



**TÜRKİYE'DE PETROL HİDROKARBONLARINI PARÇALAYAN
YERLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
HİDROKARBON PARÇALAMA KABİLİYETLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**(ISOLATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF
PETROLEUM HYDROCARBON DEGRADING METABOLIC
CAPABILITIES OF INDIGENOUS MICROORGANISMS IN TURKEY)**

Esin (ERAYDIN) ERDOĞAN ¹, Ayten NAMLI ², Fikrettin ŞAHİN ¹

ÖZET/ABSTRACT

Bu çalışmada amaç ülkemizde kirlilik sorunlarından olan petrol ve benzeri organik kirleticilerin ortadan kaldırılmasında faydalanılabilecek bir yöntem (biyoremediasyon) ve materyal geliştirmektir. Bunun için Adana, Batman ve Adıyaman illerinin petrol ile kirlenmiş topraklarından 33 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin ön tanımlaması, taksonomik sınıflaması, Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS), oksidaz ve % 3 KOH testleri yapılmıştır. Sıvı kültürde ham petrollü ortamda çoğalma yetenekleri ve petrolü parçalama kabiliyetleri test edilmiştir. Ham petrollü ortamda en iyi gelişmeyi gösteren ve ham petrolü parçalama düzeyleri en yüksek olan 6 bakteri suşu *Pseudomons aeruginosa* (2 suş) *Pseudomonas putida* (2 suş), *Citrobacter amalonaticus*, *Acinetobacter genomospecies* seçilmiştir. 120 günlük inkübasyon sürecinin sonunda bu 6 bakteri suşu toprakta % 56 oranında petrol ayrışması sağlamıştır. Bu çalışma, ülkemizde kirlili alanlarda uygulanabilecek bir biyoremediasyon ürünü elde etme açısından önemli bir basamak oluşturmaktadır.

*The aim of this study, to do develop a method and the material is utilized to eliminate organic pollutants (bioremediation) with oil pollution problems in our country. To do this, 33 bacterial strains isolated from oil contaminated soil obtained from Adana, Batman and Adıyaman in bioremediation studies. Identification of isolated bacteria were performed from the taxonomic classification of MIS (Microbial Identification System), oxidase and 3% KOH tests. All isolates were performed their proliferation capacity in crude oil contaminated environment, and high capability of crude oil degradation in liquid culture medium. 6 bacteria (*Pseudomons aeruginosa* (2 strain), *Pseudomonas putida* (2 strain), *Citrobacter amalonaticus*, *Acinetobacter genomospecies* were identified according to their improvement capacity in crude oil contaminated environment and high capability of crude oil degradation. These bacterial strains provided that the crude oil degradation by 56% at the end of the 120-day incubation period. This study, can be applied is an important step in terms of getting the bioremediation product in polluted areas in our country.*

ANAHTAR KELİMELELER/KEYWORDS

Toprak, Ham petrol, Toprak kirliliği, Bakteriler, Biyoremediasyon
Soil, Crude oil, Soil pollution, Bacteria, Bioremediation

¹ Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fak., Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İSTANBUL

² Ankara Üniversitesi, Ziraat Fak., Toprak Gübre ve Su Kayn. Merk. Araşt. Enst. Md., ANKARA,
esineraydin@hotmail.com

1. GİRİŞ

Teknolojinin gelişmesiyle hızla büyüyen sanayi ve endüstri çalışmaları daha fazla enerji gereksinimini doğurmuştur. Bu artan enerji talebi petrol ve petrol ürünleri (PPÜ)'nin kullanımını arttırarak, petrolün çıkarılmasını, işlenmesini ve nakliyesini gündeme getirmiştir. Bu faaliyetler sırasında ortaya çıkan kazalar, sızıntılar, dikkatsizlikler büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir. Zaman zaman meydana gelen bu tür kirlenmeler büyük bir çevre kirliliği oluşturmalarına rağmen petrol ve petrol türevlerinden kaynaklanan kirliliğin giderilmesi konusunda kapsamlı çalışma ve bilgi birikimi bulunmamaktadır. Petrol ve türevlerinden kaynaklanan kirliliğin giderilmesi konusunda bazı araştırmaların yapılması uygun yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Rhykerd vd., parçalanması zor, karmaşık bileşikler ve ağır metaller nedeniyle PPÜ bulaşmış alanların toprak kaynağının arzu edilen amaca (tarımsal, endüstriyel ve rekreasyonel) hizmet edemeyecek şekilde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler açısından bozulmasına neden olduğunu açıklamışlardır (Rhykerd vd., 1998; Butler ve Mason, 1997). Ham petrol yüksek oranda metal ve ağır polisiklik aromatik hidrokarbonlar içerir (PAH) (Keith ve Telliard, 1979; Cooney, 1980; Hagwell vd., 1992; Rhykerd vd., 1998; Boonchan vd., 2000). PAH'ların büyük bir kısmının çevrede birikimleri ve uzun süre kalmaları, çevre kirlenmesine sebep olduklarını ve biyolojik dengeyi olumsuz yönde etkilediklerini saptamışlardır. Kirlenici özelliklerinden dolayı biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen PAH'lardan ve petrol ve petrol türevlerinden çevrenin temizlenmesi, çevre ve uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemli olduğunu açıklamışlardır (Demir ve Demirbağ, 1999; Odu, 1977; Van Hamme vd., 2003).

Hidrokarbon kirliliğini azaltmak için fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan temizleme işlemleri oldukça pahalıdır (Bonnier vd., 1980; El Nawawy vd., 1987; Rhykerd vd., 1998). Diğer yandan biyoremediasyon yöntemleri petrol hidrokarbonlarının topraktan elimine edilmesinde çevreye dost uygulama teknolojileri içermesi ve daha ekonomik alternatifler sunması nedeniyle giderek artan bir ilgi görmektedir (Desai ve Banat, 1997). Biyoremediasyon, katabolik fonksiyonlara sahip mikroorganizmaların hücre kütesine kodlanarak, geliştirilen katabolik mikroorganizmaların toprağa aşılması ve kimyasal bileşiklerin özellikle bu mikroorganizmalar tarafından zararsız biyolojik artıklara dönüştürülmesi şeklinde tanımlanabilir (Atlas, 1978). Petrol hidrokarbonları açısından bu zararsız ürünler karbondioksit, su ve metan olarak sıralanabilir (Walter vd., 1997). Toprak kökenli *Pseudomonas* türü bazı bakteriler (*P. putida*) ham petrolün bazı fraksiyonlarını parçalama yeteneğindedir (Kapley vd., 1999; Ojumu vd., 2005; Peressuttia vd., 2003; Rahman vd., 2002a; Ökmen ve Algur, 2000; Johnson vd., 1996; Komukai-Nakamura vd., 1996; Kiyohara vd., 1992; Jack vd., 1985; Fall vd., 1979).

Mikroorganizmalar kendi metabolizma enzimlerini kullanarak kirli alanlardaki bileşikleri parçalama da ve ortamın temizlenmesinde faydalı olurlar (Atlas, 1981; Atlas ve Bartha, 1992; Steffan vd., 1997; Alexander, 1999). Hiçbir mikrobiyal tür tek başına bütün petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğinde değildir (Atlas, 1978). Hidrokarbonların kapsamlı degradasyonu farklı mikrobiyal popülasyonların eş zamanlı aktiviteleri ile gerçekleşir (Cerniglia, 1992; Wilson ve Jones, 1993). *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türü bakterilerin ayrı ayrı ve mikrobiyal bir karışım olarak toprakta ham petrolü parçalama yeteneklerinin izlendiği bir araştırmada bu türlerin karışımdan elde edilen bakteriyel performansının, türlerini ayrı ayrı gösterdiği performansa kıyasla daha etkin olduğu gözlenmiştir (Rahman vd., 2002b). Diğer petrol hidrokarbonları parçalayabilme yeteneğinde olan türler *Bacillus subtilis* (DM-04), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus mycoides*, *Klebsiella oxytaca*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus*

megaterium, *Pseudomonas diminuta*, *Gluconobacter cereuius*, *Pasteurella caballi*, *Sphingomonas paucimobilis* ve *Sphingobacterium multivoru* bildirilmiştir (Kishore ve Ashis, 2007; Pokethitiyook vd., 2002; Jürgensen vd., 2000).

Bu çalışmanın amacı ülkemiz topraklarında var olan, petrol ve türevlerini ayrıştırma yeteneğindeki **bakterilerin izole edilerek** teşhis edilmesi, petrol kirliliği bulunan bölgelerimiz veya kirlilik tehdidi altında olan topraklarımız için ekonomik ve biyolojik **biyoremediasyon ürünü** elde edilmesi aşamasında önemli bir adım oluşturmaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bakterilerin Petrol ile Kirlenmiş Topraklardan İzolasyonu

2.1.1. Kültür Ortamı

Ortam A içeriği (g l⁻¹): 1 g KNO₃, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl₂ g, 1 g K₂HPO₄ içeren 1 L besiyerine % 1 oranında ham petrol: Triton-X-100 emülsiför (1:1) ilave edilerek 3 gün boyunca 28 °C'de 180 dev/dak'da inkübasyona bırakılmıştır. Ortam B içeriği (w/v): ortam A'ya % 1.5 agar ilave edilmiştir. Tüm sıvı ve katı besiyerleri 121 °C'de 15 dak. Sterilize edilmiştir (Rojas-Avelizapa vd., 1999; Erdoğan, 2010).

2.1.2 İzolasyon

Hidrokarbon parçalayan mikroorganizmalar aşağıdaki zenginleştirme işlemi kullanılarak izole edilmiştir. Adana, Batman, Adıyaman illerinin petrol ile kirlenmiş bölgelerinden alınan topraklardan 10 gr örnek 100 ml ortam A'ya ilave edilerek 3 gün boyunca 28 °C'de 180 dev/dak'da inkübasyona bırakılmıştır. 3. gün sonunda bu besiyerinden 10 ml alınarak tekrar aynı bileşenleri içeren taze ortama alınmıştır (Rojas-Avelizapa vd., 1999). Bu işlem iki kere daha tekrarlandıktan sonra 0,1 ml'si Nutrient agar'lı (NA), Plate count agar'lı (PCA), Glutamate starch phenol (GSP-agar), Tryptic soy agar'lı (TSA) ve Maya Özütlü ve % 1 Petrollü agarlı petrilere ekilmiştir. % 1 petrol içeren petrilere binoküler altında değişik koloni yapısı sergileyen bakteriler seçilerek izolasyon yapılmıştır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra tüm suşlar % 50 gliserol ve % 10 petrol içeren ortamda -20 °C ve -70 °C'de saklandı. Bu işlemler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Toprak Biyolojisi Laboratuvarında yapılmıştır. İzolasyonu yapılan bakterilerin petri ortamındaki resimleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Biyoloji Laboratuvarında çekilmiştir. Koloni resimleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biomühendislik Bölümü Laboratuvarında çekilmiştir (Erdoğan, 2010; Erdoğan vd., 2011).

2.2. İzole Edilen Bakterilerin Ön Tanılaması

28 °C'de 16 – 44 saat gelişim gösteren bakterilerin morfolojik özellikleri, gram boyama reaksiyonları, % 3 KOH ve oksidaz testleri ile (Bactident Oxidase Merck 1.13300 kullanılmıştır) ön tanılamaları yapılmıştır (Holt vd., 1994; Suslow vd., 1982; Arthi vd., 2003).

2.3. Taxonomic Sınıflama (İzole Edilen Bakterilerin MIS (Mikrobiyal Tanılama Sistemi) Tanılaması)

Laboratuvar koşullarında ham petrole dirençli hale getirilen bakterilerin saf kültürlerinden alınan örneklerinde fosfolipit yağ asidi (FLYA) analizi yapılarak sadece kullanılacak biyoremidasyon bakterilerine özgü “indikatör-yağ asitleri” belirlenmiştir. Saf biyoremidasyon bakteri kültürlerinde yapılan FLYA analizi Miller ve Berger tarafından bildirildiği gibi Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Microbial Identification System-MIS; MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Miller ve Berger, 1985). Bu sistem, genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarlarının (yağ asidi profili) aynı olup çevre koşulları aynı olduğu sürece değişmemesini esas alınmaktadır. Genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarları (yağ asidi profilleri) aynıdır ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmez. Yağ asidi metil ester (FAME) analizi yaygın toprak bakterileri belirlenmesi için bir yöntem olarak toprak bilim adamları tarafından kullanılır (Klement vd., 1990; Paisley, 1995; Matsumoto vd., 1997; Şahin, 1997; Şahin vd., 2003a; Şahin vd., 2003b).

2.4. Sıvı Kültürde Petrol Degradasyonunun Değerlendirilmesi

Ham petrolün bakteriler tarafından parçalanma düzeylerinin belirlenmesi amacıyla her bir bakteri kültürü (500 µl) ayrı ayrı 5 ml A ortamı %1'lik ham petrol+ Triton-X100 (1:1) içeren besiyerlerine inoküle edilerek 0. gün ve 5. gün olarak iki örnekleme zamanında 5 ml DCM (diclorometan) eklenerek sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu işlemde ham petrol + triton-X100, DCM içinde çözülerek alt faza geçmiştir. Üst faz alt fazdan ayırarak, uzaklaştırılmıştır. Ekstrakte edilen kısımda toplam yağ asidi miktarı GC-MS sisteminde (HP 680 series GC system, US90704303) analiz edilerek belirlenmesi yapılmıştır (Olivera vd., 1997; Boonchan vd., 2000). Aynı işlem abiyotik kontroller için de yapılmıştır. Bu analiz petrolün biyolojik degradasyonunun bir ölçütü olarak kabul edilmiştir (Boonchan vd., 2000'nin yapmış olduğu analiz modifiye edilerek kullanılmıştır (Erdoğan, 2010).

2.5. Hidrokarbon Ayrıştırıcı Bakterilerin Ham Petrollü Ortamda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik (Biolog 590-750 Nm) Olarak Belirlenmesi

Bakterilerin petrollü ortamda çoğalma yetenekleri; ağırlık bazında (w/w) ham petrol konsantrasyonu (% 1) içeren besi ortamı BIOLOG mikro-kuyucuk sistemine aktarılmış ve daha sonra 33 bakteri kültürü (12s gelişme gösteren) tek tek her bir kuyucuğa 500 µl aşılınmış ve 28 °C–30 °C'de inkübasyona bırakılarak, sıfırıncı saatden 120.saate kadar düzenli aralıklarla bakteri yoğunluğu 620 nm'de spektrofotometrik okuma yapılarak takip edilmiştir (Rahman vd., 2002a, Rahman vd., 2002b). Bütün deneyler, iki tekrarlı yapılmıştır.

3. SONUÇLAR

3.1. İzole Edilen Bakterilerin, % 3 KOH Testi, Oksidaz Testi, Gram Boyama ve MIS Sonuçları

İzole edilen bakterilerin, % 3 KOH testi, oksidaz testi, gram boyama ve MIS sonuçları çizelge 3.1-3.3' de verilmiştir. Laboratuvar kodları her bir petriye sıra ile verilmiş olup, bakteri izolasyonunda binoküler altında bazı petrielerde 2 veya 3 farklı türün tespiti edilmiştir

sonucunda yeni petrilere aktarılmıştır. Petri numarasının yanına harflendirme (a, b) yapılarak kodlama yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Batman topraklarından izole edilen bakterilerin, % 3 KOH testi, oksidaz Testi, gram boyama ve MIS sonuçları

Kod	% 3 KOH	Oksidaz testi	Gr boyama	MIS Sonuçları
1	(-)	nonenterik	Gr (-) kokobasil	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	(-)	nonenterik	Gr (-) kısa çubuk	<i>Paucimonas lemoignei</i>
3	(-)	nonenterik	Gr (-) kokobasil	<i>Pseudomonas mucidolens</i>
4	(-)	nonenterik	Gr (-) kokobasil	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4a	(-)	enterik	Gr (-) kısa çubuk	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
4b	(-)	nonenterik	Gr (-) kısa çubuk	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Escherichia coli</i>
6	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Enterobacter hormaechei</i>
7	(-)	enterik	Gr(-) kısa çubuk	<i>Citrobacter koseri</i>
8	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Pseudomonas putida biotype A</i>
9	(-)	-----	Gr(-) çubuk	<i>Enterobacter hormaechei</i>
10	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Pseudomonas putida biotype A</i>
11	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Pseudomonas putida biotype A</i>
12	(-)	enterik	Gr(-) kısa çubuk	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13 a	(-)	enterik	Gr(-) kısa çubuk	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
13 b	(-)	enterik	Gr(-) kısa çubuk	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
14	(-)	nonenterik	Gr(-) kokobasil	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Çizelge 3.2. Adana topraklarından izole edilen bakterilerin, % 3 KOH testi, oksidaz testi, gram boyama ve MIS sonuçları

Kod	% 3 KOH	Oksidaz testi	Gr boyama	MIS Sonuçları
15	(-)	-----	Gr (-) kokobasil	<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>
16a	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Pseudomonas putida biotype A</i>
16b	(-)	nonenterik	Gr (-) kokobasil	<i>Aeromonas caviae</i>
17	(-)	-----	Gr (-) kokobasil	<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>
18	(-)	enterik	Gr (-) kokobasil	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
19a	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Aeromonas caviae</i>
19b	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
20a	(-)	enterik	Gr(-) kısa çubuk	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
20b1	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Enterobacter hormaechei</i>
20b2	(-)	nonenterik	Gr(-) çubuk	<i>Pseudomonas putida biotype A</i>

Çizelge 3.3 Adıyaman topraklarından izole edilen bakterilerin, % 3 KOH testi, oksidaz testi, gram boyama ve MIS sonuçları

Kod	% 3 KOH	Oksidaz testi	Gr boyama	MIS Sonuçları
21	(-)	nonenterik	Gr (-) kokobasil	<i>Acinetobacter genomospecies</i>
22	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Enterobacter hormaechei</i>
23	(-)	enterik	Gr (-) kısa çubuk	<i>Echerichia fergusonii</i>
24	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Enterobacter sakazakii</i>
25	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Escherichia fergusonii</i>
26	(-)	enterik	Gr (-) çubuk	<i>Enterobacter sakazakii</i>

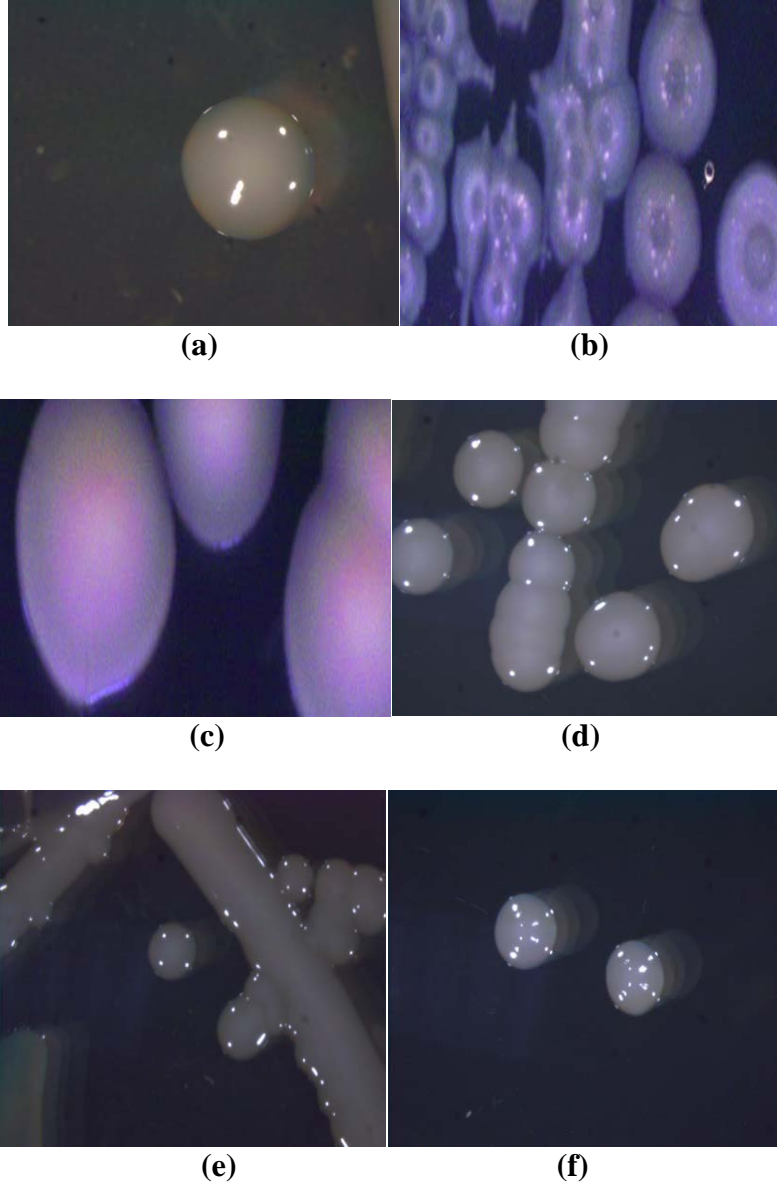
Jürgensen vd. petrol ile kirlenmiş topraklarda kompostlama çalışmasında elde ettikleri izolatlarda 3 numaralı kompost uygulamasından 4 farklı bakteri türü tanımlamışlardır (Jürgensen vd., 2000). *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus mycoides*, *Klebsiella oxytaca* ve *Acinetobacter calcoaceticus*, 1 numaralı kompost uygulamasından *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas diminuta*, *Gluconobacter cerenius*, *Pasteurella caballi*, 2 numaralı kompost uygulamasından *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingobacterium multivorum* ve birçok tanımlanamayan bakteri izolasyonu yapmışlardır. *Sphingobacterium antarcticum*, *Sphingobacterium daejeonense*, *Sphingobacterium faecium*, *Sphingobacterium mizutaii*, *Sphingobacterium multivorum*, *Sphingobacterium spiritivorum* ve *Sphingobacterium thalpophilum* türleri tanımlanmıştır (Yabuuchi vd., 1983; Shivaji vd., 1992; Takeuchi ve Yokota, 1992; Kim vd., 2006).

3.2. Petrol ile Kirlenmiş Topraklardan İzole Edilen Bakterilerin Koloni Fotoğrafları

İzole edilen bakterilerin oluşturmuş olduğu kolonilerin fotoğrafları binokülerler ile çekilmiştir. Koloni resimleri Şekil 1’de verilmiştir.

3.3 Hidrokarbon Ayrıştırıcı Bakterilerin Ham Petrollü Ortamda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik (620 Nm) Olarak Belirlenmesi

Besi ortamındaki bakteriyal gelişim, bakteri artışına bağlı olarak sıvı ortamdaki ışık geçirgenliği spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmiştir. Petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen 33 bakterinin ham petrollü ortamda çoğalma yeteneklerinin spektrofotometrik (Biolog 620 nm) okuma sonuçları Şekil 1’de verilmiştir. Şekil 2’de görüldüğü gibi petrollü (% 1) ortamda en iyi sonucu 1, 4b, 10, 11, 20a ve 21 nolu bakteriler vermiştir ve bu bakterilerin 5.gün sonunda durağan fazdan ölüm fazına geçişleri diğerlerine göre daha geç olmuştur. Benzer çalışma Leahy vd., tarafından 600 nm’de spektrofotometre ile bakteri gelişimleri ölçülerek, hidrokarbon parçalama yetenekleri ortaya konmuştur (Leahy vd., 2003). 620 nm dalga boyunda spektrofotometre ile bakteri gelişimi ve bu bakterilerin hidrokarbon parçalama yetenekleri ayrıca Rahman vd., tarafından belirlenmiştir (Rahman vd., 2002a). Başka çalışmalarla 420 nm dalga boyunda başlangıç ve final ölçümleri yaparak hidrokarbon parçalanma yüzdeleri ortaya konulmuştur (Rahman vd., 2002b). Başka bir çalışmada izole edilen bakterilerin petrol parçalama kinetiği 540 nm’de spektrofotometrede hesaplamışlardır (Hyina vd., 2003). Rahman vd., 420 nm’de *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Flavobacterium* spp. ve *Pseudomonas* spp. bakterilerinin ham petrolü parçalama yeteneklerini ortaya koymuşlardır (Rahman vd., 2002b).

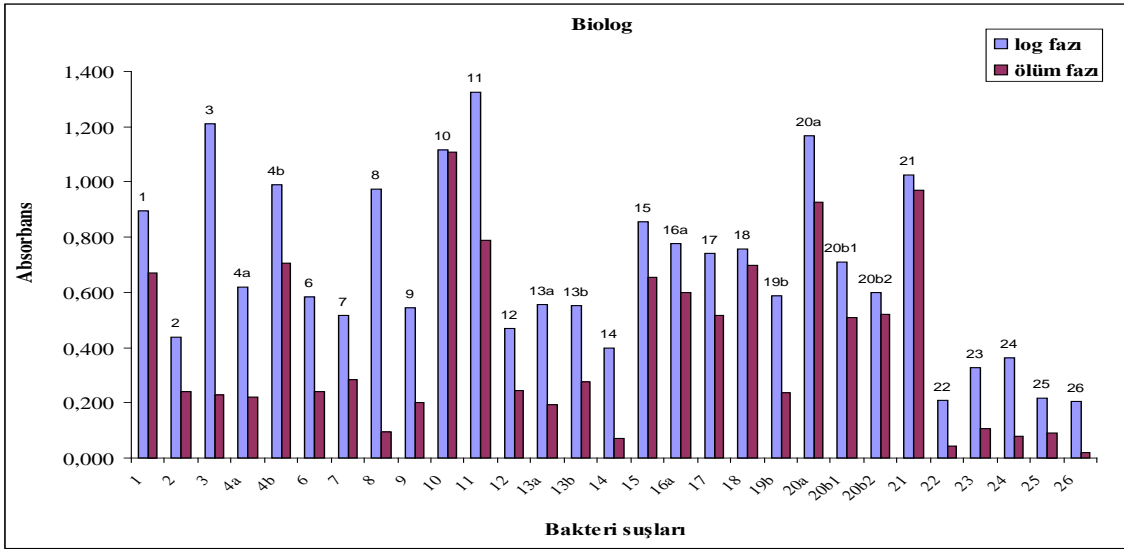


Şekil 1. a) *Pseudomonas aeruginosa* (1), b) *Pseudomonas aeruginosa* (4b), c) *Pseudomonas putida* biotype A, (10) d) *Pseudomonas putida* biotype A (11), e) *Citrobacter amalonaticus*-GC subgroup A (20a), f. *Acinetobacter genomospecies* 3 (21)

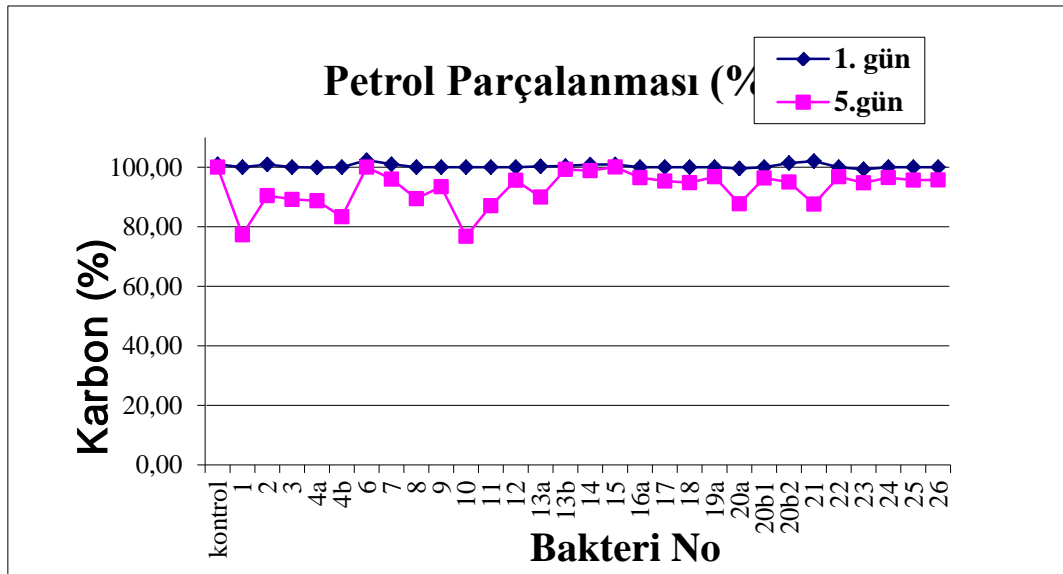
3.4. Sıvı Kültürde Petrol Parçalanmasının Değerlendirilmesi

Ham petrolün bakteriler tarafından parçalanma düzeylerinin belirlenmesi amacıyla her bir bakteri ayrı ayrı % 1'lik ham petrol+Triton-X100 (1:1) içeren besiyerlerinden 1.gün ve 5. gün olarak iki örnekleme zamanında sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır (Boonchon vd., 2000; Erdoğan, 2010). Ekstrakte edilen kısımda toplam yağ asidi miktarı GC-MS sisteminde okunarak sonuçlar petrolün biyolojik parçalanmasının bir ölçütü olarak kabul edilmiştir. Birçok araştırmacı farklı kimyasal ve farklı dalga boyu ile bakterilerin petrol parçalama yeteneklerini ortaya koymuşlardır. Örneğin, metanol:cloroform ((2:1); v/v) karışımı kullanarak parçalanmış hidrokarbon miktarını TLC (Thin layer chromatography) yöntemi ile hesaplamışlardır. Mikrobiyal gelişimi 436 nm'de belirlemişlerdir (Alvarez, 2003). Kapley vd., hegzan ile ekstraksiyon yöntemi kullanarak gas kromatografisinde hidrokarbon parçalanma

kapasitesini ortaya koymuşlardır. Optik yoğunluğu 620 nm’de belirlemişlerdir (Kapley vd., 1999).



Şekil 3.2. Hidrokarbon ayrıştırıcı bakterilerin ham petrolü ortamda çoğalma yeteneklerinin spektrofotometrik (620 nm) olarak belirlenmesi



Şekil 3.3. Sıvı kültürde petrol parçalanmasının değerlendirilmesi

Petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen 33 bakterinin sıvı kültürde (% 1’lik ham petrolü ortamda 1. ve 5.günler arasındaki farkın en yüksek olduğu) en fazla petrol parçalanması 1, 4b, 10, 11, 20a ve 21 nolu bakteri varlıklarında görülmüştür (Şekil 3). Biolog ölçümünde olduğu gibi ham petrolü ortamda en iyi gelişmeyi gösteren bakteriler bu gelişim süreci içerisinde en fazla petrol parçalamışlardır.

Yapılan bütün testlerin sonucunda ham petrolü ortamda çoğalma yetenekleri ve her bir bakterinin petrol parçalama testleri sonucu seçilen bakteri tür ve cinsleri şöyledir.

- 1- *Pseudomonas aeruginosa*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
4b- *Pseudomonas aeruginosa*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
10- *Pseudomonas putida biotype A*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
11- *Pseudomonas putida biotype A* (Batman topraklarından izole edilmiştir),
20a-*Citrobacter amalonaticus-GC subgroup A*, (Adana topraklarından izole edilmiştir),
21- *Acinetobacter genomospecies 3* (Adıyaman topraklarından izole edilmiştir).

4. SONUÇ

Bu araştırmanın temel düşüncelerden biri toprakta petrol ve benzeri maddelerden kaynaklanan kirlilik şartlarını ortadan kaldıracak mikroorganizmaların varlığını belirlemek ve laboratuvar koşullarında etkinliğini değerlendirmektir.

Rojas-Avelizapa vd. (1999) PCB (poliklorinleşmiş bifeniller) ile bulaşmış bir alandan izole ettikleri bakterileri *Comamonas acidovorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium devorans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus mascerans* ve *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlamış ve bu karışık kültürün topraksız invitro koşullarda PCB içeriği yüksek kirleticinin % 75'ni parçaladığını tespit etmişlerdir (Rojas-Avelizapa vd., 1999).

Diğer benzer bir çalışmada Kishore ve Ashis, *Bacillus subtilis* (DM-04), *Pseudomonas aeruginosa* (M) ve Güneydoğu Hindistanda petrol ile kirlenmiş bir bölgeden izole ettikleri bakterileri topraksız invitro ve kirli toprak koşullarında test etmişlerdir (Kishore ve Ashis, 2007). Topraksız ortamda *P. aeruginosa* (M) bakterisinin *Bacillus subtilis* (DM-04)'e göre daha etkin olduğunu belirlemiş ve petrollü toprak deneyinde 120 gün süren inkübasyon süreci sonunda *P. aeruginosa* (M) ve kirli toprak izolatının % 100'e varan bir ayrışma sağlarken *Bacillus subtilis* DM-04'ün % 50 düzeyinde ayrışma sağladığını kaydetmişlerdir. Benzer sonuçları Porta vd.'de bulmuşlardır (Porta vd., 1998). Diğer yandan başka araştırmacılar kompleks hidrokarbonların, fenollerin, fenantrenin ve benzopirenlerin oksidasyon ürünlerinin parçalanmasında gram pozitif bakterilerinde geniş metabolik yetenek sergilediklerini bildirmişlerdir (Sextone vd., 1978; Song ve Barta, 1990).

Bu çalışmada petrol parçalama yeteneklerini belirlemek amaçlı farklı bakteri materyalleri tamamen ülkemiz topraklarından sağlanmıştır (Adana, Batman ve Adıyaman bölgelerinden 33 bakteri suşu izole edilmiştir) ve laboratuvar koşullarında ayrışma testlerinden geçirilmiştir.

Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Microbial Identification System-MIS; MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak bakterilerin saf kültürlerinden alınan örneklerinde fosfolipit yağ asidi (FLYA) analizi yapılmıştır, bakterilere özgü "indikatör-yag asitleri" belirlenerek, tür ve cins bazında tespit edilmiştir.

Hidrokarbon ayrıştırıcı bakterilerin ham petrollü ortamda çoğalma yetenekleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Her bir bakteri suşunun sıvı-sıvı ekstraksiyonu (parçalanma testi) yapılarak ham petrolün bakteriler tarafından parçalanma düzeyleri % olarak belirlenmiştir.

Petrol parçalayan bakterilerin popülasyon dinamiğinde meydana gelen değişimler irdelenmiştir.

Tüm bu testlerin sonucunda ham petrollü ortamda en iyi gelişmeyi gösteren ve ham petrolü parçalama düzeyleri en yüksek olan 6 bakteri suşu belirlenmiştir.

- 1- *Pseudomonas aeruginosa*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
4b- *Pseudomonas aeruginosa*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
10- *Pseudomonas putida biotype A*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),
11- *Pseudomonas putida biotype A*, (Batman topraklarından izole edilmiştir),

20a-*Citrobacter amalonaticus*-GC subgroup A, (Adana topraklarından izole edilmiştir),
21- *Acinetobacter genomospecies 3* (Adıyaman topraklarından izole edilmiştir).

Bu bakteri karışımları petrol kirliliği bulunan bölgelerimiz veya kirlilik tehdidi altında olan topraklarımız için ekonomik ve biyolojik **biyoremediasyon ürünü** elde edilmesi aşamasında önemli bir adım atılmıştır. Bioremediasyon çalışmalarına ışık tutacak nitelikte önemli bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

- Alexander M. (1999): “Biodegradation and Bioremediation”, (2nd edition) Academic Press, San Diego.
- Alvarez H. M. (2003): “Relationship between B-oxidation Pathway and the Hydrocarbon-Degrading Profile in Actinomycetes Bacteria”, International Biodeterioration and Biodegradation, Sayı 52, s.35-42.
- Arthi K., Appalaraju B., Parvathi S. (2003) : “Vancomycin Sensitivity and KOH String Test as An Alternative to Gram Staining of Bacteria”, Int. J. Med. Microbiol., Sayı 21, s.121-123.
- Atlas R. M. (1978): “Microorganisms and Petroleum Pollutants”, BioScience, Sayı 28, s.387-391.
- Atlas R. M. (1981): “Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons”, An Environmental Perspective Microbial Rev., Sayı 45, s.180:209.
- Atlas R. M., Bartha R. (1992): “Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation”, Adv. Microb. Ecol., Sayı 12, s.287-338.
- Bonnier P. D., Akoun G. L., Cadron E. C., Edwards E. D., Hockness W. (1980): “ A Technique for the Disposal of Oily Refinery Wastes”, Rapor No. 3/10, The Hague: Concawe.
- Boonchan S., Britz M. L., Stanley G. A. (2000): “Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures”, Applied and Environmental Microbiology, Cilt 66; No. 3; s.1007-1019.
- Butler C. S., Mason J. R. (1997): “Structure–function Analysis of the Bacterial Aromatic Ring–Hydroxylating Dioxygenases”, Adv. Microb. Physiol., Sayı 38, s.47-84.
- Cerniglia C. E. (1992): “Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, Biodegradation, Sayı 3, s.351-368.
- Cooney J. J. (1980): “Microorganisms Capable of Degrading Refractory Hydrocarbons in Ohio Waters”, Ohio Water Resources Center, Columbus, OH for the Office of Water Research and Technology, Washington, D.C., Rapor No. 493X, https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/36346/1/OH_WRC_493X.pdf Erişim Tarihi: 21.05.2013.
- Demir İ., Demirbağ Z. (1999): “Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Olarak Parçalanması”, Tr. J. of Biology, Sayı 23, s.293-302.
- Desai J. D., Banat J. M. (1997): “Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential”, Microbiol. Mol. Rev., Sayı 61, s.47-64.
- El-Nawawy A. S., Ghobrial F., Elimam A. (1987): “Feasibility Study of Disposal of Oily Sludge in Kuwait”, Proceeding of the 2. International Conference on New Frontiers for Hazardous Waste Management, Pittsburgh, 27-30 September, s.162-8.
- Erdoğan E. E. (2010): “Petrol ile Kirlenmiş Toprakların Biyolojik Olarak İyileştirilmesinin Laboratuvar Koşullarında Denenmesi”, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

- Erdoğan E. E., Şahin F., Karaca A. (2011): “Determination of Petroleum-Degrading Bacteria Isolated from Crude Oil-Contaminated Soil in Turkey”, African Journal of Biotechnology, Cilt 11, No. 21, s. 4853-4859, <http://www.academicjournals.org/AJB> Erişim Tarihi: 13 Mart 2012.
- Fall R. R., Brown J. L., Schaeffer T. L. (1979): “Enzyme Recruitment Allows the Biodegradation of Recalcitrant–Branched Hydrocarbons by *Pseudomonas Citronellolis*”, Appl. Environ. Microbiol., Sayı 38, s.715-722.
- Hagwell I. S., Delfino L. M., Rao J. J. (1992): “Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from oil into water”, Environ. Sci. Technol., Sayı 26, s.2104-2110.
- Hyina A., Castillo S. M. I., Villarreal S. J. A., Ramirez E. G., Candelas R. J. (2003): “Isolation of Soil Bacteria for Bioremediation of Hydrocarbon Contamination”, Cilt 44, No:1, s.88-91.
- Holt J. G., Kreig N. R., Sneath P. H. A., Stanely J. T., Williams S. T. (1994): “In: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, (Ed: J. G. Holt, N.R. Krieg) Cilt 1, s.141-199.
- Jack T. R., Lee E., Mueller J. (1985): “Anaerobic Gas Production from Crude Oil”, Int. Bioresources J., 1, s.167-185.
- Johnson K., Anderson S., Jacobson C. S. (1996): “Phenotypic and Genotypic Characterization of Phenanthrene-Degrading Fluorescent *Pseudomonas* Biovars”, Appl. Environ. Microbiol., Sayı 62, s.3818-3825.
- Jürgensen K. S., Puustinen J. A., Suortti M. (2000): “Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Composting in Biopiles”, Environmental Pollution, Sayı 107, s.245 - 254.
- Kapley A., Purohit H. J., Chhatre S., Shanker R., Chakrabati T., Khanna P. (1999): “Osmotolerance and Hydrocarbon Degradation by a Genetically Engineered Microbial Consortium”, Biosource Technology, Sayı 67, s.241-245.
- Keith L. H., Telliard W. A. (1979): “Priority Pollutants 1-A Perspective View”, Environ. Sci. Technol., Sayı 13, s.416-423.
- Kim K. H., Ten L. N., Liu Q. M., Im W. T., Lee S .T. (2006): “*Sphingobacterium Daejeonense* sp. nov., Isolated from a Compost Sample”, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Sayı 56, s.2031–2036.
- Kishore D., Ashis M. K. (2007): “Crude Petroleum-Oil Biodegradation Efficiency of *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil from North-East India”, Bioresource Technology, Sayı 98, s.1339-1345.
- Kiyohara H., Takizawa N., Nagao K. (1992): “Natural Distribution of Bacteria Metabolizing Many Kinds of Polyaromatic Hydrocarbons”, J. Ferment. Bioeng., Sayı 74, s.49–51.
- Klement Z., Rudolph K., Sands D. C. (1990): “Methods in Phytobacteriology”, Akademia Kiado, Budapest.
- Komukai-Nakamura S., Sugiura K., Yamauchi-Inomata Y., Toki H., Venkateswaran K., Yamamoto S., Tanaka H., Harayama S. (1996): “Construction of Bacterial Consortia that Degrade Arabian Light Crude Oil”, Journal of Fermentation and Bioengineering, Sayı 82, s.570–574.
- Leahy J. G., Tracy K. D., Eley M. H. (2003): “Degradation of Mixtures of Aromatic and Chloroaliphatic Hydrocarbons by Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria”, FEMS Microbiology Ecology, Sayı 43, s.271-276.
- Matsumoto M., Furuya N., Matsumaya N. (1997): “Characterization of *Rhizoctonia* Spp., Causal Agents of Sheath Diseases of Rice Plant, by Total Cellular Fatty Acid Analysis”, Ann. Phytopath. Soc. Japon, Sayı 63, s.149-154.

- Miller I., Berger T. (1985): "Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acids", Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., s.228-238.
- Odu C. T. I. (1977): "Pollution and the Environment", Bull. Sci. Assoc. Nig., Cilt 3, No. 2, s.284 -285.
- Ojumu T. V., Bello O. O., Sonibare J. A., Solomon B. O. (2005): "Evaluation of Microbial Systems for Bioremediation of Petroleum Refinery Effluents in Nigeria", African Journal of Biotechnology, Cilt 4, No. 1, s.31-35.
- Olivera N. L., Esteves J. L., Commendatore M. G. (1997): "Alkane Biodegradation by A Microbial Community from Contaminated Sediments in Patagonia, Argentina", İnt. Biodeterioration and Biodegradation, Cilt 40, No. 1, s.75-79.
- Ökmen K. G., Algur Ö. F. (2000): "Farklı Karbon Kaynaklarının ve C/N Oranlarının Mikrobiyal Denitrifikasyon Üzerine Etkileri", Turk J. Biol., Sayı 24, s.533-542.
- Paisley R. (1995): "MIS Whole Cell Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography", MIDI, Inc., Newark, DE, 5.
- Peressuttia S. R., Alvarez H. M., Oscar H. P. (2003): "Dynamics Ofhydrocarbon-Degrading Bacteriocenosis Ofan Experimental Oil Pollution in Patagonian Soil", International Biodeterioration and Biodegradation, Sayı 52, s.21-30.
- Pokethitiyook P., Sungpetch A., Upathame S., Kruatrachue M. (2002): "Enhancement of Acinetobacter Calcoaceticus in Biodegradation of Tapis Crude Oil", 17th WCSS, Symposium, No. 42, Thailand.
- Porta A., Trovato A., McCarty K., Uhler A., Andreotti G. (1998): "Degredation of Saturated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Formation of their Metabolites in Bioremediated Crude Oil Containing Sois", (Ed: B. C. Alleman, A. Leeson), Cilt 1, s.505-510.
- Rahman K. S. M., Thahina J., Rahman Y., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. M. (2002a): "Towards Efficient Crude Oil Degradation by A Mixed Bacterial Consortium", Bioresource Technology, Sayı 85, s.257-261.
- Rahman K. S. M, Banat I. M., Thahira J., Thayumanavan T., Lakshmanaperumalsamy P. (2002b): "Bioremediaton of Gasoline Contaminated Soil by a Bacterial Consortium Amended with Poultry Litter, Coir Pith and Rhamnolipid Biosurfactant", Bioresource Technology, Sayı 81, s.25-32.
- Rhykerd R. L., Crews B., McInnes K. J., Weaver R. W. (1998): "Impact of Bulking Agents, Forced Aeration, and Tillage on Remediation of Oil-Contaminated Soil", Bioresource Technology, Sayı 67, s.279-285.
- Rojas-Avelizapa N. G., Rodriguez-Vazquez R., Enriquez-Villanueva F., Martinez-Cruz J., Poggi-Varaldo H. M. (1999): "Transformer Oil Degradation by An Indigenous Microflora Isolated from A Contaminated Soil", Resources, Conservation and Recycling, Sayı 27, s.15-26.
- Sextone A. J., Everett K., Jenkins T., Atlas R. (1978): "Fate of Crude and Refined Oils in North Slope Soils", Arctic, Sayı 31, s.339-347.
- Shivaji S., Ray M. K., Rao N. S., Saisree L., Jagannadham M. V., Kumar G. S., Reddy G. S. N., Bhargava P. M. (1992): "Sphingobacterium Antarcticus Sp. Nov., A Psychrotrophic Bacterium from the Soils of Schirmacher Oasis, Antarctica", Int. J. Syst. Bacteriol., sayı 42, s.102-106.
- Song H .G., Bartha R. (1990): "Effects of Jet Fuel on The Microbial Community of Soil", Appl. Environ. Microbiol., Sayı 56, s.646-651.
- Steffan R., Mccloy J. K., Vainberg S., Condee C. W., Zhang D. (1997): "Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyle Tert-Butyl Ether, Ethyl Tert- Butyl Ether and tert-

- Amyl Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Cilt 63, No. 11, s.4216-4222.
- Suslow T. V., Schroth M. N., Isaka M. (1982): “Application of A Rapid Method For Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining”, *Phytopathology*, Sayı 72, s.917-918.
- Şahin F. (1997): “Detection, Identification and Characterization of Strains of *Xanthomonas Campestris* pv. *Vesicatoria* by Traditional and Molecular Methods, and Resistance in *Capsicum* Species to *Xanthomonas Campestris* pv. *Vesicatoria* Pepper Race6.”, The Ohio State University, Doktora Tezi.
- Şahin F., Abbasi P. A., Lewis I. M. L., Zhang J., Miller S. A. (2003a): “Diversity Among Strains of *Xanthomonas Campestris* pv. *Vitians* From Lettuce”, *Phytopathology*, Sayı 93, s.64-70.
- Şahin F., Kotan R., Abbasi P. A., Miller S.A . (2003b): “Phenotypic and Genotypic Characterization of *Xanthomonas Campestris* pv. *Zinniae* Strains”, *European J. Plant Pathol.*, Sayı 109, s.165-172.
- Takeuchi M., Yokota A. (1992): “Proposals of *Sphingobacterium Faecium* Sp. Nov., *Sphingobacterium Piscium* Sp. Nov., *Sphingobacterium Heparinum* Comb. Nov., *Sphingobacterium Thalpophilum* Comb. Nov. and Two Genospecies of the Genus *Sphingobacterium*, and Synonymy of *Flavobacterium Yabuuchiae* and *Sphingobacterium spiritivorum*”, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Sayı 38, s.465–482.
- Walter M. V., Nelson E. C., Firmstone G., Martin D. G., Clayton M. J., Simpson S., Spaulding S. (1997): “Surfactant Enhances Biodegradation of Hydrocarbons: Microcosm and Field Study”, *Journal of Soil Contamination*, Cilt 6, No. 1, s.61-77.
- Wilson C. S., Jones K. C. (1993): “Bioremediation of Contaminated With Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review”, *Environmental Pollution*, Sayı 81, s.229-249.
- Van Hamme J. D., Singh A., Ward O. P. (2003): “Recent Advances in Petroleum Microbiology”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Cilt 67, No. 4, s.503-549.
- Yabuuchi E., Kaneko T., Yano I., Moss C. W., Miyoshi N. (1983): “*Sphingobacterium* Gen. Nov., *Sphingobacterium Spiritivorum* Comb. Nov., *Sphingobacterium Multivorum* Comb. Nov., *Sphingobacterium Mizutae* Sp. Nov., and *Flavobacterium Indologenes* Sp. Nov.: Glucosenonfermenting Gram-Negative Rods in CDC Groups IIK-2 and IIB”, *Int J Syst Bacteriol*, Sayı 33, s.580–598.