T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAKTERİLERİN YAĞ-SU ARA YÜZÜ İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE YAĞMUR ORHAN

DENİZLİ, OCAK - 2024

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAKTERİLERİN YAĞ-SU ARA YÜZÜ İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE YAĞMUR ORHAN

DENİZLİ, OCAK - 2024

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2022FEBE014 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Tuğçe Yağmur ORHAN

ÖZET

BAKTERİLERİN YAĞ-SU ARA YÜZÜ İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞÇE YAĞMUR ORHAN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ CANER VURAL)

DENİZLİ, OCAK - 2024

Bu çalışmada, çevresel örneklerden *n*-dekana en iyi ve hızlı adsorbe olma yeteneği olan bakteriler izole edilerek, çeşitli fizikokimyasal ve moleküler biyolojik parametreler ile bakteri *n*-dekan/su ara yüzü etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla, *n*-dekan/su ara yüzünde tutunan 12 bakteriyel izolat (*Pseudomonas putida* OW1, *Rhodococcus qingshengii* OW2, *Prescotella equi* OW3, *Brevibacillus parabrevis* OW4, *Paenibacillus lautus* OW5, *Paenibacillus lautus* OW6, *Moraxella osloensis* OW7, *Stutzerimonas stutzeri* OW8, *Stutzerimonas stutzeri* OW9, *Stutzerimonas stutzeri* OW10, *Rhodococcus ruber* OW11, *Rhodococcus erythropolis* OW12) tanılanmıştır. Bu izolatların hidrokarbon parçalama (YPO), hidrokarbona bakteriyel adsorpsiyon testi (HBA), biyosürfaktan tarama analizleri (emülsifikasyon indeksi testi, yağ yayma testi, CTAB agar petri testi), kemotaksi testi, degradasyon ve biyosürfaktan gen analizleri ve *n*-dekan/su ara yüzünde oluşan biyofilmin reolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bazı analizler (FESEM, Pendant drop vb.) gerçekleştirilmiştir. YPO analizine göre tüm izolatların *n*-dekanı parçalayabildiği tespit edilmiştir. En yüksek %97, en düşük %79 oranında parçalama olduğu tespit edilmiştir. HBA testine göre OW7 ve OW11 suşları dışında diğer suşların hidrofobik olduğu belirlenmiştir. İzolatların hepsinin, farklı kapasitelerde biyosürfaktan ürettikleri gözlemlenmiştir. Yarı-katı ortamda haraketli olan ve hidrokarbona kemotaksi yapan izolatlar tespit edilmiştir. *Pseudomonas* türlerinin *n*-dekan/su ara yüzüne hızla adsorbe olduğu ve stabil ve elastik biyofilmler oluşturduğu tespit edilmiştir. OW1 suşu hariç tüm izolatlarda alkan degradasyonundan sorumlu *alk*B ailesine ait genlerin varlığı tespit edilmiştir. *Rhodococcus* türlerinde ve OW7 suşunda trehaloz lipid üretiminden sorumlu genlerinin varlığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biyodegradasyon, biyosürfaktan, yağ/su ara yüzü, biyofilm, kemotaksi, *n*-dekan

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF BACTERIA WITH THE OIL-WATER INTERFACE
MSC THESIS
TUĞÇE YAĞMUR ORHAN
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR:ASST. PROF. DR. CANER VURAL)

DENİZLİ, JANUARY 2024

In this study, bacteria with the best and fastest adsorption ability to *n*-decane were isolated from environmental samples and various physical-chemical and molecular biological parameters and bacterial *n*-decane/water interface interactions were investigated. For this purpose, 12 bacterial isolates were identified as *Pseudomonas putida* OW1, *Rhodococcus qingshengii* OW2, *Prescotella equi* OW3, *Brevibacillus parabrevis* OW4, *Paenibacillus lautus* OW5, *Paenibacillus lautus* OW6, *Moraxella osloensis* OW7, *Stutzerimonas stutzeri* OW8, *Stutzerimonas stutzeri* OW9, *Stutzerimonas stutzeri* OW10, *Rhodococcus ruber* OW11, *Rhodococcus erythropolis* OW12, which adhered at the *n*-decane/water interface. Hydrocarbon degradation, bacterial adhesion to hydrocarbon test (BATH), biosurfactant screening analyses (emulsification index test, oil displacement test, CTAB agar plate test), chemotaxis experiment, analyses of degradation and biosurfactant genes, FESEM and Pendant drop visualizations were performed to determine the rheological properties of the biofilm formed at the *n*-decane/water interface. Hydrocarbon degradation analyses showed that all isolates have ability to degrade *n*-decane. The highest rate of degradation was 97% and the lowest rate was 79%. It was observed the, OW7 and OW11 isolates are not hydrophobic whereas the other isolates are hydrophobic. Besides, all isolates produced biosurfactant at diverse levels. It was detected that the *Pseudomonas* genus rapidly adsorbed to the *n*-decane/water interface and formed stable and elastic biofilms with mobility and chemotaxis experiments. Also, presence of *alk*B genes which responsible for alkane degradation was detected in all isolates except strain OW1. The presence of genes responsible for trehalolipid production was proved in members of *Rhodococcus* genus and strain OW7.

KEYWORDS: Biodegradation, biosurfactant, oil/water interface, biofilm, chemotaxis, *n*-decane

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
SEMBOL LİSTESİ ..... **viii**
ÖNSÖZ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR TARAMASI **3**
2.1 Hidrokarbon Degradasyonu 3
2.1.1 Hidrokarbon Kirliliği ve Çevresel Etkileri 3
2.1.2 Hidrokarbonların Yapısı 4
2.1.2.1 *n*-dekan 6
2.1.3 Hidrokarbon Kirliliğinin Arıtımı 7
2.1.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler 7
2.1.3.2 Biyolojik Yöntemler 8
2.1.4 Alkanların Biyodegradasyonu 9
2.1.4.1 Alkan Degradasyonunda Etkin Enzimler ve Fonksiyonel Genler 11
2.2 Biyosürfaktanlar 13
2.2.1 Biyosürfaktanların Sınıflandırılması 15
2.2.2 Biyosürfaktanların Uygulama Alanları 17
2.2.3 Biyosürfaktanların Mikrobiyal Sentezi 19
2.3 Kemotaksi 22
2.4 Biyofilm 24
3. MATERYAL VE YÖNTEM **29**
3.1 Materyal 29
3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar 29
3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal ve Besiyerleri 30
3.2 Yöntem 31
3.2.1 Bakterilerin Çoğaltılması ve İzolasyonu 31
3.2.2 Yağ/su Ara Yüzünde Etkinlik Gösteren Bakterilerin Belirlenmesi 32
3.2.3 Bakterilerin Yağ/su Ara Yüzünde Tutunması İçin Optimum Şartların Belirlenmesi 33
3.2.4 Hidrokarbona Bakteriyel Adsorpsiyon Testi 33
3.2.5 Toplam Hidrokarbon Gideriminin Belirlenmesi 34
3.2.6 Bakterilerin Biyosürfaktan Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi 35
3.2.6.1 Emülsifikasyon İndeksi Testi 36
3.2.6.2 Yağ Yayma Testi 37
3.2.6.3 CTAB Agar Petri Testi 37

3.2.7 Bakteriyel Haraketlilik Testi 38
3.2.8 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi 41
3.2.9 FESEM Analizi 41
3.2.10 Yağ/ su Ara Yüzünde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakalarının Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 42
3.2.11 Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanımlanması 43
3.2.11.1 Bakteri İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu 43
3.2.11.2 İzolatların Genomik DNA'larının *in Vitro* Çoğaltılması 45
3.2.11.3 Agaroz Jel Elektroforezi ve Ürün Kontrolü 46
3.2.11.4 İzolat DNA'larının Dizilenmesi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması 47
3.2.12 Bakterilerin Degradasyon ve Biyosürfaktan Genlerinin Analizi 48
4. BULGULAR 49
4.1 Bakterilerin İzolasyonu ve Belirlenmesi 49
4.2 Bakterilerin Yağ/su Ara Yüzüne Tutunması İçin Optimum Şartların Belirlenmesi 52
4.3 Bakteriyel Hidrofobisite ve Hidrokarbona Bakteriyel Adsorpsiyon Testi 54
4.4 Bakterilerin Toplam Hidrokarbon Giderimlerinin Belirlenmesi 54
4.5 Bakterilerin Biyosürfaktan Üretim Potansiyelleri 55
4.5.1 Emülsifikasyon İndeksi Testi 55
4.5.2 Yağ Yayma Testi 56
4.5.3 CTAB Agar Petri Testi 57
4.6 Bakteriyel Haraketlilik Testi 59
4.7 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi 61
4.8 FESEM Analizi 61
4.9 Yağ/ su Ara Yüzünde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakalarının Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 64
4.10 Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanımlanması 67
4.11 Bakterilerin Degradasyon ve Biyosürfaktan Genlerinin Analizi 72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 77
6. ÖNERİLER 91
7. KAYNAKLAR 92
8. EKLER 110
EK A: Çalışmada kullanılan biyodegradasyon ve biyosürfaktan primerleri ve dizileri 110
9. ÖZGEÇMİŞ 113

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Petrol hidrokarbonları 5
Şekil 2.2: *n*-dekan 3D kristal yapısı..... 7
Şekil 2.3: *n*-alkanların terminal ve subterminal oksidasyonu..... 12
Şekil 2.4: *Pseudomonas* cinsinde biyosürfaktan ramnolipid sentez yol izi..... 20
Şekil 2.5: Tek karbon kaynağı olarak sükroz varlığında *Bacillus sp*. tarafından gerçekleştirilen sürfaktin biyosentezi..... 22
Şekil 2.6: Biyofilm oluşma basamakları..... 25
Şekil 2.7: Kemotaksi ile biyofilm oluşumu ve ksenobiyotiklerin biyoremediyasyonu 28
Şekil 3.1: Bakteri izolasyon aşamalarını gösteren iş akış diyagramı 31
Şekil 3.2: HBA testi aşamaları 34
Şekil 3.3: Hidrokarbon ekstraksiyon aşaması..... 35
Şekil 3.4: E_{24} testi aşamaları..... 36
Şekil 3.5: Yağ yayma testi aşamaları..... 37
Şekil 3.6: CTAB agar petri testi aşamaları 38
Şekil 3.7: Yarı katı agara dik ekim yöntemi ile hareketlilik tespiti..... 39
Şekil 3.8: Kantitatif gradyan petri testi aşamaları 40
Şekil 3.9: Kantitatif kapiler testi aşamaları 40
Şekil 3.10: FESEM analizi. 42
Şekil 3.11: Attension Theta Goniometer cihazı ile yüzey bakteri yüklü damlanın yüzey gerilimin ölçümü..... 43
Şekil 3.12: DNA izolasyon aşamaları..... 45
Şekil 3.13: PZR ve agaroz jel elektroforezi..... 47
Şekil 4.1: İzolatların LB besiyerindeki koloni görünümler..... 49
Şekil 4.2: İzolatların Gram özellikleri ve mikroskop morfolojileri..... 50
Şekil 4.3: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzünde oluşturdukları biyofilm yapılarına örnekler 52
Şekil 4.4: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzünde tutunmaları için gereken optimum sıcaklık değerleri 52
Şekil 4.5: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzünde tutunmaları için gereken optimum çalkalama koşulları..... 53
Şekil 4.6: İzolatların HBA testi sonuçları..... 54
Şekil 4.7: İzolatların YPO testi sonuçları 55
Şekil 4.8: Bakteriyel izolatların E_{24} indeksi testi sonuçları. 56
Şekil 4.9: Yağ yayma testine ait görüntüler. 57
Şekil 4.10: İzolatların CTAB-metilen mavisi besiyerinde üreme durumları..... 58
Şekil 4.11: Hareketlilik testine göre hareketli olan izolatlar 59
Şekil 4.12: Hareketlilik testine göre hareketleri sınırlı olan izolatlar……59
Şekil 4.13: Kantitatif gradyan petri testi……...60
Şekil 4.14: İzolatların Ekzopolisakkarit (EPS) üretme durumları……61
Şekil 4.15: FESEM görüntüleri (10000x büyütme)..... 62
Şekil 4.16: FESEM görüntüleri (10000-15000x büyütme) 63
Şekil 4.17: FESEM görüntüleri (10000- 15000x büyütme) 64
Şekil 4.18: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. 65
Şekil 4.19: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. 66
Şekil 4.20: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. 66
Şekil 4.21: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü yüzey gerilimleri..... 67

Şekil 4.22: Bakteriyel izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü 68
Şekil 4.23: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Pseudomonas* grubu için oluşturulan filogenetik ağaç. 69
Şekil 4.24: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Rhodococcu*s grubu için oluşturulan filogenetik ağaç. 70
Şekil 4.25: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Bacillus* grubu için oluşturulan filogenetik ağaç……..71
Şekil 4.26: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre OW7 için oluşturulan filogenetik ağaç.....72
Şekil 4.27: İzolatların Pp ALK1, Rhd *ots*B, Mo alkB, Mo *ots*A ve Mo *ots*B genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. 73
Şekil 4.28: İzolatların Pp *rhl*B, Rhd *tre*Y genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü..... 74
Şekil 4.29: İzolatların Pp *rhl*C, Rhd *ots*A, Pae *Alk*B genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. 75
Şekil 4.30: İzolatların Pae *Alk*M, Pp *alk*B ve Pae *sfp* genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü 76

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Alkan parçalayan bakteri örnekleri 11
Tablo 2.2: Biyosürfaktan türleri ve özellikleri 16
Tablo 3.1: Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar 29
Tablo 3.2: Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal ve besiyerleri 30
Tablo 3.3: Primer dizileri 45
Tablo 3.4: PZR döngü sayısı ve sıcaklıkları 46
Tablo 4.1: İzolatların genel özellikleri 51
Tablo 4.2: İzolatların biyosürfaktan tarama testlerine ait veriler 58
Tablo 4.3: İzolatların gradyan petri testi sonuçları 60
Tablo 4.4: İzolatların 16S rRNA dizi analiz sonuçları 68

SEMBOL LİSTESİ

bç	**:**	Baz çifti
CTAB	**:**	Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	**:**	Deoksiribonükleik Asit
E_{24}	**:**	Emülsifikasyon İndeksi
kob	**:**	Koloni oluşturan birim
LB	**:**	Luria Bertani
MEGA11	**:**	Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11
NB	**:**	Nutirent Broth
NCBI	**:**	National Center for Biotechnology Information
OD	**:**	Optik yoğunluk
PAH	**:**	Poliaromatik Hidrokarbon
PZR	**:**	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	**:**	Dakikadaki devir sayısı
TAE	**:**	Tris-asetik asit-EDTA
UV	**:**	Ultraviyole

ÖNSÖZ

Tezimin gerçekleşmesinde bana yol gösteren, değerli katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Caner VURAL'a, laboratuvar çalışmalarımda alt yapı desteklerinden dolayı Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a, Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a, Prof. Dr. Metin AK'a, Prof. Dr. Dilek ODACI'ya, Doç. Dr. Berna KAVAKCIOĞLU YARDIMCI'ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana sağladıkları fikir ve destekler için Doç. Dr. Rukiye AYRANCI'ya, Dr. Fatma ÖZTÜRK KIRBAY'a, Öğr. Gör. Dr. Naime Nur BOZBEYOĞLU KART'a, tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen tüm Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmam süresince 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na,

Bu günlere gelmemde desteklerini esirgemeyen, mutluluklarımı ve zorluklarımı paylaştığım, gösterdikleri sevgi ve sabırla her zaman yanımda olan sevgili annem Serpil ORHAN'a, sevgili babam Tarık ORHAN'a ve canım kardeşim Tekin ORHAN'a,

Ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğçe Yağmur ORHAN

1. GİRİŞ

Petrol ve türevi ürünler, petrol hidrokarbonlarından elde edilir ve en yaygın kullanılan enerji kaynaklarından birisidir (Hossain ve diğ. 2022). Petrol ve türevlerinin faaliyetleri sırasında toprağa dökülmesi, taşınması sırasında kazara toprak veya okyanusa salınması, depolanması, yanlış kullanılması ve tahrip edilmesi sonucu çevresel hidrokarbon kirliliği ortaya çıkmaktadır (Keta ve diğ. 2021). Hidrokarbon kirliliklerin giderilmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Al zahrani ve diğ. 2010). Bu fiziksel ve kimyasal yöntemler maliyetli ve zaman alıcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda çok etkili de olmayabilir (Singh 2012). Biyoremediyasyon, kirleticileri parçalamak/detoksifiye etmek için canlı organizmaların kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem verimli, ekonomik, çok yönlü ve çevreye duyarlı bir tekniktir (Varjani 2017). Aynı zamanda, mikroorganizmalar hidrokarbonu enerji kaynağı olarak kullanabildiklerinden dolayı, bu tür petrol hidrokarbon kirleticilerinin güçlü ayrıştırıcıları olarak kullanılabilirler (Abbasian ve diğ. 2015). Bakterileri, filamentli fungusları ve mayaları içeren bir grup mikroorganizmanın alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak parçaladığı bildirilmiştir (van Beilen ve diğ. 2003; Wentzel ve diğ. 2007). Ancak bakterilerin, petrol kirleticilerinin parçalanmasında daha yoğun olarak kullanıldığı bilinmektedir (Abbasian ve diğ. 2015; Liu ve diğ. 2012; Meckenstock ve diğ. 2016; Varjani 2017). Bakterilerin hidrokarbon parçalama durumlarının biyosürfaktan üretme (Vijayakumar ve diğ. 2015), biyofilm oluşturma (Omarova ve diğ. 2019) ve kemotaksi (Law ve Aitken 2003) gibi yetenekleriyle doğru orantılı olduğu bilinmektedir. Bu yeteneklerin ayrıntılı olarak çalışılmasına rağmen; bakterilerin yağ/su ara yüzü ile etkileşimi inceleyen araştırmalar sınırlıdır.

Bakterilerin sıvı-sıvı ara yüzeylerde adsorbsiyonu ve biyofilm oluşumu, katı-sıvı veya katı-hava ara yüzeylerdekinden daha farklı süreçler içermektedir (Flemming ve diğ. 2016). Bakterilerin katı veya sıvı yüzeylere tutunması, katı yüzeylerin (topografisi vb.) ve sıvıların (iyonik güç, pH, karbon kaynağı konsantrasyonu vb.) fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, hücre yüzeyi hidrofobikliğine de bağlı olabilir (Dewangan ve Conrad 2020). Sıvı-sıvı ara yüzeylere yapışmayı sağlayan fiziksel

etkileşimler katı ara yüzeylerden farklıdır ve biyofilm oluşumunu ve nihai yapısını etkilemektedir (Subbiahdoss ve Reimhult 2020). Hava/sıvı ve sıvı/sıvı ara yüzey kararlığının yüzey aktif madde olan biyosürfaktan varlığından etkilendiği bilinmektedir. Biyosürfaktan yüklü ara yüzeylerde bakteri davranışlarının anlaşılmasında rol alabileceği gibi, biyomalzeme mühendislerine de yeni fırsatlar sunacağı düşünülmektedir. Örneğin, selüloz üreten bakteri çözeltisine biyosürfaktan eklenmesiyle makro gözenekli bir bakteri selüloz köpüğü elde edilmiştir (Rühs ve diğ. 2014). *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Alcaligenes*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Cycloclastic* ve *Alcanivorax* gibi birçok bakteri cinsine ait türlerin biyofilm oluşturdukları ve çeşitli kirli ortamlarda kirleticileri parçaladıkları ya da mineralize edebildikleri bildirilmiştir (Kostka ve diğ. 2011; Mangwani ve diğ. 2021; Rahmati ve diğ. 2022). Ayrıca, bakterilerin sıvı/sıvı (örneğin petrol/su) ara yüzeylerine nasıl yapıştığının anlaşılmasıyla sucul sistemlerden hidrokarbon kirliliklerinin giderilmesi için yeni stratejiler geliştirilebilecektir. Bu sayede, çevre sağlığının korunması ve remediyasyon giderlerinin azaltılması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir (Subbiahdoss ve Reimhult 2020). Bu sebeple hidrokarbonla kirlenmiş çevrelerin biyoremediyasyonunda mikroorganizmalar kirli yüzeylerle etkileşimi araştırılması önem taşımaktadır. Bu çalışma kapsamında, çeşitli çevresel (toprak, göl sedimenti, petrol ile kirlenmiş endüstriyel atık su) örneklerden *n*-dekana en iyi ve en hızlı adsorbe olma yeteneği olan bakteriler izole edilerek; bu bakterilerin fizikokimyasal ve moleküler biyolojik parametreler ile bakteri-yağ/su ara yüzü etkileşimlerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, sıvı/sıvı (yağ/su) ara yüz etkileşimlerinde bakteriyel yapışma mekanizmasının biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve mekanizmada önem arz eden biyokimyasal süreçlerde görev alan bazı önemli fonksiyonel genlerin tespit edilmiş olmasıyla literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, yapılan bu tez çalışmasının daha kısa zamanda, daha etkin, daha ekonomik ve çevre dostu bir yaklaşım olarak sıvı/sıvı ara yüz ile ilgili biyoremediyasyon çalışmaları için bir konsept çalışma olacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Hidrokarbon Degradasyonu

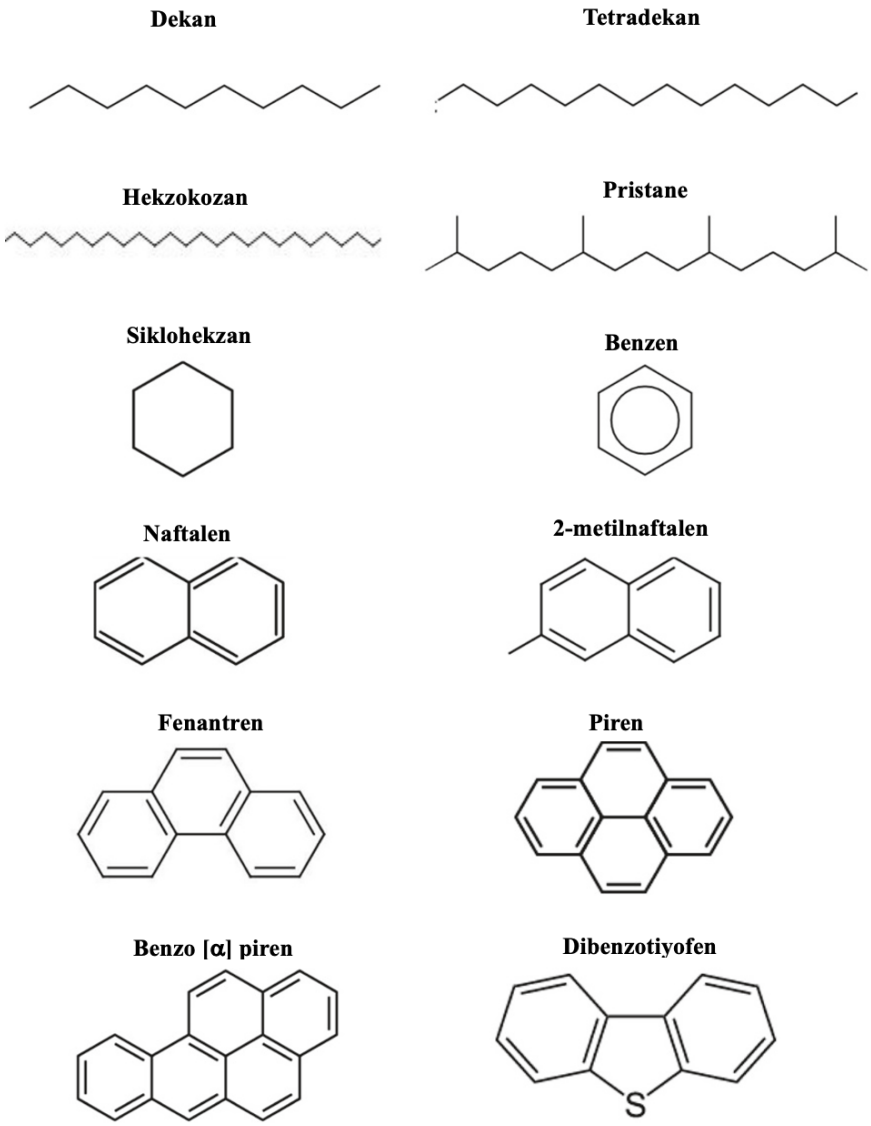
2.1.1 Hidrokarbon Kirliliği ve Çevresel Etkileri

Petrol hidrokarbonları, yakıt ve kimyasal madde olarak yaygın kullanımları nedeniyle çevreye yayılmaktadır. Ayrıca, petrol ve petrol ürünlerinin aranması, üretimi, rafine edilmesi, taşınması ve depolanması sırasında sık sık sızıntılar ve kazara dökülmeler meydana gelmekte; bu durum toprağın ve su sistemlerinin kirlenmesine neden olmaktadır (Singh ve diğ. 2012). Bu kirlilik çevreyi etkilemektedir ve dünyadaki tüm yaşam formları için doğrudan veya dolaylı yoldan çeşitli sağlık riskleri oluşturmaktadır (Varjani 2017). Örneğin; yaşanan en büyük petrol sızıntılarından biri olan ve 2010 yılında Meksika Körfezi'ndeki Deepwater Horizon petrol kulesinde meydana gelen patlamada, binlerce kuş, memeli ve deniz kaplumbağası, sızan petrolden olumsuz etkilenmiştir (Dave ve Ghaly 2011). Çevresel kirlilik bakımından dizel, benzin, yağlama yağı gibi ham petrolün damıtılmasından elde edilen petrol hidrokarbonları toksik, mutajenik ve kanserojen olmaları nedeniyle daha fazla dikkat çekmektedir. Petrol hidrokarbonlarının toksisitesi, moleküler ağırlıklarıyla doğru orantılı olarak artar (Kuppusamy ve diğ. 2020). Ancak düşük moleküler ağırlıklı moleküller, daha yüksek çözünürlükleri ve biyoyararlanımlarından dolayı daha toksik etkiye sahip olabilmektedir (Pandolfo ve diğ. 2023). Örneğin, daha hafif olan uçucu hidrokarbonların (C5-C10), insan ve çevre üzerinde daha toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Duan ve diğ. 2015). Hidrokarbonların toksisitesi insanları, bitkileri, hayvanları ve mikroorganizmaları etkileyerek ekosistem biyoçeşitliliği ve işleyişi üzerinde olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Hidrokarbonlar ve türevleri ile çevresel kirlenmenin, birçok bitki ve hayvan türünün bölgesel olarak yok olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Nagkirti ve diğ. 2017). Toprak ekosisteminin petrol hidrokarbonları ile kontaminasyonunun, topraktaki bitki ve mikroorganizma çeşitliliğini azalttığı, toprak verimliliğini tükettiği, toprağın ekolojik dengesini

bozduğu ve hatta insan sağlığını riske attığı bildirilmiştir (Ansari ve diğ. 2018). Yüksek oranda hidrokarbonla kirletilmiş toprakta yetiştirilen ürünlerin çimlenmesinin geciktiği, klorofil içeriğinin zayıfladığı ve bazı ürünlerin yok olduğu tespit edilmiştir (Ekundayo ve diğ. 2001). Hidrokarbonlar taşıma ve işlenme gibi çeşitli nedenlerle sucul sistemlerin de kirliliğine neden olmaktadır. Çok sayıda hidrofobik bileşen içerdikleri için sucul ekosistemlerde parçacıkların ve sedimentin üzerine adsorbe olurlar. Bu durum omurgasızların, balıkların, balık yumurtalarının ve çift kabukluların kirletici ile temasından dolayı olumsuz etkilenmesine neden olur (Logeshwaran ve diğ. 2018). Ayrıca, petrol hidrokarbonlarının çevrede birikimi ve kalıcılığı da hem karasal hem de sucul ekosistemlerde zararlı etkilere yol açabilir (Kuppusamy ve diğ. 2020).

2.1.2 Hidrokarbonların Yapısı

Kirletici gideriminin kapsamını ve stratejilerini anlamak için, öncelikle kirleticinin özelliklerini, kirletici ile temasta olan ortamın özelliklerini, bu ortamdaki petrol hidrokarbonun akıbetini, hidrokarbonun biyolojik bozunma mekanizmalarını ve bozunma hızını kontrol eden faktörleri anlamak önemlidir (Varjani 2017). Hidrokarbonlar, biyosferdeki canlı organizmaların biyosentetik ürünleri veya jeosferdeki biyojenik organik maddelerin abiyotik dönüşüm ürünleri olarak büyük bir yapısal çeşitlilikte ortaya çıkarlar. Hidrokarbonlar farklı konfigürasyonlarda sadece karbon ve hidrojen atomları içermekle birlikte; doymuş ve doymamış alifatikler ile aromatik hidrokarbonlar olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır (Timmis ve diğ. 2010). Alifatik hidrokarbon özelliğinde olan alkanlar, başta ham petrolün olmak üzere çoğu petrol ürününün ana bileşenidir (Abbasian ve diğ. 2015). Alkanlar doymuş hidrokarbonlar olarak da adlandırılır. Molekül omurgasını oluşturan karbon atomları, bir zincir (doğrusal veya dallanmış alkanlar), bir daire (halkalı alkenler) veya her ikisinin de bir karışımını oluşturmak için birbirine bağlanırlar. Alkanlar hidrojene tamamen doymuş olmaları ile diğer hidrokarbonlardan ayrılırlar. Bu da karbon omurgasını tahrip etmeden bu hidrokarbonlara ilave hidrojen atomu eklenemeyeceği anlamına gelir (Hille 2004). Aromatik hidrokarbon ise, genellikle farklı alkil grupları ile desteklenmiş bir veya birkaç aromatik halkaya sahip organik bileşiklerdir (Şekil 2.1) (Meckenstock ve diğ. 2016).



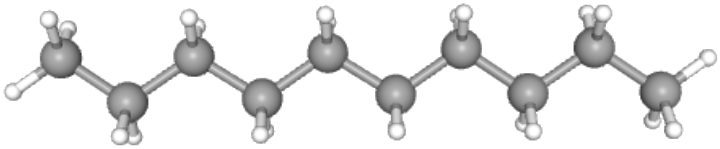
Şekil 2.1: Petrol hidrokarbonları (McGenity ve diğ. 2012'den uyarlanmıştır)

Doymuş ve aromatik yapıdaki hidrokarbonlara kıyasla, reçine ve asfaltenler hidrokarbon olmayan polar bileşikler içerir. Reçineler ve asfaltenler, çok sayıda azot, kükürt ve oksijen atomunun eklenmesiyle oldukça karmaşık ve çoğunlukla bilinmeyen karbon yapılarına sahiptir (Chandra ve diğ. 2013). Her bileşenin biyolojik olarak degradasyonunu etkileyen kendine özgü davranışı bulunmaktadır (Costa ve diğ. 2012). Alifatik yapılarda, karbon atomları elektronlarını sadece komşu atomlarla paylaşarak, polar olmayan ya da hafif polar hale gelir. Polarite arttıkça, bu moleküllerin çözünürlükleri ve suyla etkileşimleri de artar. Ancak, fonksiyonel grupların eksikliği ve suda düşük çözünürlükleri nedeniyle, çevreye salındıklarında ciddi ekolojik sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Singh ve diğ. 2012). Ayrıca, uçucu aromatik

fraksiyonlar benzen, tolüen, etilbenzen, ksilen (BTEX) ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi petrolün birçok bileşeni hemotoksik, kanserojen ve teratojenik bileşenleri nedeniyle kalıcı ve toksiktir (Varjani 2017).

2.1.2.1 *n*-dekan

Alkan grubuna ait kısa zincirli hidrokarbonların bir üyesi olan *n*-dekan 10 karbon atomuna sahip olmakla birlikte, ince, renksiz sıvı özelliktedir. Moleküler ağırlığı 142,28 g/mol, 20°C'deki suda çözünürlüğü ise 0,009 mg/L'dir (Wexler 2014). (Şekil 2.2). Bu molekül yalnızca iç motor veya uçak yakıtlarının ana bileşeni değil, aynı zamanda kimya sanayinde birincil ham madde olarak kullanılmaktadır (Zeng ve diğ. 2020). Alkanlar, kimyasal sentez için ham madde olarak (Pombeiro 2018), alkoller, aldehitler ve asitler gibi daha değerli ürünlerin üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Ayala 2004). Aynı zamanda alkanlar kozmetik ve diğer kişisel bakım ürünlerinin üretimi için temel görev görebilirler (Stepniowska 2021). *n*-dekan, bir çözücü olarak doğal kozmetik ürünlerinin geliştirilmesinde bitki metabolitlerinin ekstraksiyonunda bir çözücü olarak kullanılabilirler (Benoit 2021). *n*-dekan diğer alifatik hidrokarbonlara göre daha az toksik olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni oktan veya heptandan daha az uçucu olması ve pulmoner alveoller veya kan-beyin bariyerini kolayca geçememesidir. Ancak, soluma ile akciğerlere ulaştığında heptan ve oktanda olduğu gibi soluyan kişide olumsuz etkilere neden olabilir. *In vitro* ve/veya mikrobiyal sistemler kullanılarak dekanın dekanole metabolize olduğu gösterilmiştir (Wexler 2014).



Şekil 2.2: *n*-dekan 3D kristal yapısı (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

n-dekanın ortalama bir karbon zincir uzunluğuna sahip, suda çözünmeyen ve düşük yoğunluğundan dolayı su yüzeyinde faz oluşturabilen özelliktedir. Ayrıca *n*-dekan bakteriyel biyofilmlerin gözlemlenebildiği bir emülsiyon ara yüz oluşturduğu ve yağ-su ara yüzü oluşturmak için çalışmalarda tercih edilebilen bir hidrokarbondur (Subbiahdoss ve Reimhult 2020; Subbiahdoss ve diğ. 2022).

2.1.3 Hidrokarbon Kirliliğinin Arıtımı

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte petrol ve türevlerinin, karasal veya sucul ekosistemlerde neden olduğu kirliliğin giderilmesinde çeşitli yöntemler kullanılır hale gelmiştir. Hidrokarbonlarca kirletilmiş alanların arıtımında kullanılan yöntemler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olmak üzere üç grupta ele alınmaktadır (Al-Zahrani ve diğ. 2010).

2.1.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler

Fiziksel yöntemler, genellikle petrol sızıntılarını fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmeden kontrol altına almayı sağlayan ve çeşitli bariyerlerin kullanıldığı yöntemlerdir. Petrol sızıntılarını kontrol etmek için yakma, sıyırıcılar ve adsorban malzemeler bariyer olarak kullanılmaktadır (Dave ve Ghaly 2011). Kimyasal yöntemlerde ise, petrol sızıntılarını temizlemek için çeşitli dağıtıcılar ve katılaştırıcılar kullanılmaktadır (Dhaka ve Chattopadhyay 2022). Bu kimyasallar, kirleticinin

kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirme yeteneğine sahiptir. Kimyasal yöntemlerin pahalı olması ve iyileştirme sırasında çözücülerin ve reaktiflerin hava, su ve toprağa karışarak çevresel ortamların kirlenmesine neden olması olumsuz özellikler olarak karşımıza çıkmaktadır (Elijah 2022). Termal arıtma tekniklerinde ise fiziksel bariyerlerin içerdiği petrol sızıntısı basitçe ateşlenir. Hangi tekniğin kullanılacağı, iyileştirme süreçlerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerden bazıları; sızıntının olduğu yerdeki atmosferik ve sucul ortam koşulları (sıcaklık, gelgit dalgaları vb.), sızıntının hacmi, dökülen petrolün özelliği, sızıntının doğal yaşam alanlarına, insan nüfusuna ve kültürel öneme sahip alanlara yönelik oluşturduğu tehlikeler gibi durumlar olarak sıralanabilir (Dhaka ve Chattopadhyay 2022). Bu tarz fiziksel ve kimyasal yöntemlerin, maliyetli ve zaman alıcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda çok etkili olmadığı da bildirilmiştir (Singh 2012).

2.1.3.2 Biyolojik Yöntemler

Karmaşık organik moleküllerin mikrobiyolojik arıtımına ilişkin bilimsel çalışmalar, 1950'lerde I.C. Gunsalus tarafından aromatik bileşiklerin ve terpenoidlerin çevresel bakteriler kullanılarak dönüştürülmesi ile başlamıştır (Steffan 2019). Biyolojik yöntemler (örneğin biyoremediyasyon ve fitoremediyasyon), çeşitli avantajlarından dolayı son yıllarda daha ilgi çekici hale gelmiştir. Fitoremediyasyon, topraktaki kirletici maddeleri sabitlemek veya absorbe etmek için yeşil bitkilerin ve köklerinin kullanıldığı bir giderim yaklaşımıdır. Bu yaklaşımda, kirletici maddelerin parçalanmasına yardımcı olmak için bitki köklerinde bulunan enzimlerden faydalanılır. Bu rizosferik enzimler sayesinde, topraktaki kirletici madde konsantrasyonu azalarak, bu kirleticilerin çevre ve insan sağlığına yönelik oluşturduğu riskler azaltılmış olur (Elijah 2022). Ancak, fitoremediyasyon yavaş bir iyileştirme stratejisidir ve uzun vadeli temizleme için uygundur. Ayrıca bu yöntem, kirletici maddelerin türü ve konsantrasyonu, su içeriği, toprağın kimyasal özellikleri ve fototoksik etkilere karşı bitki direnci gibi iç ve dış parametreler ile ekolojik ve iklim koşullarından da etkilenir (Lim ve diğ. 2016).

Biyoremediyasyon, kirleticileri parçalamak/detoksifiye etmek için canlı organizmaların kullanılması olarak tanımlanabilir. Bu yöntem verimli, ekonomik, çok yönlü ve çevreye duyarlı bir tekniktir (Varjani 2017). Biyoremediyasyon, mikroorganizmaların organik molekülleri asimile ederek hücre biyokütlesini arttırdığı ve bu yolla karbondioksit, su ve ısı gibi yan ürünler ürettiği doğal iyileştirme süreci olarak da tanımlanabilir (Dave ve Ghaly 2011). Biyoremediyasyon, kirliliğin geniş bir bölgeyi etkilediği veya kirli numunenin taşınmasının mümkün olmadığı durumlarda *in situ* veya uygun bir şekilde donatılmış bir tesiste *ex situ* olarak gerçekleştirilebilir (Ganesan ve diğ. 2022). Bu durumda, biyoremediyasyon aşağıdaki gibi çeşitli alt gruplara ayrılabilir;

a- Biyo-zayıflatma (temelde kirlenmiş alandaki yerli mikroorganizmaların hiçbir müdahale olmaksızın arıtmayı yapması)
b- Biyo-uyarım (sınırlayıcı besin eklenmesi)
c- Biyo-güçlendirme (hedef kirleticinin bozunma hızını artırmak için mikrobiyal türlerin aşılanması)
d- Biyo-adsorpsiyon (mikrobiyal biyokütle üzerindeki kirletici maddesinin biyolojik olarak zararsız bir biçimde yakalanması)

Sonuçta, her durumda mikroorganizmaların degradasyon yeteneklerinden faydalanılmaktadır (Steffan 2019). Mikroorganizmalar büyüme ortamına duyarlıdır ve biyolojik bozunma etkinlikleri çeşitli değişkenlerden etkilenebilir. Mikroorganizmaların biyodegradasyon oranları; kirleticinin fizikokimyasal özelliklerine (yararlığı, uçuculuğu, hidrokarbonun türü ve uzunluğu), çevre koşullarına (pH, sıcaklık, besin, tuzluluk, oksijen vb.) ve mikroorganizmaların metabolik yolakları gibi birçok faktöre bağlıdır (Varjani 2017).

2.1.4 Alkanların Biyodegradasyonu

Alkanlar veya *n*-alkanlar, çeşitli çevresel sistemlerde, petrol bazlı ürünlerde ve ham petrol gibi doğal kaynaklarda yaygın olarak bulunurlar (Liu ve diğ. 2020). *n*-alkanlar genellikle çevresel sistemlerde yoğun olarak bulunmayacağı gibi; petrol sızıntıları, biyoremediyasyon, enerji kaynağı olarak kulanım gibi dolaylı yollarla çevreye yayılabilirler. Petrol sızıntıları, *n*-alkan molekülerinin çevreye yayılmasında

en önemli faktörlerden birisidir (Varjani 2017). Bu gibi etkenlerle çevreye yayılan alkan molekülleri sucul ekosistemleri etkileyebilmektedir. Sucul sistemlere yayılan bu tür bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması için ise biyodegradasyon ve fiziksel ayrışma süreçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doğada hem aerobik hem de anaerobik birçok mikroorganizma, çeşitli alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilir (Rojo 2009). Bu nedenle, biyodegradasyon işlemi yapılarak alkan molekülleri ortamdan doğal süreçlerle ve etkili bir şekilde uzaklaştırılabilir.

Alkanlar, petrol kaynağına bağlı olarak ham petrolün önemli bir kısmını (>%50) oluştururlar. Alkanlar doymuş hidrokarbonlardır ve apolar moleküller olarak kimyasal açıdan çok durağandırlar (inört). Alkanlar modern yaşam için gereklidirler, ancak durağan özellikleri nedeniyle çevreye salındıklarında ciddi ekolojik sorunlar yaratır. Mikroorganizmalar, alkanları karbon kaynağı olarak kullanmak için spesifik enzimler ve metabolik yollar içeren etkili stratejiler geliştirmişlerdir (Singh 2012). Bakteriler, filamentli funguslar ve mayaları içeren bir grup mikroorganizmanın alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak parçaladığı bildirilmiştir (van Beilen ve diğ. 2003; Wentzel ve diğ. 2007).

Bakteriler, petrol kirleticilerinin parçalanmasında birincil parçalayıcılar ve en aktif biyolojik ajanlar olarak rapor edilmiştir (Abbasian ve diğ 2015; Meckenstock ve diğ. 2016; Varjani 2017). Ayrıca, bazı bakteri türlerinin hidrokarbonları ayrıştırma konusunda oldukça uzmanlaşmış olduğundan, bu bakteriler hidrokabonaklastik bakteriler olarak adlandırılmıştır (Singh, 2012). Hidrokarbonaklastik bakteriler, hidrokarbonların varlığını tolere etmek için onları emülsifiye etme ve metabolize etme yeteneği, DNA onarım mekanizmalarının aktivasyonu, çoğunluk algılama (quorum sensing) ve biyofilm mekanizmalarında yer alan moleküllerin üretimi ve hücre içindeki hidrokarbon konsantrasyonunu kontrol etmek için dışa akış pompalarının ve gözeneklerin düzenlenmesi gibi mekanizmalar geliştirmiştir (Pandolfo ve diğ. 2023). Alkan parçalayan bakterilere örnekler Tablo 2.1'de verilmiştir.

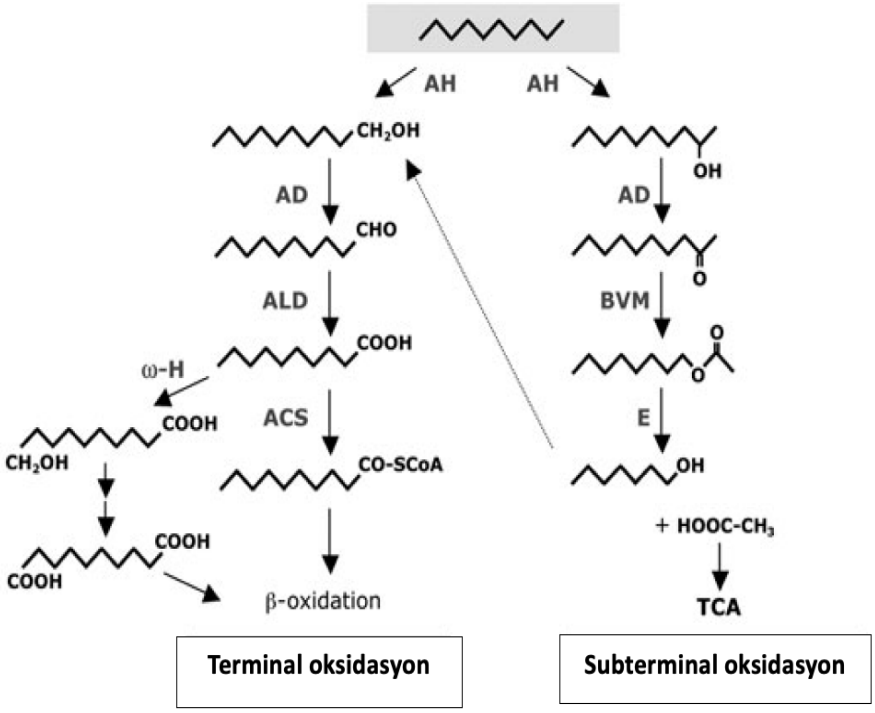
Tablo 2.1: Alkan parçalayan bakteri örnekleri

Bakteriler	**Referanslar**
Stenotrophomonas sp. *Acinetobacter* sp. *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp.	Stancu (2023)
Pseudomonas mendomanas	Balakrishnan ve diğ. (2022)
Bacillus subtilis *Pseudomonas putida*	Titah ve diğ. (2021)
Entrobacter ludwigii *Enterobacter mori* *Acinetobacter baumannii* *Cedecea davisae*	Jerin ve diğ. (2021)
Pseudomonas sp. *Acinetobacter* sp.	Diallo ve diğ. (2021)
Cobetia sp. *Shewanella* sp. *Alcanivorax* sp. *Cellilosimicrobium* sp.	Ansari ve diğ. (2021)
Rhodococcus rhodochrous *Nocardia farcinica*	Rodrigues ve diğ. (2020)
Ochrobactrum oryzae *Paenibacillus lautus*	Samaei ve diğ. (2020)
Pseudomonas stutzeri *Bacillus* sp. *Paenibacillus lautus*	Mauricio-Gutiérrez ve diğ. (2020)
Brevibacillus parabrevis	Bao ve diğ. (2012)
Rhodococcus qingshengii *Rhodococcus erythropolis*	Iminova ve diğ. (2022)
Rhodococcus erythropolis	de Carvalho (2012) Kawagoe ve diğ. (2019) Stancu (2015)
Rhodococcus qingshengii	Huang ve diğ. (2023)
Rhodococcus ruber	Bicca ve diğ. (1999)
Paenibacillus sp. *Cupriavidus* sp. *Gordonia* sp. *Lysinibacillus* sp.	Ibrar ve Zhang (2020)
Brevibacillus parabrevis	Chen ve diğ. (2021) Behnami ve diğ. (2018) Wani ve diğ (2023)
Paenibacillus sp.	Jimoh ve Lin (2022)
Pseudomonas stutzeri	Parthipan ve diğ. (2017)

2.1.4.1 Alkan Degradasyonunda Etkin Enzimler ve Fonksiyonel Genler

Hidrokarbon parçalanması bakterilerde aerobik veya anaerobik şartlar altında gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, oksijen konsantrasyonu hidrokarbon bozunma oranlarını etkilemektedir. Oksijenin son elektron alıcısı olması nedeniyle aerobik

koşullar altında gerçekleşen biyodegradasyon daha hızlı ve daha etkilidir. Anaerobik koşullar altında ise son elektron alıcısı oksijen dışında nitrat, sülfat veya demir molekülleri olabilir ve bu nedenle biyodegradasyon daha yavaş ve uzun sürede gerçekleşir. Aerobik koşullar altındaki bozunma ile karşılaştırıldığında genellikle anaerobik bozunmanın ihmal edilebilir olduğu bildirilmiştir (Pandolfo ve diğ. 2023). Hidrokarbonların biyodegradasyonu terminal ve subterminal metabolik yolaklara ayrılan çok sayıda reaksiyon ile gerçekleşmektedir. İki ya da daha fazla karbon atomu içeren *n*-alkan moleküllerin aerobik bozunması genellikle birincil alkol oluşturmak için bir terminal metil grubunun oksidasyonu ile başlar, bu da karşılık gelen aldehite oksitlenir ve son olarak yağ asidine dönüşür. *n*-alkanların subterminal aerobik bozunmasında oluşan ürün; ikincil bir alkol, karşılık gelen ketona dönüştürülür ve daha sonra Baeyer-Viliger monooksijenaz tarafından bir ester oluşturmak için oksitlenir. Ester, bir esteraz tarafından hidrolize edilerek bir alkol ve bir yağ asidi üretilir (Şekil 2.3). Hem terminal hem de subterminal oksidasyon bazı mikroorganizmalarda bir arada bulunabilir (Rojo 2009).



Şekil 2.3: *n*-alkanların terminal ve subterminal oksidasyonu (Rojo, 2009'dan uyarlanmıştır)

Alkan parçalanmasında önemli bir mekanizma, terminal metil grubunun oksidasyonudur. Birçok enzim hidrokarbon bozunmasında rol oynar. Alkan parçalayan mikroorganizmalar alkan hidroksilazlar için birden fazla gene sahip olsalar da çok çeşitli alkanları parçalama konusunda oldukça yetkinlerdir (Parthipan ve diğ. 2017). Alkan degradasyonundan sorumlu üç enzim vardır. Kısa zincirli alkanları (C1-C4) parçalayan suşlar metan monooksijenazlarla ilişkili enzimlere sahiptirler. Orta zincir uzunluğundaki alkanları (C5-C11) veya uzun zincir uzunluğundaki alkanları (>C12) parçalayan suşlar, alkan hidroksilaz ile ilgili integral membranı hem içermeyen demir monooksijenazlara sahiptir. Bununla birlikte, bazı bakteriler C5-C11 alkanlarını hidroksilleyen çözülebilir formda sitokrom P450 ailesine ait enzimler içermektedir (Rojo 2009). Olası flavin bağlayıcı monooksijenaz (AlmA) enzimi ve uzun zincirli alkan monooksijenaz (LadA) enzimi, uzun zincirli alkanların oksidasyonunda rol oynamaktadır (Sui ve diğ. 2021). Alkan hidroksilazlar alkan parçalanmasında görev alan ilk enzimlerdir. Bir integral membran (AlkB) proteini, bir rubredoksin (AlkG) proteini ve bir rubredoksin redüktaz (AlkT) proteini olmak üzere üç proteinin bileşiminden oluşur. Son ikisi elektronları NADH'den monooksijenaza aktaran çözünür proteinlerdir (Rojo 2009). Alkan monooksijenaz için *alk*B geni, katekol dioksijenaz için *xyl*E geni ve naftalin dioksijenaz için *nah*Ac geni hidrokarbon kirleticilerin biyodegradasyonunda rol oynayan başlıca genlerdir (Varjani 2017).

2.2 Biyosürfaktanlar

Biyosürfaktanlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve geniş bir uygulama alanına sahip yüzey aktif özellikli biyomoleküller olarak tanımlanabilir (Vijayakumar ve Saravanan 2015). Yapısal olarak bir asit, peptit katyonları veya anyonları, mono-, di- veya polisakkarit içeren hidrofilik bir kısım ve doymamış veya doymuş hidrokarbon zincirleri veya yağ asitlerinden oluşan hidrofobik bir kısımdan oluşular. Bu yapılar, sıvılara yüzey ve ara yüzey gerilimini düşürme ve iki farklı faz arasında miseller ve mikroemülsiyonlar oluşturma yeteneği de dahil olmak üzere çok çeşitli özellikler kazandırırlar (Mulligan ve diğ. 2014). Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK), en düşük yüzey gerilimini elde etmek için gereken minimum sürfaktan konsantrasyonu olarak tanımlanır. KMK değerlerine ulaşıldıktan sonra, daha fazla sürfaktan ilavesi yüzey geriliminde daha fazla bir azalma sağlamayacaktır (Sarubbo ve diğ. 2022).

KMK'nun altında, yüzey aktif maddeler monomer formundayken, KMK'da yüzey aktif maddeler miseller oluşturmaya başlar. Bu sayede iletkenlik, vizkozite, yoğunluk gibi çeşitli fiziksel özelliklerin değişmesine neden olur (Satpute ve diğ. 2010). Düşük KMK değerine sahip yüzey aktif maddeler, daha yüksek KMK değerine sahip olanlara kıyasla uygulamalı kullanım için daha avantajlı olarak değerlendirilmektedir (Sarubbo ve diğ. 2022).

Yüzey aktivitesi biyosürfaktanlar için önemli bir özelliktir. Bir biyosürfaktanı karakterize etmenin en iyi yolu; sıvıların molekülleri arasındaki çekim kuvvetini ölçmek, dolayısıyla yüzey aktif maddeyi yüzey ve ara yüzey gerilimlerini etkileme kabiliyetine göre değerlendirmektir. Etkili biyosürfaktanlar, farklı polar yapıdaki moleküller arasındaki etkileşimleri kolaylaştırarak yüzey gerilimlerini düşürürler (Sarubbo ve diğ. 2022). Biyosürfaktanların bir diğer önemli özelliği de emülsifikasyon aktiviteleri, sıvıları birbiri içinde dağıtmaları, yağ ve su gibi birbirine karışmayan iki sıvının emülsiyon oluşturmasını sağlamalarıdır (Aydın 2018). Biyosürfaktanların; yüzey hareketleri, pH, sıcaklık ve iyonik özelliklere dayanıklılık, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük toksisite, emülsifiye ve demülsifiye etme kapasiteleri ve antimikrobiyal etkileri gibi özellikleri de vardır (Roy 2017). Biyosürfaktanların üç ana işlevine göre kullanımı vardır:

a) Hidrofobik substratların yüzey alanını artırmak için kullanılırlar.
b) Çözünürleştirme/ desorpsiyon yoluyla hidrofobik substratların biyoyararlanımını arttırmak için kullanılırlar.
c) Mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını ve yüzeylerden uzaklaştırılmasını düzenlerler (Vijayakumar ve diğ. 2015).

Bu özelliklerinden dolayı biyosürfaktanlar, hidrofobik suda çözünmeyen substratların yüzey alanını ve hidrofobik bileşiklerin biyoyararlanımını arttırarak biyoremediyasyonda rol oynadığı belirtilmiştir (Steffan 2019). Ayrıca bir mikroorganizma hidrofobik bir ara yüzle karşılaştığında; biyosürfaktanların haraketlilik, bakteriyel hücre sinyali, biyofilm oluşumu, hücresel farklılaşma, substrat erişimi ve bakteriyel patojenez gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller üstlendiği görülmektedir (Mulligan ve diğ. 2014). Kimyasal veya sentetik sürfaktanlar ile karşılaştırıldığında, biyosürfaktanlar biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyouyumluluk ve sindirilebilirlik gibi çeşitli avantajlara sahiptirler. Ayrıca, farklı

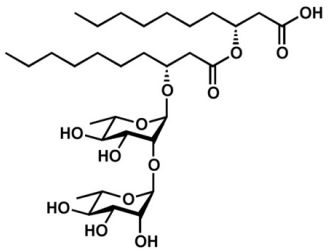
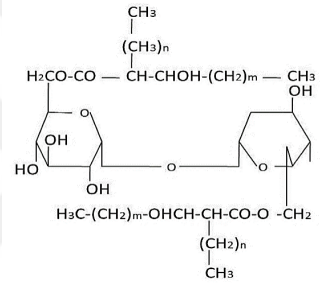
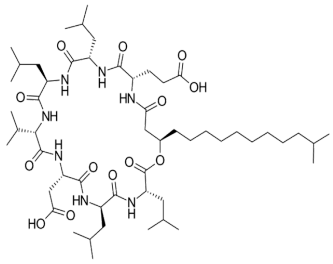
özellikleri ve etkinlik açısından geniş substrat aralığı, onları ticari uygulamalar için uygun hale getirmiştir (Roy 2017). Biyosürfaktanlar, endüstriyel atıkların biyolojik olarak parçalanması ve detoksifikasyonu yoluyla çevre temizliğinde ve kirlenmiş toprağın biyoremediyasyonunda kullanılabilir. Özgünlükleri ve ham maddelerin bulunabilirliği ile biyosürfaktanlar süreç içerisinde en çok tercih edilen yüzey aktif maddeler haline getirmiştir (Vijayakumar ve Saravanan 2015).

2.2.1 Biyosürfaktanların Sınıflandırılması

Biyosürfaktanlar, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı olmak üzere iki ana kategoride gruplandırılır. Düşük moleküler ağırlıklı biyosürfaktan bileşikleri; lipopeptitler, glikolipidler ve proteinlerden oluşur. Yüksek moleküler ağırlıklı biyosürfaktan bileşikleri ise polisakkaritler, lipopolisakkarit proteinleri ve lipoproteinlerdir. Bu yüksek moleküler ağırlıklı biyosürfaktanlar emülsanlar veya biyoemülsifiyerler olarak adlandırılmaktadır (Moutinho ve diğ. 2021; Mulligan ve diğ. 2014). Glikolipidler, uzun zincirli alifatik asitlerle birlikte karbonhidratları içeren ve üzerinde en çok çalışılan düşük molekül ağırlıklı biyosürfaktanlardır (Tablo 2.2). Glikolipidler fermentasyon sırasında kirletici hidrokarbonu (örneğin tetradekan, alifatik ve aromatik hidrokarbon) çözebilir ve hidrokarbonlu bileşikleri mikroorganizmalar için substrat olarak kullanılabilir hale getirebilir. Ramnolipidler, soforolipidler, trehalolipidler vb. glikolipid grubuna ait biyosürfaktan türleridir (Sayyed ve diğ. 2021). *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen ramnolipidler, Jeneil Biosurfactant (ABD) şirketi tarafından tarımsal amaçlı ve biyoremediyasyon faaliyetleri için ticarileştirilmiştir (Banat ve diğ. 2010). Lipopeptid veya lipoprotein biyosürfaktanlar, bir polipeptid zincirine bağlı lipitten oluşan (Vijayakumar ve Saravanan 2015), yüksek molekül ağırlıklı biyosürfaktanlardır. Doğada amfifilik karakterdedir ve sadece fungal türler (*Aspergillus* vb.) tarafından değil, aynı zamanda bakteri türleri (*Streptomyces*, *Pseudomonas, Bacillus* vb.) tarafından da üretilir (Sayyed ve diğ. 2021). Bu grubun en iyi bilinen örnekleri sürfaktinlerdir. Sürfaktinlerden halkasal lipopeptid sürfaktin molekülü lakton bağlantısı yoluyla yağ asidi zincirine bağlanmış yedi aminoasitli halka yapısından oluşan en güçlü biyosürfaktanlardan biridir (Vijayakumar ve Saravanan 2015). Surfaktin dışında iturin

ve fengisin de halkasal bileşik grubuna ait lipopeptid biyosürfaktanlardır (Sayyed ve diğ. 2021).

Tablo 2.2: Biyosürfaktan türleri ve özellikleri

Sınıfı	Molekül şekli	Kimyasal yapısı	Üretici türler
Glikolipid	 Ramnolipid	Bir veya iki ramnoz molekülü bir veya iki yağ asidi zincirine glikozit bir bağ ile bağlanmıştır.	*Pseudomonas aeruginosa* (Dobler ve diğ. 2016; Shatila ve diğ. 2020) *Pseudomonas putida* (Amézcua-Vega ve diğ. 2004)
	 Trehalolipid	Bu tür biyosürfaktanlar C-6 ve C-69 pozisyonlarında trehaloz disakkaritine bağlı mikolik asit içerir.	*Rhodococcus* sp. (Andreolli ve diğ. 2023) *Rhodococcus erythropolis* (Retamal-Morales ve diğ. 2018)
Lipopeptit	 Sürfaktin	Hidrofilik kısımdaki aminoasit dizisi, bir yağ asidi zincirinin karboksil ve hidroksil gruplarına bağlanır.	*Bacillus subtilis* (Ramirez ve diğ. 2015) *Brevibacillus parabrevis* (Haddad ve diğ. 2008) *Paenibacillus* sp. (Jimoh ve Lin 2022)

Ayrıca, bazı bakteri ve mayalar, *n*-alkanlar üzerinde büyümeleri sırasında büyük miktarlarda yağ asitleri ve fosfolipid biyosürfaktan üretirler (Vijayakumar ve Saravanan 2015). Yağ asidi türü biyosürfaktanlar; evsel uygulamalar, kozmetikler ve ticari amaçlar açısından önemlidir. Fosfolipidler; sıvı ve pulmoner hava arası karışmayan ara yüzeyde düşük yüzey gerilimini koruyan protein bileşiğiyle birlikte akciğer sürfaktanının önemli bileşenidir. Nötral lipidler; yine akciğer sürfaktanının önemli bir bileşeni olarak hava-su ara yüzeyinin altında akciğerde solunum işini

sürdüren ve alveollerin kaplanmasını önleyen dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) oluşumuna yardımcı olur (Sayyed ve diğ. 2021). Polimerik biyosürfaktanlar; *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Paracoccus, Pedobacter, Rahnella* ve *Sphingobium* gibi mikroorganizma cinsleri tarafından üretilen hücre dışı polimerlerdir. Bu tür biyosürfaktanlar hidrofobik substratların (hidrokarbon bileşikleri) emülsifikasyonunda, düşük pH'da vizkozitenin artmasında ve mikrobiyal etkileşimlerde rol oynar (Perfumo ve diğ. 2010). Partiküler biyosürfaktanlar, hidrokarbonların mikrobiyal gideriminde önemli bir rol oynar ve kimyasal olarak protein, fosfolipid ve lipo-polisakkarit bileşiğidir. Mikroemülsiyonlar şeklinde hidrokarbonların bölümlere ayrılması için hücre dışı membran vezikülleri oluştururlar. Bu tür biyosürfaktanların *Acinetobacter* türleri tarafından üretildiği bilinmektedir (Chakrabarti 2012).

2.2.2 Biyosürfaktanların Uygulama Alanları

Biyosürfaktanların biyolojik iyileştirme ve petrol sızıntılarının dağıtılması, gelişmiş petrol geri kazanımı ve petrol transferi gibi pek çok çevresel uygulaması bulunmaktadır. Biyosürfaktanlar potansiyel olarak gıda, kozmetik, sağlık endüstrileri yanında hem endüstriyel hem de tarımsal kökenli toksik kimyasalların temizliği ile ilgili alanlarda da kullanılmaktadır (Sayyed ve diğ. 2021). Birçok biyosürfaktan antibakteriyel, yapışmayı önleyici ve enzim inhibe edici nitelikleri nedeniyle tıp ve eczacılık sektörlerinde çeşitli tedavi edici amaçlar için kullanılmaktadır (Markande ve diğ. 2021).

Son yıllarda COVID-19 yönetimi için biyosürfaktanların temizleyici, dezenfektan, antivirüs ve anti-enflamatuar olarak kullanımı araştırılmıştır. Bu konuda yapılan bir araştırmaya göre, soforolipidlerin SARS-CoV-2 virüsü ile mücadelede tedavi edici ajanlar olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Daverey ve diğ. 2021). Ayrıca, biyosürfaktanların tedavi edici nitelikleri nedeniyle, antiviral etkisinin yanı sıra; bağışıklık düzenleyici, anti-kanser, yara iyileşmesi ve diğer bazı durumların tedavisinde de yararlı olabileceği belirtilmiştir (Kumari ve diğ. 2023).

Biyosürfaktanlar deterjan olarak, kozmetik endüstrisinde ıslatıcı, emülsifiye edici, köpürtücü ve çözdürücü ajanlar olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca şampuan, saç

kremi, sabun, duş jeli, diş macunu, krem, nemlendirici, temizleyiciler ve diğer birçok cilt bakım ve sağlık bakım ürünlerinde bulunmaktadır (Singh ve diğ. 2022). Glikolipid ve lipopeptit biyosürfaktanlar daha genel olarak düşük toksisite seviyesine, antimikrobiyal ve dermatolojik nemlendirme özelliklerine sahiptir. Bu durum onları son zamanlarda kozmetik ve kişisel cilt bakım ürünleri için talep edilen biyomaddeler haline getirmiştir (Adu ve diğ. 2020).

Gıda endüstrisinde biyosürfaktanlar yüzey ve ara yüzey gerilimini düşürmenin yanı sıra, emülsiyonların oluşumu ve stabilizasyonu için de kullanılmaktadır (Adetunji ve Olaniran 2021). Ramnolipid biyosürfaktanların eklenmesiyle hamurun kararlı hale getirilmesinde, hacminde, dokusunda ve korunmasında iyileşme olduğu tespit edilmiştir (van Haesendonck ve Vanzeveren 2004). Başka bir çalışmada ise *Candida utilis* ve *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen biyoemülgatörlerin salata soslarında ve gıda ürünlerindeki emülsiyonların kararlı hale getirilmeleri için kullanıldığı bildirilmiştir (Campos ve diğ. 2015).

Biyosürfaktanlar, temiz ve verimli bir tarımsal çevrenin korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Ramnolipidler, soforolipidler ve lipopeptidler gibi biyosürfaktanlar, tarımsal toprağın kalitesini artırmaya yardımcı olur ve aynı zamanda besin olarak da hizmet eder (Araujo ve diğ. 2019). Biyosürfaktanların uygulanması, mahsullerin mikrobiyal enfeksiyondan ve diğer birçok tarımsal zararlıdan korunmasına yardımcı olmaktadır (Rawat ve diğ. 2020). Biyosürfaktan üreten mikroorganizmaların dizel ile kirlenmiş ortamlara uygulanmasıyla, hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırdığını, bu sayede kirleticilerin biyodegradasyon verimliliğini arttırdığı bildirilmiştir (Xia ve diğ. 2019). Böylece, ek işlem gerektirmeden daha az maliyetle kirliliğin ortadan kaldırıldığı belirtilmiştir (Adetunji ve Olaniran 2021). Literatürde özellikle *Pseudomonas, Klebsiella, Meyerozyma, Bacillus, Rhodococcus, Acinetobacter, Staphylococcus* ve *Achromobacter* cinslerine ait bakteri türleri ile *Trichoderma, Aspergillus, Agrocybe* ve *Candida* gibi fungus cinslerinin organik kirleticileri biyosürfaktan üreterek parçaladığı rapor edilmiştir (Sanchez ve diğ. 2021). Hu ve diğ. (2020), *Rhodococcus erythropolis* HX-2 tarafından üretilen biyosürfaktanın hidrofilik bir bileşiğin çözünürlüğünü arttırdığı; bunun da petrolün biyodegradasyonunu hızlandırdığını bildirmiştir. *Rhodococcus* sp. tarafından üretilen trehalolipid biyosürfaktanlar, rezervuarlardan

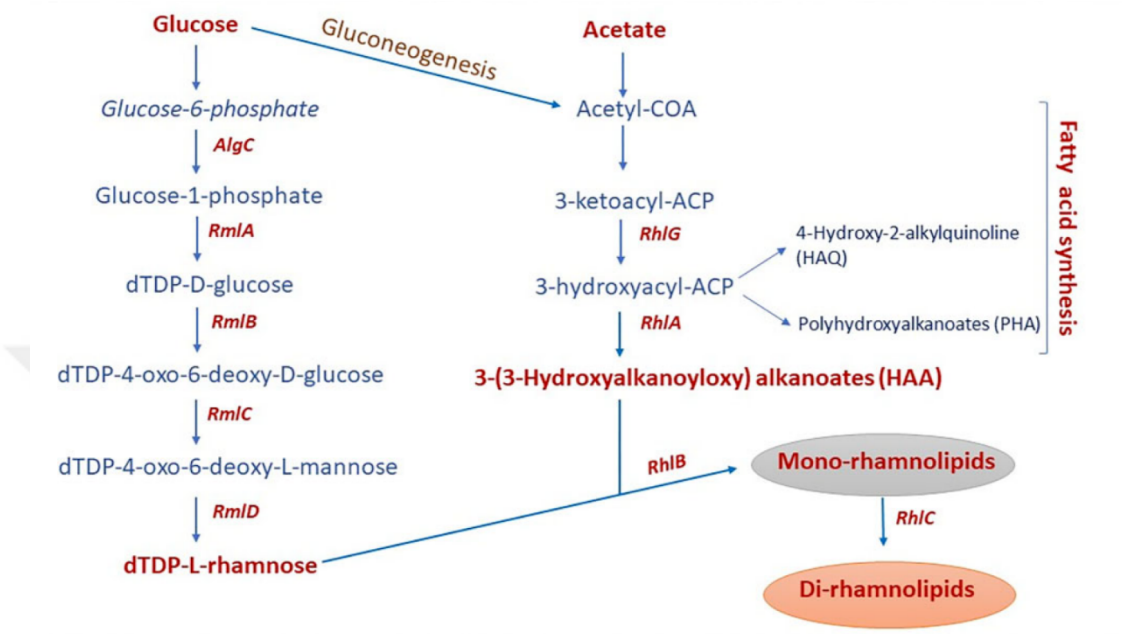
petrol geri kazanımında ve petrolle kirlenmiş toprakların biyoremediyasyon protokollerinde emülsifiye edici bileşikler olarak yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca, trehalolipidler anti-viral, antimikrobiyal, anti-kanser veya immün sistem düzenleyici faktör olarak tıbbi alanlarda kullanım potansiyelinin olabileceği bildirilmiştir (Franzetti ve diğ. 2010; Mnif ve diğ. 2018).

2.2.3 Biyosürfaktanların Mikrobiyal Sentezi

Biyosürfaktan türlerinin sentezlenmesinde gerçekleşen metabolik yol izleri birbirlerinden farklıdır. Mikroorganizmalar biyosürfaktanların hidrofilik ve hidrofobik kısımlarını oluşturmak için ayrı yolaklar kullanır ve bunları daha sonra birleştirirler (Theatre ve diğ. 2021). Mikroorganizmalar tarafından büyüme için kullanılan biyosentetik yol karbon kaynağına bağlıdır. Örneğin, tek karbon kaynağı olarak karbonhidratların kullanıldığı glikolipid biyosentezi sırasında hem lipojenik hem de glikolitik yollar sırasıyla lipid kısmını ve hidrofilik kısmı sentezlemek için karbon akışını kullanır (Sanchez 2022). Biyosürfaktanların sentezinde birçok substrat yer alır. Üretimleri pH, stres, düşük azot konsantrasyonu ve çalkalama oranlarındaki değişikliklerden etkilenir ve lipofilik maddelerin varlığı ile indüklenir (Kumari ve diğ. 2023). *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* bakterileri tarafından üretilen biyosürfaktanlardan ramnolipid ve sürfaktin moleküllerinin metabolik yol izleri ve biyosentez mekanizmaları kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Sanchez 2022; Tepebaşı 2017).

Ramnolipid üreten suşlar çoğunlukla *Pseudomonas* cinsine aittir ve en çok bildirilen tür *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* toplam ramnolipid üretiminin yaklaşık %50-60'ına katkıda bulunur. Literatürde rapor edilmiş bazı *Pseudomonas* sp. suşları; *Pseudomonas guguanensis, Pseudomonas azotoformans* AJ15, *Pseudomonas pachastrellae* LOS20, *Pseudomonas aeruginosa* OG1, *Pseudomonas indica* MTCC 3714, *Pseudomonas putida* BD2, *Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas luteola, Pseudomonas cepacian, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas chlororaphis* olarak karşımıza çıkmaktadır (Sayyed ve diğ. 2021). Ramnolipidler bir veya iki *β*-hidroksil (3-hidroksi) yağ asidinin karboksil ucuyla bir veya iki ramnoz şeker

molekülüne bağlanmasıyla oluşur (Şekil 2.4). Buna dayanarak ramnolipidler monoramnolipid; hamnosil-*β*-hidroksidekanoil-*β* hidroksidekanoat (Rha-C10-C10) ve diramnolipid; ramnozil-ramnozil-*β*-hidroksidekanoil-*β* hidroksidekanoat (Rha Rha-C10-C10) olarak sınıflandırılırlar (Shatila ve diğ. 2020).

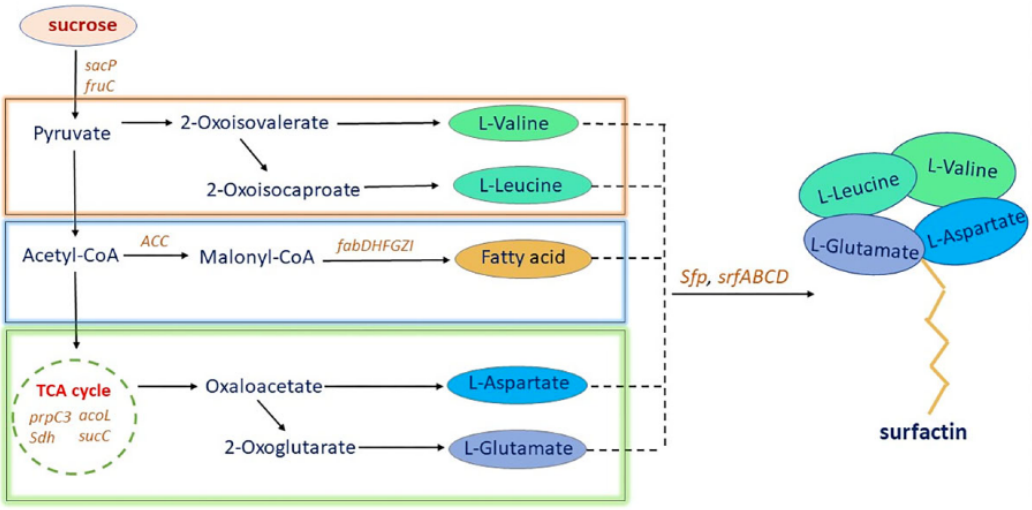


Şekil 2.4: *Pseudomonas* cinsinde biyosürfaktan ramnolipid sentez yol izi (Kumari ve diğ. 2023)

Ramnolipidler, glikoziltransferaz birimleri olarak ramnoziltransferaz I ve ramnoziltransferaz II tarafından sırasıyla monoramnolipidler ve diramnolipidler olarak katalizlenirler (Sayyed ve diğ. 2021). Ramnolipid üretiminden sorumlu anahtar enzimler *rhl*ABC genleri tarafından kodlanır. *rhl*A *β*-hidroksil yağ asitlerinin sentezinde rol oynarken, *rhl*B yağ asitlerini monoramnolipidleri sentezlemek için TDP-l-ramnoz ve *β*-hidroksil yağ asitlerini katalizler. Öte yandan, *rhl*C, di-ramnolipidlerin oluşumunu katalizleyen ramnoziltransferaz-2 (*Rhl*C) enzimini kodlar (Zhao ve diğ. 2018). Ramnolipid biyosentezinden sorumlu *rhl*ABC genleri çoğunlukla *Pseudomonas* sp. ve *Burkholderia* sp. türlerinde bulunur. Ancak ramnolipidleri daha güvenli bir şekilde üretmek için patojenik olmayan konakçı bakterilere metabolik ekleme yapılarak sentez gerçekleştirilebilir (Sayyed ve diğ. 2021). Diğer bir glikolipid türü olan trehaloz lipidler, birkaç yağ asitinin açillenmiş şeker halkalarına ester bağları ile bağlanması sonucu oluşur. Diğer biyosürfaktanlardaki uzun zincirli yağ asitleri ile karşılaştırıldığında, trehalozlardaki yağ asiti zincirleri genellikle kısadır (Zaragoza ve diğ. 2013). Trehaloz lipidler, benzersiz yüzey özelliklerine ve geniş biyolojik

aktivitelere sahip olmanın yanı sıra; düşük KMK, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük toksisite gibi diğer olumlu özelliklere de sahiptir (Mulligan ve diğ. 2014). *Rhodococcus* en iyi trehaloz lipid üreticisi organizmalardan biridir. Bu cinste monokorinomikolatlar, dikorinomikolatlar ve trikorinomikolatların yanı sıra, trehaloz tetraester ve süksinoil trehaloz lipid türlerinin varlığı da rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2019). Trehaloz biyosentezi farklı enzimler içeren üç biyokatalik yolla gerçekleştirilir: (i) trehaloz-6-fosfat sentaz ve trehaloz-6-fosfat fosfataz, (ii) maltooligozil trehaloz sentaz ve maltooligozil trehaloz trehalohidrolaz ve (iii) trehaloz sentaz (Agarwal ve Singh 2022). *Rhodococcus qingshengii* türünde trehaloz biyosürfaktan üretimi için; trehaloz-6-fosfat sentaz enzimi üretiminde *ots*A geninin, trehaloz-6-fosfat fosfataz enzimi üretiminde *ots*B geninin, maltooligozil trehaloz sentaz enzimi üretiminde *tre*Y ve maltooligozil trehaloz trehalohidrolaz enziminin üretiminde ise *tre*Z geninin sentezden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Markova ve diğ. 2023).

Sürfaktin, halkasal lipopeptitlerin çoğundan farklı olarak, ribozomal olmayan peptit sentaz (NRPS) olarak bilinen bir mekanizma ile üretilir. NRPS'yi oluşturan dört modül SrfA-A, SrfA-B, SrfA-C ve SrfA-D olup, bunlar yedi modülden oluşan doğrusal bir düzen oluşturur (Şekil 2.5). Her modül bir aminoasidin birleştirilmesinden sorumludur (Kumari ve diğ. 2023). SrfA-A ve SrfA-B ürünleri üç modül içerir ve SrfA-C sonuncusunu içerir. Bundan sonra, yağ asidi zinciri ilk modülde aktive edilen aminoaside eklenmiş halde bulunmaktadır. Ek olarak, son aktivasyon peptidil taşıyıcı protein (PCP) alanının C-terminal ucu ile kaynaşmış olan tiyoesteraz, sentezlenen ürünün enzimatik şablondan salınmasından sorumludur. İkinci tiyoesteraz/açiltransferaz (Te/At-domain) olarak bilinen dördüncü gen SrfA-D ise biyosentez sürecinin başlamasını uyarır (Sayyed ve diğ. 2021).



Şekil 2.5: Tek karbon kaynağı olarak sükroz varlığında *Bacillus* sp. tarafından gerçekleştirilen sürfaktin biyosentezi (Kumari ve diğ. 2023)

Peptit sentetaz modüllerinin dizisi, nihai peptit ürününün dizisi ile tutarlıdır ve her modül, büyüyen peptit zincirine belirli bir aminoasidi ekleyen veya değiştiren çeşitli domainlere sahiptir (Kashif ve diğ. 2022).

2.3 Kemotaksi

Hidrokarbon degradasyonu genellikle yağ/su temas noktalarında meydana gelir. Yağ/su teması mikrobiyal faaliyetler için elverişli koşullar sağlar. Hidrokarbonların yağ damlacıkları vasıtasıyla taşınması ile metabolizma için gereken elektron vericileri bol miktarda tedarik edilirken, mikrobiyal büyüme için gereken inorganik maddeler su akışı veya difüzyon yoluyla yağ/su teması üzerindeki biyosfere taşınabilir (Liang ve diğ. 2021). Birçok bakteri besin maddelerine veya toksik maddelere doğru yönlendirilmiş bir çeşit hareket özelliği sergiler (Lanfranconi ve diğ. 2003). Bakterilerin çevrelerindeki kimyasal gradyanları algılama, çekici bir maddenin kaynağına doğru hareket etme veya itici bir maddenin kaynağından uzağa doğru hareket etme yeteneği bakteriyel kemotaksi olarak adlandırılır (Ditty ve Parales 2017). Bakterilerde kemotaksiye aracılık eden moleküler mekanizma, diğer tüm bakteriyel sinyal iletim sistemlerinden çok daha karmaşıktır (Darias ve diğ. 2014). Kemotaksi, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerinde kapsamlı bir şekilde

çalışılmıştır (Ditty ve Parales 2017). Bu bakterilerdeki kemotaktik hareketler bir histidin kinazın aracılık ettiği en iyi bilinen sinyal iletim sistemini temsil etmektedir. Bu sinyal iletim sisteminin, ışık ve kimyasallara yanıt veren arkeler gibi kamçılı bakteriler ve kayarak hareket eden kamçısız bakterilerdeki sistemler ile oldukça korunmuş olduğu gösterilmiştir (Lanfranconi ve diğ. 2003). Bakteriyel kemotaksi sistemi, hücre dışı kimyasalları tanıyan ve filagellar rotasyonda değişiklik yapmak için bu bilgiyi hücre içine aktarılması yoluyla yönlendirilmiş hücresel hareketi sağlayan modifiye edilmiş iki bileşenli bir sinyal iletim sistemine dayanmaktadır (Ditty ve Parales 2017). Bir kemotaksi sinyal yolunun ilk adımı, sinyal moleküllerinin, metil-kabul eden kemotaksi proteinleri (MCPs) olarak adlandırılan sitoplazmik membran reseptörleri tarafından algılanarak (Ditty ve Parales 2017), kemoreseptörün ligand bağlama bölgesine bağlanmasından oluşur. Bu durum, membran boyunca kemoreseptör sinyal alanına iletilen ve burada bağlı CheA proteininin aktivitesini düzenleyen moleküler bir uyaran oluşturur. CheA proteininin fosforilasyon durumunun değiştirilmesi CheY proteinine olan transfosforilasyon aktivitesini değiştirecektir. Sadece CheY proteininin fosforillenmiş formu filajellar motora bağlanma kapasitesine sahiptir, böylece aktivitesini değiştirir (Darias ve diğ. 2014). Kamçı dönme yönünde ortaya çıkan değişiklikler yüzme davranışını ve nihayetinde çekici maddelere doğru veya itici maddelerden uzaklaşma hareketini düzenler (Ditty ve Parales 2017). *Escherichia coli, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis* gibi kemotaktik bakteriler, belirli kimyasalların konsantrasyonlarındaki değişiklikleri tespit ederek veya hareket kalıplarını mevcut kimyasal gradyana göre değiştirerek ortama uyum sağlayabilir (Waite ve diğ. 2018). Bakteriyel kemotaksi hidrofobik bileşiklerin bozunma hızını artırabildiğinden, kimyasal maddelerin hücre tarafından metabolize edilmesi için önemli bir başlangıçtır (Law ve Aitken 2003). Elverişli kemotaktik özellikler, petrol ayrıştırıcı bakterilerin karbon kaynağı olarak kullanılabilecek petrol damlacıklarını verimli bir şekilde tespit etmesine ve bunlara doğru göç etmesine olanak sağlayabilir (Meng ve diğ. 2019). Liang ve diğ. (2021), *Pseudomonas aeruginosa* 6-1B suşunun ham petrole yönelik potansiyel kemotaksi sürecini; arama, hareket etme ve tüketme olarak tanımlamıştır. Hekzadekan kemotaksisi hidrokarbon parçalayan bakteriler arasında yaygın olabilir. Smits ve diğ. (2003), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1'in hidrokarbona yönelik kemotaksi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 genomunda alkan hidroksilaz geni *alk*B1'in yol izinde yer alan *tlp*S geninin, alkan

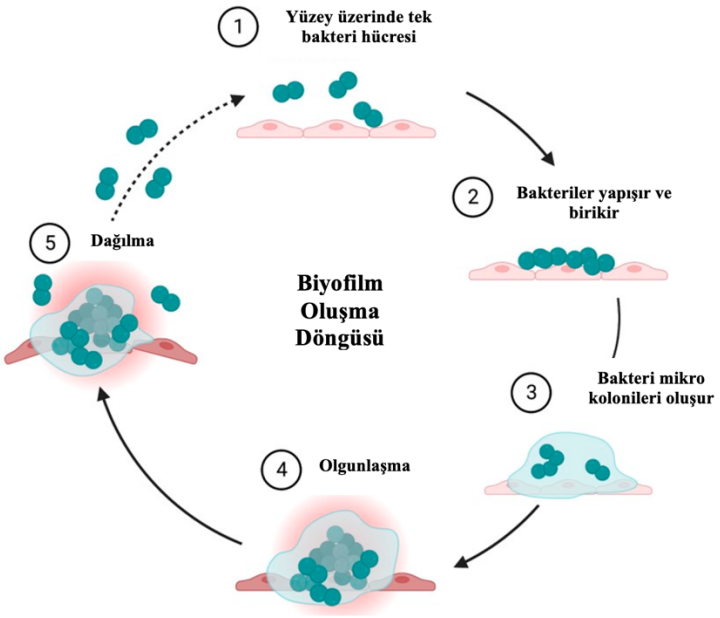
kemotaksisinde rol oynayabilecek bir MCP kodladığı tahmin edilmiştir (Parales ve diğ. 2018). Benzer şekilde *alk*N geninin de *Psedomonas putida* GPo1'de alkan kemotaksisine dahil olabilecek bir MCP kodladığı görülmekle birlikte, *Pseudomonas putida* GPo1'nın kemotaksi deneylerinde yeterince hareketli olmadığı bildirilmiştir (van Beilen ve diğ. 2001).

Bakterilerin kimyasalların gradyanlarını tespit etme ve kendilerini büyüme için en uygun koşullarda konumlandırarak bunlara yanıt verme yetenekleri hayatta kalmaları için avantaj sağlasa da bu yeteneğin doğadaki çevresel kirleticilerin bozunmasının etkinliği açısından ekolojik önemi ayrıntılı olarak incelenmemiştir (Lanfranconi ve diğ. 2003). Biyosürfaktan üretimi kemotaksi ve bakteriyel topluluk ile ilişkilidir, çünkü biyosürfaktan üretimini ortadan kaldıran mutasyonun bakteriyel topluluğu yok ettiği bildirilmiştir (Deziel ve diğ. 2003; Julkowska ve diğ. 2005).

2.4 Biyofilm

Biyofilm, hücrelerin hücre dışı polimerik maddeler (EPS) üreterek birbirleri tarafından bir alt tabakaya tutturulduğu mikrobiyal hücreler topluluğudur. EPS içerik olarak proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler, lipitler, sürfaktanlar ve hümik maddeler gibi farklı bileşenlerden oluşur (Chowdhary ve diğ. 2020) ve biyofilm gelişiminde önemli rol oynar (Das 2014). Biyofilm oluşumu ve EPS üretimi, çevresel koşullara bağlı olarak hem yapı hem de içerik olarak değişebilir (Yin ve diğ. 2019). Bakteri izolatlarında biyofilm oluşumu ve EPS üretimi arasındaki ilişki karmaşık ve çok yönlüdür. Voberkova (2015), besin açısından zengin koşullar altında *Bacillus subtilis*'te biyofilm oluşumu ve EPS üretiminde artış gözlemlemiş ve bu ikisi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Hooshdar ve diğ. (2020), EPS'nin biyofilm oluşumundaki rolünü ve EPS üreten probiyotiklerin çeşitli endüstrilerdeki potansiyel uygulamalarını vurgulayarak bu ilişkiyi desteklemektedir. Bu çalışmalar, EPS üretiminin bakteri izolatlarında biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Biyofilm oluşumu mekanik olarak çoğunluk algılamaya (quorum sensing) dayanır ve mikroorganizmalar için bir nevi koruyucu kalkan görevi görür. Çoğunluk algılama, bakterilerin hayatta kalabilmeleri için hızla değişen koşullara uyum sağlamalarını sağlar. Bu tepkiler, mevcut besinlere adaptasyon, aynı besin için

rekabet eden mikroorganizmalara karşı savunma ve hızla değişen koşullara karşı koruma olarak sıralanabilir (Bramhachari 2019). Biyofilm oluşumu birkaç aşamadan oluşan karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu süreç; adsorpsiyon, yapışma, mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve dağılma aşamalarından oluşur (Şekil 2.6). Biyofilm kolonisindeki hücrelerin yakın ilişkisi, besin varlığında gradyan gelişimini, gen alışverişini ve çoğunluk algılamayı teşvik eden koşullar yaratır (Sharma ve diğ. 2023).



Şekil 2.6: Biyofilm oluşma basamakları (Sharma ve diğ. 2023)

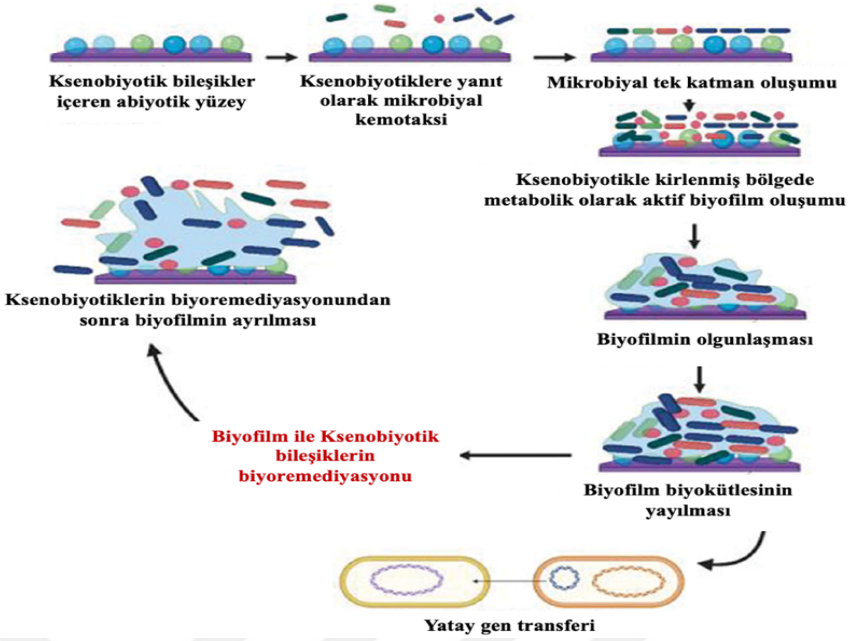
Biyofilmler genellikle tortuların, toprak ve su ara yüzlerinin etrafında bir dış örtü veya katman olarak oluşur. Biyofilmler mikrobiyal hücrelere stresli çevre koşullarına, patojenlere, antimikrobiyal maddelere ve zararlı kimyasallara karşı daha yüksek tolerans sağlar. Bakteriyel biyofilm toplulukları, yüksek mikrobiyal biyokütleleri ve immobilizasyon kabiliyetleri nedeniyle daha sağlamdır ve organik kirleticilere karşı daha yüksek direnç gösterirler (Mangwani ve diğ. 2016; Yin ve diğ. 2019). Biyofilmler tek veya çok çeşit bakteri, fungus, alg ve arke türünün bir araya gelmesiyle oluşabilir (Yin ve diğ. 2019). *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Cycloclasticus* ve *Alcanivorax* gibi birçok bakteri türünün güçlü biyofilm oluşturduğu ve bu sayede çeşitli kirlenmiş ortamlarda tehlikeli kirleticilerin yapısını bozabildiği veya mineralize edebildiği bildirilmiştir (Mishra ve diğ. 2022).

Bakterilerin yakınındaki bir ara yüzle etkileşimleri, biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere ekolojilerinde çok önemli bir rol oynar (Flemming ve diğ. 2016). Biyofilm oluşumu canlı/doğal ya da cansız/insan yapımı olabilen çoğunlukla nemli yüzeylerde gerçekleşir. Bu sebeple, doğada oluşan biyofilmler katı/sıvı ara yüzler, katı/hava ara yüzler veya sıvı/sıvı ara yüzler olmak üzere üç tür ara yüzde bulunur. Örneğin; sıvı/sıvı ara yüzlerde oluşan biyofilmler yakıtlar, yağlar ve endüstriyel soğutucular gibi hidrokarbonların degradasyonunda uygulanmıştır (Percival ve diğ. 2011). Bakterilerin katı veya sıvı yüzeylere yapışması, yüzeylerin (örneğin; yüzey işlevselliği, topografisi), sıvıların (örneğin; sürfaktan konsantrasyonu, iyonik güç, pH, karbon kaynağı konsantrasyonu) fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra hücre yüzeyi hidrofobikliğine (adhezin ve polisakkarit ifadesi) bağlı olabilir (Dewangan ve Conrad 2020).

Ara yüzlerdeki bakterilerle ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu katı yüzeylere odaklanırken; çevresel ve teknolojik önemlerine rağmen sıvı/sıvı ara yüzlerdeki bakteriyel etkileşimler henüz yeterince incelenmemiştir (Conrad 2020). Sıvı ara yüzeylere yapışmayı sağlayan fiziksel etkileşimler katı ara yüzeylerdekinden farklıdır ve bu durum biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların organizasyonunu, toplanmasını, büyümesini ve nihai yapısını etkileyecektir (Subbiahdoss ve Reimhult 2020). Sıvı/sıvı veya hava/sıvı ara yüzlerdeki biyofilm özelliklerinin ve büyüme hızının, bakterinin hidrofobikliği, ara yüzey gerilimi, alt faz pH'sı ve bakteri büyüme ortamı dahil olmak birçok faktörden etkilenebileceği belirtilmiştir (Rivas ve diğ. 2021). Sıvı/sıvı ya da sıvı/hava ara yüzlerde bakterilerin petrol ve petrol türevi hidrokarbonlar ile etkileşimine su fazı aracılık eder. Bu nedenle, böylesi ortamlarda mikroorganizmalar hidrokarbonlarla etkileşime girdiğinde hidrofobik etki, merkezi bir rol oynar. Ayrıca, hidrofobik etki, mikroorganizmaların hidrokarbonlardan biyoyararlanımının da bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Krell 2018). Petrol/su ara yüzeylerindeki biyofilmlere hâkim olduğu tespit edilen bakterilerin, ham petrol de dahil olmak üzere yağları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmalarını sağlayan çeşitli metabolizmalara sahip oldukları bildirilmiştir (Niepa ve diğ. 2017). Adezyonun başlaması için sıvı/sıvı ara yüzle fiziksel yakınlık gereklidir. Bu nedenle, bakteriler hidrokarbon ara yüzüne hareket etmek için ya hücre dışı uzantıları kullanarak aktif hareketi ya da difüzyon yoluyla pasif hareketi kullanabilirler (Subbiahdoss ve Reimhult 2020). Aktif olarak bakterilerin hidrokarbonlara yapışmasında; hücre dışı

uzantılar ve hidrofobik fimbriya, fibriller, dış membran lipitleri ve hücre yüzeyinde bulunan proteinler gibi moleküller aracılığıyla spesifik yapışma gerçekleşebilir (Varjani ve Upasani 2017; Xu ve diğ. 2018). Pasif olarak bakterilerin ara yüzlere yapışmasına, bakterileri çeken ve onları ara yüzde tutan uzun süreli kolloidal etkileşimlerin aracılık ettiğine inanılmaktadır. Böylece kısa mesafeli van der Waals (hidrofobik), asit-baz ve elektrostatik etkileşimlerin etkili hale gelmesini kolaylaştırır (Krell 2018). Bakteri hidrofobikliğinin petrol/su ara yüzlerine adsorpsiyonda önemli bir rol oynadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Kang ve diğ. 2008; Krasowska ve Sigler 2014; Obuekwe ve diğ. 2008).

Bakteriyel hareketlilik sıvı/sıvı ara yüzlerde daha hızlı ve daha fazla yapışmaya yol açabilir. Hareketliliğin biyodegradasyon ve dağılmış bir sıvı faza mikrobiyal erişim gibi diğer işlemler için bakterilere avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir (Dewangan ve Conrad 2020). Ayrıca bakterilerin hidrokarbon/su ara yüzlerine yapışmasında; iki sıvı fazlı ortamdaki reaksiyon kinetiği (Abbasnezhad ve diğ. 2011) ve bakteriyel hareketliliğe bağlı damlacıkların hareketinin rol oynadığı bildirilmiştir (Dewangan ve Conrad 2019; Ramos ve diğ. 2020). Kemotaksi, filagellar hareketlilik, topluluk oluşturma (swarming), yüzme (swimming), kayma (twitching), çoğunluk algılama (quorum sensing) ve biyofilm oluşturma gibi mikrobiyal davranışların, biyoremediyasyonda çok önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Şekil 2.7) (Bhandari ve diğ. 2021; Karmakar 2021; Lacal ve diğ. 2013; Mishra ve diğ. 2022; Sonawane ve diğ. 2022).



Şekil 2.7: Kemotaksi ile biyofilm oluşumu ve ksenobiyotiklerin biyoremediyasyonu (Bhatt ve diğ. 2023'ten uyarlanmıştır.)

Mikrobiyal adhezyon hidrokarbonların bozunmasını artırabilse de biyodegradasyon için mutlaka hidrokarbon fazına hücre yapışması gerekli değildir (Abbasnezhad ve diğ. 2011). Hidrokarbonların suda çözünürlüğünün düşük olması, substrat olarak bakteriler için erişilebilirliğini ve kullanılabilirliğini sınırlar. Dolayısıyla, bu durumda mikroorganizmaların özel asimilasyon mekanizmalara ihtiyaçları vardır. Bakteriler bunun için iki önemli mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizmalardan ilki emülsifikasyon yoluyla hidrokarbonların çözünürlüğünü artırmak için bakterilerin ürettiği biyosürfaktanlar (Karlapudi ve diğ. 2018), ikincisi ise biyofilm oluşumudur (Flemming ve diğ. 2016). Biyofilmin üç boyutlu mimarisi için yapı malzemesi ve yüzeylere tutunma için önemli bir tutunma malzemesi olarak görev alan EPS (Omarova ve diğ. 2019), hidrokarbon bozunması sırasında bakterilerin yağ/su ara yüzüne tutunmasında bir adaptasyon stratejisi olarak görev alır (Sivadon ve diğ. 2019). Ayrıca, hidrokarbon asimilasyonunda önemli bir rol oynayan ve hücreler tarafında salgılanan biyosürfaktanlar ve ekoenzimler gibi çözündürme faktörleri, EPS matrisi içinde tutulur ve biriktirilir (Ennouri ve diğ. 2017; Sivadon ve diğ. 2019). Matrisin bu tutucu özelliği, çözündürme ve enzimatik faaliyetleri matris içinde olmasını ve stabilizasyonunu sağlayarak hidrokarbonların bozunma için hücreye doğru kütle transferini artırır (Ehiosun ve diğ. 2022).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz	Kullanım amacı
Hassas terazi (Denver Instrument, SI-234)	Kimyasal maddelerin tartımında kullanılmıştır.
Vorteks (Dragon Lab, MX-F)	Çeşitli çözeltileri karıştırma işlemlerinde kullanılmıştır.
Mikrosantrifüj (Wisd, CF-10)	Çeşitli çözeltileri yoğunluk farkına göre ayırma işlemlerinde kullanılmıştır.
Otoklav (Nüve, OT40L)	Besiyerleri ve çeşitli laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Gradient thermal cycler PZR (optimus 96G, QLS)	Moleküler biyolojik analizlerde bakterilerin gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Elektroforez güç kaynağı (Major Science MP-30V)	Jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Mikropipet seti (Isolab)	Mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik çalışmalarda sıvı aktarımı için kullanılmıştır.
Çalkalamalı inkübatör (Alfagen)	Bakterilerin belirli sıcaklık ve çalkalama derecesindeki inkübasyonunda kullanılmıştır.
İnkübatör (Nüve, EN 400)	Bakterilerin belirli sıcaklıklarda inkübasyonunda kullanılmıştır.
UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, UV-1201V)	Çözeltilerin optik yoğunluklarının belirlenmesinde kullanılmıştır.
Mikro hacim spektrofotometre (Epoch, BioTek)	DNA/RNA miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.
Binoküler mikroskop (Olympus, CX21)	Bakterilerin Gram reaksiyonları ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
Jel elektroforez sistemi (Major Science, ME7-10)	PZR ürünlerinin görüntülenmesi ve bant doğrulaması için kullanılmıştır.
Jel görüntülem sistemi (gelLITE, Cleaver Scientific)	Jel görüntülenmesinde kullanılmıştır.
Drop Shape Analyzer (SEO) ve Attension Theta Goniometer	Yağ/su ara yüzünde oluşan biyofilm yapının yüzey geriliminin ölçülmesinde kullanılmıştır.
Döner bir buharlaştırıcı (rotary evaporatör-Isolab)	Ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır.

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal ve Besiyerleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar ile besiyerleri ve içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal ve besiyerleri

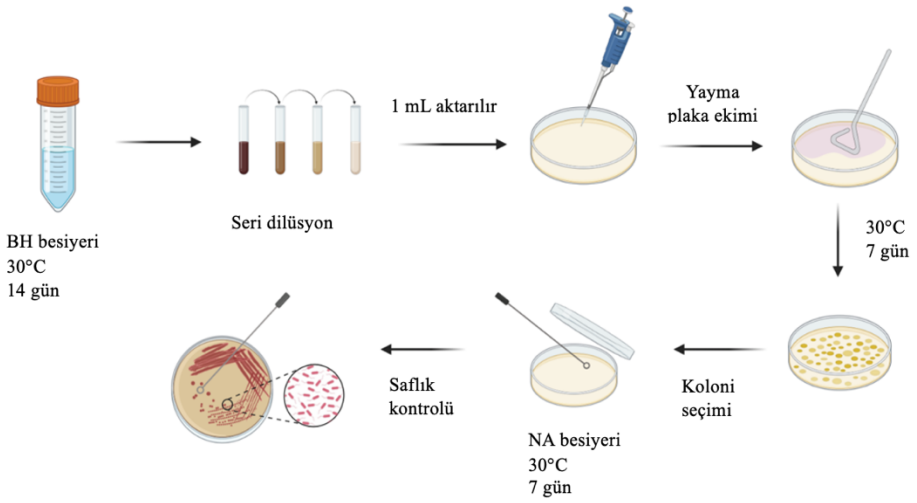
Besiyeri/Kimyasal	**İçerik**
Nutrient broth	Pepton: 5 g/L Et özütü: 3 g/L
Luria Bertani broth	Pepton: 10 g/L Maya özütü: 5 g/L NaCI: 10 g/L
Bushnell Haas broth	$MgSO_4$: 0,2 g/L $CaCI_2$: 0,02 g/L KH_2PO_4: 1 g/L K_2HPO_4: 1 g/L NH_4NO_3: 1 g/L $FeCI_3$: 0,05 g/L
Fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi	NaCI: 8 g/L KCI: 0,2 g/L Na_2HPO_4: 1,44 g/L KH_2PO_4: 0,24 g/L
Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)	NaCI: 8,5 g/L
Gram boyamada kullanılan kimyasallar	*Kristal Viyole Solüsyonu* Kristal viyole boyası (%90): 2g Etanol (%95 v/v): 20 mL Amonyum okzalat: 0,8 g Distile su: 80 mL *Gram İyodür Solüsyonu* Potasyum iyodür: 2 g İyot: 1 g Distile su: 300 mL *Safranin Solüsyonu* Safranin O: 0,25 g Etanol (%95 v/v): 10 mL Distile su: 100 mL

Fotoğraflar ve referans verilmeyen görselleştirilmelerin tasarlanmasında "Biorender" web sitesinden (https://www.biorender.com) yararlanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin Çoğaltılması ve İzolasyonu

Çalışmada göl suyu (Bafa Gölü), evsel atık su, petrokimya endüstrisi atık suyu olmak üzere oldukça çeşitli çevresel kaynaklardan örnekler alınarak, steril koşullar altında laboratuvara getirilmiştir. İzolasyon işlemi Li ve diğ. (2018) tarafından tarif edilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten 1'er mL alınarak, tek karbon kaynağı %5 (v/v) *n*-dekan içeren 5 mL steril Bushnell Haas (BH) sıvı besiyeri içeren tüplere aktarıldıktan sonra, tüpler hareketsiz koşullarda 30°C'de 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler her 48 saatte bir kontrol edilerek mikrobiyal büyümeler takip edilmiştir. 14 gün boyunca yapılan inkübasyon ile yeterli mikrobiyal üremelerin gözlendiği tüplerden alınan örnekler %0,85 NaCI içeren steril FTS (Fizyolojik Tuzlu Su) tampon çözeltisine aktarılarak homojenize edildikten sonra bir seri seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltme tüplerinden 0,1'er mL alınarak, %1 (v/v) *n*-dekan içeren BH agar besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Sonrasında, petriler 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında BH agar yüzeyinde büyüyen ve tek düşen kolonilerden Nutrient agar (NA) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekimler yapılarak bakteriler saflaştırılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Bakteri izolasyon aşamalarını gösteren iş akış diyagramı

Bakterilerin hücre morfolojileri ile Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Gram boyama uygulanmıştır. Gram boyamada sırasıyla şu işlemler uygulanmıştır: 24 saatlik saf kültürden preparat hazırlanmıştır. Preparat kristal viyole ile kaplanıp ve 1 dakika bekletilip ardından distile su ile yıkanmıştır. Preparat üzeri lügol (iyot) çözeltisi ile kaplanmış ve 1 dakika beklendikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparat %96'lık etil alkol çözeltisinde 10-15 saniye bekletilip ardından distile su ile yıkanmıştır. Preparat bazik fuksin veya safranin ile kaplanıp ve 30 saniye bekletilip ardından bol distile su ile yıkanmıştır. Kurutma kâğıdı arasında kurutulup ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. Mavi-mor renkte görünen bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkte görünen bakteriler Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Smith ve Hussey 2005).

3.2.2 Yağ/su Ara Yüzünde Etkinlik Gösteren Bakterilerin Belirlenmesi

Saflaştırılan bakteri izolatlarının yağ/su ara yüzünde biyofilm oluşturma davranışlarının incelenmesi ve *n*-dekan parçalama yeteneklerinin belirlenmesi için sıvı BH ve NB besiyerleri kullanılmıştır. BH besiyeri sadece referans hidrokarbon (*n*-dekan) eklenerek, ilgili karbon kaynağında büyüyebilen bakterilerin izolasyonunda tercih edilmektedir. NB besiyeri ise bakterilerin büyümesi için zengin ek besin maddeleri içeren genel bir besiyeridir. Çalışmada sadece tek karbon kaynağı olarak *n*-dekan varlığında ve zengin organik karbonlu bileşiklere ek olarak *n*-dekan varlığında izolatların davranışlarının gözlemlenmesi amacıyla bu iki besiyeri kullanılmıştır. Li ve diğ. (2018) tarafından kullanılan yöntem çalışmamıza uyarlanarak uygulanmıştır. Öncelikle, her bir izolata ait bir gece inkübe edilmiş taze kültürlerden %0,85'lik NaCI içeren FTS ile 1 McFarland (yaklaşık 3,0 x10^8 kob/mL) olacak şekilde hücre çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra, her bir bakteri izolatına ait hücre çözeltilerinden 100'er µL alınarak %5 (v/v) *n*-dekan içeren BH sıvı besiyeri ve %5 (v/v) *n*-dekan içeren NB sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra, hareketsiz koşullarda 30°C'de 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bakterilerin besiyerlerinde üreme durumları her 24 saatte bir kontrol edilerek yağ/su ara yüzüne en hızlı tutunma, ara yüzde biyofilm oluşturma ve *n*-dekan emülsifiye etme özelliklerinden en az birine sahip olan 12 bakteriyel izolat seçilmiştir.

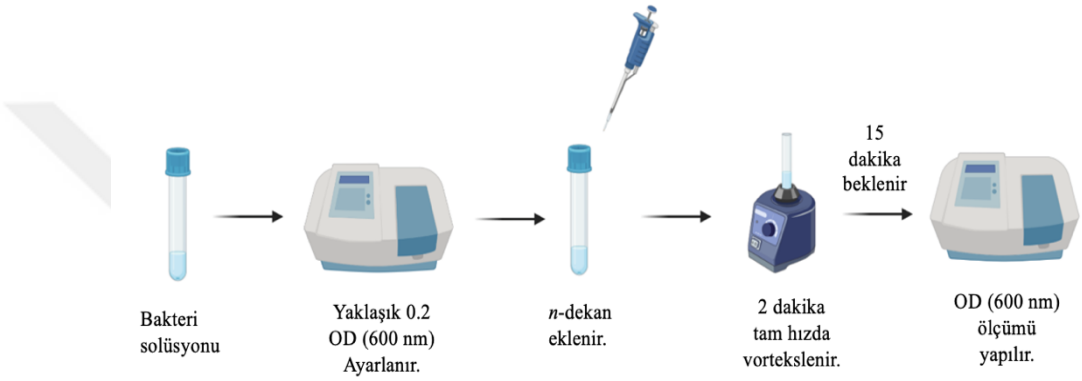
3.2.3 Bakterilerin Yağ/su Ara Yüzünde Tutunması İçin Optimum Şartların Belirlenmesi

Bakterilerin yağ/su ara yüzüne tutunmaları üzerine sıcaklık ve çalkalama koşullarının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, Eboigbodin ve Biggs (2008) tarafından kullanılan bakteriyel birikim deneyi çalışmamıza uyarlanarak uygulanmıştır. Bunun için 48 saatlik bakteri kültürlerinden, PBS kullanılarak ultraviyole görünür (UV-Vis) spektrofotometre vasıtasıyla 600 nm dalga boyunda 0,5 optik yoğunluk (OD) olacak şekilde bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bakteri çözeltilerinden, %5 (v/v) *n*-dekan içeren Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri içeren steril tüplere 100'er µL aktarılmıştır. 600 nm dalga boyunda OD ölçümleri kaydedilmiştir. Hazırlanan tüpler değişen sıcaklık ve çalkalama koşulları altında 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, yağ/su ara yüzüne tutunan hücreler mikropipet yardımıyla alınarak 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen bakteri pelletleri PBS ile iki kez yıkanmıştır. Yıkanan hücre pelletleri vorteks yardımıyla PBS içerisinde yeniden homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra 600 nm dalga boyunda OD ölçümleri yapılmıştır. İlk olarak sıcaklık koşulu yukarıda belirtildiği şekilde 20°C, 30°C, 37°C ve 45°C'de 7 gün inkübasyona bırakılarak bakteriler ara yüze tutunması ve biyofilm oluşturmaları için optimum sıcaklık koşulu belirlenmiştir. En uygun sıcaklık tespit edildikten sonra, ortam hareketinin bakteriyel tutunma üzerine etkisini gözlemlemek için belirlenen optimum sıcaklıkta orbital çalkalayıcı vasıtasıyla 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm döngüsel çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon öncesi ve sonrası 600 nm dalga boyunda OD ölçümleri alınarak her bir izolat için optimum hareket koşulları belirlenmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar alınarak hesaplanmıştır.

3.2.4 Hidrokarbona Bakteriyel Adsorpsiyon Testi

Bakterilerin hidrofobisite ve yağ/su ara yüzüne tutunma özellikleri, hidrokarbona bakteriyel adsorbsiyon (HBA) testi ile belirlenmiştir. HBA testi genellikle bakterilerin hidrofobik özelliğinin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. Karıştırma sonucunda bakterilerin bilinen bir konsantrasyondaki polar olmayan faz yüzeyine yapışma yeteneğini ölçen bir testtir (Rosenberg ve diğ. 1991). Çalışmada,

Rosenberg ve diğ. (2006) tarafından geliştirilen HBA testi literatüre göre bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bakteriler steril NB sıvı besiyerinde 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir izolattan PBS kullanılarak 600 nm dalga boyunda 0,2 OD olacak şekilde bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bakteri çözeltileri *n*-dekan ile 1:3 (nonpolar (v): polar (v)) oranında karıştırıldıktan sonra vorteks vasıtasıyla 2 dakika boyunca tam hızda karıştırılmıştır. Oluşan emülsiyonların ayrılması için 15 dakika beklendikten sonra sulu fazdan 1 mL örnek alınarak 600 nm dalga boyunda OD ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: HBA testi aşamaları

Bakterilerin yağ fazına yapışması, karıştırma öncesi ve sonrası optik yoğunluk arasındaki oran aşağıdaki formüle göre hesaplanarak ölçülmüştür.

HBA (%) = 100 x [1 - (OD_{600} karıştırma sonrası / OD_{600} karıştırma öncesi)]

3.2.5 Toplam Hidrokarbon Gideriminin Belirlenmesi

Bakterilerin, *n*-dekan parçalama oranları gravimetrik analiz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Diallo ve diğ. 2021). Bu analiz için bakteriler öncelikle NB sıvı besiyerinde 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Taze kültürlerden PBS ile 600 nm dalga boyunda 0,3 OD olacak şekilde olacak şekilde bakteri çözeltiler hazırlanmıştır. Bakteri çözeltilerinden 200 µL alınarak %5 (v/v) *n*-dekan içeren 20 mL NB sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra, 30°C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol olarak bakteri inoküle edilmemiş %5 (v/v) *n*-dekan içeren 20 mL NB sıvı besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler

6000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası süpernatant alınmıştır ve üzerine eşit hacimde olacak şekilde hekzan/siklohekzan (2:1) karışımından ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım 5 dakika çalkalandıktan sonra, ayırma hunisi kullanılarak organik faz sıvı fazdan alınarak toplanmıştır. Ekstraksiyon işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen faz, döner bir buharlaştırıcı (rotary evaporatör) kullanılarak çözücü buharlaştırılmıştır (Şekil 3.3).



a) b) c) d)

Şekil 3.3: Hidrokarbon ekstraksiyon aşaması. a) Ayırma hunisi ile fazın ayrılması, b) Döner buharlaştırıcı, c) Evaporasyon sonrası kalan organik faz, d) Tartım işlemi

Evaporasyon sonrasında tartım alınarak hidrokarbon giderim yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

YPO = (KBYA – ÖKYA) x 100 / KBYA

YPO: Yağ parçalanma oranı,

KBYA: Kontrol besiyerindeki yağın ağırlığı,

ÖKYA: Örnekte kalan yağın ağırlığı.

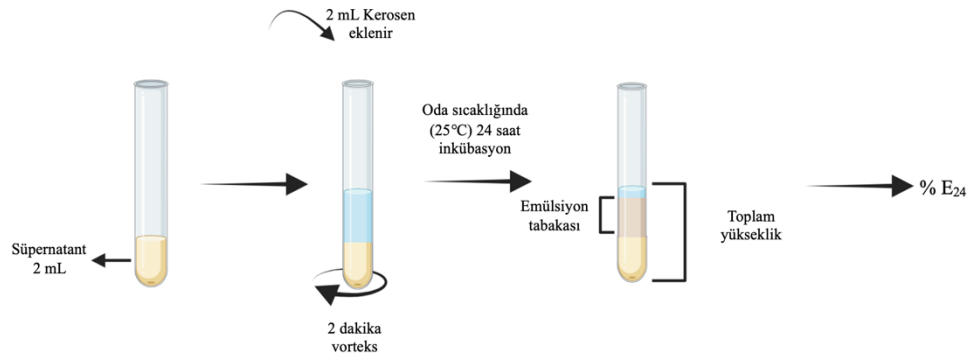
3.2.6 Bakterilerin Biyosürfaktan Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakterilerin biyosürfaktan üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla emülsifikasyon indeksi testi (Cooper ve Goldenberg 1987), yağ yayma testi (Morikawa ve diğ. 2000) ve Cethyltrimethylammoonium bromide (CTAB) agar petri testi (Siegmund ve Wagner 1991) gerçekleştirilmiştir. Her bir test için, 48 saatlik bakteri kültürlerinden 600 nm dalga boyunda 0,5 OD olacak şekilde PBS ile homojen bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bakteri çözeltilerinden %5 (v/v) *n*-dekan içeren 50 mL NB besiyerine %1 (v/v) oranında aktarılarak 30°C 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürler 12500

rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant emülsifikasyon indeksi testi ve yağ yayma testinde kullanılmıştır.

3.2.6.1 Emülsifikasyon İndeksi Testi

Biyosürfaktan/ biyoemülgatörün işlevsel özellikleri arasında, karışmayan iki sıvının faz ayırımını içeren emülsifikasyon yer almaktadır (Satpute ve diğ. 2010). Bakterilerin ürettiği biyosürfaktanın emülsifiye etme özelliğinin belirlenmesi amacıyla Cooper ve Goldenberg (1987) tarafından tarif edilen emülsifikasyon indeksi (E_{24}) testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 10 mL cam deney tüplerine eşit miktarlarda (2 mL) kerosen ve süpernatant eklenmiştir. Karışım 2 dakika boyunca yüksek hızda vorteks ile karıştırılmıştır.



Şekil 3.4: E_{24} testi aşamaları

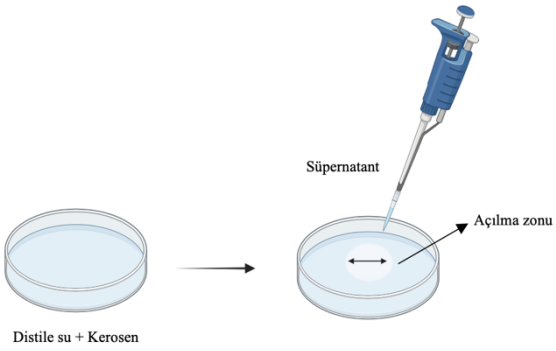
Karışım 25°C'lik oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra, aşağıda belirtilen formül ile emülsifikasyon yüzdesi (%E_{24}) hesaplanmıştır (Şekil 3.4).

%E_{24}= (Emülsifikasyon tabakasının yüksekliği/ Toplam solüsyon yüksekliği) x 100

Deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

3.2.6.2 Yağ Yayma Testi

Yağ yayma testi Morikawa ve diğ. (2000) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin ürettiğin biyosürfaktanın yağ yayma etkinliğinin ölçülmesi için 40 mL distile su ve 40 µL *n*-dekan içeren petri kaplarının merkezine, yukarıda belirtilen şekilde elde edilen süpernatanttan 40 µL aktarılmıştır. Işık altında gözlemlenen açılma zonu ölçülmüştür (Şekil 3.5).



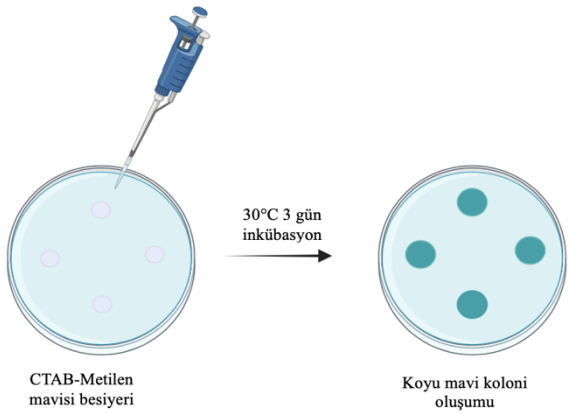
Şekil 3.5: Yağ yayma testi aşamaları

Yağın yer değiştirmesi ve berrak bölge oluşumu, kültür süpernatantında biyosürfaktan varlığını gösterir. Yağ yüzeyindeki berrak bölgenin çapı biyosürfaktan madde aktivitesiyle eşdeğerdir. Yay yağma yöntemi, çeşitli mikroorganizmalar tarafından biyosürfaktan veya biyoemülgatör üretimini tespit etmek için hızlı, hassas ve güvenilir bir tekniktir (Adetunji ve Olaniran 2019; Kumar ve diğ. 2015). Deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Çalışmada distile su negatif kontrol, Tween 80 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.6.3 CTAB Agar Petri Testi

Glikolipid veya diğer aniyonik yüzey aktif madde üreten mikroorganizmaları tespit etmek için CTAB agar petri testi uygulanmaktadır (Siegmund ve Wagner 1991). Bu teknikte, mikroorganizmalar CTAB ve metilen mavisinden oluşan bir ortamda büyütülmüştür. Mikrobiyal suşlar tarafından aniyonik yüzey aktif madde üretimi, kolonilerin etrafında koyu mavi halkaların oluşmasıyla gösterilmiştir (Soltanighias ve diğ. 2019). Bu doğrultuda, CTAB/Metilen mavisi agar ortamı (CTAB 0,2 g/L, metilen

mavisi 0,005 g/L, glikoz 20 g/L, maya özütü 1 g/L, pepton 2 g/L, $CaCl_2$ 0,1 g/L ve agar 15 g/L) hazırlanmıştır. 48 saatlik bakteri kültürlerinden hazırlanan CTAB/ metilen mavisi agar ortamına ekildikten sonra 30°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

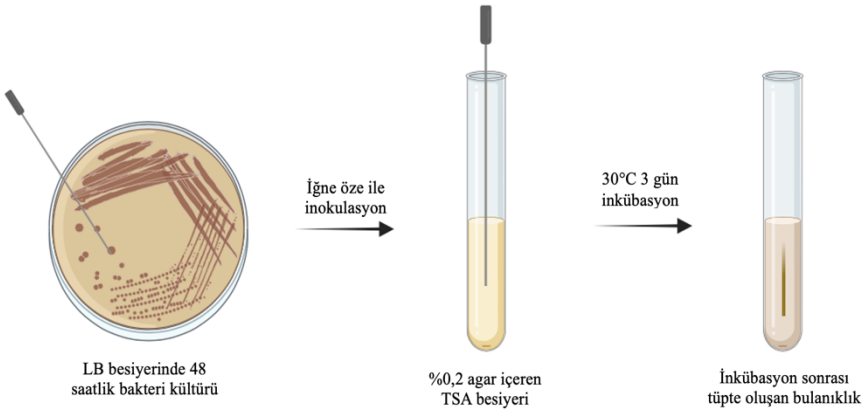


Şekil 3.6: CTAB agar petri testi aşamaları

Koloni çevrelerinde oluşan koyu mavi halelerin oluşması glikolipid veya aniyonik biyosürfaktan varlığını göstermiştir (Şekil 3.6).

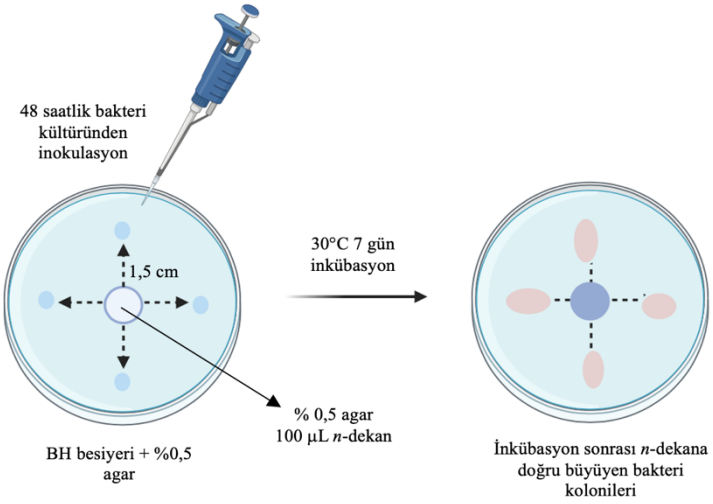
3.2.7 Bakteriyel Haraketlilik Testi

Bakterilerin hareket ve kemotaksi yetenekleri değerlendirmek için yumuşak dik besiyerinde hareketlilik testi (Tittsler ve Sandholzer 1936), kantitatif gradyan petri testi (Ditty ve Paales 2017) ve kantitatif kapiler testi (Ibrar ve Zhang 2020) olmak üzere üç farklı test uygulanmıştır. Yumuşak dik besiyerinde hareketlilik için Tittsler ve Sandholzer (1936) tarafından tarif edilen yönteme göre geçekleştirilmiştir. Bu testte; TSB (Tryptic Soy Broth-Condalab, İspanya) besiyeri % 0,2-0,4 agar içerecek şekilde hazırlandıktan sonra, 10 mL'lik vidalı kapaklı cam tüplere 5'er mL aktarılmıştır. Sonrasında, tüpler 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra, dik bir şekilde katılaşmaları için ortam sıcaklığında bırakılmıştır. Katılaşan besiyerlerine 48 saatlik taze bakteri kültürlerinden iğne öze yardımıyla dik bir şekilde ekimleri gerçekleştirildikten sonra 30°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerdeki bulanıklık bakterilerin haraketliliği olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7).



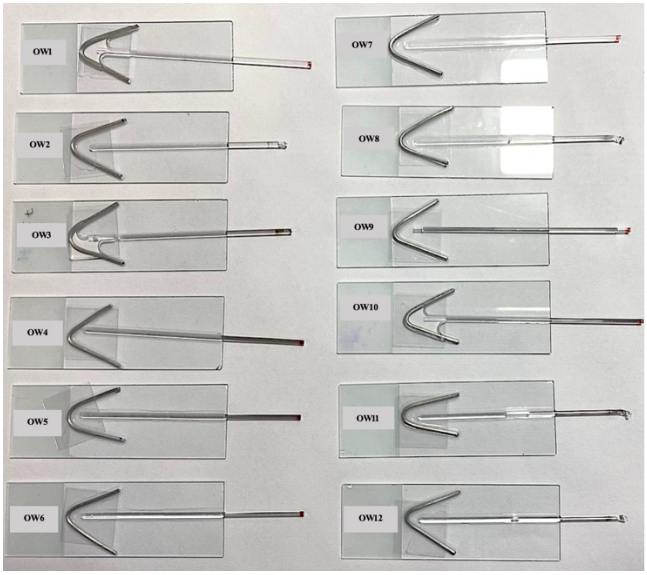
Şekil 3.7: Yarı katı agara dik ekim yöntemi ile hareketlilik tespiti

Kantitatif gradyan petri testi Ditty ve Parales (2017) tarafından belirtilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bu testte; %0,5 agar içeren BH besiyeri hazırlanmıştır. 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra steril petri kaplarına aktarılmış ve oda koşullarında kontrol inkübasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra, %0,5 agarlı BH petrilerin merkezinde 1,5 cm çapında delikler açılmıştır. Bu deliklerin içerisine erimiş halde steril %0,5 agarda bir miktar eklenmiş ve donmaya bırakılmıştır. Sonrasında bir petriye dört izolat merkezdeki delikten 1,5 cm uzaklıkta olacak şekilde (600 nm dalga boyunda 0,5 OD olarak hazırlanan taze hücre çözeltilerinden spotlanmıştır. Ayrıca, petri merkezindeki %0,5 agarlı deliğe 100 µL referans hidrokarbon (*n*-dekan) eklendikten sonra, petriler 30°C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Her 25 saatte bir agar petride bakteriyel kolonilerin gelişimleri izlenmiştir. Bakteriyel kemotaksi koloni hareketliliklerine göre görsel olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.8). Bu çalışmada pozitif olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.



Şekil 3.8: Kantitatif gradyan petri testi aşamaları

Kantitatif kapiler testi ise Ibrar ve Zhang (2020) tarafından tarif edilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, %5 referans hidrokarbon (*n*-dekan) içeren kemotaksi tamponu (100 mM fosfat tamponu ve 20 µM EDTA) cam kapiler tüplere çektirilmiştir. Hemen sonrasında cam kapiler tüpler cam lamel üzerindeki yaklaşık 600 nm dalga boyunda 0,2 OD olarak hazırlanmış, taze bakteri kültürüne daldırıldıktan sonra, 25°C'lik oda koşullarında 25 dakika boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Kantitatif kapiler testi aşamaları

İnkübasyon sonrasında kapiler tüp içeriği katı LB besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekimi gerçekleştirilmiştir. 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında petrilerde üreyen koloniler sayılarak (kob) bakterilerin kemotaksi aktivitesi belirlenmiştir.

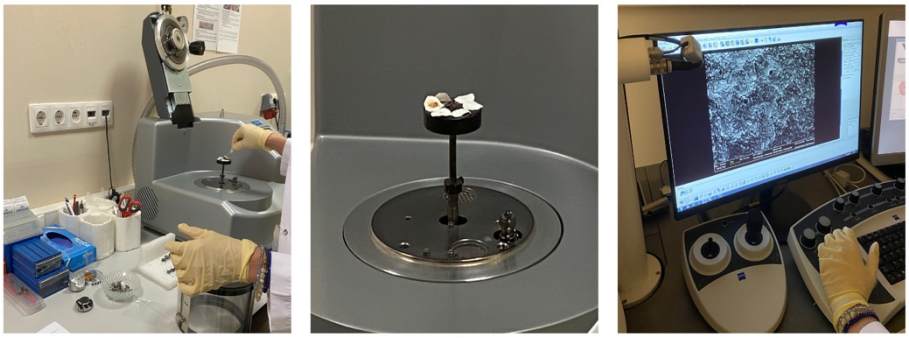
3.2.8 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Çoğunlukla mikroorganizmaların kendileri tarafından salgılanan ekzopolisakarit (EPS), biyofilm oluşumu açısından önemlidir (Flemming ve Wingender 2010; Zhang ve diğ. 2015). Bakteriyel izolatların EPS üretim potansiyellerini kantitatif olarak belirlemek amacıyla Kaci ve diğ. (2005) tarafından kullanılan RVC-sükroz besiyeri (0,1 g/L maya özütü, 30 g/L sükroz, 15 g/L agar) kullanılmıştır. Bakterilerin besiyerine ekimi yapıldıktan sonra 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petrilerdeki yoğun jel görünümüne sahip koloniler EPS üretimi bakımından pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

3.2.9 FESEM Analizi

Ara yüzde oluşan olgun biyofilmlerin mimarisini incelemek için Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma merkezinde (İLTAM) bulunan alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) kullanılmıştır. Bu analiz için örneklerin hazırlanmasında Ammar (2017) ve Kavakcıoğlu Yardımcı ve Mollaoğlu (2021) tarafından tarif edilen yöntemler çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda, 48 saatlik taze bakteri kültürlerinden 600 nm dalga boyunda 0,5 OD olacak şekilde PBS ile homojen taze bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Homojen bakteri çözeltilerinden 100 µL alınarak %5 (v/v) *n*-dekan içeren sıvı LB besiyerine inoküle edilmiştir. Kültürler 30°C'de 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Biyofilm oluşumunu gözlenen izolatlardan biyofilm tabakası steril filtre kâğıdı ile geri kazanılmış ve steril PBS ile hafifçe durulanmıştır. Sonrasında %2,5 gluteraldehit (Merck, USA- %25) ile 7 saat boyunca sabitlenmiştir. Ardından örnekler %30, %50, %70, %80, %90, ≥%99,9 derişiminde hazırlanan bir seri alkol çözeltilerinin her birinde 10'ar dakika, ≥%99,9 derişimindeki etil alkolde ise 1 saat bekletilerek dehidre edilmiştir. Sonrasında oda

koşullarında alkol giderilerek FESEM görüntülemesi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).

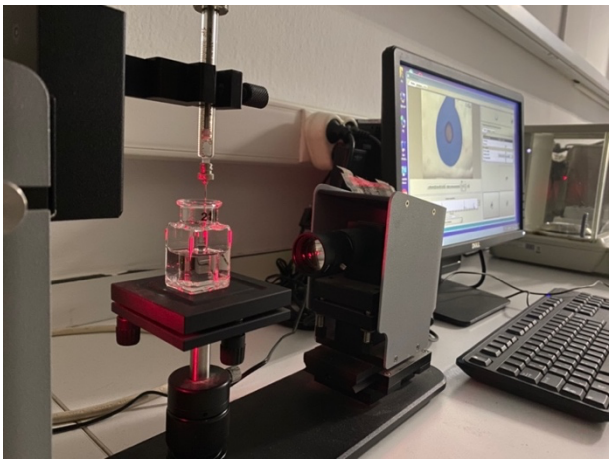


a) b) c)

Şekil 3.10: FESEM analizi. a) Örneklerin kaplama için hazırlanması, b) Örneklerin altın-paladyum ile kaplanması, c) SEM ile görüntüleme yapılması

3.2.10 Yağ/ su Ara Yüzünde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakalarının Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin yağ/ su ara yüzünde oluşturdukları biyofilm tabakanın reolojik özelliklerinin belirlenmesi için Drop Shape Analyzer (SEO) cihazı kullanılmıştır. 48 saatlik taze kültürlerden 600 nm dalga boyunda 0,2 OD olacak şekilde PBS ile bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan herbir bakteri çözeltisi cam küvet içerisine aktarılmıştır. Cam küvet içerisine yerleştirilen ters çevrilmiş iğne ucunda *n*-dekan damlacığı oluşturulmuştur. Damla, 24 saat boyunca bakteri solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Damlanın 0. ve 24. saatlerde gözlemleri yapılarak yağın reolojik yapısı kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Guruprakash ve Reimhult 2020).



Şekil 3.11: Attension Theta Goniometer cihazı ile yüzey bakteri yüklü damlanın yüzey gerilimi ölçümü

Ayrıca yağ/su ara yüzünde tutunan bakterilerin oluşturduğu yüzey gerilimini ölçmek için Revera ve diğ. (2010) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Bu analizde Attension Theta Goniometer (Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü) cihazında asılı damla tekniği (pendant drop) kullanılmıştır (Şekil 3.11). Hesaplamalar cihazın, kendi yazılımı olan OneAttension kullanılarak yapılmıştır. Buna göre kerosene batırılmış küt uçlu iğne ucunda, yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,2 OD'ye ayarlanmış olan bakteri yüklü bir damla oluşturulduktan sonra damlanın yüzey gerilimi (mN/m) ölçülmüştür.

3.2.11 Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanımlanması

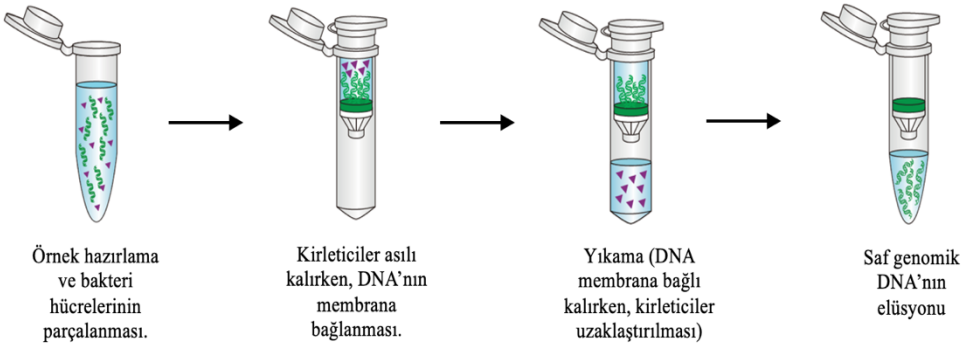
3.2.11.1 Bakteri İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu

İzolatların moleküler biyolojik olarak tanımlanması için her bir bakteri izolatından genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonu için Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Tayvan) kullanılmıştır. Bunun için kit protokolünde belirtilen aşağıdaki izolasyon basamakları takip edilmiştir.

1. Örnek hazırlama: Gram negatif bakteriler için: Sıvı besiyerinde üretilen bakteri hücreleri ($1,0x10^9$ kob/mL yoğunluğunda) 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. 14000-16000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.

Hücre pelleti üzerine 180 µL GT tamponu eklenir ve vorteks ile karıştırılır. 20 µL Proteinaz K eklenir ve 60°C'de en az 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında her 3 dakikada bir tüp ters-yüz edilir. Gram pozitif bakteriler için: Sıvı besiyerinde üretilen bakteri hücreleri (1x 10^9 yoğunluğunda) 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. 14000-16000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır. Lizozim, Gram + tamponu (0,8 mg/200 µL) ile hazırlanır. Hücre pelleti üzerine hazırlanan lizozimden 200 µL eklenir ve vorteks ile karıştırılır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında her 10 dakikada bir tüp ters-yüz edilir. 20 µL Proteinaz K eklenir ve 60°C'de en az 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında her 3 dakikada bir tüp ters-yüz edilir.

2. Parçalama: Numuneye 200 µL GB tamponu eklenir ve 10 saniye vorteks ile karıştırılır. Numune lizatının berrak olduğundan emin olmak için 70°C'de en az 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında her 3 dakikada bir tüp ters-yüz edilir. Bu sırada Elüsyon tamponundan kullanılacak miktar kadar alınarak 70°C'de inkübe edilir.
3. DNA bağlanması: Numune lizatına 200 µL absolute etanol eklenerek vorteks ile karıştırılır. Çökelti olmaması gerekmektedir. 2 mL'lik toplama tüpüne GD kolonu yerleştirilir. Karışım GD kolonuna aktarılır ve 14-16000 x g'de santrifüjlenir. Akış atılır ve GD kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
4. Yıkama: GD kolonuna 400 µL W1 tamponundan eklenir. 14-16000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir ve akış atılır. GD kolonu 2 mL'lik toplama tüpüne geri yerleştirilir. GD kolonuna 600 µL Wash tamponu eklenir. 14-16000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir. Akış atılır ve GD kolonu yeni 2mL'lik toplama tüpüne yerleştirilir. 14-16000 x g'de 3 dakika santrifüjlenir.
5. Elüsyon: Standart elüsyon hacmi 100 µL'dir. Daha az örnek gerekli ise DNA konsantrasyonunu artırmak için hacim azaltılabilir (30-50 µL). GD kolonu steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir. Kolon matrisinin merkezine önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklenir ve 3 dakika bekletilir. Sonrasında 14-16000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir. Elde edilen DNA moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: DNA izolasyon aşamaları (Görsel kit içeriğinden uyarlanmıştır)

Elde edilen genomik DNA'ların miktar ve saflığını belirlemek amacıyla bir mikro-hacim spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Genomik DNA'ların miktar ve saflık analizleri A260/A280 nm dalga boyu ölçümleriyle (~1,7-1,8 absorbans) yapılmıştır.

3.2.11.2 İzolatların Genomik DNA'larının *in Vitro* Çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA üzerindeki spesifik bir bölgenin, uygun primerler kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılması işlemidir. İzolasyonu ve saflık kontrolü yapılan bakteri DNA'larının moleküler biyolojik tanımlanması için konvansiyonel termal döngüleyici cihaz ile bakteriler için korunmuş bölge olan evrensel 16S rRNA bölgesini hedef alan 11F-1492R primerleri kullanılmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.3: Primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi
11F	5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

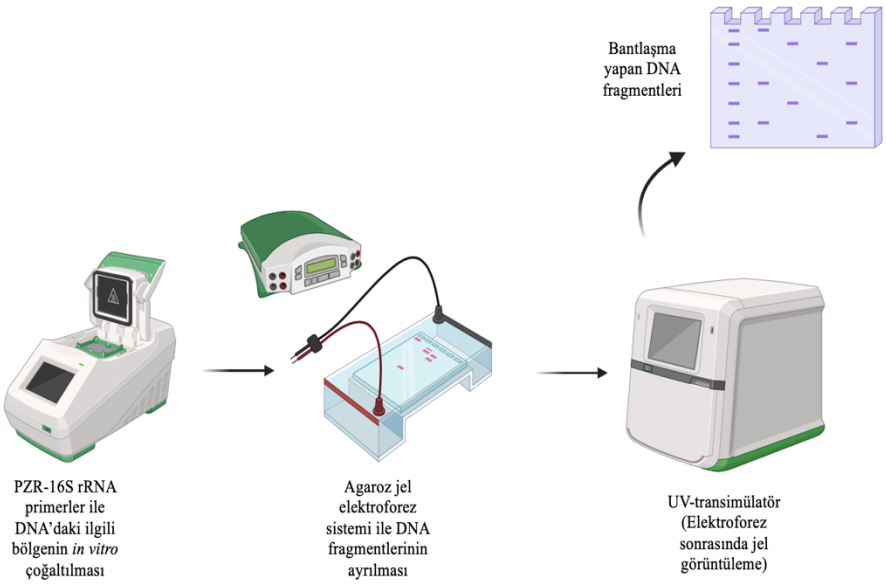
PZR için, EcoTaq 2x PCR Master Mix (ECO-TECH Biotechnology, Türkiye) kullanılmıştır. PZR protokolü Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4: PZR döngü sayısı ve sıcaklıkları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	98°C	30 sn	1
Denatürasyon	94°C	10 sn	35
Primerlerin bağlanması	55°C	15 sn	
Uzama	72°C	15 sn	
Son uzama	72°C	1 dk	1
Soğutma	4°C	∞	∞

3.2.11.3 Agaroz Jel Elektroforezi ve Ürün Kontrolü

Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinleri molekül ağırlığı, miktarı ve tiplerine göre ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. PZR ürünlerini doğrulanması için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. 1 g agaroz (BIOMAX, HISPANAGAR, İspanya) tartılıp, 100 mL 1x Tris-asetik asit-EDTA (TAE, EcoTech Biotechnology, Türkiye) tamponu içerisinde homojen oluncaya kadar çözülerek agaroz jel hazırlanmıştır. DNA'ların görüntülenmesi için 0,75 µL etidyum bromür eklenen jel tanka dikkatli bir şekilde dökülüp donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilerek TAE tampon çözelti ile tank yeterli seviyeye kadar doldurulmuştur. Her bir PZR ürününden 8 µL ve DNA işaretleyiciden (GRISP universal ladder GL061.0050, Portekiz ve 1kb Plus Opti-DNA Marker G248, Applied Biological Materials, Kanada) 5 µL jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Sonrasında elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 90 voltta 45 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonunda agaroz jel, jel görüntüleme cihazına yerleştirilerek görüntüleme yapılmıştır. Agaroz jelde görüntülenen bantlar, DNA işaretleyicide karşılık gelen bölgelere göre yorumlanmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: PZR ve agaroz jel elektroforezi

3.2.11.4 İzolat DNA'larının Dizilenmesi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

DNA dizilenmesi, bir DNA molekülündeki nükleotit bazlarının sırasının belirlenmesidir. İzolatların moleküler olarak tanılanmasının yapılması amacıyla, doğrulaması yapılan PZR ürünleri Sanger dizileme yöntemi kullanılarak hizmet alımı ile (BM Labosis, Türkiye) yapılmıştır. Dizilenen gen bölgelerinde gerekli temizleme ve düzenleme işlemleri DNA Dragon-DNA Sequence Contig Assembler Software (SequentiX- Digital DNA Processing, Almanya) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında, temizleme ve düzenleme işlemleri yapılan DNA dizileri Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) web sitesi BLAST programı (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak sisteme kayıtlı organizmalar ile dizi benzerlikleri bakımından değerlendirilmiştir. %97 ve üzeri benzerlik gösteren organizmalar tespit edilmiştir. MEGA11 (https://www.megasoftware.net) programı kullanılarak Neighbor-Joining metoduyla 1000 Bootstrap uygulanarak izolatlara ait filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3.2.12 Bakterilerin Degradasyon ve Biyosürfaktan Genlerinin Analizi

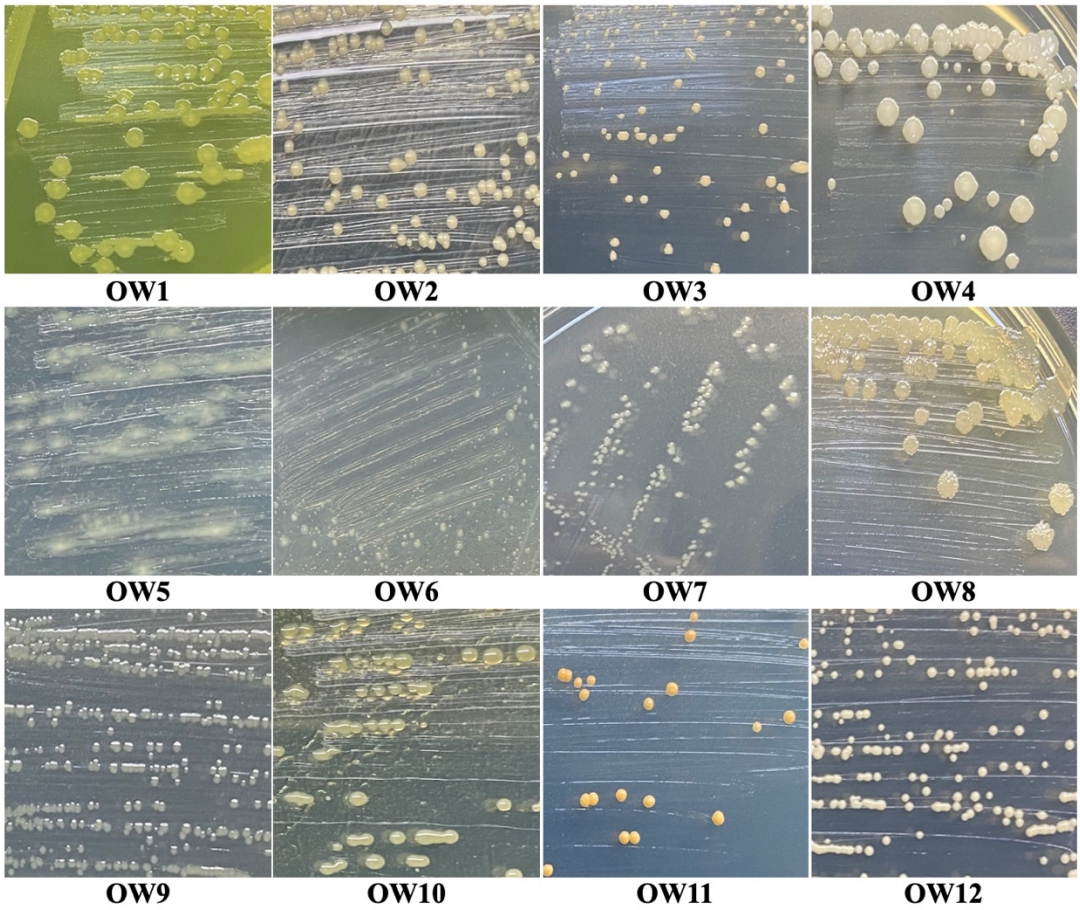
Bakterilerin yağ/su ara yüzüne adsorpsiyonu için gerekli özelliklerden olan degradasyon ve biyosürfaktan üretme genlerinin varlığı araştırılmıştır. İzolatlarda alkan degradasyonundan sorumlu genlerin varlığını tespit etmek için alkan monooksijenaz enziminin üretiminden sorumlu olan *alk* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Biyosürfaktan üretiminden sorumlu genler için izolatlara özgü olası biyosürfaktan türleri literatürden tespit edilmiştir. Glikolipid türüne ait ramnolipid üretiminde sorumlu ramnozil transferaz enzimini kodlayan *rhl* genleri (*rhl*B ve *rhl*C) ve trehalolipid üretiminden sorumlu trehaloz-fosfat sentaz (*ots*A), trehaloz-fosfat fosfataz (*ots*B) ve malto-oligosiltrehaloz sentaz (*tre*Y) enzimlerinin üretiminden sorumlu *ots* ve *tre* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada, izolatların ilgili gen bölgelerine özgü primerlerden literatürde tespit edilebilenler sentezletilmiştir. Literatürden tespit edilemeyen genler için ise, izolatlara özgü olarak ilgili primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımında belirlenen enzimlere özgü protein dizilerinin tespiti için UniProt (https://www.uniprot.org) veritabanı kullanılmıştır. Protein dizilerine özgü nükleotid dizileri NBCI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) veri tabanından tespit edilmiştir. Belirlenen dizilere özgü primerler Primer3 (https://primer3.ut.ee) ve NCBI primer BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) programları kullanılarak tasarlandıktan sonra yine NCBI veri tabanı kullanılarak kontrolü yapılmıştır. Primerlerin sentezi ilgili firma aracılığıyla temin edilmiştir (Sentebiolab, Türkiye). Çalışmada kullanılan primerleri içeren tablo EK A'da verilmiştir.

Degradasyon ve biyosürfaktan genlerinin varlığının tespiti için izolatlara özgü primerler kullanılarak ilgili gen bölgeleri PZR çoğaltılmıştır. Genlerin varlığı agaroz jel elektroforez tekniği ile saptanmıştır.

4. BULGULAR

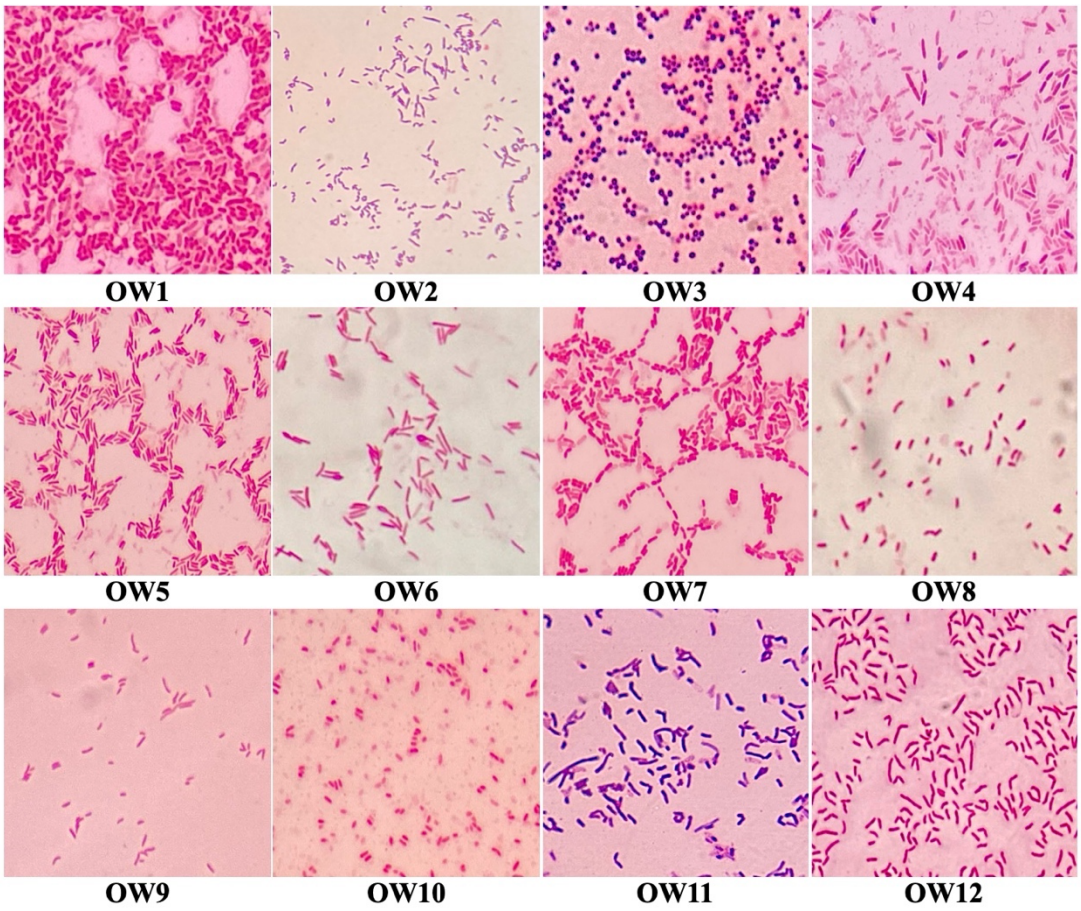
4.1 Bakterilerin İzolasyonu ve Belirlenmesi

Çevresel kaynaklardan yapılan izolasyon işlemleri sonrasında *n*-dekan/su ara yüzüne en hızlı tutunma, biyofilm oluşturma ve *n*-dekan emülsifiye etme özelliklerine göre 12 bakteriyel izolat seçilmiştir. Bakteri izolatlarının LB besiyerinde krem, beyaz, şeffaf ve turuncu renkli koloniler oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: İzolatların LB besiyerindeki koloni görünümleri

İzolatların Gram özellikleri ve ışık mikroskobu altında hücre morfolojilerinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2).



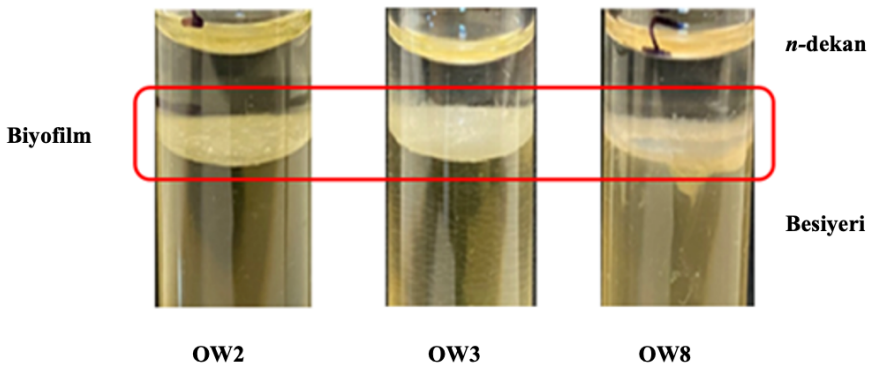
Şekil 4.2: İzolatların Gram özellikleri ve mikroskop morfolojileri

İzolatların ön tanılamaları için LB besiyeri üzerindeki koloni şekli, koloni rengi gibi özellikler ile Gram reaksiyonları, hücre morfolojileri, referans hidrokarbon (*n*-dekan) içeren BH ve LB besiyerlerinde üreme durumları, izolatlara verilen bakteri kodları ile birlikte Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: İzolatların genel özellikleri

İzolat Kodları	Genel Özellikler				
	LB besiyerindeki koloni morfolojisi	**Gram özelliği**	**Hücre morfolojisi**	**%5 *n*-dekan içeren NB'da üreme (30°C)**	**%5 *n*-dekan içeren BH'de üreme (30°C)**
OW1	Krem	Gram negatif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW2	Krem/mukoid	Gram pozitif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW3	Koyu krem	Gram pozitif	Kok	5 gün	5 gün
OW4	Beyaz	Gram pozitif	Çomak	1 gün	1 gün
OW5	Şeffaf	Gram negatif	Çomak	1 gün	1 gün
OW6	Şeffaf	Gram negatif	Çomak	5 gün	5 gün
OW7	Beyaz/küçük	Gram negatif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW8	Krem/orta	Gram negatif	Çomak	5 gün	5 gün
OW9	Krem/orta	Gram negatif	Çomak	5 gün	5 gün
OW10	Krem/küçük	Gram negatif	Çomak	5 gün	5 gün
OW11	Turuncu	Gram pozitif	Çomak	2 gün	2 gün
OW12	Beyaz/mukoid	Gram pozitif	Çomak	3 gün	3 gün

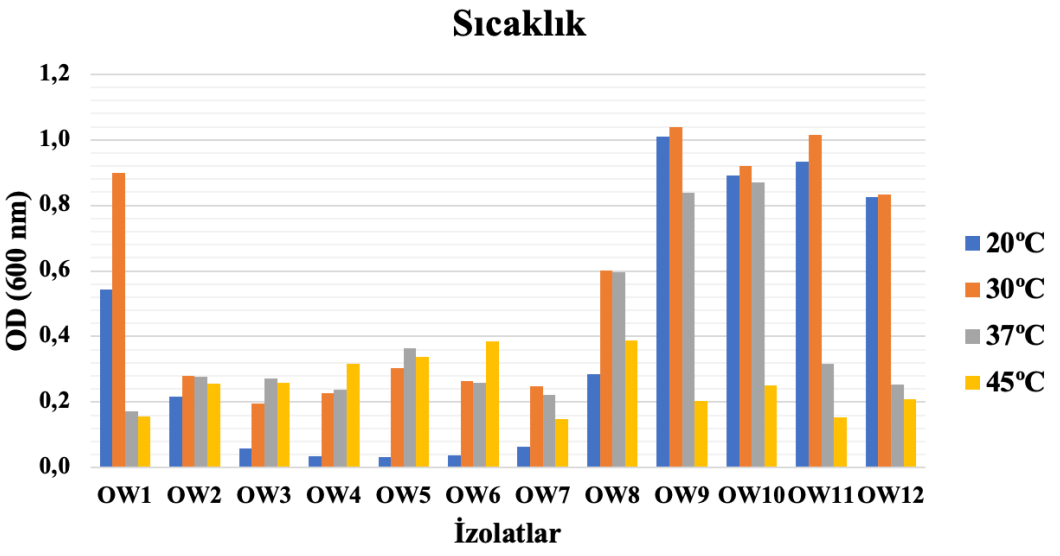
Bakteri izolatlarının %5 (v/v) *n*-dekan içeren NB ve BH besiyerlerinde 1- 5 gün arasında üredikleri gözlenmiştir. OW1, OW2, OW4, OW5 ve OW7 kodlu izolatlarda 24 saat sonrasında üremeler gözlenirken; OW11 kodlu izolat 2. günde, OW12 kodlu izolat ise 3. günde üremiştir. Ayrıca, OW3, OW6, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatlarda üremenin 5. günde gerçekleştiği görülmüştür. LB ve BH besiyerinde inkübasyon sonrasında OW5, OW6 ve OW11 kodlu izolatlar dışında diğer izolatların çoğunun *n*-dekan/su ara yüzünde biyofilm tabakası oluşturdukları ancak bu tabakaların yapısının (kalınlık, tekstür, stabilite vb.) değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. NB besiyerinde yağ/su ara yüzüne tutunan ve biyofilm oluşumu iyi olan izolatlardan bazıları Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzünde oluşturdukları biyofilm yapılarına örnekler (Orhan ve Vural 2023)

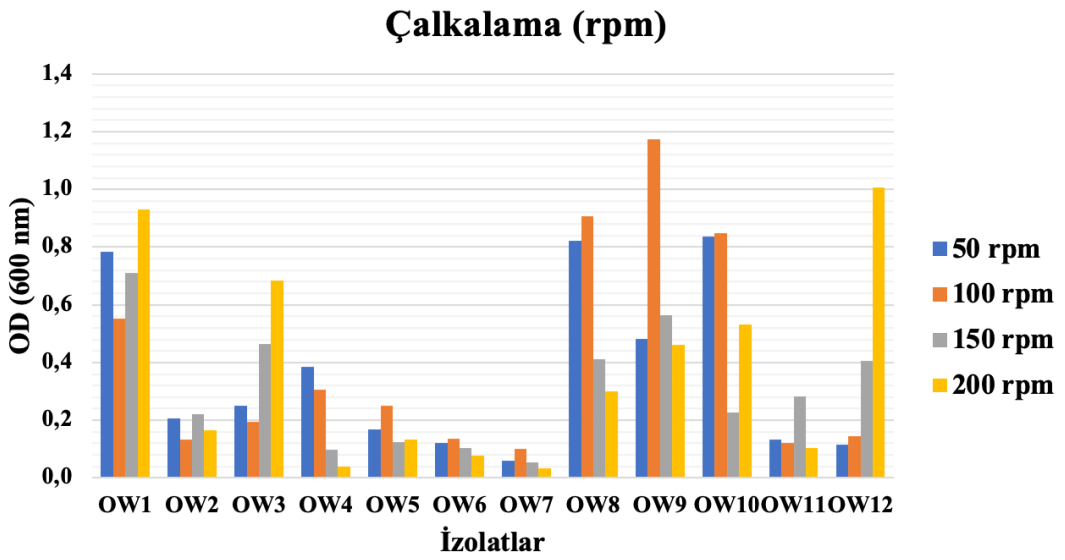
4.2 Bakterilerin Yağ/su Ara Yüzüne Tutunması İçin Optimum Şartların Belirlenmesi

Bakterilerin yağ/su ara yüzüne tutunmaları için gerekli olan optimum sıcaklık ve çalkalama koşulları belirlenmiştir. Optimum sıcaklığa ait bulgular Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.4: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzünde tutunmaları için belirlenen optimum sıcaklık değerleri

Bulgulara göre, her bir izolatın en iyi *n*-dekan/su ara yüzüne tutunma sıcaklıkları değişkenlik göstermektedir. OW1, OW2, OW7, OW8, OW9, OW10, OW11 ve OW12 kodlu izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne tutundukları optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edilmiştir. OW3 ve OW5 kodlu izolatların 37°C'de, OW4 ve OW6 kodlu izolatların ise 45°C'de *n*-dekan/su ara yüzüne daha iyi tutundukları gözlenmiştir. Genel olarak, izolatların 30°C'de ara yüz tutunmalarının iyi olduğu, ancak 20°C'nin tutunma için yeterli olmadığı söylenebilir. Bu deney sonrasında, izolatların çoğunun 30°C'de tutunma sağladıkları için çalkalama deneyi bu sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çalkalama deneyine ait bulgular Şekil 4.5.'de verilmiştir.

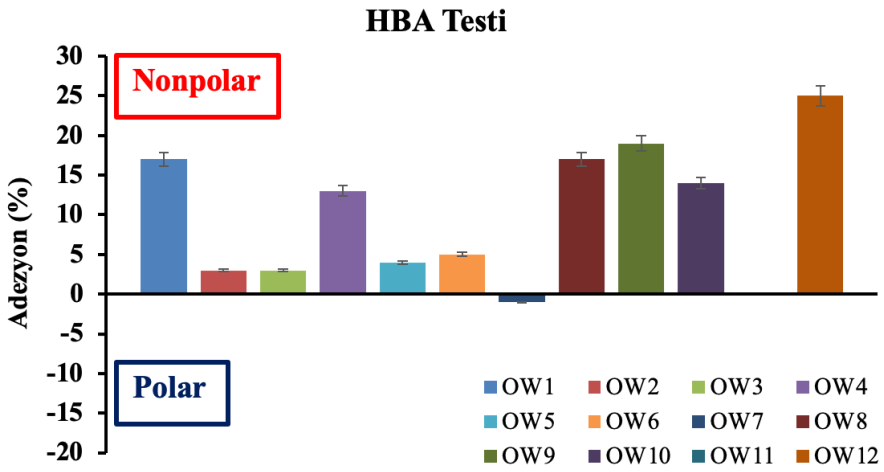


Şekil 4.5: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzüne tutunmaları için gereken optimum çalkalama koşulları

Bulgulara göre; OW5, OW6, OW7, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatların 100 rpm çalkalama ile *n*-dekan/su ara yüzüne daha iyi tutundukları gözlemlenmiştir. OW1, OW3 ve OW12 izolatlarının 200 rpm'de, OW2 ve OW11 izolatlarının 150 rpm'de ve OW4 izolatının ise 50 rpm'de en iyi ara yüze tutundukları tespit edilmiştir.

4.3 Bakteriyel Hidrofobisite ve Hidrokarbona Bakteriyel Adsorpsiyon Testi

Hidrokarbonlara bakteriyel yapışma testi (HBA) sonuçları Şekil 4.6.'da verilmiştir.



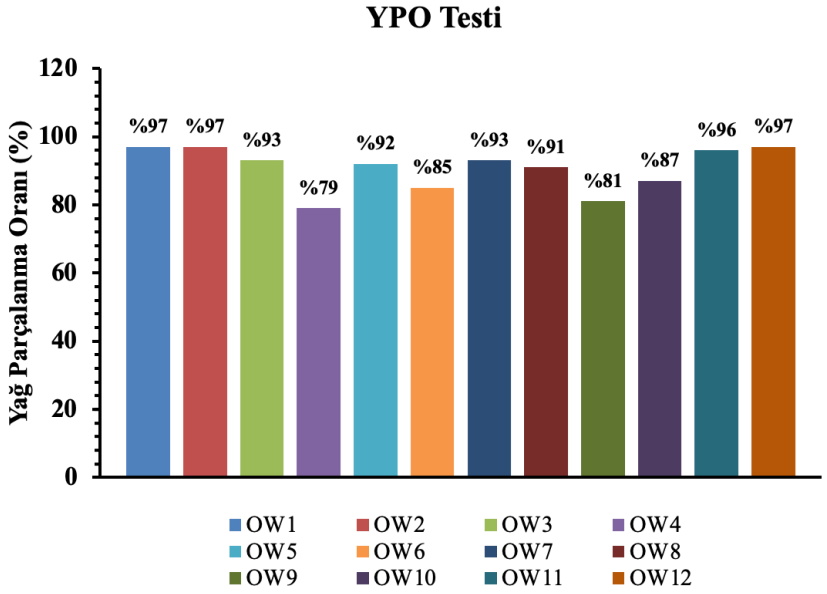
Şekil 4.6: İzolatların HBA testi sonuçları

HBA testi, mikroorganizmaların bilinen bir konsantrasyonda çalkalama sonucunda polar olmayan faz yüzeyine yapışma yeteneğini ölçen bir testtir (Rosenberg 1991). HBA testi sonuçlarına göre polar olmayan faza (*n*-dekan) en fazla tutunan izolatların OW12 (%25), OW9 (%19), OW1, OW8 (%17), OW10 (%14) ve OW4 (%13) olduğu görülmektedir. Polar olmayan faza en az tutunanlar ise OW2 (%3), OW3 (%3), OW5 (%4), OW6 (%5) olarak belirlenmiştir. OW11 kodlu izolatta polar/nonpolar faz yoğunluğunda herhangi bir değişiklik olmazken, OW7 kodlu izolatın polar yüzeye eğilimi olduğu söylenebilir. İzolatlardan iki izolat (OW7 ve OW11) hariç diğer tüm izolatların hidrofobik karakterde olduğu söylenebilir.

4.4 Bakterilerin Toplam Hidrokarbon Giderimlerinin Belirlenmesi

Hidrokarbon giderimi testinden elde edilen bulgulara göre izolatların çoğunun yüksek hidrokarbon giderimine sahip olduğu görülmektedir. En yüksek hidrokarbon giderimlerinin %97 oranıyla OW1, OW2 ve OW12 kodlu izolatlar oldukları, en düşük hidrokarbon gideriminin ise %79 oranıyla OW4 kodlu izolatına

olduğu gözlenmiştir. Hidrokarbon giderimi testine ait bulgular Şekil 4.7.'de verilmektedir.



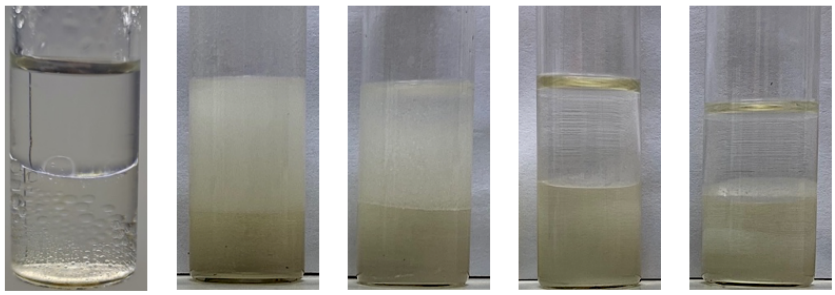
Şekil 4.7: İzolatların YPO testi sonuçları

4.5 Bakterilerin Biyosürfaktan Üretim Potansiyelleri

Çalışmada 12 bakteriyel izolatın, biyosürfaktan üretme yeteneği olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel izolatların biyosürfaktan üretme yeteneklerinin tespiti için E_{24}, yağ yayma ve CTAB agar petri testlerine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

4.5.1 Emülsifikasyon İndeksi Testi

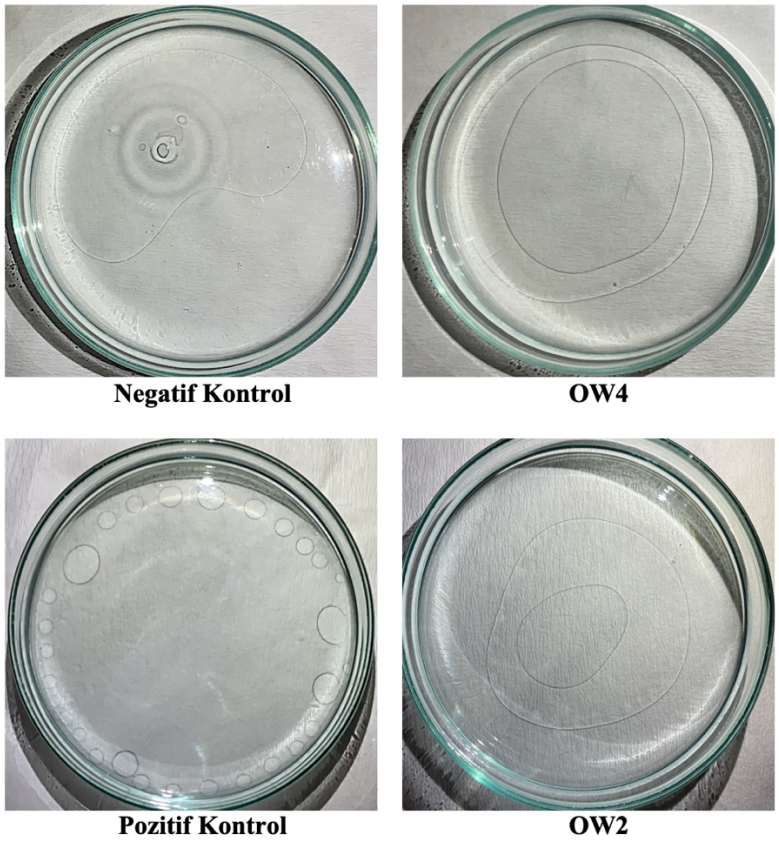
İzolatların emülsifikasyon indeksi kerosen ile ölçülmüştür. Bulgulara göre; OW1 (%53,7), OW4 (%70), OW5 (%63), OW6 (%57,4), OW7 (%61,1), OW8 (%63) ve OW9 (%51,9) kodlu izolatların %50'nin üzerinde emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. En düşük emülsifikasyon aktivitesi gösteren bakteri izolatları ise OW2 (%9,3), OW3 (%9,3) ve OW12 (%9,3) kodlu izolatlardır. OW10 kodlu izolatın %27,8 ve OW11 izolatın ise %16,7 oranında emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.2) En yüksek ve en düşük emülsifikasyon aktivitesi gösteren izolatlara ait görüntüler Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8: Bakteriyel izolatların E_{24} indeksi testi sonuçları. İnokülasyon yapılmamış LB sıvı besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.5.2 Yağ Yayma Testi

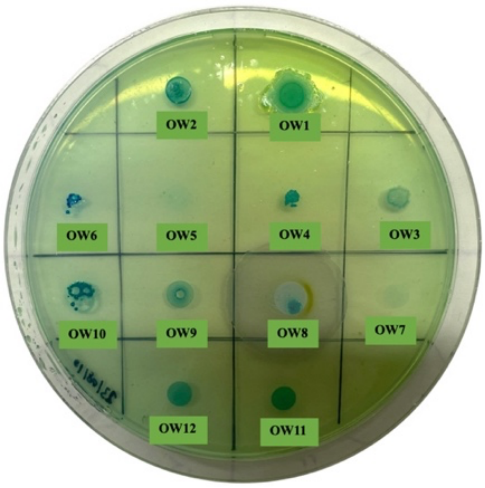
İzolatların yağ yüzeyinde meydana getirdikleri açılma alanları cetvel vasıtasıyla ölçülerek ortalamaları alınmıştır. OW4 (5,83 cm), OW9 (5,18 cm) ve OW12 (5,15 cm) kodlu izolatların 5 cm'nin üzerinde yağ yüzeyinde açılmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Yağ yüzeyinde büyük açılma zonları biyosürfaktanın yüksek yüzey aktivitesini temsil etmektedir. İzolatlardan en az açılma zonuna sahip olan izolat ise OW2 kodlu izolat olarak saptanmıştır. Biyosürfaktan varlığını tespit etmek için kullanılan yağ yayma testine ait bulgular Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Yağ yayma testinde en yüksek ve en düşük yüzey aktivitesine sahip izolatlara ait görüntüler Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9: Yağ yayma testine ait görüntüler (Su negatif kontrol, Tween 80 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır).

4.5.3 CTAB Agar Petri Testi

Bu testte koloni etrafında mavi zon oluşturan izolatlar pozitif, yani biyosürfaktan üreticisi olarak kabul edilmiştir. Bulgulara göre, OW5 ve OW7 dışındaki tüm izolatların biyosürfaktan ürettikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). CTAB agar petri testine ait bulgular Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.10: İzolatların CTAB-metilen mavisi besiyerinde üreme durumları

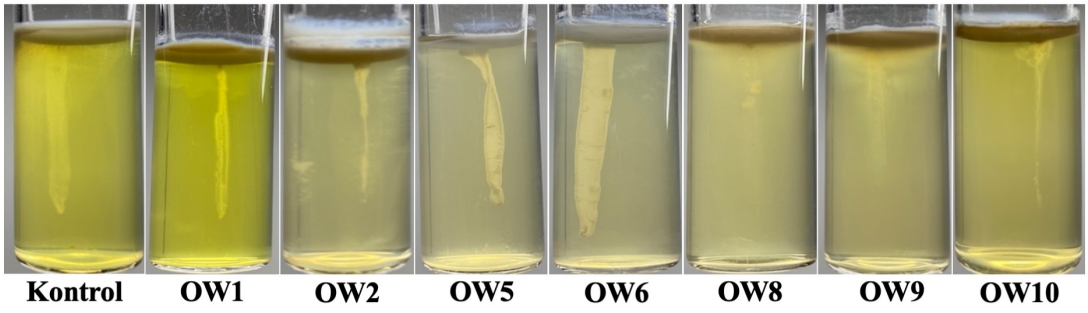
Biyosürfaktan varlığını tespit etmek amacıyla yapılan E_{24} indeksi testi, yağ yayma testi ve CTAB agar petri testi sonuçlarına göre izolatların farklı aktiveye sahip biyosürfaktan üretme potansiyellerinin olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2: İzolatların biyosürfaktan tarama testlerine ait veriler

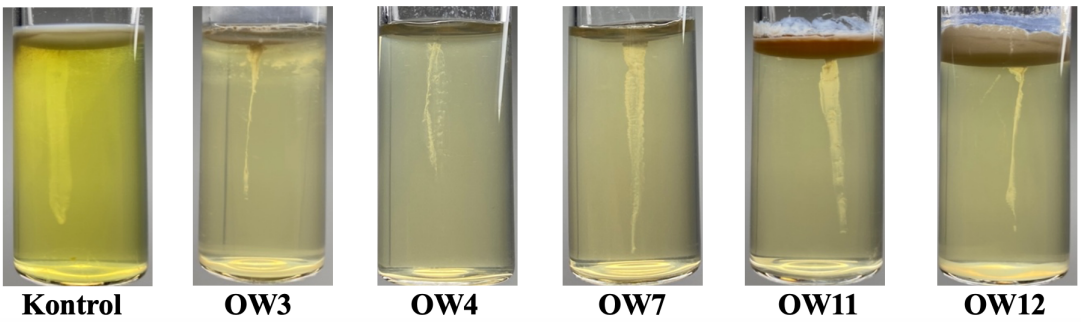
Bakteriyel izolatlar	E_{24} indeksi testi (%)	Yağ yayma testi (açılma zon çapı-cm)	CTAB agar petri testi
OW1	53,7	3,12	+
OW2	9,3	2,98	+
OW3	9,3	3,81	+ (zayıf)
OW4	70	5,83	+
OW5	63	4,84	-
OW6	57,4	3,80	+
OW7	61,1	3,92	-
OW8	63	3,34	+
OW9	51,9	5,18	+
OW10	27,8	4,28	+
OW11	16,7	3,82	+
OW12	9,3	5,15	+ (zayıf)

4.6 Bakteriyel Haraketlilik Testi

İlk olarak, bakterilerin %0,5 agar içeren yarı katı ortamda genel bakteriyel hareketlilik durumları gözlemlenmiştir. Dik yarı-katı ortama ekimleri yapılan izolatlar inkübasyon sonrasındaki durumları Şekil 4.11' de gösterilmektedir. Buna göre; OW1, OW2, OW5, OW6, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatların hareketli oldukları gözlemlenmiştir. Diğer izolatların ise hareket yeteneklerinin sınırlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: Hareketlilik testine göre hareketli olan izolatlar (Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.)



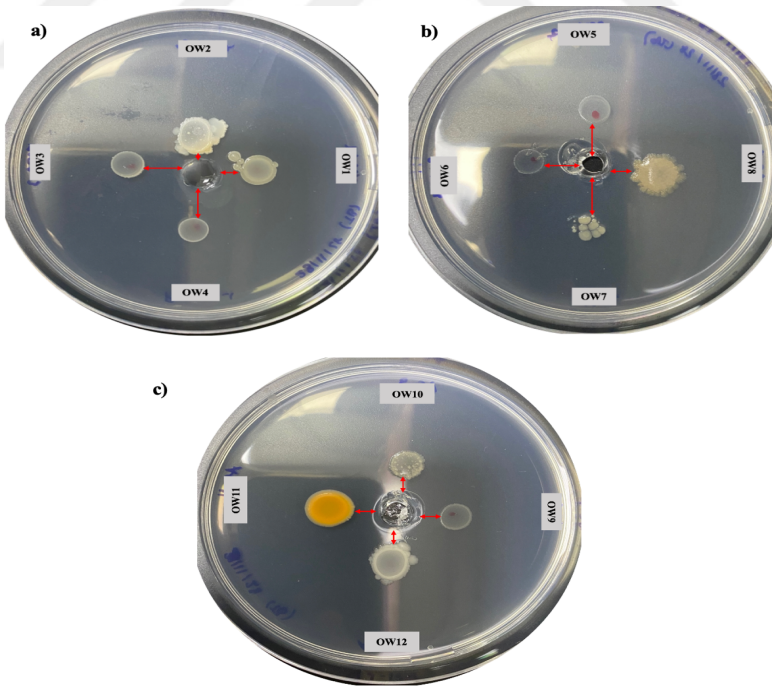
Şekil 4.12: Hareketlilik testine göre hareketleri sınırlı olan izolatlar (Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.)

Kantitatif gradyan petri testinde petri merkezindeki içinde hidrokarbon bulunan deliğe olan yakınlıkları ve izolatların spotlandıktan sonra büyüme çapları kemotaksi yeteneklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. 30°C'de 7 gün inkübasyon sonrasında elde edilen veriler Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

Tablo 4.3: İzolatların gradyan petri testi sonuçları

Bakteriyel izolatlar	Hidrokarbona uzaklık (cm)	Büyüme çapı (cm)
OW1	0,5	1
OW2	0,1	1,1
OW3	0,8	0,8
OW4	0,7	0,8
OW5	1	0,8
OW6	1,1	0,7
OW7	0,9	0,8
OW8	0,8	1,3
OW9	0,7	0,7
OW10	0,6	0,7
OW11	0,6	1,2
OW12	0,7	1,1

Bu testte izolatlar hidrokarbona 1,5 cm uzaklıkta spotlanmıştır. Buna göre; OW2, OW9 ve OW10 kodlu izolatlarda hidrokarbona doğru bir yönelim olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatların ise, ekimi yapıldığı noktalarda yayılarak büyüdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



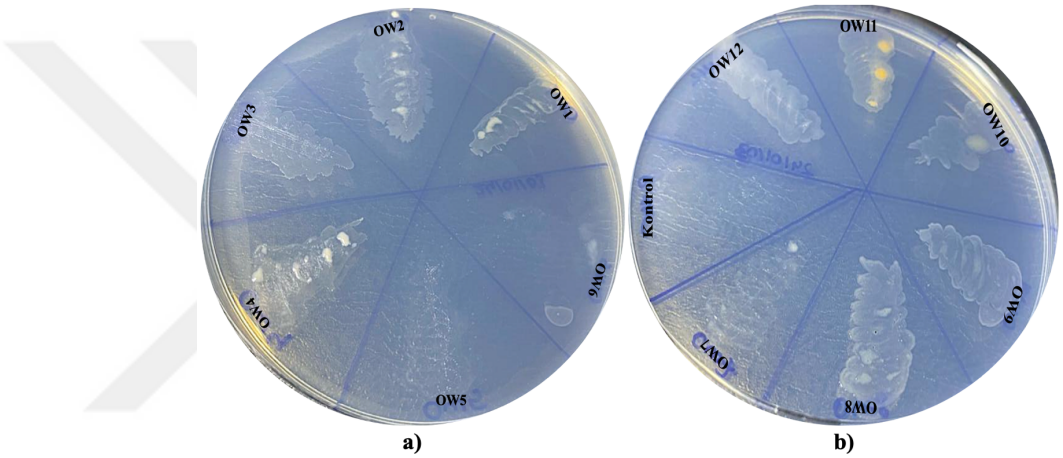
Şekil 4.13: Kantitatif gradyan petri testi

Diğer bir kemotaksi testi olan kantitatif kapiler test sonuçlarına göre; OW3, OW4, OW7, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatların petrilerinde üreme olmadığı tespit

edilmiştir. Diğer izolatlarda ise en yüksek OW1 (1,3x10^6 kob/mL), OW11 (2,3x10^6 kob/mL) ve OW12 (2,8x10^6 kob/mL) kodlu izolatların petride üredikleri tespit edilmiştir.

4.7 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

İzolatların EPS üretim yeteneklerini kantitatif olarak belirlemek için RVC-sükroz besiyeri kullanılmıştır. 30°C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında petrilerdeki koloni görünümleri Şekil 4.14'te verilmiştir.



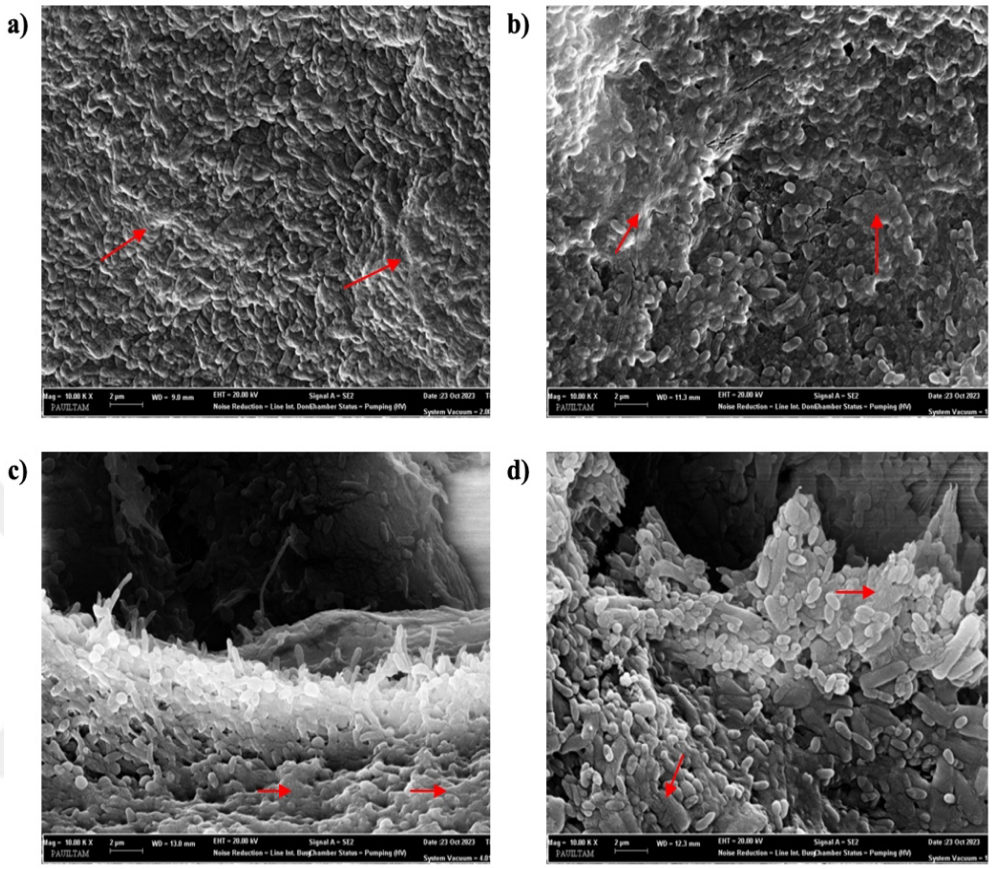
Şekil 4.14: İzolatların Ekzopolisakkarit (EPS) üretim durumları (Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.)

Buna göre OW1, OW2, OW4, OW8, OW9, OW10, OW11, OW12 kodlu izolatlarda oluşan jel görünümlü koloniler EPS varlığını göstermektedir. OW8, OW10 ve OW12 kodlu izolatlarda EPS üretiminin daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. OW3, OW5 ve OW7 kodlu izolatlarda üreme zayıf olduğu için EPS üretiminin zayıf olduğu gözlemlenmiştir.

4.8 FESEM Analizi

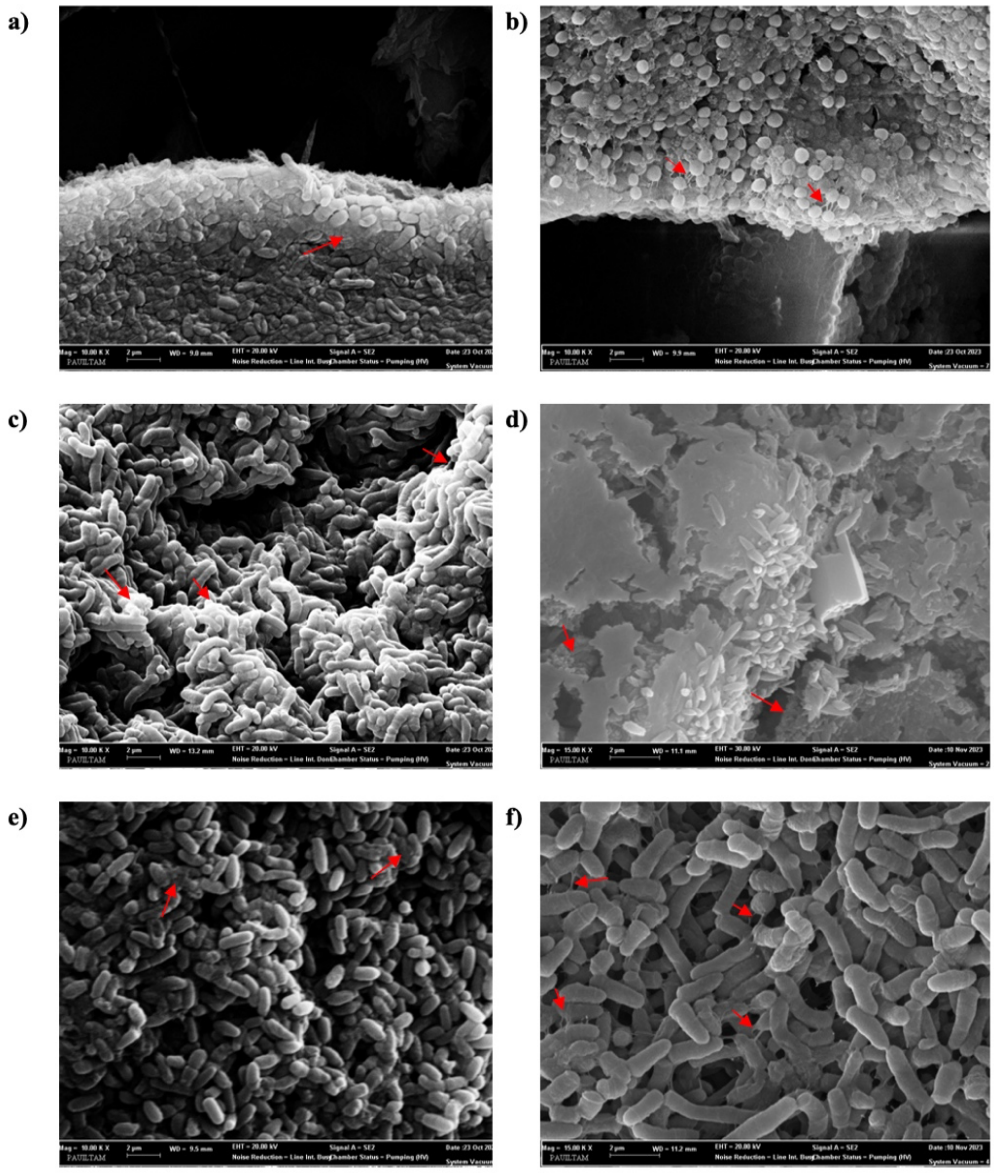
İzolatların oluşturdukları biyofilm yapılarını gözlemlemek için *n*-dekan/su ara yüzünde oluşan biyofilmlerin FESEM ile görüntülemesi yapılmıştır. OW1, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatların daha yoğun biyofilm yapıları oluşturduğu

görülmüştür. Bu izolatların FESEM görüntülerinde (Şekil 4.15) birbirine bağlı hücre ağları ve salgılanan polimerik matrisler, bu bakterilerin biyofilm oluşturduklarını ortaya koymaktadır.



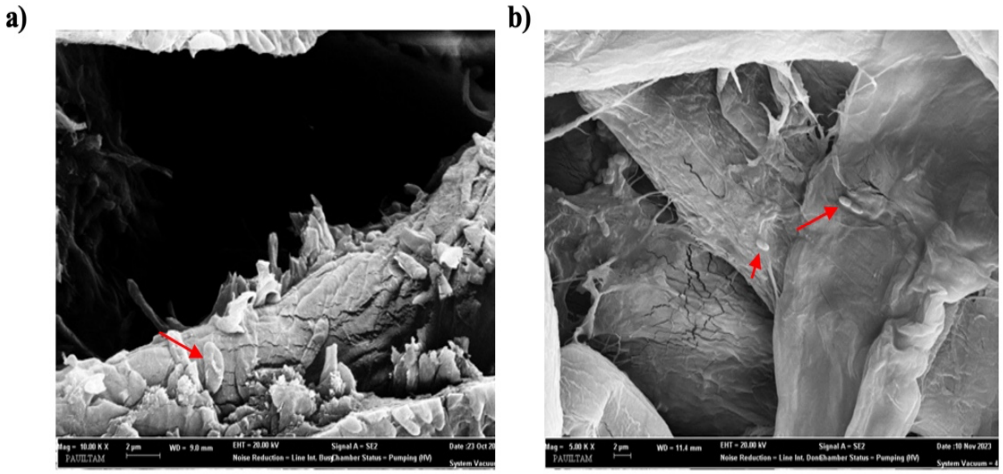
Şekil 4.15: FESEM görüntüleri (10000x büyütme). Kırmızı oklar biyofilmlerdeki polimerik yapıları göstermektedir. a) OW1, b) OW8, c) OW9 ve d) OW10

OW2, OW3 ve OW12 kodlu izolatların biyofilm yapıları birbirine benzer özellikte olup EPS oluşumu daha az olarak gözlemlenmiştir. OW5, OW6 ve OW11 kodlu izolatlarda ise şeffaf bir ara yüz yapısının, biyofilm oluşumuna işaret ettiği düşünülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: FESEM görüntüleri (10000-15000x büyütme). Kırmızı oklar biyofilmlerdeki polimerik yapılarını göstermektedir. a) OW2, b) OW3, c) OW12, d) OW5, e) OW6 ve f) OW11

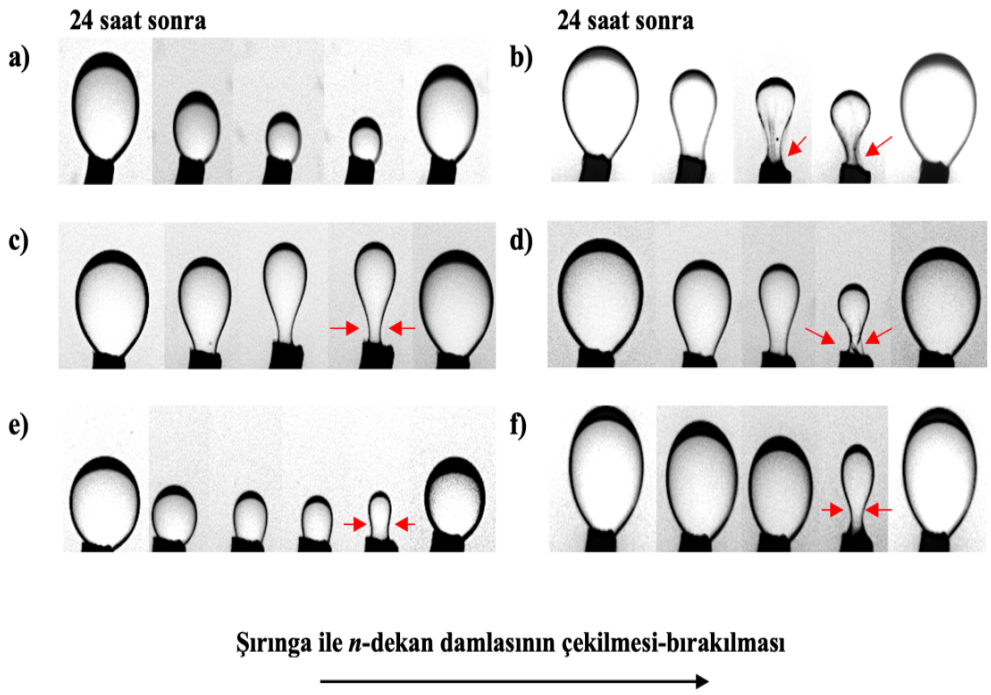
OW4 ve OW7'de filtre kağıdına tutunan az sayıda tekli bakteri öbekleri görülmüştür ve biyofilm oluşumuna dair bir kanıt bulunamamıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: FESEM görüntüleri (10000-15000x büyütme). Kırmızı oklar filtre kağıdına tutunan bakteri hücrelerini göstermektedir. a) OW4 ve b) OW7

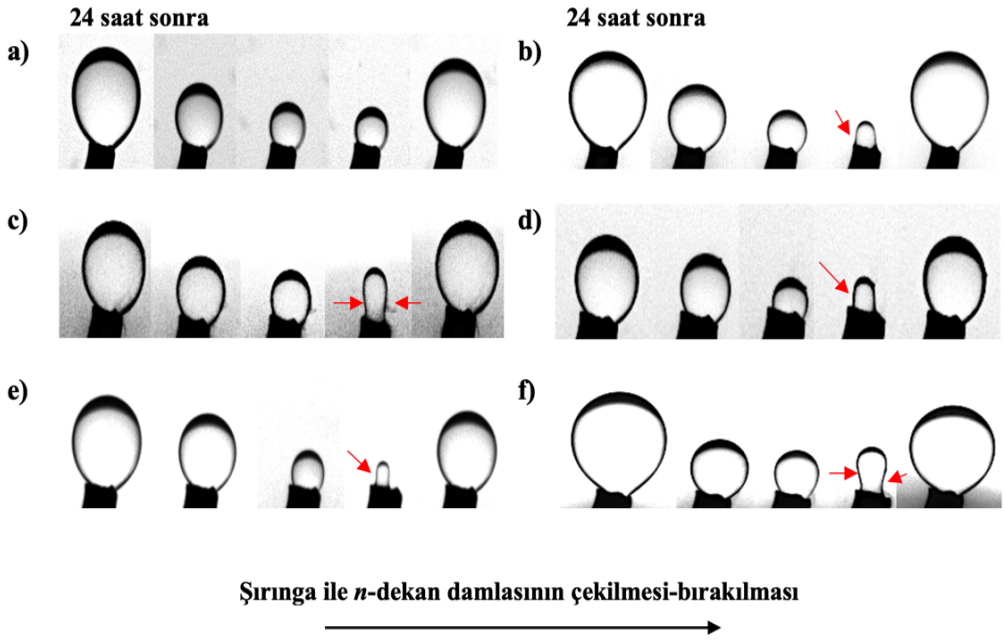
4.9 Yağ/ su Ara Yüzünde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakalarının Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin *n*-dekan/su ara yüzündeki reolojik özelliklerinin incelenmesi için gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre; OW1, OW8, OW9, OW10 ve OW12 kodlu izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne hızla adsorbe olduğu ve 24 saat içinde stabil ve elastik biyofilm yapısı oluşturdukları tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



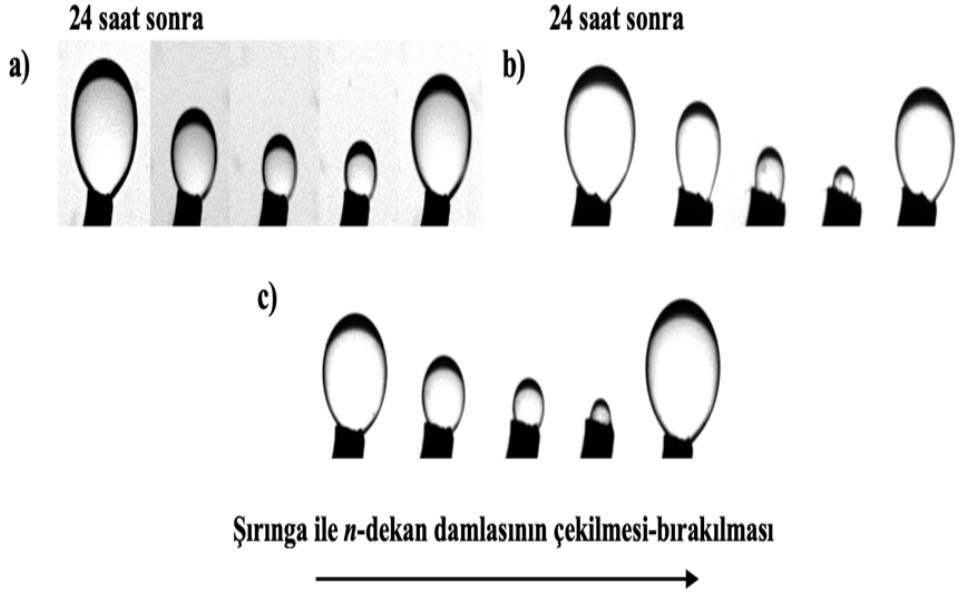
Şekil 4.18: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. Kırmızı oklar 24 saat sonunda *n*-dekan damlasına tutunan bakterilerin biyofilmlerini göstermektedir. a) Kontrol, b) OW1, c) OW8, d) OW9, e) OW10 ve f) OW12

OW2, OW3, OW5, OW6 ve OW11 koldu izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne adsorbe olduğu ancak stabil biyofilmler oluşturmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



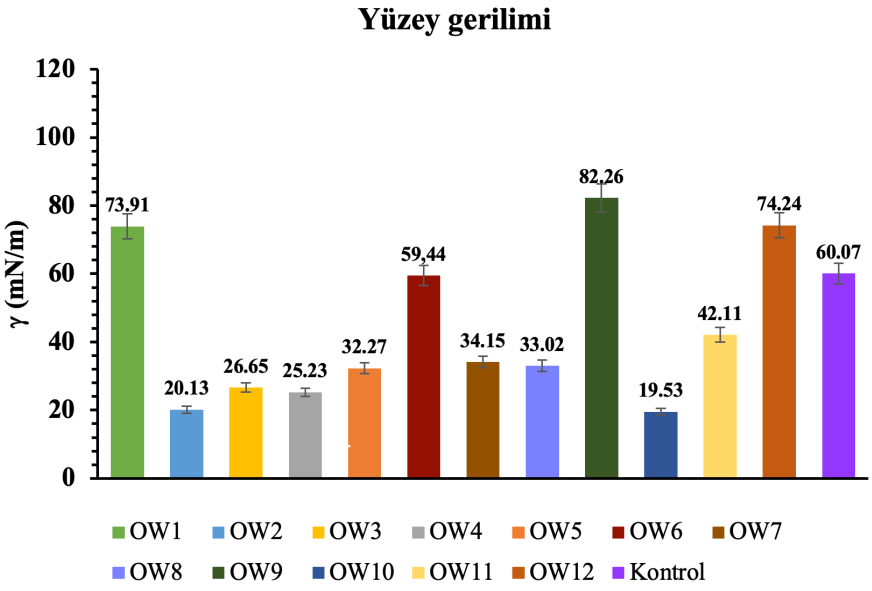
Şekil 4.19: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. Kırmızı oklar 24 saat sonunda *n*-dekan damlasında meydana gelen değişimi göstermektedir. a) Kontrol, b) OW2, c) OW3, d) OW5, e) OW6 ve f) OW11

Ayrıca OW4 ve OW7 kodlu izolatlarda kontrole göre bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü reolojileri. a) Kontrol, b) OW4 ve c) OW7

Bu durum biyofilm yapısının 10 gün sonra bile görüntülenemediği ve tam olarak oluşmuş bir biyofilmin elastik membran özelliklerinin ara yüz alanını şekillendirmediğini göstermiştir. Buna karşılık, FESEM analizleri OW1, OW8, OW9, OW10 ve OW12 kodlu izolatların 10 gün sonunda *n*-dekan/su ara yüzünde kalın ve olgun biyofilmler oluşturduğunu ve bu durumun 24 saat sonraki elastiki davranışlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bulgulara göre, OW1, OW8, OW9, OW10 ve OW12 kodlu izolatların *n*-dekan/su ara yüzünde yetkin bir biyofilm üreticisi olduğu söylenebilir.



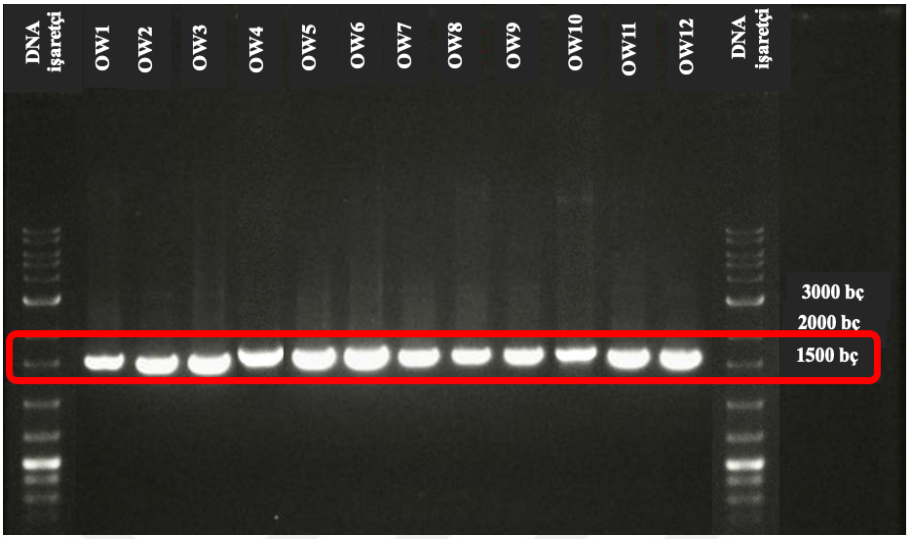
Şekil 4.21: İzolatların *n*-dekan/su ara yüzü yüzey gerilimleri

Asılı damla tekniği kullanılarak *n*-dekan/su ara yüz gerilimi ölçümleri ile farklı suşlar için farklı adsorpsiyon davranışları gözlemlenmiştir (Şekil 4.21). OW1, OW6, OW9 ve OW12 kodlu izolatlarda kontrole (PBS) göre ara yüz gerilimlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En büyük yüzey gerilimine sahip izolat OW9 (82,26 mN/m), en düşük yüzey gerilimi OW10 (19,53 mN/m) kodlu izolatına sahip olduğu görülmüştür.

4.10 Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanımlanması

Bakteriyel izolatların moleküler tanımlamaları kapsamında ilk olarak saf izolatlardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise DNA yoğunluğu

kontrol edilerek universal 16S rRNA gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezi ile doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 4.22)



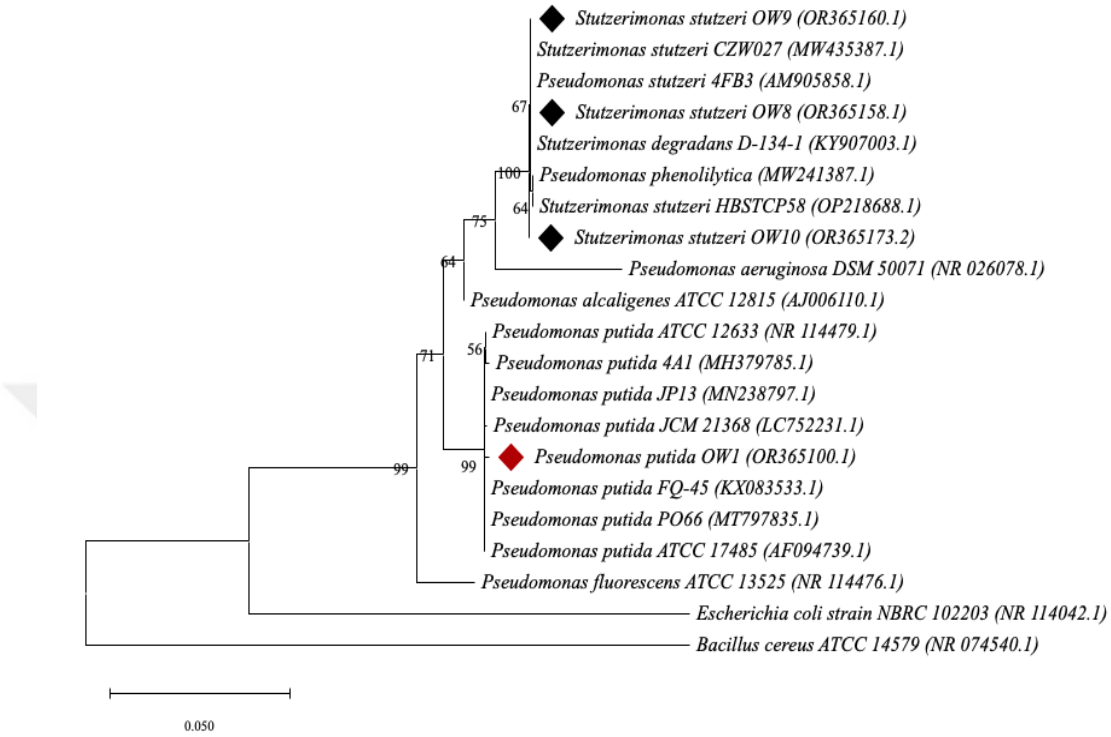
Şekil 4.22: Bakteriyel izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü

16S rRNA gen bölgesi çoğaltılan izolatların veritabanındaki16S rRNA gen dizileri ile benzerliklerine göre %97 ve üstü benzerlik oranına sahip, en yakın ilişkili suşlar belirlenerek, tür bazında tanımlama yapılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: İzolatların 16S rRNA dizi analiz sonuçları

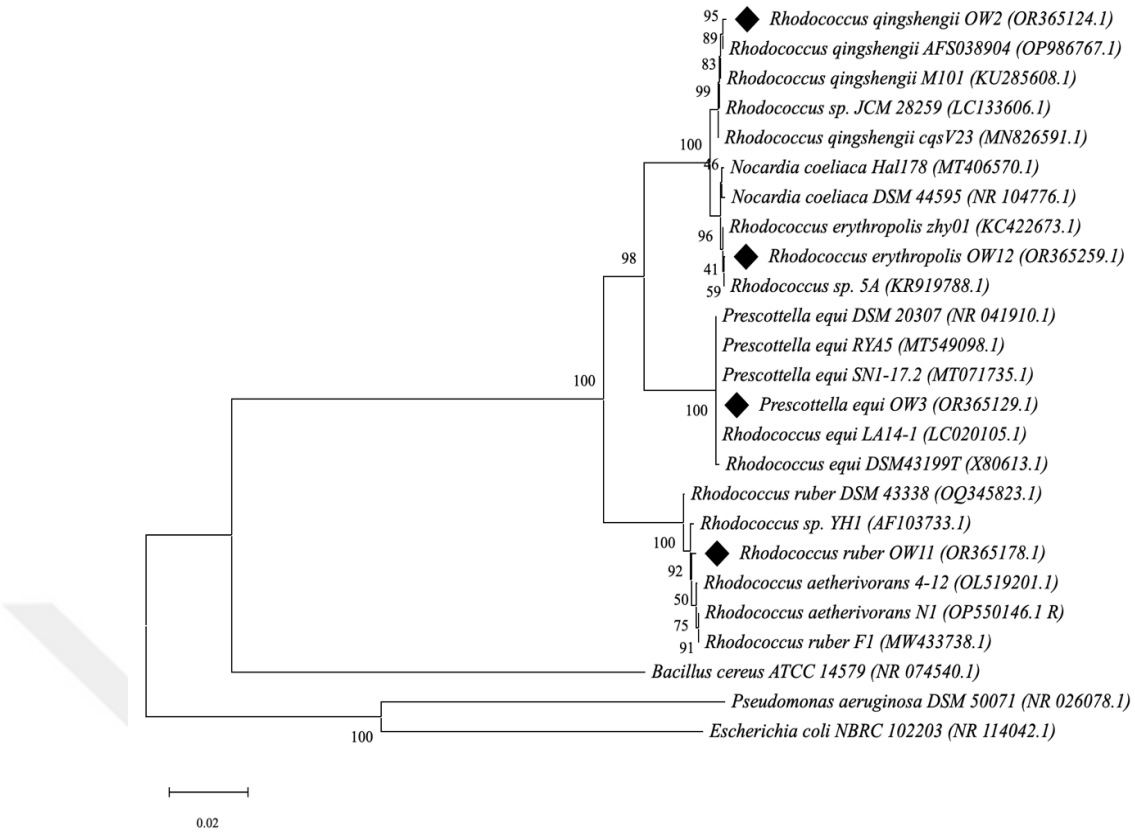
İzolat Kodu	Bakteriler (NCBI erişim numarası)	Benzerlik Oranı (%)
OW1	*Pseudomonas putida* (OR365100.1)	99,72
OW2	*Rhodococcus qingshengii* (OR365124.1)	99,57
OW3	*Prescotella equi* (OR365129.1)	100
OW4	*Brevibacillus parabrevis* (OR365147.1)	99,93
OW5	*Paenibacillus lautus* (OR365156.1)	99,86
OW6	*Paenibacillus lautus* (OR365157.1)	99,79
OW7	*Moraxella osloensis* (PP033691.1)	100
OW8	*Stutzerimonas stutzeri* (OR365158.1)	100
OW9	*Stutzerimonas stutzeri* (OR365160.1)	99,86
OW10	*Stutzerimonas stutzeri* (OR365173.2)	100
OW11	*Rhodococcus ruber* (OR365178.1)	98,29
OW12	*Rhodococcus erythropolis* (OR365259.1)	99,36

MEGA11 programı kullanılarak Neighbor-Joining metoduyla izolatlara ait filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. *Pseudomonas putida* ve *Stutzerimonas stutzeri* suşları benzer taksonlardan geldiği için bunlar bir grup içinde taranmıştır (Şekil 4.23).



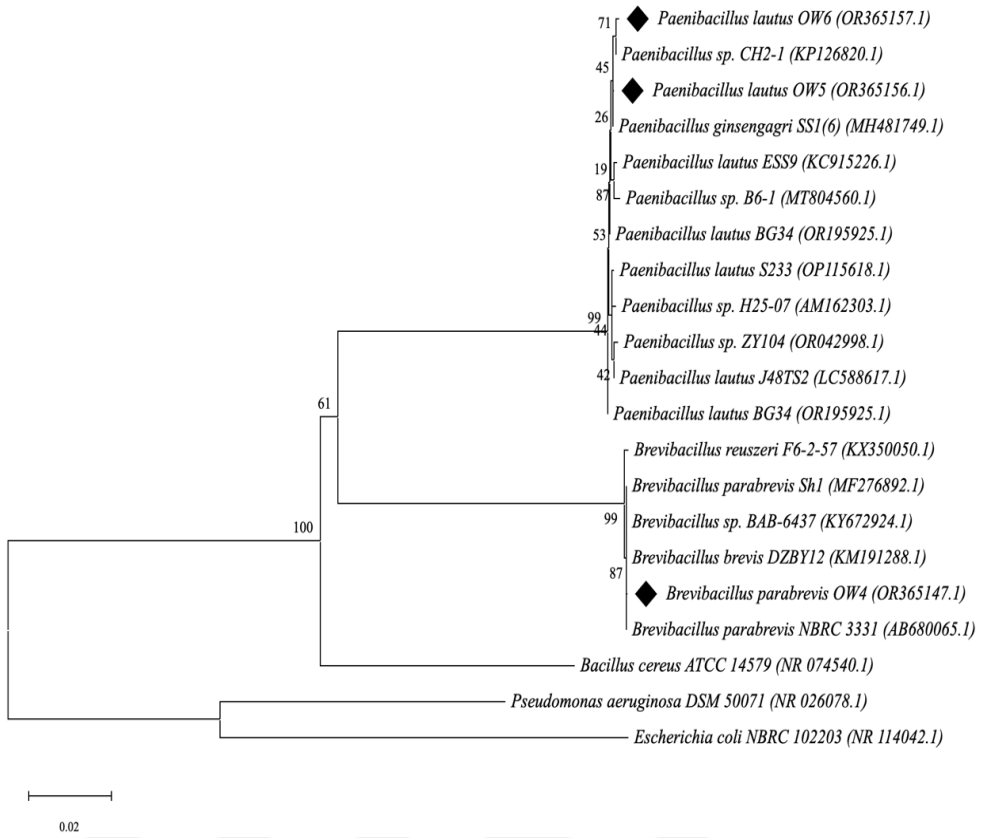
Şekil 4.23: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Pseudomonas* grubuna için oluşturulan filogenetik ağaç (İşaretli izolatlar bu çalışmada tanımlanan izolatlardır).

Filogenetik analize göre OW1 kodlu izolatına *Pseudomonas putida*, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatların ise *Stutzerimonas stutzeri* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. OW2, OW3, OW11 ve OW12 *Rhodococcus* türlerine benzer olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar bir grup olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.24).



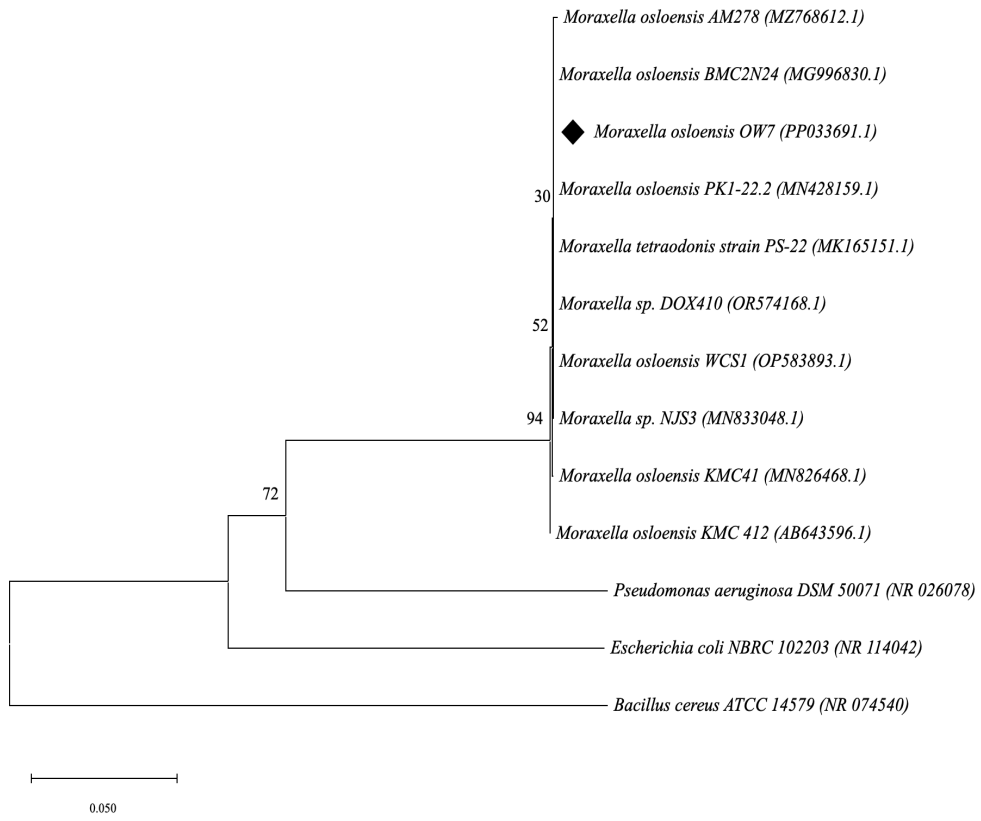
Şekil 4.24: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Rhodococcus* grubu için oluşturulan filogenetik ağaç (işaretli izolatlar bu çalışmada tanımlanan izolatlardır).

Filogenetik analiz sonuçlarına göre, OW2 kodlu izolat *Rhodococcus qingshengii*, OW11 kodlu izolat *Rhodococcus ruber* ve OW12 kodlu izolat *Rhodococcus erythropolis* olarak tanımlanmıştır. OW3 kodlu izolat *Prescotella equi* olarak tanımlanmıştır. *Prescotella equi* türü, *Rhodococcus equi* türü ile yakın olduğu görülmüştür. OW4, OW5 ve OW6 kodlu izolatlar *Bacillus* türlerine ait alt grupları temsil ettikleri için birlikte analiz edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Bacillus* grubu için oluşturulan filogenetik ağaç (işaretli izolatlar bu çalışmada tanımlanan izolatlardır).

Filogenetik analiz sonuçlarına göre, OW4 kodlu izolat *Brevibacillus parabrevis*, OW5 ve OW6 kodlu izolatlar ise *Paenibacillus lautus* olarak tanımlanmıştır. OW7 izolatına ait filogenetik ağaç Şekil 4.26'da gösterilmektedir.



Şekil 4.26: 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre OW7 için oluşturulan filogenetik ağaç (işaretli izolat bu çalışmada tanımlanan izolattır)

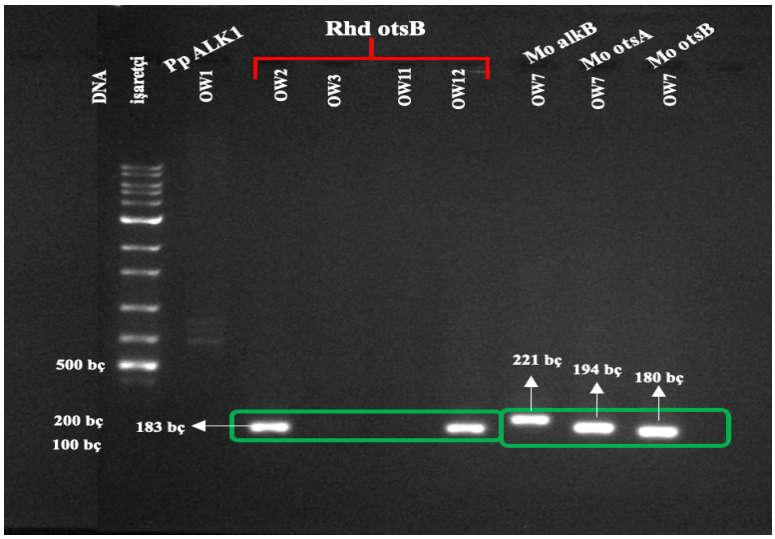
Filogenetik analiz sonuçlarına göre, OW7 kodlu izolat *Moraxella osloensis* olarak tanımlanmıştır.

4.11 Bakterilerin Degradasyon ve Biyosürfaktan Genlerinin Analizi

İzolatlarda degradasyondan ve biyosürfaktan üretimlerinden sorumlu genlerin varlığı araştırılmıştır. Literatür araştırması sonrasında degradasyon özelliğini belirlemek için *alk*Bw, *alk*B, CYP153, Pp *alk*B, Pp ALK1, Mo *alk*B, Pae *alk*B, Pae *alk*M gen bölgeleri ilgili bakteri izolatlarında taranmıştır. Biyosürfaktan özelliğini belirlemek için ise; Pp *rhl*B, Pp *rhl*C, Rhd *ots*A, Rhd *ots*B, Rhd *tre*Y, Mo *ots*A, Mo *ots*B, Pae *sfp* gen bölgelerinin varlığı taranmıştır. Gen bölgeleri ile ilgili primerlere ait bilgiler EK A'da verilmiştir.

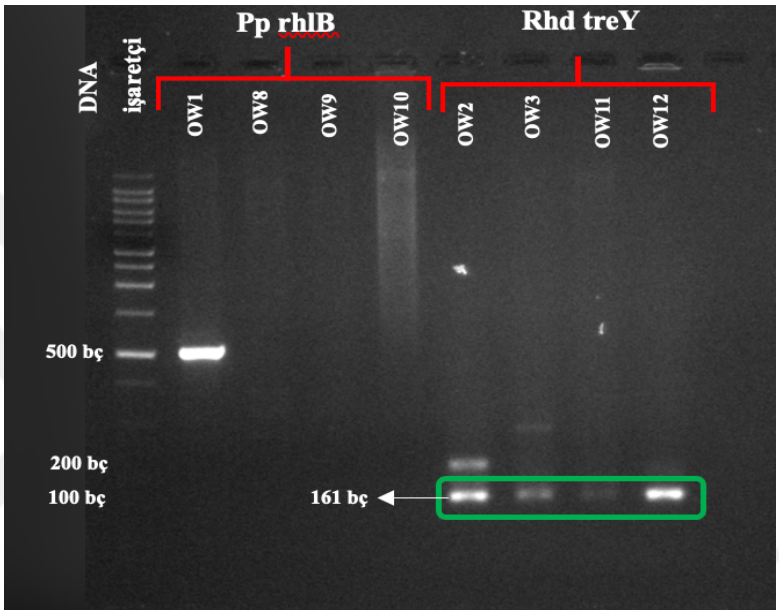
*alk*Bw primeri 550 bç'lik birer bölgeyi çoğaltmaktadır. *alk*Bw gen bölgesi pozitif sonuç veren izolatlar OW3 ve OW11 olarak saptanmıştır. *alk*B primeri 100 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. alkB geni pozitif sonuç veren izolatlar OW2, OW11 ve OW12 olarak saptanmıştır. CYP153 primeri 356 bç'lik bölgeyi çoğaltmaktadır. CYP153 geni pozitif sonuç veren izolatlar ise OW8, OW10 ve OW12 olarak saptanmıştır.

Pp ALK1 primeri *Pseudomonas* cinsine özgü, alkan degradasyonundan sorumlu, 185 bç'lik bir bölgeyi çoğaltmaktadır. Pp ALK1 geni ile ilgili olarak PZR sonucu jel görüntülemesi yapılan ilgili izolatlarda istenilen bölgede belirgin bir bant gözlenmiştir. Bu sebeple Pp ALK1 geni ile ilgili tarama sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Rhd *ots*B primeri *Rhodococcus* cinsine ait trehalolipid üretiminden sorumlu, 183 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. OW2 ve OW12 kodlu izolatlarda istenilen bölgede bantlar gözlemlenmiştir. Bu sebeple, ilgili izolatların Rhd *ots*B gen varlığı pozitif olarak kabul edilmiştir. Mo alkB primeri *Moraxella* cinsine özgü, alkan degradasyonundan sorumlu, 221 bç'lik bir bölgeyi çoğaltmaktadır. OW2 kodlu izolatta Mo alkB geni için istenilen bölgede bant gözlendiğinden dolayı, bu gen pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mo *ots*A ve Mo *ots*B primerleri *Moraxella* cinsine ait trehalolipid üretiminde sorumlu, sırasıyla 194 bç ve 180 bç'lik bölgeleri temsil etmektedir. İstenilen bölgelerde bantların görülmesinden dolayı OW2 izolatı için bu genlerin varlığı da pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.27).



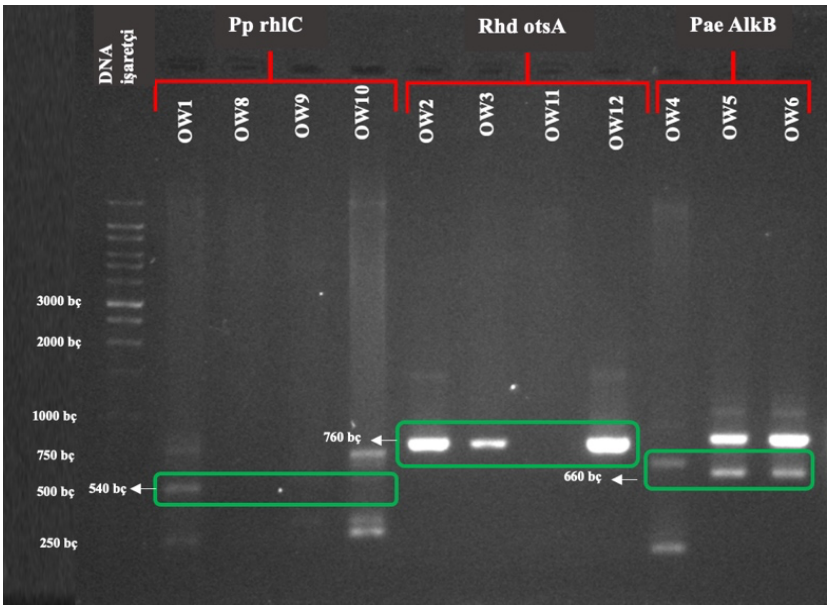
Şekil 4.27: İzolatların Pp ALK1, Rhd *ots*B, Mo alkB, Mo *ots*A ve Mo *ots*B genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Pp *rhl*B primeri *Pseudomonas* cinsine özgü, ramnolipid üretiminden sorumlu, 226 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. İzolatlarda istenilen bölgede belirgin bir bant görülmediğinden dolayı, bu gen varlığı negatif olarak değerlendirilmiştir. Rhd *tre*Y primeri *Rhodococcus* cinsine özgü trehalolipid üretiminden sorumlu, 161 bç'lik bölgeyi çoğaltmaktadır. OW2, OW3, OW11 ve OW12 kodlu izolatlarına ait PZR sonuçlarına göre istenilen bölgede bantlar görüldüğünden dolayı, bu gen bölgesi bu izolatlar için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.28).



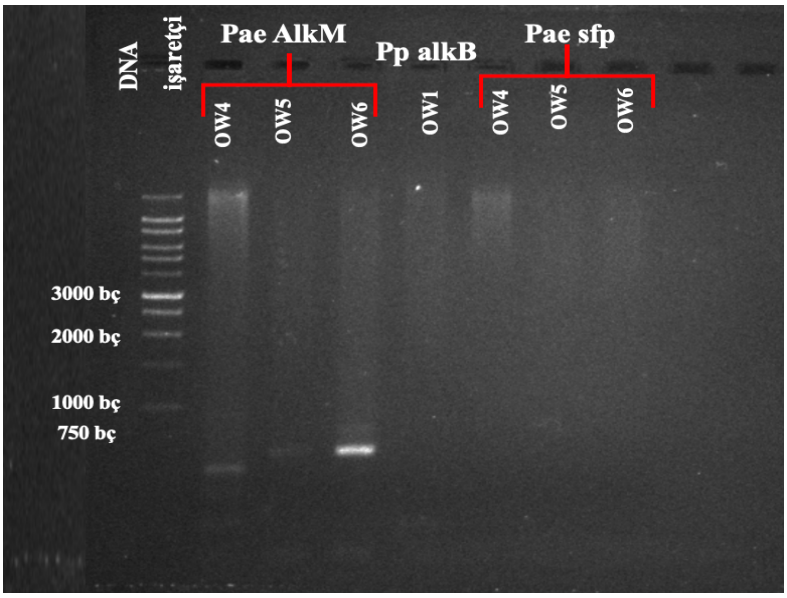
Şekil 4.28: İzolatların Pp *rhl*B, Rhd *tre*Y genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

Pp *rhl*C primeri *Pseudomonas* cinslerine özgü ramnolipid üretiminden sorumlu, 540 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. Pp *rhl*C geni için pozitif sonuç veren izolat OW1 olmuştur. OW9 ve OW10 izolatlarında ise ilgili genle ilişkili olarak agaroz jelde zayıf bantlar gözlemlenmiştir. Rhd *ots*A geni *Rhodococcus* cinslerine özgü trehalolipid üretiminde sorumlu, 760 bç'lik bir bölgeyi çoğaltmaktadır. Rhd *ots*A geni için pozitif sonuç veren izolatlar OW2, OW3, OW12 olmuştur. Pae *Alk*B primeri *Paenibacillus* cinslerine özgü alkan degradasyonundan sorumlu, 660 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. Pae *Alk*B geni pozitif sonuç veren izolatlar ise OW4, OW5 ve OW6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: İzolatların Pp *rhl*C, Rhd *ots*A, Pae *Alk*B genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Pae *Alk*M primeri *Paenibacillus* cinsine ait alkan degradasyonundan sorumlu, 1062 bç'lik bir bölgeyi temsil etmektedir. İzolatlarda Pae *Alk*M geni için istenilen bölgede herhangi belirgin bir bant görülmemiştir. OW4, OW5, OW6 kodlu izolatlar bu gen bakımından negatif olarak değerlendirilebilir. Pp *alk*B (870 bç) ve Pae *sfp* (675 bç) primerlerinde ise hiç bant görülmemiştir. Bu nedenle, Pp *alk*B geni ile ilgili sonuçlar da negatif olarak değerlendirilebilir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: İzolatların Pae *Alk*M, Pp *alk*B ve Pae *sfp* genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, farklı çevresel kaynaklardan izole edilen 12 farklı bakteri izolatının *n*-dekan/su ara yüzüne en iyi adsorbe olma, *n*-dekanı en iyi parçalama, kemotaksi, hareket, biyofilm oluşturma özellikleri ile bu özelliklerin yağ/su ara yüzü etkileşimlerine olan etkisi araştırılmıştır. 16S rRNA dizi analizlerine göre 12 bakteriyel izolatın tür bazında farklı bakteri gruplarına ait oldukları tespit edilmiştir. Buna göre; *Pseudomonas putida* OW1, *Rhodococcus qingshengii* OW2, *Prescotella equi* OW3, *Brevibacillus parabrevis* OW4, *Paenibacillus lautus* OW5 ve *Paenibacillus lautus* OW6, *Moraxella osloensis* OW7, *Stutzerimonas stutzeri* OW8, *Stutzerimonas stutzeri* OW9, *Stutzerimonas stutzeri* OW10, *Rhodococcus ruber* OW11 ve *Rhodococcus erythropolis* OW12 olmak üzere 8 farklı bakteri cinsine ait türler oldukları tespit edilmiştir.

İlk olarak izolatların makro (koloni) morfolojileri, mikro morfolojileri, Gram özellikleri ve *n*-dekan içeren ortamlarda üreme durumları araştırılmıştır. İzolatların *n*-dekan/su ara yüzüne tutunmaları için optimum sıcaklığı 30°C ile 45°C arasında tespit edilmiştir. Ancak, çoğu izolatın 30°C sıcaklıkta 1 ila 5 gün arasında üreyerek yağ/su ara yüzüne tutundukları görülmüştür. Çalkalama koşulları açısından değerlendirildiğinde; 50 rpm çalkalamada izolatların biyofilm oluşturmasına rağmen, optimum çalkalama koşullarının izolatlara bağlı olarak 100 rpm ve 200 rpm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çalkalama koşullarındaki farklılıkların belirli koşullara ve bakteri türüne bağlı olarak bakteriyel biyofilm oluşumu üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkilere sahip olabildiği düşünülmüştür. Örneğin, çalkalama bakteri-substrat temas yüzeyini arttırarak (Eze ve El Zowalaty 2019) veya EPS üretimi artırarak biyofilm üretimini olumlu yönde etkileyebilir (Alotaibi ve Bukhari 2021). Yüksek düzeyde çalkalama ise kesme kuvveti oluşturarak (Garrett ve diğ. 2008) veya anaerobik bakteriler için oksijen varlığını arttırarak biyofilm oluşumunu olumsuz yönde de etkileyebilir (Zhao ve diğ. 2023). Bu doğrultuda, çalışmamızda çalkalama değerlerinin biyofilm oluşumu üzerine değişen etkisi olağan kabul edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, biyofilm oluşumu ve hidrokarbon giderimi için inkübasyon sıcaklığının ve süresinin değişiklik gösterdiği görülmüştür. Bu sıcaklık aralığının 30°C

ile 37°C arasında değiştiği, inkübasyon süresinin ise 48 saat ile 21 gün arasında değiştiği görülmüştür (Ehmedan ve diğ. 2021; Titah ve diğ. 2021). Basumatary ve diğ. (2020), hidrokarbon kirliliği olan alanlardan izole ettikleri izolatların 37°C ve 135 rpm'de 7 günde ürediklerini bildirmişlerdir. Hossain ve diğ. (2022) izole ettikleri petrol degradasyonu yapan izolatların 37°C'de 180 rpm'de 48 saatte ürediklerini bildirmişlerdir. Onur (2015) ve Aydın (2018) ise petrol hidrokarbonları ile kirletilmiş nehir suyundan elde ettikleri izolatların 30°C'de sırasıyla yedi gün ve üç hafta inkübe ettiklerini bildirmişlerdir. İnkübasyon sıcaklığı ve süresi ile ilgili bulgularımız literatürle uyum göstermektedir. Araştırmalarda da görüldüğü gibi; örneğin alındığı ortam, degradasyonu yapılan hidrokarbon ve mikroorganizma değiştikçe inkübasyon koşulları da değişmektedir. Ayrıca yüksek sıcaklıkta sudaki oksijen çözünürlüğünün azalması, düşük sıcaklıkta ise enzimlerin etkinliğinin sınırlanmasından dolayı hidrokarbon degradasyonu gerçekleşmeyebilir (Sharma ve diğ. 2019). Çalışmamız kapsamında ise izole edilen bakteriyel izolatların çevresel kaynaklı olmasından dolayı sonraki testler geneli temsilen 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada elde edilen çevresel izolatların hidrokarbonu (*n*-dekanı) %79 ile %97 arasında değişen oranlarda parçalayabildikleri tespit edilmiştir. *Pseudomonas putida* OW1, *Rhodococcus qingshengii* OW2 ve *Rhodococcucs erythropolis* OW12 %97'lik bir oranla *n*-dekanı parçalayarak en yüksek degradasyon oranına sahip olduklarını göstermişlerdir. İzolatlar arasında en az YPO oranına sahip olan ise %79 ile *Brevibacillus parabrevis* OW4 olmuştur. Literatürde de benzer çalışmalarla bu bulgular paralellik göstermektedir. İzolatların degradasyon oranların bakteri türüne göre değişkenlik göstermektedir. Benzer olarak Ansari ve diğ. (2021), yaptıkları çalışmalarında, ham petrolün degradasyon oranının bakteri cinsine bağlı olarak değiştiğini tespit etmişlerdir. Deniz mercanlarına simbiyotik olarak yaşayan türleri izole etmişlerdir. En yüksek ham petrol degradasyonuna sahip olan etkili suşların *Cobetia, Shewanella*, *Alcanivorax* ve *Cellulosimicrobium* cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. IAUK3568, IAUK3568, IAUK3502, IAUK3531 ve IAUK3552 suşları sırasıyla %93,5, %88,13, %87,24, %85,17 ve %77,3 oranlarında maksimum ham petrol parçalama yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Erdoğan ve diğ. (2013) tarafından yapılan çalışmada; Adana, Batman ve Adıyaman illerinden petrolle kirletilmiş topraklardan izole ettikleri 30 bakteri suşu arasından, *Pseudomonas putida*, *Citrobacter amalonaticus* ve *Acinetobacter genomospecies*'e ait 6 bakteri suşunun

topraktaki petrolü %56 oranında parçalayabildikleri rapor edilmiştir. Titah ve diğ. (2021)'nin çalışmalarında *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas putida* kullanarak ham petroldeki toplam petrol hidrokarbonu (TPH) giderim etkinliğini belirlenmesi amaçlanmıştır. Laboratuvar koşullarında %33 tuzluluk oranına sahip mineral besin ortamı içeren beş farklı reaktör oluşturmuş. TPH giderimleri GC-MS ile belirlenmiştir. En yüksek TPH giderimi 35 günün sonunda %66,29 oranıyla PB serisinde (besiyerine ilk önce *P. putida*'nın eklendiği, 7 gün sonra ise *B. subtilis*'in eklendiği dizi) tespit edilmiştir. Sonuç olarak tek tek bakterilerin eklenmesinin veya ardışık olarak bakterilerin eklenmesinin TPH parçalanmasında bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir. Ancak, besin ve oksijen ilavesinin süreci hızlandırma eğiliminde olduğundan, parçalanma hızında bir artış olabileceği bildirilmiştir. Jerin ve diğ. (2021) ise çalışmalarında bakterilerin petrol atığı döküm sahalarından izole ettikleri *Enterobacter ludwigii, Enterobacter mori, Acinetobacter baumannii* ve *Cedecea davisae* bakterilerinin %2 dizeli 30°C ve pH 7'de parçaladığını, ayrıca *A. Baumannii* ve *C. davisae'nin* %10 dizeli ile 21 günlük inkübasyon sonunda, sırasıyla yaklaşık %61 ve %52 oranında parçaladığını bildirmişlerdir. Stancu (2023), çalışmasında Tuna Deltası tatlı su sedimentlerinden dizel parçalayıcı bakterilerin incelenmesini amaçlamıştır. Bu amaçla tek karbon kaynağı olarak dizel içeren minimal besiyerinde üreyebilen 10 bakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler *Pseudomonas* (*P. aeruginosa, P. nitroreducens, P. resinovorans, P. multiresinivorans*), *Acinetobacter* (*A. tandoii*), *Bacillus* (*B. marisflavi*) ve *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*) cinslerine ait olduğunu tespit etmiştir. Çalışmada, izole edilen bakterilerin %3 (v/v) dizel ortamında biyodegradasyon oranlarının %47,7-78,9 arasında değiştiği, en yüksek parçalama kapasitesine sahip türlerin *Pseudomonas, Acinetobacter* ve *Stenotraphomonas* olduğu bildirilmiştir. Bu bakterilerin, farklı petrol hidrokarbonlarını (örneğin *n*-heptan, *n*-dekan, *n*-pentadekan, *n*-hekzadekan, dizel) tolere etme kabiliyetlerinin yanı sıra, dizeli de parçalayabilmiş ve biyosürfaktan üretebildikleri bildirilmiştir. Iminova ve diğ. (2022), *Rhodococcus qingshengii* 7B suşunun 15 günlük inkübasyon sonrasında 28°C'de ham petrolün %51'ni ve 45°C'de ise %24'ünü parçalayabildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu suş için yüksek tuz (%7,5 ve %10) içeren ortamda 28°C'de 12 gün sonunda belirgin büyüme gözlemlendiği belirtilmiştir. 45°C sıcaklıkta üreyemediklerinden dolayı degradasyon kapasitelerinin sınırlı kaldığı bildirilmiştir. *R. qingshengii* 7B ekstrem koşullarda (yüksek tuz, yüksek

sıcaklık) petrol kirliliğinin giderilmesinde iyi bir tuza toleranslı organizma olarak karakterize edilmiştir. Benzer şekilde de Carvalho (2012), *Rhodococcus erythropolis* suşlarının ekstrem koşullara adapte edilerek biyoremediyasyonda kullanılabileceğini bildirmiştir. Samaei ve diğ. (2020), İran'da petrol ile kirletilmiş toprak ve sediment örneklerinden *Ochrobactrum oryzae* ve *Paenibacillus lautus* bakteri suşlarını izole etmişlerdir. Bu bakteri suşlarının *n*-hekzadekan parçalama kinetiğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Sıvı ortamda 33°C'de 120 rpm'de 33 günün sonunda *O. oryzae* suşunun giderim yüzdesini %87,77 ve *P. lautus* suşunun giderim yüzdesini ise %80,89 olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan bakteri suşlarının daha önce tanımlanan bakterilere kıyasla *n*-hekzadekan gideriminde daha yüksek verimliliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Parthipan ve diğ. (2017) iyi biyosürfaktan üreticisi olarak tanımladıkları *Pseudomonas stutzeri* NA3 ve *Acinetobacter baumannii* MN3 suşlarından karışık bir konsorsiyum oluşturmuşlardır. Karışık konsorsiyumun parçalama verimliliği %86, sadece *P. stutzeri* suşunun parçalama verimliliği ise %84 olarak rapor edilmiştir. *P. stutzeri* ve *A. baumannii* için en uygun parçalama koşullarının sırasıyla pH: 8 ve 7, sıcaklık 30°C ve 40°C olduğu bildirilmiştir. Mauricio-Gutiérrez ve diğ. (2020)'nin yaptıkları bir diğer çalışmada ise, dizel ile kirletilmiş tarımsal topraklardan izole ettikleri bakteri suşlarını; *Pseudomonas stutzeri* M1CH1, *Bacillus pumilus* M1CH1b, *Bacillus cereus* M1CH10, *Bacillus subtilis* M1CH15a ve *Paenibacillus lautus* M1CH19 ve M1CH27 olarak tanımlanmıştır. GC-FIS analiz sonuçlarına göre, bakterilerin dizel yağını parçalama kapasitelerinin 4000 ila 24000 mg/L arasında değiştiği tespit etmişlerdir. *B. pumilus* suşunun en yüksek dizel parçalama kapasitesine sahip olduğu, ancak bu miktarın *P. lautus* için toksik olduğu ve molekül bozunmasının daha az olduğu bildirilmiştir. Bao ve diğ. (2012), *Brevibacillus parabrevis* N2 suşunun da aralarında bulunduğu karışık bir bakteri konsorsiyumu hazırlamışlardır. %0,1 sıvı hidrokarbon varlığında 25°C'de 14 gün inkübasyon sonrasında konsorsiyumun hidrokarbon parçalama oranını %51,1 olarak bildirmişlerdir. *B. parabrevis* bakterisinin daha iyi biyodegradasyon potansiyeli ile yüksek konsantrasyonlu petrol ortamlarına uyum sağlayabileceği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise, petrokimyasal atık su arıtma tesisinden alınan örneklerde aktif çamurun hidrokarbon giderim performansı incelenmiş ve bakteri çeşitliliği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *B. parabrevis*, *Sphingopyxis soli* ve *Cloacibacterium normanense* gibi bakteri türlerinin tanımlandığı bildirilmiştir (Behnami ve diğ. 2018). Thi Mo ve

diğ. (2022) çalışmalarında, yağ parçalayan *Rhodococcus erythropolis* S67 ve *Rhodococcus erythropolis* X5 suşlarının düşük sıcaklıklarda katı haldeki hidrofobik hidrokarbonu parçalama durumlarını araştırmışlardır. Bu sebeple 10°C'de katı halde ve 26°C'de sıvı halde bulunan hekzadekan kullanılmıştır. Bakterilerin 10°C'de katı haldeki hekzadekanı 18 günde %30 (S67) ve %40 (X5) oranında parçalayabildiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, *Rhodococcus* sp. türlerinin katı haldeki hidrokarbona bağlanması ile degradasyon oranını arttırdığı bildirilmiştir (Ivshina ve diğ. 2022). Bogatyrenko ve diğ. (2021) Japon Denizi'nin üç farklı bölgesinden, yüzey sularından ve dip sedimentlerinden 137 mezofilik ve psikotolerant hidrokarbon oksitleyici bakteri türü izole etmişlerdir. İzole edilen mikroorganizmalar *Actinobacteria*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* filumlarına ait olduğu tespit edilmiştir. *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava, Patulibacter* sp., *P. minatonensis*, *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp. bakterilerinin hidrokarbon oksidasyon kabiliyetlerinin daha önceki çalışmalarda rapor edilmesine rağmen; *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum*, *Jeotgalibacillus marinus*, *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima* ve *Idiomarina piscisalsi* suşlarının bu yeteneklerinin ilk kez kaydedildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, tez çalışmamız kapsamında izole edilen bakteriyel izolatların hidrokarbon degradasyon özellikleri literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

HBA testi sonuçlarına göre iki izolat (*M. osloensis* OW7 ve *R. ruber* OW11) hariç, diğer tüm izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne tutundukları gözlemlenmiştir. *M. osloensis* OW7 ve *R. ruber* OW11 suşlarının hidrofilik diğer suşların ise hidrofobik karakterde olduğu tespit edilmiştir. HBA testine göre en yüksek tutunmayı ise %25 oranla *R. erythropolis* OW12 suşu gerçekleştirmiştir. Koolivand ve diğ. (2019), petrol hidrokarbon zenginleştirmesi yapılmış çamurdan izole ettikleri *Sphingomonas olei* ve *Acinetobacter radioresistens* bakterilerinden oluşturdukları konsorsiyumun petrol giderim özelliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla, petrol giderimi, emülsifikasyon indeksi, HBA vb. testleri gerçekleştirmişler. Oluşturulan bakteri karışımının HBA değerini %15,25 olarak tespit etmişlerdir. Subbiahdoss ve Reimhult (2020), bakterilerin hidrofobisite özellikleri ile biyofilm oluşturma durumlarını ilişkilendirmiştir. Bakterilerin hidrokarbona yapışma durumlarının biyofilm oluşumuna etkisi olduğu ve aynı zamanda ürettikleri biyosürfaktanların da biyofilm yapılarına etki ettiğini belirtilmiştir. Thi Mo ve diğ. (2022), *R. erythropolis* S67 ve *R.*

erythropolis X5 suşlarının hücre yüzey hidrofobisitesinin katı ve sıvı hidrokarbonda farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. *R. erythropolis* S67 ve *R. erythropolis* X5 suşlarının hidrofobisitesinin katı hekzadekanda sırasıyla %86 ve %75, sıvı hekzadekanda %76 ve %63 olduğu belirtilmiştir. Rodrigues ve diğ. (2020), ham petrolle kirletilmiş deniz suyundaki bakteri hücresi dağılımını değerlendirmek için hekzadekan içeren mineral ortamda büyüyen iki hidrokabonaklastik tür olan *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 ve *Nocardia farcinica* TRH1 kullanmıştır. İki türün hidrofobik bileşiklere hücresel afinitesinin ölçümü için BATH testi uygulanmış, her iki suşun ara yüzdeki hücre popülasyonları ise floresan *in situ* hibridizasyon ile gözlenmiştir. *R. rhodochrous* ve *N. Farcinica'nın* hekzadekana sırasıyla %97 ve %60'a varan yapışma oranlarıyla bağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca, Rühs ve diğ. (2014), bakteriyel hidrofobikliğin petrol/su ara yüzeyinde biyofilm oluşumu olasılığını artırdığını bildirmiştir.

Çalışmamızda, izolatların biyosürfaktan üretme durumları araştırılmıştır. Bu amaçla E_{24} indeksi, yağ yayma ve CTAB agar petri testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testlerden elde edilen sonuçlara göre, izolatlarının hepsinin biyosürfaktan üretme yeteneğine sahip olduğu, ancak biyosürfaktan üretme kapasitelerinin farklı olduğu anlaşılmıştır. Bu test sonuçlarına göre; E_{24} indeksi en yüksek olan *B. parabrevis* OW4 suşu (%70), en düşük olan ise *R. qingshengii* OW2 suşu (%9,3) olarak tespit edilmiştir. Yağ yağma testinde en çok açılma zonuna (5,83 cm) sahip olan suş *B. parabrevis* OW4, en az açılma zonuna (2,98 cm) sahip olan suş ise *R. qingshengii* OW2 olmuştur. E_{24} ve yağ yayma testleri sonuçları birbirlerini destekler niteliktedir. CTAB agar petri testinde ise *P. lautus* OW5 ve *M. osloensis* OW7 hariç diğer izolatlar mavi halkalar oluşturmuşlardır. Bu test glikolipid ve aniyonik biyosürfaktanları tespitine yönelik bir test olduğundan *P. lautus* OW5 ve *M. osloensis* OW7 suşlarının CTAB agar petri testinin negatif çıkması, bu izolatların biyosürfaktan üretmediğinin bir göstergesi olarak kabul edilemeyebilir. Ayrıca, bu izolatların E_{24} ve yağ yayma testleri sırasıyla %63 ve 4,84 cm, %61,1 ve 3,92 cm olarak tespit edilmiştir. Dolasıyla, bu suşların biyosürfaktan ürettiği ancak glikolipid veya aniyonik biyosürfaktan dışında başka grup veya gruplara ait biyosürfaktanlar üretebildikleri söylenebilir. Mesbaih ve diğ. (2016) çalışmalarında termofilik koşulları altında PAH parçalayan *Paenibacillus* sp. tarafından üretilen biyosürfaktanları karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla substrat olarak zeytinyağı kullandıkları, *Paenibacillus popilliaae* 1C suşunu 45°C'de

150 rpm'de 24 saat boyunca inkübe etmişlerdir. FTIR sonuçlarına göre izolatların lipopeptit sınıfına ait biyosürfaktan ürettiğini tespit etmişlerdir. Biyosürfaktanın yüzey gerilimi 32,6 mN/m, kritik misel konsantrasyonunu (CMC) 29,4 mN/m ile yaklaşık 0,5 g/L olarak bildirmişlerdir. Ayrıca biyosürfaktanın PAH çözünürlüğünü artırdığını ve patojenlere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, biyosürfaktanın PAH kirliliğinin temizlenmesinde kullanılabileceği önerisinde bulunmuşlardır. Balakrishnan ve diğ. (2022) çalışmalarında petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş Chennai Körfezi etrafından toplanan toprak örneklerinden biyosürfaktan üreten deniz bakterilerinin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonunu amaçlamışlardır. Toprak numuneleri %2 dizel ile zenginleştirilerek bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyosürfaktan üretme yeteneklerinin tespitinde hemoliz, yağ yer değiştirme, mikroplaka deneyi (damla çökme testi) ve E_{24} testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Moleküler analiz sonucuna göre ADY2b izolatı *Pseudomonas mendocina* ile %98 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. ADY2b izolatının E_{24} indeksi %58.33 olarak bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis* ZNI5 suşundan elde edilen lipopeptid sınıfına ait biyosürfaktanın yağ yayma testine göre 800 mg/L konsantrasyonda 80 mm'ye kadar yağ dağıtma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Mnif ve diğ. 2022). Andreolli ve diğ. (2023), *Rhodococcus* sp. SP1d suşunun biyosürfaktan üretimini ve aktivitesini bitkisel yağ, mineral yağ, tereyağı, *n*-hekzadekan ve dizel gibi farklı büyüme substratları kullanarak değerlendirmeyi amaçlamıştır. Sentezlenen biyosürfaktanın çevresel uygulamalar için kullanmak amacıyla, bu bileşiğin bakteri biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Dizi analizi sonucunda *Rhodococcus* sp. SP1d suşunun *Rhodococcus globerulus* ile yakın benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ham biyosürfaktanın 1000 mg/L'lik konsantrasyonu hem ksilen hem de zeytinyağına karşı %55'lik bir emülsifikasyon aktivitesi ve suyun yüzey geriliminde 25 mN/m'lik bir azalma gösterdiği bildirilmiştir. NMR sonuçları biyosürfaktanın trehalolipid sınıfına ait olduğunu göstermiştir. Ayrıca, SP1d tarafından üretilen biyosürfaktanların *P. protegens* MP12'nin biyofilm üretimini arttırdığı gözlenmiştir. Parthipan ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada, iki biyosürfaktan üreticisi olan *Pseudomonas putida* ve *Acinetobacter baumannii* bakterilerin biyosürfaktan üretimleri ise sırasıyla 3,81 g/L ve 4,68 g/L olduğu bildirilmiştir. Biyosürfaktan üretebilen en önemli bakteri cinsleri *Pseudomonas* sp. (ramnolipidler veya nithine lipidler, karbonhidrat lipidler), *Bacillus* sp. (yüzey aktif maddeler, lipopeptidler), *Acinetobacter* sp. (glikolipidler,

lipopeptidler, rhamnolipidler ve glikolipoproteinler) ve *Rhodococcus* sp. (trehalolipidler)'dir (Jahan ve diğ. 2019; Roy ve diğ. 2017). *Rhodococcus* cinsine *ait R. erythropolis, R. ruber*, *R. fascians*, *R. longus*, *R. wratislaviensis*, *R. equi*, *R. rhodochrous* ve *R. opacus* gibi birçok *Rhodococcus* türü biyosürfaktan üreticisi olarak tanımlanmıştır (Kuyukina ve Ivshina 2019). Thi Mo ve diğ. (2022), *R. erythropolis* S67 ve *R. erythropolis* X5 suşlarının yağ parçalama sırasında ortama süksinoil trehalolipid (aniyonik trehalolipid) ürettiğini tespit etmişlerdir. Ramnoliplerin, *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında virülans faktörü olarak hareket edebileceği, biyofilm oluşumu ve sürü hareketliliğini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, bu çok yönlü yüzey aktif molekül grubunun antimikrobiyal aktiviteleri, sulu çözünürlüğü artırma ve organik bileşiklerin ve ağır metallerin biyodegradasyonu gibi özelliklerinin de bulunduğu bildirilmiştir (Dobler ve diğ. 2016). Biyosürfaktan üretimi kemotaksi ve bakteriyel topluluk ile ilişkili olduğu belirtilen çalışmaya göre, biyosürfaktan üretimini ortadan kaldıran mutasyon bakteriyel topluluğu yok ettiği tespit edilmiştir (Ibrar ve Yang 2022).

Tez çalışması kapsamında izolatların hareket ve kemotaksi yetenekleri değerlendirilmiştir. Dik yarı-katı ortamda *P. putida* OW1, *R. qingsehngii* OW2, *P. lautus* OW5, *P. lautus* OW6, *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW9 ve *S. stutzeri* OW10 suşlarının hareketli oldukları tespit edilmiştir. Bu türler ile ilgili literatürde hareketli olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır. Pfeifer ve diğ. (2022), *P. putida*'nın filajellar dönüş için iki motor torku MotAB ve MotCD adlı statöre sahip olduğunu bildirmişlerdir. *Paenibacillus* sp. türlerinin >%1,5 agar içeren besiyerinin yüzeyinde hareket edebilecek kadar güçlü hareket kabiliyeti sergiledikleri bildirilmiştir (Kobayashi ve Kanesaki 2016). Ayrıca, *B. parabrevis* OW4, *S. stutzeri* OW9 ve *S. stutzeri* OW10 suşlarının yarı-katı ortamda referans hidrokarbona doğru yönelmesi kemotaksi davranışı olarak değerlendirilebilir. Ancak, kapiler test sonuçlarına göre *B. parabrevis* OW4 ve *S. stutzeri* OW9 suşlarının negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu teste göre, en yüksek kemotaksi davranışı gösteren suşlar *P. putida* OW1, *R. ruber* OW11 ve *R. erythropolis* OW12 suşları olmuştur. Marx ve Atiken (2000), *P. putida* G7 suşunun kemotaksi davranışı değerlendirmek amacıyla iki mutant suştan hareketli olan suşun hareketsiz olan suşa göre naftaleni daha hızlı parçaladığını bildirmişlerdir. Kobayashi ve diğ. (2016), *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 suşunda kemotaksiden sorumlu 30 kb fla/che operonu tespit etmişlerdir. Ibrar ve Zhang (2020) çalışmalarında

Lysinibacillus türlerinin yarı-katı agarda hidrokarbona yönelik hiper kemotaksi gösterdiğini, ancak *Paenibacillus* türünün gliseril tribütrat hidrokarbonuna kemotaksi göstermediğini bildirmişlerdir. Wang ve diğ. (2018), kamçılı bakteriler gibi kamçısız *Rhodococcus* sp. türlerinin de çevrelerindeki substratlar tükendiğinde kemotaksi süreci yoluyla aktif olarak substrat arayabileceğini göstermiştir.

Tez çalışmasında bakteri izolatlarının farklı yapılarda (tekstür, kalınlık, vb.) biyofilm tabakası oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca FESEM analiz verileri de bazı izolatların (*P. putida* OW1, *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW9 ve *S. stutzeri* OW10) biyofilm tabakalarının daha yoğun bir polimerik madde içerdiği ve birbirine bağlı hücre ağını göstermektedir. *B. parabrevis* OW4 ve *M. osloensis* OW7 izolatların biyofilm yapısı oluşturmadıkları görülmüştür. *R. qingshengii* OW2, *P. equi* OW3 ve *R. erythropolis* OW12 izolatlarının biyofilm yapılarının birbiri ile benzer yapıda ve EPS oluşumunun az olduğu tespit edilmiştir. *P. lautus* OW5, *P. lautus* OW6 ve *R. ruber* OW11'in şeffaf bir ara yüz yapısına sahip olduğu ve biyofilm oluşumuna işaret ettiği düşünülmektedir. Ayrıca *n*-dekan/su ara yüzündeki biyofilm reolojik özellikleri bakımından incelendiğinde; *P. putida* OW1, *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW9, *S. stutzeri* OW10 ve *R. erythropolis* OW12 izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne hızla adsorbe olduğu ve 24 saat içinde stabil ve elastik biyofilmler oluşturduğu tespit edilmiştir. *R. qingshengii* OW2, *P. equi* OW3, *P. lautus* OW5, *P. lautus* OW6 ve *R. ruber* OW11 izolatların *n*-dekan/su ara yüzüne adsorbe olduğu ancak stabil biyofilmler oluşturmadığı, biyofilmlerin kolayca dağılabilen yapıda oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, *B. parabrevis* OW4 ve *M. osloensis* OW7 izolatlarında kontrole göre bir farklılık gözlenmemiştir. Bunlara ek olarak izolatların çoğunluğunun EPS ürettiği tespit edilmiştir. *P. equi* OW3, *P. lautus* OW5 ve *M. osloensis* OW7 izolatların dışında EPS üretimi belirgin bir şekilde görülmüştür. *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW10 ve *R. erythropolis* OW12 izolatlarında yoğun jel görünümü daha fazladır. Ding ve diğ. (2019), çalışmasında EPS'nin iyi bir biyofilm üreticisi olan *Pseudomonas stutzeri* XL-2 suşu tarafından biyofilm oluşumundaki rolünü tespit etmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, *P. stutzeri* XL-2 suşundan salgılanan EPS kolorimetre ve Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Sonuçta, biyofilm büyümesi ile hücre dışı protein içeriği arasında güçlü bir korelasyon görülürken (r_P=0,96, p<0,001), ekzopolisakkarit içeriği ile bir ilişki görülmediği tespit edilmiştir. Sivan ve diğ. (2006) çalışmalarında polietilen parçalayan *Rhodococcus ruber* C208

suşunun, oluşturduğu biyofilmdeki EPS'nin içeriğini test etmişlerdir. Sonuç olarak *R. ruber* C208'in EPS analizine göre polisakkarit seviyesinin proteinden 2,5 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Nielsen ve diğ. (2011), çalışmalarında *Pseudomonas putida* KT2440'ın genomunda tanımlana iki varsayımsal EPS üretme bölgesinin (A (pea)) biyofilm gelişimi üzerindeki rolünü araştırmışlardır. Aynı zamanda kendi adlandırdıkları "putida ekzopolisakkarit A (pea)", yeni EPS lokusunun hücre-yüzey etkileşimlerini de incelemişlerdir. Sonuç olarak, daha önceden karakterize edilen EPS lokusunun biyofilm matrisinin oluşumu için gerekli hücre-hücre etkileşimlerini sürdürmek için merkezi bir olan yeni bir polisakkarit kodlayabileceği göstermişlerdir. Yegorenkova ve diğ. (2011) ise daha yüksek moleküler ağırlıklı ekzoglikanlar ürettiğini tespit ettikleri *Paenibacillus polymyxa* 1465 suşunun, katı hidrofobik ve hidrofilik ortamlarda biyofilm oluşumunu ve bu bakteriler tarafından sentezlenen ekzoglikanların biyofilm oluşum sürecine ne derecede katkı sağladıklarını araştırmışlardır. Sonuçta, *P. polymyxa* suşunu ekzoglikanlarının, bu bakteriler tarafından katı hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerde biyofilm oluşumuna dahil olduğunu bildirmişlerdir. Wu ve diğ. (2017), *Pseudomonas stutzeri* 273 suşunun, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1'e karşı yüksek anti-biyofilm aktivitesine sahip ekzopolisakkarit 273 (EPS273) ürettiğini bildirmiştir. Ayrıca, EPS273'ün *P. aeruginosa* PAO1'in biyofilm oluşumunu engellerken, onu üreten *P. stutzeri* 273 suşu için biyofilm oluşturmayı kolaylaştırdığı gözlenmiştir.

Çalışmada reolojik ölçüm verilerinin FESEM analizinden elde edilen veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür. *B. parabrevis* OW4 ve *M. osloensis* OW7 izolatlarının10 gün sonra bile biyofilm yapısı oluşturmaması nedeniyle, bu izolatlar için tam olarak oluşmuş bir biyofilmin elastik membran özelliklerinin ara yüzey alanına etkisinden söz edilememektedir. Buna karşılık, FESEM analizleri *P. putida* OW1, *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW9, *S. stutzeri* OW10 ve *R. erythropolis* OW12 izolatların 10 gün sonunda *n*-dekan/su ara yüzünde kalın ve olgun biyofilmler oluşturduğunu ve bu durumun reolojik ölçümlerle gözlenen 24 saat sonraki elastiki davranışlarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bulgulara göre, *P. putida* OW1, *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW9, *S. stutzeri* OW10 ve *R. erythropolis* OW12 izolatlarının *n*-dekan/su ara yüzünde yetkin bir biyofilm üreticisi olduğu söylenebilir. Literatürde petrol/su ara yüzünde oluşan mikrobiyal biyofilmin dağılmış petrol damlacıklarını stabilize etme ve suya dökülen petrolün giderilmesinde çevresel yönden

sürdürebilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Omarova ve diğ. 2019). Ding ve diğ. (2019) *P. stutzeri* XL-2 suşunun biyofilm oluşumunda önemli bir performans sergilediğini belirtmiştir. Mangwani ve diğ. (2021) PAH parçalayan ve biyofilm oluşturan deniz bakterilerini, fenantren ve piren ile seçici zenginleştirme yoluyla izole etmişlerdir. Dizi analizlerine göre izolatların *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Alcaligenes, Sporosarcina* ve *Lysinibacillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin %75'nin biyofilm oluşturabildiği bildirilmiştir. PAH'ın etkili bir şekilde parçalanmasında, EPS matrisi içine gömülü olan aktif hücrelerle stabil kalmasının önemli bir potansiyel olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, Lahiri ve diğ. (2022), biyofilmin PAH bozunmasında önemli bir rol oynadığını, biyofilm matrisinin üç boyutlu yapısının PAH'ın etkili ve hızlı bir şekilde parçalanmasını kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Omarova ve diğ. (2019) ise yaptıkları çalışmada, bakterilerin biyofilm oluşumunun su yüzeyinde hidrokarbon dağıtıcı etkisine odaklanmışlardır. Bakterilerin biyosürfaktan yardımıyla yağ/su ara yüzüne adsorpsiyonun gerçekleştiği belirtilmiştir. Çalışmada *Alcanivorax borkumensis* suşu kullanılmıştır. Biyofilm oluşumu ile hekzadekanın 5 günlük bir inkübasyon süresi sonunda %90'nın parçalandığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile bakteriyel biyofilm ve biyosürfaktanların petrol sızıntılarının dağıtımı için tamamen çevresel ve sürdürülebilir doğal malzemeleri temsil ettiği belirtilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan analizler sonucunda, bakteri türüne bağlı olarak biyosürfaktan üretme yeteneği ile biyofilm üretme durumları arasında değişen bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin, *P. putida* OW1 izolatının *n*-dekanı iyi oranda parçaladığı, biyosürfaktan ürettiği ve biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Ancak, *B. parabrevis* OW4 izolatının *n*-dekanı parçalamasına ve etkili bir biyosürfaktan üreticisi olmasına rağmen yağ/su ara yüzde biyofilm oluşumunun zayıf olduğu görülmüştür. Literatürde çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfaktanların biyofilm oluşumunda ve kontrolünde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Satpute ve diğ. 2016). Biyosürfaktanlar, çoğunluk algılamada rol oynadığı ve hücresel iletişim yoluyla biyofilmlerin yüzeylere yapışmasına ve yüzeylerden ayrılmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Sharma ve diğ. 2021). Bununla birlikte, biyosürfaktanların yapışmayı azaltmak için yüzeylerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Janek ve diğ. 2012). Örneğin, *Lactobacillus fermentum*'un ürettiği biyosürfaktanın *Candida albicans*'ın biyofilm oluşumunu engellediği

bulunmuştur (Kaur 2020). Ayrıca bazı biyosürfaktanların ise biyofilm oluşumunda rol oynayan bakteriyel genlerin ifadesini engellediği bildirilmiştir (Salehi ve diğ. 2014).

Bu çalışmada izolatların biyokimyasal analizlerle tespit edilen degradasyon ve biyosürfaktan üretme yetenekleri moleküler biyolojik olarak da değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, biyokimyasal analizler ve moleküler biyolojik analizlerin birbirini doğrular nitelikte olduğunu görülmüştür. Buna göre, alkan degradasyonundan sorumlu alkBw geninin *P. equi* OW3 ve *R. ruber* OW11 suşlarında; AlkB geninin *R. qingshengii* OW2, *R. ruber* OW11 ve *R. ertyhropolis* OW12 suşlarında; CYP153 geninin ise *S. stutzeri* OW8, *S. stutzeri* OW10 *ve R. ertyhropolis* OW12 suşlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Mo *alk*B geninin *M. osloensis* OW7'de; Pae AlkB geninin ise *B. parabrevis* OW4, *P. lautus* OW5 ve *P. lautus* OW6 suşlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Sadece *P. putida* OW1 suşunda alkan degradasyonu ilişkisi olduğu düşünülen alkBw, AlkB, CYP153, Pp alkB ve Pp ALK1 gen bölgelerine özgü primerler ile yapılan PZR çalışmaları sonucunda, agaroz jelde istenilen boyutların dışında bantlar görülmüştür. Bahsi geçen genlerin varlığı bu mikroorganizmaların alkan degradasyonu yaptığının moleküler kanıtı olarak düşünülmektedir. İlgili genlerin saptanamamasının ise çevresel izolatlarda aktiviteden sorumlu genlerde farklılaşmalar olabileceği ve/veya daha başka gen ailelerinin degradasyondan sorumlu olabileceğini düşündürmekle birlikte, *P. putida* OW1'de alkan degradasyonu ile ilişkili genlerin saptanamaması, bu izolatın ilgili katabolik reaksiyonlar için aktiviteden sorumlu genlere sahip olmadığının direkt göstergesi olmayabilir. Çünkü moleküler biyolojik çalışmalar dışındaki diğer tüm fizikokimyasal çalışmalarla *P. putida* OW1'in *n-dekan* degradasyonunda oldukça iyi olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, ilgili primerler ile yapılan PZR çalışmalarıyla çoğaltılan farklı boyutlara sahip DNA bölgelerinin dizilenmesi yoluyla genlerin saptanması ve gen karakterizasyonunun yapılması doğru bir yol olabilir. Rojo (2009), *P. putida* GPo1 suşunun alkan hidroksilaz (AlkB) enzimine sahip olduğunu ve ayrıca C5-C11 alkanlarını hidroksilleyen çözünebilir sitokrom P450 ailesine ait enzimleri de içerdiğini belirtmiştir. Diallo ve diğ. (2021), *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* cinslerine ait dört suşu içeren üç farklı konsorsiyum oluşturarak ham petrolün biyodegradasyonu incelemişlerdir. Ayrıca, çalışmada alkan hidroksilaz (alkB, AlmA, cyp153) ve aromatik dioksijenaz (pah-rhdGN, nah, phdAC ve cat23) genlerinin indüksiyon seviyeleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, konsorsiyumun %1 (v/v) ham petrol içeren

besiyerinde en yüksek parçalama %78 oranında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Alkan hidroksilaz genlerinin (alkB, AlmA, cyp153) pH 7 yüksek oranlarda (sırasıyla; 86, 35, 63 kat) ifade edildiği ancak, aromatik dioksijenaz (pah-rhdGN, nah, phdAC ve cat23) genlerinin ise düşük seviyelerde (sırasıyla; 11, 8, 6, 7 kat) ifade edildiği bildirilmiştir. Whyte ve diğ. (2002) dört alkan monooksijenaz geninin (*Pseudomonas putida* GPo1, Pp *alk*B; *Rhodococcus* sp. Q15, Rh *alk*B1 ve Rh *alk*B2*; Acinetobacter* sp. ADP-1, Ac *alk*M) yaygınlığını tespit etmek için kutup ve Antartika kıtasında hidrokarbonlarca kirletilmiş ve bozulmamış topraklardan örneklemeler yapmışlardır. Kirlenmiş topraklarında çoğunda rodokokkal *alk*B genotipleri tespit edilirken, Pp *alk*B genine kirlenmiş topraklar ve bozulmamış topraklarda daha sıklıkla rastlandığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, *Rhodococcus* türlerinin kirlenmiş ve bozulmamış toprakların baskın alkan parçalayıcı bakterileri olabileceği, *Pseudomonas* türlerinin kirlenme olayından sonra topraklarda zenginleşebileceğini, *Acinetobacter* türlerinin kutup toprakların alkan parçalayıcı baskın üyeleri olmadığı belirtilmiştir. Iminova ve diğ. (2022), çalışmasında *R. qingshengii* 7B suşunda *alk*B ailesinden *alk*B1, *alk*B2, *alk*B3 ve *alk*B5 genlerinin varlığını tespit etmişlerdir. Kawagoe ve diğ. (2019), *R. ertyhropolis* suşunun *alk*B ailesinden alkB R2 tipi taşıdığını bildirmiştir. Benzer olarak, Huang ve diğ. (2023), *R. qingshengii* RHZ01 suşunda alkB1 ve alkB3 varlığını tespit ederek gen karakterizasyonu yapmışlardır. Jimoh ve Lin (2022), *Paenibacillus* sp. D9 suşunun dizel ve *n*-hekzadekanı parçalama süreci incelenmesini amaçlamışlardır. *Paenibacillus* sp. D9 suşunun 14 günlük inkübasyon sonundan *n*-hekzadekanı %98,4 ve dizeli %61,2 oranında parçaladığı bildirilmiştir. Biyodegradasyon sürecinde alkan hidroksilaz (AlkB ve AlkM), alkol dehidrojenaz ve esteraz gibi parçalayıcı enzimlerin varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda biyosürfaktan üretme geninin (*sfp*) varlığı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak, enzim üretimi nedeniyle, *Paenibacillus* sp. D9 suşunun hidrofobik kirleticilerin biyodegradasyonunda rapor edilen ve biyosürfaktan üreten bakterilerden daha aktif olduğu belirtilmiştir. Ehis-Eriakha ve diğ. (2020) yaptıkları çalışmada ham petrolle kirlenmiş bölgelerden aldıkları örneklerden izole ettikleri bakterilerde hidrokarbon parçalayıcı işlevsel genler araştırılması amaçlanmıştır. Potansiyel parçalayıcı genler olarak C23O, AlmA, AlkB, nahAc ve PAH-RHD(GP) genleri seçilmiştir. İzole edilen 50 izolattan 16'sının biyodegradasyon etkinliği gösterdiği tespit ediliştir. C23O genin popülasyonun >%50'sinde bulunurken nahAc ve PAH-RHD genlerinin düşük oranlarda ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

Biyosürfaktan üretiminden sorumlu Pp *rhl*C gen bölgesi *P. putida* OW1 suşunda pozitif çıkarken, diğer *Pseudomonas* türüyle ilişkili olan *S. stutzeri* OW8 suşunda tespit edilememiştir. *S. stutzeri* OW9 ve *S. stutzeri* OW10 suşlarında zayıf bantlar olduğu görülmüştür. Rhd *ots*A geni *R. qingshengii* OW2, *P. equi* OW3 ve *R. ertyhropolis* OW12 suşlarında; Rhd *ots*B *R. qingshengii* OW2 ve *R. ertyhropolis* OW12 suşlarında; Rhd *tre*Y geni ise *R. qingshengii* OW2, *P. equi* OW3, *R. ruber* OW11 ve *R. ertyhropolis* OW12 suşlarında tespit edilmiştir. Mo *ots*A ve Mo *ots*B geni *M. osloensis* OW7 suşunda tespit edilmiştir. Pae *sfp* geni ise, *B. parabrevis* OW4, *P. lautus* OW5 ve *P. lautus* OW6 suşlarında saptanmamıştır. Shatila ve diğ. (2020), çalışmalarında *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 bakterisinde ramnolipid sentezinden sorumlu *rhl*A, *rhl*B ve *rhl*C genlerinin varlığını kanıtlamışlardır. Pacwa-Plociniczak ve diğ. (2014), ağır petrol hidrokarbonu ile kirlenmiş topraktan izole ettiği *Pseudomonas* sp. P-1 suşunda ramnolipid biyosentezinden sorumlu olan *rhl* gen varlığını bildirmiştir. Jimoh ve Lin (2022), *Paenibacillus* sp. D9 suşunda, sürfaktin üretiminden sorumlu *sfp* gen bölgesinin varlığını bildirmiştir. Retamal-Morales ve diğ. (2018), *R. ertyhropolis* B7 suşunun trehaloz-tetra ester biyosürfaktan üretiminden sorumlu *ots*A, *ots*B, *tre*Y ve *tre*Z gen bölgelerini içerdiğini tespit etmiştir. Benzer olarak, Markova ve diğ. (2023), *R. qingshengii* VKM suşunda *ots*A, *ots*B, *tre*Y ve *tre*Z gen bölgelerini içerdiğini bildirmiştir.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışma kapsamında petrol hidrokarbonlarıyla kirletilmiş çeşitli çevresel örneklerden yapılan izolasyon sonrasında elde edilen bakterilerin hidrokarbon giderim mekanizmalarını yakından ilgilendiren biyosürfaktan üretimi, yağ/su ara yüzündeki davranışları, biyofilm üretme ve kemotaksi davranışları incelenmiştir. Bu tür aktif çevresel izolatlarda belirtilen özelliklerin araştırılması sucul sistemlerden yağlı bileşiklerin biyoremediyasyonu çalışmaları için önem taşımaktadır. Hidrokarbon kirliliğinin giderilmesinde geleneksel yöntemler yerine, sürdürülebilir biyoteknolojik yöntemler; zaman, maliyet ve çevreye verilen tahribatın en aza indirilmesine yardımcı olabilecek potansiyel sahiptir. Aynı zamanda, daha önce degradasyon, biyosürfaktan, biyofilm oluşumu gibi özellikleri az çalışılan mikroorganizmaların yağ/su ara yüzü ile etkileşimlerinin araştırılmasıyla ilgili gelecek araştırmalar için önemli bir ön bilgi niteliği taşıdığı düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamındaki mikroorganizmaların tek tek veya farklı kombinasyonlar ile amaca uygun çeşitli konsorsiyumlar oluşturularak degradasyon, biyosürfaktan üretimi, biyofilm oluşturma veya yağ/su ara yüzü etkileşimlerinin incelenmesi ileri çalışmalar için önerilmektedir. Ayrıca, bu çalışmada kısıtlı zaman ve maliyet nedeniyle çalışılamamış, ancak biyolojik ve kimyasal testler kapsamında varlığı kanıtlanan olguların (degradasyon, biyosürfaktan üretimi vb.) moleküler biyolojik düzeyde ayrıntılı olarak araştırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M. and Naidu, R., "A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *176*, 670-699, (2015).

Abbasnezhad, H., Gray, M. and Foght, J. M., "Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *92*, 653-675, (2011).

Adetunji, A. I. and Olaniran, A. O., "Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater", *3 Biotech*, *9*(4), 151, (2019).

Adetunji, A. I. and Olaniran, A. O., "Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview", *Saudi J. Biol. Sci*., *28*(1), 669-679, (2021).

Adu, S. A., Naughton, P. J., Marchant, R. and Banat, I. M., "Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations", *Pharma*, *12*(11), 1099, (2020).

Agarwal, N. and Singh, S. P., "A novel trehalose synthase for the production of trehalose and trehalulose", *Microbiol. Spectr.*, *9*(3), e01333-21, (2021).

Alotaibi, G. F. and Bukhari, M. A., "Factors influencing bacterial biofilm formation and development", *Am. J. Biomed. Sci. Res.*, *12*(6), 617-626, (2021).

Al-Zahrani, A. A. and Idris, G. M., "Biological treatment of hydrocarbon contaminants: petroleum hydrocarbon uptake by *Pseudomonas alkanolytica*", *JKAU: Eng. Sci.*, *21*(1), 39-53, (2010).

Amézcua-Vega, C., Ferrera-Cerrato, R., Esparza-García, F., Ríos-Leal, E. and Rodríguez-Vázquez, R., "Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *Pseudomonas putida*", *J. Environ. Sci. Health*, *Part A*, *39*(11-12), 2983-2991, (2004).

Ammar, F. O., Preparation of bacteria for scanning electron microscope and common reagents preparation protocols, (2017).

Andreolli, M., Villanova, V., Zanzoni, S., D'Onofrio, M., Vallini, G., Secchi, N. and Lampis, S., "Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine strain *Rhodococcus* sp. SP1d and its potential for environmental applications", *Microb. Cell. Fact.*, *22*(1), 126, (2023).

Ansari, N., Hassanshahian, M. and Ravan, H., "Study the microbial communities' changes in desert and farmland soil after crude oil pollution", *Int. J. Environ. Res.*, *12*, 391-398, (2018).

Ansari, N., Rokhbakhsh-Zamin, F., Hassanshahian, M. and Hesni, M. A. "Biodegradation of crude oil using symbiont crude-oil degrading bacteria isolated from corals collected at the Persian Gulf", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *96*(7), 1882-1892, (2021).

Araujo, H. W., Andrade, R. F., Montero-Rodríguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Alves da Silva, C. A. and Campos-Takaki, G. M., "Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications", *Microb. Cell. Fact.*, *18*(1), 1-13, (2019).

Ayala, M. and Torres, E., "Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective", *Appl. Catal. A. Gen.*, *272*(1-2), 1-13, (2004).

Aydın, D. C., "Hidrokarbon parçalayan lokal bakterilerin kerosen parçalama ve biyosürfaktan üretme potansiyellerinin belirlenmesi", Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, (2018).

Baek, K. H., Yoon, B. D., Oh, H. M., Kim, H. S. and Lee, I. S., "Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Nocardia* sp. H17-1", *Geomicrobiol. J.*, 23(5), 253-259, (2006).

Balakrishnan, S., Arunagirinathan, N., Rameshkumar, M. R., Indu, P., Vijaykanth, N., Almaary, K. S., Almutairi, S. M. and Chen, T. W., "Molecular characterization of biosurfactant producing marine bacterium isolated from hydrocarbon-contaminated soil using 16S rRNA gene sequencing", *J. King Saud Univ. Sci.*, *34*(3), 101871, (2022).

Bhandari, G., Bagheri, A. R., Bhatt, P. and Bilal, M., "Occurrence, potential ecological risks, and degradation of endocrine disrupter, nonylphenol, from the aqueous environment", *Chemosphere*, *275*, 130013, (2021).

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. and Marchant, R., "Microbial biosurfactants production, applications and future potential", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *87*, 427-444, (2010).

Bao, M. T., Wang, L. N., Sun, P. Y., Cao, L. X., Zou, J. and Li, Y. M., "Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment", *Mar. Pollut. Bull.*, *64*(6), 1177-1185, (2012).

Basumatary, M., Das, S., Gogoi, M., Das, I., Charingia, D. and Borah, D., "Evaluation of pilot scale in-vitro and ex-situ hydrocarbon bioremediation potential of two novel indigenous strains of *Bacillus vallismortis*", *J. Bioremediat.*, *24*(2-3), 190-203, (2020).

Behnami, A., Farajzadeh, D., Isazadeh, S., Benis, K. Z., Shakerkhatibi, M., Shiri, Z., Ghorghanlu, S. and Yadeghari, A., "Diversity of bacteria in a full-scale petrochemical wastewater treatment plant experiencing stable hydrocarbon removal", *J. Water Process. Eng.*, *23*, 285-291, (2018).

van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M. and Witholt, B., "Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and

flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes", *Microbiology*, *147*(6), 1621-1630, (2001).

Benoit, C., Virginie, C. and Boris, V., The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. In Advances in Botanical Research, London, United Kingdom: Academic Press, 97, 309-332, (2021).

Bicca, F. C., Fleck, L. C. and Ayub, M. A. Z., "Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus ertyhropolis*", *Revista de Microbiologia*, *30*, 231-236, (1999).

Biktasheva, L., Gordeev, A., Selivanovskaya, S. and Galitskaya, P. "Di- and mono-rhamnolipids produced by the *Pseudomonas putida* PP021 isolate significantly enhance the degree of recovery of heavy oil from the Romashkino oil field (Tatarstan, Russia)", *Processes*, 10(4), 779. MDPI AG, (2022).

Bhatt, P., Bhatt, K., Huang, Y., Li, J., Wu, S. and Chen, S., "Biofilm formation in xenobiotic-degrading microorganisms", *Crit. Rev. Biotechnol.*, *43*(8), 1129-1149, (2023).

Bodour, A. A., Drees, K. P. and Maier, R. M., "Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6), 3280–3287, (2003).

Bogatyrenko, E. A., Kim, A. V., Dunkai, T. I., Ponomareva, A. L., Es' kova, A. I., Sidorenko, M. L. and Okulov, A. K., "Taxonomic Diversity of Culturable Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in the Sea of Japan", *Russ. J. Mar. Biol.*, *47*, 232-239, (2021).

Bramhachari, P. V. (Ed.), Implication of quorum sensing and biofilm formation in medicine, agriculture, and food industry, Singapore: Springer, (2019).

Chakrabarti, S., "Bacterial biosurfactant: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties", MSc Thesis, National Institute of Technology, Rourkela, Odisha, (2012).

de Carvalho, C. C., "Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions", *Res. Microbiol.*, *163*(2), 125-136, (2012).

Campos, J. M., Stamford, T. L., Rufino, R. D., Luna, J. M., Stamford, T. C. M. and Sarubbo, L. A., "Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*", *Toxicol. Rep.*, *2*, 1164-1170, (2015).

Chandra, S., Sharma, R., Singh, K. and Sharma, A., "Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon", *Ann. Microbiol.*, *63*(2), 417-431, (2013).

Chen, X., Hou, Y., Cheng, H., Bao, M. and Li, Y., "Rapid capturing of oil-degrading bacteria by engineered attapulgite and their synergistic remediation for oil spill", *J. Colloid. Interface Sci.*, *604*, 272-280, (2021).

Chowdhary, P., Raj, A., Verma, D. and Akhter, Y. (Eds.), Microorganisms for sustainable environment and health, Amsterdam, Netherlands: Elsevier, (2020).

Conrad, J. C., "Biophysical methods to quantify bacterial behaviors at oil–water interfaces", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, *47*(9-10), 725-738, (2020).

Costa, A. S., Romão, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski Jr, A. and Alexandre, M. D. R., "Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass", *Bioresour. Technol. 105*, 31-39, (2012).

Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G., "Surface-active agents from two *Bacillus* species", *Appl. Environ. Microbiol.*, *53*(2), 224-229, (1987).

Darias, J. A. R., García-Fontana, C., Lugo, A. C., Rico-Jiménez, M. and Krell, T., "Qualitative and quantitative assays for flagellum-mediated chemotaxis", *Pseu. Methods Protoc.*, 87-97, (2014).

Das, S. (Ed.), Microbial biodegradation and bioremediation, London, United Kingdom: Elsevier, (2014).

Dave, D. A. E. G. and Ghaly, A. E., "Remediation technologies for marine oil spills: A critical review and comparative analysis", *Am. J. Environ. Sci.*, *7*(5), 423, (2011).

Daverey, A., Dutta, K., Joshi, S. and Daverey, A., "Sophorolipid: a glycolipid biosurfactant as a potential therapeutic agent against COVID-19", *Bioengineered*, *12*(2), 9550-9560, (2021).

Dewangan, N. K. and Conrad, J. C., "Rotating oil droplets driven by motile bacteria at interfaces", *Soft Matter.*, *15*(45), 9368-9375, (2019).

Dewangan, N. K. and Conrad, J. C., "Bacterial motility enhances adhesion to oil droplets", *Soft Matter.*, *16*(35), 8237-8244, (2020).

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. and Villemur, R., "rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids", *Microbiology*, *149*(8), 2005-2013, (2003).

Dhaka, A. and Chattopadhyay, P., "A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills", *J. Environ. Manag.*, *288*, 112428, (2021).

Diallo, M. M., "Microorganism compositions fort he degradation of lipids in wastewater", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Diallo, M. M., Vural, C., Cay, H. and Özdemir, G., "Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria", *J. Appl. Microbiol.*, *130*(4), 1192-1207, (2021).

Ding, X. S., Zhao, B., An, Q., Tian, M. and Guo, J. S., "Role of extracellular polymeric substances in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2", *Appl Microbiol. Biotechnol.*, *103*, 9169-9180, (2019).

Ditty, J. L. and Parales, R. E., "Protocols for the measurement of bacterial chemotaxis to hydrocarbons", *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Activities and Phenotypes*, 7-42, (2017).

Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V. and Neves, B. C., "Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting", *New Biotechnol.*, *33*(1), 123-135, (2016).

Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J. and Megharaj, M., "Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach", *Environ. Scie. Poll. Res.*, *22*, 8927-8941, (2015).

Eboigbodin, K. E. and Biggs, C. A., "Characterization of the extracellular polymeric substances produced by *Escherichia coli* using infrared spectroscopic, proteomic, and aggregation studies", *Biomacromolecules*, *9*(2), 686-695, (2008).

Ehis-Eriakha, C. B., Chikere, C. B. and Akaranta, O., "Functional gene diversity of selected indigenous hydrocarbon-degrading bacteria in aged crude oil", *Int. J. Microbiol.*, (2020).

Ehiosun, K. I., Godin, S., Urios, L., Lobinski, R. and Grimaud, R., "Degradation of long-chain alkanes through biofilm formation by bacteria isolated from oil-polluted soil", *Int. Biodeterior Biodegradation*, *175*, 105508, (2022).

Ehmedan, S. S., Ibrahim, M. K., Azzam, A. M., Hamedo, H. A. and Saeed, A. M., "Acceleration the bacterial biodegradation of crude oil pollution using Fe2O3 and ZnO nanoparticles"., *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag., 16*, 100613, (2021).

Ekundayo, E. O., Emede, T. O. and Osayande, D. I., "Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (Zea mays L.) in soils of midwestern Nigeria", *Plant Foods Hum. Nutr.*, *56*, 313-324, (2001).

Elijah, A. A., "A review of the petroleum hydrocarbons contamination of soil, water and air and the available remediation techniques, taking into consideration the sustainable development goals", *Earth. J. Chem. Sci.*, *7*(1), 97-113, (2022).

Ennouri, H., d'Abzac, P., Hakil, F., Branchu, P., Naïtali, M., Lomenech, A. M., Oueslati, R. Desbrieres, J., Sivadon, P. and Grimaud, R., "The extracellular matrix of the oleolytic biofilms of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* comprises cytoplasmic proteins and T2SS effectors that promote growth on hydrocarbons and lipids", *Environ. Microbiol.*, *19*(1), 159-173, (2017).

Erdoğan, E. E., Namlı, A., ve Şahin, F., "Türkiye'de Petrol Hidrokarbonlarını Parçalayan Yerli Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Hidrokarbon Parçalama Kabiliyetlerinin Belirlenmesi", *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, *15*(45), (2013).

Eze, E. C. and El Zowalaty, M. E., "Combined effects of low incubation temperature, minimal growth medium, and low hydrodynamics optimize *Acinetobacter baumannii* biofilm formation", *Infec. Drug. Resis.t.*, 3523-3536, (2019).

Flemming, H. C. and Wingender, J., "The biofilm matrix". *Nat. Rev. Microbiol.*, *8*(9), 623-633, (2010).

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S., "Biofilms: an emergent form of bacterial life", *Nat. Rev. Microbiol.*, *14*(9), 563-575, (2016).

Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J. and Banat, I. M., "Production and applications of trehalose lipid biosurfactants", *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, *112*(6), 617-627, (2010).

Ganesan, M., Mani, R., Sai, S., Kasivelu, G., Awasthi, M. K., Rajagopal, R., Azelee, N. I. W., Selvi, P. K., Chang, S. W. and Ravindran, B., "Bioremediation by oil degrading marine bacteria: An overview of supplements and pathways in key processes", *Chemosphere*, *303*, 134956, (2022).

Garrett, T. R., Bhakoo, M. and Zhang, Z., "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces", *Progress Nat. Sci.*, *18*(9), 1049-1056, (2008).

Ha, D.G., Kuchma, S. L. and O'Toole, G. A., "Plate-Based Assay for Swarming Motility in Pseudomonas aeruginosa", A. Filloux ve J.-L. Ramos (Ed.), Pseudomonas Methods and Protocols, New York: Springer, (ss. 67-72), (2014).

Haddad, N. I., Wang, J. and Mu, B., "Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacilis brevis* HOB1", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, *35*(12), 1597-1604, (2008).

Hille, D., Encyclopedia of Soils in the Environment, New York, USA: Academic Press, (2004).

Hooshdar, P., Kermanshahi, R. K., Ghadam, P. and Khosravi-Darani, K., "A review on production of exopolysaccharide and biofilm in probiotics like lactobacilli and methods of analysis", *Biointerface Res. Appl. Chem*, *10*, 6058-6075, (2020).

Hossain, M. F., Akter, M. A., Sohan, M. S. R., Sultana, N., Reza, M. A. and Hoque, K. M. F., "Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment", *Saudi J. Biol. Sci.*, *29*(1), 211-216, (2022).

Huang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Zhao, Q., Zheng, L., Song, F. and Wang, J., "Characterization of a Diesel-Degrading *Rhodococcus qingshengii* RHZ01 and Its Genome Analysis", *Pol. Environ. Stud.*, *32*(1), (2023).

Hu, X., Qiao, Y., Chen, L. Q., Du, J. F., Fu, Y. Y., Wu, S. and Huang, L., "Enhancement of solubilization and biodegradation of petroleum by biosurfactant from *Rhodococcus erythropolis* HX-2", *Geomicrobiol J.*, *37*(2), 159-169, (2020).

Ibrar, M. and Zhang, H., “Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants”, *Sci. Total Environ.*, *714*, 136400, (2020).

Ibrar, M. and Yang, X., “Reconstructing polyaromatic hydrocarbons degrading pathways in the enriched bacterial consortium and their biosurfactants characterization”, *J. Environ. Chemi. Eng., 10*(2), 107219, (2022).

Ivshina, I. B., Krivoruchko, A. V., Kuyukina, M. S., Peshkur, T. A. and Cunningham, C. J., “Adhesion of *Rhodococcus* bacteria to solid hydrocarbons and enhanced biodegradation of these compounds”, *Sci. Rep.*, *12*(1), 21559, (2022).

Iminova, L., Delegan, Y., Frantsuzova, E., Bogun, A., Zvonarev, A., Suzina, N., Anbumani, S. and Solyanikova, I., “Physiological and biochemical characterization and genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation”, *Biotechnol Rep.*, *35*, e00741, (2022).

Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M. and Alexandridis, P., “Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, *275*, 102061, (2020).

Janek, T., Łukaszewicz, M. And Krasowska, A., “Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5”, *BMC Microbiol.*, *12*, 1-9, (2012).

Jerin, I., Rahi, M. S., Sultan, T., Islam, M. S., Sajib, S. A., Hoque, K. M. F. and Reza, M. A., “Diesel degradation efficiency of *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., and *Cedecea* sp. isolated from petroleum waste dumping site: a bioremediation viewpoint”, *Arch. Microbiol.*, *203*, 5075-5084, (2021).

Jimoh, A. A. and Lin, J., “Degradative enzymes and biosurfactant mediated mechanism of diesel fuel and *n*-hexadecane biodegradation by *Paenibacillus* sp. D9”, *Biorem. J.*, *26*(4), 328-340, (2022).

Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B. and Séror, S. J., “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. Bacteriol.*, *187* (1), 65-76, (2005).

Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M. And Heulin, T., “Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure”, *Res. Microbiol.*, *156*(4), 522-531, (2005).

Kang, Z., Yeung, A., Foght, J. M. and Gray, M. R., “Mechanical properties of hexadecane–water interfaces with adsorbed hydrophobic bacteria”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, *62*(2), 273-279, (2008).

Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Ramu Dirisala, V. and Kodali, V. P., "Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review", *Petroleum*, *4*(3), 241-249, (2018).

Karmakar, R. "State of the art of bacterial chemotaxis", *J. Basic Microbiol.*, *61*(5), 366-379, (2021).

Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H. N. P., Jamal, A., Aftab, M. N., Mainali, B. and Choi, Y., "Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants–A critical review", *Adv. Colloid Interface Sci.*, *306*, 102718, (2022).

Kawagoe, T., Kubota, K., Araki, K. S. and Kubo, M., "Analysis of the alkane hydroxylase gene and long-chain cyclic alkane degradation in *Rhodococcus*", *Adv. Microbiol.*, *9*(3), 151-163, (2019).

Kavakcıoğlu Yardımcı, B. and Mollaoğlu, Z., "Antioxidant or pro-oxidant? The effects of boron compounds on *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain", *Prep. Bioche. Biotechnol.*, *51*(1), 96-103, (2021).

Keta, M. N., Bello, I. M., Bazata, Y. A., Keta, J. N., Aminu, M., Patrick, R. J. and Aliero, A. S., "Biodegradation of crude oil contaminated soils using fungal species", *Biodegradation*, 8(4), 35-41, (2021).

Krell, T. (Ed.). Cellular Ecophysiology of microbe: hydrocarbon and lipid interactions. Springer International Publishing, (2018).

Kobayashi, K., Kanesaki, Y. and Yoshikawa, H., "Genetic analysis of collective motility of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1", *PLoS Genetics*, *12*(10), e1006387, (2016).

Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K. and Mori, K., "Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria", *Microbes Environ.*, 17(3), 114-121, (2002).

Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M. P., Raatjes, P., Kingma, J., van Lelyveld, P. H. and Witholt, B., "The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression", *J. Biological Chem.*, 264(10), 5435–5441, (1989).

Koolivand, A., Abtahi, H., Parhamfar, M., Didehdar, M., Saeedi, R. and Fahimirad, S., "Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process", *J. Environ. Manag.*, *248*, 109228, (2019).

Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C. and Huettel, M., "Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill", *Appl. Environ. Microbiol., 77*(22), 7962-7974, (2011).

Krasowska, A. and Sigler, K., "How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, *4*, 112, (2014).

Kumar, A. P., Janardhan, A., Radha, S., Viswanath, B. and Narasimha, G., "Statistical approach to optimize production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* 2297", *Biotech.*, *5*, 71-79, (2015).

Kumari, S., Nandi, A., Sinha, A., Ghosh, A., Sengupta, S., Saha, U., Singh, P. K., Panda, P. K., Raina, V. and Verma, S. K., "The paradigm of prophylactic viral outbreaks measures by microbial biosurfactants", *J. Infec. Public Health*, (2023).

Alvarez, H. M. and Steinbüchel, A. (Edt), Biology of *Rhodococcus*, (içinde), Kuyukina, M. S. and Ivshina, I. B. "Production of trehalolipid biosurfactants by Rhodococcus", Springer International Publishing, 271-298, (2019).

Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M. and Venkateswarlu, K., "Total petroleum hydrocarbons", *Environ. Fate Toxic. Remediat.*, (2020).

Lacal, J., Reyes-Darias, J. A., García-Fontana, C., Ramos, J. L. and Krell, T., "Tactic responses to pollutants and their potential to increase biodegradation efficiency", *J. Appl. Microbiol.*, *114*(4), 923-933, (2013).

Lahiri, D., Nag, M., Dey, A., Sarkar, T., Joshi, S., Pandit, S., Das, A. P., Pati, S., Pattanaik, S., Tilak, V. K. and Ray, R. R., "Biofilm mediated degradation of petroleum products" *Geomicrobiol J.*, *39*(3-5), 389-398, (2022).

Lanfranconi, M. P., Alvarez, H. M. and Studdert, C., "A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane", *Environ. Microbiol.*, *5*(10), 1002-1008, (2003).

Law, A. M. and Aitken, M. D., "Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid", *Appl. Environ. Microbiol.*, *69*(10), 5968-5973, (2003).

Li, C., Zhou, Z. X., Jia, X. Q., Chen, Y., Liu, J. and Wen, J. P., "Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *171*, 1715-1725, (2013).

Liang, K., Gao, R., Wang, C., Wang, W. and Yan, W., "Chemotaxis toward crude oil by an oil-degrading 6-1B strain", *Pol. J. Microbiol.*, *70*(1), 69-78, (2021).

Liu, Q. Y., Zhang, Y. B., Zhao, D. F. and Zhao, C. C., "Bioremediation condition optimization of hydrocarbon in soil using response surface methodology by microbial consortium KL9-1", *Adv. Mat. Res.*, *518*, 2073-2078, (2012).

Liu, Y., Wan, Y. Y., Wang, C., Ma, Z., Liu, X. and Li, S. "Biodegradation of n-alkanes in crude oil by three identified bacterial strains", *Fuel*, *275*, 117897, (2020).

Lim, M. W., Von Lau, E. and Poh, P. E., "A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—Present works and future directions", *Mar. Pollut. Bull.*, *109*(1), 14-45, (2016).

Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M. and Naidu, R., "Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches", *Environ. Technol. Innov.*, *10*, 175-193, (2018).

Mangwani, N., Kumari, S. and Das, S., "Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology", *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, *32*(1-2), 43-73, (2016).

Mangwani, N., Kumari, S. and Das, S., "Taxonomy and characterization of biofilm forming polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from marine environments", *Polycycl. Aromat. Compd*., *41*(6), 1249-62, (2021).

Markande, A. R., Patel, D. and Varjani, S., "A review on biosurfactants: properties, applications and current developments", *Bioresour. Technol.*, *330*, 124963, (2021).

Markova, Y. A., Petrushin, I. S. and Belovezhets, L. A., "Detection of gene clusters for biodegradation of alkanes and aromatic compounds in the *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D genome", *Vavil. Genet. Breed.*, 27(3), 276, (2023).

Marx, R. B. and Aitken, M. D., "Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system", *Environ. Sci. Technol., 34*(16), 3379-3383, (2000).

Mauricio-Gutiérrez, A., Machorro-Velázquez, R., Jiménez-Salgado, T., Vázquez-Crúz, C., Sánchez-Alonso, M. P. and Tapia-Hernández, A., "*Bacillus pumilus* and *Paenibacillus lautus* effectivity in the process of biodegradation of diesel isolated from hydrocarbons contaminated agricultural soils", *J. Environ. Protect.*, *46*(4), 59-69, (2020).

McGenity, T., Van Der Meer, J. R. and de Lorenzo, V., Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (p. 4716). K. N. Timmis (Ed.). Berlin: Springer, (2010).

McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A. and Sanni, G. O., "Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions", *Aqua Bios.*, *8*, 1-19, (2012).

Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, C. P., Weyrauch, P., Dong, X. and Himmelberg, A. M. "Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons", *Microbiol. Physiol.*, *26*(1-3), 92-118, (2016).

Meng, L., Li, W., Bao, M. and Sun, P. "Great correlation: Biodegradation and chemotactic adsorption of *Pseudomonas synxantha* LSH-7'for oil contaminated seawater bioremediation", *Water Res.*, *153*, 160-168, (2019).

Mishra, S., Huang, Y., Li, J., Wu, X., Zhou, Z., Lei, Q., Bhatt, P. and Chen, S., "Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants", *Chemosphere*, *294*, 133609, (2022).

Mnif, I., Ellouz-Chaabouni, S. and Ghribi, D., "Glycolipid biosurfactants, main classes, functional properties and related potential applications in environmental biotechnology", *J. Poly. Environ.*, *26*, 2192-2206, (2018).

Mnif, I., Rajhi, H., Bouallegue, A., Trabelsi, N. and Ghribi, D., "Characterization of lipopeptides biosurfactants produced by a newly isolated strain Bacillus subtilis ZNI5: potential environmental application", *J. Poly. Environ.*, *30*(6), 2378-2391, (2022).

Morikawa, M., Hirata, Y. and Imanaka, T., "A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants", *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids*, *1488*(3), 211-218, (2000).

Moutinho, L. F., Moura, F. R., Silvestre, R. C. and Romão-Dumaresq, A. S., "Microbial biosurfactants: a broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production", *Biotechnol. Prog.*, *37*(2), e3093, (2021).

Mulligan, C. N., Sharma, S. K. and Mudhoo, A. (Eds.). Biosurfactants: research trends and applications, Boca, Raton: CRC Press, (2014).

Nagkirti, P., Shaikh, A., Vasudevan, G., Paliwal, V. and Dhakephalkar, P., "Bioremediation of terrestrial oil spills: Feasibility Assessment", *Opt. Appl. Bioproc.*, 141-173, (2017).

Niepa, T. H., Vaccari, L., Leheny, R. L., Goulian, M., Lee, D. and Stebe, K. J., "Films of bacteria at interfaces (FBI): remodeling of fluid interfaces by *Pseudomonas aeruginosa*", *Sci. Rep.*, *7*(1), 17864, (2017).

Nielsen, L., Li, X. and Halverson, L. J., "Cell–cell and cell–surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions", *Environ. Microbiol.*, *13*(5), 1342-1356, v

Obuekwe, C. O., Al-Jadi, Z. K. and Al-Saleh, E. S., "Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Appl. Microbiol.*, *105*(6), 1876-1887, (2008).

Omarova, M., Swientoniewski, L. T., Mkam Tsengam, I. K., Blake, D. A., John, V., McCormick, A., Bothun, G. D., Raghavan, S. R. and Bose, A., "Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion", *ACS Sustain. Chem. Eng.*, *7*(17), 14490-14499, (2019).

Onur, G., "Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters", MSc thesis, Ankara: Middle East Technical University, (2015).

Orhan, T. Y. ve Vural, C., "Bazı çevresel İzolatların yağ/su ara yüzü etkileşimlerinin incelenmesi üzerine bir ön çalışma", *Turk Mikrobiyol. Cemiy. Derg.*, *53*(2), 107-117, (2023).

Pacwa-Plociniczak, M., Płaza, G. A., Poliwoda, A. and Piotrowska-Seget, Z., "Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil". *Environ. Sci. Pollu. Res.*, *21*, 9385-9395, (2014).

Parales, R. E. and Jayna L. Ditty., "Chemotaxis to Hydrocarbons", (içinde) Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions, editör T. Krell. Cham: Springer International Publishing, 221-39, (2018).

Parthipan, P., Elumalai, P., Sathishkumar, K., Sabarinathan, D., Murugan, K., Benelli, G. and Rajasekar, A., "Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3", *3 Biotech*, *7*, 1-17, (2017).

Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A. and Rolando, L., "Recent advances in bacterial degradation of hydrocarbons", *Water*, *15*(2), 375, (2023).

Percival, S. L., Knottenbelt, D. C. and Cochrane, C. A. (Eds.). Biofilms and veterinary medicine (Vol. 6). Springer Science & Business Media, (2011).

Perfumo, A., Smyth, T., Marchant, R. and Banat, I., Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 1501-1512). Springer, (2010).

Pfeifer, V., Beier, S., Alirezaeizanjani, Z. and Beta, C., "Role of the two flagellar stators in swimming motility of *Pseudomonas putida*", *Mbio.*, *13*(6), e02182-22, (2022).

Pombeiro, A., J., Alkane Functionalization: Introduction and Overview, Alkane Functionalization, 1-15, (2019).

Rahmati, F., Asgari Lajayer, B., Shadfar, N., van Bodegom, P. M. and van Hullebusch, E. D., "A review on biotechnological approaches applied for marine hydrocarbon spills remediation", *Microorganisms*, *10*(7), 1289, (2022).

Ramirez, I. M., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Alameda, E. J., Román, M. G. and Banat, I. M., "Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source", *Bioresour. Technol.*, *198*, 231-236, (2015).

Rawat, G., Dhasmana, A. and Kumar, V., "Biosurfactants: the next generation biomolecules for diverse applications", *Environ. Sustain.*, 3, 353-369, (2020).

Retamal-Morales, G., Heine, T., Tischler, J. S., Erler, B., Gröning, J. A., Kaschabek, S. R., Schlömann, M., Levican, G. and Tischler, D., "Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* B7g, a biosurfactant producing actinobacterium", *J. Biotechnol.*, 280, 38-41, (2018).

Rivas, D. P., Hedgecock, N. D., Stebe, K. J. and Leheny, R. L., "Dynamic and mechanical evolution of an oil–water interface during bacterial biofilm formation", *Soft Matter*, *17*(35), 8195-8210, (2021).

Rodrigues, E. M., Cesar, D. E., de Oliveira, R. S., de Paula Siqueira, T. and Tótola, M. R., "Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: implications for bioaugmentation in marine ecosystems", *Environ. Pollut.*, *267*, 115579, (2020).

Rojo, F., "Degradation of alkanes by bacteria" *Environ. Microbiol., 11*(10), 2477-2490, (2009).

Ramos, G., Cordero, M. L. and Soto, R., "Bacteria driving droplets"., *Soft Matter*, *16*(5), 1359-1365, (2020).

Rosenberg, M., "Basic and Applied Aspects of Microbial Adhesion at the Hydrocarbon: Water Interface", *Crit. Rev. Microbiol.*, *18*(2):159-73, 1(991).

Rosenberg, M., "Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH", *FEMS Microbiol. Lett.*, 262(2):129-34, (2006).

Roy, A., "Review on the biosurfactants: properties, types and its applications", *J. Fundam. Renew. Energy Appl.*, *8*(2), (2017).

Rühs, P. A., Böcker, L., Inglis, R. F. and Fischer, P., "Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid–liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, *117*, 174-184, (2014).

Salehi, R., Savabi, O., Kazemi, M., Salehi, A. R., Eslami, G. and Tahmourespour, A., "Effects of Lactobacillus reuteri-derived biosurfactant on the gene expression profile of essential adhesion genes (gtfB, gtfC and ftf) of *Streptococcus mutans*", *Adv. Biomed. Res.*, *3*, (2014).

Sanchez, C., "A review of the role of biosurfactants in the biodegradation of hydrophobic organopollutants: production, mode of action, biosynthesis and applications", *World J. Microbiol. Biotechnol., 38*(11), 216, (2022).

Samaei, M. R., Jalili, M., Abbasi, F., Mortazavi, S. B., Jonidi Jafari, A. and Bakhshi, B., "Isolation and kinetic modeling of new culture from compost with high capability of degrading n-hexadecane, focused on *Ochrobactrum oryzae* and *Paenibacillus lautus*", *Soil Sediment Contam.*, *29*(4), 384-396, (2020).

Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S. and Banat, I. M., "Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives", *Biochem. Eng. J.*, *181*, 108377, (2022).

Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M. and Chopade, B. A., "Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review", *Crit. Rev. Biotechnol.*, *30*(2), 127-144, (2010).

Satputea, K. S., Banpurkar, G. A., Banat, M. I., Sangshetti, N. J., Patil, H. R. And Gade, N. W., "Multiple roles of biosurfactants in biofilms", *Curr. Pharm. Des.*, *22*(11), 1429-1448, (2016).

Sayyed, R. Z. and El-Enshasy, H. A. (Eds.). *Microbial Surfactants: Volume 1: Production and Application*. CRC Press, (2021).

Shatila, F., Diallo, M. M., Şahar, U., Ozdemir, G. and Yalçın, H. T., "The effect of carbon, nitrogen and iron ions on mono-rhamnolipid production and rhamnolipid synthesis gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442", *Archi. Microbiol.*, 202(6), 1407–1417, (2020).

Sharma, N., Lavania, M. and Lal, B., "Microbes and their secondary metabolites: Agents in bioremediation of hydrocarbon contaminated site", *Arch. Pet. Environ. Biotechnol.*, *4*, 151, (2019).

Sharma, J., Sundar, D. and Srivastava, P., "Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism", *Front. Mol. Biosci.*, *8*, 727070, (2021).

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L. and Aalinkeel, R., "Microbial biofilm: A review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment", *Microorganisms*, *11*(6), 1614, (2023).

Siegmund, I. and Wagner, F., "New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar" *Biotechnol. Techniq.*, *5*(4), 265-268, (1991).

Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L. and Grimaud, R., "Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates", *Environ. Microbiol. Rep.*, *11*(6), 749-764, (2019).

Singh, M., Singh, G. P. and Tyagi, S. (Eds.), Microbial Products: Applications and Translational Trends, Boca, Raton: CRC Press, (2022).

Singh, S. N. (ed.), Microbial Degradation of Xenobiotics, Environmental Science and Engineering, Berlin, Germany: Springer, (2012).

Sivan, A., Szanto, M. And Pavlov, V., "Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*", *App. Microbiol. Biotechnol.*, *72*, 346-352, (2006).

Smits, T. H., Witholt, B. and van Beilen, J. B., "Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*", *Antonie Van Leeuwenhoek*, *84*, 193-200, (2003).

Smith, A. C. and Hussey, M. A., "Gram stain protocols", *Am. Soci. Microbiol.*, *1*(14), 113-144, (2005).

Soltanighias, T., Singh, A. E., Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Koolivand, A. and Rahi, P. "Assessment of biosurfactant-producing bacteria from oil contaminated soils and their hydrocarbon degradation potential", *Environ. Sustain.*, *2*, 285-296, (2019).

Sonawane, J. M., Rai, A. K., Sharma, M., Tripathi, M. and Prasad, R., "Microbial biofilms: Recent advances and progress in environmental bioremediation", *Sci. Total Environ.*, *824*, 153843, (2022).

Stancu, M. M., "Response of *Rhodococcus erythropolis* strain IBB Po1 to toxic organic solvents", *Braz. J. Microbiol.*, *46*, 1009-1018, (2015).

Stancu, M. M., "Characterization of new diesel-degrading bacteria isolated from freshwater sediments", *Int. Microbiol.*, 26(1), 109–122, (2023).

Stepniowska, A., Cieplińska, P., Fac, W. and Gorska, J., "Selected Alkaloids Used in the Cosmetics Industry". *J. Cosmet. Sci.*, *72*(2), (2021).

Steffan, R. J. (Ed.). Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: biodegradation and bioremediation. Springer International Publishing, (2019).

Subbiahdoss, G. and Reimhult, E., "Biofilm formation at oil-water interfaces is not a simple function of bacterial hydrophobicity", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, *194*, 111163, (2020).

Subbiahdoss, G., Osmen, S. and Reimhult, E. "Cellulosic biofilm formation of *Komagataeibacter* in kombucha at oil-water interfaces", *Biofilm*, *4*, 100071, (2022).

Sui, X., Wang, X., Li, Y. and Ji, H., "Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: Advances, mechanisms, and challenges", *Sustainability*, *13*(16), 9267, (2021).

Tepebaşı, G. "Petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş topraklardan biyosürfaktan üretici mayaların izolasyonu ve identifikasyonu", Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2017).

Theatre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M. H., Leonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H. and Jacques, P., "The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: Natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, *9*, 623701, (2021).

Thi Mo, L., Irina, P., Natalia, S., Irina, N., Lenar, A., Andrey, F., Ekaterina, A., Sergey, A. and Olga, P., "Hydrocarbons Biodegradation by *Rhodococcus*: Assimilation of Hexadecane in Different Aggregate States", *Microorganisms*, *10*(8), 1594, (2022).

Titah, H. S., Pratikno, H., Purwanti, I. F. and Wardhani, W. K., "Biodegradation of crude oil spill using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* in sequencing method", *J. Eco. Eng.*, *22*(11), 157-167, (2021).

Tittsler, R. P. and Sandholzer, L. A., "The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility", *J. Bacteriol.*, *31*(6), 575-580, (1936).

Tischler, D., Niescher, S., Kaschabek, S. R. and Schlömann, M., "Trehalose phosphate synthases OtsA1 and OtsA2 of *Rhodococcus opacus* 1CP", *FEMS Microbiol. Let.*, 342(2), 113-122, (2013).

Waite, A. J., Frankel, N. W. and Emonet, T., "Behavioral variability and phenotypic diversity in bacterial chemotaxis", *Ann. Revi. Biophys.*, *47*, 595-616, (2018).

Wang HP., "The study on oil pollution environmental treatment based on micro-biological degradation", *Adv. Mater Res.*, 490-495:1743-7, (2012).

Wang, H., Hu, J., Xu, K., Tang, X., Xu, X. and Shen, C., "Biodegradation and chemotaxis of polychlorinated biphenyls, biphenyls, and their metabolites by Rhodococcus spp.", *Biodegradation*, *29*, 1-10, (2018).

Wang, Y., Nie, M., Diwu, Z., Lei, Y., Li, H. and Bai, X., "Characterization of trehalose lipids produced by a unique environmental isolate bacterium *Rhodococcus qingshengii* strain FF", *J. Appl. Microbiol.*, *127*(5), 1442-1453, (2019).

Wani, P. A., Rafi, N., Wani, U., Bilikis A, H. and Khan, M. S. A., "Simultaneous bioremediation of heavy metals and biodegradation of hydrocarbons by metal resistant *Brevibacillus parabrevis* OZF5 improves plant growth promotion", *Bioremed. J.*, *27*(1), 20-31, (2023).

Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B. and Throne-Holst, M., "Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *76*, 1209-1221, (2007).

Wexler, P. (Eds.). Encyclopedia of toxicology, third edition (Vol. 1), USA: Academic Press, (2014).

Whyte, L. G., Schultz, A., Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D. and Greer, C. W., "Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils", *FEMS Microbiol. Eco.*, 41(2), 141–150, (2002).

Wu, S., Zheng, R., Sha, Z. and Sun, C., "Genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* 273 and identification of the exopolysaccharide EPS273 biosynthesis locus". *Marine drugs*, *15*(7), 218, (2017).

Xia, M., Fu, D., Chakraborty, R., Singh, R. P. and Terry, N., "Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders", *Bioresour. Technol.*, *282*, 456-463, (2019).

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. and Yu, H., "Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis", *Front. Microbiol., 9*, 2885, (2018).

Yegorenkova, I. V., Tregubova, K. V., Matora, L. Y., Burygin, G. L. and Ignatov, V. V., "Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production

and rheological properties of their exopolysaccharides". *Curr. Microbiol.*, *62*, 1554-1559, (2011).

Yin, W., Wang, Y., Liu, L. and He, J., "Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments" *Int. J. Mol. Sci.*, *20*(14), 3423, (2019).

Van Haesendonck, I. P. H. and Vanzeveren, E. C. A. Rhamnolipids in bakery products. *International Application Patent (PCT) WO*, *40984*, (2004).

Varjani, S. J., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons", *Bioresour. Technol.*, *223*, 277-286, (2017).

Varjani, S. J. and Upasani, V. N., "A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants", *Int. Biodeter. Biodegradation*, *120*, 71-83, (2017).

Vijayakumar, S. and Saravanan, V., "Biosurfactants-types, sources and applications", *Res. J. Microbiol.*, *10*(5), 181-192, (2015).

Voběrková, S., Hermanová, S., Hrubanová, K. And Krzyžánek, V., "Biofilm formation and extracellular polymeric substances (EPS) production by Bacillus subtilis depending on nutritional conditions in the presence of polyester film", *Folia Microbiol.*, *61*, 91-100, (2016).

Zaragoza, A., Teruel, J. A., Aranda, F. J. and Ortiz, A., "Interaction of a trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 with a secretory phospholipase A2", *J. Colloid Interface Sci.*, *408*, 132-137, (2013).

Zhang, Y., Wang, F., Zhu, X., Zeng, J., Zhao, Q. and Jiang, X., "Extracellular polymeric substances govern the development of biofilm and mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons for improved biodegradation", *Biores. Tech.*, *193*, 274-280, (2015).

Zhao, F., Shi, R., Ma, F., Han, S. and Zhang, Y., "Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*", *Microb. Cell. Fact., 17*, 1-11, (2018).

Zhao, A., Sun, J. and Liu, Y., "Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, *13*, 1137947, (2023).

Zheng, X., Qu, D., Zhang, F., Liu, Y. and Qin, G., "Measurements and calculations of thermal conductivity for liquid *n*-octane and *n*-decane", *Fluid Phase. Equilib.*, *533*, 112940, (2021).

EKLER

8. EKLER

EK A: Çalışmada kullanılan biyodegradasyon ve biyosürfaktan primerleri ve dizileri

Ek A: Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri

Primer/Gen	Dizi	Mekanizma	Ürün miktarı	Referans
AlkBw-F	5'-AAYCANGCNCAYGARCTNGGVCAYAA-3'	Degradasyon	550 bç	Diallo ve diğ. 2020
AlkBw-R	5'-GCRTGRTCHGARTGNCGYTG-3'			
AlkB-F	5'-AACTACMTCGARCAYTACGG-3'	Degradasyon	100 bç	Diallo ve diğ. 2020
AlkB-R	5'-TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC-3'			
CYP153-F	5'-TGTCGGTTGAAATGTTCATYGCNMTGGAYC-3'	Degradasyon	800 bç	Diallo ve diğ. 2020
CYP153-R	5'-TGCAGTTCGGCAAGGCGGTTDCCSRYRCAVCKRTG-3'			
Pp *alk*-B-F	5'-TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG-3'	Degradasyon	870 bç	Whyte, et al. (2002a), Kok, et al. (1989)
Pp *alk*-B-R	5'-CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG-3'			
Pp ALK1-F	5'-CATAATAAAGGGCATCACCGT-3'	Degradasyon	185 bç	Kohno, et al. (2002)
Pp ALK1-R	5'-GATTTCATTCTCGAAACTCCAAAC-3'			
Pp *rhl*B-F	5'- GCCCACGACCAGTTCGAC-3'	Biyosürfaktan	226 bç	Biktasheva ve diğ. (2022) Bodour ve diğ. (2003)
Pp *rhl*B-R	5'- CATCCCCCTCCCTATGAC-3'			
Pp *rhl*C-F	5'- CTGTTCAATCCTGGCGACGA-3'	Biyosürfaktan	540 bç	Shatila ve diğ. (2020)
Pp *rhl*C-R	5'-AGGCTGTAYTCGGTGTCCA-3'			
Rhd *ots*A-F	5'- GT(GC)TGGGT(GC)CA(GC)GACTACCA-3'	Biyosürfaktan	760 bç	Tischler ve diğ. (2013); Retamal-Morales ve diğ. (2018); Markova ve diğ. (2023)
Rhd *ots*A-R	5'-(CT)TCCTT(GC)GC(GC)AC(GC)AG(AG)TTCAT-3'			

Ek A: Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri (devamı)

Primer/Gen	Dizi	Mekanizma	Ürün miktarı	Referans
Rhd *ots*B-F	5'- CGAGAACTACCTSGACTGGG-3'	Biyosürfaktan	183 bç	Bu çalışma
Rhd *ots*B-R	5'- AGTTGAACCTGCTGATTCGC-3'			
Rhd treY-F	5'- CMCCGAWGATGTTCTGCCAC-3'	Biyosürfaktan	161 bç	Bu çalışma
Rhd *tre*Y-R	5'- GTCCACYCACGACACCAARC-3'			
Mo *alk*-B-F	5'-TTGTCAAYTTGCRCCGTGGT-3'	Degradasyon	221 bç	Bu çalışma
Mo *alk*-B-R	5'-GCGGGCTTGTTGGTCATAAA-3'			
Mo *ots*A-F	5'- CCCCACGCCATCCARATTAC-3'	Biyosürfaktan	194 bç	Bu çalışma
Mo *ots*A-R	5'- CGTTCYACCGCTAMAATCGT-3'			
Mo *ots*B-F	5'- CATTTTCGTGAGCAYCCYGA-3'	Biyosürfaktan	180 bç	Bu çalışma
Mo *ots*B-R	5'- ACGGCAATGAGGRTGATAGT-3'			
Pae *Alk*B-F	5'- CCTGCTCCCGATCCTCGA-3'	Degradasyon	660 bç	Jimoh ve Lin (2022)
Pae *Alk*B-R	5'-TCGTACCGCCCGCTGTCCAC-3'			
Pae *Alk*M-F	5'-GGATCCGAATGCGATCTTGGAACAGCCTTG-3'	Degradasyon	1062 bç	Baek ve diğ. (2006)
Pae *Alk*M-R	5'- CTCGAGTCAGGCAAGCCTGCCGA-3'			
Pae *Sfp*-F	5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3'	Biyosürfaktan	675 bç	Jimoh ve Lin (2022)
Pae *Sfp*-R	5'-TTATAAAAGCTCTTCGTACG-3'			