

**PETROL VE HİDROKARBON PARÇALAYAN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ayşe EREN

MAYIS 2022

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PETROL VE HİDROKARBON PARÇALAYAN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ayşe EREN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV
YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

MAYIS 2022

DİYARBAKIR

**PETROL VE HİDROKARBON PARÇALAYAN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ayşe EREN tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Biyoloji Ana Bilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Kemal GÜVEN
Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Dicle Üniversitesi

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Sevdâ KIRBAĞ (*)
Biyoloji Bölümü, Fırat Üniversitesi

Prof. Dr. Kemal GÜVEN (**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Veysel TOLAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Numan YILDIRIM
Çevre Mühendisliği Bölümü, Munzur Üniversitesi

ONAY

Savunma Tarihi: 26 / 05 /2022

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.

(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.



Babama...

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılıyıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımınla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ayşe EREN

İmza:

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın bu meşakkatli aşamasında bana yol gösterip yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN’e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez dönemi boyunca önerileriyle bana yol gösteren Tez İzleme Komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Veysel TOLAN ve sayın Prof. Dr. Mahmut BALKAN’a verdikleri desteklerden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında tecrübeleri ile bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Fatma MATPAN BEKLER’e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü teşvik ve desteklerini gördüğüm, çoğu zaman kendilerini ihmal ettiğim başta sevgili kız kardeşlerim Şükran YÜMÜN, Esmâ EREN olmak üzere kıymetli aileme şükranlarımı borç bilir en derin teşekkürlerimi ederim.

Kıymetli dostlarım Ahmet UĞUR, Nesrin BOZHAN, Gülşen KAYA, Filiz KOYUNCU ve Sedat KAYA olmak üzere tüm dostlarıma bu süre zarfında hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne (DÜBAP), bu tez çalışması için sağladıkları finansal destek için (Proje No: DÜBAP-FEN.19.014) için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xiv
EKLER LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
ABSTRACT	xxi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1 Bakteri Sistematığının Tarihçesi	7
2.2 Bakterilerin Tanımlanması	8
2.2.1 Fenotipik yöntemler	8
2.2.2 Genotipik yöntemler	10
2.3 Bakterilerin Sınıflandırılması	12
2.3.1 Bakterilerin filogenetiğe dayalı sınıflandırılması	13
2.3.2 Proteobakteriler	14
2.4 Mikroorganizmaların Çevresel Rolü	19
2.5 Ham Petrol Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılan Teknikler	20
2.5.1 Fiziksel ve kimyasal teknikler	20
2.5.2 Biyolojik teknikler	21
2.6 Petrol Hidrokarbonları	21
2.7 Petrol Hidrokarbon Analiz Teknikleri	22
2.8 Petrol Hidrokarbonlarının Biyodegradasyonu (Biyobozunması)	22
2.9 Petrol ve Türevlerinin Metabolik Bozunma Mekanizmaları	24
2.9.1 Aerobik bozunmada enzimler ve fonksiyonel genler	24

2.9.2 Anaerobik bozunmada enzimler ve fonksiyonel genler	26
2.10 Konu Kapsamıyla İlgili Literatürün Özeti	28
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1 Materyal	35
3.1.1 Kullanılan aletler	35
3.1.2 Kullanılan kimyasallar	35
3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyeri bileşimleri	35
3.1.4 Örneklerin toplanması	36
3.2 Metot	37
3.2.1 Bakteri izolasyonu ve saf kültür üretimi	37
3.2.2 Bakteri tanımlanması	37
3.2.3 Bakterilerin hidrokarbonları parçalaması ve kullanması	45
3.2.4 Petrol parçalayan bakterilerde alkB ve alkM genlerinin izolasyonu.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	49
4.1 Bakteri İzolasyonu	49
4.2 İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik Testler	49
4.2.1 Koloni morfolojisi	49
4.2.2 Hücre morfolojisi	50
4.3 Bakterilerin Üreme Şartlarının Tespiti	53
4.3.1 Bakteri üremesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi	53
4.3.2 Bakteri üremesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi	57
4.3.3 Zamanın bakterilerin üremesi üzerine etkisi	61
4.3.4 NaCl oranlarının bakteri üremesi üzerine etkisi	65
4.3.5 Bakteri suşlarında hareketlilik ve oksijen gereksiniminin belirlenmesi..	65
4.4 Biyokimyasal Testler	68
4.4.1 Nişasta hidroliz testi	68
4.4.2 Katalaz testi	69

4.4.3 Jelatin hidrolizasyon testi	69
4.4.4 Oksidaz aktivitesi	70
4.4.5 Üreaz testi	70
4.4.6 Sitrat testi	71
4.4.7 İndol testi	73
4.5 Antibiyotik duyarlılık testi	74
4.6 16S rRNA Dizi Analizi ile Bakterilerin Filogenetik Tanımlanması	83
4.6.1 Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi	83
4.6.2 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	84
4.6.3 İzole edilen suşların 16S rRNA gen dizilerinin analizi	85
4.7 Bakterilerin Çeşitli Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	90
4.8 Tanımlanan Bakterilerin Ham Petrolü Parçalama (Biyodegradasyon) Oranlarının GC-MS Analizi ile Belirlenmesi	94
4.9 Bakteri Suşları Tarafından Hekzadekan Biyodegradasyonu	99
4.10 Bakteri Suşları Tarafından Pentadekan Biyodegradasyonu	102
4.11 Pentadekan ve Hekzadekan İçeren Sıvı Besiyerinde Bakterilerin Tek veya Karışım Halinde Degredasyon Analizi	105
4.12 Petrol Parçalayan Geninin İzolasyonu	106
4.12.1 Kromazomal DNA Agaroz Jel Elektroforezi	106
4.12.2 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	107
4.12.3 AlkB ve AlkM Genlerinin PCR ile Amplifikasyonu	107
4.12.4 AlkB ve AlkM gen dizi analizi.....	107
4.12.5 AlkB ve AlkM'nin filogenetik analizi.....	112
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	115
KAYNAKLAR	132
EKLER	153

ÖZGEÇMİŞ	154
----------------	-----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Yaşamın filogenetik ağacı.....	13
Şekil 2.2 Bakterilere ait filogenetik ağaç.....	14
Şekil 2.3 Taksonomide proteobacteria'ya ait hiyerarşik düzenleme.....	15
Şekil 2.4 Farklı hidrokarbon sınıfları.....	22
Şekil 2.5 Terminal ve subterminal oksidasyon yoluyla n-alkanların bozunması için aerobik yollar.....	26
Şekil 3.1 Örneklerin alındığı petrol kuyusu ve çevresi.....	36
Şekil 4.1 İzole edilen suşların gram boyama özellikleri.....	51
Şekil 4.2 İzole edilen suşların spor boyama özellikleri.....	52
Şekil 4.3 Sıcaklığın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.4 Sıcaklığın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.5 Sıcaklığın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.6 Sıcaklığın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.7 Sıcaklığın D11 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.8 Sıcaklığın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.9 Sıcaklığın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.10 Sıcaklığın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.11 pH'nın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.12 pH'nın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.13 pH'nın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.14 pH'nın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.15 pH'nın D11 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.16 pH'nın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.17 pH'nın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.18 pH'nın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.19 Zamanın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	61
Şekil 4. 20 Zamanın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.21 Zamanın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.22 Zamanın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.23 Zamanın D11 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.24 Zamanın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	63

Şekil 4.25 Zamanın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.26 Zamanın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.27 D7 suşunun hareket testi	66
Şekil 4.28 D8 suşunun hareket testi.....	66
Şekil 4.29 D9 suşunun hareket testi.....	66
Şekil 4.30 D10 suşunun hareket testi.....	66
Şekil 4.31. D11 suşunun hareket testi.....	67
Şekil 4.32. D12 suşunun hareket testi.....	67
Şekil 4.33. E1 suşunun hareket testi.	67
Şekil 4.34. E2 suşunun hareket testi.....	67
Şekil 4.35 D7, D8, D9 ve D10 suşlarına ait nişasta hidroliz testleri.....	68
Şekil 4.36 D11, D12, E1 ve E2 suşlarına ait nişasta hidroliz testleri.....	69
Şekil 4.37 D7 suşunun üreaz testi.....	70
Şekil 4.38 D8 suşunun üreaz testi.....	70
Şekil 4.39 D9 suşunun üreaz Testi.....	71
Şekil 4.40 D10 suşunun üreaz Testi.....	71
Şekil 4.41 D12 suşunun üreaz Testi.....	71
Şekil 4.42 D11, E1 ve E2 suşlarının üreaz testi.....	71
Şekil 4.43 D7 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.44 D8 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.45 D9 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.46 D10 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.47 D11 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.48 D12 suşunun sitrat testi.....	72
Şekil 4.49 E1 suşunun sitrat testi.....	73
Şekil 4.50 E2 suşunun sitrat testi.....	73
Şekil 4.51 İzole edilen suşlarının indol testi.....	73
Şekil 4.52 D7 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	75
Şekil 4.53 D8 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	76
Şekil 4.54 D9 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	77
Şekil 4.55 D10 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	78
Şekil 4.56 D11 suşunun antibiyotiklerine duyarlılığı.....	79
Şekil 4.57 D12 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	80

Şekil 4.58 E1 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	81
4.59 E2 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı.....	82
Şekil 4.60 Kromozomal DNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	84
Şekil 4.61 Elde edilen suşların dağılım yüzdesi.....	86
Şekil 4.62 D7, D10 ve D12 suşlarına ait 16S rRNA dizi analizleri yardımıyla elde edilen filogenetik ağaç.....	87
Şekil 4.63 D8 suşuna ait 16S rRNA dizi analizi yardımıyla elde edilen filogenetik ağaç	88
Şekil 4.64 D9 suşuna ait 16S rRNA dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç.....	88
Şekil 4.65 D11,E1 ve E2 suşuna ait 16S rRNA dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç.....	89
Şekil 4.66 D7 suşunun farklı %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması.....	90
Şekil 4.67 D8 suşunun değişik %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması.....	91
Şekil 4.68 D9 suşunun değişik hidrokarbonlarda (%1) çoğalması.....	91
Şekil 4.69 D11 suşunun değişik hidrokarbonlarda (%1) çoğalması.....	92
Şekil 4.70 D12 suşunun %1'lik değişik hidrokarbonlarda çoğalması.....	92
Şekil 4.71 E1 suşunun değişik %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması.....	93
Şekil 4.72 E2 suşunun değişik hidrokarbon ortamlarında (%1) çoğalması.....	93
Şekil 4.73 İnkübasyon sonrasında %1'lik ham petrol ortamında bakteri izolatlarının üreme ve biyodegradasyon düzeylerinin görüntülenmesi.....	94
Şekil 4.74 %1'lik ham petrolün GC-MS analizi. Abiyotik kontrol.....	94
Şekil 4.75 D8 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi.....	95
Şekil 4.76 D9 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi.....	96
Şekil 4.77 D10 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi.....	96
Şekil 4.78 %1'lik ham petrolün D11 suşu tarafından biyodegradasyonu.....	97
Şekil 4.79 D12 suşunun %1'lik ham petrol biyodegradasyonu.....	97
Şekil 4.80 E1 suşunun ham petrol (%1) biyodegradasyonu.....	98
Şekil 4.81 E2 suşunun %1'lik ham petrol biyodegradasyonu analizi.....	98
Şekil 4.82 BM sıvı besiyerinde %1'lik hekzadekanın GC-MS Grafiği Abiyotik kontrol.....	100

Şekil 4.83 D9 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	100
Şekil 4.84 D11 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	101
Şekil 4.85 D12 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	101
Şekil 4.86 E1 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	102
Şekil 4.87 %1'lik Pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.	
Abiyotik kontrol.....	103
Şekil 4.88 D7 tarafından %1'lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	103
Şekil 4.89 D8 tarafından %1'lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	104
Şekil 4.90 E2 tarafından %1'lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği.....	104
Şekil 4.91 Karışım halinde bakteri ve hidrokarbonların bakteri çoğalması üzerine etkisi	105
Şekil 4.92 Kromozomal DNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	106
Şekil.4.93 AlkB ve AlkM genlerine ait primer 1 ve primer 3 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	107
Şekil 4.94 D11 ve E2 suşlarının AlkM ve AlkB genlerinin nükleotid sekanslarının karşılaştırılması.....	109
Şekil 4.95 D11 suşuna ait AlkM geninin filogenetik ağacı.....	112
Şekil 4.96 E2 suşuna ait AlkM geninin filogenetik ağacı.....	113
Şekil 4.97 D11 suşuna ait AlkB geninin filogenetik ağacı.....	113
Şekil 4.98 E2 suşuna ait AlkB geninin filogenetik ağacı.....	114

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Bakterilerin sınıflandırılma yöntemlerinde kullanılan bazı özellikler ve yöntemler.....	9
Tablo 3.1 16S rRNA gen dizi analizi amplifikasyonu için hazırlanan thermal cycler programı.....	44
Tablo 3.2 Gaz kromatografisi fırın sıcaklık programı.....	46
Tablo 3.3 alkB ve alkM genlerinin PCR ile amplifikasyonu için thermal cycler programı.....	48
Tablo 4.1 Bakterilerin koloni morfolojisi özelliği.....	49
Tablo 4.2 Bakterilerin hücre morfolojisi.....	50
Tablo 4.3 İzolatların farklı konsantrasyonlardaki NaCl'ye toleransları.....	65
Tablo 4.4 İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin toplu gösterimi.....	74
Tablo 4.5 İzole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları.....	83
Tablo 4.6. İzole edilen kromozomal DNA'ların saflık durumları.....	84
Tablo 4.7. İzole edilen bakterilerin 16S rRNA gen dizilerine benzerlik oranları.....	85
Tablo 4.8 Tanımlanan bakteri izolatları tarafından ham petrolde bulunan alkanların biyodegradasyonu sonunda edilen yüzde alanlar.....	99
Tablo 4.9 Bakteri Suşlarına ait GC-MS analizi ile heksadekan için elde edilen yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri.....	102
Tablo 4.10 Bakteri suşlarına ait GC-MS analizi ile pentadekan için elde edilen yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri.....	104
Tablo 4.11 Tek veya karışım halinde test edilen bakteri suşlarına ait GC-MS analizi sonucunda pentadekan ve heksadekan karışımı yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri.....	106
Tablo 4.12 Alkan monooksijenaz genlerinin dizi analizi.....	108
Tablo 5.1 D7, D10 ve D12'nin fenotipik özelliklerinin diğer bazı <i>Pseudomonas</i> türleri ile karşılaştırılması.....	117
Tablo 5.2 D8'in fenotipik özelliklerinin diğer bazı <i>Enterobacter</i> türleri ile karşılaştırılması.....	119
Tablo 5.3 D9'un fenotipik özelliklerinin diğer bazı <i>Delftia</i> türleri ile karşılaştırılması	121

Tablo 5.4 D11, E1 ve E2'nin fenotopik özelliklerinin diğer bazı <i>Acinetobacter</i> türleri ile karşılaştırılması.....	124
---	-----



EKLER LİSTESİ

EK 3. AgaroZ Jel Elektroforezi.....	153
EK 3.1 50X TAE Tamponu	153
EK 3.2 DNA standardı.....	153



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
g/L	Gram/litre
g	Gram
v/v	Hacim/Hacim
L	Litre
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mg/mL	Miligram/Mililitre
mL/dk	Mililitre/Dakika
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Di sodyum hidrojen fosfat heptahidrat
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
NH_4Cl	Amonyum klorür
MgSO_4	Magnezyum sülfat
CaCl_2	Kalsiyum klorür
FeCl_3	Demir (III) klorür
MnSO_4	Mangan (II) sülfat
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko sülfat heptahidrat
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Amonyum hepta molibdat tetrahidrat
I_2	İyot

KI	Potasyum iyodür
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
NaCl	Sodyum klorür
H ₂ O	Su
Ce(SO ₄) ₂	Seryum sülfat
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
MoO ₃	Molibden trioksit
Mo	Molibden
CHCl ₃	Kloroform
CH ₃ OH	Metanol
%	Yüzde
ng	Nanogram

Kısaltma

Açıklama

bç	Baz çifti
BM	Minimal besiyeri
GC-MS	Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi
GC-FID	Gaz kromatografi-alev iyonizasyon dedektörü
TPAO	Türkiye petroleri anonim ortaklığı
TAE	Tris-EDTA-asetik asit
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

PETROL VE HİDROKARBON PARÇALAYAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Eren, Ayşe.

Doktora, Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Kemal Güven

Mayıs 2022, 179 sayfa

Petrol dünyadaki en yaygın çevresel kirleticilerdir. Petrol kirleticileri balıkçılık, deniz habitatları, halobiyolar ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmakta ve yıllarca hatta on yıllarca sürebilen ekolojik dengeyi tahrip etmektedir. Bu çalışmada, Batman bölgesinde petrolle kirletilmiş alanlardan bakteri izole ederek, petrol parçalayan bu bakteri varyeteler üzerinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve filogenetik analizler yapılarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bu bakterilerin ham petrolü ve çeşitli hidrokarbonları enerji kaynağı olarak kullanabilme kapasiteleri, hidrokarbonları parçalama özellikleri ve biyoparçalamada görev alan genlerin tespit edilmesi üzerinde çalışmalar gerçekleştirildi. Batman petrol sahalarından petrol ile kirlenmiş bölgelerden *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Delftia*, *Acinetobacter* cinslerine ait 8 bakteri izole edilmiştir. Bu izole edilen bakterilerin fenotipik analizleri yapılmış ve 16S rRNA gen dizi analizine göre, sırasıyla D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1 ve E2 olarak adlandırılan bakterilerin *Pseudomonas aeruginosa*'ya %100, *Enterobacter ludwigii*'ye %100, *Delftia tsuruhatensis*'e %100, *Pseudomonas putida*'ya %100, *Acinetobacter pittii*'ye %99,93, *Pseudomonas rhodesiae*'ye %100, *Acinetobacter pittii*'ye %100, *Acinetobacter calcoaceticus*'a %100 benzer oldukları belirlenmiştir. Çalışılan tüm bakteri suşlarının ham petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları belirlenmiştir. Bakterilerin farklı uzunluklara sahip alifatik hidrokarbonlardan, sadece uzun zincirli n-alkanlarda (pentadekan, hekzadekan) ve dekanda iyi ürettiği görülmüştür. Test edilen uzun zincirli alkanlar arasında, genel olarak bakteriler tarafından en çok tercih edilen hekzadekan olmuştur. Beş günlük inkübasyon sonucunda GC-MS analizi yapılarak, ham petrolü parçalama potansiyeli açısından yüksekte düşüğe doğru sıralayacak olursak; D11'in %43, D8'in %27, D12'nin %21, D10'nun %18, D9'un %12, E2'nin ise %12 ve E1'in %9 oranında degradasyona uğrattıkları tespit edildi. Üç günlük inkübasyon sonucunda bakterilerin %1'lik alkan hidrokarbonlarını parçalama oranları GC-MS analizi ile belirlenmiştir. Hekzadekanı, D9'un yaklaşık olarak %65, D11'in %70, D12'nin %38, E1'in %76 oranında parçaladığı tespit edilmiştir. Pentadekanı, D7'in %3, D8'in %29, E2'in ise %48 oranında parçaladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, üç günlük inkübasyon sonucunda, bakterilerin tek veya karışım halinde hekzadekan ve pentadekandan oluşan hidrokarbon karışımlarını (toplam %1) parçalama oranları belirlenmiştir. Bireysel olarak D8 %31, D11 %43, E2 %53 oranında etkili olurken, karışım halinde D8+D11 %60, D11+E2 %49, D8+E2 %61 ve D8+D11+E2 ise %72 gibi yüksek oranda

biyodegradasyon yaptıkları tespit edildi. D11 ve E2 suşları için tasarlanan primerlerden ilki (primer 1) kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin alkM geninin dizi analizi sonuçlarına göre sırasıyla %93,06 ve %92,72 oranında *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9) alkM gen dizisine benzerlik gösterdiği, ayrıca D11 ve E2 suşları için tasarlanan diğer primer (primer 3) kullanıldığında elde edilen PCR ürünlerinin alkB geni dizi analizi sonuçlarına göre, sırasıyla %94,48 oranında *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) ve %95,52 oranında *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8) alkB gen dizilerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Petrol kirliliği, Bakteriyel karakterizasyon, 16S rRNA gen dizisi analizi, Hidrokarbon biyodegradasyonu, AlkB ve AlkM gen analizi



ABSTRACT

ISOLATION AND DETERMINATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIALS OF PETROLEUM AND HYDROCARBON DEGRADING BACTERIA

Eren, Ayşe

Ph. D in Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Kemal GÜVEN

May 2022, 179 pages

Petroleum is the most common environmental pollutant in the world. Oil pollutants pose a serious threat to fisheries, marine habitats, halobionts and human health, and destroy the ecological balance that can last for years or even decades. In this study, by isolating bacteria from oil-contaminated areas in the Batman region, these oil-degrading bacteria were identified by performing morphological, physiological, biochemical and phylogenetic analyzes on the varieties. In addition, studies were carried out on the capacity of these bacteria to use crude oil and various hydrocarbons as energy sources, their ability to break down hydrocarbons, and the determination of genes involved in biodegradation. Eight bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Delftia*, *Acinetobacter* genera were isolated from oil-contaminated areas of Batman oil fields. Phenotypic analyzes of these isolated bacteria were carried out and according to the 16S rRNA gene sequence analysis, the bacteria designated as D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1 and E2 were found to be similar as 100% to *Pseudomonas aeruginosa*, 100% to *Enterobacter ludwigii*, 100% to *Delftia tsuruhatensis*, 100% to *Pseudomonas putida*, 99,93% to *Acinetobacter pittii*, 100% to *Pseudomonas rhodesiae*, 100% to *Acinetobacter pittii* and 100% to *Acinetobacter calcoaceticus*, respectively. It has been determined that all bacterial strains studied use crude oil as a carbon and energy source. It has been observed that bacteria grow well from aliphatic hydrocarbons of different lengths, only in long chain n-alkanes (pentadecane, hexadecane) and decane. Among the long chain alkanes tested, hexadecane was the most preferred by bacteria overall. After five days of incubation, GC-MS analysis is performed and the order of crude oil degradation capacity by bacteria from high to low were as follows; D11, D8, D12, D10, D9, E2 and E1 degraded 43%, 27%, 21%, 18%, 12%, 12% and 9%, respectively. After three days of incubation, the rate of degradation of 1% alkane hydrocarbons by bacteria was determined by GC-MS analysis. It has been determined that 1% hexadecane decomposes approximately 65% by D9, 70% by D11, 38% by D12 and 76% by E1. Pentadecane was found to be decomposed 3% by D7, 29% by D8, and 48% by E2. In addition, as a result of three days of incubation, the rate of bacterial degradation of hydrocarbon mixtures (total 1%) consisting of hexadecane and pentadecane, singly or as a mixture, was determined. While individually D8, D11 and E2 degraded 31%, 43% and 53% respectively, in mixtures biodegradation of hydrocarbon mixtures was as high as 60% by D8+D11, 49% by D11+E2, 61% by D8+E2 and 72% by D8+D11+E2. The results of the sequence analysis of the alkM gene of PCR products obtained using the first primer (primer 1)

designed for D11 and E2 strains showed 93,06% and 92,72% alkM gene similarity to that of *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9), respectively. The sequence analysis of the alkB gene PCR products using the other primer (primer 3) designed for D11 and E2 strains showed 94,48% and 95,52% alkB gene similarity to that of *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) and *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8), respectively.

Keywords: Oil pollution, Bacterial characterization, 16S rRNA gene sequence analysis, Hydrocarbon biodegradation, AlkB and AlkM gene analysis



1. GİRİŞ

Petrol dünyadaki en yaygın çevresel kirleticilerdir ve petrol sızıntıları karasal ve deniz ekosistemleri için büyük tehlike oluşturmaktadır (Hassanshahian vd., 2014). Petrol küresel ekonomide çok önemli bir kaynaktır. Ancak taşınması, işlenmesi ve kullanımı sırasında çevresel kazalara neden olmaktadır (Cerqueda-Garcia vd., 2020). Her yıl yaklaşık beş milyon ton ham petrol ve rafine petrol antropojenik kaynaklar çevreye karışmaktadır. Kazalar genellikle tanker, toprak boru hattı ve diğer gemilerden dökülmeden kaynaklanmaktadır (Malatova, 2005).

Doğal çevreye dökülen petrol kirliliğe neden olmaktadır. Petrol kaynaklı zehirli dumanlara maruz kalınması, biyotik toplulukları büyük ölçüde etkilenmektedir (Cerqueda-Garcia vd., 2020). Örneğin, Nisan 2010'da Meksika Körfezi'ndeki Deepwater Horizon patlaması ve Temmuz 2010'da Çin'deki Dalian'da petrol sızıntısı, okyanus ve kıyılarda ciddi çevresel sorunlara neden olmuştur. Petrol kirleticileri çevreye dökülmesi balıkçılık, deniz habitatları, halobiyolar ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Etkisi yıllarca sürebilen bu durum ekolojik dengeyi tahrip etmektedir. Birçok araştırmacı, kirleticilerin çevreye ve insana etkilerini en aza indirmek için birçok araştırma yapmaktadır (Zhang vd., 2011).

Hidrokarbon kirliliğinin giderilmesinde fiziksel, kimyasal veya biyolojik teknik kullanılmaktadır (Sawadogo vd., 2014). Biyolojik yöntem olarak, kirletici maddelerin ortadan kaldırması için biyodegradasyon veya biyoremediasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler son yıllarda tercih edilmektedir. Mikroorganizmaların, çeşitli metabolik yetenekleri nedeniyle kirleticileri detoksifiye etmek veya uzaklaştırmak için kullanılması şeklinde tanımlanan biyoremediasyon işlemi, petrol endüstrisi ürünleri de dahil olmak üzere birçok çevresel kirleticinin uzaklaştırılması ve parçalanması için geliştirilen bir yöntemdir (Medina-Bellve vd., 2005).

Biyolojik olarak mikroorganizmaların metabolizmaları ile parçalama petrol ve diğer hidrokarbon kirleticileri çevreden uzaklaştırılabileceği birincil mekanizmalardan birini temsil eder (Ulrici, 2000). Fiziksel ve kimyasal tekniklerden daha ucuz ve çevre dostu olmasıyla çok verimli bir şekilde etkilidir. Verimli ve uygun maliyetli bir teknoloji olarak kabul edilen biyoremediasyon, kirleticileri ortadan kaldırmak için

hidrokarbon parçalayıcı mikroorganizmaların ortama konulmasıyla büyük avantajlara sahiptir (Zheng vd., 2018). Petrol kirliliği nedeniyle büyüyen çevresel kriz, petrol kirleticilerinin artırılması için yeni teknolojiler geliştirmeye odaklanan çabalar teşvik edilmektedir (Chen vd., 2014).

Son zamanlarda arkea, bakteri ve mantar dahil olmak üzere petrolle kirlenmiş topraklardan petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen çok çeşitli mikroorganizmalar izole edilmiş olsa da bakteriler mikrobiyal ekolojide en bol ve önemli olanlarıdır (Acer vd., 2020). Bugüne kadar, petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen 79'dan fazla bakteri türü tanımlanmıştır (Xu vd., 2017; Xu vd., 2018). Petrol hidrokarbonları parçalanmasında önemli rol oynayan bakteriler aşağıda yer alan gruplara ait olduğu belirlenmiştir; *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Alteromonas*, *Kocuria*, *Dietzia*, *Marinobacter*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus* ve *Rhodococcus* (Acer vd., 2020; Chaerun vd., 2004; Jin vd., 2012; Margesin vd., 2003; Nie vd., 2014a; Sarkar vd., 2017; Varjani ve Upasani, 2016; Varjani, 2017; Xu vd., 2017; Xu vd., 2018).

Mikroorganizmalar çevrenin önemli bir parçasıdır ve kirliliği temizleyerek ekosistemin sürdürülebilirliğinin korunmasına yardımcı olurlar. Biyobozunmada mikroorganizmalar, metabolizma için kullanılabilecek kirleticiler bozunma sırasında enerji kazanırlar, ayrıca tüm hücresel bileşenlerin temel bir bileşeni olan “Karbon” elde ederler, bu nedenle petrol hidrokarbonlarının biyolojik olarak parçalanmasının enerji açısından elverişli olduğu söylenebilir (Abbasian vd., 2015; Varjani, 2017). Kirlenmiş bölgelerdeki doğal mikrobiyal toplulukların, sonraki nesillerde direnç potansiyellerini artıran kirleticilere sürekli maruz kalmışlardır. Genetik mutasyonlar nedeniyle çevreye uyum sağladıkları bulunmuştur (Varjani, 2017).

Ham petrol, herbiri belirli bir molekül grubunu parçalayabilen çeşitli mikroorganizmalar tarafından parçalanmış çeşitli basit ve karmaşık hidrokarbonların bir karışımıdır (Zanaroli vd., 2010). Sugiura vd. (1997), ve Ghazali vd. (2004), farklı ham petrol numunelerindeki aynı bileşiğin aynı organizmalar/konsorsiyum tarafından farklı derecelerde bozunduğunu bildirmişlerdir, bunun nedeni ham petrol numunesindeki belirli bir bileşiğin kimyasal yapısı değil biyoyararlanımı olabilir. Ham

petrolle kirlenmiş alanların biyolojik olarak iyileştirilmesi, genellikle mikrofloranın düşük biyolojik çeşitliliği ve/veya kirlenmiş bölgede meydana gelen farklı hidrokarbonları parçalamak için gerekli olan tamamlayıcı substrat özgülüğüne sahip özelleşmiş mikropların kıtlığı nedeniyle sınırlıdır (Ron ve Rosenberg, 2014). Ham petrolde hidrokarbon kirleticilerini tek karbon kaynağı olarak kullanmak için saf kültürlere göre karışık kültürlerin metabolik çok yönlülüğü hakkında çeşitli raporlar elde edilmiştir. Bakteriyel ve fungal ortak kültür(ler), laboratuvar koşullarında kontrol edildiğinde dizel yağının ve birçok PAH'ların bozunma oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle biyolojik bozunma sırasında farklı mikrobiyal grupların katabolik olarak bir arada bulunması önemlidir (Varjani, 2017).

Bununla birlikte, petrol hidrokarbon bozunma verimliliği ile mikrobiyal topluluk dinamikleri ve mikrobiyal aktivite arasındaki ilişkiyi araştırmak için çok az araştırma yapılmıştır (wu vd., 2016a). Mikroorganizmaların hidrokarbonları parçalama yeteneği genetik yapılarının sonucudur. Bu metabolizmada yer alan kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinde enzimler rol alır. Bakterinin sahip olduğu enzimler, hücredeki spesifik genetik bilginin yansımasıdır (Zylstra ve Gibson, 1991). Bazı metabolik fonksiyonlar plazmidlere kodlanan genler tarafından gerçekleştirilir. Bazı polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) toluen, naftalen, salisilat, oktan vs.'nin parçalanmasında rol oynayan enzimlerin plazmidlere kodlanmış olduğu bulunmuştur (Barbly ve Barbour, 1984; Nelson, 1990). Hidrokarbonların parçalanmasında plazmitler (Q15, OCT, TOL, NAH7, pND140, pND160) ve (alkA, alkB, nahA-M vb.) gibi genler rol oynar. Organizmaların çoğunda biyolojik parçalayıcı enzimler genellikle plazmitlerde kodlanır (Podar vd., 2019). Birçok organik kirleticinin tam ve çok hızlı bir şekilde biyolojik olarak parçalanması aerobik şartlar altında gerçekleştirilir (Das ve Chandran, 2011). Bakterilerin aerobik bozunmasında sitokrom P450, monooksijenaz ve dioksijenaz gibi çeşitli enzimler görev almaktadır (Maeng vd., 1996; Maier vd., 2001; Hamamura vd., 2001; Van Beilen ve Funhoff, 2007). Monooksijenazlar (alkan hidroksilasyonu), bir protein ailesine ait olup önemli farklı yapısal farklılıklara sahiptirler. Bu katalik sistemin aktif bölgesinde demir-kükürt, di-demir ve hem'e bağlı bakır içerir (Van Beilen ve Funhoff, 2007; Wang ve Shao, 2012a). Aerobik olarak alkan bozunma yolunda ilk önce bir alkan bir alkole dönüşür. Genelde bir primer alkol üretilir, ancak subterminal oksidasyon da bildirilmiştir (Rojo,

2009). Önce alkol oksitlenir, daha sonra oksidasyon yoluyla bir yağ asidine dönüştürülen bir aldehite dönüştürülür; β -oksidasyon yoluna girer. Alkan bozunumunun ilk reaksiyon yolunda, hem içermeyen integral bir membran proteini aracılık eder, bu membran protein kompleksinde substratı hidroksile eden di-demir monooksijenaz enziminin terminal konumunda bulunur. Bu monooksijenaz kompleksi, partikül şeklinde membrana bağlı hidroksilaz (pAH), bir rubredoxin ve bir rubredoxin redüktaz'dan oluşur. İndirgeme aşaması için, kofaktör FAD aracılığıyla elektronlar daha sonra indirgenmiş NADH'den rubredoksin redüktaza (AlkT), çözünür rubredoksine (AlkG), pAH ve sonuçta alkana transfer edilir. Bu katabolik genler *Pseudomonas putida*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* gibi türlerde yaygın olarak bulunmuştur (Fuentes vd., 2014; Van Beilen vd., 2006). n-Alkanların yağ asitlerine dönüştürülmesi *P. putida*'nın OCT plazmidinde yer alan alkBFGHJKL ve alkST operonlarınca kodlanan metabolik enzimler tarafından gerçekleştirildiği bulunmuştur (Rojo, 2009). Bu AlkBFGHJKL operonu, alkanların asetil-CoA'ya dönüşümünü sağlayan enzimleri kodlarken. AlkST kümesi genler, rubredoksin redüktaz AlkT' yi ve transkripsiyonel aktivatör AlkS'yi kodlamaktadır (Van Beilen ve Funhoff, 2007). *Acinetobacter* sp. M1 suşunda alkanları C20-C44 kullandığı ve iki n-alkan hidroksilaz kodlayan gen (alkMa ve alkMb) belirlenmiştir (Rojo, 2009).

Alkan-monooksijenazı kodlayan alkB genlerinin birçok aerobik alkan bozunmasından rol aldığı bulunmuştur (Tourova vd., 2016). Hem olmayan membranı kodlayan bu AlkB monooksijenazları, mikrobiyal alkan bozunmasında beta oksidasyon yolunun ilk adımından sorumludur (Amouric vd., 2010). *Acinetobacter*, alkA tipi alkan monooksijenaz genine sahiptir. AlkB monooksijenaz, C13-C44 arasında değişen orta ve uzun zincirli alkanları kullanabilir (Das ve Chandran, 2010; Wentzel vd., 2007). AlkB, uzun zincirli alkanları metabolize eden tek alkan-monooksijenaz değildir. Diğer iki alkan tek terminal oksidasyon enzimi, çözünür flavoprotein alkan-monooksijenaz LadA'yı içerir (Feng vd., 2017).

Bu nedenle bu çalışmada, Batman bölgesinde petrolle kirletilmiş alanlardan bakteri izole ederek, petrol parçalayan bu bakteri varyeteleri üzerinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve filogenetik analizler yapılarak karakterize edilmeleri amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmanın amaçlarından biri de bu bakterilerin ham petrolü ve çeşitli

hidrokarbonları enerji kaynağı olarak kullanabilme kapasitelerini, hidrokarbonları parçalama özelliklerini ve biyoparçalamada görev alan genlerini tespit etmektir.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Bakteri Sistematığının Tarihçesi

Mikroorganizmalarla uğraşan bilim insanları için ön şart, çeşitlilikleri ortaya çıkaran güvenilir bir sınıflandırma sistemi oluşturmaktır (Schleifer, 2009). Tanımlama, ve sistematik mikrobiyoloji disiplininde merkezinde yer almaktadır. Sistematikte amaç, biyolojik çeşitliliği belirlemek için farklı organizmaları düzenli şekilde incelemektir (Ludwig, 2007). Yeni mikroorganizmaların keşfi onların farklı karakterlere sahip olmaları ve yeni kanıtların bulunması nedeniyle bakteri sistematığı sürekli değişime uğramıştır (Arda, 2011). Adlandırılmış bakteri türlerinin sınıflandırılması kolay veya hızlı bir şekilde olmamıştır (Garrrity vd., 2001).

Hayvanların sistematik düzenlemesini deneyen ilk kişi olan Danimarkalı tabiat bilimcisi Otto Muller (1773 ve 1774), protozoa ve bakteri arasında net bir fark bulmamış. Ancak 1786'da yayınlanan son çalışmasında Monas ve Vibrio bakterileri içeren ve nokta biçimli ve uzun türleri barındıran olmak üzere iki cinse yer vermiştir (Logan, 1992; Logan, 1994). On dokuzuncu yüzyıl boyunca Ferdinand Cohn (1872, 1875) tarafından sınıflandırmalar yapılmıştır. Cohn, 1872 yılında altı bakteri cinsi (*Micrococcus*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Spirillum* ve *Spirochaeta*) tanımlanmıştır. Aynı araştırmacı, sonrasında (1875), daha fazla bakteri cinsini (*Sarcina*, *Ascococcus*, *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Cladothrix*, *Crenothrix*, *Streptococcus* ve *Streptothrix*) ekleyerek, siyanobakterileri de içerecek şekilde sınıflandırmayı genişletmiştir (Schleifer, 2009). Adlandırma kuralları tüm sisteme izin vermek için 19. ve 20. yüzyılda güçlü bir şekilde gelişmiştir. Ayrıca, son on yılda bu adlandırma, Phylocode destekçileri tarafından sorgulanmıştır (Manktelow, 2010).

1897 yılında Migula mikroorganizmaların morfolojisi dışında ayrıca renk (koloni) ve çeşitli fizyolojik özelliklerini (azot fiksasyonu gibi) dikkate alan çalışmaya geliştirmiş Bu çalışma “System of the Bacteria” adı altında yayınlanmıştır. 1897 yılında Lehmann ve Neumann, “Diagnostic Bacteriology” adı altında (1886) çalışma yayınladılar (Arda, 2011). Bu ikinci çalışma, görünüşe göre daha başarılıydı ve 1930’a kadar, özellikle Avrupa’da ardışık baskılarda kullanıldı. F.D. Chester, 1897 ve 1898’de, 1901’de “Manual of Determinative Bacteriology”da bakteriler hakkında raporlar oluşturdu. F.D. Chester, organize tanımlamalardaki eksikliklerin farkına

varmış ve bunun da yeni türlerin tanımlanmasını imkânsız hale getirdiğini tespit etmiştir (Garrity vd., 2001). Orla-Jensen (1909)'nın çalışması, daha ileri fizyolojik karakterleri yansıttığı için etkili bulunmuştur. Cinsleri ve türleri, metabolik ürünlere, morfolojiye ek olarak çeşitli şekerlerin gelişimdeki rolüne ve fermantasyon için gerekli sıcaklık aralıkları gibi özelliklere dayanarak sınıflandırmaya çalışmıştır. Ayrıca, 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'' Amerikan Bakteriyologlar Derneği'ndeki (SAB) bir grup meslektaşın ilgi ve çabalarıyla (Rogers, Krumwiede, Buchanan ve Smith tarafından) 1917'de Journal of Bacteriology'de bir çalışma yayınlandı. Bu çalışmada bakteriler fenotipik özelliklerine göre tek hücreli bitkiler olarak sınıflandırılmıştır (Arda, 2011). 1974'te Bergey's's' Manual of Determinative Bacteriology'' kitabının 8. baskısı yayınlanmasına rağmen, taksonomide yaygın olarak kullanılmadı. Bununla beraber, 1977'de daha kısa ve sade olan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabı yayınlandı (Garrity vd., 2001; Schleifer, 2009). Moleküler tekniklerin sınıflandırmada kullanılması aşamasına kadar bakteri sınıflandırma ve adlandırmasında bu kitaptan oldukça faydalanılmıştır.

2.2 Bakterilerin Tanımlanması

2.2.1 Fenotipik yöntemler

Fenotipik yöntemler DNA veya RNA testleriyle doğrudan ilişkili değildir. Tanımlamada çoğunlukla temel mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan klasik veya geleneksel fenotipik testleri kapsar. Bakterilerin genel fenotipik özellikler (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal) özelliklere dayanmaktadır. Fenotipik özellikler birçoğunun genetik açıdan ilgisiz veriler olduğu belirlenmiştir. Fakat taksonları tanımlamak ve açıklamak için bilgi sağlarlar (Vandamme vd., 1996; Moraes vd., 2013). Bakterilerin sınıflandırılma yöntemlerinde kullanılan bazı özellikler ve yöntemler Tablo 2.1'de görülmektedir (Karam, 2016).

Tablo 2.1 Bakterilerin sınıflandırılma yöntemlerinde kullanılan bazı özellikler ve yöntemler (Karam, 2016).

Kategori	Özellikler
Morfoloji	Koloni morfolojisi, gram reaksiyonu, hücre boyutu ve şekli, sporların varlığı
Hareketlilik	Hareketsiz, kayma hareketliliği, kamçı hareketliliği
Metabolizma (Besin)	Karbon, nitrojen veya kükürt bileşiklerinin kullanımı; şekerlerin fermentasyonu, nitrojen fiksasyonu, büyüme faktörü gereksinimleri
Fizyoloji	Sıcaklık, pH ve tuz aralıkları; oksijene tepki (aerobik, fakültatif, anaerobik), katalaz veya oksidaz varlığı, hücre dışı enzimlerin üretimi
Biyokimya	Yağ asitleri, RNA molekülleri, hücre duvarı, pigmentler, biyokimyasal test
Genetik	DNA baz dizisi ve yüzdesi, DNA hibridizasyonu
Diğer özellikler	Antibiyotik duyarlılığı, serotip; bileşiklerin üretimi, örneğin, antibiyotikler

2.2.1.1 Bakterilerin morfolojik tanımlanması

Organizmaların tanımlanması ve sınıflandırılması, bilim adamlarının önde gelen çalışmaları arasında olmuştur. Bitkileri ve hayvanları tanımlamak için fazlasıyla morfolojik özelliklere sahip olsalar da bakterileri tanımlayan morfolojik özellikler az ve sınırlayıcıdır. Gram boyama, Hans Christian Joachim Gram (1850-1938) tarafından bakterileri hücre duvarlarının yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmasının bir sonucudur. Bu, bakterilerin gram boyama ile gram negatif veya gram pozitif olarak farklı şekilde sınıflandırılabilceği anlamına gelmektedir. Günümüzde hala tanımlama ve sınıflandırma için kullanılmaktadır. Her ne kadar bazı morfolojik özellikler ve bu özelliklerde çok değişiklik olsa da, morfolojiye dayalı önemli taksonomik değere sahiptir. Farklı türler çok farklı koloniler sergileyebildiğinden, özelliklerini tanımlamak için bir başka yöntem daha bulunmuştur (Christopher ve Bruno, 2003). Herhangi bir koloninin kendine özgü özellikleri bir bakteri türünün tanımlanmasında yardımcı olabilmektedir. Katı agar üzerinde kolonilerin karakteristiği küçük, orta, büyük koloni (genişlik),şekil (yuvarlak, düzensiz ya da rhizoid), boyutu (düz, dalgalı, sert, taneli, papillate) yüzey, yükseklik (dışbükey, içbükey, umbilicate), margin

(dalga, ciliate veya kıvrık), yapı/- (opak, yarı saydam / şeffaf) opaklık, renk artışı (pigmentasyon sarı, yeşil) ve derece (yetersiz, orta ya da bol) içermektedir. En yaygın bakteri şekilleri kok (yuvarlak), basil (çubuk) ve spirilla (spiral) şeklindedir. Gram boyama bakteri morfolojileri tanımlamada genellikle ilk adım olarak kullanılmaktadır. Bakteri kolonilerini ve morfolojilerini tanımlamak için ışık mikroskobu kullanılmaktadır (Tshikhudo vd., 2013). Morfolojik tanımlama ile Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve in situ hibridizasyon (ISH) teknikleriyle (SEM-ISH), rRNA hedefli oligonükleotit problemleri ile in situ hibridizasyon kullanılması tanınacak bakteri türleri hakkında filogenetik ve morfolojik bilginin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Kenzaka ve Tani, 2012).

2.2.1.2 Fizyolojik özellikler

Bakterilerin fizyolojik özellikleri türlerine göre farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle üreme sıcaklığı, kuluçka süresi, oksijen ihtiyacı, ortamın bileşimi ve diğer fizyolojik özelliklerin araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir (Acer, 2014).

2.2.1.3 Biyokimyasal özellikler

Canlı organizmaların biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi anlamına gelen biyokimya David (2000) mikroorganizmaların biyokimyasal aktivitesinin belirlenmesinde katalaz, nişasta, üre, jelatin, nitrat, oksidaz ve nitrit redüksiyonu yanı sıra karbonhidrat kullanım testi gibi farklı testler mikroorganizma türüne göre seçilerek kullanılmaktadır (Acer, 2014).

2.2.2 Genotipik yöntemler

Morfolojik ve fizyolojik testler tür tanımlanmasında yalnız yeterli değildir. Bakteri sınıflandırılırken kullanılan metotlar (fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal) uzun, zor, zahmetli olduğu için farklı yeni metotlar geliştirilmek için çalışma yapılmıştır (Gül-Güven, 2007). Tek hücre morfolojisinin veya koloni özelliklerinin gözlemine kullanan geleneksel yöntemler, bakteri türlerinin tanımlanması için güvenilir parametreler olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, bu geleneksel tekniklerin bazı dezavantajları vardır. İlk olarak, zaman alıcı ve zahmetli olmasıdır. İkincisi, farklı çevresel koşullar nedeniyle kültürün değişkenliği belirsiz sonuçlara yol açabilmektedir. Üçüncüsü, tanımlamayı gerçekleştirmek için saf bir kültür gereklidir, bu da kültüre alınamayan bakterilerin tanımlanmasını zor ve bazen imkânsız hale getirmektedir. Bu sorunlardan kaçınmak için bakterileri hızlı ve güvenilir bir şekilde

tanımlayan daha yeni ve otomatik yöntemler dünya çapında birçok laboratuvar tarafından benimsenmiştir. Bu yöntemlerden biri, 16S rRNA geninin analizidir. Bu analiz saf kültür gerektirmemektedir (Tshikhudo vd., 2013). Tshikhudo vd., (2013) tarafından Metagenomik kavramı kullanılarak, bir ortamda, bitkilerde veya hayvan konaklarında yaşayan konsorsiyum halinde karışık tüm mikrobiyal populasyonlar kültüre alınmadan toplu genom setleri bağımsız analiz edilebilmektedir. Genomların karşılaştırmalı analizi, bakteri türlerini birbirinden ayırmak ve tanımlamak için çeşitli özellikler sağlar. Genotipik analizi, 16S rRNA gibi korunmuş genlerin dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu vb. DNA düzeyinde sağladığı faydalar nedeniyle mikrobiyal taksonomide özel bir uygulamaya sahip olmuştur ve mikrobiyal taksonomide DNA analizi yaygın kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

2.2.2.1 16S rRNA analizi

Ribozomal RNA genleri, protein sentez mekanizmasının önemli bir parçasıdır. 16S rRNA, RNA'nın küçük ribozomal alt biriminin (30S Ribozomal alt birimi) bir bileşenidir ve bazen SSU rRNA olarak adlandırılır. Tüm bakterilerin 16S rRNA'sının %98'i aynı tür için benzerdir (Woese, 1987; Glazer ve Nikaido, 2007). 1970'lerin başında Carl Woese, karşılaştırma yapmak için rRNA'yı kullanmıştır. rRNA'nın her canlıda aynı işlevi görüyor olması ve daha da önemlisi, rRNA dizisi evrim sürecinde son derece yavaş değişmiş olmasıdır. Bu kritere göre, rRNA genlerinin analizi ribozomal RNA genlerinin evrimsel olarak korunmasından dolayı bakteri türlerinin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında uygun bir araçtır. Ancak taksonları ayırt etmek için yeterli varyasyona sahip değildir (Woese, 1987).

Prokaryotlarda, rRNA genleri bir genomda üç veya dört kopya halinde bulunmaktadır (Glazer ve Nikaido, 2007; Tshikhudo vd., 2013). 16S rRNA geninin, yaklaşık 1.500 bp (baz çifti) uzunluğu biyoinformatik analiz için yeterlidir (Janda ve Abbott, 2007). 16S rRNA geninin analizi, DNA izolasyonu, genin primerler aracılığıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonundan sonra elde edilen PCR ürünlerinin gen diziliminin belirlenmesini içermektedir. Bu gen dizisinin, çeşitli DNA veri tabanlarından elde edilen önceden toplanmış 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırması yapılır. Yapılan analiz sonucunda, hangi seviyelerde eşleşmeler olduğu, bu eşleşen veya eşleşmeyen oranlar üzerinden analiz edilen türün yeni bir tür olup olmadığı belirlenir (Tshikhudo vd., 2013). 16S rRNA gen dizisi, bakteri türlerini tanımlamak ve

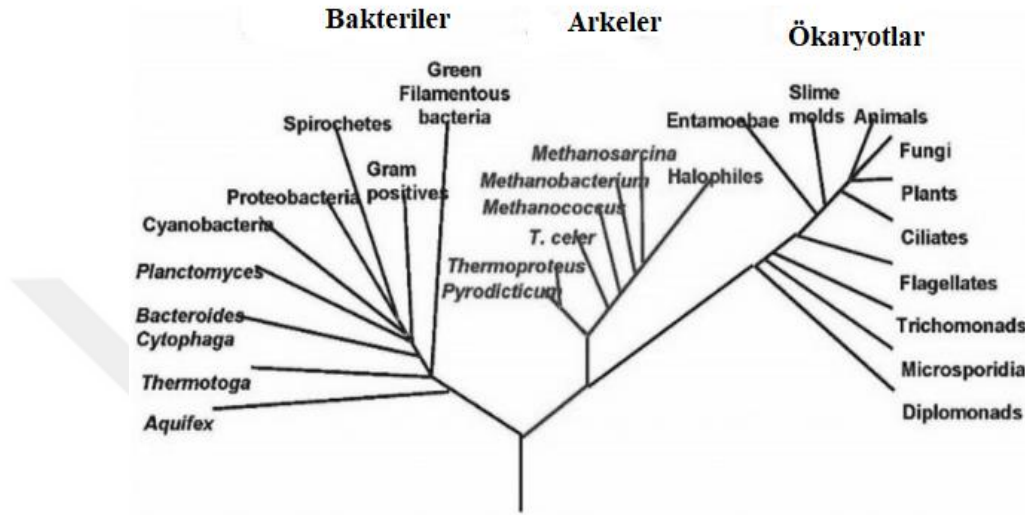
aralarındaki filogenetik ilişkileri bulmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Murat vd., 2010). Tüm bakteri türlerinin 16S rRNA genini içerdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, türleri tanımlamak için yararlı olan değişken bölgelerin yanı sıra ortak primerler tasarlamak için oldukça korunmuş bir alana sahiptir. Bu nedenle, bakteriyel tanımlama için 16S rRNA geni en geniş kabul gören gen olarak kabul edilmektedir (Tshikhudo vd., 2013).

Türlerin kesin olarak tanımlanmasında genelde DNA-DNA hibridizasyonu önerilmektedir (Busse vd., 1996). DNA-DNA Hibridizasyonu, iki organizma aşırı derecede benzer gen içerdiğinde, çok yakın bakteri türlerini karşılaştırmak ve tanımlamak için kullanılır. DNA'larının, DNA dizilerindeki benzerliklerle hibritleşmesi gerekir. Buna göre DNA-DNA hibridizasyonu, küçük alt birim rRNA gen dizisinin bir tamamlayıcısı olarak organizmalar arasında ayırım yapmak için kullanılmaktadır (Glazer ve Nikaido, 2007; Madigan ve Martinko, 2010; De Oliveira vd., 2011). Son zamanlarda, DGGE (Denatüre Gradiyen Jel Elektroforezi), TGGE (Sıcaklık Gradiyen Jel Elektroforezi), T-RFLP (Terminal Restriksiyon Enzimiyle Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), RT-Q-PCR (Kantitatif real-time PCR), FISH (Floresan İn situ Hibridizasyonu), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve RFLP (Restriksiyon Enzimiyle Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) gibi birçok gelişmiş kültüre bağlı moleküler teknikler geliştirildi. Bu teknikler bakteri suşlarının izolasyonu ve tanımlanması için yararlıdır (Stancu, 2018).

2.3 Bakterilerin Sınıflandırılması

Organizmalar rRNA'nın genetik akrabalığına dayanarak, bakteri, arkea ve ökaryotlara ayrılmıştır (Şekil 2.1). Bu üç grubun birbirinden evrimleşmek yerine eski bir atadan ayrıldığına inanılmaktadır (Glazer ve Nikaido, 2007). 16S rRNA gen dizilimine göre 7000'den fazla bakteri ve arke türü bilinmektedir ve daha binlerce olabileceği düşünülmektedir. Yaklaşık 1,8 milyon tür adlandırılmış olup, çoğu henüz tanımlanmamıştır. Veri eksikliğinden dolayı onlarca yıllık çabaya ve çeşitli dallar üzerinde binlerce filogenetik çalışmaya rağmen, kapsamlı bir yaşam ağacından bahsedilmemektedir (Madigan ve Martinko, 2010; Hinchliff vd., 2015). Sınıflandırma organizmaların ya fenotipik benzerlik ya da evrimsel ilişki temelinde gruplara dâhil edilmek üzere aşamalı olarak düzenlenmesidir. Bir tür, çeşitli suşlardan oluşur ve benzer türler, cinslere göre düzenlenmektedir. Benzer cinsler familyalara, familyalar

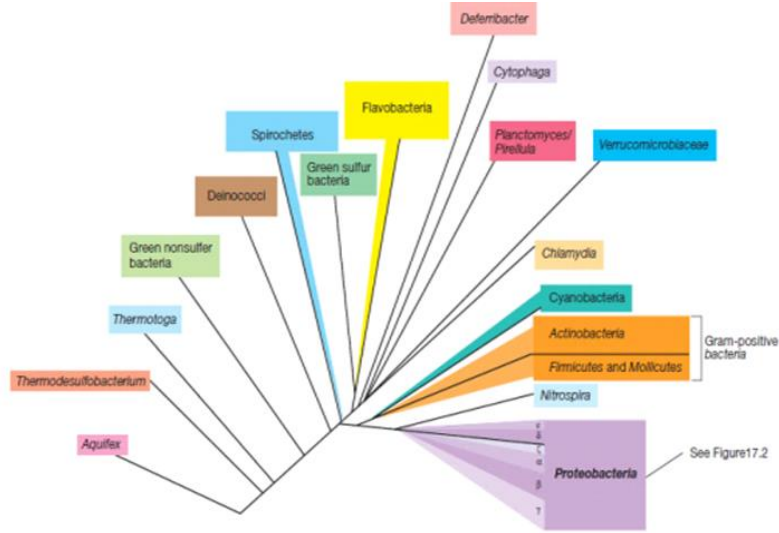
takımlara, takımlar sınıflara en üst düzey takson olarak sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırma İsveçli tıp doktoru ve botanikçi Carl Linnaeus tarafından geliştirilen iki terimli isimlendirme sistemidir. İsimler, genellikle organizmanın bazı temel özelliklerini temsil eden Latince veya Latince Yunanca kökenli ve italik olarak yazılmaktadır (Black, 1996; Madigan ve Martinko, 2010; Staton, 2015).



Şekil 2.1 Yaşamın filogenetik ağacı (Sarıçam ve Müştak, 2015)

2.3.1 Bakterilerin filogenetiğe dayalı sınıflandırılması

Ribozomal RNA (rRNA) genlerinin dizilenmesi ve analizi sonucunda bakterilere ait birçok grup tanımlanmıştır. 16S rRNA dizilerine dayalı olarak, laboratuvar kültürlerinin elde edildiği bakterilerin ana filumlarının filogenisinin özeti Şekil 2.2’de gösterilmiştir. *Firmicutes*, *Actinobacteria* olarak adlandırılan iki alt gruba ayrılabilen Gram pozitif bakteriler, kemoorganotrofik bakterilerin büyük bir grubunu teşkil eder (Manteca vd., 2006; Madigan ve Martinko, 2010). Siyanobakteriler, Gram-pozitif bakterilere yakın ilişkili oksijenik fototrofik bakterilerdir. *Proteobacteria* Şekil 2.2’de tüm bakteriler arasında en büyük grup ve metabolik olarak en çeşitli olanıdır (Madigan ve Martinko, 2010).

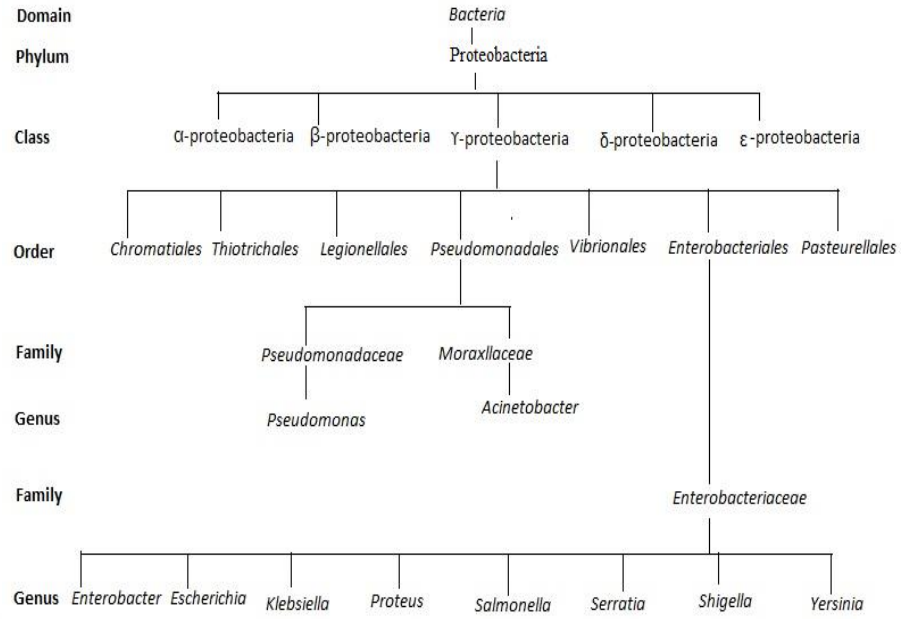


Şekil 2.2 Bakterilere ait filogenetik ağaç. (Bu ağaç 16S ribozomal RNA dizilerinden elde edilmiştir. Görüldüğü üzere en az 17 büyük bakteri grubu tanımlanabilmektedir. Ağaç ilgili veriler Ribozomal Database projesinden alınmıştır) (<http://rdp.cme.msu.edu/>)

2.3.2 Proteobakteriler

Proteobacteria, tüm bakteriler arasında en büyük ve metabolik olarak en farklı grubu oluşturur. *Proteobakteriler*, endüstriyel, tıbbi ve tarımsal önemi olan bakterilerin çoğunluğunu oluşturmaktadır. *Proteobakterilerin* tümü gram negatif bakterilerdir (Madigan ve Martinko, 2010). Bu grup içerisinde kemolitotrofik, kemoorganotrofik ve fototrofik türler olduğundan farklı çeşitlilikte enerji üreten mekanizmalara sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 2.2). *Proteobakterilerin* üyeleri arasında, oksijen (O_2) ile ilişkileri açısından, anaerobik, mikroaerofilik ve fakültatif aerobik olanları vardır. Morfolojik olarak, düz koklar, çubuklar, filamentli, spiral, tomurcuklanan ve eklenmiş formlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre şekilleri de gösterirler.

16S rRNA gen dizilerine göre filum *Proteobacteria* (Şekil 2.3), her biri birçok cins ve tür içeren *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* ve *Zetaproteobacteria* olmak üzere altı sınıfa ayrılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010). *Proteobakteriler*, gram-negatif bakterilerden oluşan bir gruptur. Bunlar, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Deftia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Vibrio* ve *Yersinia* gibi çok çeşitli patojenleri ve diğer önemli cinsleri içermektedir (Madigan ve Martinko, 2010).



Şekil 2.3 Taksonomide proteobacteria'ya ait hiyerarşik düzenleme (Karam, 2016)

2.3.2.1 *Pseudomonas* cinsi

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* familyasının Genus l'ine aittir. Beş cins *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Azorhizophilus* ve *Cellvibrio* bu familyaya aittir. Tüm cinsler aerobik, kemoorganotrofik metabolizma, fermentasyon yokluğu, fotosentez yokluğu ve çok çeşitli organik substratlarda büyüme gibi fizyolojik özelliklere sahiptir. Bu genel özelliklerin birkaç istisnası var, ancak fenotipik kriterler genellikle ailenin tüm üyeleri için ortaktır. 1900'de cinsin daha evrensel bir açıklaması (Migula, 1900), 75 türün incelenmesi ve daha önce *Bacterial aeruginosa* olarak tanımlanan *Pseudomonas aeruginosa*'nın cinsin bir türü olarak kaydedilmesidir (Moore vd., 2006). Yakın zamanda tanımlanmış olan 16 türden bazıları şunlardır: *Pseudomonas aestusnigri* (Gomila vd., 2017; Sánchez vd., 2014), *Pseudomonas salegens* (Amoozegar vd., 2014), *Pseudomonas oceani* (García-Valdés vd., 2018; Wang ve Sun, 2016), *Pseudomonas populi* (Anwar vd., 2016) ve *Pseudomonas saudimassiliensis* türleridir fakat henüz doğrulanmamıştır (Azhar vd., 2017). *Pseudomonas* cinsi, *Gammaproteobacteria* sınıfı içinde, polar flagella ile hareketli, spor oluşturmeyen hücre şekli çubuk olan gram negatif bakteri grubunu temsil etmektedir (Palleroni, 1984). *Pseudomonas* cinsinin gelişimi esnasında, yalnızca hücre morfolojisinin özelliklerine dayanan bir takson oluşturulmuştur (Moore vd., 2006). Bu bakteriler düz veya hafif bükülmüş çubuklarla 0,5-1,0 mikrometre çapında ve 1,5-5,0

mikrometre uzunluğundadır. Gram negatif, bir veya birden fazla polar flagella ile hareketlidirler, nadiren hareketsizdir. Endospor oluşumu birkaç türde görülür (Migula 1900; Moore vd., 2006). *Pseudomonas* türleri, farklı toprak, su ortamlarından hayvan ve bitki dokularına kadar her yerde bulunabildiklerinden dolayı çevre açısından zengindir (Moore vd., 2006; Silby vd., 2011). Özellikle bu türler için habitat sıcaklığı yaklaşık 4-42°C'dir. Mezofilik ve pH 'ları 4-8 arasında değişen değerlere sahiptir. Bu bakterilerin oksidaz pozitif veya negatif, katalaz pozitif'dir. Çeşitli organik (basit veya karmaşık) bileşikleri kullandıkları belirlenmiştir (Franzetti ve Scarpellini, 2007; Migula, 1900; Moore vd., 2006; Raaijmakers vd., 2010). *Pseudomonas* türlerinin bazıları aerobik, bazıları anaerobiktirler. Aşırı termofilik ve asidik habitatlarda bulunabilirler (Euzéby, 1997; Moore vd., 2006; Parte, 2014).

2.3.2.2 *Delftia* cinsi

Delftia cinsi, *Betaproteobacteria* sınıfının *Burkholderiales* takımı içinde *Comamonadaceae* familyasına aittir. Esas olarak filogenetik ve fenotipik analizleri nedeniyle *Comamonas acidovorans*'ın yeniden sınıflandırılmasından sonra 1999 yılında tanımlanmıştır (Wen vd.,1999). *Delftia*, yalnızca bilinen beş tür içeren bir cinstir: *Delftia tsuruhatensis* (Shigematsu vd., 2003), *Delftia acidovorans* (Wen vd., 1999), *Delftia litopenaei* (Chen vd., 2012), *Delftia lacustris* (Jørgensen vd., 2009), yakın zamanda *Delftia deserti* tanımlanmıştır (Li vd., 2015). *Delftia* cinsi, gram negatif, spor oluşturmeyen, aerobik, çubuklardan oluşur. Polar veya bipolar flagella ile hareketlidir (Sly vd., 2015; Wen vd.,1999). Çubuk şeklindeki bu bakteriler (genişlik 0,8-1,0 µm, uzunluk 2,1-2,5 µm), %1'lik NaCl, pH 6-10 (optimum pH 7) ve 4-30°C (optimum sıcaklık 28°C) arasındaki sıcaklıklarda çoğalır (Carro vd., 2017). *Delftia* cinsi heterotrofik olup çok yönlü metabolik yönleriyle bilinmektedir. Ayrıca, glikozu fermente etmeyen, oksidaz pozitif bakterilerdir (Braña vd., 2016). *Delftia spp.* tatlı ve deniz sularda, toprakta, rizosferde, bitkilerde, çamurda bulunan geniş dağılıma sahip çevresel açıdan önemli mikroorganizmalardır (Wen vd., 1999). *Delftia spp.* organik ve inorganik kirleticilerin biyoremediasyonunda ve endüstriyel olarak değerli bileşiklerin üretiminde önemli rollere sahiptir. *Delftia* cinsinin üyeleri, endüstriyel ve klinik uygulamalarla bazı enantiyomerik moleküllerin, polimerlerin ve nanopartiküllerin sentezinde kullanılmaktadır. *Delftia* cinsinin bakterileri, herbisitler ve metalik iyonlar gibi farklı organik ve inorganik bileşikleri dönüştürme, parçalama yetenekleri ile karakterize edilmiştir (Braña vd., 2016). Liu vd. (2002), tek karbon, nitrogen ve enerji

kaynakları olarak anilin veya asetanilid kullanan *Delftia* sp. AN3 olarak adlandırılan suşu aktif çamurdan izole etmişlerdir. Toprakdan izole edilen *D. tsuruhatensis* AD9'un benzer seviyelerde anilin parçaladığı rapor edilmiştir (Geng vd., 2009). Ayrıca, *D. lacustris* suşu LZ-C'nin, naftalini parçaladığı gösterilmiştir (Wu vd., 2016b).

2.3.2.3 *Acinetobacter* cinsi

Bu bakteriler taksonomik olarak: Bacteria, Şube-*Proteobacteria*, Sınıf-*Gammaproteobacteria*, Takım-*Pseudomonadales*, Familya-*Moraxellaceae*, Cins-*Acinetobacter* ve türler (*A. Haemolyticus*, *A. calcoaceticus* ve *A. baumannii* vb.) sınıflandırılmıştır (Doughari vd., 2011). Hücre şekli, flagella yokluğu, 16S rRNA analizi, DNA'nın G+C içeriği, DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak ve beslenme özellikleri kullanılarak yapılan son sınıflandırmalara dayanarak, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. Baumannii* ve *A. calcoaceticus* gibi 32 *Acinetobacter* türü tanımlanmış ve bunlardan 22 tür geçerli ve geri kalanlara numaralar verilmiştir. Genomik grup olarak belirlemişlerdir (Doughari vd., 2011). Son yapılan araştırmalarda *Acinetobacter* cinsi, <https://www.bacterio.net/acinetobacter.html>'de belirtildiği gibi 63 tür içerdiği belirlenmiştir. *Acinetobacter* spp'nin ilk suşu 1911 yılında Beijerinck'i topraktan izole edildikten sonra *Micrococcus calcoaceticus* olarak tanımlamıştır (Bouvet ve Joly-Guillo, 2000; Barbe vd., 2004). Bergey'in Bakteriyoloji El Kitabında bu bakterilerin tür olarak sadece *A. calcoaceticus* ve iki alt türü olan *A. anitratum*, *Acinetobacter lwoffii* Neisseriaceae familyasına yerleştirilmiştir (Barbe vd., 2004; Juni, 1984). Bouvet ve Grimont (1986), birkaç yıl sonra *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii* ve *Acinetobacter radioresistens* gibi on beşten fazla genomik tür tanımlanmıştır (Bouvet ve Grimont, 1986; Bouvet ve Joly-Guillou, 2000; De Bord, 1939). Bu bakterilerin cinsi hakkında çok az bilgi sahibi olunmuştur ve bir fazla çeşitli cins içinde (*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Diplococcus*, *Bacterium*, *Herellea*, *Lingelsheimia*, *Mima*, *Micrococcus*, *Moraxella* ve *Neisseria*) sınıflandırmıştır (Doughari vd., 2011). Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle bu organizmaların genetik yapısının daha çok anlaşılmasına, türlerin adlarının yıllar içinde önemli taksonomik değişikliklere uğramasına sebep olmuştur (Urban vd., 2003). Brisou ve Prevot (1954) *Acinetobacter* cinsi ilk olarak oluşturulmuş ve hareketli olan *Achromobacterae* ayrılmış, oksidaz-negatif, oksidaz-pozitif türlerini içeren

pigmentsiz gram-negatif saprofit bakterilerden oluştuğu düşünülmüştür (Doughari vd., 2011).

Acinetobacter sp. doğada genellikle insan, hayvan derisi yanı sıra üst solunum yolları toprakta atık su ve çamur hastanede her yerde bulunmaktadır (Nadhe vd., 2019). *Acinetobacter* spp, toprak, tortullar, okyanuslar, tatlı su ve kirlenmiş alanlar gibi çeşitli ortamlarda bulunması nedeniyle doğada önemli bir konuma sahiptir. *Acinetobacter* cinsinin türleri çok çeşitli doğal bileşikleri katabolize etmesine sağlayan çok yönlü metabolik özelliklere sahiptir, bu da ekosistemdeki besin döngüsüne aktif katılım anlamına gelir (Jung vd., 2015).

2.3.2.4 *Enterobacter* cinsi

Enterobacter cinsi, daha önce sırasıyla "Cloaca B" ve "Cloaca A" olarak da bilinen "*Aerobacter aerogenes*" ve "*Aerobacter cloacae*" olarak tanımlanan suşların sınıflandırılmasını çözmek için 1960 yılında oluşturulmuştur (Hormaeche ve Edwards, 1960). *E. cloacae* ilk olarak *Bacterium cloacae* ve *Cloaca cloacae* olarak adlandırılmış, ancak cins kurulduğunda *E. cloacae* olarak yeniden adlandırılmıştır (Gillespie ve Hawkey, 2006; Nishijima vd., 2007). Taksonomik olarak bu bakteriler Şube-Proteobacteria, Sınıf-Gammaproteobacteria, Takım-Enterobacteriales, Familya- Enterobacteriaceae, Cins-Enterobacter olarak sınıflandırılmıştır (Humann vd., 2011). *Enterobacter* cinsinin filogenetik analizleri, birkaç türden oluşan *E. cloacae* kompleksinin oluşumuyla sonuçlanmıştır. *E. cloacae* kompleksi, *E. ludwigii*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *E. nimipressuralis* ve *E. kobei* türlerini içerir (Hoffmann vd., 2005; Paauw vd., 2008). *Enterobacter*, Enterobacteriaceae familyasına ait, yaygın bir bakteri olan, fakültatif, aerob, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen gram-negatif bir cinstir. *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloacae* kompleksine ait Enterobacteriaceae familyasından gram-negatif bir bakteridir (Mezzatesta vd., 2012; Shaikhan vd., 2020). *Enterobacter*'in iki önemli bilinen türü *Enterobacter cloacae* ve *E. Aerogenes* klinik öneme sahip olan ve hastane patojenleri olarak patojenik yoğun bakım hastalarında ortaya çıkmaktadır (Mezzatesta vd., 2012). *Enterobacter*'in özellikleri *Klebsiella*'ya benzer ve hareketli ve belirli biyokimyasal reaksiyonlarla tanınabilir. Hareketlilik özellikleri, hareketli *E. cloacae*'yi hareketsiz *Klebsiella* sp.'den ayırt etmek için kullanılır. Biyokimyasal ve morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeleri güçtür (Muhialdin, 2014). *Enterobacter* türleri, su ve karasal ortamlarda (su, kanalizasyon, toprak ve gıda) yaşayan evrensel bakterilerdir

(Shaikhan vd., 2020). *E. ludwigii* sadece klinik örneklerden değil, aynı zamanda fermente sebzelerden de izole edilmiştir (Pau-Roblot vd., 2013). *E. cloacae* doğada her zaman mevcuttur ve soğan, zencefil, papaya gibi çeşitli bitkilerde birçok hastalığın nedeni olduğu bilinmektedir (Gillespie ve Hawkey, 2006; Nishijima vd., 2007). Ayrıca, *E. ludwigii* bitki rizosferinde bulunmuş, bazı suşların, bitki büyümesini teşvik eden ve biyolojik kontrol kapasiteleri olan Shoebitz vd (2009) ve hidrokarbon bozunumuna sahip bitki ile ilişkili bakteriler oldukları bulunmuştur (Yousaf vd., 2011).

2.4 Mikroorganizmaların Çevresel Rolü

Mikroorganizmalar metabolik yetenekleri nedeniyle, çeşitli çevre koşullarında kolaylıkla çoğalabilirler. Ayrıca besinsel çok yönlülüğe sahip olmaları sebebiyle çeşitli kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasında ve çevresel iyileştirmenin sağlanmasında kullanılırlar. Kirleticilerin biyolojik olarak parçalanması işlemine biyoremediasyon denir. Bu işlem, enerji ve biyokütle üretimi elde etmek için belirli mikroorganizmaların toksik kirleticileri dönüştürme, değiştirme ve kullanma yeteneklerine dayalı olarak gerçekleştirilir (Abatenh vd., 2017). Biyoremediasyon, kirleticileri toplamak ve depolamak yerine, kirleticileri parçalamak daha az toksik veya toksik olmayan element ve bileşik formlarına dönüştürmeyi esas alır. Bakteriler, arkeler ve mantarlar birincil biyoremediasyonlardır (Strong ve Burgess, 2008; Abatenh vd., 2017). Çevrede oluşan atıklar için en genel geçer çözüm, onları tekrar çevreye uygun bir şekilde geri entegre etmektir (Ezeonu vd., 2012). Entegrasyon işlemi genellikle mikroorganizmaların (mayalar, bakteriler veya mantarlar) kullanımını içerir. Mikroorganizmalar veya onların ürettikleri ürünler, biyomadencilik, biyodeterjan, kâğıt hamurunun biyolojik arıtımı, atıkların biyolojik arıtımı (biyoremediasyon), biyofiltreleme, su ürünleri yetiştiriciliği arıtımı, biyokatalizörler, biyokütle yakıt üretimi, biyolojik izleme gibi çok sayıda endüstriyel alanlarda kullanılır. Ayrıca, mikroorganizmalar, karbon ve nitrojen döngülerine katılırlar ve diğer organizmaların ölü kalıntılarını ve atık ürünlerini ayrıştırma yoluyla madde döngüsüne katılırlar (Adebayo ve Obiekezie, 2018). Biyoremediasyon işleminde, kirleticiler enerji veya karbon kaynağı amacıyla metabolize edilerek enzimatik bir şekilde parçalanır, bu nedenle birçok çevre sorunlarının çözümüne de katkı sunmuş olurlar. Bozulma hızını belirleyen biyotik ve abiyotik koşullar olmak üzere iki tür faktör vardır (Abatenh vd., 2017).

2.5 Ham Petrol Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılan Teknikler

Petrol hidrokarbonları, kimyasal yapı ve fiziksel özellikler bakımından geniş bir alanı kapsar. Petrol kirliliğinin giderilmesinde kullanılan teknikler biyolojik, kimyasal ve fiziksel teknikler olmak üzere üç grupta ele alınır (Sawadogo vd., 2014; Seyis, 2019). Bu teknikler içerisinde yaygın olarak kullanılan mekanik teknikler; toplama ve silme, suyla yıkama, toprak işleme ve yakmayı içerir (Yavari vd., 2015). Petrolün yerinde yakılması, bir su kütlesine veya karaya dökülen kalın petrol tabakasının hızla uzaklaştırılması için kullanılabilen alternatif bir yöntemdir. Ancak uygulanması ortamın durumuna göre sınırlıdır. Örneğin, iğne otları gibi bazı bitki toplulukları hassastır ve yangın nedeniyle zarar görebilir veya yok olabilir (Zengel vd., 2003). Petrol sızıntılarının mekanik olarak uzaklaştırılması, kirliliğin giderilmesinde genellikle başlangıç stratejisi olarak kullanılır. Ancak bu teknikler pahalı olup, özel ekipmana da ihtiyaç duyulabilir (Al-Majed vd., 2012). Bu dezavantajlar, araştırmacıları alternatif yöntem arayışına yönlendirmektedir.

2.5.1 Fiziksel ve kimyasal teknikler

Fiziksel teknikler ile kirliliğin giderilmesi, dökülen petrolün özellikle suda yayılmasını önlemek için farklı türden engellerin, inorganik emicilerin, sıyırıcıların ve katılaştırıcıların kullanımı ile olur. Kimyasal iyileştirme ise oksidasyon-indirgeme, kapsülleme, solvent ekstraksiyonu ve dağıtıcıların kullanımı içerir. Fiziksel ve kimyasal iyileştirme teknikleri in-situ veya ex-situ olarak uygulanabilir. Fiziksel ve kimyasal yöntemleri tercih edilir kılan en önemli özellik, hızlı olmasıdır. Bu sistemlerin başlıca dezavantajları, uygulamaların maliyeti olması ve olası ikincil kirleticilerin oluşumudur (Seyis, 2019). Sıyırıcılar, petrolün özelliklerinde herhangi bir değişiklik yaratmadan su yüzeyinden dökülen petrolü kurtarmak için kullanılır (Hammoud, 2001). Sıyırma işleminden sonra dökülen petrolün temizlenmesinde son bir adım olarak, yağın tamamen çıkarılması için sıvı yağı yarı katı faza dönüştürmek için doğal veya sentetik adsorbanlar kullanılır (Asghar vd., 2016). Termal işlem teknikleri, yakma, termal desorpsiyon ve mikrodalga frekanslı ısıtma örneklerini içerir. Termal işlem stratejileri hızlı ve basit uygulamalar olmakla birlikte, rüzgâr gibi çevresel faktörlerin dikkate alınmasını gerektirirler (Asghar vd., 2016; Rushton vd., 2007). Petrol kirliliğinin giderilmesi için dispersanların kullanımı, yağ damlacıklarının boyutunun küçültülmesi ve dağılımının artırılmasını kapsar (Federici ve Mint., 2014).

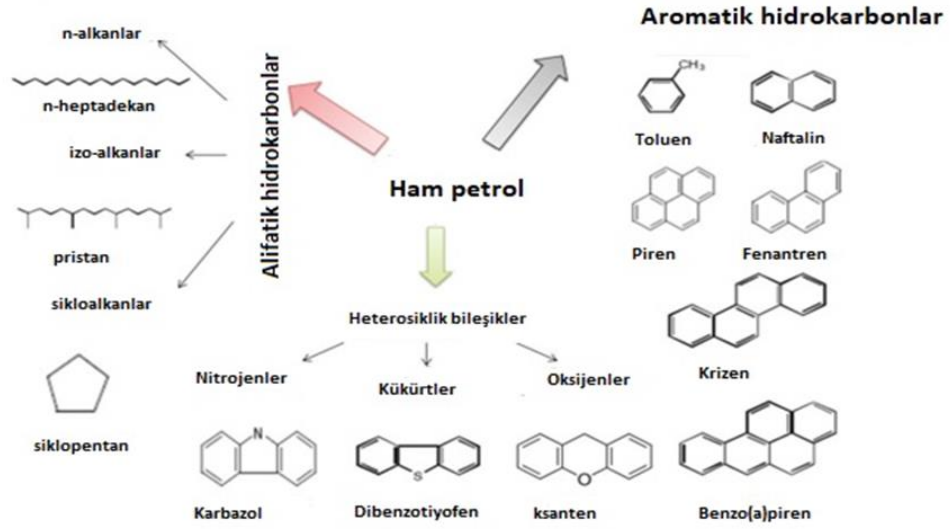
Petrol kirliliğinin giderilmesi için en hızlı yöntemlerden biri kimyasal oksidanların kullanılmasıdır. Fenton reaktifi, ozon, permanganat ve hidrojen peroksit genellikle oksitleyici olarak kullanılır. Kimyasal oksidasyon, kontamine olanın az olduğu ve kirleticili konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda tercih edilir (Seyis, 2019).

2.5.2 Biyolojik teknikler

Biyolojik arıtma, 1980'lerde geliştirilen ve kirleticileri uzaklaştırmak için mikroorganizmaların ve/veya bitkilerin doğal yeteneklerini kullanan bir başka temizleme tekniğidir (Balba vd., 1998; Díaz, 2010; Khan vd., 2013). Biyolojik teknikler, kirleticilerin çevre için daha az toksik olan başka forma parçalanması ve dönüştürmek için mikroorganizmaların ve enzimlerinin kullanılması esasına dayanır. Biyoremediasyon olarak bilinen bu dönüşümü bakterilerin, alglerin ve mantarların sergilediği keşfedilmiştir (Dua vd., 2002). Bitkilerin kirleticilerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılması fitoremediasyon olarak bilinir. (Sharma vd., 2018). Biyoremediasyon işleminin performansı, biyoyararlanım ve kirleticinin kimyası gibi faktörlere bağlıdır (Seyis 2019). Biyoremediasyon, uzun yıllardan beri çevre dostu ve düşük maliyetli (Perelo, 2010) olup, tehlikeli organik kirleticileri CO₂, CH₄, H₂O ve biyokütle gibi zararsız bileşiklere dönüştürür (Ron ve Rosenberg, 2014).

2.6 Petrol Hidrokarbonları

Ham petrol, karmaşık on binlerce hidrokarbonun (alifatikler ve aromatikler) ve hidrokarbon olmayanların (kükürt, nitrojen, oksijen ve çeşitli eser metaller içeren) karışımından oluşur. Petrolün bileşimi kökenlerine bağlı olarak değişir. Ayrıca aynı kaynakta zamana bağlı bir değişim de gözlemlenebilir. Genel olarak, farklı ham petrol bileşikleri Şekilde 2.4 görüldüğü gibi üç gruba ayrılabilir: alifatik hidrokarbonlar, aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik bileşikler (Mahjoubi vd., 2018).



Şekil 2.4 Farklı hidrokarbon sınıfları (Mahjoubi vd., 2018)

Petrol, antik bitki örtüsü ve hayvan kalıntıları üzerinde yüksek basınç ve sıcaklığın etkisiyle oluşan bir üründür. Bitki örtüsü ve jeolojik özellikler farklı yerlerde büyük ölçüde değişiklik gösterdiğinden, petrolün bileşimi de buna göre değişir (Viswanathan, 2017). Petrolün görünümü ve kimyasal bileşimi, farklı örnekler arasında büyük ölçüde değişir. Yaş, olgunluk, çökelme ortamı, rezervuarın derinliği gibi faktörler petrolün fizikokimyasal özelliklerini etkiler. Bu faktörlere bağlı olarak petrol numunesinin viskozitesi, yoğunluğu, kaynama noktası ve rengi değişirken petrolün temel element bileşimi sabit kalır (Seyis, 2019).

2.7 Petrol Hidrokarbon Analiz Teknikleri

Petrol kirliliğinin biyoremediasyonunda petrol hidrokarbonlarının bozunma oranlarını test etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Şu anda, petrol kirliliğinin içeriğindeki maddeleri belirlemek ve daha sonra bozunma oranını hesaplamak için ilk olarak spektrum, kromatografi ve diğer yöntemler kullanılır. En yaygın yöntemler Gaz kromatografisi-Kütle spektrometrisi (GC-MS) ve Gaz kromatografi-Alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) kullanılmaktadır (Wu vd., 2018).

2.8 Petrol Hidrokarbonlarının Biyodegradasyonu (Biyobozunması)

Mikrobiyal biyoremediasyon, karasal ve su ekosistemlerinde petrol hidrokarbon kirliliğinin giderilmesinde yaygın olarak kullanılan tekniktir. Gelişmiş sürdürülebilir bir çevre için mikroorganizmalar, ekosistem ve biyosferin korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Varjani, 2017). Ekosistemin biyolojik olarak iyileştirilmesinde,

yani kirleticilerin çevreden temizlenerek zararlı etkilerinin azaltılmasında kullanılmaktadır (Chandra vd., 2013; Varjani ve Upasani, 2016). Mikroorganizmaların hidrokarbon ile kirlenmiş olan toprak ve sudan giderimi bu nedenle doğada bulunan petrol ürünü hidrokarbonların kullanma/bozunma sürecine bağlıdır (Varjani, 2017). Biyobozunma işleminde mikroorganizmalar, hidrokarbon kirleticileri bozunuma uğratarak enerji kazanımını gerçekleştirirler. Bu enerjiyi metabolizmal süreçlerinde kullanırlarken bu esnada tüm hücresel yaşamın temel bir bileşeni olan “Karbon”u elde ederler. Sonuç olarak petrol hidrokarbonlarının biyolojik olarak parçalanmasının enerji eldesinde önemi oldukça büyüktür (Abbasian vd., 2015; Varjani, 2017). Bunu yanında bazı mikroorganizmalar alkanları ve/veya aromatikleri parçalama yeteneğine sahiptir (Boonchan vd., 2000; Rahman vd., 2003; Meckenstock vd., 2016; Varjani ve Upasani, 2016). Özellikle, petrolle kirlenmiş alanlardaki mikroorganizmalar o çevreye adapte olur ve bunun sonucunda sonraki nesillerde oluşan genetik mutasyonlar onları hidrokarbon bozundurucuları haline getirebilir (McDonald vd., 2006; Watkinson ve Morgan, 1990).

Atlas (1991), petrolle kirlenmemiş ekosistemlerdeki hidrokarbonu parçalayan mikroorganizmaların mikrobiyal topluluğun %0,1’ inden daha azını oluşturduğunu, ancak bu sayının petrol hidrokarbonu ile kirlenmiş ortamlarda toplam popülasyonun %1-10’una kadar yükselebileceğini göstermiştir. Ancak kirlenmiş ortamlarda genel mikrobiyal çeşitliliğin azaldığı da bildirilmiştir (Atlas, 1981; Aislabie vd., 2006). Bilimsel çalışmalar göstermektedir ki, hidrokarbon parçalayıcı mikroorganizmalar biyoremediasyon sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (McDonald vd., 2006; Varjani vd., 2015; Varjani ve Upasani, 2016). Bunu yanında bakteriler, mantarlar, algler gibi çeşitli mikroorganizmaların hidrokarbon gibi kirleticileri parçalama yetenekleri oldukları da bildirilmişlerdir (Hendrickx vd., 200; Boonchan vd., 2000; 6; Wilkes vd., 2016; Varjani ve Upasani, 2013). Bakterilerin, petrol kirleticilerin parçalanmasında birincil bozundurucular olarak aktif ajan oldukları rapor edilmiştir (Atlas, 1981; Abbasian vd., 2015; Meckenstock vd., 2016; Varjani ve Upasani, 2012). Bazı mikroorganizmalar alifatik maddeleri parçalama yeteneğine sahiptir; bazıları monoaromatikleri veya poliaromatikleri parçalayabilirken diğerleri reçineleri parçalayabilir. *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Cellulomonas*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*,

Ochrobactrum, *Vibrio*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomaonas* ve cinslerinin üyeleri hidrokarbon bozundurucuları olarak rapor edilmiştir (Chandra vd., 2013; Mittal ve Singh, 2009; Foght, 2008; Widdel ve Rabus, 2001; Varjani vd., 2015; Varjani ve Upasani, 2016). Ayrıca, *Aspergillus*, *Amorphoteca*, *Graphium*, *Fusarium*, *Neosartoria*, *Sporobolomyces*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces* cinslerine ait mantarlar ve *Candida*, *Pichia*, *Pseudozyma* *Rhodotorula* ve *Yarrowia* cinslerine ait mayalar da petrol hidrokarbon kirleticilerin bozunmasında önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir (Atlas, 1981; Boonchan vd., 2000; Leahy ve Colwell, 1990; Sajna vd., 2015; Wilkes vd., 2016).

2.9 Petrol ve Türevlerinin Metabolik Bozunma Mekanizmaları

Petrol hidrokarbonları bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından çeşitli bozunma oranlarıyla aerobik veya anaerobik olarak biyolojik bozunmaya uğrar. Oksijen varlığında veya yokluğunda farklı ve geniş metabolik sınırlar gösteren karışım halinde bakteri popülasyonlarının varlığı, örneğin topraktaki, tatlı sudaki ve deniz ortamındaki karmaşık petrol hidrokarbon karışımlarının bozunması için temel öneme sahiptir. Çeşitli araştırmalarda, petrol hidrokarbon bozunma kapasitesinin mikrobiyal bozundurucu popülasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mahmoud ve Bagy, 2018). Mikrobiyal yolla hidrokarbonların biyolojik bozunması, farklı enzimler (Abbasian vd., 2015; Varjani ve Upasani, 2017), dehidrojenazlar (Varjani, 2017), sitokrom P450, peroksidazlar, lakkazlar (Kadri vd., 2017) ve oksijenazlar (Fuchs vd., 2011) tarafından katalize edilen bir seri metabolik reaksiyonlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu organik kirleticilerin katabolizması hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında meydana gelebilir (Ghosal vd., 2016). Ancak anaerobik bozunma süreçlerinin (genler ve enzimler) tam olarak anlaşılması için tamamlayıcı bilgilere ihtiyaç vardır (Varjani ve Upasani, 2017).

2.9.1 Aerobik bozunmada enzimler ve fonksiyonel genler

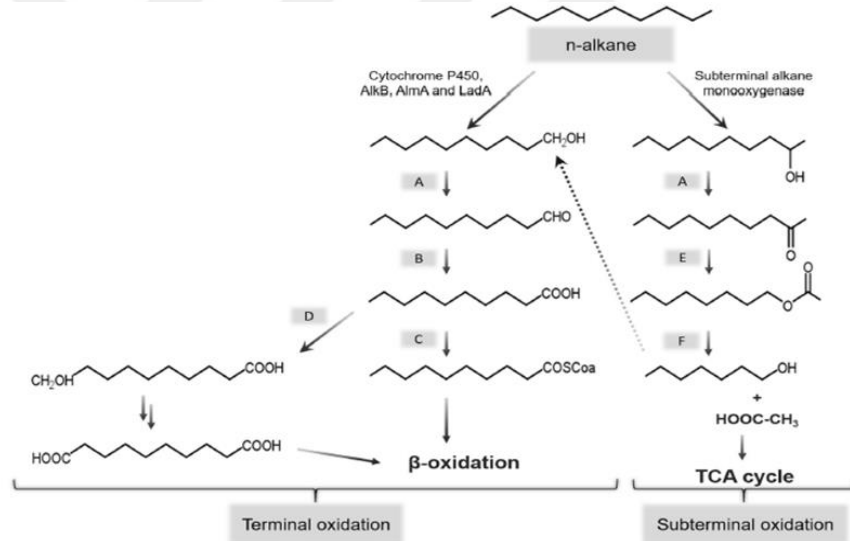
Aerobik bakteriler, hidrokarbonlara sırasıyla bir veya iki oksijen atomu eklemek için monooksijenaz ve dioksijenaz enzimlerini kullanır (Abbasian vd., 2015). Aerobik alkan bozunması, bakteriler, filamentli mantarlar ve mayalar dâhil olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından gerçekleştirilir (Wang ve Shao, 2013). Bu yolda mikroorganizmalar, alkan oksidasyonunun ilk adımında yer alan alkan hidroksilazlar/alkan monooksijenazları üretir (Wentzel vd., 2007). Monooksijenazlar,

elektron taşıma sistemlerine ve moleküler yapılarına göre rubredoksin bağımlı enzimler (2FeO içeren) veya sitokrom P450 içeren monooksijenazlar olarak sınıflandırılır (Rojo, 2009; Ji vd., 2013). Rubredoksin bağımlı enzimler, alkan hidroksilaz (AlkB), rubredoksin (AlkG) ve rubredoksin redüktaz (AlkT) tarafından oluşturulan bir enzim kompleksinden oluşur (Abbasian vd., 2016; Ji vd., 2013). AlkB enzimlerine ek olarak, uzun zincirli alkanların asimilasyonunda monooksijenaz (LadA) ve flavin bağlayıcı monooksijenaz (AlmA) gibi iki monooksijenazın da yer aldığı rapor edilmiştir (Li vd., 2020a, 2020b; Wang ve Shao, 2014).

Alkan bozunması genellikle bileşiğin terminal ucunda bir oksidasyon ile başlar. Hidrokarbon üzerinde bir alkol molekülüne dönüştürülen metil grubu, β -oksidasyon yoluna girebilen bir yağ asidine oksitlenir (Şekil 2.5) (Cabral vd., 2022). Bununla birlikte, bazı durumlarda, üretilen yağ asidi, terminal metil grubunda (ω -pozisyonu) ω -hidroksilasyona uğrayabilir ve daha sonra bir dikarboksilik aside dönüştürülen bir ω -hidroksi yağ asidi üretebilir ve sonrasında β -oksidasyon sürecine girebilir (Ji vd., 2013). Subterminal oksidasyon yolu olarak bilinen bir yol da rapor edilmiştir. Bu yol, bir ketona dönüştürülen ve daha sonra bir ester oluşturmak üzere Baeyer-Villiger monooksijenaz tarafından oksitlenen ikincil alkol üretir. Daha sonra ester, alkol ve yağ asidi oluşumu ile sonuçlanan bir esteraz tarafından hidrolize edilir (Rojo, 2009; Van Beilen vd., 2003) (Şekil 2.5). AlkB geni, farklı numunelerde (petrol sızıntısı, tortular, su sütunu ve toprak) işlevsel bir biyobelirteç geni olarak başarıyla kullanılmıştır ve araştırmacıların mikrobiyal bozunmayı belirlemelerine yardımcı olmuştur (Cabral vd., 2022).

AlkB geninin varlığı *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Burkholderia*, *Rhodobacter*, *Legionella*, *Frankia*, *Acinetobacter* ve *Marinobacter* türlerine ait genomlarda bulunmuştur (Cabral vd., 2022; Nie vd., 2014b). AlmA geni, flavin bağlayıcı ailenin varsayılan monooksijenazını kodlar. Bu enzim, uzun zincirli alkanların metabolizmasına katılır (Wang ve Shao, 2012b) ve *Alcanivorax* (Wang ve Shao, 2014; Zadjelovic vd., 2020), *Acinetobacter* (Throne-Holst vd., 2007) ve *Pseudomonas* (Li vd., 2020a, 2020b) dahil olmak üzere petrolle kirlenmiş bölgelerde yaygın olarak bulunan bakteri cinslerinin türlerinde tanımlanmıştır. Sitokrom P450 enzimleri hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunabilen monooksijenazlardır (Cabral vd., 2022). Sitokrom P450 monooksijenazları çok yönlü proteinler olup, esnek

tanıma bölgeleri nedeniyle çok çeşitli substratları kabul edebilir (Luo vd., 2016). Aromatik bileşiklerin metabolizmasında sitokrom P450'nin önde gelen rolü, bu bileşiklerin hidroksilasyonunu sağlamak ve molekülün çözünürlüğünü artırmaktır (Khmelevtsova vd., 2017). Petrolle kirlenmiş ortamlarda bol miktarda bulunan *Acinetobacter* (Maier vd., 2001) de dahil olmak üzere birçok bakteri, C5-C10 n-alkanları parçalamak için sitokrom P450 (CYP153A1) enzimlerini kullanır. Benzer enzimler, *Mycobacterium*, *Novosphingobium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, ve *Alcanivorax* gibi petrol ve türevlerini parçalayabilen bakteri cinslerinde de tespit edilmiştir (Ghosal vd., 2016; Nie vd., 2014a, 2014b; Scheps vd., 2011; Wang vd., 2010a; Xu vd., 2018). Dioksijenazlar, hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda aerobik aromatik hidrokarbon metabolizmasında önemli bir işleve sahiptir (Sharma vd., 2020). Bu enzimler, reaksiyon ürünlerine moleküler oksijeni (O_2) dâhil eder (Varjani ve Upasani, 2017).



Şekil 2.5 Terminal ve subterminal oksidasyon yoluyla n-alkanların bozunması için aerobik yollar (Alkol dehidrojenaz (A); aldehit dehidrojenaz (B), acil-CoA sentetaz (C); ω -hidroksilaz (D); Baeyer-Villiger monooksijenaz (E); esteraz (F) (Rojo, 2009; Cabral vd., 2022)

2.9.2 Anaerobik bozunmada enzimler ve fonksiyonel genler

Hidrokarbonların anaerobik katabolizması, esas olarak indirgemeye dayalı aerobik katabolizmadan farklı bir yaklaşıma sahiptir (Ghosal vd., 2016). Farklı elektron alıcıları manganiz $[Mn(IV)]$, nitrat (NO_3^-), sülfat (SO_4^{2-}), ferrik demir $[Fe(III)]$ ve karbon dioksit (CO_2) kullanılmasıdır (Callaghan, 2013). Anaerobik hidrokarbon bozunmasında fumarat, karboksilasyon, hidroksilasyon (Callaghan, 2013), metilasyon (Nzila, 2018) ve ters metanojenez dahil olmak üzere farklı mekanizmalar rol

oynamaktadır (Cabral vd., 2022). Bu reaksiyonlar, biyokütleye dahil edilen veya tamamen oksitlenen metabolitlerle sonuçlanır (Varjani ve Upasani, 2017).



2.10 Konu Kapsamıyla İlgili Literatürün Özeti

Cormack ve Fraile (1997) *Acinetobacter* cinsine ait izole edilen *Acinetobacter* ADH-1 suşunun karbon kaynağı olarak ham petrol, hekzadekan ve dodekanı kullandığını tespit etmişlerdir.

Di Cello vd. (1997) 25 bakteri izole etmiş ve bunlardan *Acinetobacter venetianus* 'un yeni bir tür olduğunu bulmuşlardır. Bu türün n-alkanları (C10, C14 ve C20) karbon kaynağı olarak kullandığını belirlemişlerdir.

Razak vd. (1999) *Acinetobacter* sp. E11, olarak adlandırılan bakteriyi izole etmişlerdir. Bu bakterinin ham petrol ve uzun zincirli (pentadekan, hekzadekan ve dodekan) hidrokarbon bulunan ortamlarda ürediği, fakat kısa zincirli hidrokarbonların (hekzan ve pentan, heptan) olduğu ortamda üremediği görülmüştür. 15 günlük inkübasyon sonunda ham petrol hidrokarbonlarının %60'ından fazlasını parçaladığını tespit etmişlerdir.

Huy vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada; 4 tane bakteri izole etmişlerdir. Yaptıkları 16S rRNA dizi analizi sonucunda birinin *Acinetobacter* sp. ve diğer üçünün de *Pseudomonas* sp. üyesi olduğunu tanımlamışlardır. *Acinetobacter* sp. suşunun %5 ham petrolü 1 gün inkübasyon sonucunda %95 oranda parçalayabildiğini bulmuşlardır.

Samanta vd. (1999) izole ettikleri suşların çeşitli (PAH)'ları enerji ve karbon kaynağı olarak kullandığını belirledikten sonra, morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda bu suşların *A. sulphureus* ve *Brevibacterium* sp. üyesi olduklarını tespit etmişlerdir.

Yuste vd. (2000), petrolle kirletilmiş alandan izole edilen suşun gram-negatif kok/çubuk şeklinde olduğu bulmuşlardır. 16S rRNA dizi analiz sonucuna göre *Acinetobacter calcoaceticus* türü olduğunu tespit edilmiştir. Analiz sonucuna göre tanımlanan bakteri C10-C34 aralığındaki düz zincirli alkanları parçaladığı belirlenmiştir.

Al-Sharidah vd. (2000) iki tane *Bacillus* türü izole etmişlerdir. Bakterilerin en iyi büyüme 37°C'de nötr pH'da ve NaCl konsantrasyonlarda gerçekleştirdiklerini

gözlemlemişlerdir. Her iki suşun zorunlu aerobik ve tek karbon ve enerji kaynağı olarak dizel yakıt, n-dekan veya naftalin kullandıkları tespit edilmiştir. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri yanı sıra 16S rRNA analizleri baz alınarak iki bakteri türünün de *Bacillus subtilis* üyesi olarak tanımlamışlardır.

Malatova (2005) 20 bakteri türü izole ederek, bütün suşların ham petrolü enerji ve karbon kaynağı olarak kullandığını ve bunlar arasında hidrokarbonları parçalayabilen bakteriler arasında *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas* sp.'yi tespit etmişlerdir.

Oboh vd. (2006) tarafından Nijerya'da petrolle kirlenmiş alandan 15 bakteri ve mantar türü izole edilmiştir. Baskın türler *Pseudomonas* ve *Aspergillus* cinslerine ait olup, bunlar arasında *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mellei* ve *Alcaligenes* sp. türlerinin naftalin, kerosene ve dizeli parçaladığını tespit etmişlerdir. Tüm izolatların hidrokarbonları tek karbon ve enerji kaynağı olarak eşit derecede iyi kullandıkları bulunmuştur.

Domínguez-Cuevas vd. (2006) *P. putida* mt-2 tarafından toluenin bozulması araştırılmıştır. Toluen (m-ksilen, p-ksilen) degradasyonu için gerekli enzimlerin, pWW0 plazmiti üzerindeki ksilen genleri tarafından oluşturulduğunu bulmuşlardır.

Throne-Holst vd. (2007) *Acinetobacter* varyetesinin n-alkanlar olan dekan ($C_{10}H_{22}$) ve tetrakontan ($C_{40}H_{82}$) aralıklarında karbon kaynağını kullanabildikleri belirlemişlerdir. Bu suşta AlkB-tipi alkan hidroksilaz homologları olan ve alkMa ve alkMb olarak adlandırılan iki genin C10-C20 zincir uzunluklarına sahip n-alkanların parçalanmasında rol oynadıkları tespit edilmiştir.

Urszula vd. (2009) yaptıkları çalışmada, gram-negatif olan *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 bakterisinin aromatik hidrokarbonları karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını belirlemişlerdir.

Zhang vd. (2011) tarafından, ham petrol, n-alkanlar ve PAH'ları parçalayabilen *Pseudomonas* DQ8 olarak adlandırılan bir izolat bulunmuştur. Bu izolatın, biyokimyasal ve genetik verilere dayanarak *Pseudomonas aeruginosa* türüne ait

olduğunu belirlemişlerdir. Ham petroldeki iki ana bileşen olan n-alkanlar ve PAH'ları her ikisini de *P. aeruginosa* DQ8 suşunun indirgediğini tespit etmişlerdir.

Wang vd. (2011) *Dietzia* sp. DQ12-45-1b suşunun n-alkanları (C6-C40) ve tek karbon kaynağı olarak diğer bileşikleri kullanabildiğini tespit etmişlerdir.

Hassanshahian vd. (2012) 25 adet ham petrol parçalayan bakteri izole etmişler, 16S rRNA geninin nükleotit sekansının belirlenmesi ile bu suşların, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Cobetia*, *Alcanivorax*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Microbacterium* ve *Marinobacter* cinslerine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Geetha vd. (2013) çeşitli hidrokarbon parçalayan 14 bakteri izole etmişler ve bunların dizel, benzin, toluen, naftalin gibi çeşitli hidrokarbonları parçaladığını bulmuşlardır. En iyi hidrokarbon ve dizel parçalayıcının gram-negatif bakteri (RP12 suşu) olduğunu belirlemişlerdir.

Erdoğan vd. (2013) tarafından 33 adet bakteri izole edilmiştir. Ham petrolü parçalama yeteneği en yüksek olan 6 bakteri suşunun *Pseudomonas aeruginosa* (2 suş), *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas putida* (2 suş), *Acinetobacter genomospecies* 'e ait oldukları bulunmuştur. 120 günlük inkübasyon sonucunda 6 bakteri suşunun %56 oranında ham petrolü ayrıştırdığını tespit etmişlerdir.

Hassanshahian vd. (2013), *Rhodococcus jostii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter piechaudii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aeruginosa* türlerini izole ettikleri çalışmada bakterilerin karbon ve enerji kaynağı olarak hekzadekanı kullandıkları ve 1 hafta inkübasyon sonucunda %2,5'lik hekzadekanı %50 oranda parçaladıklarını bulmuşlardır.

Panda vd. (2013) tarafından *Pseudomonas* sp. suşu %0,5 dizeli 20 günlük inkübasyon sonucunda %49.93 oranında parçaladığı tespit edilmiştir.

Acer (2016), *Acinetobacter* cinsine ait BT1A suşunu izole ettikleri çalışmada ham petrolü enerji ve karbon kaynağı olarak kullandığı ve uzun zincirli alkanları parçaladığını belirlemişlerdir. BT1A suşunun *Acinetobacter* cinsinin bir üyesi olduğunu ve *Acinetobacter baumannii* 'ye benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Mukherjee vd. (2016), petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *E. cloacae* suşu S1:CND1'in n-hekzan ve n-hekzadekan gibi alkanları, poliaromatik naftalini ve ayrıca dizel ve ham petrolü parçaladığını belirlemişlerdir.

Fuentes vd. (2016), *Pseudomonas* sp. suşunun oktan, naftalin, fenantren ve flordan'ı metabolize edebildiğini, ancak hekzadekan, siklohekzan, toluen ve antrasen üzerinde çoğalamadıklarını bulmuşlardır.

Chebby vd. (2017), *P. aeruginosa* W10 suşunun, büyüme substratları olarak hekzadekan, naftalin, fenantren, floranten ve piren'i kullandığını tespit etmişlerdir.

Zheng vd. (2018) bir petrol sahasında uzun süre petrole kirletilmiş toprakta bakteri topluluğu ve çeşitliliğini 16S rRNA dizi analizi ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, *Proteobacteria* (%49,11) ve *Actinobacteria* (%24,24)'nın en baskın, toprakta en çok rastlanan diğer cinslerin ise *Luteimonas* (%3,64), *Pseudoxanthomonas* (%8,47), *Acinetobacter* (%5,26), *Agromyces* (%8,56) *Alkanindiges* (%9,76) ve olduğunu göstermiştir. *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus* ve *Variovorax* cinslerine ait 9 izolatın biyoremediasyonda kullanılma potansiyeline sahip olduğu (C9-C30) gibi geniş aralıklarda uzun alkan karışımını güçlü bir şekilde parçalayabildiği gösterilmiştir.

Kumari vd. (2018) ise yaptıkları çalışmada *Pseudomonas mendocina*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Microbacterium esteraromaticum*'un ham petroldeki çoklu PAH'ları parçalayabildiklerini rapor etmişlerdir.

Kojouri ve Ardestani (2018), ham petrol parçalayan 9 farklı bakteri izole etmişlerdir. Tüm türler 28°C ve 35°C'de iyi çoğalırken, dört izolat *Pantoea* sp. SA1112, *Bacillus* sp. SA13, *Pseudomonas aeruginosa* sp. SA21 ve *Bacillus* sp. SA23 yaklaşık 42°C'ye kadar olan bir sıcaklıkta çoğaldıkları görülmüştür. Ham petrolü (%1 oranında) 7 günlük inkübasyonu sonucunda en yüksek parçalama yüzdeleri *Acinetobacter* sp. SA172 %86, *Pseudomonas* sp. SA75 %68 ve *Enterobacter* sp. SA711 %89 olarak belirlenmiştir.

Wang vd. (2019), *Acinetobacter pittii* H9-3 suşunun 21 günlük inkübasyonü sonucunda ham petrolü %36,8 oranında parçaladığını belirlemişlerdir.

Acer vd. (2020) yaptığı çalışmada, gram-negatif, aerobik, kokoid çubuklar, hareketsiz ve spor oluşturmeyan *Acinetobacter mesopotamicus* sp. nov suşu izole etmişlerdir. 7 günlük inkübasyondan sonucunda %1 ham petrolü ve n-alkanları (C11-C34) arasındaki %100'ünü bozduğu bulmuşlardır.

Lenchi vd. (2020), *Delftia* sp. NL1 suşu dizeli karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını bulmuşlardır. 7 günlük inkübasyon sonucunda dizeli %66.76'sından fazlasını parçaladığını bulmuşlardır.

Chaudhary vd. (2020) tarafından izole edilen *Acinetobacter* sp. K-6 suşunun dizel ve n-alkanları (C22, C20 ve C18) parçalama oranları araştırılmış, bu bakteri suşunun dizeli %59,2 ve C18-C22 hidrokarbonları ise %56,4 oranında parçaladığı bulunmuştur.

Medić vd. (2020), yaptıkları çalışmada alkalifilik ve metallotolerant bakteri *P. aeruginosa* 'nin etkili bir n-alkan ve PAH indirgeyici olduğunu kanıtlamıştır. 7 gün boyunca, her bir substratın (n-hekzadekan, n-nonadekan, floren, fenantren ve piren) biyolojik bozunmasının %41 ile %98'in aralığında olduğu bulunmuştur.

Jerin vd. (2021), yaptıkları çalışmada, *Acinetobacter baumannii*, %10 dizeli 21 gün inkübasyon sonucunda dizeli %61 oranında parçaladıklarını bulmuşlardır.

Cai vd. (2021), petrolle kirlenmiş alandan izole edilen *Acinetobacter* sp. SCYY-5 suşunun 10 günlük inkübasyon sonucunda (C9-C34) aralığındaki n-alkanları parçaladığını belirlemişlerdir.

Wei vd. (2021), petrolle kirlenmiş çamurdan üç petrol parçalayıcı suş elde edilmiş ve A4 (*Acinetobacter calcoaceticus*), A2 (*Pseudomonas putida*) ve L5 (*Sphingomonas* sp) olarak belirtilmiştir. Suşların ve bunların bakteriyel konsorsiyumunun (C) ham petrol üzerindeki bozunmalarını araştırmak için ham petrol bozunma deneyleri yapılmıştır. Deney sonucunda A2, A4, L5 ve C'nin petrol bozunma oranları, 28 günlük kültürasyondan sonra sırasıyla %42,8, %48,01, %26,56 ve %81,07 parçaladıklarını bulmuşlardır.

Bacosa vd. (2021), yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* sp. suşunun oktan, toluen, etilbenzen ve ksileni parçalayabildiği tespit etmişlerdir.

Allamin vd. (2021), *Enterobacter* sp. IAA-01 suşunun 21 günlük inkübasyon sonucunda (GC-MS) analizi sonucunda dizeli %78 oranında parçaladığını belirlemişlerdir.

En son yayınlanan bir makalede, tek karbon kaynağı olarak ham petrol üzerinde *P. aeruginosa* AQNU-1'in çoğaldığı, hidrokarbonların üç sınıfının hepsinde yüksek derecede bozunmanın gözlemlendiği gösterilmiştir: alkanlar (C13'ten C35'e doğrusal, ancak pristan ve fitan gibi dallı olmayan), monoaromatik (alkilbenzenler ve alkiltoluenler) ve PAH (C1-naftalenler, C4-naftalenler, C1-fenantrenler, asenafetilen, asenaften ve bifenil) (Liu vd., 2022).



3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan aletler

Çalışmada kullanılan aletler; hassas terazi (Daihan), manyetik karıştırıcı (Weightlab Instruments), çalkalamalı su banyosu (Mipro), pH metre (Hanna Instruments), spektrofotometre (Libra Biochrom), otoklav (Hirayama), otomatik pipetler (Eppendorf), steril kabin (Biobase), santrifüj (Nuve), vorteks (Grant-bio), thermal cycler (Bio-rad), görüntüleme (Daihan), inkübatör (Mipro), Mikrodalga fırın (Samsung) kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Çalışmada besiyeri hazırlamak için kullanılan kimyasallar; Nutrient Broth (NB) (Merck), Agar (Merck), Kalsiyum klorür (CaCl_2), Sodyum fosfat tamponu (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl), Magnezyum sülfat (MgSO_4), Ferrik klorür (FeCl_3), İz mineral element (MnSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), NaOH, Asetik asit, Brom fenol blue, Gliserol, Toluen, Dekan, Pentadekan, Hekzadekan ve Skualen (Sigma-Aldrich), Saf etil alkol, Antimikrobiyal diskleri (Bioanalyse) ve Qiagen jel ekstraksiyon kiti kullanıldı.

3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyeri bileşimleri

Sıvı besiyerinin bileşimi

Minimal besiyeri (BM)

5,0 mL Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0)

19,7 g/L K_2HPO_4 , 8,7 g/L KH_2PO_4 , 3,744 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g/L NH_4Cl

1,0 mL kalsiyum klorür çözeltisi (36,4 g/L CaCl_2),

3,0 mL magnezyum sülfat çözeltisi (22,5 g/L MgSO_4)

1,0 mL ferrik klorür çözeltisi (0.25 g/L FeCl_3)

1,0 mL iz mineral element çözeltisi (MnSO_4 (39,9 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (42,8 mg/L) ve $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (34,7 mg/L))

Sıvı ve Katı Nutrient Broth (Merck)

3.1.4 Örneklerin toplanması

Bu çalışmada kullanılan örnekler Güney Raman (Batman) bölgesinin 2 farklı petrole kirlenmiş istasyondan toplandı. Örnekler Güney Raman 1 ve 237 istasyonu kuyularının etrafındaki petrole kirlenmiş topraklardan Nisan 2018’de alındı. Önce petrole kirlenen topraktan yaklaşık 2 cm üst toprak alındı ve daha sonra belirli bir miktar kirlenmiş toprak steril spatula ile toplandı. Toprak örnekleri labaratuvara getirilene kadar 4°C’de soğuk koşullarda saklandı.



Şekil 3.1 Örneklerin alındığı petrol kuyusu ve çevresi

3.2 Metot

Çalışmamız 3 aşamadan oluşmaktadır.

- ✓ Bakteri izolasyonu ve tanımlanması
- ✓ Bakterilerin hidrokarbonları parçalaması ve kullanması
- ✓ Petrol parçalayan bakterilerin genleri üzerinde çalışmalar

3.2.1 Bakteri izolasyonu ve saf kültür üretimi

Batman'dan petrolle kirlenmiş alanlardan alınan toprak ve çamur örnekleri soğuk şartlar altında korunarak laboratuara getirildi. Steril ortamda sakalanan toprak ve çamur örnekleri birer gram olacak şekilde tartıldı. Ham petrolü içeren BM ortamına, tartılan örneklerin ekimi için hazırlandı. Bunun için ham petrol steril 0.2 µm por çapında filtrelerden geçirildi ve 121°C'de 21 dakika süreyle 3 kez steril edildi. Sonrasında BM'ye %1 olacak şekilde ham petrol eklendi. Petrolü parçalayan, enerji ve karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerin izolasyonu için tartılan toprak ve çamur örnekleri %1 ham petrol içeren besiyerlerine inoküle edildikten sonra ve 30°C'de 120 rpm'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamından 1 ml alındıktan sonra tekrar aynı ortama (%1 ham petrol+BM) aktarıldı. Bu işlem 3 kez daha tekrarlandı. 30°C'de 120 rpm'de 24 saat inkübasyon sonunda tek tek koloniler düşürmek için, alınan kültür örneklerinden 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltme işlemi yapılarak petri kutularında zenginleştirilmiş nutrient agar (NA) besiyerine ekim yapıldıktan sonra ve 30°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreci sonunda petrilere üreyen ve farklı görünümlü bakteri kolonilerinden tek koloni alındı ve çizgi ekim yapılarak saf kültür elde edildi.

3.2.2 Bakteri tanımlanması

3.2.2.1 Morfolojik testler

Koloni Morfolojisi

Seçilen izolatlara ait koloniler boyut, şekil, koloni çeperi, renk, yoğunluk ve ışık ve koloni görünümü fenotipik hücre morfolojisi incelenip karakterize edildi. Hücre morfolojik özellikleri ışık mikroskobu altında incelendi.

Hücre Morfolojisi

Dussault'a (1955) tarafından geliştirilen yönteme göre, gram boyama ışık mikroskobu altında inceleme yapıldı. Malaşit yeşil boyama ile sporları boyama mikroskopda incelendi.

Gram Boyama

Bakteriler katı besiyeri NB'da 24 saat üretildikten sonra öze ile koloni alınıp lamin kenarına serum fizyolojik damlatıldıktan sonra kolonilerin yayılması sağlandı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra, alevden geçirilerek tespit edildi. Daha sonra elde edilen preparatlar kristal viyole çözeltisinde 2 dakika (dk) bekletilme işlemi yapıldı ve su ile yıkanarak boyanması sağlandı. Lugol çözeltisinde 1 dk bekletildikten sonra preparatlar yıkandı ve kurutuldu. Deklorizasyonu sağlamak için %96 alkol de 15-20 sn. bekletildikten sonra tekrar su ile yıkanıp kurutuldu. En son işlem olarak sulu fuksinde 2 dk bekletildi ve tekrar su ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdıyla kurutuldu. İmmersiyon yağı kullanılarak mikroskopta inceleme yapıldı.

Spor boyama

Bakteriler katı NB besiyerine 30°C'de 24 saat inkübasyon edildi, 24 saat inkübasyondan sonra bakteri kültür iki gece +4°C'de bekletildi. Sonra temiz lamin kenarına su damlatılarak özeyele bakteri kolonisinde alınıp yayma yapıldı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra, alevden geçirilip tespit edildi. Bakterilerin yer aldığı preparatlara öncelikle karbol fuksin de 5 dk ısıtılıp boyandı. Yıkanan preparatlar daha sonra %10 nitrik asitde 10 sn. tutulup sonra suyla yıkandı. En son olarak metilen mavisinde 2 dakika boyanması sağlanan preparatlar mikroskop altında incelendi.

3.2.2.2 Fizyolojik testler

Optimum üreme şartlarının belirlenmesi

Optimum üreme şartları için 100 mL'lik erlenlerde 30 mL NB sıvı besiyerlerinde 20-45°C sıcaklık aralıklarında ve pH 4.0-12.0 aralıklarında bakteriler inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonunda 600 nm'de bakteri OD değerleri ölçüldü. Elde edilen veriler doğrultusunda optimum üreme sıcaklığı ve optimum pH değerleri tespit edildi. Bakterilerin uygun üreme zamanını belirlemek için optimum pH ve optimum üreme sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra, 4-72 saat aralıklarında 4 saat

aralıklarla örnekler spektrofotometre de üreme değerlerine bakıldı. Deneyler üç tekrar olarak yapıldı.

NaCl toleransı

Bakterilerin NaCl toleransını belirlemek için bakteriler ve kontrol için 30 mL NB sıvı besiyeriyle saf suyla hazırlandıktan sonra %0,5, %1, %2, %3, %5, %7, %10 konstrasyonlarda NaCl eklendi. Sonra hazırlanan besiyerlerine 1 ml inokulum ekildi ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 600 nm’de spektrofotometrede ölçülerek kontrolle karşılaştırıldı.

Hareketlilik ve oksijen gereksinimi

Bu testde, bakterilerin hareket yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılır. Öncelikle %0,4-0,5 berrak yarı-katı agar besiyerinin buyyon tüplerin içinde bulunan kapiler tüp besiyerine dökülür. Bakterilerin 24 saat’lik kültürlerinden tek koloni iğne öze ile alınıp kapiler tüpe daldırılarak ekim yapıldı. Ardından sonuca bakıldı.

3.2.2.3 Biyokimyasal testler

Nişasta hidrolizi testi

Bu testte, bir polisakkarid olan nişastanın bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstraselüler amilaz enzimi tarafından parçalayıp parçalamadığı tespit etmede kullanılır. Önce, petri kutularına %3’lük nişastalı agar (pH 7.0) döküldü. Katı besiyerinde üretilen bakteri kolonilerinden alınan bakteri kültürü ayrı ayrı çizgi ekim yapıldı. Bakteriler için optimum sıcaklık da 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra agarların üzerine 0,5 g I₂ ve 1g KI (150 mL) ile hazırlanan çözeltiden ilave edilerek reaksiyon 5 dk içinde değerlendirildi.

Katalaz testi

Mikroorganizmaların katalaz enzimini sentezleyebildikleri sentezleyemediklerini belirlemek için kullanılır. Bir günlük inkübasyon sonrası taze olarak hazırlan bakteri kültürlerine %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) yavaş yavaş ilave edildi. Sonra değerlendirme yapıldı.

Üreaz testi

Bu testte, mikroorganizmalar üreyi hidrolize eden üreaz enzimi sentezlediği ya da sentezlemediğini belirlemek için kullanılır. Bakterilerin cins ve tür tespitinde test

kullanılır. Öncelikle 2,4 g üre agar ve 2 g saf üre sırasıyla 95 mL ve 5 mL saf suda çözülmesi sağlandı. Daha sonra ise üre agar otoklavlandı ve 0,2 µm por çapındaki steril filtreden geçirilip saf üre ilave edildi. Bu test için üre agarlı besiyeri tüpler içinde yatık olarak hazırlandı. Taze olan bakterilerden besiyerine ekim yapıldıktan sonra 2-5 gün optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Sonra renginin değişip değişmediği gözlemlendi.

Sitrat testi

Bu testte, mikroorganizmaların bulunduğu besiyerine eklenen sitratı karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Bakterilerin cins ve tür tanımlanmasında kullanılmaktadır. Öncelikli olarak 2,25 g Simmons citrate agar 100 mL saf suda çözüldükten sonra otoklavlandı. Sonra tüpler yatık olacak şekilde besiyerinin katılaşması sağlandı. Daha sonra taze olarak hazırlanan bakteri kültüründen ekim yapıldıktan sonra 2-5 gün optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra renk değişimi olup oluşmadığı belirlendi.

İndol testi

Bu testte, mikroorganizmalar aminoasit olan triptofanı ayrıştırıp indol oluşturup oluşturmadığını tespit etmek amacıyla kullanılır. Bakterilerin cins ve tür ayırımında da kullanılır. Önce, 10 g/L tripton ve 5 g/L NaCl bulunan sıvı besiyeri 7-9 mL olacak şekilde tüplerde hazırlandıktan sonra, 24 saat'lik hazırlanan bakteri kültüründen 1 mL alınarak ekim yapıldı. Daha sonra optimum sıcaklıkta 1-5 gün inkübasyona bırakıldı. Kültürler üzerine 2,5 g para amino benzaldehit, 37,5 mL etil alkol, 12,5 mL HCl ve 0,5 mL eterden hazırlanan kovaks ayırıcından 0,5 mL eklendi.

Jelatin hidrolizasyon testi

Bu test, mikroorganizmaların jelatini hidrolizleyen jelatinaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini belirlemek için kullanılır. Öncelikle, %12 jelatin içeren besiyeri hazırlandıktan sonra taze kültürden mikroorganizma ekimi yapıldı. Besiyerleri her suş için optimum sıcaklıkta 10 gün kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kontrollerle beraber buzdolabında 1-2 saat bırakıldı. Erimenin olup olmadığı gözlemlendi.

Antibiyotik duyarlılık testi

Bakteri suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Antibiyotik multi diskler; Ampisilin (10µg), fusidik asit (10µg), novobiocin

(5µg), lincomycin (15µg), neomisin (10µg), kanamisin (5µg), kloramfenikol (30 µg), tilmicosin (15µg), nistatin (100 units), gentamisin (10µg), streptomisin (10µg), penisilin (2units), penisilin (10 units), basitrasin (10 units) ve tetrasiklin (30 µg) bakteri suşları petri kutularında NA üzerinde aşılıdıktan sonra üzerine antibiyotik diskler yerleştirildi. Agar plakaları, 30°C’de 48 saat süreyle bir inkübatöre yerleştirildi. İnkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar elde edildi.

3.2.2.4 16S rRNA gen analizi

Kromozomal DNA izolasyonu

D11 ve E2’den kromozomal DNA elde etmek amacıyla suşlar NB besiyerinde 30°C’de 120 rpm ‘de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürler 10000 rpm’de santrifüj edildi ve pelet kısımları kromozomal DNA izolasyonu için kullanıldı. Kromozomal DNA izolasyonu bakteriyal genomik DNA ekstrasyon kiti kullanılarak ilgili protokole göre yapıldı.

500 ml *A.pittii* D11 ve *A.calcoaceticus* E2 kültürü hazırlandı. 500 ml kültür 10 000 rpm’de 15 dk santrifüjlenerek peletteki hücreler toplandı.

1. Pelet 100 µL TE Buffer tamponuyla yıkandı, 50 mL Falcon tüplere süspanse hücreler transfer edildi. Daha sonra 10000 rpm’de santrifüj edildi.
2. Pelete 10 µL elüsyon tamponu (Lizozim) eklendikten sonra 37°C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. 100 µL buffer tamponu ve 20 µL proteinaz K eklendi. Dikkatli bir şekilde karıştırılarak 55°C’de 1 saat inkübeye bırakılarak, her 20-30 dk çıkarılarak vortex yapıldı.
4. 5 µL RNase eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
5. Pelet 2 dk 10,000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, süpertant kısmı yeni mikrosantifuj tüpüne aktarıldı.
6. 220 µL buffer eklenip vortex yapıldı. 65°C’de 10 dk inkübasyon edildi.
7. 220 µL %100 etanol eklenip vortex yapıldı.
8. 2 mL bir toplama tüpüne Hibind DNA mini kolonu yerleştirildi. Tüm numuneyi Hibind DNA mini kolonuna aktarıldı.
9. 1 dk 10000 rpm’ de santrifüj edilerek filtreli tüplere alındı.
10. Hibind DNA mini sütununu yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi.

11. 500 µL HBC buffer tamponu ve %100 izopropanol ile seyreltilmiş eklendi ve 1 dk 10,000 rpm’de santrifüj edildi.
12. 700 µL DNA yıkama buffer tamponu ve %100 etanol eklendi. 1 dk boyunca 100.000 rpm’de santrifüj edildi.
13. İkinci bir DNA yıkama tamponu yıkama adımı için 12. adım tekrarlandı.
14. Kolonu kurutmak için boş Hibind DNA mini kolonunu maksimum hızda ($\geq 10.000 \times g$) 2 dakika santrifüjlendi.
15. Hibind DNA mini kolonunu yeni bir nükleaz içermeyen 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
16. 50-100 µL 65°C’de ısıtılmış elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 3-5 dk bekletildi. DNA ayırmak için 1 dk 10000 rpm’de santrifüj edildi.
17. İkinci bir elüsyon adımı için 16. adımı tekrarlandı.
18. Ayırıştırılmış DNA’yı -20°C’de saklandı.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA konsantrasyonunu hesaplamak ve saflığının kontrol etmek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için, DNA örneği 100X seyreltilerek (990 µL Milli Q su ve 10 µL DNA örneği) kullanıldı, spektrofotometrede kör olarak 10 mL TE tamponu ve 990 mL Milli Q su karışımı kullanıldı. 260 nm ve 280 nm’de kör ve DNA örneklerinin absorbansları ayrı ayrı olarak ölçüldü. DNA’nın saflığını kontrol etmek için %1 agaroz jel elektroforezde yürütülüp, Ek 3’deki çözeltiler kullanılarak analiz edildi.

Agaroz jel elektroforezi

Belirlenen hacimde gerekli miktarda saf agaroz tartılıp erlen mayer içine koyulup üzerine hesaplanan hacimde 1X TAE (Tris-EDTA-Asetik asit) tamponu (Ek 3.1) ilave edildi. Daha sonra mikrodalga fırında iyice eriyene kadar tutuldu. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50°C) soğuduktan sonra konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde RedSafe (Nükleik asit boyama solüsyonu) çözeltisi eklendi. Jel kabına döküldükten sonra jel tarağı yerleştirildi ve donması için yaklaşık 20 dk beklendi. Jel elektroforez tankına alındı ve üzeri örtülecek kadar 1X TAE tamponu eklendi. Tarak çıkarıldıktan sonra oluşan kuyulara DNA örneği (2 µL BFB ve 10 µL DNA) yerleştirildi. DNA büyüklüğünü belirlemek için kuyulardan birine DNA standartı (4 µL) (Ek 3.2) yüklendi. Jeldeki moleküllerin elektriksel alanda ilerlemesini sağlandıktan sonra

yeterli ilerlemeden akımı kesilerek jel 10 dk saf suda bekletildi. Sonra translüminatör ile jelde görülen bantlar gözlemlendi.

Kromozomal DNA'nın jelden saflaştırılması

%1'lik agaroz jelde görüntülendi. DNA'lar agaroz jelde yürütüldükten sonra steril bistüri ile jelde bulunan uygun bantlar kesilerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Saflaştırmak için QIAGEN jel ekstraksiyon kiti kullanıldı. Mikrosantrifüj tüplerine alınan jel ağırlığı hassas terazide ölçüm yapıldıktan sonra üzerine 3 hacim olacak şekilde QC tamponu ile 1 hacim izopropanol eklenip 50°C'de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra arada bir jelin tümünün çözünüp çözünmediği kontrol edilip vortex yapıldı. Jelin tümü çözünme işlemi sonrası reaksiyon rengi kontrol edildi (Eğer karışımın rengi turuncu ise karışıma 10 µL 3 M sodyum asetat eklenmek gerekir). Karışım QIAquick spin kolon tüplerine (2 mL toplama tüplerinin içinde bulunan) aktararak DNA'nın spin kolon tüplerinin filtresine tutunması sağlandı. 1 dk 10000 rpm'de santrifüj edilip toplama tüpünde santrifüjden sonra elde edilen sıvı atılıp spin kolon tüplerine 0,5 mL QC tamponu ilave edildi. Sonra tüpler 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek tekrar toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tüpleri 0,75 mL PE tamponu ile yıkandıktan sonra 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra toplanan sıvı atıldı ve aynı toplama tüpü kullanılarak 1 dk daha santrifüj edildi. QIAquick spin kolon tüpleri yeni steril toplama tüplerinin içine bırakıldı ve 40 µL steril saf su spin kolon tüplerinin merkezine doğru eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Inkübasyondan sonra 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki sıvı sonraki işlemler için kullanıldı.

16S rRNA gen dizi analizi

Hidrokarbon parçalayan olarak seçilen suşların, 16s rRNA gen dizi analizi ile tanımlandı. İzolatların 16S rRNA dizi analizleri BMLabosis (Ankara) ile yapılmıştır. Kullanılan prosedürünü aşağıda görüldüğü gibidir.

- 1) Bakteri üzerinden tür tayini istediğiniz örneklerin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır.
- 2) DNA izolasyonundan sonra elde ettiğimiz DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirdik.

3) PCR çalışmasında universal primer olarak 27F-1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R 5' TACGGYTACCTTGTACGACTT 3'

Tablo 3.1 16S rRNA gen dizi analizi amplifikasyonu için hazırlanan thermal cycler programı

Program	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı (cycle)
1	95°C	5 dk	35
2	95°C	45 sn	
3	57°C	45sn	
4	72°C	60 sn	
5	72°C	5 dk	
6	4°C	∞	

Yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. 1 örnek için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

4) PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnek için "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent" (ThermoFisher Scientific, USA) saflaştırma enzimi kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

5) Sanger Dizileme işlemi BMLabosis (Ankara) tarafından MacroGen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

Bakteri suşları 16S rRNA geninin dizileri belirlendi. Bu dizileri karşılaştırmak için bir BLAST araştırması (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kullanan GenBank veri tabanı kullanıldı. 16S rRNA gen benzerlikleri, en yakından ilişkili suşları belirleyerek veri

tabanından alındı. Filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi ve CLUSTAL W programı kullanılarak oluşturuldu.

3.2.3 Bakterilerin hidrokarbonları parçalaması ve kullanması

3.2.3.1 Bakterilerin hidrokarbonlarda çoğalma yeteneklerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi

Bakterilerin hidrokarbonlarda çoğalmaları için gerekli BM ortamı oluşturuldu (Nie vd., 2010'dan modifiye edildi). NB sıvı ortamında 24 saat çoğaltılan taze bir kültür elde edildi. Daha sonra kültürler santrifüjlendi ve pelet BM ile yıkanarak, bu işlem 3 kez olarak tekrarlandı. Yıkandıktan sonra %1'lik hidrokarbon bulunan BM ortamına yıkanmış bakteri kültüründen ekim yapıldı. Bakteriler, BM içerisinde optimum büyüme koşulları altında 30°C'de 120 rpm'de, %1 oranında hidrokarbon (hekzan, heptan, oktan, dekan, pentadekan, hekzadekan, skualen ve toluen) içeren sıvı BM ortamında 3 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bakteri üremesi 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kullanılan hidrokarbonların tamamı (Sigma-Aldrich, ABD)'den temin edildi.

3.2.3.2 GC-MS analizi ile sıvı kültür ortamında bakterilerin ham petrol, hekzadekan ve pentadekan biyodegradasyon oranlarının tespiti

Bakteri suşlarının ham petrol ve tek veya karışım halinde n-alkanların bozunmalarını belirlemek için GC-MS kullanılarak analiz edildi. Yukarda (3.2.3.1 başlıkta) anlatıldığı şekilde elde edilen bakteriler, %1'lik hidrokarbon veya ham petrol içeren 30 mL BM içerisine aktarıldı. Ham petrol ve hidrokarbon biyodegradasyonu için; 121°C 21 dk süreyle steril edildikten sonra ve 0,2 µm por çapındaki steril filtreden geçirildi. Sonra hazırlanan BM ortamına %1 olacak şekilde ilave edildi. Her bir bakteri suşu optimum şartlarda 30°C, 120 rpm'de tek hidrokarbonlarda 3 gün, ham petrolde ise 5 günlük inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında numuneler 10000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı alındı. Daha sonra, GC-MS analiz işlemi için Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı (TPAO) (Ankara) gönderildi.

Pentadekan ve hekzadekanı veya bakterileri karışım halinde içeren sıvı besiyerinde hidrokarbon degradasyon analizi, benzer şekilde, optimum üreme şartlarında 3 gün 30°C 120 rpm'de inkübasyona bırakılarak yapıldı. Aynı şekilde, GC-MS analizi için TPAO'ya gönderildi. GC-MS analiz aşağıda verildiği gibi yapılmıştır;

Numune hazırlama

%1'lik hidrokarbon veya ham petrol içeren BM sıvı besiyerinde inkübasyondan sonrasında üreyen bakteriler santrifüjle çöktürüldükten sonra üst sıvıdan 15 mL numuneler alınarak, geriye kalan hidrokarbon içeriklerin GC-MS analiziyle ölçümü için TPAO'ya gönderildi. GC-MS analiz ile ilgili bilgiler aşağıdadır.

Gaz kromatografisi-MS analizi

Ham petrol veya numune içerisindeki hidrokarbonları ve bu bileşiklerin genel dağılımını belirlemek için GC-MS kullanılan bir yöntemdir.

Biyolojik parçalamayı, bir alev iyonizasyon dedektörü (FID; HP 6850; Hewlett Packard) kullanılarak ve bir PONA kuvars kapiler kolonu (100m×0.250mm i.d.×0.50m) ile donatılmış GC-MS'i ham petrolün n-alkan fraksiyonunu analiz etmek için kullanıldı. Split enjeksiyonları gerçekleştirmek için taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Kolon sıcaklığı dakikada 3°C hızla 60°C'den 320°C'ye yükseldi. Enjektörün sıcaklığı 300 190°C ve dedektörün sıcaklığı 350°C kullanılmıştır. Analiz koşulları aşağıdaki gibidir.

Enjektör sıcaklığı: 300°C

Dedektör sıcaklığı: 350°C

Toplam analiz süresi: 163 dk.

Tablo 3.2 Gaz kromatografisi fırın sıcaklık programı

	Sıcaklık Artış Hızı, °C/dk	Sıcaklık °C	Bekleme Süresi, dk
Başlangıç		35	8
Artış 1	3	320	60

3.2.4 Petrol parçalayan bakterilerde AlkB ve AlkM genlerinin izolasyonu

AlkB ve AlkM geni çalışmak için daha önce açıklanan kromozomal DNA izolasyonu (3.2.2.4 başlıkta) yöntemiyle elde edilen kromozomal DNA üzerinde aşağıdaki primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

3.2.4.1 AlkB ve AlkM genlerine özgü primer dizaynı ve PCR programlama

Primer dizaynı için literatür taraması yapıldı ve dejenere primerler literatürden (Li vd., 2013; Whyte vd., 2002) faydalanarak dizayn edildi. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlandığı sıcaklık (T_m =Erime Sıcaklığı), primer uzunlukları dikkat edilerek her iki

primer de ayrı ayrı olarak hesaplandı. Primerlerin Tm değerleri aşağıdaki formül kullanılıp hesaplandı.

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Yukarda olan formülde yapılan hesaplama işlemine göre tasarlanan primerler ve bu primerlerin Tm değerleri aşağıda verilmiştir.

Primer 1: Ac alkM-R -p1 (Reverse)

5'-GTGATGATCTGAATGTCGTTGTAAGTGG-3' Tm= 58,46°C

Ac AlkM-F-p1 (Forward)

5'-CCTGTCTCATTTGGCGCTCGTTCCTACAGG- 3' Tm=65,72°C

Primer 3: Pp-alkB-R-p3 (Reverse)

5'-CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG- 3' Tm=69,82°C

Pp-alkB-F-p3 (Forward)

5'-TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG- 3' Tm=67,02°C

3.2.4.2 AlkB ve AlkM genlerinin PCR ile amplifikasyonu

Günlük stoklar hazırlanıp steril ve buz üstünde, en son enzim olarak eklenerek PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR ürünü elde etmek için Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. AlkB ve AlkM genlerinin amplifikasyon işlemi için hazırlanan PCR reaksiyonun bileşenleri aşağıda gibidir.

Miktar	9X	Kimyasal	Son konstrasyon
2.5 µL	22.5	10X PCR tamponu 1X (15 mM MgCl ₂)	1X
2.5 µL	22.5	10 mM dNTP	200 mM
1.25 µL	11.25	Primer 1	0.5 mM
1.25 µL	11.25	Primer 3	0.5 mM
0.25 µL	2,25	Taq polimeraz	0.05 U/ µ L
16.25 µL	146.25	Sigma H ₂ O	

Yukarıdaki şekilde hazırlanan örneklerden 0,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 24 µL aktarıldı ve 1 tüp kontrol olacak şekilde (üzerine DNA eklenmemiş) ayarlanarak diğer

tüplerin üzerine 1 µL (10-20 ng) kromozomal DNA eklendi. Kromozomal DNA eklenmeden önce 100X sulandırıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımı önceden ayarlanmış olan PCR cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

Tablo 3.3 alkB ve alkM genlerinin PCR ile amplifikasyonu için thermal cycler programı

Program	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı (cycle)
1	94	4dk	1
2	94	30 sn	35
3	55-65	1dk	35
4	72	1dk	35
5	72	7 dk	1
6	14	∞	1

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülendi. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra steril bisturi ile jelde uygun bantlar kesildikten sonra steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Daha sonra saflaştırma işlemi için QIAGEN jel ekstraksiyon kiti kullanıldı. Elde edilen saflaştırılmış PCR ürünleri sekanslama için Sentebiolab'a (Ankara, Türkiye) gönderildi.

3.2.4.3 AlkB ve AlkM gen dizi analizi

Petrol parçalayan D11 ve E2 suşlarına ait alkB ve alkM genleri için elde edilen PCR ürünleri, Sentebiolab (Ankara, Türkiye)'a gönderilerek, her iki DNA zinciri üzerinde dizileme yapılmıştır. DNA dizilemesi yapıldıktan sonra, CLUSTAL X programı kullanılarak çoklu hizalamalar yapıldı ve tüm diziler, NCBI [Ulusal Biyoteknoloji Merkezi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] üzerinde bir BLAST arama aracı veritabanı kullanılarak karşılaştırıldı.

3.2.4.4 AlkB ve AlkM'nin filogenetik analizi

AlkB ve AlkM gen benzerlikleri, en yakından ilişkili bakteri genlerini belirlemek için veri tabanından faydalanıldı. Filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi kullanılarak oluşturuldu.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bakteri İzolasyonu

Batman'dan 2 farklı petrol istasyonundan 8 bakteri suş izole edildi. Petrolü parçalama özelliği bulunan 8 suş üzerinde çalışmalar sürdürüldü. Batman'daki Güney Raman bölgesinin; Güney Raman 1 istasyonundan D7, D8 ve E1; 237 istasyonundan D9, D10, D11, D12 ve E2 olarak adlandırılan suşlar elde edildi.

4.2 İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik Testler

4.2.1 Koloni morfolojisi

D7'nin koloni morfolojisi incelendiğinde küçük, yuvarlak, krem renkli, kenarı tırtıklı, yarı şeffaf, mat olduğu belirlendi. D8 koloni morfolojisi, orta, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, opak, mat olduğu belirlendi. D9'un koloni morfolojisi orta, yuvarlak, açık krem renkli, bombeli kenarlı, şeffaf, mat olduğu belirlendi. D10'nun koloni morfolojisi, orta, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, opak, parlak olduğu belirlendi. D11'in koloni morfolojisi küçük, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, opak, parlak olduğu belirlendi. Bunun yanında, D12'nin koloni morfolojisi orta, yuvarlak, krem-yeşilimsi, kenarı tırtıklı, şeffaf, mat olduğu belirlendi. E1'in koloni morfolojisi ise küçük, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, opak, mat olduğu belirlendi. E2'nin koloni morfolojisi orta, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, opak, mat olduğu belirlendi. Bakterilerin koloni morfolojisi özelliği Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1 Bakterilerin koloni morfolojisi özelliği						
Bakteriler	Boyut	Şekil	Renk	Kolon çeperi	Işık Yoğunluk ve	Koloni Görünümü
D7	Küçük	Yuvarlak	Krem	Kenarı tırtıklı	Yarı şeffaf	mat
D8	Orta	Yuvarlak	Krem	Düz kenarlı	Opak	mat
D9	Orta	Yuvarlak	Açık krem	Bombeli kenarlı	Şeffaf	mat
D10	Orta	Yuvarlak	Krem	Düz kenarlı	Opak	parlak
D11	Küçük	Yuvarlak	Krem	Düz kenarlı	Opak	parlak
D12	Orta	Yuvarlak	Krem- Yeşilimsi	Kenarı tırtıklı	Şeffaf	mat
E1	Küçük	Yuvarlak	Krem	Düz kenarlı	Opak	mat
E2	Orta	Yuvarlak	Krem	Düz kenarlı	Opak	mat

4.2.2 Hücre morfolojisi

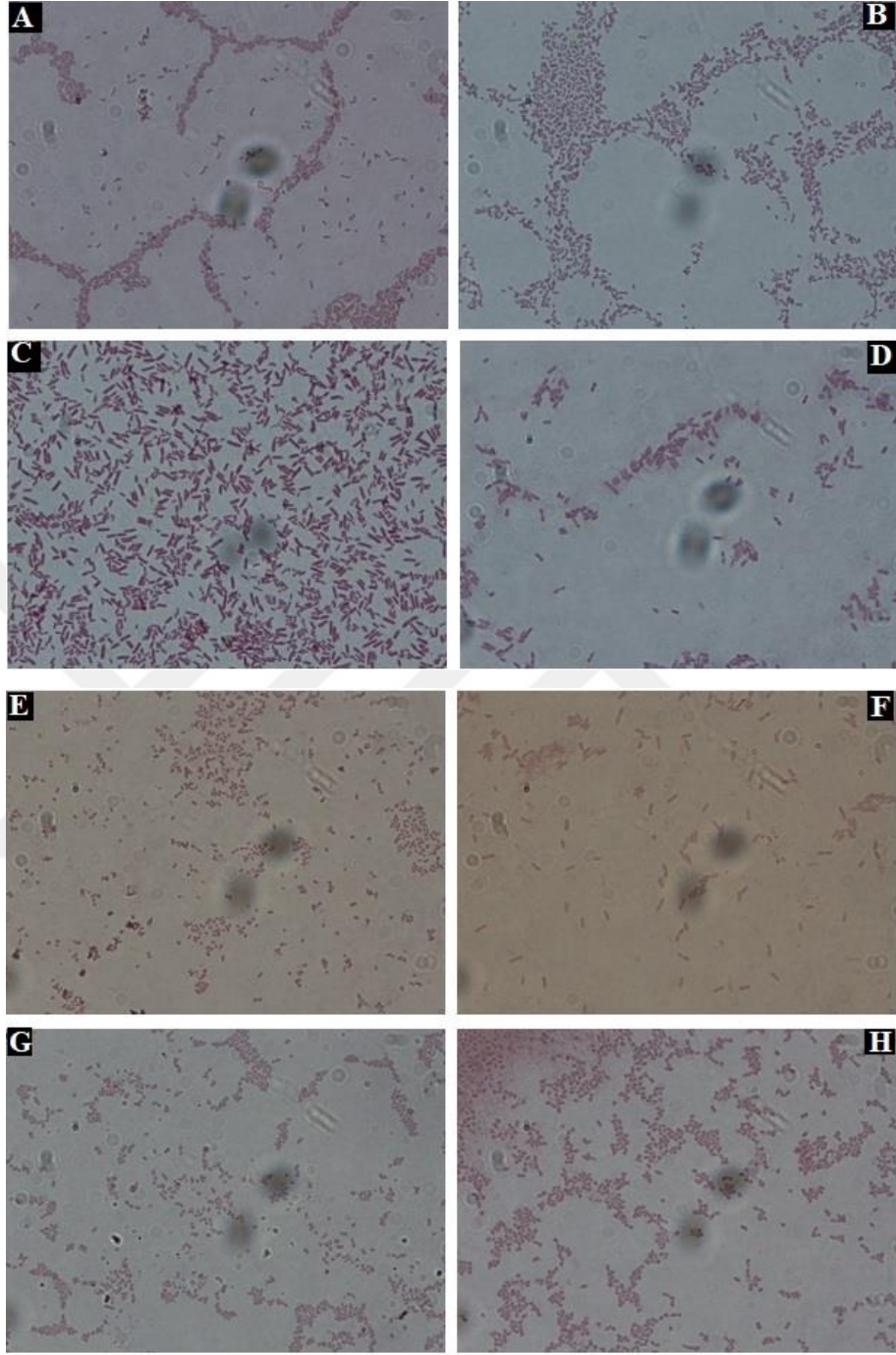
Bakterilerin hücre morfolojisi (gram boyama, hücre şekli ve spor boyama) özelliklerine ışık mikroskobu kullanılarak bakıldı. Çalışmamızda bakterilerin hücre morfolojisi sırasıyla şöyledir;

D7 ve D8' in hücreleri basil şeklinde, gram-negatif (Şekil 4.1 A ve 4.1 B) ve spor oluşturmaktadır (Şekil 4.2 A ve 4.2 B). D9 ve D10'nun hücreleri ise basil şeklinde, gram-negatif (Şekil 4.1 C ve Şekil 4.1 D), ve spor oluşturmadağı belirlendi (Şekil 4.2 C ve Şekil 4.2 D). D11'in hücreleri kokobasil, gram-negatif (Şekil 4.1 E), spor oluşturduğı belirlendi (Şekil 4.2 E). D12'nin hücreleri basil, gram-negatif (Şekil 4.1 F), spor oluşturmadağı belirlendi (Şekil 4.2 F). Son olarak, E1 ve E2'nin hücreleri kokobasil, gram-negatif (Şekil 4.1 G ve Şekil 4.1 H), E1'in spor oluşturmadağı E2'nin spor oluşturduğı belirlendi (Şekil 4.2 G ve Şekil 4.2 H). Bakterilerin hücre morfolojisi özellikleri Tablo 4.2'de görölmektedir.

Tablo 4.2 Bakterilerin hücre morfolojisi

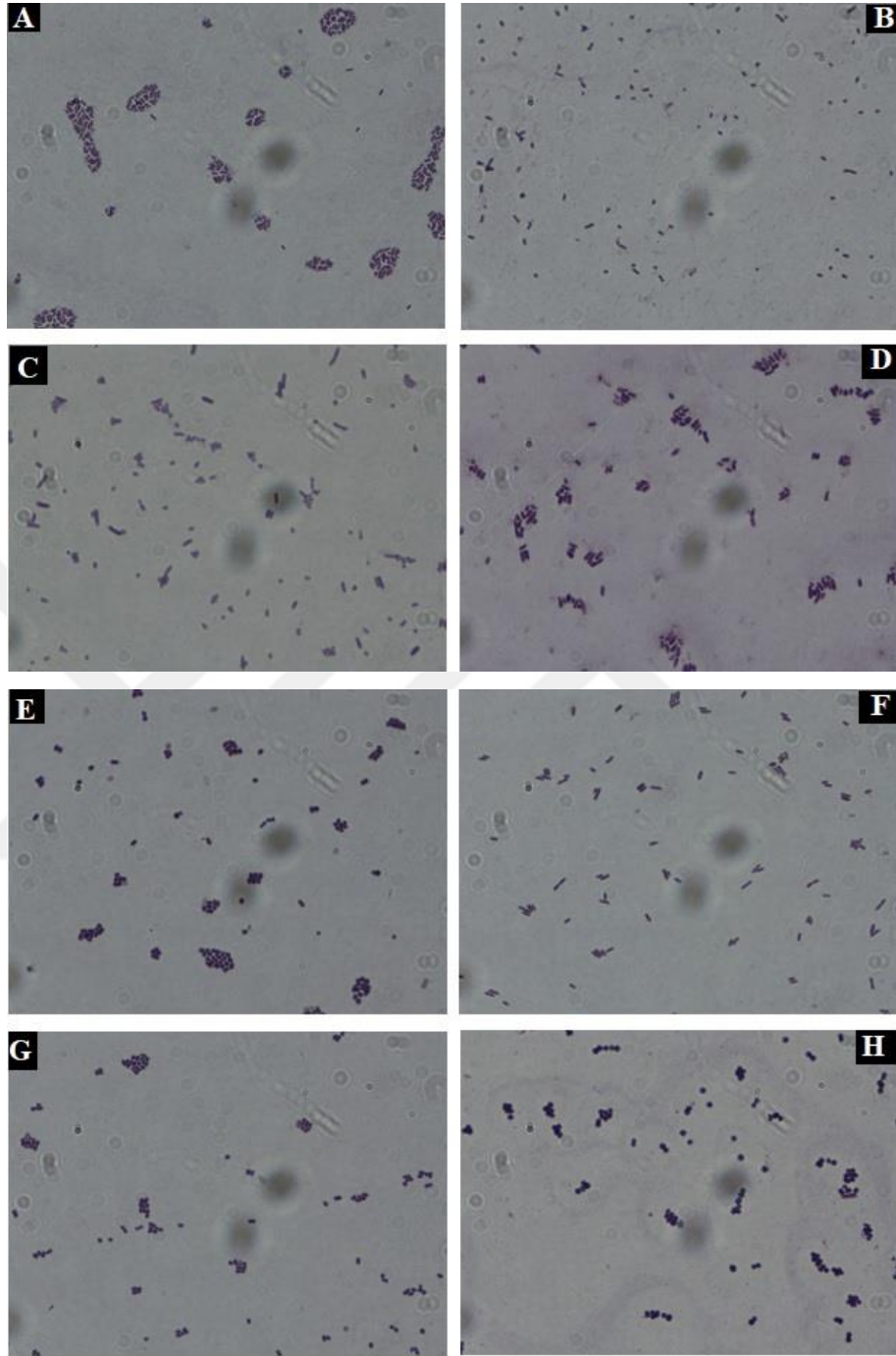
Bakteriler	Gram boyama	Hücre Şekli	Spor boyama
D7	(-)	Basil	(+)
D8	(-)	Basil	(+)
D9	(-)	Basil	(-)
D10	(-)	Basil	(-)
D11	(-)	Kokobasil	(+)
D12	(-)	Basil	(-)
E1	(-)	kokobasil	(-)
E2	(-)	kokobasil	(+)

4.2.2.1 Gram boyama



Şekil 4.1 İzole edilen suşların gram boyama özellikleri (A:D7, B:D8,C:D9,D:D10,E:D11, F:D12,G:E1 ve H:E2)

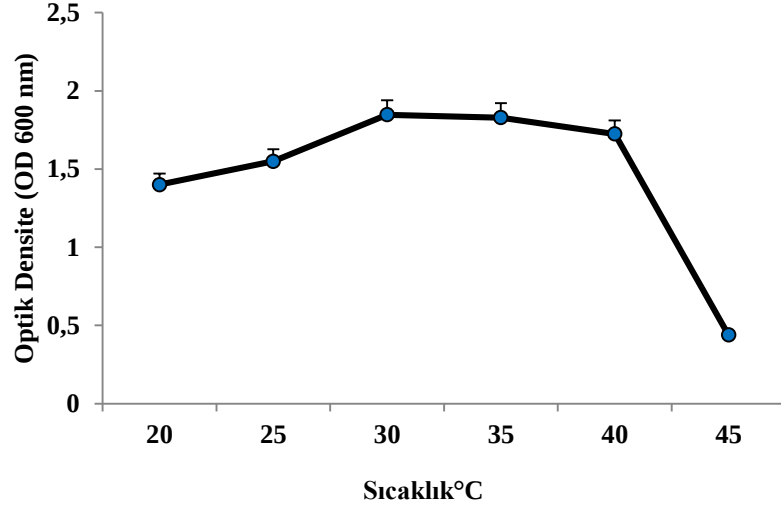
4.2.2.2 Spor boyama



Şekil 4.2 İzole edilen suşların spor boyama özellikleri (A:D7, B:D8,C:D9,D:D10,E:D11,F:D12,G:E1 ve H:E2)

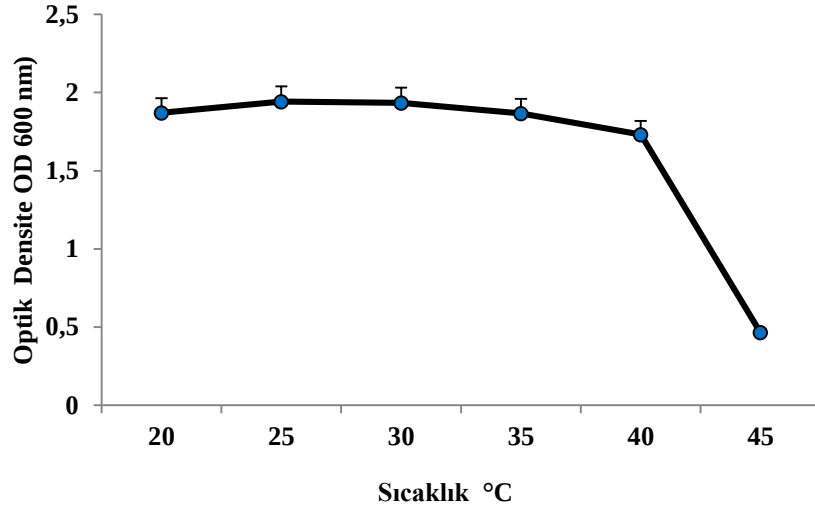
4.3 Bakterilerin Üreme Şartlarının Tespiti

4.3.1 Bakteri üremesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi



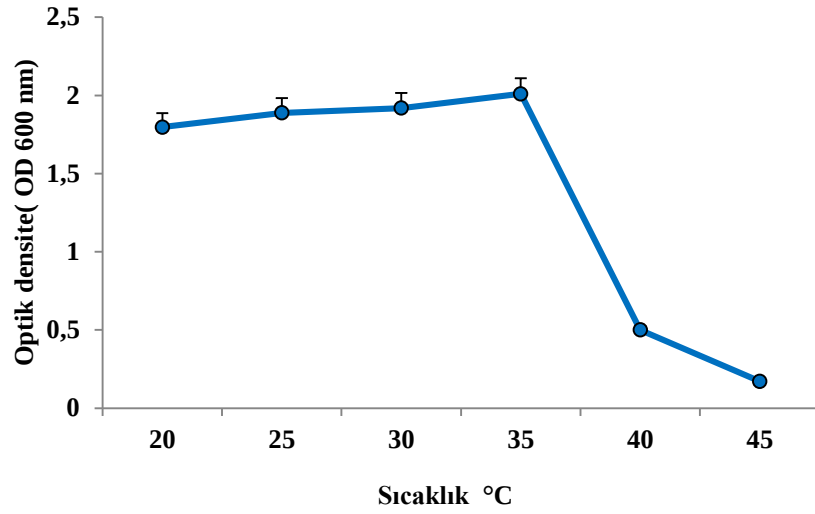
Şekil 4.3 Sıcaklığın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.3'te sıcaklığın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. D7 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 40°C'den sonra üremede azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 30°C olarak belirlendi.



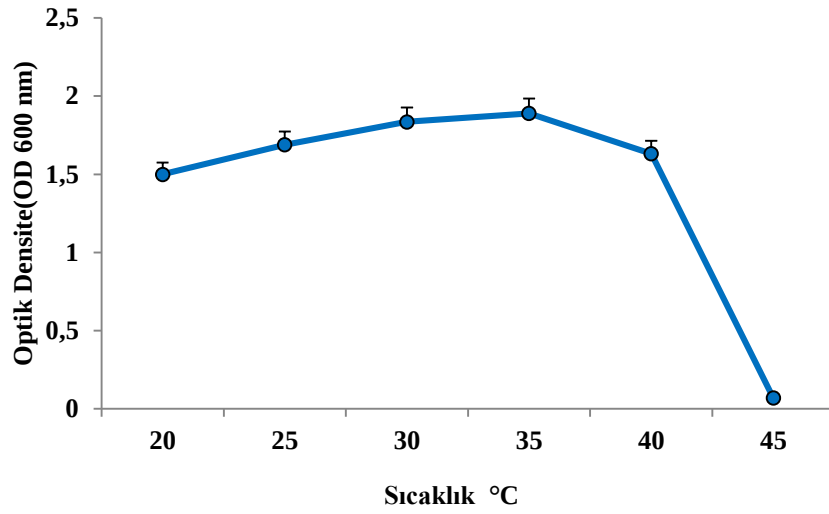
Şekil 4.4 Sıcaklığın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.4'te görüldüğü üzere, D8 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C'den sonra üremede azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 30°C olarak belirlendi.



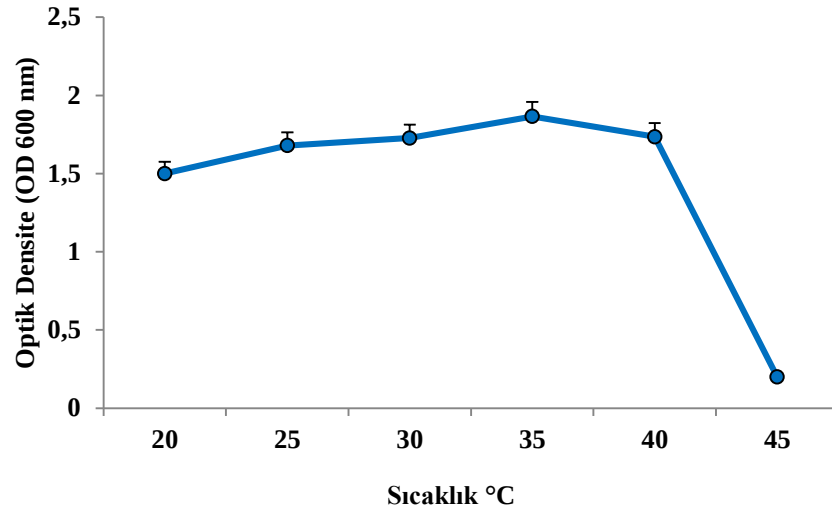
Şekil 4.5 Sıcaklığın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.5’de sıcaklığın D9 üremesi üzerine etkisi görülmektedir. D9 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C’den sonra üremede azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 35°C olarak belirlendi.



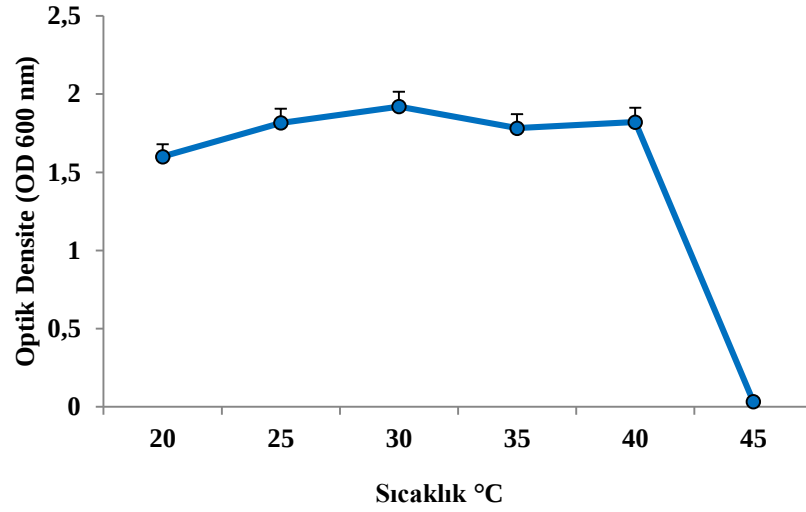
Şekil 4.6 Sıcaklığın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.6’da sıcaklığın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. D10 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C’den sonra üreme azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 35°C olarak belirlendi.



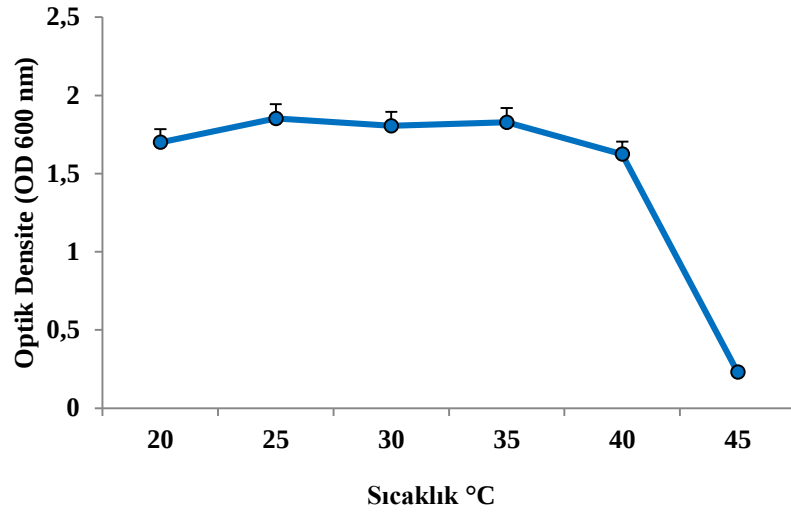
Şekil 4.7 Sıcaklığın D11 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.7 'de görüldüğü gibi, D11 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C 'den sonra üreme azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 35°C olarak belirlendi.



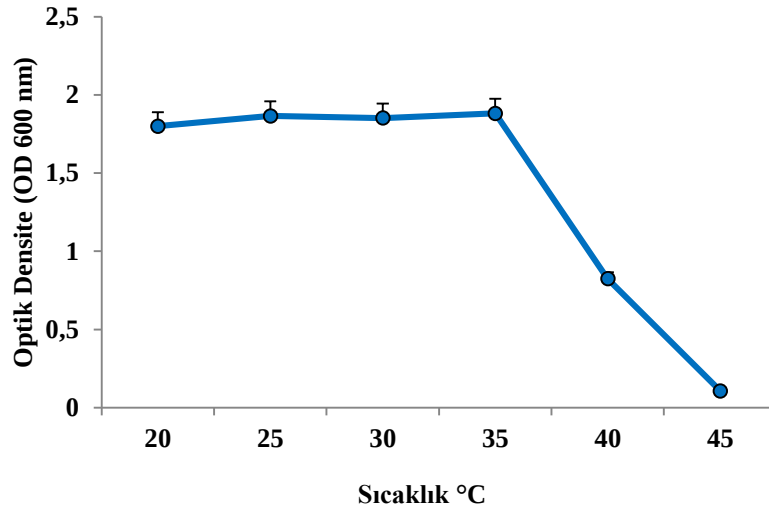
Şekil 4.8 Sıcaklığın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.8'de D12 suşunun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. D12 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 40°C'den sonra üreme azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 30°C olarak belirlendi.



Şekil 4.9 Sıcaklığın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi

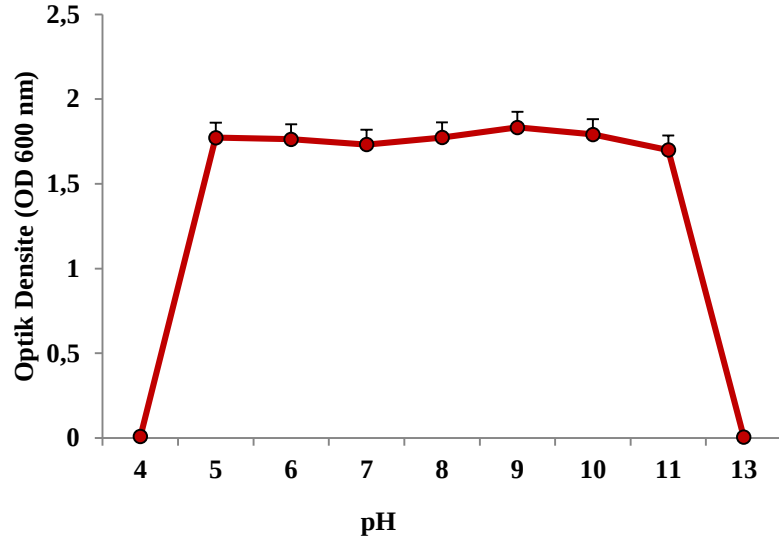
Şekil 4.9 'da E1 suşunun üreme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C'den sonra üreme azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 35°C olarak belirlendi.



Şekil 4.10 Sıcaklığın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi

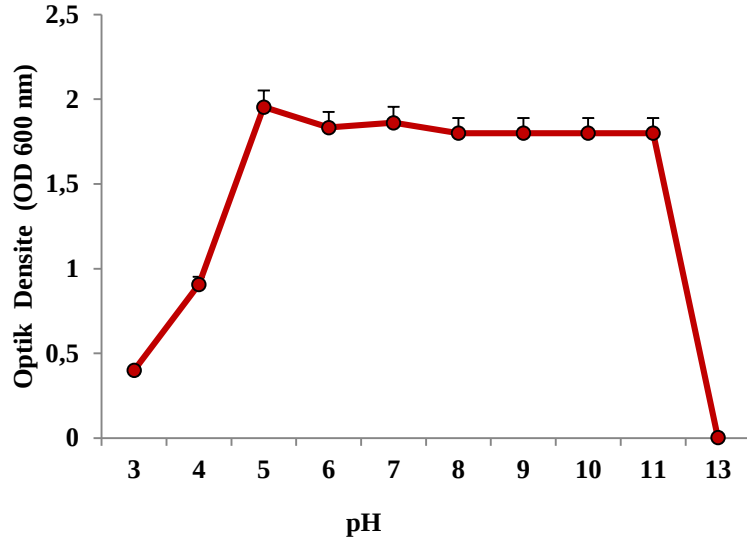
Şekil 4.10'da sıcaklığın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. E2 suşunun büyüme aralığı 20-40°C arasında olduğu, 35°C'den sonra üreme azalma eğiliminde olduğu ve optimum sıcaklık ise 35°C olarak belirlendi.

4.3.2 Bakteri üremesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi



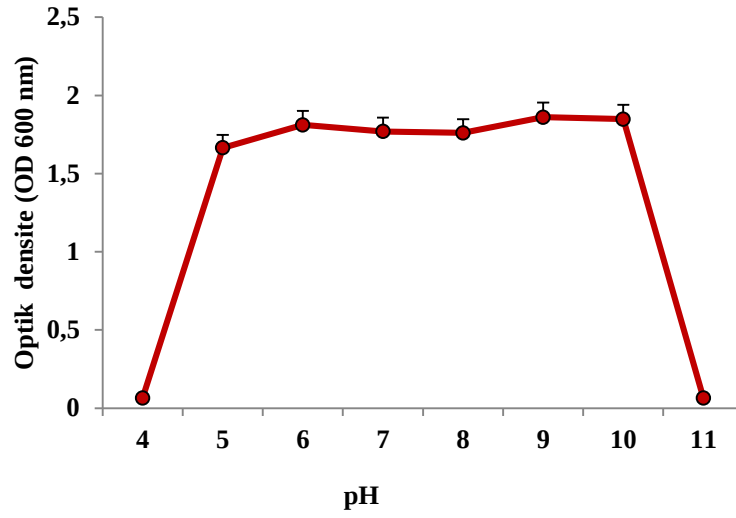
Şekil 4.11 pH'nın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.11'de pH'ın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. D7 'nin 5.0-11.0 gibi geniş pH aralıklarında ürediği ve optimum pH 9.0 olarak tespit edildi.



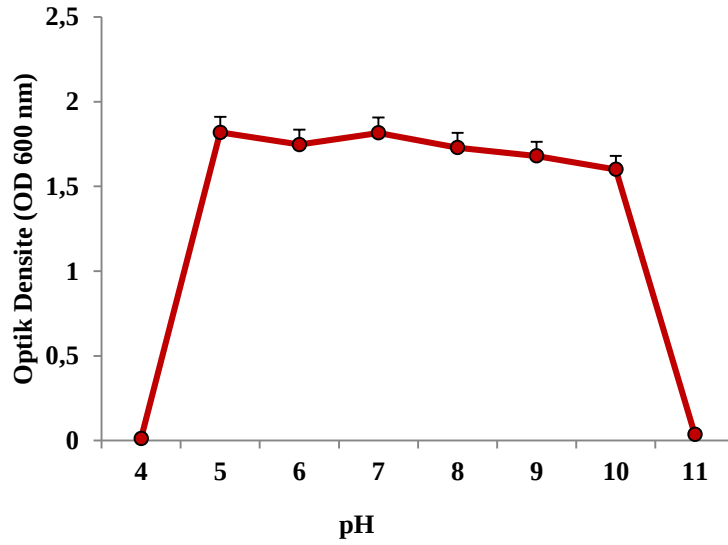
Şekil 4.12 pH'nın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.12'de pH'ın D8 suşunun üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. D8'in, 3.0-11.0 gibi geniş pH aralıklarında ürediği ve optimum pH 5.0 olduğu tespit edildi.



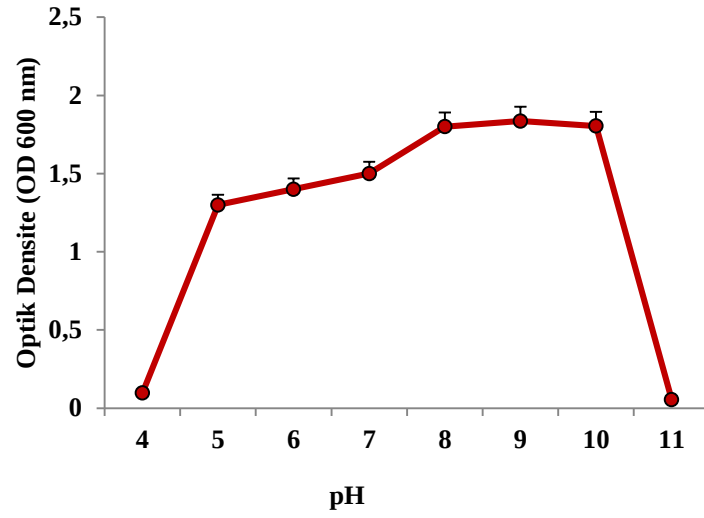
Şekil 4.13 pH'nın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.13'de pH'nın D9'un üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi D9'un 5.0-10.0 gibi geniş pH aralıklarında ürediği ve optimum pH 9.0-10.0 olduğu tespit edildi.



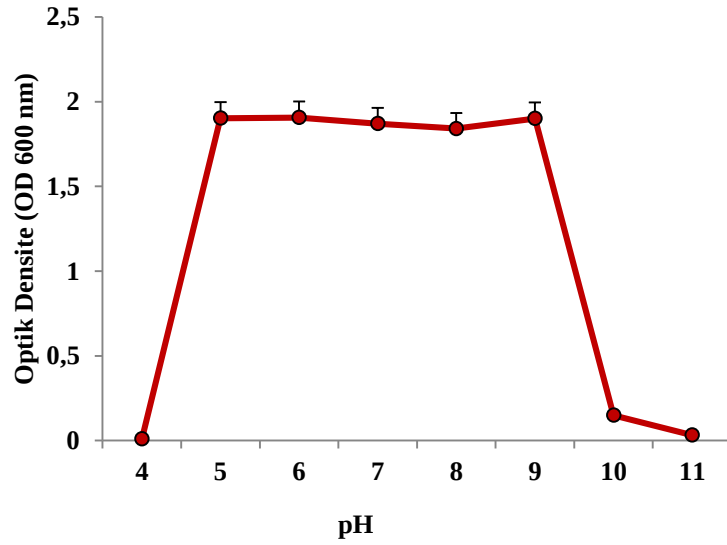
Şekil 4.14 pH'nın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.14'de pH'nın D10'nun üremesi üzerine etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi D10 'nun 5.0-10.0 gibi geniş pH aralığında üremenin olduğu ve optimum pH 5.0 olduğu belirlendi.



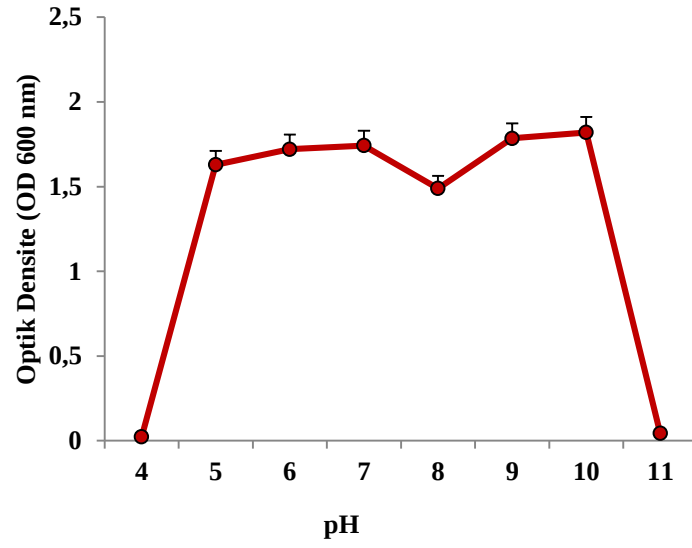
Şekil 4.15 pH'nın D11 suşunu üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.15'de pH'nın D11'in üremesi üzerine etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi D11'in 5.0-10.0 gibi geniş pH aralığında ürediği ve optimum pH 8.0-10.0 olduğu tespit edildi.



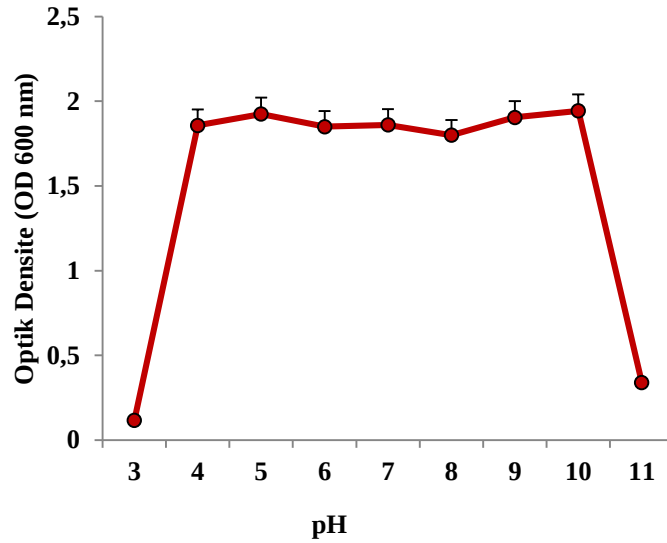
Şekil 4.16 pH'nın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.16'da pH'nın D12'nin üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi D12'nin 5.0-9.0 gibi geniş pH aralıklarında üremenin olduğu ve optimum pH 5.0-9.0 olarak belirlendi.



Şekil 4.17 pH'nın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi

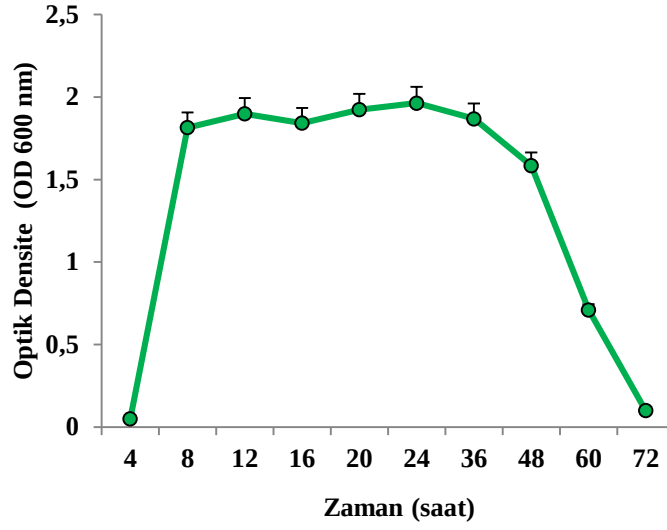
Şekil 4.17'de pH'nın E1'in üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi E1'in 5.0-10.0 gibi geniş pH aralığında üremenin olduğu ve optimum pH 9.0-10.0 olduğu tespit edildi.



Şekil 4.18 pH'nın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi

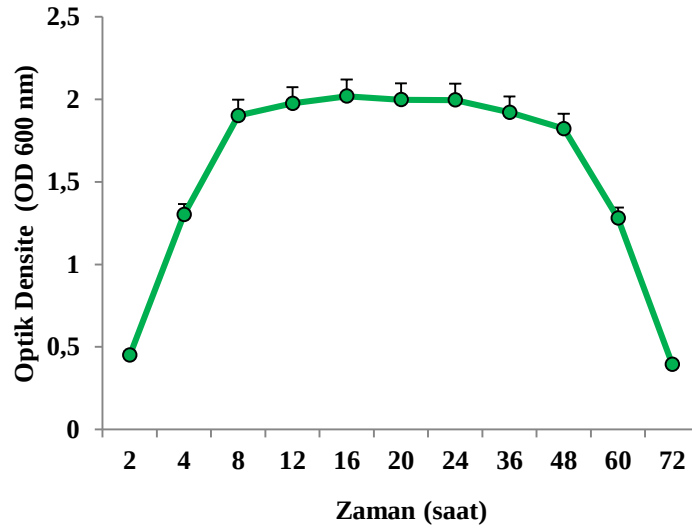
Şekil 4.18'de pH'nın E2 suşunun üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi E2'in 4.0-10.0 gibi geniş pH aralıklarında ürediği ve optimum pH 4.0-10.0 olarak belirlendi.

4.3.3 Zamanın bakterilerin üremesi üzerine etkisi



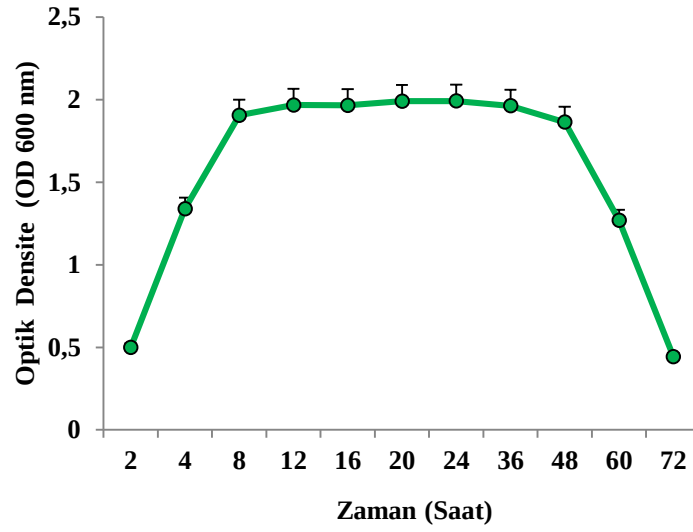
Şekil 4.19 Zamanın D7 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.19’da zamanın D7 üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. D7’nin üremesi 8. saaten 24. saate kadar arttığı ve 24. saaten sonra da düşüş eğiliminde olduğu belirlendi. En yüksek üremenin 24. saatte olduğu tespit edildi.



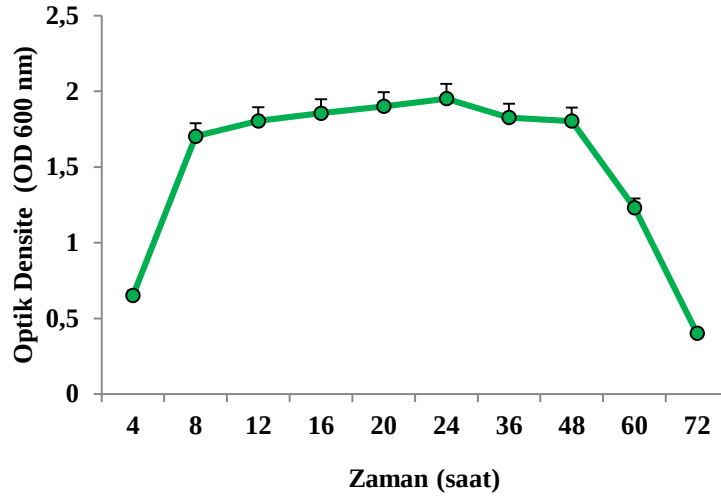
Şekil 4. 20 Zamanın D8 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.20’de zamanın D8’in üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. D8’in üremesi 24. saate kadar arttığı ve 36. saaten sonra düşüş eğiliminde olduğu belirlendi.



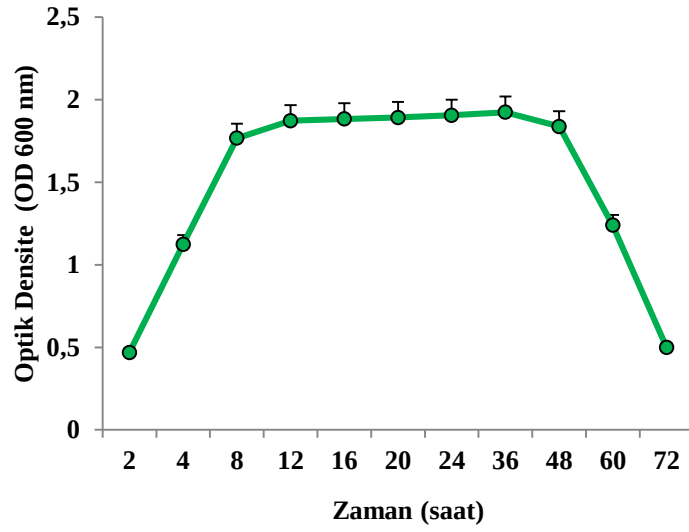
Şekil 4.21 Zamanın D9 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.21’de Zamanın D9’un üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde 4.22’de görüldüğü gibi D9’un üremesi 8. saate kadar hızla arttığı, 36. saaten sonra düşme eğiliminde olduğu belirlendi.



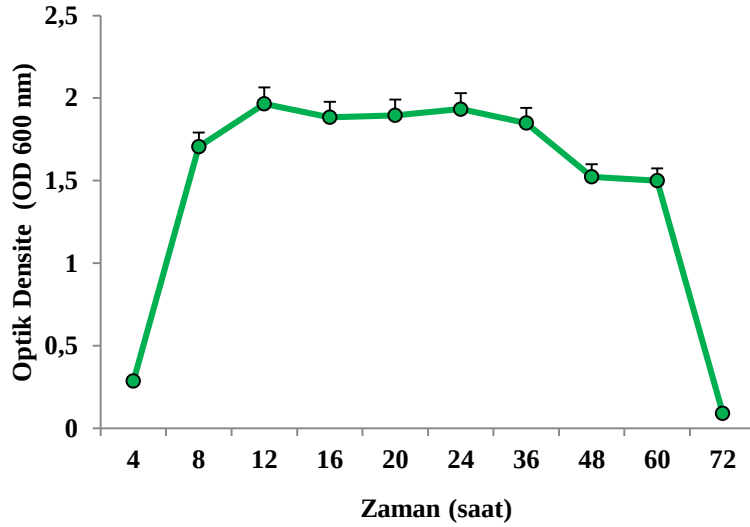
Şekil 4.22 Zamanın D10 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.22’de Zamanın D10’nun üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi D10’nun üremesi 8. saaten 24. saate kadar arttığı ve 48. saaten sonra da düşme eğiliminde olduğu belirlendi. En yüksek üreme 24. saatte elde edildi.



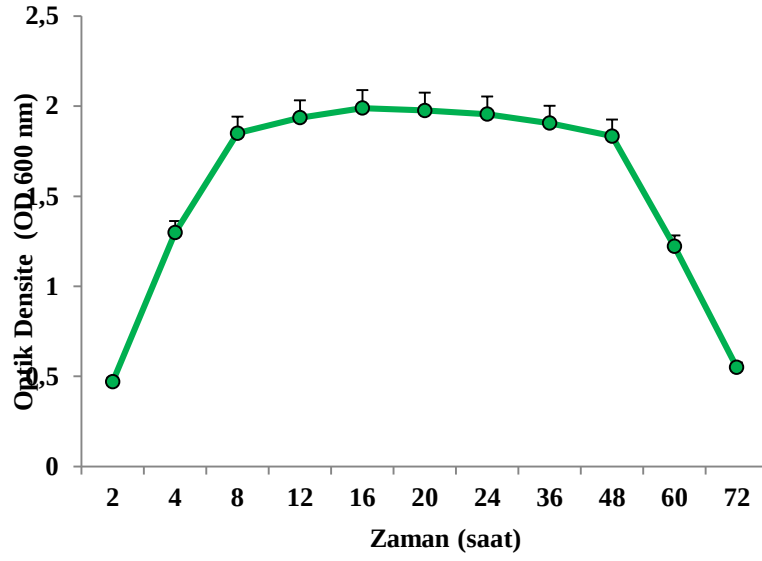
Şekil 4.23 Zamanın D11 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.23’de Zamanın D11 ‘in üremesi üzerine etkisi görülmektedir. Şekilde D11’in büyümesi 8. saate kadar hızla arttığı, 36. saate kadar artma eğiliminde olduğu ve 36. saaten sonrada düşme eğiliminde olduğu belirlendi.



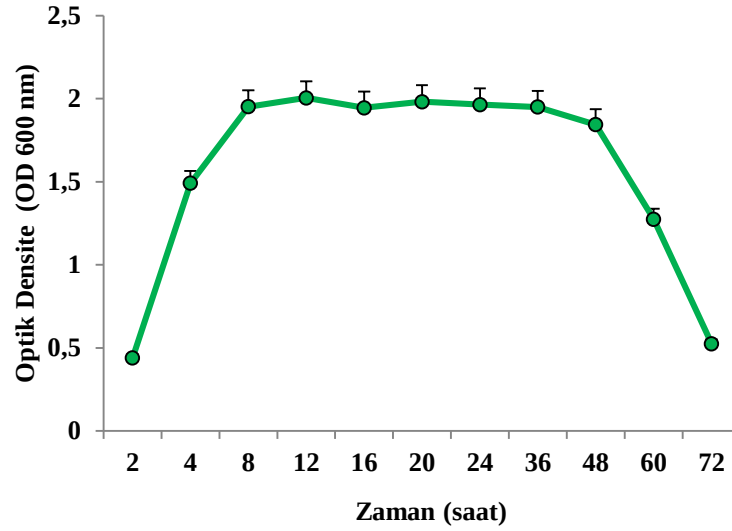
Şekil 4.24 Zamanın D12 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.24’de Zamanın D12’nin üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde D12 ‘nin üremesi 12. saate kadar hızla arttığı ve 24. saaten sonra düşüş eğiliminde olduğu belirlendi. En yüksek üreme 12. saatte tespit edildi.



Şekil 4.25 Zamanın E1 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.25’de zamanın E1’in üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi E1’in üremesinin 8. saate kadar hızla arttığı, 48. saaten sonra da düşme eğiliminde olduğu belirlendi. En yüksek üreme 16. saatte olduğu belirlendi.



Şekil 4.26 Zamanın E2 suşunun üremesi üzerine etkisi

Şekil 4.26’de Zamanın E2’nin üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi E2’nin üremesi 8. saate kadar hızla arttığı, 48.saaten sonra düşme olduğu belirlendi. En yüksek üreme 12. saatte elde edildi.

4.3.4 NaCl oranlarının bakteri üremesi üzerine etkisi

Bakterilerin NaCl toleransı, farklı NaCl konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyon sonrası kontrole karşılaştırılarak değerlendirildi. Tablo 4.3’de görüldüğü gibi D7’nin %5, D8’in %7, D9’un %3, D10’nun %5, D11’in %3, D12’nin %5, E1’in %3 ve E2’nin %5 oranındaki NaCl konsantrasyonlarını tolere ettikleri belirlendi. OD değerler 3 ayrı tekrar ortalamasını göstermektedir.

Tablo 4.3 İzolatların farklı konsantrasyonlardaki NaCl’ye toleransları (OD 600)

Bakteriler	Kontrol	NaCl(%)konstrasyon					
		%0.5	%1	%3	%5	%7	%10
D7	1,822	1,692	1,733	1,741	1,361	0,058	0,057
D8	1,787	1,791	1,780	1,799	1,741	0,746	0,036
D9	1,546	1,598	1,478	1,488	0,104	-	-
D10	1,674	1,636	1,567	1,806	1,618	0,079	0,023
D11	0,885	0,862	0,958	0,577	0,145	-	-
D12	0,818	0,920	0,922	0,922	0,635	0,117	0,061
E1	0,697	0,838	0,786	0,597	0,102	-	-
E2	1,550	1,019	0,910	0,415	0,308	0,008	-

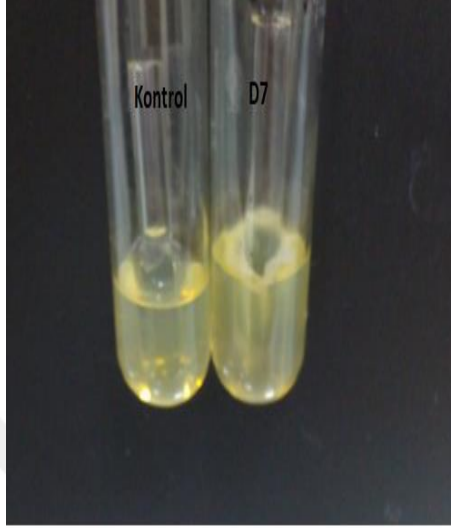
- : Üreme tespit edilmedi.

4.3.5 Bakteri suşlarında hareketlilik ve oksijen gereksiniminin belirlenmesi

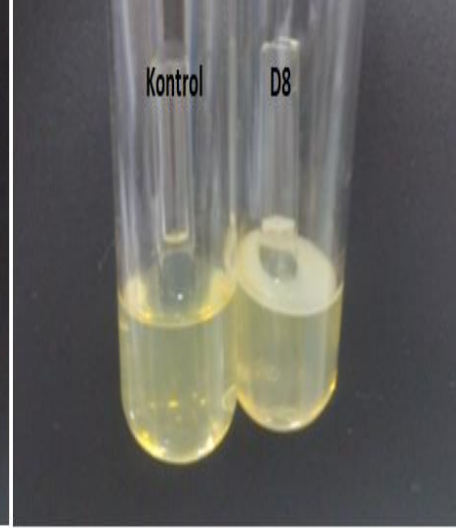
Bakterilerin hareket yeteneklerinin olup olmadığını tespit etmek için kullanılır. Öncelikle, %0,4-0,5’lik berrak yarı katı agarlı besiyeri buyyon tüplerin içinde bulunan kapiler tüplerin bulunduğu besi ortamına döküldükten sonra bakterilerin 24 saat taze kültürlerinden alınarak ekim yapıldı ve inkübasyona bırakıldı. Değerlendirilirken eğer besiyerinin inokülasyon hattı boyu üreme olup fakat sağa sola doğru yayılma ve dallanma görülüyorsa bakteri hareketsiz kabul edildi. Ancak inokülasyon hattının etrafı ve agarın içine doğru yayılma olması bakteri hareketli olarak belirlendi. Mikroorganizmalar besin gereksinimi için hareket eder ve üstte doğru hareket etmeleri aerobik, alt da kaldıklarında anaerobik, inokülasyon hattı bütün kısmında üremenin görülmesi ise fakültatif anaerob olarak değerlendirme yapılır.

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de D7 ve D8 suşlarının hareket testleri görülmekte olup şekillerde de görüldüğü üzere inokülasyon hattı boyu üreme olduğu ve inokülasyon

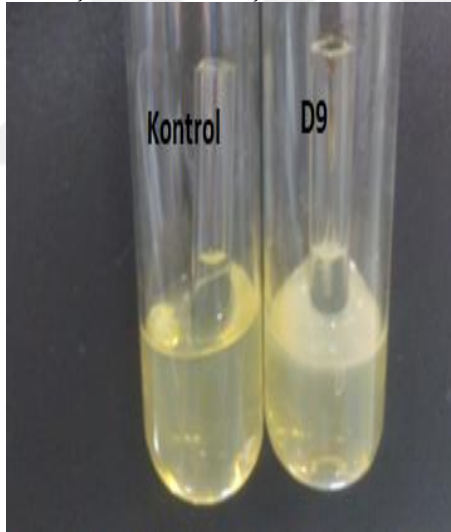
hattından agarın içine yayılma gözlemlendi. Bu D7 ve D8 suşlarının hareketli olduklarını göstermektedir. Bununla beraber, üremenin inokülasyon hattı boyu üste doğru oluşması D7 ve D8'in oksijen gereksinimi yönünden aerobik oldukları görülmektedir.



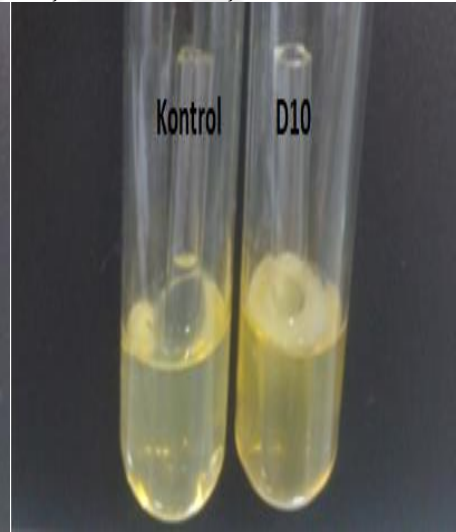
Şekil 4.27 D7 suşunun hareket testi



Şekil 4.28 D8 suşunun hareket testi

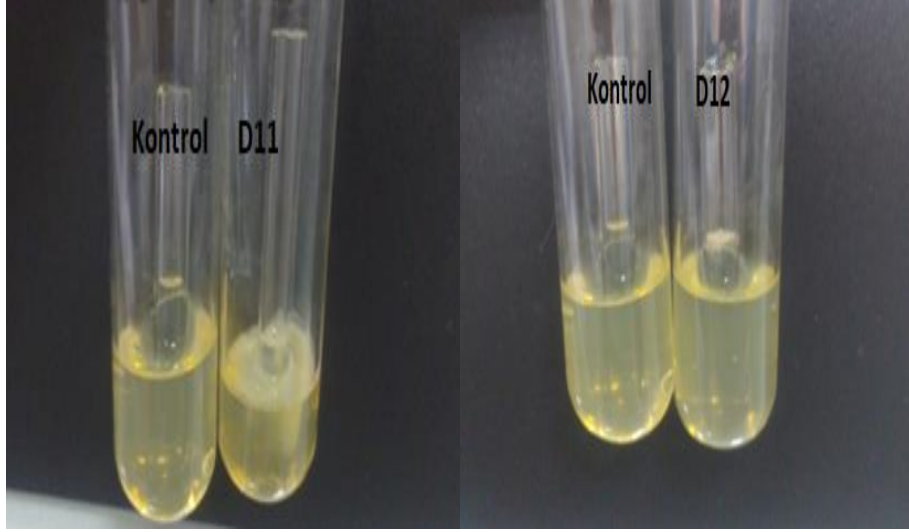


Şekil 4.29 D9 suşunun hareket testi



Şekil 4.30 D10 suşunun hareket testi

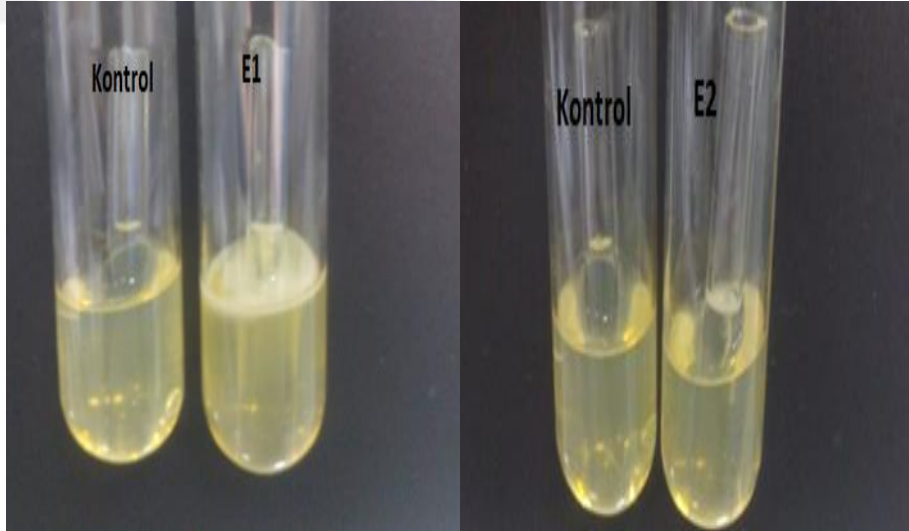
Şekil 4.29, D9 suşunun hareket testi görülmektedir. Şekilde de, inokülasyon hattında üreme olup sağa sola doğru yayılması ve dallanma görülmesi D9'nun hareketli olduğu gözlenmektedir. Ayrıca, üremenin ise inokülasyon hattında ve yukarıya doğru olacak şekilde olması D9'un oksijen gereksinim bakımından aerob olduğu tespit edildi. Şekil 4.30'da görüldüğü üzere inokülasyon hattı boyunca üreme olup inokülasyon hattının etrafına doğru agarın içine doğru yayılma görülmesi D10'nun hareketli, üremenin yukarıya doğru da oksijen gereksinim yönünden aerob olduğu tespit edildi.



Şekil 4.31. D11 suşunun hareket testi

Şekil 4.32. D12 suşunun hareket testi

Şekil 4.31’de görüldüğü üzere, D11 suşunun inokülasyon hattı boyu üremenin ve sağa sola doğru yayılması ve dallanmaların görülmesi bu suşun hareketli ve oksijen gereksinimi bakımından aerob olarak değerlendirildi. Şekil 4.32’ de ise D12 suşunun inokülasyon hattı boyu üreme olup, fakat sağa sola doğru yayılma ve dallanma olmaması D12’nin hareketsiz ve oksijen gereksinimi yönünden aerob olduğu görülmektedir.



Şekil 4.33. E1 suşunun hareket testi

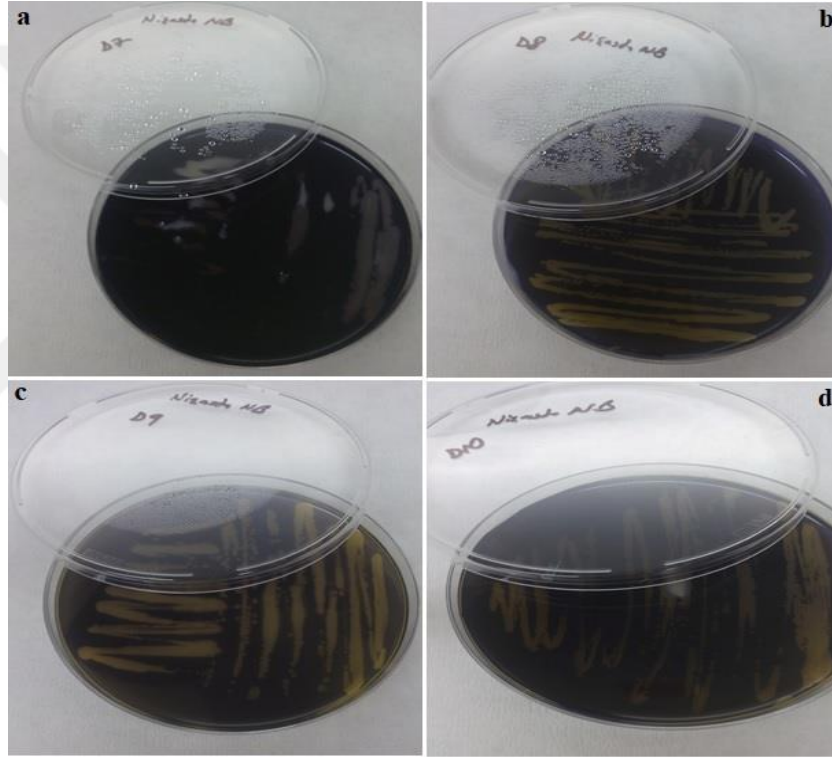
Şekil 4.34. E2 suşunun hareket testi

Şekil 4.33’de görüldüğü gibi, E1 suşu hareketli ve oksijen gereksinimi bakımından aerob özelliğindedir. Şekil 4.34’de ise E2 suşunun hareketsiz olduğu görülmektedir. Ayrıca üreme inokülasyon hattı boyu üste doğru ve E2’nin oksijen gereksinimini yönünden aerob olarak değerlendirildi.

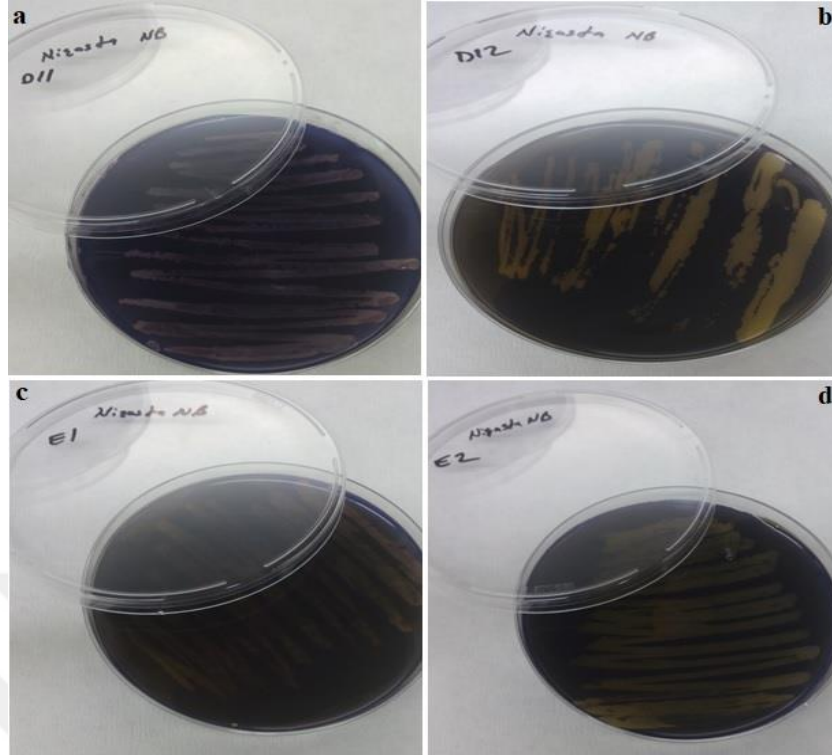
4.4 Biyokimyasal Testler

4.4.1 Nişasta hidroliz testi

Suşların, nişastayı parçalayan ekstraselüler amilaz enzimi üretip yada üretmediğini belirlemek için nişastalı besiyerine bu suşlardan ekim yapıldı. Daha sonra inkübasyon sonunda petriler üzerine iyodür solüsyonu damlatıldı. Tüm besiyerlerin iyodür ile koyu menekşe rengine boyandıkları fakat, kolonilerin etrafının açık renk zonlar oluşturdukları görüldü. Değerlendirme yapılırken pozitif reaksiyonda, koloni etrafında renksiz halka oluşmaktadır. Negatif reaksiyonda besiyeri mavi-mor renk olarak görülür.



Şekil 4.35 D7, D8, D9 ve D10 suşlarına ait nişasta hidroliz testleri (a:D7, b: D8, c: D9 d: D10)



Şekil 4.36 D11, D12, E1 ve E2 suşlarına ait nişasta hidroliz testleri (a: D11 b: D12 c: E1 d: E2)

Çalışmamızda, Şekil 4.35- 4.36’ da sırasıyla D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1 ve E2 suşların nişasta hidroliz test sonuçları görülmektedir. Bu şekillerde de görüldüğü gibi D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1 ve E2 besi ortamının iyodürle muamelesi sonucunda koloni etrafında renksiz bir halka oluştuğundan pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca, bu sonuçlara göre D11 ve E2’nin nişasta hidrolizi testleri sonucunda güçlü pozitif reaksiyon verdiği tespit edildi.

4.4.2 Katalaz testi

Değerlendirme yapılırken hidrojen peroksit ilave edildi. Daha sonra kolonilerin olduğu yerde kabarcık veya gaz çıkışı oluşması katalaz enzimi sentezlendiği ve pozitif değerlendirildi. H_2O_2 ilavesinden sonra tüm bakterilerde kabarcık oluşumu gözlemlendi. Tüm bakterilerin katalaz enzimi sentezlendiğini göstermektedir.

4.4.3 Jelatin hidrolizasyon testi

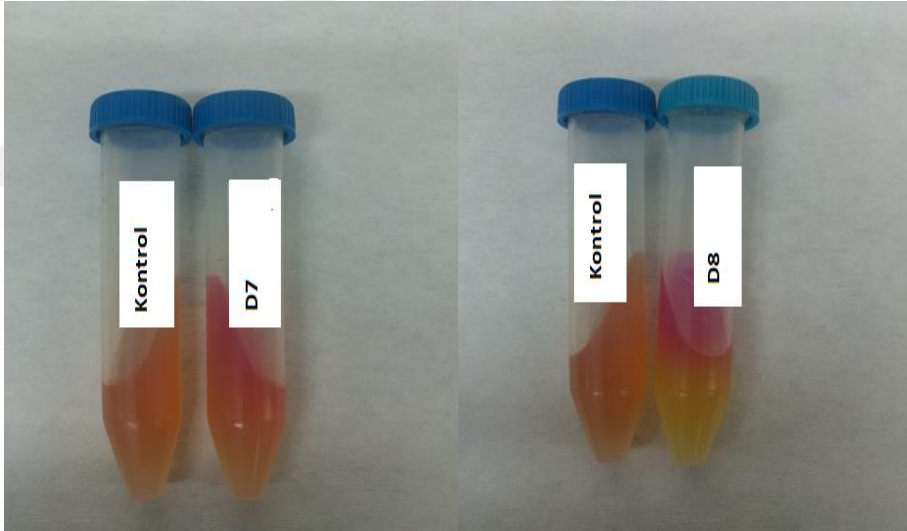
Değerlendirme yapılırken inkübasyon süresi sonucunda kontrollerle beraber buzdolabında 1-2 saat bekletildi. Daha sonra katı şeklindeki tüpler negatif olarak, eriyenler ise pozitif değerlendirildi. Suşların jelatin hidrolizi test sonuçları görülmektedir. D7, D12 ve E1 ‘de jelatin hidrolizi pozitif sonuç verirken D8, D9, D10, D11 ve E2’de ise negatif olarak tespit edildi.

4.4.4 Oksidaz aktivitesi

Değerlendirme yapılırken bu test için distile suda çözülmüş tetrametil-p fenilendiamin dihidroklorür substratı ile ıslatılmış bir filtre kâğıdı kullanıldı. Test edilen koloni öze yardımıyla alındı ve filtre kâğıdına koyuldu. 10-30 sn. de koyu mavi rengin oluşup oluşmadığı değerlendirildi. Koyu mavi veya mor renge dönüşmesi pozitif olarak belirlendi. Çalışmamızda oksidaz testi D7, D9, D10, D12 için pozitif bulunurken, D8, D11, E1 ve E2 için negatif reaksiyon elde edildi.

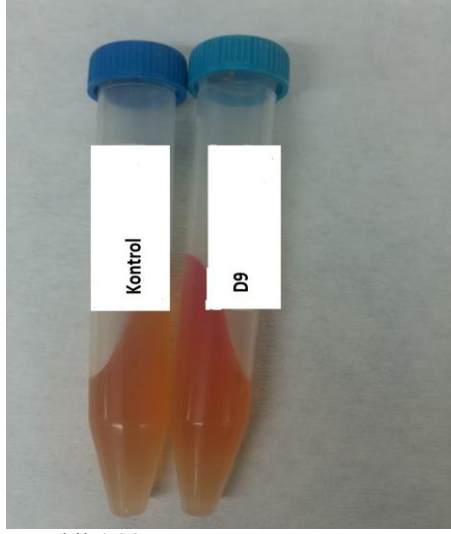
4.4.5 Üreaz testi

Değerlendirme yapılırken renk sarıdan pembe olarak dönüşmesi pozitif olarak, herhangi bir renk değişimi olmaması negatif olarak değerlendirilme yapıldı. Şekil 4.37-4.42 izole edilen suşlara ait üreaz testi sonuçlarını göstermektedir. Bu şekillerde görüldüğü gibi üreaz testi, D7, D8, D9, D10 ve D12 için pozitif sonuç verirken, D11, E1 ve E2 için negatif sonuç verdi.

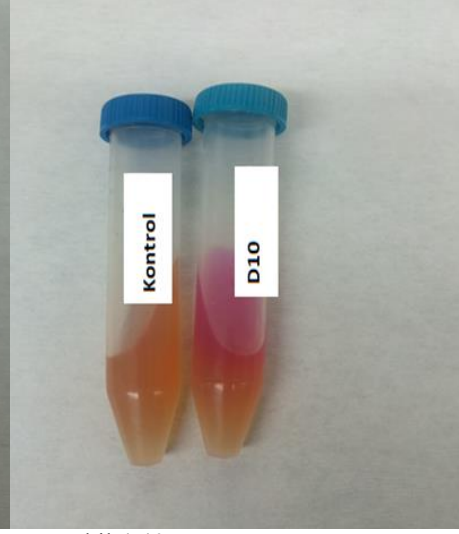


Şekil 4.37 D7 suşunun üreaz testi

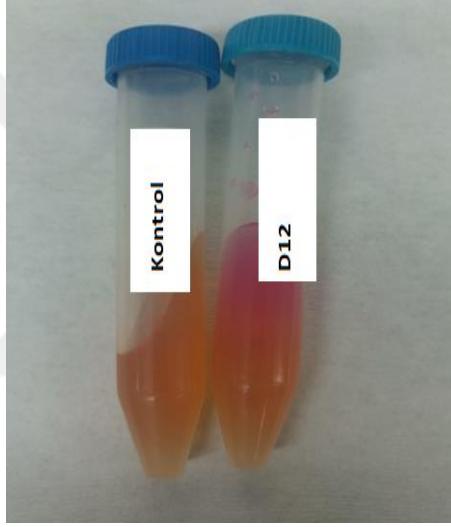
Şekil 4.38 D8 suşunun üreaz testi



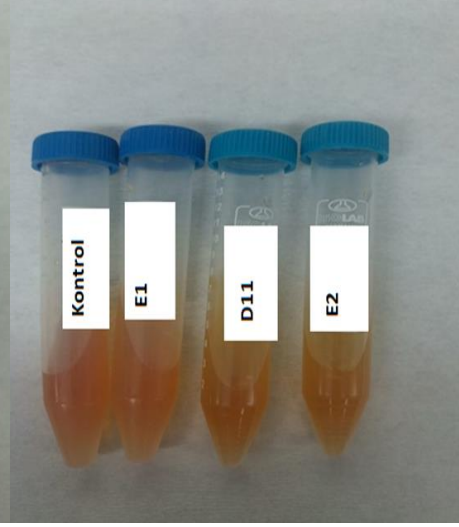
Şekil 4.39 D9 suşunun üreaz Testi



Şekil 4.40 D10 suşunun üreaz Testi



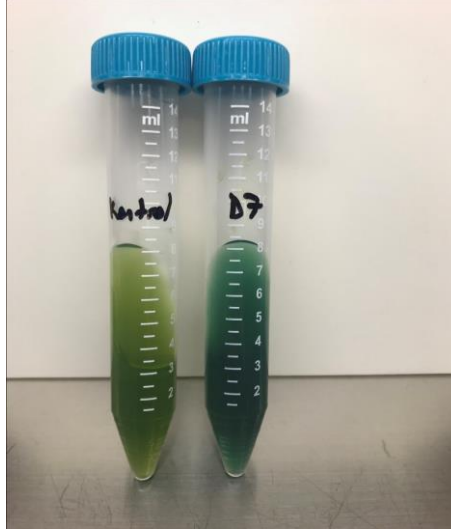
Şekil 4.41 D12 suşunun üreaz Testi



Şekil 4.42 D11, E1 ve E2 suşlarının üreaz testi

4.4.6 Sitrat testi

Değerlendirme yapılırken Simmons citrate besiyerinde, uygun bir inkubasyondan sonra üreme olmaması ve yeşil rengin korunması negatif olarak ve ekim hattı boyu üremeye beraber koyu mavi renk oluşması da pozitif reaksiyon olarak değerlendirme yapıldı. Şekil 4.43-4.50, çalışılan suşlarının sitrat testi sonuçlarını görülmektedir. Bu şekillerde sitrat testi, D7, D8, D9, D10, D11 ve D12 suşları için pozitif reaksiyon verirken, E1 ve E2 güçlü pozitif reaksiyon verdiği tespit edildi.



Şekil 4.43 D7 suşunun sitrat testi



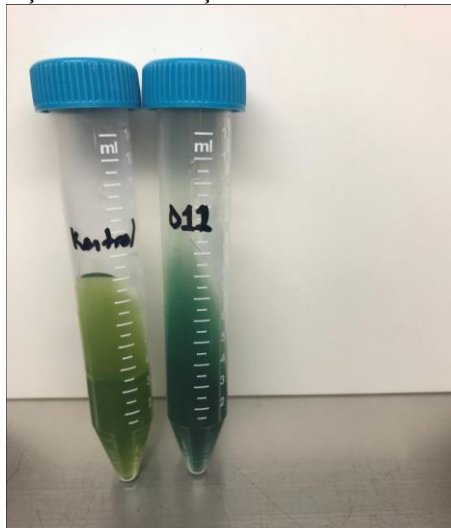
Şekil 4.44 D8 suşunun sitrat testi



Şekil 4.45 D9 suşunun sitrat testi



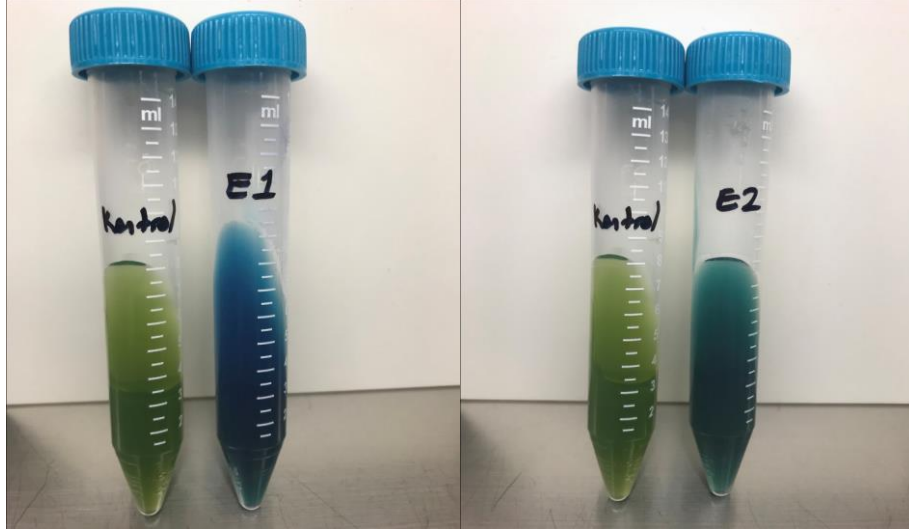
Şekil 4.46 D10 suşunun sitrat testi



Şekil 4.47 D11 suşunun sitrat testi



Şekil 4.48 D12 suşunun sitrat testi

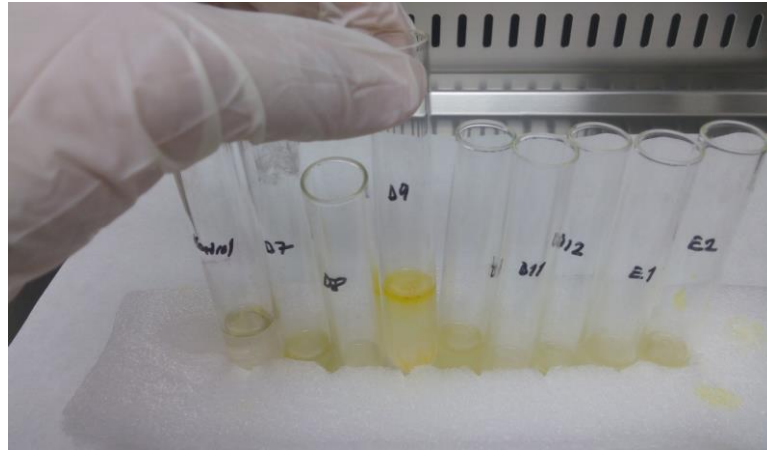


Şekil 4.49 E1 suşunun sitrat testi

Şekil 4.50 E2 suşunun sitrat testi

4.4.7 İndol testi

Suşların triptofanı ayrıştırıp indol oluşup oluşmadığını tespit için triptofanı içeren sıvı besiyeri ortamına taze bakteri kültürlerinden ekim yapıldı. Daha sonra, optimum koşullarda inkübasyona bırakıldıktan sonra inkübasyon sonunda kültürler üzerine kovaks ayıracı eklenip 1-2 dakika beklendi. Değerlendirmede, tüpün üst kısmında 1-2 dk kırmızı halka olması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Sarımsı halka indol oluşmadığını göstermektedir (indol testi, negatif) ve oluşan renk indol de bulunan pirol'den kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.51 İzole edilen suşlarının indol testi

Şekil 4.51' de görüldüğü gibi D7, D8, D10, D11, D12, E1 ve E2 suşları negatif sonuç verirken D9 suşu pozitif sonuç gösterdi.

Tablo 4.4'de görüldüğü gibi izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin toplu olarak sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.4 İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin toplu gösterimi

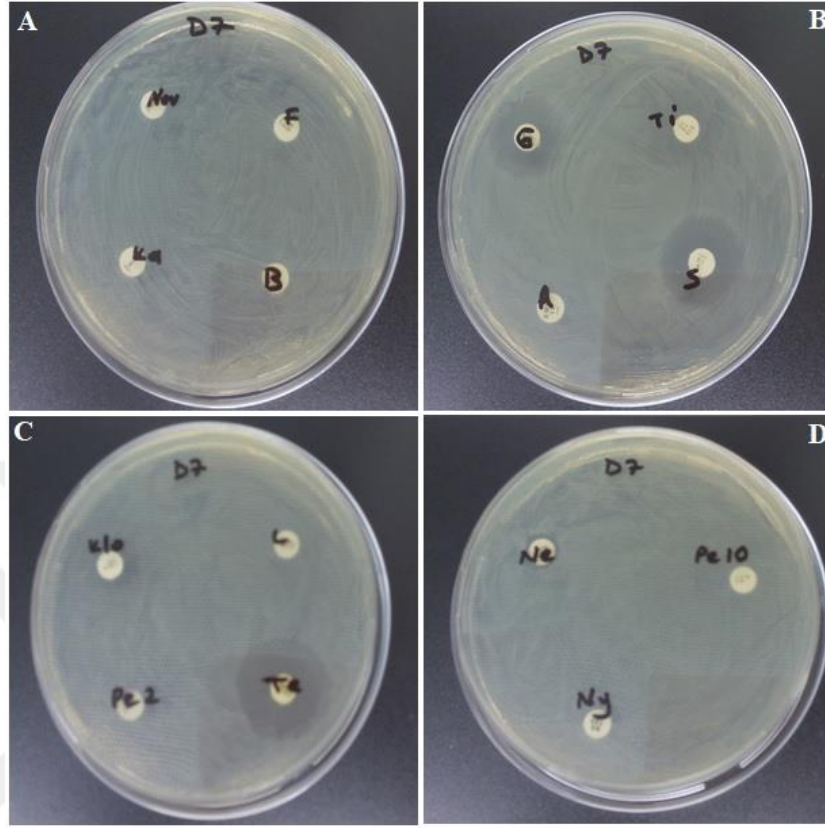
Özellik	D7	D8	D9	D10	D11	D12	E1	E2
Hücre şekli	B	B	B	B	K	B	K	K
Gram	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Özelligi								
Hareket	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Spor	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Oksijen kullanımı	A	A	A	A	A	A	A	A
Ürediği sıcaklık aralığı (°C)	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40
Optimum üreme sıcaklığı (°C)	30	30	35	35	35	30	35	35
Ürediği pH aralığı	5.0-11.0	3.0-11.0	5.0-10.0	5.0-10.0	5.0-10.0	5.0-9.0	5.0-10.0	4.0-10.0
Optimum üreme pH	9.0	5.0	9.0-10.0	5.0	8.0-10.0	5.0-9.0	9.0-10.0	4.0-10.0
Nişasta hidrolizi	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(++)
Jelatin Hidroliz	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oksidaz	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
Sitrat	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)
Üreaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
İndol	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NaCl (%)	%5	%7	%3	%5	%3	%5	%3	%5

+ pozitif ; ++ güçlü pozitif ; - negatif; B=Basil; K=Kokobasil; A= aerobik

4.5 Antibiyotik Duyarlılık Testi

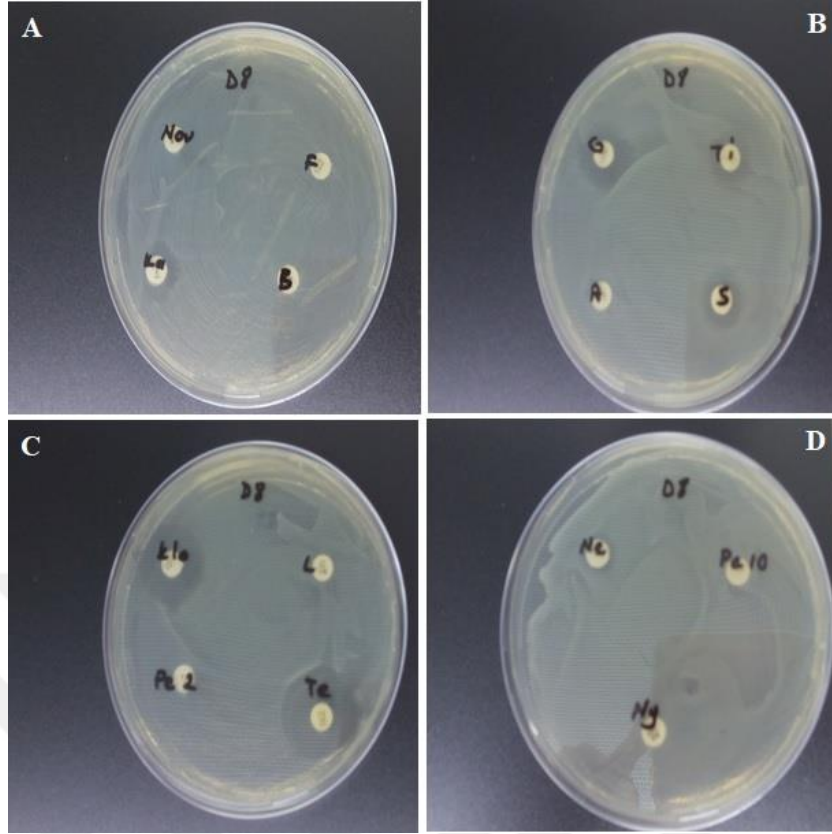
Antibiyotik duyarlılık testini belirlemek için, 24 saat'lik taze kültürden hazırlanan suşların NA katı besiyeri üzerinde yayma şeklinde ekim yapıldıktan sonra, kuruyan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, inkübasyon süresi sonucunda antibiyotik disklerin etrafında zon olup olmadığı gözlemlenerek ve zon büyüklüğü ölçüldü. Suşlara ait antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4.5'de görülmektedir. Testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Antibiyotik diskler; A (Ampisilin 10 µg), F (Fusidik asit 10 µg), Nov (Novobiyosin 5 µg), L (Linkomisin 15 µg), Ne (Neomisin 10 µg), Ka (Kanamisin 5 µg), Klor (Kloramfenikol 30 µg), Ti (Tilmikosin 15 µg) , Ny (Nistatin 100 units), G Gentamisin (10 µg), S

(Streptomisin 10 µg), Pe 2 (Penisilin 2 Units), T (Tetrasiklin 30 µg), Pe 10 (Penisilin 10 units), Basitrasin 10 units (B).



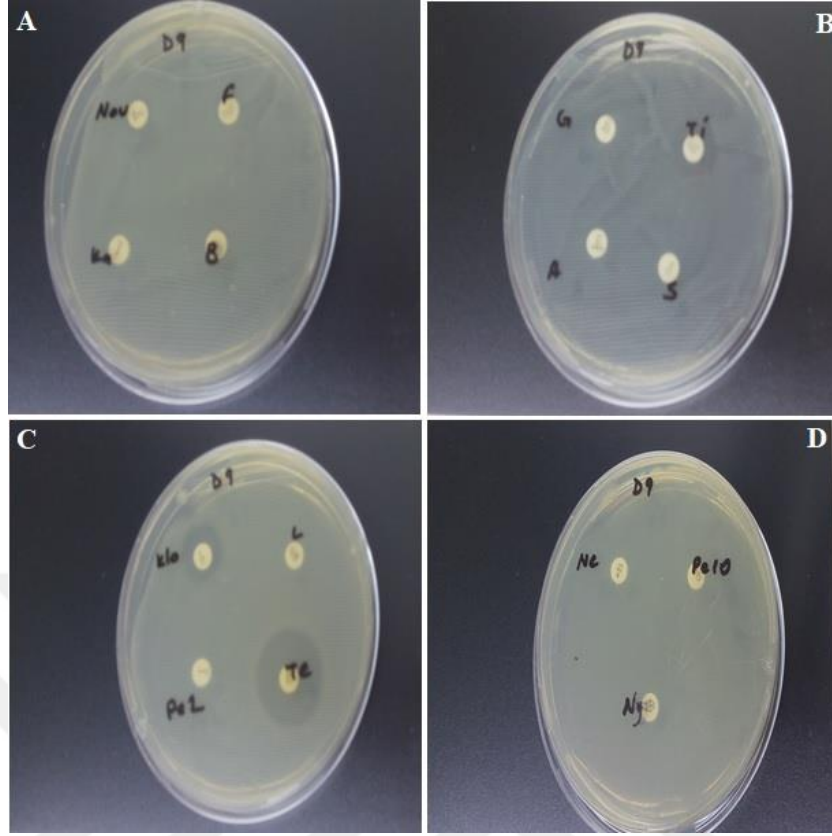
Şekil 4.52 D7 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5, B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

Şekil 4.52’de D7 suşunun antibiyotiklere duyarlılığını göstermektedir. D7 suşunun ampisilin (0), fusidik asit (0), kanamisin (0), basitrasin (0), tilmikosin (0), novobiyosin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), Penisilin 10 unit (0), nistatin (0), neomisin (6 mm), kloromfenikol (10 mm)’e dirençlilik gösterirken, gentamisin (27 mm), streptomisin (27 mm) ve tetrasiklin (31 mm)’e duyarlı olduğu bulundu.



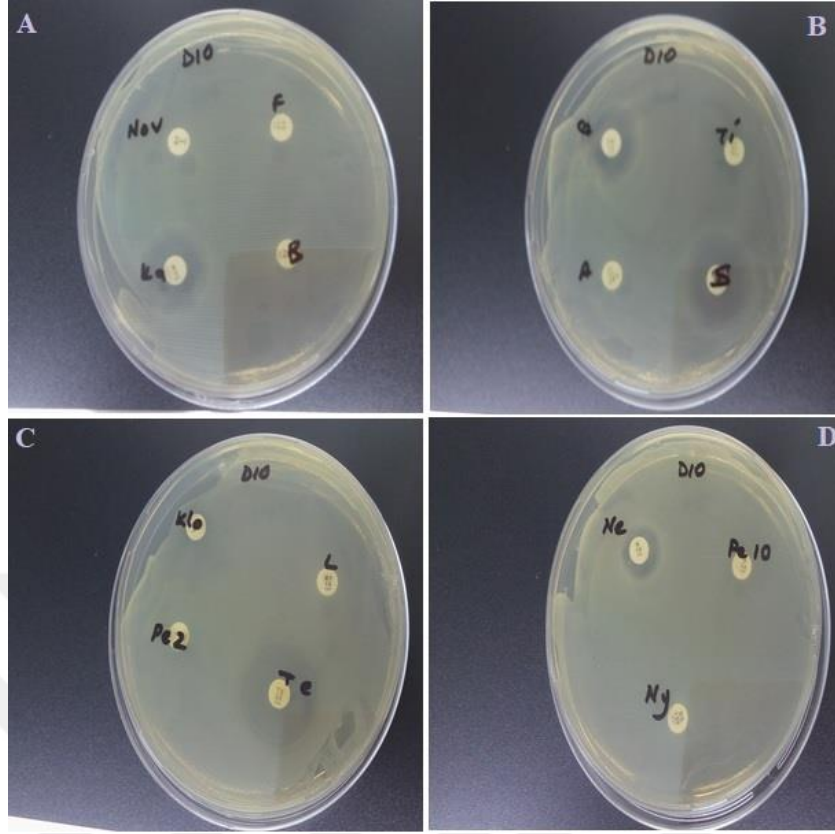
Şekil 4.53 D8 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

D8 suşunun şekil. 4.53' de antibiyotiklere duyarlılığını göstermektedir. D8 suşunun ampicilin (0), fusidik asit (0), novobiyosin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), basitrasin (0), nistatin (0), neomisin (6 mm), streptomisin (12mm), kanamisin (12 mm)'e dirençlik gösterirken, gentamisin (15 mm) ve tilmikosin (18 mm)'e yarı duyarlı, kloramfenikol (30 mm) ve tetrasikline (33 mm) duyarlı bulundu.



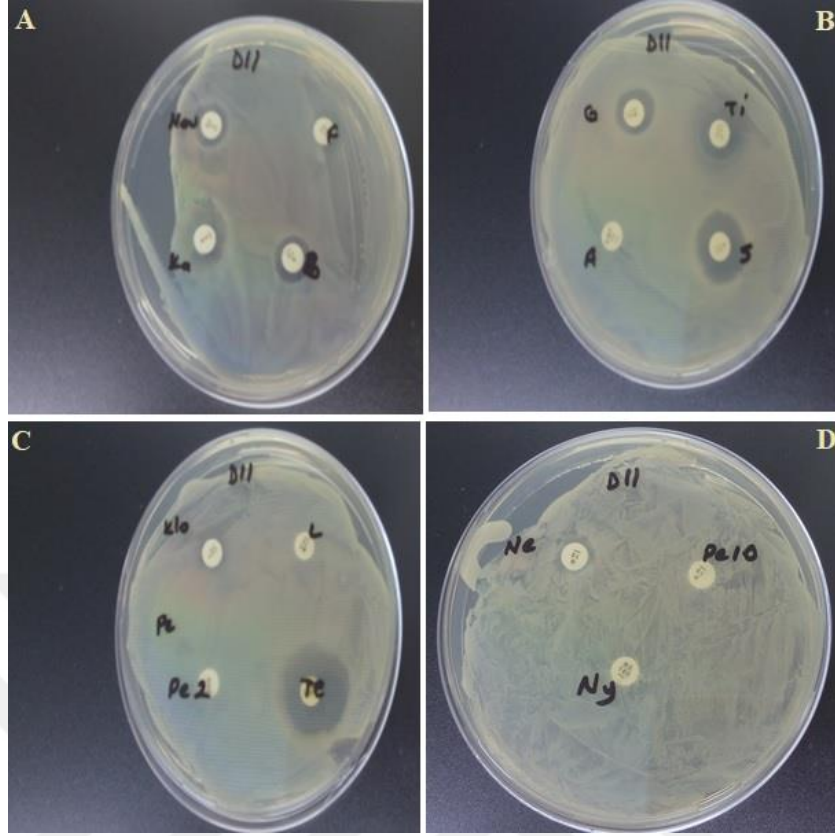
Şekil 4.54 D9 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

Şekilde 4.54’de görüldüğü gibi D9 suşunun antibiyotiklerine duyarlılığını göstermektedir. D9 suşunun ampisilin (0), fusidik asit (0), novobiosin (0), kanamisin (0), basitrasin (0), gentamisin (0), streptomisin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (9), penisilin 10 unit (0), neomisin (0), nistatin (0)’e dirençlik gösterirken, kloramfenikol (12 mm) ve tilmikosin (13 mm)’e yarı duyarlı, tetrasiklin (33 mm)’e duyarlı olduğu bulundu.



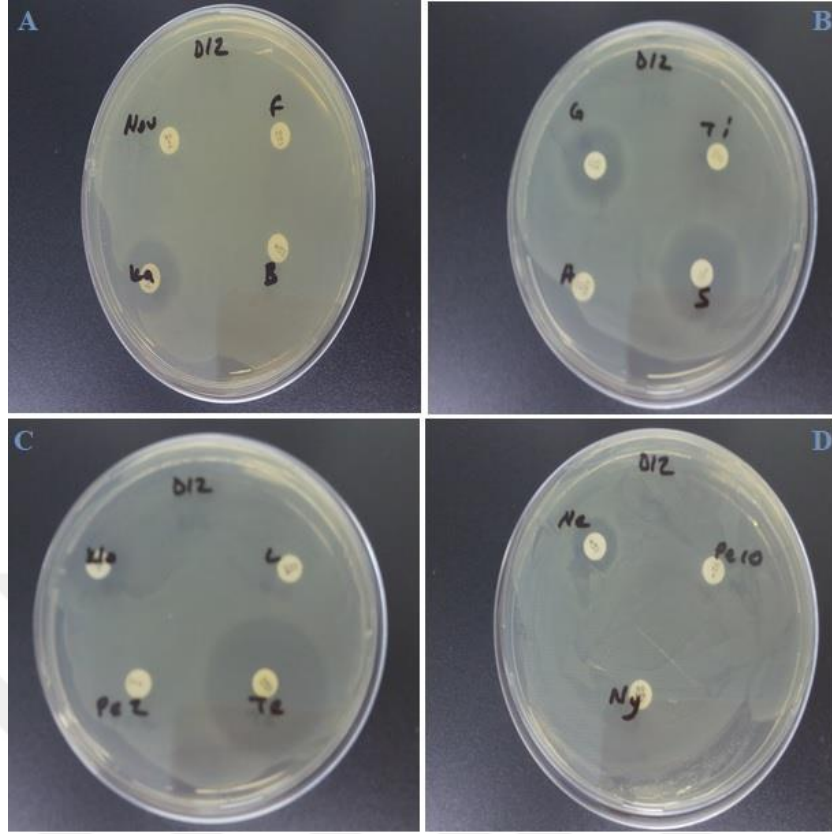
Şekil 4.55 D10 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A; Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

Şekil 4.55’de D10 suşunun antiyotiklere duyarlılığını göstermektedir. D10 suşunun ampisilin (0), fusidik asit (0), basitrasin (0), tilmikosin (0), novobiyosin (0, kloromfenikol (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), nistatin (0), neomisin (11 mm)’e dirençlik gösterirken, kanamisin (15mm), streptomisin (17 mm)’e yarı duyarlı olduğu, gentamisin (19 mm) ve tetrasiklin (20 mm) duyarlı olduğu bulundu.



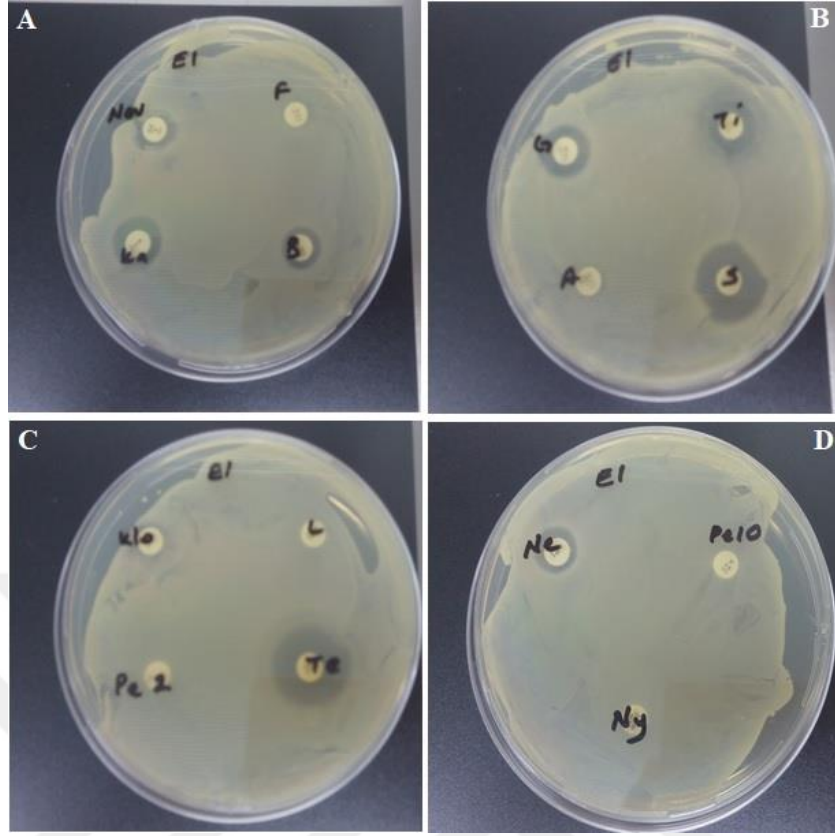
Şekil 4.56 D11 suşunun antibiyotiklerine duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

D11 suşunun antibiyotiklere duyarlılığını Şekil 4.56’da görülmektedir. D11 suşunun ampisilin (0), fusidik asit (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), neomisin (0), nistatin (0), kloramfenikol (0), basitrasin (9 mm), novobiosin (9 mm), gentamisin (12 mm)’e dirençlik gösterirken, kanamisin (13 mm) ve tilmikosin (15 mm)’e, yarı duyarlı, streptomisin (19 mm) ve tetrasiklin (20mm)’e duyarlı bulundu.



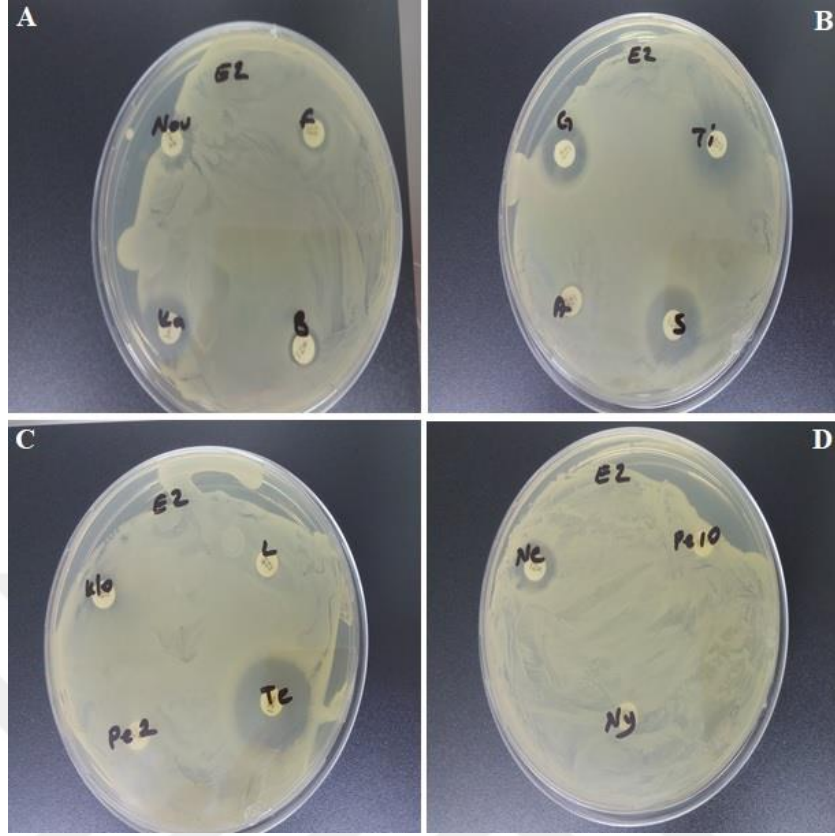
Şekil 4.57 D12 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

Şekilde 4.57’de D12 suşunun antibiyotiklere duyarlılığını göstermektedir. D12 suşunun ampicilin (0), fusidik asit (0), basitrasin (0), novobiyoisin (0), tilmicosin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), nystatin 0), neomisin (12 mm)’e dirençlik gösterirken, kloromfenikol (13 mm) ve kanamisin (15 mm)’e yarı duyarlı, gentamisin (18 mm), streptomisin (25 mm) ve tetrasiklin (39 mm)’e duyarlı olduğu bulundu.



Şekil 4.58 E1 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10 C: Klo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30 D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

E1'in antibiyotiklere duyarlılığını Şekil 4.58'de görülmektedir. E1 suşunun ampicilin (0), fusidik asit (0), kanamisin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), nistatin (0), kloramfenikol (0), basitrasin (6 mm), novobiosin (6 mm), neomisin (6 mm), gentamisin (11 mm)'e dirençlik gösterirken, Streptomisin (19 mm), Tetrasiklin (19 mm) ve Tilmicosin (20 mm)'e duyarlı bulundu.



4.59 E2 suşunun antibiyotiklere duyarlılığı (A: Nov 5, F 10, Ka 5 ve B 10; B: G 10, Ti 15, A 10 ve S 10; C: KLo 30, L 15, Pe 2 ve Te 30; D: Ne 10, Pe 10 ve Ny 100)

Şekilde 4.59’da E2’nin antibiyotiklere duyarlılığı görülmektedir. Ampisilin (0), linkomisin (0), penisilin 2 unit (0), penisilin 10 unit (0), nistatin (0), fusidik asit (6mm), kloramfenikol (6 mm), basitrasin (8 mm), novobiosin (11mm), neomisin (11 mm), kanamisin (12 mm)’e dirençlik gösterirken, gentamisin (13 mm)’e yarı duyarlı, dirençli, tilmikosin (17 mm), streptomisin (19 mm) ve tetrasiklin (23 mm)’e duyarlı bulundu.

Tablo 4.5 İzole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları (mm: zon)

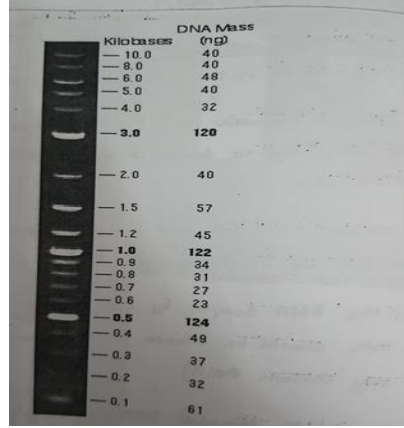
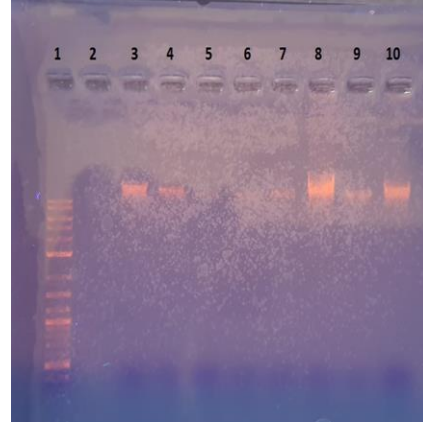
Antibiyotikler	D7	D8	D9	D10	D11	D12	E1	E2
Novobiyosin (5µg)	0	0	0	0	9	0	6	11
Fusidik asit (10 µg)	0	0	0	0	0	0	0	6
Kanamisin (5 µg)	0	12	0	15	13	15	0	12
Basitrasin (10 units)	0	0	0	0	9	0	6	8
Gentamisin (10 µg)	27	15	0	19	12	18	11	13
Tilmikosin (15 µg)	0	18	13	0	15	0	20	17
Ampisilin (10 µg)	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptomisin (10 µg)	27	12	0	17	19	25	19	19
Kloramfenikol (30 µg)	10	30	12	0	0	13	0	6
Linkomisin (15µg)	0	0	0	0	0	0	0	0
Penisilin G (2 units)	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetrasiklin (30 µg)	31	33	33	20	20	39	19	23
Neomisin (10 µg)	6	6	0	11	0	12	6	11
Penisilin (10 units)	0	0	0	0	0	0	0	0
Nistatin (100 units)	0	0	0	0	0	0	0	0

(Dirençli (0-12 mm), yarı duyarlı (13-18 mm), duyarlı (>18 mm))

4.6 16S rRNA Dizi Analizi ile Bakterilerin Filogenetik Tanımlanması

4.6.1 Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi

İzole edilen bakteriler ait kromozomal DNA'larının saflığının belirlemek amacıyla %1 agaroz jel elektroforezinde yürütölüp analiz edildi. Şekil 4.60 B'de görüldüğü üzere DNA markırı kullanılmıştır. 3, 4, 5, 7, 8, 9 ve 10 kuyucuklarda izole edilen bakterilere ait kromozomal DNA'larının kullanılan standart DNA markırına göre 10 kb'dan büyük olduğu ve miktarlarının 50 ng'dan büyük oldukları belirlendi. Tek bant olarak görülmeleri ise RNA'dan arındırılmış olduğunu göstermektedir.

A**B**

Şekil 4.60 Kromozomal DNA'nın agaroz jel görüntüsü (A. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan standart DNA markırı (New England Biolabs), B. Suşlara ait kromozomal DNA 1: Lader, 2:Boş, 3:D7,4:D8, 5:D9: D10, 7:D11, 8:D12, 9:E1 ve 10:E2 DNA)

4.6.2 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA'ların konsantrasyonunu hesaplamak ve saflığının belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi. İzole edilen DNA'lar, 260 nm ve 280 nm'de absorbansları ayrı ayrı ölçüldü. DNA saflığını belirlemek için bu formülüyle;

DNA saflığı= $A_{(260)}/A_{(280)}$ hesaplandı.

DNA'ların konsantrasyonu belirlemek için ise şu formül kullanılarak hesaplandı;

DNA konsantrasyonu $50 \times A_{(260)} \times 100$. Tablo 4.6 'da izole edilen kromozomal DNA'ların saflık ve konsantrasyon miktarları bulundu.

Tablo 4.6. İzole edilen kromozomal DNA'ların saflık durumları (A_{260}/A_{280}) ve konsantrasyon oranları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Bakteriler	A_{260}/A_{280}	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
D7	1,925	25,50
D8	1,714	22,22
D9	1,830	4,279
D10	1,878	7,809
D11	1,543	10,08
D12	1,900	71,44
E1	1,593	19,60
E2	1,532	26,93

4.6.3 İzole edilen suşların 16S rRNA gen dizilerinin analizi

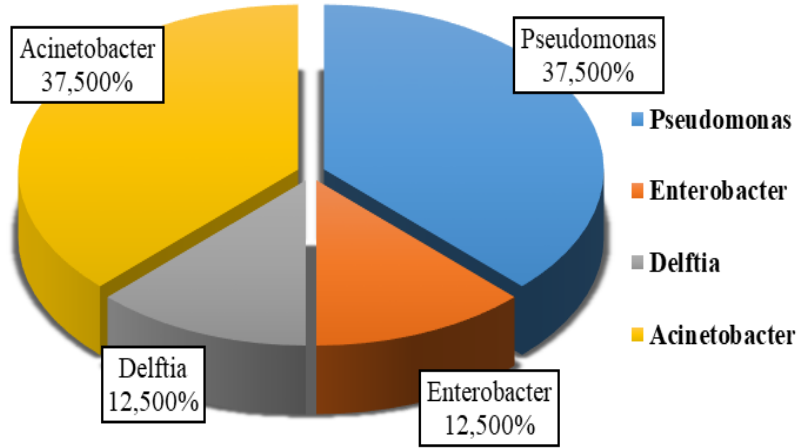
Saflaştırılan DNA'lar PCR amplifikasyonu için ve 16S rRNA gen analizi için hizmet alımı yapıldı (BMLabosis (Ankara). Bu dizileri karşılaştırmak için bir BLAST araştırması (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kullanan GenBank veri tabanı kullanıldı. 16S rRNA gen benzerlikleri, en yakından ilişkili suşları belirleyerek veri tabanından alındı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. İzole edilen bakterilerin 16S rRNA gen dizilerine benzerlik oranları

Sayı	İzolat	Bakteriler	Dizi uzunluğu (baz çifti)	Benzerlik oranı (%)
1	D7	<i>P. aeruginosa</i>	1402	100
2	D8	<i>E. ludwigii</i>	1413	100
3	D9	<i>D. tsuruhatensis</i>	1405	100
4	D10	<i>P. putida</i>	1388	100
5	D11	<i>A. pittii</i>	1407	99,93
6	D12	<i>P. rhodesiae</i>	1400	100
7	E1	<i>A. pittii</i>	1383	100
8	E2	<i>A. calcoaceticus</i>	1393	100

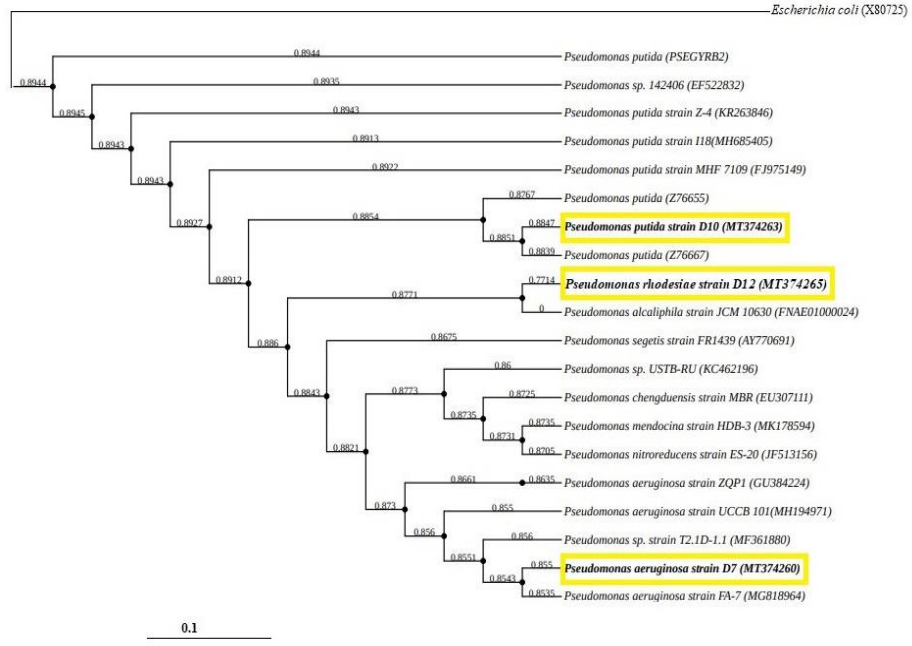
D7 suşu 1402 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analiz sonucuna göre, *P. aeruginosa*'ya %100 benzediği; D8'in 1413 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre *E. ludwigii*'ye %100; D9'un 1405 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre *D. tsuruhatensis*'e %100 oranında; D10 'nun 1388 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre *P. putida*'ya %100; D11 'nin 1407 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre *A. pittii* 'ye % 99,93; D12'nin 1400 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre *P. rhodesiae*'ya %100; E1'in 1383 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre, *A. pittii*'ye %100; E2'nin 1393 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre, *A. calcoaceticus*'a %100 oranında benzediği belirlendi. Mesafe matriks hesaplanmasından sonra filogenetik ağaçlar neighbour-joining metodu ile çizimi yapıldı.

Petrolle kirletilmiş topraktan izole edilen suşların dağılım yüzdesi Şekil (4.61) görülmektedir. Buna göre *Pseudomonas* %37,500, *Enterobacter* %12,500, *Delftia* %12,500 ve *Acinetobacter* %37,500 şeklinde dağılım göstermiştir.



Şekil 4.61 Elde edilen suşların dağılım yüzdesi

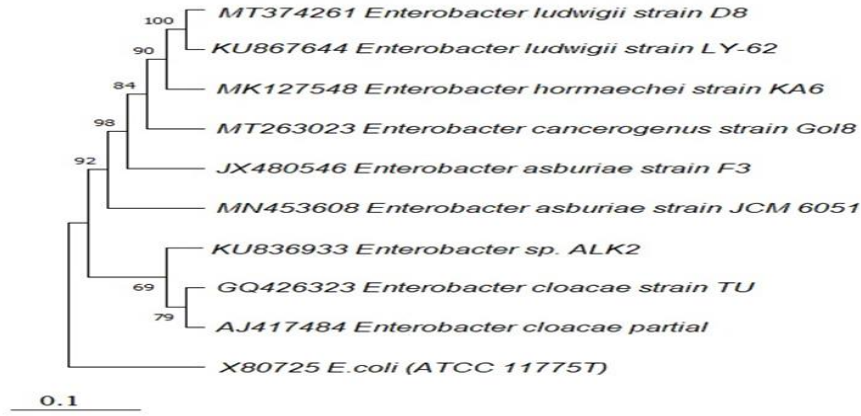
Şekil 4.62’de görüldüğü gibi D7, D10, D12 suşları petrol parçalayan diğer *Pseudomonas*’larla kıyaslaması yapılmıştır. *Pseudomonas putida* strain MHF 7109 (FJ975149), *Pseudomonas* sp. Strain USTB-RU (KC462196), *Pseudomonas mendocina* strain HDB-3 (MK178594), *Pseudomonas* sp. strain KA (FN421340), *Pseudomonas aeruginosa* strain FA-7 (MG818964), *Pseudomonas putida* strain I18 (MH685405), *Pseudomonas putida* (Z76667), *Pseudomonas alcaliphila* strain JCM 10630 (FNAE01000024), *Pseudomonas aeruginosa* ZQP1 (GU84224), *Pseudomonas aeruginosa* UCCB 101 (MH194971) bakterileri kullanılarak, Tablo 4.7’de belirtilen baz çiftleri üzerinden kıyaslama yapılmıştır. Benzerliklere göre filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi ve CLUSTAL W programı kullanılarak oluşturulmuştur. Şekil 4.62’de D7, D10, D12 ile diğer *Pseudomonas* türlerin fiogenetik ağacı gösterilmiştir.



Şekil 4.62 D7, D10 ve D12 suşlarına ait 16S rRNA dizi analizleri yardımıyla elde edilen filogenetik ağaç. Bootstrap değerleri 1,000 olarak gösterildi. *Escherichia coli* (X80725) Out-grup olarak kullanıldı. Bar değerleri 0,1 nükleotitik dizilimini göstermektedir.

Şekil 4.62’de görüldüğü gibi D7 suşu petrol parçalayan bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* FA-7’ye, D10 suşu *Pseudomonas putida*’ya ve D12 *Pseudomonas alcaliphila* strain JCM 10630’a benzerlik göstermektedir.

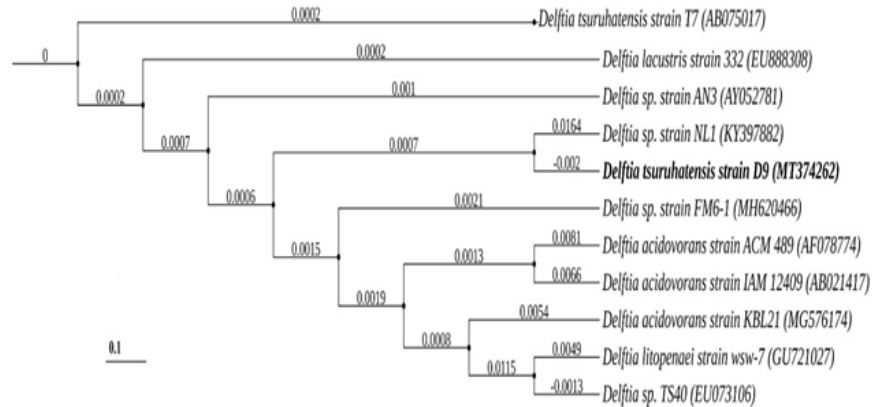
D8 suşunun petrol parçalayan diğer *Enterobacter*’lerle kıyaslaması yapılmıştır. *Enterobacter hormaechei* strain KA6 (MK127548), *Enterobacter* species strain ALK-23 (KU836933), *Enterobacter cloacae* strain TU (GQ426323), *Enterobacter* sp. strain F3(JX480546), *Enterobacter ludwigii* strain LY-62 (KU867644), *Enterobacter ludwigii* strain EN-119T (AJ853891), *Enterobacter ludwigii* strain MS32 bakterileri kullanılarak 1413 bç kıyaslanmıştır. Benzerliklere göre filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi ve CLUSTAL W programı kullanılarak oluşturulmuştur. D8 ile diğer *Enterobacter* türlerin fiogenetik ağacı Şekil 4.63’de gösterilmiştir.



Şekil 4.63 D8 suşuna ait 16S rRNA dizi analizi yardımıyla elde edilen filogenetik ağaç. Bootstrap değerleri 1,000 olarak gösterildi. *Escherichia coli* (X80725) Out-grup olarak kullanıldı. Bar değerleri ise 0,1 nükleotitik dizilimini göstermektedir.

Şekil 4.63’de görüldüğü gibi D8 suşu petrol parçalayan bakterilerden *Enterobacter ludwigii* strain LY-62 ‘e benzerlik göstermektedir.

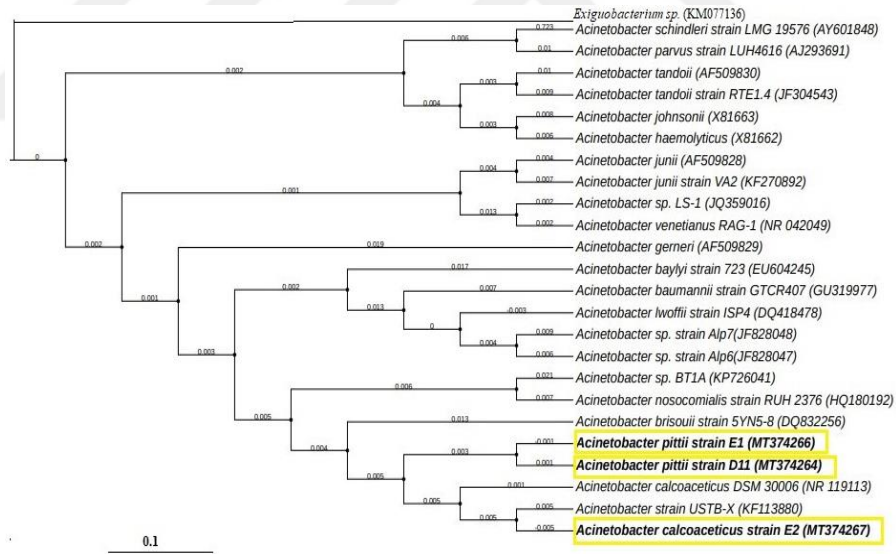
D9 suşunun petrol parçalayan diğer *Delftia*’larla kıyaslaması yapılmıştır. *Delftia tsuruhensis* strain T7T (AB075017), *Delftia rhizosphaerae* strain RA6T (KY075818), *Delftia* sp. strain NL1 (KY397882), *Delftia lacustris* strain 332T (EU888308), , *Delftia acidovorans* strain ACM 489 (AF078774), *Delftia* sp. strain AN3 (AY052781), *Delftia acidovorans* strain KBL21 (MG576174) bakterileri kullanılarak 1405 bç kıyaslanmıştır. Benzerliklere göre filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi ve CLUSTAL W programı kullanılarak oluşturulmuştur. D9 ile diğer *Delftia* türlerine ait fiogenetik ağaç Şekil 4.64’de gösterilmiştir.



Şekil 4.64 D9 suşuna ait 16S rRNA dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç. Bootstrap değerleri 1,000 olarak gösterildi. Bar değerleri ise 0,1 nükleotitik dizilimini göstermektedir.

Şekil 4.64’de görüldüğü gibi D9 suşu petrol parçalayan bakterilerden *Delftia* sp. strain NL1’e benzerlik göstermektedir.

Şekil 4.65’de D11, E1 ve E2 suşlarına ait filogenetik ağaç sonuçları görülmektedir. *Acinetobacter* sp. strain LS-1 (JQ359016), *Acinetobacter* strain USTB-X (KF113880), *Acinetobacter* sp. strain Alp6 (JF828047), *Acinetobacter* sp. strain Alp7 (JF828048), *Acinetobacter tandoii* strain RTE1.4 (JF304543), *Acinetobacter* sp. strain BT1A (KP726041), *Acinetobacter junii* strain VA2 (KF270892), *Acinetobacter junii* (AF509828), *Acinetobacter baumannii* strain GTCR407 (GU319977), *Acinetobacter tandoii* (AF509830), *Acinetobacter johnsonii* (X81663), *Acinetobacter lwoffii* strain ISP4 (DQ418478), *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006 (NR119113) bakterileri kullanılarak Tablo 4.7’de belirtilen baz çiftleri üzerinden kıyaslama yapılmıştır. Benzerliklere göre filogenetik ağaç, CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen, Danimarka) yazılım paketi ve CLUSTAL W programı kullanılarak oluşturulmuştur. D11, E1 ve E2 ile diğer *Acinetobacter* türlerin fiogenetik ağacı Şekil 4.65’de gösterilmiştir.

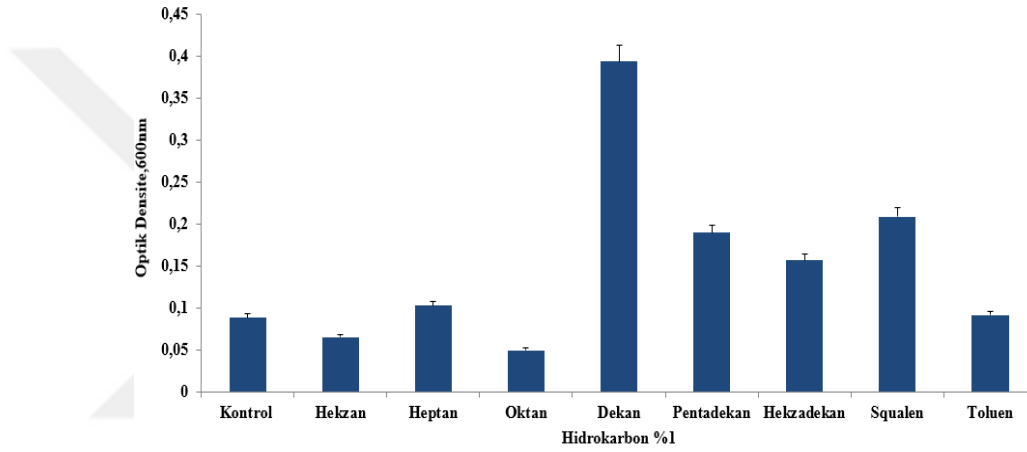


Şekil 4.65 D11,E1 ve E2 suşuna ait 16S rRNA dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç. Bootstrap değerleri 1,000 olarak gösterildi. *Exiguobacterium* sp. (KM077136) Out-grup olarak. Bar değerleri ise 0,1 nükleotitik dizilimini göstermektedir.

Şekil 4.65’de görüldüğü gibi D11 suşu petrol parçalayan bakterilerden *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006, E1 suşu *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006, E2 suşu *Acinetobacter* strain USTB-X benzerlik gösterdiği bulundu.

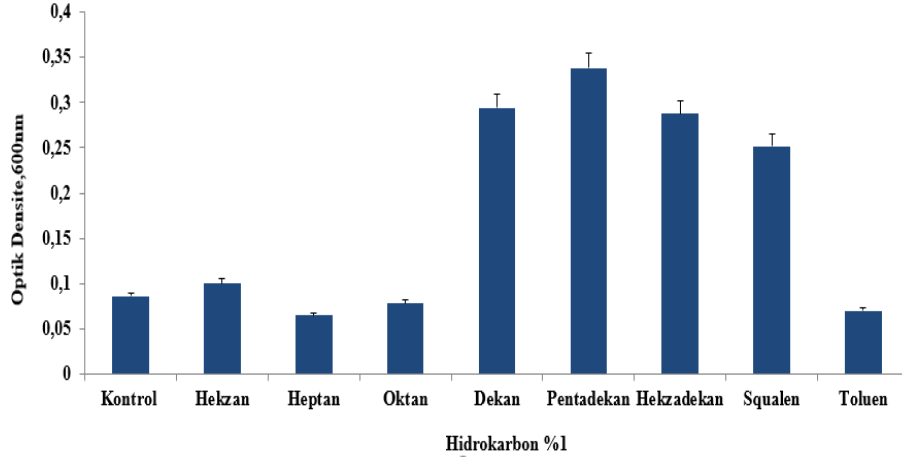
4.7 Bakterilerin Çeşitli Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen ve tanımlanan suşların farklı hidrokarbonları kullanıp yada kullanamadıklarını belirlemek amacıyla materyal metotta ayrıntılı şekilde açıklandığı gibi hazırlanan BM'ye %1 (v/v) oranında farklı hidrokarbonlar eklenerek taze bakteri kültüründen alınarak ekim yapıldı. Çalışılan suşlar, optimum şartlarda 120 rpm'de 30°C'da %1'lik farklı hidrokarbonlarda 3 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra İnkübasyon sonunda 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümler alınarak ve sonuçlar hidrokarbon içermeyen ama bakteri içeren kontrolle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı. OD değerleri ise 3 ayrı tekrarın ortalamasından elde edildi.



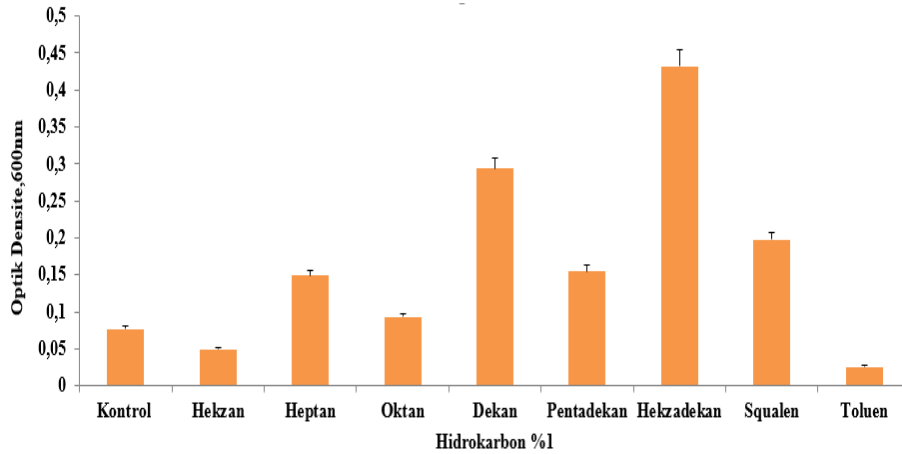
Şekil 4.66 D7 Suşunun farklı %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

Şekil 4.66'da D7 suşunun değişik hidrokarbonlarda çoğalma oranları görülmektedir. D7 suşunun karbon ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için alkan hidrokarbonlarını kullandığını göstermektedir. Bakteri suşu D7'in, çok kısa zincirli alkanlar yerine dekan, pentadekan, hekzadekan ve skualen gibi orta ve uzun zincirli alkanları degradasyona uğrattığı ve bu bileşikleri kullanarak çoğaldığı görülmektedir. Fakat hekzan, heptan, oktan ve tolüen ortamında çoğalmanın kontrole yakın olduğu ve üremenin olmadığı bulundu. D7 suşunun OD değerleri kontrolle karşılaştırıldığında en iyi dekan ortamında ürediği ve yaklaşık 4 kat çoğaldığı, squalenin 2, pentadekan ve hekzadekan ortamında ise 1 kat çoğalma gerçekleştiği görüldü.



Şekil 4.67 D8 suşunun değişik %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

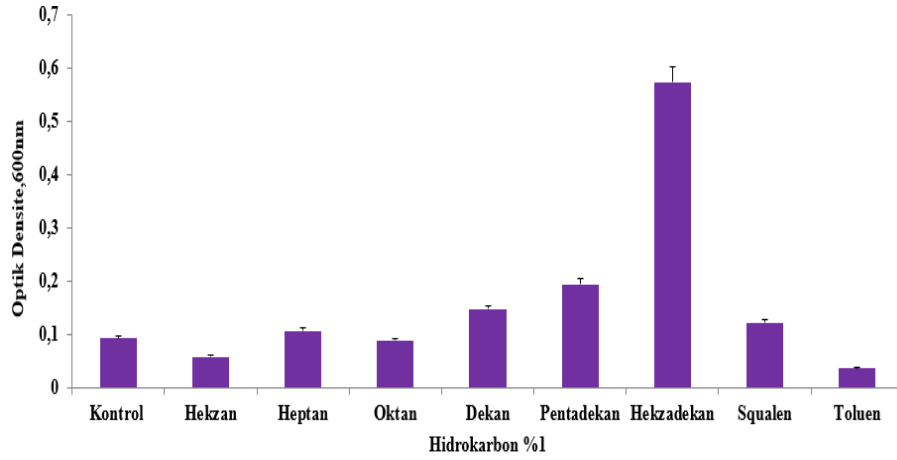
Değişik hidrokarbonlarda D8 suşunun çoğalması Şekil 4.67'de görülmektedir. D8 suşunun karbon ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için alkan hidrokarbonları kullandığını göstermektedir. Bu bakteri suşunun, çok kısa zincirli alkanlar yerine dekan, pentadekan, hekzadekan ve skualen gibi hem orta hem de uzun zincirli alkanlarda büyük oranlarda çoğaldığı ve bozunma gerçekleştirdiği tespit edildi. En etkili şekilde pentadekan ortamında çoğaldığı bulundu. Kontrolle karşılaştırıldığında, hekzan, heptan, oktan ve tolüende, önemli derecelerde çoğalma olmadığı bulundu. Çoğalmanın dekan, pentadekan ve hekzadekan ortamında yaklaşık 3 kat arttığı ve squalende ise 2 kat artışı görüldü.



Şekil 4.68 D9 suşunun değişik hidrokarbonlarda (%1) çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

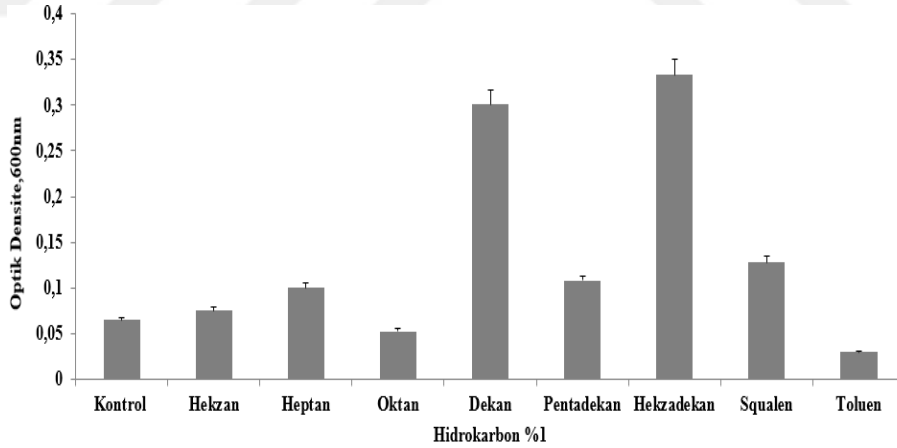
D9 suşunun değişik hidrokarbonlarda çoğalması Şekil 4.68'de görülmektedir. D9 suşu da kısa zincirli alkanlardan hekzan ve oktan ortamında üremediği, heptan ortamında kısmen çoğaldığı görülmektedir. Dekan, pentadekan, hekzadekan ve skualen gibi hem orta hem de uzun zincirli alkanlarda iyi oranlarda çoğaldığı belirlendi. En etkili şekilde hekzadekan ortamında ürediği bulundu. D9 suşunun OD değerleri kontrolle

karşılaştırıldığında hekzadekan ortamında çoğalmanın yaklaşık 4 kat, dekan 3 kat ve squalen ortamında ise 2 kat arttığı görüldü.



Şekil 4.69 D11 suşunun değişik hidrokarbonlarda (%1) çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

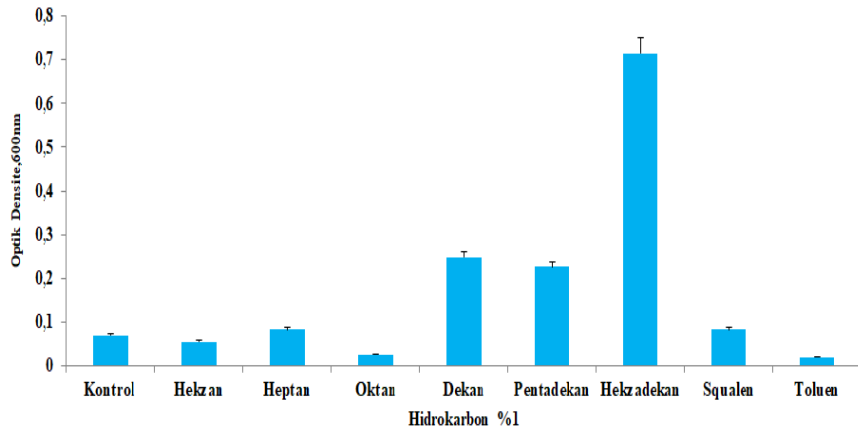
Değişik hidrokarbonlarda D11 suşunun çoğalması Şekil 4.69’da görülmektedir. D11 suşunun, en etkili biçimde hekzadekan ortamında çoğaldığı, ancak kısa zincirli alkanlar ile toluende büyük oranlarda üremediği belirlendi. D11 suşunun OD üreme değerleri kontrolle karşılaştırıldığında hekzadekan ortamında yaklaşık 5 kat çoğalma gerçekleştirdiği, dekan ve pentadekan ortamında göreceli artış gözlemlendi.



Şekil 4.70 D12 suşunun %1’lik değişik hidrokarbonlarda çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

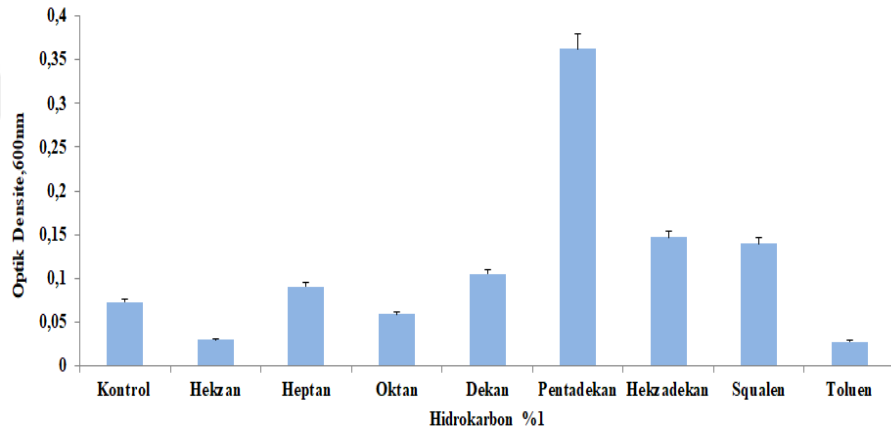
Şekil 4.70’de D12 suşunun değişik hidrokarbonlarda çoğalma oranları gösterilmiştir.

D12 Suşunun karbon ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için alkan hidrokarbonlarını kullandığı görülmektedir. D12 suşunun, heptan, pentadekan ve skualen ortamında göreceli şekilde çoğaldığı, dekan ve hekzadekan ortamında çok iyi ürediği bulundu. D12 suşunun OD değerleri kontrolle karşılaştırıldığında, çoğalmanın dekan ve hekzadekan ortamında yaklaşık 3 kat arttığı görüldü.



Şekil 4.71 E1 suşunun değişik %1'lik hidrokarbonlarda çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

E1 suşunun değişik hidrokarbon ortamlarında çoğalması Şekil 4.71'de görülmektedir. Bakteri suşu E1'nin, kısa zincirli alkanlar yerine dekan, pentadekan ve heksadekan gibi orta ve uzun zincirli alkan ortamında çoğaldığı bulundu. En iyi üremenin 7 kat olduğu heksadekan ortamında elde edildiği, pentadekan ve dekan ortamlarında ise yaklaşık 2 kat üremenin gerçekleştiği görüldü.

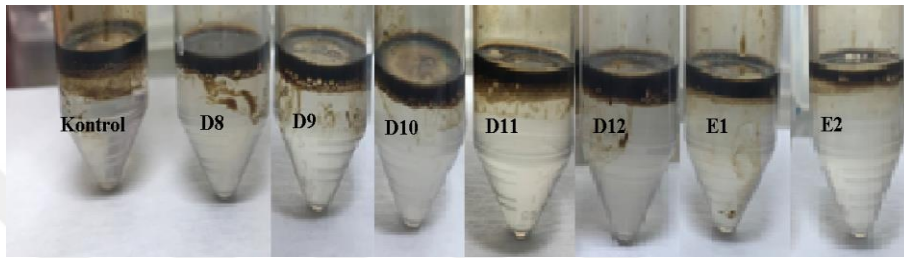


Şekil 4.72 E2 suşunun değişik hidrokarbon ortamlarında (%1) çoğalması. Her veri noktası 3 tekrarlı deneyin ortalamasını göstermektedir

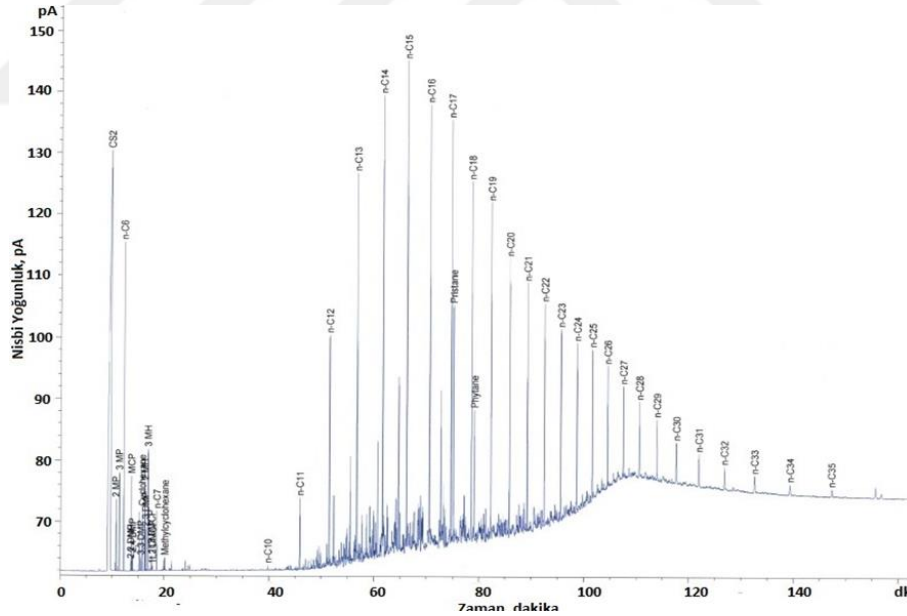
Şekil 4.72'de E2 suşunun değişik hidrokarbon ortamlarında çoğalmasını göstermektedir. Bakteri suşu E2'nin, heptan ve dekan ortamında kısmen çoğaldığı, heksadekan ve squalen ortamında iyi ürediği görülmektedir. Bununla beraber, pentadekan ortamında kontrole göre en iyi şekilde yaklaşık 4 kat çoğalma gösterdiği belirlendi.

4.8 Tanımlanan Bakterilerin Ham Petrolü Parçalama (Biyodegradasyon) Oranlarının GC-MS Analizi ile Belirlenmesi

İzolatlar tarafından ham petrolün biyodegradasyon analizi için, %1 (v/v) oranında ham petrol eklenen BM içine bakteri ekimi yapıldıktan sonra, optimum şartlarda 120 rpm'de 5 gün inkübasyonda bekletildi. Kontrol için ise, bakteri ekilmeyen BM ortamına %1'lik ham petrol ilave edilerek aynı koşullarda 5 gün inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.73'de inkübasyon sonunda kontrolle karşılaştırılma yapıldığında bakteri izolatlarının farklı düzeylerde ham petrolü parçaladıkları, bu nedenle üstteki petrol bantlarının kalınlığının azaldığı belirlendi.

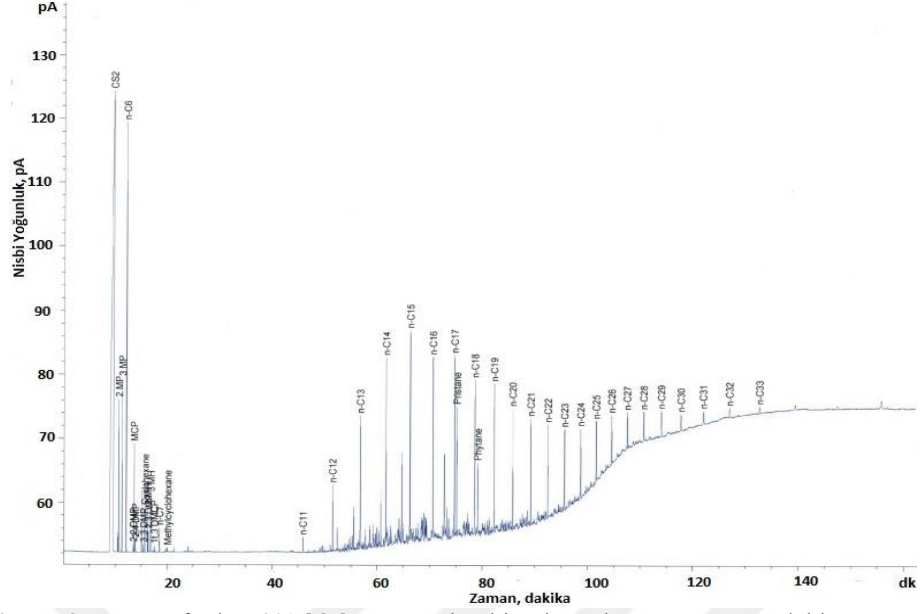


Şekil 4.73 İnkübasyon sonrasında %1'lik ham petrol ortamında bakteri izolatlarının üreme ve biyodegradasyon düzeylerinin görüntülenmesi



Şekil 4.74 %1'lik ham petrolün GC-MS analizi. Abiyotik kontrol

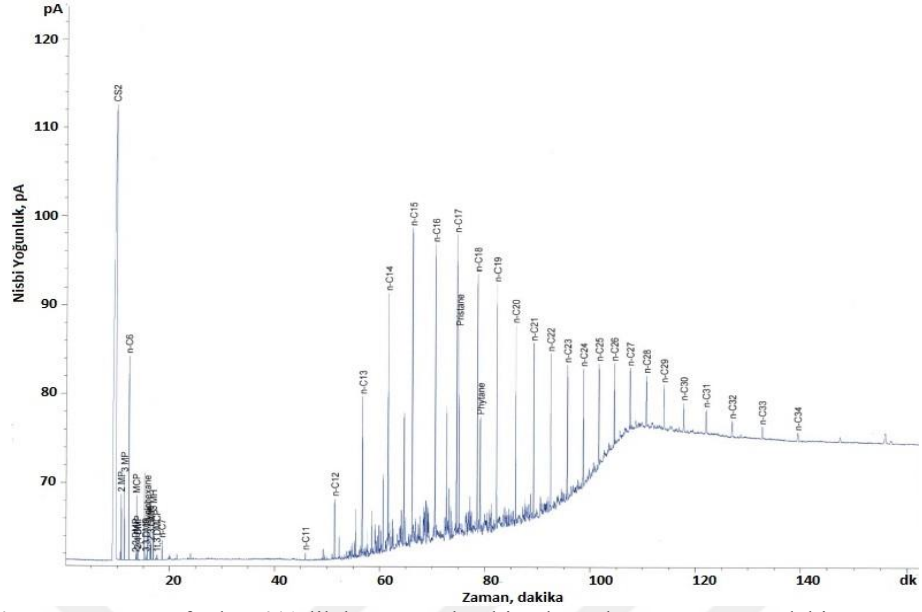
Şekil 4.74'de %1'lik ham petrolün (abiyotik kontrol) GC-MS analizi sonucu görülmektedir.



Şekil 4.75 D8 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi

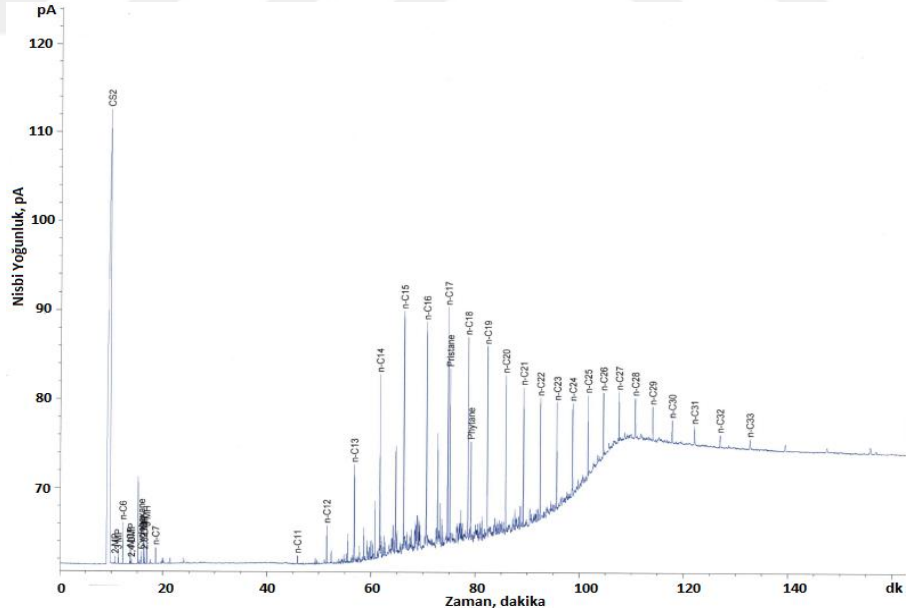
Şekil 4.75'de D8 bakteri suşunun ham petrolde (%1) yer alan n-alkanları (C11-C33) parçalama ve kullanma düzeylerinin GC-MS ile analiz grafiğini göstermektedir. Beş günlük inkübasyondan sonra ortamda kalan hidrokarbonların GC-MS analizi ile elde edilen veriler, D8 suşunun ham petrolü yaklaşık %27 gibi iyi bir oranda bozunmaya uğrattığını gösterdi.

Bakteri suşları için elde edilen toplam petrol hidrokarbon biyodegradasyon (bozunma) oranları, sonraki tüm deneylerde de abiyotik kontrole kıyasla azalan değerler kullanılarak hesaplanmıştır.



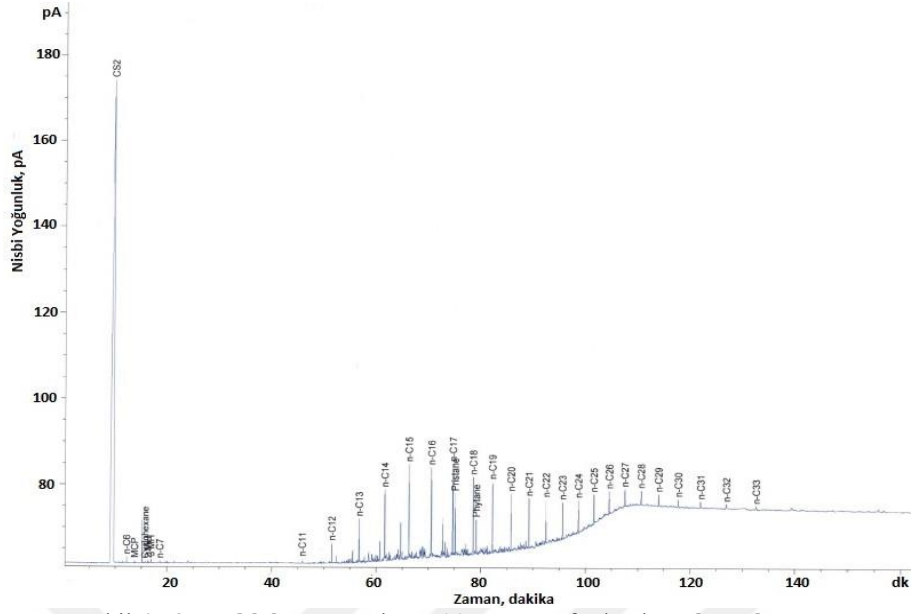
Şekil 4.76 D9 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi

Şekil 4.76'da D9 bakteri suşunun ham petrolde (%1) yer alan n-alkanları (C11-C33) parçalama ve kullanma düzeylerinin GC-MS ile analiz grafiğini göstermektedir. Beş günlük inkübasyondan sonra ortamda kalan hidrokarbonların GC-MS analizi ile elde edilen veriler, D9 suşunun ham petrolü yaklaşık %12 oranında parçaladığını gösterdi.



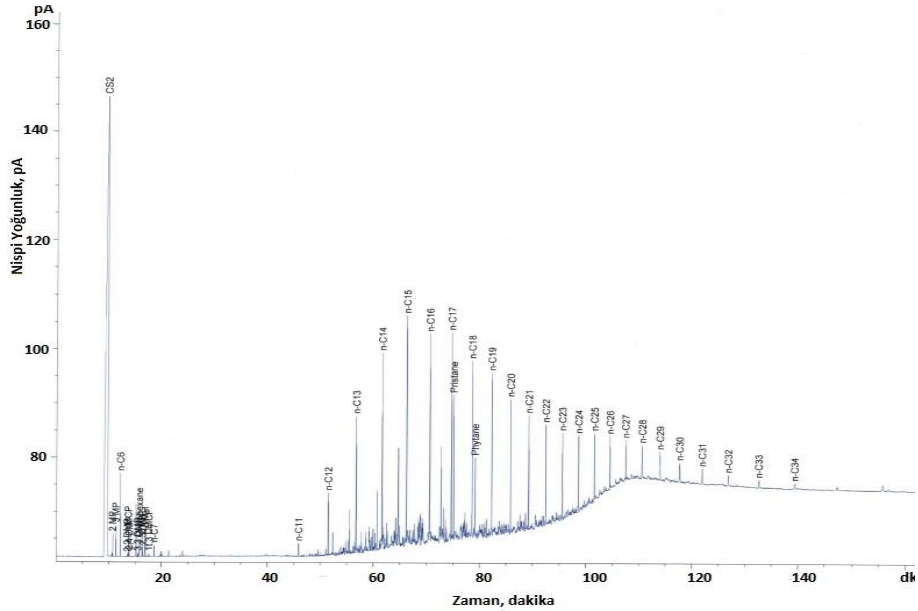
Şekil 4.77 D10 suşu tarafından %1'lik ham petrolün biyodegradasyonu sonrasındaki GC-MS analizi

D10 suşunun %1'lik ham petrol biyodegradasyonu sonucunda yapılan GS-MS analiz grafiği Şekil 4.77'de görülmektedir. D10 suşu ham petroldeki (%1) n-alkanları (C11-C33) 5 günlük inkübasyondan sonra yaklaşık %18 oranında parçaladığı belirlendi.



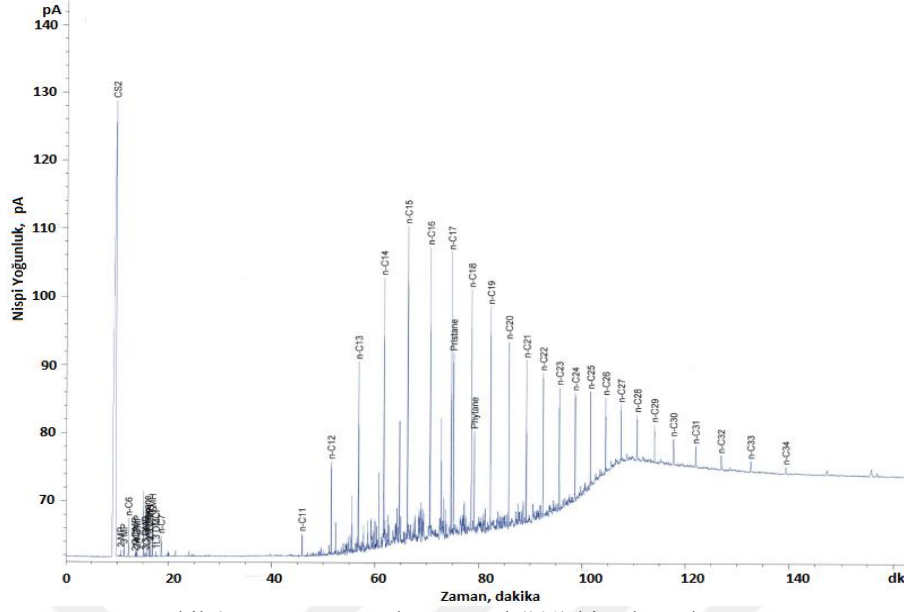
Şekil 4.78 %1'lik ham petrolün D11 suşu tarafından biyodegradasyonu

Şekil 4.78'de D11 suşunun %1'lik ham petrol biyodegradasyonu sonucunda yapılan GS-MS analiz grafiği görülmektedir. D11 suşunun ham petroldeki (%1) n-alkanları (C11-C33) 5 günlük inkübasyondan sonra diğer bakteri suşlarına kıyasla en etkili şekilde biyodegradasyona uğrattığı ve değerin yaklaşık %43 oranında gerçekleştiği belirlendi.



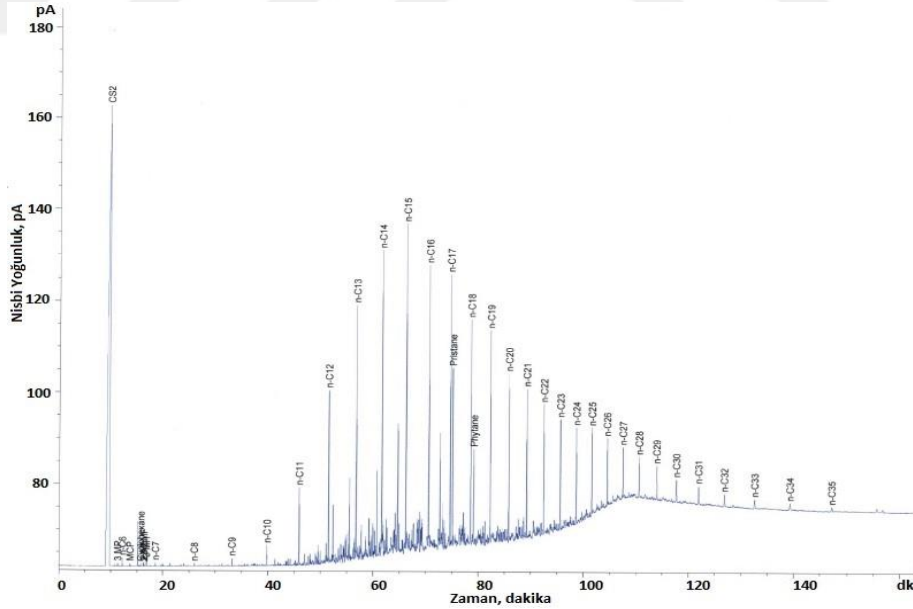
Şekil 4.79 D12 suşunun %1'lik ham petrol biyodegradasyonu

Şekil 4.79'da ham petrolün GC-MS analiz verileri abiyotik kontrol ile kıyaslandığında D12 suşunun 5 günlük inkübasyondan sonra, ham petroldeki n-alkanları parçalama yüzdesinin yaklaşık %21 olduğu tespit edildi.



Şekil 4.80 E1 suşunun ham petrol (%) biyodegradasyonu

Şekil 4.80 ve 4.81’de görüleceği üzere, E1 ve E2 suşlarının 5 günlük kısa inkübasyondan sonra, ham petroldeki n-alkanları düşük oranlarda bozunmaya uğrattığı ve değerlerin sırasıyla yaklaşık %9 ve %12 olduğu belirlendi. Tüm suşlar için toplam petrol hidrokarbon bozunma değerleri, abiyotik kontrole kıyasla azalan değerler kullanılarak yüzdelere hesaplanmıştır.



Şekil 4.81 E2 suşunun %1’lik ham petrol biyodegradasyonu analizi

Tablo 4.8, tüm tanımlanan bakteri izolatların %1’lik ham petrolde 5 günlük inkübasyonları sonucunda geriye kalan ham petroldeki n-alkanların GC-MS analizi ile elde edilen yüzde alanlarını göstermektedir. Özetle, ham petrol içinde bulunan C11-C33 aralığındaki düz zincirli n-alkanları toplamda D8 %27, D9 %12, D10 %18, D11

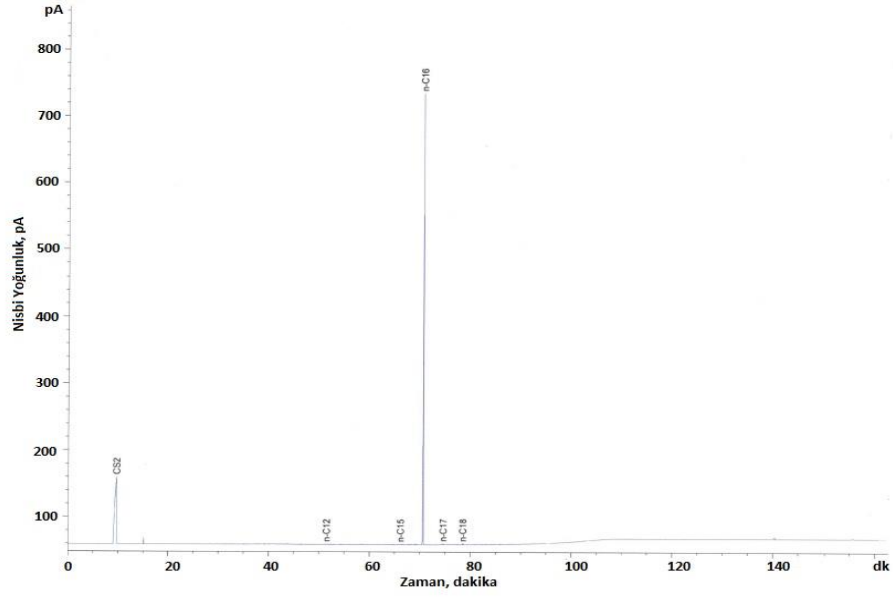
%43, D12 %21, E1 %9 ve E2 ise %12 oranında biyodegradasyona uğrattıkları tespit edildi. Ham petrolü en iyi biyodegradasyona uğratma oranı olan suş D11 iken, en düşük olanı E1 suşu olduğu bulundu.

Tablo 4.8 Tanımlanan bakteri izolatları tarafından ham petrolde bulunan alkanların biyodegradasyonu sonunda edilen yüzde alanlar

Hidrokarbonlar	Kontrol	D8	D9	D10	D11	D12	E1	E2
	% Alan	% Alan	% Alan	% Alan	% Alan	% Alan	% Alan	% Alan
n-C11	0,42865	0,15466	0,06827	0,09080	0,08763	0,14331	0,20376	0,64199
n-C12	1,35980	0,69009	0,47756	0,37995	0,35276	0,63829	0,79237	1,39556
n-C13	2,35915	1,41326	1,31883	0,99923	0,81208	1,44881	1,67957	2,14577
n-C14	2,81542	2,04165	2,15050	1,85805	1,32206	2,10810	2,39846	2,56790
n-C15	3,03450	2,28455	2,59711	2,43994	1,74782	2,47752	2,84914	2,80927
n-C16	2,70964	2,02110	2,45554	2,35641	1,68792	2,26283	2,61159	2,41579
n-C17	2,61867	2,00524	2,52874	2,46205	1,73128	2,28543	2,59592	2,34216
n-C18	2,20971	1,71271	2,18750	2,12606	1,45639	1,91340	2,19736	1,94616
n-C19	2,43658	1,98094	2,46201	2,45694	1,61186	2,15310	2,45378	2,14995
n-C20	1,79242	1,40042	1,74917	1,69293	1,11828	1,48361	1,75165	1,51070
n-C21	1,57002	1,21690	1,52724	1,46530	0,94842	1,27091	1,50953	1,29509
n-C22	1,39238	1,05875	1,34943	1,30055	0,86223	1,11602	1,32744	1,13263
n-C23	1,27730	0,95544	1,20901	1,17991	0,75367	1,01653	1,20778	1,01706
n-C24	1,14065	0,85836	1,09166	1,05397	0,70670	0,89811	1,06820	0,90071
n-C25	1,06649	0,79318	1,00882	0,97525	0,62545	0,83385	0,99972	0,84504
n-C26	0,89443	0,63069	0,82571	0,78458	0,49866	0,68057	0,80728	0,68429
n-C27	0,71259	0,50410	0,66150	0,60498	0,39946	0,54789	0,64837	0,55340
n-C28	0,66606	0,48968	0,64773	0,61551	0,40683	0,54108	0,63149	0,53220
n-C29	0,59629	0,45891	0,59137	0,58407	0,36923	0,50931	0,56693	0,49053
n-C30	0,46938	0,34520	0,46488	0,44186	0,28956	0,39197	0,44681	0,37422
n-C31	0,42900	0,31545	0,41239	0,41240	0,25141	0,35668	0,39529	0,34745
n-C32	0,32169	0,23682	0,31866	0,32097	0,19842	0,26470	0,30238	0,25960
n-C33	0,28354	0,21605	0,27728	0,26948	0,17301	0,23575	0,26721	0,21981

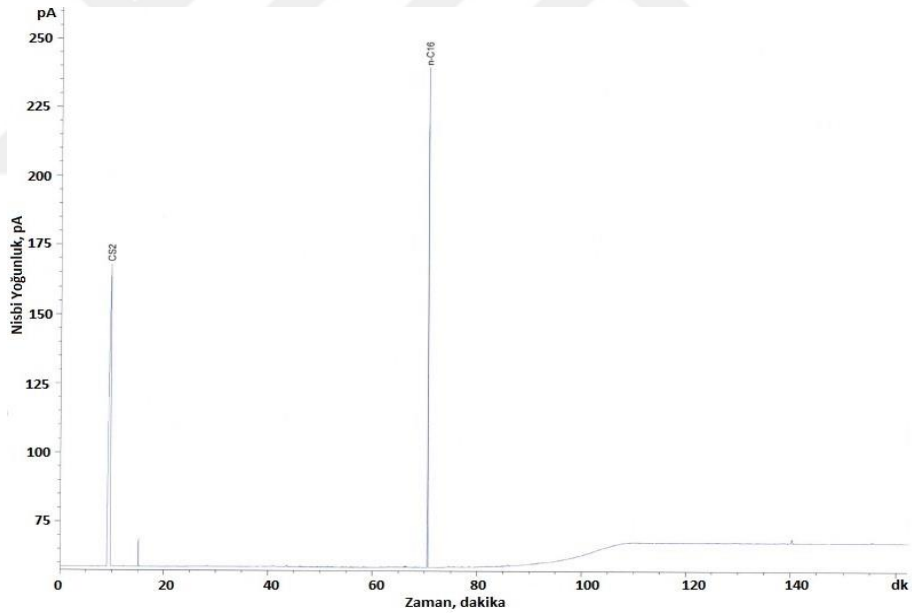
4.9 Bakteri Suşları Tarafından Hekzadekan Biyodegradasyonu

n-Hekzadekan ortamında çoğalma gösteren ve bu bileşiği en iyi kullanan 4 bakteri suşu (D9, D11, D12 ve E1) %1'lik hekzadekan içeren sıvı BM'de optimum koşullarda 3 günlük 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kontrol için de %1'lik hekzadekan içeren BM'ye, bakteri ekimi yapılmayıp aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonucunda tüm numuneler 10000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı alınıp GC-MS analizi yapıldı (Şekil 4.82-4.86).



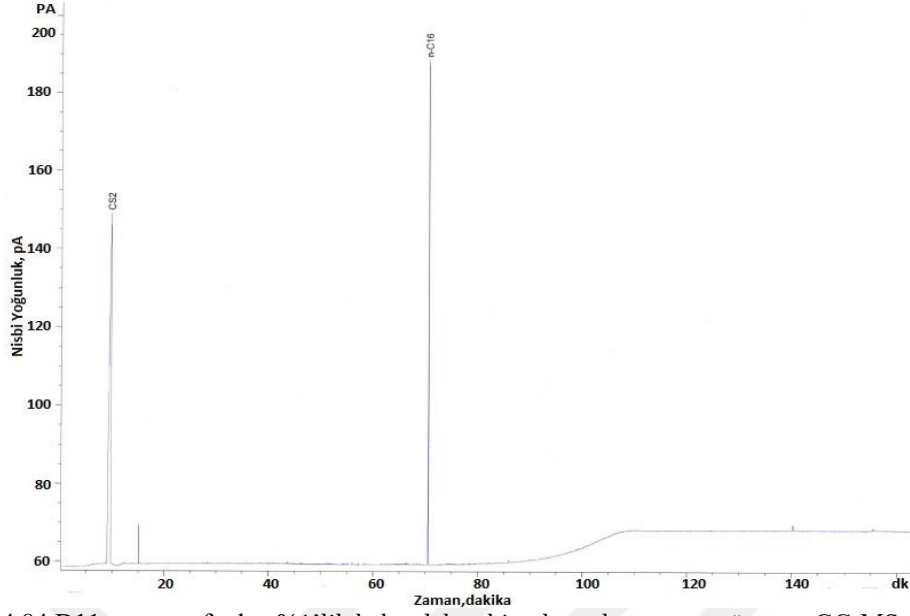
Şekil 4.82 BM sıvı besiyerinde %1'lik hekzadekanın GC-MS Grafiği. Abiyotik kontrol

Şekil 4.82, %1'lik hekzadekanın kontrol GS-MS grafiğinde nisbi yoğunluk düzeyini göstermektedir.



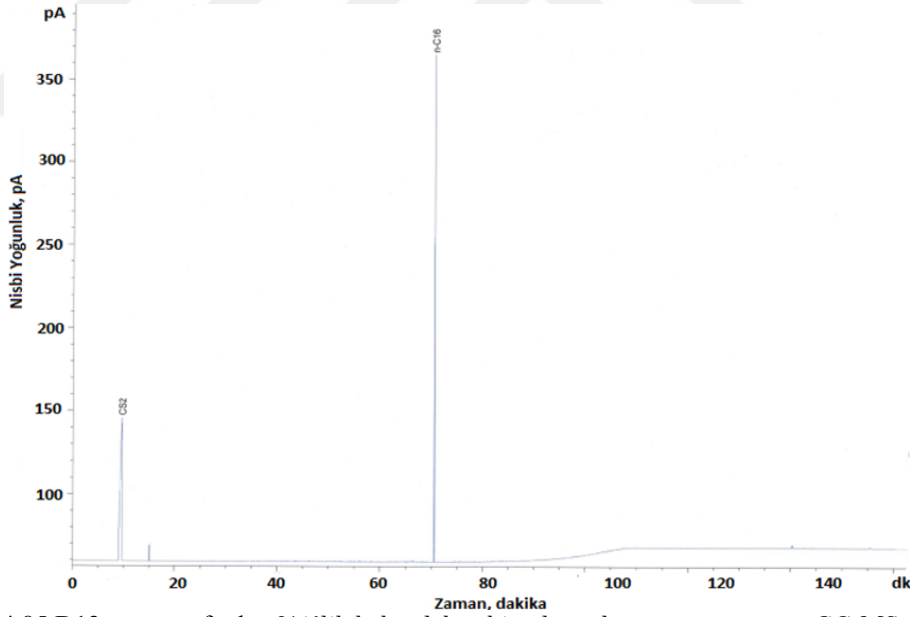
Şekil 4.83 D9 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

D9 suşunun %1'lik hekzadekan biyodegradasyonu abiyotik kontrole kıyaslandığında 3 günlük inkübasyon süresinden sonra yaklaşık %65 oranında gerçekleştiği bulundu (Şekil 4.83).



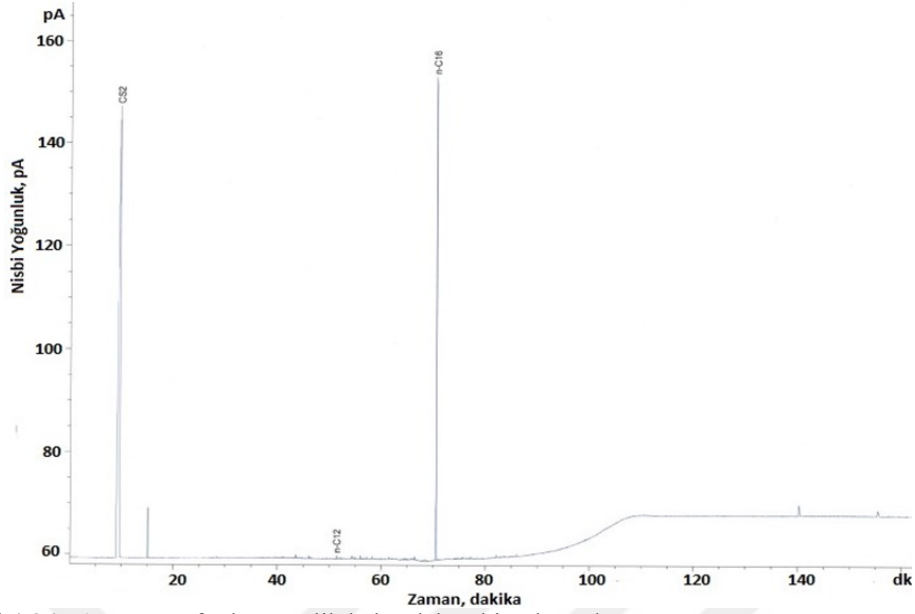
Şekil 4.84 D11 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

Şekil 4.84'de D11 suşunun %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunun abiyotik kontrole kıyaslandığında 3 günlük inkübasyon sonrasında yaklaşık %70 düzeyinde gerçekleştiği belirlendi.



Şekil 4.85 D12 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

Şekil 4.85'deki grafikte görüldüğü üzere D12 suşunun hekzadekanı oldukça düşük seviyede %38 biyodegradasyona uğrattığı belirlendi.



Şekil 4.86 E1 suşu tarafından %1'lik hekzadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

E1 suşuda hekzadekanı %76 oranında degradasyona uğrattığı Şekil 4.86 ve Tablo 4.9'daki verilerden görülebilir.

Tablo 4.9'da tüm bakteri suşlarına ait GC-MS analizinden elde edilen % alan değerlerinin bakterisiz kontrol ortamındaki % alan değerleri kıyaslanarak hesaplandığında elde edilen yüzdelik biyodegradasyon değerleri görülebilir. Yukarıda da belirtildiği üzere D9'un %65, D11'in %70, D12'nin %38 ve E1 ise %76 oranında hekzadekanı parçaladıkları hesaplandı.

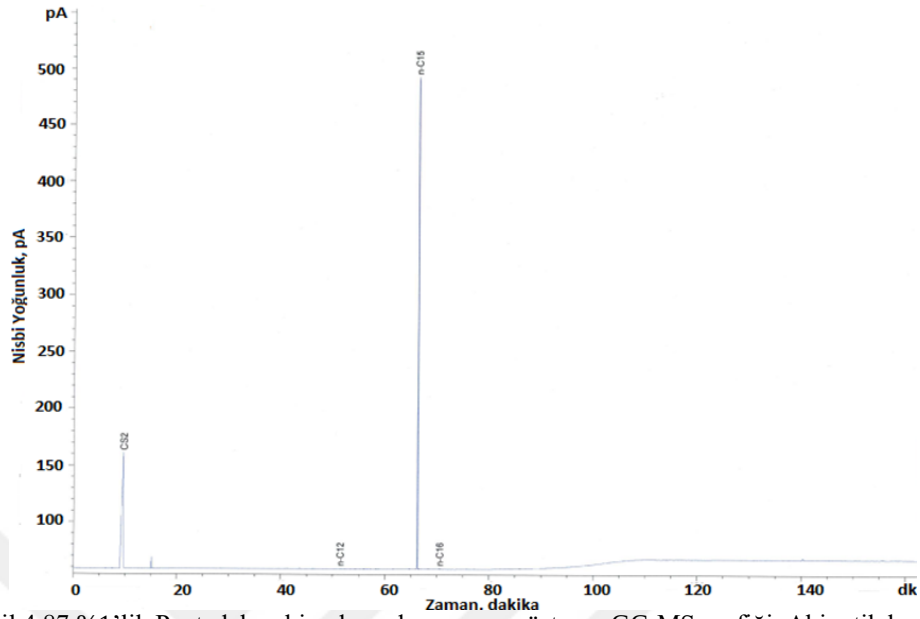
Tablo 4.9 Bakteri Suşlarına ait GC-MS analizi ile hekzadekan için elde edilen yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri

Suşlar	% Alan	% Biyodegradasyon
Kontrol	55,23525	0
D9	18,84968	65
D11	16,54851	70
D12	33,96784	38
E1	12,73601	76

4.10 Bakteri Suşları Tarafından Pentadekan Biyodegradasyonu

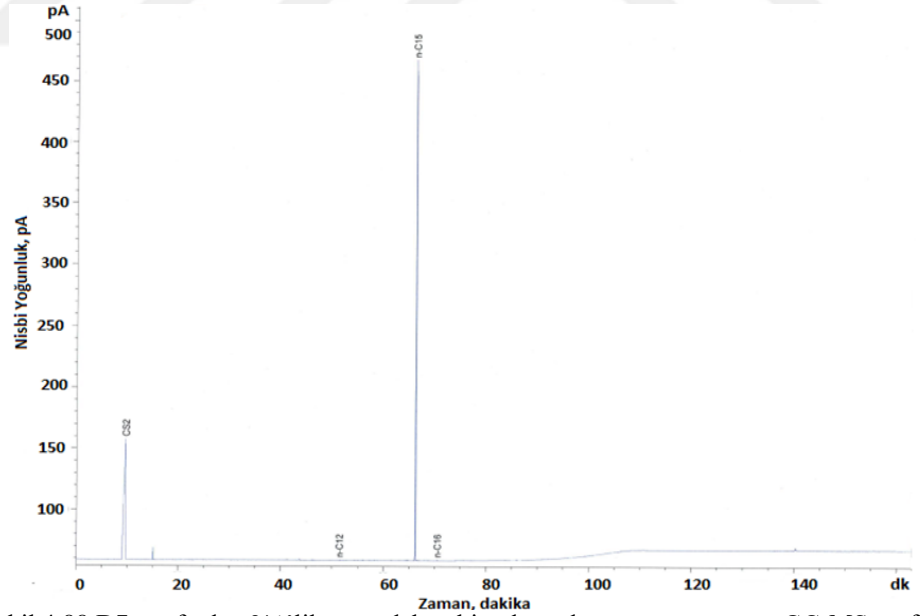
%1 Oranında pentadekan içeren BM ortamında optimum şartlarda 3 gün 120 rpm'de inkübasyon sonucunda bu bileşiği en iyi kullanan 3 suş belirlendi (D7, D8 ve E2). Kontrol için %1 pentadekan içeren BM'ye, bakteri ekimi yapılmayıp aynı şartlar

altında inkübasyona bırakıldıktan sonra, inkübasyon sonrası nümuneler 10000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üst sıvısı alınıp GC-MS ile analizleri yapıldı.



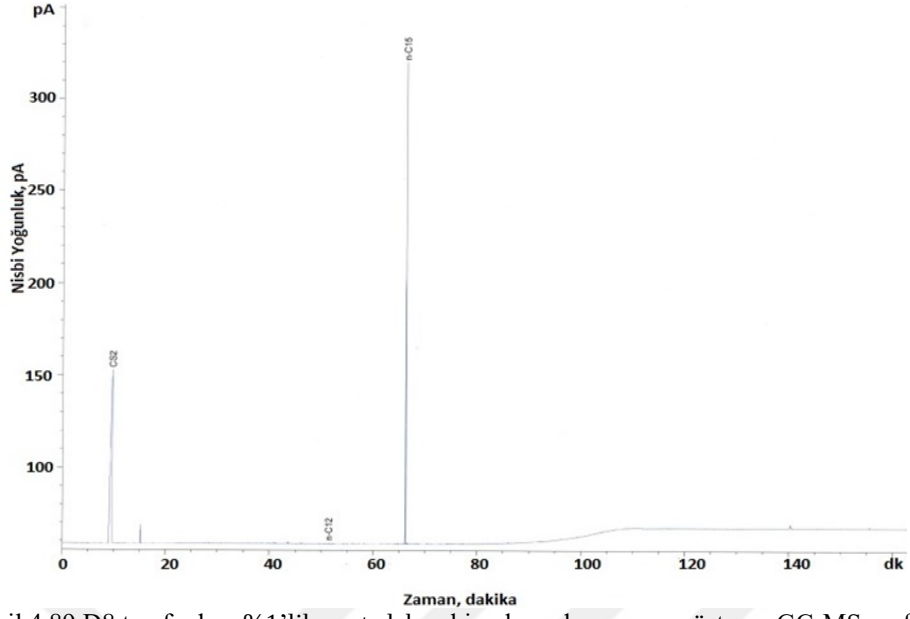
Şekil 4.87 %1’lik Pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği. Abiyotik kontrol

Şekil 4.87 %1’lik pentadekan (abiyotik kontrol)’ın GS-MS grafiğini göstermektedir.

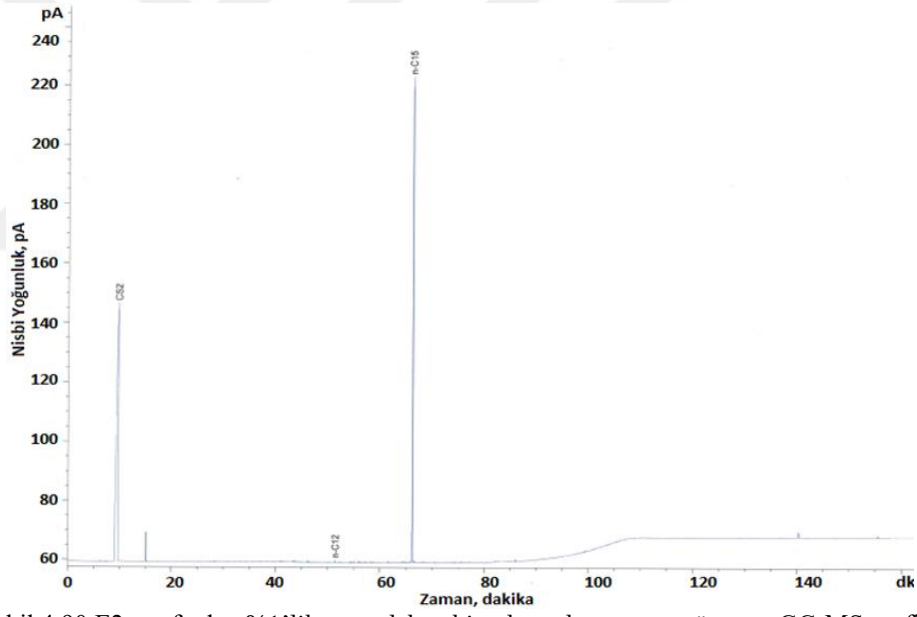


Şekil 4.88 D7 tarafından %1’lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

Tablo 4.10 ve Şekil 4.87-4.90, D7, D8 ve E2 suşlarının optimum şartlarda %1’lik pentadekan biyodegradasyonu sonunda GC-MS analizi sonuçlarını göstermektedir. D7, D8 ve E2 suşlarının sırasıyla %3, %29 ve %48 oranında bir biyodegradasyon gerçekleştirdikleri yüzde alan değerleri kontrolle kıyaslanma yoluyla hesaplandı.



Şekil 4.89 D8 tarafından %1'lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği



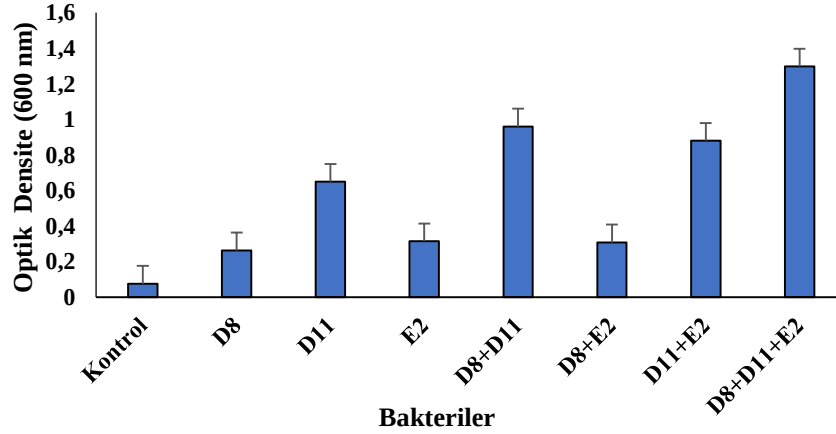
Şekil 4.90 E2 tarafından %1'lik pentadekan biyodegradasyonunu gösteren GC-MS grafiği

Tablo 4.10 Bakteri suşlarına ait GC-MS analizi ile pentadekan için elde edilen yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri

Bakteri suşları	% Alan	% Biyodegradasyon
Kontrol	40,58342	0
D7	39,07572	3
D8	28,48160	29
E2	20,72173	48

4.11 Pentadekan ve Hekzadekan İçeren Sıvı Besiyerinde Bakterilerin Tek veya Karışım Halinde Degredasyon Analizi

Toplamda %1 olacak şekilde hekzadekan ve pentadekan karışımını içeren BM besiyerinde bakteri suşlarının tek tek veya karışık kültürlerinin 3 günlük inkübasyon sonunda çoğalmaları 600 nm’de ölçüldü. Ayrıca, inkübasyon sonrasında alınan üst sıvıların GC-MS analizi gerçekleştirildi.



Şekil 4.91 Karışım halinde bakteri ve hidrokarbonların (toplamda %1’lik hekzadekan, pentadekan) bakteri çoğalması üzerine etkisi

Pentadekan ve hekzadekan karışımının karbon ve enerji kaynağı olarak test edilen suşlar tarafından kullanıldıkları görülmektedir (Şekil 4.91). OD 600 değerleri üzerinden tek suş olarak çoğalma oranları, kontrolle kıyaslandığında D8’in 3 kat arttığı, D11’in 8 kat arttığı, E2’nin ise 4 kat arttığı belirlendi. Bakterilerin karışım halinde hidrokarbon ortamında çoğalmalarını gösteren OD değerleri kontrolle kıyaslandığında ise D8+D11, D8+E2, D11+E2 ve D8+D11+E2 için sırasıyla 12, 4, 11 ve 16 kat arttığı tespit edildi. Tablo 4.11’de görüleceği üzere, pentadekan ve hekzadekan karışımlarının tek suş olarak D8, D11 ve E2 karışık kültürler olarak D8+D11, D11+E2, D8+E2 ve D8+D11+E2 suşlarının biyodegradasyon oranları sırasıyla %31, %43, %53, %60, %49, %61 ve %72 olduğu tespit edildi.

Tablo 4.11 Tek veya karışım halinde test edilen bakteri suşlarına ait GC-MS analizi sonucunda pentadekan ve hegzadekan karışımı yüzde alanları ve hesaplanan biyodegradasyon yüzdeleri

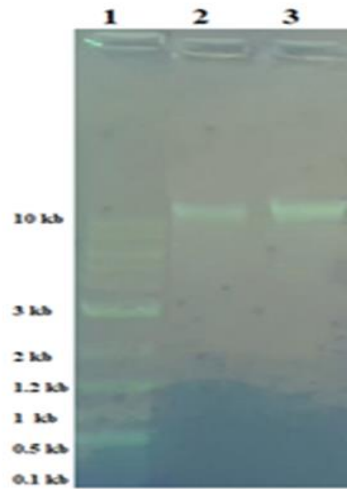
Bakteri suşları	% Alan	Pentadekan ve Hekzadekan Biyodegradasyonu (%)*
Kontrol	90,0389	0
D8	61,29691	31
D11	51,28408	43
E2	41,95053	53
D8+D11	35,53225	60
D11+E2	45,61473	49
D8+E2	34,70622	61
D8+D11+E2	24,77318	72

*GC-MS analizi sonucunda hesaplanan yüzde oranları. Bakterisiz Kontrol (%0,5 hegzadekan ve %0,5 pentadekan) ortamında mevcut hidrokarbon değeri %100 kabul edilerek, 3 günlük inkübasyon sonrasında bakterilerce parçalanmış hidrokarbon yüzdeleri hesaplanmıştır.

4.12 Petrol Parçalayan Geninin İzolasyonu

4.12.1 Kromazomal DNA Agaroz Jel Elektroforezi

D11 ve E2 ‘ye ait izole edilen kromozomal DNA’ların saflığını belirlemek için %1 agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra analiz edildi. Şekil 4.92’de, 1. Kuyucukta DNA markırı, 2. ve 3. kuyucuklarda D11 ve E2 ‘nin kromozomal DNA’ları gösterilmektedir. Kullanılan standart DNA markırı göre izolat DNA’ların 10 kb’den büyük oldukları ve miktarının 50 ng’den fazla ve görünür şekilde olduğu belirlendi. Bununla beraber, DNA’ların tek bant olarak görülmesi saf olduğunu göstermektedir.



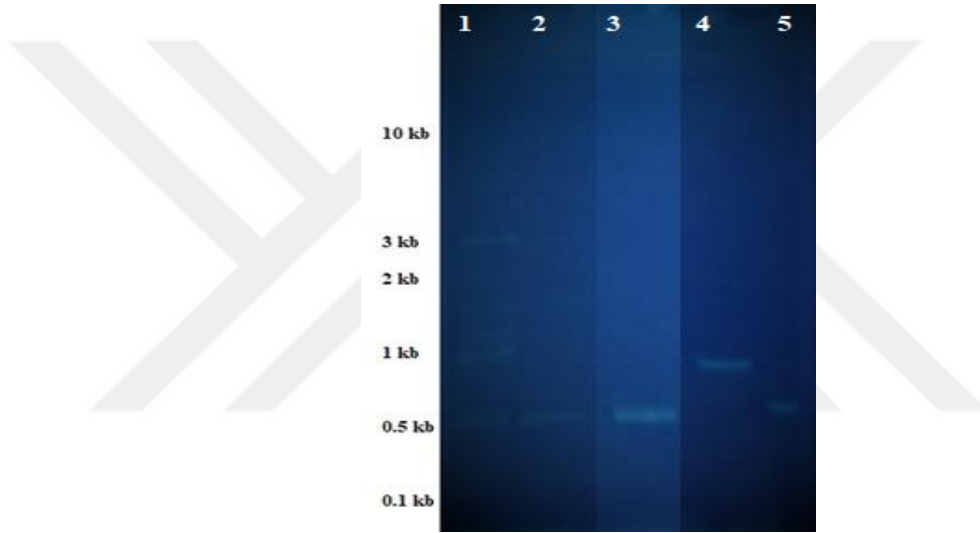
Şekil 4.92 Kromozomal DNA’nın agaroz jel görüntüsü (1: Ladder (0.1-10 kb), 2: D11 DNA, 3: E2 DNA)

4.12.2 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

4.6.2. kısımda detaylı açıklandığı gibi, *A. pittii* D11 ve *A. calcoaceticus* E2'ye ait kromozomal DNA'ların konsantrasyonu ve DNA saflık kontrolü spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. İzole edilen *A.pittii* D11 kromozomal DNA'sının konsantrasyonu 10,08 µg/µL ve saflığının da 1,543, *A.calcoaceticus* E2 DNA'sının konsantrasyonu ise 26,93 µg/µL ve saflığının 1,532 olduğu bulundu.

4.12.3 AlkB ve AlkM Genlerinin PCR ile Amplifikasyonu

Her iki suş için primer 1 ve primer 3 kullanılarak elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.93'de görülmektedir.



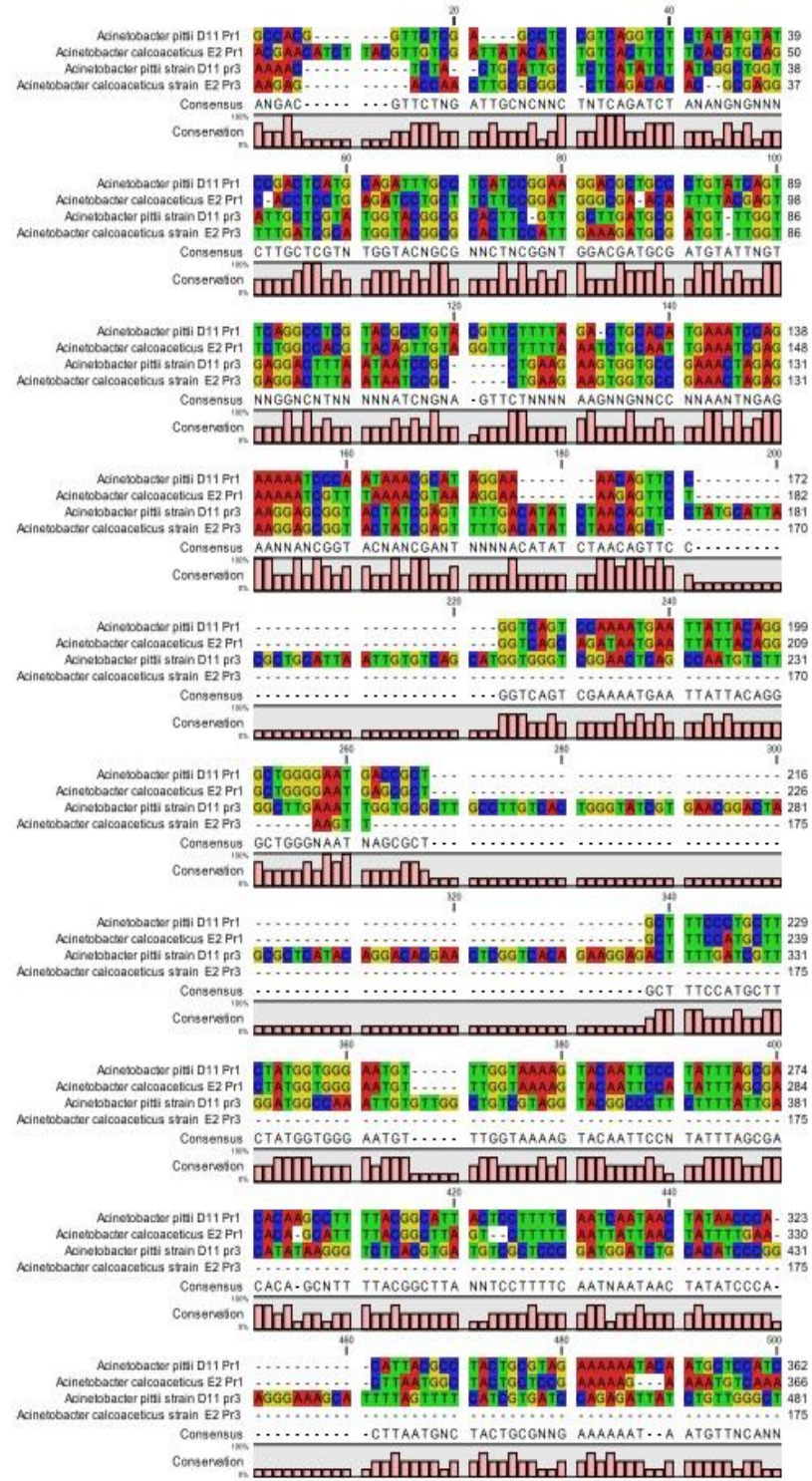
Şekil.4.93 AlkB ve AlkM genlerinin primer 1 ve primer 3 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (1: Lader (0.1-10 kb), 2: D11 pr1, 3: E2 pr1, 4: D11 pr3, 5: E2 pr3)

4.12.4 AlkB ve AlkM gen dizi analizi

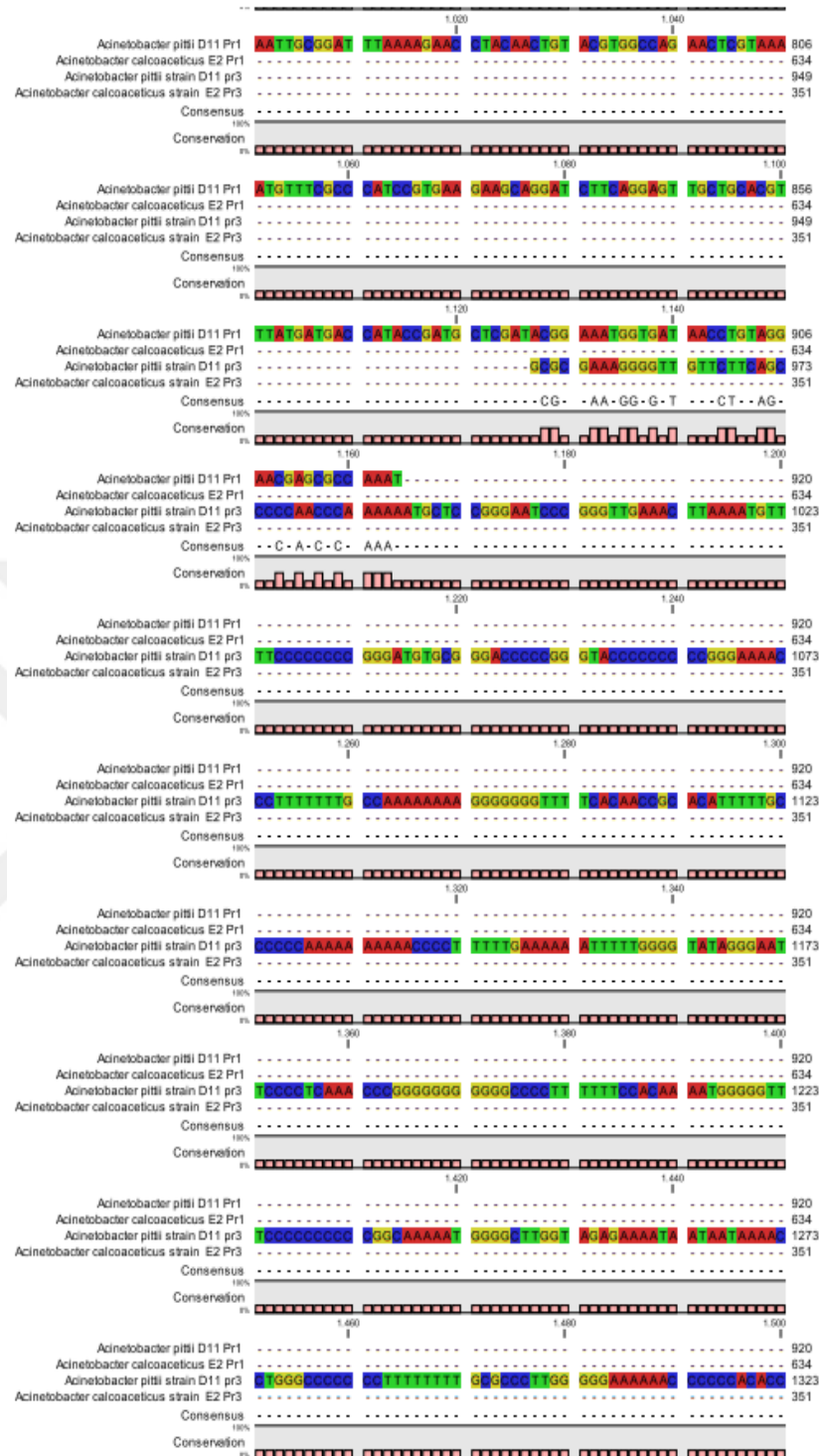
D11 ve E2 suşlarının primer 1 ile elde edilen PCR ürünlerinin alkan monooksijenaz geninin (alkM) dizi analizi sonuçlarına göre, *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9) ve *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9) alkan 1-monooksijenaz gen dizisine sırasıyla %93,06 ve %92,72 oranında benzerlik gösterdiği Tablo 4.12'te görülmektedir. Ayrıca D11 ve E2 suşlarının primer 3 ile elde edilen PCR ürünlerinin alkan monooksijenaz geninin (alkB) dizi analizi sonuçlarına göre, *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) ve *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8) alkan 1-monooksijenaz gen dizisine sırasıyla %94,48 ve %95,52 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12 Alkan monooksijenaz genlerinin dizi analizi

Bakteriler	Benzerlik gösterdiği suş	Gen adı	Nükleotid uzunluğu (bç)	Nükleotid benzerliği (%)
D11 (p1)	<i>Acinetobacter</i> sp. BUU8 (A6N7F9)	Alkan 1-monooksijenaz (AlkM)	651	93,06
D11 (p3)	<i>Pseudomonas citronellolis</i> (A0A024A3Z2)	Alkan 1-monooksijenaz (AlkB)	1336	94,48
E2 (p1)	<i>Acinetobacter</i> sp. BUU8 (A6N7F9)	Alkan 1-monooksijenaz (AlkM)	448	92,72
E2 (p3)	<i>Pseudomonas mendocina</i> (A4XPE8)	Alkan 1-monooksijenaz (AlkB)	351	95,52

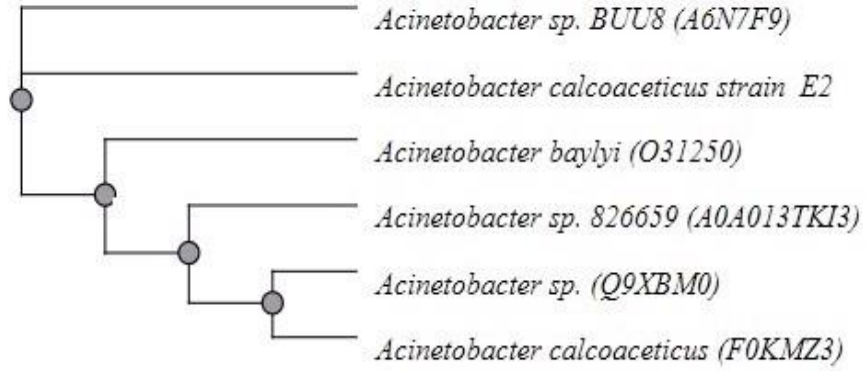


Şekil 4.94 D11 ve E2 suşlarının AlkM ve AlkB genlerinin nükleotid sekanslarının karşılaştırılması



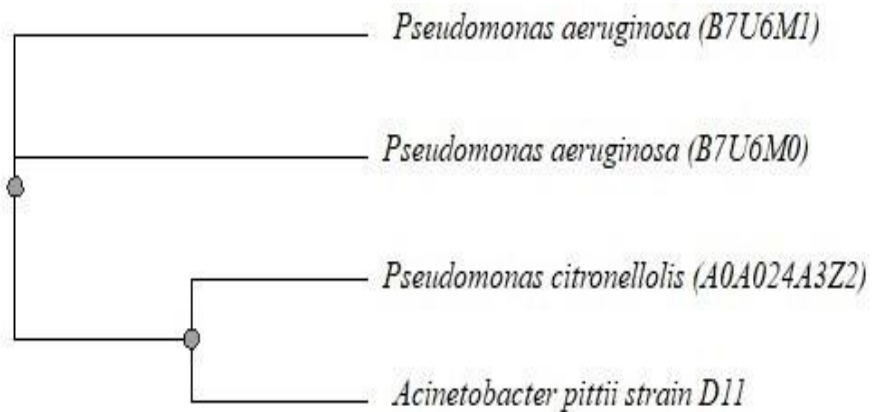
Şekil 4.94 (Devam)

suşlarından *Acinetobacter* sp. BUU (A6N7F9), *Acinetobacter baylyi* (O31250), *Acinetobacter* sp. 826659 (A0A013TK13), *Acinetobacter* sp. (Q9XBM0), *Acinetobacter calcoaceticus* (F0KMZ3) kullanılarak kıyaslaması yapılmıştır. Buna göre *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9) alkM gen dizisine %92,72 oranında benzerlik göstermektedir.



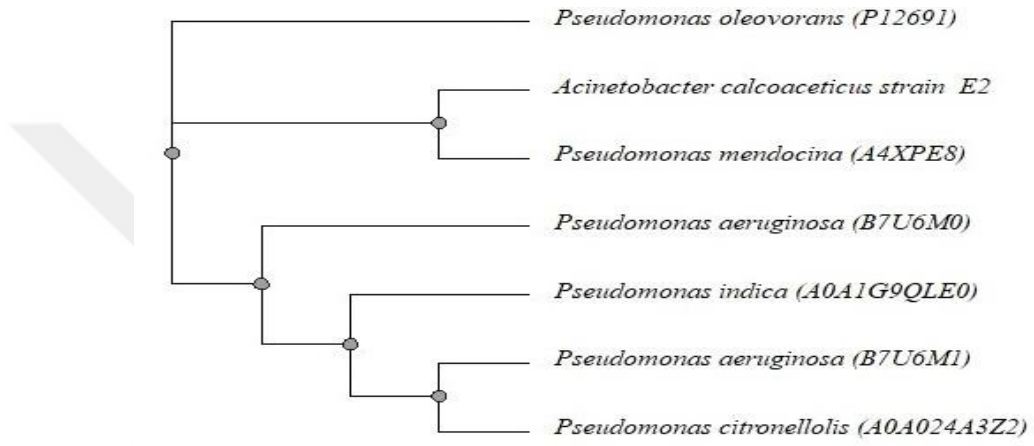
Şekil 4.96 E2 suşuna ait AlkM geninin filogenetik ağacı

D11 suşunun primer 3 ile elde edilen PCR ürünlerinin alkB geninin (1336 bp) dizi analizi sonuçlarına göre Uniprot (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) veri tabanında bulunan diğer *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından *Pseudomonas aeruginosa* (B7U6M1), *Pseudomonas aeruginosa* (B7UM0), *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) kullanılarak kıyaslaması yapılmıştır. Buna göre *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) alkB gen dizisine %94,48 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 4.94 ve Şekil 4.97).



Şekil 4.97 D11 suşuna ait AlkB geninin filogenetik ağacı

Şekil 4.94 ve Şekil 4.98’de E2 suşunun primer 3 ile elde edilen PCR ürünlerinin alkB geninin (351bç) dizi analizi sonuçlarına göre Uniprot (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) veritabanında bulunan diğer *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından *Pseudomonas oleovorans* (P12691), *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8), *Pseudomonas aeruginosa* (B7U6M0), *Pseudomonas indica* (A0A1G0QLE0), *Pseudomonas aeruginosa* (B7U6M1), *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) kullanılarak kıyaslaması yapılmıştır. Buna göre *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8) alkB gen dizisine %95,52 oranında benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.98 E2 suşuna ait AlkB geninin filogenetik ağacı

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

On dokuzuncu yüzyılın ortalarından bu yana, dünyanda birincil enerji kaynağı olan petrol ekonomide önemli bir rol oynamıştır. Petrol ve petrol ürünleri, insan hayatı için bir enerji kaynağı olmasının yanı sıra ülke ekonomilerinin gelişiminde de önemli ölçüde katkı sağlamıştır (Ben ve Baird, 2021). Petrol, sanayi, ulaşım ve günlük insan faaliyetleri dahil olmak üzere birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılan birincil ve gerekli bir enerji kaynağıdır (Mahjoubi vd., 2018). Ancak taşıma, işleme, depolama ve kullanımı sırasında çevresel kazalara neden olması gibi zorlukları başlıca dezavantajlarından (Cerqueda-Garcia vd., 2020). Antropojenik kaynaklı petrol sızıntıları nedeniyle her yıl yaklaşık beş milyon ton ham petrol ve rafine petrol çevreye yayılmaktadır (Malatova, 2005). Petrol hidrokarbonları en tehlikeli çevre kirleticilerinin başında gelmektedir ve gelecekte de enerji ve kimyasal kullanımı sebebiyle önemli organik kirleticiler olmaya devam edecektir. Mikrobiyal degradasyon, petrol hidrokarbonlarının mikroorganizmalar tarafından kirleticileri biyolojik olarak gidermek için bozunmas ilkesine dayanan yeşil bir alternatif yaklaşımdır (Tian vd., 2019). Mikroorganizmalar, geniş metabolik potansiyelleri nedeniyle hayatta kalabilir ve hatta ham petroleri parçalayabilirler (Head vd., 2006). Petrol parçalayan bakteriler, karasal ve deniz ekosistemleri dahil olmak üzere çeşitli ortamda bulunurlar (Cerqueda-Garcia vd., 2020). Petrol kirliliğinin giderilmesinde geleneksel yöntemlerle sınırlı kalmıştır. Mikrobiyal degradasyon, kirliliğinin nedeni olan petrolün gideriminde fizikokimyasal yöntemlere göre daha çevre dostu olmasının yanı sıra verimli ve ekonomik bir yöntem olarak da öne çıkmaktadır. Hidrokarbonların mikrobiyal aktivite ile biyolojik olarak parçalanması yaklaşık yüz yıldır devam etmektedir (Muthukamalam vd., 2017).

Birçok çalışmada, petrol ile kirlenmiş topraklar ve atık sular dahil olmak üzere farklı ortamlardan petrol hidrokarbonu parçalayan bakteriler tanımlanmıştır (Cappello vd., 2012; Jurelevicius vd., 2012). Bakteri popülasyonlarının kapasitesinin, ham petrolle kirlenmiş toprak bölgelerindeki hidrokarbonları mineralize ettiği iyi bilinmektedir (Ojo, 2006). Son zamanlarda, arkea, bakteri ve mantar dahil olmak üzere petrolle kirlenmiş topraklardan petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen çok çeşitli mikroorganizmalar izole edilmiş olsa da bakteriler mikrobiyal ekolojide en bol ve önemli olanlarıdır (Acer vd., 2020). Yayımlanan bir derlemede, petrol

hidrokarbonlarını parçalayabilen 79'dan fazla bakteri türü tanımlanmıştır (Xu vd., 2017; Xu vd., 2018). Son araştırmalar 79 bakteriyel, 9 siyanobakteriyel, 103 mantar ve 14 alg'in hidrokarbonları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiğini bildirdi. Ayrıca deniz ortamında en az 25 bakteri türü hidrokarbon parçaladığı bulunmuştur (Mahjoubi vd., 2018).

Çalışmamızda, Batman'daki petrole kirlenmiş alanlardan izole edilerek tanımlanan petrolü parçalayan D7'in Güney Raman 1 petrol istasyonundan, D10 ve D12'nin 237 petrol istasyonundan izole edilen bu suşların *Pseudomonadaceae*'da familyasında *Pseudomonas* cinsinde cinsi içinde yer alan aldığı ve gram-negatif, aerobik, basil şeklinde oldukları belirlenmiştir. D7'nin spor oluşturan ve hareketli, 237 petrol istasyonundan izole edilen D10'nun spor oluşturmayan ve hareketli, D12'nin ise spor oluşturmayan ve hareketsiz olarak tespit edilmiştir (Tablo.5.1).

Sıcaklık ve pH üreme aralıklarını belirlemek için yapılan çalışmalarda; sırasıyla D7'nin 20-40°C (optimum 30°C) ve pH 5.0-11.0 (Optimum pH 9.0), D10'nun 20-40°C (Optimum 35°C) ve pH 5.0-10.0 (Optimum pH 5.0), D12'nin 20-40°C (optimum 30°C) ve pH 5.0-9.0 (Optimum pH 5.0-9.0) aralıklarında üredikleri belirlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada Masakorala vd. (2013), *Pseudomonas* sp. USTB-RU suşunun 25-35°C (Optimum 30°C) ve pH 6.5-8.5 (Optimum pH 7.0) aralıklarında ürediğini bulmuşlardır. Ayrıca, Singh ve Fulekar (2010) *Pseudomonas putida* MHF 7109 için Optimum sıcaklık 37°C, Tian vd. (2019) *Pseudomonas mendocina* HDB-3 için ve Al-Dhabaan (2019) *Pseudomonas aeruginosa* için Optimum sıcaklığı 30°C, diğer bir çalışmada ise Di-Martino vd., 2012, *Pseudomonas* sp. KA için Optimum sıcaklığı 32°C olarak rapor etmişlerdir.

Tablo 5.1 D7, D10 ve D12 'nin fenotipik özelliklerinin diğer bazı *Pseudomonas* türleri ile karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hücre şekli	Basil	Basi l	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Silindirik basil	Basi l
Gram özelliği	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Spor	(+)	(-)	(-)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	(+)
Hareket	(+)	(+)	(-)	N.D	(+)	N.D	N.D	N.D	N.D
Oksijen gereksinimi	Aerob	Aerob	Aerob	N.D	Aerob	N.D	ND	N.D	N.D
Ürediği sıcaklık aralığı (C°)	20-40	20-40	20-40	N.D	25-35	N.D	N.D	N.D	N.D
Optimum üreme sıcaklığı (C°)	30	35	30	37	30	32	30	30	N.D
Ürediği pH aralığı	5.0-11.0	5.0-10.0	5.0-9.0	N.D	6.5-8.5	N.D	N.D	N.D	N.D
Optimum üreme pH	9.0	5.0	5.0-9.0	N.D	7.0	N.D	N.D	N.D	N.D
Nişasta hidrolizi	(+)	(+)	(+)	N.D	N.D	N.D	(-)	N.D	(-)
Jelatin hidrolizi	(+)	(-)	(+)	N.D	N.D	(-)	(-)	(+)	N.D
Oksidaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	N.D	(+)	(+)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sitrat	(+)	(+)	(+)	(+)	N.D	N.D	(+)	(+)	(+)
Üre	(+)	(+)	(+)	(-)	N.D	N.D	N.D	(-)	(+)
İndol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
NaCl Direnci (%)	5	5	5	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

(+): pozitif, (-): negatif, N.D: test edilmemiş

1. *Pseudomonas aeruginosa* strain D7, 2. *Pseudomonas putida* strain D10, 3. *Pseudomonas rhodesiae* strain D12, 4. *Pseudomonas putida* strain MHF 7109 (Singh ve Fulekar, 2010), 5. *Pseudomonas* sp. strain USTB-RU (Masakorala vd., 2013), 6. *Pseudomonas* sp. strain KA (Di-Martino vd., 2012) ,7. *Pseudomonas mendocina* strain HDB-3 (Tian vd., 2019), 8. *Pseudomonas aeruginosa* strain (Al-Dhabaan 2019) ,9. *Pseudomonas putida* strain I16 (Kalaivani ve Selvakumar, 2019)

D7, D10 ve D12'nin oksidaz, katalaz pozitif, indol testi negatif olarak tespit edilmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada Tian vd. (2019), *Pseudomonas mendocina*, HDB-3'nin gram-negatif, basil şeklinde ve katalaz pozitif, indol negatif olduğunu bulmuşlardır.

Ayrıca, *Pseudomonas* üzerinde yapılan diğer çalışmalarda, gram negatif, hareketli, basil şeklinde, katalaz ve oksidaz pozitif olduğu bildirilmiştir (Al-Dhabaan 2019; Di Martino vd., 2012; Masakorala vd., 2013; Singh ve Fulekar, 2010; Kalaivani ve Selvakumar, 2019). D7, D10 ve D12 suşlarının NaCl'yi %5'e kadar tolere ettiği bulunmuştur. Nie vd. (2016), *Pseudomonas aeruginosa* NY3 suşunun NaCl'yı %2 tolere ettiğini bulmuşlardır.

Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık testinin sonucunda, D7, D10 ve D12 tetrasiklin'e duyarlı ve penisilin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. Ayrıca D7 ve D10 suşları klorofenikol'e dirençli, D12'nin yarı duyarlı olarak bulunmuştur. Saadoun (2002) antibiyotik direnç çalışmasında, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas maltophilia* türlerinin tetrasiklin'e duyarlı, penisilin'e dirençli ve *Pseudomonas putida*'nın kloromfenikol'e duyarlı olduğunu rapor etmiştir. Tablo 5.1'de verildiği üzere, D7, D10 ve D12 suşlarının fenotipik özellikleri ile diğer *Pseudomonas* türlerinin karşılaştırılmasında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bu fenotipik özellikler yanında yapılan 16 S rRNA gen dizi analizleri sonucunda D7, D10 ve D12 suşlarının *Pseudomonas* cinsinin üyeleri olduğu tespit edilmiştir. D7 suşunun *Pseudomonas aeruginosa*'ya, D10 suşunun *Pseudomonas putida*'ya ve D12 suşunun *Pseudomonas rhodesiae*'ya %100 16S rRNA dizi benzerliğine sahip oldukları belirlenmiştir. Filogenetik analiz benzerliklerine göre D7'nin *Pseudomonas aeruginosa* strain FA-7'ye, D10'nun *Pseudomonas putida*'ya ve D12'nin *Pseudomonas alcaliphila* strain JCM 10630'ya en yakın olduğu bulunmuştur. Masakorala vd (2013) yaptıkları çalışmada, filogenetik analiz benzerliklere göre *Pseudomonas* sp. USTB-RU'nun *Pseudomonas anguilliseptica* (%97,69), *Pseudomonas toyotomiensis* (%97,53), *Pseudomonas oleovorans* sub sp. *Lubricantis* (%97,44), *Pseudomonas alcaliphila* (%97,34) ve *Pseudomonas indoloxydans* (%97,32) benzerlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Gupta vd. (2018), 16S rRNA dizisinin GenBank'taki dizilerle karşılaştırılması sonucunda, *Pseudomonas*

aeruginosa sp. S3'ün, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 suşu ile %98 benzer olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda izole edilen diğer bir petrol parçalayan bakteri suşu olan ve *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan D8'in, gram-negatif ve basil şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Güney Raman 1 istasyonundan izole edilen D8'nin aerobik, spor oluşturan, hareketli, katalaz, nişasta hidrolizi, sitrat, üreaz pozitif, jelatin, oksidaz, indol testi negatif olarak bulunmuştur (Tablo 5.2).

Tablo 5.2 D8'in fenotipik özelliklerinin diğer bazı *Enterobacter* türleri ile karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5	6
Hücre şekli	Basil	N.D	Basil	Basil	N.D	Basil
Gram özelliği	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Spor	(+)	N.D	N.D	(+)	N.D	(-)
Hareket	(+)	N.D	N.D	N.D	(+)	(+)
Oksijen gereksinimi	Aerob	N.D	N.D	N.D	N.D	Aerob
Ürediği sıcaklık aralığı °C	20-40	N.D	25-40	28-44	N.D	N.D
Optimum üreme sıcaklığı °C	30	N.D	30	37	40	N.D
Ürediği pH aralığı	3.0-11.0	N.D	5.0-8.0	6.0-10.0	N.D	N.D
Optimum üreme pH	5.0	N.D	6.0	7.0	7.0	N.D
Nişasta hidrolizi	(+)	N.D	(+)	(-)	(+)	(+)
Jelatin hidrolizi	(-)	N.D	(-)	(+)	(-)	N.D
Oksidaz	(-)	(-)	(-)	N.D	ND	N.D
Katalaz	(+)	(+)	(+)	N.D	(+)	(+)
Sitrat	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	N.D
Üre	(+)	(-)	(+)	N.D	N.D	N.D
İndol	(-)	(-)	(-)	N.D	(-)	(-)
NaCl direnci (%)	7	N.D	N.D	4-20	N.D	N.D

(+): pozitif, (-): negatif, N.D: test edilmemiş

1. *Enterobacter ludwigii* strain D8, 2. *E. hormaechei* strain KA6 (Abtahi vd., 2020), 3. *Enterobacter* species strain ALK-23 (Dwivedi vd., 2019), 4. *Enterobacter* sp. strain F3 (Gupta vd., 2018), 5. *E. ludwigii* strain LY-62 (Zhang vd., 2018), 6. *E. ludwigii* strain MS32 (Wendy vd., 2014)

Benzer bir çalışmada *Enterobacter ludwigii* LY-62 suşunun gram-negatif ve hareketli, nişasta hidrolizi, katalaz ve sitrat pozitif, jelatin hidrolizi ve indol ise negatif olarak tespit edilmiştir (Zhang vd., 2018). *Enterobacter* suşu üzerinde yapılan diğer birçok çalışmada, bu bakterilerin gram negatif, hareketli, basil şeklinde ve oksidaz negatif

iken katalaz pozitif olarak rapor edilmiştir (Abtahi vd., 2020; Dwivedi vd., 2019; Gupta vd., 2018; Wendy vd., 2014; Zhang vd., 2018).

D8 suşunun sıcaklık 20-40°C (Optimum 30°C) ve pH 3.0-11.0 (Optimum pH 5.0) aralığında ürediği bulunmuştur. Ayrıca, bu suşun NaCl'yi %7'ye kadar tolere ettiği bulunmuştur. *E. ludwigii*'nin diğer bir suşu olan LY-62'nin Optimum sıcaklığı 40°C ve optimum pH'sı 7.0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2018). Daha önce yapılan sıcaklık ve pH üreme aralıkları ile ilgili benzer çalışmalarda, Dwivedi vd. (2019), *Enterobacter* ALK-23 için sıcaklık 25-40°C (Optimum 30°C), pH 5.0-8.0 (Optimum pH 6.0), Gupta vd. (2018), *Enterobacter* sp. F3 için sıcaklık 28-44°C (Optimum 37°C), pH 6.0-10.0 (Optimum pH 7.0) olarak rapor etmişlerdir.

D8 suşunun antibiyotik duyarlılık sonucuna göre ampisilin, penisilin, dirençli olduğu, gentamisin'e yarı duyarlı, kloramfenikol, tetrasikline duyarlı olduğu bulunmuştur. Saadoun (2002) rapor ettiği çalışmada, *Enterobacter cloacae* suşunun kloramfenikol ve penisilin'e dirençli, tetrasiklin'e duyarlı olduğu bulunmuştur. Yakın zamanlı bir çalışmada ise Jerin vd. (2021), *Enterobacter ludwigii* CCUG 51323^T suşunun gentamisin'e duyarlı, ampisilin'e dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Tablo 5.2'de görüldüğü üzere, D8 suşunun fenotipik özellikleri ile diğer *Enterobacter* türlerinin karşılaştırılmasında türlerin bazı özelliklerin gram-negatif katalaz, oksidaz, indol gibi *Enterobacter* cinslerinde ortak diğer özelliklerin ise türden türe değişiklik göstermektedir. D8'in diğer türlerden ayrılan bir belirgin özelliği geniş pH aralığında üreyebilmesidir.

16 S rRNA'nın gen dizi analizi sonucunda D8 suşunun *Enterobacter* cinsine ait olduğu bulunmuştur. D8 suşunun *E. ludwigii* 'ye %100 16S rRNA dizi benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Filogenetik analize göre D8 suşunun *Enterobacter ludwigii* LY-62'ye en yakın olduğu tespit edilmiştir. Zhang vd. (2018), yaptıkları çalışmada filogenetik analiz benzerliklerine göre *Enterobacter ludwigii* LY-62 suşunun, *Enterobacter cloacae* UW5 (%99,87), *E. cloacae* P101 (%99,87), *E. cloacae* EcWSU1 (%99,93) benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Diğer yapılan bir çalışmada, *Enterobacter* sp. F3 suşunun 16S rRNA sekansına dayalı filogenetik analiz sonucuna göre, *Enterobacter cloacae* 279-56 suşuna daha yakın olduğu belirlenmiştir (Gupta vd., 2018).

Bu çalışmada elde edilen ve petrol parçalayan diğer bir suş, *Comamonadaceae* familyasına ait petrol parçalayan D9'un gram-negatif, basil şeklinde olduğu bulunmuştur. 237 istasyonundan izole edilen D9'un aerob, spor oluşturmeyen, hareketli ve oksidaz, katalaz, nişasta hidrolizi, sitrat, üreaz pozitif ve jelatin testi negatif olarak bulunmuştur (Tablo.5.3)

Tablo 5.3 D9 'un fenotipik özelliklerinin diğer bazı *Delftia* türleri ile karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5	6
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram özelliği	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Spor	(-)	N.D	N.D	(-)	N.D	(-)
Hareket	(+)	(-)	(+)	(+)	N.D	(+)
Oksijen gereksinimi	Aerob	N.D	N.D	N.D	Aerob	Aerob
Ürediği sıcaklık aralığı (C°)	20-40	20-50	10-40	3-37	4-30	4-41
Optimum üreme sıcaklığı (C°)	35	30	35	25	28	30
Ürediği pH aralığı	5.0-10.0	5.0-9.0	5.0-9.0	5.0-10.0	6-10	N.D
Optimum üreme pH'sı	9.0-10.0	8.0	7.0	6.0-7.0	7.0	N.D
Nişasta hidrolizi	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Jelatin hidrolizi	(-)	(-)	N.D	(+)	(-)	(-)
Oksidaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Katalaz	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sitrat	(+)	N.D	(+)	(+)	N.D	N.D
Üre	(+)	N.D	(+)	N.D	(-)	N.D
İndol	(+)	N.D	N.D	N.D	(-)	(+)
NaCl Direnci (%)	3	2	N.D	0.1	1	0.5-1.5

(+): pozitif, (-): negatif, N.D: test edilmemiş.

1. *Delftia tsuruhatensis* strain D9, 2. *Delftia* sp. strain NL1 (Lenchi vd., 2020). 3. *D. tsuruhatensis* strain T7^T (Shigematsu vd., 2003) ,4. *D. lacustris* strain 332^T (Jørgensen vd., 2009), 5. *D. rhizosphaerae* RA6T (Carro vd., 2017), 6. *D. acidovorans* strain ACM 489 (Wen, 1999)

Lenchi vd. (2020) tarafından, *Delftia* sp.NL1'in gram negatif, hareketsiz, basil şeklinde ve oksidaz pozitif iken katalaz negatif olarak bildirilmiştir. Ayrıca, *Delftia* suşları üzerinde yapılan diğer birkaç çalışmada, hücrelerin gram-negatif, hareketli, basil şeklinde, katalaz ve oksidaz testi açısından pozitif oldukları rapor edilmiştir (Carro vd., 2017; Jørgensen vd., 2009; Shigematsu vd., 2003).

D9 suşu için yapılan sıcaklık ve pH üreme aralığı çalışmasında, sırasıyla 20-40C° (Optimum 35C°) ve 5.0-10.0 (Optimum pH 9.0-10.0) olarak bulunmuştur. Yapılan literatür araştırmasında, *Delftia tsuruhatensis* T7^T için sıcaklık 10-40°C (optimum 35°C), pH 5.0-9.0 (Optimum 7-0) (Shigematsu vd., 2003); *Delftia lacustris* 332^T suşu

için sıcaklık 3-37°C (Optimum 25°C), pH 5.0-10.0 (Optimum 6.0-7.0) (Jørgensen vd., 2009); *D. rhizosphaerae* RA6T için ise sıcaklık 4-30°C (Optimum 28°C), pH 6.0-10 (Optimum 7.0) (Carro vd., 2017) olarak rapor edilmiştir. Yakın tarihli diğer bir çalışmada ise Lenchi vd. (2020) *Delftia* sp. NL1 suşunun ürettiği sıcaklık aralığının 20-50°C (Optimum 30°C) ve pH'nın 5.0-9.0 (Optimum pH 8.0) aralıklarında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. D9'un NaCl'yi %3'e kadar tolere ettiği bulunmuştur. Jørgensen vd. (2009) *D. lacustris* strain 332^T'nin %0.1 oranında, Carro vd. (2017) ise *D. rhizosphaerae* RA6T'nin %1 oranında NaCl'yi tolere ettiğini bulmuşlardır.

Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda D9 suşunun ampisilin, fusidik asit, kanamisin, gentamisin, streptomisin'e dirençlik gösterdiği, tilmikosin'e yarı duyarlı, tetrasiklin'e ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Antibiyotiklerin *Delftia* sp. üzerindeki etkileri konusunda birkaç çalışma yapılmıştır. Lenchi vd., (2020), *Delftia* sp. NL1 suşunun ampisiline dirençli ancak fusidik asit, gentamisin ve kanamisine duyarlı olduğunu, diğer bir çalışmada ise *Delftia tsuruhatensis* suşu TR1180'in ampisilin, gentamisin, tetrasiklin ve streptomisin'e dirençli, fakat kloromfenikol'e duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Cheng vd., 2021). Tablo 5.3'de D9 suşunun fenotipik özelliklerinin diğer bazı *Delftia* türlerine benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Yapılan 16 S rRNA gen dizi analizi, D9 suşunun *Delftia* cinsinin bir üyesi olduğunu ve daha çok *Delftia tsuruhatensis*'e (%100) benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Filogenetik analize göre D9 suşunun *Delftia* sp. NL 'ye en yakın olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA gen dizileri kullanılarak benzer bazı filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; Jørgensen vd. (2009), *D. lacustris* strain 332^T suşunun *D. tsuruhatensis* T7^T (%99,9)'ye ve Lenchi vd (2020), *Delftia* sp. NL1 suşunun, daha çok *Delftia lacustris* 332^T (%99,92)'ye ve *D. tsuruhatensis* T⁷ (%99,85)'ye benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Petrole kirlenmiş alandan 237.istasyon izole edilen D11 ve E2, Güney Raman1 istasyonundan izole edilen E1, Gammaproteobacteria familyasında *Acinetobacter* cinsi içinde yer alan D11, E1 ve E2 suşlarının gram-negatif ve aerobik oldukları tespit edilmiştir. D11'in kokobasil, hareketli, spor oluşturan, E1'in kokobasil, hareketli ve spor oluşturmayan, E2'in kokobasil, hareketsiz ve spor oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.4). D11, E1 ve E2 suşları için yapılan sıcaklık ve pH aralığı çalışmasında

sırasıyla, D11'in 20-40°C (Optimum 35°C), pH 5.0-10.0 (Optimum pH 8.0-10.0), E1'in 20-40°C (Optimum 35°C), pH 5.0-10.0 (Optimum pH 9.0-10.0), E2 suşunun 20-40°C (35°C), pH 4.0-10.0 (Optimum pH 4.0-10.0) üredikleri tespit edilmiştir. Önceki yapılan literatür çalışmalarında, Acer (2016), *Acinetobacter* sp. BT1A için sıcaklık pH 5.0-11.0 (Optimum pH 5.0) ve, 10-45°C (Optimum 30°C), Yuan vd (2014), sıcaklık *Acinetobacter* strain USTB-X sıcaklık 25-45°C (Optimum 30°C), pH 6.0-8.0 (pH 7.0), Liu vd. (2014) *Acinetobacter* sp. strain LS-1 sıcaklık 20-45°C (optimum 30°C) ve pH 5.0-12.0 (Optimum pH 7.0), Pasioa vd. (2013) *Acinetobacter tandoii* RTE1.4 sıcaklık 25-40°C (Optimum 28°C), pH 5.0-11.0 (Optimum 7.0), Zhang vd. (2014), *Acinetobacter junii* VA2 için sıcaklık ise 20-40°C (Optimum 30°C), pH 6.0-9.0 (Optimum pH 7.0) olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca D11 ve E1'in NaCl'yi %3'e ve E2'nin ise NaCl'yi %5 olarak tolere ettikleri bulunmuştur. Önceki yapılan benzer bir çalışmada Cormack ve Fraile (1997), *Acinetobacter* ADH-1 %3,5 NaCl, Acer (2016) *Acinetobacter* sp. BT1A'nın NaCl'yı %4 tolere ettiğini bulmuşlardı.

Tablo 5.4 D11, E1 ve E2'nin fenotopik özelliklerinin diğer bazı *Acinetobacter* türleri ile karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hücre şekli	Kokoba sil	Kokoba il	Kokoba il	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Kokoba sil	Basil
Gram özellliği	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Spor	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	N.D	N.D	N.D
Hareket	(+)	(+)	(-)	N.D	(-)	(-)	(-)	N.D	(+)	(-)
Oksijen gereksinim i	Aerob	Aerob	Aerob	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	Aerob	N.D
Ürediği sıcaklık aralığı (C°)	20-40	20-40	20-40	20-45	25- 45	N.D	N.D	25-40	10-45	20- 40
Optimum üreme sıcaklığı (C°)	35	35	35	30	30	N.D	N.D	28	30	30
Ürediği pH aralığı	5.0-10.0	5.0-10.0	4.0-10.0	5.0- 12.0	6.0- 8.0	N.D	N.D	5.0- 11.0	5.0- 11.0	6.0-9.0
Optimum üreme pH'sı	8.0-10.0	9.0-10.0	4.0-10.0	7.0	7.0	N.D	N.D	7.0	5.0	7.0
Nişasta hidrolizi	(+)	(+)	(+)	N.D	N.D	N.D	N.D	ND	(+)	(+)
Jelatin hidrolizi	(-)	(+)	(-)	N.D	N.D	N.D	N.D	(-)	(+)	(+)
Oksidaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sitrat	(+)	(+)	(+)	N.D	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Üre	(-)	(-)	(-)	N.D	N.D	N.D	N.D	(-)	(+)	N.D
İndol	(-)	(-)	(-)	N.D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N.D
NaCl Direnci(%)	3	3	5	N.D	N.D	N.D	N.D	0-9	4	0-9

(+): pozitif, (-): negatif, N.D: test edilmemiş.

1. *Acinetobacter pittii* strain D11, 2. *Acinetobacter pittii* strain E1, 3. *Acinetobacter calcoaceticus* strain E2, 4. *Acinetobacter* sp. strain LS-1 (Liu vd., 2014), 5. *Acinetobacter* strain USTB-X (Yuan vd., 2014), 6. *Acinetobacter* sp. strain Alp6 (Singh vd., 2011), 7. *Acinetobacter* sp. strain Alp7 (Singh vd., 2011), 8. *Acinetobacter tandoii* strain RTE1.4 (Pasioa vd., 2013) , 9. *Acinetobacter* sp. strain BT1A (Acer, 2016), 10. *Acinetobacter junii* strain VA2 (Zhang vd., 2014)

D11'in katalaz, nişasta hidrolizi, sitrat testleri pozitif, üreaz, jelatin, indol ve oksidaz testleri negatif olarak, E1'in katalaz, nişasta hidrolizi, sitrat, jelatin hidrolizi testleri pozitif, oksidaz, üre ve indol negatif olarak ve E2'nin katalaz, nişasta hidrolizi, sitrat testleri pozitif, jelatin hidrolizi, üre ve indol ve oksidaz testleri negatif olarak bulunmuştur. *Acinetobacter* cinslerinin en göze çarpan özellikleri oksidaz testinin negatif olmasıdır (Bergogne-Berzin ve Tower 1996). D11, E1 ve E2 suşlarında

oksidaz testi negatif bulunmuştur. Acer (2016), yaptıkları çalışmada *Acinetobacter* sp. BT1A'nın gram negatif, kokobasil ve aerobik ve katalaz, sitrat, nişasta, jelatin hidroliz, üre testleri pozitif, oksidaz ve indol negatif tespit etmişlerdir. Daha önceki *Acinetobacter* üzerindeki çalışmalarda gram-negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz olduğu rapor etmişlerdir. Katalaz pozitif, oksidaz ve indol negatif bulmuşlardır (Liu vd., 2014; Pasioa vd., 2013; Singh vd., 2011; Yuan vd., 2014).

D11, E1 ve E2 suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre, D11'in ampisilin, gentamisin, penisilin, kloramfenikol'a dirençlik gösterirken, kanamisin ve tilmikosin'e yarı duyarlı, streptomisin ve tetrasiklin'e duyarlı, E1'in ampisilin, kanamisin, penisilin, kloramfenikol'a dirençlik gösterirken, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin duyarlı, E2'nin ampisilin, kanamisin, basitrasin, penisilin, kloramfenikol'a dirençlik gösterirken, gentamisin'e yarı duyarlı, tilmikosin, streptomisin ve tetrasiklin duyarlı bulunmuştur. Önceki birkaç çalışmada, Saadoun (2002), *Acinetobacter lowfii* suşunun tetrasiklin ve penisiline'e dirençli, kloramfenikol'e duyarlı olduğunu bulmuştur. Kim vd. (2008), *Acinetobacter soli*, sp. nov suşunun ampisilin, penisiline duyarlı fakat gentamisin kanamisin, streptomisin, kloramfenikol ve tetrasiklin'e dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer çalışmada *Acinetobacter* sp. BT1A'nın ampisilin, penisilin ve kloramfenikol'e dirençlik, gentamisin'e duyarlı olduğunu bulmuşlardır (Acer, 2016). Tablo 5.4'de verildiği üzere, D11, E1 ve E2 suşlarının fenotopik özellikleri ile diğer *Acinetobacter* türlerinin karşılaştırılmasında gram-negatif, oksidaz, katalaz, indol testleri gibi özelliklerin *Acinetobacter* türlerinde ortak diğer özelliklerin türden türe değişiklik göstermektedir. D11, E1 ve E2'in diğer türlerden ayrılan belirgin özelliği geniş optimum pH aralığında üreyebilmeleridir.

16 S rRNA gen dizisinin analiz sonucuna göre D11, E1 ve E2 suşlarının *Acinetobacter* cinsinin üyesi olduklarını ve daha çok D11'in *Acinetobacter pittii* (%99.93), E1'in *Acinetobacter pittii* (%100), E2 suşunun *Acinetobacter calcoaceticus* (%100) dizi benzerliğine sahip oldukları belirlenmiştir. 16 rRNA dizisi kullanılarak filogenetik analiz sonucunda D11'in *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006'e, E1'in *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006'e, E2'nin *Acinetobacter* USTB-X'e benzerlik gösterdiği bulunmuştur. 16S rRNA gen dizileri kullanılarak benzer bazı filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Min vd. (2012), *Acinetobacter* sp. Y9 suşunun *Acinetobacter venetianus* RAG-1T (%99,8)'a, Acer (2016), *Acinetobacter* sp. BT1A

suşunun *Acinetobacter baumannii* DSM 30007'ye, Yuan vd. (2014) *Acinetobacter* USTB-X suşunun, *Acinetobacter calcoaceticus* (%98,81), *Acinetobacter pittii* (%98,32) *Acinetobacter nosocomialis* (%97,81), *Acinetobacter brisouii* (%97,11) ve *Acinetobacter soli* (%96,85) benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Liu vd. (2014) *Acinetobacter* sp. LS-1 suşunun *Acinetobacter beijerinckii* mj01-PW12-OH10 benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Şekil 4.66-4.72'de %1'lik hidrokarbon kaynağı olan besiyerlerinde OD (600nm) değerlerinin yansıttığı üreme grafiklerinde görüldüğü üzere *Delftia tsuruhatensis* D9, *Acinetobacter pittii* D11, *Pseudomonas rhodesiae* D12 ve *Acinetobacter pittii* E1 suşlarının hekzadekan ortamında, *Enterobacter ludwigii* D8 ve *Acinetobacter calcoaceticus* E2 suşlarının ise pentadekan ortamında en iyi üredikleri tespit edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* D7 suşunun ise karbon kaynağı olarak dekan ortamında en iyi ürediği bulunmuştur. Suşların hekzadekanda üremeleri karşılaştırıldığında en yüksek *Acinetobacter pittii* E1'de, en düşük ise *Pseudomonas aeruginosa* D7 ve *Acinetobacter calcoaceticus* E2 'de olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* D7, *Enterobacter ludwigii* D8, *Delftia tsuruhatensis* D9'un squalen bulunan ortamda kontrolle göre kayda değer bir çoğalma olurken diğer izolatlarda önemli bir çoğalma olmadığı bulunmuştur. Tüm suşların hekzan, heptan, oktan ve toluen de üremediği tespit edilmiştir.

Diğer literatür çalışmalarında, *Delftia tsuruhatensis* B7 suşunun, ham petrol ve hekzadekan ortamında çoğaldığı rapor edilmiştir. (Roy vd., 2014). Ayrıca *Delftia Lacustris* LZ-C'nin, naftalen, 2-metilnaftalen, antrasen, fenantren, piren, naftol, benzen, fenol veya toluen gibi tek karbon kaynağı olarak aromatik hidrokarbonlarda ürediği tespit edilmiştir (Wu vd., 2016b). Hossain vd. (2022) yaptıkları en yakın zamanlı çalışmalarında *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. ve *Enterobacter* sp. suşlarının dizeli karbon kaynağı olarak kullanıp ürediklerini rapor etmişlerdir. Acer (2016), *Acinetobacter* sp. BT1A suşunun alifatik hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkan ortamlarında (tridekan, pentadekan ve hekzadekan) çoğaldığı, fakat kısa zincirli alkanlar olan heptan, toluen'de üremediklerini bulmuştur.

Çalışmamızda suşlar tarafından ham petrolün biyodegradasyon oranlarını tespit etmek için %1'lik ham petrol bulunan BM ortamına 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. GC-

MS analizi sonucuna göre ham petroldeki C11-C33 aralığındaki düz zincirli n-alkanları yaklaşık olarak *Enterobacter ludwigii* D8'in %27, *Delftia tsuruhatensis* D9'un %12, *Pseudomonas putida* D10'nun %18, *Acinetobacter pittii* D11'in %43, *Pseudomonas rhodesiae* D12'nin %21, *Acinetobacter pittii* E1'in %9 ve *Acinetobacter calcoaceticus* E2 'nin ise %12 oranında degradasyona uğrattıkları belirlenmiştir (Tablo 4.8). En iyi ham petrolü *Acinetobacter pittii* D11'in degradasyona uğratma oranına sahip olduğu, en düşük ise *Acinetobacter pittii* E1 tarafından olduğu tespit edilmiştir.

Hekzadekan (C16) biyodegradasyonu oranını belirlemek için izole edilen ve petrol hidrokarbonları ortamında üreyen bakteri suşları, 3 günlük inkübasyon sonucunda %1'lik hekzadekanı yaklaşık olarak *Delftia tsuruhatensis* D9'un %65, *Acinetobacter pittii* D11'in %70, *Pseudomonas rhodesiae* D12'nin %38 ve *Acinetobacter pittii* E1'in %76 oranında parçaladıkları belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada 3 günlük inkübasyon sonucunda %1'lik pentadekanı yaklaşık *Pseudomonas aeruginosa* D7'nin %3, *Enterobacter ludwigii* D8'in %29, *Acinetobacter calcoaceticus* E2'in ise %48 oranında parçaladığı tespit edilmiştir.

Petrol hidrokarbonlarından biyolojik olarak en fazla parçalanabilen n-alkanlardır. Diğer naftenik, aromatik hidrokarbonlara nispeten mikrobiyal türler tarafından daha çok parçalamaktadır (Chaerun vd., 2004). Daha önceki çalışmalarda; *Acinetobacter* cinsine ait izole edilen *Acinetobacter* ADH-1 suşunun karbon kaynağı olarak ham petrol yanında, hekzadekan ve dodekanı kullandığı tespit edilmiştir (Cormack ve Fraile, 1997). Throne-Holst vd. (2007) yaptıkları benzer çalışmada *Acinetobacter* sp. suşunun tek karbon kaynağı olarak farklı zincir uzunluklarına (C10-C40) sahip n-alkanları kullandığını belirlemişlerdir. Min vd. (2012), *Acinetobacter* strain Y9 suşunun, C9-C22 aralığındaki n-alkanları tek karbon kaynağı olarak kullandığını ve 7 gün sonunda %53,28 oranında parçalama gerçekleştirdiğini bulmuşlardır. Panda vd (2013), *Pseudomonas aeruginosa* türüne ait suşun %0,5'lik dizeli 20 gün içinde %49.93 oranında parçaladığını rapor etmişlerdir. Acer (2016), *Acinetobacter* sp. BT1A suşunun %1'lik ham petrolde 7 günlük inkübasyonu sonucunda %83 oranında parçalama gerçekleştirdiğini bulmuşlardır. *Pseudomonas* sp. 6C suşunun, %1 ham petrolde 10 günlük inkübasyon sonunda n-alkanları (C9-C34) %91.62 ve

Acinetobacter sp. strain 8F'nin C12-C34 aralığındaki hidrokarbonları %41 oranında parçaladıkları bulunmuştur (Karam, 2016).

Varjani ve Upasani (2016), *P. aeruginosa* NCIM 5514 ham petrolü yaklaşık olarak %60 oranında parçaladığını bulmuşlardır. Mukherjee vd. (2016) , petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *E. cloacae* suşu S1:CND1'in n-hekzan, n-hekzadekan gibi alkanları, poliaromatik naftalini, dizel ve ham petrolü parçaladığını belirlemişlerdir. Chebbi vd. (2017), *P. aeruginosa* W10 suşunun, büyüme substratları olarak hekzadekan, naftalin, fenantren, floranten ve piren'i kullandığını belirlemişlerdir. Kojouri ve Ardestani (2018), ham petrol parçalayan 9 farklı bakteri izole etmişlerdir. *Bacillus* sp. SA13, *Pantoea* sp. SA1112, *Pseudomonas aeruginosa* sp. SA21 ve *Bacillus* sp. SA23 %1 ham petrolü 7 günlük inkübasyonu sonucunda parçalama oranları sırasıyla *Enterobacter* sp. SA711 %89, *Acinetobacter* sp. SA172 %86 ve *Pseudomonas* sp. SA75 %68 olarak tespit etmişlerdir. *Acinetobacter baumannii* MKS2'nin 7 gün sonunda ham petrolü yaklaşık %43'ünü parçaladığını bulmuşlardır (Muthukamalam vd., 2017). Wang vd. (2019), *Acinetobacter pittii* H9-3 suşunun 21 günlük inkübasyonu sonunda ham petrolü %36,8 oranında parçaladığını tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada, *Enterobacter* türleri ALK-23, *Bacillus methylotrophicus* ALK16 ve *Alcaligenes* türleri ALK-14'ün sırasıyla maksimum %5,59, %8,11 ve %11,65 oranında parçaladıklarını bulmuşlardır (Dwivedi vd., 2019). Son zamanlarda, *Delftia* sp. NL1'in 7 gün sonunda dizeli %66,76'sından daha fazlasını parçaladığını tespit etmişlerdir (Lenchi vd., 2020).

Son yıllarda birçok benzer çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Medić vd. (2020), alkalifilik ve metallotolerant bakteri *P. aeruginosa* 'nin etkili bir n-alkan ve PAH indirgeyicisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu bakteri suşuyla 7 günlük inkübasyon sonrasında, her bir substratın (n-hekzadekan, n-nonadekan, floren, fenantren ve piren) biyolojik bozunmasının %41 ile %98'in aralığında olduğu tespit etmişlerdir. Bacosa vd. (2021), *Pseudomonas* sp. suşunun oktan, toluen, etilbenzen ve ksileni parçalayabildiğini tespit etmişlerdir. Allamin vd. (2021), *Enterobacter* sp. IAA-01 suşunun 21 gün sonununda (GC-MS) analizi sonucunda dizeli %78 oranında parçaladığını belirlemişlerdir. Cai vd. (2021), petrolle kirlenmiş alandan izole edilen *Acinetobacter* sp. SCYY-5 suşunun 10 günlük inkübasyon sonucunda (C9-C34) aralığındaki n-alkanları parçaladığını belirlemişlerdir. El-Shennawy vd. (2022) yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* CS1.1

and *Bacillus licheniformis* CS1.7 olarak tanımlanan izolatlar 15 günlük inkübasyon sonrasında petrol hidrokarbonları sırasıyla %65 ve %64 oranında parçaladıklarını bulmuşlardır.

Tablo 4.11’de görüleceği üzere, izole ettiğimiz bazı suşlar tek veya karışık kültürleri kullanılarak, toplamda %1’lik hekzadekan ve pentadekan karışımlarının olduğu ortamlarda suşların üremeleri 600nm’de OD ölçümü sonucunda en yüksek çoğalmanın 3 bakterinin karışımında (*Enterobacter ludwigii* D8+*Acinetobacter pittii* D11+*Acinetobacter calcoaceticus* E2) olduğu, en düşük çoğalmanın ise (*Enterobacter ludwigii* D8+ *Acinetobacter calcoaceticus* E2)’de olduğu tespit edilmiştir. GC-MS analizi sonucunda tek ve karışık kültürlerin alkan karışımlarının olduğu ortamlarda suşların biyodegradasyon oranları sırasıyla (*Enterobacter ludwigii* D8) %31, (*Acinetobacter pittii* D11) %43, (*Acinetobacter calcoaceticus* E2) %53, (*Enterobacter ludwigii* D8+ *Acinetobacter pittii* D11) %60, (*Acinetobacter pittii* D11+ *Acinetobacter calcoaceticus* E2) %49, (*Enterobacter ludwigii* D8+ *Acinetobacter calcoaceticus* E2) %61 ve (*Enterobacter ludwigii* D8+ *Acinetobacter pittii* D11+ *Acinetobacter calcoaceticus* E2) %72 olarak belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda, Chhatre vd. (1996), Sugiura vd. (1997), Vasudevan ve Rajaram (2001) karışık bakteri konsorsiyumlarının ham petrolde bulunan doymuş maddeleri %28-51’ini ve aromatikleri %0-18’ini, parçaladığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Sathishkumar vd. (2008), hidrokarbon ortamında karışık bakteri konsorsiyumunun tek suşlara göre daha fazla çoğalma ve parçalama gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, karışık bakteri konsorsiyumunun, 18 günlük inkübasyon sonucunda %1’lik ham petrolün maksimum %77 sini bozundurduğunu bulmuşlardır. Suşlar tek kültür olarak şu şekilde bozunma gerçekleştirmiştir: *Bacillus* sp. IOS1-7 %64, *Pseudomonas* sp. BPS1-8 %69, *Corynebacterium* sp. BPS2-6 %41 ve *Pseudomonas* sp. HPS2-5 %45. Aynı şekilde, Wei vd. (2021), petrolle kirlenmiş çamurdan üç petrol parçalayıcı suş elde etmiş ve A2 (*Pseudomonas putida*), A4 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ve L5 (*Sphingomonas* sp) olarak tanımlanan suşların ve bunların konsorsiyumunun (C) ham petrol üzerindeki bozunmalarını araştırmak için ham petrol bozunma deneyleri yapmıştır. Deney sonucunda yapılan analizler, A2, A4, L5 ve C’nin petrol bozunma oranları, 28 günlük kültürasyondan sonra sırasıyla %42,8, %48,01, %26,56 ve %81,07 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda *Acinetobacter pittii* D11 ve *Acinetobacter calcoaceticus* E2 suşları için tasarlanan primerlerden ilki (primer 1) kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin alkM geninin dizi analizi sonuçlarına göre sırasıyla %93,06 ve %92,72 oranında *Acinetobacter* sp. BUU8 (A6N7F9) alkM gen dizisine benzerlik gösterdiği, ayrıca *Acinetobacter pittii* D11 ve *Acinetobacter calcoaceticus* E2 suşları için tasarlanan diğer primer (primer 3) kullanıldığında elde edilen PCR ürünlerinin alkB geni dizi analizi sonuçlarına göre, sırasıyla %94,48 oranında *Pseudomonas citronellolis* (A0A024A3Z2) ve %95,52 oranında *Pseudomonas mendocina* (A4XPE8) alkB gen dizilerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Mikrobiyal aerobik bozunma, hidrokarbon molekülleyiciye moleküler oksijen eklenmesiyle sağlanır. Aerobik bozunmada yer alan Alk enzimini kodlayan alkan monooksijenaz (alkB) geninin, alkan parçalayan bakterilerin saptanması için potansiyel olarak işlevsel bir gen biyobelirteçi olduğu bilinmektedir (Li vd., 2013). *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Firmicutes*'in üyeleri birkaç alkan monooksijenaz gen ailesine sahip olduğu bilinmektedir. Filogenetik analiz, ham petrol hidrokarbon bozunmasını içeren genlerin, daha önce *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus*, *Alcanivorax*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* ve *Achromobacter* alkan hidroksilaz (alkB) genlerinde kümelendiğini göstermiştir (Hassanshahian vd., 2012; Tanase vd., 2013; Wang vd., 2010b). Whyte vd. (2002) tarafından hidrokarbon parçalayan gen analizinde, *Pseudomonas putida* GP01'in Pp alkB; *Rhodococcus* sp. suşu Q15'in Rh alkB1 ve Rh alkB2 ve *Acinetobacter* sp. suşu ADP-1'in Ac alkM genlerini taşıdıklarını belirlenmiştir. Ayrıca, Hou vd. (2013), *Acinetobacter* sp. F9'daki CYP153A geni dizisinin, *Acinetobacter* sp. EB104 'nin CYP153A gen dizisiyle %99 benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır. F9 suşunun bir CYP153A geni ve iki AlkB genine sahip olduğunu gösterdi. Bunlardan bir AlkB gen dizisinin, *Acinetobacter venetianus* VE-C3'ün AlkM gen dizisiyle %99 benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ülkemizin petrol ihtiyacının çoğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden karşılanmaktadır. Petrol ve türevleri tarafından kirlenen veya kirlilik tehdidi altında bulunan bölgemiz topraklarının biyoremediasyonu sürecinde toprakta bulunan petrol parçalayan bakterilerin izole edilerek teşhis edilmesi büyük önem arz etmektedir.

Çalışmamızda izole edilen suşlardan 3 suşun en iyi parçalama potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. *Enterobacter ludwigii* D8, *Acinetobacter pittii* D11 ve *Pseudomonas rhodesiae* D12'nin suşların BM ortamında 5 günlük inkübasyon sonucunda %1'lik ham petrolü karbon kaynağı olarak kullanabildikleri ve degradesyon oranlarının *Enterobacter ludwigii* D8'in %27, *Acinetobacter pittii* D11'in %43, *Pseudomonas rhodesiae* D12'nin %21 olduğu suşların biyoremediasyon çalışmalarında kullanma potansiyellerinin bulunduğu görülmektedir.

Ayrıca uzun zincirli alkanları da karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneği bulunmaktadır. Alkan, ham petrolün ve tek hidrokarbonların daha kısa inkübasyon sürelerinde parçalanmasında etkili görünmektedir

Daha fazla mikrobiyal konsorsiyum çalışmalar ham petrol ve çeşitli hidrokarbon üzerinde yapılması biyoremediasyonun için iyi avantaj sağlayabilir. Ayrıca bu bulunan genlerin enzimleri saflaştırılarak karakterize edilebilir. Petrol parçalayan genler uygun plazmitlerle *E. coli*'ye aktarılarak klonlama çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-30.
- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(2), 224-250.
- Abtahi, H., Parhamfar, M., Saeedi, R., Villasenor, J., Sartaj, M., Kumar, V., ... & Koolivand, A. (2020). Effect of competition between petroleum-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms on the efficiency of petroleum sludge bioremediation: Field application of mineral-based culture in the composting process. *Journal of Environmental Management*, 258, 110013.
- Acer, Ö. (2014). Petrolle Kirletilmiş Topraklardan Petrolü Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Acer, Ö., Güven, K., Bekler, F. M., & Gül-Güven, R. (2016). Isolation and characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakır, in the Southeast of Turkey. *Bioremediation Journal*, 20(1), 80-87.
- Acer, Ö., Güven, K., Poli, A., Di Donato, P., Leone, L., Buono, L., ... & Finore, I. (2020). *Acinetobacter mesopotamicus* sp. nov., petroleum-degrading bacterium, isolated from petroleum-contaminated soil in Diyarbakir, in the southeast of Turkey. *Current Microbiology*, 77(10), 3192-3200.
- Adebayo, F. O., & Obiekezie, S. O. (2018). Microorganisms in waste management. *Research Journal of Science and Technology*, 10(1), 28-39.
- Aislabie, J., Saul, D. J., & Foght, J. M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10(3), 171-179.
- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247-1252.
- Allamin, I. A., Dungus, F. B., Ismail, H. Y., Ismail, G., Bukar, U., Shettima, H., & Faruk, A. U. (2021). Biodegradation of hydrocarbon by *Enterobacter* sp IAA-01 isolated from hydrocarbon exploration site soil of Kukawa Northeastern Nigeria. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 15(9), 384-389.
- Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R., & Hossain, M. E. (2012). A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of environmental management*, 113, 213-227.

- Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, J. R., Dierstein, R., & Tadros, M. H. (2000). Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. *Microbiological research*, 155(3), 157-164.
- Amoozegar, M. A., Shahinpei, A., Sepahy, A. A., Makhdoumi-Kakhki, A., Seyedmahdi, S. S., Schumann, P., & Ventosa, A. (2014). *Pseudomonas salegens* sp. nov., a halophilic member of the genus *Pseudomonas* isolated from a wetland. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_10), 3565-3570.
- Amouric, A., Quéméneur, M., Grossi, V., Liebgott, P. P., Auria, R., & Casalot, L. (2010). Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete. *Journal of applied microbiology*, 108(6), 1903-1916.
- Anwar, N., Abaydulla, G., Zayadan, B., Abdurahman, M., Hamood, B., Erkin, R., ... & Rahman, E. (2016). *Pseudomonas populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1419-1425.
- Arda, M., (2011). Temel mikrobiyoloji, MedisanYayın Serisi no: 71: 551, ANKARA.
- Asghar, H. N., Rafique, H. M., Zahir, Z. A., Khan, M. Y., Akhtar, M. J., Naveed, M., & Saleem, M. (2016). Petroleum hydrocarbons-contaminated soils: remediation approaches. In *Soil science: agricultural and environmental perspectives* (pp. 105-129). Springer, Cham.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180-209.
- Atlas, R. M. (1991). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52, 149-156.
- Azhar, E. I., Papadioti, A., Bibi, F., Ashshi, A. M., Raoult, D., & Angelakis, E. (2017). *Pseudomonas saudimassiliensis* sp. nov. a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New microbes and new infections*, 16, 43-44.
- Bacosa, H. P., Mabuhay-Omar, J. A., Balisco, R. A. T., Omar, D. M., & Inoue, C. (2021). Biodegradation of binary mixtures of octane with benzene, toluene, ethylbenzene or xylene (BTEX): insights on the potential of *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Cupriavidus* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(7), 1-8.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32(2), 155-164
- Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., ... & Medigue, C. (2004). Unique features revealed by the genome sequence of

- Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic acids research*, 32(19), 5766-5779.
- Barbly, R. C., and Barbour, M. G. (1984). The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways. In: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. D.T. Gibson (ed) MarcelDekker, Inc., New York. Pp. 253-294.
- Ben I and Baird J.(2021). A review of the nigeria petroleum end the insight in oil pollution management; sustainability appraisal. *International Journal of Innovation Scientific Research and Review*. 3(12),2141-2147.
- Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 148-165.
- Black, J.G. (1996). *Microbiology principles and applications*. Prentice-Hall, pp: 790, New Jersey, USA.
- Boonchan, S., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1007-1019.
- Bouvet, P., and Grimont, P. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp.nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and amended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 36, 228-240.
- Bouvet, P.J.M., and Joly-Guillou. M. L. (2000). *Acinetobacter* spp. 34-86. In J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet (ed.), *Summary of Clinical Bacteriology*. Eska, Paris.
- Braña, V., Cagide, C., & Morel, M. A. (2016). The sustainable use of *Delftia* in agriculture, bioremediation, and bioproducts synthesis. In *Microbial models: from environmental to industrial sustainability* (pp. 227-247). Springer, Singapore.
- Busse, H. J., Denner, E. B., & Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of biotechnology*, 47(1), 3-38.
- Cabral, L., Giovanella, P., Pellizzer, E. P., Teramoto, E. H., Kiang, C. H., & Sette, L. D. (2022). Microbial communities in petroleum-contaminated sites: Structure and metabolisms. *Chemosphere*, 286, 131752.
- Cai, Y., Wang, R., Rao, P., Wu, B., Yan, L., Hu, L., ... & Zhou, X. (2021). Bioremediation of petroleum hydrocarbons using *Acinetobacter* sp. SCYY-5 isolated from contaminated oil sludge: Strategy and effectiveness study. *International journal of environmental research and public health*, 18(2), 819.
- Callaghan, A. V. (2013). Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. *Current opinion in biotechnology*, 24(3), 506-515.

- Cappello, S., Santisi, S., Calogero, R., Hassanshahian, M., & Yakimov, M. M. (2012). Characterisation of oil-degrading bacteria isolated from bilge water. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(6), 3219-3226.
- Carro, L., Mulas, R., Pastor-Bueis, R., Blanco, D., Terrón, A., González-Andrés, F., ... & Velázquez, E. (2017). *Delftia rhizosphaerae* sp. nov. isolated from the rhizosphere of *Cistus ladanifer*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1957-1960.
- Cerqueda-Garcia, D., Garcia-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110775.
- Chaerun, S. K., Tazaki, K., Asada, R., & Kogure, K. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30(7), 911-922.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., & Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology*, 63(2), 417-431.
- Chaudhary, D. K., Bajagain, R., Jeong, S. W., & Kim, J. (2020). Biodegradation of diesel oil and n-alkanes (C 18, C 20, and C 22) by a novel strain *Acinetobacter* sp. K-6 in unsaturated soil. *Environmental Engineering Research*, 25(3), 290-298.
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghdien, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., ... & Chamkha, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122, 128-140.
- Chen, W. M., Lin, Y. S., Sheu, D. S., & Sheu, S. Y. (2012). *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62, 2315-2321.
- Chen, Y., Li, C., Zhou, Z., Wen, J., You, X., Mao, Y., ... & Jia, X. (2014). Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(7), 3433-3447.
- Cheng, C., Zhou, W., Dong, X., Zhang, P., Zhou, K., Zhou, D., ... & Ying, J. (2021). Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Strain TR1180 Isolated From A Patient From China With In4-Like Integron-Associated Antimicrobial Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11.
- Chhatre, S., Purohit, H., Shanker, R., & Khanna, P. (1996). Bacterial consortia for crude oil spill remediation. *Water Science and Technology*, 34(10), 187-193.

- Christopher, K., and Bruno, E. (2003). Identification of bacterial species. In Proceedings of the 24th. Workshop/Conf. Assoc. Biol. Lab. Educ, 24,103-130.
- Cormack, W. M., ve Fraile, E. R. (1997). Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarctic Science*, 9(2), 150-155.
- Das, N., and Chandran, P. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarboncontaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 14.
- David, Farrell. (2000). Reader's guide to the history of science. Fitzroy Dearborn Publishing. P: 934. London.
- De Bord, G. (1939). Organisms invalidating the diagnosis of gonorrhea by the smear method. *J. Bacteriol*, 39,119.
- De Oliveira Gaio, A., Rodrigues, R.C., do Nascimento, C., Secundino, N.F., Lemos, F.J.,Pimenta, P.F. and Monesi, N. (2011). Use of the checkerboard DNA-DNA hybridization technique for bacteria detection in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.). *Parasites & Vectors*, 4 (1): 1-5.
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., & Fani, R. (1997). Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Research in microbiology*, 148(3), 237-249.
- Di Martino, C., López, N. I., & Iustman, L. J. R. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, 15-20.
- Díaz, E. (2010). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7(3), 173-180.
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L., & de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11981-11991.
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S.,& Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* sp.: an overview. *Microbes and Environments*, 26(2):101-12.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2), 143-152.
- Dussault H. P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriol*, 70,484-485.
- Dwivedi, A., Chitranshi, S., Gupta, A., Kumar, A., & Bhat, J. L. (2019). Assessment of the petroleum oil degradation capacity of indigenous bacterial species isolated from petroleum oil-contaminated soil. *International Journal of Environmental Research*, 13(4), 735-746.

- El-Shennawy, S. (2022). Isolation and characterization of crude oil-degrading bacteria from petroleum oil contaminated Egyptian soil. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(1), 107-128.
- Erdoğan ,E.E., Namlı, A., & Şahin, F.(2013).Türkiye’de petrol hidrokarbonlarını parçalayan yerli bakterilerin izolasyonu ,karakterizasyonu ve hidrokarbon parçalama kabiliyetlerinin belirlenmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15(3),45.
- Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 590-592.
- Ezeonu, C. S., Tagbo, R., Anike, E. N., Oje, O. A. and Onwurah, I. N. E. (2012). Biotechnological Tools for Environmental Sustainability: Prospects and Challenges for Environments in Nigeria-A Standard Review. *Biotechnology Research International*. Vol 2012.
- Federici, C., and Mintz, J. (2014). Oil properties and their impact on spill response options. CNA, Alexandria, VA, USA.
- Feng, K., Zhang, Z., Cai, W., Liu, W., Xu, M., Yin, H., ... & Deng, Y. (2017). Biodiversity and species competition regulate the resilience of microbial biofilm community. *Molecular ecology*, 26(21), 6170-6182.
- Foght, J.M. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 93-120.
- Franzetti, L., & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of microbiology*, 57(1), 39-47.
- Fuchs, G., Boll, M., & Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds-from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 803-816.
- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J. G., & Seeger, M. (2016). From rare to dominant: a fine-tuned soil bacterial bloom during petroleum hydrocarbon bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 82(3), 888-896.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4781-4794.
- García-Valdés, E., Gomila, M., Mulet, M., & Lalucat, J. (2018). Draft genome sequence of *Pseudomonas oceani* dsm 100277T, a Deep-sea bacterium. *Genome Announcements*, 6(15), e00254-18.
- Garrrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. 2001. The history of Bergey’s Manual.In Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology. Second Edition, Springer New York, 2: 312, 1-13., NewYork.

- Geetha, S. J., Joshi, S. J., & Kathrotiya, S. (2013). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacterial isolate from oil contaminated sites. *APCBEE procedia*, 5, 237-241.
- Geng, L., Chen, M., Liang, Q., Liu, W., Zhang, W., Ping, S., ... & Lin, M. (2009). Functional analysis of a putative regulatory gene, *tadR*, involved in aniline degradation in *Delftia tsuruhatensis* AD9. *Archives of microbiology*, 191(7), 603-614.
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61-67.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in microbiology*, 1369.
- Gillespie, S.H. and Hawkey, P.M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition.
- Glazer, A.N., and Nikaido, H. (2007). Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Press. P: 539. London.
- Gomila, M., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2017). Draft genome sequence of *Pseudomonas pachastrellae* strain CCUG 46540T, a deep-sea bacterium. *Genome Announcements*, 5(14), e00136-17.
- Gupta, B., Rajor, A., & Kaur, J. (2018). Isolation, characterisation of novel *Pseudomonas* and *Enterobacter* sp. from contaminated soil of Chandigarh for naphthalene degradation. In *Utilization and Management of Bioresources* (pp. 175-186). Springer, Singapore.
- Gül Güven, R. (2007). Sıcaksu kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve Alicyclobacillus acidocaldarius sub sp. Rittmanii'nin β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması. (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Hamamura, N., vd., (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in Nocardioideis sp. strain CF8. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 4992-4998.
- Hammoud, A. (2001). Enhanced oil spill recovery rate using the weir skimmer.
- Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., & Kariminik, A. (2013). Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine pollution bulletin*, 73, 300-305.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), 7-12.

- Hassanshahian, M., Zeynalipour, M. S., & Musa, F. H. (2014). Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine pollution bulletin*, 82, 39-44.
- Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F.M., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 173-182.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., ... & Springael, D. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of microbiological methods*, 64(2), 250-265.
- Hinchliff, C. E., Smith, S. A., Allman, J. F., Burleigh, J. G., Chaudhary, R., Coghill, L. M., ... & Cranston, K. A. (2015). Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12764-12769.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., ... & Roggenkamp, A. (2005). Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and applied microbiology*, 28(3), 206-212.
- Hormaeche, P.R. and Edwards, A. (1960). A proposed genus *Enterobacter*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon*, 10, 71-74.
- Hossain, M. F., Akter, M. A., Sohan, M. S. R., Sultana, N., Reza, M. A., & Hoque, K. M. F. (2022). Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 211-216.
- Hou, D., Shi, Z., Shen, X., He, Y., Sun, M., & Wang, Q. (2013). Isolation, identification and alkane hydroxylase genes detection of a marine diesel-degrading bacterial strain (F9). *African Journal of Microbiology Research*, 7(22), 2794-2802.
- Humann, J. L., Wildung, M., Cheng, C. H., Lee, T., Stewart, J. E., Drew, J. C., ... & Schroeder, B. K. (2011). Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. *Standards in genomic sciences*, 5(3), 279-286.
- Huy, N. Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N. B., Hang, D. T., ... & Kanaya, S. (1999). Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(1), 100-102.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2761-2764.
- Jerin, I., Rahi, M., Sultan, T., Islam, M.S., Sajib, S. A., Hoque, K. M., & Reza, M. A. (2021). Diesel degradation efficiency of *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., and *Cedecea* sp. isolated from petroleum waste dumping site: a bioremediation view point. *Archives of Microbiology*, 203(8), 5075-5084.

- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, 1-13.
- Jin, H.M., Kim, J.M., Lee, H.J., Madsen, E.L., & Jeon, C.O. (2012). *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environmental science & technology*, 46(14), 7731-7740.
- Jørgensen, N.O., Brandt, K.K., Nybroe, O., & Hansen, M. (2009). *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2195-2199.
- Jung, J., & Park, W. (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2533-2548.
- Juni, E. (1984). Genus III. *Acinetobacter* brisou et prévot. 1954. p.303–307. In: N. Krieg, and J. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, vol 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Jurelevicius, D., Cotta, S. R., Peixoto, R., Rosado, A. S., & Seldin, L. (2012). Distribution of alkane-degrading bacterial communities in soils from King George Island, Maritime Antarctic. *European Journal of Soil Biology*, 51, 37-44.
- Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 51, 52-74.
- Kalaivani M., & Selvakumar S. (2019). Isolation of Effective Hydrocarbon Degrading Bacteria from Hydrocarbon Polluted Sites. *International Archive of Applied Sciences and Technology*, 95-105
- Karam, S.S. (2016). Isolation and investigation of bioremediation potentials of petroleum-degrading bacteria from kurdistan region in iraq. (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Kenzaka, T. and Tani, K. 2012. Scanning electron microscopy imaging of bacteria based on nucleic acid sequences. INTECH Open Access Publisher. Hard Cover, Publication No: 65, p:830. Shanghai.
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., & Khan, Q. M. (2013). Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90(4), 1317-1332.
- Khmelevtsova, L. E., Sazykin, I. S., Sazykina, M. A., & Seliverstova, E. Y. (2017). Prokaryotic cytochromes P450. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(4), 401-409.

- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., ... & Seong, C. N. (2008). *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *The Journal of Microbiology*, 46(4), 396-401.
- Kojuri, M., & Ardestani, F. (2018). Isolation, identification and evaluation of oil hydrocarbon decomposing bacteria from contaminated areas of oil fields. *Advances in Environmental Technology*, 3, 139-147.
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource technology*, 254, 174-179.
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), 305-315.
- Lenchi, N., Kebbouche-Gana, S., Servais, P., Lamine Gana, M., Llíros, M. (2020). Diesel biodegradation capacities and biosurfactant production in saline-alkaline conditions by *Delftia* sp NL1, isolated from an Algerian oil field. *Geomicrobiology Journal*, 37 (5):454-466.
- Li, C.T., Yan, Z.F., Chu, X., Hussain, F., Xian, W.D., Yunus, Z., ... & Li, W.J. (2015). *Delftia deserti* sp. nov., isolated from a desert soil sample. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(6), 1445-1450.
- Li, H., Wang, X. L., Mu, B. Z., Gu, J. D., Liu, Y. D., Lin, K. F., ... & Du, X. M. (2013). Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, 49-57.
- Li, H., Zhang, D., Luo, J., Jones, K. C., & Martin, F. L. (2020b). Applying Raman microspectroscopy to evaluate the effects of nutrient cations on alkane bioavailability to *acinetobacter baylyi* ADP1. *Environmental Science & Technology*, 54(24), 15800-15810.
- Li, Y. P., Pan, J. C., & Ma, Y. L. (2020a). Elucidation of multiple alkane hydroxylase systems in biodegradation of crude oil n-alkane pollution by *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 151-160.
- Liu, H., Yang, G., Jia, H., & Sun, B. (2022). Crude oil degradation by a novel strain *Pseudomonas aeruginosa* AQNU-1 isolated from an oil-contaminated lake Wetland. *Processes*, 10(2), 307.
- Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y., Chen, H., Wang, F., ... & Choi, M. M. (2014). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 52-59.
- Liu, Z., Yang, H., Huang, Z., Zhou, P., & Liu, S. J. (2002). Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 679-682.
- Logan, N.A. (1992). *Bacterial Systematics*, Blackwell Scientific Publications, p: 62-78.

- Logan, N.A. (1994). Bacterial Systematic, google elektronik kitap, Sayfa: 272.
- Ludwig, W. (2007). Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology*, 120 (3), 225-236.
- Luo, A., Wu, Y.R., Xu, Y., Kan, J., Qiao, J., Liang, L., Huang, T., Hu, Z., 2016. Characterization of a cytochrome P450 monooxygenase capable of high molecular weight PAHs oxidization from *Rhodococcus* sp. P14. *Process Biochemistry*, 1-31.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2010). Brock Biology of Microorganisms 13th edition. Palme Publishing, p: 992, Ankara.
- Maeng, J. H., Sakai, Y., Tani, Y., & Kato, N. (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal of bacteriology*, 178(13), 3695-3700.
- Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., & Cherif, A. (2018). Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated marine environments. *Recent insights in petroleum science and engineering*, 325, 325-350.
- Mahmoud, G. A. E., & Bagy, M. M. K. (2018). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. In *Microbial action on hydrocarbons* (pp. 299-320). Springer, Singapore.
- Maier, T., Forster, H. H., Asperger, O., & Hahn, U. (2001). Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(3), 652-658.
- Malatova, K. (2005). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in western New York State. Rochester Institute of Technology. Rochester. 102
- Manktelow, M. (2010). History of taxonomy. Lecture from Dept. of Systematic Biology, Uppsala University, 29.
- Manteca, A., Pelaez, A. I., Zardoya, R., & Sanchez, J. (2006). Actinobacteria cyclophilins: phylogenetic relationships and description of new class-and order-specific paralogues. *Journal of molecular evolution*, 63(6), 719-732.
- Margesin, R., Moertelmaier, C., and Mair, J. (2013). Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 84, 185-191.
- Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H., & Chen, H. (2013). Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 263, 493-500.
- McDonald, I. R., Miguez, C. B., Rogge, G., Bourque, D., Wendlandt, K. D., Groleau, D., & Murrell, J. C. (2006). Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 225-232.

- Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, P. C., Weyrauch, P., ... & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microbial Physiology*, 26, 92-118.
- Medić, A., Lješević, M., Inui, H., Beškoski, V., Kojić, I., Stojanović, K., & Karadžić, I. (2020). Efficient biodegradation of petroleum n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity. *RSC Advances*, 10(24), 14060-14070.
- Medina-Bellver, J. I., Marín, P., Delgado, A., Rodríguez-Sánchez, A., Reyes, E., Ramos, J. L., & Marqués, S. (2005). Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. *Environmental microbiology*, 7(6), 773-779.
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887-902.
- Migula, W. (1900). System der Bakterien: Handbuck der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien. Verlag von Gustav Fischer. Jena, Germany. II: 875-954.
- Min, S., Qun, L., Xian-rong, S., Deng-yong, H., Ying, H., Zhan, S., & Qing-rong, W. (2012). Isolation and identification of biodegradation ability of alkane-degrading bacteria: Molecular detection and analysis of alkane hydroxylase genes. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17), 3936-3943.
- Mittal, A., & Singh, P. (2009). Isolation of hydrocarbon-degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(9), 760-765.
- Moore, E. R., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A., Pieper, D. H., Ramos, J. L., & Palleroni, N. J. (2006). Nonmedical: pseudomonas. The prokaryotes, 6, 646-703.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva Júnior, A., & Nero, L. A. (2013). Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109-112.
- Muhalidin, A.J. (2014). Bacterial Uropathogens from patient with urinary tract infections and their antibiotic susceptibility patterns in Kalar city, North of Iraq. Master thesis, Kahramanmaraş Sütçü İmam University. Turkey.
- Mukherjee, A., Chettri, B., Langpoklakpam, J. S., Singh, A. K., & Chattopadhyay, D. (2016). Draft genome sequence of hydrocarbon-degrading *Enterobacter cloacae* strain S1: CND1, isolated from crude oil-contaminated soil from the Noonmati oil refinery, Guwahati, Assam, India. *Genome Announcements*, 4(3), e00367-16.
- Murat, E.A., Ferris, M.J. and Taylor, C.M. (2010). A framework for analysis of metagenomic sequencing data. Pacific Symposium on Biocomputing, p: 131-141.
- Muthukamalam, S., Sivagangavathi, S., Dhreshya, D., & Sudha Rani, S. (2017). Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 48, 637-647.

- Nadhe, S. B., Singh, R., Wadhwani, S. A., & Chopade, B. A. (2019). *Acinetobacter* sp. mediated synthesis of AgNPs, its optimization, characterization and synergistic antifungal activity against *C. albicans*. *Journal of applied microbiology*, 127(2), 445-458.
- Nelson, A. H. (1990). The biodegradation of halogenated organic compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 445-470.
- Nie, M., Nie, H., He, M., Lin, Y., Wang, L., Jin, P., & Zhang, S. (2016). Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. *Journal of environmental management*, 173, 34-40.
- Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., & Shen, Q. (2010). Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology advances*, 28(5), 635-643.
- Nie, Y., Chi, C. Q., Fang, H., Liang, J. L., Lu, S. L., Lai, G. L., ... & Wu, X. L. (2014b). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific reports*, 4(1), 1-11.
- Nie, Y., Liang, J. L., Fang, H., Tang, Y. Q., & Wu, X. L. (2014a). Characterization of a CYP153 alkane hydroxylase gene in a Gram-positive *Dietzia* sp. DQ12-45-1b and its “team role” with alkW1 in alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 163-173.
- Nishijima, K. A., Wall, M. M., & Siderhurst, M. S. (2007). Demonstrating pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on macadamia and identifying associated volatiles of gray kernel of macadamia in Hawaii. *Plant Disease*, 91(10), 1221-1228.
- Nzila, A. (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. *Environmental Pollution*, 239, 788-802.
- Oboh, B.O., Ilori, M.O., Akinyemi, J.O., & Adebuseye, S.A. (2006). Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen (Tarsand) deposit. *Nature and Science*, 4 (3): 51-57.
- Ojo, O. A. (2006). Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria. *African Journal of biotechnology*, 5(4), 333-337.
- Orla-Jensen, S. 1909. Die Hauptlinien des natürlichen Bakterien systems. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, 22: 97-98.
- Paauw, A., Caspers, M. P., Schuren, F. H., Leverstein-van Hall, M. A., Delétoile, A., Montijn, R. C., ... & Fluit, A. C. (2008). Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS one*, 3(8), e3018.

- Paisio, C. E., Talano, M. A., González, P. S., Pajuelo-Domínguez, E., & Agostini, E. (2013). Characterization of a phenol-degrading bacterium isolated from an industrial effluent and its potential application for bioremediation. *Environmental technology*, 34(4), 485-493.
- Palleroni, N.J. (1984) .Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984, 237AL, in: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 141-199.
- Panda, S.K., Kar, R.N., & Panda, C.R. (2013). Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading microorganisms from oil contaminated environment. *International journal of environmental sciences*, 3(5).
- Parte, A. C. (2014). LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research*, 42(D1), D613-D616.
- Pau-Roblot, C., Lequart-Pillon, M., Apanga, L., Pilard, S., Courtois, J., & Pawlicki-Jullian, N. (2013). Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate polymers*, 93, 154-162.
- Perelo, L. W. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 81-89.
- Poddar, K., Sarkar, D., & Sarkar, A. (2019). Construction of potential bacterial consortia for efficient hydrocarbon degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 144, 104770.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Rahman, K. S., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource technology*, 90(2), 159-168.
- Razak, C. N. A., Wang, W. F., Rahman, S. H. S. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (1999). Isolation of the crude oil degrading marine *Acinetobacter* sp. E11. *Acta biotechnologica*, 19(3), 213-223.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology*, 11(10), 2477-2490.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27, 191-194.
- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Boruah, H. P. D., Saikia, N., ... & Bora, T. C. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79-89.

- Rushton, D., Ghaly, A., & Martinell, K. (2007). Assessment of Canadian regulations and remediation methods for diesel oil contaminated soils. *Am. J. Appl. Sci*, 4, 465.
- Saadoun, I. (2002). Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 42(6), 420-428.
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., & Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource technology*, 191, 133-139.
- Samanta, S. K., Chakraborti, A. K., & Jain, R. K. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 98-107.
- Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A. C., David, Z., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2014). *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and applied microbiology*, 37(2), 89-94.
- Sarıçam, S., & Müştak, H.K. (2015). Filogenetik ağaçlandırma metotları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26(2), 58-64.
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource technology*, 242, 15-27.
- Sathishkumar, M., Binupriya, A.R., Baik, S.H., & Yun, S.E.(2008). Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. *Clean* .36 (1), 92-96.
- Sawadogo, A., Harmonie, O.C., Sawadogo, J.B, Kaboré, A., Traoré, A. S., & Dianou. (2014). Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso. *Journal of Environmental Protection* 5: 1183-1196.
- Scheps, D., Malca, S. H., Hoffmann, H., Nestl, B. M., & Hauer, B. (2011). Regioselective ω -hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Pseudomonas* sp. strain JS666. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(19), 6727-6733.
- Schleifer, K.H. 2009. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (8): 533–542.
- Seyis, M. (2019). Anaerobic Biodegradation Potential of Petroleum Derived Wastes Under Nitrate and Iron Reducing Conditions.(Yayınlanmamış Doktora Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Shaikhan, B. A., Güven, K., Bekler, F. M., Acer, Ö., & Güven, R. G. (2020). A highly inducible β -galactosidase from *Enterobacter* sp. *J. Serb. Chem. Soc.* 85 (5) 609-622.
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of environmental management*, 210, 10-22.
- Sharma, V., Kumar, R., Sharma, V. K., Tirola, M., & Sharma, P. K. (2020). Expression, purification, characterization and in silico analysis of newly isolated hydrocarbon degrading bleomycin resistance dioxygenase. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 533-544.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., & Kida, K. (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1479-1483.
- Shoebitz, M., Ribaud, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., & Cura, J. A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768-1774.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S.B., & Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.
- Singh, D., & Fulekar, M. H. (2010). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas putida* strain MHF 7109. *Clean-Soil Air Water*, 38(8), 781-786.
- Singh, G. B., Gupta, S., Srivastava, S., & Gupta, N. (2011). Biodegradation of carbazole by newly isolated *Acinetobacter* spp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 87(5), 522-526.
- Sly, L.I, Wen ,A., &Fegan M. (2015). *Delftia*. In: whitman WB (editor). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. USA: John Wiley & Sons, Inc, Association with Bergey's Manual Trust; 2015. pp. 1–7.
- Stancu, M.M. (2018). Bacterial degradation of petroleum and petroleum products. *J.Mol. Microbiol*, 2 (1), 2.
- Staton, J.L. (2015). Understanding phylogenies: Constructing and interpreting phylogenetic trees. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 13(1), 6.
- Strong, P. J., & Burgess, J. E. (2008). Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. *Bioremediation journal*, 12(2), 70-87.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., & Harayama, S. (1997). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1), 45-51.
- Tanase, A. M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., & Stoica, I. (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 150-154.

- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., & Zotchev, S. B. (2007). Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3327-3332.
- Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2019). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily waste water. *Water Science and Technology*, 78(12), 2626-2638.
- Tourova T P, Sokolova D S, Semenova E M, Shumkova E S, Korshunova A V, Babich T L, Poltarau A B, Nazina T N (2016). Detection of n-alkane biodegradation genes *alkB* and *ladA* in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera *Aeribacillus* and *Geobacillus*. *Microbiology*, 85(6): 693–707
- Tshikhudo, P., Nnzeru, R., Ntushelo, K., & Mudau, F. (2013). Bacterial species identification getting easier. *African Journal of Biotechnology*, 12(41), 5975-5982.
- Ulrici, W. 2000. Contaminant Soil Areas, Different Countries and Contaminant Monitoring of Contaminants, In: Rehm, H.J. and Reed, G., Eds., *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology set*, 11,5-42.
- Urban, C., Segal-Maurer, S., & Rahal, J. J. (2003). Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, 36(10), 1268-1274.
- Urszula, G., Izabela, G., Danuta, W., & Sylwia, Ł. (2009). Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 285-291.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., ... & Witholt, B. (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 59-65.
- Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H., & Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*, 58(4), 427-440.
- Van Beilen, J.B., & Funhoff, E.G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(1), 13-21.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Varjani Sunita, J., Rana Dolly, P., Bateja, S., & Upasani Vivek, N. (2013). isolation and screening for hydrocarbon utilizing bacteria (HUB) from petroleum samples. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2(4), 48-60.

- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, 223, 277-286.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2012). Characterization of hydrocarbon utilizing *Pseudomonas* strains from crude oil contaminated samples. *Int. J. Sci. Comput*, 6(2), 120-127.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Technol*, 2(10), 5377-5383.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology*, 222, 195-201.
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., & Upasani, V. N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 116-124.
- Varjani, S.J., & Upasani, V.N., 2017. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71-83.
- Vasudevan, N., & Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, 26(5-6), 409-411.
- Viswanathan, B. (2017). Chapter 2 Petroleum. *Energy Sources* (s. 29-57). Elsevier.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., & Shao, Z. (2010a). Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environmental microbiology*, 12(5), 1230-1242.
- Wang, M. Q., & Sun, L. (2016). *Pseudomonas oceani* sp. nov., isolated from deep seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 4250-4255.
- Wang, W., & Shao, Z. (2012b). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (almA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 523-533.
- Wang, W., and Shao, Z. (2013). Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in microbiology*, 4, 116.
- Wang, W., and Shao Z. (2012a). Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94, 437-448.
- Wang, W., and Shao, Z. (2014). The long-chain alkane metabolism network of *Alcanivorax dieselolei*. *Nature Communications*, 5(1), 1-11.

- Wang, W., Wang, L., & Shao, Z. (2010b). Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. *Microbial ecology*, 60(2), 429-439.
- Wang, X. B., Chi, C. Q., Nie, Y., Tang, Y. Q., Tan, Y., Wu, G., & Wu X. (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C₆-C₄₀) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology*, 102 (17), 7755–7761.
- Wang, Y., Wang, Q., & Liu, L. (2019). Crude oil degrading fingerprint and the overexpression of oxidase and invasive genes for n-hexadecane and crude oil degradation in the *Acinetobacter pittii* H9-3 strain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2), 188.
- Watkinson, R.J., Morgan, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* 1 (2-3), 79-92.
- Wei, X.N., vd., (2021). Degradation Performance of Petroleum-Hydrocarbon Degrading Bacteria and its Application in Remediation of Oil Contaminated Soil. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 766, 012096.
- Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., & Sly, L.I. (1999). Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 567-576.
- Wendy, F. T., Hena, M. A., Wong, S. K., Idris, M. H., Sharifuzzaman, S. M., & Ina-Salwany, M. Y. (2014). *Enterobacter ludwigii*, a candidate probiont from the intestine of Asian seabass. *Journal of Science and Technology in the Tropics*, 10(1), 5-14.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1209-1221.
- Whyte, L. G., Schultz, A., Van Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D., & Greer, C. W. (2002). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2), 141-150.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259-276.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T., & Rabus, R. (2016). Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 138-151.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221-271.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... & Chen, L. (2016a). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the

- microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.
- Wu, Q., Zhao, L., & Ma, A. (2018). Testing method of degrading heavy oil pollution by microorganisms. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 111, No. 1, p. 012023). IOP Publishing.
- Wu, W., Huang, H., Ling, Z., Yu, Z., Jiang, Y., Liu, P., & Li, X. (2016b). Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C. *Ecotoxicology*, 25(1), 234-247.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2885.
- Xu, X., Zhai, Z., Li, H., Wang, Q., Han, X., & Yu, H. (2017). Synergetic effect of biophotocatalytic hybrid system: g-C₃N₄ and *Acinetobacter* sp. JLS1 for enhanced degradation of C₁₆ alkane. *Chemical Engineering Journal*, 323, 520-529.
- Yavari, S., Malakahmad, A., & Sapari, N. B. (2015). A review on phytoremediation of crude oil spills. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(8), 1-18.
- Yousaf, S., Afzal, M., Reichenauer, T. G., Brady, C. L., & Sessitsch, A. (2011). Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environmental pollution*, 159(10), 2675-2683.
- Yuan, H., Yao, J., Masakorala, K., Wang, F., Cai, M., & Yu, C. (2014). Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2724-2732.
- Yuste, L., Corbella, M. E., Turiégano, M. J., Karlson, U., Puyet, A., & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 69-75.
- Zadjelovic, V., Gibson, M. I., Dorador, C., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Genome of *Alcanivorax* sp. 24: a hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. *Marine Genomics*, 49, 100686.
- Zanaroli, G., Di Toro, S., Todaro, D., Varese, G. C., Bertolotto, A., & Fava, F. (2010). Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial cell factories*, 9(1), 1-13.
- Zengel, S. A., Michel, J., & Dahlin, J. A. (2003). Environmental effects of in situ burning of oil spills in inland and upland habitats. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(4), 373-377.
- Zhang, J., Cui, T., & Li, X. (2018). Screening and identification of an *Enterobacter ludwigii* strain expressing an active β -xylosidase. *Annals of Microbiology*, 68(5), 261-271.

- Zhang, Q., Wang, D., Li, M., Xiang, W. N., & Achal, V. (2014). Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil. *Frontiers of Earth Science*, 8(1), 58-63.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., & Xu, P. (2011). Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102, 4111-4116
- Zheng, J., Feng, J. Q., Zhou, L., Mbadinga, S. M., Gu, J. D., & Mu, B.Z. (2018). Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 1-11.
- Zylstra, G. J., & Gibson, D. T. (1991). Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Genetic engineering*, 183-203.

EKLER

EK-3. Agaroz Jel Elektroforezi

3.1. 50X TAE Tamponu (pH 8.0): 4 Litre için 2 M Tris-baz (968.8 gr) 50 mM EDTA pH 8.0 (74.45 gr) Asetik asit %96-100 (330 mL) hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıda verilen değerlere göre hesaplanarak alındı. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülüp pH'sı 1 M NaOH ile 8.0'e ayarlanarak otoklavlandı. Kullanım konsantrasyonu olan 1X elde etmek için 100 mL 50X TAE alınarak üzerine 4.9 L saf su eklendi.

3.2. DNA standardı: Agaroz jel için kullanılan DNA standardı New England BioLabs'tan tedarik edildi. 140 µL TE tamponu (pH 8.0) 40 µL BFB (Brom Fenol Blue) [%50 gliserol, %1 BFB, %50 su].

ÖZGEÇMİŞ

<u>Kişisel Bilgiler</u>		
Soyad, Ad	EREN AYŞE	
Web sayfası (Research Gate, Academia, vs.)		
<u>Eğitim Bilgileri</u>		
Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İlaç Kimyası Tezsiz	2015
	Bitlis Eren ve Fırat Üniversitesi Ortak Fen Bilimleri Enstitüsü	2017
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi	2013
Lise	Silvan Lisesi	2003
<u>İş Deneyimi</u>		
<u>Yabancı Dil</u>		
İngilizce		
<u>Yayınlar</u>		
<u>Özel İlgiler</u>		

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Ayşe EREN
Öğrenci No	17801602
Ana Bilim Dalı	Biyoloji
Program Türü	Proje ☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof. Dr. Kemal GÜVEN
(Varsa) II. Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	
Tez Başlığı	Petrol ve Hidrokarbon Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu ve Biyoteknolojik Potansiyellerinin Belirlenmesi
RAPOR BİLGİLERİ	
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası
Sayfa Sayısı	179
Raporlama Tarihi	27.06.2022
Benzerlik Oranı (%)	12

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 179 sayfalık kısmına ilişkin, 27/06/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 12 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

☒Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç

☒Kaynaklar hariç

☐Alıntılar hariç/dâhil

☐Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Benzerlik oranım üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir, gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı:

Ayşe EREN

Tarih:27.06.2022

İmza:

Danışman Adı, Soyadı:

Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Tarih: 27.06.2022

İmza:

Ana Bilim Dalı Başkanı Adı, Soyadı:

Prof. Dr. Ahmet KILIÇ

Tarih:27.06.2022

İmza: