

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN BİYOSÜRFİKTAN ÜRETEN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU**

Özgür SALAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2017**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN BİYOSÜRFİKTAN ÜRETEN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU**

Özgür SALAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2017**

Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR danışmanlığında, Özgür SALAM'ın hazırladığı **“Çeşitli Çevresel Örneklerden Biyosüpfaktan Üreten Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler İdentifikasyonu”** konulu bu çalışma 13/11/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR

Üye : Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hatice AKTAŞ

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 16026

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sürfaktanlar (Yüzey Aktif Maddeler)	1
1.1.1.Anyonik sürfaktanlar	4
1.1.2.Kasyonik sürfaktanlar	4
1.1.3.İyonik olmayan sürfaktanlar	5
1.1.4.Amfoterik sürfaktanlar	5
1.2. Biyosürfaktanların Genel Özellikleri	7
1.2.1. Yüzey/Arayüzey gerilimini düşerebilme.....	7
1.2.2. Düşük toksisite	8
1.2.3. Biyouyumluluk ve sindirilebilirlik	8
1.2.4. Biyoparçalanabilirlik	8
1.2.5. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı	8
1.2.6. Maliyet	9
1.2.7. Özgüllük ve kimyasal çeşitlilik	9
1.3. Biyosürfaktanların Sınıflandırılması	9
1.3.1. Glikolipidler	10
1.3.1.1. Ramnolipidler	10
1.3.1.2. Trehalolipidler	11
1.3.1.3. Soforolipidler.....	11
1.3.2. Lipopeptidler ve lipoproteinler	11
1.3.3. Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötrallipidler	12
1.3.4. Polimerik biyosülfaktanlar	12
1.3.5. Partiküler biyosülfaktanlar	13
1.4. Biyosürfaktan Üreten Mikroorganizmalar	14
1.5. Biyosürfaktanların Kullanım Alanları	16
1.5.1. Petrol endüstrisi	17
1.5.2. Biyodegradasyon/biyoremediasyon teknolojileri	18
1.5.3. Farmasötik endüstrisi.....	20
1.5.4. Gıda endüstrisi	21
1.5.5. Kozmetik endüstrisi.....	22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan çevresel örnekler	30
3.1.2. Kullanılan besiyerleri	31
3.1.3. Kullanılan çözeltiler,kimyasallar, tamponlar, kitler	33
3.1.4. Kullanılan cihazlar	36
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Bakteri izolasyonu	36
3.2.2. Bakterilerin biyosülfaktan üretimi açısından taranması	37
3.2.2.1. Oil spreading denemesi	37
3.2.2.2. Drop collopse denemesi	38
3.2.2.3. Parafilm M testi	38
3.2.2.4. Hemoliz testi.....	38
3.2.2.5. Emülsifikasyon indeksi (E ₂₄)'nin belirlenmesi	39
3.2.3. Ekstraselüler lipaz aktivitesinin belirlenmesi	39

3.2.4. Biyosülfaktan üretimi pozitif olan izolatların moleküler tanılaması	40
3.2.4.1. Genomik DNA'nın izolasyonu	40
3.2.4.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması	41
3.2.4.3. PCR ürünlerinin elektroforezle görüntülenmesi	42
3.2.4.4. 16S rDNA bölgesinin sekans analizi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	44
4.1. Bakteriyal İzolatların Elde Edilmesi	44
4.2. Bakteriyal İzolatların Biyosülfaktan Üretimi Açısından Taranması	46
4.2.1. Hemoliz testi	46
4.2.2. Oil displacement (yağ yer değiştirme) testi	50
4.2.3. Parafilm M testi	52
4.2.4. Drop collapse testi	55
4.2.5. Emülsifikasyon indeksi (E_{24})'nin belirlenmesi	57
4.3. Bakteriyal İzolatların Ekstraselüler Lipaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	60
4.4. Biyosülfaktan Üreten Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu	63
4.4.1. Kültürel ve makroskopik karakterizasyon	63
4.4.2. Moleküler karakterizasyon	63
4.4.2.1. Genomik DNA'nın izolasyonu	63
4.4.2.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu	64
4.5. Biyosülfaktan Üretimi Pozitif Olan Bakteriyal İzolatların 16S rDNA Gen Bölgelerinin Dizi Analizi Sonuçları	67
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	88

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN BİYOSÜRFAKTAN ÜRETEBİLİR BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU

Özgür SALAM

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR
Yıl:2017, Sayfa:89

Petrol türevleriyle kontamine olan toprak örnekleri Şanlıurfa il sınırları içerisinde bulunan bazı otomobil tamirhanelerinden toplanarak biyosümfaktan üreten bakterilerin elde edilmesi için izolasyona tabi tutulmuştur. Toplam 107 bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolatların biyosümfaktan üretme yetenekleri hemoliz testi, drop collapse testi, yağ yerdeğıştirme denemesi ve parafilm M testi olmak üzere 4 farklı teknik kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca, bakteriyal izolatlar tarafından üretilen ham biyosümfaktanların çeşitli hidrofobik bileşiklere (kerosen, dizel yağı ve n-hegzadekan) karşı emülsifikasyon indeksleri (E_{24}) de belirlenmiştir. Biyosümfaktan üretimi açısından pozitif olarak değerdendirilen bakteriyal izolatların moleküler karakterizasyonu için genomik DNA'ları saflaştırılmış ve 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Dizi analiz sonuçlarına göre; *Proteus* (5), *Bacillus* (1), *Micrococcus* (1), *Stenotrophomonas* (1), *Klebsiella* ve *Citrobacter* (1) olmak üzere 6 farklı cinsten 10 bakteri türü biyosümfaktan üretimi yapabilmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Biyosümfaktan, bakteri, izolasyon, tarama, moleküler tanılama

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA FROM VARIOUS ENVIRONMENTAL SAMPLES

Özgür SALAM

**Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

**Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ebru UYAR
Year: 2017, Page:89**

Soil samples contaminated with petroleum derivatives were collected from various automobile repair shops located in Şanlıurfa provinces and subjected to isolation to obtain biosurfactant-producing bacteria. A total of 107 bacterial isolates were obtained. Biosurfactant production ability of the isolates was tested using four different techniques; hemolysis test, drop collapse test, oil displacement assay and parafilm M test. In addition, the emulsification indices (E_{24}) of crude biosurfactants produced by bacterial isolates against various hydrophobic compounds (kerosene, diesel oil and n-hexadecane) were also determined. Genomic DNAs were purified and 16S rDNA regions were amplified using PCR for molecular characterization of the bacterial isolates that gave positive results in terms of biosurfactant production. According to the sequence analysis results, 10 bacterial strains belonging to 6 different genera including *Proteus* (5), *Bacillus* (1), *Micrococcus* (1), *Stenotrophomonas* (1), *Klebsiella* (1) and *Citrobacter* (1) were capable of biosurfactant production.

KEY WORDS: Biosurfactant, bacteria, isolation, screening, molecular identification

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR’a,

Yüksek lisans eğitimine başlamama vesile olan ve bana inanan Doç. Dr. H.Tansel YALÇIN ÖZTÜRK’e,

Ayrıca tez çalışmamda laboratuvarını bizden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR’a,

Her anımda arkamda büyük desteklerini hissettiğim, iyi bir eğitim almam için her türlü fedakarlığı gösteren, beni asla yalnız bırakmayan sevgili Yazi SALAM’a (annem) ve bütün aile fertlerime,

Yüksek lisans eğitiminde bana her zaman destek veren, yardımlarını ve dostluklarını asla unutmayacağım Özgür YÜKSEKDAĞ’a ve Hasine YEL’e,

Ayrıca maddi destek sağlayan HÜBAK’a, teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Apolar (hidrofobik) ve polar (hidrofilik) kısımları olan sürfaktan molekülü	1
Şekil 1.2. Biyosüpfaktan konsantrasyonuna bağılı olarak misel oluşumu, KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu	2
Şekil 1.3. Biyosüpfaktanlar tarafından oluşturulan agregat türleri	3
Şekil 1.4. Bilinen bazı biyosüpfaktanların kimyasal yapıları (a) Ramnolipid, (b) Trehalolipid, (c) Soforolipid, (d) Mannozileritritol lipid, (e) Süpfaktin, (f) Emülsan.....	13
Şekil 1.5. Biyosüpfaktanla arttırılmış petrol kurtarım mekanizması.....	18
Şekil 1.6. Petrol üzerindeki biyosüpfaktan etkisinin ilüstrasyonu	20
Şekil 4.1. Saf kültürleri yapılan bakteriyal izolatlardan bazılarının (üstte soldan sağı: SLM B53, SLM B49, SLM B61, SLM B57, altta soldan sağı: SLM B83, SLM B82, SLM B85, SLM B84) Nutrient Agar petrisindeki genel görünümüleri	45
Şekil 4.2. Hemoliz testi pozitif olan bazı bakteriyal izolatların %5 kan agar petrisindeki görünümü	47
Şekil 4.3. SLM 28, SLM 29, SLM 31, SLM 37, SLM 81, SLM 82, SLM 83, SLM 84 (sırasıyla soldan sağı) numaralı bakteriyal izolatlara ait ve biyosüpfaktan tarama testlerinde kullanılan fermentasyon sıvıları	49
Şekil 4.4. Yağı filmi üzerine biyosüpfaktan içeren hüresiz kültür ortamı transferiyle meydana gelen yağı yer değışme alanı (ODA)	50
Şekil 4.5. Bazı izolatların fermentasyon sıvılarıyla elde edilen yağı yer değıştirme denemesine ait görseller.....	51
Şekil 4.6. Bazı izolatların hüresiz kültür ortamlarıyla elde edilen parafilm M testi sonuçları.....	52
Şekil 4.7. Bazı hüresiz kültür ortamları ile pozitif ve negative kontroller için elde edilen drop collapse test sonuçları	55
Şekil 4.8. Bazı bakteri izolatlarına ait fermentasyon sıvılarının n-hegzadekan ile oluşturdukları emülsiyonlar	57
Şekil 4.9. Ekstraselüler lipaz enzim üretimi pozitif olan bazı bakteriyal izolatların petrideki görünümü	61
Şekil 4.10. SLM B28, SLM B29, SLM B56 ve SLM B85 numaralı(sırasıyla) izolatlara ait kolonilerin genel petri görünümü(üstte) ve Gram boyama ile elde edilen mikroskop görüntüsü(alta)	63
Şekil 4.11. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarına ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	64
Şekil 4.12. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarının PCR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgelerine ait ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Tipik Hidrofilik Gruplar	6
Çizelge 1.2. Mikrobiyal biyosüpfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar	15
Çizelge 1.3. Biyosüpfaktanların başlıca uygulama alanları ve kullanım amaçları	16
Çizelge 3.1. Biyosüpfaktan üreten bakterilerin izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri ve bu örneklerin toplandığı lokasyonlar	30
Çizelge 4.1. Muhtemel biyosüpfaktan üreticisi bakteri izolatlarının elde edildiğı örnekler ve ön zenginleştirmede kullanılan ilave karbon kaynakları	46
Çizelge 4.2. Bakteriyal izolatların kan agardaki hemoliz testi sonuçları	48
Çizelge 4.3. Bakteriyal izolatlara ilişkin yağ yer değıştirme denemesi ve parafilm M testi sonuçları	53
Çizelge 4.4. Bakteriyal izolatların kültür ortamlarına ait drop collapse test sonuçları	56
Çizelge 4.5. Biyosüpfaktan içeren hücresiz fermentasyon sıvılarının farklı hırdokarbonlar üzerindeki emülsifikasyon indeksleri	59
Çizelge 4.6. Bakteriyal izolatlara ilişkin hemoliz testi ve ekstraselüler lipaz enzim üretimi sonuçları	62
Çizelge 4.7. Moleküler tanılaması yapılan bakteriyal suşların 16S rDNA bölgesinin sekans analizine göre temsil ettiğı cinsler	66

SİMGELER DİZİNİ

E ₂₄	Emülsifikasyon indeksi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EM	Zenginleştirme ortamı
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
MBC	Minimum Bactericidal Concentration, Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MIC	Minimum Inhibitory Concentration, Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MSM	Mineral tuz ortamı
ODA	Oil Displacement Area, Yağ yer değiştirme alanı
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
SmF	Submerged Fermentation, Batık kültür fermentasyonu
TAE	Tris-asetat-EDTA
TLC	Thin Layer Chromatography, İnce Tabaka Kromatografisi

1. GİRİŞ

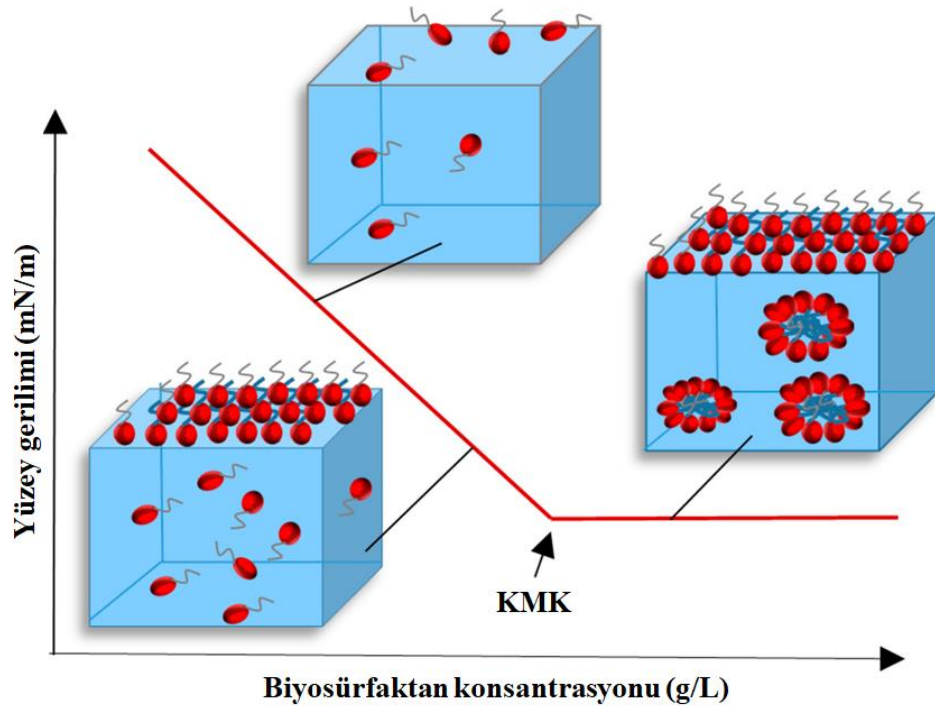
1.1. Sürfaktanlar (Yüzey Aktif Maddeler)

Sürfaktanlar, günlük hayattaki yaygın kullanımlarının yanı sıra temizlik ürünleri, ziraat ve sağlık endüstri gibi farklı alanlardaki çok çeşitli uygulamaları dolayısıyla kimyasal ürünlerin önemli bir grubudur (Varjani ve Upasani, 2017). Hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlardan oluşan bu amfipatik bileşikler tercihen farklı derecelerde polariteye ve hidrojen köprülerine sahip yağ/su ya da hava/su sıvı gibi arayüzeyleri bölmektedir. Apolar kısmı çoğunlukla bir hidrokarbon zincir olmasına karşın polar kısım iyonik (katyonik ya da anyonik), iyonik olmayan veya amfoterik olabilmektedir (Şekil 1.1.) (Santos ve ark., 2016).



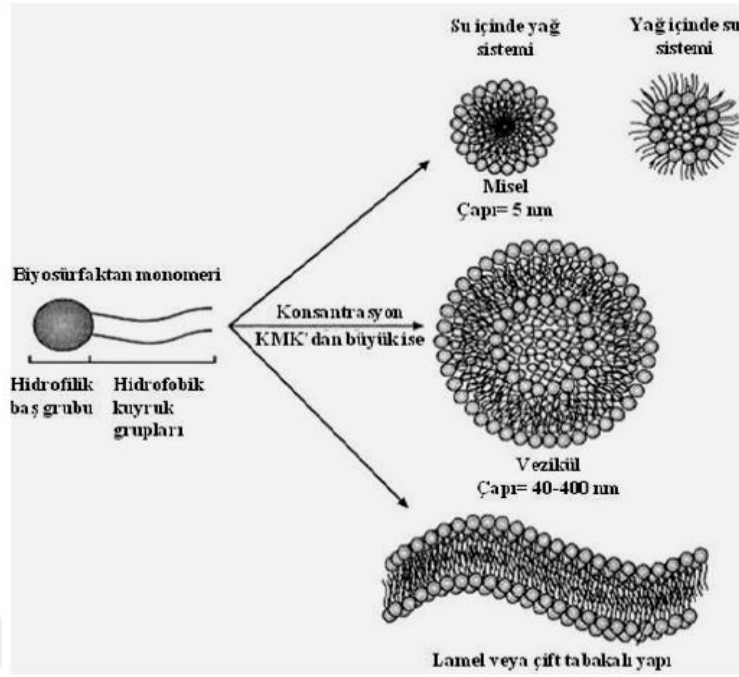
Şekil 1.1 Apolar (hidrofobik) ve polar (hidrofilik) kısımları olan sürfaktan molekülü (Santos ve ark., 2016)

Bu özellikler; sürfaktanların yüzey ve arayüzey gerilimini düşürerek hidrokarbonların su içerisinde veya suyun hidrokarbonlar içerisinde çözünerek mikroemülsiyonlar oluşturmaya yardımcı olmaktadır (Varjani ve Upasani, 2017). Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK) (Critical Micelle Concentration: CMC), misel olarak adlandırılan agregatların şekillendiği (Şekil 1.2.) ve yüzey aktif maddenin kararlı olan en düşük yüzey gerilimini elde ettiği noktaya karşılık gelen sürfaktan konsantrasyonudur (Şekil 1.3.) (Santos ve ark., 2016).



Şekil 1.2. Biyosürfaktan konsantrasyonuna bağlı olarak misel oluşumu, KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu (Santos ve ark., 2016)

Sürfaktan monomerleri, Kritik misel konsantrasyonunda biraraya gelerek misel, vezikül ve çift tabakalı yapılar olarak adlandırılan agregatları şekillendirmektedirler (Şekil 1.3.). Polar baş ve apolar kuyruk kısımları arasındaki zayıf kimyasal etkileşimler (hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağı gibi) ile şekillenen bu yapılar, sıcaklık ve elektrolit konsantrasyonu gibi koşullar değiştikçe monomer-polimer durumları arasında geçiş yapabilmektedirler (Fracchia ve ark., 2011; Pacwa-Płociniczak ve ark., 2011; Franzetti ve ark., 2010; Mulligan, 2005).



Şekil 1.3. Biyosürfaktanlar tarafından oluşturulan agregat türleri (Uyar ve Yalçın, 2013)

Günümüzde üretilen çoğu yüzey aktif madde petrolden elde edilmektedir. Bu sentetik sürfaktanların hem baş hem de kuyruk yapısında sayısız varyasyonlar görmek mümkündür. Sürfaktanların baş grubu; yüklü veya nötr, boyut olarak küçük ve kompakt, veya bir polimerik zincir olabilir. Kuyruk grubu ise genellikle bir veya iki, düz veya dallanmış hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır. Bu nedenle sentetik sürfaktanlar genel olarak dört temel sınıfta toplanmaktadırlar (Eastoe, 2010);

- 1- Anyonik surfaktanlar
- 2- Katyonik surfaktanlar
- 3- İyonik olmayan surfaktanlar
- 4- Amfoterik surfaktanlar

1.1.1. Anyonik sürfaktanlar

Günümüzde kullanımda olan yüzey aktif maddelerin birçoğu anyonik sürfaktanlar sınıfından olup toplam sürfaktan tüketiminin yaklaşık % 70-75'ini oluşturmaktadır (Myers, 2006). Bu durum, nispeten düşük üretim maliyetleri ve her deterjan tipinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. En iyi temizleme gücü için hidrofobik zincir 12-16 C atomlu zincir uzunluğuna sahip doğrusal bir alkil grubu olup polar baş grubu da zincirin ucunda yer almalıdır. Dallı zincirlerden daha etkili ve bozunabilirliği daha yüksek olduğu için genellikle doğrusal zincirler tercih edilmektedirler. En çok kullanılan hidrofilik gruplar karboksilatlar, sülfatlar, sülfonatlar ve fosfatlardır (Çizelge 1.1.) (Tadros, 2014).

Anyonik sürfaktanların büyük çoğunluğu temizleme uygulamasında arzu edilen bir özellik olan kritik misel konsantrasyonunun üzerinde önemli köpürme üretmektedirler. Ancak bu özellik, köpüğün problem olduğu alanlarda anyonik yüzey aktif maddelerin kullanımını kısıtlayabilmektedir (Hibbs, 2006).

1.1.2. Katyonik sürfaktanlar

Katyonik yüzey aktif maddeler, anyonik ve noniyonik yüzey aktif maddelere kıyasla daha küçük bir sınıfı temsil etmektedirler. Pozitif yüklü baş gruplarına ($-N(CH_3)_3^+$) sahip olup temel olarak katyonik sürfaktanların yüzeyden absorpsiyonuyla ilgili uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bunlar, genellikle katyonik yüzey aktif maddeler ile muamele üzerine modifiye edilebilecek şekilde negatif yükle (örneğin, metal, plastikler, mineraller, lifler, tüyler ve hücre zarları) yüklenmektedirler. Bu nedenle katyonik sürfaktanlar; antikorozyon ve antistatik ajanlar, flotasyon toplayıcıları, kumaş yumuşatıcıları, saç kremleri ve bakterisitler olarak kullanılmaktadırlar (Eastoe , 2010).

1.1.3. İyonik olmayan surfaktanlar

İyonik olmayan sürfaktan terimi, genellikle etilen oksit ve/veya propilen oksitin bir aktif hidrojen atomu içeren alkol türevlerine karşılık gelmektedir (Eastoe, 2010). En yaygın iyonik olmayan sürfaktanlar, etoksillenmiş sürfaktanlar olarak da isimlendirilen etilen oksit bazlı yüzey aktif maddelerdir. Alkol etoksilatlar, alkil fenol etoksilatlar, yağ asidi etoksilatları, monoalkanolamid etoksilatlar, sorbitan ester etoksilatlar, yağ amin etoksilatlar ve polimerik sürfaktanlar olarak da isimlendirilen etilen oksit propilen oksit kopolimerleri gibi alt sınıfları ayırdedilebilmektedir. İyonik olmayan sürfaktanların diğer bir önemli sınıf ise glikol esterleri, gliserol/poligliserol esterleri, glukozitler/poliglukozitler ve sükroz esterleri gibi multihidroksi ürünlerdir. Amin oksitler ve sülfonil sürfaktanlar, küçük bir baş grubuna sahip iyonik olmayan yüzey aktif maddeleri temsil etmektedirler (Tadros, 2014).

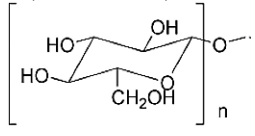
1.1.4. Amfoterik sürfaktanlar

Bunlar hem katyonik hem de anyonik gruplar içeren yüzey aktif maddelerdir. Amfoterik yüzey aktif maddelerin temel karakteristiği çözündükleri solüsyonun pH'ına bağlı olmasıdır. Asitli pH'daki çözeltilerinde molekül pozitif bir yük alıp katyonik gibi davranırken, alkali pH'daki çözeltilerinde ise negatif yüklü olur ve anyonik gibi davranır. Bu gruptaki sürfaktanlar için her iki iyonik grubun da eşit miktarda iyonizasyon gösterdiği spesifik bir pH değeri tanımlanabilmektedir (Tadros, 2014).

Hem pozitif hem de negatif yükleri destekleme kabiliyetlerinden dolayı amfoterik sürfaktanlar genellikle sulu faz için afinite gösteren hidrofilik kısmında büyük bir baş molekülüne sahiptirler. Bu özellik nedeniyle miseller yapıyı değiştirebilme yeteneği gösterdikleri için de en çok talep gören ikincil sentetik yüzey aktif madde grubu haline gelmiştir. Amfoterik surfaktanlar, çeşitli temizleme sistemlerinin ve emülsiyonlarının vizkozite, çözünürlük, misel boyutu, köpük stabilitesi, deterjan özelliklerinin modifiye edilebilmesi için anyonik veya iyonik olmayan yüzey aktif maddeler içeren formülasyonlarda kullanılmaktadırlar

(Otterson, 2006). Her ne kadar amfoterik maddeler dünya genelindeki yüzey aktif madde üretiminin yalnızca küçük bir bölümünü oluştursa da, bu tür maddelerin bir formülasyona kazandırdıkları eşsiz özellikler nedeniyle pazar pozisyonları önemli derecede artmaktadır (Myers, 2006).

Çizelge 1.1. Tipik Hidrofilik Gruplar (Karsa, 2006)

İyonik Gruplar	Örnekler	Yapıları
Anyonik	Sülfat Sülfonat Eter Sülfat Eter Fosfat Eter Karboksilat Karboksilat	OSO_2O^- SO_2O^- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_2\text{O}^-$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{P}(\text{O})\text{O}^-$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CO}^{2-}$ $\text{C}(\text{O})\text{O}^-$
Katyonik	Primer amonyum Sekonder amonyum Tersiyer amonyum Kuaterner amonyum	N^+H_3 $\text{N}^+(\text{R})\text{H}_2$ $\text{N}^+(\text{R})_2\text{H}$ $\text{N}^+(\text{R})_3$
Amfoterik	Amin oksid Betain Aminokarboksilat	$\text{N}^+(\text{R})_3\text{O}^-$ $\text{N}^+(\text{R})_3(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}^-$ $\text{N}^+\text{H}(\text{R})_2(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}^-$
İyonik olmayan	Polioksietilen Asetilenik Monoetenolamin Dietenolamin Poliglukosid	$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ $\text{CH}(\text{OH})\text{C}\equiv\text{CH}(\text{OH})^-$ $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ 

Günümüzde kullanılan sürfaktanların çoğu petrokimyasal kaynaklardan sentetik olarak ucuz maliyetle üretilmektedir (Gudiña, 2015). Bununla birlikte çeşitli nedenlerle biyosürfaktanlara, özellikle de mikrobiyal sürfaktanlara olan ilgi giderek artmaktadır. İlk olarak, nispeten toksik olmadıkları ve biyolojik yollarla bozunabilme özelliği taşıdıkları için çevreyle uyumlu olarak kabul edilmektedirler. İkincisi, eşsiz yapısal özelliği sayesinde biyoteknolojiden çevre temizlenmesine kadar pekçok endüstriyi de içerisine alan potansiyel uygulamaya sahiptirler. Üçüncü olarak;

sıcaklık, pH ve tuzluluğun söz konusu olduğu ekstrem çevre koşullarında daha yüksek köpürme kapasitesi, yüksek seçicilik ve spesifik aktivite sahip olup yenilenebilir hammaddelerden sentezlenebilmektedirler (Varjani ve Upasani, 2017).

1.2. Biyosüpfaktanların Genel Özellikleri

Belirgin yüzey etkinliğine sahip mikrobiyal bileşikler biyosüpfaktanlar olarak adlandırılmaktadırlar. Bakteriler, mayalar ve fungusların membran bileşeni ya da sekonder metabolitleri olarak üretilen bu maddeler yapısal olarak da çeşitlilik göstermektedirler (Maier ve Soberon, 2000; Kim ve ark., 1999; Fiechter, 1992). İlk kez 1960'ların sonlarına doğru hidrokarbonların dağılmasını sağlayan ajanlar olarak dikkat çeken bu maddelerin sentetik süpfaktanlara üstünlükleri, günümüzde doğayı korumaya yönelik birçok çevre dostu uygulamada kullanılmasına olan ilgiyi arttırmıştır (Wei ve ark., 2003; Parkinson, 1985; Arima ve ark., 1968).

Biyosüpfaktanların, sentetik süpfaktanlara kıyasla sahip oldukları üstünlükler şöyle sıralanabilmektedir;

1.2.1. Yüzey/ara yüzey gerilimini düşürebilme

İyi bir yüzey aktif maddenin en temel özellikleri verimlilik ve etkinliktir. Verim kritik misel konsantrasyonu ile ölçülürken, etkinlik de yüzey ve arayüzey gerilimiyle ilişkilidir. Biyosüpfaktanların KMK değerleri 1-2000 mg/L arasında değişebilmektedir. Benzer şekilde, ara yüzey(yağ/su) ve yüzey gerilimleri ise sırasıyla yaklaşık 1 ve 30 mN/m' dir. Nitelikli süpfaktanlar suyun yüzey gerilimini 72 mN/m' den 35 mN/m'ye , n- hagzadekanın ara yüzey gerilimini ise 40 mN/m' den 1 mN/m'ye düşürebilmelidirler (Gautam ve Tyagi, 2006)

1.2.2. Düşük toksisite

Biyosürfaktanların toksisitesi hakkında çok az sayıda literatür bulunmasına rağmen, genellikle düşük veya toksik olmayan ürünler olarak kabul edilmektedirler. Düşük toksisite gıdalarda, kozmetik ürünlerde ve eczacılıkta biyosürfaktanların kullanılmasına olanak sağlamakla kalmayıp bu biyomoleküllerin çevresel uygulamaları için de büyük önem taşımaktadır (Santos ve ark., 2016).

1.2.3. Biyouyumluluk ve sindirilebilirlik

Biyosürfaktanların biyolojik kökenli olmaları, organizmalarla uyumluluk özelliği kazandırmaktadır. Bu özellik onların kozmetik, farmasötik ve fonksiyonel gıda katkı maddeleri olarak kullanılmalarına imkan sağlamaktadır (Kosaric ve Vardar, 2015).

1.2.4. Biyoparçalanabilirlik

Kimyasal olarak sentezlenen ve ticari yollarla temin edilen perflorlanmış anyonik sürfaktanlar gibi yüzey aktif maddeler biyodegradasyona dirençli olup ekolojik sorunlar oluşturacak şekilde doğada birikmektedirler (Cameotra ve ark., 2010). Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfaktanlar ise sentetik sürfaktanların aksine biyolojik olarak mikroorganizmalar tarafından su ve toprakta kolayca parçalanabilmektedir. Bu özellik; biyoremediasyon, atıkların işlenmesi ve petrol kirliliğinin dağıtılması gibi çevresel uygulamalar için biyosürfaktanları daha uygun hale getirmektedir (Santos ve ark., 2016; Gautam ve Tyagi, 2006).

1.2.5. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı

Biyosürfaktanların çoğu yüksek sıcaklıklarda ve 2-12 arasında değişen pH değerlerinde kullanılabilir. Biyosürfaktanlar aynı zamanda % 10'a kadar olan tuz konsantrasyonunu tolere ederken, % 2'lik NaCl sentetik yüzey aktif maddeleri inaktive etmek için yeterli olabilmektedir (Santos ve ark., 2016).

1.2.6. Maliyet

Mikrobiyal yüzey aktif maddelerin şimdiye kadar yerleşik bir biyoteknolojik üretimi olmasına karşın yüksek üretim maliyetleri nedeniyle belirli ekolojik alanlarda kullanılabilmektedir. Bu nedenle biyosüpfaktan üretim maliyetlerinin önemli ölçüde azaltılması, hem mevcut ekolojik alanlarda hem de yeni uygulama alanlarında sentetik süpfaktanlara alternatif olarak kullanılacak mikrobiyal süpfaktanların tercih edilmesi için gereklidir (Kosaric ve Vardar, 2015). Mikrobiyal organizmalar aracılığıyla biyosüpfaktan üretimi sırasında yüksek miktarlarda bulunan ham maddelerin kullanılması maliyeti belirgin ölçüde düşürebilmektedir (Gautam ve Tyagi, 2006)

1.2.7. Özgüllük ve kimyasal çeşitlilik

Biyosüpfaktanlar, spesifik fonksiyonel gruplara sahip kompleks moleküller olmaları nedeniyle genellikle spesifik etkilere de sahiptirler. Bu etkiler özellikle, farklı kirleticilerin detoksifikasyonu ve endüstriyel emülsiyonların de-emülsifikasyonunun yanı sıra spesifik gıda, farmasötik ve kozmetik uygulamalarında ilgi çekicidir (Santos ve ark., 2016)

1.3. Biyosüpfaktanların Sınıflandırılması

Polar gruplanlarının doğasına göre sınıflandırılan kimyasal olarak sentezlenmiş süpfaktanların aksine, biyosüpfaktanlar temel olarak kimyasal kompozisyonlarına ve mikrobiyal kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Genel olarak yapıları; amino asitler, peptid anyonları veya katyonları ile mono-, di-, ya da polisakkaritleri içeren hidofilik kısım ile beraber doymamış, doymuş veya yağ asitlerinden oluşan hidrofobik kısım da içermektedir. Biyosüpfaktanlar genellikle mikrobiyal kaynağı ve kimyasal kompozisyonuna bağlı olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır;

1. Glikolipidler

- Ramnolipidler
- Trehalolipidler
- Soforolipidler

2. Lipopeptidler ve Lipoproteinler

3. Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler

4. Polimerik Biyosüpfaktanlar

5. Partiküler Biyosüpfaktanlar (Gautam ve Tyagi, 2006).

1.3.1. Glikolipidler

En iyi bilinen biyosüpfaktanlar glikolipidlerdir. Mono- veya oligosakkaritlerin yanı sıra lipid kısmı da içeren glikolipidler, düşük moleköl ağırlıklı biyosüpfaktanların en önemli grubunu oluşturur. Şeker kısmı; glikoz, mannoz, galaktoz, galaktoz sülfat, glukuronik asit veya ramnoz kısımlarını içerebilmektedir (Kosaric ve Vardar, 2015). Glikolipitler arasında en iyi bilinenler ramnolipidler, trehalolipidler ve soforolipidlerdir.

1.3.1.1. Ramnolipidler

Bir veya iki ramnoz molekölünün bir veya iki hidroksidekanoik asit molekölüne bağlanmasıyla oluşan ramnolipidler en çok çalışılmış glikolipidlerdir. Ramnoz içeren glikolipidlerin üretimi ilk defa Jarvis ve Johnson tarafından *Pseudomonas aeruginosa* türünde tespit edilmiştir (Gautam ve Tyagi, 2006). Bakteri straini, kullanılan karbon kaynağı ve proses stratejisi üretilen ramnolipid türünü belirlemektedir. Ramnolipidlerin süpernatantta akümüasyonu logaritmik fazın sonunda başladığı için sekonder metabolitler olarak nitelendirilmektedirler (Mulligan ve Gibbs, 1993; Robert ve ark., 1989).

1.3.1.2. Trehalolipidler

Mikrobiyal trehalolipid biyosüpfaktanlar için çeşitli yapısal türler bildirilmiştir. Mikolik asitlere C-6 ve C-6' kısımlarından bağlanan disakkarit trehaloz genellikle *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium* cinslerine ait bir çok tür tarafından sentezlenmektedir. Mikolik asitler, uzun zincirli α -dallanmış- β -hidroksi yağ asitleridir. Farklı organizmalar tarafından sentezlenen trehalolipidler, mikolik asidin yapısı ve boyutu, karbon atomlarının sayısı ve doymamışlık derecesi bakımından çeşitlilik göstermektedir (Mukherjee ve Das, 2010).

1.3.1.3. Soforolipidler

Bu glikolipidler, glikozidik bağ ile birbirine bağlı olan uzun zincirli hidroksi yağ asidi ve dimerik soforoz karbohidratı içermektedirler (Santos ve ark., 2016). Genel olarak *Candida*, *Torulopsis* ve *Wickerhamiella* cinsine ait mayalar tarafından üretilmektedirler. Soforolipidler; 40-100 mg/L kritik misel konsantrasyonu ile suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 40-30 mN/m'ye düşürebilmektedirler (Mukherjee ve Das, 2010).

1.3.2. Lipopeptidler ve lipoproteinler

Deka-peptid antibiyotikler (gramisidinler) ve lipopeptid antibiyotikleri (polimiksinler) içeren çok sayıda siklik lipopeptidler üretilmektedir. *Bacillus subtilis* ATCC 21332 tarafından üretilen siklik bir lipopeptid olan süpfaktin, en güçlü biyosüpfaktanlardan birisidir. Süpfaktin, %0,005'lik düşük konsantrasyonlarda bile suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 27,9 mN/m'ye düşürebilmektedir. *Bacillus licheniformis* sinerjik davranan ve mükemmel bir sıcaklık, pH ve tuz stabilitesine sahip çeşitli biyosüpfaktanlar üretmektedir. *B. licheniformis* 86 tarafından üretilen lipopeptid karakterdeki biyosüpfaktan suyun yüzey gerilimini 27 mN/m'ye, su ile n-hegzadekan arasındaki arayüzey gerilimini ise 0.36 mN/m'ye düşürebilmektedir (Uyar ve Yalçın, 2013; Gautam ve Tyagi, 2006).

1.3.3. Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral lipidler

Çeşitli bakteri ve mayalar n-alkanlar üzerinde büyümeleri sırasında yüksek miktarlarda yağ asitleri ve fosfolipid sürfaktanlar üretmektedirler. Fosfatidil etanolamin bakımından zengin veziküller *Acinetobacter* cinsine üye türler tarafından üretilmekte ve su içerisinde optik olarak berrak alkan mikroemülsiyonları oluşturmaktadırlar. Bu biyosürfaktanlar medikal uygulamalar için oldukça önemlidir. Fosfolipid protein kompleksinin eksikliği, prematüre doğan çocuklardaki solunum yetmezliğinin başlıca nedenidir. Bu nedenle sürfaktanların üretiminde rol oynayan genlerin izolasyonu ve klonlanması yapılarak fermentasyon proseslerinde kullanılabileceği önerilmektedir (Uyar ve Yalçın, 2013; Santos ve ark., 2016).

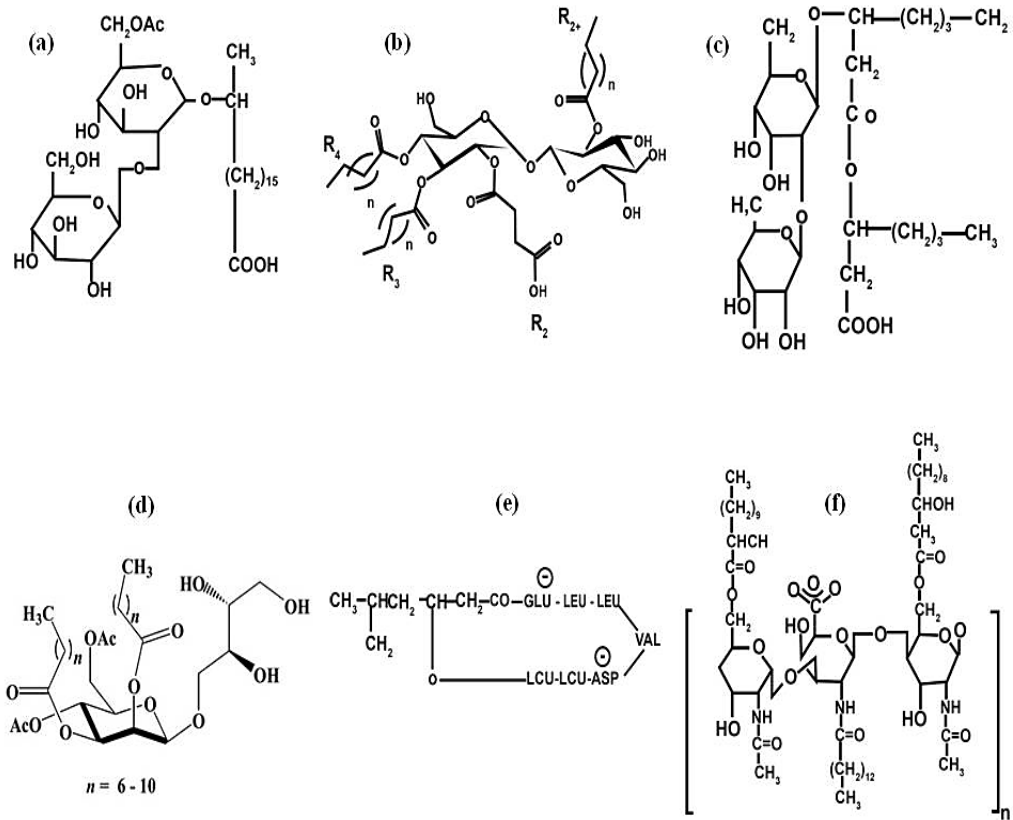
1.3.4. Polimerik biyosürfaktanlar

Emülsan, lipomannan, alasan, liposan ve diğer polisakkarit protein kompleksleri en çok çalışılmış polimerik biyosürfaktanlardır. Emülsan, %0.001 - %0.01'lik düşük konsantrasyonlarda dahi hidrokarbonların sudaki emülsifikasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Günümüzde bilinen en güçlü emülsiyon stabilizatörlerinden biri olan emülsan, 1:4'lük su-yağ oranında bile inversiyona direnç gösterebilmektedir. Uzun süreli beklemlerde, bu emülsiyon iki faza ayrılmaktadır. Emülsanosol olarak bilinen üst krem tabakası %70-75 oranında yağ içermektedir. Bu nedenle gıda ve kozmetik sektöründe potansiyel kullanım alanlarına sahiptir. (Santos ve ark., 2016; Uyar ve Yalçın, 2003; Gautam ve Tyagi, 2006).

Candida lipolytica tarafından sentezlenen liposan, suda çözünen hücre dışı bir emülsifiye edici olup %83 karbohidratlar ve %17 proteinlerden meydana gelmektedir *Saccharomyces cerevisiae* tarafından büyük miktarlarda üretilen mannoproteininin de bazı yağlara, alkanlara ve organik çözücülere karşı mükemmel bir emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Gautam ve Tyagi, 2006).

1.3.5. Partiküler biyosürfaktanlar

Partiküler biyosürfaktanlar, mikrobiyal hücrelerdeki alkan alımına etki eden mikroemülsiyonları oluşturmak üzere ekstraselüler zar veziküllerini ayırırlar (Santos ve ark., 2016). *Acinetobacter* sp. HO1-N suşunun 20-50 nm çapında ve batık yoğunluğu 1.159 g/cm^3 olan vezikülleri protein, fosfolipid ve lipopolisakkaritten meydana gelmektedir. Membran vezikülleri aynı organizmanın dış membranındaki fosfolipidlerin yaklaşık 5 katı fosfolipid, polisakkaritlerin de yaklaşık 350 katı kadar polisakkarit içermektedir (Uyar ve Yalçın, 2013; Gautam ve Tyagi, 2006).



Şekil 1.4. Bilinen bazı biyosürfaktanların kimyasal yapıları (a) Ramnolipid, (b) Trehalolipid, (c) Sforolipid, (d) Mannosileritritol lipid, (e) Sürfaktin, (f) Emülsan (Uyar ve Yalçın, 2013)

1.4. Biyosüpfaktan Üreten Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar büyüme için bir dizi karbon kaynağı ve enerji kullanmaktadırlar. Karbon kaynaklarının çözünmeyen substratlarla kombinasyonu hücre içi difüzyonu ve farklı maddelerin üretimini kolaylaştırmaktadır. Mikroorganizmalar (bakteriler, mayalar ve bazı flamentöz funguslar), farklı moleküler yapılar ve yüzey aktivitelerine sahip biyosüpfaktanlar üretebilmektedirler. (Çizelge 1.2). Son yıllarda düşük kritik misel konsantrasyonu, düşük toksisite ve emülsifiye etme aktivitesi gibi iyi biyosüpfaktan karakteristiklerine sahip yüzey aktif moleküllerin mikroorganizmalardan izolasyonuna yönelik bilimsel çalışmalar artış göstermiştir (Santos ve ark., 2016). Biyosüpfaktan üreten bakteriler; *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Bacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter* ve *Alcanivorax* cinsleri ile sınırlı kalmamak koşuluyla toprak, deniz suyu, denizel sedimentler ve hidrokarbonlarla kirlenmiş bölgeler de dahil olmak üzere çok çeşitli çevrelerden izole edilmiştir (Chávez, 2011; Gautam ve Tyagi, 2006).

Lipoidal moleküller olan mikrobiyal süpfaktanların oluşumu, kimyasal yapısı ve özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bazı durumlarda biyosüpfaktanlar, mikroorganizmaların özellikle hidrofobik substrat üzerinde büyümeleri sırasında üretilmektedirler. *Rhodococcus* ve *Corynebacterium* cinsleri bu gruba giren mikroorganizmaların temsilcileridir. Biyosüpfaktan üreten *Pseudomonas aeruginosa* ve *Torulopsis bambicola* gibi diğer grupların temsilcileri ise, yüzey aktif maddelerin sentezini hem suda çözünür substratlar hem de hidrofobik substratlar üzerinde gerçekleştirebilmektedirler. Bu nedenle, biyosüpfaktan üretiminde kullanılacak mikroorganizmalar için tercih edilecek substratın doğası ve kompozisyonu çok iyi değerlendirilmelidir (Chávez, 2011).

Çizelge 1.2. Mikrobiyal biyosüpfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar (Uyar ve Yalçın, 2013)

Biyosüpfaktan Sınıfı		Mikroorganizma
Glikolipidler	Ramnotlipidler	<i>Pseudomonas sp. (P.aeruginosa)</i> <i>Burkholderia sp.</i> <i>Serratia rubidea</i>
	Trehalolipidler	<i>Rhodococcus sp.(R. erythropolis)</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i>
	Sforolipidler	<i>Candida bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Candida (Torulopsis) apicola</i> <i>Candida bogorienses</i> <i>Candida lipolytica</i>
	Sellobiolipidler	<i>Ustilago maydis</i> <i>Ustilago zeae</i>
Lipopeptidler ve Lipoproteinler	Süpfaktin, Subtilisin, İturin Likenisin A/B Serrawettin Viskosin Gramisidin Polimiksin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler	Mikolik asit	<i>Mycobacterium sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i>
	Korinomikolik asit Fosfatidiletanolamin	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Polimerik Biyosüpfaktanlar	Emülsan Alasan Liposan Mannoprotein	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Partiküler Biyosüpfaktanlar	Mikrobiyal hücre	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Yarrowia sp.</i>
	Vezikül ve fimbria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Serratia sp.</i>

1.5. Biosüpfaktanların Kullanım Alanları

Son birkaç on yıl boyunca, biyolojik yüzey aktif maddeler alanında yoğun araştırma yapılmıştır. Biosüpfaktanlar; deterjan, petrol, deri tabaklama, ilaç, kozmetik ve gıda gibi çeşitli endüstrilerde uygulanma potansiyeline sahiptir. Biosüpfaktanların emülsifikasyon, köpürme, temizleme, ıslatma, faz ayrımı, yüzey aktivitesi ve ham petrolün viskozitesindeki azalma gibi çeşitli işlevsel özellikler sayesinde bu maddelerin birçok uygulama amacı için kullanımı mümkün olmaktadır (Varjani ve Upasani, 2017). Biosüpfaktanların uygulandığı endüstriler ve kullanım amaçları Çizelge 1.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Biosüpfaktanların başlıca uygulama alanları ve kullanım amaçları (Uyar ve Yalçın, 2013)

Endüstri		Biosüpfaktanın Kullanım Amacı
ÇEVRE	Biyoremediasyon	Hidrokarbonların emülsifikasyonu, arayüzey geriliminin düşürülmesi, metallerin ve ağır metallerin alıkonması
	Toprak remediasyonu	Hidrokarbonlara tutunmak suretiyle emülsifikasyonu, dispersiyonu, köpük yapıcı, deterjan, toprak yıkama
PETROL	Petrol geri kazanımı	Burgu kuyularına yapılan petrol drenajının artırılması, kapillerde tutuklu olan petrolün salınımının artırılması, katı yüzeylerin ıslatılması, petrol viskozitesinin, akma noktasının ve arayüzey geriliminin düşürülmesi, petrolün ayrıştırılması
	Demülsifikasyon	Yağ emülsiyonlarının giderilmesi, petrolün çözünürleştirilmesi, viskozitenin düşürülmesi, ıslatıcı ajan
BİYOLOJİK	Mikrobiyolojik	Hücre hareketi, hücreler arası iletişim, besin alınımı, hücreler arası rekabet, bitki ve hayvan patogenezi gibi fizyolojik davranışlar
	Farmasötikler ve terapötikler	Antibakteriyal, antifungal, antiviral ajanlar, adhezif ajanlar, immünomodulator moleküller, aşılarda ve gene terapisi
GIDA	Emülsifikasyon/demülsifikasyon	Emülsifiye edici, emülsiyon kırıcı, ıslatıcı, köpük yapıcı/kırıcı, inceltici, yağlayıcı, lipidler, proteinler ve karbohidratlarla etkileşim
	Fonksiyonel katkı maddesi	Yağlar, proteinler ve karbohidratlarla etkileşim, koruyucu ajan

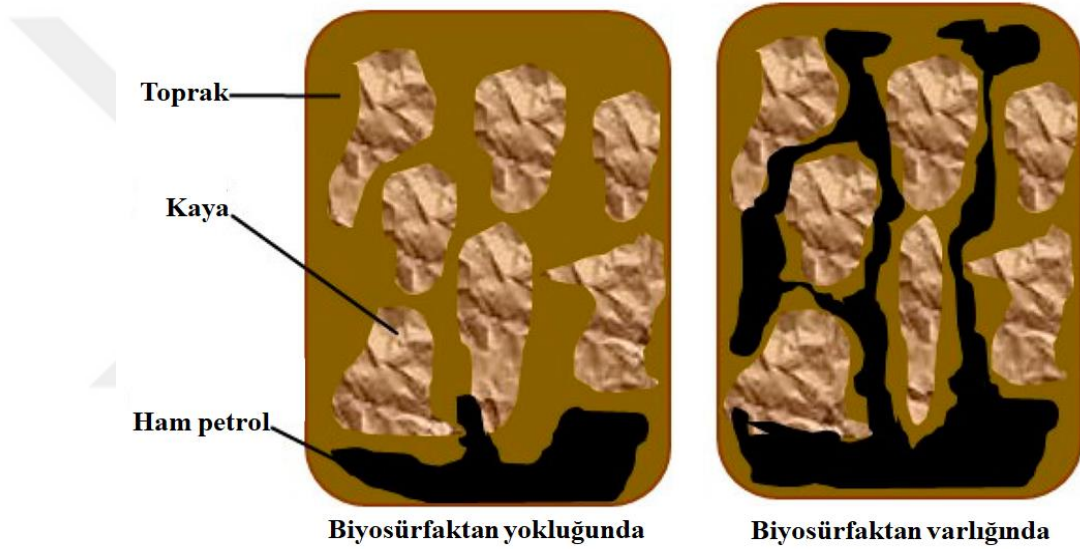
Çizelge 1.3. (devam)

DERİ	Deriden yağ giderimi	Yağ gidermede deterjan ve emülsifiye edici
	Tabaklama ve boyama	Islatma ve penetrasyonunun teşviki
ZİRAAT	Biyokontrol	Parazitizm, antibiyozis, rekabet, indüklenmiş sistemik direnç ve hipovirulans gibi mikrop mekanizmalarının biyokontrolünün kolaylaştırılması
	Fosfat gübreleri	Depolama sırasındaki topaklanmanın engellenmesi
KOZMETİK	Sağlık ve güzellik ürünleri	Emülsifiye edici, köpük yapıcı, ıslatıcı, çözücü, temizleyici, antimikrobiyal ajanlar, enzim aktivitesi mediyatörü

1.5.1. Petrol endüstrisi

Gelişmiş petrol kurtarımı için uygulanan termal ve kimyasal yöntemler maliyetli olup aynı zamanda çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Toprak remediasyonu ve ham petrolün geri kazanımı için kullanılan bu teknolojiler genellikle pahalıdır ve kirleticilerin tamamen dekompozisyonuna imkan vermezler. Mikrobiyal olarak geliştirilmiş petrol kurtarımı (Microbial Enhanced Oil Recovery-MEOR), primer (mekanik) ve sekonder (fiziksel) petrol kurtarım tekniklerinden sonra rezervuarlarda kalan petrolün kurtarımı için kullanılan tersiyer bir petrol kurtarım tekniğidir. Petrol kurtarımı sırasındaki asıl problem; (a) rezervuarların geçirgenliğinin düşük olması, (b) zayıf hareket kabiliyetine neden olan ham petrolün yüksek viskozitesi ve (c) su ile ham petrol arasında yüksek arayüzey gerilimi sebebiyle ham petrolün rezervuarda tutulu kalmasına neden olan yüksek kapillar güçlerdir. Mikrobiyal olarak geliştirilmiş petrol kurtarımındaki anahtar mekanizmalar; (a) porozite (gözenek) ve permeabilite (geçirgenlik) modifikasyonu, (b) petrolün hareket oranının düşürülmesi, (c) emülsifikasyon, (d) ıslatılabilirlik özelliğindeki değişiklik, (e) sodium bikarbonat kullanılarak mikrobiyal metabolik yol izlerde değişiklik, (f) ara yüzey kuvvetlerin değişimi ve (g) petrolün çözünürleştirilmesi şeklinde sıralanabilmektedir (Varjani ve Upasani, 2017).

Biyosüpfaktanla arttırılmış petrol kurtarımı, rezidüel petrolün önemli bir kısmını kurtarmak için kullanılan en umut verici ve gelişmiş yöntemlerden birisidir. Biyosüpfaktanlar tarafından petrol/su ve petrol/kaya arasındaki ara yüzey gerilimi düşürölür ve bu sayede petrolün kayalardaki porlarda hareketini sınırlandıran kapillar kuvvetler azaltılmış olur (Şekil 1.5.) (Varjani ve Upasani, 2017). *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus licheniformis* ve *Desulfobivbrio desulfurican* gibi bakterilerin yanı sıra biyosüpfaktanlar ve gerekli besin ilavesinin yapıldığı rezervuarlarda %30 -%200 aralığında değışen oranlarda pertolün geri kazanıldığı rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2007).



Şekil 1.5. Biyosüpfaktanla arttırılmış petrol kurtarım mekanizması

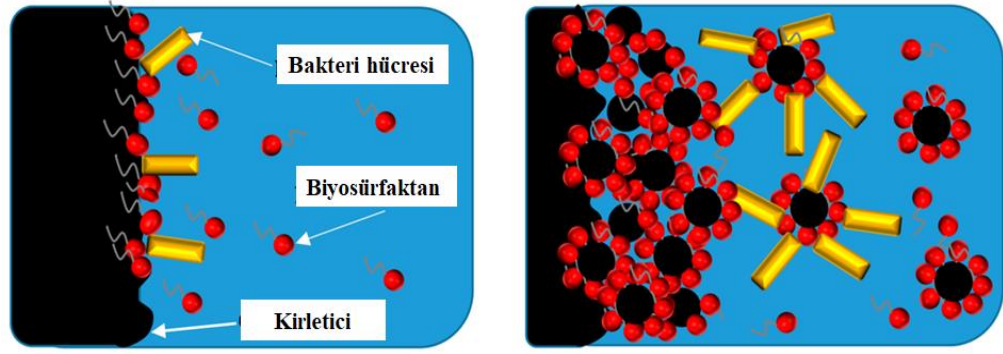
1.5.2. Biyodegradasyon/Biyoremediasyon Teknolojileri

Küresel endüstrileşme ve artan nüfusun bir sonucu olarak, çoğunlukla hidrokarbonların dahil olduğu çeşitli doğal kaynakların kullanımı ile karşılanmaya çalışılan küresel enerji talebinde önemli ölçüde bir artış olmuştur. Böylelikle, canlıların sağlığı ve ekosistemin sürdürülebilirliğini tehlikeye atan büyük miktarlarda hidrokarbon ve hidrokarbon temelli ürünlerin çevreye salınımı gerçekleşmiştir. (Joy ve ark., 2017).

Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency:EPA) tarafından değişik kirleticilerle kontamine olmuş toprakların arıtımında farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik teknolojiler önerilmesine rağmen en yaygın kullanılan teknik biyoremediasyondur. Bu proses, kirleticilerin kısmi olarak daha az toksik bileşikler haline dönüştürülmesi veya bu maddelerin karbondioksit ve suya dönüştürülmesi için bitki ve mikroorganizmaların doğal degradasyon kapasitesinden faydalanmaktadır (Santos ve ark., 2016).

Biyoremediasyon tekniği, 1989 yılında Alaska körfezinde Exxon Valdez isimli petrol tankeri kazasında bölgeye yayılan 41 milyon litre ham petrolün arıtımında önemli bir rol oynamıştır. Öncelikle yüksek basınçlı su ile fiziksel yıkama yapılmış, sonra da kimyasal sürfaktanlar kirlenmiş bölgelere uygulanarak petrol parçalayan mikroorganizmaların aktivitesi ve büyümesi hızlandırılmıştır. Sürfaktan uygulaması yapılan bölgedeki hidrokarbon kirliliğinin kontrol bölgelerinden daha temiz olması, her ne kadar yapılan işlemin etkinliğini gösterse de sentetik sürfaktanların kullanımından kaynaklanan maliyet bu yöntemi sınırlandırmıştır. Ayrıca, çevrede birikim yaptığı bilinen sentetik sürfaktanlarla eş değer fonksiyona sahip biyosüpfaktanları üreten organizmaların kullanımı çevre dostu yöntemleri ön plana çıkarmıştır (Santos ve ark., 2016).

Petrol türevli hidrokarbonların biyodegradasyonu iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Birinci mekanizma, bakterinin etrafındaki ortamın yüzey geriliminde ve aynı zamanda hücre çeperi ile hidrokarbon molekülleri arasındaki ara yüzey geriliminde bir azalmaya neden olarak mikroorganizmalar için hidrofobik substratın biyomevcudiyetinin artırılmasını içermektedir. Diğer mekanizma ise hidrokarbon yapışmasını kolaylaştıran ve membrana zarar vermeden hücre duvarının lipopolisakkarid indeksini düşürerek membranda değişikliğe neden olan biyosüpfaktan ve hücre yüzeyi arasındaki etkileşimi kapsamaktadır. Şekil 1.6.' da petrol damlacıklarının yüzey alanlarının biyosüpfaktanlar tarafından arttırılarak çok sayıda bakterinin substrata erişimini kolaylaştırması ve bu sayede daha fazla biyokütle üretimini gerçekleştirmesi durumu şematize edilmiştir (Santos ve ark., 2016).



Şekil 1.6. Petrol üzerindeki biyosürfaktan etkisinin ilüstrasyonu (Santos ve ark., 2016)

1.5.3. Farmasötik endüstrisi

Biosürfaktanlar; fungisidal, bakterisidal, insektisidal ve anti-viral özelliklerin yanı sıra yapışmayı önleyici ajanlar ve enzim inhibitörleri özelliği nedeniyle de farklı biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (Santos ve ark., 2016). Dallanmış halkalı bir lipopeptit olan ve *Streptomyces roseosporus* kültürleri tarafından üretilen daptomisin, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve diğer Gr(+) bakterilerin neden olduğu deri enfeksiyonlarında, endokardit ve bakteremi’de klinik olarak kullanılmaktadır (Fracchia ve ark., 2015; Robbel ve ark., 2010; Tally ve ark., 1999).

Özellikle farklı yüzeylerde oluşturulan ve bazı bakteriler tarafından üretilen biyofilmler, medikal malzeme ve cihazlarda ciddi sorunlara neden olmaktadır (Percival ve ark., 2015; Veerachamy ve ark., 2014). Biyofilm oluşumu için ilk olarak patojenik mikroorganizmanın katı yüzey ya da enfeksiyon bölgesine tutunması gerekmektedir. Sentetik kimyasallara gerek duymadan mikrobiyal tutunmayı engelleyen anti-adhezif aktivite ise biyosürfaktanlar için tanımlanmıştır (Rodrigues ve ark., 2006). Biyosürfaktanların, farklı patojen mikroorganizmalara (*Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* gibi) karşı biyofilm oluşumunu engelleyici anti-adhezif özelliği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Luna ve ark., 2011; Rufino ve ark., 2011; Meylheuc ve ark., 2001).

1.5.4. Gıda endüstrisi

Biosürfaktanlar, gıda katkı maddeleri olarak gıda endüstrisinde gelecek vaadeden birçok uygulamada kullanılmaktadırlar. Lesitin ve türevleri, gliserol, sorbitan veya etilen glikol içeren yağ asit esterleri ve son zamanlarda sentezlenmiş bir oligopeptit de dahil olmak üzere monogliseridlerin etoksillenmiş türevleri şu anda gıda endüstrisinde emülsifiye edici olarak dünya çapında kullanılmaktadır (Gautam ve Tyagi, 2006).

Emülsifikasyon, gıdalardaki kıvam ve doku oluşumunun yanı sıra faz dağılımı ve aromaların çözünürleştirilmesinde de oldukça önemlidir. Gıda ürünlerindeki emülsifiye edicilerin (emülgatörlerin) genel fonksiyonu, yağ globüllerinin aglomerasyonunun kontrolü ve havalandırılmalı sistemlerin stabilizasyonu ile emülsiyonu kararlı kılmaktır. Bir emülsiyon, damlacıklar şeklinde diğerine dağılmış (sürekli dış faz) en az bir karışmayan sıvıya (süreksiz iç faz) sahiptir. Bu sistemin kararlılığı minimumdur. Ancak, arayüzey gerilimindeki düşüş ile iki faz arasındaki yüzey enerjisini azaltan ve böylece sterik ve elektrostatik bariyerlerin oluşumuyla parçacık birleşmesini önleyen bir sürfaktan ilavesi ile söz konusu kararlılık arttırılabilmektedir. Emülsiyon içeren işlenmiş gıdalar arasında kaymak, tereyağı, mayonez, salata sosları, gıda dolguları, vb. yer almaktadır. Emülgatörler için diğer kullanımlar; nişasta içeren ürünlerin dokusunun ve raf ömrünün iyileştirilmesi, komplekslerin oluşumu, buğday ununun reolojik özellikleri ve gluten ile olan etkileşimlerinin değiştirilmesinin yanı sıra yağların polimorfizminin ve kristal yapılarının kontrolü ile yağ bazlı ürünlerin kıvamını ve dokusunu iyileştirmek şeklinde sıralanabilmektedir (Santos ve ark., 2016). Salata sosunda kullanılan ve *Candida utilis* tarafından üretilen biyoemülsifiye edicilerin yanı sıra *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen ve dondurma, mayonez gibi gıdalarda su/yağ emülsiyonlarını stabilizasyonu için kullanılan mannoproteinler gıdaların hazırlanmasındaki uygulama alanlarına verilecek bazı örneklerdendir (Campos ve ark., 2015; Torabizadeh ve ark., 1996; Shepherd ve ark., 1995)

1.5.5. Kozmetik endüstrisi

Kişisel bakım ve kozmetik ürünlerinde de biyosürfaktanların kullanımı oldukça caziptir. Kozmetik uygulamalar için kullanılan çok sayıda bileşik, hidrofobik moleküllerin çeşitli lipazlar ve/veya hücrelerin kendisi tarafından enzimatik dönüşüm ile hazırlanmaktadır. Kozmetik endüstrisi genellikle raf ömrü en az 3 yıllık olan sürfaktanları talep etmektedir. Dolayısıyla, doymamış açıl grupları içeren bileşiklere kıyasla doymuş açıl grupları bulunan bileşikler daha çok tercih edilmektedirler. Kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sürfaktanlardan biri olan monogliseridlerin, *P.fluorescens* lipazları tarafından % 90 verimle gliserol içyağının kullanılmasıyla üretildiği bildirilmiştir (Gautam ve Tyagi, 2006)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyosürfaktanlar; bakteriler, mayalar ve fungusları da içerisine alan mikroorganizmaların geniş bir grubu tarafından üretilen yüzey aktif biyomoleküller olarak bilinmektedir. Düşük toksisite, yüksek biyoparçalanabilirlik, yüksek köpük oluşturma aktivitesi, çevre dostu olması ve yüksek seçicilik gibi özellikleri dolayısıyla kimyasal olarak sentezlenen sürfaktanlara kıyasla belirgin üstünlükleri bulunmaktadır (Shekhar ve ark., 2015). Farklı mikroorganizmalar tarafından biyosentetik yolla üretilen biyosürfaktanlar, yapısal olarak da sentetik sürfaktanlardan daha fazla çeşitlilik göstermektedirler. Bu yapısal çeşitlilik sayesinde farmasötik/tıp, gıda, kozmetik, pestisit, petrol ve biyodegradasyon endüstrileri olmak üzere çok sayıda kullanım alanlarına sahiptirler (Shekhar ve ark., 2015; Gautam ve Kyagi, 2006). Her endüstriyel prosesin kendine özgü koşulları olması ve canlı sistemlerin biyosentetik yollarındaki çeşitlilik de göz önüne alındığında, çevresel koşulların geniş bir aralığında aktivite gösteren yeni biyosürfaktanların keşfine yönelik çalışmaların artarak devam ettiği görülmektedir.

Biyosürfaktan üreten mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu, moleküler tanılaması, biyosürfaktan üretim koşullarının optimizasyonu ve üretilen biyosürfaktanların karakterizasyonuna ilişkin sayısız yurt dışı çalışma bulunmasına karşın ülkemizde gerçekleştirilen benzer çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yurt içi ve yurt dışında yapılan bazı çalışmalar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

Biyosürfaktanlara ilişkin ilk çalışma Arima ve ark. (1968) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, izole ettikleri ve *Bacillus subtilis* olarak tanıladıkları mikroorganizmanın lipopeptid karakterde bir biyosürfaktan ürettiğini göstermişlerdir. 20-40 mg/L olan kritik misel konsantrasyonu ile 20 µM gibi düşük konsantrasyonda dahi suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 27 mN/m'e düşüren bu biyosürfaktan, olağanüstü bir yüzey aktivitesi gösterdiği için surfaktin olarak adlandırılmıştır (Nerurkar, 2010; Peypoux ve ark., 1999; Grangemard ve ark., 1997). Daha sonraki yıllarda sürfaktinin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin

aydınlatılmasına yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir (Bonmatin ve ark., 1994; Baumgart ve ark., 1991; Kakinuma ve ark., 1969). Moleküler ağırlığı 1007-1035 Da aralığında olan bu amfipatik siklik lipopeptidin farklı izoformlarda hücre içinde birarada sentezlendiği belirlenmiştir (Bonmatin ve ark., 2003; Kowall ve ark., 1998). *Bacillus* cinsine üye bazı suşlar tarafından stasyoner fazda üretilen sürfaktinin; biofilm oluşumu, swarming kolonilerin gelişimi ve hidrofobik substratların yüzey alanını artırarak besinlerin hücreye girişini kolaylaştırmak gibi birçok rolünün olduğunu belirlenmiştir (Julkowska ve ark., 2005; Kinsinger ve ark., 2005; Stanley ve Lazazzera, 2004; Rosenberg ve Ron, 1999).

Amfifilik doğası nedeniyle surfaktin molekülü, membranı destabilize etmekte ve membran bütünlüğünü bozmaktadır. Membran destabilizasyonu ve sızıntısındaki anahtar basamak çift katlı yağ tabakası içinde surfaktin moleküllerinin dimerizasyonudur. Membran yapıları ile sürfaktin etkileşiminin varsayılan mekanizmaları arasında; çift katlı yağ tabakasına insersiyon, mono ve divalent katyonların şelatlanması, kanal oluşumu vasıtasıyla membran permeabilitesinin modifikasyonu veya deterjan benzeri mekanizmalarla membranın çözünmesi yer almaktadır (Seydlová ve Svobodová, 2008; Carillo ve ark., 2003; Bernheimer ve ark., 1970). Sürfaktin molekülleri hidrofobik interaksiyonlar aracılığıyla membrana nüfus etmekte ve böylece hem hidrokarbon zincirlerinin sırasını hem de membran kalınlığını etkilemektedir. Bu primer çarpışmanın ardından, peptid halka konformasyonel değişiklik göstererek daha sonraki etkileşim proseslerini kolaylaştırmaktadır.

Sürfaktin moleküllerinin hedef hücre membranı ile çok çeşitli etkileşimini farklı medikal uygulamaları da beraberinde getirmiştir. Fibrin pıhtı oluşumunun engellemesi (Arima ve ark., 1968), antibakteriyal ve antifungal etkileri (Thimon ve ark., 1995; Thimon ve ark., 1992; Besson ve ark., 1976), antiviral (Kracht ve ark., 1992; Vollenbroich ve ark., 1997a) ve antimikoplazma (Vollenbroich ve ark., 1997b) özelliği, antitümoral aktivite (Kim ve ark., 2007; Wang ve ark., 2007; Kameda ve ark., 1974) ve hemolitik aktivite (Dehghan ve ark., 2005)' nin yanı sıra sayısız

biyolojik aktiviteye sahip olması biyosüpfaktanların önemini daha da arttırmıştır (Seydlová ve Svobodová, 2008).

Çevreye yönelik remediasyon uygulamalarda da etkin bir şekilde kullanılan süpfaktinin, metal iyonlarının gideriminde etkili olduğu saptanmıştır (Mulligan ve ark., 1999). Yapay civa kontaminasyonu yapılan sulardan ucuz ve basit bir teknik olan köpük fraksiyonlama yöntemi ile civanın uzaklaştırıldığı bir çalışmada süpfaktinin ve kimyasal süpfaktanların (SDS ve Tween-80) etkinliği kıyaslanmıştır. Civa iyonlarının en yüksek geri kazanımın miktarının (%10.4) süpfaktin ile gerçekleştirildiği, SDS için bu değerin %8.14 olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2011). Süpfaktin molekülünün çok yönlü işlevselliği, diğer biyosüpfaktan üreticilerinin izolasyonu ile ürettikleri farklı yapısal özellikteki biyosüpfaktanların karakterizasyon çalışmaları endüstriyel uygulamalarına yönelik araştırmaları zorunlu kılmıştır. Literatürde özellikle bakteriler tarafından üretilen biyosüpfaktanlara ilişkin çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Biyosüpfaktan üretimi açısından önem taşıyan bakteriyal cinsler arasında en önemlileri *Bacillus* ve *Pseudomonas* olup hidrokarbonlarla kontamine ekosistemlerde dominant oldukları rapor edilmiştir (Das ve Mukherjee, 2005; Bodour ve ark., 2003; Yateem ve ark., 2002). Bakterilerde biyosüpfaktan üretimiyle ilgili bazı çalışmalar şöyle özetlenebilmektedir;

Ibrahim ve ark (2013) tarafından ham petrol parçalayan bakterilerin izole edildiği bir çalışmada biyosüpfaktan üretimi, kan hemolizi ve emülsifikasyon testleri ile taranmıştır. Üretilen biyosüpfaktanın türü, IR (Infra-Red) ve GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi) analizleri ile tayini sonucunda lipopeptit yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Tanılaması yapılan türlerin *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus licheniformis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Micrococcus kristinae* olarak belirlenmiş ve en yüksek emülsifikasyon indeksine (%87) *S. marcescens*'in sahip olduğu rapor edilmiştir.

Tuz fabrikasından izole edilen sekiz halofilik bakterinin (*Kocuria* sp., *Kurthia* sp., *Halococcus* sp., *Proteus* sp., *Photobacterium* sp., *Aerococcus* sp., *Clavibacter* sp.

biyosüpfaktan üretme kapasitesi drop collapse testi, emülsifikasyon ve hemolitik aktivitelerin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. İlk 3 mikroorganizmanın biyosüpfaktan üretimi açısından pozitif sonuç verdiği bu çalışmada, *Kocuria sp.* tarafından üretilen biyosüpfaktanın TLC, FTIR ve GC-MS analizleri neticesinde lipopeptit yapıda olduğu tayin edilmiştir. Ayrıca, hidrokarbonların geniş bir grubuna karşı (ham petrol, hindistan cevizi yağı, ayçiçek yağı, zeytin yağı ve kerosen) %50'den fazla emülsifiye etme kapasitesinde olduğu rapor edilmiştir (Sarafin ve ark., 2014).

Anaukwu ve ark. (2015), Nijerya topraklarından izole ettikleri *Pseudomonas monteilii* ve *Citrobacter murlinae* türlerinin biyosüpfaktan üretimini; drop-collapse, yağ yer değiştirme (oil displacement), CTAB agar testleri ile emülsifikasyon indeksinin ve yüzey geriliminin belirlenmesi sayesinde pozitif olduğunu bulmuşlardır. *P. monteilii* ve *C. murlinae* için E₂₄/yağ yerdeğiştirme çaplarının sırasıyla % 76.67/2.1 cm ve %66.67/1.8 cm olduğunu rapor etmişlerdir.

Biyosüpfaktan üreten mikroorganizmaların taranmasında kullanılan yöntemlerin etkinliğinin karşılaştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Thavasi ve ark., 2011; Satpute ve ark., 2008; Płaza ve ark., 2006; Youssef ve ark., 2004; Huy ve ark., 1999; Bodour ve Miller-Maier, 1998). Bu çalışmalarda, drop-collapse ve yağ yer değiştirme, tekniklerinin çok sayıda örneğin sözkonusu olduğu durumlarda biyosüpfaktan üretiminin belirlenmesi açısından güvenilir bir şekilde uygulanabileceği bildirilmiştir. Bu yöntemlerin özel bir ekipmana ihtiyaç duymadan uygulanması en önemli avantajları arasında yer almaktadır. Ancak araştırmacılar, bu yöntemlerin yanısıra emülsifikasyon indeksi ve yüzey geriliminin belirlenmesi gibi ilave yöntemlerle de biyosüpfaktan varlığının teyyid edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Biyosüpfaktanlara yönelik ülkemizde gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışmalardan bazıları ise şöyle özetlenebilmektedir;

Tuğrul ve Cansunar (2005), farklı mikrobiyal popülasyonlara (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* ve *Phanerochaete chrysosporium*) ait sıvı kültür ortamlarını küçük hacimlerini kullanarak mikropilaka kuyucuklarında çok sayıda örneğin taranmasında yararlanılabilecek hızlı bir yöntem olan drop-collapse tekniğinin etkinliğini test etmişler.

Velioğlu ve Öztürk (2015), solid state fermentasyon (katı faz fermentasyonu) ve submerged fermentasyon (batık fermentasyon) yöntemleriyle fungal bir tür olan *Pleurotus ostreatus* tarafından biyosüpfaktan üretimini karşılaştırmasını iki farklı üretim ortamını kullanarak kıyaslamıştır. Biyosüpfaktan üretiminin yağ yer değiştirme denemesi, emülsifikasyon aktivitesinin ve yüzey geriliminin ölçülmesi gibi testlerle tarandığı bu çalışmada, en etkili ve ekonomik biyosüpfaktan üretiminin karbon kaynağı olarak ayçiçeği kabuklarının kullanıldığı katı faz fermentasyonu ile gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Sidal ve Yılmaz (2012), serbest ve immobilize *Pseudomonas sp.* BKK041 hücreleriyle substrat olarak glukozun kullanılarak ramnolipid üretiminin etkinliğini karşılaştırmayı amaçladıkları çalışmalarında en yüksek ramnolipid üretiminin (600 mg/L) 30 °C'de ve pH:7,0'da serbest *Pseudomonas sp.* BKK041 hücreler tarafından gerçekleştirildiğini bildirmiştir.

Kaskatepe ve ark.(2015) zeytin ve balık yağı fabrikalarının atıklarıyla kontamine olmuş toprak örneklerinden izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* suşları tarafından ramnolipid üretimini artırmak için kefir ve balık yemini kullanarak besiyerini formüle etmeye çalıştıkları araştırmalarında en yüksek ramnolipid verimini (10,3-9,3 mg/L) balık yağının ilave edildiği MSM ortamında elde etmişlerdir.

Petrol rafinerisi atık sularından izole edilerek tanılanan *Pseudomonas aeruginosa* RWI, *Pseudomonas putida* RWII, *Pseudomonas fluorescens* RWIII ve *Burkholderia cepacia* RWIV suşlarından biyosüpfaktan üretimi gerçekleştirilmiştir (sırasıyla BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV) ve drop collapse yöntemiyle biyosüpfaktan

üretimi taranmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan bu biyosüpfaktanların biyokimyasal testler ve FTIR ile kısmi karakterizasyonu yapılarak medikal önemi bulunan bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerileri test edilmiştir. Agar disk difüzyon yöntemi, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC, Minimum inhibitory concentration) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC, minimum bactericidal concentration) değerlerinin belirlendiği çalışmada, en yüksek MBC değerinin (64 mg/L) BS-I ile *E. coli* için elde edildiği, diğer test biyosüpfaktanları ile patojenik suşlar üzerinde alınan sonuçların ise bu değerden çok daha düşük olduğu gösterilerek biyosüpfaktanların antimikrobiyal aktiviteleri vurgulanmıştır (Yalçın ve Ergene, 2009).

Yılmaz ve ark. (2009) tarafından biyosüpfaktanların antifungal aktivitelerine ilişkin bir başka çalışmada, süt fabrikası atık sularını kullanarak 5 farklı mikroorganizma izole etmişlerdir. Biyosüpfaktan üretiminin belirlenmesinde drop collapse ve hemoliz testi, yüzey geriliminin ve emülsifikasyon indeksinin belirlenmesiyle pozitif sonuç veren üç türü *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmışlardır. Bu izolatlardan peynir altı suyu atık suları kullanılmak suretiyle üretilen biyosüpfaktanların (sırasıyla BS-I, BS-II ve BS-III) yapısal karakterizasyonu, fonksiyonel grupların FTIR ile tayini aracılığıyla kısmen gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar; BSI-I ve BS-III'ün bir lipopeptid, BS-I'in ise glikolipid yapısında olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, sözkonusu biyosüpfaktanların bitki patojeni olan farklı *Fusarium* cinslerine karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu da tespit etmişlerdir (Yılmaz ve ark. 2009b).

Rafineri atık suyundan izole edilen *Bacillus subtilis* RW-I ile üretilen biyosüpfaktanın antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada hücresiz kültür ortamı kullanılmıştır. Yapısal tayin ve ileri saflaştırma için FTIR ve HPLC'nin kullanıldığı bu çalışmada, üretilen biyosüpfaktanın lipopeptid biyosüpfaktan olan surfaktine oldukça benzeyen pikler verdiği ve serbest radikalleri süpürme kapasitesinde olduğu gösterilmiştir (Yalçın ve Çavuşoğlu, 2010).

Petrol kontaminasyonunun olduğu topraklardan izole edilen *Staphylococcus xylosus* STF1 tarafından üretilen biosürfaktan hemolitik aktivite, drop-collapse assay, atomize yağ denemesi ile tespit edilmiştir. Biyokimyasal karakterizasyonu FTIR, Raman spektroskopisi ve kütle spektroskopisi ile yapılan bu biosürfaktanın lipopeptid karakterde bir biyomolekül olduğu rapor edilmiştir. Ayçiçek yağı, motor yağı, kerosen ve benzen gibi çeşitli hidrokarbonlara karşı yüksek emülsiyon oluşumunun gözlenmesi, sözkonusu biosürfaktanın sadece hidrokarbon kirliliğinin önlenmesinde değil aynı zamanda temizleyici ve emülsifiye edici ajan olarak gıda endüstrisinde de kullanılabilecek aday biosürfaktanlardan olduğunu göstermiştir. Ayrıca, kısmen saflaştırılan biosürfaktanın *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* RSHM 25923, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* DH5'i de içeren bazı patojenik bakterilere karşı antimikrobial aktivitesinin belirlenmesi, terapötik ajan ya da gıda katkı maddesi olarak da kullanılabileme potansiyelini ortaya koymuştur (Keskin ve ark., 2015).

Yukarıda da özetlenmeye çalışıldığı gibi Türkiye'de gerçekleştirilen ve çevresel örneklerden izole edilen mikroorganizmalardan biosürfaktan üretimine yönelik kısıtlı miktarda araştırma bulunduğu için bu çalışmada, Şanlıurfa'daki hidrokarbon kirliliğinin yoğun miktarda olduğu ve daha önce çalışılmamış çevresel toprak örneklerinden biosürfaktan üreten bakterilerin izolasyonu ve moleküler tanılaması yapılarak biyoteknolojik öneme sahip ve yöreye özgü bakteriyal suşların kazandırılması amaçlanmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan çevresel örnekler

Şanlıurfa il sınırları içerisinde bulunan ve petrol türevleriyle (motor yağı, kullanılmış motor yağı ve dizel yağı) ile kontamine olan toprak örnekleri çeşitli otomobil tamirhanelerinden toplanmıştır (Ekim, 2016). Toplanan örnekler, aseptik koşullar altında laboratuvara getirilerek biyosüpfaktan üretme yeteneğinde olan bakterilerin izolasyonu için önzenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Toprak örneklerinin toplandığı lokasyonlar aşağıdaki tabloda (Çizelge 3.1.) belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Biyosüpfaktan üreten bakterilerin izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri ve bu örneklerin toplandığı lokasyonlar

Örnek No	Alındığı Yer	Konum
1	Akçakale sanayi sitesi	36°43'57.1" N 38° 56'45.5"E
2	Akçakale sanayi sitesi	36°43'55.9" N 38° 56'42.6"E
3	Akçakale sanayi sitesi	36°43'59.8" N 38° 56'44.9"E
4	Akçakale sanayi sitesi	36°43'55.8" N 38° 56'45.3"E
5	Şanlıurfa sanayi sitesi	37°09'27.3" N 38° 47'54.8"E
6	Şanlıurfa sanayi sitesi	37°09'29.2" N 38° 47'48.7"E
7	Şanlıurfa sanayi sitesi	37°09'24.4" N 38° 47'55.2"E

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

Ön zenginleştirme besiveri (Enrichment medium=EM)

Pepton	10 g/L
Et ekstraktı	5 g/L
NaCl	5 g/L
D-glukoz	10 g/L
Gliserol	10 g/L
Soya/kullanılmış motor yağı	%1
Distile su	1000 mL

pH:7,0 a ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çevresel örneklerdeki biyosüpfaktan üretme yeteneğine sahip bakterilerin ön zenginleştirme işlemi için kullanılmıştır.

Submerged (batık kültür) Fermentasyon (SmF) besiveri

K ₂ HPO ₄	2.2 g/L
KH ₂ PO ₄	0.14 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.04 g/L
NaCl	10 g/L
Et ekstraktı	2 g/L
D-glukoz	10 g/L
Soya yağı	1%
Distile su	1000 mL

121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve bakteriyal izolatların biyosüpfaktan üretme yeteneklerinin belirlenmesinde fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Luria-Bertani (LB) Broth

Trypton	10 g/L
Maya ekstraktı	5 g/L
NaCl	10 g/L
Distile su	1000 mL

Bu sıvı besiyeri, genomik DNA'nın izolasyonu için bakterilerin hücrelerinin elde edilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca, izole edilen bakterilerin gliserol stoklarının oluşturulması basamağında ise %20 oranında steril gliserol içeren LB besiyeri kullanılmıştır.

Nutrient Agar

Nutrient agar	28 g/L
Disile su	1000 mL

Bakteriyal izolatların izolasyonu, saf kültürlerin eldesi ve rutin ekimlerde bu besiyeri kullanılmıştır.

Tribütirin agar

Nutrient agar	28 g/L
Tribütirin	%1
Disile su	1000 mL

Bakteriyal izolatların ekstraselüler lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Tam homojenizasyonu sağlamak amacıyla, besiyerinin petrilere dökülmeden önce iyice karıştırılması gerekmektedir.

Koyun Kanlı agar

Trypton	14 g/L
Pepton	4.5 g/L
Maya ekstraktı	4.5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

Otoklavlanarak steril edilen bu besiyerinin sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde %5 koyun kanı ilave edilerek petrilere dökülmüş ve izolatların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler, kimyasallar, tamponlar, kitler

Bu çalışmada; analitik seviyede saflık gösteren kimyasallar Sigma, Merck gibi analitik seviyede üretim yapan tedarikçilerden temin edilerek kullanılmıştır. Ön zenginleştirme, biyosüpfaktan üretiminin gerçekleştirildiği fermentasyon ortamı ve tarama testlerinden olan yağ yer değiştirme denemesi için kullanılan soya yağı ise Abalıoğlu Yağ Sanayi ve Ticaret A.Ş. (İzmir)' den temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan diğer çözeltiler ve kullanım amaçları şu şekildedir;

Fizyolojik tuzlu su (FTS)

NaCl	8,5 g/L
Distile su	1000 mL

Otoklavlanarak steril edilen bu çözelti, bakterilerin izolasyonu sırasında önzenginleştirme yapılan örneklerin seri dilüsyonlarının hazırlanmasının yanı sıra ekstraselüler lipaz aktivitesinin ve hemolitik aktivitenin belirlenmesi sırasında saf kültürlerin hücre süspansiyonlarının hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Kristal violet boyası

Kristal violet	2 g
Etanol (%95)	20 mL
Amonyum okzalat	0,8 g
Distile su	80 mL

Amonyum okzalat ise distile su içerisinde çözülerek daha önceden etanol içerisinde çözünmüş olan kristal violet çözeltisine ilave edilerek hazırlanmıştır. Bakteriyal izolatların Gram boyama ile mikroskopik karakterizasyonun yapılması için kullanılmıştır.

% 0.5'lik safranin boyası

Safranin	0,5 g
Distile su	100 mL

Bakteriyal izolatların Gram boyama ile mikroskopik karakterizasyonun yapılması için kullanılmıştır.

Gram iyodür (Lugol) çözeltisi

İyot (I)	1 g
Potasyum iyodür (KI)	2 g
Distile su	300 mL

Gram boyama sırasında mordan olarak kullanılmıştır.

5X TAE Tamponu

Tris base	24,2 g/L
Glasiyal asetik asit	5,71 g/L
EDTA (0,5 M, pH: 8,0)	10 mL

750 mL distile suda Tris base çözülmüş ve daha sonra diğer bileşenler eklenerek hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. PCR ürünlerinin

görüntülenmesinde kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve PCR ürünlerinin elektroforezi sırasında tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

Lizis tamponu

Tris-HCl	25 mM
EDTA	2,5 mM
Triton X-100	% 1

Gr(+) bakterilerden DNA izolasyonu öncesinde hücre çeperinin parçalanması ve böylece hücre lizatının hazırlanması için kullanılmıştır. Bu tampon çözeltiye, final konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde lizozim (Merck) eklenerek çözölmüş ve her bir örnek bakteri pelleti lizozim içeren 200 µL lizis tampon içinde süspanse edilmiştir.

Genomik DNA izolasyon kiti

Bakteriyal izolatlardan genomik DNA'ların saflaştırılmasında Purelink genomik DNA (Invitrogen) saflaştırma kiti kullanılmış ve üretici firmanın kullanım talimatları doğrultusunda genomik DNA'lar izole edilmiştir.

16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve görüntülenmesinde kullanılan materyaller

- dNTP karışımı (10 mM, Thermo Scientific)
- MgCl₂ (2,5 mM, Thermo Scientific)
- TrueStart Hot Start Taq DNA polimeraz (500 Unit, Thermo Scientific)
- Primerler (Invitrogen) 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
- DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)
- 6X DNA yükleme tamponu (Thermo Scientific)

- Agaroza (Sigma)
- SafeView Classic nükleik asit boyası (Applied Biological Materials)

3.1.4. Kullanılan cihazlar

İnkübatör (Nüve, EN-055), Otoklav (Nüve OT-90L), steril kabin (Nüve MN-120), Etüv (Nüve FN-120), derin dondurucu (Nüve DF-490), çalkalamalı su banyoları (GFL 1086 ve Nüve ST-30), mikrosantrifüj (Eppendorf 5415R), santrifüj (Hettich Rotina 420R), vorteks (Daihan WiseMix VM-10), hassas terazi (Shimadzu AW320), pH metre (Hanna HI-2210), mikroskop (Olympus), yatay elektroforez ve güç kaynağı (Biorad), görüntüleme cihazı (Major Science, SmartView Pro 1100 Imager), PCR cihazı (Veriti 96-well thermal cycler, Applied Biosystems).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

7 farklı lokasyondan toplanan toprak örneklerine ilk olarak ön zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Bunun için 30 ml'lik steril önzenginleştirme ortamına %1 oranında soya yağı veya kullanılmış motor yağı ilavesi yapılarak her bir toprak örneği için 2 farklı ön zenginleştirme ortamı hazırlanmıştır. 3 gr toprak örneği tartılarak zenginleştirme ortamlarına ilave edilmiş ve 7 gün boyunca 30 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, steril fizyolojik tuzlu su kullanılarak ön zenginleştirilmesi yapılan örneklerin bir seri dilüsyonu (10^{-1} - 10^{-7}) hazırlanmıştır. Daha sonra, dökme plaka yöntemi ile her önzenginleştirme ortamının belli aralıktaki seyreltmelerinden (10^{-5} - 10^{-7}) alınan 1 mL'lik örnekler petrilere transfer edilmiş ve ardından aynı petrilere ~20 mL Nutrient agar ilavesi yapılmıştır. Petriler, 37°C' de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, petride üreyen kolonilerin saf kültürleri elde edilecek şekilde ardışık olarak en az 2 defa Nutrient agara pasajları yapılmış ve elde edilen saf kültürlerin %20'lik gliserol içeren LB besiyerinde stokları hazırlanmıştır.

3.2.2. Bakterilerin biyosüpfaktan üretimi açısından taranması

Bakteri izolatlarının biyosüpfaktan üretme kapasitesinde olup olmadığını belirlemek için öncelikle bu biyopolimerlerin sentezleneceği batık fermentasyon (SmF) besiyerinin içeriği belirlenmiştir. İlk olarak saf bakteri izolatları 10 mL'lik SmF ortamına ekilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlanmış ve bu sayede fermentasyonun yapılacağı besiyerine uyumları sağlanmıştır. Daha sonra, her bir izolat için 24 saatlik kültür inokulum olarak kullanılmış ve 30 mL'lik hacimdeki SmF ortamına %1'lik aşılama yapılmıştır. 5 gün boyunca 30°C' de 150 rpm'de fermentasyona devam edilmiştir. Bu süre sonunda fermentasyon ortamı steril tüplere aktararak 4 °C, 4600 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, dipteki hücre pelletine dokulmadan yeni bir steril tüpe aktarılmıştır. Yaklaşık 30 mL'lik hücresiz fermentasyon ortamı 4 °C'de muhafaza edilmiş ve biyosüpfaktan üretimini belirlemek için tarama testlerinde kullanılmıştır. Biyosüpfaktan üretimini belirlemek için 5 farklı tarama testi uygulanmıştır;

3.2.2.1. Oil displacement (Yağ yerdeğıştirme) denemesi

Morikawa ve ark., (2000) tarafından geliştirilen yağ yer değıştirme denemesi hafifçe modifiye edilerek aşağıdaki gibi uygulanmıştır; 90 mm çaplı bir petri kabına 40 mL distile su aktarılmış ve ince bir film tabakası oluşturmak için 3 mL kullanılmış motor yağı su yüzeyinde mikropipet yardımıyla transfer edilmiştir. Daha sonra hücresiz fermentasyon sıvısının 500 uL'si bu yağ tabakasının ortasında mikropipetle aktararak meydana gelen açılmalar 2 dakika boyunca gözlemlenmiş ve bu süre sonunda oluşan zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak steril distile su (dH₂O) ve SmF besiyeri, pozitif kontrol olarak da %1'lik SDS kullanılmıştır.

3.2.2.2. Drop collapse denemesi

Youssef ve ark., (2004) ile Płaza ve ark. (2006) kullanılan drop collapse denemesi hafif modifiye edilerek kısaca şu şekilde uygulanmıştır; 96 kuyucuklu mikropalaklara öncelikle 20 µL kullanılmış motor yağı transfer edilmiş ve denge haline gelmesi için 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kullanılmış motor yağı ile kaplanmış mikropalaka kuyucuklarının merkezine, yağ filminin yüzeyine dokunmadan mikropipet yardımıyla 20 µL hücresiz fermentasyon sıvısı transfer edilmiştir. 1 dakika sonra fermentasyon sıvısının oluşturduğu damlacık boyutu ölçülmüştür. Biyosürfaktan üretiminin olduğu pozitif örneklerde yağ damlaları yayılırken, negatif kontrolde su ve yağ fazı ayrı ayrı bulunmuştur. Damlacık çapı, negatif kontrol olarak kullanılan distile su ve steril SmF besiyerinin oluşturduğu çaptan daha büyük ise sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak %1'lik SDS kullanılmıştır.

3.2.2.3. Parafilm M testi

Kültür süpernatantının 25 µL'si hidrofobik yüzey olarak parafilm M'in soyulmuş kısmına damlatılmıştır. 1 dakika sonra ölçülen damlacık çapına ait sonuçlar, negatif ve pozitif kontroller ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kimyasal sürfaktan olan SDS, negatif kontrol olarak ise distile su ve steril SmF ortamı kullanılmıştır. Ayrıca parafilm M yöntemi kolay ve hızlı bir yöntem olduğu için ön elemelerde kullanılmıştır (Satpute ve ark., 2010).

3.2.2.4. Hemoliz testi

Mulligan ve ark., (1984) tarafından geliştirilen bu yöntem, genellikle mikroorganizmaların biyosürfaktan üretim yeteneklerinin belirlenmesinde ön tarama testi olarak kullanılmış ve biyosürfaktanların kan hücrelerini lizis etme kabiliyetlerine dayandırılmıştır. Bu test kapsamında, %5 koyun kanı içeren agar petripleri yüzeyine saf bakteriyal kültürlerin hücre süspansiyonlarından mikropipet yardımıyla birkaç µL spot halinde transfer etmek suretiyle ekimler yapılmıştır.

Petriler, 3 gün boyunca 37 °C’de inkübe edilmiş ve kolonilerin etrafında oluşan lizis zonlarının varlığı biyosüpfaktan üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.5. Emülsifikasyon indeksi (E₂₄)’nin belirlenmesi

Biyosüpfaktan içeren hücresiz fermentasyon sıvılarının çeşitli hidrofobik bileşikler (n-hegzadekan, kerosen ve dizel yağ) emülsifiye etme yetenekleri, Iqbal et al. (1995) tarafından tarif edilen protokole göre Emülsifikasyon indeksi (E₂₄)’nin hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem kısaca şu şekilde özetlenebilmektedir; 2 ml hücresiz fermentasyon sıvısı, eşit hacimdeki (2 ml) hidrofobik substratı içeren temiz bir cam tüpe aktarılarak 2 dakika boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında sarsılmadan 24 saat dikey konumda bekletilen bu örnekler için E₂₄ değerleri aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır (Denklem 3.1).

(3.1)

$$E_{24} = \frac{\text{Emülsifiye olan fazın yüksekliği (mm)}}{\text{Sıvı kolonun toplam yüksekliği (mm)}} \times 100$$

Pozitif kontrol olarak 1% SDS, negatif kontrol olarak ise dH₂O ve steril SmF ortamı kullanılmıştır. Tüm testler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ekstraselüler lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Saf bakteriyal izolatların taze kültürleri, nutrient agar petrilere ekilerek hazırlanmıştır. Bu kültürler, steril fizyolojik tuzlu su içerisine transfer edilerek hücre süspansiyonları elde edilmiştir. %1 tribütrin içeren nutrient agar petrilere üzerine bu hücre süspansiyonlarından birkaç µL aktararak ekimler yapılmıştır. Petriler, Hücre dışı lipolitik aktivitenin belirlenmesi için 37°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, oluşan kolonilerin zon çapı ile ekstraselüler lipaz enziminin aktivitesiyle parçalanan tribütrinden kaynaklanan hidroliz zon çapı ölçülmüştür.

3.2.4. Biyosürfaktan üretimi pozitif olan izolatların moleküler tanılaması

3.2.4.1. Genomik DNA'nın izolasyonu

Tarama testlerinde en iyi sonuçları veren ve emülsifikasyon indeksleri de yüksek olan bakteriyal izolatlar belirlenmiştir. Bu bakterilerden genomik DNA'larının saflaştırılması için öncelikle steril LB besiyerine aşılama yapılmış ve daha sonra 37 °C'de 160 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bir gece inkübe edilmiştir. Yaklaşık 2×10^9 hücreye karşılık gelen hücre pelleti, ependof tüplerine aktarılan bir gecelik kültürün 12,000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj yapılmasıyla elde edilmiş ve -86 °C'de muhafaza edilmiştir. Gr (+) özellikteki bakteri izolatlarına ait hücre pelletlerinden gDNA izolasyonu için PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen) protokolü kısaca aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

- Hücre pelleti 200 µL lizozim digestion buffer (lisis tamponu) +lizozim karışımında süspansiyon haline getirilerek flash vortex ile iyice karıştırılmıştır ve 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 20 µL Proteinaz K eklenmiştir ve flash vorteksle iyice karıştırılmıştır. Gram (-) bakterilerden gDNA izolasyonu için bu basamaktan başlayacak şekilde saflaştırma protokolü uygulanmıştır.
- 200 µL Purelink Genomik Lysis/ Binding Buffer eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır.
- 55 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve 200 µL % 96-100' lük etanol lizata ilave edilmiştir. Homojen bir karışım elde etmek için 5 saniye vortekslenmiştir.
- Purelink spin kolonu bir toplama tüpü içene yerleştirilmiş ve bir önceki basamakta elde edilen etanol içerikli lizat karışımı (~640 µL) bu kolona transfer edilmiştir.
- Kolon 10.000 g (10,400 rpm)'de, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve yeniden temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- DNA saflaştırma kiti içerisinde bulunan ve etanol ilavesi yapılmış Wash Buffer 1'den 500 µL kolona transfer edilmiş ve oda sıcaklığında 10.000

g'de 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA'nın ilk yıkama işlemi tamamlanmıştır.

- Toplama tüpü atılarak spin kolon temiz bir toplama tüpüne alınmış ve yine kit içerisinde bulunan etanol ilavesi yapılmış Wash Buffer 2'den 500 µL kolona transfer edilerek oda sıcaklığında 13,000 rpm 3 dakika santrifüj edilmek suretiyle ikinci yıkama işlemi de tamamlanmış ve safsızlıklar uzaklaştırılmıştır.
- Spin kolon 1,5 mL steril ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve kolon üzerine yaklaşık 75 µL Purelink Genomic Elution Buffer transfer edilerek kolondaki genomik DNA'nın elüsyon tamponuna geçmesi için oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası 13,000 rpm de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA'lar kolondan ayrıştırılmıştır. Ürünlerin varlığını teyid etmek için %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve genomik DNA'ların jel görüntüleri alınmıştır.

3.2.4.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Biyosüpfaktan üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilen bakteriyal izolatların moleküler karakterizasyonu için öncelikle prokaryotik canlılarda tanılayıcı olan 16S'lik rDNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon sırasında universal primerler olarak bilinen 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3') (Lane ve ark., 1991) primer çifti kullanılmıştır. PCR karışımının bileşenleri aşağıdaki gibidir;

<u>PCR KARIŞIMI</u>	<u>100 µL</u>
10X Trustart Hot Start Buffer	10 µL
dNTP Mix (10 mM)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM; 2 mM final konsantrasyon)	8 µL
27F (2 pmol/ µL)	10 µL
1492R (2 pmol/ µL)	10 µL

Taq Polimeraz	0,8 µL
Genomik DNA (kalıp) (Her örnek için 3 µL)	12 µL
Ultra saf su	42,8 µL

Her bir örnek için 25 µL'lik toplam hacim olacak şekilde PCR gerçekleştirilmiş ve ultra saf su kullanılarak toplam hacim 100 µL'ye tamamlanmıştır. TrueStart Hot Start Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilen amplifikasyon işlemi için optimize edilmiş PCR koşulları şöyledir;

95°C	2 min (Hot start)	} 35 döngü
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	90 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve beklenen uzunluktaki (~1500 bp) PCR ürünlerinin meydana geldiği gözlemlenmiştir.

3.2.4.3. PCR ürünlerinin elektroforezle görüntülenmesi

PCR ürünlerinin ve bakterilerden saflaştırılan genomik DNA'ların görüntülenmesi için %1 agaroz (w/v) içeren 1X TAE tampon çözeltisi hazırlanmış ve mikrodalga yardımıyla agarozun erimesi sağlanmıştır. Agaroz jel tablaya dökülmeden hemen önce, 100 mL'de 4 µL olacak şekilde SafeView Classic (Abm) nükleik asit boyası ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Agaroz jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel tablasına dökülmüştür.

Katılaştıran agaroz jel, Biorad marka elektroforez tankına yerleştirilerek 1 X TAE tampon çözeltisi ile jel yüzeyine kadar elektroforez tankı doldurulmuştur. Her

bir jel kuyucuğuna 2,5 µL PCR ürünü (genomik DNA için de 2,5 µL örnek hacmi) ile 3 µL 6X yükleme tamponu karıştırılarak yüklenmiştir. Ayrıca, örnek boyutlarının belirlenmesi amacıyla DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) da yüklenmiştir. Örneklerin jele yüklenmesi tamamlandıktan sonra 90 voltta 40 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme cihazı (Major Science) ile agaroz jel görüntülenmiş ve bu sayede hem genomik DNA'ların hem de PCR ürünlerinin varlığı teyid edilmiştir.

3.2.4.4. 16S rDNA bölgesinin sekans analizi

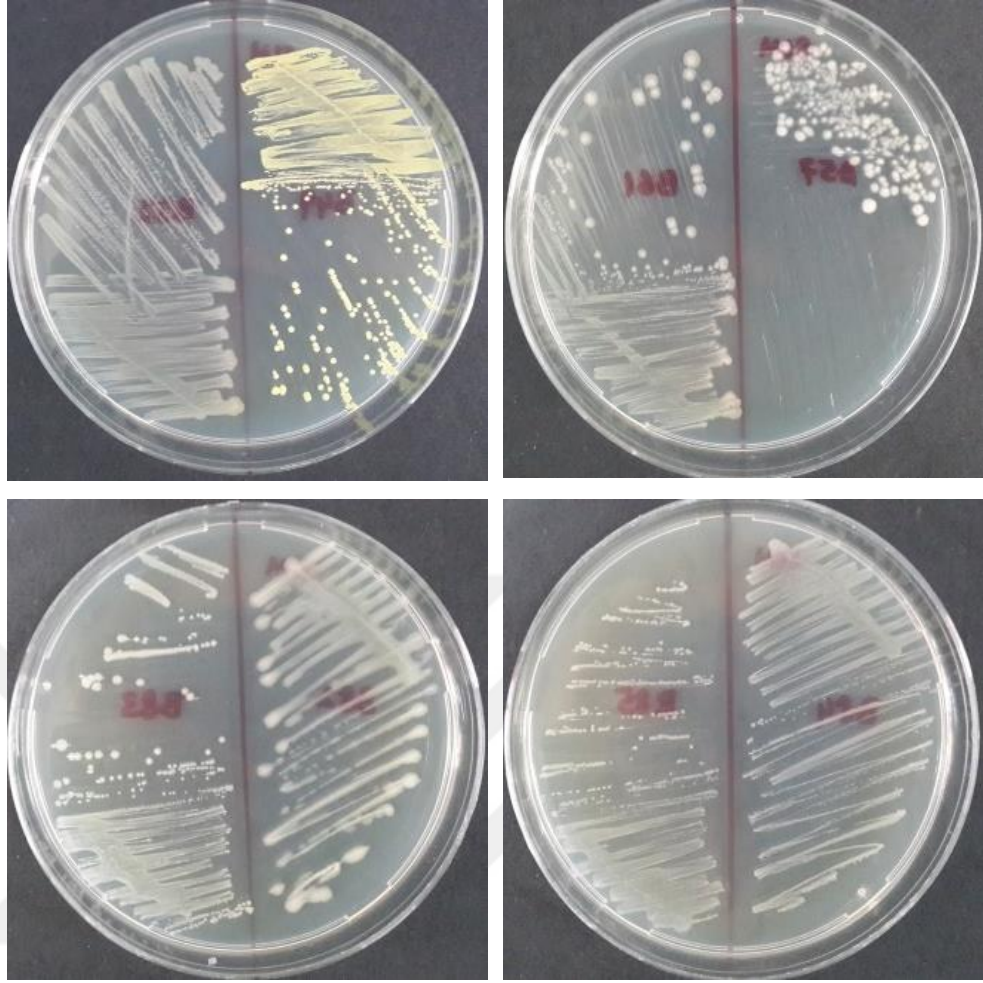
PCR ile çoğaltılan bakteriyal izolatlara ait 16S rDNA bölgelerinin sekans analizleri MedSanTek laboratuvarlarında tamamlanmıştır. Dizi analizi, Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir bakteriyal izolatın 16S rDNA bölgesi için elde edilen çift yönlü sekans sonuçlarının montajı ve doğruluğu, DNA Baser Sequence Assembler V4 (Heracle BioSoft, Romania) programı kullanılarak onaylanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bakteriyal İzolatların Elde Edilmesi

Çevresel kirliliğin olmadığı alanlardan da izole edilmelerine karşın, özellikle hidrokarbonlarla kontamine olmuş bölgeler biyosüpfaktan üreten mikroorganizmaların izolasyonu için en çok ümit vaad eden çevresel örneklerden olmuştur (Sharma ve ark., 2015; Chandankere ve ark., 2013; Chen ve ark., 2012; Walter ve ark., 2010; Bodour ve ark., 2003). Yüzey aktif moleküllerin oluşumu sayesinde doğada bulunan ve çevresel kirliliğe de neden olan sözkonusu hidrokarbonlar mikrobiyal hücrelerin içine kolaylıkla alınmaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkılarak, daha önce çalışılmamış ve petrol türevleriyle (motor yağı, kullanılmış motor yağı, dizel yağı) kontamine olan toprak örnekleri biyosüpfaktan üreten bakterilerin izolasyonu ve moleküler identifikasyonunu gerçekleştirmek amacıyla Şanlıurfa'daki çeşitli otomobil tamir atölyelerinden toplanarak 7 gün boyunca önzenginleştirmeye bırakılmıştır. Her bir toprak örneği için %1 soya yağı ve %1 kullanılmış motor yağı ilavesiyle hazırlanan 2 farklı önzenginleştirme ortamı hazırlanmıştır. Dökme plaka yöntemi sonrası Nutrient Agar üzerinde büyüyen farklı morfoloji ve tekstüre sahip toplamda 107 bakteri izolatu elde edilmiştir. Nutrient Agar petrilere en az üç kez çizgi ekimlerini yapmak suretiyle saflaştırılan bu izolatların oluşturduğu kolonilerin büyük bir kısmında mukoid tekstür öne çıkmıştır. Pigment üretiminin nadiren görüldüğü bu izolatların bazılarına ait genel koloni görünüşü Şekil 4.1.' de görülmektedir.



Şekil 4.1. Saf kültürleri yapılan bakteriyal izolatlardan bazılarının (üstte soldan sağa: SLM B53, SLM B49, SLM B61, SLM B57, altta soldan sağa: SLM B83, SLM B82, SLM B85, SLM B84) Nutrient Agar petrisindeki genel görünüşleri

Bakteriyal izolatların elde edildiği toprak örnekleri ve ön zenginleştirmede kullanılan supplementler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Muhtemel biyosüpfaktan üreticisi bakteri izolatlarının elde edildiği örnekler ve ön zenginleştirmede kullanılan ilave karbon kaynakları

İzolat No	Örnek No	Supplement (%1)
SLM B1-SLM B10	1	Soya yağı
SLM B11-SLM B19	1	Kullanılmış motor yağı
SLM B20-SLM B24	2	Soya yağı
SLM B25-SLM B30	2	Kullanılmış motor yağı
SLM B31-SLM B39	3	Soya yağı
SLM B40-SLM B48	3	Kullanılmış motor yağı
SLM B49-SLM B56	4	Soya yağı
SLM B57-SLM B63	4	Kullanılmış motor yağı
SLM B64-SLM B79	5	Soya yağı
SLM B80-SLM B87	5	Kullanılmış motor yağı
SLM B88-SLM B93	6	Soya yağı
SLM B94-SLM B98	6	Kullanılmış motor yağı
SLM B99-SLM B103	7	Soya yağı
SLM B104-SLM B107	7	Kullanılmış motor yağı

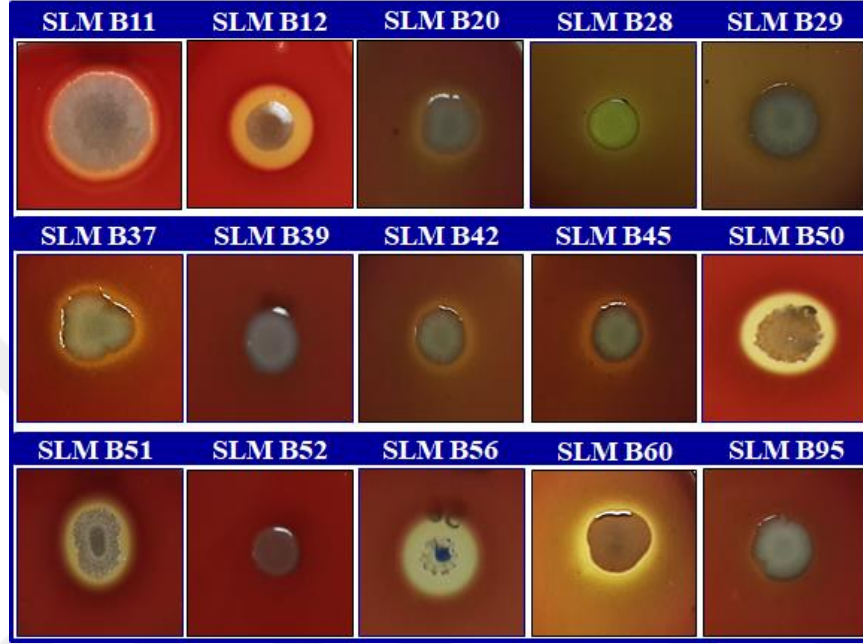
4.2. Bakteriyal İzolatların Biyosüpfaktan Üretimi Açısından Taranması

İzole edilen bakteriler farklı tarama testlerine (Hemoliz testi, Yağ yer değiştirme denemesi, Parafilm M testi, Drop collapse testi gibi) tabi tutularak biyosüpfaktan üretimi açısından çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Bu testlerde en iyi sonuçları veren bakteriyal izolatların ürettiği biyosüpfaktanların emülsifikasyon indeksi (E_{24}) de hesaplanarak söz konusu biyosüpfaktanların emülsiyon oluşturma yetenekleri belirlenmiştir.

4.2.1. Hemoliz testi

Özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmadan ve özellikle çok sayıda mikroorganizmanın izole edildiği durumlarda yaygın olarak kullanılan yukarıdaki tarama testlerinden ilk olarak hemoliz testi gerçekleştirilmiştir. Bakteriyal izolatların hücre süspansiyonlarının %5 koyun kanı içeren agar petrilere ekimleri ile yapılan bu ön test ilk olarak Mulligan ve ark. (1984) tarafından biyosüpfaktanların

eritrositleri parçalama yeteneği temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Biyosürfaktan üretimi açısından pozitif olan izolatlar 37 °C de 3 günlük inkübasyon sırasında kandaki eritrositleri parçalayarak koloni etrafında şeffaf bir zon oluşturmaktadır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Hemoliz testi pozitif olan bazı bakteriyal izolatların %5 kan agar petrisindeki görünümü

107 bakteri izolattan 9 tanesi (% 8,4; β - hemolitik) hemoliz testine pozitif yanıt vermiştir. Buna karşın 53 izolat için kan hücrelerinin kısmi hidrolizi gözlenirken (%49,5; α -hemolitik), diğer 45 izolat için (%42,1; γ -hemolitik) hemoliz gözlenmemiştir. İzolatların hemoliz test sonuçları Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Ancak, hemoliz testinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, litik enzimler de kan hücrelerinin parçalanmasına yol açarak şeffaf zon oluşturabilmektedir ki bu durum yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mikroorganizma tarafından üretilen biyosürfaktanın kan agardaki difüzyon kısıtlaması ise zon oluşumunu engelleyebileceği için yanlış negatif sonuçlara sebep olabilmektedir. Ayrıca, araştırmacılar bazı biyosürfaktanların hemolitik aktiviteye sahip olmadığını göstererek bu yöntemin spesifikliğinin düşük olduğunu ifade etmişlerdir (Płaza ve ark., 2006; Youssef ve ark., 2004; Schulz ve ark., 1991).

Çizelge 4.2. Bakteriyal izolatların kan agardaki hemoliz testi sonuçları

İzolat no	Hemoliz	İzolat no	Hemoliz
SLM B1	-	SLM B55	-
SLM B2	-	SLM B56	+ (β)
SLM B3	-	SLM B57	-
SLM B4	-	SLM B58	-
SLM B5	-	SLM B59	-
SLM B6	-	SLM B60	+ (β)
SLM B7	-	SLM B61	-
SLM B8	-	SLM B62	-
SLM B9	-	SLM B63	-
SLM B10	-	SLM B64	-
SLM B11	+ (β)	SLM B65	-
SLM B12	+ (β)	SLM B66	-
SLM B13	-	SLM B67	-
SLM B14	-	SLM B68	-
SLM B15	-	SLM B69	-
SLM B16	-	SLM B70	-
SLM B17	-	SLM B71	-
SLM B18	+	SLM B72	-
SLM B19	+	SLM B73	-
SLM B20	+	SLM B74	-
SLM B21	+	SLM B75	-
SLM B22	+	SLM B76	-
SLM B23	+	SLM B77	-
SLM B24	-	SLM B78	-
SLM B25	+	SLM B79	-
SLM B26	+	SLM B80	-
SLM B27	+	SLM B81	-
SLM B28	+ (β)	SLM B82	-
SLM B29	+	SLM B83	-
SLM B30	+	SLM B84	-
SLM B31	+	SLM B85	-
SLM B32	+	SLM B86	-
SLM B33	+	SLM B87	-
SLM B34	+	SLM B88	-
SLM B35	+	SLM B89	-
SLM B36	+	SLM B90	-
SLM B37	+ (β)	SLM B91	-
SLM B38	-	SLM B92	-
SLM B39	-	SLM B93	-
SLM B40	-	SLM B94	-
SLM B41	-	SLM B95	-
SLM B42	-	SLM B96	-
SLM B43	-	SLM B97	-
SLM B44	-	SLM B98	-
SLM B45	-	SLM B99	-
SLM B46	-	SLM B100	-
SLM B47	-	SLM B101	-
SLM B48	-	SLM B102	-
SLM B49	+ (β)	SLM B103	-
SLM B50	+ (β)	SLM B104	-
SLM B51	+ (β)	SLM B105	-
SLM B52	-	SLM B106	-
SLM B53	-	SLM B107	-
SLM B54	-		

Yüzey aktif moleküller olarak biyosüpfaktanlar, heterojenik bir doğaya sahip sekonder metabolitlerdendir. Drop collapse testi, yağ yer değıştirme denemesi ve hemolitik aktivitenin belirlenmesi gibi tarama testleri lipopeptit ve polimerik yapıdaki biyosüpfaktanların tespitinde etkin bir şekilde kullanıyor olmasına karşın, yapısal çeşitlilik gösteren diğer biyosüpfaktanların belirlenmesi için ilave tarama testlerinin de kullanılması önerilmektedir (Donio ve ark., 2013; Satpute ve ark., 2008). Bu nedenle diğer tarama yöntemleriyle biyosüpfaktan üretiminin desteklenmesi gerekmektedir.

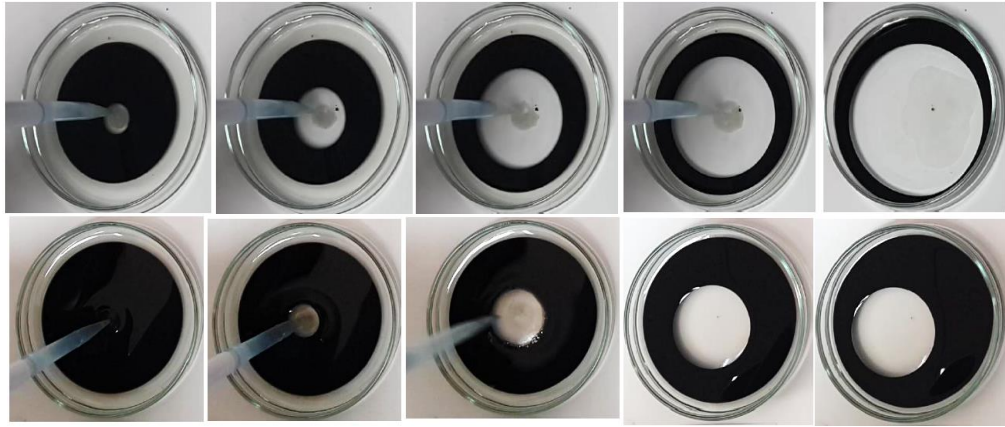
Mevcut tez çalışmasında tarama testi olarak kullanılan diğer testler yağ yer değıştirme denemesi, parafilm M testi, drop collapse testi ve emülsifikasyon indeksi (E_{24})'nin belirlenmesidir. Tüm bu denemelerde, bakterilerin hücre süpsansiyonları yerine SmF ile ürettikleri ham biyosüpfaktanlar kullanılmıştır. O nedenle her bakteri izolatu, mineral tuz ortamına karbon kaynağı olarak D-glukoz, azot kaynağı olarak et ekstraktı ve biyosüpfaktan üretiminin teşvik edilmesi için de %1 (v/v) oranında soya yağının ilave edildiğı SmF besiyerine ekilerek 5 gün boyunca 37 °C' de çalkalamalı su banyosunda fermentasyona bırakılmıştır (Şekil 4.3.). Santrifüjle elde edilen hücresiz fermentasyon sıvısı, daha sonraki tarama testlerinde ham biyosüpfaktan solüsyonu olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3. SLM 28, SLM 29, SLM 31, SLM 37, SLM 81, SLM 82, SLM 83, SLM 84 (sırasıyla soldan sağa) numaralı bakteriyal izolatlarla ait ve biyosüpfaktan tarama testlerinde kullanılan fermentasyon sıvıları

4.2.2. Oil displacement (Yağ yer değıştirme) testi

Yağ yer değıştirme denemesi, test edilen yağ örneğine karşı sürfaktan/biyosürfaktan örneğinin sahip olduğı yüzey aktivitesinin indirekt bir ölçümüdür. Test solüsyonunun yüzey aktivitesi arttıkça daha büyük bir yer değıştirme alanı oluşmaktadır (Afshar ve ark., 2008; Rodrigues ve ark., 2006). Bu alanın hesaplanması yada oluşan açılma zonuna ait çapın mm cinsinden ölçümüyle, farklı biyosürfaktanların etkinliğı hücresiz fermentasyon sıvılarının kullanımıyla sayısal olarak karşılaştırılabilmekte ve etkin yüzey aktivitesine sahip biyosürfaktanlar belirlenebilmektedir. Bu denemede, kullanılmış motor yağı ile oluşturulan ince film tabakası üzerine hücresiz biyosürfaktan üretim ortamları transfer edilmiş ve 2 dakika içerisinde meydana gelen yağ yerdeğışme bölgesinin çapı ölçülmüştür (Şekil 4.4.). Oluşan dairenin alanı (yağ yer değıştirme alanı, Oil displacement area:ODA) hesaplanmış ve 107 bakteriyal izolat için bu değerlerin 0.20-33.18 cm² aralığında olduğı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). En belirgin yağ yerdeğıştirme alanı 33.18 cm² ile SLM B52 nolu izolat için gözlenirken, 10 cm²'nin üzerinde etkin yüzey aktivitesine sahip yüzey aktif biyomolekülleri üreten diğeri izolatlar SLM B9, SLM B39, SLM B80, SLM 84, SLM 85, SLM B86 ve SLM B87 olarak belirlenmiştir.



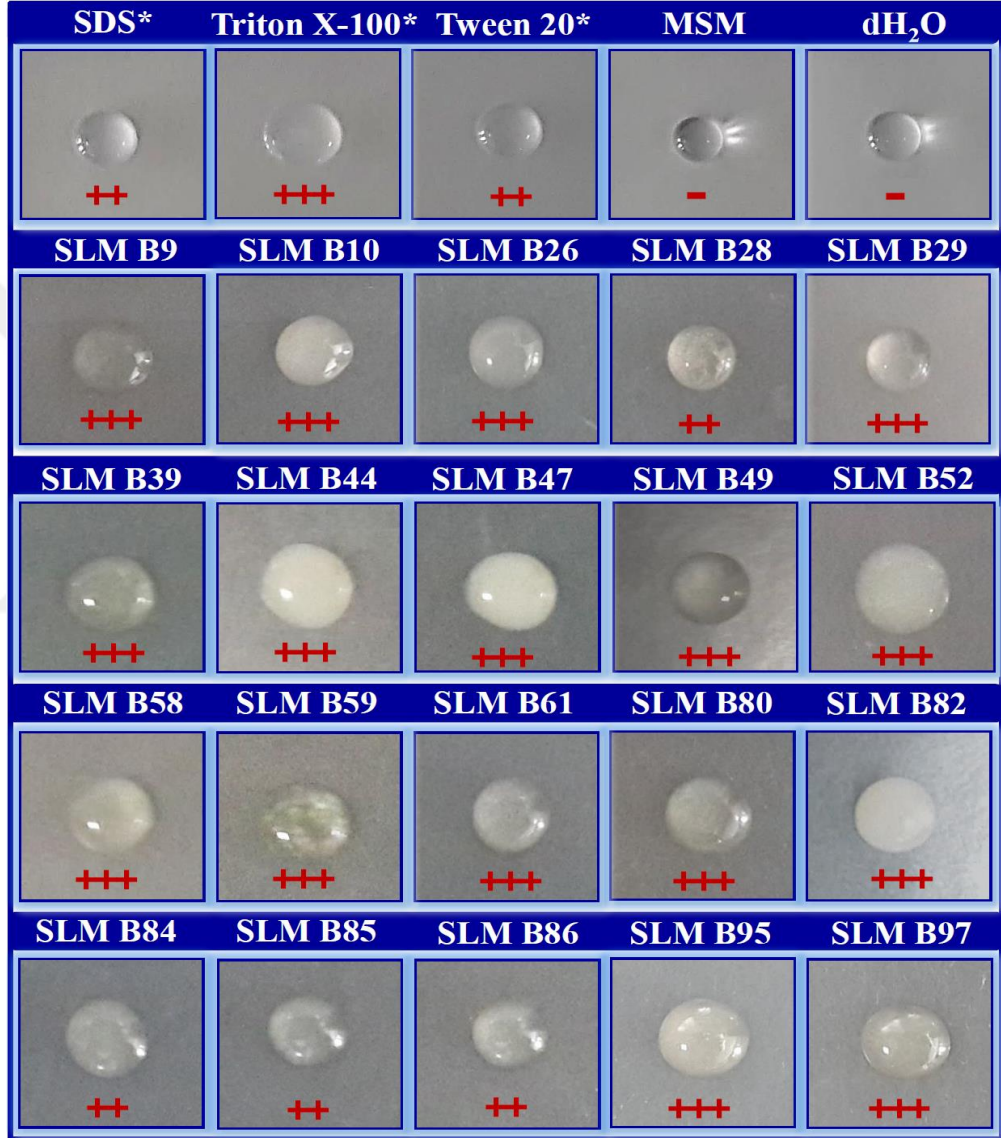
Şekil 4.4. Yağ filmi üzerine biyosürfaktan içeren hücresiz kültür ortamı transferiyle meydana gelen yağ yer değışme alanı (ODA)



Şekil 4.5. Bazı izolatların fermentasyon sıvılarıyla elde edilen yağ yer değıştirme denemesine ait görseller

4.2.3. Parafilm M testi

Bu testte 25 µL hacmindeki fermentasyon sıvısı, hidroforik bir yüzeye sahip olan parafilm M üzerine dikkatli bir şekilde transfer edilmiş ve oluşan damlacığın çapı mm cinsinden ölçülmüştür (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Bazı izolatların hücreless kültür ortamlarıyla elde edilen parafilm M test sonuçları

Hidroforik yüzey üzerine transfer edilen damlacık çapları için ölçülen değerler skorlama yapılarak ($4\text{mm} < R$: - , $4\text{mm} \leq R \leq 4.9\text{ mm}$: + , $5\text{mm} \leq R \leq 5.9\text{ mm}$: ++, $6\text{mm} \leq R \leq 6.9\text{ mm}$:+++) Çizelge 4.3.'te verilmiştir. İzolatların kültür ortamlarının

tamamı için damlacık çapı en az 5 mm uzunlukta ölçülmüş olup biyosüpfaktanların varlığına işaret etmiştir. En yüksek damlacık çapı 6.5 mm ile SLM B52 nolu izolat için belirlenmiştir. Bu sonuç, yüzey aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan yağ yer değiştirme denemesinde SLM B52 nolu izolat için gözlenen yüksek yağ değiştirme sonuçlarıyla oldukça uyumluluk göstermiştir.

Çizelge 4.3. Bakteriyal izolatlara ilişkin yağ yer değiştirme denemesi ve parafilm M testi sonuçları

İzolat no	Yağ yer değiştirme denemesi		Parafilm M testi
	Yağ yer değiştirme çapı (R, mm)	Yağ yer değiştirme alanı (cm ²)	Damlacık çapı (R, mm)
SLM B1	12	1.13	++
SLM B2	15	1.76	++
SLM B3	16	2.01	++
SLM B4	25	4.90	++
SLM B5	9	0.64	++
SLM B6	16	2.01	++
SLM B7	15	1.77	++
SLM B8	15	1.77	++
SLM B9	43	14.52	+++
SLM B10	15	1.77	+++
SLM B11	14	1.54	++
SLM B12	12	1.13	++
SLM B13	15	1.77	++
SLM B14	17	2.27	++
SLM B15	28	6.16	++
SLM B16	22	3.80	++
SLM B17	13	1.33	++
SLM B18	10	0.78	++
SLM B19	7	0.38	++
SLM B20	20	3.14	++
SLM B21	18	2.54	++
SLM B22	6	0.28	++
SLM B23	20	3.14	++
SLM B24	6	0.28	++
SLM B25	8	0.50	++
SLM B26	19	2.83	+++
SLM B27	15	1.77	++
SLM B28	9	0.63	++
SLM B29	28	6.16	+++
SLM B30	20	3.14	++
SLM B31	32	8.04	++
SLM B32	26	5.31	++
SLM B33	22	3.80	++
SLM B34	23	4.15	++
SLM B35	25	4.91	+++
SLM B36	23	4.15	+++
SLM B37	18	2.54	++
SLM B38	14	1.54	+++
SLM B39	45	15.90	+++
SLM B40	26	5.31	+++

Çizelge 4.3. (devam)

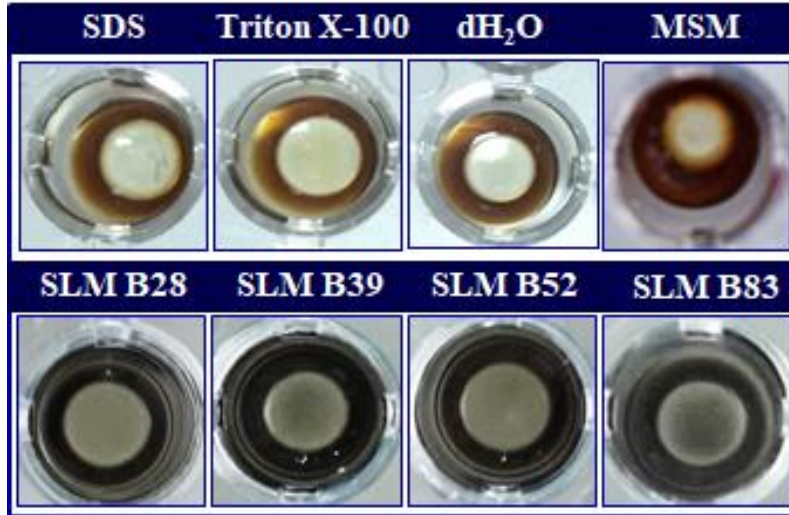
SLM B41	20	3.14	+++
SLM B42	22	3.80	+++
SLM B43	18	2.54	++
SLM B44	24	4.52	+++
SLM B45	26	5.31	++
SLM B46	20	3.14	+++
SLM B47	26	5.31	+++
SLM B48	28	6.16	++
SLM B49	15	1.77	+++
SLM B50	18	2.54	++
SLM B51	17	2.27	++
SLM B52	65	33.18	+++
SLM B53	15	1.77	++
SLM B54	16	2.01	++
SLM B55	7	0.38	++
SLM B56	5	0.20	++
SLM B57	7	0.38	++
SLM B58	22	3.80	+++
SLM B59	20	3.14	+++
SLM B60	21	3.46	++
SLM B61	35	9.62	+++
SLM B62	7	0.38	++
SLM B63	20	3.14	++
SLM B64	8	0.50	++
SLM B65	8	0.50	++
SLM B66	24	4.52	++
SLM B67	30	7.07	++
SLM B68	14	1.54	++
SLM B69	7	0.38	++
SLM B70	7	0.38	++
SLM B71	7	0.38	++
SLM B72	5	0.20	++
SLM B73	5	0.20	++
SLM B74	14	1.54	++
SLM B75	25	4.91	++
SLM B76	27	5.73	++
SLM B77	22	3.80	++
SLM B78	32	8.04	++
SLM B79	22	3.80	++
SLM B80	37	10.75	+++
SLM B81	25	4.91	++
SLM B82	25	4.91	++
SLM B83	31	7.55	++
SLM B84	45	15.90	++
SLM B85	44	15.21	++
SLM B86	50	19.64	++
SLM B87	56	24.63	++
SLM B88	35	9.62	++
SLM B89	14	1.54	++
SLM B90	7	0.38	++
SLM B91	7	0.38	++
SLM B92	34	9.08	++
SLM B93	30	7.07	++
SLM B94	25	4.91	++
SLM B95	35	9.62	++
SLM B96	31	7.55	++

Çizelge 4.3. (devam)

SLM B97	26	5.31	++
SLM B98	10	0.78	++
SLM B99	10	0.78	++
SLM B100	15	1.77	++
SLM B101	15	1.77	++
SLM B102	17	2.27	++
SLM B103	7	0.38	++
SLM B104	7	0.38	++
SLM B105	5	0.20	++
SLM B106	10	0.78	++
SLM B107	5	0.20	++
SDS	70	38.48	++
TritonX-100	65	33.18	+++
MSM	4	0.12	-

4.2.4. Drop collapse testi

Kültür sıvısındaki biyosüpfaktan varlığını belirlenmesinde duyarlı ve küçük hacimlerle uygulanabilen kolay bir teknik olması sebebiyle Jain ve ark., (1991) tarafından önerilmiştir. 20 µL hüresiz kültür sıvısı mikrolaka kuyucuklarında denge haline getirilen kullanılmış motor yağı üzerine transfer edilerek oluşan damlacık çap ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak steril dH₂O ve ekim yapılmamış SmF ortamı kullanılırken, pozitif kontrol olarak SDS ve Triton-X 100 gibi sentetik süpfakların %1'lik solüsyonu kullanılmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Bazı hüresiz kültür ortamları ile pozitif ve negatif kontroller için elde edilen drop collapse test sonuçları

Sonuçlar, yağ yüzeyinde kısmen yayılma ile tamamen yayılmayı temsil edecek şekilde skorlama yapılarak (+, ++, +++) verilmiştir. Negatif kontrol örneklerinde olduğu gibi yayılma göstermeden yuvarlak damlalar oluşturan hücresiz kültür ortamları, “-” olarak değerlendirilmiş olup biyosüpfaktan üretiminin gerçekleşmediğini anlamına gelmektedir. Buna göre 107 bakteriyal izolatın hücresiz kültür ortamıyla yapılan drop collapse testi sonucunda, izolatlardan sadece 5 tanesi negatif (%4,7), 102 izolat (%95,3) için de değişen skorlarda pozitif sonuç gözlenmiştir (Çizelge 4.4.). En yüksek skorlamanın gözlemlendiği izolatlar; “+++” ile SLM B28 ve SLM B52 olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.4. Bakteriyal izolatların kültür ortamlarına ait drop collapse test sonuçları

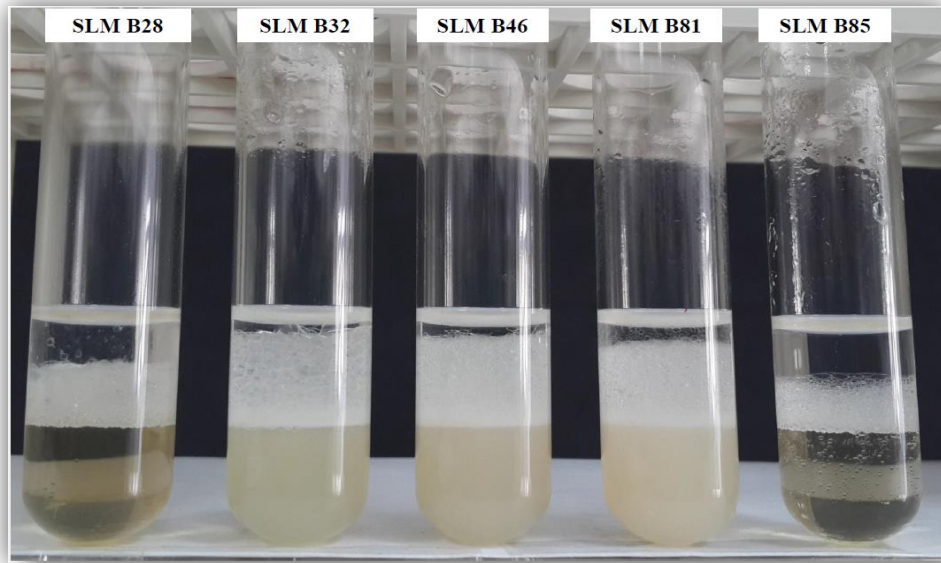
İzolat no	Damlacık çapı	İzolat no	Damlacık çapı	İzolat no	Damlacık çapı
SLM B1	+	SLM B38	++	SLM B75	++
SLM B2	++	SLM B39	++	SLM B76	++
SLM B3	++	SLM B40	++	SLM B77	++
SLM B4	++	SLM B41	++	SLM B78	++
SLM B5	++	SLM B42	++	SLM B79	+
SLM B6	++	SLM B43	++	SLM B80	-
SLM B7	++	SLM B44	++	SLM B81	++
SLM B8	++	SLM B45	++	SLM B82	+
SLM B9	++	SLM B46	++	SLM B83	++
SLM B10	++	SLM B47	++	SLM B84	++
SLM B11	++	SLM B48	+	SLM B85	+
SLM B12	++	SLM B49	++	SLM B86	++
SLM B13	++	SLM B50	++	SLM B87	+
SLM B14	++	SLM B51	++	SLM B88	+
SLM B15	++	SLM B52	+++	SLM B89	+
SLM B16	++	SLM B53	++	SLM B90	++
SLM B17	++	SLM B54	++	SLM B91	+
SLM B18	++	SLM B55	+	SLM B92	+
SLM B19	++	SLM B56	++	SLM B93	++
SLM B20	++	SLM B57	-	SLM B94	++
SLM B21	++	SLM B58	++	SLM B95	++
SLM B22	++	SLM B59	++	SLM B96	++
SLM B23	++	SLM B60	++	SLM B97	++
SLM B24	-	SLM B61	+	SLM B98	+
SLM B25	++	SLM B62	++	SLM B99	-
SLM B26	++	SLM B63	++	SLM B100	++
SLM B27	++	SLM B64	++	SLM B101	-
SLM B28	+++	SLM B65	++	SLM B102	+
SLM B29	++	SLM B66	+	SLM B103	+
SLM B30	++	SLM B67	++	SLM B104	+
SLM B31	++	SLM B68	++	SLM B105	+
SLM B32	++	SLM B69	++	SLM B106	+
SLM B33	++	SLM B70	++	SLM B107	+
SLM B34	++	SLM B71	++	dH20	-
SLM B35	++	SLM B72	+	MSM	-

Çizelge 4.4. (devam)

SLM B36	++	SLM B73	+	TritX-100	++
SLM B37	++	SLM B74	+	SDS	++

4.2.5. Emülsifikasyon indeksinin belirlenmesi

Mikroorganizmalar tarafından üretilen yüzey aktif bileşikler iki çeşit olup aktivite gösterdiği yere göre farklı isimlendirilmektedir. Hava-su arayüzeyinde yüzey gerilimini düşüren yüzey aktif biyomoleküller “biyosürfaktanlar” olarak adlandırılırken, birbiri ile karışmayan sıvılar ya da katı-sıvı arasındaki ara yüzey gerilimini düşüren biyomoleküller de “biyoemülsifiye ediciler” olarak adlandırılmaktadır. Biyosürfaktanlar çoğunlukla emülsifiye etme kapasitesinde olmasına rağmen, biyoemülsifiye edicilerin mutlaka yüzey gerilimini düşürmesi beklenmez (Karanth ve ark., 1999). Test edilen hidrokarbon substratlarıyla emülsiyon oluşturabilme yeteneklerini belirlemek için biyosürfaktanların emülsifikasyon aktivitesi araştırılmıştır. Eşit hacimde (2 ml) hidrokarbon ile karıştırılan hücresiz fermentasyon sıvısı, en yüksek hızda 2 dakika vortekslelendikten sonra 24 saat dik pozisyonda bekletilerek emülsifikasyon indeksi olarak da isimlendirilen emülsiyon yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Bazı bakteri izolatlarına ait fermentasyon sıvılarının n-hegzadekan ile oluşturdukları emülsiyonlar

Biyosüpfaktanların emülsiyon oluşturma yeteneğini belirlemede dizel yağ, kerosen ve n- hegzadekan olmak üzere üç farklı hidrofobik substrat kullanılmıştır. İlk olarak tüm bakteriyal izolatlardan elde edilen hücresiz fermentasyon sıvısı kullanılmış ve dizel yağa karşı emülsiyon aktivitesi test edilmiştir. Dizel yağ emülsifiye etme potansiyeli ve diğer tarama testlerinin (hemoliz, parafilm M, drop collapse ve yağ yer değıştirme testleri) sonuçları göz önüne alınarak emülsifikasyon aktivitesinin belirlenmesi için 26 izolat seçilmiştir. Dizel yağ kullanıldığında en yüksek E₂₄ değeri; SLM B35, SLM B36, SLM B44, SLM B46 ve SLM B9 numaralı bakteriyal izolatlar için %33.3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5.). Bu değeri, %1'lik SDS solüsyonu ile elde edilen emülsiyon oluşumunun (%63.3) yaklaşık %50'si kadardır. 26 izolattan 16 tanesi %27.6- 3.3 arasında değışen değeri emülsiyon indeksine sahip olmasına karşın, kalan 5 izolatın dizel yağa karşı emülsiyon aktivitesi göstermediği gözlenmiştir.

Kerosene karşı en yüksek emülsiyon oluşturan hücresiz fermentasyon sıvısı %41.7 ve %33.3 ile SLM B28 ve SLM B95 bakteriyal suşlardan elde edilmiştir. SLM B52 kodlu izolat emülsifikasyon aktivitesi göstermezken, bunun haricindeki diğer 23 izolatın tarafından üretilen biyosüpfaktanlara ait emülsifikasyon indeksinin %26.6-13.3 arasında değıştiği gözlenmiştir. n-hegzadekan'a karşı tespit edilen en yüksek emülsifikasyon indekslerinin ise %43.3 - %40- %36.6 değeriyle sırasıyla SLM B32-SLM B46- SLM B81 kodlu izolatlarla ait olduğu belirlenmiştir. 7 izolat n-hegzadekana karşı hiçbir emülsifikasyon aktivitesi göstermezken, kalan 16 izolatın E₂₄ değeri %30-3.3 arasında değışiklik gösterdiği bulunmuştur.

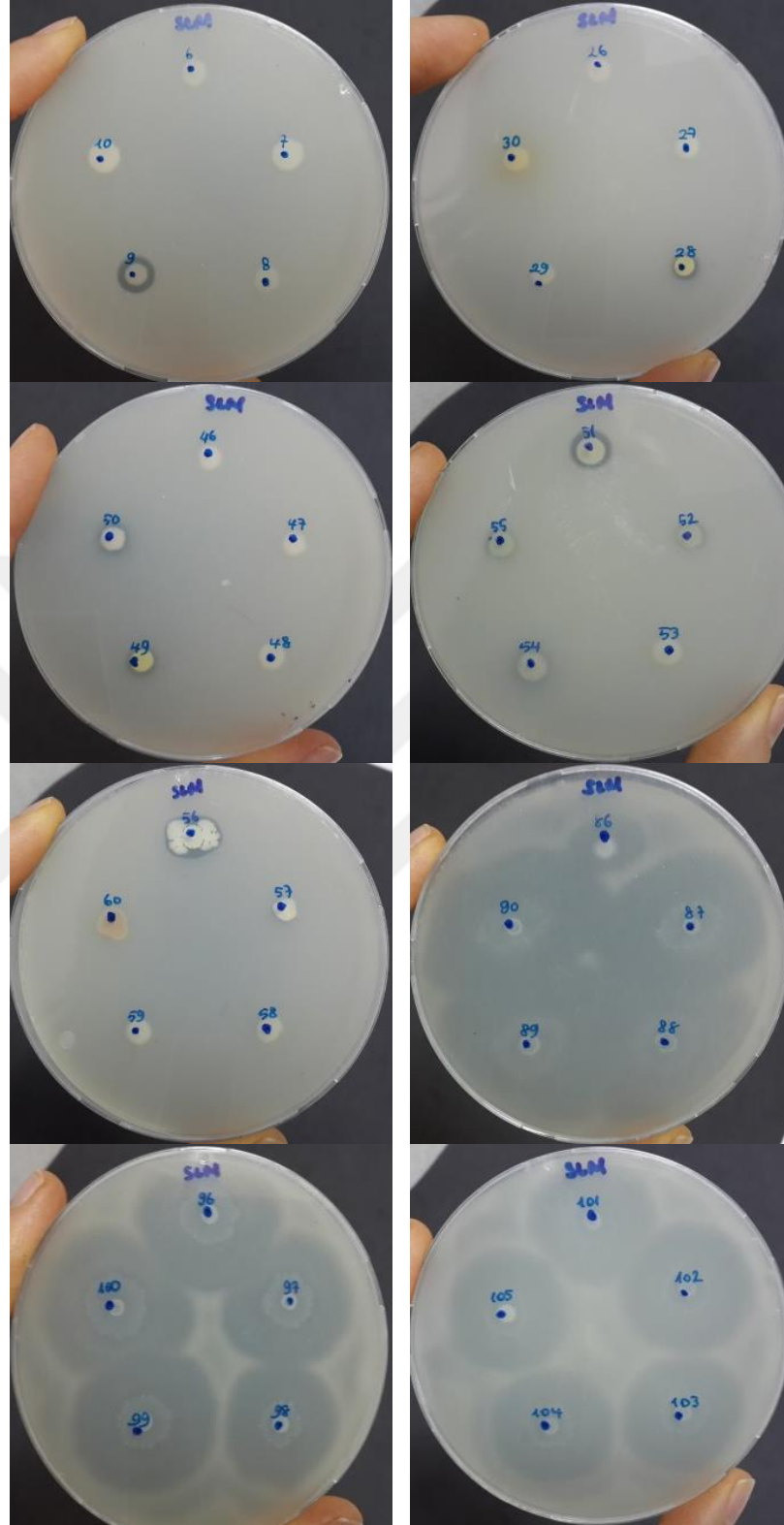
Bu denemede, test edilen üç farklı hidrofobik substratı emülsifiye etme kapasitesindeki en etkili izolatın SLM B28 olduğu tespit edilmiştir. SLM B52 kodlu bakteriyal izolatın test substratlardan hiçbirinde emülsifikasyon aktivitesi bulunmamasına rağmen, en yüksek yağ yer değışim alanı bu izolatla elde edilmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, SLM B52 izolatı tarafından üretilen süpfaktanın yüzey gerilimini düşürdüğü, fakat test edilen hidrokarbonlar için emülsifikasyon aktivitesi göstermediği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.5. Biyosüpfaktan içeren hücresiz fermentasyon sıvılarının farklı hırdokarbonlar üzerindeki emülsifikasyon indeksleri

İzolat no	<u>Emülsifikasyon indeksi (E₂₄)</u>		
	Kerosen	Dizel yağ	n-hegzadekan
SLM B28	41.7	26.6	30
SLM B29	26.6	26.6	10
SLM B32	16.6	13.3	43.3
SLM B35	13.3	33.3	10
SLM B36	16.6	33.3	10
SLM B39	20	3.3	0
SLM B40	16.6	16.6	10
SLM B44	13.3	33.3	6.6
SLM B45	16.6	26.6	3.3
SLM B46	13.3	33.3	40
SLM B47	20	16.6	13.3
SLM B52	0	0	0
SLM B56	16.6	0	0
SLM B58	23.3	10	20
SLM B59	20	33.3	0
SLM B60	16.6	3.3	23.3
SLM B69	20	16.6	6.6
SLM B70	16.6	0	0
SLM B81	16.6	20	36.6
SLM B82	16.6	26.6	0
SLM B84	26.6	27.6	6.6
SLM B85	26.6	10	23.3
SLM B86	26.6	20	0
SLM B94	16.6	0	6,6
SLM B95	33.3	13.3	3.3
SLM B97	20	0	6.6
SDS*	63.3	63,3	66,6
dH ₂ O	0	0	0
MSM	0	0	0

4.3. Bakteriyal izolatların ekstraselüler lipaz aktivitelerinin belirlenmesi

Daha önce yapılan çalışmalar, biyosüpfaktan üretimini gerçekleştiren mikrobiyal türlerin lipaz enzimi üretimi açısından da çoğunlukla pozitif olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, %1 oranında tributrin içeren Nutrient agar besiyerinde ekstrasellüler lipaz aktivitesi taraması da gerçekleştirilmiştir. Bakteri izolatlarına ait saf kültürlerin 24 saatlik taze kültürlerinin %0.85'lik steril tuzlu su içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonları tribütrin petrilere nokta ekimleri yapılarak 37 °C de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.9.). Sonuçlar, koloni çapı/hidroliz zon çapı olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.6.). 107 izolattan 38 tanesinde (% 35.5) lipolitik aktivite belirlenmiş olup tributrin petrisinde en yüksek açılma zonunun 38 mm ile SLM B88 nolu izolata ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, gerçekleştirilen tarama testleri göz önüne alındığında, biyosüpfaktan ürettiği belirlenen izolatların çoğunda ekstraselüler lipaz aktivitesi de tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Ekstraselüler lipaz enzim üretimi pozitif olan bazı bakteriyal izolatların petrideki görünümü

Çizelge 4.6. Bakteriyal izolatlarla ilişkin hemoliz testi ve ekstraselüler lipaz enzim üretimi sonuçları

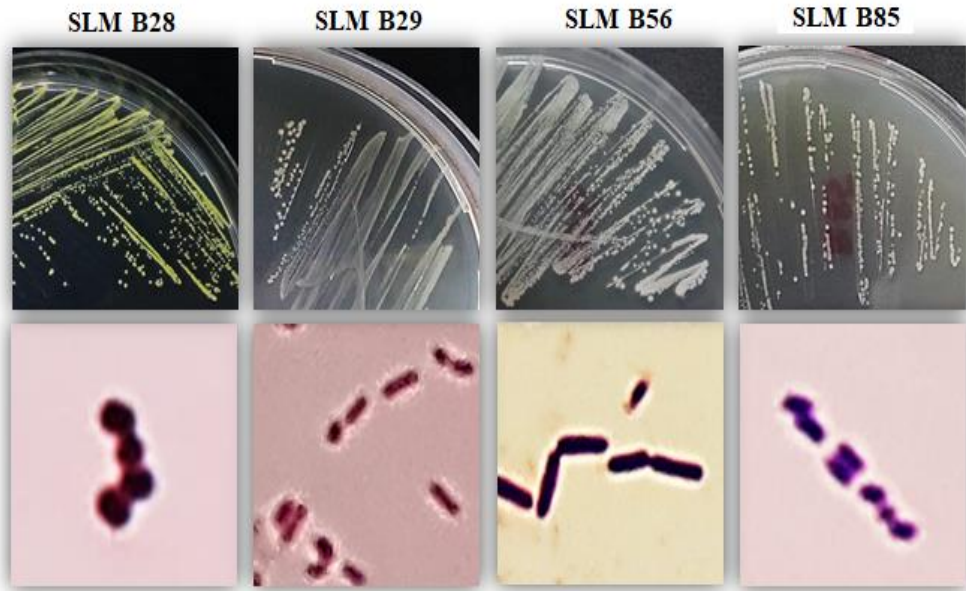
İzolat no	Lipaz (KÇ/HZÇ) (mm)	İzolat no	Lipaz (KÇ/HZÇ) (mm)
SLM B1	-	SLM B55	8/9
SLM B2	-	SLM B56	11/15
SLM B3	-	SLM B57	6/7
SLM B4	-	SLM B58	-
SLM B5	-	SLM B59	-
SLM B6	-	SLM B60	9/10
SLM B7	-	SLM B61	-
SLM B8	-	SLM B62	-
SLM B9	6/12	SLM B63	-
SLM B10	-	SLM B64	-
SLM B11	-	SLM B65	-
SLM B12	-	SLM B66	-
SLM B13	-	SLM B67	12/37
SLM B14	-	SLM B68	-
SLM B15	-	SLM B69	4/19
SLM B16	-	SLM B70	7/25
SLM B17	-	SLM B71	-
SLM B18	-	SLM B72	-
SLM B19	-	SLM B73	-
SLM B20	-	SLM B74	-
SLM B21	-	SLM B75	-
SLM B22	-	SLM B76	-
SLM B23	-	SLM B77	-
SLM B24	-	SLM B78	-
SLM B25	-	SLM B79	-
SLM B26	-	SLM B80	-
SLM B27	-	SLM B81	-
SLM B28	6/8	SLM B82	-
SLM B29	-	SLM B83	-
SLM B30	-	SLM B84	8/23
SLM B31	-	SLM B85	7/25
SLM B32	-	SLM B86	5/14
SLM B33	-	SLM B87	11/34
SLM B34	-	SLM B88	10/48
SLM B35	-	SLM B89	16/44
SLM B36	-	SLM B90	11/30
SLM B37	-	SLM B91	13/35
SLM B38	-	SLM B92	14/37
SLM B39	-	SLM B93	17/37
SLM B40	-	SLM B94	11/33
SLM B41	-	SLM B95	10/30
SLM B42	-	SLM B96	14/36
SLM B43	-	SLM B97	12/34
SLM B44	-	SLM B98	10/28
SLM B45	-	SLM B99	13/33
SLM B46	-	SLM B100	14/35
SLM B47	-	SLM B101	10/30
SLM B48	-	SLM B102	11/30
SLM B49	7/9	SLM B103	10/26
SLM B50	7/12	SLM B104	11/29
SLM B51	8/12	SLM B105	9/28
SLM B52	7/8	SLM B106	10/30
SLM B53	-	SLM B107	10/29
SLM B54	9/10		

KÇ: Koloni Çapı, HZÇ: Hidroliz Zon Çapı

4.4. Biyosürfaktan Üreten Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu

4.4.1. Kültürel ve makroskobik karakterizasyon

Yapılan tarama testleri sonucunda yüksek yüzey aktivitesi ve emülsifiye etme kapasitesinin tespit edildiği 10 bakteriyal izolat (SLM B28, SLM B29, SLM B39, SLM B52, SLM B56, SLM B58, SLM B69, SLM B85, SLM B95 ve SLM B97) ileri moleküler tanılama için seçilmiştir. Moleküler tanılama öncesi izolatların petrideki genel görünüşlerinin yanısıra mikroskobik olarak da morfolojileri incelenmiş ve gram boyama ile izolatların gram reaksiyonları belirlenmiştir. Tanılaması yapılan bazı izolatlara ilişkin petri görünümü, hücre morfolojileri ve gram boyama sonuçları Şekil 4.10.'da görülmektedir.



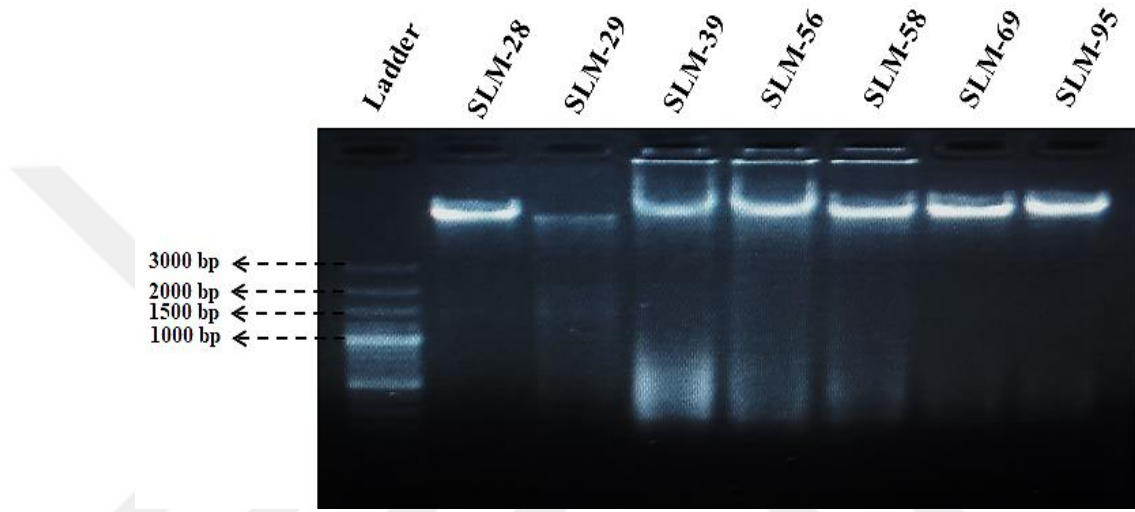
Şekil 4.10. SLM B28, SLM B29, SLM B56 ve SLM B85 numaralı (sırasıyla) izolatların petri kültür ve Gram boyama sonuçları (üstte) ve Gram boyama ile elde edilen mikroskop görüntüleri (altta)

4.4.2. Moleküler karakterizasyon

4.4.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Kültürel ve makroskobik karakterizasyonu yapılan bakteriyal izolatların genomik DNA'nın saflaştırılması için ticari olarak temin edilen DNA izolasyon kiti

(PureLink, Invitrogen) kullanılmıştır. Üretici firmanın kullanım talimatları doğrultusunda Gr(+) ve Gr(-) suşlara ait genomik DNA'lar ilgili saflaştırma protokolü uygulanarak elde edilmiştir. Genom bütünlüğü ve ürünlerin saflaştırıldığından emin olmak için elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmüş ve her bir bakteri kültürü için yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11.).



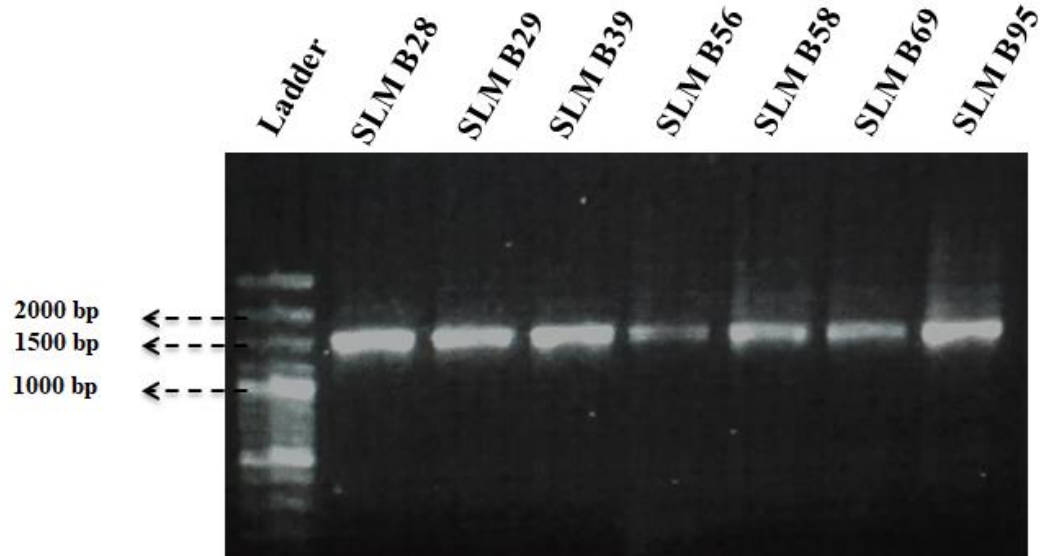
Şekil 4.11. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarına ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

4.4.2.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Gram boyama sonuçları, koloni morfolojisi, büyüme gereksinimleri, enzimatik ve/veya metabolik aktiviteleri de içerisine alan fenotipik profiller durağan olmayıp mikroorganizmanın strese ve çevresel etkileşime maruz kalmasıyla değişebilecek özelliklerdir. Ayrıca, bazı mikroorganizmaların rutin laboratuvar koşullarında kültürel olarak büyütülmesindeki güçlükler nedeniyle de konvansiyonel yöntemler eski önemini yitirmiştir (Petti ve ark., 2005). İlk olarak 1980'de Fox ve arkadaşları (1980) tarafından ileri sürülen prokaryotik organizmaların karakterizasyonu, sınıflandırması ve tanımlamasını değiştirecek olan 16S rRNA dizi analizine dayalı filogenetik sınıflandırmaya ilişkin açıklamalarından sonra moleküler identifikasyon çalışmaları artarak devam etmiştir (Kolbert,1996). Metagenomik verilerin analizi için yeni sekanslama teknolojileri ve araçlarının geliştirilmesi

nedeniyle mikrobiyal genomların sayısı büyük ölçüde artmıştır (Lazarevic ve ark., 2009). Prokaryotik canlılarda 30S küçük ribosomal alt birimin temel bileşeni olan 16S rRNA'nın değişime uğrama sıklığının daha az olması, söz konusu sekans veritabanlarındaki mikrobiyal topluluklar arasında istatistiksel olarak daha sağlam niceliksel karşılaştırmalara izin vermiştir (Pandey ve ark., 2013; Pace, 2009; Tringe ve Hugenholtz, 2008; DeLong ve Pace, 2001; Stackebrandt ve ark., 1994).

Mikroskobik olarak morfolojileri ve gram boyama sonuçları belirlenen bakteriyel izolatların ileri taksonomik karakterizasyonu için 16S rDNA bölgesi PCR ile amplifiye edilmiştir. Hedef bölgenin çoğaltılmasında, universal primerler olarak bilinen 27F /1492R primer çifti kullanılmıştır (Lane ve ark., 1991). 35 döngü sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve yaklaşık 1500 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarının PCR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgelerine ait ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Kalıp olarak bu PCR ürünlerinin ve aynı primer setinin kullanıldığı bir diğer sekanslama PCR işlemi gerçekleştirilerek elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi ABI (Applied Biosystem) dizileme cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü yapılan dizileme sonuçlarının montajı DNA Baser Sequence Assembler V4 (Heracle BioSoft, Romania) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA bölgesine ait dizileme

sonuçları, NCBI veri tabanında blastn suite kullanılmak suretiyle değerlendirilmiştir. Biyosüpfaktan üretimi açısından pozitif olan bakteriyel suşlara ilişkin moleküler tanılama cins seviyesinde yapılarak sonuçlar Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Moleküler tanılaması yapılan bakteriyel suşların 16S rDNA bölgesinin sekans analizine göre temsil ettiği cinsler

İzolat no	Temsil ettiği tür	16S rDNA (PCR bp)	Homoloji (%)
SLM B28	<i>Micrococcus sp.</i>	1376	99
SLM B29	<i>Citrobacter sp.</i>	1410	100
SLM B39	<i>Klebsiella sp.</i>	1389	99
SLM B52	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	1421	98
SLM B56	<i>Bacillus sp.</i>	1420	100
SLM B58	<i>Proteus sp.</i>	1406	100
SLM B69	<i>Proteus sp.</i>	1373	100
SLM B85	<i>Proteus sp.</i>	1418	99
SLM B95	<i>Proteus sp.</i>	1411	100
SLM B97	<i>Proteus sp.</i>	1405	100

Moleküler karakterizasyon sonucunda *Proteus* (5), *Bacillus* (1), *Micrococcus* (1), *Stenotrophomonas* (1), *Klebsiella* (1), *Citrobacter* (1) olmak üzere 6 farklı cinse ait 10 adet suş tanılanmıştır. Bu cinslere üye suşların çevresel örneklerden izolasyonu ve biyosüpfaktan üretimine yönelik gerçekleştirilmiş olan çok sayıdaki diğer araştırmalar, bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları doğrular niteliktedir (Anaukwu ve ark., 2015; Sarafin ve ark., 2014; Ibrahim ve ark., 2013; Jain ve ark., 2013; Jain ve ark., 2012; Jamal ve ark., 2012; Yılmaz ve ark., 2009a; Tuleva ve ark., 2009; Lee ve ark., 2008; Rahman ve ark., 2003)

Biyosüpfaktanların en önemli iki özelliği; yüzey gerilimini düşürme ve emülsiyon oluşturma yeteneğidir. Moleküler tanılaması yapılan bu bakteriler içerisinde test edilen farklı hidrokarbonlara karşı en etkin emülsifikasyon aktivitesine sahip izolat *Micrococcus sp.* strain SLM B28'dir. Das ve ark (1998) izole ettikleri bir *Micrococcus* türünü çeşitli hidrokarbonlar (n-dodekan, n-tetradekan, n-hegzadekan, n-oktadekan) varlığında büyütürken kerosene karşı emülsifikasyon aktivitesini belirledikleri çalışmalarında, 0 ve 48 saat sonrasındaki emülsiyon hacmini karşılaştırmışlardır. Çalışmada bildirilen en yüksek emülsiyon aktivitesi 48 saat sonrasında n-dodekan (%40) ve n-tetradekan (%62) varlığında büyütüldüğünde elde edilmiştir. Bu çalışmamızda ise; *Micrococcus sp.* strain SLM B28 olarak moleküler

tanılamasını gerçekleştirdiğimiz bakteriyal suşun, D-glukoz varlığında ve %1 soya yağı ilave edilen mineral tuz ortamında büyümesiyle ürettiği yüzey aktif maddenin kerosene karşı %42 emülsifikasyon aktivitesine sahip olduğu ve oluşan emülsiyonların 7 gün boyunca stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca, dizel yağ ve n-hegzadekan için sırasıyla %26 ve %30'luk emülsifikasyon aktivitesi de hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, *Micrococcus* sp. strain SLM B28 tarafından üretilen biyosüpfaktanın farklı hidrokarbonları emülsifiye etme kapasitesinde olduğuna işaret ederek söz konusu suşun ve ürettiği biyoaktif molekülün çevresel uygulamalar için potansiyel bir aday olduğunu ortaya koymaktadır.

4.5. Biyosüpfaktan Üretimi Pozitif Olan Bakteriyal İzolatların 16S rDNA Bölgelerinin Dizi Analizi Sonuçları

- *Micrococcus* sp. strain SLM B28 (1376 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

ATGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAAC
GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTCTGGGATAAGCCTGG
GAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTT
GGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAA
GCCAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGTCTGAAAGTCCGGGGCTTA
ACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGA
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC
CGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAA
CGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTA
GAGATACGGTTTCCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTAGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGA

TACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCCAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGG
GTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAG
TCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCT

- *Citrobacter* sp. strain SLM B29 (1410 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GTAAGCGCCCTCCCGAAGGTAAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTC
CCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGT
GGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTT
GCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTC
GCGAGGTGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAC
TCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATC
ACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATA
AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTG
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCA
TCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGC
GTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATC
GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTA
TTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCC
TCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCC
CGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCC
AGTAATTCCGATTAAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATTGCTGAGGTTAT
TAACCTCAACACCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCC
TTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAAT
ATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAG
TGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGC
CGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGA
GGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTA
CCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCAGTTTCCCAGACATTACTC
ACCCGTCCGCCACTCGTCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTACCGTT
CGACTGCA

- *Klebsiella* sp. strain SLM B39 (1389 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATT

ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT
 ACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGCTTCTCTTTGT
 ATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGAC
 TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAG
 TTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
 GGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
 CCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTG
 GATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACAT
 GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGC
 GGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACG
 CCTCAAGGGCACAACTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
 GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGACCTGAGCGTCAGTCT
 TTGTCCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCA
 TTTACACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGC
 CAGTTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACT
 TGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCGGATTAACGCTT
 GCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCT
 TCTGCGGGTAACGTCAATCGACAAGGTTATTAACCTCAACGCCTTCCTCC
 CCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATG
 GCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCC
 GTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA
 GACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCT
 AATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTT
 TGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCC
 CTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCAC
 CCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGACTGC

- *Stenotrophomonas sp.* strain SLM B52 (1421 bp) olarak tanımlanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GCAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCC
 CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCA
 GCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTT
 GCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTC
 GCCGGCTTGACAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTG
 GCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG
 TCACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGG
 ACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
 GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAAT
 CCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCG
 TTGCATCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAA
 CGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTTCGC
 ATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCAC

GCTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATG
 GATGTTCCCTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAATTCCGCT
 ACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCCAGTATCCACTGCAGTTCCCAGGTTG
 AGCCCAGGGCTTTCACAACGGACTTAAACGACCACCTACGCACGCTTTAC
 GCCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCT
 GGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCAACCAG
 GTATTAGCCGGGTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAA
 GGCCTTCTTCACCCACGCGGTATGGGTGGATCAGGCTTGCGCCCATTTGTC
 CAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTGTGGACCGTGTGTCAGTT
 CCAGTGTGGGTGATCATCCTCTCAGACCAGATACGGATAGTCGCCCTGGT
 GGGCCTTTACCCCGCCAACTAGATAATCTGACATCGGCTCATTCAATCGC
 GCAAGGTCTGAAGATCCCCCGCTTTCACCCGTAGGTCGTGTGCGGTATTA
 GCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCCAGACAGAGTAGATTCCGATGTAT
 TCCTCACCCGTCCGCCACTCGCCACCCGTAAGAGCAAGCTCTTACTGTGC
 TGCCGTTGCACTGCATGGTAGC

- *Bacillus* sp. strain SLM B56 (1420 bp) olarak tanımlanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

TCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAA
 CTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC
 GCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAG
 TTGCAGACTGCGATCCGAACGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACC
 TCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
 GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT
 GTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGAT
 CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
 TGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCTT
 ATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
 CCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATG
 CGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCAT
 CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGC
 TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGG
 TGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCT
 CCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
 CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCC
 CAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
 ACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTA
 TTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAA
 CCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGA
 AGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCC
 AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGTACGCATCGTTGCCTTGGTGA
 GCCATTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGG

TAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCC
GGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTAC
CCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCAT
CTGTCCGCTCGACTGCA

- *Proteus sp. strain SLM B58* (1406 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATG
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTAGCAT
TCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGA
CTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGAGTTCCGCTTGCTCTCGCGAG
GTCGCTTCTCTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCG
GCAGTCTCCTTTGAGTTCCACCATACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACACAACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACTCCTCTATCTC
TAAAGGATTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATC
GAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTT
GAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTA
GCTCCAGAAGCCACGGTTCAAGACCACAACCTCTAAATCGACATCGTTTA
CAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGC
ACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCC
TCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCTACCCCCCTCTA
CAAGACTCTAGCCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCCAAGTTAAGCTCGGG
GCTTTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA
GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGATAAGGGTATTAAC
CTTATCACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCTAAGGCCTTCTT
CATAACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCC
CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGG
CTGATCATCTCTCAGACCAGCTAGAGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTA
CCCCACCTACTAGCTAATCCCATATGGGTTTCATCCGATAGTGCAAGGTCC
GAAGAGCCCCTGCTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCCACCGTT
TCCAGTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCATACATTACTCACCC
GTCCGCCGCTCGTCAGCAAGAAAGCAAGCTTTCTCCTGTTACCGCTCGAC
TTGC

- *Proteus sp. strain SLM B69* (1373 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

AAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT
GTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACT

AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG
 ACAGACTTTATGAGTTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATC
 TGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTG
 ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTC
 CCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG
 ACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT
 GTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCGCTGGAT
 GTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCT
 CCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCGGG
 CGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCAGAAGCCACGGTT
 CAAGACCACAACCTCTAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGG
 GTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTT
 GTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCACATCTCTACGCATT
 TCACCGCTACACATGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCAACC
 AGTTTCAGATGCAATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGCTTTCACATCTGACTT
 AATTGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTG
 CACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTT
 CTGCGGGTAACGTCAATTGATAAGGGTATTAACCTTATCACCTTCCTCCC
 CGCTGAAAGTACTTTACAACCCTAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGG
 CTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGT
 AGGAGTCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGA
 CCAGCTAGAGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCCACCTACTAGCTAA
 TCCCATATGGGTTTCATCCGATAGTGCAAGGTCCGAAGAGCCCCTGCTTTG
 GTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCT
 CTATCGGGCAGATCCCCATACATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTCAGCA
 AGAAAGCAAGCTTTCTCCT

- *Proteus sp.* SLM B85 (1418 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCC
 CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTA
 GCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTG
 CAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGAGTTCCGCTTGCTCTCG
 CGAGGTCGCTTCTCTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACT
 CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATC
 ACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCAACATTACGTGCTGGCAACAAAGGAT
 AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCT
 GACAACAGCCATGCAGCACCGGTCTCAACGTTCCCAAAGGCACTCCTCTA
 TCTCTAAAGGATTGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
 CATAGAAATTAAACCACATGCTCCCACCGCTGGTGCGGGCCCCCGTCAAT
 TCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAAC
 GCGTTAGCTCCAGAAGCCACGGTTCAAGACCACAACCTCTAAATCGACAT
 CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCCTGTTTGCTCCCCACG

CTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCG
 GTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCTACCC
 CCCTCTACAAGACTCTAGCCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCTCAAGTTAA
 GCTCGGGGCTTTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTTACG
 CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG
 GCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGACAAGGG
 TATTAACCTTATCACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCTAAGG
 CCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCA
 ATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCC
 AGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGAGATCGTCGCCTAGGTGA
 GCCTTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATATGGGTTCATCCGATAGCGC
 AAGGTCCGAAGAGCCCCCTTCTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGC
 CACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCAGATCCCCATACATTA
 CTCACCCGTCCGCCGCTCGTCAGCAAGAAAGCAAGCTTCTCCTGTTACCG
 CTCGACTGCATGTGT

- *Proteus sp.* SLM B95 (1411 bp) olarak tanımlanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GCCCTCCCGAAGGTAAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGT
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTAGCATTCT
 GATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC
 CAATCCGGACTACGACAGACTTTATGAGTTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTC
 GCTTCTCTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGG
 GCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCA
 GTCTCCTTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTT
 GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACA
 GCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACTCCTCTATCTCTAA
 AGGATTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAA
 TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAG
 TTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCT
 CCAGAAGCCACGGTTCAAGACCACAACCTCTAAATCGACATCGTTTACAG
 CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCT
 GAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCA
 CATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCTACCCCCCTCTACAA
 GACTCTAGCCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGCT
 TTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATT
 CGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA
 GCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGATAAGGGTATTAACCTTA
 TCACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCTAAGGCCTTCTTCATA
 CACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCTCAC
 TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGA
 TCATCCTCTCAGACCAGCTAGAGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCCC
 ACCTACTAGCTAATCCCATATGGGTTCATCCGATAGTGCAAGGTCCGAAG

AGCCCCTGCTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCA
GTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCATACATTACTCACCCGTCC
GCCGCTCGTCAGCAAGAAAGCAAGCTTTCTCCTGTTACCGCTCGACTTGC
ATGTGT

- *Proteus sp.* SLM B97 (1405 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

TGCAGTCGAGCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACT
ACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGG
GCTCTTCGGACCTTGCACCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTA
GGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAG
GAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAA
GTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATCTGAACTGG
TTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTT
GAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT
TGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCT
GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATG
GTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCAT
AAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAG
TAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGC

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yüzey aktif maddeler olarak bilinen sürfaktanlar, sentez ve saflaştırma basamaklarını içeren maliyetli bir işlem sonucunda petrolden üretilmektedirler. Uygulama alanları her geçen gün artarak büyüyen sürfaktanlar, parçalanmaya olan dayanıklılığı sebebiyle çevrede birikime uğramaktadır ve canlılar üzerine toksik etki göstermektedir. Bu dezavantajlar nedeniyle Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın almış olduğu önlemler doğrultusunda mikroorganizmalar tarafından üretilen, daha düşük toksisiteye sahip ve parçalanabilirliği daha yüksek olan biyosürfaktanlarla sentetik sürfaktanların yer değiştirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Çevre dostu özelliğinin yanı sıra, (i) petrol geri kazanımını arttırması, (ii) organik ve metal atıkların remediasyonu (iii) biyolojik aktiviteleri dolayısıyla farmasötik kullanımı, (iv) kozmetik ürünlerde katkı maddesi vb uygulamalar biyosürfaktanlara olan ilgiyi artırarak son yıllarda biyosürfaktan üreten yeni mikroorganizmaların izolasyonuna ilişkin çalışmaların ivme kazanmasını sağlamıştır. Söz konusu çalışmaların yapılmasındaki en önemli motivasyon kaynağı; (i) güçlü yüzey/arayüzey aktivitesi, (ii) düşük kritik misel konsantrasyonu, (iii) yüksek çözünürlük, (iv) yüksek emülsiyon kapasitesi, (v) geniş pH aralığında aktiviteye sahip olma gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri taşıyan yeni biyosürfaktan yapılarının bulunmak istenmesidir.

Biyosürfaktan üreten mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan en yaygın kaynak çevresel örneklerdir. Mikrobiyal izolasyon, moleküler tanılama ve üretilen biyosürfaktanların karakterizasyonunu içeren çok sayıda yurt dışı çalışma bulunmasına karşın ülkemizde bu alandaki araştırmalar oldukça azdır. Bu çalışmamızda, yeni yapısal ve fizikokimyasal özelliklere sahip biyosürfaktanların üretimini gerçekleştiren bakterilerin daha önce çalışılmamış olan Şanlıurfa sınırları içerisindeki çeşitli çevresel örneklerden izolasyonu ve moleküler tanılaması amaçlanarak söz konusu eksiklik kısmen giderilmeye çalışılmıştır. Bakteriyal suşlar özellikle petrol hidrokarbonları ile kontaminasyonun yoğun olduğu bölgeler olarak bilinen otomobil tamir atölyelerinden alınan örneklerden izole edilmiştir. Farklı tarama testleri sonucunda elde edilen veriler, bu bakteriyal izolatlar tarafından

üretilen biyosüpfaktanlara ait yüzey aktivitesi ve emülsiyon kapasitesinin sentetik süpfaktanlarla kıyaslanabilecek seviyede etkin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen yüksek yüzey aktivitesi ve E_{24} değerine sahip yeni biyosüpfaktanlar ile bu biyosüpfaktanları üreten bakteriyal suşlar, çevre kirliliğinin ortadan kaldırılması için kullanılan remediasyon stratejilerinde de potansiyel olarak kullanıma sahip olabilecektir. Ayrıca, çalışmamızda farklı tarama yöntemleri kıyaslanarak güvenilirlikleri de araştırılmıştır. Yüzey aktivitesini belirlemede kullanılan en yaygın ve güvenilir yöntemlerden birisi de yağ yer değiştirme denemesidir. Ancak bu deneme sonuçlarına göre çalışmamızda belirgin bir yüzey aktivitesi gözleyemediğimiz *Micrococcus* sp. strain SML B28 tarafından kültür ortamına salınan biyomoleküllerin, aslında farklı hidrokarbonlarla emülsiyon oluşturabilme yeteneğini bir başka tarama testi olarak kullandığımız emülsifikasyon aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda elde edebildik. Bu çalışma ile, yüzey aktif maddelerin belirlenmesinde çok sayıda tarama testinin kullanılmasının gerekliliği bir kez daha vurgulanmıştır.

Global biyosüpfaktan marketine yönelik gerçekleştirilen pazar araştırmaları, 2013 yılında 344,068 ton olan biyosüpfaktan marketinin %4.3'lük yıllık birleşik büyüme oranı (Compound Annual Growth Rate:CAGR) ile 2020 yılında 461,991 ton'a ulaşacağını göstermiştir (Grand View Research, 2014). Sentetik süpfaktanlarla yer değiştirerek çevre kirliliğinin çözümünde etkin rol oynayabilecek olan biyosüpfaktanların ticari kullanımındaki en önemli sınırlayıcı faktör üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Maliyetin düşürülmesindeki en etkili stratejilerden bazıları; ucuz yenilenebilir substratların kullanılması, üretim koşullarının optimize edilmesi, yüksek miktarda biyosüpfaktan üretimi yapan rekombinant mikroorganizmaların inşaa edilmesi ve daha ekonomik olan alt akım işlemleri ile üretilen biyosüpfaktanların saflaştırılmasıdır. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalarda söz konusu biyosüpfaktanların üretim koşullarının optimizasyonu ve kısmi saflaştırmasının yapılması ile üretimin en yüksek seviyeye çıkarılması önerilmektedir. Kısmen veya tamamen saflaştırılacak olan biyosüpfaktanların yüzey gerilimini düşürme özelliği ve kritik misel konsantrasyonunun belirlenmesi gibi fizikokimyasal olarak karakterizasyonu yapılabilecektir. Ayrıca, ince tabaka

kromatografisi (TLC) ve FTIR ile yapılacak araştırmalar biyosüpfaktanın kimyasal yapısını da aydınlatarak hangi sınıfta yer aldığını gösterecektir. Üretilen her biyosüpfaktanın kendine özgü yapısal özellikleri gözönüne alındığında, saflaştırılan biyosüpfaktanların antimikrobiyal ve antitümoral aktivite gibi bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması ilgili biyosüpfaktanın terapötik amaçlı kullanımını da gözler önüne serebilecektir.



KAYNAKLAR

- AL-ARAJI, L. R. R., 2007. Microbial Surfactant. Asia Pacific Journal Of Molecular Biology And Biotechnology, 15 (3): 99-105.
- ANAUKWU, C. G. , . EKWEALOR, A. I. , EZEMBA, C.C. , ANAKWENZE , V. N. , OKAFOR U. C. VE ARCHIBONG E. J.,2015, *Pseudomonas Monteilii* And *Citrobacter Murlinae*, Biosurfactant-Producing Bacteria Isolated From Nigerian Soil. British Microbiology Research Journal, 10(1): 1-9.
- ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G., SURFACTIN, A., 1968. Crystalline Peptidelipid Surfactant Produced By *Bacillus subtilis*: Isolation, Characterization And its Inhibition Of Fibrin Clot Formation. Biochemical and biophysical research communications, 31: 488-494.
- BANAT, I. M., 2010. Microbial Biosurfactants Production, Applications Future Potential. Applied Microbiology And Biotechnology, 87:427-444.
- BANAT, I. M., 2012. Microbial Biosurfactants: Challenges And Opportunities For Future Exploitation. Trends Biotechnology, 30(11):558-65.
- BAUMGART, F., KLUGE, B., ULLRICH, C., VATER, J., ZIESSOW, D., 1991. Identification Of Amino Acid Substitutions In The Lipopeptide Surfactin Using 2D NMR Spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun, 177: 998-1005.
- BERNHEIMER, A.W., AVIGAD, L.S., Nature And Properties Of A Cytolytic Agent Produced By *Bacillus Subtilis*, J. Gen. Microbiol., 1970 (6): 361-366.
- BESSON, F., PEYPOUX, F., MICHEL, G., 1976. Characterization Of Iturin A In Antibiotics From Various Strains Of *Bacillus Subtilis*. J. Antibiot, 29: 1043-1049.
- BODOUR, A. A., DREES, K. P., MILLER, R., 2003. Distribution Of Biosurfactantproducing Bacteria In Undisturbed And Contaminated Arid Southwestern Soils. Appl Environ Microbiol, 69: 3280-3287.
- BONMATIN, J. M., GENEST, M., LABBÉ, H., PTAK, M., 1994. Solution Three Dimensional Structure Of Surfactin: A Cyclic Lipopeptide Studied By 1h-Nmr, Distance Geometry, And Molecular Dynamics. Biopolymers, 34: 975-986.
- BONMATIN, J. M., LAPRÉVOTE, O., PEYPOUX, F., 2003. Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins And Surfactins. Activity-Structure Relationship To Design New Bioactive Agents, Comb. Chem. High Throughput Screen, 6(6):541-56.
- CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S., KAUR, J., MEHTA, S.K., 2010. Synthesis Of Biosurfactants And Their Advantages To Microorganisms And Mankind. In Biosurfactants, Springer New York, 672:261-80.
- CAMPOS, J.M., STAMFORD, T.L., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., STAMFORD, T.C.M. AND SARUBBO, L.A., 2015. Formulation Of Mayonnaise With The Addition Of A Bioemulsifier Isolated From *Candida Utilis*. Toxicology Reports, 2: 164-1170.
- CARRILLO, C., TERUEL J.A., ARANDA F.A., ORTIZ A., 2003. Molecular Mechanism Of Membrane Permeabilization By The Peptide Antibiotic Surfactin. Biochem. Biophys, 1611(1-2):91-7

- CATHERINE, N., MULLIGAN, S. K., 2014. Green Chemistry And Biosurfactant Research. S. K. Mulligan C. N. İçinde, *Biosurfactant Research Trends And Applications*, CRC pres, 10-23.
- CHANDANKERE, R., YAO, J., CHOI, M.M., MASAKORALA, K., CHAN, Y., 2013. An Efficient Biosurfactant-Producing and Crude-Oil Emulsifying Bacterium *Bacillus Methylophilus* Ustba Isolated From Petroleum Reservoir. *Biochemical Engineering Journal*, 74: 46-53.
- CHÁVEZ, G. S., 2011. *Biosurfactants: A General Overview*. Springer, Germany, 1-12.
- CHEN, H.R., CHEN, C.C., REDDY, A.S., CHEN, C.Y., LI, W.R., TSENG, M.J., LIU, H.T., PAN, W., MAITY, J.P. AND ATLA, S.B., 2011. Removal Of Mercury By Foam Fractionation Using Surfactin, A Biosurfactant. *International Journal Of Molecular Sciences*. 12(11): 8245-8258.
- CHEN, J., HUANG, P. T., ZHANG, K. Y., DING, F. R., 2012. Isolation Of Biosurfactant Producers, Optimization And Properties Of Biosurfactant Produced By *Acinetobacter* Sp. From Petroleum-Contaminated Soil. *Journal Of Applied Microbiology*, 112(4): 660-671.
- DAES, J., MAEYER, D. K., PAUWELYN, E., HOFTE, M., 2010. Biosurfactants In Plant-Pseudomonas Interactions And Their Importance To Biocontrol. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 359-72.
- DAS, K., MUKHERJEE, A. K., 2005. Characterization Of Biochemical Properties and Biological Activities Of Biosurfactants Produced By *Pseudomonas Aeruginosa* Muroid And Non-Muroid Strains Isolated From Hydrocarbon-Contaminated Soil Samples. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 192-199.
- DAS, M., DAS, S. K., MUKHERJEE, R. K., 1998. Surface Active Properties Of The Culture Filtrates Of A *Micrococcus* Species Grown On N-Alkanes And Sugars. *Bioresource Technology*, 63(3): 231-235.
- DEHGHAN, N. G., HOUSAINDOKHT, M., BAZZAZ, B. S. F., 2005. Isolation, Characterization And Investigation Of Surface And Haemolytic Activities Of A Lipopeptide Biosurfactant Produced By *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. *J. Microbiol*, 43:272-276.
- DELONG, E. F., PACE, N. R., 2001. Environmental Diversity Of Bacteria And Archaea. *Systematic Biology*, 50(4): 470-478.
- DESAI, J. D. AND BANAT I. M. 1997. Microbial Production Of Surfactants And Their Commercial Potential. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47-64.
- DHANARAJAN, G., SEN, R., 2014. Amphiphilic Molecules Of Microbial Origin Classification, Genetic, Regulations, And Pathways for Biosynthesis. CRC Press, 32-42.
- DONIO, M. B. S., RONICA, F. A., VIJI, V. T., VELMURUGAN, S., JENIFER, J. S. C. A., MICHAELBABU, M., DHAR, P., CITARASU, T., 2013. *Halomonas* sp. BS4, A Biosurfactant Producing Halophilic Bacterium Isolated From Solar Salt Works In India And Their Biomedical Importance. *Springerplus*, 2(1): 149.
- EASTOE, J., 2010. Surfactant Aggregation And Adsorption At Interfaces. T. Cosgrove İçinde, *Colloid Science Principle , Methods And Application*. John Wiley & Sons, 61-88.

- FAKRUDDIN, M. D., 2012. Biosurfactant: Production And Application. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, 3:124.
- FRACCHIA, L., CAVALLO, M., MARTINOTTI, M. G., BANAT, I. M., 2011. Biosurfactants and Bioemulsifiers: Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials. In: *Biomedical Science, Engineering and Technology* (ed. Ghista DN), InTech, Croatia, 325- 370.
- FRACCHIA, L. C. C., KOSARIC, N., VARDAR-SUKAN, F., 2015. Industrial Applications Of Biosurfactants Biosurfactant Production And Utilization. *Processes Technologies, And Economics*, 246-260.
- FRACCHIA, L., CAVALLO, M., MARTINOTTI, M. G., BANAT, I. M., 2011. Biosurfactants and Bioemulsifiers: Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials. In: *Biomedical Science, Engineering and Technology* (ed. Ghista DN), InTech, Croatia, 325- 370.
- FRANZETTI, A., TAMBURINI, E., BANAT. I. M., 2010. Applications of Biological Surface Active Compounds in Remediation Technologies. In: *Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed. Sen R), Springer, New York, 121-134.
- GADBERRY, J. F., 2006. Other Types Of Surfactants. R. J. Farn İçinde, *Chemistry And Technology Of Surfactants*. Blackwell Publishing, 153-166.
- GAKPE, E., RAHMAN, P., 2007. Microbial Biosurfactants. *Journal Of Marine and Atmospheric Research*, 3 (2): 1-17
- GAKPE, E., RAHMAN, P., 2008. Production, Characterisation And Applications Of Biosurfactants. *Biotechnology*, 7: 360-370.
- GAUTAM, K. K., TYAGI, V. K., 2006. Microbial Surfactants: A Review. *Journal Of Oleo Science*, 55(4): 155-166.
- GRANGEMARD, I., PEYPOUX, F., WALLACH, J., DAS, B. C., LABBEÂ, H., CAILLE, A., GENEST, M., MAGET-DANA, R., PTAK, M., BONMATIN, J. M., 1997. Lipopeptides With Improved Properties: Structure By NMR, Puri®cation By HPLC And Structure-Activity Relationships Of New Îsoleucyl-Rich Surfactins. *J Peptide Sci*, 3: 145-154.
- GUDIÑA, E. J., F. E. 2015. Biosurfactant Production By *Bacillus Subtilis* Using Corn Steep Liquor As Culture Medium. *Front Mcrobiology*, 6:59.
- GUPTA, A., 2016. Surfactants. Niir Project Consultancy Services, New Delhi, 552s.
- HAUSMANN, R., SYLDATK, C., 2015. Biosurfactants Production And Utilization—Processes,Technologies, And Economics. CRC Press, 3-18.
- HEPWORTH, P., 2006. Non-Ionic Surfactants. R. J. Farn İçinde, *Chemistry And Technology Of Surfactants*. Blackwell Publishing, 133-151.
- HIBBS, J., Farn, R. J., 2006. Anionic Surfactants. *Chemistry And Technology Of Surfactants*. Blackwell Publishing, 90-132.
- HUY, N. Q., JIN, S., AMADA, K., HARUKI, M., HUU, N. B., HANG, D. T., HA, D. T. C., IMANAKA, T., MORİKAWA, M., KANAYA, S., 1999. Characterization Of Petroleum-Degrading Bacteria From Oil-Contaminated Sites In Vietnam. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 88(1): 100-102.
- HUE, N., SERANI, L., LAPRÉVOTE, O.,2001. Structural Investigation Of Cyclic Peptidolipids From *Bacillus Subtilis* By High Energy Tandem Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15: 203- 209.

- IBRAHIM, M. L., IJAH, U. J. J., MANGA, S. B., BILBIS, L. S., UMAR, S., 2013. Production And Partial Characterization Of Biosurfactant Produced By Crude Oil Degrading Bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81: 28-34.
- JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H., TREVORS, J. T., 1991. A Drop-Collapsing Test For Screening Surfactant-Producing Microorganisms. *Journal Of Microbiological Methods*, 13(4): 271-279.
- JAIN, R.M., MODY, K., MISHRA, A. AND JHA, B., 2012. Physicochemical Characterization Of Biosurfactant And Its Potential To Remove Oil From Soil And Cotton Cloth. *Carbohydrate Polymers*, 89(4):1110-1116.
- JAIN, R.M., MODY, K., JOSHI, N., MISHRA, A. AND JHA, B., 2013. Production And Structural Characterization Of Biosurfactant Produced By An Alkaliphilic Bacterium, *Klebsiella* Sp.: Evaluation Of Different Carbon Sources. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 108: 199-204.
- JAMAL, P., NAWAWI, W., FAZLI, W.M. AND ALAM, M., 2012. Optimum Medium Components For Biosurfactant Production By *Klebsiella Pneumoniae* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil As A Substrate. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1): 100-108.
- JOY, S., BUTALIA, T., SHARMA, S., RAHMAN, P. K., 2017. Biosurfactant Producing Bacteria From Hydrocarbon Contaminated Environment. In *Biodegradation And Bioconversion Of Hydrocarbons*. Springer Singapore, 259-305.
- JULKOWSKA, D., OBUCHOWSKI, M., HOLLAND, I. B., SÉROR, S. J., 2005. Comparative Analysis Of The Development Of Swarming Communities Of *Bacillus Subtilis* 168 And A Natural Wild Type: Critical Effects Of Surfactin And The Composition Of The Medium, *J. Bacteriology*, 187: 65-76.
- KAKINUMA, A., OUCHIDA, A., SHIMA, T., SUGINO, H., ISONO, M., TAMURA, G. AND ARIMA, K., 1969. Confirmation Of The Structure Of Surfactin By Mass Spectrometry. *Agricultural And Biological Chemistry*, 33(11):1669-1671.
- KAMEDA, Y., OUCHIRA, S., MATSUI-KKANATOMO, S., 1974. Antitumor Activity Of *Bacillus Natto* V. Isolation And Characterization Of Surfactin In The Culture Medium Of *Bacillus Natto* KMD 2311. *Chem Pharmacol Bull*, 22:938-944.
- KARSA, D. R., 2006. What Are Surfactants. R. J. Farn İçinde, *Chemistry And Technology Of Surfactants*. Blackwell Publishing, 1-21.
- KARANTH, N. G. K., DEO, P. G. VEENANADIG, N. K., 1999. Microbial Production Of Biosurfactants And Their Importance. *Current Science*, 116-126.
- KASKATEPE, B., YILDIZ, S., GUMUSTAS, M., OZKAN, S. A., 2015. Biosurfactant Production By *Pseudomonas Aeruginosa* Kefir And Fish Meal. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 46(3): 855-859.
- KAYA, T., KARIPTAS, E., ASLIM, B., 2007. Biyosüpfaktanlar Ve Biyoteknolojik Önemi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2 : 325-335.
- KHAN, M. S. A., SING, B., CAMEOTRA, S. S., 2015. Biological Applications of Biosurfactants and Strategies to Potentiate Commercial Production. London Newyork, 269-295.

- KHAN, M. S. A., SING, B., CAMEOTRA, S. S., 2015. Biosurfactants Production And Utilization Processes, Technologies, And Economics. London Newyork, 371.
- KINSINGER, R. F., KEARNS, D. B., HALE, M., FALL, R., 2005. Genetic Requirements For Potassium Ion-Dependent Colony Spreading In *Bacillus Subtilis*, *J. Bacteriology*, 8462-8469.
- KIM, H. S., YOON, B. D., CHOUNG, D. H., KATSURAGI, T., TANI, Y., 1999. Characterization Of A Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid Produced From *Candida* Sp. SY16. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 52(5): 713-721.
- KIM, S. Y., KIM, J. Y., KIM, S. H., BAE H. J., YI, H., YOON, S. H., 2007. Surfactin From *Bacillus Subtilis* Displays Anti-Proliferative Effect Via Apoptosis Induction, Cell Cycle Arrest And Survival Signaling Suppression, *Febs Lett.*, 581: 865-871.
- KOLBERT, C. P., PERSING, D. H., 1999. Ribosomal DNA Sequencing As A Tool For Identification Of Bacterial Pathogens. *Current Opinion In Microbiology*, 2(3): 299-305.
- KONAR, V., KAHYAOĞLU, M., 2006. Rhamnolipit Biyosümfaktanların Üretiminde Endüstriyel Atık Maddelerin Kullanılması ve Rhamnolipitlerin Uygulama Alanları. *D.P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12: 1-12.
- KOSARIC, N., VARDAR-SUKAN, F., 2015. Biosurfactant Production And Utilization Processes, Technologies, And Economics. CRC Press, 371.
- KOWALL, M., VATER, J., KLUGE, B., STEIN, T., FRANKE, P., ZIESSOW, D., 1998. Separation And Characterization Of Surfactin Isoforms Produced By *Bacillus Subtilis* OKB 105, *J. Colloid. Interface Sci.*, 204: 1-11.
- KRACHT, M., ROKOS, H., OZEL, M., KOWALL, M., PAULI, G., VATER, J., 1999. Antiviral And Hemolytic Activities Of Surfactin Isoforms And Their Methyl Ester Derivatives, *J. Antibiot.*, 152: 613-619.
- LANE, D. J., 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques In Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., And Goodfellow, M., Eds., John Wiley And Sons, New York, 115-175.
- LAZAREVIC, V., WHITESON, K., HUSE, S., HERNANDEZ, D., FARINELLI, L., OSTERÅS, M., SCHRENZEL, J. FRANÇOIS, P., 2009. Metagenomic Study Of The Oral Microbiota By Illumina High-Throughput Sequencing. *Journal Of Microbiological Methods*, 79(3): 266-271.
- LEE, S.C., LEE, S.J., KIM, S.H., PARK, I.H., LEE, Y.S., CHUNG, S.Y. AND CHOI, Y.L., 2008. Characterization Of New Biosurfactant Produced By *Klebsiella* Sp. Y6-1 Isolated From Waste Soybean Oil. *Bioresource Technology*, 99(7): 2288-2292.
- LUNA, J.M., RUFINO, R.D., SARUBBO, L.A., RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A. ve DE CAMPOS-TAKAKI, G.M., 2011. Evaluation Antimicrobial And Antiadhesive Properties Of The Biosurfactant Lunasan Produced By *Candida Sphaerica* UCP 0995. *Current Microbiology*, 62(5): 1527-1534.
- MAIER, R. M., SOBERON-CHAVEZ, G., 2000. *Pseudomonas Aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Applications. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 54(5): 625-633.
- MANUEL, R., Biosurfactants Market Analysis By Product (Rhamnolipids, Sophorolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters) and Segment Forecast To 2020. Grand View Research, 195s.

- MCLNERNEY, M. J., YOUSSEF. N. NAQLE D. P., 2009. Lipopeptide Biosurfactants And Their Use In Oil Recovery. AOCs Mission Statement, 129s.
- MEYLHEUC, T., VAN OSS, C.J. ve BELLON-FONTAINE, M.N., 2001. Adsorption Of Biosurfactant On Solid Surfaces And Consequences Regarding The Bioadhesion Of *Listeria Monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5):822-832.
- MONDAL, M. H., MALIK, S., ROY, A., SAHA, R., SAHA, B., 2015. Modernization Of Surfactant Chemistry In The Age Of Gemini And Bio-Surfactants. *Royal Society Of Chemistry*, 92707–92718.
- MORIKAWA, M., HIRATA, Y., IMANAKA, T., 2000. A Study On The Structure-Function Relationship Of Lipopeptide Biosurfactants. *Biochim Biophys Acta.*, 1488(3): 211-218.
- MUKHERJEE, A. K., DAS, K., 2010. *Microbial Surfactants And Their Potential Applications*. Springer, 54-60.
- MUKHERJEE, A. K., DAS, K., 2010. *Microbial Surfactants And Their Potential Applications: An Overview*, Springer New York, 54-64.
- MULLIGAN, C. N., COOPER, D., NEUFELD, R., 1984. Selection Of Microbes Producing Biosurfactants In Media Without Hydrocarbons. *J Fermentation Technology*, 62(4): 311–314.
- MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F., 1993. Factors Influencing The Economics Of Biosurfactants. *Surfactant Science Series*, 329-329.
- MULLIGAN, C. N., YONG, R. N., GIBBS, B. F., JAMES, S., BENNETT, H. P. J., 1999. Metal Removal From Contaminated Soil And Sediments By The Biosurfactant Surfactin. *Environmental Science & Technology*, 33(21): 3812-3820.
- MULLIGAN, C. N., 2005. Environmental Applications For Biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133:183–198.
- MYERS, D. 2006. *Surfactant Science And Techonology*. John Wiley & Sons, America, 375s.
- NERURKAR, A. S., 2010. Structural And Molecular Characteristics Of Lichenysin And Its Relationship With Surface Activity, In *Biosurfactants*, R. Sen, 304–315.
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., 2014. Biosurfactants In The Food Industry. *Biosurfactants Research Trends and Applications*, 276-191.
- OKOLIEGBE, I. N., AGARRY, O. O., 2012. Application Of Microbial Surfactant. *Scholarly Journals Of Biotechnology*, 15-23.
- OMONIYI, O. A., ABDULMALIK, F., 2015. Biosurfactants Production And Possible Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oilpollution Remediation. *International Journal Of Scientific & Engineering Research*, 1378-1389.
- OTTERSON, R., 2006. Other Types Of Surfactants., *Chemistry And Technology Of Surfactants*. Blackwell Publishing, 170-185.
- PACE, N. R., 2009. Mapping The Tree Of Life: Progress And Prospects. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 73(4): 565-576.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., PIOTROWSKA-SEGET, Z., CAMEOTRA, S. S., 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Science*, 12: 633-654.

- PARKINSON, M., 1985. Bio-Surfactants. *Biotechnology Advances*, 3(1): 65-83.
- PERCIVAL, S.L., SULEMAN, L., VUOTTO, C. ve DONELLI, G., 2015. Healthcare-Associated Infections, Medical Devices And Biofilms: Risk, Tolerance And Control. *Journal Of Medical Microbiology*, 64(4): 323-334.
- PETTI, C. A., POLAGE, C. R., SCHRECKENBERGER, P., 2005. The Role Of 16S Rrna Gene Sequencing In Identification Of Microorganisms Misidentified By Conventional Methods. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43(12): 6123-6125.
- PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., WALLACH, J., 1999. Recent Trends In The Biochemistry Of Surfactin. *Applied. Microbiology And Biotechnology*, 51(5): 553-563.
- PLAZA, G. A., ZJAWIONY, I., BANAT, I. M., 2006. Use Of Different Methods For Detection Of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria From Hydrocarbon-Contaminated And Bioremediated Soils. *Journal Of Petroleum Science And Engineering*, 50(1): 71-77.
- RAHMAN, K. S. M., RAHMAN, T. J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., MARCHANT, R., BANAT, I. M., 2003. The Potential Of Bacterial Isolates For Emulsification With A Range Of Hydrocarbons. *Engineering In Life Sciences*, 23(4): 335-345.
- RANDHAWA, K. S. R., 2015. Biosurfactants Produced By Genetically Manipulated Microorganisms Challenges And Opportunities. CRC PRES, 49-72.
- REIS, R. S., P. G., 2013. Biosurfactants: Production And Applications. *Life Of Science*, 31-62.
- ROBERT, M., MERCADE, M. E., BOSCH, M. P., PARRA, J. L., ESPUNY, M. J., MANRESA, M. A., GUÍNEA, J., 1989. Effect Of The Carbon Source On Biosurfactant Production By *Pseudomonas Aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, 11(12):871-874.
- ROBBEL, L. AND MARAHIEL, M.A., 2010. Daptomycin, A Bacterial Lipopeptide Synthesized By A Nonribosomal Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36):27501-27508.
- RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., VANDER-MEI, H. C., OLIVEIRA, R., 2006. Physicochemical And Functional Characterization Of A Biosurfactant Produced By *Lactococcus Lactis*. *Colloids And Surface*, 49:79-86.
- RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., 2010. Biomedical And Therapeutic Applications Of Biosurfactants. *Springer Science*, 73-85.
- ROSENBERG, E., RON, E. Z., 1999. High- And Low-Molecularmass Microbial Surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 52:154-162.
- RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A., RODRIGUES, L.R.M., TEIXEIRA, J.A.C. ve CAMPOS-TAKAKI, G.M., 2011. Antimicrobial And Anti-Adhesive Potential Of A Biosurfactant Rufisan Produced By *Candida Lipolytica* UCP 0988. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 84(1):1-5.
- SALAGER J. L., 2002. Surfactants Types and Uses. *Venezuela*, 50s.
- SANTOS, D. K. F., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., SARUBBO, L. A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules Of The 21st Century. *International Journal Of Molecular Sciences*, 17(3):401.

- SAN KESKIN, N. O., HAN, D., OZKAN, A. D., ANGUN, P., UMU, O. C. O., TEKİNAY, T., 2015. Production And Structural Characterization Of Biosurfactant Produced By Newly Isolated *Staphylococcus Xylosus* STF1 From Petroleum Contaminated Soil. *Journal Of Petroleum Science And Engineering*, 133:689-694.
- SARAFIN, Y., DONIO, M. B. S., VELMURUGAN, S., MICHAELBABU, M. CİTARASU, T., 2014. Kocuria Marina BS-15 A Biosurfactant Producing Halophilic Bacteria Isolated From Solar Salt Works In India. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 21(6):511-519.
- SATPUTE, S. K., BHAWSAR, B. D., DHAKEPHALKAR, P. K. CHOPADE, B. A., 2008. Assessment Of Different Screening Methods For Selecting Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, 37:243-250.
- SATPUTE, S. K., BHAWSAR, B. D., DHAKEPHALKAR, P. K. CHOPADE, B. A., 2008. Assessment of Different Screening Methods For Selecting Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *India*, 37(3):14-33.
- SATPUTE, S. K., BHUYAN, S. S., PARDESI, K. R., MUJUMDAR, S. S., DHAKEPHALKAR, P. K., SHETE, A. M., CHOPADE, B. A., 2010. Molecular Genetics Of Biosurfactant Synthesis In Microorganisms, In *Biosurfactants* Springer New York, 14-41s.
- SEYDLOVÁ, G., SVOBODOVÁ, J., 2008. Review Of Surfactin Chemical Properties And The Potential Biomedical Applications. *Open Medicine*, 3(2):123-133.
- SCHULZ, D., PASSERI, A., SCHMIDT, M., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V., GUNKEL, W., 1991. Marine Biosurfactants, I. Screening For Biosurfactants Among Crude Oil Degrading Marine Microorganisms From The North Sea. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 46(3-4):197-203.
- SHEKHAR, S., SUNDARAMANICKAM, A., BALASUBRAMANIAN, T., 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A Review. *Critical Reviews In Environmental Science and Technology*, 45(14):1522-1554.
- SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SUTHERLAND, I.W. AND ROLLER, S., 1995. Novel Bioemulsifiers From Microorganisms For Use In Foods. *Journal Of Biotechnology*, 40(3):207-217.
- SIDAL, U., YILMAZ, E. S., 2012. Production Of Rhamnolipid (A Biosurfactant) Using Free And Immobilized Cells Of *Pseudomonas Sp.* *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi*, 18(2): 285-289.
- SILVA, R. C. F. S., ALMEIDA, D. G., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., SARUBBO, L. A., 2014. Applications Of Biosurfactants In The Petroleum Industry And The Remediation Of Oil Spills. *International Journal Of Molecular Sciences*, 15(7): 12523–12542.
- SINGH, A., VAN-HAMME, J. D., WARD, O. P., 2007. Surfactants In Microbiology And Biotechnology: Part 2. Application Aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1): 99-121.
- SHOEB, E., AKLAQ, F., BADAR, U., AKHTER, J., IMTIAZ, S., 2013. Classification And Industrial Applications Of Biosurfactant . *Academic Research International*, 4(3):243-252.

- STACKEBRANDT, E. GOEBEL, B. M., 1994. Taxonomic Note: A Place For DNA-DNA Reassociation And 16S Rna Sequence Analysis In The Present Species Definition In Bacteriology. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 44(4):846-849.
- STANLEY, N. R., LAZAZZERA, B. A., 2004. Environmental Signals And Regulatory Pathways That Influence Biofilm Formation. *Mol. Microbiology*, 52: 917-924.
- TADROS, T. F., 2014. General Classification Of Surfactants. In: *An Introduction To Surfactants*. Degruyter, 1-24.
- TALLY, F.P., ZECKEL, M., WASILEWSKI, M.M., CARINI, C., BERMAN, C.L., DRUSANO, G.L. AND OLESON JR, F.B., 1999. Daptomycin: A Novel Agent For Gram-Positive Infections. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 8(8):1223-1238.
- THAVASI, R., MARCHANT, R., BANAT, I. M., 2015. Biosurfactant Applications In Agriculture. In: *Biosurfactants Production And Utilization—Processes Technologies And Economics*, CRC Pres, 310-321.
- THAVASI, R., SHARMA, S., JAYALAKSHMI, S., 2011. Evaluation Of Screening Methods For The Isolation Of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 1: 1-6.
- THIMON, L., PEYPOUX, F., MAGET-DANA, R., ROUX, B., MICHEL, G., 1992. Interactions Of Bioactive Lipopeptides, Iturin A And Surfactin From *Bacillus Subtilis*, *Biotechnol. Appl. Biochem*, 16:144-151.
- THIMON, L., PEYPOUX, F., WALLACH, J., 1995. Effect Of Lipopeptide Antibiotic, Iturin A, On Morphology And Membrane Ultrastructure Of Yeast Cells. *FEMS Microbiol Lett*, 128:101-106.
- TORABIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S.A. AND TEHRANI, H.A., 1996. Preparation And Characterisation Of Bioemulsifier From *Saccharomyces Cerevisiae* ve Its Application In Food Products. *LWT-Food Science and Technology*, 29(8): 734-737.
- TRINGE, S. G., HUGENHOLTZ, P., 2008. A Renaissance For The Pioneering 16S rRNA Gene. *Current Opinion In Microbiology*, 11(5):442-446.
- TULEVA, B., CHRISTOVA, N., COHEN, R., ANTONOVA, D., TODOROV, T., STOINEVA, I., 2009. Isolation And Characterization Of Trehalose Tetraester Biosurfactants From A Soil Strain *Micrococcus Luteus* BN56. *Process Biochemistry*, 44:135-141.
- UYAR, E., YALÇIN, H. T., 2013. Mikrobiyal Biyosüfaktan. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2):93-102.
- VARJANI, S. J., and UPASANI, V. N., 2017. Critical Review On Biosurfactant Analysis, Purification And Characterization Using Rhamnolipid As A Model Biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232:389-397
- VELİOĞLU, Z., ÜREK, R. Ö., 2015. Biosurfactant Production By *Pleurotus Ostreatus* In Submerged And Solid-State Fermentation Systems. *Turkish Journal Of Biology*, 39(1):160-166.
- VEERACHAMY, S., YARLAGADDA, T., MANIVASAGAM, G., ve YARLAGADDA, P. K., 2014. Bacterial Adherence And Biofilm Formation On Medical Implants. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 228(10):1083-1099.

- VIJAYAKUMAR, S., SARAVANAN, V., 2015. Biosurfactants-Types, Sources And Applications. Research Journal Of Microbiology, 10: 181-192.
- VOLLENBROICH, D., OZEL, M., 1997. Antimycoplasma Properties And Applications In Cell Culture Of Surfactin, A Lipopeptide Antibiotic From *Bacillus Subtilis*. Appl Env Microbiol, 63:44-49.
- VOLLENBROICH, D., OZEL, M., VATER, J., 1997. Mechanism Of Inactivation Of Enveloped Viruses By The Biosurfactant Surfactin From *Bacillus Subtilis*. Biologicals, 25:289-297.
- WALTER, V., SYLDATK, C., HAUSMANN, R., 2010. Screening Concepts For The Isolation Of Biosurfactant Producing Microorganisms. Biosurfactants, 672: 1-13.
- WARD, O. P., 2010. Microbial Biosurfactants And Biodegradation. Advances In Experimental Medicine And Biology, Springer Science+Business Media LLC, 65-72.
- WEI, Y. H., WANG, L. F., CHANGY, J. S., KUNG, S. S., 2003. Identification Of Induced Acidification In Iron-Enriched Cultures Of *Bacillus Subtilis* During Biosurfactant Fermentation. Journal Of Bioscience And Bioengineering, 96(2):174-178.
- YILMAZ, F., ERGENE, A., YALÇIN, E., 2009. Süt Fabrikası Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalardan Elde Edilen Biyosüpfektanların Bitki Patojeni Fusarium Türleri Üzerine Antifungal Etkilerinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 13-3: 214-220.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : ÖZGÜR SALAM
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : AKÇAKALE/04.09.1988
Telefon : 0554 552 84 72
e-mail : ozgur.salam@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Akçakale Lisesi	2006
Üniversite	: Ege Üniversitesi /Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü Bornova/İZMİR	2014
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü /Biyoloji Anabilim Dalı Haliliye /ŞANLIURFA	2017

TEKNİK YETENEKLER

Moleküler Biyoloji: LCMS/MS cihaz kullanımı, Biyokimya analiz cihazları

Bilgisayar: Microsoft Office, Image J,LCMS/MS software

YAYINLAR

A 1: Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

- Ebru UYAR, Özgür SALAM, H. Tansel YALÇIN, Zafer UYAR. Isolation and molecular identification of biosurfactant producing bacteria using soil samples from auto repair shops in Şanlıurfa. Ecology 2017 International Symposium, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri, s.211.
- Evren BÜYÜKFIRAT¹, Kadir EĞİ, Özgür YÜKSEKDAĞ, Ebru TEMİZ, Özgür SALAM, Zafer UYAR, Maruf BALOS “Investigation of Anticancer Activity of Different Extracts Obtained from *Centaurea stapfiana* Plant”. 1.Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi. 21-23 Eylül 2017, Şanlıurfa, s.75.
- Ataman GÖNEL¹, İsmail KOYUNCU, Abdurrahim KOÇYİĞİT, Mustafa DURGUN, Ebru TEMİZ, Özgür YÜKSEKDAĞ, Hasine YEL, Özgür SALAM, Reşat DİKME, Mahmut PADAK “The Effects of 4-(2-((5-Bromo-2-hydroxybenzyl)amino)ethyl)benzenesulfonamide and 4-(2-((5-Chloro-2-hydroxybenzylideneamino)benzenesulfonamide Compounds on Amino Acid Metabolism in Cervix Cancer”. 1.Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi. 21-23 Eylül 2017, Şanlıurfa, s.88
- Ataman GÖNEL¹, İsmail KOYUNCU, Abdurrahim KOÇYİĞİT, Mustafa DURGUN, Ebru TEMİZ, Özgür YÜKSEKDAĞ, Hasine YEL, Özgür SALAM, Reşat DİKME,Hamza YALÇIN. “The Effects of 4-(2-((5-Chloro-2-hydroxybenzylidene)amino)ethyl)benzenesulfonamide and 4-(2-((5-Bromo-2-hydroxybenzylidene)amino)ethyl)benzenesulfonamide Compounds on Free Amino Acid Profile in HELA Cells”. 1.Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi. 21-23 Eylül 2017, Şanlıurfa, s.89