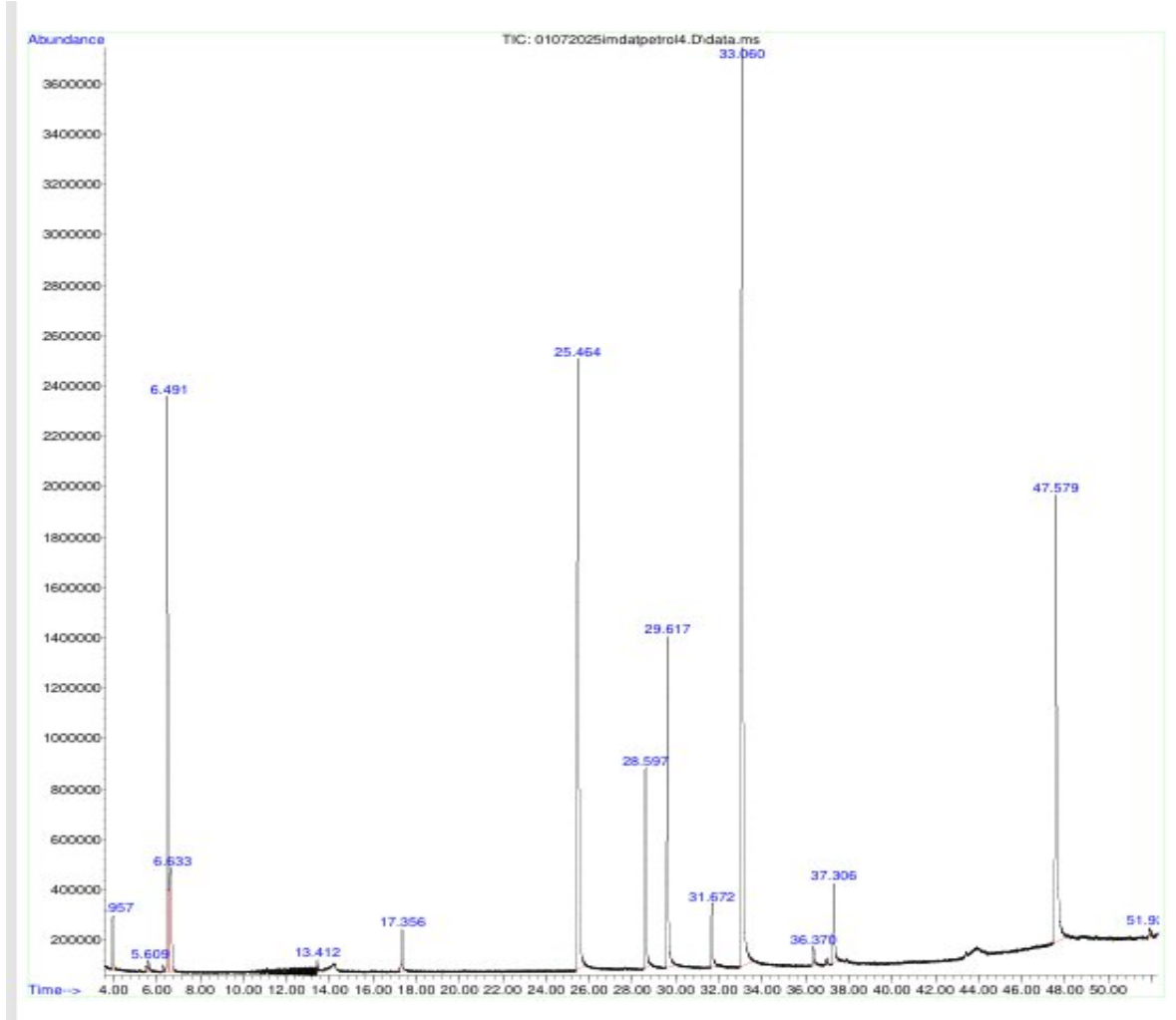
Şekil 6. *Lysinibacillus fusiformis* 'e ait GC-MS kromatogramı

*Lysinibacillus fusiformis* izolatına ait GC-MS kromatogramında farklı alıkonma zamanlarında çok sayıda pik tespit edilmiştir. Kromatogramda en belirgin pikler 25,426; 29,609 ve 33,047 dakika alıkonma zamanlarında gözlenmiştir. Ayrıca 6,484; 17,327; 28,592; 31,664; 36,364; 43,094 ve 47,754 dakika alıkonma zamanlarında daha düşük yoğunluklu pikler belirlenmiştir. Pik yoğunluklarındaki farklılıklar, örnekte bulunan organik bileşiklerin miktarlarının değişken olduğunu göstermektedir. Elde edilen kromatogram, *Lysinibacillus fusiformis* izolatına ait örneğin karakteristik GC-MS profilini ortaya koymuştur.



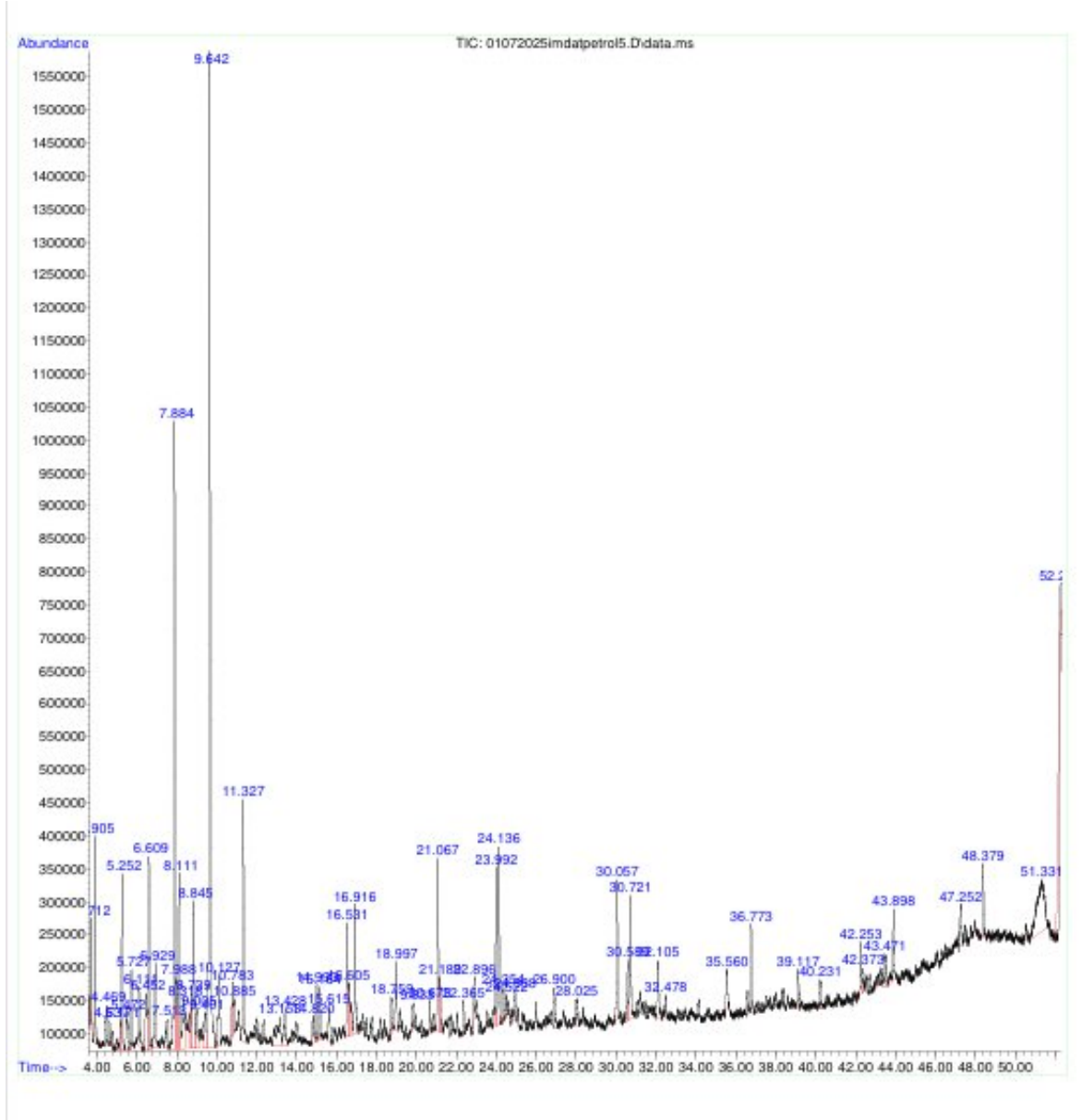
Şekil 7. *Pseudomonas neustonica* 'ya Ait GC-MS kromatogramı

*Pseudomonas neustonica* GC-MS kromatogramı incelendiğinde, izolatın farklı alıkonma zamanlarında çok sayıda organik bileşiğe ait pikler oluşturduğu görülmüştür. En yüksek pik yaklaşık 9,64 dakika alıkonma zamanında, ardından 7,470 ve 30,063 dakika alıkonma zamanlarında gözlenmiştir. Ayrıca kromatogramın farklı bölgelerinde düşük ve orta yoğunlukta çok sayıda pik tespit edilmiştir. Bu bulgular, izolatın kendine özgü bir kimyasal bileşik profiline sahip olduğunu göstermektedir. GC-MS analizi sonucunda elde edilen kromatogram, örnekte bulunan organik bileşiklerin dağılımını göstermiştir.



Şekil 8. *Bacillus licheniformis*'e ait GC-MS kromatogramı

*Bacillus licheniformis*'e ait GC-MS kromatogramı izolatına ait GC-MS kromatogramı incelendiğinde, GC-MS kromatogramında farklı alıkonma zamanlarında çok sayıda pik tespit edilmiştir. Kromatogramda en belirgin pikler 25,435; 29,597; 33,060 ve 37,306 dakika alıkonma zamanlarında gözlenmiştir. Piklerin GC-MS kütüphane eşleştirmesi sonucunda etanol, asetik asit, propanoik asit, 2-metilpropanoik asit, bütanoik asit, 2-metilbütanoik asit ve pentanoik asit gibi bileşikler belirlenmiştir. Elde edilen kromatogram, *Bacillus licheniformis* izolatına ait karakteristik kimyasal bileşik profilini ortaya çıkarmıştır.



Şekil 9. *Sphingobacterium soli* 'ye ait GC-MS kromatogramı

*Sphingobacterium soli* izolatına ait GC-MS kromatogramında geniş bir alıkonma zamanı aralığında çok sayıda pik tespit edilmiştir. Kromatogramda en belirgin pikler yaklaşık 7,884 ve 9,642 dakika alıkonma zamanlarında gözlenmiştir. Bunun yanında 11,327; 21,067; 24,136; 30,067; 36,773; 43,898; 48,379 ve 51,331 dakika alıkonma zamanlarında da çeşitli yoğunluklarda pikler belirlenmiştir. Kromatogramda çok sayıda pikin bulunması, örneğin farklı organik bileşikler içerdiğini göstermektedir. Piklerin yoğunluklarının değişken olması ise bileşiklerin örnekte farklı oranlarda bulunduğunu göstermektedir. Elde edilen kromatogram, *Sphingobacterium soli* izolatına ait karakteristik GC-MS profilini ortaya koymuştur.

Tablo 4. GS-MS analiz sonuçları

| Sıra no | RT (alığınma zamanı ) | %Alan | Adı                      | Kovats İndex |
|---------|-----------------------|-------|--------------------------|--------------|
| 1       | 3,955                 | 0,58  | Acetone                  | 810          |
| 2       | 6,490                 | 8,84  | Ethanol                  | 937          |
| 3       | 6,567                 | 3,41  | Ethanol                  | 940          |
| 4       | 17,314                | 0,67  | Ethanol,2 ethoxy         | 1245         |
| 5       | 25,435                | 17,47 | Acetic acid              | 1457         |
| 6       | 28,571                | 8,63  | Propanoic acid, 2-methyl | 1547         |
| 7       | 29,597                | 10,84 | Propanoic acid,          | 1576         |
| 8       | 31,652                | 1,97  | Butanoic acid            | 1637         |
| 9       | 33,067                | 17,09 | Butanoic acid, 2-methyl  | 1680         |
| 10      | 37,289                | 12,10 | Pentanoic acid, 4-methyl | 1813         |

GC-MS analizi sonucunda elde edilen bileşikler, alığınma zamanı (RT), pik alan yüzdesi (%Alan), Kovats indeksi (KI) ve kimyasal bileşik adları ile birlikte Tablo 4'te sunulmuştur. Bu parametreler kullanılarak petrol örneğinde inkübasyon sonrası oluşan metabolik ürünlerin türü ve göreceli dağılımı değerlendirilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre erken alığınma zamanlarında (RT = 3,955–6,567 dk) asetone ve etanol gibi düşük moleköl ağırlıklı ve uçucu özellikte bileşikler tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin düşük Kovats indeks değerlerine sahip olması (KI  $\approx$  810–940), kısa karbon zincirli yapıda olduklarını ve kromatografik kolondan hızlı elüe olduklarını göstermektedir. Etanolün iki farklı RT değerinde ve nispeten yüksek alan yüzdeleriyle (%8,34 ve %3,41) belirlenmesi, petrol bileşenlerinin parçalanması sonucunda alkol türevlerinin önemli ara ürünler arasında yer aldığını düşündürmektedir. Orta alığınma zamanlarında (RT  $\approx$  17,314–29,597 dk) etanol türevleri ve özellikle asetik asit tespit edilmiştir. Asetik asidin %17,47 gibi yüksek bir alan yüzdesine sahip olması, bu bileşiğin ortamda baskın metabolik ürünlerden biri olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu bileşiğe

ait Kovats indeks değeri literatür aralığı ile uyumlu olması, bileşik tanımlamasının güvenilirliğini desteklemektedir.

Daha ileri alıkonma zamanlarında (RT = 31,652–37,289 dk) propanoik asit, 2-metil propanoik asit, butanoik asit, 2-metil butanoik asit ve 4-metil pentanoik asit gibi kısa zincirli ve dallanmış karboksilik asitler belirlenmiştir. Bu bileşiklerin Kovats indekslerinin 1300–1500 aralığında yoğunlaşması, karbon zincir uzunluğunun arttığını ve kolonda daha geç elüsyon gerçekleştiğini göstermektedir.

Özellikle 2-metil butanoik asit (%17,09) ve 4-metil pentanoik asit (%12,10) gibi dallanmış asitlerin yüksek alan yüzdelere sahip olması, petrol bileşenlerinin yalnızca düz zincirli ürünlere değil, aynı zamanda dallanmış organik asitlere de dönüştürüldüğünü ortaya koymaktadır.

Tabloda yer alan pik alan yüzdelерinin 0,58 ile 17,47 arasında değışmesi, bazı bileşiklerin ortamda daha yoğun olarak biriktiğini, bazılarının ise daha düşük miktarlarda oluştuğunu göstermektedir. Bu durum, petrol biyodegradasyonu sırasında oluşan ürünlerin dağılımının homojen olmadığını ve süreç boyunca farklı bileşiklerin baskın hale gelebildiğini düşündürmektedir.

Genel olarak Tablo 4’de sunulan GC-MS sonuçları, petrol hidrokarbonlarının bakteriyel faaliyetler sonucunda alkoller, ketonlar ve kısa zincirli organik asitler gibi daha basit ve oksijenli bileşiklere dönüştürüldüğünü açık biçimde ortaya koymaktadır. Bu bulgular, çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının petrol kirliliğinin biyolojik yollarla azaltılmasında potansiyel taşıdığını göstermektedir.

Kovats indeks değeri, bileşik tanımlamasının yalnızca alıkonma zamanına dayandırılmaz ve uluslararası standartlara göre doğrulandığını gösterir. Kovats indeksi, bileşiklerin n-alkan serisine göre göreceli alıkonma davranışını tanımlayan ve GC analizlerinde kimliklendirme güvenilirliğini artıran bir parametre olarak kabul edilmektedir (IUPAC, 1997).

Bento ve arkadaşları (2005) dizel ve ham petrol ile kirlenmiş topraklardan izole ettikleri *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerinin alifatik ve aromatik hidrokarbonları etkin şekilde parçaladığını bildirmiştir. *Pseudomonas* türlerinin geniş enzim repertuarına sahip olması nedeniyle petrol bileşenlerine karşı yüksek adaptasyon yeteneği gösterdiğini vurgulamaktadır.

*Bacillus licheniformis* ise spor oluşturma yeteneği sayesinde çevresel stres faktörlerine dayanıklı bir tür olup, uzun süreli kirlilik bulunan ortamlarda varlığını sürdürebilmektedir. Bu özellik, söz konusu türün petrol ile kirlenmiş topraklarda sıkça tespit edilmesini açıklamaktadır (Das ve Chandran, 2011). *Sphingobacterium* ve

*Lysinibacillus* türleri literatürde daha sınırlı sayıda çalışmada rapor edilmekle birlikte, özellikle kompleks organik maddelerin parçalanmasında görev alabildikleri bildirilmektedir (Margesin ve Schinner, 2001).

Bu bağlamda, çalışmada elde edilen tür dağılımının petrol kirliliği bulunan ortamlar için tipik olduğu ve literatürde bildirilen bulgularla genel olarak uyum gösterdiği söylenebilir.

Petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen bakteriler arasında büyüme kinetiklerinin önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğini ve bu durumun biyodegradasyon etkinliğini doğrudan etkilediğini belirtmiştir. Kurtoğlu (2008), ham petrolü karbon kaynağı olarak kullanan bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* suşlarının yüksek büyüme performansı gösterdiğini ve biyodegradasyon çalışmalarında etkin mikroorganizmalar olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Bu çalışmada gözlenen büyüme performansı farklılıkları, izolatların genetik yapıları, enzim repertuarları ve petrol bileşenlerine karşı adaptasyon düzeyleri ile ilişkilendirilebilir. Yüksek OD<sub>600</sub> değerine sahip izolatların, özellikle kısa ve orta zincirli hidrokarbonları daha hızlı metabolize edebildiği düşünülmektedir.

Spektrofotometrik ölçümler, izolatlar arasında büyüme hızları ve metabolik aktiviteler açısından belirgin farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Bazı izolatların yüksek optik yoğunluk değerlerine ulaşması, bu bakterilerin petrol bileşenlerini daha etkin biçimde karbon kaynağı olarak kullanabildiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızdaki GC-MS analizleri, bakteri inokülasyonu sonrası petrol örneklerinde önemli kimyasal değişimler meydana geldiğini göstermiştir. Özellikle düşük ve orta molekül ağırlıklı hidrokarbonlara ait pik alanlarında belirgin azalmalar gözlenmiş; buna karşılık kısa zincirli alkoller ve çeşitli organik asitlerin oluştuğu tespit edilmiştir.

Bento vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada da *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerinin petrol kirliliği bulunan ortamlarda baskın olduğu ve degradasyon hızının türlere göre değiştiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda gözlenen tür dağılımı ve büyüme performansı farklılıkları, bu literatür bulgularını destekler niteliktedir.

Bununla birlikte bazı çalışmalarda aromatik hidrokarbonların da önemli ölçüde parçalandığı bildirilirken, bu çalışmada daha çok alifatik ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerde belirgin değişim gözlenmiştir. Bu farklılık, kullanılan petrol türü, inkübasyon süresi, çevresel koşullar ve bakteri konsorsiyumunun yapısı ile ilişkilendirilebilir.

#### **4.5. Çalışmanın Biyoremediasyon Açısından Önemi**

Elde edilen sonuçlar, petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen yerel bakteri türlerinin biyoremediasyon uygulamaları açısından önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. Yerel mikroorganizmaların kullanılması, çevresel koşullara daha iyi uyum sağlamaları nedeniyle uygulamada avantaj sunmaktadır.

#### **4.6. Petrol Parçalayan Bakterilerin Çevresel ve Endüstriyel Önemi**

Petrolün tanker kazaları veya sızıntılar sonucu çevreye yayılması, sucul ekosistemlerde ciddi çevresel sorunlara neden olmaktadır. Petrolü parçalayan bakteriler, biyoremediasyon açısından önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, petrolün depolama tanklarında ve yakıt sistemlerinde mikrobiyal aktivite; yakıt kalitesinin düşmesi, biyofilm oluşumu ve mikrobiyal korozyon gibi istenmeyen etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle petrol endüstrisinde, depolanan yakıtların mikrobiyal bozunmasını önlemek amacıyla biyosit uygulamaları ve çeşitli koruyucu yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada izole edilen petrol parçalayıcı bakteriler, çevreye yayılan petrolün biyolojik yollarla giderilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte, petrolün depolama ve taşınma süreçlerinde aynı bakterilerin gelişmesi yakıtın bozulmasına ve mikrobiyal korozyon gibi istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle petrol endüstrisinde, depolanan yakıtların mikrobiyal bozunmasını önlemek amacıyla biyosit uygulamaları, tankların düzenli temizlenmesi ve sistemde su birikiminin önlenmesi gibi koruyucu yöntemler kullanılmaktadır (Passman, 2013). Yapılan bir çalışmada, yakıt sistemlerinde gelişen mikroorganizmaların biyofilm oluşumuna neden olduğu ve bunun metal yüzeylerde mikrobiyal korozyon riskini artırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle, yakıt sistemlerinde düzenli izleme ve uygun kontrol yöntemlerinin uygulanmasının önemli olduğu vurgulanmıştır (Videla ve Herrera, 2005).

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ham petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinden hidrokarbon parçalayan bakterilerin izolasyonu, moleküler olarak tanımlanması ve biyodegradasyon potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, petrol türevli kirleticilerin biyolojik yöntemlerle giderilmesinde yerli mikroorganizmaların önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda, farklı özelliklere sahip bakteri suşları elde edilmiştir. Bu izolatların hidrokarbon içeren ortamlarda büyüme gösterebilmesi, söz konusu mikroorganizmaların petrol bileşenlerini enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabildiğini ortaya koymaktadır. OD600 ölçümleri ile belirlenen büyüme verileri, bazı izolatların diğerlerine kıyasla daha yüksek adaptasyon yeteneği sergilediğini ve hidrokarbonlara karşı daha dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Moleküler tanımlama çalışmaları sonucunda izole edilen bakterilerin farklı cinslere ait olduğu belirlenmiş ve bu mikroorganizmaların hidrokarbon biyodegradasyonunda etkin rol oynayabildiği görülmüştür. Özellikle *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Corynebacterium* ve *Sphingobacterium* gibi cinslerin petrol türevli bileşiklerin parçalanmasında etkili olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, petrol ile kirlenmiş ortamlardan izole edilen yerli bakterilerin biyoremediasyon uygulamalarında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu mikroorganizmaların çevre dostu ve sürdürülebilir yaklaşımlar kapsamında değerlendirilmesi, çevresel kirliliğin azaltılmasına katkı sağlayabilecek önemli bir alternatif sunmaktadır. Elde edilen bulgular, petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen yerli bakterilerin çevresel kirliliğin azaltılmasında etkin bir şekilde değerlendirilebileceğini ortaya koymakta olup, biyoremediasyon uygulamalarının geliştirilmesine yönelik önemli bir bilimsel altyapı sunmaktadır.

Bu doğrultuda, izole edilen bakterilerin biyodegradasyon kapasiteleri laboratuvar koşullarında belirlenmiş olmakla birlikte, doğal çevre koşullarındaki performanslarının ortaya konulabilmesi için saha ölçekli çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca, farklı bakteri türlerinin birlikte kullanıldığı mikrobiyal konsorsiyumların oluşturulması, hidrokarbonların parçalanma sürecinde daha yüksek verimlilik sağlayabilir. Bununla birlikte, farklı kirletici konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması, biyodegradasyon

süreçlerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, izole edilen bakterilerin uzun süreli stabilite ve etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla zamana bağlı deneylerin gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Bu tür çalışmalar, mikroorganizmaların farklı çevresel koşullarda sürdürülebilirliklerini ortaya koyarak uygulamaya yönelik daha güvenilir verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Biyodegradasyon süreçlerinde çevresel faktörlerin (pH, sıcaklık, oksijen ve nem gibi) önemli rol oynadığı göz önünde bulundurularak, bu parametrelerin optimize edildiği deneysel çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bunun yanı sıra, hidrokarbonların farklı fraksiyonları üzerindeki etkilerin daha ayrıntılı olarak belirlenebilmesi için ileri düzey analitik çalışmaların gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada analiz edilen tüm izolatlara ait GC-MS kromatogramlarında farklı alıkonma zamanlarında çok sayıda pik tespit edilmiştir. Piklerin sayısı ve yoğunluklarındaki farklılıklar, örneklerde bulunan organik bileşiklerin göreceli dağılımlarının değişken olduğunu göstermektedir. Ancak bu çalışmada bileşiklerin kimlik doğrulaması yapılmadığından, kromatogramlarda gözlenen piklerin belirli hidrokarbonlara veya biyodegradasyon ürünlerine ait olduğu kesin olarak ifade edilememektedir. Bu nedenle GC-MS analizleri, izolatlara ait kromatografik profillerin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda bileşik tanımlamalarının gerçekleştirilmesi, biyodegradasyon mekanizmasının daha ayrıntılı olarak ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

Son olarak; moleküler düzeyde yapılacak ileri çalışmalar ile hidrokarbon biyodegradasyonunda görev alan mekanizmaların daha detaylı olarak ortaya konulması ve bu bilgilerin uygulamaya aktarılması, biyoremediasyon stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation* (2. Baskı). Academic Press.  
<https://shop.elsevier.com/books/biodegradation-and-bioremediation/alexander/97>
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209.  
<https://doi.org/10.1128/MR.45.1.180-209.1981>
- Atlas, R. M. ve Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: A tale of two worst spills in U.S. history. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6709–6715.  
<https://doi.org/10.1021/es2013227>
- Bal, H. (2005). *Yerel ekosistemlerden izole edilen ve endüstriyel önemi olan proteinleri üreten bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve ilgili proteinlerin taranması* [Yayımlanmış doktora tezi, Marmara Üniversitesi].  
<https://katalog.marmara.edu.tr/veriler/yordambt/cokluortam/4D/T0052292.pdf?>
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C. ve Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049–1055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Berreby, J.J. (1959). *Le golfe Persique: Mer de légende, réservoir de pétrole: Iran, Irak, Arabie Séoudite, Koweït, Bahreïn, Qatar, Côte des Pirates, Mascate et Oman*. Payot. [https://books.google.com/books/about/Le\\_golfe\\_Persique.html?id=39jUT](https://books.google.com/books/about/Le_golfe_Persique.html?id=39jUT)
- Bossert, I. ve Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. M. Atlas (Ed.), *Petroleum microbiology* (ss. 435–473). Macmillan.  
<https://www.sci epub.com/reference/81090>
- BP. (2016). *BP Statistical Review of World Energy 2016* (65. Baskı). BP p.l.c.  
<https://docslib.org/doc/2471543/bp-statistical-review-of-world-energy-2016>
- Cappuccino, J. G. ve Welsh, C. T. (2017). *Microbiology: A laboratory manual* (11. Baskı). Pearson Education.  
[https://books.google.com/books/about/Microbiology\\_A\\_Laboratory\\_Manual](https://books.google.com/books/about/Microbiology_A_Laboratory_Manual)
- Ceyhan, N. ve Esmeray, E. (2019). Petrol kirliliği ve biyoremediasyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 95–101.  
<https://derleme.gen.tr/index.php/derleme/article/view/96>

- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Das, N. ve Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International* 941810, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dindar, E. (2014). *Petrol ve petrol ürünleriyle kirlenmiş toprakların ıslahı* [Yayımlanmış doktora tezi, Uludağ Üniversitesi]. <http://hdl.handle.net/11452/5860>
- Doğan, M. (2011). Enerji kullanımının coğrafi çevre üzerindeki etkileri. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 23, 36–52. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/marucog/issue/470/3811>
- Doğanay, H. (1998). *Ekonomik coğrafya 2: Enerji kaynakları* (2. Baskı). Şafak Yayınevi. <https://www.kitantik.com/product/Ekonomik-Cografya-2-Enerji-Kaynaklari>
- Erdoğan, E. E., Namlı, A. ve Şahin, F. (2013). Isolation, characterization and determination of petroleum hydrocarbon degrading metabolic capabilities of indigenous microorganisms in Turkey. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 15(45), 1–13. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/deumffmd/article/492381>
- Forbes, R. J. (1958). *Studies in early petroleum history*. E. J. Brill. <https://katalog.bibliothek.kit.edu/bib/740005>
- Fritze, D. (1996). *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 98–101. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-98>
- García, M. T., Mellado, E., Ostos, J. C. ve Ventosa, A. (2004). *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1723–1728. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63114-0>
- Güneş, A. (2019). *Petrol kirliliğinin biyoremediasyon ile giderilmesi*. Nobel Akademik Yayıncılık. <https://www.nobelyayin.com/>
- Haritash, A. K. ve Kaushik, C. P. (2009). Fate and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Head, I. M., Jones, D. M. ve Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>

- Icgen, B. ve Yilmaz, F. (2017). Screening and in situ monitoring of potential petroleum hydrocarbon degraders in contaminated surface water. *Clean Soil Air Water*, 45(1), e1600194. <https://doi.org/10.1002/clen.201600194>
- IUPAC. (1997). *Compendium of chemical terminology (the Gold Book)*. International Union of Pure and Applied Chemistry. <https://goldbook.iupac.org/>
- Janda, J. M. ve Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kimes, N. E., Callaghan, A. V., Aktas, D. F., Smith, W. L., Sunner, J., Golding, B. T., Drozdowska, M., Hazen, T. C., Suflita, J. M. ve Morris, P. J. (2013). Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in Microbiology*, 4, Article 50. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00050>
- Koshlaf, E. ve Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), 25–49. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
- Kumbur, H., Özer, Z., Özsoy, H. D. ve Avcı, E. D. (2005). Türkiye’de geleneksel ve yenilenebilir enerji kaynaklarının potansiyeli ve çevresel etkilerinin karşılaştırılması [Sözlü bildiri]. *III. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu ve Sergisi (YEKSEM)*, Mersin, Türkiye.
- [https://www.emo.org.tr/etkinlikler/yeksem/etkinlik\\_bildirileri\\_detay.php?bilkod](https://www.emo.org.tr/etkinlikler/yeksem/etkinlik_bildirileri_detay.php?bilkod)
- Kurtoğlu, H. (2008). *Mikroorganizmalar Yardımıyla Petrol Hidrokarbonlarının Biyolojik Parçalanması*. [Yayımlanmış yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi]. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Woodward, J. C. ve Phillips, E. J. P. (1995). Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 953–958. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.3.953-958.1995>
- Margesin, R. ve Schinner, F. (2001). Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 650–656. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>
- Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, P. C., Weyrauch, P., Dong, X. ve Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26(1–3), 92–118. <https://doi.org/10.1159/000441358>

- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. ve Łabuzek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1), 15–25.  
<https://www.pjoes.com/Bacterial-degradation-and-bioremediation-of-polycyclic>
- Painter, D. S. (2014). Oil and geopolitics: The oil crises of the 1970 and the Cold War. *Historical Social Research*, 39(4), 186–208.  
<https://doi.org/10.12759/hsr.39.2014.4.186-208>
- Passman, F. J. (2013). Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. ve Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633–654.  
<https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Rojó, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>
- Sambrook, J. ve Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3. Baskı). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://cshprotocols.cshlp.org>
- Taşkın, Ö. S. (2010). *Marmara Denizi İstanbul kıyılarında PAH ve organoklorlü pestisitlerin HPLC ile tayini ve sediment jeokimyası* [Yayımlanmış yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi]. <https://nek.istanbul.edu.tr/ekos/TEZ/ET001400>.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. ve Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 1–10.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00162-9)
- Vanbeilen, J. B. ve Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13–21.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>
- Videla, H. A. ve Herrera, L. K. (2005). Microbiologically influenced corrosion: Looking to the future. *International Microbiology*, 8(3), 169–180.  
<https://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/4c457c7ccca0f.002?utm>
- Wang, Z. ve Fingas, M. F. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47(9–12), 423–452.  
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00215-7)

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. ve Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Widdel, F. ve Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259–276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3)
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N. ve Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006>
- Zobell, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews*, 10(1), 1–49. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC440899>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sabina TAGHIYEVA

### Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Azerbaycan Devlet İktisat Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim  
Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : Azerice, Türkçe, Rusça, İngilizce

Bilimsel Faaliyetler ve Yayınlar : Uluslararası Kongrede Sözlü Sunum (III.  
Uluslararası Apiterapi ve Doğa Kongresi  
IANCO 2025) Azerbaycan

### İş Deneyimi

Stajlar : AZZA Laboratuvar Stajı

Projeler :

Çalıştığı Kurumlar : AGROLAB Laboratuvar Teknisyeni  
A1 Asad Company İdari İşler Sorumlusu

Tarih :25.06.2026