

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİRLİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN
ETKİLERİYLE HAM PETROLÜN BİYODEGRADASYONU**

Khalaf Mohammed Khalaf Khalaf

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2022**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Khalaf Mohammed Khalaf AL-JUBORUI tarafından hazırlanan “**KİRLİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN ETKİLERİYLE HAM PETROLÜN BİYODEGRADASYONU**” adlı tez çalışması 02/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Prof. Dr. Yassin Hussein Owaid AL-JUBOURI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mine TÜRKTAS
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Ttoprak İlmi ve Ekoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“KİRLİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN ETKİLERİYLE HAM PETROLÜN BİYODEGRADASYONU”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (02/02/2022).

Khalaf Mohammed Khalaf Khalaf

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KİRLİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN ETKİLERİYLE HAM PETROLÜN BİYODEGRADASYONU

Khalaf Mohammed Khalaf Khalaf

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman: Prof. Dr. Yassin Hussein Owaid AL-JUBOURI

Zenginleştirme kültürü tekniği ile mikroorganizmaların izole edilmesinin önemli bir avantajı, esas olarak mikroorganizmaların kullanıldıkları test tipinin kriterlerine ve ihtiyaçlarına göre izole edilmesine ve seçilmesine izin vermesidir. Enerji ve karbon, bakteri suşlarının ham yağ eklenmiş kültür ortamında adapte olma ve büyüme yeteneği, temel olarak, çeşitli hidrokarbonları aerobik olarak kullanma kabiliyetine sahip çok çeşitli mikroorganizmaların bulunması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Biyobozunma tekniği, petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş ortamların biyolojik arıtımı için son derece uygun bir alternatiftir. Biyobozunma; yağ gibi organik bir maddenin, canlı bir organizmanın, genellikle bir mikroorganizmanın ve özellikle de bakterilerin etkisiyle ayrışmasıdır. Doğaya ve mevcut hidrokarbona bağlı olarak farklı aşamalardan oluşur. Petrolde bulunan hidrokarbonlar, balıklarda ve diğer organizmalarda ölüme neden olmakta, esas olarak balıkçılık endüstrisinin faaliyetlerini ve ayrıca kıyı ve karasal bölgelerin tropik zincirlerini etkileyerek ciddi ekolojik sorunlara yol açmaktadır.

2022, 101 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: Bakteriyel bozulma, Ham petrol, Kirleticileri, Çevresel tedavi

ABSTRACT

Master of Science Thesis

BIODEGRADATION OF CRUDE OIL BY THE ACTION OF SOME BACTERIAL SPECIES ISOLATED FROM POLLUTED SOILS

Khalaf Mohammed Khalaf Khalaf

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Prof. Dr. Yassin Hussein Owaid AL-JUBOURI

An important advantage of isolating microorganisms with the enrichment culture technique is that it allows the isolation and selection of microorganisms primarily based on the criteria and needs of the test type in which they are used. Energy and carbon, the ability of bacterial strains to adapt and grow in culture medium supplemented with crude oil is mainly due to the fact that there is a wide variety of microorganisms capable of using various hydrocarbons aerobically. The biodegradation technique is an extremely suitable alternative for the biological treatment of media contaminated with petroleum hydrocarbons. Biodegradation; It is the decomposition of an organic substance such as oil, a living organism, usually a microorganism, and especially by the action of bacteria. It consists of different stages depending on the nature and the hydrocarbon present. Hydrocarbons in oil cause death in fish and other organisms, mainly affecting the activities of the fishing industry, as well as the tropical chains of coastal and terrestrial regions, causing serious ecological problems.

2022, 101 pages

Keywords: Bacterial degradation, Crude oil, Pollutants, Environmental treatment

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

“KİRLİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN ETKİLERİYLE HAM PETROLÜN BİYODEGRADASYONU” Adlı bu çalışma 2019-2021 yılları arasında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne “Yüksek Lisans Tezi” olarak sunulmuştur. Yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN ve çalışmalarım esnasında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan annem, babam, kardeşlerim, eşim ve çocuklarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, bu çalışmanın yazılmasında bana yardımcı olan herkese teşekkür ediyorum.

Khalaf Mohammed Khalaf Khalaf
Çankırı, Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Petrol Hidrokarbonlarının Kimyasal ve Fiziksel Sınıflandırılması	3
2.2 Petrol Sızıntısı.....	5
2.3 Biyotransformasyon.....	5
2.4 Aktinobakteriler	9
2.5 Biyolojik Bozunma	12
2.5.1 Petrol biyobozunması	13
2.5.2 Hidrokarbonların aktinobakteriler tarafından biyodegradasyonu	15
2.5.3 N-alkanların bozulması	16
2.6 Kirlenmiş Ortamların Biyoremediasyonu	18
2.6.1 Biyolojik artış	22
2.6.2 Biyo havalandırma	23
2.6.3 Fitoremediasyon	24
2.6.4 Arazi çiftçiliği	25
2.6.5 Biyopiller	25
2.6.6 Kompostlama.....	26
2.7 Petrolün Zemine Etkisi	26
2.8 Irak Kürdistan Bölgesi'nin Edafik Özellikleri	28
2.9 İncelenen Toprakların Asitliği ve Tuzluluğu.....	29
2.10 Bakteri.....	30
2.10.1 Toprakta dağılım ve bakteri bolluğu	31
2.10.2 Hidrokarbonları parçalayabilen bakteriler.....	32

2.11 Hidrokarbonların Bozunması	34
2.12 Genel Hedef	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Materyal	39
3.2 Yöntem	40
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ.....	103



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
C°	Sıcaklık
mg	Miligram
mL	Mililitre
pH	Hidrojenin Gücü t
ul	Mikrolitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Alkanların biyolojik olarak parçalanması.....	6
Şekil 2.2 Alkan döngüsünün oksidasyon süreci.....	7
Şekil 3.3 Metan oluşumu	20
Şekil 3.1 Toprak örneklerinin çıkarıldığı üç alanın coğrafi referanslandırılması	41
Şekil 3.2 Bakteri sayımı için dilüsyonların hazırlanma şeması.	46
Şekil 4.1 CFU plakası sayısı (En az seyreltilmişten (solda) en çok seyreltilmişe (sağda)	55
Şekil 4.2 Kontrol ham petrolünün kızılötesi spektrumu	68
Şekil 4.3 C180: <i>Bacillus coagulans</i> suşu ile bozunma kinetiği	70
Şekil 4.4 <i>Bacillus brevis</i> (C88 suşu) ile muamele edilmiş ham petrol İstiridyasının bozunma kinetiği.....	72
Şekil 4.5 <i>Bacillus coagulans</i> ve <i>Bacillus brevis</i> tarafından ham petrolün parçalayıcı kinetiği	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tedavi seçiminde baskın faktörler	18
Çizelge 2.2 pH'ın suya göre yüzde olarak frekans dağılımı (1: 2.5).....	29
Çizelge 3.1 Kültür ortamı.....	48
Çizelge 3.2 KRI topraklarına özgü iki bakteri suşu tarafından ham petrolün bozunması için deneysel tasarım.	49
Çizelge 4.1 Zeminlerin granülometrik analizi	50
Çizelge 4.2 Toprakların kimyasal analiz sonucu (Kürdamir).	51
Çizelge 4.3 Toprakların kimyasal analiz sonucu (Kurdamir)	52
Çizelge 4.4 KRI topraklarında belirlenen heterotrofik bakteri popülasyonları.....	55
Çizelge 4.5 Seçilen bakteri kolonilerinin maksimum boyutu	56
Çizelge 4.7 Seçilmiş 13 bakteri suşu için istatistiksel analiz	66
Çizelge 4.8 Yağ eklenmiş mineral et suyunda bakteri kültürlerinin taze ağırlığı.....	67
Çizelge 4.9 Seçilen bakteri suşlarının taksonomik tespiti.....	67
Çizelge 4.10 <i>Bacillus coagulans</i> ve <i>Bacillus brevis</i> suşlarına göre ham petrolün biyolojik bozunma hızı.....	74
Çizelge 4.11 <i>Bacillus coagulans</i> ve <i>Bacillus brevis</i> tarafından ham petrol bozunmasının analizi	76

1. GİRİŞ

Petrol, Latince 'Petra' (taş) ve 'oleum' (yağ) kelimelerinden türetilen karmaşık bir hidrokarbon karışımıdır. Petrol, karakteristik değişen yağlı, yanıcı bir maddedir ve siyah-açık kahverengi renkleri arasındadır. Petrol milyonlarca yıl önce düşük oksijen seviyesindeki bakteriler tarafından organik maddenin parçalanmasından ortaya çıkmıştır. Bu parçalanma okyanusların, denizlerin ve göllerin dibinde birikerek, petrol denilen yağlı maddenin yer kabuğunun baskısı altına girmesini sağlamaktadır.

Petrol, Dünya'da büyük önem taşımaktadır ve yenilenemeyen bir enerji kaynağıdır. Ham petrol, hafif kısımları gazları, ağır kısımları ham petrolü oluşturan ve hidrokarbon zinciri ile temsil edilen bir grup farklı bileşik içermektedir. Hidrokarbon zincirindeki farklılıklar, dünyadaki farklı yağ türlerinin belirlenmesine neden olmaktadır. Solventler, akaryakıtlar, benzin, motorin, gazyağı, uçak benzini, yağlayıcılar, asfalt, plastik vb. örnek olarak sayılabilir. 19. yüzyılda, petrol kuyularının açılmasına ve sondaj çalışmalarına başlanmıştır. Bunu takiben, petrol endüstrisi, özellikle de benzinli ve dizel motorların icadı ile özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da uluslararası pazarda büyük bir genişleme yaşanmıştır (Völgyesi and Moser 1982).

Son yıllarda, dünyanın petrol taşımacılığı giderek verimsiz hale gelerek farklı ekosistemler üzerinde farklı türde etkilere neden olmuştur. Bu nedenle, biyolojik bozunma, aktinik bakteriler gibi mikroorganizmaların etkisiyle, kirli ortamın toksisitesini azaltan, organik maddenin ayrışması yoluyla petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş ortamların biyolojik olarak iyileştirilmesini sağlayan uygun yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kirlenmiş ekosistemin biyolojik olarak iyileştirilmesi, doğal mikroorganizmaların uyarılması, besinlerin ve oksijenin eklenmesi ile sağlanabilir. Fakat, kirli ortamda bulunan bileşiklerin çeşitliliği yapılacak olan uygulamalardaki farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Uygulamalardaki farklılıklar; sahada, kaza mahallinde veya dışında, kontaminasyon sahası dışında, biyolojik arıtma vb biyoremediasyon ilkesine dayalı olarak kullanılan farklı teknolojileri içermektedir. En uygun yöntemin seçimi kirleticinin ortamdaki mevcudiyetine bağlı olmaktadır (Naman *et al.* 2019).

Bu çalışmada, ham petrol ile kirlenmiş toprağı iyileştiren ve toprağa bağlı hidrokarbonları en iyi parçalama kabiliyetine sahip olan bakteriler izole edilmiştir. Ayrıca, iyileştirme aşamalarındaki toprakların fiziksel ve kimyasal göstergeleri, hidrokarbon bileşenlerinin bozunma derecesi, bakteriyel aktivite için gerekli besinlerin varolma derecesi ve kirlilik alanını oluşturan çevresel faktörler araştırılmıştır. Bunlara ek olarak, ham petrol ile mevsimsel kirlilik ve dietil eter kullanılarak yıllık doğal bozulma miktarı ölçülerek uygulanan yöntemlerin daha önceki çalışmalar ile karşılaştırılması yapılmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Petrol Hidrokarbonlarının Kimyasal ve Fiziksel Sınıflandırılması

Petrol, mutlak bir hidrokarbon baskınlığı ile sayısız organik bileşiğin oluşturduğu bir karışımdır. Kimyasal bileşimleri kökenlerine göre değişir ve bunları saf kimyasal bileşenlerine ya da bilinen bileşimdeki karışımlara ayırmak pratik olarak imkansızdır.

Petrolde, karışıma ek olarak, gaz, sıvı veya katı halde, gözeneklerde ve kırıklarda, genel olarak tortul kayalarda az miktarda azot, kükürt ve oksijen bulunur. Tortular ayrıca tuzlu su ve petrolün açılan kuyulardan yükselmesine neden olan basınçtan sorumlu bir gaz karışımı içerir. En önemli ticari ürün olan rafine yağdan ayırt edilmesi için sıvı yağa ham petrol de denilmektedir. Petrol gazı (doğal gaz) hafif hidrokarbonların bir karışımı iken yarı katı formlar ağır hidrokarbonlardan oluşur. Hidrokarbonlar, karbon ve hidrojenin oluşturduğu organik bileşiklerdir. Yapılarına göre doymuş, doymamış ve aromatik olarak sınıflandırılırlar (James, 2006).

Doymuş hidrokarbonlarda karbon atomları yalnızca basit bağlarla ve mümkün olan en fazla sayıda hidrojen atomuyla birleştirilir. Moleküller, karbon atomlarını doyurmaya yetecek kadar hidrojen atomu içerir. Zincir, dallanmış veya döngüsel lineer formda, birbirine bağlı veya bağlı olmayan olarak gözlemlenebilir.

Parafinler veya alkanlar, karbon atomları arasında basit bağlar bulunan düz zincirlere sahiptir. Parafin terimi, Latince 'parum' küçük ve 'affinis' afinite anlamına gelen iki kelimeden oluşur. Alkanların fiziksel özelliklerinden bazıları şunlardır: 25 °C oda sıcaklığında lineer zincirlerde 4 karbon atomuna kadar gaz halindedir, C5'ten C17'ye kadar olan alkanlar sıvıdır ve 18'den fazla karbon atomuna sahip alkanlar katıdır. (Simanzhenkov, 2003).

Aromatik bileşikler, temel yapılarında, aralarında değişen çift bağlar bulunan altı karbon atomlu bir halka sunan kapalı zincirli hidrokarbonlardır; bu temel birime, rezonans olgusunun doğrulandığı benzen adı verilir.

İki veya daha fazla halkaya sahip hidrokarbonlara polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) denir, bu hidrokarbonlar yağın en toksik bileşenleri olarak kabul edilir ve kanserojen bir etki ile ilişkilendirilir. Birçok düşük moleküler ağırlıklı PAH suda çözünür ve kontaminasyon riskini artırır (Lur'e, 2003).

Petrol, günümüz uygarlığı için ana enerji kaynaklarından biridir ve dünya genelinde tüketimin artması onu çevreye kazandırmıştır. Dünya’da, petrol taşıma ve boşaltma işlemleri genellikle bu ürünlerle kazaların görülme sıklığını artıran faaliyetler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kazalar, farklı küresel ekosistemler üzerinde çok sayıda etki yaratmaktadır .

Petrol deniz suyuyla temas ettiğinde birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreç meydana gelir ve bunların her birinin şiddeti zamanla değişir. Petrolde; buharlaşma, çözünme, dispersiyon, emülsifikasyon, foto oksidasyon, çökelme ve biyolojik bozunma, solventler, parke malzemesi gibi bazı işlemler ve ürünler bulunmaktadır. Bu petrol ürünleri, elektrik üretiminin yanı sıra doğrudan yakma yoluyla dünyanın toplam enerji arzının yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Bu sayede dünyanın birçok yerinde halk aydınlanma ihtiyaçlarını gidermektedir. Ayrıca, sentetik kumaş, sentetik kauçuk, sabun, deterjan, boya, plastik, böcek ilaçları, gübre vb. malzemelerin imalatında da bu yan ürünler kullanılmaktadır. Üç kısma ayrılabilirler: alifatik, alisiklik ve aromatik. Gaz, sıvı veya katı halde, gözenek ve kırıklarda, genellikle tortul kayaçlarda bulunurlar (Selley ve Sonnenberg 2015).

Petrolün bozunma hızı, yağın fiziksel ve kimyasal özelliklerine, hava durumuna ve iklime bağlıdır. Hidrokarbonlar, sudaki tortullarda, ışık ve oksijen yokluğunda çok yavaş bozunmaktadır. Tortuda, yağın bozunması suya göre çok daha yavaştır, çünkü daha hafif bileşikler daha uzun süre kalır. Hidrokarbonlar, askıda kalan malzemenin parçacıkları üzerinde adsorpsiyona uğrar ve bu da tortularda güçlü bir birikim eğilimine

neden olur. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), petrolün yapısında büyük oranda bulunan bileşiklerdir. Bu kirleticiler, farklı besin zincirlerinde biyolojik olarak birikme kabiliyetine sahip olduklarından canlılar üzerinde toksik etkilerinin yanı sıra kanserojen, mutajenik, teratojenik olarak bilinmeleri nedeniyle çevresel bir öncelik olarak kabul edilmekte ve sıklıkla izlenmelidirler (El Nady *et al.* 2012).

2.2 Petrol sızıntısı

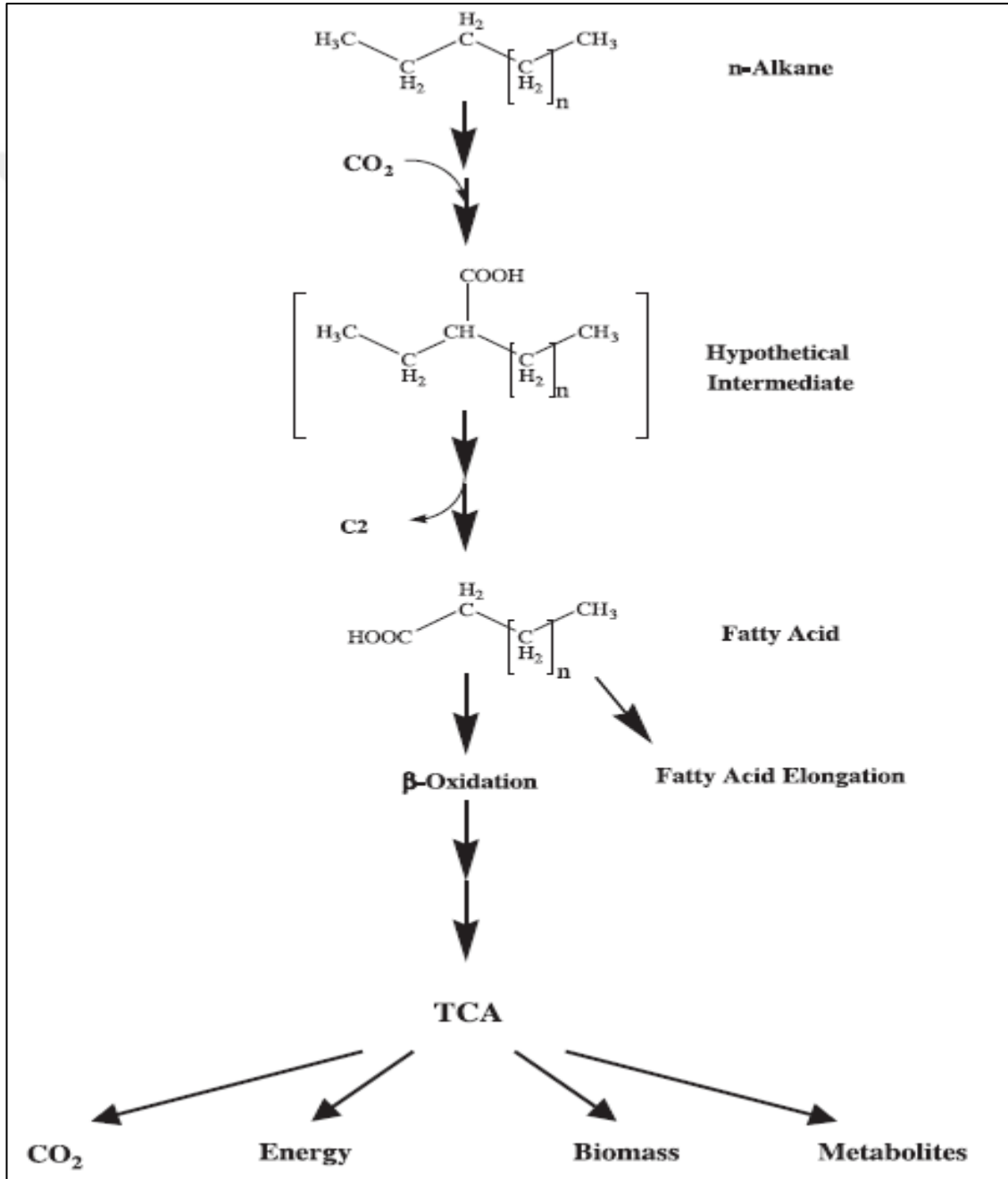
Petrol sızıntısı genellikle, karaya doğru gemileri çeken çalkantılı sular, delinmiş platformlar, kuyu patlamaları, mevcut kapasitesinin üstünde yükleme yapan tanklar nedeniyle olmaktadır. Petrol, su ile temas ettiğinde, daha düşük moleküler ağırlığa sahip olan moleküller ilk 24 ve 48 saat boyunca güçlü bir buharlaşma ve çözünme sürecine girmektedir. Bu şekilde, deniz ve kara ortamındaki organizma topluluğu üzerindeki etkiyi azaltarak, petrolün bileşiminde önemli bir değişiklik meydana gelmektedir. Denize döküldükten sonra petrol, bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik işleme tabi tutulmaktadır. Genellikle, petrol sızıntıları daha çok sularda meydana gelmesine karşın kıyı şeridinin yakınlığına bağlı olarak bozulma çok farklı olabilmektedir. Toprağı kirletmenin haricinde, balık ve mercan gibi mevcut canlıların ölümüne ve lokalize alanın verimsiz ve toksik hale gelmesine neden olmaktadır. Bu sebeple, suda canlılar için yaşam sürdürülemez hale gelmektedir. Ayrıca su yüzeyinde oluşan film tabakası insanlar için suyun kullanımını imkansız hale getirmektedir. Petrol sızıntısının kıyıya ulaşması da ciddi anlamda zararlara yol açmaktadır. (Hobson ve Pohl 1973).

2.3 Biyotransformasyon

Mikrobiyal büyüme için enerji sağlayan biyotransformasyonlar, vericilerin ve elektron alıcılarının varlığına bağlıdır. Bu nedenle, biyolojik bozunmanın gerçekleşmesi için bir karbon kaynağına ek olarak besinlerin eklenmesi gerekmektedir. Birçok organik kirletici, elektron donörleri olarak hareket ederek büyüme gereksinimlerini karşılayabilmektedir. Bu tür kirleticiler, mikrobiyal metabolizmanın bir sonucu olarak oksidasyona uğramaktadır. Mikrobiyal büyüme için, ara bileşikler bir karbon kaynağı

olarak asimile edilebilmekte, $-NH_2$, $-NO_2$ ve $-SO_3$ gibi fonksiyonel gruplar ise besin kaynağı olarak kullanılabilir.

Oksidasyon aerobik veya anaerobik olarak gerçekleşmektedir. Aerobiyozda, oksijen son alıcı olarak hareket ederek, inorganik kombinasyonlar nitrat, metal iyonları, sülfatlar veya karbon dioksit oksitlenmektedir (Speight 1999).

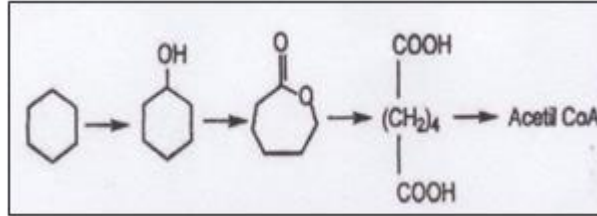


Şekil 2.1 Alkanların biyolojik olarak parçalanması

N-alkanların biyolojik bozunması, normal olarak bir monoterminal sıra ile ilerlemektedir. Zincir, alifatik bileşimin molekülüne, moleküler bir oksijen atomu sokan bir monoksijenaz tarafından saldırıya uğrar, daha sonra bir aldehide ve son olarak bir karboksilik aside oksitlenen bir birincil alkol oluşumu meydana gelmektedir (Şekil 2.1).

Karboksilik asit, β -oksidasyon yoluyla parçalanarak, iki karbon daha az yağ asitleri ve asetil-koenzim A oluşturarak ve sonunda CO_2 salınmaktadır. Oksijenle ilk oksidasyon aşaması, anoksik koşullar altında mümkün değildir, bu da metan hariç, alkanların anaerobik olarak inatçı olduğuna dair kanıtları arttırmaktadır. Bu işlemle oluşan bazı yağ asitleri toksik olabilir ve biyolojik bozunma işlemi sırasında birikebilmektedir (Brakstad *et al.* 2004).

Alkan döngüsü, biyolojik bozunmaya karşı özellikle dirençlidir. Bento (2005) altı adede kadar yoğunlaştırılmış halkadan oluşan ve yavaş yavaş bozunabilen siklik hidrokarbonların bulunduğunu bildirmektedir. Oksitlendikten sonra, bu bileşiklerin bozulma süreci halkaların bölünmesiyle devam eder ve ketonlara veya alkollere doğru ayrışım meydana gelir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Alkan döngüsünün oksidasyon süreci

Metabolizma yolu, daha sonra bir dehidrojenasyona uğrayan ve ardından karşılık gelen ketonları oluşturan siklik alkollerdeki oluşumdan geçer. Tüm süreç, siklohidrojenazlar ve monoksijenaz enzimleri tarafından katalize edilir. Sonraki aşamada, monooksijenazların aracılık ettiği halka laktonizasyonu meydana gelir ve halkanın laktonahidrolaz tarafından açılmasına yol açar.

Dallanmış açık zincirli alkanlar mikroorganizmalar tarafından bozunabilir, ancak uzamsal konfigürasyonları nedeniyle oksidasyona enzimatik erişim bozularak biyolojik

bozunabilirlik oranını düşürür. Dikarboksilik asitlerin oluşumuyla birlikte bozunduruca bir yol olarak β -oksidasyona uğrayacaklardır.

Alkenler ve alkinler gibi doymamış alifatik bileşikler, alkanlara benzer mekanizmalar yoluyla aerobik olarak parçalanmaktadır. Bununla birlikte, ikili ve üçlü bağlar kimyasal olarak daha reaktiftir ve epoksidasyon (oksijen transfer reaksiyonu) veya hidrasyon gibi ek reaksiyonlara girebilmektedir. İkili ve üçlü kimyasal bağlar daha sonra aerobik olarak bir alkol oluşturmak üzere hidratlanabilmektedir. Alkenler ve alkinler, aerobik ve anaeroblar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Her iki organizma türü de hidrasyon yoluyla ilk moleküle saldırılmaktadır (Størdal *et al.* 2015).

Üç halkaya kadar olan aromatik hidrokarbonlar daha kolay bozunmaktadır. Birçok aromatik bileşik sınıfının aerobik biyolojik bozunması, bir ara ürün olan katekolün oluşumu yoluyla ilerlemektedir. En hafif aromatik bileşikler, çözünmüş halde buharlaşmaya ve mikrobiyal bozulmaya maruz kalmaktadır. Enzimatik saldırı, alkil üzerinde veya doğrudan halka üzerinde olabilmektedir.

Aromatik petrol hidrokarbonlarının aerobik biyolojik bozunması için mikrobiyal yollar iki kısma ayrılabilir: ilk aşamada, aromatik substrat, mono veya dioksijenazlar tarafından hidroksil gruplarının eklenmesiyle bir dihidroksi aromatik metabolite (tipik olarak bir katekol) dönüştürülür; ikinci aşama, katekol halkasının dioksijenazlar tarafından açılmasından oluşmaktadır. Bu enzimler, karbon-karbon bağlarından birini kırarak halkaya moleküler oksijen eklenmesini katalize etmektedir. Halka kırılması iki farklı pozisyonda meydana gelebilir: hidroksil grupları arasında (intradiol veya orto kırılması) veya hidroksil gruplarından birine bitişik (ekstradiol veya meta kırılması) olarak. Aromatik hidrokarbon katabolizmasının son aşamasında, halkanın açılmasından kaynaklanan ürün, asetil-CoA, oksalat ve piruvatın ara ürünlerine dönüştürülmektedir

Anaerobik olarak, aromatik halka oksitlenmez, indirgenmektedir. Bu yoldaki ara madde bir sikloheksanondur. Halka, sikloheksanonun hidrasyonu ile açılmaktadır. Bununla birlikte, aromatik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanmasından dolayı anaerobların metabolik potansiyeli hakkında çok az şey bilinmektedir. Bazı aromatik hidrokarbonlar,

fonksiyonel gruba ve mevcut terminal elektron alıcısına bağılı olarak bozunmaktadır (Bento 2005).

2.4 Aktinobakteriler

Eskiden aktinomisetler olarak adlandırılan aktinobakteriler, guanin ve sitozin açısından zengin DNA'ya sahip Gram pozitif bakterilerdir. Bu mikroorganizmalar toprakta, suda ve diğ er ortamlarda bulunabilir, ancak ana kaynakları topraktır. Topraktaki ana antibiyotik üreticileri ve aynı zamanda ticari açıdan ilgi çekici enzimler üreten ana mikrobiyal gruplardan biri olarak tanımlanmıştır (Joshi *et al.* 2019).

Aktinobakteriler, 12 nm çapa kadar ribozomlara sahip fibriller bir nükleer bölge ve gran ler sitoplazmadan oluşmaktadır. Mikroorganizma, büyüme süresi ve kullanılan ortama bağılı olarak, sitoplazma çeşitli başka inkl zyonlar içerebilmektedir. Plazma zarı, diğ er işlevsel lipidlerin dahil edilmesi için kararlı bir matris üreten polar lipidlerin ve zar proteinlerinin amfipatik etkileşimi ile elde edilen lipid çift katmanlı tiptedir. En çok çalışılan lipidler menakinomalar ve karotenoid tipi pigmentlerdir. Menakinonlar esas olarak elektron taşıma zincirinde ve solunumda yer almaktadır. Hücre duvarı, anyonik asitler ve nötr polisakkaritler gibi bir veya daha fazla ilişkili polimerle birlikte peptidoglikandan oluşmaktadır. Aktinobakteriler, miselyuma dönüşen hif adı verilen ince dallı filamentler üretirler. Filament, bazılarında kısa olmasına rağmen oldukça uzun olabilir ve bazı durumlarda küçük birimler halinde parçalanabilmektedir. Bireysel hifler veya filamentler, morfolojik olarak mantar filamentlerine benzemekte fakat daha dar olarak karşımıza çıkmaktadır (Hern ndez-L pez *et al.* 2016).

Aktinobakterilerin büyümesi, esas olarak, görünüşte üstel bir büyüme kinetiğini takip eden dallı hifler olarak hücre duvarının genişlemesi ile gerçekleşir. Koloniler bir kez büyüdüğ nde, sınırın en uzak kısmı glikojen, lipidler ve polifosfat gibi çeşitli yedek malzeme sınıflarını biriktirebilmektedir.

Bakterilerle olan taksonomik konumlarına rağmen, aktinobakteriler ve mantarlar arasındaki benzerlik üç özellikte belirgindir: aktinobakterilerin miselyumu, mantarların karakteristiği olan geniş dallara sahiptir; her ikisi de hava miselyumunu ve konidiyumu oluşturur ve sıvı kültürde büyümeleri nadiren şişkinlikle sonuçlanır, daha çok kütle veya "peletler" olarak kendini göstermektedir. Atmosferik nitrojeni sabitleyebilen *Frankia* cinsi, *nocardiosis*, aktinomikoz ve ayrıca bitki ve hayvanlarda insan hastalıklarına neden olduğu da tanımlanmıştır (Parthipan *et al.* 2017).

Aktinobakteriler, *Streptomyces* ve *Streptoverticillium* cinslerinde olduğu gibi, Hindistan cevizinden yüksek oranda dallanmış ve farklılaşmış bir miselyum içeren parçalanmış hif formlarına kadar uzanan geniş bir morfoloji sergileyen cinsleri içermektedir. Aktinobakteriler, toprak, tatlı su ve deniz habitatları dahil olmak üzere çeşitli habitatlardan izole edilmiştir. Laboratuarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir, ancak bu doğal ortamlarda hayatta kalmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Bazı cinsler, hareketli zoosporları ve özellikle kurutucuya dirençli yapıları içeren sporlar oluşturmaktadır, ancak endosporların varlığını ve aşırı direnç özelliklerini bulundurmaz. Bu özellikler sadece *Thermoactinomyces* cinsine aittir.

Streptomyces genellikle hiphalardan daha kalın bir spor duvarına sahiptir ve ayrıca daha hidrofobiktir. Sporlar genellikle farklı biçimlerde ve bu farklılıklar ayırt edici taksonomik kriter olarak kullanılmaktadır. Bu sporlar ayrıca kuruma ve ısıyı tolere ederler uzun yıllar yaşayabilmektedir ancak dirençleri endosporlar kadar güçlü değildir.

En yaygın olarak izole edilen ve yaygın olarak çalışılan cins *Streptomyces*'tir. Bununla birlikte, literatürde başka türler de gözlemlenmiş ve tanımlanmıştır. *Nokardioform* aktinobakteri grupları, sonunda yeni bir miselyum oluşturarak, kokoid veya basiller olarak ayrılan hifler meydana getirmektedir. Bu gruba dahil olan cinslerden bazıları *Caseobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* ve *Nocardia* olarak sıralanmaktadır. Aktinobakterilerin sporları büyük morfolojik karmaşıklığa sahiptir (Khudur *et al.* 2018).

Genetik kararsızlık, aktinobakterilerde bulunan çok yaygın bir özelliktir. Farklılaşma ve ikincil metabolizma ile ilgili çoğu fenotipik özellik, genetik olarak kararsızdır. Hava,

miselyum oluşumu, pigmentasyon, sporülasyon, genotoksik ajanlara direnç (mitomisin C veya ultraviyole ışınlama) ve direnç ve/veya antibiyotik üretimi bunlara örnek olarak verilmektedir. Aktinobakterilerin taksonomisi son derece karmaşıktır. Birkaç morfolojik ve fizyolojik özelliği dikkate alan geleneksel yöntemlerin kullanılması mümkün olmamaktadır. Bu arada, daha gelişmiş sistematik yöntem ve tekniklere dayanan üç ana yaklaşım kullanılmıştır. Birincisi, lipidler, duvar amino asitleri, şeker ve proteinler gibi spesifik hücre bileşenlerinin karakterizasyonunu kullanan kemotaksonomi, ikincisi, sayısal taksonomi, mümkün olan en fazla sayıda fenotipik özelliğin kullanımına dayanmaktadır. Üçüncü ve son olarak, nükleik asit hibridizasyon yöntemleri DNA-DNA ve DNA-RNA, faj tipleme, pirolizat kütle spektroskopisi ve RNR dizileme tekniklerini kullanarak jenerik içi ve jenerik düzeylerdeki ilişkileri ortaya çıkaran moleküler sistematigi olarak açıklanabilir (Ndimele 2010).

Çevreden alınan örneklerde bulunan aktinobakterilerin sayısını ve türlerini belirlemek için kullanılan geleneksel yöntem, substrat olarak seçici ve/veya seçici olmayan kültür ortamının kullanıldığı seyreltme plakası tekniğini içermektedir. Bu tür deneyler yapılırken, örneğin çeşidi (örnek: toprak, tortu veya su), ekstraksiyon ve geri kazanım prosedürünün etkinliğini, seçici kültür ortamı ve kültür koşulları, plaka izolasyon hızı vb. konulara dikkat etmek gerekmektedir. Aktinobakteriler topraktaki ana antibiyotik üreticileri olarak kabul edilmektedir. Ancak antibiyotiklere ek olarak topraktan, antiviral, antitümör, immünomodülatör maddeler, agrobiyolojik bileşikler ve yüksek ticari değeri olan enzimler de izole edilmektedir (Fuentes *et al.* 2014).

Nadir aktinobakterilerin izolasyonu için kullanılan yöntemler, antibiyotiklerin eklenmesi veya bir antibiyotik karışımı gibi seçici basınçların kullanılmasını içermektedir. Aktinobakterilerin biyokimyasal heterojenliği, ekolojik çeşitliliği ve ikincil metabolitlerin üretimi için olan kapasiteleri, onu enzimlerin üretimi için iyi bir hedef haline getirmektedir.

Aktinobakteri enzimleri, organik azotlu bileşikler, karbonhidratları, kolesterol gibi çeşitli steroidleri, çeşitli aromatik bileşikler, asetileni ve diğerlerini parçalayabilir. Ayrıca, bakteri ve mantarların büyük çoğunluğunun saldırılarına karşı dirençli olduğu bilinen maddeler olan agar, kauçuk, parafinler ve ligninleri de kullanabilirler. Bu

enzimlerin bazıları halihazırda endüstriyel ölçekte üretilmiştir, ancak büyük çoğunluğu henüz üretilmemiştir.

2.5 Biyolojik bozunma

Dünyanın endüstriyel faaliyetlerinin sürdürülmesi için olsun ya da olmasın, petrol ve türevlerine sunduğu artan bağımlılık, genellikle boru hatlarındaki kayıplar veya kopmalar nedeniyle toprakların ve su ortamının hidrokarbonlarla kirlenmesine veya ulaşımalarında meydana gelen kazalar neden olmaktadır. Bu durum, mikroorganizmalar üzerinde toksisite süreçleri ve organizmaların ölümü ile kontamine ortamın özellikleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmaktadır. Bu kazalar, kontaminasyon olayları yoluyla çeşitli ekosistemler üzerinde farklı türde etkilere neden olmakta ve bu nedenle bu çevrenin sürekli olarak incelenmesi ihtiyacını doğurmaktadır (Wartell *et al.* 2021).

Son moleküler çalışmalar, hidrokarbonlar tarafından kontaminasyonun ve arktik topraklarda biyolojik yığın tekniği (kazı, havalandırma ve gübreleme) ile arıtmanın, örneğin çeşitli hidrokarbon bileşiklerini parçalayabilen aerobikleri (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ve *Caulobacter*) destekleyerek toprak mikrobiyal topluluğunu çarpıcı biçimde değiştirdiğini göstermiştir. Bu organizmaların baskınlığı, biyoremediasyon sırasında hidrokarbonların ve besinlerin mevcudiyeti ve kalitesindeki değişime göre zamanla değişmektedir (Banerjee, 2016).

Biyolojik bozunma süreci, petrolün organik bileşenlerinin bir mikroorganizma aracılığıyla daha basit ve daha az moleküler veya daha fazla polar bileşenlere parçalanmasını içermektedir. Hidrokarbonların tamamen biyolojik olarak bozunması, karbondioksit ve su oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu biyolojik süreç iki temel faktörü içerir: beslenme ve nefes alma. Mikroorganizmalar, katı veya sıvı bir kalıntıdan oluşan organik maddeyi, büyümeleri ve üremeleri için bir bölümünü kullanmaktadır. Geri kalanı nefes yoluyla oksitlenir, enerjisinden yararlanır ve metabolizmanın yan ürünleri şeklindeki elementleri telafi ederler. Bu sayede atığın organik moleküllerinin bir parçası olan karbon, azot ve fosfor ve diğerleri aralarında karbondioksit, fosfat, nitrat gibi daha basit bileşikler halinde çevreye (hava, su, toprak) geri verilmektedir (Ndibe *et al.* 2018).

Petrolün doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanması, kirletici maddelerin parçalanması ve çevreden uzaklaştırılması için önemli bir aracı temsil etmektedir. Bu durum, mikrobiyal adaptasyon kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, kirleticileri topraktan ve sudan tercihen yerinde çıkarmak için canlı mikroorganizmaların kullanımına dayalı teknoloji sağlayan biyoremediasyon çalışmalarına ilgi artmaktadır. Hidayati *et al.* (2018), *Fusarium* sp'nin deniz koşullarında ham petrolün alisiklik fraksiyonlarının bozunmasında etkili olduğunu göstermiştir. Bu petrol bileşiklerinden bazıları kolayca buharlaşır veya biyolojik olarak parçalanırken, diğerleri ise doğada uzun süre kalmaktadır.

2.5.1 Petrol biyobozunması

Yerli bakteri popülasyonları hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahiptir. Belirli ortamlar, ham petrol ve türevlerinin neden olduğu etkiyi hafifleten doğal mekanizmalardan biridir. Petrolün doğaya yayılması insan kaynaklı dökülmeler ve kazalar sayesinde olmaktadır. Günümüzde hala kıyılarda dökülen petrolün kalıntıları görülmektedir. Bir başka kontaminasyon kaynağı da petrolde bulunan doğal yayılımlardır. Petrolde bulunan hidrokarbonlar balıklarda ve diğer organizmalarda ölüme neden olmakta, esas olarak balıkçılık endüstrisinin faaliyetlerini ve ayrıca kıyı ve karasal bölgelerin trofik zincirlerini etkilemesi nedeniyle ciddi ekolojik sorunlara yol açmaktadır (Bharathi ve Purushothaman 2017).

Mikroorganizmalar tarafından yağın tüketimi, tek karbon ve enerji kaynağı olarak gerçekleştirilmektedir. Hidrokarbonları tüketmek için söz konusu metabolik kapasite, biyoremediasyonun tüketim oranını desteklemek için farklı yöntemlerin kullanılmasından meydana gelmektedir. En çok kullanılan yöntemler arasında enzimlerin, besinlerin uygulanması, daha önce yağ tüketimine adapte edilmiş mikroorganizmaların kullanılması, diğerlerinin yanı sıra, sık kullanılan kimyasal yöntemler (örn. dağıtıcılar olarak), biyoremediasyon süreçleri, düşük maliyet, güvenli kullanım ve çevresel etkinin olmaması gibi birçok avantaj sunmaktadır (Parales *et al.* 2002).

Ancak bu bileşikler propanol gibi deterjanlarla reçete edildiğinden, deniz organizmalarında yağın toksisitesini artırabilmektedir. Ayrıca mikrobiyal topluluklar üzerinde toksik etki yapabilmektedir. Mikroorganizmalar ve daha yüksek organizmaların toksisitesi hakkında fazla çalışma olmadığından, kullanımı ve petrolün varlığı ile oluşturulan olası senaryoları dikkate alarak yan etkilere neden olup olmayacağı hala uluslararası bilim camiasında tartışılmaktadır. Bunların haricinde, petrolün bozunma işlemi sırasında çeşitli bakteri türlerinin katıldığı ve farklı metabolik süreçlerinin %100'e varan tüketim oranlarına ulaşabildiği bilinmektedir (Ubani *et al.* 2013).

Acinetobacter sp., *Pseudomonas* sp.'de olduğu gibi mikrobiyal türlerin ve cinslerin büyük değişkenliği, hidrokarbonlar için bir afiniteye sahip farklı bakterilerin olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, monoaromatik ve poliaromatik alkanları parçalayan *Mycobacterium* sp. türlerinin sintrofiye katılabildikleri görülmüştür. Ayrıca, alkanların bozunması sırasında anaerobik koşullar altında, sülfatatör indirgeyici ve metanojenik bakterilerin katılımı da gözlenmiştir.

Diğer önemli faktörlerin yanı sıra, petrol bozunması sırasında mikrobiyal popülasyonlar, bölgedeki abiyotik faktörlerden (pH, sıcaklık, tuzluluk, redoks-oksit, diğerleri arasında) ve ayrıca petrolün fizikokimyasal özelliklerinden (hafif veya ağır) etkilenebilmektedir (Ubani *et al.* 2013). Meksika Körfezi'ndeki petrol sızıntısı sırasında kontaminasyon bulutu boyunca gerçekleştirilen 1500 m derinlikte yapılan mikrobiyal ekoloji çalışmalarında kontamine alanlar ve etrafındakiler arasında mikrobiyal topluluklarda bir değişiklik olduğunu tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar esas olarak oksijen ve petrol konsantrasyonundaki farklılıklar, mikrobiyal popülasyonlar, petrol ve düşük oksijen konsantrasyonu nedeniyle tortulardaki tabakalaşma ile sunulduğundan, kirlilik bulutu boyunca bir konsantrasyon gradyanı ve petrolün dönüşümü gözlemlenmiştir (Mortazavi *et al.* 2013).

Florida, Campeche, Veracruz (Meksika) kıyılarında ve Mississippi Nehri (ABD) deltasında yapılan çalışmalarda, Meksika Körfezi'nde büyük bir mikrobiyal çeşitlilik bulunmuştur, bu yerlerde *Gammaprotobacteria*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* ve

Acinetobacter olmak üzere 14 cinse dağılmış yaklaşık 24 bakteri türü ile *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclastikus* ve *Oleispira* gibi bazı hidrokarbonoklastik bakteri türleri tespit edilmiştir. Hidrokarbonoklastik bakteriler, yalnızca petrolle beslenen, onu tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan bir bakteri grubudur. Kirlenmiş bölgelerde bulunan türlerin %90'ını oluşturdıkları için petrolün biyolojik olarak parçalanmasında çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu nedenle bu tip bakterilerin petrolden rahatsız olan alanları değerlendirmek için kullanıldığı, hidrokarbonoklast/heterotrofik bakteri oranı (Hi/He) bir darbe indeksi olarak hesaplanarak, bileşiklerin deniz akıntıları tarafından sürüklenmeleri nedeniyle, bu bakterilerin büyümesini destekleyen belirli alanlarda yoğunlaştıkları batı Meksika Karayipleri aynı şekilde hidrokarbonlardan etkilenen yerler de bulunmuştur (Olson *et al.* 2017).

2.5.2 Hidrokarbonların Aktinobakteriler Tarafından Biyodegradasyonu

Bakteriler petrolün bozunmasında en aktif ajanlardır ve petrol çevreye döküldüğünde ilk bozunanlardır. Birkaç bakterinin, mantarlara ek olarak hidrokarbonları ne kadar hızlı bozdukları konusunda benzersiz olduğu bilinmektedir. Halihazırda, bakteri, filamentli mantar ve mayaların petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunmasına ne ölçüde katıldığı, yerel çevresel koşullar ve ekosistem ile ilgili olarak sınırlı bir çalışmaya sahiptir. Geçen yüzyıldan beri aktinobakteriler, petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğine sahip mikroorganizmalar olarak belirtilmiştir. Toprakta yaşayan mikroorganizmaların sikloheksanı oksitleyebildiğini ve bu oksidasyon mekanizmasının birlikte oksidasyonu içerdiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Aktinobakteriler, aromatik alisiklikler gibi hidrokarbonları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak, kirlетici organik bileşikleri çok az veya hiç toksisitesi olmayan maddelere biyolojik olarak parçalayan mikroorganizmalardır (Hasan ve Perot 2021).

2.5.3 N-alkanların bozulması

Körfez savaşında petrolle kirlenmiş alanlardaki topraklardan izole edilen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Rodococcus* gibi bazı bakteriler, n-alkanların C12'den C17'ye

kadar karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımında etkili olduğunu ve bunlardan *Rodococcus*'u *Bacillus* ve *Arthrobacter* 'lerin en baskını olduğunu belirtmiştir. Mikrobiyotanın etkisiyle yağın bileşiminde meydana gelen değişiklikler, alkan zincirini kullanan farklı cinsler arasındaki farklı potansiyel ile anlaşılmaktadır. Bu mikroorganizmalara örnek olarak *Rhodococcus*, *Streptomyces* ve *Pseudomonas* verilebilmektedir. *Actinobacteria*, *Thermomonospora fusca* ara maddeler yoluyla alifatik bileşiklerin bozunma işlemlerinde incelenmiştir (Okpokwasili ve Amanchukwu 1988).

Rodococcus, *Nocardia* ve *Gordonia*, aromatik bileşiklerin β -oksidasyonu yoluyla hidrokarbon kullanım profilinde benzer özellikler göstermiştir. Bu mikroorganizmalar, farklı karmaşıklık ve işlevlere sahip çok çeşitli lipidler üretmek için yapılarında bir alkil yan zinciri olan hidrokarbonları kullanmaktadır. Aktinobakterilerin doğada sıklıkla meydana gelen koşullar altında dönüşme yeteneği, bu mikroorganizmaları kontamine ortamlarda biyoremediasyon faaliyetleri için potansiyel adaylar haline getirmiştir. Irak'taki petrol faaliyeti ülkenin KRI Bölgesinde, Miran West, Kurdamir ve Sarqala olmak üzere üç bölgede yoğunlaşmıştır. 50 yılı aşkın süredir devam eden bu petrol endüstrisi, geniş bir altyapı yelpazesine sahiptir; diğerlerinin yanı sıra, ayırma bataryaları, sondaj kuyuları, rafineriler, depolama tesisleri, pompalama tesisleri ve 2.500 kilometreden fazla boru hattı bu bölgede bulunmaktadır. Tüm bu tesisler kırılma riski taşır, bu nedenle hidrokarbon malzemesinin dökülmesine ve ardından toprağın kirlenmesine neden olmaktadır. Bu topraklar, Kirleticiyi mümkün olduğunca ortadan kaldırarak geri kazanılması gereken ve hidrokarbonlardan etkilenen alanlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Toma 2011).

Bu amaçla, günümüzde bu tür kirlenmiş toprakların geri kazanılması için verimli, ekonomik ve ekolojik bir çevre yönetimine sahip olmak esastır. Bu nedenle, petrol faaliyetinden rahatsız olan ekosistemleri kurtarmak için temiz ve doğal teknolojilerin uygulanması gerekmektedir. Mikroorganizmaların kullanımı yoluyla biyoremediasyon, diğerlerinin yanı sıra, kirlenmiş toprakların geri kazanılması için kullanılabilecek bir alternatif olarak düşünülebilir (Bapeer *et al.* 2020).

Bakteriyel biyoremediasyon, kirletici maddelerin parçalanması veya çevre dostu maddelere dönüştürülmesi amacıyla çevrede mevcut olan mikroorganizmalardan yararlanmaktadır. Bu durum, hidrokarbonlar söz konusu olduğunda karbondioksit, su ve biyokütlenin mikrobiyal oluşumu anlamına gelmektedir.

Irak'ın Kürdistan bölgesinin ham petrol sızıntıları ile kaplanmış toprakları benzersiz özelliklere sahiptir. Bu nedenle burada uygulanacak olan teknolojik çözümlerin alanda görülen step bölgesi koşullarına ve özelliklerine uygun olması gerekmektedir. Bu durum, gelecekte ham petrolle kirlenmiş topraklar için biyoremediasyon sistemlerinde kullanılabilecek olan doğal mikroorganizmalara sahip olmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

2.6 Kirlenmiş ortamların biyoremediasyonu

Kirlenmiş ortamların biyolojik olarak iyileştirilmesi, genellikle canlılar için tehlikeli olan maddeleri biyolojik olarak parçalamak ve bunları karbondioksit, su ve biyokütle gibi çok az veya hiç toksisitesi olmayan ürünlere dönüştürmek için mikrobiyal türlerin kullanılmasından oluşmaktadır. Organik bileşiklerin çoğu doğal olarak bozunmasına rağmen, bazı bileşikler, özellikle bazı makromoleküller çevrede kalıcıdır. Bu kalıcılığa katkıda bulunan faktörler hala tartışılmaktadır, ancak polimerik molekülün veya yapının çözünürlüğünü, boyutunu, toksisitesini ve kökeni önemli konular olarak karşımıza çıkmaktadır (Fathepure 2014).

Farklı mikroorganizmalar, farklı maddeleri bozar ve bazıları son derece olumsuz koşullarda hayatta kalabilmektedir. Bu kontamine ortamların biyolojik arıtımı için besinler ve oksijenin verilmesi yoluyla doğal mikroorganizmaların uyarılmasıyla ya da diğer mikroorganizmaların aşılınması yoluyla olabilmektedir. Kirlenmiş çevredeki organik bileşiklerin çeşitliliği nedeniyle, biyoremediasyon çalışmaları giderek daha önemli hale gelme biyoremediasyonun ekosistemlerin tedavisi için son derece önemli olduğu kanıtlanmaktadır. Biyoremediasyon teknikleri, kirletici maddeleri besin olarak kullanarak mikroorganizmaları uyarmayı amaçlar. Biyoremediasyon, farklı aşamalardan oluşan ve birçok mikroorganizma türü tarafından enzimatik reaksiyonlarla

tamamlanabilen bir süreçtir. Metabolik ve bozunma yolları, bakteri soyuna ve ilgili spesifik enzimlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Etkili bir biyolojik arıtma elde etmek için normalde mikrobiyal havuzlar kullanılmaktadır. Biyoremediasyon için farklı stratejiler, mikrobiyal popülasyonu artırmayı ve gelişimi için uygun çevresel koşullar yaratmayı amaçlamaktadır (Baniasadi ve Mousavi 2018).

Alınacak en uygun önlem, aralarında mevcut mikroorganizmaların türleri ve kontamine ortamın yerel koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Belirli bir biyoremediasyon tekniğini seçmek için tanımlanmış kriterler yoktur, kontaminasyon problemlerinin karmaşıklığı birkaç tekniğin kombinasyonunu gerektirebilir. Çizelge 2.1'de kontamine alanların geri kazanılması için en iyi teknolojinin seçilmesinde önemli olan kimyasal ve biyolojik faktörler gösterilmektedir. Mikroorganizmalar; besin ve enerji elde ettikleri, büyüdükçe tükettikleri, biyokütle, karbondioksit ve su gibi bileşiklere dönüştürdükleri kirleticinin kendisini bir besin kaynağı olarak kullanabilmektedir. Genel olarak, doğal mikroorganizmalar çevreye daha fazla adapte olacağından ve prensipte diğerlerinden daha etkili olacağından, eksojen mikroorganizmalar kullanmak yerine mevcut mikroorganizmaların metabolik aktivitesinin artırılması tercih edilmektedir. Ancak ortam steril ise veya mikrobiyal popülasyon mevcut kirleticileri bozmuyorsa, eksojen mikroorganizmaların kullanımı biyoremediasyonda pozitif bir alternatif olarak düşünülmektedir (Rajasekar 2017).

Çizelge 2.1 Tedavi seçiminde baskın faktörler

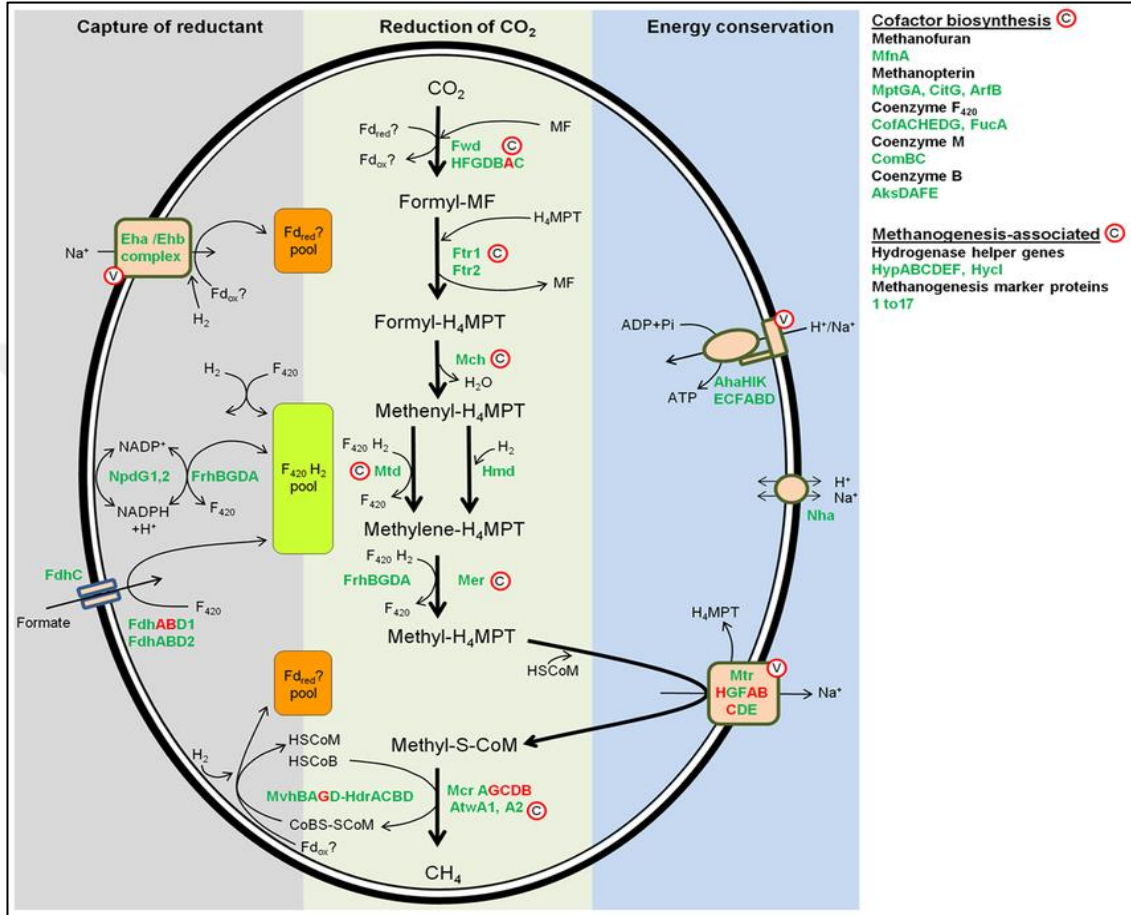
Uygun kimyasal ve biyolojik faktörler	Elverişli olmayan kimyasal ve biyolojik faktörler
Az miktarda kirletici.	Büyük miktarda kirletici ve / veya organik bileşiklerin kompleks karışımı
Uygun mikroorganizma miktarı	Olumsuz mikroorganizma miktarı
Toksik olmayan konsantrasyonlar	Toksik konsantrasyonlar
Karmaşık mikrobiyal popülasyon	Küçük mikrobiyal aktivite.
pH 6 ile 8	aşırı pH
Daha düşük toksisite derecesi (yüksek geçirgenlik)	Yüksek toksik konsantrasyon (düşük geçirgenlik)

İşlem aerobik koşullar altında gerçekleşirse, mikroorganizmanın biyokimyasal reaksiyonlarında oksijen, evrensel bir hidrojen reseptörü görevi görmektedir. Öte yandan, anaerobik koşullar altında, birkaç madde hidrojen reseptörü haline geldiğinden bu süreç daha karmaşık hale gelebilir. Bu şekilde, aynı bileşik, bulunan çevresel koşullara bağlı olarak reseptör veya hidrojen donörü olarak hareket edebilir. Oksijen ve diğer besin elementlerinin varlığında mikroorganizmalar çoğu organik kirleticiyi karbondioksit, su ve mikrobiyal hücre kütesine dönüştürebilmektedir (Rylott *et al.* 2011).

Anaerobik süreçte, yani oksijenin yokluğunda, karbon tamamen metabolize olmaz ve kendisini ara formda sunar. Bu durumda metan ve az miktarda karbondioksit üretilir. İndirgeme koşulları altında sülfat, nitrat, sülfürik gaz ve merkaptanın indirgenmesi yoluyla sülfür veya kükürt ve moleküler nitrojene dönüştürülür. Doğal gaz oluşumunda bulunan bileşik metan, Merkaptanlar, RSH genel formülünün organik bileşikleridir. Burada R bir organik radikaldir; S bir kükürt atomudur ve H bir hidrojen atomudur. Merkaptanlar, anaerobik bakterilerin kükürt içeren proteinler üzerindeki etkisiyle üretilir, bu süreç doğal olarak gerçekleşir ve koku oluşmasının sebebidir. Bazen kirleticiler, orijinal kirleticiden daha az, eşit veya daha tehlikeli olabilen ara ürünlere veya son ürünlere indirgenebilmektedir (Rylott *et al.* 2011).

Anaerobik organizmalar için substratlar, aerobik organizmalar için olanlardan daha kısıtlıdır. Bu substratların tam oksidasyonu, aralarında fermenterler, indirgeyici nitratlar, indirgeyici sülfatlar ve metanojenik olan çeşitli mikroorganizmaların aktivitelerinin bir dizi adımı ve kombinasyonu ile sağlanmaktadır. Oksijenin bulunmadığı koşullar altında, organik maddenin büyük bir bölümünün bozunması metanojenez yoluyla gerçekleşebilir. Ortamdaki anaerobik süreç, iki aşamada gerçekleşir; bunlardan ilki, asit oluşturan bakteriler adı altında gruplanan heterojen anaerobik bakterilerin çeşitliliğini etkiler. İkinci aşamada, proteinleri polipeptidlere ve daha sonra basit amino asitlere, karbonhidratları şekerlere ve yağları gliserole dönüştüren bakterilerin etkisiyle enzimatik hidroliz işlemi gerçekleşir. Enzimatik hidroliz ile oluşan amino asitler, şekerler ve gliserol suda çözünür ve Şekil 2.3'te gösterildiği gibi fermantasyon işlemiyle organik asitlere dönüştürülür. Bu şekilde

metanojenik bakteriler bu organik asitleri karbondioksit ve metana dönüştürmek için kullanırlar. Karbonhidratların fermentasyonundan elde edilen bazı alkoller, metanojenik bakteriler vasıtasıyla metan ve karbondioksite dönüştürülebilir (Adams *et al.* 2015).



Şekil 2.3 Metan oluşumu

Genel olarak, ilk aşamada karbon dioksit, organik asitlerden türetilen hidrojen eklenerek metan'a indirgenen bir hidrojen reseptörü görevi görür. İkinci aşamada fermentasyon ile üretilen ana ara ürün olan asetik asit, karbondioksit ve metan gazına dönüştürülür. Bozulacak kirletici, mikroorganizmalar tarafından birlikte metabolize edilebilir, bu da onun ana besin kaynağı olmadığı, ancak ana gıda kaynağı ile birlikte tüketildiği anlamına gelir. Bu durumlarda, kolayca bozulan ve böylece büyümelerini teşvik eden bileşiklerin sağlanması yaygındır (Ławniczak *et al.* 2020).

Biyoremediasyonun mikrobiyal kinetik yoluyla kontamine bölgelerin temizlenmesi için bir süreç olarak kullanılması o kadar dinamiktir ki, bazı bakteriler tarafından salınan ürünler, daha basit bileşikler olmak üzere diğerleri için gıda olabilir. Biyoremediasyonun amacı, yalnızca karbondioksit, su ve moleküler biyokütle gibi inert maddeleri serbest bırakarak kirleticileri en aza indirmektir. Kirleticilerin konsantrasyonunu ve/veya toksisitesini azaltmak için biyoremediasyon tekniğinin kullanılması umut verici olabilir. Bunlar, çok sayıda prosedürü içerebilen in situ (yerinde) ve ex situ (tesis dışı) tedavilerdeki varyasyonları içermektedir. Toprakta in situ biyoremediasyon tekniği, çevreyi kazmadan arıtmaya izin verir ve kirlenmiş materyalin taşınmasıyla ilgili sorunları önler, böylece maliyetleri düşürür. Bu tür bir işlemde proses kontrolü, ex situ işlemde daha zor olabilir ve nihai ürünün kalitesini garanti etmenin zorluğuna ek olarak daha yavaş bir işlemle sonuçlanabilmektedir (Xue *et al.* 2015).

Ex situ bioremediation tekniği, in situ ile karşılaştırıldığında arıtma süresinde daha hızlı olma avantajına sahiptir. Bu durum, kontamine materyalin başka bir alana çıkarılmasını, arıtma maliyetlerinin artmasını ve arıtılacak atığa bağlı olarak kaza riskini içermektedir. Ex situ biyoremediasyonun uygulanması, kirlenmiş alanın hidrojeolojisinin getirdiği zorlukları ortadan kaldırır. Genel olarak, sahanın hidrojeolojisinin su ve besinlerin ve/veya oksijenin alt katmandan taşınmasına izin verdiği ve kirleticilerin tutulmasını sağladığı yerlerde yerinde biyobozunma uygulanmaktadır. Biyolojik olarak parçalanamayan organik bileşikler olmasına rağmen, farklı kirlenmiş ekosistemleri iyileştirmek için biyoremediasyon teknikleri başarıyla kullanılmıştır. Mikroorganizmaların kirleticileri parçalama hızı, bu kirleticilerin varlığı ve konsantrasyonundan, oksijen ve besin kaynağından, nem ve sıcaklıktan etkilenmektedir. Bu genellikle oksijen, besin maddeleri ve nemin yanı sıra sıcaklık ve pH kontrolünün birleştirilmesine ihtiyaç olduğu anlamına gelmektedir (Brassington *et al.* 2010).

Biyoremediasyon inorganik kirleticileri bozamaz, ancak bu bileşiklerin değerlik durumunu değiştirmek ve mikro veya makro organizmalarda absorpsiyon, hareketsiz hale getirmek, çöktürmek, uzaklaştırmak, biriktirmek ve konsantre etmek için kullanılabilir.

2.6.1 Biyolojik Artış

Mikroorganizmaların organik bileşikleri parçalama yeteneği ve parçalanmanın meydana gelme hızı, yukarıda bahsedilen çok sayıda faktörün etkileşimine bağlıdır. Biyobozunma oranını arttırmanın iki yöntemi vardır (Ikhimiukor ve Nneji 2013). Birincisi, yerli nüfusun uyarılması (biyostimülasyon). Biyostimülasyon, besinlerin ve/veya oksijen (substratların oksijen enzimleri tarafından oksidasyonunu içeren aerobik bir süreç) veya nitrat gibi nihai elektron alıcılarının eklenmesi yoluyla yerli mikrobiyal popülasyonun aktivitesinin arttırılmasından oluşur. İkincisi, seçilen mikroorganizmanın eklenmesidir (biyo-büyütme).

Biyo-artış, kontamine ortamın, aynı ortamdan doğrudan izole edilmiş doğal mikroorganizmalarla yeniden aşılması, spesifik biyolojik aktivitenin arttırılması ve sonuç olarak çevrenin biyoremediasyon hızından oluşmaktadır (Singh ve Borthakur 2018).

Kirlenmiş bölgeye madde ve besinlerin eklenmesi, fiziksel özelliklerini biyolojik olarak iyileştirmeye daha elverişli hale getirir. Düşük geçirgenliğe sahip ortamın havalandırılması daha zordur ve genellikle aglomeralar oluşturarak nemi, havayı dağıtmayı, besin eklemeyi (biyostimülasyon) ve mikroorganizmaları (biyo-arttırmayı) zorlaştırırlar. Bu şekilde, yoğunluğunu azaltmak, gözenekliliği artırmak ve daha fazla oksijen difüzyonu sağlamak için ortama düşük yoğunluklu malzemeler eklenir. Bu elementler, sıvı bir araç (su) vasıtasıyla kirlenmiş toprağa eklenir ve mevcut mikrobiyotanın ihtiyacına göre aerobik ve/veya anaerobik sistemlerin kullanılmasına olanak sağlar (Singh *et al.* 2011).

Biyo-büyütme, tüm bozunma durumlarında kullanılacak bir araç değildir, genellikle, hidrokarbonlarla kontaminasyondan sonra kirleticinin yerel mikrobiyota için toksik olduğu zaman yavaş yavaş ayrışan bileşikler tedavi etmek için kullanılır. Tekniğin uygulanmasının başarılı olması için kullanılan mikroorganizmanın izole edilmesi, karakterize edilmesi ve çevreye bırakıldıktan sonra hayatta kalmasının doğrulanması gerekmektedir (Chang 2008).

2.6.2 Biyo Havalandırma

Biyovermilyasyon, toprak mikrobiyal aktiviteye sahip olduğu sürece, oksijen temini yoluyla toprakta aerobik olarak bozunabilen herhangi bir bileşimin yerinde doğal biyobozunmasını uyaran bir teknolojidir. Biyovermilyasyon tekniğinde, mikrobiyal popülasyonu desteklemek için oksijen düşük akışta sağlanır. Oksijen, mikroorganizmaların büyüme ve bozunma aktivitesini uyarak kirlenmiş toprak ve yeraltı suyunun artık kontaminasyonuna hava enjeksiyonu yoluyla sağlanır (Abdel-Shafy and Mansor 2018).

2.6.3 Fitoremediasyon

Fitoremediasyon, toprakta ve tortularda bulunan organik ve inorganik kirleticileri uzaklaştırmak, transfer etmek, stabilize etmek ve yok etmek için bazı bitki türlerinin kullanımına dayanan şu anda çok umut verici bir biyolojik tekniktir. Bir sınırlama, imha veya çeşitli kirletici türlerin ekstraksiyon yöntemi olarak uygulanabilir. Bitki örtüsü altındaki ortamlar, ekilmeyen alanlara kıyasla daha hızlı ve tam bir biyolojik parçalanabilirlik sunar. Bazı bitkiler, organik kirleticileri metabolik olarak dönüştüren ve böylece toprakta bulunan mikroorganizmalar tarafından daha hızlı oksidasyona katkıda bulunan enzimler üretme yeteneğine sahiptir (Kamal 2016).

Fitoremediasyonda yer alan mekanizmalar şunları içerir:

Fito-birikim: Bitki kökleri tarafından kirleticilerin uzaklaştırılması ve kirleticilerin çimlenmiş yapraklar içinde yer değiştirmesi / birikmesi.

Fito-bozunma: Bitki dokuları içindeki kirleticilerin metabolizmasıdır. Bitkiler, dehalojenazlar ve oksijenazlar gibi bozunmayı katalize etmeye yardımcı olan enzimlere sahiptir.

Fito-uyarılma: Bitkilerin kök ve toprak ara yüzeyindeki kirleticileri hareketsiz hale getirmek için kimyasal bir bileşik üretme olgusudur. Bu tekniğin temel dezavantajları, mevsimsel özellikleri ve hayvanlarda biyolojik birikime neden olma olasılığıdır (Mackertich and Samarrai 2015).

2.6.4 Arazi çiftçiliği

Arazi çiftçiliği, biyolojik bozunma ile ortadan kaldırılan organik bileşiklerle kirlenmiş toprakların biyolojik olarak iyileştirilmesi için uygulanan bir tekniktir. Bu teknoloji, kirleticinin sıvı veya katı haldeki toprağın ekilebilir tabakasına uygulanmasından oluşur. Kalıntı, bir alanın yüzeyine uygulanır ve besinlerin eklenmesi yoluyla mikrobiyal aktivitenin uyarılmasını teşvik eden ince yüzeyler oluşturmak için saban ve/veya tırmıkla donatılmış traktörler mineraller veya her ikisinin karışımı gibi geleneksel ekipman vasıtasıyla toprakla karıştırılır. Kirlenme derinliği 90 cm'den az ise toprağı kazmadan biyolojik aktiviteyi uyarmak mümkündür (Sümer ve Joseph 2019).

Toprak Çiftçiliği tekniği, basitliği ve düşük maliyeti nedeniyle petrol endüstrisinden gelen katı atıkların arıtılmasında en çok kullanılan yöntemdir. Su ortamlarında, bu teknik, mevcut kirleticilerin bozunmasını ve hareketsizleştirilmesini teşvik etmek için kontrollü koşullar altında toprağı dahil edilerek gerçekleşir. Kirletici maddenin homojen bir şekilde karışmasını sağlamak için toprak sürülür ve tırmıklanır. Bu katman, atığın birleşme derinliğine bağlı olarak 18 inç'e ulaşabilir. Toprağın pullukla püskürtülmesi, kirletici maddelerle toprağın rüzgarla yayılmasını kolaylaştırır. Bunun

önüne geçilebilmesi için toprağın nemli tutulması gerekir (Naman ve Al-Ghalami 2013).

2.6.5 Biyopiller

Biyo yığınlarla arıtma, toprağın kazıldığı ve düzeltilmiş toprakla karıştırıldığı ve tedavi için bir alana yerleştirildiği büyük ölçekli bir işlemdir. Biyolojik yığınlar - havalandırmayı teşvik etme yolunda farklılık gösteren arazi çiftçiliği tekniğiyle aynı amaç için kullanılır. Arıtma genellikle, kirleticinin yeraltı suyuna ve toprağa sızmasını azaltarak kirlenme riskini en aza indirmek için geçirimsiz astarlı kapalı veya kapalı bir alanda gerçekleştirilir. Drenaj, geri dönüştürülmeden önce bir biyoreaktörde işlenebilir. Toprak hücreleri ve hücreleri normalde, havanın topraktan geçtiği bir vakum veya pozitif basınçlı hava dağıtım sistemine sahiptir. Toprak yığınlarının yüksekliği 3 metreyi geçmemelidir (Gutiérrez ve Zavala 2001).

Bu yöntem, havalandırma, besin ilavesi ve nem düzeltme yoluyla kirletici bozunma sürecini hızlandırarak aerobik mikrobiyal aktiviteyi simüle etmeyi amaçlar. Yerinde teknikle ilgili olarak bu teknolojinin kullanımı, pH, sıcaklık, besin konsantrasyonu, nem ve havalandırma gibi kirleticinin biyolojik bozunmasını etkileyen çevresel faktörleri kolayca manipüle etme avantajına sahiptir.

2.6.6 Kompostlama

Kompostlama tekniği, organik kirleticinin stabilizasyonunu (nemifikasyon olarak da bilinir) kaliteli bir şekilde hızlandırmak amacıyla geliştirilmiş ex situ bir prosedürdür. Doğada nemlendirme, çevresel koşullara ve organik atıkların kalitesine bağlı olarak belirli bir süre olmadan gerçekleşir (Ramos Alvarez 2020).

Kompostlama, atık işlemenin ekonomik, hijyenik ve ekolojik bir yoludur. Bir kompostlama sisteminin mümkün olabilmesi için temel gereksinimlerden biri, tarımda kullanılmasıdır. Proses, kontamine alanların biyolojik olarak bozunması yoluyla farklı

türdeki organik maddeleri dönüştürmek için kullanılabilir ve bunları çok az veya hiç toksisitesi olmayan yan ürünlere dönüştürür. Toprak kazılır ve dispersiyon maddeleri ve odun talaşı veya sebze artıkları gibi organik katkı maddeleri ile karıştırılır. Karışımı sabit oksijen konsantrasyonu, pH ve sıcaklık koşulları altında tutarak maksimum bozunma verimliliği elde edilebilir. Bu işlem, biyolojik olarak parçalanabilen organik bileşikler içeren topraklara veya tortulara uygulanabilir. Bu arıtma ile ilgili maliyetler, toprağın hacmine ve arıtılacak kirleticilerin türüne göre değişir (Martinez ve López 2001).

2.7 Petrolün zemine etkisi

Organik bileşikler, hem fiziksel etkileşimler yoluyla hem de Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, anyon değişimi, katyon değişimi ve fiziksel engelleme gibi kimyasal bağlar oluşturarak edafik parçacıklarla etkileşime girebilir. Absorpsiyon etkileşiminde yer alan aktif yüzeyler, kil mineralleri, toprakların organik fraksiyonu, tortular, demir ve alüminyum oksitler olabilir. Bu şekilde, negatif yüklü malzeme killer tarafından reddedilebilir, ancak toprağın pozitif yüklü organik maddesi tarafından reddedilebilir.

Parçacık boyutu da absorpsiyon üzerinde bir etkiye sahiptir. Farklı tane boyutlarına sahip zeminlerin farklı absorpsiyona sahip olması, daha küçük tanelerin daha büyük bir yüzey alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Başka bir açıklama, farklı parçacık boyutlarının farklı özelliklere sahip farklı minerallere karşılık gelmesi olabilir. Gutiérrez ve Zavala (2001) göre killer, hidrokarbonların toprakta emilmesine ve birikmesine izin veren kumlardan daha aktif yüzeylere sahiptir. Kumlu topraklar, verimli drenaj ve az sayıda aktif yüzey, en yüzeysel toprak profillerinde hidrokarbonların birikmesini önleyen ve hidrokarbonun derinlikte negatif hareketini kolaylaştıran koşullar sunar. Sıcaklık, absorpsiyona etki eden bir diğer önemli parametredir. Çoğu bileşik için, artan sıcaklıkla absorpsiyon azalır.

Carlson (1998) için zaman faktörü, absorpsiyon etkileşimi için de önemlidir. Bileşiğin zeminde birikmesinden bu yana geçen süre ne kadar uzun olursa, hidrokarbonun edafik partiküller ile güçlü bir şekilde absorpsiyonunun bir sonucu olarak biyoremediasyon işlemi o kadar zor ve uzun sürer. Hidrokarbon malzemenin kimyasal karakteri, konfigürasyonu, sudaki çözünürlüğü, yük dağılımı, moleküler boyutu ve polarizasyonu gibi özellikleri de absorpsiyon derecesini ve oranını etkiler. Bu nedenle, tüm toprakların doğal hallerinde tanımlanmış özelliklere sahip oldukları ve kirleticinin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak değiştikleri göz önüne alındığında, hidrokarbon maddesinin toprak üzerindeki etkisinin bilinmesi gerekir.

Martinez ve López (2001), hidrokarbonların killi bir toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri üzerine yaptığı bir çalışmada, bu topraklarda dokusal sınıf, gözeneklilik ve görünür yoğunlukta değişiklikler olup olmadığını ve ayrıca pH'daki elektriksel iletkenlik değişimleri analiz etmiştir. Benzer şekilde Hasan ve Perot (2021), KRI'de ham petrol ile etkilenmiş killi bir toprağın özelliklerindeki varyasyonu belirlemiştir. İncelenen parametreler topraktaki yoğunluk, pH, toplam azot, mevcut fosfor, organik karbon ve yağ içeriğiydi, bu son iki parametre hidrokarbonlar tarafından toprak kirliliğinin göstergesiydi.

Okpokwasili ve Amanchukwu (1988) tarafından alıntılanan Walker ve Colwell (1977), mikrobiyolojik bir bakış açısıyla, kirleticiden etkilenmeyen bir toprağa (kontrol toprağı) kıyasla hidrokarbondan etkilenen bir toprağın bakteri popülasyonunu nasıl değiştirdiğini gözlemledi. Bununla birlikte, belirli mikroorganizmaların aktivite seviyesi kirlilikten etkilenmedi.

Bu nedenle, hidrokarbonlar tarafından toprakların kirlenmesi, mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir toksisite etkisine ve fitotoksik etkilerden dolayı bitki örtüsünün ölümüne neden olabilir. Irak'ta, bu durum özellikle Patagonya'da daha da kötüleşebilir, çünkü son derece kırılgan bir ekosistemdir ve ayrıca bitki büyümesini doğal olarak sınırlayan aşırı iklim koşulları sunar. Buna göre, ham petrolün dökülmesinden veya hapsedilmesinden etkilenen topraklar için herhangi bir iyileştirme sisteminin

planlanması için kirleticinin toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkisinin bilinmesi esastır.

2.8 Irak Kürdistan Bölgesi'nin edafik özellikleri

KRI için oluşturulan toprak grupları, Amerikan sınıflandırmasındaki büyük toprak gruplarına karşılık gelir ve bunlar şunları içerir: kestane toprakları, kır toprakları (pH'ı 6'dan büyük olan çayırlar, pH'ı 5.7 ile 5,9 arasında olan çayırlar ve pH değeri 5,7'den düşük), podsole kahverengi topraklar, podsole topraklar, alpin çayırlar ve tuzlu olmayan çayırlar.

Kürdistan Bölgesi'ne tekabül eden topraklar kestane toprakları olarak sınıflandırılır. Bu bölgedeki geniş toprak gruplarının çalışmasına göre, bu toprakların bölgede 118.000 hektarlık bir alanı kapladığı, bu toprakların alanın batı kısmını işgal ederek dağıldığı ve esas olarak geniş çaplı koyun sömürüsü için kullanıldığı belirtilmektedir. Onları siyah çayır topraklarından ayıran koyu kahverengi bir yüzey tabakasına sahip topraklara karşılık gelirler. Bunlar aynı zamanda ağırlıklı olarak kum, ince ve düz topografyaya sahip, taşkınlara maruz kalmayan bir doku sunan topraklardır.

Kürdistan Bölgesi'nde bulunan diğer toprak grubu ise çayır toprağı olarak sınıflandırılmaktadır. Bu topraklar en geniş bölgesel yüzeyi kaplar ve kestane toprakları arasında yer alır. United Nations (1958) göre, kır toprakları 90.000 hektarlık bir yüzey alanını kaplar ve hem kıta sektöründe hem de Dokan Gölü bölgesinde dağılır ve kestane topraklarla birlikte doğu ovalarının fizyografik bölgesinin büyük bir bölümünü işgal eder. Dokusal olarak kil ağırlıklıdır, topografik olarak kestane toprakları ile aynı özellikleri gösterirler, ancak yılın belirli zamanlarında sel sorunu yaşayabilen verimli ovaların ve kestane ağacı olarak sınıflandırılan topraklar gibi verimli ovaların dahil edilmesini dışlamazlar ve ağırlıklı olarak geniş koyun yetiştiriciliği için kullanılır.

2.9 İncelenen toprakların asitliği ve tuzluluğu

Alanda bulunan hem kestane toprakları hem de çoğu çayır toprağı, düşük bir alüminyum konsantrasyonuna ek olarak 5,5'in üzerinde pH değerlerine sahiptir. Çizelge 2.2'te gösterildiğı gibi, kestane toprağı ve çayır toprağı grupları için pH (1:2,5) cinsinden frekans dağılımını (incelenen toplam toprakların) göstermektedir.

Çizelge 2.2 pH'in suya göre yüzde olarak frekans dağılımı (1: 2.5)

Zemin Gruplaması	Yüzde olarak frekans dağılımı (%)			
	pH			
	< 5	5-5,5	5,6-6,0	> 6,0
Kestane	0	3	37	61
Çayırlar				
pH > 6,0	0	0	15	84
pH 5,7 to 5,9	0	0	99	0
pH < 5,7	4	56	42	0

İncelenen iki toprak grubu için tuz birikimi, deniz suyu içeren eski kuru lagünlerle ve genel olarak buzul kabartmasından türetilen çöküntülerde geçici veya yarı kalıcı su birikimi olan çayırlarla bağlantılıdır. Bu tuz birikimi, ister yüksek ister düşük yağışlı olsun, hem kabartma hem de toprak substratı ile yakından ilişkilidir.

2.10 Bakteriler

Bakteriler, çok heterojen bir organizma grubu oluşturan ve toprakta diğer mikroorganizma grupları üzerinde baskın olan prokaryotik mikroorganizmalardır. Alexander (1961) göre toprakta bulunan toplam bakteri sayısının belirlenmesi çok güçleşir ve bunların sadece bazı popülasyonlarını belirlemek mümkündür. Topraktaki bakteriler, enerjilerini üretmek ve çoğalmak için besin maddelerine ihtiyaç duymanın yanı sıra, yaşamak için kimyasal ve fiziksel olarak uygun bir ortama ihtiyaç duyarlar. Sıcaklık, pH, kısmi oksijen basıncı ve ozmotik basınç, bakterinin hayatta kalması için gereklidir. Yukarıdakilere göre, toprakta bulunan ve özellikleriyle yakın ilişki içinde olan iki büyük bakteri popülasyonundan söz edilebilir: toprağın gerçek sakinleri olan otokton bakteriler ve yerli olmayan bakteriler.

Otokton veya yerli popülasyonlar direnç durumlarında ortaya çıkabilir ve toprakta uzun süreler boyunca varlığını sürdürebilir. Bu mikroorganizmalar belirli bir habitat için

doğaldır; içinde belirli bir ekosistemin mikrobiyal popülasyonları için mevcut çevresel nişleri işgal ederek hayatta kalabilir, büyüyebilir ve metabolik aktivitelerini gerçekleştirebilirler. Bu organizmalar genellikle fiziksel ve kimyasal çevreleriyle fizyolojik olarak uyumlu olmalarını sağlayan uyarlanabilir özellikler sunar. Öte yandan, yerli olmayan popülasyonlar bir habitatın geçici üyeleridir ve ekosistemin işlevsel nişlerini işgal etmezler. Genel bir kural olarak, bu mikroorganizmalar başka yerlerde çoğalmış ve kendilerine yabancı olan ve zaman içindeki değişkenliklerini dışlamayan bir ekosisteme taşınmışlardır; bazıları 24 saatten daha kısa sürede yok olabilir, bazıları ise yeni ortamlarına uyum sağlayabilir ve uzun süre orada kalabilir.

Bakteri grubu içinde kok, basil ve spirilli şeklinde spor oluşturanlar ve spor oluşturmeyenler bulunur. Bunlar toprakta büyüklük, şekil, oksijen gereksinimleri (aerobik ve anaerobik), karbon elde etme (ototroflar ve heterotroflar) ve bitkiler ve hayvanlarla (saprofitler ve parazitler) ilişkilerine göre değişir. Basiller, topraklarda daha yüksek oranda bulunur ve söz konusu mikroorganizmanın yaşam döngüsünün bir parçası olarak işlev gören direnç sporlarının oluşumu yoluyla, olumsuz veya aşırı durumlarda bunları sürdürme kabiliyetine sahiptir.

Bakteriler, toplam toprak mikroorganizmaları grubunun en önemli bileşenleri olarak kabul edilir. Bu nedenle, mikroorganizmalarla bağlantılı toprağın tüm faaliyetlerinden en önemlisi bakterilerden sorumludur.

2.10.1 Toprakta dağılım ve bakteri bolluğu

Toprak mikrobiyolojisi alanında yapılan ardışık çalışmalarda, hem enlem hem de yükseklik arttıkça toprak bakterilerinin sayısının azaldığı gözlemlenmiş toprakların organik madde içeriğinin artmasıyla birlikte soğuk bölgelerden daha sıcak alanlara doğru toprak artar, bu nedenle aşırı iklim koşullarındaki toprakların daha düşük mikrobiyal popülasyona sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yılın mevsimlerinin mikrobiyal popülasyonlar üzerindeki değişikliklerini belirlemek zordur, ancak bunların sayısında bir "pik" genellikle ilkbaharda gözlenir, muhtemelen parçalama için malzeme sıcaklıktaki artışa ve mikroorganizma girişlerindeki artışa bir tepki olur.

Kışın düşük sıcaklıklara maruz kalan bu topraklar, baharın çözülmesinden hemen sonra mikrobiyal popülasyonda bir "zirve" gösterir. Sıcaklıktaki bir artışla birlikte, toprak yapısının fiziksel olarak bozulmasının bir sonucu olarak besin maddelerinin daha fazla kullanılabilirliğinin eklendiği düşünülmektedir.

Bakteriler ayrıca toprak profilinde dikey bir dağılıma sahiptir. Toprak profilinin derinliği arttıkça mikroorganizma sayısındaki azalma oranı, edafik tipte olanlar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere büyük ölçüde bağlı olabilir. Böylece tüm topraklarda en fazla mikroorganizma humusça en zengin bölgeye tekabül eden üst tabakada bulunur. Bakterilerin toprağa soğurma kapasitesi ve sayısız mikro habitatları da büyük ölçüde bakteri sayısını ve bunlarla toprak arasındaki ilişkiyi belirleyecektir. Bunun nedeni, Alexander (1961) göre topraktaki bakterilerin sıvı fazda nadiren bulunması, ancak çoğunlukla topraktaki kolloidlere yapışmasıdır. Aynı şekilde, belirli bir toprakta bulunan bakteri miktarı ve türü, toprağın türü ve içinde var olan kültürel uygulamalar tarafından belirlenir. Hücrenin yüzey yükü, hidrofobiklik ve polisakaritler ve flagella gibi hücre dışı yapılar ve ayrıca kolloidin elektrik yükü bu absorpsiyonu büyük ölçüde belirler. Öte yandan, bakteri hücreleri toprakta her zaman düzgün bir şekilde dağılmaz, birçoğu birkaç santimetrekarelik küçük alanlarda bulunur, bu da toprak bakteri mikro dağılımı olarak bilinir.

2.10.2 Hidrokarbonları parçalayabilen bakteriler

Bakteriler, çok çeşitli organik ve inorganik kirleticileri çevreye geri dönüştürülebilen zararsız maddelere dönüştürme kabiliyetine sahip oldukları için çevre açısından çok önemlidir. Bu bakteriler, endüstriyel olarak üretilen ve kullanılan organik bileşiklerin büyük bir miktarını oksitleme yeteneğine sahiptir. Toprakta bulunan tüm mikroorganizmalar içinde en fazla sayıda bulunan ve hidrokarbonların bozunmasında en önemli olanın bakteriler olduğu tahmin edilmektedir. Hidrokarbonların bakteriyel bozunmasının temeli, bunların mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasına dayanmaktadır. Aslında, hidrokarbonlar belirli bakteri ve mikroorganizmalar için besin sağlar.

Sharpley (1966) tarafından alıntılanan Beerstecher (1954) bilinen mikroorganizmaların toplamı içinde, önemli sayıda türün bir besin kaynağı olarak hidrokarbonları kullanabildiğini tahmin etmektedir. Bu mikroorganizmalar, bu kaynağı metabolik olarak kullanabildikleri için kirlenmiş habitatlarda hayatta kalmayı başarırlar, bu şekilde kirletici aynı zamanda potansiyel bir enerji kaynağına dönüştürülür. Parrish (1999) tarafından alıntılanan Fontúrbel ve Achá (2000), petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen bazı bakterilerin olduğunu ve bunlara belirli bir süre maruz kaldıktan sonra adapte olabildiklerini ve popülasyonlarını artırabildiklerini belirtmektedir. Bu, çoğu mikroorganizmanın, eğer o ortamda hayatta kalabiliyorlarsa, bu bileşikler büyük bir rahatsızlık duymadan parçalayabileceğini açıklayacaktır.

Topraktaki petrol hidrokarbonlarının mevcudiyetine karşı bu mikrobiyal tolerans, seçiciliğe ve çeşitlilikte bir azalmaya neden olur. Bu stres ortamına toleranslı mikroorganizmalar, hidrokarbonun bozunması için özel enzimatik ve fizyolojik tepkiler geliştirir ve kullanır. Bir biyoremediasyon sistemi geliştirmek için gerekli olan tüm faktörler arasında, tehlikeli atıkları parçalayabilen bir bakteri popülasyonunun varlığının veya yokluğunun bilinmesi çok önemlidir. Rittmann'a (2001) göre, bir kirletici kolaylıkla biyolojik olarak parçalanabilir olsa da, parçalayıcı kapasiteye sahip bir mikrobiyal popülasyonun olmaması, etkilenen toprağın biyolojik olarak iyileştirilmesi için sınırlayıcı bir faktör olabilir.

Bu nedenle, sahanın belirli özelliklerini karakterize etmek için bir biyolojik iyileştirme projesine başlamadan önce bir fizibilite çalışması yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, sadece iyileştirilecek malzemenin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi değil, daha az önemli olmayan bir diğer karakterizasyon, hidrokarbon kullanma kapasitesine sahip sahanın potansiyel mikroorganizmalarının belirlenmesidir. Levin ve Gealt (1997), bu bozunma sürecini gerçekleştirebilen birkaç mikroorganizma olduğunu tahmin etmektedir. Bazı durumlarda bunlar tanımlanmış ve karakterize edilmiştir, diğerlerinde ise onları yetiştirmek ve hatta izole etmek son derece zor olmuştur. Bu amaçla ilk aşama, sonuçları tüm topluluğa veya ekosisteme uygulanan temsili örneklerin alınmasıdır. Her numune, gereklilik olarak, ortamın tamamına kıyasla küçüktür; bu

nedenle, gerçek bolluğun çok üstünde veya çok altında popülasyon sonuçlarına yol açabilir.

Ham petrol açısından zengin saf kültürlerde ardışık popülasyon büyüme testleri yoluyla bakteri izolasyonu ve seçimi, yüksek konsantrasyonlarda yağa toleranslı suşların adaptasyonunu ve hayatta kalmasını değerlendirmek için etkili bir stratejidir.

Kassim (2013), biyoremediasyona tabi tutulan petrol hidrokarbon dökülmelerinden etkilenen topraklardan farklı petrol hidrokarbonları, bakteri suşları kullanarak seçici besiyerinde izole etmiştir. İzole edilen tüm suşlar, bozunma çalışmasında en iyilerini belirlemek için daha sonra laboratuvar koşullarında toprakta bozunma testlerine tabi tutuldu. Benzer şekilde, Cubitto ve Cabezali (2000), başta lineer hidrokarbonlar olmak üzere belirli organik bileşikleri kullanan bir bakteri suşu izole etmiştir. Çalışmanın amacı, bu suşun taksonomik olarak tanımlanması ve ham petrol üzerindeki hidrokarbonolitik aktivitesinin değerlendirilmesiydi. Altamirano ve Pozzo (2000) Arjantin'in Río Negro eyaletinde bir yıl boyunca biyoremediasyona tabi tutulan bir çiftlikten alınan toprak örneklerinden altı hidrokarbonolitik bakteri izole etmiş ve tanımlamıştır. Petrol hidrokarbonları ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde ardışık değerlendirmeler yoluyla şunları belirlemek mümkün olmuştur: *Pseudomonas paucimobilis*, *Sphingomonas vesicularis*, *Micrococcus varians*, *M. roseus* ve *Micrococcus sp.*

2.11 Hidrokarbonların bozunması

Yağ, kerosen, yağlama yağı ve benzen gibi farklı substratlar ve besin olarak minimum orta ve ticari yaprak gübresi kullanarak hidrokarbon biyobozunma deneyleri yapılar ve önceki aşılamanın bozulma sürecini hızlandırdığı sonucuna vardılar. Sarkar *et al.* (2005) 20 m² yağla kirlenmiş toprağa 369 gün süreyle biyoremediasyon uygulandı. Bu toprağa inorganik besinler, havalandırma ve nem eklenerek, uluslararası standartlar tarafından önerilen hidrokarbon konsantrasyonunun < %1'i değerleri elde edildi.

Abalos *et al.* (2004) *Pseudomonas aeruginosa* AT10'un rhamnolipidlerini incelediler ve bunların eklenmesinin 10 günlük inkübasyonda petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunmasını %61 oranında hızlandırdığını belirlediler (Bracho *et al.* 2004). Naftalin, antrasen, fenantren ve dibenzotiyofen üzerinde bakteriyel bozunma ile ilgili bir çalışma yaptılar. İncelenen topraktan izole edilen parçalayıcı bakteriler şunlardı: *Pseudomonas* (%54,05), *Bacillus* (%24,30), *Staphylococcus* (%16,20) ve *Micrococcus* (%5,4); Ayrıca suşların %100'ünün naftalin ve antraseni, %78,5 fenantrenini, %71,42 dibenzotiyofeni ve %50'sinin dört hidrokarbonu bozduğunu belirlediler (Pardo *et al.* 2004). Deney sonunda %91'lik bir hidrokarbon giderme yüzdesi elde ederek, 4 ay boyunca inorganik gübreler ekleyerek biyo-çiftçiliğin (kara çiftçiliği) etkinliğini ölçtüler.

Volke ve Velasco (2003) Petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunması üzerine bir çalışma yürütmüşler ve kompostlaştırmaya ek olarak elektrokimyasal ön işlemlerin ve sürfaktanların eklenmesinin sırasıyla %48 ve %46'lık bir bozunma ürettiğini belirlemişlerdir.

Zucchi *et al.* (2003) Biyostimülasyon ve yeterli havalandırma, besinlerin ve yüzey aktif maddelerin eklenmesiyle 72 günlük bir süre içinde biyoremediasyon sırasında bir bakteri topluluğunun tepkisini değerlendirdiler ve %39,5'lik bir nihai hidrokarbon azalması elde ettiler (Escalante 2002). Ham petrolün 90 gün boyunca 3 teraryumda biyolojik bozunması üzerine bir çalışma geliştirdiler, türlerin daha iyi biyolojik bozunma aktivitesi gösterdiği 129 bakteri suşu izole edildi: *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus sp.* ve *Serratia Rubidae* bu deneyde kullanılan konsorsiyumu oluşturanlarla aynılar. Eksojen konsorsiyumun gübresiz aşılandığı birinci teraryumda %92,5 oranında biyobozunma sağlanırken, doğal bakterilerden oluşan ikinci teraryumda elde edilen biyobozunma yüzdesi %60 ve son olarak üçüncü teraryumda abiyotik kontrole karşılık gelen biyolojik bozunma %55 idi.

Hidrokarbonlarla kirlenmiş toprakların isteğe bağlı bir muamelesi olarak biyoremediasyonun fizibilitesini araştırdılar. Doğal zayıflama ve biyostimülasyonun etkinliğini incelemek için hem döllenen hem de NPK olmayan döllenen topraklarla bir mezokozm kullandılar. İlk kontaminasyon seviyesi, gübrelenmemiş ve gübrelenmiş

toprakta sırasıyla yaklaşık %50 ve %70 oranında azaltılmıştır (Mishra *et al.* 2001). Bir rafineriye ait topraklarda bir bakteri konsorsiyumunun biyoremediasyon potansiyelini analiz ettiler, çalışma alanını 4 blok A, B, C ve D'ye böldüler; bunlardan A, B ve C'nin konsorsiyum ile muamele edildiği ve D'nin muamele edilmediği kontrol. Bakteri ve besin konsorsiyumunun uygulandığı bloklarda %90,2 biyobozunma yüzdesi gözlenirken, D blokta %16,8 120 günlük bir sürede deney geliştirildi (Margesin ve Schinner 1997).

Nwachukwu 2001 Yağla kirlenmiş topraklarda *Pseudomonas Putida* aşılansmış, bazalarına inorganik besinler eklenmiş. En yüksek bozunma etkinliği 9 haftada elde edildi, bu, biyolojik geri kazanımın kanıtı olarak kullanılan *Lepidium sp.*'nin büyümesiyle desteklendi; çimlenme oranı gübrelenmemiş topraklarda %27,5, gübreli topraklarda %98,8 olmuştur. Parales *et al.* 2000 yılında, *Pseudomonas putida*'nın hidrokarbonları etkin bir şekilde bozduğunu belirleyerek beş suşun bozunma kapasitesini ve kemotaktik reaksiyonunu değerlendirdi.

Belloso 1999 Gübre uygulamadan eksojen mikroorganizmalar ve doğal mikroorganizmalar kullanarak "kara çiftliği" süreci sırasında biyolojik bozunma yüzdesini değerlendirir. Çalışma 3 ay sürmüştür. Bozunma verimliliği %84 (eksojen mikroorganizmalarla 1 numaralı teraryumda) ve %49 (doğal mikroorganizmalarla 2 numaralı teraryumda) idi.

Deyta ve Saval 1999 Benzinle kirlenmiş iki bölgenin toprağında benzen, toluen ve ksilenin (BTX) nem, besin ilavesi ve iklime alıştırmış bakteri gibi kombinasyon faktörleri bozunmasını analiz ettiler ve bir sahadan diğerine bozunma oranlarındaki ve yüzdesindeki farklılıkların, aşağıdakilerden kaynaklandığı sonucuna vardılar; aynı şekilde, verimlilik de toprağın türüne bağlıydı (Machin 1999). Yarı katı fazlı reaktörlerde kirlenmiş toprakta hidrokarbonların biyolojik bozunması üzerinde biyostimülasyonun etkisini gözlemlediler ve bir gübre ekleyerek yüksek oranda bozunma elde edildiğini buldular. İşlenen toprakta yüksek düzeyde hidrokarbon kirliliği vardı; bu nedenle katı faz biyostimülasyonu, toprak biyoremediasyonu için bir alternatif olarak düşünülebilir.

Morales *et al.* (1999) Hidrokarbonları iki kaynaktan ayırıştırma kapasitesine sahip mikrobiyal konsorsiyumları izole ettiler ve seçtiler: biri hidrokarbonlarla kirlenmiş (IMP) ve diğeri kirlenmemiş (artık kompost). Hidrokarbonların bozunması IMP konsorsiyumu için %25,48 ve kompost konsorsiyumu için %22,37 olmuştur (Ortiz *et al.* 1999). Artan gözeneklilik, su direnci, diklorometan direnci ve yüksek hidrokarbon geri kazanımı nedeniyle kolon tipi biyoreaktörlerde destek olarak en iyi özellikleri sunan aynı organik tekstüre edici malzemeyi (kamış küspesi ve kompost) seçtiler; Aynı şekilde, IMP konsorsiyumu için %9,35, IMP + kompost konsorsiyumu için %14,77 ve IMP + kamış küspesi için %25 biyobozunma yüzdesi belirlerler.

Aislabie *et al.* (1998) Antarktika topraklarındaki petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunma potansiyelini incelediler ve nitrojenin ham petrolle kirlenmiş topraklarda hidrokarbonların mineralleşmesini önemli ölçüde arttırdığını gösterdiler. Belloso 1999 Teraryumlarda bulunan “kara çiftliği” topraklarındaki farklı bakteri suşlarının hidrokarbonolitik aktivitesini, C / N: 20: 1 ve NPK oranlarında 2 konsantrasyon NPK gübresi uygulamasıyla karşılaştırdılar: ilk 30 günde Z2 gübresi ile teraryumda 20 : 2: 1 ilk durumda (Z1) ve C / N oranları: 100: 1 ve ikinci durumda (Z2) NPK: 20: 20: 1, en yüksek hidrokarbon azalma yüzdesi (%45) gözlenir. W2 türünün en yüksek hidrokarbonolitik kapasiteye sahip olduğu ortaya çıktı.

Merino (1998) Petrol emülgatörleri üreten yerli mikroorganizmalar üzerinde bir çalışma yürüttü ve en büyük emülsiyonlaştırma ve parçalama kapasitesine sahip mikroorganizmaların suşlar olduğunu belirtti: *Pseudomonas Aeruginosa* KT1-1 ve *Serratia Rubidae* BT5-4. Ham petrolle kirlenmiş su ve toprak örneklerinden çeşitli cinslere karşılık gelen doksan bakteri suşunun yağ üzerindeki büyümesini değerlendirdiler; en yüksek degradatif aktivite gösteren cinsler: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* ve *Flavobacterium*, kinetik parametreler, spesifik büyüme hızı ve üretim süresi ile değerlendirilen cinslerdir (Rentería ve Miranda 1998).

Dagher *et al.* (1998) 5 polisiklik aromatik hidrokarbon bozunduran toprak suşunun karşılaştırmalı bir çalışmasını gerçekleştirdiler; *Sphingomonas* sp. Suş 107, en yüksek

parçalama kapasitesine sahip suştu, bunu *Pseudomonas aeruginosa* suşları 57 ve PL1 izledi. Biyosüpfaktanlar *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* tarafından ve biyoemülgatör *Sphingomonas* sp. tarafından üretildi.

Delille *et al.* (1998) INIPOL EAP22 (NPK) gübresini ekleyerek suda biyoremediasyonun etkinliğini analiz ettiler, bu gübre saprofitik ve hidrokarbon bozundurucu mikroflorada bir artışa neden oldu, petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunmasının etkinliğini artırdı. Korda *et al.* 1997 Petrol hidrokarbon biyolojik bozunmasını ölçmek için analitik yöntemlerin etkinlik açısından farklılık gösterdiğini belirttiler; in vitro biyolojik bozunma, mikroorganizma sınırlı olmak üzere çok çeşitli kirleticilere maruz kaldığında değişir; doğal mikroorganizmaların yeniden eklenmesinin en etkili biyoremediasyon yöntemi olduğu sonucuna varmışlardır.

2.12 Genel hedef

Irak'ın Kürdistan bölgesindeki (Miran West, Kurdamir ve Sarqala) topraklara özgü bakteri suşlarının ham petrolü parçalama kabiliyetine sahip olup olmadığını belirlemek.

- **Özel hedefler**

Kürdistan, Irak'taki üç toprağın kimyasal özelliklerindeki değişimleri, ham petrolün dökülmesinden ve hapsedilmesinden etkilenir. Kürdistan'ın üç toprağının (Miran West, Kurdamir ve Sarqala) dökülmelerden ve ham petrolün hapsedilmesinden etkilenen bakteri popülasyonlarını izole edin ve miktarını belirleyin.

İzole bakteri suşlarında, ham yağ ile seçici kültür ortamında üreme yeteneğinin belirlenmesi. Ham petrolün parçalayıcı kinetiği aracılığıyla, seçilen iki bakteri suşunun ham petrolün bileşenlerini dönüştürme veya parçalama kapasitesini değerlendirin. Kızılötesi spektrofotometri ile, seçilen bakteri suşları tarafından bozulan bu fonksiyonel ham petrol gruplarını belirleyin ve miktarını belirleyin.

3. MATERYALVE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan materyaller aşağıda açıklanmıştır.

Biyolojik materyal

KRI'de, yani Miran West, Kurdamir ve Sarqala'daki ham petrol sızıntılarından ve hapsedilmelerden etkilenen ve etkilenmeyen üç topraktan izole edilen 240 bakteri suşu kullanıldı.

Reaktifler

Bu araştırmada kullanılan reaktifler aşağıda alfabetik sırayla listelenmiştir ve metinde kullanılan karşılık gelen kısaltmalar parantez içinde belirtilmiştir, Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1M pH 7, sülfürik asit H_2SO_4 (0,05 N, 0,005 N), agar-agar, agar-pepton %2 (AP %2), hidrojen peroksit H_2O_2 (100 hacim), sodyum bikarbonat, aktif karbon, kalsiyum klorür (CaCl_2), stronsiyum klorür (SrCl_2), %10 sodyum klorür (NaCl), potasyum dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), et özütü, monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4), sodyum fosfat ($\text{Na}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), ortofenantrolin indikatörü, amonyum nitrat (NH_4NO_3), ortofenantrolin indikatörü, magnezyum oksit (MgO), pepton, Devarda reaktifi, N-mineral indikatör solüsyonu (bromokresol yeşili, metil kırmızısı, borik asit ve etanol), Olsen B solüsyonu, KCl (1M) (2N) ekstraktif solüsyonu, amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,5N FeSO_4 demir sülfat, magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), karbon tetraklorür (CCl_4).

Ekipman

Lab.Line Türkiye Environ-shaker orbital shaker, Orsa otoklav, Stirrer manyetik karıştırıcı, HANNA HI9835 iletkenlik ölçer, Precisa 2200C terazi, Sartorius 2462

analitik terazi, Kotterman GMB tip S430 inkübasyon odası, Eurofrigo soğuk oda, santrifüj, Rapidstill II distile (Labconco II), GBC Model 909AA Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (880 nm ve 396,2 nm Monokromatörler), Perkin Elmer FTIR bx II Kızılötesi Spektrofotometre, ASTM Hidrometre, Mikrodalga Fırın, Carl Zeiss Optik Mikroskop, pH Metre (Model 05669-20 Cole Parmer), Trotter buzdolabı, Elekler (630, 200 ve 63 mikron).

Diğerleri

Daldırma yağı, damıtılmış su, ekim iğnesi, pamuk, ekim halkası, polietilen torbalar, 50 mL plastik şişeler, 300 mL cam şişeler, huniler, plastik şişeler, keçeli kalem, 1000 mL ölçülü şişeler, Kjerldahl şişeler (100 mL), çakmaklar, toprak ham petrolden etkilenen ve etkilenmeyen numuneler, Megafensa düdüklü tencere, Watmann filtre kağıdı n° 4 ve n° 5, kürek, kağıt, alüminyum folyo, ham petrol, 5 mL'lik otomatik pipetler, filtre kağıdı, volümetrik pipetler (1, 5 ve 10 mL), kap, huni tutucu, 90 mm Petri kutuları, nesne tutucu (75 x 25 mm çap), tohum tırmığı, makas, elekler (2 mm), tüpler 50 mL test numunesi, 500 ve 2000 mL beherler.

3.2 Yöntem

Bu çalışmada kullanılan yöntemler aşağıda detaylandırılmıştır:

Çalışma alanının konumu

Bu çalışmada kullanılan toprak örnekleri, KRI'nin ham petrol sızıntılarından ve hapsolmalarından etkilenen üç bölgesinde toplanmıştır ve yerleri Şekil 3.1'de gösterilmektedir (Miran West, Kurdamir ve Sarqala). Aynı sahalardan, ham petrol kontaminasyonu olmadan toprak örnekleri toplanmıştır (toprak kontrolleri).

Ham petrol ile kirlenmiş toprak örneklerinden ilki, KRI komününe ait Miran West adlı topraktan alındı. Bu toprak, 102 numaralı üretim kuyusunun faaliyeti sonucu ham petrol

hapsinden etkilenir. Ham petrol ile kirlenmiş ikinci toprak örneği ise KRI'ye ait Kurdamir (0440236 E ve 4144195 N) adlı topraktan alınmıştır. Sarqala'yı birbirine bağlayan boru hattının 18 serisi ısıtıcıdan çıkan emisyonların etkisiyle bu toprak ham petrolün etkisine maruz kalıyor. Son olarak, üçüncü toprak örneği, KRI'de bulunan ve bir boru hattının yırtılması sonucu bir ham petrol sızıntısından etkilenen Sarqala adlı sektöre karşılık gelir.



Şekil 3.1 Toprak örneklerinin çıkarıldığı üç alanın coğrafi referanslandırılması

Toprak örneklerinin toplanması

Üç toprağa ait örneklerin toplanması Mart 2020'de gerçekleştirildi. Numune alınan üç alanın her birinden (ham petrolden etkilenen toprak artı buna karşılık gelen kirlenmemiş toprak) iki derinlikte (0-20 cm ve 20-40 cm) toprak hacimleri çıkarıldı. Belirtilen her toprak ve derinlikten steril bir kürekle her biri yaklaşık 500 gramlık 3 adet toprak alt örneği toplandı ve bunlar birbirinden bağımsız olarak sektöre ve derinliğe göre etiketlenmiş polietilen torbalara konuldu. Daha sonra mikrobiyolojik ve toprak

analizleri için Laboratuvara transfer edildiler. Bu şekilde, analiz edilen her toprak için dört örnekleme durumu elde edilmiştir: biri ham petrolden etkilenen toprağa karşılık gelen 0–20 cm derinlikte ve diğeri 20–40 cm derinliğe sahip, artı aynı topraktan, ancak ham petrolün etkisi olmayan, yukarıda belirtilen aynı derinliklerde toplanan iki numune.

Toprak örneklerinin işlenmesi

Toprak örneklerinin her biri bağımsız olarak işlendi. Bunu yapmak için, her bir toprağa ve duruma (kirlenmiş ve ham petrol ile kirlenmemiş ve 0 ila 20 cm ve 20 ila 40 cm derinlikte) karşılık gelen alt numuneler aseptik olarak karıştırılmış, steril forseps, taşlar ve yapraklar yardımıyla kök kalıntıları ayıklanmıştır. Ardından, benzersiz ve temsili numuneler elde etmek için ezildi ve homojenleştirildi.

Toprak karakterizasyonu

Toprağın verimlilik düzeyini ve ham petrolün toprağın belirli kimyasal parametrelerini nasıl etkilediğini kontrol etmek için 20 cm ve 40 cm derinlikte toplanan toprak örnekleri Bağdat Üniversitesi, Bağdat, Türkiye laboratuvarında kimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Bu analizler, toprak asitliği, değişebilir baz ve değişebilir alüminyum içeriği, organik madde yüzdesi, toplam nitrojen, kullanılabilir fosfor (P-Olsen), elektrik iletkenliği ve granülometrik analizlerin belirlenmesini öngörüyordu.

Toprak asitliğinin belirlenmesi (pH) potansiyometrik ölçüm

Su, pH yöntemiyle 1: 2,5 oranında bir toprak-çözelti oranında belirlendi, bunun için 10 g toprak numunesi tartıldı ve 25 mL su ilave edildi. Numuneler daha sonra 15 dakika arayla 3 kez 45 dakika çalkalandı, ardından pH metre ile okunmasına izin verildi.

Değiştirilebilir bazların içeriğinin belirlenmesi

Bu belirleme için, 2 mm'ye elenmiş 5 g kuru toprak numunesi tartıldı, 50 mL (1M) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 7,0 eklendi. Örnekler 15 dakika çalkalandı ve süzüldü. Filtratlardan 3 mL'lik kısımlar alınarak 100 mL'lik şişelere bırakılmış, bunlara daha sonra distile su ile hacimsel hale getirilmek üzere 10 mL SrCl_2 eklenmiştir. Kalsiyum, Magnezyum, Potasyum ve Sodyum için okuma, 880 nm dalga boyunda bir atomik absorpsiyon spektrofotometresinde gerçekleştirildi.

Değiştirilebilir alüminyum içeriğinin belirlenmesi

2 mm'ye kadar elenmiş 10 g kuru toprak numunesi tartıldı. Daha sonra plastik bir şişeye yerleştirildiler. Daha sonra 50 mL KCl değişim çözeltisi (1M) ilave edildi. 50 mL'lik bir şişe üzerinde bir huni içine yerleştirilmiş filtre kağıdından süzün (bir boşluk ve bir referans numune dahil edilecektir). Elde edilen süzüntü, damıtılmış su ile hacimsel olacak şekilde 50 mL'lik bir şişede toplandı, daha sonra 396.2 nm dalga boyunda bir atomik absorpsiyon spektrofotometresinde okundu.

Organik madde içeriğinin belirlenmesi

Kullanılan yöntem Walkley-Black'inkiydi, 0,5 mm'de elenmiş 0,25 ila 1 g toprak tartıldı, 10 mL %5 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N) eklendi ve 20 mL H_2SO_4 0,05 N Hızlı bir şekilde 250 mL'lik bir Erlenmeyer şişesinde, bir dakikada hemen karıştırıldı ve sonra 30 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra 200 mL distile su ve 5 damla ortofenantrolin indikatörü eklendi. 0,5 N FeSO_4 ile son titrasyon için.

Toplam azot tayini

Beş gramr kuru toprak tartıldı, plastik bir şişeye konuldu ve 50 mL KCl (2N) ilave edildi. Numune bir saat çalkalandı ve sonra bir saat daha oturmaya bırakıldı. Filtrattan 10 mL alındı ve 100 mL'lik bir Kjeldahl şişesine yerleştirildi. Daha sonra 200 mg MgO

ve Devarda reaktifi eklendi, ardından şişeler bir damıtma sistemine bağlandı. Distilat, 30 mL hacme kadar 5 mL indikatör solüsyonu (borik asit ve etanol içinde bromokresol yeşili artı metil kırmızısı) ile 50 mL'lik bir Erlenmeyer şişesine alındı. Daha sonra yeşilden uçuk pembe renge dönüşüm elde edilene kadar 0,005 N H₂SO₄ ile titre edildi.

Olsen yöntemi kullanılarak mevcut fosforun belirlenmesi

2,5 g toprak numunesi tartılmış, 0,3 g aktif karbon ve 50 mL NaHCO₃ eklenmiştir. 30 dakika karıştırıldı ve sonra süzüldü. Süzüntü plastik kaplarda toplandı. Ardından, 5 mL süzüntü alınmış ve 50 ml'lik ölçülü balonlarda biriktirilmiş, ardından 20 mL Olsen B çözeltisi ilave edilmiştir. Üzerine distile su ilave edilerek karıştırılarak karıştırıldıktan sonra UV/VIS spektrofotometrede 880 nm dalga boyunda okunmuştur.

Toprakların elektriksel iletkenliğinin belirlenmesi

Kuru toprak, bir toprak kapta 45 dakika boyunca su ilave edilerek ve sürekli karıştırılarak karıştırılmıştır. Son olarak doymuş bir macun elde edildikten sonra, (µS/cm) cinsinden ifade edilen toprakların elektriksel iletkenliği bir iletkenlik ölçer kullanılarak ölçülmüştür.

Day yöntemiyle granülometrik tayin

2 mm'den küçük 40 gr kuru toprağa 100 hacim 60 mL H₂O₂ eklendi. Organik maddenin okside olması için 24 saat bekletildi ve son olarak numuneye 100 mL dispersan (0,1 N Na₄P₂O₄) ilave edildi ve 10 dakika karıştırıldı. Süspansiyon, 30 C°'de tutulan 1000 ml'lik dereceli bir silindire getirildi. Daha sonra, süspansiyon karıştırıldı ve daha sonra aşağıdaki zaman aralıklarında ölçmek için bir ASTM hidrometresi yerleştirildi: 30 saniye; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 dakika ve hidrometre okumasını kaydedin. Mineral faz bir dizi elek (630, 200 ve 63 mikron) olarak bölünmüş, bunlar çalkalanmış ve son olarak üzerlerine su basıncı uygulanmıştır.

Seri seyreltme yöntemiyle bakteri suşlarının izolasyonu

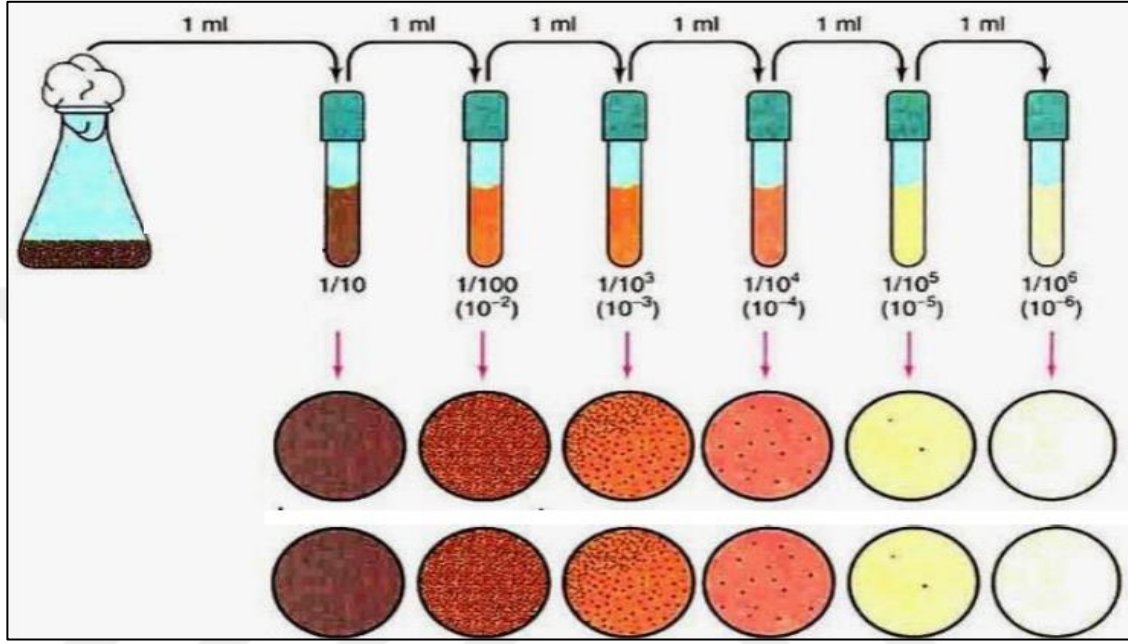
Toprak örneklerinin her biri ayrı ayrı işlendi. 10 g ilgili toprak numunesi tartıldı ve 100 mL steril damıtılmış su içeren bir şişeye yerleştirildi. Bu karışım homojenleşmek için 5 dakika kuvvetlice karıştırıldı, böylece 10-1 adı verilen ilk seyreltme elde edildi. Bu dilüsyondan 1 mL karışım steril pipet yardımı ile ekstrakte edildi ve 9 mL steril distile su içeren tüpe konularak 10-2 dilüsyon elde edildi. 10-2 dilüsyonundan 1 mL karışım yeni bir steril pipetle ekstrakte edildi ve 9 mL steril distile su içeren yeni bir tüpe yerleştirildi, böylece 10-3'lük bir seyreltme elde edildi. Aynı metodoloji, numune ekstraksiyonundan önce tüpü sallamayı akılda tutarak, 10-7'lik bir seyreltme elde edilene kadar kullanıldı. Seyreltmeler elde edildikten sonra, her biri bağımsız olarak %2 AP içeren Petri kaplarına ekildi. Bunun için ilgili seyreltiden 0,1 mL ekstrakte edildi ve Petri kabında biriktirildi, ardından bu numune bir tohum tırnağı yardımıyla plakanın her tarafına yayıldı. Tohumlama yapıldıktan sonra plakalar etiketlendi ve bir kuluçka odasında 23 +/- 2 C°'de 48 ila 72 saat inkübe edildi.

Kuluçka döneminin sonunda bir yanda gram toprak başına koloni oluşturan birim (CFU/g toprak) olarak ifade edilen bakteri popülasyonları sayılmış, diğer yanda 240 adet bakteri kolonileri civciv kurtarıp ekilmiştir.

Saf bakteri kültürlerinin elde edilmesi

Bakteri kolonileri, madde şekil 3.2'te belirtildiği gibi ekilen AP plakalarından (%2) elde edildi. Her koloni, eğimli %2 AP içeren tüplerde kopyalandı. Tohumlandıktan sonra tüpler 23 +/- 2 C°'de 48 ila 72 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin ardından kültürler, bir tür kontaminasyonu tespit etmek için kontrol edildi ve daha sonra daha fazla çalışma için 5 C°'de saklandı.

Toplamda 240 koloni (her topraktan 40), petrolle kirlenmiş topraklardan 120 koloni seçilmiştir; 20 koloni 0–20 cm'de toplanan topraktan ve 20 koloni 20–40 cm derinlikten toplanan topraktan geldi. Analiz altındaki üç zemin için geçerli durum. Diğer 120 koloni, kirlenmemiş topraklardan (kontroller) ve yukarıda belirtilen derinliklerden gelir.



Şekil 3.2 Bakteri sayımı için dilüsyonların hazırlanma şeması

Ham yağ ilaveli mineral ortamda üreme kabiliyetine sahip bakteri suşlarının seçimi

Bakteri suşlarının (toplamda 240) ham petrol varlığında büyüyüp gelişmediğini belirlemek ve ardından laboratuvar koşullarında ham petrolün parçalayıcı kinetiğini gerçekleştirmek için en iyi iki bakteri suşunu seçmek için aşağıdaki metodoloji uygulanır.

Katı seçici ortamda büyüme (AM + P)

İnorganik mineral agar Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi, 10 mL ham yağdan (AM + P) oluşan her bir izole edilen 240 bakteri türünün her biri, Ilyina *et al.*(2003) tarafından belirtilen katı seçici ortam içinde bağımsız olarak tohumlandı. Bunun için, saf ve taze

bakteri kültüründen, AM + P agar üzerine üç kopya halinde bırakılan bir ekim öznesi ile bir miktar bakteri inokulum ekstrakte edildi, inokulum hemen bir piezometre ile ölçüldü (milimetre cinsinden, inokulumun uzunluğu ve genişliği) ve Petri kabının arkasına çizilir. Plakalar ekildikten sonra, yeni karbon kaynağına daha yavaş adapte olan bakterileri ayırt etmemek için 23 +/- 2 C°'de 15 gün süreyle inkübe edildi. Kuluçka süresinin sonunda, teste tabi tutulan 240 suşun her birinin elde ettiği gerçek büyüme belirlendi. Son olarak, AM + P ortamında koloninin en yüksek gerçek büyümesini gösteren beş bakteri suşu seçildi. Bunun için, her koloninin (uzunluk ve genişlik) üç kopya halindeki ölçümleri, Statgraphics 2,0 bilgisayar programı kullanılarak bir varyans analizi (ANOVA) vasıtasıyla istatistiksel analize tabi tutuldu (Ilyina *et al.* 2003).

Seçici sıvı ortamda büyüme (CM + P)

AM + P'de kültürlendikten sonra seçilen beş bakteri suşu, ham yağ (CM + P) eklenmiş seçici sıvı ortamda tek tek yetiştirildi. Sıvı seçici kültür ortamı, Ilyina *et al.* (2003) tarafından kullanılanla aynıdır, artı %3 v/v ham petroldür, Çizelge 3.1'te gösterildiği gibi. Çalışma altında seçilen suşun saf ve taze bakteri kültüründen, tartılan ve daha sonra 1000 mL CM + P ortamı içeren bir şişeye yerleştirilen bir miktar bakteri kültürü ekstre edildi. Her bakteri suşu iki kopya halinde ekildi, böylece beş suş için toplam 10 şişe tohumlandı. Şişeler 15 gün boyunca 175 rpm'de, 15 ila 18 °C'lik bir sıcaklıkta sabit çalkalama altında tutuldu. Kuluçka süresinin sonunda ve ham petrolün parçalayıcı kinetiklerini gerçekleştirecek potansiyel iki bakteri suşunun seçilmesi için bir kriter olarak, beş suştan her birinin bakteri ağırlığındaki (büyüme göstergesi) artış bir seçim kriteri olarak belirlendi.

Ham petrol parçalayıcı kinetiği

Seçilen bakteri suşlarının ham petrolün bazı bileşenlerini parçalama kapasitesini belirlemek için, zaman içinde bir parçalayıcı ham petrol kinetiği gerçekleştirilmiştir. Bu etki için, seçilen iki bakteri suşu, ham yağ eklenmiş bir tuzlu mineral ortam içinde ayrı ayrı ve iki kopya halinde tohumlanmıştır. Kültür ortamı Abu-Elgheit ve Yusef (1980) tarafından belirtilmiştir, çizelge 3.1'te gösterildiği gibi.

Çizelge 3.1 Kültür ortamı

Mineral Agar (AM + P)	
Agar - agar	20 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 gr
Na ₂ HPO ₄	0,2 gr
Steril damıtılmış su	1000 mL
Ham petrol	10 mL
Mineral Suyu (CM + P)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 gr
Na ₂ HPO ₄	0,2 gr
Steril damıtılmış su	1000 mL
Ham petrol	3% v / v
Ham petrolün parçalayıcı kinetiği için Tuzlu Mineral Ortamı	
NH ₄ NO ₃	2 gr
Na ₂ HPO ₄	1,5 gr
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,5 gr
Steril damıtılmış su	1000 mL
Ham petrol	3% v/v

Tohumlanan şişeler, seçilen suşlarla aşılamaadan 0, 7, 15 ve 30 gün sonra ölçümler yapmak için 18 +/- 2 C°'de, 175 rpm'de bir orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Her inkübasyon süresinin sonunda, bakteriyel etkiye maruz kalan ham petrol, karbon tetraklorür ile ekstrakte edildi ve biyolojik olarak parçalanan ham petrol fraksiyonlarını belirlemek için laboratuvarlarda kızılötesi spektrofotometri ile analiz edildi. Ham petrolün bu fraksiyonlarının (fonksiyonel gruplarının) belirlenmesi için, bozunmaya tabi tutulan 1 mL ham petrol alınmış ve bir otomatik numune hücresinde biriktirilmiştir. Numuneyi içeren otomatik numune hücresi kızılötesi spektrofotometreye girildikten sonra, 400 ila 4000 nm arasında değişen bir dalga boyunda bir spektral okuma gerçekleştirildi.

Bakteri suşlarının tanımlanması

Ham petrolün parçalayıcı kinetiğinde kullanılan seçilen iki bakteri suşu için tür aralığına kadar taksonomik bir belirleme yapılmıştır. Bu amaçla, bakteri kolonilerinin makroskopik karakterizasyonu (renk, şekil, kenar ve boyut) ve bakterilerin mikroskopik

karakterizasyonu, bakterilerin morfolojisini, gruplamasını ve bu boyamaya tepkisini belirlemek için gram boyama kullanılarak gerçekleştirildi. Makroskopik ve mikroskopik tayinlere göre biyokimyasal testler (oksidasyon testi, jelatin hidroliz, katalaz testi, sitrat testi, indol testi, oksidaz testi, nitrat indirgeme testi, kırmızı test metil ve Voges Proskauer testi) Wirtz boyaması yapıldı ve Bergey'in el kitabından sınıflandırma şemalarında Wirtz boyaması yapıldı.

Deneysel ve istatistiksel tasarım

Ham petrolün bakteriyel etkiyle parçalayıcı kinetiğini temsil eden numunelerin analizi için tasarımın ayrıntılarını vermektedir. Bakterilerin büyümesini değerlendirmek için, homojen ortalama gruplarını ayırmak için bir varyans analizi (ANOVA) ve bir tukey testi yapıldı. ANOVA'lar, Statgraphics Plus sürüm 2,0 yazılımı kullanılarak yürütülmüştür. Regresyon analizleri, istatistiksel program GraphPad Prism v 4.0 kullanılarak doğrusal olmayan regresyonlar uydurularak yapıldı, Çizelge 3.2'te gösterildiği gibi.

Çizelge 3.2 KRI topraklarına özgü iki bakteri suşu tarafından ham petrolün bozunması için deneysel tasarım

Örnekler	Analiz	Ölçüm süresi (gün)			
		0	7	15	30
MSL kontrolü	IR spektrofotometrisi	X			
MSL + Gerinim 1 *	IR spektrofotometrisi	X	X	X	X
MSL + Gerinim 2 *	IR spektrofotometrisi	X	X	X	X
Petrol	Kimyasal	X			
* = çift X'te büyütülen suşlar: değerlendirme günleri					

4. BULGULAR

4.1 Toprak örneklerinin kimyasal değerlendirmesi

Toprakların granölometrik analizi, Çizelge 4.1'de detaylandırılmıştır. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de Miran West, Sarqala ve Kurdamir sektörlerinde 0–20 cm ve 20–40 cm derinliklerde toplanan toprak örneklerinin kimyasal özelliklerini göstermektedir. Toprak numunelerinin her biri ve ilgili derinlikleri iki durum sunar; etkilenen toprak ve kontrol toprağı, ham petrol sızıntısından ve muhafazadan etkilenmemiş Ham petrolün topraklar üzerindeki varyasyonlarını ve etkilerini belirlemek için seçilen parametreler: pH (suda), Organik madde (%), Toplam azot (%), Mevcut fosfor (mg / kg), Değiştirilebilir Potasyum (mg / kg), Değiştirilebilir Sodyum (cmol + / kg), Değiştirilebilir Kalsiyum (cmol + / kg), Değiştirilebilir Magnezyum (cmol + / kg), Değiştirilebilir Alüminyum (cmol + / kg) ve Elektrik İletkenliği (dS/m).

Çizelge 4.1 Zeminlerin granölometrik analizi

Toprak numunesi	Kil (%)	Silt (%)	Kum (%)	Doku sınıfı
Kurdamir	40	20	40	Killi toprak
Miran West	10	20	70	Killi toprak
Sarqala	10	30	60	Kumlu balçık

Çizelge 4. 2 Toprakların kimyasal analiz sonucu (Kürdamir)

	Numune tipi Derinlik (cm)	pH (H ₂ O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Toplam (%)	C:N	P Mevcut (mg / kg)	Elektrikse l iletkenlik (dS/m)
Örnek kontrol	0-20	6,8	3,5	2	0,17	12	5,1	0,18
	20-40	7,31	1,8	1	0,1	10	3,2	0,26
Kontamin e numune	0-20	7,4	4,4	2,5	0,31	8,1	4	0,17
	20-40	7,45	2,8	1,6	0,18	8,9	2,9	0,27
Miran West								
	Numune tipi Derinlik (cm)	pH (H ₂ O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Toplam (%)	C:N	P Mevcut (mg / kg)	Elektrikse l iletkenlik (dS/m)
Örnek kontrol	0-20	6,9	2,1	1,2	0,12	10	7,5	0,43
	20-40	6,8	0,6	0,4	0,02	18	2	0,64
Kontamin e numune	0-20	7,12	2,6	1,5	0,31	4,8	6,8	0,47
	20-40	7,22	1	0,6	0,06	10	2	0,15
Sarqala toprağı								
	Numune tipi Derinlik (cm)	pH (H ₂ O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Toplam (%)	C:N	P Mevcut (mg / kg)	Elektrikse l iletkenlik (dS/m)
Örnek kontrol	0-20	4,5	8,6	5	0,08	14	4,2	0,17
	20-40	4,51	5,6	3,3	0,35	41	2,3	0,2
Kontamin e numune	0-20	5,44	16,8	9,8	0,33	24	3,1	0,2
	20-40	5,45	7	4	0,41	12	1,9	0,22

Çizelge 4. 3 Toprakların kimyasal analiz sonucu (Kürdamir)

	Örnek tipi derinlik	K İnter.	Na İnter.	Ca İnter.	Mg İnter.	Bazların toplamı	Al- İnter.
	(cm)	(mg/kg)	(cmol ₊ /K)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)
Örnek kontrol	0-20	295	1,91	5,1	2,57	10,34	0,019
	20-40	162	2,56	4,31	2,52	9,8	0,019
Kontamine numune	0-20	215	2,38	6,47	2,02	11,42	0,017
	20-40	215	2,49	6,47	2,38	11,89	0,018
Miran West							
	Örnek tipi derinlik	K İnter.	Na Inter.	Ca Inter.	Mg İnter.	Bazların toplamı	Al-İnter.
	(cm)	(mg/kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)
Örnek kontrol	0-20	190	0,36	3,36	1,67	5,87	0,015
	20-40	112	0,48	2,59	1,32	4,68	0,018
Kontamine numune	0-20	102	0,29	1,91	1,01	3,47	0,012
	20-40	92	0,27	2,94	1,1	4,54	0,014
Sarqala toprağı							
	Örnek tipi derinlik	K İnter.	Na-İnter.	Ca-İnter.	Mg- İnter.	Bazların toplamı	Al-İnter.
	(cm)	(mg/kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)	(cmol ₊ /Kg)
Örnek kontrol	0-20	235	2,16	6,07	2,97	11,8	0,048
	20-40	114	0,1	4,88	2,51	7,78	0,012
Kontamine numune	0-20	355	2,1	6,22	2,9	12,13	0,092
	20-40	222	1,25	5,21	2,77	9,8	0,01

Kurdamir ve Miran West sektörlerine ait topraklar hafif alkali ile hafif asidik aralıkta olup, değerleri pH 7,0 civarındadır. Sarqala toprağı, kendi adına, güçlü asidik pH değerleri sunar. Ham petrolden etkilenen topraklarda 0-20 cm derinlikten alınan örneklerde pH'ın yağ ilavesiyle suya bağılı değışimi kontrolüne göre pH değıerinde artış göstermiştir. Bu durum 20-40 cm derinlikteki üç toprak için de aynı şekilde meydana gelmiştir. Topraklarda ham petrolün etkisiyle pH artışı, her iki derinlikte de 20-40 cm numunelerde Kurdamir toprağı için 0,14 pH birimi ve Sarqala toprak numuneleri için 0,94 pH birimi artmıştır. Hem Kurdamirs petrolünde hem de Miran West toprağında toprağıın ilk 20 santimetresinde daha önemli bir pH artışı kaydedilirken Sarqala toprağıında pH artışı her iki derinlikte de aynıydı.

Toprak profilinin derinliğı arttıkça toprakların organik madde içeriğı daha düşük bir konsantrasyon gösterir. Bu, tüm toprak türleri için geçerlidir. Ancak incelenen toprakların organik madde içerikleri farklıdır. Kürdamir ve Miran West sektörlerinden alınan toprak örnekleri, bölgenin mineral topraklarının karakteristik bir durumu olan %5'in altında değerler sunarken, Sarqala sektöründen alınan toprak örnekleri, genellikle daha yüksek miktarda organik madde içeren topraklara karşılık gelen %8'in üzerinde değerler sundu. Macellan bölgesinin çayırlarının topraklarında üretilir.

Her iki derinlikte de (0–20 cm ve 20–40 cm) ham petrol eklenmeden durumuna göre dökülen petrolün toprak örnekleri üzerindeki etkisi değıerlendirildiğinde, toprağıın organik karbon içeriğinde ve dolayısıyla organik madde üzerinde bir artış tespit edilmiştir. Organik madde, daha derinlerde (20-40 cm) Miran West toprağıında %0,4'lük bir artış değıerinden, yüzeysel tabakalarda (0-20 cm) Kürdamir toprağıında %8,2'ye kadar değışmiştir. Ham petrol ilavesine bağılı organik madde artışları, Kürdamirs petrol numuneleri (0-20 cm'de %0,9 ve 20-40 cm'de %1) ve Miran West (0-20 cm'de %0,5 ve 20-40 cm için %0,4) için her iki derinlikte de benzerdi, Sarqala toprak örneklerinde ise ilk 20 cm toprakta çok daha yüksekti (40 cm'de 20 için %1,4'e karşı %8,2).

Toprağıın toplam azot içeriğı, organik madde için belirlenene benzer bir model izler. Toprak profilinin derinliğı arttıkça topraklar daha düşük bir toplam azot konsantrasyonu sergiledi. Ham petrolün etkisi altındaki topraklarda toplam azot içeriğinde bir artış

olmuştur, bu artış üç toprak ve her iki numune derinliği için de geçerlidir. Toplam azot içeriğindeki bu artışlar, toprağın ilk 20 santimetresinde çok daha fazladır. Bunlar, Kurdamirs petrolündeki %0,14'lük bir artıştan Sarqala toprağındaki %0,25'lik bir artışa kadar değişmektedir. Öte yandan, değerlendirilen farklı toprak örneklerinde 20-40 cm derinlik için toplam azot artışları %0,04 ile %0,08 arasında değişmektedir, çizelge 4.2'de gösterildiğı gibi. Değişim bazlarının toplamını oluşturan değişebilir potasyum, sodyum, kalsiyum ve magnezyum içeriğı Sarqala ve Kurdamir toprak örneklerinde 10 cmol +/-kg'dan büyük değerler ve Miran West zemini için 6 cmol +/-kg'dan düşük değerler göstermiştir. Toprak tabanları, ham petrol ilavesinden dolayı değişebilir Ca içeriğinde bir artış gösterirken, K, Na ve Mg, başlangıç içeriklerini değiştirme konusunda net bir eğilim göstermedi, Çizelge 4.3'te gösterildiğı gibi.

Toprak örneklerinin mevcut fosfor (P-Olsen) sınıflandırma değerlerini düşük kullanılabilir fosfor iken Kurdemir ve Sarqala için çok düşük fosfor konsantrasyonu (5 mg/kg'dan az) olarak sunarken, Soil Miran West için 7,0 mg/kg civarındadır. Ham petrol ilavesine maruz kalmış topraklarda mevcut olan P konsantrasyonunda bir azalma tespit edildi, bu durum daha yüzeysel tabakalarda daha önemli olmak üzere üç toprak ve iki numune alma derinliği için geçerli bir durum olarak belirlendi. En yüksek iniş değeri, 1,1 mg/kg'lık bir düşüşle Kurdamir ve Sarqala 0-20 cm toprağı tarafından sunulurken, Miran Batı 20-40 cm toprağı mevcut P konsantrasyonuna göre farklılık göstermemektedir, çizelge 4.2'de gösterildiğı gibi.

Toprakların elektriksel iletkenliğı, değerlendirilen toprakların tuzluluk artışının bir ölçüsünü verir (dS/m cinsinden ifade edilen değerler) ve tüm toprak örneklerinin iletkenliğı düşük (0,5 dS/m'den az) topraklar kategorisinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca, dökülen ham petrolün etkisi nedeniyle toprakların bu parametrede önemli değişikliklere uğramadığı da tespit edilmiştir. Bu değerlerdeki değişimler, zeminlerin taban toplamlarındaki değişimlerde gözlenenlere benzerdi, çizelge 4.2'de gösterildiğı gibi.

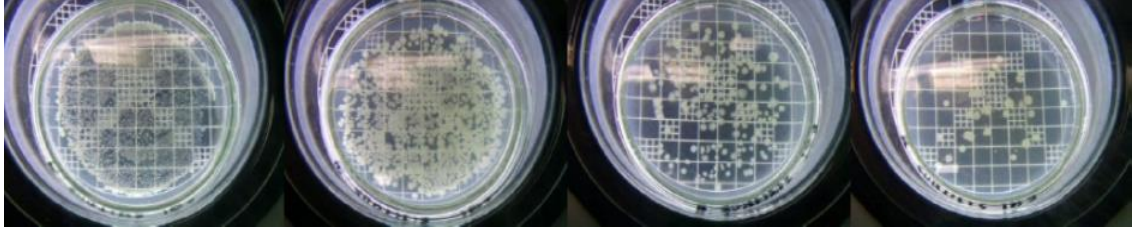
4.2 Toprakların canlı heterotrofik bakteri popülasyonlarının sayısı

KRI'da toplanan ham petrolden etkilenen ve etkilenmeyen (kontrol) toprak örneklerinde (0-20 cm ve 20-40 cm iki derinlikten) belirlenen canlı heterotrofik bakteri popülasyonlarının sayılarının değerlerini göstermektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 KRI topraklarında belirlenen heterotrofik bakteri popülasyonları

Toprak	Bakteri popülasyonu (x 102 CFU / g toprak)			
	Kontrol Toprağı (0-20 cm)	Etkilenen toprak (0-20 cm)	Kontrol Toprağı (20-40 cm)	Etkilenen toprak (20-40 cm)
Sarqala	13,8	1,08	1,69	580
Kurdamir	13,2	1,33	1,21	1,57
Miran West	10,3	1,06	1,07	720

Koloni oluşturan birimlerin (CFU) sayısını belirlemek için magnezyum ile zenginleştirilmiş et suyunun seri dilüsyonları yapıldı. Plaka sayısı sonuçları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 CFU plakası sayısı (En az seyreltilmişten (solda) en çok seyreltilmişe (sağda))

Çizelge 4.4'te en yüksek bakteri popülasyonunun (13,800 x102 CFU/g toprak) Sarqala sektöründen alınan kontrol toprak örneklerinde (0-20 cm) ve en düşük bakteri popülasyonunun (580 x102 CFU/g toprak) tespit edildiği görülmektedir, ham petrolden (20-40 cm) etkilenen Sarqala sektöründen alınan toprak örneklerinde belirlenmiştir. Analiz edilen üç durumda (kontrol toprakları) toprak profilinin derinliği arttıkça bakteri popülasyonunda belirgin bir azalma eğilimi gözlemlenir.

Öte yandan, kirlilik faktörü dikkate alınarak topraklar karşılaştırıldığında, ham petrolün dökülmesinden ve hapsolmasından etkilenen toprakların, hidrokarbon etkisi olmayan aynı topraklara (kontrol toprakları) kıyasla önemli ölçüde daha düşük popülasyonlara sahip olduğu gözlemlenebilir. Bakteri popülasyonunda belirgin bir değişikliğin olmadığı 20-40 cm derinlikte Kurdemirs petrolünde belirlenen popülasyonlar hariç.

4.3 Ham yağdan (AM + P) eklenmiş mineral agar üzerinde bakteri suşlarının kültürü ve seçimi

Çizelge 4.5'te gösterildiği gibi, seçim kriteri olarak 0,2 mm²'ye eşit veya daha büyük bir gerçek büyümeye sahip kolonileri kaydeden AM + P ortamındaki büyüme testinde seçilen 13 bakteri suşunu göstermektedir.

İlgili suşun izole edildiği sektör ve derinlik, çizelge 4.5'nin ilk sütununda suşa atanan kod, ikinci sütunda koloninin ortalama büyüme büyüklüğü ve üçüncü sütunda toprak numunesi (ham petrolden etkilenmemiş veya etkilenmemiş) belirtilmiştir. Çizelge 4.5'de gösterildiği gibi, test edilen tüm suşlar için gerçek büyümenin bireysel sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 Seçilen bakteri kolonilerinin maksimum boyutu

C61	0,2	Ham petrolden etkilenir, Sarqala, 0-20 cm
C26	0,25	Kontrol, Sarqala, 20-40 cm
C40	0,23	Kontrol, Sarqala, 20-40 cm
C42	0,2	Ham petrolden etkilenmiş, Miran Watı, 20-40 cm
C43	0,41	Ham petrolden etkilenmiş, Miran Watı, 20-40 cm
C147	0,26	Kontrol, Miran West, 20-40 cm
C152	0,33	Kontrol, Miran West, 20-40 cm
C103	0,24	Ham petrolden etkilenir, Kurdamir, 0-20 cm
C189	0,38	Ham petrolden etkilenir, Kurdamir, 20-40 cm
C177	0,22	Kontrol, Kurdamir, 0-20 cm
C179	0,28	Kontrol, Kurdamir, 0-20 cm
C180	0,74	Kontrol, Kurdamir, 0-20 cm
C88	0,51	Kontrol, Kurdamir, 20-40 cm

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme

Sarqala toprak kontrolü (0-20 cm)													
Zorlanma	Koloni boyutu (mm) Gün 0 Gün 15					Ortalama Gerçek Büyüme (mm2)	Zorlanma	Koloni boyutu (mm) Gün 0 Gün 15					Ortalama Gerçek Büyüme (mm2)
	R	L	A	L	A			R	L	A	L	A	
C121	1	0,5	0,3	0,6	0,7		C131	1	0,5	0,3	0,5	0,5	
	2	0,5	0,4	0,9	0,5	0,06		2	0,6	0,3	0,7	0,4	0,02
	3	0,5	0,3	1	0,5			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C122	1	0,3	0,2	0,7	0,6		C132	1	0,4	0,3	0,5	0,3	
	2	0,3	0,3	0,6	0,6	0,12		2	0,5	0,3	0,6	0,3	0
	3	0,4	0,3	0,8	0,6			3	0,4	0,4	0,6	0,4	
C123	1	0,2	0,2	0,2	0,2		C133	1	0,4	0,3	0,6	0,3	
	2	0,3	0,2	0,3	0,2	0		2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,01
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,2	0,2	0,4	0,3	
C124	1	0,3	0,2	0,3	0,3		C134	1	0,3	0,3	0,7	0,7	
	2	0,2	0,2	0,3	0,3	0		2	0,3	0,2	0,6	0,6	0,16
	3	0,2	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,2	0,7	0,7	
C125	1	0,4	0,3	1	0,4		C135	1	0,5	0,3	0,5	0,5	
	2	0,5	0,3	0,8	0,6	0,06		2	0,5	0,2	0,7	0,6	0,03
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,8	0,3	0,8	0,5	
C126	1	0,4	0,3	0,9	0,4		C136	1	0,2	0,2	0,8	0,6	
	2	0,8	0,3	1,3	0,4	0,06		2	0,3	0,3	0,7	0,6	0,17
	3	0,5	0,3	1,3	0,4			3	0,3	0,3	0,8	0,6	
C127	1	0,2	0,2	0,6	0,6		C137	1	0,3	0,2	0,3	0,3	
	2	0,3	0,2	0,9	0,4	0,13		2	0,2	0,2	0,3	0,3	0
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,2	0,2	0,3	0,2	
C128	1	0,4	0,3	1	0,4		C138	1	0,3	0,3	0,4	0,4	
	2	0,5	0,3	0,8	0,6	0,06		2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,04
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,2	0,8	0,4	
C129	1	0,3	0,3	0,4	0,4		C139	1	0,5	0,3	0,5	0,5	
	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,04		2	0,6	0,3	0,7	0,4	0,02
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C130	1	0,4	0,3	0,7	0,5		C140	1	0,2	0,1	0,2	0,1	
	2	0,4	0,3	0,6	0,5	0,05		2	0,2	0,2	0,9	0,4	0,05
	3	0,3	0,3	0,8	0,4			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
AM + P'de yetiştirilen Sarqala toprağından (20-40) cm izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme.													
C21	1	0,3	0,2	0,3	0,3		C31	1	0,2	0,2	0,7	0,5	
	2	0,2	0,2	0,3	0,3	0		2	0,3	0,3	0,6	0,5	0,13
	3	0,2	0,2	0,3	0,2			3	0,4	0,2	1	0,5	
C22	1	0,2	0,2	0,4	0,3		C32	1	0,2	0,2	0,9	0,3	
	2	0,1	0,1	0,5	0,4	2		2	0,2	0,2	0,9	0,4	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

	3	0,2	0,2	0,6	0,3			3	0,2	0,2	1	0,5	
C23	1	0,3	0,2	0,3	0,3		C33	1	0,3	0,2	0,3	0,2	
	2	0,4	0,2	0,5	0,3	0		2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
	3	0,6	0,2	0,6	0,2			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C24	1	0,4	0,2	0,8	0,3		C34	1	0,3	0,3	0,6	0,6	
	2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,02		2	0,3	0,3	0,6	0,5	0,12
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,7	
C25	1	0,3	0,2	0,3	0,2		C35	1	0,4	0,3	0,8	0,4	
	2	0,4	0,3	0,4	0,3	0		2	0,3	0,2	1	0,4	0,08
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C26	1	0,3	0,2	1,2	0,8		C36	1	0,2	0,2	0,8	0,6	
	2	0,4	0,2	0,8	0,6	0,25		2	0,3	0,3	0,7	0,6	0,17
	3	0,2	0,2	0,6	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,6	
C27	1	0,3	0,2	0,7	0,6		C37	1	0,2	0,2	0,6	0,5	
	2	0,3	0,3	0,6	0,6	0,12		2	0,3	0,1	0,8	0,2	0,06
	3	0,4	0,3	0,8	0,6			3	0,2	0,2	0,7	0,2	
C28	1	0,2	0,2	0,2	0,2		C38	1	0,2	0,1	0,2	0,1	
	2	0,3	0,2	0,3	0,2	0		2	0,2	0,2	0,9	0,4	0,05
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
C29	1	0,2	0,2	0,9	0,3		C39	1	0,5	0,2	1	0,3	
	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,03		2	0,5	0,3	1	0,3	0,02
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,4	0,3	0,5	0,3	
C30	1	0,4	0,3	0,9	0,3		C40	1	0,2	0,2	1,2	0,6	
	2	0,3	0,3	0,8	0,4	0,02		2	0,3	0,2	1	0,5	0,23
	3	0,4	0,3	0,5	0,4			3	0,2	0,2	0,9	0,3	
Kirlenmiş Sarqala toprağından (0–20 cm) izole edilen suşlar için gerçek büyüme AM + P,													
C61	1	0,3	0,3	1	1		C71	1	0,4	0,2	0,8	0,6	
	2	0,3	0,3	0,9	0,4	0,2		2	0,6	0,4	1,1	0,4	0,06
	3	0,3	0,3	0,6	0,5			3	0,7	0,4	1	0,5	
C62	1	0,3	0,2	0,4	0,2		C72	1	0,4	0,2	0,9	0,3	
	2	0,4	0,4	0,4	0,4	0		2	0,4	0,2	0,7	0,5	0,08
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,6	0,3	1,1	0,5	
C63	1	0,2	0,2	0,4	0,6		C73	1	0,6	0,3	1	0,4	
	2	0,4	0,4	0,6	1	0,07		2	0,4	0,3	0,8	0,4	0,05
	3	0,3	0,3	0,3	0,4			3	0,3	0,3	0,6	0,5	
C64	1	0,4	0,3	0,8	0,6		C74	1	0,4	0,4	0,6	0,6	
	2	0,2	0,2	0,6	0,6	0,15		2	0,4	0,4	0,6	0,6	0,03
	3	0,2	0,2	1	0,4			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C65	1	0,6	0,3	1	0,4		C75	1	0,6	0,4	1,1	0,7	
	2	0,4	0,3	0,8	0,4	0,05		2	0,4	0,4	1,1	0,6	0,1
	3	0,3	0,3	0,6	0,5			3	0,5	0,4	0,8	0,4	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

C66	1	0,4	0,4	0,6	0,6		C76	1	0,5	0,5	0,6	0,5	
	2	0,4	0,4	0,6	0,6	0,03		2	0,3	0,3	0,6	0,3	0
	3	0,5	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,3	0,4	0,4	
C67	1	0,6	0,4	1,1	0,7		C77	1	0,5	0,3	0,9	0,6	
	2	0,4	0,4	1,1	0,6	0,1		2	0,4	0,3	0,7	0,5	0,09
	3	0,5	0,4	0,8	0,4			3	0,4	0,2	0,8	0,4	
C68	1	0,5	0,5	0,6	0,5		C78	1	0,5	0,3	0,6	0,7	
	2	0,3	0,3	0,6	0,3	0		2	0,5	0,4	0,9	0,5	0,06
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,5	0,3	1	0,5	
C69	1	0,5	0,3	0,9	0,6		C79	1	0,4	0,2	0,8	0,6	
	2	0,4	0,3	0,7	0,5	0,09		2	0,6	0,4	1,1	0,4	0,06
	3	0,4	0,2	0,8	0,4			3	0,7	0,4	1	0,5	
C70	1	0,5	0,3	0,6	0,7		C80	1	0,4	0,3	1	0,4	
	2	0,5	0,4	0,9	0,5	0,06		2	0,5	0,3	0,8	0,6	0,06
	3	0,5	0,3	1	0,5			3	0,3	0,3	0,6	0,4	
AM + P'de kontamine Sarqala toprağından (20-40 cm) izole edilen suşlar için gerçek büyüme,													
C1	1	0,2	0,2	0,2	0,2		C11	1	0,2	0,2	0,6	0,3	
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0		2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,04
	3	0,2	0,2	0,2	0,2			3	0,4	0,3	0,9	0,4	
C2	1	0,3	0,3	0,3	0,3		C2	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,3	0,3	0,3	0,3	0		2	0,3	0,3	0,3	0,3	0
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
C3	1	0,4	0,2	0,4	0,2		C13	1	0,3	0,3	0,7	0,5	
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0		2	0,3	0,3	0,8	0,4	0,06
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,4	0,3	0,7	0,5	
C4	1	0,4	0,3	0,7	0,5		C14	1	0,5	0,3	0,8	0,5	
	2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,05		2	0,2	0,2	1	0,5	0,11
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,4	0,2	0,5	0,4	
C5	1	0,2	0,2	0,2	0,2		C15	1	0,3	0,2	0,4	0,2	
	2	0,3	0,2	0,3	0,2	0		2	0,2	0,2	0,3	0,2	0
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
C6	1	0,3	0,2	0,4	0,3		C16	1	0,3	0,3	0,4	0,4	
	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,02		2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,01
	3	0,3	0,3	0,5	0,5			3	0,2	0,2	0,3	0,3	
C7	1	0,2	0,2	0,8	0,5		C17	1	0,3	0,3	1	0,4	
	2	0,2	0,2	0,6	0,5	0,14		2	0,3	0,2	0,5	0,3	0,03
	3	0,2	0,2	0,6	0,5			3	0,3	0,2	0,3	0,3	
C8	1	0,2	0,2	0,2	0,2		C18	1	0,3	0,2	0,3	0,3	
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0		2	0,2	0,2	0,3	0,3	0
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,2	0,2	0,3	0,2	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

C9	1	0,4	0,3	0,5	0,4		C19	1	0,3	0,2	0,3	0,2	
	2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,01		2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
	3	0,4	0,3	0,5	0,4			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C10	1	0,3	0,3	0,4	0,3		C20	1	0,2	0,2	0,6	0,4	
	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,02		2	0,2	0,2	0,5	0,4	0,06
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,2	0,5	0,4	
AM + P'de yetiştirilen Control Miran West (0–20 cm) toprağından izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
221	1	0,4	0,3	0,6	0,5		231	1	0,4	0,2	0,8	0,3	
	2	0,3	0,2	0,5	0,4	0,03		2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,02
	3	0,4	0,2	0,5	0,4			3	0,4	0,2	0,5	0,3	
222	1	0,4	0,3	1	0,4		232	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,5	0,3	1,1	0,4	0,06		2	0,4	0,3	0,4	0,3	0
	3	0,3	0,3	1	0,4			3	0,5	0,3	0,5	0,3	
223	1	0,2	0,2	0,7	0,3		233	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,3	0,1	0,8	0,3	0,05		2	0,4	0,2	0,4	0,2	0
	3	0,3	0,3	0,4	0,3			3	0,7	0,2	1	0,2	
224	1	0,2	0,1	0,6	0,2		234	1	0,5	0,2	0,9	0,7	
	2	0,4	0,1	0,6	0,2	0,03		2	0,6	0,2	0,6	0,6	0,07
	3	0,5	0,1	0,8	0,2			3	0,5	0,3	0,6	0,5	
225	1	0,2	0,2	0,6	0,4		235	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,05		2	0,4	0,2	0,4	0,2	0
	3	0,4	0,2	0,6	0,4			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
226	1	0,4	0,4	0,6	0,4		236	1	0,5	0,2	0,7	0,5	
	2	0,4	0,3	1	0,4	0,03		2	0,4	0,3	0,6	0,5	0,05
	3	0,6	0,3	0,8	0,4			3	0,4	0,3	0,6	0,5	
227	1	0,1	0,1	0,3	0,1		237	1	0,4	0,4	0,6	0,6	
	2	0,2	0,2	0,7	0,3	0,05		2	0,3	0,3	0,6	0,5	0,05
	3	0,1	0,1	0,6	0,3			3	0,4	0,3	0,6	0,5	
222	1	0,4	0,3	1	0,4		232	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,5	0,3	1,1	0,4	0,06		2	0,4	0,3	0,4	0,3	0
	3	0,3	0,3	1	0,4			3	0,5	0,3	0,5	0,3	
223	1	0,2	0,2	0,7	0,3		233	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,3	0,1	0,8	0,3	0,05		2	0,4	0,2	0,4	0,2	0
	3	0,3	0,3	0,4	0,3			3	0,7	0,2	1	0,2	
224	1	0,2	0,1	0,6	0,2		234	1	0,5	0,2	0,9	0,7	
	2	0,4	0,1	0,6	0,2	0,03		2	0,6	0,2	0,6	0,6	0,07
	3	0,5	0,1	0,8	0,2			3	0,5	0,3	0,6	0,5	
AM + P'de yetiştirilen Control Miran West (20-40 cm) toprağından izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
141	1	0,3	0,3	0,4	0,3		151	1	0,2	0,2	0,8	0,2	
	2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,01		2	0,5	0,2	0,6	0,2	0

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

	3	0,2	0,2	0,4	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
142	1	0,5	0,3	0,8	0,5		152	1	0,5	0,2	0,7	0,4	
	2	0,6	0,3	1,2	0,7	0,13		2	0,4	0,3	1,4	0,7	0,33
	3	0,4	0,4	1,4	0,5			3	0,3	0,3	1,4	0,8	
143	1	0,4	0,1	0,5	0,2		153	1	0,3	0,3	0,3	0,3	
	2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,01		2	0,4	0,3	0,5	0,5	0,02
	3	0,1	0,1	0,3	0,1			3	0,2	0,2	0,4	0,4	
144	1	0,5	0,3	0,7	0,4		154	1	0,3	0,2	0,8	0,3	
	2	0,5	0,2	0,7	0,3	0,03		2	0,4	0,2	1	0,3	0,04
	3	0,4	0,4	0,6	0,6			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
145	1	0,5	0,4	0,5	0,4		155	1	0,5	0,3	1,1	0,4	
	2	0,5	0,3	0,5	0,3	0		2	0,3	0,3	0,9	0,3	0,03
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,5	0,3	0,8	0,4	
146	1	0,5	0,3	1	0,5		156	1	0,7	0,2	1,2	0,3	
	2	0,5	0,3	1	0,5	0,11		2	0,6	0,3	1,1	0,3	0,04
	3	0,3	0,3	1	0,5			3	0,5	0,3	1,1	0,4	
147	1	0,5	0,5	1,5	1,2		157	1	0,2	0,2	0,9	0,6	
	2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,26		2	0,4	0,3	1,1	0,6	0,2
	3	0,4	0,3	1,2	0,4			3	0,4	0,3	1	0,5	
148	1	1	0,2	1	0,2		158	1	0,5	0,2	0,6	0,4	
	2	0,6	0,2	0,6	0,3	0		2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,03
	3	0,3	0,2	0,4	0,3			3	0,2	0,2	0,4	0,4	
149	1	0,3	0,3	0,8	0,8		159	1	0,4	0,3	0,6	0,5	
	2	0,4	0,3	0,9	0,4	0,12		2	0,3	0,2	0,5	0,4	0,03
	3	0,3	0,2	0,9	0,3			3	0,4	0,2	0,5	0,4	
150	1	0,4	0,3	1,1	0,3		160	1	0,2	0,2	0,5	0,2	
	2	0,4	0,2	1,1	0,2	0,01		2	0,4	0,2	0,6	0,2	0
	3	0,5	0,2	0,9	0,3			3	0,3	0,2	0,5	0,2	
AM + P'de yetiştirilen Kirlenmiş Miran West (0–20 cm) topraktan izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
201	1	0,3	0,3	0,4	0,4		211	1	0,5	0,2	0,6	0,2	
	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,04		2	0,3	0,2	0,3	0,2	0
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
202	1	0,2	0,2	0,2	0,2		212	1	0,2	0,2	0,3	0,3	
	2	0,2	0,2	0,3	0,3	0		2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,01
	3	0,3	0,2	0,3	0,3			3	0,2	0,2	0,3	0,2	
203	1	0,3	0,2	0,5	0,3		213	1	0,3	0,1	0,3	0,2	
	2	0,4	0,2	0,6	0,3	0,01		2	0,4	0,4	0,4	0,5	0
	3	0,2	0,1	0,3	0,1			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
204	1	0,4	0,2	0,5	0,3		214	1	0,3	0,2	0,5	0,3	
	2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,05		2	0,4	0,2	0,8	0,3	0,05
	3	0,3	0,2	0,6	0,5			3	0,6	0,3	1	0,5	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

205	1	0,4	0,3	0,4	0,3		215	1	0,5	0,3	0,6	0,3	
	2	0,3	0,3	0,3	0,3	0		2	0,3	0,2	0,4	0,3	0
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
206	1	0,2	0,1	0,6	0,2		216	1	0,4	0,4	0,4	0,4	
	2	0,4	0,1	0,6	0,2	0,03		2	0,6	0,4	0,6	0,4	0
	3	0,5	0,1	0,8	0,2			3	0,4	0,3	0,4	0,3	
207	1	0,4	0,2	0,8	0,3		217	1	0,6	0,2	0,8	0,3	
	2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,02		2	0,3	0,3	0,6	0,3	0,02
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,4	0,2	0,7	0,3	
208	1	0,3	0,3	0,3	0,3		218	1	0,3	0,3	0,7	0,3	
	2	0,4	0,3	0,4	0,3	0		2	0,3	0,3	0,5	0,3	0
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,3	0,3	0,5	0,3	
209	1	0,3	0,2	0,6	0,3		219	1	0,8	0,2	0,8	0,3	
	2	0,3	0,1	0,6	0,2	0,02		2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,01
	3	0,4	0,2	0,5	0,2			3	0,3	0,3	0,4	0,4	
210	1	0,3	0,3	0,4	0,3		220	1	0,4	0,2	0,4	0,2	
	2	0,4	0,2	0,5	0,3	0		2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,01
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,2	0,2	0,3	0,3	
AM + P'de yetiştirilen Toprak Kirlenmiş Miran West (20-40 cm)'den izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
41	1	0,8	0,2	0,8	0,3		51	1	0,3	0,2	0,4	0,3	
	2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,01		2	0,4	0,4	0,5	0,4	0,01
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
42	1	0,3	0,3	1	0,5		52	1	0,5	0,3	0,9	0,4	
	2	0,3	0,3	1,6	0,5	0,2		2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,05
	3	0,4	0,3	1,4	0,5			3	0,5	0,3	0,7	0,6	
43	1	0,4	0,3	0,8	1,2		53	1	0,2	0,2	0,8	0,2	
	2	0,3	0,3	1,6	0,9	0,54		2	0,5	0,2	0,6	0,2	0
	3	0,4	0,2	1,2	0,8			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
44	1	0,3	0,3	0,3	0,3		54	1	0,3	0,2	0,3	0,3	
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0		2	0,4	0,2	0,5	0,3	0
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,6	0,2	0,6	0,2	
45	1	0,3	0,3	0,3	0,3		55	1	0,3	0,2	0,3	0,3	
	2	0,4	0,3	0,4	0,3	0		2	0,4	0,2	0,5	0,3	0
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,6	0,2	0,6	0,2	
46	1	0,3	0,2	0,4	0,3		56	1	0,2	0,2	0,8	0,2	
	2	0,4	0,4	0,5	0,4	0,01		2	0,5	0,2	0,6	0,2	0
	3	0,3	0,2	0,4	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
47	1	0,5	0,3	0,9	0,4		57	1	0,3	0,3	0,4	0,3	
	2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,05		2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,01
	3	0,5	0,3	0,7	0,6			3	0,2	0,2	0,4	0,3	
48	1	0,3	0,2	0,3	0,3		58	1	0,2	0,2	0,2	0,2	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

	3	0,6	0,2	0,6	0,2			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
49	1	0,4	0,2	0,8	0,3		59	1	0,3	0,1	0,9	0,3	
	2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,02		2	0,3	0,2	0,6	0,5	0,12
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,3	0,1	1	0,3	
50	1	0,3	0,3	0,3	0,3		60	1	0,2	0,2	0,4	0,2	
	2	0,4	0,3	0,4	0,3	0		2	0,2	0,2	0,3	0,2	0
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
AM + P'de yetiştirilen toprak Kirdamir kontrolünden (0-20 cm) izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
C161	1	0,4	0,3	0,5	0,5		C171	1	0,5	0,2	1,2	0,6	
	2	1,1	0,2	1,4	0,3	0,02		2	0,6	0,3	1,4	0,5	0,19
	3	0,6	0,3	0,7	0,4			3	0,3	0,2	1	0,4	
C162	1	0,3	0,2	1	0,5		C172	1	0,5	0,3	0,5	0,3	
	2	0,4	0,2	1,4	0,3	0,13		2	0,3	0,2	0,3	0,2	0
	3	0,5	0,2	1,4	0,3			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
C164	1	0,3	0,3	1,3	0,3		C174	1	0,6	0,4	0,9	0,4	
	2	0,2	0,2	1,4	0,3	0,11		2	0,2	0,2	1,3	0,6	0,17
	3	0,2	0,2	1,2	0,4			3	0,4	0,3	0,7	0,5	
C165	1	0,3	0,3	0,9	0,4		C175	1	0,3	0,2	0,9	0,4	
	2	0,4	0,2	1	0,3	0,05		2	0,4	0,3	1,2	0,5	0,12
	3	0,3	0,3	0,7	0,4			3	0,4	0,3	0,8	0,5	
C166	1	0,4	0,3	0,4	0,4		C176	1	0,3	0,3	0,8	0,4	
	2	0,4	0,3	0,6	0,4	0,01		2	0,3	0,3	1,1	0,4	0,05
	3	0,4	0,3	0,5	0,5			3	0,3	0,3	0,6	0,4	
C167	1	0,7	0,2	1	0,3		C177	1	0,2	0,2	1	0,6	
	2	0,5	0,3	1,1	0,4	0,06		2	0,4	0,2	1,3	0,5	0,22
	3	0,5	0,3	0,9	0,5			3	0,6	0,3	1	0,5	
C168	1	1	0,2	1,6	0,2		C178	1	0,3	0,2	0,3	0,2	
	2	0,5	0,2	0,7	0,2	0		2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
	3	0,4	0,2	0,7	0,2			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C169	1	0,3	0,3	1,5	0,5		C179	1	0,3	0,3	1,6	0,6	
	2	0,4	0,2	1	0,6	0,18		2	0,5	0,3	1,4	0,6	0,28
	3	0,3	0,3	0,9	0,4			3	0,4	0,2	1	0,5	
C170	1	0,6	0,2	0,9	0,5		C180	1	0,2	0,2	1,2	0,8	
	2	0,4	0,2	1	0,3	0,08		2	0,2	0,2	1,6	0,9	0,74
	3	0,3	0,3	1,3	0,4			3	0,1	0,1	2,2	0,4	
AM + P'de yetiştirilen kontamine Kirdamir toprağından (0-20 cm) izole edilen suşların gerçek büyümesi,													
C101	1	0,5	0,3	0,5	0,5		C111	1	0,5	0,3	1,1	0,5	
	2	0,6	0,3	0,7	0,4	0,02		2	0,3	0,3	1	0,4	0,06
	3	0,3	0,3	0,9	0,4			3	0,4	0,3	1,1	0,3	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

C101	1	0,5	0,3	0,5	0,5		C111	1	0,5	0,3	1,1	0,5	
	2	0,6	0,3	0,7	0,4	0,02		2	0,3	0,3	1	0,4	0,06
	3	0,3	0,3	0,9	0,4			3	0,4	0,3	1,1	0,3	
C102	1	0,4	0,3	0,7	0,4		C112	1	0,6	0,3	1,4	0,4	
	2	0,5	0,2	0,7	0,5	0,07		2	0,4	0,3	0,9	0,4	0,09
	3	0,3	0,3	0,9	0,5			3	0,5	0,3	1	0,6	
C103	1	0,4	0,2	1,5	0,5		C113	1	0,7	0,3	1,4	0,5	
	2	0,6	0,2	0,9	0,3	0,24		2	0,4	0,3	0,9	0,5	0,08
	3	0,5	0,4	1,4	0,8			3	0,4	0,4	1	0,4	
C104	1	0,6	0,3	0,6	0,3		C114	1	0,5	0,4	0,5	0,4	
	2	0,7	0,3	0,7	0,3	0		2	0,6	0,3	0,6	0,3	0
	3	0,6	0,3	0,6	0,3			3	0,6	0,4	0,6	0,4	
C105	1	0,6	0,3	1,1	0,5		C115	1	0,5	0,4	0,8	0,6	
	2	0,5	0,3	0,7	0,4	0,06		2	0,3	0,3	0,5	0,5	0,07
	3	0,5	0,3	1	0,4			3	0,4	0,3	0,8	0,6	
C106	1	0,4	0,3	1,1	0,4		C116	1	0,3	0,3	0,5	0,3	
	2	0,5	0,3	1,2	0,4	0,05		2	0,5	0,3	0,6	0,4	0,01
	3	0,3	0,3	0,8	0,3			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C107	1	0,7	0,3	1	0,5		C117	1	0,2	0,2	0,2	0,2	
	2	0,6	0,4	0,7	0,6	0,08		2	0,3	0,3	0,3	0,3	0
	3	0,6	0,4	1	0,8			3	0,4	0,4	0,4	0,4	
C108	1	0,5	0,3	1	0,4		C118	1	0,2	0,2	0,4	0,3	
	2	0,5	0,3	1,5	0,4	0,12		2	0,1	0,1	0,5	0,4	0,06
	3	0,2	0,2	1,2	0,4			3	0,2	0,2	0,6	0,3	
C109	1	0,2	0,2	0,5	0,5		C119	1	0,6	0,3	0,8	0,6	
	2	0,5	0,3	0,7	0,5	0,1		2	0,4	0,4	0,8	0,5	0,04
	3	0,3	0,3	1,1	0,5			3	0,5	0,5	0,6	0,6	
C110	1	0,3	0,2	1	0,5		C120	1	0,7	0,3	1	0,5	
	2	0,4	0,3	1,4	0,4	0,11		2	0,6	0,3	0,9	0,4	0,04
	3	0,6	0,3	0,9	0,4			3	0,5	0,3	0,7	0,4	
AM + P'de yetiştirilen kontamine Kurdamir toprağından (20-40 cm) izole edilen suşların gerçek gelişimi,													
C181	1	0,2	0,2	0,5	0,5		C191	1	0,1	0,1	0,5	0,1	
	2	0,5	0,3	0,7	0,5	0,1		2	0,1	0,1	0,3	0,1	0
	3	0,3	0,3	1,1	0,5			3	0,4	0,2	0,6	0,2	
C182	1	0,4	0,3	0,8	0,3		C192	1	0,3	0,1	0,3	0,2	
	2	0,7	0,2	0,9	0,3	0,01		2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
	3	0,4	0,3	0,8	0,3			3	0,4	0,1	0,4	0,3	
C183	1	0,4	0,3	1,1	0,4		C193	1	0,2	0,2	0,3	0,2	
	2	0,5	0,4	1	0,5	0,05		2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,01
	3	0,8	0,3	1,1	0,4			3	0,3	0,3	0,5	0,4	

Çizelge 4.6 AM + P'de yetiştirilen topraklardan izole edilen kontrol suşları için gerçek büyüme (Devam)

C184	1	0,5	0,2	0,8	0,4		C194	1	0,5	0,2	1	0,2	
	2	0,4	0,2	0,5	0,2	0,02		2	0,5	0,3	1,4	0,4	0,06
	3	0,2	0,2	0,2	0,2			3	0,5	0,3	1,4	0,4	
C185	1	0,4	0,4	0,6	0,4		C195	1	0,1	0,1	0,8	0,3	
	2	0,4	0,3	1	0,4	0,03		2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,06
	3	0,6	0,3	0,8	0,4			3	0,1	0,1	0,4	0,2	
C186	1	0,4	0,3	0,4	0,3		C196	1	0,3	0,2	1,1	0,4	
	2	0,6	0,3	0,6	0,3	0		2	0,3	0,2	0,8	0,4	0,12
	3	0,7	0,3	0,7	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,5	
C187	1	0,4	0,3	0,6	0,3		C197	1	0,3	0,3	0,5	0,3	
	2	0,3	0,3	0,7	0,4	0,04		2	0,5	0,3	0,6	0,4	0,01
	3	0,3	0,3	1,1	0,4			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C188	1	0,4	0,3	1,4	0,5		C198	1	0,2	0,2	0,2	0,2	
	2	0,4	0,3	1	0,4	0,12		2	0,3	0,3	0,3	0,3	0
	3	0,3	0,3	1,3	0,4			3	0,4	0,4	0,4	0,4	
C189	1	0,3	0,3	1,3	0,9		C199	1	0,4	0,3	0,6	0,3	
	2	0,1	0,1	0,6	0,7	0,38		2	0,3	0,3	0,7	0,4	0,04
	3	0,1	0,1	0,7	0,5			3	0,3	0,3	1,1	0,4	
C190	1	0,1	0,1	0,2	0,2		C200	1	0,4	0,3	1,4	0,5	
	2	0,1	0,1	0,4	0,3	0,02		2	0,4	0,3	1	0,4	0,12
	3	0,2	0,2	0,5	0,2			3	0,3	0,3	1,3	0,4	

Çizelge 4.9'da gösterildiği gibi, seçilen 13 suşun maksimum koloni boyutunun, ortalama 0.74 mm²'lik bir gerçek büyüme ile C180 suşu tarafından sunulduğu görülebilir. Bu suş, Kurdamir'in 0-20 cm derinliğinde toplanan kontrol toprak örneğinden izole edilmiştir. Çizelge 4.6'da ise, bakteri kolonilerinin maksimum boyutlarının, hem kontrol topraklarından hem de ham petrolden etkilenenlerden 20-40 cm derinlikten izole edilen suşlar tarafından sunulma eğiliminde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7 'te gösterildiği gibi, ham yağ ilaveli mineral et suyunda (CM + P) büyüme testlerinde kullanılacak beş tanesini seçmek için seçilen 13 suşun tabi tutulduğu istatistiksel analizin sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 4.7 Seçilmiş 13 bakteri suşu için istatistiksel analiz

Zorlanma	Tekrarlar	Ortalama (mm ²)	Homojen Gruplar
C42	3	0,2	a
C61	3	0,2	a
C177	3	0,22	a
C40	3	0,23	a
C103	3	0,24	a
C26	3	0,25	a
C147	3	0,26	a
C179	3	0,28	a
C189	3	0,38	a
C152	3	0,4	a
C43	3	0,41	ab
C88	3	0,51	ab
C180	3	0,74	b

Seçilen diğer suşların kolonilerinin geri kalanından çizelge 4.11'de gözlemlendiği gibi, 15 gün boyunca (AM + P) kültürlendikten sonra seçilen on üç bakteri suşu için ANOVA analizi, C180 suşunun kolonilerinin (0,74 mm²) gerçek büyümesinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini gösterir ($p \leq 0,005$). C189, C152, C43 ve C88 suşlarının kolonileri, birbirleriyle karşılaştırıldığında büyümelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermeseler de, en yüksek ortalama büyüme değerlerini sundukları için seçilmişlerdir.

4.4 Ham yağ (CM + P) eklenen mineral et suyunda bakteri türlerinin büyümesi

Seçilen beş bakteri suşunun, 15 gün boyunca ham yağ (CM + P) eklenmiş mineral et suyunda kültürlerinden sonra büyümesinin sonuçlarını gösterir. Bu test için bir seçim kriteri olarak, gram olarak ifade edilen bakteri kültürünün taze ağırlığındaki artış tahmin edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Yağ eklenmiş mineral et suyunda bakteri kültürlerinin taze ağırlığı

	Seçilen bakteri kültürlerinin ortalama taze ağırlığı (g Bakteriyel Pelet / 1000 mL CM+P)	
Zorlanma	Test günü 0	Test günü 15
C180	0,01	0,02
C189	0,01	0,01
C152	0,02	0,02
C88	0,02	0,03
C43	0,03	0,03

Çizelge 4.11'de görülebileceği gibi, denemenin sonunda (15 gün) taze ağırlıktaki en büyük artış C180 ve C88 suşlarının (0,01 g / 100 mL) kültürlerinde kaydedilmiştir, test edilen suşların geri kalanı ağırlık artışı kaydetmedi. Bu nedenle, ham petrolün parçalayıcı kinetiğini gerçekleştirmek için C88 ve C180 suşları seçilmiştir.

4.5 Ham petrolün parçalayıcı kinetiğini gerçekleştirmek için bakteri suşunun taksonomik tespiti

Seçilen iki suş için belirlenen morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler belirtilmiştir ve bunlar, Bergey'in bakteriyolojik tanımlama kılavuzundaki tanı tabloları ile karşılaştırıldığında, çalışmadaki suşların taksonomik tanımlanmasına izin vermiştir, Çizelge 4.9'da gösterildiği gibi.

Çizelge 4.9 Seçilen bakteri suşlarının taksonomik tespiti

Morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler	Bakteri soyları	
	C180	C88
Bakteriyel hücre şekli	Basiller	Basiller
Bakteriyel hücre gramı	Pozitif	Pozitif
Wirtz lekesi	Pozitif	Pozitif
Bakteriyel endospor oluşumu	Pozitif	Pozitif
Bakteriyel endospor formu	Eliptik	Eliptik
Bakteriyel endospor pozisyonu	Merkezi	Merkezi
Katalaz testi	+	+
Oksidaz testi	-	-

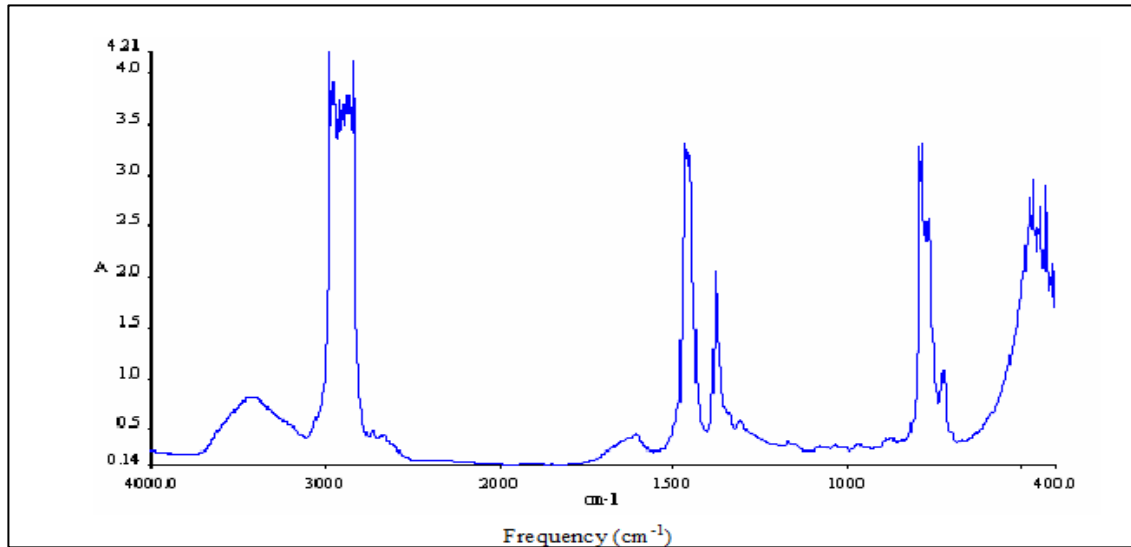
Çizelge 4.9 Ham petrolün parçalayıcı kinetiğini gerçekleştirmek için seçilen bakteri suşlarının taksonomik tespiti (Devam)

Metil Kırmızı Testi (Asit)	+	-
Voges Proskauer testi (asetoin)	-	-
Nitrat azaltma testi	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	-
Anaerobiyozda Büyüme	+	-
Pozitif Test = (+). Negatif test = (-).		

Seçilen iki bakteri suşunun morfolojik ve boyama özelliklerine ve fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre her ikisinin de *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlendi. C180 suşu *Bacillus coagulans*'a ve C88 suşu *Bacillus brevis*'e karşılık gelir.

4.6 Ham petrolün fonksiyonel gruplarının bozunmasının belirlenmesi

Kızılötesi spektrofotometri ile elde edilen okumalar, absorbans ve radyasyon frekansı arasındaki ilişkiyi temsil eder, böylece incelenen ham petrolün ana bileşen gruplarının bir okumasını sağlar. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, ham petrol kontrol numunesi “Ham petrol” (Sıfır Gün) için bir spektral okuma gösterilmektedir.



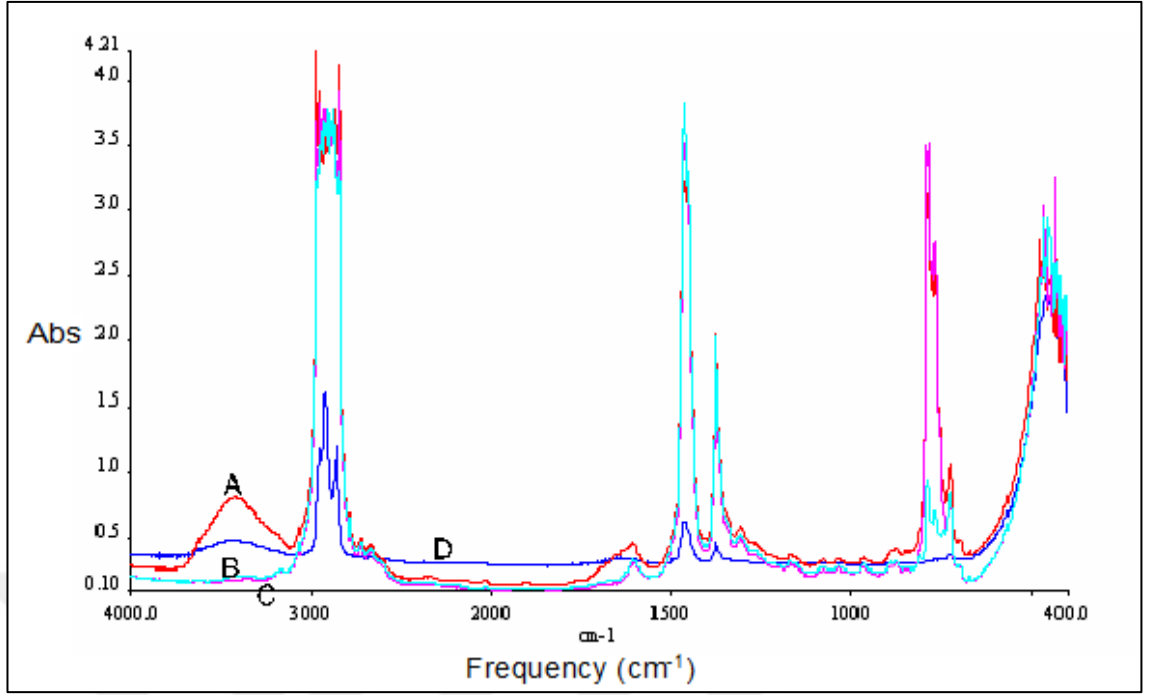
Şekil 4.2 Kontrol ham petrolünün kızılötesi spektrumu

Ham petrol kontrol numunesinin kızılötesi spektrumunun okunması Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, üç ana bölgeye ayrılabilir, bunlar: 1) 4000 - 2500 cm^{-1} arasındaki, organik bileşenleri hidrojen veya üçlü bağlantılar ile basit bağlar sunan bölge 2) 2000 - 1500 cm^{-1} arasında, çift bağ gösteren organik bileşenlere sahip bölge ve 3) 1500 - 400 cm^{-1} arasında, hidrojen olmadan organik bileşiklerin belirgin bir şekilde baskın olduğu bölge.

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, ayrıca parafin tipi yağlar için tipik olan 5 tepe noktasının varlığını gösterir. Bunlardan birincisi 2950 cm^{-1} frekansında kendini gösterir ve esas olarak metil gruplarına karşılık gelir, ikinci absorpsiyon tepe noktası 1468 cm^{-1} frekansına karşılık gelir ve büyük bir Metilen / Metil bandına karşılık gelir, üçüncü absorpsiyonun kaydedilen frekansı tepe noktası en yüksek 1377 cm^{-1} frekansı ve zayıf bir Metil bandına karşılık gelir, dördüncü ve son absorpsiyon zirvesi 721 cm^{-1} frekansında kaydedilir ve ek bir Metilen bandına karşılık gelir. Bir ham petrol spektral okuması için önemli olan diğer fonksiyonel gruplar ve bunların ilgili frekans aralığı aşağıda belirtilmiştir.

4.6.1 *Bacillus coagulans* tarafından ham petrolün parçalayıcı kinetiği

Ham petrolün degradatif kinetiği için okumaların yapıldığı günler için belirlenen sonuçlar yani sıfırıncı gün (Kırmızı) için "A" harfi ile, gün için "B" harfi ile yedi (Celeste), onbeşinci gün için "C" harfiyle (Macenta) ve otuz gün için "D" harfiyle (Mavi) gösterilmektedir, Şekil 4.3'te gösterildiği gibi.



Şekil 4.3 C180: *Bacillus coagulans* suşu ile bozunma kinetiği

Genel olarak, ham petrolün fonksiyonel gruplarında en büyük azalmanın bozunma kinetiğinin yedinci (B) gününde meydana geldiği görülebilir, bu bozunma testin on beş (C) ve otuz (D) günlerinde daha az yoğunlukla devam eder. Yedinci günde, doymuş ve doymamış alkan gruplarının, belirli aromatik grupların, terminal alkinler ve aldehitlerin baskın olduğu toplam hidrokarbon sektörü - TPH (2850 cm^{-1} ila 3000 cm^{-1}) dışında hemen hemen tüm fonksiyonel ham petrol gruplarının bozulması gözlemlenebilir.

Bacillus coagulans'ın bozundurucu etkisinden en çok etkilenen fraksiyonlar arasında 3000 cm^{-1} dalga boyunun üzerinde oluşan sektör bulunur, spektrumun bu bölümü alkoller, fenoller, aminler ve ayrıca alkan fonksiyonel gruplarının doymuş hidrokarbon tarafı ve doymamış taraftaki belirli aromatik gruplar varlığı açısından çok zengin bir sektörü temsil eder. Bu şekilde, kızılötesi spektrumda, testin yedi gününde bu fonksiyonel gruplar için, 3000 cm^{-1} 'den büyük okumada mevcut fonksiyonel grupların %66,8'lik bir azalma ile belirgin bir azalma açıkça gözlemlenir. Onbeşinci günde bozulma olmasına rağmen, testin ilk haftasında kaydedilen önemi sağlamaz, çünkü testin yedi ila on beşinci gününden onbeşinci güne kadar fonksiyonel gruplardaki azalma sadece %1,1'dir.

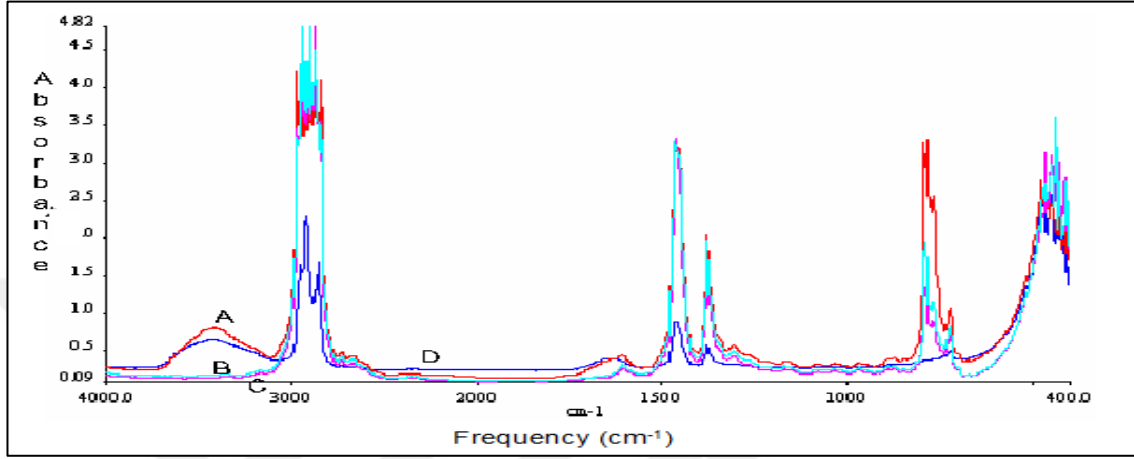
Söz konusu fonksiyonel gruplarda bir artışın gözlemlendiği 30 ölçüm gününde ise farklı bir durum gözlenmektedir. Fonksiyonel grupların konsantrasyonundaki bu artış, ölçümün on beşinci gününde var olan konsantrasyonu iki katından fazla arttırdı (fonksiyonel grupların konsantrasyonu %78). Toplam petrol hidrokarbonları (TPH) olarak adlandırılan 2850 cm^{-1} ile 3000 cm^{-1} arasındaki sektörde, ağırlıklı olarak doymuş alkan grupları ve aromatik halkalar hakimdir ve ancak ölçümün 30 gününde kayda değer bir bozulma tespit edilmiştir. Bu bozulma, testin sıfırıncı gününde ölçülen değere göre %71'e tekabül etmektedir. Öte yandan, 2800 cm^{-1} ve 2700 cm^{-1} arasındaki frekans değerleri, ölçümün yedinci gününden otuzuncu gününe kadar kısmi bir bozulma gösteren iki aldehit grubu zirvesi kaydeder.

Çift bağlı grupların (anhidritler, esterler, aldehitler, ketonlar, karboksilik asitler ve amidler gibi) baskın olduğu 1500 cm^{-1} ile 1900 cm^{-1} arasındaki sektörle ilgili olarak, bugüne kadar on beş ölçüme kadar söz konusu fonksiyonel grupların konsantrasyonunda bir artışın kaydedildiği otuzuncu günde bu durumu değiştirerek bozulmaya uğramazlar. Benzer bir durum, 2000 cm^{-1} ile 2700 cm^{-1} arasında meydana gelen, alkin fonksiyonel gruplarının ve esas olarak nitrojen bileşiklerinin baskın olduğu bir durumdur, bu bileşiklerin ölçümünde onbeşinci güne karşılık gelen bir azalma vardır, ancak spektrumda bu grupların otuzunda günde bir artış tespit edilmiştir.

Son olarak, sırasıyla metilen / metil, metil ve metilen tepelerine karşılık gelen 1470 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} ve $725 - 720\text{ cm}^{-1}$ segmentlerinde temsil edilen tipik alifatik bantların tepe noktaları için (doymuş alkanlar, aromatik bileşikler, alkin grupları ve diğerleri arasında klorlu bileşikler gibi fonksiyonel gruplar), farklı durumlar kaydedildi. Bir yandan metilen/metil ve metil pikleri (1470 cm^{-1} ve 1380 cm^{-1}) 30 güne kadar (sırasıyla %72,3 ve %51) bozulma göstermezken, $725 - 720\text{ cm}^{-1}$ pik için bir metilen bandı ile temsil edildiğinde, ikinci ölçümden sonra bozunma meydana gelir (sırasıyla %66,35 ile 15 gün ve %89,57 ile 30 gün ve %22,7 ile 15 gün ve fonksiyonel grup gradyanlarının %63'ü ile 30 gün).

4.6.2 *Bacillus brevis* ile ham petrolün bozunma kinetiği

Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, C88: *Bacillus brevis* suşu ile bozunma kinetiğine (0-30 gün) tabi tutulan ham petrol numunesinin okuması gösterilmektedir.



Şekil 4.4 *Bacillus brevis* (C88 suşu) ile ham petrolün bozunma kinetiği

Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, ham petrolün parçalayıcı kinetiği için okumaların yapıldığı günler için belirlenen spektrumlar yani sıfır gün için "A" harfi (Kırmızı) ile "B" harfi yedi (Celeste), onbeşinci gün için "C" harfiyle (Macenta) ve otuz gün için "D" harfiyle (Mavi) belirtilmiştir.

Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, görülebileceği gibi, ham petrol ham petrolünün fonksiyonel gruplarının çoğunda önemli bir azalma, esas olarak bozunma kinetiğinin yedinci gününde (B) gerçekleştirilen ölçümde kaydedildi ve on beş günden sonra daha yavaş devam etti (C). Otuz günlük ölçümde (D) yağın belirli fonksiyonel gruplarında da bir düşüş gözlenmesine rağmen, diğer fonksiyonel grupların ortaya çıkması nedeniyle bu özel bir analiz gerektirir. Şekil 4.4'e göre, sektörde alkoller, fenoller, aminler ve hidrojen ile basit bağlar sunan bileşikler ve alkanlar ve belirli aromatikler gibi fonksiyonel gruplar ağırlıklı olmak üzere 3000 cm^{-1} dalga boyunun üzerinde oluşan sektör. Bu fonksiyonel gruplar için testin yedinci gününde önemli bir azalma belirlendi, on beşinci günde daha az bozulma kaydedildi. Böylece 7 günde fonksiyonel gruplar %71,3 ve 15 günde %78,9 oranında degrade olmuştur. *Bacillus coagulans*'ta meydana

gelene benzer bir durum, degradatif kinetiğin 30 gününde de kaydedildi ve söz konusu fonksiyonel gruplarda bir artış, konsantrasyonu arttırdı. Öte yandan, doymuş alkan gruplarının (TPH) baskın olduğu 2850 cm^{-1} ile 3000 cm^{-1} arasındaki sektörde, degradatif kinetikte sadece 30 günde % 64,4'e ulaşan kayda değer bir bozulma kaydedildi. 2800 cm^{-1} ve 2700 cm^{-1} arasındaki frekans değerleri, aldehit gruplarına karşılık gelen iki tepe noktasını temsil eder ve kinetiğin yedinci gününden otuzuncu gününe kadar kısmi bir bozulma sunar.

Çift bağlı grupların (anhidritler, esterler, aldehitler, ketonlar, karboksilik asitler ve amidler ve diğerleri) baskın olduğu 1500 cm^{-1} ile 1900 cm^{-1} arasındaki sektör için, ölçümün on beşinci gününe kadar bozulmaya uğramazlar. Ölçümün 30 günü için, söz konusu fonksiyonel gruplarda bir artış ile durum değişir.

Benzer bir durum, 2000 cm^{-1} ile 2700 cm^{-1} arasında, alkin fonksiyonel grupları ve esas olarak nitrojen bileşiklerinin baskın olduğu bir durumdur, bunlar, on beşinci güne, karşılık gelen ölçüme kadar bu bileşiklerde bir azalma gösterir, otuzuncu güne ise ölçüm, spektrumda bu gruplarda bir artış gösterir.

Son olarak sırasıyla metilen/metil, metil ve metilene karşılık gelen 1470 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} ve 725-720 cm^{-1} bantları için farklı durumlar ortaya çıkmaktadır. Bir yandan metilen/metil ve metil pikleri (1470 cm^{-1} ve 1380 cm^{-1}) ölçümün 30 gününe kadar sırasıyla %71,7 ve %52,3 ile bozulma göstermezken, 725-720 cm^{-1} bandı için bu durum yedinci gün itibarıyla tespit edilmiştir, 725 cm^{-1} bandı için, yedinci günde bozulma %47,3'e, 15 günde %59,4'e ve son olarak 30 günde %82,3'e ulaşmaktadır. 720 cm^{-1} bandı için yedi, on beş ve otuzuncu günlerdeki bozulmalar sırasıyla %21, %38 ve %60'tır.

4.7 Bozunma hızının belirlenmesi

Çizelge 4.10'de gösterildiği gibi, seçilen her bakteri suşu için bağımsız olarak yürütülen degradatif kinetik testinin başlangıcından 0, 7, 15 ve 30 gün sonra kaydedilen petrol

bileşenlerinin yüzde değişimlerini gösterir. Bunun için, kızılötesi spektrofotometri ile belirlenen bir varyasyon olan, ham petrolün fonksiyonel gruplarındaki ve zaman içindeki konsantrasyonlarındaki (absorbans) azalmanın bir yüzde tahmini geliştirildi. Her numune için belirlenen petrol bileşenlerinin (fonksiyonel gruplar) konsantrasyonlarına göre, her fraksiyonun biyobozunma hızı aşağıdaki ifadeye göre hesaplanmıştır, Denklem 4.1’de gösterildiği gibi.

$$T_B = \frac{C_b - C_m}{C_b} \times 100 \quad Eq. 4.1$$

T_B : % olarak ifade edilen her fraksiyonun biyolojik bozunma oranı.

C_b : Beyaz konsantrasyonu

C_m : Numune konsantrasyonu

Çizelge 4.10 *Bacillus coagulans* ve *Bacillus brevis* suşlarına göre ham petrolün biyolojik bozunma hızı

Bakteri türü	Gün	Tekrarlama	Konsantrasyon	T_B (%)	Ortalama T_B
			(C_m)		(%)
		1	1860,3	21	
	7	2	1872,3	20,5	20,59
		3	1879,5	20,2	
		1	1710,2	27,4	
<i>Bacillus coagulans</i>	15	2	1698,6	27,9	27,56
		3	1710,5	27,4	
		1	1569,9	33,4	
	30	2	1572	33,3	33,45
		3	1561,4	33,7	
		1	1867,3	20,7	
	7	2	1897,5	19,5	20,19
		3	1875,6	20,4	
		1	1824,6	22,5	
<i>Bacillus brevis</i>	15	2	1836,8	22	22,1
		3	1844,2	21,7	
		1	1665,3	29,3	
	30	2	1689,7	28,3	28,76
		3	1679,5	28,7	
C_b konsantrasyon değeri: 2355,8					

Çizelge 4.10'de gösterildiği gibi, ham petrolün fonksiyonel gruplarının, her iki bakteri suşunun etkisinden dolayı nasıl bozulma gösterdiğini göstermektedir. *Bacillus coagulans* suşu (C180) başlangıçta hızlı bir bozunma hızı gösterir, zamanla stabilize olur, bu oran *Bacillus brevis*'in (C88) %T_B'sine kıyasla 7. günden itibaren aynı ham petrol üzerinde daha yüksek biyobozunma değerlerine (%TB) ulaşır. On beşinci günde yapılan ölçümlerde, *Bacillus coagulans*'ın ham petrol üzerindeki bozunması fonksiyonel gruplarını %27,56 oranında azaltmayı başarırken, otuzuncu günde bu bozunma %33,45 değerine ulaşmaktadır.

Bacillus brevis, başlangıçta çok hızlı bir şekilde zamanla stabilize olmak üzere ham petrol üzerinde aynı bozunma eğilimini gösterir. Testten yedi gün sonra, ham petrol fonksiyonel gruplarında ortalama %20,19 bozunmaya uğrar, on beş gün sonra bu bozunma %22,10'a ulaşır. Son olarak, testin 30 gününde ham petrol, fonksiyonel gruplarında %28,76'lık bir düşüşe ulaştı.

4.8 Parçalayıcı kinetiklerin belirlenmesi

Ham petrol bileşenlerinin konsantrasyonundaki yüzde değişimleri, her iki bakteri suşu için degradatif kinetiği belirlemeyi amaçlayan bir analize tabi tutuldu. Çizelge 11'de gösterildiği gibi, aşağıdaki ifadeye göre bir hiperbol fonksiyonuna ayarlanmış iki bakteri suşu tarafından ham petrolün bozunma analizine karşılık gelen sonuçları göstermektedir, Denklem 4.2'de gösterildiği gibi.

$$Y = \frac{B_{MAX} \times t}{K_D + t} \dots \quad Eq. 4.2$$

Y = kümülatif bozulmuş yağ miktarı

B_{MAX} = Eklenen substratın maksimum miktarı veya potansiyel bozulması

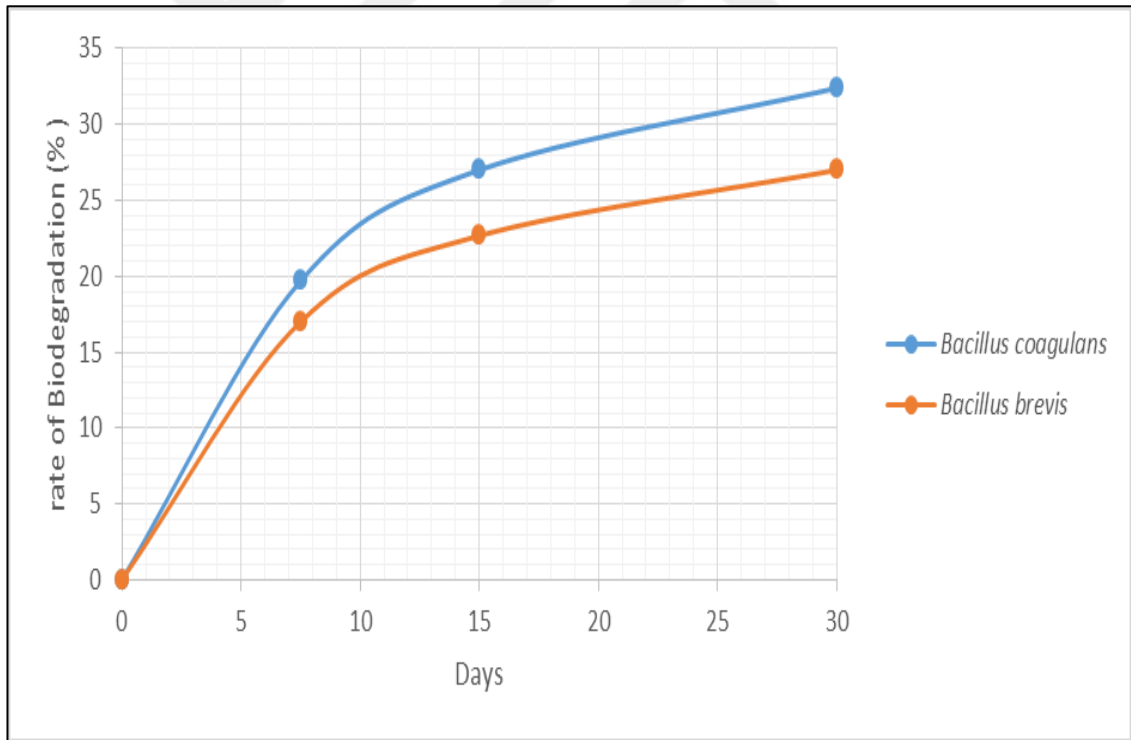
t = Zaman

K_D = B_{MAX} 'ın yarısına ulaşıldığı zamanın değerini temsil eden sabit

Çizelge 4.11 *Bacillus coagulans* ve *Bacillus brevis* tarafından ham petrol bozunmasının analizi

Değişkenler	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus brevis</i>
B_{MAX}	41,27	31,86
K_D	7,18	4,67
Güven aralıkları (%95)		
B_{MAX}	40,25 to 42,29	28,06 to 35,65
K_D	6,621 to 7,742	2,428 to 6,916
R^2	0,999	0,982

Çizelge 4.11'de gösterildiği gibi, bakteri suşlarının, K_D değeri ile ifade edilen aynı degradatif kinetiği sunduğu görülmektedir. Bununla birlikte, B_{MAX} değeri ile temsil edilen, ham petrolün bozunması için en büyük potansiyele sahip olan *Bacillus coagulans* suşudur, Şekil 4.5'te gösterildiği gibi.



Şekil 4.5 *Bacillus coagulans* ve *Bacillus brevis* tarafından ham petrolün parçalayıcı kinetiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ham petrol sızıntısı ve hapsi ile etkilenen ve etkilenmeyen sektörlerden toprak örneklerinin kimyasal değerlendirmesi

Dünyanın çeşitli yerlerinde yapılan araştırmalara göre genel olarak ham petrol ile kirlenmiş topraklarda pH, değerlerin korunduğunu veya pH değerinde artış olduğunu göstermektedir. Böylece Pardo *et al.* (2002), ham petrol ile kirlenmiş KRI'daki killi topraklarda yaptıkları bir çalışmada, pH'ın doğal durumuna göre herhangi bir değişikliğe uğramadığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Meksika'da killi bir toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde hidrokarbonların etkisini inceleyen Martinez ve Lopez *et al.* (2001). ham petrolün etkisi altındaki topraklar için pH değişimlerinin düzenli olmadığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte, ham petrolün etkisinden dolayı pH'da hafif bir artış eğilimi gösterdiler. Aynı şekilde Adenipekun ve Fasidi (2005) Nijerya'nın kumlu topraklarında ham petrolün doğal mikroorganizmaların etkisiyle bozunma hızını değerlendirirken, ham petrol ile kirlenmiş toprakların önemli değişikliklere uğramadığını veya pH'daki düzenli bir eğilim değişikliği göstermediğini belirlemişlerdir. Odokuma ve Dickson (2003), ham petrolle kirlenmiş toprakların pH'larında büyük değişiklikler göstermediğine dikkat çekiyor, bir biyoremediasyon sistemine tabi tutulmadıkça, aynı bozunma sürecinin bir sonucu olarak söz konusu parametrede düşüşler gözlemlenebilir. Bununla birlikte, farklı hidrokarbon türlerinin Nijerya topraklarının fiziksel-kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerindeki etkisini değerlendiren Obire *et al.* (2002) sonuçları, onlar tarafından değerlendirilen toprakların kontrollerinden daha yüksek pH gösterdiğini 0,6 pH birimine ulaşan varyasyonlar göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, dökülen ve ham petrolün hapsedilmesinden etkilenen toprakların pH'ında bir artış gösterdiğinden, literatür çalışmalarının çoğuyla aynı fikirde değildir. Bu çalışmadaki artışlar, ham petrolün bileşimine atfedilmiştir, çünkü Macellan zonu yataklarından elde edilen bu malzeme, deniz ve acı sulardaki oluşum kökenlerinden dolayı değişken miktarlarda Na, Ca ve Mg içerir. Bölge XII'deki kirlenmiş toprakların petrol ile pH'ının artma ve düşmeme eğilimini yapan da bu toprak-

ham petrol etkileşimidir. Toprakların bu "alkalizasyonu", KRI topraklarında dökülen ve hapsedilen ham petrolün kimyasal özelliklerine ve karşılık gelen dünya sınıflandırmasına atfedilir. Bu yağ, diğer yağlardan farklı olarak "hafif" veya "tatlı" olarak sınıflandırılmıştır, nötr pH özelliklerine sahiptir ve ayrıca, kükürt varlığına ve asit sülfürik topraklarda asitlik durumu gibi bir dizi ilişkili bileşiğe sahip değildir.

Yağda bulunan, yağ ilave edildiğinde toprakta artan Ca ve Mg ile ilişkili OH-bileşikler, toprakta H⁺'nin azalmasına neden olacak, böylece pH'larını yükseltecek olanlardır. Analiz edilen topraklardaki pH'daki değişiklikler, pH'ı artırarak mikrobiyal popülasyonları destekleme eğiliminde olacaktır, bu koşullar Lagrega *et al.* (1996), mikrobiyal büyümeye ve hayatta kalmaya ve dolayısıyla ham petrolün biyolojik olarak parçalanmasına yardımcı olacaktır. Organik karbon ve organik madde ile ilgili olarak, incelenen üç toprak için sonuçlar bölümünde belirtildiği gibi, ham petrolün dökülmesi ve hapsedilmesi organik madde içeriğinde bir artışa yol açmaktadır. Bu sonuçlar, incelenen literatürde bulunan tüm raporlarla uyumludur. Böylece Brissio (2005) tarafından kumlu topraklarda (ABD) petrol hidrokarbonlarının etkisini incelerken elde edilen veriler, kirlilik altında bu toprakların organik madde ve organik karbonda artışlar gösterdiğini belirlemiştir. Bu organik karbon, eklenen hidrokarbon kirletici miktarı ile orantılı olarak doğrudan artırılacaktır. Benzer şekilde, Martínez ve López (2001) Meksika'daki killi topraklar üzerine yaptıkları çalışmada, topraklarda kirletici madde olarak bulunan hidrokarbonların konsantrasyonu ile orantılı olarak topraklardaki organik madde artışlarını belirlemişlerdir. Aynı şekilde Adenipekun ve Fasidi (2005) tarafından Nijerya topraklarında yapılan bir çalışmada, ham petrolün farklı kirlilik aralıkları ile ardışık ölçümler yapılarak, organik madde ve organik karbon yüzdesindeki artışın topraklarda kirleticinin C konsantrasyonu ile yakından bağlantılıdır. Benzer sonuçlar Okolo (2005) Nijerya'da kumlu bir toprakta belirlendi. Bu yazarlar, ham petrol ilavesiyle toprakların organik karbonunun, kontrol toprağı için %2,15'ten petrol ilavesinden sonra %7,06'ya yükseldiğini belirlemişlerdir. Etkilenen kumlu bir toprak için organik karbondaki %1'lik bir artış kaydeden Obire *et al.* (2002) tarafından elde edilen değere daha yakın bir değer olan % 0,5'lik bir artış sunan Miran West toprağı için olanlarla ham petrolde örtüşmeyen durum, ancak artışın dökülen petrol miktarına bağlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

del Carmen Rivera *et al.* (2002), Meksika'nın killi-tınlı toprağında, 79,500 mg/kg TPH (toplam petrol hidrokarbonları) ilavesiyle topraklarda %46'ya varan artışlar göstermiştir. Bu değerler, eklenen yağın yüksek konsantrasyonu nedeniyle yüksektir. Bu çalışmada elde edilen değerlere daha yakın değerler, %40 ham petrolden etkilenen topraklarda organik karbonda %3 artış kaydeden Adenipekun ve Fasidi (2005) organik karbon artışları%8'e yakın olan Odokuma ve Dickson (2003) tarafından bulunan değerlerdir, Sarqala toprağı için %5 ve Kürdemirs petrolü için %1'lik artışla daha tutarlı değerler.

Ham petrolün faaliyetinden etkilenen topraklarda organik karbondaki ve dolayısıyla organik maddedeki bu artış, hiçbir şekilde mikrobiyal yaşam için faydalı olduğu anlamına gelmez. Walkley-Black topraklarındaki organik maddeyi belirleme yönteminin onu tanıyamaması gerçeğinden bağımsız olarak, etkilenen toprak profilleri bu biyogenik organik madde ile farklı topraklarda ham petrolün katkısıyla petrojenik olan arasında ayırım yapabilmek önemlidir.

Organik madde değerlerindeki artış, incelenen toprakları etkileyen ham petrolün birkaç doymuş ve poliaromatik bileşikten oluşmasından kaynaklanmaktadır, bu da Walkley – Black yöntemi ile yağın oksitlenmesini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, bileşenlerinin büyük bir kısmı oksitlenir, böylece elde edilen nihai değer artar. Ham petrolde bulunan karbonun %75'inin oksitlenebilir olduğu tahmin edilmektedir, bu değer, topraklarda oksitlenebilir durumda olduğu varsayılan değerle aynıdır.

Ham petrol ile kirlenmiş topraklarda toplam azot (%) konsantrasyonunda bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar literatürde başvuru alan çalışmaların çoğu ile uyumludur ve organik madde artışına benzer bir model izlemektedir. Sonuçlar Okolo (2005), ham petrolden etkilenen topraklarda toplam azot konsantrasyonunda %0,16'dan ve bu çalışmada Calentador 18-Kurdamir toprağı için ilk 20 cm'de %0,14'lük bir artış göstermiştir. Aynı şekilde Pala *et al.* (2002) ham petrol ile kirlenmiş killi topraklarda toplam azotun %0,006 oranında arttığını göstermiştir. Bu, artışın, dökülen ham petrolde bulunan N içeriğı ile orantılı olduğunu göstermektedir. Bu şekilde, Obire *et al.* (2002) hidrokarbonlarla kirlenmiş topraklarla ilgili çalışmalarında, hidrokarbonlarla kirlenmiş toprakları kontrol topraklarıyla karşılaştırırken önemli değişiklikleri kaydetmediler.

Adenipekun ve Fasidi (2005) göre topraklardaki toplam azot konsantrasyonundaki artış, toprak tabakalarına eklenen kirletici miktarı ile doğrudan ilişkili olarak toprağın diğer kimyasal parametrelerinin yanı sıra, bu artışın esas olarak olabileceği yerde ham petrolde bulunan çeşitli azotlu bileşiklerin dahil edilmesine atfedilir.

Mevcut fosfor (P-Olsen) ile ilgili olarak, ham petrolden etkilenen topraklar konsantrasyonunda bir düşüş gösterir. Bu sonuçlar, incelenen literatürde bulunanlara benzerdir. Böylece, Ogboghodo *et al.* (2005) ham petrolün topraklara katılmasının neden olduğu etkileri ve kimyasal ve fiziksel özelliklere olan yansımalarını araştırarak hidrokarbondan etkilenen topraklarda fosfor içeriğinde azalma olduğunu tespit etmiştir. Benzer bir durum Okolo (2005), ham petrol ile kirlenmiş benzerleri ile kontrol topraklarını karşılaştırırken, petrol ile kirlenmiş topraklarda fosfor mevcudiyetinde bir azalma olduğunu belirlemiştir. Benzer şekilde, Benka-Coker ve Ekundayo (1995) killi topraklar üzerinde yaptığı çalışmada, kirlilik olaylarından etkilenen toprakların ilgili kontrol topraklarına göre daha düşük miktarda kullanılabilir fosfora sahip olduğunu belirlemiştir. Topraklardaki fosfor konsantrasyonundaki bu azalma, bu çalışmada yağ ile kirlenmiş üç toprak için belirlenmiştir ve yağa eklenen kalsiyumun etkisiyle fosforun çökmesine bağlı olarak bulunabilir.

Bu çalışmada analiz edilen topraklar, değişebilir kalsiyum değerlerinde bir artış göstermiştir. Kalsiyum içeriğindeki ve çalışılan topraklardaki bu artış, bazı durumlarda K ve Na konsantrasyonunda ek artışlar dahil edilmesine rağmen, başvuru literatürün çoğuyla uyumludur. Böylece, Okolo (2005), ham petrolün kirletici etkisiyle değişen topraklar için sodyum, kalsiyum ve potasyumda artışlar buldu.

Bununla birlikte, bu çalışmada potasyum, kontrol toprakları ile kontamine durumları karşılaştırıldığında, hem azalmalar (Miran Batı) hem de artışlar (Sarqala) gözlenmiştir. Benzer etkiler, ham petrolün varlığına maruz kalan topraklarda potasyum konsantrasyonunda bir azalma gösteren Adenipekun ve Fasidi (2005) tarafından belirlenirken, Obire *et al.* (2002) için hem potasyum hem de kalsiyum, ham petrol kirliliği olayları altında topraklarda bir artış göstermektedir. Bu, potasyum varyasyonlarında genel bir eğilimin belirlenmediğine işaret ediyor gibi görünmektedir.

Gözlenen bu varyasyonlar Karim *et al.* (2011) oluşumunun kökenine bağlı olarak değişen miktarlarda Na, Ca ve Mg ile eklenen yağın konsantrasyonuna ve eklenen ham petrolün bileşimine değinen Martinez ve López (2001) tarafından yapılmıştır.

İncelenen toprakların katyon değişim kapasitesi ile ilgili olarak, Martinez ve López (2001), analize tabi tutulan toprakların CEC'sinde tanımlanmış bir eğilim olmaksızın büyük değişiklikler bulamadı. Benzer şekilde, hidrokarbonların etkisiyle tuzlu toprakların kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri değerlendiren. Arocena ve Rutherford (2005) yağ ve kontrol toprağı ile eklenen toprakları karşılaştırırken CIC'nin önemli değişiklikler göstermediğini doğruladı. Yukarıda belirtilenler, belirli bazların mevcudiyetinde ve dolayısıyla toprakların KRI'sinde hafif bir artışın olduğu, ancak bu, kontrol numunelerinin koşullarını önemli ölçüde değiştirmedeği çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, elektriksel iletkenlik önemli farklılıklar göstermemekte, literatürde danışılanlarla uyumlu sonuçlar vermektedir. Bu nedenle Martinez ve López (2001) hidrokarbonun kontaminasyon sorunları olan toprakların elektriksel iletkenliği üzerinde doğrudan bir etkisi tespit etmemiştir. Aynı şekilde, Arocena ve Rutherford (2005) ham petrolden etkilenen toprakların elektriksel iletkenliğinde herhangi bir değişiklik bulamamışlardır. Ham petrolün, ham petrolle kirlenmiş topraklarda elektrik iletkenliğindeki küçük değişiklikler üzerindeki etkisi, eklenen miktar ve petrol bileşenlerindeki bazların konsantrasyonu ile bağlantılı olacaktır.

KRI'nin üç sektöründen gelen ham petrolden etkilenmeyen ve etkilenmeyen toprakların canlı heterotrofik bakteri popülasyonlarının sayısı

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, 0–20 cm derinliğe sahip kontrol topraklarının mikrobiyolojik analizlerinin sonuçları 20–40 cm ile karşılaştırıldığında, toprakların canlı heterotrofik bakteri popülasyonlarında bir azalma tespit edilmiştir. Sarqala, Kurdamir ve Miran West toprağı için bu azalma %90 civarındadır (sırasıyla %87,8, %90,8 ve %89,6), bu da toprak profilinin derinliğindeki artışa göre bakteri

popülasyonlarının azaldığını daha düşük oksijen konsantrasyonu, besinlerin ve/veya organik maddelerin mevcudiyetini göstermektedir. Hattori'ye (1973) göre, toprak profilinde dikey bir popülasyon dağılımı sunan bakteriler, tüm topraklarda en fazla mikroorganizmanın, organik madde ve humusun derinlikte karşılık gelen nüfus azalması bakımından en zengin olana karşılık gelen toprağın üst tabakasında bulunduğunu gösterir.

İncelenen üç toprakta meydana gelen dökülmelerin ve hapsolmaların ham petrol ürünü ile kontaminasyonun etkisi analiz edilirken, hidrokarbonların edafik ekosistemler üzerinde çeşitli toksik etkileri olan ve çoğu mikroorganizmanın içinde hidrokarbonların varlığı büyüyemez ve ölür ve bu değişken bileşimli maddeler olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu bağlamda, Okpokwasili ve Amanchukwu (1988) tarafından alıntılanan Walker ve Colwell (1977), hidrokarbonlarla kirlenmiş toprakların, hidrokarbon etkisi olmayan aynı toprağa kıyasla toplam mikrobiyal sayıyı önemli ölçüde azalttığını, ancak mevcut mikrobiyal kalıntı için aktivite seviyesi kontaminasyondan etkilenmez ve aynı kaldığını belirlemiştir. Bu durum, ham petrolü substrat ve enerji kaynağı olarak kullanabilme özelliği sayesinde ham petrole toleranslı bazı bakterilerin varlığı ile açıklanmaktadır. Önemli sayıda diğer türler bunu yapamaz ve sistemden kademeli olarak elimine edilir. Nüfusun yaklaşık %90'ı ile çalışılan topraklarda temsil edilen durum.

İncelenen vaka için, her biri bağımsız olarak analiz edilen üç toprak, ham petrolün kirletici etkisinden dolayı bir nüfus azalması kaydetti. 0-20 cm derinlikteki üç toprak için bu popülasyon %90'a yakın azalmakta, kirletici olarak ham petrolün girişine yanıt vermektedir. Ancak bu, kalan nüfusun (yaklaşık %10) böyle bir ortamda gelişme ve karbon ve enerji kaynağı olarak ham petrol kullanma kapasitesine sahip olduğunu dışlamaz. Böylece, Macnaughton *et al.* (1999) bakteriyel yapının ve çeşitliliğin önemli ölçüde değiştirildiğini belirleyerek, mikroorganizmanın ham petrol sızıntısı ürününün popülasyon varyasyonlarını inceledi. Li *et al.* (2000) yaptıkları çalışmada, ham petrolün varlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak kirlenmiş bir topraktaki bakteri popülasyonunun azaldığını doğruladıkları için durum benzerdir.

Gezegeenin hemen hemen tüm ortamlarında, hidrokarbonları daha az toksik formlara indirgeyebilen ve bunları karbon kaynağı olarak kullanabilen mikroorganizmaların bulunması, bunların teşhir süresinden sonra kontamine ortamlardaki varlıklarını ve nüfus artışını açıklamaktadır. Teorik olarak, eğer bu mikroorganizmalar o ortamda hayatta kalma yeteneğine sahipse, bu bileşikleri büyük bir rahatsızlık duymadan parçalayabilirler. Bu nedenle, ham petrol ile kirlenme sorunları olan bu topraklarda bulunan bakteri popülasyonunun, söz konusu hidrokarbonu parçalama kabiliyeti sunduğu göz ardı edilmemektedir.

Bu çalışmada, 20-40 cm derinlikte bulunan bakteri popülasyonları analiz edildiğinde, bakteri popülasyonlarında bir azalma olduğuna dair kanıtlar olmasına rağmen, ilgili kontrol topraklarıyla karşılaştırıldığında, bu, 20-40 cm derinlikte olduğu kadar önemli değildir; bunun nedeni, ham petrolün özelliklerinden dolayı bunların 20 cm derinliğin ötesine önemli ölçüde göç etmemeleridir, bu da deniz üzerinde daha az şiddetli yansımalar ve bakteri popülasyonunun azaltılmasına sahiptir. Ham petrolün bu düşük hareketliliği, fiziksel özelliklerinden ayrı olarak, KRI'nin yılın büyük bir bölümünde, yoğunluğunu ve hidrokarbonu emebilen toprakların kil içeriğini azaltan düşük ortam sıcaklıklarından etkilenir.

Ham petrol ile kontaminasyondan etkilenen ve etkilenmeyen KRI topraklarına ait bakteri suşlarının izolasyonu, büyümesi, seçimi ve taksonomisi

Ham petrolden etkilenen ve etkilenmeyen toprakların çalışmasında, katı (AM + P) ve ham yağ eklenmiş sıvı (CM + P) kültür ortamlarında en iyi büyümeyi gösteren ikisini seçmek için 240 bakteri suşu izole edildi. Test edilen kültür ortamında üreyebilen bakteri suşlarının yüzdesi %70'i aşıyor ve bunların sadece %5,42'si (13 suş) daha sonra hidrokarbonolitik kapasitelerini değerlendirmek için kabul edilebilir bir büyüme elde etmeyi başardı.

Li *et al.* (2000) hidrokarbonlarla kirlenmiş toprakların biyoremediasyon çalışmasında, durumlarının hidrokarbondan etkilenip etkilenmediğine bakılmaksızın, hidrokarbonolitik kapasiteye sahip bakteri popülasyonunun büyük bir yüzdesinin

toprağın ilk 15 santimetresinde bulunduğunu tespit etmiştir. del Carmen Rivera *et al.* (2002) % 1 oranında ham yağ ile zenginleştirilmiş kültür ortamında otokton bakterilerin adaptasyonu ve seçimi çalışıldı. Toplam 34 izole koloniden sadece 3'ünün karbon ve enerji kaynağı olarak ham petrol eklenmiş kültür ortamında adapte olma ve büyüme kapasitesine sahip olduğuna dikkat çekiyorlar. Hidrokarbonolitik kapasiteye sahip az miktarda bakteri izolatu, sonunda toplam 240 izolattan en iyi iki bakteri suşunun seçildiği çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır.

Zenginleştirme kültürü tekniği ile mikroorganizmaların izole edilmesinin önemli bir avantajı, esas olarak mikroorganizmaların kullanıldıkları test tipinin kriterlerine ve ihtiyaçlarına göre izole edilmesine ve seçilmesine izin vermesidir. Bakteri suşlarının, çeşitli hidrokarbonları aerobik olarak kullanma kabiliyetine sahip çok çeşitli mikroorganizmaların bulunması gerçeğine göre, ham yağ eklenmiş kültür ortamında adapte olma ve büyüme yeteneği, temel olarak, mikroorganizmalar için biyolojik olarak parçalanabilen bir enerji ve karbon kaynağı oluşturur. Bu şekilde, Altamirano ve Pozzo (2000) ham petrol eklenmiş seçici ortam ile biyoremediasyona tabi tutulan topraklardan hidrokarbonolitik kapasiteye sahip altı doğal bakteri türünü izole etmiş ve tanımlamıştır. Aynı şekilde, Barengo *et al.* (2002) ham petrol ile eklenen yarı-sürekli kültürler vasıtasıyla, esas olarak lineer hidrokarbonları parçalama kabiliyetine sahip bakterileri izole edebilmiştir.

Atlas ve Bartha 2002, hidrokarbonlu kültür ortamına adaptasyonu ile temsil edilen ham petrolün varlığına mikrobiyal tolerans, popülasyon seçiciliğine izin verir, çünkü yalnızca metabolik süreçleri için hidrokarbonları kullanma kabiliyetine sahip bakteri suşları bu bölgelerde medya büyüyecek ve çoğalabilecektir. Çalışmadaki ham petrolün varlığına bakteriyel adaptasyonun eşit olmayan aralıkları ve belirli bakterilerin parçalayıcı özelliklere sahip olma kapasitesi, bu nedenle, kültür ortamında kolonilerin büyümesinde veya gelişmemesinde kendini gösterir. Sonuçlar bölümünde belirtildiği gibi, ham petrolün parçalayıcı kinetiğini gerçekleştirmek için seçilen iki bakteri suşunun taksonomik sınıflandırması ile ilgili olarak, bunlar *Bacillus brevis* ve *Bacillus coagulans*'a karşılık geldi.

Bu bağlamda Walker ve Colwell (1977), dökülmelerden etkilenen topraklardan ham petrolün uzaklaştırılmasında doğal bakterilerin önemini açıklamıştır. Bu şekilde, izole edilmiş ve seçilmiş aerobik bakteri popülasyonunun toplamından, en büyük popülasyona sahip olanlar ve ham petrol üzerinde parçalayıcı öneme sahip olanlar, *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait bakterilerdi. Aynı şekilde Jobson *et al.* (1972) ham petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen bakterileri kullanarak, ham petrolün yüksek konsantrasyonda olduğu ortamlarda popülasyon seçimi ve degradatif kinetik testler yoluyla elde edilen bakterileri kullanarak, ham petrol, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* ve *Bacillus* cinslerine ait ana bakteri suşlarını belirleme yeteneğine sahip olduğunu belirlemek için çalışmışlardır.

Benzer şekilde Arafa (2003) Suudi Arabistan'da ham petrol üzerinde bakteriyel biyobozunma potansiyelini değerlendirmeye çalışan bir çalışmada, *Bacillus* türünden bakteriler izole edilmiş ve seçilmiştir, bunlardan *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pallidus* ve *Bacillus pıhtılaştırıcı* öne çıkmıştır. Giles (2001) bir ham petrol sızıntısını karakterize etmeye ve söz konusu bileşiği parçalama kabiliyetine sahip bakterileri belirlemeye çalışan, etkilenen bölgeye özgü toplam 20 bakteri suşunu izole etmeyi başardı. En yüksek parçalayıcı aktiviteye sahip suşlar arasında *Bacillus coagulans* bulunur. Perry ve Gillott (1979) tarafından alıntılanan Rehm ve Kachholz (1977), *Bacillus* tarafından ham petrol alkanlarının bozunması üzerine yaptıkları çalışmalardan birinde, ko-oksidasyon yoluyla petrol alkanlarını parçalama kabiliyetine sahip dört ana *Bacillus* türü bulunduğunu, bu türlerin *Bacillus macerans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus coagulans*'a tekabül ettiğini söyleyebiliriz.

Öte yandan Pardo *et al.* (2004) ham petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen ve parçalayıcı kapasitelerine göre seçilen dört bakteriyel mikroorganizmadan ikisinin *Bacillus brevis*'e karşılık geldiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Arenas ve Pardo (1999) ham petrol ile kirlenmiş toprak örneklerinden toplam 262 bakteri suşu izole etmiş ve bunlardan ham petrolün en yüksek parçalayıcı aktivitesini gösteren 55 suş seçilmiştir. İzole edilen bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus brevis* bulunur. Benzer şekilde, Gomes *et*

al. (2004) gelecekteki çevresel sanitasyon sistemlerinde kullanılmak üzere, hidrokarbonlardan etkilenen topraklardan parçalayıcı kapasiteye sahip doğal bakterileri izole etmiş ve seçmiştir. Tanımlanan bakteri suşlarından aşağıdaki türler biyokimyasal olarak belirlendi: *Pseudomonas*, *auroginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerius* ve *Bacillus brevis* diğerleri arasında.

Literatürdeki araştırmalar, *Bacillus* cinsine ait bazı türlerin hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu bakteriler, ham petrol açısından zengin ortamlarda ve ortamlarda hayatta kalmak için adaptif ve fizyolojik kapasiteye sahiptir ve bu nedenle onu bir karbon ve enerji kaynağı olarak daha fazla veya daha az ölçüde kullanabilir. Uyarlanabilirlik ve ham petrolün bir substrat olarak kullanılmasına ilişkin bu fizyolojik ve enzimatik tepkileri oluşturma yeteneği, Ratledge (1978) içindir; bu bakterilerin belirli hidrokarbonları parçalayabilmek için kodlanmış belirli genleri bir plazmit oluşturan ekstrakromozomal DNA sunacağının bir göstergesidir.

Yukarıdakilere ek olarak, bu cinsin bakterilerinin direnç endosporları oluşturma yeteneği eklenir, bu da onların olumsuz ortamlarda uzun süre kalmalarını sağlar, bu da onları KRI'nın alışılmış sakinleri yapar. Bu nedenle çalışılan bakteriler, toprak dekontaminasyonu için biyolojik bir araç olarak biyoremediasyon sistemlerine tabi tutulan topraklarda bakteriyel biyo-büyütme ve biyostimülasyon sistemlerinde kullanım için sonraki değerlendirmeler için düşünülmesi gereken bir alternatif olarak düşünülebilir.

Ham petrolün fonksiyonel gruplarının bozunmasının ve seçilen iki bakteri suşu tarafından bozunma hızının kızılötesi spektrofotometri ile belirlenmesi

Bacillus coagulans C180 ve *Bacillus brevis* C88 suşlarının ham petrolün bazı bileşenlerini parçalama yeteneğini belirlemek için ham petrolün parçalayıcı bir kinetiği değerlendirildi. Petrol bileşenlerinin bozunma veya dönüşüm ürünleri, kızılötesi spektrofotometri ile belirlendi. Kızılötesi spektroskopi, bir molekül elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinde enerji (ısı) emdiğinde meydana gelen titreşimleri (gerginlik ve bükülme) tespit eder. Bu şekilde, farklı fonksiyonel gruplar ve bağ türleri,

tespit edilen ve nicelenen farklı kızılötesi absorpsiyon frekanslarına ve yoğunluklarına sahiptir. Bu nedenle kızılötesi (IR) absorbans, ham petrolün bileşenlerini oluşturan tüm bileşiklerin toplamını temsil eden bir ölçümdür. IR'ye dayalı Toplam Petrol Hidrokarbonları (HTP) yöntemleri, kirliliğin türü veya onu oluşturan belirli fraksiyonlar hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaz, ancak basitliği, hızı ve düşük maliyetli nedeniyle hidrokarbonların bozunmasını belirlemek için yapılan çalışmalarda geçerli bir araç oluşturur. Kızılötesi spektrofotometri (Absorpsiyon) ile tespit edilen bantların yoğunluğundaki azalma, seçilen bakteri suşları tarafından ham petrolün biyolojik olarak bozunmasının bir göstergesi olarak alınır. Bu teknik, bozunmayı ölçmek için çok sayıda hidrokarbon biyolojik olarak bozunabilirlik çalışmasında kullanılmıştır.

Petrol, esas olarak hidrokarbonlar (karbon ve hidrojen atomlu moleküller), heteroatomlu bileşikler (kükürt, nitrojen veya oksijen gibi heteroatomlu karbon ve hidrojen atomlu moleküller) ve düşük konsantrasyonlarda metalik bileşenler içeren karmaşık bir karışımdır.

Petrol ve türevlerinin karmaşıklığı, karbon sayısı ile artar. Petrol hidrokarbonları doymuş fraksiyonlardan (alkan ve izoalkan grupları, endüstriyel olarak alifatik bileşikler olarak da adlandırılır), doymamış (alkenler ve alkinler), aromatik fraksiyonlardan (benzen, alkilbenzen, BTXS) ve asfalt veya katı fraksiyondan oluşur. Genel olarak, her yağın farklı yüzdeleri ve bu fraksiyonların varlığı vardır. Yukarıda bahsedilen fraksiyonlar ve onları oluşturan bileşiklerden (Walker ve Colwell 1977, Atlas 1981). alkanların (alifatik bileşikler), hidrokarbonların kontaminasyonundan etkilenen topraklardan otokton bakterilerin etkisiyle bozulmaya en duyarlı olduğunu belirtmektedir. Bununla birlikte, alkan gruplarının, seçilen suşlar tarafından 3000 cm^{-1} ham petrol bozunma aralığı üzerindeki spektral okumalarda belirlenen bir husus olan ham petrolün bozunma sürecinden kaynaklanması mümkündür. Alkanların ve daha basit grupların bozunma işlemi sırasındaki bu "neogenezi", ham petroldeki kompleks bileşiklerin hidrolizine ve basitleştirilmesine atfedilebilir. Elde edilen spektral okumalarda ham petrol bileşenlerinin uğradığı bozunma, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus brevis*'in bozunduruğu etkisine atfedilir, çünkü çalışmada kullanılan alifatik bileşiklerin baskın olduğu parafinik yağ, buhar fazında ve 250 C° 'nin üzerindeki sıcaklıklarda

oksijen ile reaksiyona girebilir ve sadece oksitlenebilir. Tuzlu ortam, ham petrolün kimyasal bileşimine müdahale etmez ve bu çalışmada değerlendirilen numunelerdeki tuzlu su içeriği önemli ölçüde artmamıştır.

Çalışmada kullanılan yağda önemli bileşenler olan n-alkanların biyolojik bozunması, normalde bir birincil alkol, ardından bir aldehit ve son olarak bir monokarboksilik asit oluşumu ile monoterminal bir saldırı ile gerçekleşir. Böylece, ASTLE (1962) ve Sabirova *et al.* (2006) parafinik yağların bakteriyel etki ile oksidasyonundan elde edilen ürünler esas olarak alkoller, aldehitler, ketonlar ve yağ asitleridir. Bu, daha basit bileşikler tarafından oluşturulan fraksiyonların ilk aşamada bozulduğu ve aynı bozunma etkisinden dolayı bu ürünlerin görünümü ile çakıştığı, biyolojik bozunmaya tabi tutulan petrol numunelerinin daha karmaşık işlevleri gruplandırır ve spektral okumalarında belirlenenle örtüşür.

Bu nedenle, genel bir şekilde, bu parafinik veya alifatik veya doymuş hidrokarbonların, bakteri faaliyeti nedeniyle bu aromatik yağlardan daha fazla biyolojik olarak bozunma olasılığı daha yüksek olacaktır. Buna göre Jobson *et al.* (1972) kısa zincirli doymuş fraksiyonlara uzun zincirli olanlardan önce saldırı için bir tercih olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada, kullanılan parafinik ham petrolü oluşturan çok sayıda fonksiyonel grubun kısmi bozunmasının olduğu her iki bakteri suşu ile muamele edilmiş ham petrolün kızılötesi spektrumlarının okunmasında gözlemlenebilen durum. Gallegos'a (2005) göre, parafinik yağlar %70 ila %90 alifatik bileşenlerden (n-alkanlar) oluşabilir, bu da diğer yağ türlerine kıyasla bakteriyel etkiyle bozunmalarını daha fazla yapar.

Ham petrolde aromatik ve asfalt bileşikleri olarak bulunan aromatik fraksiyonlar, Pineda-Flores ve Mesta-Howard (2001), için, en basit yapılar için bir haftadan birkaç aromatik halkaya sahip olanlar için 990 güne kadar asfaltın eliminasyon süresi ile farklı oranlarda nitrojen, kükürt ve oksijen sunan son derece karmaşık moleküler yapıları nedeniyle bozunması en zor olanıdır. Ham petrolün bileşimindeki aromatik grupların varlığı, ham petrolün laboratuvar koşullarında tamamen parçalanmasını imkansız hale getirir. Mikrobiyal popülasyonlar, doymuş fraksiyonların önemli bir kısmını parçalama yeteneğine sahip olsalar da, sadece bazı aromatik fraksiyonlara

saldırılır. 2850 cm⁻¹ ile 3000 cm⁻¹ arasındaki sektör, toprak kirliliği hakkında bilgi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağı oluşturan çok sayıda bileşik nedeniyle, her birini ayrı ayrı ölçmek pratik değildir; bu nedenle, belirli bir numunede bulunan toplam hidrokarbon miktarını ölçebilmek faydalıdır. Bu petrol oluşturan bileşikler grubuna toplam petrol hidrokarbonları - TPH denir. Bu fraksiyonun bozunması, 50 günlük bir sürenin ardından laboratuvar koşullarında %38'den %57'ye ulaşabilir. Bu çalışmada elde edilenlerden daha düşük değerler, 30 gün sonra *Bacillus brevis* için %65'ten *Bacillus coagulans* için %71'e kadar düşüşler gözlemlenmek mümkündür. Bu bileşiklerin bozunması, Arafa (2003) tarafından *Bacillus coagulans* dahil olmak üzere bakteri suşlarının, ham petrol eklenmiş ortamda adapte olma ve büyüme yeteneğine sahip olduğu çalışma dikkate alınarak açıklanabilir.

Hem izole edilmiş hem de seçilmiş bakteri suşları tarafından gerçekleştirilen ham petrolü oluşturan fonksiyonel grupların parçalayıcı kinetiği, başta kullanılan yağda bulunan çok sayıda alifatik grup nedeniyle, ATLAS and BARTHA'a göre başlangıçta (7 gün) hızlı bir bozulma gösterdi (Atlas ve Bartha 2002). Aromatik ve asfalt bileşenlere kıyasla ham petrolü oluşturan karmaşık hidrokarbon karışımındaki mikroorganizmalar tarafından en hızlı ve en kolay parçalanabilenlerdir. Jobson *et al.* (1972) ham petrolün mikrobiyal kullanımı üzerine yaptıkları çalışmada, doymuş fraksiyonlar için bozunmanın mikrobiyal büyüme için ilk karbon ve enerji kaynağını oluşturduğunu açıklar. Bu çalışmanın test edilmesinin ilk günlerinde yağın bazı bileşenlerinin hızlı bozulmasını açıklayacak sebep. Bu bağlamda, Obire *et al.* (2002) petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunması üzerine bir çalışma yoluyla, testin ilk haftalarında substratın bozunma hızında ilerleyici bir artış olduğunu ve daha sonra zamanla stabilize olduğunu ve nihayet azaldığını açıklamıştır. İlk test periyodu sırasındaki bu yüksek aktivite, bozunmanın son aşamalarında ham petrolün daha ağır fraksiyonları ile karşı karşıya kaldıklarında zamanla mikroorganizmalar için daha zor hale gelen, kolayca bozunabilen fraksiyonların daha fazla mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır. Thouand *et al.* (1999) ham petrol ile topraklardan izole edilen bakterilerin biyolojik bozunması üzerine yaptıkları çalışmada, ham petrolün bu doymamış fraksiyonunun hiçbir zaman önemli ölçüde biyolojik olarak bozunmadığını, ancak genel olarak, bakterilerin toplam fonksiyonel grupların 30. günde ham petrol, bu

çalışmada sunulan değerlerle örtüşen değerlerin %25'ini bozunma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.

Ham petrolün bozunma hızındaki yavaşlama, bozunmaya maruz kalmayan fonksiyonel grupların mevcudiyeti ile birlikte, bileşiğin oksidasyonundan sorumlu bakteriyel enzimlerin inhibisyonuna da cevap verebilir. Bu nedenle ham petrolün biyolojik bozunması, onu oluşturan fonksiyonel grupların tipine bağlıdır. Bu nedenle, 21 gün sonra bozunma %30'u aşmaktadır; bu, *Bacillus brevis* ve *Bacillus coagulans* suşları için bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur, çünkü her ikisi de ham ürünün toplam fonksiyonel gruplarının yağ testi sırasıyla edildi ve %28'ini ve %34'ünü bozunmayı başarmıştır. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, 28 günlük testten sonra Dizel için bozulma oranının %60 ila %73 arasında değiştiğini ve bu yüksek bozulma yüzdesini Dizeldeki yüksek alkan gruplarının varlığına ve geri kalanını düşük ağır metal varlığına biyolojik bozunmaya karşı dirençli hidrokarbonlar bağladığını göstermektedir. Doğal bakterilerle yapılan yağ bozunma testlerinde, bir hafta sonra alkan bileşiklerinin %70'e yakın, diğer alkan olmayan bileşiklerin ise %30'a varan bozunma değerleri elde etmek mümkündür. Ancak Diaz *et al.* (2003) alifatik fraksiyona ait olan alkan bileşiklerinin bu biodegradasyonu %50'ye ulaşırken aromatik fraksiyon %30'a ulaşır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda sonuç olarak, Ham petrol sızıntılarından ve hapsedilmelerden etkilenen topraklar, belirli kimyasal özellikleri bakımından (esas olarak organik madde ve organik karbon) değişiklikler göstermektedir. Bununla bağlantılı olarak toprakların sahip olduğu bakteri popülasyonlarında da farklılıklar bulunabilmektedir. KRI topraklarından, toprak örneğinin derinliğine ve ham petrolden etkilenip etkilenmediğine bakılmaksızın, hidrokarbon kapasiteli bakteriler izole edilerek üremeleri sağlanmıştır. Bu bakterilerden, mineral agar ve mineral et suyunda en iyi gelişme gösterenler *Bacillus coagulans* ve *Bacillus brevis* olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu bakteri türlerinin ham petrolün parçalayıcı kabiliyetine sahip olduğu ve bozunmanın ham petrolü oluşturan fonksiyonel grupları için %30'a yakın bir değer aldığı görülmüştür. Ayrıca çalışmada seçilen bakteri suşlarının, ham petrol ile kirlenme sorunları olan KRI'deki topraklara uygun biyoremediasyon teknolojilerinin üretilmesine

izin veren ve bundan sonra yapılacak olan çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülen türler olarak kabul edilmesi uygun görülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abalos, A., Vinas, M., Sabate, J., Manresa, M. A. and Solanas, A. M. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, 15: 249-260.
- Abdel-Shafy, H. I. and Mansour, M. S. 2018. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment: An Overview. *Microbial action on hydrocarbons*, 356: 353-386.
- Abu-Elgheit, M. A. and Yusef, H. M. 1980. Isolation of hydrocarbon-degrading microorganisms in Mediterranean waters. *Environment international*, 4: 417-420.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E. and Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3: 28-39.
- Adenipekun, C. O. and Fasidi, I. O. 2005. Bioremediation of oil-polluted soil by *Lentinus subnudus*, a Nigerian white-rot fungus. *African journal of biotechnology*, 4: 796-798.
- Aislabie, J., McLeod, M. and Fraser, R. 1998. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 210-214.
- Alexander, M. 1961. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley, pp. 472, USA
- Altamirano, M. and Pozzo, M. 2000. Isolation and identification of hydrocarbonolytic bacteria from a soil subjected to bioremediation. XXVII Inter-American Congress of Environmental and Sanitary Engineering. Buenos Aires, pp. 6, Argentina.
- Arafa, M. 2003. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of biological sciences*. 23: 1482-1486.
- Arenas, C. and Pardo, G. 1999. Latest Oligocene–Late Miocene lacustrine systems of the north-central part of the Ebro Basin (Spain): sedimentary facies model and

palaeogeographic synthesis. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology*, 151: 127-148.

- Arocena, J. M. and Rutherford, P. M. 2005. Properties of hydrocarbon- and salt-contaminated flare pit soils in northeastern British Columbia . *Chemosphere*, 60: 567–575.
- Astle, M. 1962. *Petrochemical*, University Publishing House, First edition, pp 310, Argentina.
- Atlas, R. And Bartha, R. 2002. *Microbial Ecology And Environmental Microbiology*, 4th Edition, Addison Wesley, 677 P, Spain.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiological Reviews*, 45: 180-209.
- Baniasadi, M. and Mousavi, S. M. 2018. A comprehensive review on the bioremediation of oil spills. *Microbial action on hydrocarbons*, 233: 223-254.
- Bapeer, G. B., Muhammad, R. K., Nadr, K. A., Khodakarami, L. and Al-Ansari, N. 2020. Geotechnical Properties of Soil in Ranya and Arbat Area, Sulaimaniya, Kurdistan Region, Iraq. *Journal of Earth Sciences and Geotechnical Engineering*, 10: 35-48.
- Beerstecher, E. 1954. *Petroleum microbiology: an introduction to microbiological petroleum engineering*. Elsevier Press.
- Belloso, C. 1999. Hydrocarbons biodegradation in landfarming soil using exogenous microorganisms obtained from different sources; a field study. Alleman B. C. y A. Lenon (Eds.) *Bioreactor and Ex Situ Biological Treatments Technology*. Battelle Press 5: 75-80.
- Benka-Coker, M. O. and Ekundayo, J. A. 1995. Effects of an oil spill on soil physico-chemical properties of a spill site in the Niger Delta Area of Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 36: 93–104.
- Bento, D. M. 2005. Chemical Analysis of Degradation of Diesel Oil Hydrocarbons in the Lagoa dos Patos Estuary. MSc. Thesis, Federal University, 78 page, Rio Grande.
- Bharathi, B. and Purushothaman, G. 2017. Biodegradation of Crude oil by bacterial isolated from crude oil contaminated soil- A Review. *International Journal of Development Research*.

- Bracho, M. A., García-Robles, I., Jiménez, N., Torres-Puente, M., Moya, A. and González-Candelas, F. 2004. Effect of oligonucleotide primers in determining viral variability within hosts. *Virology journal*, 1: 13.
- Brakstad, O. G., Bonaunet, K., Nordtug, T. and Johansen, Ø. 2004. Biotransformation and dissolution of petroleum hydrocarbons in natural flowing seawater at low temperature. *Biodegradation*, 15: 337-346.
- Brassington, K. J., Pollard, S. J. and Coulon, F. 2010. Weathered hydrocarbon biotransformation: implications for bioremediation, analysis and risk assessment. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 9: 2487-2499.
- Brissio, P. 2005. Preliminary evaluation of the state of contamination in soils in the province of Neuquén where hydrocarbon exploitation activities are carried out. Sanitation and Environmental Protection Thesis. National University of Comahue. Argentina.
- Carlson, C. 1998. Influences of sorption on microbial degradation. University of Lund. Sweden. Disponible en <http://www.ecotox.lu.se>. Consultado el 03 jun. 2004.
- Chang, Y. S. 2008. Recent developments in microbial biotransformation and biodegradation of dioxins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 15: 152-171.
- Cubitto, M. A., Morán, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D. and Siñeriz, F. 2004. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 15: 281–287.
- Dagher, A., Gunn, R.N., Lockwood, G., Cunningham, V.J, Grasby, PM. and Brooks, DJ. 1998 Measuring Neurotransmitter Release with PET. *Methodological Issues*, 449–454.
- del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R. and Fernández, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra latinoamericana*, 20: 423-434.
- Delille, D., Basseres, A. and Dessommès, A. 1998. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology*, 19: 237-241.
- Deyta, A. and Saval, S. 1999. Biodegradation of BTX at the microcosm level in soils contaminated with gasoline. Engineering Institute. Coordination of

- Environmental Bioprocesses. Autonomous University of Mexico. Page 452, Mexico.
- Diaz, M. F.; Padilla, C.; Torres, V.; Gonzalez, A.; Noda, A., 2003. Bromatological characterization of seasonal legume species and varieties with possibilities of use in animal feeding. *Cuban J. Agric. Sci.*, 37: 443-447.
- El Nady, M. M., El-Naggar, A. Y., Faramawy, S. A. and Salem, A. A. 2012. Application of molecular and polycyclic aromatic sulfur compounds in evaluation of some Egyptian crude oils. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 34: 2243-2252.
- Escalante, R. 2002. Biodegradation of Crude Petroleum in Terrariums. MSc. Thesis, National University of San Marcos, 70 page, Lima Peru.
- Fathepure, B. Z. 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in microbiology*, 5: 173.
- Fontúrbel, F. and Achá, D. 2000. Use of the microbial biomass determination method by fumigation-extraction for the study of soils in the Bolivian highlands contaminated by hydrocarbons. 2: 144-163.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. and Seeger, M. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98: 4781-4794.
- Gallegos, D. 2005 Fly-in fly-out employment: managing the parenting transitions. Centre for Social and Community Research, Murdoch University, Perth, Western Australia.
- Giles, H. 2001. Speech accommodation. In R. Mesthrie (Ed.), *Concise encyclopaedia of sociolinguistics*, pp. 193-196, UK.
- Gomes, A. V. da C. ; Vieira, F. da S. ; Crespi, M. P. A. L. de; Coll, J. F. C. ; Pessoa, M. F., 2004. Performance and carcass characteristics of rabbits under different particle size of sugar cane bagasse as fibre source. *Veterinaria Noticias*, 10: 87-92.
- Gutiérrez M. And Zavala J. 2001. Hydromorphic features of tropical soils contaminated with hydrocarbons. *Document Institute of natural resources of the University of Tabasco*, 6: 101-11.

- Hasan, Q. M. and Perot, K. A. 2021. Production sharing contracts and rentierism: Reforming transparency gaps in Kurdistan's oil and gas contracts. *The Extractive Industries and Society*, 8: 100899.
- Hattori, T. 1973. *Microbial life in the soil; An introduction*. M. Dekker, pp. 427, USA.
- Hernández-López, E. L., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R. and Vazquez-Duhalt, R. 2016. Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 10773-10784.
- Hidayati, W., Padillah, A., Maharadinda, N., Putu, E., Hikmawanti, R., Pratiwi, A., Pratiwi, Lady, Farahmayuni, R., Syahputra, M. and Fahrul. 2018. The Alpha-Amylase Inhibition Potential of Endophytic Fungi from Indonesian Bay Leaves *Eugenia polyantha* wight, 14: 107-111.
- Hobson, G. D. and Pohl, W. 1973. *Modern Petroleum Technology*, 4 the dn. Applied Science Publishers, pp. 233-249, England.
- Ikhimiukor, O. O. and Nneji, L. M. 2013. The review of the use of microorganisms in biodegradation of crude oil spill: challenges and prospect. *Sci Pub Researcher*, 5: 155-163.
- Ilyina, A., Castillo Sanchez, M. I., Villarreal Sanchez, J. A., Ramirez Esquivel, G. and Candelas Ramirez, J. 2003. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya*, 2, 88-91.
- Jobson, A., Cook, F. D. and Westlake, D. W. S. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Applied microbiology*, 23: 1082-1089.
- Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. and Al-Bahry, S. 2019. Biotransformation of heavy crude oil and biodegradation of oil pollution by arid zone bacterial strains. In *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds*, pp. 103-122, Singapore.
- Kamal, I. 2016. *Crude Oil & Gas Of Kurdistan Region-Iraq*. 10.13140/RG.2.2.25115.00804.
- Karim, K. 2011. *Geology of Iraq: Basic Principles Description of stratigraphy, tectonics and boundary conditions of the some Rock units in Iraq and Kurdistan during Cretaceous and Tertiary*, pp. 563, Iraq.

- Kassim, J. K. 2013. Method for estimation of calcium carbonate in soils from Iraq. *International Journal of Environment*, 1: 9-19.
- Khudur, L. S., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A. and Ball, A. S. 2018. A review on the bioremediation of petroleum hydrocarbons: current state of the art. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 5: 643-667.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A. and Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied microbiology and biotechnology*, 48: 677–686.
- Lagrega, M. Buckingham, L. and Evans, J. 1996. *Toxic Waste Management. Treatment, elimination and recovery of soil. Volume II.* McGraw-Hill, pp. 316, Spain.
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J. and Chrzanowski, Ł. 2020. Microbial degradation of hydrocarbons—basic principles for bioremediation: a review. *Molecules*, 25: 856.
- Levin, M. and Gealt, M. 1997. *Biotreatment of toxic and hazardous waste.* McGraw-Hill, pp. 153, Spain.
- Li, G., Huang, W., Lerner, D. N. and Zhang, X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research*, 34: 3845-3853.
- Lur'e, M. A., Kurets, I. Z. and Shmidt, F. K. 2003. The possible abiogenic origin of oil and gas. *Chemistry and technology of fuels and oils*, 4: 39: 1-5.
- Machin, J. 1999. Effect of Biostimulation on the Biodegradation of Hydrocarbons in a contaminated soil, in semi-solid phase reactors. VII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. IV Latin American Congress of Biotechnology and Bioengineering. Page 365, Mexico
- Mackertich, D. S. and Samarrai, A. I. 2015. History of hydrocarbon exploration in the Kurdistan Region of Iraq. *GeoArabia*, 20: 181-220.
- MacNaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J. and White, D. C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and environmental microbiology*, 65: 3566-3574.

- Margesin, R. And Schinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2660-2664.
- Martinez, V. E. and López, F. 2001. Effects of hydrocarbon pollutants on the physical and chemical properties of clay soil. *Terra*, 19: 9-17.
- Merino, F. 1998. Study of native microorganisms producing petroleum emulsifiers. Thesis to qualify for the degree of Biologist. La Molina National University. Lima Peru. Biological Sciences Faculty, pp. 98, Molina.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C. and Lal, B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and environmental microbiology*, 67: 1675-1681.
- Morales, D., Machin C. and Trejo, M. 1999. Biodegradation of Crude Oil Maya type in Aqueous Medium. VII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. IV Latin American Congress of Biotechnology and Bioengineering. 410 Page, Usa.
- Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M. J. and Sobecky, P. A. 2013. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of hazardous materials*, 244: 537-544.
- Naman, S. and Al-Ghalami, F.S. 2013. Assessment and Evaluation Study of Crude Oils in Kurdistan. PhD thesis, University of Zakho, 63 page, Iraq.
- Naman, S., Jamil, L. A., Al-Gulami, F. I. R. A. S., Sımo, S. and Alı, M. K. 2019. Evaluation Of Crude Oils And Natural Gases Of Kurdistan-Iraq By Catalytic Improvements To Lighter Oils Using Local Clays. *Wit Transactions On Ecology And The Environment*, 222: 81-91.
- Ndibe, T. O., Benjamin, B., Eugene, W. C. and Usman, J. J. 2018. A review on biodegradation and biotransformation of explosive chemicals. *European Journal of Engineering and Technology Research*, 3: 58-65.
- Ndimele, P. E. 2010. A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbon. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 13: 715-722.

- Nwachukwu, S. 2001. Bioremediation of Sterile Agricultural Soils Polluted with Crude Petroleum by application of de soil bacterium, *Pseudomonas Putida* with Inorganic Nutrient Supplementation. *Current Microbiology*, 42: 231-236.
- Obire, O., Nwaubeta, O., Ofojekwu, P. C., Ezenwaka, I. S. and Alegbeleye, W. O. 2002. Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physicochemical and bacteriological characteristics. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 6: 39-44.
- Odokuma, L. O. and Dickson, A. A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical mangrove environment. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 7: 23-29.
- Ogboghodo, I. A., Azenabor, U. F. and Osemwota, I. O. 2005. Amelioration of a crude-oil-polluted soil with poultry manure and the effects on growth of maize and some soil properties. *Journal of plant nutrition*, 28: 21-32.
- Okolo, J. C. 2005. Odu, Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. In *Applied ecology and environmental research*. 4: 47-53.
- Okpokwasili, G. C. and Amanchukwu, S. C. 1988. Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* species. *Environment International*, 14: 243-247.
- Olson, G. M., Gao, H., Meyer, B. M., Miles, M. S. and Overton, E. B. 2017. Effect of Corexit 9500A on Mississippi Canyon crude oil weathering patterns using artificial and natural seawater. *Heliyon*, 3: e00269.
- Ortiz, A., Kraatz, M. and Luthy, R. G. 1999. Organic phase resistance to dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds. *Environmental science and technology*, 33: 235-242.
- Parales, R. E., Bruce, N. C., Schmid, A. and Wackett, L. P. 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). *Applied and environmental microbiology*, 68: 4699-4709.
- Pardo, J. Qiu, Q. S., Guo, Y., Quintero, F. J., M., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. 2004. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of biological chemistry*, 279: 207-215.
- Pardo, R., Midden, C. and Miller, J. D. 2002. Attitudes toward biotechnology in the European Union. *Journal of biotechnology*, 98: 9-24.

- Parrish, C. C. 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In *Lipids in freshwater ecosystems*, pp. 4-20, New York.
- Parthipan, P., Elumalai, P., Karthikeyan, O. P., Ting, Y. P. and Rajasekar, A. 2017. A review on biodegradation of hydrocarbon and their influence on corrosion of carbon steel with special reference to petroleum industry. *Journal of Environment & Biotechnology Research*, 6: 12-33.
- Perry, C. and Gillott, J. E. 1979. The formation and behaviour of montmorillonite during the use of wet forward combustion in the Alberta oil sand deposits. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology*, 27: 314-325.
- Pineda-Flores, G. and Mesta-Howard, A. M. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 43: 143-150.
- Rajasekar, A. 2017. Biodegradation of petroleum hydrocarbon and its influence on corrosion with special reference to petroleum industry. In *Biodegradation and bioconversion of hydrocarbons* (pp. 307-336). Springer, Singapore.
- Ramos Alvarez, R. O. 2020. Capacidad biodegradadora de petróleo por microorganismos aislados de una refinería. 2: 100-157.
- Ratledge, C. 1978. Degradation of Aliphatic Hydrocarbons. In: Watkinson, R.J., Ed., *Development in Biodegradation of Hydrocarbons*, Vol. 1, Applied Sciences Publishers, 46 page, London.
- Rehm, H. J. and Kachholz, T., 1977. Degradation of long chain alkanes by bacilli. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 6: 39-54.
- Rentería, A. And Miranda, H. 1998. Isolation and primary selection of microorganisms capable of using oil as the only carbon source. *Book of Abstracts I Peruvian Congress of Iotechnology and Bioengineering*, 5: 425-428.
- Rinanti, A. and Nainggolan, I. J. 2018. Petroleum residues degradation in laboratory-scale by rhizosphere bacteria isolated from the mangrove ecosystem. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 106, No. 1, p. 012100). IOP Publishing.
- Rittmann, B. 2001. *Biotechnology of the environment, Principles and applications*. McGraw-Hill. Madrid, 745 page, Spain.

- Rylott, E. L., Lorenz, A. and Bruce, N. C. 2011. Biodegradation and biotransformation of explosives. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 434-440.
- Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N. and Golyshin, P. N. 2006. Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of bacteriology*, 188: 3763-3773.
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R. Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental pollution*, 136: 187-195.
- Selley, R. C. and Sonnenberg, S. A. 2015. Chapter 2-The physical and chemical properties of petroleum. *Elements of Petroleum Geology*, by RCSA Sonnenberg, 3rd edn, Academic, Boston, 13-39.
- Sharpley, J. M. 1966. *Petroleum Microbiology*. Gulf publishing company, 249 page, USA.
- Simanzhenkov, V. and Idem, R. 2003. *Crude Oil Chemistry*, CRC Press.
- Singh, P. and Borthakur, A. 2018. A review on biodegradation and photocatalytic degradation of organic pollutants: A bibliometric and comparative analysis. *Journal of cleaner production*, 196: 1669-1680.
- Singh, S. N., Kumari, B. and Mishra, S. 2012. Microbial degradation of alkanes. In *Microbial degradation of xenobiotics*, pp. 439-469, Berlin.
- Speight, J.G. 1999a. *The Desulfurization of Heavy Oils and Residua*. 2nd Edition. 480 page, New York.
- Speight, J. G. 2006b. *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press.
- Størdal, I. F., Olsen, A. J., Jenssen, B. M., Netzer, R., Altin, D. and Brakstad, O. G. 2015. Biotransformation of petroleum hydrocarbons and microbial communities in seawater with oil dispersions and copepod feces. *Marine pollution bulletin*, 101: 686-693.
- Sümer, F. and Joseph, J. 2019. Compatibility of the Kurdistan Region of Iraq's Institutions and Economic Development Within Iraq. In *Iraqi Kurdistan's Statehood Aspirations*, pp. 27-54, Cham.

- Thouand, G., Friant, P., Bois, F., Cartier, A., Maul, A. and Block, J.C. 1999. Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30: 274–282.
- Toma, J. J. 2011. Limnological study in Dokan Lake, Kurdistan region of Iraq. *Journal of Environmental Studies*, 6: 1-12.
- Ubani, O., Atagana, H. I. And Thantsha, M. S. 2013. Biological degradation of oil sludge: A review of the current state of development. *African Journal of Biotechnology*, 12: 6544-6567.
- United Nations. Economic Commission for Latin America, and United Nations. Technical Assistance Administration. 1958. Manual on economic development projects, Vol. 12, New York.
- Volke, T. and Velasco, J. 2003. Biodegradation of petroleum hydrocarbon in weathered soils by composting. National Center for Environmental Research and Training. Mexico.
- Völgyesi, L. and Moser, M. 1982. The inner structure of the Earth. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 26: 155-204.
- Walker, J. D. and Colwell, R. R. 1977. Role of autochthonous bacteria in the removal of spilled oil from sediment. *Environmental Pollution*, 12: 51-56.
- Wartell, B., Boufadel, M. and Rodriguez-Freire, L. 2021. An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 157: 105156.
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L. and Wu, Y. 2015. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71: 220-228.
- Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, S., Brusetti, L., Dietrich, N., Gigliotti, C., Barbieri, P., Sorlini, C. and Daffonchio, D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 248–257.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Khalaf Mohammed Khalaf AL-JUBORUI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
---------------	---	------------

Lisans	Musul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2000-2004
--------	--	-----------