

T.C.

AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDÜSTRİYEL ATIKLARLA KİRLENMİŞ
ALANLARDAN PETROL TÜREVİ
HİDROKARBONLARIN BİYODEGREDASYONUNU
YAPAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Muhammed Yunus Emre KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2017

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDÜSTRİYEL ATIKLARLA KİRLENMİŞ
ALANLARDAN PETROL TÜREVİ
HİDROKARBONLARIN BİYODEGREDASYONUNU
YAPAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Muhammed Yunus Emre KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

KIRŞEHİR 2017

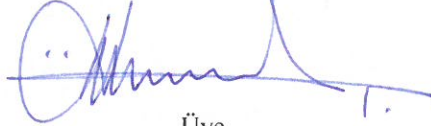
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Başkan

Yrd. Doç. Dr. M. İsmail VAROL



Üye

Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ



Üye

Doç. Dr. Belgin ERDEM

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

20 / 01 / 2017

Prof. Dr. Levent KULA

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek yazıldığını, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Muhammed Yunus Emre KARAMAN



**ENDÜSTRİYEL ATIKLARLA KİRLENMİŞ ALANLARDAN PETROL
TÜREVİ HİDROKARBONLARIN BİYODEGREDASYONUNU YAPAN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Muhammed Yunus Emre KARAMAN

Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

OCAK 2017

ÖZET

Bu çalışmada toprak örnekleri Kırşehir ilinde bulunan lastik fabrikası etrafından, Mersin ilindeki krom fabrikası ve Mersin ili Kazanlı ve Karaduvar rafineri bölgesinden petrol ve petrol türevlerini içeren endüstriyel atıklar ile kirlenmiş alanlardan alınmıştır. Toprak örneklerinden toplam 40 bakteri izole edilmiştir. İzolatlar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra moleküler tanı yöntemiyle tanımlanmıştır. 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre izolatların; *Bacillus*, *Diaphorobacter*, *Cupriavidus*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Massilia*, *Staphylococcus* ve *Azospirillum* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

İzolatların antibiyotik dirençlilikleri ve toplam antibiyotik direnç yüzdesi belirlenmiştir. Toplam antibiyotik direnç yüzdesi en yüksek % 82,5 Tetracycline ve en düşük % 15 Imipenem'e ait olduğu tespit edilmiştir. Yine izolatların ağır metal dirençlilikleri de belirlenmiş ve en yüksek ağır metal dirençliliği hem 5 mM hemde 20 mM'lık mangan konsantrasyonlarında gözlenmiştir.

Ayrıca izolatların biosümfektan üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla "Drop Collapse" yöntemi uygulanmış ve 29 izolatın biosümfektan sentezleme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; petrol ve petrol türevlerini içeren endüstriyel atıklarla kirlenmiş alanlardan poliaromatik hidrokarbonları parçalayabilen, ağır metal ile antibiyotiklere karşı direnç gösteren ve biyosümfektan üretebilen farklı bakteri türleri elde edilmiştir. Yukarıda belirtilen özelliklere sahip türlerin biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmasının ekosistemin dengesinin düzenlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyosümfektan, Biyoremediasyon, Antibiyotik Dirençlilik, Ağır

Metal Dirençlilik

Sayfa Adedi: 159

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND EXAMINATION OF SOME
FEATURES OF BACTERIA THAT BIODEGRADE HYDROCARBONS
DERIVED FROM PETROLEUM IN AREAS CONTAMINATED WITH
INDUSTRIAL WASTE**

(Master of Science Thesis)

Muhammed Yunus Emre KARAMAN

Ahi Evran University

Institute Of Science

JANUARY 2017

ABSTRACT

In this study, the soil samples were taken from the contaminated areas with industrial waste including petroleum and its derivatives from around the tire factory in Kırşehir, chrome factory in Mersin and Kazanlı, and Karaduvar refinery regions in Mersin. A total of 40 bacteria were isolated from soil samples. The isolates were identified with molecular diagnostic method as well as morphological, physiological and biochemical tests. Based on the results of 16S rRNA sequence analysis, it was found out that the isolates belonged to the *Bacillus*, *Diaphorobacter*, *Cupriavidus*, *Acinetobacter*, *Massilia*, *Staphylococcus* and *Azospirillum* genera.

Antibiotic resistance and total antibiotic resistance percentage of the isolates were determined. The percentage of total antibiotic resistance was determined as the highest 82,5 % Tetracycline and the lowest 15% Imipenem. Again, heavy metal resistances of isolates were determined and the highest heavy metal resistance was observed in both 5 mM and 20 mM manganese concentrations.

Additionally, in order to determine biosurfactant production abilities of isolates, “Drop Collapse” method was applied and it was determined that 29 isolates have biosurfactant producing ability.

As a result, in this study, different bacterial species degrading polyaromatic hydrocarbon, resisting against antibiotics with heavy metals and producing biosurfactant from the contaminated areas with industrial wastes including petroleum and petroleum derivatives were acquired. It is thought that usage of species with aforementioned features in bioremediation studies will contribute to the improvement of the balance of ecosystem.

Key Words: Biosurfactant, Bioremediation, Antibiotic Resistance, Heavy Metal Resistance

Number of Pages: 159

Thesis Advisor: Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında her türlü desteği sağlayan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın danışman hocam Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ'ye, teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca izolatların moleküler tanı aşamasında destek olan Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya ve Biyolog Selin HÜNDÜR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Kıymetli bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen maddi ve manevi olarak yardımcı olan Prof. Dr. Ergin KARIPTAŞ'a, Doç. Dr. Belgin ERDEM'e ve Doç. Dr. Makbule ERDOĞDU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda tecrübelerini esirgemeyen ve her zaman yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Tayfun KAYA'ya ve Arş. Gör. Esin KIRAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım Hülya AVŞAR'a, Deniz ŞANLI'ya ve Ferhat KANTAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca bana derslerinin yanında hayat derside veren ve üzerimde hakkı olan tüm hocalarımda gönülden teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgilerimi ve saygılarımı sunarım. Saygılarımla.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri PYO-FEN.4001.16.009 kapsamında desteklenmiştir.

Muhammed Yunus Emre KARAMAN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
RESİMLER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Petrol ve Petrol Türevleri	3
1.2. Hidrokarbonlar	4
1.2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH).....	5
1.2.2. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
1.2.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kaynakları	12
1.2.4. PAH'ların Çevre Üzerine Etkileri	13
1.3. Sürfektanlar	15
1.3.1. Biyosürfektanlar	16
1.3.2. Biyosürfektanların Yapısı ve Fonksiyonları	17
1.3.3. Biyosürfektanların Sınıflandırılması.....	19
1.3.4. Biyosürfektan Üreten Mikroorganizmaları İzleme Yöntemleri	21
1.3.4.1. Hemolitik Aktivite	21
1.3.4.2. Setiltrimetilamonyum Bromid (CTAB) Agar Testi	21
1.3.4.3. Antron Yöntemi	22
1.3.4.4. Drop-Collapse Yöntemi	22
1.4. Ağır Metaller	23
1.4.1. Ağır Metallerin Kaynakları	23
1.4.2. Ağır Metallerin Çevreye Etkisi	25
1.4.3. Mikrobiyal Metal Direnç Mekanizması	27
1.4.4. Ağır Metal Çeşitleri.....	30
1.4.4.1. Kobalt.....	30
1.4.4.2. Civa	31

1.4.4.3. Mangan.....	32
1.4.4.4. Çinko	33
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	35
3. MATERYAL VE METOD.....	52
3.1. Materyal	52
3.1.1. Materyal Örnekleri	52
3.1.2. Kullanılan Kontrol Suşu.....	53
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	53
3.1.3.1. Nutrient Agar	53
3.1.3.2. Nutrient Broth	53
3.1.3.3. Tryptic Soy Agar (TSA).....	54
3.1.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB).....	54
3.1.3.5. Ham Petrol İçeren Zenginleştirilmiş Besiyeri.....	55
3.1.3.6. Mueller Hinton Agar	55
3.1.3.7. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyeri	56
3.1.3.8. Stok Besiyeri	57
3.1.4. Kullanılan Boyalar	57
3.1.4.1. Kristal Viyole	57
3.1.4.2. Safranin	57
3.1.4.3. Etidyum Bromür.....	57
3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	58
3.1.5.1. Lugol Çözeltisi (Gram İyot Çözeltisi).....	58
3.1.5.2. KOH Çözeltisi (%3`lük)	58
3.1.5.3. H ₂ O ₂ Çözeltisi (%3`lük)	58
3.1.5.4. Serum Fizyolojik.....	59
3.1.5.5. Gliserol.....	59
3.1.5.6. Mineral Yağ	59
3.1.5.7. Tetrametil-p-fenilendiamin Çözeltisi (%1`lik)	59
3.1.5.8. Etil Alkol (%70`lik)	59
3.1.5.9. STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) Tamponu 60	
3.1.5.10.% 10`luk Sodium Dodecyl Sulfate Çözeltisi (% 10`luk SDS).....	60
3.1.5.11. 5M NaCl Çözeltisi	60

3.1.5.12. %10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl Çözeltisi	61
3.1.5.13. Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) Çözeltisi	61
3.1.5.14. Kloroform: izoamilalkol (24: 1) Çözeltisi	61
3.1.5.15. TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8)Tamponu	62
3.1.5.16. Agaroz Jel (0,6`lık)	62
3.1.5.17. Dimetil Sülfoksit (DMSO).....	62
3.1.5.18. 0,5XTBE Tamponu	62
3.1.5.19. 6X Yükleme Tamponu	62
3.1.6. Kullanılan Antibiyotikler	62
3.1.7. Kullanılan Ağır Metaller	64
3.2. Metod	64
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu	64
3.2.2. Bakterilerin Muhafaza Edilmesi	69
3.2.3. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri	69
3.2.3.1. Kültür Özellikleri	69
3.2.3.2. Gram Boyama	69
3.2.3.3. % 3`lük KOH Testi	70
3.2.3.4. Hareketlilik Testi.....	70
3.2.4. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testleri.....	71
3.2.4.1. Katalaz Testi.....	71
3.2.4.2. Oksidaz Testi.....	72
3.2.5. İzole Edilen Bakterilerin Moleküler Testleri	72
3.2.5.1. Bakteri Hücrelerinden Genomik DNA`ların İzolasyonu	72
3.2.5.2. Bakteri İzolatlarının 16S rDNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu.....	74
3.2.5.3. Reaksiyonun (Master mix`in) Hazırlanması	74
3.2.5.4. PCR Programı	75
3.2.5.5. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi	75
3.2.5.6. 16S rDNA Sekans Analizi	75
3.2.6. Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	76
3.2.7. Ağır Metal Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi	76
3.2.8. Biosülfektan Üretimi İçin Ekim ve Kültürasyon	77

3.2.9. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Varlığının Saptanması.....	78
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	79
4.1. Bakterilerin İzolasyonu	79
4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri	89
4.3. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testleri.....	93
4.4. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları	94
4.5. İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi	95
4.6. Bakterilerin Ağır Metal Dirençliliği.....	101
4.7. İzole Edilen Bakterilerde Biyosùrfektan Üretiminin Saptanması.....	120
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	124
KAYNAKLAR	126
EKLER.....	149
ÖZGEÇMİŞ.....	159

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı (Kılıç, 2015).....	8
Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı (Kılıç, 2015) (Devamı).	9
Tablo 1.3. Poliaromatik Hidrokarbonların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Esen, 2006).	11
Tablo 1.4. Mikrobiyal Sürfektanların Önemli Tipleri ve Mikrobiyal Kaynakları (Kaya, 2008).....	20
Tablo 1.5. Temel Endüstrilerden Çevreye Bırakılan Metal Türleri (Çay, 2014)	24
Tablo 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı Bölgeler.....	52
Tablo 3.2. Kullanılan Antibiyotiklerin Grupları ve Etki Mekanizmaları (Akkan, 2009)	63
Tablo 3.3. Kullanılan Ağır Metallerin Moleküler Formülleri	64
Tablo 4.1. İzolatların Kültür Özellikleri.....	89
Tablo 4.2. İzole Edilen Bakterilerin Gram Boyama, Morfoloji, %3`lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları	90
Tablo 4.3. İzole Edilen Bakterilerin Gram Boyama, Morfoloji %3`lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları (Devamı)	91
Tablo 4.4. İzolatların Katalaz ve Oksidaz Test Sonuçları	93
Tablo 4.5. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları	94
Tablo 4.6. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları (Devamı).....	95

Tablo 4.7. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Değerleri	97
Tablo 4.8. İzolatlarının Direnç Gösterdikleri Antibiyotik Sayısı	98
Tablo 4.9. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları	99
Tablo 4.10. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları (Devamı).....	100
Tablo 4.11. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Suşuna Ait Zon Çapları (mm).....	101
Tablo 4.12. İzolatların Kobalt Dirençlilikleri.....	103
Tablo 4.13. İzolatların Çinko Dirençlilikleri.....	107
Tablo 4.14. İzolatların Mangan Dirençlilikleri.....	111
Tablo 4.15. İzolatların Civa Dirençliliği	115
Tablo 4.16. İzolatların Biyosümfektan Üretebilme Yetenekleri.....	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. PAH'ların çevredeki dağılımları (Kalkan, 2012)	14
Şekil 1.2. a. Tekli yapıdaki biyosürefektan, b. Misel yapıdaki biyosürefektan, c. Silindirik yapıdaki biyosürefektan, d. Çift tabakalı biyosürefektan, e. Emülsiyon haldeki biyosürefektan (Yalçın, 2008).....	18
Şekil 1.3. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları (Kahvecioğlu ve ark., 2007)	25
Şekil 4.1. İzolatların kobalt direnç yüzdeleri	102
Şekil 4.2. İzolatların çinko direnç yüzdeleri	106
Şekil 4.3. İzolatların mangan direnç yüzdeleri	110
Şekil 4.4. İzolatların civa direnç yüzdeleri	114

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Petrol dolum boşaltım silosunun çevresi ve alınan toprak örnekleri.....	65
Resim 3.2. Ham petrol içeren steril besiyerleri	66
Resim 3.3. Toprak örneği eklenmiş ham petrol içeren besiyerleri	66
Resim 3.4. Çalkalayıcı inkübatör (180 rpm`de 28 °C`de 72 saat inkübasyon).....	67
Resim 3.5. İnkübasyon sonrası ham petrol içeren steril taze besiyerlerine aktarım..	67
Resim 3.6. Üçüncü inkübasyon sonucundaki besiyerleri	68
Resim 3.7. Çizgi ekim ile izolasyon	68
Resim 3.8. Saf kültür eldesi.....	68
Resim 3.9. Hareketlilik testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu	71
Resim 3.10. Drop Collapse testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu	78
Resim 4.1. a. Tanımlanmamıştır (YH 9-1) b. <i>Bacillus megaterium</i> (YH 9-2) c. <i>Diaphorobacter</i> sp. (YH 9-4) d. <i>Diaphorobacter</i> sp. (YH 9-5)	79
Resim 4.2. a. <i>Cupriavidus</i> sp. (YH 9-6) b. Tanımlanmamıştır (YH 9-7) c. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (YH 9-8) d. Tanımlanmamıştır (YH 9-9)	80
Resim 4.3. a. <i>Bacillus megaterium</i> (YH 9-12) b. Tanımlanmamıştır (YH 10-1) c. Tanımlanmamıştır (YH 10-2) d. Tanımlanmamıştır (YH 10-3).....	81
Resim 4.4. a. Tanımlanmamıştır (YH 10-5) b. Tanımlanmamıştır (YH 10-6) c. Tanımlanmamıştır (YH 10-7) d. Tanımlanmamıştır (YH 10-8).....	82
Resim 4.5. a. <i>Bacillus subtilis</i> (YH 10-11) b. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (YH 10-12) c. <i>Cupriavidus</i> sp. (YH 11-1) d. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (YH 11-2)	83

Resim 4.6. a. Tanımlanmamıştır (YH 11-3) b. Tanımlanmamıştır (YH 11-4) c. Tanımlanmamıştır (YH 11-5) d. Tanımlanmamıştır (YH 11-7).....	84
Resim 4.7. a. Tanımlanmamıştır (YH 12-1) b. Tanımlanmamıştır (YH 12-2) c. Tanımlanmamıştır (YH 12-3) d. Tanımlanmamıştır (YH 12-4).....	85
Resim 4.8. a. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (YH 13-1) b. <i>Massilia alkalitolerans</i> (YH 13-2) c. <i>Bacillus simplex</i> (YH 13-3) d. <i>Massilia alkalitolerans</i> (YH 13-4).....	86
Resim 4.9. a. <i>Bacillus simplex</i> (YH 13-5) b. Tanımlanmamıştır (YH 13-6) c. <i>Staphylococcus</i> sp. (YH 15-2) d. <i>Azospirillum brasilense</i> (YH 15-3)	87
Resim 4.10. a. <i>Massilia alkalitolerans</i> (YH 16-1) b. <i>Azospirillum brasilense</i> (YH 16-4) c. <i>Azospirillum brasilense</i> (YH 16-6) d. <i>Azospirillum brasilense</i> (YH 16-7).....	88
Resim 4.11. İzole edilen bakterilerin Gram boyama görüntüleri (100x) a. <i>Massilia alkalitolerans</i> (YH 16-1) b. <i>Staphylococcus</i> sp. (YH 15-2) c. <i>Bacillus megaterium</i> (YH 9-2) d. Tanımlanmamıştır (YH 10-5) e. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (YH 9-8) f. Tanımlanmamıştır (YH11-4)	92
Resim 4.12. İzolat YH 13-5 `in antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin).....	96
Resim 4.13. İzolat YH 13-5 `in antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)	96
Resim 4.14. İzolat YH 9-9`un kobalt dirençliliği (5 mM, 10 mM).....	104
Resim 4.15. İzolat YH 9-9`un kobalt dirençliliği (15 mM, 20 mM).....	104
Resim 4.16. İzolat YH 10-5`inin kobalt dirençliliği (5 mM, 10 mM).....	105
Resim 4.17. İzolat YH 10-5`inin kobalt dirençliliği (15 mM, 20 mM).....	105
Resim 4.18. İzolat YH 10-3`ün çinko dirençliliği (5 mM, 10 mM).....	108
Resim 4.19. İzolat YH 10-3`ün çinko dirençliliği (15 mM, 20 mM).....	108
Resim 4.20. İzolat YH 13-1`in çinko dirençliliği (5 mM, 10 mM).....	109

Resim 4.21. İzolat YH 13-1`in çinko dirençliliği (15 mM, 20 mM).....	109
Resim 4.22. İzolat YH 13-5`in mangan dirençliliği (5 mM, 10 mM)	112
Resim 4.23. İzolat YH 13-5`in mangan dirençliliği (15 mM, 20 mM)	112
Resim 4.24. İzolat YH 10-7`nin mangan dirençliliği (5 mM, 10 mM)	113
Resim 4.25. İzolat YH 10-7`nin mangan dirençliliği (15 mM, 20 mM)	113
Resim 4.26. İzolat YH 12-4`ün civa dirençliliği (5 mM, 10 mM)	116
Resim 4.27. İzolat YH 12-4`ün civa dirençliliği (15 mM, 20 mM)	116
Resim 4.28. İzolat YH 9-9`un civa dirençliliği (5 mM, 10 mM)	117
Resim 4.29. İzolat YH 9-9`un civa dirençliliği (15 mM, 20 mM)	117

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
LPG	Sıvılaştırılmış Petrol Gazı
EPA	Enviromental Protection Agency- Çevre Koruma Kuruluşu
MAH	Monosiklik Aromatik Hidrokarbon
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry- Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
CAS	Chemical Abstracts Service- Amerikan Kimya Derneği`nin Bir Alt Bölümü
M.Ö.	Milattan Önce
NA	Nutrient Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
MSM	Mineral Salt Medium Besiyeri
ATP	Adenozin Trifosfat
ATCC	American Type Culture Collection
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromid
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FTIR	Fourier Transform Infrared
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
BS	Biyosürefktan
EPS	Ekzopolisakkarit

ÇAD	Çoklu antibiyotik dirençlilik
PCR	Polymerase Chain Reaction
MIS	Mikrobiyal Tanılama Sistemi
MTC	Maximum Tolerable Metal Concentrations
LogKow	Sudan Lipide Geçiş Potansiyelini
LogKoc ³	Organik Karbon Üzerine Adsorblanma Potansiyeli
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
L	Litre
ml	Mililitre
pH	Asitlik-Bazlık Birimi
M	Molar
mM	Milimolar
dev/dak	Devir/Dakika
°C	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Nüfusun hızla artmasıyla birlikte gerçekleşen Sanayi Devrimi sonunda endüstriyel atıklarda büyük bir artış gözlenmiştir. İnsanlar gün geçtikçe gelişmekte olan endüstriyel alanlarda hammadde arayışı içine girmişlerdir. Günümüzde doğal kaynakların azalmasıyla yapay, sentetik, petrol ve petrol türevi olan ham maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan bu hammaddelerin çevreye verdiği zararlar düşünülmeden üretime geçilmiştir. Bu seri üretimler sonucunda çevre kirliliği; ekosistemleri ve insan sağlığını etkileyebilecek kadar büyük boyutlara ulaşmıştır.

Petrol ve petrol türevi olan hammaddelerin yapılarında hidrokarbon olarak nitelendirdiğimiz bileşenler bulunmaktadır. Hidrokarbonlar yapılarında C ve H atomu bulduran organik yapıdaki kararlı bileşiklerdir ve yapısında ne kadar çok benzen halkası içerirse çevre için oluşturduğu kirlilik tehdidi de o derece büyük olmaktadır. Hidrokarbonun yapısında bulunan çoklu benzen halkaları ise hidrokarbonların parçalanmalarını zorlaştırmaktadır. Çok sayıda benzen halkasına sahip olan hidrokarbonlara Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) denilmektedir.

Poliaromatik hidrokarbonlar doğada kolaylıkla parçalanmayıp bulaştıkları ekosistemi yok edebilecek güce sahip maddelerdir. Bu maddelerin bulunduğu yerde canlılık faaliyeti yavaşlamakta hatta durmaktadır. Bu maddeler iki şekilde temizlenebilir; ya buldukları ortamdan direk maddeyi toplama sayesinde ya da biyolojik iyileştirme yöntemleri sayesinde ortamdan uzaklaştırılabilirler.

Bir yandan yeni endüstriyel işletmeler kurulurken bir yandan da var olanların etkinliğini devam ettirmeleri doğal kaynaklarımızın kirlenmesine sebep olmuştur. Endüstrinin hızlı gelişmesi sonucu çevreye bırakılan atıklar içerisinde sadece poliaromatik hidrokarbonlara rastlanılmamakta aynı zamanda ağır metaller de rastlanılmaktadır. Bu ağır metaller endüstri kuruluşlarının atık sularından doğaya karışmaktadır.

Endüstri kuruluşlarında kullanılan ağır metaller; genellikle bakır, çinko, kobalt, kadmiyum, civa, kurşun ve demir gibi metal iyonlarıdır. İnsanlar yüzyıllar boyunca ağır metallerin etkilerini bilmeden birçok ağır metal içeren malzemeler üretmişler ve

sonuç olarak bu ağır metaller doğada birikmeye başlamıştır. Bu atık maddeler gün geçtikçe daha kompleks hale gelmekte ve doğadan temizlenmesi zorlaşmaktadır. Ağır metallerin birikmesi sonucu canlılarda çeşitli zehirlenmeler gözlenmiş ve bunların çevreden temizlenmesi ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Son yıllarda bu kirletici unsurları doğadan temizlemek amacıyla doğal yöntemler araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda birçok biyolojik iyileştirme yöntemi bulunmuş ve geliştirilmiştir. Bunlara biyoremediasyon, fitoremediasyon ve biyoliçing gibi birçok biyolojik iyileştirme yöntemi örnek verilebilir.

Hidrokarbonlar bazı canlılar için toksik etki gösterirken bazı canlılar içinse besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar bu kirletici unsurları karbon kaynağı olarak kullanmakta ve metabolizmaları için gerekli olan enerjiyi bu maddelerden sağlamaktadırlar. Günümüzde yapılan biyolojik iyileştirme yöntemleri içerisinde mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmakta ve poliaromatik hidrokarbonları en iyi derecede parçalayabilen yeni mikroorganizma türleri araştırılmaktadır. Özellikle doğal yaşam alanlarından izole edilerek biyoremediasyon amacıyla kullanılmak üzere bu mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar son yıllarda önem arz etmektedir.

Kirleticilerin toprakta birikmesi sadece oradaki canlılık faaliyetlerini etkilemekle kalmayıp besin zinciri yoluyla canlıların ve insanların sağlığını da tehlikeye sokmaktadır. Biyoremediasyon sayesinde kimyasal sıvıların, tehlikeli atıkların ve atık suların arıtılması ve temizlenmesi sağlanmıştır. Artık günümüzde atık suların arıtılmasında mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

Çalışmamızın amacı; doğayı kirleten poliaromatik hidrokarbonları parçalayabilme özelliğine sahip bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, biyosürefektan üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve antibiyotik ile ağır metal dirençliliklerinin saptanmasıdır. Bu amaç ışığında elde edilen izolatların biyoremediasyon çalışmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

1.1. Petrol ve Petrol Türevleri

Enerji, sanayi, ulaştırma, endüstri, konut ve tarım alanlarında yoğun olarak kullanılan petrol terimi Yunanca'da taş anlamına gelen "petra" ile yağ anlamına gelen "oleum" sözcüklerinden oluşmuştur. Petrolün yapısı % 12 hidrojen, % 85 karbon, % 3'lük oksijen, azot ve sülfür içeren organik bir hidrokarbondur. Petrol bütan, propan, etan ve metan gibi çeşitli hidrokarbonların karışımından meydana gelmiştir. Yanıcı özelliğe sahip olan petrol sıvı halde genellikle koyu yeşil, siyah veya kahverengi renkte olup suda çözünmeyen yapışkan bir sıvıdır. Farklı petrol tipleri kimyasal yapıları farklı olan hidrokarbonlar sayesinde meydana gelmektedir (Önertürk,1983; Faschchuk, 1991; Yalçın, 2008).

Kozmetik, plastik ve boya gibi birçok kimyasal ürünün hammaddesi olan petrol ve petrol türevleri endüstride ve günlük hayatta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Jet yakıtı, fuel oil, kurşunsuz benzin, süper benzin, normal benzin, sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG), nafta, solvent, gazyağı, motorin, kalorifer yakıtı, asfalt, madeni yağ ve diğerleri ham petrolün işlenmesiyle elde edilmektedir. Böcek ilaçları ve parfüm gibi çeşitli ikincil ürünler de ham petrolün artımı sonucu oluşmaktadır. Bu ürünlerden bazıları girdi veya destek ürün olarak petrokimya sanayisinde kullanılmaktadır. Ham petrolün ilk damıtma kalıntısı olan mazot önemli bir yakıttır ve çoğu durumda taşkömürünün yerini almıştır. Etil, propilen, benzen, amonyak ve metanol gibi temel petrokimya ürünlerinin haricinde 4000` in üzerinde petrokimya ürünü bulunmaktadır (Acun, 1949; Sevil, 2003; Yalçın, 2008) .

Petrokimya sanayisi için önemli bir hammadde kaynağı olan petrol ve petrol türevlerinden günümüzde yapay lif, sentetik kauçuk, gübre, kozmetik ürünleri, filmler, plakalar, besin maddeleri, plastikler ve deterjan gibi 80.000 farklı ürün elde edilmektedir. Büyük bir öneme sahip olan petrol ve petrol türevlerinden oluşan her ürünün ya da yan ürünün kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Petrol türevi olan maddelerden parafin kağıt üretiminde kullanılırken, yağlar mekanik yağlamada kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta katran tortusunun yükseltgenmesiyle elde edilen bitüm ya da asfalt, su geçirmez yol kaplamalarının yapılmasında yer alır (Eckenfelder, 1989; Üşümezsoy ve şen, 2003; Yalçın, 2008).

Poliaromatik hidrokarbon (PAH) olarak adlandırılan karmaşık yapılı hidrokarbonlar petrol ve petrol türevlerinin yapısında bulunmaktadır. Environmental Protection Agency- Çevre Koruma Kuruluşu (EPA) tarafından PAH'ların 16 adedinin öncelikli kirletici olduğu belirlenmiştir. Su ekosistemine bulaşan bu maddeler buradaki canlıların vücutlarında birikmekte ve kanserojenik/mutajenik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. PAH kirleticileri denizlerde fitoplanktonlar ile başlayan besin zincirine girip besin zincirinde insana kadar ulaşmaktadır (Doğanay, 1998; Yalçın, 2008).

Çevre kirliliğini oluşturmaları yönünden dünya gündeminde öncelikli hale gelen poliaromatik hidrokarbonlar genellikle petrol ve petrol türevlerinin çevreye salınımları sonucu bulaşmaktadır. Petrol rafineri atıkları, denizlerde petrol taşıyan gemi kazaları, petrol dolun boşaltım istasyonlarındaki sızıntılar, petrol tankerlerinin devrilmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmaları gibi olaylar sonucunda çevremizde petrol kirliliği meydana gelmektedir. Sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler petrol ve petrol türevlerini de kapsamaktadır (Yalçın, 2008).

1.2. Hidrokarbonlar

Yapısında sadece karbon ve hidrojen atomu içeren bileşiklere hidrokarbon denir. Hidrokarbonlar alifatik ve aromatik hidrokarbonlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.

Alifatik hidrokarbonlar; yapısal olarak düz zincirli veya dallanmış, bağ sayısına göre ise doymuş veya doymamış olarak sınıflandırılmaktadır. Doymuş hidrokarbonların karbon atomları aralarında tekli hidrojen bağı bulunurken doymamış hidrokarbonların karbon atomları arasında ise ikili veya üçlü hidrojen bağı bulunur. Alifatik hidrokarbonlar alkanlar, alkenler ve alkinler diye üç gruba ayrılır.

Aromatik hidrokarbonlar; yapılarında bir veya daha fazla benzen halkası içeren bileşiklerdir. Aromatik hidrokarbonlar halka yapıda olan hidrokarbonlardır. Benzen halkası karbon atomları arasında sırasıyla bir tekli ve bir çift bağ içeren en basit aromatik hidrokarbondur. Aromatik hidrokarbonlar monosiklik aromatik

hidrokarbonlar (MAH) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) olarak iki gruba ayrılırlar.

1.2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) lar, petrol ve petrol türevlerinde bulunan fosil yakıtların tam yanmaması sonucu açığa çıkan tehlikeli organik kirleticiler listesinde yer almaktadır. Biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen polisiklik aromatik hidrokarbonlar çevrede uzun süre kalmaları ve birikimleri sonucu doğal çevrenin kirlenmesine ve ekolojik sistemin bozulmasına sebep olurlar (Telli-Karakoç ve ark., 2002; Li ve ark., 2006; Sprovieri ve ark., 2007). Petrol dökülmesi, fosil yakıtların (evsel ısınma, ulaşım, endüstri vb. sırasında) tamamen yanmadan atılması, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda çevreye bulaşan, suçul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen PAH'ların çevrede taşınımları ve birikimleri sonucu ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat son yıllarda tüm dünyanın çözüm aradığı sorunlarından biri haline gelmiştir (Karakaya, 2003; Yunker ve Macdonald, 2003; Martinez ve ark., 2004; Köseleler, 2008).

(PAH) Polisiklik aromatik hidrokarbonlar genellikle poliaromatik hidrokarbonlar olarak da bilinirler. Poliaromatik hidrokarbonlar iki veya daha fazla benzen halkasından oluşan lipofilik ve hidrofobik özelliğe sahip organik bileşiklerdir (Wcislo, 1998 ; Zhang ve ark., 2006; Wang ve ark., 2010; Alver ve ark., 2012; Saygılı, 2012; Kılıç, 2015).

PAH'lar lipofilik yapılarından dolayı yağdaki çözünürlükleri oldukça fazladır. Ancak hidrofobik yapıda olduklarından dolayı PAH'ların sudaki çözünürlükleri oldukça azdır. Bu özelliklerinden dolayı hava ve suya kıyasla toprakta, sedimentlerde ve yağlı maddelerde daha çok rastlanılmaktadır (Saygılı, 2012).

Geniş bir organik bileşik grubu olan poliaromatik hidrokarbonlar yapılarında dörtten az benzen halkası bulunduruyorsa hafif PAH, yapısında dört veya dörtten daha fazla benzen halkası bulunduruyorsa ağır PAH olarak sınıflandırılırlar (Danyi ve ark., 2009; Alver ve ark., 2012; Kılıç, 2015).

Ağır PAH `ların sudaki çözünlükleri ve buhar basınçları hafif PAH `lara göre daha azdır. Poliaromatik hidrokarbonların yapısındaki benzen halka sayısı arttıkça çözünlükleri ve buhar basıncı azalırken toksik ve karsonejenik özellikleri artmaktadır (Wenzl ve ark., 2006 ; Ferrarese ve ark., 2008; Alver ve ark., 2012; Kılıç, 2015).

Daha karmaşık yapıdaki bileşikler benzo-, dibenzo-, veya nafto- eklerini alarak adlandırılırken daha basit yapıdaki PAH` lar ise ek almadan anthracene, phenanthrene, pyrene, perylene gibi temel yapılarına göre adlandırılırlar (Bolanos ve ark., 2010; Kalkan, 2012).

Çevre kirliliği bakımından önemli bir sınıfı oluşturan poliaromatik hidrokarbonlar kanserojen olma, mutasyona yol açma ve hücreler için zehirleyici etkilere sahip olma gibi çeşitli özelliklere de sahiptirler (Kabadayı, 2003; Kalkan, 2012).

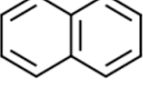
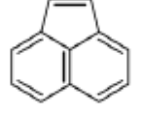
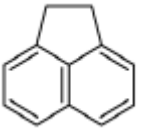
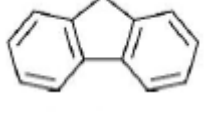
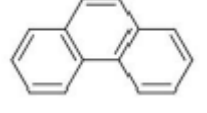
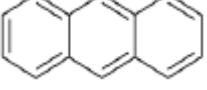
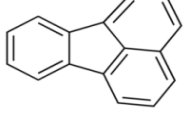
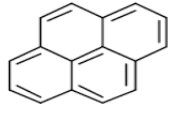
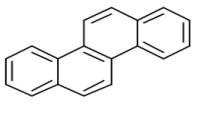
1775`de Londra`da St. Bartholomew`s Hospital`da cerrah olarak çalışan Percivall Pott PAH`ların kanser ile ilişkisinin olup olmadığını baca temizleme işçilerinin derilerindeki isten dolayı testis kanserine yakalandıklarını gözlemlemesi sonucu ortaya çıkarmıştır. Bu gözlem kanserin çevresel faktörlerle oluştuğunun ilk kanıtıdır. Yaklaşık 100 yıl sonra Almanya ve İskoçya`da parafin endüstrisinde çalışan insanlarda testis derisi kanseri Volkmann ve Bell tarafından tespit ederek Pott`un yaptığı gözlem doğrulanmıştır (Luch ve Baird, 2005). İnsanlar ve laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda benzo(a)pyrene içeren zengin PAH kaynağı olarak; özellikle yağ, katran, is ve duman gibi kimyasallar bulunmuştur (Douben, 2003; Alver ve ark., 2012).

Üç aromatik halkaya sahip phenanthrene ve anthracene Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry) `ne göre en basit yapıları PAH`lar olarak tanımlanmıştır. Poliaromatik hidrokarbon sınıfına benzen gibi daha küçük moleküller girmemektedir. EPA tarafından hem çevresel kirlilik hemde insan sağlığı açısından büyük önem taşıyan 16 adet PAH belirlenmiştir (Saygılı, 2012).

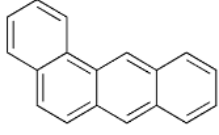
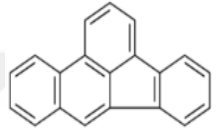
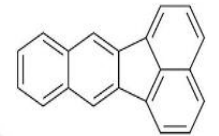
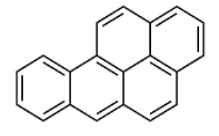
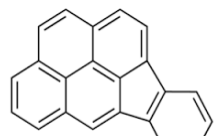
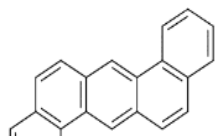
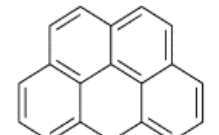
Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından temel kirleticiler olarak belirlenen 16 poliaromatik hidrokarbon; Naphthalene, Acenaphthene, Acenaphthylene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Chrysene, Benzo(a)anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Indeno(1,2,3-c,d)pyrene, Benzo(g,h,i)perylene ve Dibenzo(a,h)anthracene`dir. Başlıca temel kirletici olan PAH`ların bulunduğu atıklar canlı ekosistemine zarar vermektedir (Garcia, 1999). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve EPA`nın önceliklendirdiği 16 PAH türünün molekül şekilleri, yapısal formları, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.1. ve Tablo1.2.`de verilmiştir (Karakaş ve Pekey, 2005; Kılıç, 2015).



Tablo 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı (Kılıç, 2015)

PAH	Molekül Formülü	Halka Sayısı	Yapısı
Naphthalene (NaP)	$C_{10}H_8$	2	
Acenaphthalene (Ace)	$C_{12}H_8$	3	
Acenaphthene (Act)	$C_{12}H_{10}$	3	
Fluorene (Fln)	$C_{13}H_{10}$	3	
Phenanthrene (Phe)	$C_{14}H_{10}$	3	
Anthracene (Ant)	$C_{14}H_{10}$	3	
Fluoranthene (FI)	$C_{14}H_{10}$	4	
Pyrene (Pyr)	$C_{16}H_{10}$	4	
Chrysene (Chr)	$C_{18}H_{12}$	5	

Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) Tarafından Öncelikli Kirleticiler Listesine Alınan 16 Poliaromatik Hidrokarbon Bileşenlerinin Yapısı (Kılıç, 2015) (Devamı)

PAH	Molekül Formülü	Halka Sayısı	Yapısı
Benzo(a)anthracene (BaA)	$C_{16}H_{10}$	4	
Benzo(b)fluoranthene (BbF)	$C_{18}H_{12}$	5	
Benzo(k)fluoranthene (BkF)	$C_{20}H_{12}$	5	
Benzo(a)pyrene (BaP)	$C_{20}H_{12}$	5	
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (InP)	$C_{22}H_{12}$	6	
Dibenzo(a,h)anthracene (DahA)	$C_{22}H_{14}$	5	
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	$C_{22}H_{12}$	6	

1.2.2. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

PAH'lar yanmanın tam olarak gerçekleşmemesi sonucunda genellikle tek bir bileşik olarak değil yanma ürününün kompleks bir karışımı olarak ortaya çıkarken araştırma amaçlı saf bir bileşik olarak da üretilebilirler. Saf bileşik halinde PAH'lar renksiz, beyaz, açık sarı-yeşil renkli, katı halde ve hafif hoş bir kokuya sahiptirler. Bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere üretilenler dışında PAH'ların çoğunluğunun bir kullanım alanı bulunmamaktadır. Sağlık alanında, pestisit, boya veya plastik yapımında bazı PAH'lar kullanılmaktadır (ATSDR, 1995; Douben, 2003). Poliaromatik hidrokarbonlar kükürt dioksitler ve sülfürik asitle reaksiyona girerek sülfürik ve sülfonik asit formlarını, azot oksit ve nitrik asit ile tepkimeye girerek de nitro türevlerini oluştururlar (WHO, 1998; Marce ve Borrull, 2000). Ozon ve hidroksil radikalleriyle tepkimeye girmeye eğilimlidirler (Douben, 2003; Alver ve ark., 2012).

PAH'ların sudaki çözünürlükleri, CAS kodları, bileşik formülleri, molekül ağırlıkları, renkleri, erime noktaları, buharlaşma noktaları, yoğunlukları, Henry sabiti, buhar basınçları, LogKow ve LogKoc³ değerleri Tablo 1. 3.'de belirtilmiştir. Tabloda bulunan CAS numarası, bilinen tüm kimyasal bileşikleri tanımlamak için Amerikan Kimya Derneği'nin (American Chemical Society) bir alt bölümü olan "Chemical Abstracts Service" (CAS), tarafından verilmiştir. Bileşiğin sudan lipide geçiş potansiyelini LogKow gösterir. Bileşiğin toprakta bulunan organik karbon üzerine adsorblanma potansiyelini LogKoc³ gösterir. Denge durumunda bir bileşiğin sudaki ve havadaki derişimlerini açıklayan ve bu kimyasalın uçuculuk potansiyeliyle ilgili bilgi veren bir değere Henry Sabiti denir (Alver ve ark., 2012).

Tablo 1.3. Poliaromatik Hidrokarbonların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Esen, 2006)

Bileşik	C.AS-Kod	Formül	Molekül Ağırlığı	Renk	Erime Noktası °C	Buharlaşma Noktası °C	Buhar Basıncı Pa 25°C	Yoğunluk (g/cm ³)	Çözünürlük 25 °C suda µg/litre	Henry Sabiti 25 °C (kPa)	Log K _{ow}	Log K _{oc}
Acenaphthylene (ACE)	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152,2	-	92-93	265-275	2,9x10 ⁻² mm-Hg (20 °C)	-	3,93 x 10 ³	1,45 x 10 ⁻³ (atm-m ³ /mol) ²	4,07	1,40
Acenaphthene (ACT)	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154,2	Beyaz	95	279	2,9 x 10 ⁻¹	1,024	3,93 x 10 ³	1,48 x 10 ⁻²	3,92	3,66
Fluorene (FLN)	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166,2	Beyaz	115-116	295	8 x 10 ⁻²	1,203	1,98 x 10 ³	1,01 x 10 ⁻²	4,18	3,86
Anthracene (ANT)	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178,2	Renksiz	216,4	342	8 x 10 ⁻⁴	1,283	73	7,3 x 10 ⁻²	4,5	4,15
Phenanthrene (PHE)	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	178,2	Renksiz	100,5	340	1,6 x 10 ⁻²	0,98	1,29 x 10 ³	3,98 x 10 ⁻³	4,6	4,15
Fluoranthene (FL)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202,3	Mat sarı	108,8	375	1,2 x 10 ⁻³	1,252	260	6,5 x 10 ⁻⁴ (20 °C)	5,22	4,58
Pyrene (PY)	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202,3	Renksiz	150,4	393	6 x 10 ⁻⁴	1,271	135	1,1 x 10 ⁻³	5,18	4,58
Chrysene (CHR)	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228,3	Renksiz	253,8	448	8,4 x 10 ⁻³ (20 °C) ²	1,274	2,0	1,05x10 ⁻⁶ (atm-m ³ /mol) ²	5,91	5,30
Benz[<i>a</i>]anthracene (BaA)	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228,3	Renksiz	160,7	400	2,8 x 10 ⁻³	1,226	14	1x10 ⁻⁶ (atm-m ³ /mol) ²	5,61	5,30
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene (BbF)	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Renksiz	168,3	481	6,7 x 10 ⁻³ (20 °C) ²	-	1,2 (20 °C)	5,1 x 10 ⁻⁵	6,12	5,74
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene (BkF)	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Mat sarı	215,7	480	1,3 x 10 ⁻⁴ (20 °C) ²	-	0,76	4,4 x 10 ⁻⁵ (20 °C)	6,84	5,74
Benzo[<i>a</i>]pyrene (BaP)	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252,3	Sarımtırak	178,1	496	7,3 x 10 ⁻⁷	1,351	3,8	3,4 x 10 ⁻⁵	6,50	6,74
Benzo[<i>ghi</i>]perylene (BghiP)	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	276,3	Mat sarı-yeşil	278,3	545	1,4 x 10 ⁻⁸	1,329	0,26	2,7 x 10 ⁻⁵ (20 °C)	7,1	6,20
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene (DahA)	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278,4	Renksiz	262	-	1x10 ⁻¹⁰ mm-Hg (20 °C)	1,282	0,5	7,3 x 10 ⁻⁸ (atm-m ³ /mol) ²	6,84	6,52
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene (I123-cdP)	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276,3	Sarı	163,6	536	1,3 x 10 ⁻⁸	-	62	2,9 x 10 ⁻⁵	6,58	6,20

1.2.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kaynakları

Kaynaklarına göre PAH'lar iki gruba ayrılır. Doğal kaynaklar; volkanik patlamalar, orman ve çayırların yanması gibi doğa olayları sonucu oluşurken; antropojenik kaynaklarda endüstride organik maddenin tam olarak yanma sürecini tamamlamaması, atıkların yakılması, asfalt üretimi, alüminyum üretimi, ısı ve enerji için kullanılan kömür, petrol ve doğal gaz gibi yakıtların yanması, sigara ve arabaların egzoz gazlarından PAH'ların doğaya bulaşmasını kapsamaktadır (WHO, 2000). Hava, su, toprak ve sedimentlerde geniş alanlarda yayılmalarından dolayı canlılar için toksik etki gösteren bazı poliaromatik hidrokarbonlar EPA tarafından öncelikli kirleticiler listesine eklenmiştir. İnsan ve çevre sağlığı açısından PAH'ların çevredeki analizleri ve izlenmesi gereklidir (Li ve ark., 2010; Kalkan, 2012).

PAH kaynakları sabit ve hareketli kaynaklar şeklinde de gruplandırılabilir. Motorlu taşıtların egzozlarından çıkan gazlar hareketli kaynaklara örnek verilirken; ısınma, çöplerin yanması, kok ve alüminyum üretimi, demir ve çelik üretimi, petrol prosesi, asfalt üretimi ve kullanımı ise sabit kaynaklar olarak bilinmektedir (Kordybach, 1999; Kalkan, 2012).

Farklı sektörlerde ve endüstriyel alanlarda değişik PAH emisyonları ortaya çıkmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip PAH'ların, kok fırınları, elektrik arklı kalorifer ocakları ve ağır yakıtların yakıldığı tesislerde yüksek derişimlerde olduğu tespit edilmiştir. Asenaftilen, asenaften ve antrasen çimento fabrikası için indikatör PAH'lar olarak belirtilmiştir. Endüstriyel atıkların yanması sonucu oluşan PAH'lar indeno(1,2,3-c,d)pyrene ve chrysene olarak belirtilmiştir. Genellikle daha düşük molekül ağırlıklı olan fluorene ve fluoranthene gibi moleküller hareketli kaynaklardan çıkan indikatör PAH'lardır (Yang ve ark., 1998; Kalkan, 2012).

Poliaromatik hidrokarbonların sucul ve karasal ortamlara taşınmaları genellikle atmosfer sayesinde gerçekleşir. Gaz ve aerosol fazda olabilen poliaromatik hidrokarbonlar uzak mesafelere taşınabilmeleri ve bozunmaya karşı dirençli olmaları nedeniyle kentsel ve endüstriyel alanlarda geniş kaynaklara sahip olmalarına rağmen daha çok kırsal ve uzak alanlarda daha yüksek derişimlerde bulunurlar. PAH'lar

kentsel ve endüstriyel alanlarda atmosfer sayesinde kıyı alanlarına ve karasal yüzey sularına kadar taşınmaktadır (Manoli ve Samara, 1999; Kalkan, 2012).

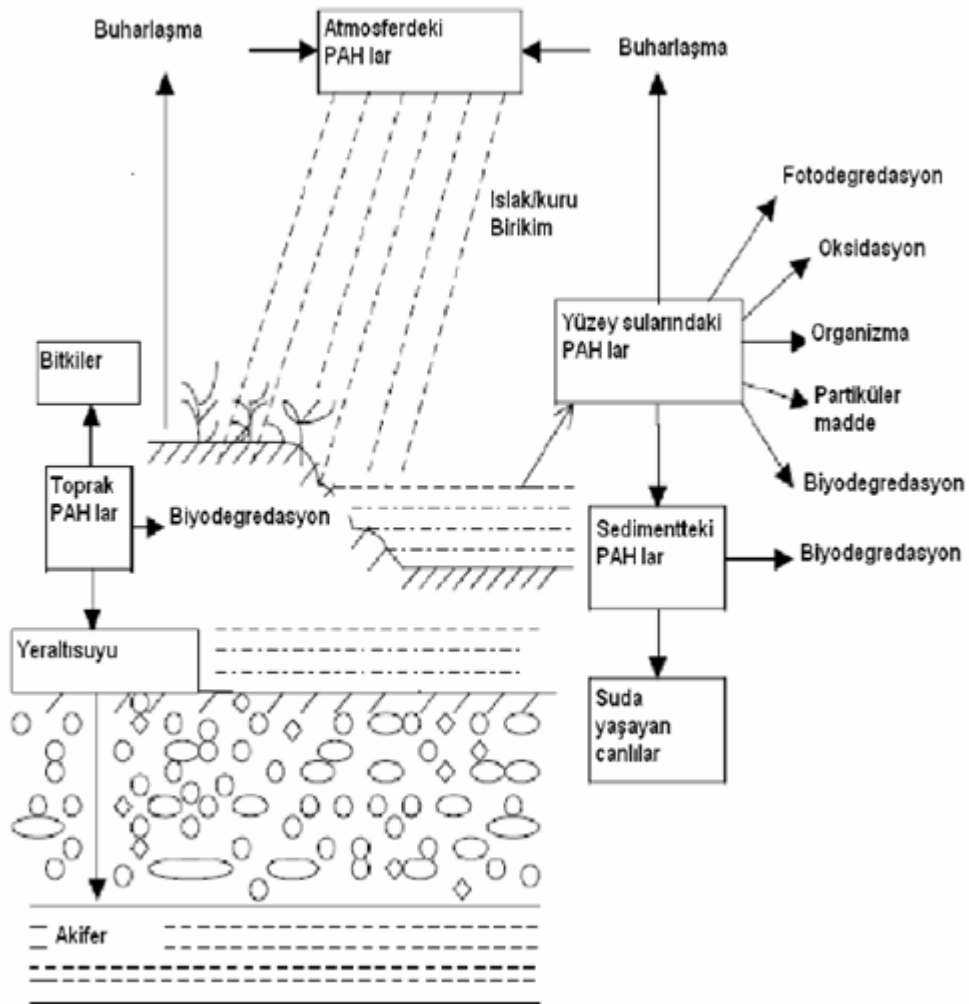
1.2.4. PAH'ların Çevre Üzerine Etkileri

Poliaromatik hidrokarbonlar çevreye hava ve su yoluyla dağılım gösterirler. Volkanik patlamalar, otomobil egzozları, orman yangınları ve odun gibi organik maddelerin yanması sonucu çevreye hava yoluyla bulaşır. Bir yandanda atıksu arıtma tesislerinden ve endüstriyel atıksulardan yüzey sularına ulaşmaktadırlar. Toprağın PAH'larla kontaminasyonunun nedenlerinden biride tehlikeli atıkların bulunduğu konteynırların dikkatsizce çevreye bırakılmasıdır (ATSDR,1995).

Genelde atmosferde yoğun olarak bulunan naphthalene, acenaphthene, acenaphthalene, anthracene, fluorene ve phenanthrene gibi iki veya üç halkaya sahip olan PAH bileşikleri gaz halindeyken benzo(a)pyrene ve benzo(g,h,i)perylene gibi beş ve daha fazla halkaya sahip PAH bileşikleri ise partikül fazında bulunmaktadır. Ancak fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene gibi dört halkalı PAH bileşikleri ise her iki fazda da gözlenebilir (Arı, 2008; Kalkan, 2012).

PAH'ların özelliklerine baktığımızda genellikle sudaki çözünürlükleri düşüktür. Küçük partiküller ya da gaz halinde bulduklarından dolayı uzak mesafelere taşınmaları kolaydır. Bu sayede atmosferden kuru ve yağ çökme olaylarıyla toprağa, su kütlelerine ve bitkilerin üzerlerine düşerler. Atmosfere salındıktan sonra PAH bileşikleri atmosferdeki partiküler halde bulunan maddelerle birleşirler. Hava şartları, partikül çapı ve atmosferde bulunan maddelerle etkileşimleri poliaromatik hidrokarbonların farklı yerlere taşınma süresini etkiler. Poliaromatik hidrokarbonların atmosferdeki küçük partiküllere tutunması sonucunda atmosferde bulunan ozon ve diğer oksidanlar tarafından fotodegradasyonunun süresi daha büyük bir partiküle tutunan PAH bileşiğine göre daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Mesela PAH bileşiğinin tutunduğu partikülün çapı 1 µm'nin altında olduğu zaman fotodegradasyonunun süresi birkaç gün ile altı hafta arasında değişirken daha büyük bir partikül olduğunda bu süre birkaç güne düşmektedir (Köseler, 2008; Kalkan, 2012).

Yüzey sularında bulunan poliaromatik hidrokarbonlardan bazıları atmosfere buharlaşırken bunların çoğu katı parçacıklara tutunarak nehir veya göllerin dibine çökmektedirler. Toprakta bulunan PAH'ların büyük çoğunluğu partiküllere tutunmuş haldedir. Toprakta bulunan PAH'lardan bazıları atmosfere buharlaşırken bazılarında yeraltı sularına karıştıktan sonra akifere kadar giderler. Sucul ve karasal ekosistemde yaşayan hayvanların ve bitkilerin üzerinde bulunan PAH derişimlerinin toprakta ve sudaki derişimlerinden çok daha fazla olduğu bilinmektedir. Güneş ışığı ve atmosferdeki kimyasallar ile poliaromatik hidrokarbonların yapısı bozunuma uğrayabilir (ATSDR, 1995; Kalkan, 2012).



Şekil 1.1. PAH'ların çevredeki dağılımları (Kalkan, 2012)

Doğada bulunan PAH'lar hava, su ve toprak kirliliği sonucunda gıdalarda da gözlenmektedir. PAH'ların bazıları yüzey sularından havaya buharlaşırken çoğunlukla göl ve nehir diplerine ulaşan PAH'lar katı taneciklere tutunmuş haldedir. PAH'lar yağmur tanecikleriyle temas etmeden önce atmosferde uzak diyarlara gidebilmektedirler. Ancak yağmur taneciklerine temas eden PAH'lar toprağa ulaşır oradanda yeraltı sularına karışmaktadır (Kabadayı, 2003; Kalkan, 2012).

Lehndorff ve Schwark (2002) Almanya'nın Cologne Bölgesi'nde yerleşim bölgesi, havaalanı, park ve şehir kenarı gibi birbirinden farklı özelliklere sahip 43 farklı yerden örnekler topladıkları çalışmada çam yapraklarını pasif örnekleyici olarak kullanıp bu çam yapraklarını analiz etmişlerdir. Çam yaprakları üzerinde bulunan PAH derişimleri 51-410 ng/g arasında değiştii gözlenirken, phenanthrene, fluoranthene ve pyrene'in baskın PAH bileşikleri olduğu bulunmuştur. Şehir merkezlerinde bulunan bitkiler sayesinde poliaromatik hidrokarbonların belirlenmesi daha ekonomik ve pratik yöntem olarak kullanılmıştır (Lehndorff and Schwark, 2004; Kalkan, 2012).

Hayvanlar üzerinde yapılan daha önceki çalışmalarda poliaromatik hidrokarbonların karsinogenik ve mutajenik özelliklerinin yanısıra çeşitli zehirleyici etkilere sahip olduğu gözlenmiştir (Castellano ve ark., 2003; Kalkan, 2012).

Atmosferden sucul ekosisteme geçen PAH'ların deniz ekosisteminde yaşayan balıklar ve kabukluların bünyesinde birikmesiyle besin zinciri aracılıyla insanlara kadar ulaştığı gözlenmiştir (Golomb, 1997; Kalkan, 2012).

1.3. Sürfektanlar

Kelime olarak sürfektan "yüzeyi saran" anlamına gelmektedir. Hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahip olan ve yüzey gerilimini düşüren sürfektanlar farklı fazlar arasındaki yüzeylerde ya da yüzeyler arasında etkili olurlar. Suyu sevmeyen gruplarının varlığı nedeniyle her iki fazın yüzey özelliklerini değiştirirerek buldukları ortamın yüzey gerilimini ya da yüzeyler arası gerilimi düşürürler (Desai ve Banat, 1997; Nitschke, 2004; Yılmaz, 2008).

Sürfektanlar doğal olarak ya da yapay olarak üretilmekle birlikte doğal olarak üretilen biyosürfektanlar mikroorganizmalar sayesinde elde edilmektedir. Mikroorganizmaların suda çözünmeyen substratlarda gelişmeleri göz önünde bulundurulduğunda genellikle aerob şartlarda sürfektan üretebildikleri tespit edilmiştir (Uysal ve Türkman, 2004). Bitkisel ya da hayvansal yağların, petrol türevlerinin, yağ asitlerinin ve alkollerin birçok kimyasal süreçten geçmesi sonucu üretilen sürfektanlara sentetik sürfektan denilmektedir. Mikrobiyal sürfektanlar güngeçtikçe önem kazanmakta ve sentetik sürfektanların yerini almaktadırlar (Singh ve ark., 2006; Yılmaz, 2008).

1.3.1. Biyosürfektanlar

Torulopsis magnoliae tarafından hücre dışına sentezlenen glikolipitler olarak bilinen biyosürfektanlar ilk defa 1961`de Gorin ve arkadaşlarının tarafından bulunmuştur (Gorin, ve ark., 1961; Çelikdemir, 2012). Yapılan çalışmada mikroorganizmanın yanlış tanımlandığı fark edilerek mikroorganizmanın *Torulopsis apicola* olduğu bildirilmiştir (Tulloch ve Spencer, 1968; Çelikdemir, 2012).

Emülsifikasyon yeteneğine sahip olan, güçlü ve etkin yüzey aktivitesi sergileyen ve sentezleri mikroorganizmalar tarafından gerçekleşen bileşenlere biyosürfektanlar denir (Banat ve ark., 2000; Çelikdemir, 2012).

Biyosürfektanlar yağları, karbonhidratları ve hidrokarbonları karbon kaynağı olarak kullanan ve oksijenli solunum yapan mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir (Uysal ve Türkman, 2004; Yılmaz, 2008).

Yapay sürfektanlara oranla biyosürfektanların sahip oldukları avantajlar aşağıda belirtilmiştir.

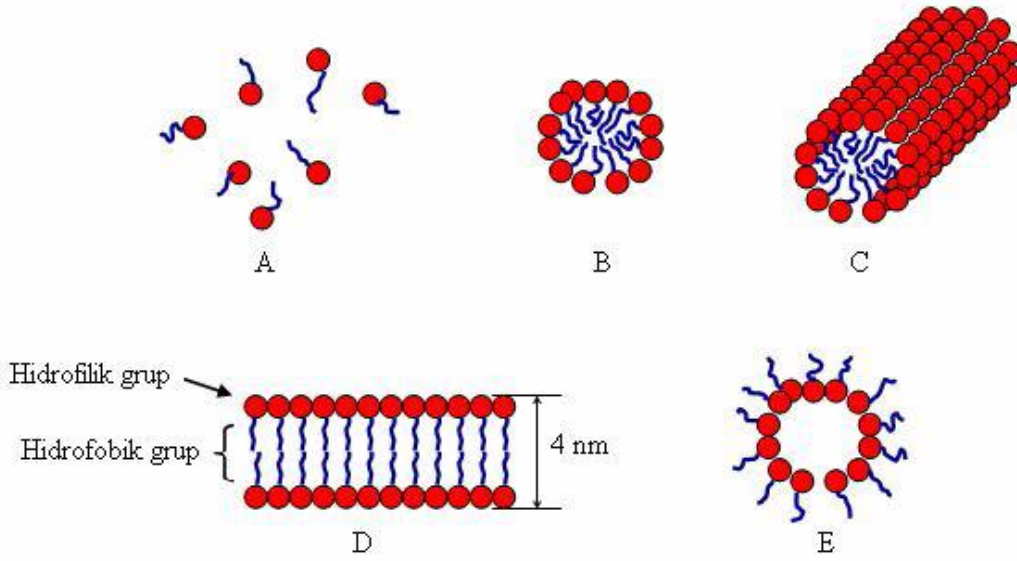
- ✚ Biyolojik yolla parçalanabilirler.
- ✚ Genel olarak düşük zehirleyici etkiye sahiptirler.
- ✚ Canlı dokulara zarar vermediklerinden dolayı kozmetik, gıda ve ilaçlarda katkı maddesi olarak kullanılabilirler.

- ✚ Biyosürefektan üretimi için mikroorganizmalara substrat olarak direk ham madde verilebilir. Bu ham maddeler; karbonhidratlar, yağlar, hidrokarbonlar veya bunların bileşimleri olabilir. Bu özelliklerinden dolayı üretim daha ekonomik olur.
- ✚ Çevresel kirliliğinin gideriminde; atıkların detoksifikasyonunda, petrol ve petrol türevi ile kirlenmiş toprakların biyoremediasyonunda ve yağ atıklarının kontrolünde etkili bir şekilde kullanılabilirler.
- ✚ Biyosürefektanlar kendilerine ait özelliklerinden dolayı spesifik etkiye sahiptirler. Biyosürefektanlar yapılarında kompleks organik moleküllerden oluşan özel işlevsel gruplar bulundurlar.
- ✚ Kullanım alanlarının çeşitli olmasının sebebi; aşırı sıcaklık, pH ve tuzluluk koşullarına toleranslarından kaynaklanmaktadır (Kosaric, 2001; Kaya, 2008).

Aynı zamanda biyosürefektanlar metallerle bağ kurma eğiliminde olduklarından dolayı ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve suların arıtılmasında da kullanılmaktadır. Biyoremediasyonla ağır metal giderimi endüstriyel uygulanabilirlik açısından da son günlerde ilgi görmektedir (Rodrigues ve ark., 2006; Yılmaz, 2008).

1.3.2. Biyosürefektanların Yapısı ve Fonksiyonları

Amfipatik karaktere ve yüzey aktif özelliklere sahip olan biyosürefektanlar çok farklı yapısal özellik gösterdiklerinden dolayı çok sayıda endüstriyel alanda ve çeşitli işlemlerde kullanılırlar. Peptitler, katyonlar, anyonlar, aminoasitler ve polisakkarit grupları biyosürefektanın hidrofilik grubunu oluştururken; yağ asitleri, doymuş ve doymamış yağlarda biyosürefektanın hidrofobik kısmını oluşturmaktadır. Lipopeptitler, glikolipidler, fosfolipidler, lipoproteinler, polimerik ve partiküllü olarak isimlendirilen biyosürefektanlar hidrofilik ve hidrofobik gruplarının içerdiği yapılara göre sınıflandırılmaktadır. Biyosürefektan birimleri konsantrasyona bağlı olarak sıvı çözeltilerde farklı şekillerde bulunabilmektedir (Şekil 1.2.). Yine düşük konsantrasyonlarda tekli ya da lineer formda bulunurken yüksek konsantrasyonlarda ise misel ve silindirik formda bulunmaktadırlar (Lang ve Wagner, 1987; Desai ve Desai, 1993; Yalçın, 2008).



Şekil 1.2. a. Tekli yapıdaki biosürfektan, b. Misel yapıdaki biosürfektan, c. Silindirik yapıdaki biosürfektan, d. Çift tabakalı biosürfektan, e. Emülsiyon haldeki biosürfektan (Yalçın, 2008)

Mikroorganizmaların substrata erişiminin kolaylaşması ve mikrobiyal büyümenin hızlanmasının nedeni; biosürfektanların yüzey gerilimini azaltma, düşük kritik misel konsantrasyonu, emülsiyonları stabil etme ve köpürmeyi düzenleme gibi özelliklere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Cerniglia, 1981; Poeton ve ark., 1999; Yalçın, 2008). Biosürfektanların yüzey gerilimini düşürme özelliğinden dolayı petrol gibi suda çözünmeyen hidrofobik yapıdaki substratların çözünürlüğü artmakta ve ayrıca biyodegradasyonun gerçekleşmesini kolaylaştırmaktadır (Neu ve Marshall, 1990; Banat ve ark., 2000; Demirdögen, 2012).

Doğadaki hidrokarbon kirliliğinin temizlenmesinde kullanılan kimyasal sürfektanların ortaya çıkardığı yan ürünler çevreyi kirletebilmektedir. Buna karşılık biosürfektan hem doğada biyolojik olarak parçalanabilirken hemde çevreyi kirleten maddeleride parçalar. Bu özelliklerinden dolayı biosürfektan üreten mikroorganizmalar poliaromatik hidrokarbonlarla kirletilmiş alanların biyodegradasyonunun hızlandırılmasında önemli bir yere sahiptir (Rosenberg, 1999). Aynı zamanda biosürfektanlar petrol-yağ gideriminde de kullanılabilirler (Shulga ve ark., 1999). Biosürfektanların seramik, herbisid ve pestisid formulasyonu, deterjan, sağlık hizmetleri, kozmetik, selüloz - kağıt, kömür, tekstil,

gıda sanayisi ve maden işletmeciliği gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Banat ve ark., 2000; Ron ve Rosenberg, 2001). Biyosümfektan üreten birçok bakteri ve maya türleri karbon kaynağı olarak hidrokarbonları kullandıklarında yüzey gerilimini değiştirebilme özelliğine sahip glikolipid, fosfolipid ve lipopeptid gibi çeşitli biyosümfektanları üretebilirler (Banat, 1995). Sentezlenen biyosümfektanlar hidrokarbonları emülsiyeye etmek ve parçalanan hidrokarbonların hücre içine taşınmasını kolaylaştırmaktadır (Desai ve Banat, 1997; Yılmaz, 2008).

1.3.3. Biyosümfektanların Sınıflandırılması

Yüzey aktif bileşenleri olarak bilinen biyosümfektanlar yapılarında hidrofilik ve hidrofobik gruplar içerirler. Biyosümfektanlar sentetik sümfektanlardan farklı olarak sentezlendikleri mikroorganizmaya göre ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar (Desai ve Desai, 1993; Desai ve Banat, 1997; Yalçın, 2008).

Yüzey aktif maddelerden olan biyosümfektanlar mikrobiyal orjinlerine göre fungal, maya ve bakteriyel sümfektanlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Bakteriler tarafından sentezlenen *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerinden elde edilen trehaloz lipidler, ramnolipidler, hidrofobik proteinler ve aminoasit içeren lipidler gibi yüzey aktif maddelere bakteriyel biyosümfektanlar denilmektedir. *Torulopsis*, *Endomycopsis* ve *Candida* gibi maya cinslerinden elde edilen soforoz lipidler ve mannosileritritol lipidler gibi maddelere de maya biyosümfektanları denilmektedir. Bir yandan da *Shizonella*'nın ürettiği mannosileritritol lipidler ve *Ustilago* genuslarından elde edilen ustilajik asit gibi maddelerede fungal biyosümfektanlar denilmektedir (Desai ve Desai, 1993).

Biyosümfektanlar lipidler, lipopeptit/lipoproteinler, glikolipidler, partiküller ve polimerler olmak üzere kimyasal kompozisyonlarına göre beş gruba ayrılırlar (Desai ve Desai, 1993; Desai ve Banat, 1997; Yalçın, 2008).

Biyosümfektan üreten mikroorganizmalar ve ürettikleri biyosümfektanların çeşitleri Tablo 1.4.' de verilmiştir (Kaya, 2008).

Tablo 1.4. Mikrobiyal Sürfektanların Önemli Tipleri ve Mikrobiyal Kaynakları
(Kaya, 2008)

Biyosürfektan	Mikroorganizma
1) Glikolipidler	
Glikoz Lipidler	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Alcanigenes</i> sp.
Ramnolipidler	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Trehalozlipidler	<i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp.
Soforozlipidleri	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> , <i>T. petrophilum</i>
Hücresel lipidler	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>
2) Lipopeptidler ve lipoproteinler	
Ornitin lipidler	<i>Myroides</i> sp. SM1
Peptid-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Viskosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfektin & Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramisidinler	<i>Bacillus brevis</i>
Polimiksinler	<i>Bacillus polymyxa</i>
3) Yağ asitleri, nötral lipidler ve fosfolipidler	
Yağ asitleri	<i>Corinebacterium lepus</i>
Nötral lipidler	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipidler	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
4) Polimerik sürfektanlar	
Emülsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Mannan-lipid-protein	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Karbohidrat – protein – lipid	<i>Pseudomonas nautica</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Yarrowina lipolytica</i> , <i>Debaryomyces</i> <i>polymorphus</i>
Protein PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5) Partiküler biyosürfektanlar	
Vesiküller ve fimbria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Bütün hücre	Çeşitli bakteriler

1.3.4. Biosümfektan Üreten Mikroorganizmaları İzleme Yöntemleri

Etkin biosümfektan üretebilen mikroorganizmaları tespit edebilmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerde biosümfektanın yapısı ve fonksiyonu temel alınırken bir yandan da hücre dışına salınan biosümfektanların hücre dışındaki özgül davranışları da göz önünde bulundurulmuştur. Örneğin Drop Collapse yöntemi mineral yağ üzerine süpernatant damlacığının bırakılması sonucunda damlacığın davranışına göre sonuçlanan kantitatif bir yöntemdir. Du Nouy Ring yöntemi ise yüzey geriliminin değişimi göz önüne alan bir yöntemdir (Bento ve ark., 2005; Tuğrul ve Cansunar, 2005; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.1. Hemolitik Aktivite

Genellikle hemolitik aktivite testleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan birincisi kanlı agar besiyerine ekilen bakterilerin inübasyon sonrasında besiyerinde oluşturdukları zonlar sonucu gözlenmektedir. Kanlı agar besiyerinde bakteri üremesi sonucu alyuvarların parçalanması ile oluşan şeffaf zonlar bakterilerin β - hemolitik aktiviteye sahip olduğunu gösterirken hemoglobin moleküllerinin parçalanması sonucu oluşan yeşil zonlarda α -hemolitik aktivite olduğunu göstermektedir (Siegmond ve Wagner, 1991; Çelikdemir, 2012).

İkinci yöntem ise eritrosit süspansiyonunun 540 nm'de absorbansı okunması süreti ile gerçekleşen kantitatif bir yöntemdir (Johnson ve Boese-Marrazzo, 1980).

Biosümfektan üretimini tespitinde kullanılan hemolitik aktivite testinde ki pozitif sonucun hücrelerin sahip olduğu enzimlerden de kaynaklanabileceği düşünüldüğü için ikinci bir teste ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı hemolitik aktivite yönteminin biosümfektan üretimini tespitinde spesifik olmadığı anlaşılmaktadır (Heyd ve ark., 2008; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.2. Setiltrimetilamonyum Bromid (CTAB) Agar Testi

Bu test metilen mavisi ile katyonik bir sümfektan olan setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) içeren agarlı besiyerinde gerçekleştirilmektedir. CTAB agar testi ramnolipidler gibi anyonik sümfektan varlığını saptamada kullanılır. Ortamda bulunan katyonik biosümfektan olan CTAB anyonik bir biosümfektanla reaksiyona

girdiğinde metilen mavisinin rengini açarak şeffaf zon oluşmasına neden olur. Bu sayede bakterinin anyonik bir sürfektan ürettiği kantitatif olarak belirlenir. Bu testde 0,2 g/L CTAB ve 0,005 g/L oranında metilen mavisi içeren besiyeri sayesinde gerek ramnolipidler gerekse yeni anyonik biyosürfektanları hızlı bir şekilde tespit edilir. İdeal bir yöntem olmasına rağmen sınırlı sayıda bir gruba hizmet ettiğinden dolayı biyosürfektanların hepsinin tespitinde kullanılamaz (Siegmond ve Wagner 1991; Perfumo ve ark., 2006; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.3. Antron Yöntemi

Bu yöntem spektrofotometre ölçümüne dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Ramnoz ile ısıtılan güçlü bir asit olan antron (9,10-dihidro-9-oksoantrasen)'un reaksiyona girmesi sonucu renk oluşumunun 625 nm`de spektrofotometre cihazında okunması sonucunda belirlenmektedir. Bu yöntem standart olarak kullanılan ramnolipidlerin ya da ramnozun farklı konsantasyonları ile standart eğri oluşturmasını esas alır (Helbert ve Brown, 1957; Hodge ve Hofreiter, 1962). Hem ucuz olan bu yöntem 20 mg/L miktarının altındaki düşük ramnolipid derişiminde dahi etkilidir (Noordman, 2000; Çelikdemir, 2012).

1.3.4.4. Drop-Collapse Yöntemi

Drop Collapse yöntemi hidrofobik bir sıvı üzerine biyosürfektan maddenin bırakılması sonucunda damlacığın yayılım yada stabil halde kalma davranışına göre sonuçlanan kantitatif bir yöntemdir. İnkübasyondan sonra sıvı kültürün santrifüjlenmesi sonucu elde edilen biyosürfektan içeren süpernatant mineral yağ üzerine damlatıldığında damlacık yayılma özelliği gösterirken sadece besiyeri damlatılan mineral yağda ise damlacık besiyerinin hidrofilik olmasından dolayı damlacık halinde kalmaktadır. Drop Collapse yönteminde negatif kontrol olarak steril besiyeri ve su kullanılırken pozitif kontrol olarak Tween 80 ve sodyum dodesil sülfat gibi yüzey aktif maddeler kullanılabilir. Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha geniş kapsamlı ve genel amaçlı olduğu için tercih edilmektedir (Jain ve ark., 1991; Çelikdemir, 2012).

1.4. Ağır Metaller

Fiziksel özellik bakımından 5 g/cm^3 ($\rho > 5 \text{ g/cm}^3$)'ten daha yüksek yoğunluğa sahip olan metallere ağır metal denilmektedir (Sevgi, 2007). Çinko, molibden, krom, demir, kurşun, kadmiyum, bakır, nikel, kobalt, vanadyum, alüminyum, arsenik, kalay ve mangan gibi 60'dan fazla metal içeren geçiş elementleri periyodik cetvelin en geniş grubunu oluşturmaktadır. Genellikle bu ağır metaller doğada kararlı bileşikleri olan silikat, oksit, karbonat ve sülfür halinde veya silikatlar içerisinde hapsedilmiş olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Metallerin yoğunluk değerlerine bakılarak ekolojik denge üzerinde oluşturdukları etkiler tahmin edilmeye çalışılsa bile, metallerin biyolojik etkileri ile yoğunlukları arasında bir ilişki bulunmadığı görülmektedir (Yücel, 2010; Çay, 2014).

Ağır metaller esansiyel ve nonesansiyel olmak üzere iki gruba ayrılır. Canlılar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için iz elementlere ihtiyaç duyarlar. Bu iz elementlerin içerisinde yer alan ağır metallere esansiyel ağır metaller denir. Canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri için gerekli olmayan ağır metallere nonesansiyel ağır metaller denilmektedir (Gohre ve Paszkowski, 2006; Sanchez-Chardi ve ark., 2009; Çay 2014). Nikel (Ni), mangan (Mn), demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi esansiyel metaller canlıların yaşamsal faaliyetleri için gerektiği gibi canlılarda yüksek konsantrasyonlar da bulunması sonucunda toksik etki göstermektedirler (Demirezen ve Aksoy, 2004). Ayrıca kurşun (Pb), krom (Cr), civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi esansiyel olmayan ağır metallerin canlılarda düşük miktarlarda bulunması bile toksik etki oluşturabilmektedir (Market, 1993; Altay, 2016).

1.4.1. Ağır Metallerin Kaynakları

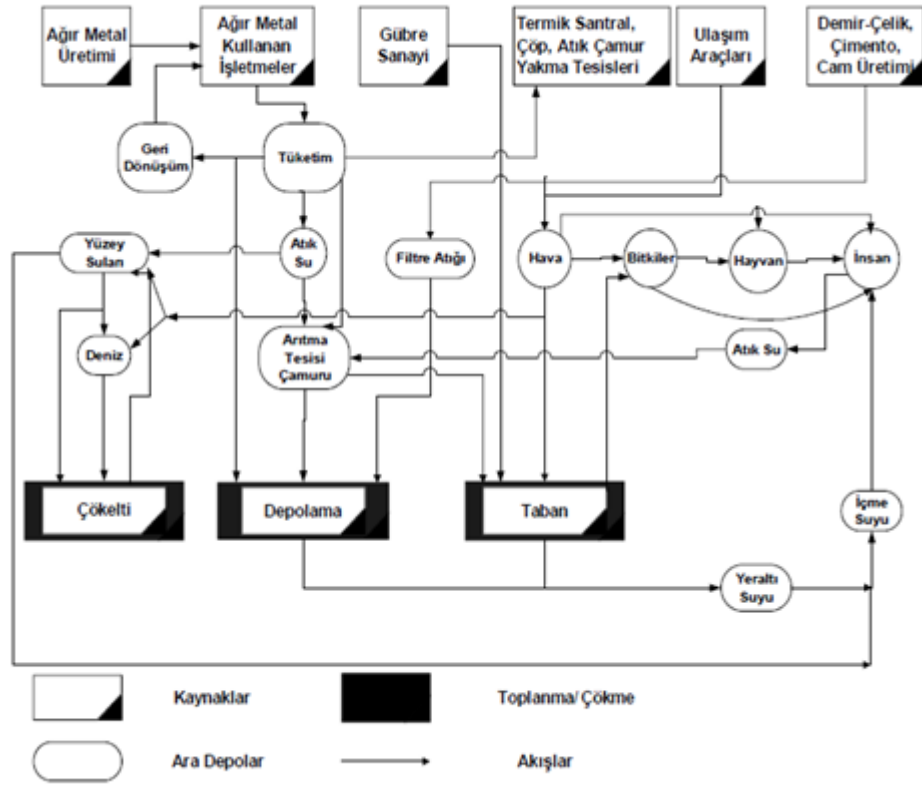
Toprakların ve kayaçların doğal bileşenlerinden biri olan ağır metaller toprakların bileşimlerine bağlı olarak farklı miktarlarda ve çeşitli yapılarıyla topraklarda bulunurlar. Doğadaki ağır metallerin doğal dağılım desenlerinin son zamanlarda insanlar tarafından değişmeye başladığı gözlenmeye başlamıştır (Baskaya ve Teksoy, 1997; Kocaer ve Baskaya, 2003; Özdemir, 2008).

Ağır metallerin doğaya bulaşma süreçleri doğal kaynak ve antropojen kaynak olmak üzere ikiye ayrılır. Volkanik patlamalar, erozyon, minerallerin hava ve rüzgar ile aşınması doğal kaynaklara örnek olarak verilebilirken evsel ısınma sistemleri, termik santraller, madencilik, gübreler, motorlu taşıtlar, pestisitler, demir-çelik, şeker, çimento, petrokimya ve metal endüstrileri ise insan kaynaklı yollar olarak belirtilmektedir (Chehregani ve Malayeri, 2007; Sabiha-Javied ve ark., 2009). Ağır metallerin doğaya salınımlarının temel nedeni genellikle insan kaynaklı endüstriyel atıklardan kaynaklanmaktadır. Temel endüstrilerden çevreye bırakılan ağır metal türleri Tablo 1.5.'de genel olarak gösterilmiştir (Çay, 2014) .

Tablo 1.5. Temel Endüstrilerden Çevreye Bırakılan Metal Türleri (Çay, 2014)

Endüstri Tipi	Co	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Sn	Zn	Fe	As	Al	Mn	Mo	V
<i>Kağıt</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petrokimya</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Klor-alkali</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Gübre Sanayi</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Demir-çelik</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enerji Üretimi</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Doğaya atılan ağır metallerin yayınımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden çeşitli prosesler sonucunda biyosfere atılımının gerçekleştiği görülmüştür. Şekil 1.3.'de ağır metallerin biyosfere farklı sektörlerden salınımları gösterilmiştir (Kahvecioğlu ve ark., 2007).



Şekil 1.3. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları (Kahvecioğlu ve ark., 2007)

Ağır metallerin önemli bir miktarı atık sularda bulunduğu gibi aynı zamanda arıtma çamurlarında da bulunmaktadır. Çözünmüş ağır metaller yüzey suları ve denizlere ulaşarak buradanda içme sularına katılırlar ve tekrar mobilize olarak içme sularına buradan da besin zincirine katılırlar. Besin zincirine katılan ağır metaller kimyasal veya biyolojik yollarla bünyeden atılamaz ve akümüle olurlar. Buna rağmen canlı organizmalarda her ne kadar taban, hava veya sularda rastlanılan konsantrasyonlardan çok daha yüksek oranda ağır metal konsantrasyon değerlerinde olsa bile, çok az olarak hayvan ve insanlarda sağlığında risk oluşturacak kadar akümülyasyon sınırına ulaşılır (Kahvecioğlu ve ark., 2007).

1.4.2. Ağır Metallerin Çevreye Etkisi

Birçok Ağır metallerin ve metaloidlerin çoğu zehirli olduğu için çok küçük derişimlerde bile zehirlenmelere sebep olabilmektedirler (Kara, 2005; Arora ve ark., 2008). Ağır metallerin etkileri canlı orgnizmlarda ve toprakta kısa sürede

gözlemlenemez. Bundan dolayı da ağır metal birikimini sürekli olarak kontrol etmemiz gerekmektedir (Çay, 2014).

Antropojen etkinin doğadaki ağır metal dağılımına etkisinin büyük olduğu gözlenmektedir (Facchinelli ve ark., 2001). İnsan faktörünün en büyük olduğu yerler olarak çimento üretimi, cam üretimi, ev aletleri üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, tekstil endüstrisi kuruluşları, rafineri ve endüstriyel faaliyetler örnek verilebilir (Market, 1993). Ayrıca atmosferdeki duman ve partiküllerin kaynağını fosil yakıtlar ve taşıtlar oluştururken topraktaki ağır metallerin kaynaklarında atıklar, pestisidler ve gübreler oluşturmaktadır (Demirezen ve Aksoy, 2004; Altay, 2016).

Ağır metallerin toprak üzerindeki etkilerinin kolaylıkla tespit edilememesinin sebebi doğrudan toprağa verilen ağır metalin toprakta bulunan başka maddeler ile tepkimeye girmesinden kaynaklanmaktadır. Farklı maddelerle tekimeye giren ağır metalin toprağa etisini saptamakta zorlaşmaktadır. Ağır metal kirliliği suyun kalitesini bozmada, yer altı sularına karışıp mikroorganizmalara zarar vermede, bitkilerin yapılarına girip besin zinciri yoluyla insana ulaşmada önemi bir tehlike arz etmektedir (Çay, 2014).

Genellikle toprakta biriken ağır metaller toprağın kimyasal yapısını bozmakta ve bu nedenle toprağın verimliliğininide düşürmektedirler. Bir yandan da toprakta bulunan canlılar için toksit etki gösterebilmektedirler. Besin zinciri vasıtasıyla canlılara ulaşan ağır metaller canlılarda birikmekte ve belirli konsantrasyonlara ulaştıklarında zehirli etkiler gösterebilmektedirler (Çay, 2014).

Oksidatif stresin oluşmasının nedenlerinden biriside ağır metallerin serbest radikal formlarından kaynaklanmaktadır (Mudipalli, 2008). Kararsız yapıda olan serbest radikaller kararlı bir hale geçebilmek için canlının hücrelerine saldırmakta ve zarar vermektedirler (Krystofova ve ark., 2009). Ağır metale çok fazla maruz kalma sonucunda vücudunda fazlasıyla biriken serbest radikal formlar ileriki safhalarda canlının enzimlerindeki ve pigmentlerindeki temel elementlerin yerine geçerek bu yapıların canlılık fonksiyonlarını yerine getiremez hale getirmektedirler (Ali ve ark.,

2013; ay, 2014). Membran fonksiyonlarını engellemeleri, nükleik asitlerine zarar vermeleri ve enzimatik aktivitelerini inhibe etmelerinden dolayı ağır metaller mikroorganizmalar için toksik etki göstermektedirler (Gadd, 1992; Freedman, 1995). Ağır metaller önemli fonksiyonel grupları bloke etmelerinden dolayı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkiye sahiptirler (Doelman ve ark., 1994; Akkan, 2009).

Elektrik retimi için termik santrallerde öğütülmüş kömür kullanılmaktadır. Yakma işlemi sonucunda ortaya çıkan küllerden birçoğu baca tarafından çekilen gazlarla birlikte atmosfere verilmektedir. Bu kl partiküllerinin yzeyince genellikle As, Cd ve Cu gibi ağır metaller bulunmaktadır. Kullanılan kömürün çeşidine göre santrallerde çeşitli atıklar meydana gelmekte ve farklı ağır metaller doğaya saçılmaktadır (Dülger, 2012).

Atmosferde bulunan ağır metallerin yağmur gibi hava olayları sonucu suya geebileceğide bilinen bir gerçektir (Hornbuckle ve ark., 1993; Jeremiason ve ark., 1994; Taşdemir, 1997; Akkan,2009).

1.4.3. Mikrobiyal Metal Direnç Mekanizması

Ağır metallerin periyodik tabloda geçiş elementlerinde bulunmasının sebebi d orbitallerinin gerekli sayıda elektrona sahip olmamalarından kaynaklanmaktadır. Geçiş elementi olan ağır metallerin d orbitalleri ağır metallerin farklı elementlerle tepkimeye girmesini kolaylaştırmaktadır. Bundan dolayı ağır metaller birer iz element olarak birçok biyokimyasal reaksiyonda önemli rollere sahiptirler (Nies, 1999; Dülger, 2012).

Bruins ve ark., (2000)` e göre, mikroorganizmalar yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için iz miktarda da olsa ağır metale gereksinim duyarlar. Bu iz elementler sınıfında potasyum, kalsiyum, bakır, magnezyum, kobalt, nikel, krom, çinko, manganez, demir ve sodyum gibi bazı metaller yer almaktadır. Canlıların yaşamsal faaliyetlerinde yer almayan metallere örnek olarak altın, civa, gümüş, kurşun, kadmiyum ve alüminyum verilebilir. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri

aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar. Demir, bakır ve nikel gibi esansiyel geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol alırken, magnezyum ve çinko gibi esansiyel metaller elektrostatik güçleri sayesinde çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize etmektedirler. Demir, nikel, magnezyum ve kobalt düzenleyicilik görevi olan kompleks moleküllerin yapısında yer almaktadır (Dülger, 2012).

Makro elementlerden daha düşük miktarda bulunmalarına rağmen mikro element olan V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo ve W yaşam için zorunludur ve genellikle inorganik iyonlar gibi yerel çevresinden alınır. Bu tip metallere esansiyel metaller denilmiştir. Bu metaller kofaktör gibi kullanıldıkları için gereklidirler (Bruins ve ark. 2000). Enzim ve proteinlerde yapısal ve katalitik rol oynarlar ve biyolojik moleküllerin stabilizasyonunu sağlarlar. Ayrıca elektron transferinde ve osmotik denge sağlanmasında ve bakteriyal hücrelerin enzimlerinin (yaklaşık %30`unda) yapısal bir bileşeni olarak kullanılırlar (Wackett ve ark. 2004). Biyolojik rolleri bilinmeyen çok sayıda metal vardır. Bunlar genellikle ağır metaller ya da toksik metaller olarak isimlendirilir. Bilinen toksik metaller Al, Au, Ag, Bi, Cd, Cr, Hg, Sn, Pb ve Tl`dir (Torabi, 2013).

Metallere karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayatın başlaması ile ortaya çıkmıştır (Sevgi, 2007). Guzzo ve ark., (1999)` a göre toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen mikroorganizmaların bulunduğu çevrede toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerinde yarattığı strestir (Gülcan, 2006; Dülger, 2012).

Bakteriyal stresin genel bir tanımını yapmak oldukça zordur yine de dış faktörlerden kaynaklanan büyümenin yavaşlamasına ya da ölüme neden olacak kadar güçlü bir biçimde hücresel fizyoloji ya da metabolizmada ortaya çıkan karışıklık veya düzensizlik olarak tanımlanabilir. Bakteri stresi farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Bunlardan bazılarını (sıcak soğuk şoku, asit, osmotik ve oksidatif stres gibi) karşı bakterilerin oluşturduğu yanıtlar bilinir. Metaller ise mikrobiyal beslenmesinde temel rol oynadığı bilinmesede strese de neden olabilirler. Bakterilerde metal iyon stresi gerekli metal iyonlarının aşırı derecede bulunması ya da gerekenden az bulunması

durumunda ve toksik metal iyonlarının hücrede bulunması durumunda ortaya çıkar (Torabi, 2013).

Bu nedenle metal iyonlarının içeri alınmasını taşınmasını ve dışarı atılmasını düzenleyen genlerin ifadesinin regülasyonu temel hücrel bir fonksiyondur. Bakteriler temel ve toksik metallerin aşırı seviyelerini algılayabilir ve yanıt olarak bu seviyeleri normale çekilmesini sağlayabilirler. Bu durum metal iyonlarının hücrede içindeki seviyelerinin değişimine yanıt olarak iyonların içeri alınmasını ve dışarı atılmasını sağlayan genlerin ifadesi ile kontrol edilir. Temel (Esansiyel) metaller kromozomlarda kodlanmıştır ve homeostasi sistemi bu iyonların hücre içindeki seviyelerine karar verir. Metal iyonlarına karşı direnç sağlayan sistemler için kodlanan genler genellikle plasmid ve transpozon gibi hareketli genetik elemanlarda bulunur. Metal iyonlarına cevap veren regülatörler sitoplazmada yerleşir. İki komponent sensör regülatörlerinin ve ekstra sitoplazmik duyarlı sigma faktörlerinin metal iyonları ya da neden oldukları hasarı tespit eden hücrel sistemlerin bir parçası olduğu hakkında artan kanıtlar bulunmaktadır. Bakteriler çeşitli fiziksel durumlarında dalgalanmalara maruz bırakıldıklarında buna süratle cevap verirler ya da yaşam kabiliyetini kaybeder. Bu çevresel değişimler sıcaklık değişimlerini, anaerobik çevreden aerobik çevreye geçiş, pH, iyonik güç, su aktivitesi, osmolarite, kaynaklar için rekabet, toksik kimyasallara ve metallere maruz kalmayı içerebilir. Çevresel stres ve bunlardan kaynaklanan hasarlar çok hızlı biçimde algılanmalıdır ki bu durum metal iyonu atımında metal iyonu hasarının tamiri için gerekli olan proteinlerin fonksiyonel olarak aktif olmaları durumunda mümkündür (Torabi, 2013).

Ağır metallerin bakteri suşları için MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri çeşitli doğal habitatlarda çalışılmıştır. Bu dirençliliğin bakteriler arasında yayılmasında değişen çevre koşullarına uyumu kolaylaştıran plazmidlerin etkisi çok önemlidir. Çeşitli habitatlarda yapılan birçok çalışmada metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmidler (Sandaa ve ark., 1992; Davies, 1994; Doelman ve ark., 1994; Arvanitidou ve ark., 1997) ve konjugatif transpozonlar (Scott, 1992; Saylers ve Shoemaker, 1994) üzerinde kodlandığı gösterilmektedir (Akkan, 2009).

Yapılan çalışmalarda mikroorganizmalardaki ağır metal direnç mekanizması ile antibiyotik direnç mekanizması arasında bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur. Çünkü her iki mekanizmada da mikroorganizmalar arasında konjugasyon ya da transdüksiyon ile genetik madde aktarımı gerçekleşmektedir. Bazı mikroorganizmalarda bu iki dirençlilikte aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Bakterilerdeki metal dirençliliğinin ise antibiyotik kullanımından daha önce ortaya çıktığı bildirilmiştir (Sevgi, 2007).

Mikroorganizmaların geliştirdikleri metal dirençlilik mekanizmaları; Geçirgenlik bariyeri ile metallerin dışarıda tutulması, metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu, metalin proteine bağlanması yolu ile hücre içinde alıkonması, ekstraselüler alıkonma, metallerin daha az toksik formlara dönüştürüldüğü enzimatik detoksifikasyon, metallerin etki ettiği hücresel komponentlerin metal hassasiyetinin azaltılması gibi mekanizmalar ile mikroorganizmalar metallere direnç göstermektedirler (Sevgi, 2007).

1.4.4. Ağır Metal Çeşitleri

1.4.4.1. Kobalt

Kobalt ismini kurşun ve kalay madenlerinin üretimi esnasında ortaya çıkan, erimeyen ve metalin kullanılmasını engelleyen katı yapı nedeniyle maden ruhu, şeytan anlamına gelen “Kobold” kelimesinden almıştır. Geçmiş M.Ö. 2000’li yıllara dayanan kobalt bileşikleri cam ve emayede mavi boya olarak kullanılırken 1742 yılında İsveç’li bilim adamı G. Brant tarafından yeni bir metal olarak tanımlanmıştır. Tobern Bergman 1780 yılında kobaltı element olarak tanımlamıştır (Habashi, 1997; Özdemir, 2008).

Askeri alanda ve endüstriyel uygulamalarda önemli bir yere sahip olan kobalt en çok süper alaşım olarak jet motor türbinlerinde kullanılır. Ayrıca kobalt elmas takımlarında ve kesici uçlarda alaşım elementi olarak, korozyondan korunma ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla alaşımlarda, yüksek hız çeliklerinde, takım çeliklerinde ve malzemelere mekanik özellik kazandırmada kullanılır. Kobalt

bileşikleri ise mürekkep ve verniklerde kurutma maddesi olarak ve boyalarda pigment maddesi olarak kullanılırken petrol ve seramik endüstrisinde katalizör görevi görmektedir. Bununla birlikte çeşitli kayıt cihazlarında, çeşitli manyetik malzemelerde ve pil elektrotlarında kullanılmaktadır (Özdemir, 2008).

İnsanlar üzerinde kanserojen etkisi bilinmemesine rağmen kobalt ve kobalt bileşikleri kanserojen bir madde gibi muamele görürler. Kobalt içeren implant takılan bölgelerde tümör oluşumuna da rastlanmış ve hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, kobalt sülfidin tek zincir DNA kırıklarına neden olduğu bulunmuştur (Kawanishi, ve ark., 1994). Ayrıca kobalt indirekt olarak oksidatif stres oluşturarak reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olur (Freeman ve ark., 2005; Özdemir, 2008).

Günlük besin ihtiyacımızda çok küçük bir yer teşkil eden kobalt, kırmızı kan hücreleri üretiminin ve sinir düzenlenmesinde kullanılan B12 vitaminin bileşenidir. Kobalt vücutta yapı taşı olarak bulunur ve anemiyi engeller, ayrıca B12 vitaminin; yorgunluk, sindirim kolaylığı ve kas problemlerinin giderilmesine faydası vardır. Yetersiz kobalt alınımında pernisiyöz (zararlı) anemi ve sinirlerde bozukluk gibi pek çok problemler ve semptomlar ortaya çıkar ancak yeterli B12 vitamini alınarak etkiler ortadan kaldırılabılır (Kawanishi, ve ark., 1994; Özdemir, 2008).

1.4.4.2. Civa

Çok eski çağlardan beri insanlığın bildiği bir metal olan civa oda sıcaklığında sıvı durumda bulunan metallere bir tanesidir. 14.06 g/cm^3 yoğunluğu ile ağır metaller grubunun bir üyesi olan civa periyodik cetvelin 2B grubunda bulunan bir geçiş elementidir. Yerkabuğunda ortalama 0.08 ppm oranında bulunan civa deniz suyunda 3×10^{-5} ppm civarında bulunmaktadır. Doğal civa içeriği havada 0.005 – 0.06 ng/m³; bitkilerde 0.001 – 0.3 µg/g (genelde < 0.01 µg/g) seviyelerindedir (Güven, 2004).

Civa endüstride gerek metalik olarak gerekse organik ve inorganik civa bileşikleri olarak termometrelerde, bazı metallerin üretim proseslerinde, ilaç sanayiinde, diş tedavilerinde dolgu malzemesi olarak, laboratuvar uygulamalarında, boya sanayiinde ve kağıt sanayiinde kullanılmaktadır. Ancak günümüzde civa kullanımı gerek metalik formunun ve gerekse bileşiklerinin flora ve fauna için çok

zehirli olmasından dolayı azaltılmaktadır ve bazı endüstri kollarında kullanımı yasaklanmıştır (Habashi, 1997; Bingham ve ark., 2001). Civa yüksek buhar basıncı nedeni ile oda sıcaklığında bile kısmen buharlaşabilen bir metaldir. Fosil yakıtların yanması, madencilik sektöründe civa içeren kayaçların kırılması, civa üretimi esnasında ve katı atık depo sahalarının sızma, atık pillerin rastgele atılması, diş hekimliğinde kullanılan amalgam dolgular ve evde kullanılan civa içeren aletlerin kırılması sonucunda içerdikleri civanın ortalığa yayılması civanın insan faaliyetleri sonucunda havada ve suda ki oranlarının yükselmesine neden olmaktadır. Bir diğer önemli kirletici kaynak metilcivadır. Suyu karışan civanın bakteriler ve organizmalar tarafından metilcivaya çevirilmesi ile meydana gelir. Planktonlar, onları yiyen küçük balıklar ve midyeler ve küçük balıklarla beslenen büyük balıklar ve deniz memelileri ile besin zincirine karışır (Güven, 2004).

1.4.4.3. Mangan

Mangan ilk olarak C.W. Scheele tarafından fark edilmiş ve 1774'te J.G. Gahn tarafından ilk kez bir serbest metal olarak izole edilmiştir. İlk kez bulunduğu manyetik kayadan isimlendirilmiştir. Yer kabuğu üzerindeki en yaygın 12. elementtir ve % 0.1'ini oluşturur. Mangan serbest metal halinde bulunmaz ve 100 mineralden daha fazlasıyla bileşik halinde bulunabilir. Buna ek olarak % 7-27 oranında deniz tabanındaki nodüllerde bulunur (Liu ve ark., 2005; Özdemir 2008).

Mangan yoğun bir şekilde; kuru hücre pillerinde, fungusit olarak, camlarda, seramiklerde, boyalarda, pigmentlerde, toprak ve gıda katkı maddelerinde ve tıpta yüzyıllardır veya daha fazla bir süredir yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Manganın % 90'ından daha fazlası demir ve çelik yapımında ve demirsiliko mangan alaşımlarında kullanılır. Diğer kullanım alanları ise korozyonu azaltmak için bakır veya alüminyum alaşımı şeklinde, permanganat ile olan alaşımlarında ise kimyasal endüstrilerde oksidasyon reaksiyonlarında kullanılır (Gerber ve ark., 2002; Özdemir, 2008).

Diğer bir taraftan esansiyel bir element olan mangan antioksidant savunma sisteminde önemli bir role sahiptir ve aynı zamanda kanser hücrelerini modifiye eden

süperoksit dizmutazın`ın (MnSOD) bir parçasını oluşturur (Parker, ve ark., 1987; Liu ve ark., 2005; Özdemir, 2008).

Bakterilerde yüksek dozdaki mangan DNA replikasyonunu ve onarımını etkilemektedir. AMES testinde özellikle manganın sorumlu olmadığı görülmesine rağmen mikroorganizma ve memeli hücrelerinde mangan DNA zararlarına ve kromozom kırılmalarına neden olur. Yüksek oranda mangan memelilerde verimliliği etkiler ve embriyo ve fetüs üzerinde toksik etkiye sahiptir (Domingo, 1994). Mangandan kaynaklanan kanser üzerine olan bilgiler azdır. Fakat mevcut sonuçlar inorganik manganın karsinojenik olduğuna işaret etmemiştir (Gerber ve ark., 2002; Özdemir, 2008).

1.4.4.4.Çinko

Metalik çinko kompleks cevherlerden yapılan bakır bazlı alaşımların üretiminde ortaya çıkmasına rağmen, üretimi hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir. M.Ö. 1000 yıllarında Çinlilerin ve 14. yüzyılda Hindistanlıların metalik çinko ürettikleri ileri sürülmektedir. Avrupa`da Löhyenns ilk kez Goslar`da bu metali bulmuştur (1617) ve muhtemelen ismini de vermiştir (Özdemir, 2008).

Çinko demir konstrüksiyon malzemelerinininkine kıyasla daha elektronegatif olduğundan çinko kaplamalar çelik yapılar için çok iyi korozyondan korunma sağlarlar ve bu özellik en önemli kullanım alanını oluşturur. Çinko beyazı veya Çin beyazı olarak bilinen çinko oksit (ZnO), boya pigmenti olarak kullanılır. Ayrıca demir, bronz, cam, kağıt yapımı, fungusitler, akü, ve kauçuk-lastik sanayinde kullanılmaktadır. Tıpta; dermal ürünler, antiseptikler ve insülin preparatlarında da kullanılır (Vural, 1993; Özdemir, 2008).

Çinkonun ilk olarak 1869`da Raulin tarafından *Aspergillus niger`in* büyümesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (McCall ve ark., 2000). Mikroorganizmaları, bitkileri ve hayvanları içeren yaşayan bütün canlıların büyümesi gelişmesi ve farklılaşması için esansiyel olduğu gösterilmiştir (McCall ve ark., 2000; Choudhury ve Srivastava, 2001; Özdemir, 2008).

Çinkonun gelişme, deri bütünlüğü ve fonksiyonu, yumurta olgunlaşması, bağışıklık gücü, yara iyileşmesi ve karbohidrat, yağ, protein, nükleik asit sentezi ya da degradasyon gibi sayısız fonksiyonu rapor edilmiştir. Alkol dehidrojenaz, karbonik anhidraz ve karboksipeptidaz gibi 70`den fazla metaloenzim fonksiyonu için ko-enzim bileşeni olarak gereklidir. Aynı zamanda DNA bağlı proteinlerin temel bileşenidir. tRNA sentetaz çinko bağımlıdır. Çinko eksikliği apoptizi etkin hale getirmektedir. Fizyolojik miktarlardaki çinko Cd, Hg, Pb ve Sn gibi diğer ağır metal iyonlarının zehirleyici etkilerini azaltmaktadır (Glasfeld ve Schimmel, 1997; Özdemir, 2008).

Yüksek çinko konsantrasyonları birçok önemli fonksiyonları etkileyen inhibitördür. Çinko bakteri ve mitokondrilerin elektron taşıma sisteminin potansiyel inhibitörü olarak bilinir. Toksikitesi Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, ve Co gibi diğer metallerle karşılaştırıldığında nispeten daha düşük olduğu bulunmuştur (Choudhury ve Srivastava, 2001; Özdemir, 2008).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Hidrokarbonla kirlenmiş endüstriyel alanlarda Christova ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmada bakteri izolasyonunda tek karbon kaynağı olarak % 2 n-hekzadekan içeren mineral salt besiyeri kullanılmıştır. Saflaştırmadan sonra tek koloniler 100 ml'lik erlenlerin içine zenginleştirici olarak %2 n-hekzadekan ya da n-parafin içeren 10 ml'lik besiyerlerine aktarılıp inkübe edilmişlerdir. Yeni bir suş olan *Renibacterium salmoninarium* 27BN VİTEK sistemi, biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucunda tanımlanmış ve bu suşun biyosüpfektan üretme yeteneğinde olduğu da tespit edilmiştir. Üretilen biyosüpfektanın *Pseudomonas aeruginosa* suşu için tipik olan RLL ve RRLL iki ramnolipiti ürettiği kromotografi ve kızıl ötesi spektro analizleri sonucunda tespit edilmiştir.

Mersin Rafineri bölgesinden petrolle kirlenmiş alanlardan alınan toprak örnekleri zenginleştirilmiş M9 minimal besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda *Pseudomonas* (ARP) cinsine ait 50 alt tür izole edilmiştir. Coral ve Karagöz (2005) tarafından yapılan bu çalışmada MM9 agar besiyerinde en iyi gelişme gösteren ARP26 ve ARP28 numaralı suşlar biyodegradasyon testleri için seçilmiştir. Phenantrene`in yedi günlük inkübasyonu sonucu ARP26 nolu suшта %93, ARP28 nolu suшта %98 oranında bir parçalama olduğu gözlenmiştir. ARP26 ve ARP28 nolu suşlarda 26kb`lık phenanthrene degradasyonundan sorumlu bir plazmid belirlenmiştir.

Tuğrul ve Cansuar (2005) tarafından yapılan çalışmada “Drop Collapse” yöntemi kullanılarak mikroorganizmaların biyosüpfektan üretme yetenekleri belirlenmiştir. Hızlı bir yöntem olan “Drop Collapse” *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*`in biyosüpfektan üretimlerini göstermek için kullanılmıştır. Toplam biyosüpfektan ölçümünden önce “Drop Collapse” yöntemi sıvı kültürde ramnolipit varlığını algılamak amacıyla kullanılmıştır. Bu yöntemde; mikropate kuyucukları mineral yağ ile kaplandıktan sonra eklenen süpernatantda biyosüpfektan bulunuyorsa mineral yağ çözülerek süpernatantın kuyucukta yayıldığı gözlendiği ancak süpernatant biyosüpfektan içermiyorsa mineral yağın çözülmeyip süpernatantın damlacık halinde kaldığı belirtilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*

suşlarının süpernatantlarının yayılma hareketi gösterdiği ve bunun ise suşların biyosürefektan ürettiği anlamına geldiği belirtilmiştir.

Üçden fazla benzen halkası içeren pyrene (Pyr) ve benzo[a]pyren (BaP) gibi yüksek moleküler ağırlıklı poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneğindeki bakterilerin izolasyonu Hunter ve ark., (2005) tarafından araştırılmıştır. PAH ile kirletilmiş topraklardan izole edilen *Bacillus subtilis*, yağ asidi metil ester analizi ile tanımlanmıştır. Biyodegradasyon yeteneğini değerlendirmek için pyrene, 1-aminopyrene ve 1-hidroksipyrene`in her birinin 33 µg/ml konsantrasyonunda gelişmesi incelenmiştir. Pyrene yada benzo[a]pyrene`in 20 µg/ml`sinde 30 °C` de 4 günlük inkübasyonu sonucunda *Bacillus subtilis`in pyrene`i % 40 ve benzo[a]pyrene`i %50 oranında parçaladığı gözlenmiştir. Bu çalışma *Bacillus subtilis`in poliaromatik hidrokarbonları parçalamasına ilişkin ilk çalışmadır. Dönüşüm sonucu oluşan ara ürünlerin ana bileşiklere göre daha toksik olup olmadığı ve *Bacillus subtilis`in pyrene ya da benzo[a]pyrene`i karbondioksit ve suya mineralize etme özelliği olup olmadığı değerlendirilmiştir.***

Kuzey Doğu Hindistan`da Das ve Murkherjee (2007) tarafından petrole kirletilmiş topraklardan alınan örneklerle yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* DM-04, *Pseudomonas aeruginosa* M ve *Pseudomonas aeruginosa* NM suşları izole edilmiş ve suşların ham petrol hidrokarbonlarını kullanabildikleri belirtilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* M, *Pseudomonas aeruginosa* NM ve *Bacillus subtilis* suşları ile kirletilmiş toplam petrol hidrokarbonlarında 120 günlük inkübasyon süresi sonunda kontrol toprağına kıyasla bakterilerle muamele edilen toprakda toplam petrol hidrokarbonları seviyesinde belirgin bir azalma görülmüştür. *Pseudomonas* suşlarının besiyerindeki toplam petrol hidrokarbonları parçalamada *Bacillus subtilis* suşundan daha etkili olduğunu belirlemişler ve izolatların biyosürefektan üretme yeteneğinin olduğunu da tespit etmişlerdir. Sonuç olarak *Bacillus subtilis* DM-04 ve *Pseudomonas aeruginosa* M ve NM suşlarının doğal ortamda biyoremediasyonda etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Termofilik yapıdaki *Geobacillus toebii* sub sp. *decanicus*, *Bacillus thermantarcticus*, *Anoxybacillus amylolyticus*, ve *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis* bakterilerinin Cd, Co, Cu, Mn, Zn ve Ni`e karşı toleranslarını

ölçmek için minimum inhibisyon konsantrasyonları ölçülmüştür. Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan tüm metal konsantrasyonları (mM) cinsinden ayarlanmıştır. 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonu sonuçları rapor edilmiştir. Özdemir (2008) tarafından yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre; bakterileri metal dirençliliği bakımından her bir metal için en dirençlilikten en duyarlılığa doğru sıraladığında *Bacillus thermoantarcticus* için; Mn>Co>Cu>Ni>Zn>Cd, *Anoxybacillus amylolyticus* için; Mn>Co>Zn>Ni>Cu>Cd, *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis* için; Mn>Ni>Cu>Co>Zn>Cd ve *Geobacillus toebii* sub. sp. *decanicus* için; Mn>Ni>Cu>Zn>Co>Cd şeklinde tespit edilmiştir.

Yılmaz (2008) yaptığı çalışmada; süt fabrikası atık sularından bakteri izolasyonu gerçekleştirmiştir. İzole ettiği bakteriler 5 farklı türde olup bunlardan sadece 3 izolatan biyosülfektan ürettiğini belirlemiştir. İzolatların biyosülfektan üretme yeteneğine sahip olduğunu belirlemek için “Drop Collapse” yöntemini kullanmıştır. Biyosülfektan üreten mikroorganizmalar *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmışlardır. Bu suşlardan elde ettiği biyosülfektanları sırasıyla BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlamıştır. Bu izolatlardan elde ettiği biyosülfektanları bitki patojeni olan *Fusarium* cinsine ait *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 ve *Fusarium heterosporium* ATCC 15625 türleri üzerinde antifungal etkilerini tespit etmede kullanmıştır. Sonuç olarak denenen bütün biyosülfektanların funguslara karşı antifungal etkiye sahip oldukları saptanmıştır. En büyük fungal etkiyi BS-III numaralı biyosülfektan göstermiştir.

Yalçın (2008) rafineri atık sularından izole ettiği mikroorganizmalar ile yaptığı çalışmada biyosülfektan üretimi ve hidrokarbon degradasyonunu araştırmıştır. İzole ettiği suşlar *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmıştır. “Drop Collapse” yöntemi ile bakteri izolatlarında biyosülfektan varlığını saptamış ve bütün izolatların biyosülfektan üretme yeteneği olduğunu tespit etmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* tarafından

üretilen biyosüpfektan maddeler sırası ile BS-I, BSII, BS-III ve BS-IV olarak kodlanmıştır. Biyosüpfektan üretiminde hidrokarbon kaynağı olarak rafineri atık suyu kullanılmıştır. Biyosüpfektan üretiminde optimum şartların ayarlanmasında pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve EDTA varlığının etkisi incelenmiştir. Bakteri suşları tarafından üretilen BS-I, BS-II, BS-III ve BS-IV biyosüpfektanlarının yapısı FTIR analizi, protein, karbonhidrat ve lipid testleri ile özellikleri ise yüzey gerilimi, emülsiyon testi, antimikrobiyal ve hemoliz aktivite testleri ile araştırılmıştır. Tanımlanan suşlar rafineri atık suyu ile 10 gün 35 °C`de inkübasyona bırakılmıştır ve belirli zamanlarda alınan örneklerde biyosüpfektan üretimi ve hidrokarbon parçalaması araştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında BS-I, BS II, BS-III ve BS-IV için sırası ile 712, 536, 448 ve 356 mg/L`lik üretim gözlenmiştir. Rafineri atık su içeriğinde bulunan hidrokarbonların parçalanmasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia cepacia* tarafından %79.2, %54.0, %69.5 ve %40.2 oranlarında parçalandığı belirlenmiştir.

Tekirdağ ilinde endüstriyel atıkla kirlenmiş Çorlu deresinden ve Batman ilinde petrole kirlenmiş topraklardan toplam 26 adet bakteri izole edilmiştir. Kaya (2008) yaptığı bu çalışmada bakteri suşlarını 5 ve 42 °C`de gelişme, oksidaz, denitrifikasyon, jelatin hidrolizi, nişasta hidrolizi, pigmentasyon gibi testlere tabi tuttuktan sonra suşların protein profillerini çıkarıp suşlar arasındaki benzerlikleri incelemiştir. Basal Mineral Salt Medium besiyeri kullanarak izolatların biyosüpfektan üretme yeteneklerini belirlemiştir. En yüksek ramnolipit üreten *P. aeruginosa* 78 ve 99 suşlarının yanı sıra, 393 mg/mL ile en yüksek oranda ekzopolisakkarit (EPS) üreten *P. stutzeri* T3 izolatlarını çalışmalarında kullanmak üzere seçmiştir. Ramnolipit üreten *P. aeruginosa* 78 ve *P. aeruginosa* 99 suşları kritik misel konsantrasyonunun sırasıyla 115 mg/L ve 130 mg/L olduğu belirlenmiştir. Değişen pH ve sıcaklık koşullarında ramnolipitlerin etkinliklerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ramnolipid üreten suşların EPS üretimlerinde yüksek olduğu fakat EPS üretimi en yüksek olan *P. stutzeri* T3 suşunun ramnolipid veya benzeri bir yüzey aktif madde üretmediği tespit edilmiştir. EPS`nin besiyerini yüzey gerilimine etkisinin olmadığı görülmüştür.

Akkan (2009) evsel atık, fabrika atığı ve ticari gemi atıkları ile kirlenilen İskendurun Körfezi'nde belirlediği farklı bölgelerden aldığı su örneklerinden ile 356 Gram negatif bakteri izole etmiştir. Bu izolatların tanımlanması sonucu 21 farklı tür belirlenmiştir. Antibiyotik direnci en yüksek olan bakteriler 1 ve 3 numaralı bölgelere aittir. 1 numaralı bölgede izolatların %94,9'unun, 3 numaralı bölgedeki izolatların %75,4'ünün ve 2 numaralı bölgedeki izolatların % 37,1'inin ÇAD (Çoklu antibiyotik dirençlilik) değeri 0,2'den yüksek saptanmıştır. Ağır metal direncine bakıldığında izolatların tamamı kadmiyum ve bakıra karşı dirençli çıkmıştır. Ancak izolatların en düşük ağır metal dirençlilik oranı kurşun % 67,7 olarak saptanmıştır.

Termofilik bir bakteri olan *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 suşunu petrolle kirlenmiş topraklardan izole etmişler ve karbon kaynağı olarak naphthalene ya da hexadecane içeren Bushnell Hass besiyeri kullanmışlardır. İzole edilen bakteriden biyosümfektan üretimi gerçekleştirilip üretilen biyosümfektanın yüzey gerilimi üzerine etkisine bakılmış ve ham biyosümfektan Du-Nouy Tensiometer cihazıyla ölçülmüştür. Zhao ve Wong (2009) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre üretilen biyosümfektanın poliaromatik hidrokarbonların parçalamasını artırma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Klankeo ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada ise tek enerji ve karbon kaynağı olarak pyrene'i kullanabilme yeteneğine sahip KOTLB ve RN402 kodlu 2 yeni bakteri suşu topraktan izole edilmiş ve suşların sıvı kültürde 16 günlük inkübasyon süresi sonucunda 100 mg/L pyrene'in % 99'unu parçaladığı belirlenmiştir. Pyrene dışında, her iki suşunda 8 gün içinde phenantrene'nin 100 mg/L 'sini tamamen parçaladığını ve suşların sırasıyla 24 gün içerisinde fluoranthene'in 100 mg/L 'sini %99 ve % 55 oranında parçaladığını tespit etmişlerdir. 16S rRNA tanımlamalarına göre KOTLB kodlu suş *Diaphorobacter* sp. olarak RN402 kodlu suş da *Pseudoxanthomonas* sp. olarak tanımlanmıştır. PCR çalışmaları sonucunda her iki suşda da doksijenaz (*nidA*) geninin varlığı saptanmıştır. Bu çalışmanın pyrene parçalayan Gram negatif bakterilerin *nidA* genini taşıdığını gösteren ilk araştırma olduğu bildirilmiştir.

Katar`ın Umm-Saied şehrinde sanayi bölgelerinden alınan toprak örneklerinden poliaromatik hidrokarbon parçalayabilme yeteneğindeki bakteriler izole edilmiştir. İzolasyonda tek karbon ve enerji kaynağı olarak naphthalene, phenanthrene yada anthracene`nin zenginleştirme maddesi içeren besiyeri kullanılarak izolasyon yapılmış ve bakteri izolatları çeşitli fenotipik, morfolojik ve moleküler özelliklerine bakılarak tanımlanmıştır. İzolatlar ortamda bulunan PAH bileşiklerinin konsantrasyonlarına göre büyüme göstermişlerdir. İzolatların inkübasyonları esnasında büyüme ortamlarının renginde gözle görülür değişikliklerin olduğu ve bunun ise izolatların farklı metabolitler üretmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Her bir izolatanın test edilen üç farklı poliaromatik hidrokarbonuda parçalayabileceği belirtilmiştir. İzolatlar 16S rDNA gen sekansına dayanan tanımlarına göre *Pseudomonas geniculata* ve *Achromobacter xylosoxidans* olarak belirlenmişlerdir. Poliaromatik hidrokarbon parçalayan bakterilerin çeşitli popülasyonlarının poliaromatik hidrokarbonlarla kirletilmiş toprak örneklerinde barındığı ve toprakta bulunan bu mikroorganizmaların bu alanların biyoremediasyonu için kullanılabileceği Al-Thani ve ark., (2009) tarafından belirtilmiştir.

Mersin Kazanlı endüstri bölgesinden toprak örnekleri alınarak 272 adet *Pseudomonas* spp. ve 161 *Bacillus* spp. izole edilmiştir. Toprak örneklerinde Cr, Cu, Ni, Co, Cd ve Zn olmak üzere altı çeşit ağır metal tespit edilmiştir. İzole edilen bakterilerin %73,9`u Cr`a, %26`sı Ni`e, %18,4`ü Zn`ya, %11,5`i Cd`a, % 9,2`si Co`a ve %7,3`ü Cu`a karşı dirençli bulunmuşlardır. Sevgi ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada en yüksek MTC oranları (Maximum tolerable metal concentrations); Cr için 2mM, Ni için 3mM ve Zn ile Cu için 5mM olarak bulunmuştur. Cu, Cr, Zn ve Ni`e karşı direnç gösterme yeteneğinde olan *Pseudomonas* spp. izolatlarında 1,8, 2,1 ve 28kb büyüklüğünde ortak plazmidler belirlenmiştir.

Küce (2010) yaptığı bu çalışmada, petrol rafinerisinden ham petrolle kirlenmiş alanlardan aldığı toprak örneklerini 2.4-dinitrotoluen (2.4-DNT) ile zenginleştirilen MM9 besiyerinde inkübe ettikten sonra 15 bakteri suşu izole etmiştir. 30 °C`de 10 günlük inkübasyondan sonra en iyi üreme gösteren izolat identifikasyonu yapılmak

için seçilmiştir. İdetifikasyon için 16S rRNA/DGGE metodu kullanılmış ve bakteri suşu *Arthrobacter chlorophenicus* olarak teşhis edilmiştir. Bakterinin moleküler tanısı 16S rRNA/DGGE metodu ile yapılmıştır.

Adana, Batman ve Adıyaman`nın petrol ile kirlenmiş topraklarından 33 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakteri suşlarının ön tanımlaması, taksonomik sınıflaması, Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS), oksidaz ve %3 KOH testleri yapılmıştır. Ham petrollü besiyerinde en iyi üreme gösteren ve ham petrolü parçalama yeteneği en yüksek olan 6 bakteri suşu seçilmiştir. Eraydın-Erdoğan (2010) tarafından yapılan çalışmada bakterileri izolatları *Pseudomonas aeruginosa* (2 suş), *Pseudomonas putida biotype A* (2 suş), *Citrobacter amalonaticus-GC subgroup A*, *Acinetobacter genomospecies* olarak tanımlanmıştır. Besiyerinde en iyi gelişme gösteren bu 6 bakteri suşu kirletilmiş toprağa uygulanmış ve sonuç olarak 120 günlük inkübasyon sonrasında toprakta % 56 oranında petrol ayrışmasını sağlandığı bildirilmiştir.

Kumar ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada bakteri suşları Hindistan`ın Himachal Pradesh kentinde beş farklı benzin istasyonundan petrolle kirlenmiş topraklardan izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin anthracene parçalama yeteneklerine bakılmış ve bu amaçla % 0,5 pepton ve % 0,1 anthracene içeren zenginleştirilmiş Basal Salt Medium besiyeri kullanılmıştır. Pepton miktarı 0,25g ve 0,1g`dan 0,0 grama kadar düşürülmüştür. Zenginleştirilmiş besiyerinden 76 adet bakteri izole edilerek 5 tanesinin anthracene dirençli olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan *Pseudomonas* sp. suşunun anthracene parçalama kapasitesi % 74,8 olarak belirlenmiş yine bu izolatin cefadroxil ve ampicilline karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilen *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* genusundan 5 bakteri suşu Mirdamadian ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada petrol ve bazı aromatik hidrokarbonların varlığında büyüme yeteneği gösterdikleri için seçilmişlerdir. Büyüme oranları ve biyodegradasyon yetenekleri hafif yağ, ham petrol, anilin+katekol, toluen ve naftalin ile zenginleştirilmiş besiyerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak bu kültürlerin çevrede toksik olan farklı aromatik hidrokarbonların parçalamasını yapabildiği ortaya

çıkarılmıştır. Yine bu bakterilerin plazmit profilleri belirlenmiş ve bazı kültürlerde biyodegradasyon yapma yeteneği ile ilişkili plazmidler olduğu tespit edilmiştir.

Chile`de Valparaiso bölgesindeki kirli bir sahadan ham petrol ile kirlenmiş toprak örnekleri alınarak hidrokarbon parçalayan bakteriler tek karbon kaynağı olarak ham petrol ile zenginleştirilmiş Bushnell Haas besiyeri kullanılarak izole edilmiştir. Bakteri izolatları biyokimyasal ve moleküler testler yardımıyla tanımlanmışlardır. Mendez ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada izolatlar 16S rRNA gen sekans analizlerine göre; *Acinetobacter*, *Kocuria* ve *Pseudomonas* genusunun üyeleri olarak tanımlanmışlardır. Toluen/Ksilen bozunma yolu catechol 2,3-dioxygenase enzimini kodlayan xylE genine sahip *Acinetobacter*, *Kocuria* ve *Pseudomonas* genuslarında saptanmıştır. *Acinetobacter radioresistens* ve *Acinetobacter calcoaceticus* suşlarının tek karbon kaynağı olarak n-hexadecane`ı substrat olarak kullanırken *Pseudomonas stutzeri* suşunun naphthalene`de büyüme gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca civa, nikel, kurşun, kadmiyum ve bakır metallerine karşı bakteriyel tolerans analiz edilmiştir. *A. radioresistens* ve *A. calcoaceticus* suşlarının hidrokarbonla kirlenmiş alanlarla sıkça bağlantısı olan bakır ve kadmiyum metallerine karşı direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Sonuçlara göre *Acinetobacter* izolatlarının hidrokarbon parçalamada önemli suşlar olduğu ve ağır metallere karşı direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

Ramos ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada hidrokarbonla kirlenmiş alanlardan izole edilen bakterilerden biyosümfektan üretme kapasitesine sahip olanlar tanımlanmıştır. İzolatların biyosümfektan üretme kapasiteleri “Drop Collapse” yöntemi ile belirlenmiştir. Toplamda 324 adet bakteri suşu test edilmiş ve 17 tanesinin biyosümfektan ürettiği tespit edilmiştir. Biyosümfektan üreten 3 izolat dışında diğerlerinin *Pseudomonas* cinsine ait olduğu belirtilerek diğer üç izolatın *Acinetobacter*, *Bacillus* ve *Rhodococcus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; mikrobiyal biyosümfektanlar arasındaki moleküler yapı çeşitliliği de göz önüne alındığında biyosümfektanların çözünebilir deterjan, biyoremediasyon veya ticari amaçla farklı uygulama alanlarında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Hindistanın Tamil Nadu'nun Chennai şehrinde petrole kirlenmiş farklı alanlardan toprak örnekleri toplanmış ve bu örneklerden *Flavobacterium* spp. ve *Pseudomonas* spp. izole edilmiştir. Ayrıca bakterilerin benzen, hekzan, naftalin ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonları parçalamada ki etkilerine, parçalama esnasındaki optimum pH ve optimum üreme sıcaklıkları araştırılmıştır. Hemalatha ve Veeraminakandan (2011) yaptıkları bu çalışmada *Flavobacterium* spp. 2, *Pseudomonas* spp. 1 & 2 için optimum pH'ı 7 olarak tespit etmişlerdir. *Flavobacterium* spp. 1 & 2 ve *Pseudomonas* spp. 1 & 2 için optimum sıcaklık 40 °C ile 45 °C olarak belirlemişlerdir.

Escherichia fergusonii KLU01 suşu petrole kirlenmiş topraklardan izole edilmiştir. Sriram ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada; tek karbon ve enerji kaynağı olarak dizel yakıt kullanıp güçlü bir biyosümfektan üretebilen, ağır metal direncine sahip ve hidrokarbon parçalama özelliği olan bir tür olarak tanımlanmış buna ilaveten üretilen biyosümfektanın lipopeptit karakterde olduğu tespit edilmiştir. Biyosümfektanın minimum aktif dozu ve kritik misel konsantrasyonu sırasıyla 0,165 ± 0,08 µg ve 36 mg/ L olarak bulunmuş ve mükemmel bir çözücü olmasına rağmen ekstrem sıcaklık, pH ve NaCl, CaCl₂, ve MgCl₂ 'nin çeşitli konsantrasyonlarında inanılmaz bir kararlılık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bakterinin manganez, demir, kurşun, nikel, bakır ve çinkoya karşı dirençlilik göstermesinin yanısıra ve bu suşun potansiyel çevre ve endüstri uygulamaları, genellikle hidrokarbon parçalama ve ağır metal biyoremediasyonunda biyosümfektan üreticilerinin yeni bir sınıfını ortaya çıkardığı belirtilmiştir.

Kullanılmış motor yağı ile kirlenmiş topraklardan beş farklı bakteri izole edilmiş ve bu izolatların laboratuvar koşullarında kullanılmış motor yağını parçalama yetenekleri araştırılmıştır. Khan ve Asthana (2011) tarafından yapılan çalışmada izolatlar kullanılmış motor yağı ile zenginleştirilmiş Mineral Salt Medium besiyerinde üretilmiş ve MJAL1101 izolatının 7 günlük inkübasyon süresi sonucunda % 27.37 ile en iyi parçalama yeteneğine sahip olduğunu gözlemlemiştir. Bergey's Manuel'e göre izolatın *Bacillus megaterium* olarak tanımlandığı bildirilmiştir.

Poliaromatik hidrokarbonları parçalayan JY3A kodlu bakteri izolatu Çin'in Shandong eyaletinde Jinan Petrol Rafinerisinde kirlenmiş topraklardan izole

edilmiştir. Bu izolat 16S rDNA sekans analizi, DNA-DNA ilişkisi ve yağ asidi analizlerine ilaveten çeşitli fizyolojik özellikleri incelenerek *Bacillus vallismortis* olarak tanımlanmıştır. Bu bakterinin Gram pozitif, hareketli, endosporlu, aerob, oksidaz ve katalaz pozitif, hücrelerin 0,8-1,0 µm genişliğinde ve 2,0-2,5 µm uzunluğunda, tek veya çift bazende zincir halinde olduğu belirlenmiştir. Ling ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmaya göre; *B. vallismortis* JY3A suşunun tek karbon kaynağı olarak naphthalene, phenanthrene, anthracene, pyrene, fluorene, benzene, toluene, phenol, methanol, ethanol, Tween 80, cyclohexane ya da catechol'u kullanabildiği bildirilmiştir. Bakteri suşu tek başına % 0,5 (w/w) Tween 80'de 15 gün boyunca 150 ppm başlangıç konsantrasyonunda pyrenin % 90,5'ini ayrıştırabildiği belirtilmiştir.

Eddouaouda ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada biyosümfektan üreten *Staphylococcus* sp. 1E suşu Cezayir'de ham petrol ile kirletilmiş topraklardan izole edilmiştir. Biyosümfektan üretimi yüzey gerilim ölçümü kullanılarak ölçülmüştür. Bakteri suşu için en iyi substrat olarak ham petrol belirlenmiştir. Bu suş tarafından üretilen biyosümfektanın besiyeri yüzey gerilimini 30 dynes cm⁻¹ aşıya çektiği belirtilmiş ve üretilen biyosümfektanın *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* gibi patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Sudaki phenantrene'a biyosümfektan eklenmesi sonucunda phenantrene'nın parçalanmaya başladığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak üretilen biyosümfektanın hidrokarbonla kirletilmiş alanların biyoremediasyonunda uygulanabilir özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

Eskişehir'de sanayi bölgesinden hidrokarbonlar ile kirlenmiş alanlardan toprak örnekleri toplanıp 70 adet bakteri izole edilmiştir. Bakteri suşlarının biyosümfektan üretimi Drop Collapse yöntemi ile belirlenmiştir. Çelikdemir (2012) tarafından yapılan bu çalışmada izole edilen bakterilerden 33 tanesinin biyosümfektan üretebilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. En iyi biyosümfektan üreten 5 bakteri suşunu Mineral Salt Medium besiyerinde inkübe ettikten sonra yüzey gerilimlerini ölçmüştür ve 71,1 mN/m yüzey gerilimindeki saf su kontrolüne göre 33,6 mN/m olarak ölçülen yüzey gerilimi değeri ile D1 kodlu izolat etkin üretici olarak seçilmiştir. Etkin biyosümfektan üreten suş için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Optimizasyon sonucu olarak optimum karbon kaynağı glikoz derişimi 20g/L, azot kaynağı NH₄Cl ve azot miktarı 25 g/L, etkin C:N oranı 2:2,5 (w/w) olarak belirlenmiştir. 16S rRNA sekans sonuçlarına göre biyosürefektan üreten suşun %99 benzerlikle *Gordonia amicalis* olduğu tespit edilmiştir.

Çan Termik Santral bölgesinde belirlenen 4 istasyondan 345 bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bakterilerin *Enterobacter*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* genusuna ait olduğu belirlenmiştir. Ağır metal dirençliliğın ölçülmesi için MIC yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemde ZnCl₂, FeCl₃.6.H₂O, Pb(NO₃)₂ ve CuSO₄ metal çözeltileri 8µg/ml- 8192 µg/ml aralığında değışen konsantrasyonlarda besiyerine katılmıştır. Ağır metal dirençlilik testinde dirençli olan 37 türün tanımlaması Vitek II ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlaması yapılan 37 suşun plazmit profilleri çıkarılmış ve 18`inde plazmid olduğu belirlenmiştir. Ağır metale en yüksek direnci gösteren 2 suşun biyosorpsiyon çalışması yapılmıştır. Biyosorpsiyon için seçilen suşlar. (izolat 26) *Bacillus mycoides* ve (izolat 10) *Enterobacter cloacea* complex`dir. Biyosorpsiyon çalışması ICP cihazında gerçekleştirilmiştir. Biyosorpsiyon çalışmasında Fe, Zn, Pb ve Cu metalleri çalışılmıştır. *B. mycoides* (izolat 26) için çalışmada kullanılan metaller arasında biyosorpsiyon hızının en yüksekten düşüğe doğru sıralması Zn > Pb > Fe > Cu şeklinde gözlenmiştir. *E. cloacea* complex (izolat 10) için biyosorpsiyon hızının en yüksekten düşüğe doğru sıralaması Pb > Zn > Fe > Cu olduğu Dülger (2012) tarafından yapılan çalışmada tespit edilmiştir.

Acenaphthene ve fluorene parçalayabilme yeteneğindeki mikroorganizmaların izolasyonu için Petkim Petrokimya Holding A.Ş atık su arıtma ünitesinden örnekler alınmıştır. Toplanan örneklerden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi Saygılı (2012) tarafından yapılan bu çalışmada amaçlanılmıştır. İzole edilen bakterilerin *Arthrobacter protophormiae*, *Arthrobacter* sp. ve *Acinetobacter* sp. olduğu belirlenmiş ve HPLC analizleri ile bu bakterilerin biyoparçalama yetenekleri değerlendirilmiştir. Tanımlanan bakteri suşlarının fluorene`i biyoparçalama yeteneğı *A. protophormiae* %34, *Arthrobacter* sp. %72, ve *Acinetobacter* sp. için ise %15 oranında biyoparçalama yeteneğı gözlenmiştir. Acenaphthene için ise elde edilen sonuçlar *A. protophormiae* %80,

Arthrobacter sp. ise %71 oranında biyoparçalama etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Demirdöğen (2012) tarafından yapılan çalışmada yedi farklı tekstil fabrikası atık suyundan alınan örneklerden 33 farklı bakteri türü izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin biyosümfektan üretme yeteneği “ Drop Collapse” yöntemi ile belirlenerek 6 izolatın biyosümfektan üretebildiği tespit edilmiştir. Biyosümfektan üreten mikroorganizmalar sırasıyla *Sphingomonas paucimobilis*, *Citrobacter freundii*, *Pantoea* ssp., *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, ve *Escherichia coli* suşlarıdır. Üretilen biyosümfektanlar BS-I, BS-II, BS-III, BS-IV, BS-V ve BS-VI olarak kodlanmıştır. Fenol sülfirik asit yöntemiyle biyosümfektan miktarları belirlenmiştir. 10 gün boyunca izolatlar Mineral Salt Medium (MSM) besiyerinde 35⁰C`de inkübe edilmiş ve her 24 saatte bir ölçüm yapılmıştır. Suşların biyosümfektan üretim kapasiteleri BS-I 0,287g/L, BS-II 0,275 g/L, BS-III 0,263 g/L, BS-IV 0,261 g/L, BS-V 0,306 g/L ve BS-VI 0,585 g/L`dir. İnkübasyon süreci sonunda 0,585g/L elde edilen biyosümfektan ile en iyi biyosümfektan üreticisi olarak *Escherichia coli* seçilmiştir.

Karbon ve enerji kaynağı olarak naphthalene, phenanthrene ve pyrene kullanan bakteri suşları İran`da katı atık depolama alanlarından izole edilmişlerdir. Bakteri hücre yoğunluğu OD₆₀₀` de ölçülerek gözlemlenmiştir. Kafilzadeh ve Pour (2012) tarafından yapılan çalışmada ilk sonuçlar; poliaromatik hidrokarbonların gideriminde *Pseudomonas* sp. ve *Corynebacterium* sp. `nin diğerlerinden daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu iki bakterinin PAH bileşiklerinin varlığında 3. ve 5. gün aralığında en yüksek OD₆₀₀ değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. *Corynebacterium* sp. ve *Pseudomonas* sp. tarafından phenanthrene parçalama oranı sırasıyla %91,5 ve %83,2; pyrene parçalama oranı ise %79,4 ve %68,2 olarak bulunmuştur. İnkübasyonun 10. gününden sonra her iki suş tarafından naphthalene`nin tamamen tüketildiği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada izole edilen bakterilerin PAH ile kirletilmiş bölgelerde mikrobiyal popülasyonun arttırılmasında ve biyoremediasyon sürecinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Barauni petrol rafinerisinden toprak örnekleri alınıp laboratuvar koşullarında BP10, NJ2 ve P2 olarak kodlanmış 3 ayrı bakteri suşu izole edilmiştir. Singh ve ark.,

(2013) tarafından yapılan çalışmada izole edilen suşların MSM besiyerinde pyrene`in biyolojik parçalama yetenekleri araştırılmıştır. 50µg/ml pyrene içeren MSM besiyerinde 8 günlük inkübasyon sonucunda gelişen suşlar arasında NJ2 adlı izolat %60 pyrene parçalama oranı ile en iyi parçalayıcı olarak belirlemişler ve onu % 44 parçalama oranı ile BP10 takip etmiştir. En düşük parçalama oranı ise % 42 ile P2 adlı izolat ile elde edilmiştir. Pyrene parçalama esnasında catechol 1,2 dioxygenase (C12O) enzim aktivitesi catechol 2,3 dioxygenase (C23O) enzimi ile kıyaslandığında BP10`da 13 kat ve P2`de 17 kat arttırıldığı bildirilmiştir. Halbuki NJ2 suşunda C23O enzim aktivitesi C12O den 1,3 kat daha fazla arttırılmıştır. C12O enziminin BP10 ve P2 suşları tarafından pyrene parçalama esnasında büyük bir rol oynadığı bildirilmiş ve NJ2 suşunda C23O enzim aktivitesinin C120`den daha fazla biyoparçalanmaya katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Toplam petrol hidrokarbonları, uçucu petrol hidrokarbonları, toplam alkil benzenler ve poliaromatik hidrokarbonlar ile kirletilmiş topraklardan örnekler alınmış ve bakteriyal popülasyonların uzun süreli etkisi belirlenmiştir. Benedek ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada toplam poliaromatik hidrokarbonların miktarının artması sonucunda hydrocarbonoclastic bakterilerin çeşitliliğinin arttığı gözlemlenilmiştir. Bu bulgu α -, β -, γ - Proteobakterler, Aktinobakterler, Flavobacterler ve Bacil sınıflarının bulunmasıyla desteklenmiştir. Uçucu petrol hidrokarbonları ve toplam alkil benzenlerinin yüksek konsantrasyonları Aktinobakter izolatlarının baskın olarak bulunmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak poliaromatik hidrokarbonlardan etkilenen topraklarda bunların konsantrasyonlarının bakteri türlerinin çeşitliliği ile negatif bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Ağır şekilde poliaromatik hidrokarbonlarla kirletilmiş topraklarda β -, γ - Proteobakterleri ve Aktinobakterleri temsil eden türlerin bulunduğu bildirilmektedir.

Yanto ve Tachibana (2013) tarafından yapılan çalışmada ise; *Pestalotiopsis* sp. suşunun petrol hidrokarbonlarını biyolojik parçalamada rol oynadığı tespit edilmiştir. İzole edilen 72 adet bakteri asfalt içeren zenginleştirilmiş katı besiyerinde inkübe edilerek en aktif üreme gösteren izolat kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu izolat gen sekans analizi ve morfolojik özelliklerine göre *Pestalotiopsis* sp. NG007 olarak tanımlanmıştır. Bakteri suşu sıvı besiyerinde pH 4,5`da ve tuzlu koşullarda pH 8,2`de

30 günlük inkübasyon süreci sonunda % 48 – 96 arasında petrol hidrokarbon çeşitlerinin hepsini parçalayabilme yeteneği gösterdiği bildirilmiştir. Bakteri suşu n-decane, n-undecane, n-dodecane, n-tetradecane, n-pentadecane, n-hexadecane, n-octadecane, n-nonadecane, n-eicosane ve pristane içeren alifatik hidrokarbon karışımının biyodegradasyonu esnasında 15 metabolitin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Petrol hidrokarbonlarının varlığında hem dioksijenaz hemde lignilolitik enzim aktivitelerinin gözlemlendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak; *Pestalotiopsis* sp. NG007 suşunun petrolle kirletilmiş alanların biyoremediasyonu için potansiyel bir kaynak olduğu bildirilmiştir.

Dizel yakıt ile kirletilmiş topraklardan toprak örnekleri alınmış ve 50mg/L pyrene içeren zenginleştirilmiş Basal Salt Medium besiyeri kullanılarak bakteri izolasyonu Valsala ve ark., (2014) tarafından yapılmıştır. İzole edilen bakterinin 16S rRNA gen sekans sonucuna göre *Staphylococcus nepalensis* olduğu belirlenmiştir. Pyrene`in parçalanmasında pH, sıcaklık ve temas süresi gibi çeşitli parametreler optimize edilmiştir. Pyrene`in bozunma hızını arttırmak için farklı konsantrasyonlarda glukoz ve sukroz gibi karbon kaynaklarını incelemiştir. *S. nepalensis`in* pH:8 ve 30 °C`de beş günlük inkübasyonu sonucunda pyrene`nin en iyi parçalandığı belirtilmiştir. Bakterinin en iyi üremesi ve verimli pyrene parçalaması ortamına %4 glukoz ve % 2 sukroz eklenmesi sonucunda gözlenmiştir.

Zafra ve ark., (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise poliaromatik hidrokarbonları parçalayan mikrobiyal bir birliğin 3, 4 ve 5 benzen halkasına sahip poliaromatik hidrokarbonlar üzerindeki toleranslarına bakılmıştır. Yaptıkları bu araştırmada ham petrol ile kirletilmiş topraklardan mantar ve bakteri türlerini izole ederek bu izolatların morfolojik ve moleküler tanı sonucunda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Scedosporium*, *Acremonium* mantar genusları ve *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Kocuria* ve *Delftia* gibi bakteri genusları olduğunu saptamışlardır. Bakteri ve mantar izolatlarının sırasıyla phenantrene, pyrene ve benzo[a]pyrene gibi farklı molekül ağırlıklara sahip poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonlarına karşı toleransları araştırılmıştır. Bu izolatların 0-6000 mg/L`ye kadar poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonlarındaki üreme yeteneklerine

bakılmıştır. *Trichoderma asperellum* H15, *Aspergillus nomius* H7, *Aspergillus flavus* H6, *Pseudomonas aeruginosa* B7, *Klebsiella* sp. B10 ve *Stenotrophomonas maltophilia* B14 izolatlarının poliaromatik hidrokarbonların 6000mg/L konsantrasyonuna kadar dikkate değer yüksek bir tolerans gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu suşlar poliaromatik hidrokarbonları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmışlardır. Toplam 12 adet PAH toleransına sahip mantar ve bakteri suşu içeren mikrobiyal birliğin 14 günlük inkübasyon sonucunda phenantrene`ın % 87,76 sını pyrene`in % 48,18 ini ve benzo[a]pyrene`in % 56,55` ini kirlenmiş topraktan temizlediği bildirilmiştir. Sonuç olarak biyoremediasyon için yüksek bir potansiyel sunan mikrobiyal parçalama birliğinin yüksek molekül ağırlığına sahip poliaromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde yararlı olabileceği belirtilmektedir. Bu çalışma daha düşük konsantrasyonların denendiği diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında poliaromatik hidrokarbonların ekstrem konsantrasyonlarına yüksek tolerans gösteren bir mikrobiyal birlik olarak değerlendirilen ilk çalışma olduğu bildirilmiştir.

Hindistan`ın Meerut bölgesinde petrol ile kirlenmiş topraklardan petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve değerlendirilmesi Prakash ve ark., (2014) tarafından araştırılmıştır. Petrolle kirlenmiş topraklardan *Bacillus* sp. , *Pseudomonas* sp., ve *Micrococcus* sp. genuslarına ait türler olduğu biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi sonuçlarına göre belirlenmiştir. Bu izolatların benzen, dizel, toluen, anthracene ve naphthalene gibi petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğinde oldukları tespit edilmiştir. Seçilen suşlarla birlikte bir bakteri birliği belirlenmiş ve petrol hidrokarbonlarını parçalama kapasitesi ölçülmüştür. İzolatlar arasında *Pseudomonas* sp. APHP9 diğerlerine göre daha iyi parçalama performansı göstermiştir. Benzen ve toluenin en iyi parçalanması bakteri birliğinde gözlenmiştir. Sonuç olarak; *Bacillus* sp. APHP6, *Pseudomonas* sp. APHP9, *Pseudomonas* sp. APBP1, *Micrococcus* sp. APIO4 ve bakteriyel birlik benzen konsantrasyonunda sırasıyla % 54.8, %60.2, %40.9, % 32.5 ve %66.2 parçalanma gözlenmiş ve dizel konsantrasyonunda sırasıyla %61.2, %68.4, % 53.7, %39.3 ve %75.5 gözlendiği bildirilmiştir.

Hidrokarbon parçalayan bakterilerin xylene, phenanthrene, naphthalene, biphenyl ve anthracene gibi aromatik hidrokarbonları parçalayabilme yeteneklerinin belirlenmesi Mujahid ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada Karachi bölgesinden petrol ile kirletilmiş alanlardan alınan toprak örneklerinden izole edilen bakteriler ile araştırılmıştır. Petrol içeren zenginleştirilmiş Bushnell Hass besiyeri kullanılarak 12 bakteri izolatu elde edilmiş ve hepsinin hidrokarbonları parçalayabildikleri gözlenmiştir. Özellikle *Pseudomonas* sp. SA044`ün test edilen beş hidrokarbonuda parçalayabildiği belirtilmiştir. Çalışmada elde edilen *Burkholderia* sp., *Ralstonia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Micrococcus* sp. ve *Staphylococcus* sp. suşlarının üç yada daha fazla aromatik hidrokarbonu parçalayabilme kapasitesinde oldukları saptanmıştır.

Esedafe ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada rafineri atık sularındaki poliaromatik hidrokarbonların parçalanması amaçlanmıştır. Kirilenmiş toprak örnekleri Warri rafineri ve petrokimya şirketinden alınmış ve bakteri izolatlarının *Pseudomonas* sp. SB, *Achromobacter xylosoxidans* SBI ve *Pseudomonas* SB3 olduğu tespit edilmiştir. 360 saatlik inkübasyon sonucunda rafineri atık suyundaki poliaromatik hidrokarbonların bozunması % 97,90 ile en yüksek parçalama oranı karışık bakteri kültüründe gözlenerek bunu % 93 ile *Pseudomonas* sp. SB ve % 93,40 ile en düşük parçalama oranı gözlenen *A. xylosoxidans* SBI'nin takip ettiği bildirilmiştir.

Hindistanın Assam bölgesinde Sivasagar şehrinde Lakowa petrol sahasından ham petrol ile kirletilmiş alanlardan toprak örnekleri alınmıştır. İzole edilen bakteri 16S rDNA gen sekans analizine göre *Pseudomonas aeruginosa* KS3 olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda bu suşun poliaromatik hidrokarbon parçalama yeteneği araştırılmış ve biyosürefektan üretimi ise besiyerinin yüzey geriliminin azalmasına bakılarak ölçülmüştür. Patowary ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada sonuç olarak yerli biyosürefektan üreten bakteri suşunun toplam petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında büyük bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bakteri suşunun poliaromatik hidrokarbonları etkili bir şekilde parçaladığı kanıtlanarak ham petrol örneğinde mevcut olan başlıca 16 PAH arasından 8 tane poliaromatik hidrokarbonu tamamıyla parçalayabildiği belirlenmiştir.

Biyokimyasal ve FTIR analizi sonucunda üretilen biyosürefektanın doğada glikolipit yapıda olduğu tespit edilmiştir.

Petrol ile kirletilmiş topraklardan Gupta (2016) tarafından MJAG1501, MJAG1502, MJAG1503, MJAG1504 ve MJAG1505 olarak isimlendirilen 5 bakteri suşu izole edilmiştir. Beş izolatin hepsinin petrol parçalama potansiyelleri 10 gün süreyle %5 kullanılmış motor yağı içeren Mineral Salt Medium besiyerinde inkübe edilirken büyümeleri ve protein profilleri çalışılarak değerlendirilmiştir. MJAG1505 suşu inkübasyon süresi boyunca en fazla büyümeyi göstermiş yine MJAG1505 suşunu içeren erleninde protein konsantrasyonu en yüksek olarak tespit edilmiştir. Karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmış motor yağı denenmiş ve MJAG1505 no`lu bakterinin kullanılmış motor yağını en iyi şekilde parçaladığı belirtilmiştir. Bu izolat Bergey`s Manual`e göre *Bacillus megaterium* olarak tanımlanmıştır.

Wang ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada yeni bir phenanthrene parçalayan *Massilia* sp. WF1 suşu poliaromatik hidrokarbonlar ile kirletilmiş topraklardan izole edilmiştir. Bu izolatin pH 5,0-8,0 ve 20-35 °C sıcaklık aralığında ve 25-400 mg/L oranında phenanthrene parçalama yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Yine bu suş 28 °C` de pH 6`da optimum şartlarda 2 günlük inkübasyon sonunda phenanthrene`nin 100 mg/L`ini tamamen parçalayarak son derece etkileyici bir phenanthrene parçalama kabiliyeti göstermiştir. Sonuçlara göre phenanthrene parçalamanın kullanılan laktik asit ile inhibe edildiği fakat karbon ve hidrojen kaynağı olarak verilen glikoz, sitrik asit ve süksinik asit tarafından teşvik edildiğini göstermişlerdir. Salisilik asit ve ftalik asitin *Massilia* sp WF1 tarafından kullanılmadığı ve phenanthrene parçalamasına belirgin bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Sadece iki metabolit 1-hidroksi-2-naftoik asit ve ftalik asit phenanthrene parçalama sürecinde tanımlanmıştır. Nicel olarak, phenanthrene`nin yaklaşık % 27,7`si 1-hidroksi-2-naftoik asite çevrildiği ve ayrıca 1-hidroksi-2-naftoik asitin % 30,3`ü ftalik asite metabolize edildiğini tespit etmişlerdir. Ftalik asit metabolik yolu bozulmuş ve salisilik asit metabolik yolu ise *Massilia* sp. WF1 tarafından phenantrene parçalama sürecinde göz ardı edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmanın deneysel sürecinde aşağıda verilmiş olan materyaller kullanılmıştır.

3.1.1. Materyal Örnekleri

Toprak örnekleri 5-6 Şubat 2015 tarihinde; Kırşehir ilindeki Lastik Fabrikası, Mersin ilindeki Krom Fabrikası ve Mersin İli Kazanlı ve Karaduvar mevki Rafineri bölgesinden alınmıştır. Bakteriler bu bölgelerdeki petrol ve petrol türevi endüstriyel atıklarla kirlenmiş alanlardan alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir

Tablo 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı Bölgeler

<i>Toprak Örnekleri</i>	<i>İzolat Numaraları</i>	<i>Alındıkları Bölgeler</i>
9. Örnek	YH 9-1, YH 9-2, YH 9-4, YH 9-5, YH 9-6, YH 9-7, YH 9-8, YH 9-9, YH 9-12	Ataş Rafineri Eski Silo
10. Örnek	YH 10-1, YH 10-2, YH 10-3, YH 10-5, YH 10-6, YH 10-7, YH 10-8, YH 10-11, YH 10-12	Ataş Rafineri Eski Silo
11. Örnek	YH 11-1, YH 11-2, YH 11-3, YH 11-4, YH 11-5, YH 11-7	Krom Fabrikası
12. Örnek	YH 12-1, YH 12-2, YH 12-3, YH 12-4	Krom Fabrikası
13. Örnek	YH 13-1, YH 13-2, YH 13-3, YH 13-4, YH 13-5, YH 13-6	Lastik Fabrikası
15. Örnek	YH 15-2, YH 15-3	Lastik Fabrikası
16. Örnek	YH 16-1, YH 16-4, YH 16-6, YH 16-7	Lastik Fabrikası

Ham Petrol

İzmir Aliğa Tüpraş Petrol Rafineri`sinden temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kontrol Suşu

Bakterilere uygulanan deneylerde kontrol mikroorganizma olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no`lu suş kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1. Nutrient Agar

Bakterilerin izolasyonu ve bakterilerin +4 °C`de stoklanması için gerekli olan yatık agar besiyeri hazırlamada kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone	5,0
Meat ekstrakt	3,0
Agar-Agar	12,0

Çalışmada hazır besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinden 20 gram alınıp 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri otoklavda (Nüve OT 40L) steril edilmiş ve aseptik şartlarda steril petrilere dökülüp kontaminasyonunu kontrol etmek için bir gece 37 °C`de etüvde (Nüve EN 500) inkübe edilmiştir.

3.1.3.2. Nutrient Broth

Bakteri suşlarının aktifleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone	5,0
Meat ekstrakt	3,0

Hazır besiyerinden 8 gram alınıp 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra hazırlanan besiyeri deney tüplerine dağıtılmıştır. Besiyeri deney tüplerinin içerisinde steril edilmiştir.

3.1.3.3. Tryptic Soy Agar (TSA)

Bu besiyeri, üremesi az olan bakteri suşlarının izolasyonu esnasında daha iyi bir üreme gözlenebilmesi için kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone from casein	15,0
Peptone from soymeal	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar-Agar	15,0

Çalışmada hazır besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinden 40 gram alınıp 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri steril edilmiştir. Bu besiyeri aseptik şartlarda steril petrilere dökülüp kontaminasyonu kontrol etmek için bir gece 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB)

Bakteri suşlarının zenginleştirilmesi amacıyla ve aynı zamanda izolasyonda az üreme gösteren suşların daha iyi gelişebilmesi için kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Peptone from casein	17,0
Peptone from soymeal	3,0
D (+) Glucose monohydrate	2,5
Sodium chloride	5,0
di-Potasyum hidrojen phosphate	2,5

Hazır besiyerinden 30 gram alınıp 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra hazırlanan besiyeri deney tüplerine dağıtılarak steril edilmiştir.

3.1.3.5. Ham Petrol İçeren Zenginleştirilmiş Besiyeri

Toprak rnekleri zenginleştirilmiş besiyerine eklenerek ham petrol karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
KNO ₃	1,0
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	1,0

Yukarda belirtilen içerik 1 litre distile su ile zlm ve bu besiyerine %1 oranında Ham petrol:Triton-X-100 emlsifr (1:1) ilave edilmiştir. Besiyeri otoklavlandıktan sonra ham petrol eklenmiştir (Rojas ve ark., 1999, Eraydın-Erdoğan, 2010).

3.1.3.6. Mueller Hinton Agar

Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Infusion from meat	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar-Agar	13,0

Çalışmada; hazır besiyerinden 34 gram alınıp 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra besiyeri steril edilerek aseptik şartlarda steril petrilere dökülüp kontaminasyonunu kontrol etmek için bir gece 37 ⁰C'de etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.3.7. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyeri

Biyosürefektan varlığının saptanması amacıyla mikroorganizma üretimi için Zhang ve arkadaşları, tarafından önerilen Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanılmıştır (Zhang ve Miller, 1992; Zhang ve Miller, 1994). Mineral Salt Medium bileşenleri aşağıda verilmiştir (Yalçın, 2008).

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaNO ₃	4,0
NaCl	1,0
KCl	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ NPO ₄ .12H ₂ O	3,0
MgSO ₄	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,75
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,08
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,075
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5
H ₃ BO ₃	0,15
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05

MSM besiyeri pH: 6.8 (Hanna HI 2211) olarak ayarlanmış ve 121 °C`de 30 dakika otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.3.8. Stok Besiyeri

İzole edilen bakteri kültürlerinin saklanması için % 20 oranında gliserol içeren TSB (Tryptic Soy Broth) hazırlanmış ve 1,5 ml`lik ağzı kapaklı ependorf tüplerine yaklaşık 1.5 ml aktarılarak 121°C`de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Boyalar

3.1.4.1.Kristal Viyole

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Kristal Viyole	2,0
Amonyum Oksalat	0,8
Etil Alkol (% 95)	20 ml
Distile Su	80 ml

2 g kristal viyole ve 20 ml % 95`lik etil alkol içerisinde çözdürülmüştür. Diğer taraftan, 0,8 g amonyum oksalat 80 ml distile suda çözdürülerek bu iki çözelti birbirine karıştırılmıştır (Temiz 2010).

3.1.4.2. Safranin

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Safranin	0,5
Etil Alkol (% 95)	10 ml
Distile Su	100 ml

Safranin etil alkolde eritilip distile suda çözdürülmüştür (Temiz 2010).

3.1.4.3. Etidyum Bromür

DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Etidyum bromür	10,0
Distile Su	1000 ml

10 g etidyum bromür 1000 ml steril distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak iyice çözdürülmüştür.

3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.5.1. Lugol Çözeltisi (Gram İyot Çözeltisi)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
İyot	5,0
Potasyum iyodit	10,0
Distile Su	100 ml

Potasyum iyodit 30 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra iyot çözeltiye eklenmiş ve çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır (Temiz, 2010).

3.1.5.2. KOH Çözeltisi (%3'lük)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
KOH	3,0
Distile Su	100 ml

Madde distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.1.5.3. H₂O₂ Çözeltisi (%3'lük)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
% 30` luk H ₂ O ₂	10 ml
Distile Su	90 ml

% 30`luk konsantre hidrojen peroksit solüsyonundan 10 ml alınıp 90 ml distile su ilavesi ile % 3`e seyreltilmiştir.

3.1.5.4. Serum Fizyolojik

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	9,0
Distile Su	1000 ml

9 gram sodyum klorür, 1000 ml distile su içinde çözdürülmüştür. Erlenmayere konularak otoklavda steril edildikten sonra steril tüplere dağıtılmıştır.

3.1.5.5. Gliserol

Bakteri kültürleri için stok besiyeri hazırlamada kullanılmıştır.

3.1.5.6. Mineral Yağ

DNA izolasyonu ve biyosüpfektan üretiminin saptanmasında kullanılmıştır.

3.1.5.7. Tetrametil-p-fenilendiamin Çözeltilisi (%1`lik)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tetrametil-p-fenilendiamin	1,0
Distile Su	100 ml

Tetrametil-p-fenilendiamin 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

3.1.5.8. Etil Alkol (%70`lik)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
% 96`lık Etil Alkol	73 ml
Distile su	27 ml

73 ml %96`lık etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml`ye tamamlandı. Genomik DNA çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.5.9. STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) Tamponu

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tris	1,21
NaCl	1,75
EDTA	3,72

Karışım saf su içerisinde çözülmüştür. 1 N HCl ile pH'sı 8 olana kadar titre edilmiştir. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir.

3.1.5.10. %10`luk Sodium Dodecyl Sulfate Çözeltisi (% 10`luk SDS)

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Sodium Dodecyl Sulfate	10,0 g
Distile su	100 ml

10 gram Sodium Dodecyl Sulfate 100 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Çözelti otoklavda steril edilmiş ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.5.11. 5M NaCl Çözeltisi

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	29,22
Distile su	100 ml

29,22 g NaCl 100ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve otoklavda steril edilmiştir.

**3.1.5.12. %10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl
Çözeltisi**

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	4,09
CTAB	10,0
Distile su	100 ml

80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözülmüştür. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.5.13. Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) Çözeltisi

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Fenol	25 ml
Kloroform	24 ml
İzoamilalkol	1 ml

25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.5.14. Kloroform: izoamilalkol (24: 1) Çözeltisi

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Kloroform	24 ml
İzoamilalkol	1 ml

24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.5.15. TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8)Tamponu

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tris-HCL	0,3
EDTA	0,093
Distile su	250 ml

0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözülmüş ve pH=8'e ayarlanmıştır. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir (Orhan 2013).

3.1.5.16. Agaroz Jel (0,6'lık)

Plazmid DNA'nın yürütülmesi için kullanılmıştır.

3.1.5.17. Dimetil Sülfoksit (DMSO)

% 100'lük DMSO 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.5.18. 0,5XTBE Tamponu

100 ml 5xTBE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.1.5.19. 6X Yükleme Tamponu

100 ml için % 100'lük gliserolden 40ml alınıp, 0,1g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.6. Kullanılan Antibiyotikler

İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotikler bioanalyse marka olup kısaltma isimleri, antibiyotik isimleri ve grupları, içerdikleri antimikrobiyal madde miktarı ile etki ettiği mekanizmalar Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan Antibiyotiklerin Grupları ve Etki Mekanizmaları (Akkan, 2009)

<i>Kısaltma İsmi</i>	<i>Antibiyotikler</i>	<i>Grubu</i>	<i>Etki Mekanizması</i>
<i>NA, 30 µg</i>	<i>Nalidixic Acid</i>	<i>Kinolin</i>	<i>DNA giraz (topoizomerez II) enzimi inhibitörüdür.</i>
<i>IPM, 10 µg</i>	<i>Imipenem</i>	<i>Karbapenem</i>	<i>Bakteri duvarındaki penisilin bağlayan proteinlerden PBP- 1 ve PBP- 2`ye bağlanırlar. En geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiktirler.</i>
<i>CTX, 30 µg</i>	<i>Cefotaxime</i>	<i>Sefalosporin 3</i>	<i>Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.</i>
<i>GM, 10 µg</i>	<i>Gentamicin</i>	<i>Aminoglikozit</i>	<i>Protein sentezini inibe eder.</i>
<i>E, 15 µg</i>	<i>Erythromycin</i>	<i>Makrolid</i>	<i>Bakteri ribozomlarının 50S alt birimindeki 23S tRNA bağlanarak, aynı yere tRNA`nın bağlanmasını ve dolayısıyla peptid yan zincirin uzamasını önlerler.</i>
<i>TE,30 µg</i>	<i>Tetracycline</i>	<i>Tetrasiklin</i>	<i>30S alt birimine bağlanarak tRNA`nın bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önlerler.</i>
<i>CIP, 5 µg</i>	<i>Ciprofloxacin</i>	<i>Florokinolin</i>	<i>DNA giraz enzimini inhibe ederler.</i>
<i>C,30 µg</i>	<i>Chloramphenicol</i>	<i>Kloramfenikol</i>	<i>50S ribozomunu etkileyerek peptidil transferaz etkinliğini azaltırlar.</i>
<i>AM, 10 µg</i>	<i>Ampicilin</i>	<i>Aminopenisilin</i>	<i>Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.</i>
<i>F/M, 300 µg</i>	<i>Nitrofurantoin</i>	<i>Nitrofurantoin</i>	<i>Bakteride piruvattan asetilkoenzim A oluşmasına engel olurlar.</i>

3.1.7. Kullanılan Ağır Metaller

Her bir ağır metalin 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, konsantrasyonları hazırlanıp 0, 2 µm çapında steril filtre ile sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ağır metal dirençliliği için kullanılan metallerin moleküler formülleri şu şekildedir (Tablo 3.3):

Tablo 3.3. Kullanılan Ağır Metallerin Moleküler Formülleri

<i>Kullanılan Ağır Metal Tuzları</i>	
<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	<i>MnCl₂ 2H₂O</i>
<i>ZnSO₄ 7H₂O</i>	<i>HgCl₂</i>

3.2. Metod

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Toprak örnekleri Kırşehir ilindeki Lastik Fabrikası, Mersin ilindeki Krom Fabrikası ve Mersin İli Kazanlı ve Karaduvar mevki Rafineri bölgesinden alınmıştır. Bakterilerin izolasyonu amacıyla; 10 gr toprak örneği, 1 g KNO₃, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl₂, 1 g K₂HPO₄ içeren 1 L besiyerine % 1 oranında ham petrol: Triton-X-100 emülsiför (1:1) ilave edilerek besiyeri hazırlanmıştır. Toprak örnekleri 100 ml'lik besiyerleri içerisine konularak 3 gün boyunca 28 °C'de 180 dev/dak.'da çalkalayıcı inkübatörde (MAXQ 4450) inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü gün sonunda bu besiyerinden 10 ml alınarak tekrar aynı bileşenleri içeren taze ortama aktarılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlandıktan sonra (toplam 3 inkübasyon) en son inkübasyon örneklerinin 0,1 ml'si nutrient agarlı petrilere ekilmiş ve binoküler (Novex P-20) altında değişik koloni yapısı sergileyen bakteri izolatları seçilerek izolasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar tanımlanmak ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoğa alınmıştır (Rojas-Avelizapa ve ark., 1999; Eraydın-Erdoğan, 2010).



Resim 3.1. Petrol dolum boşaltım silosunun çevresi ve alınan toprak örnekleri



Resim 3.2. Ham petrol içeren steril besiyerleri



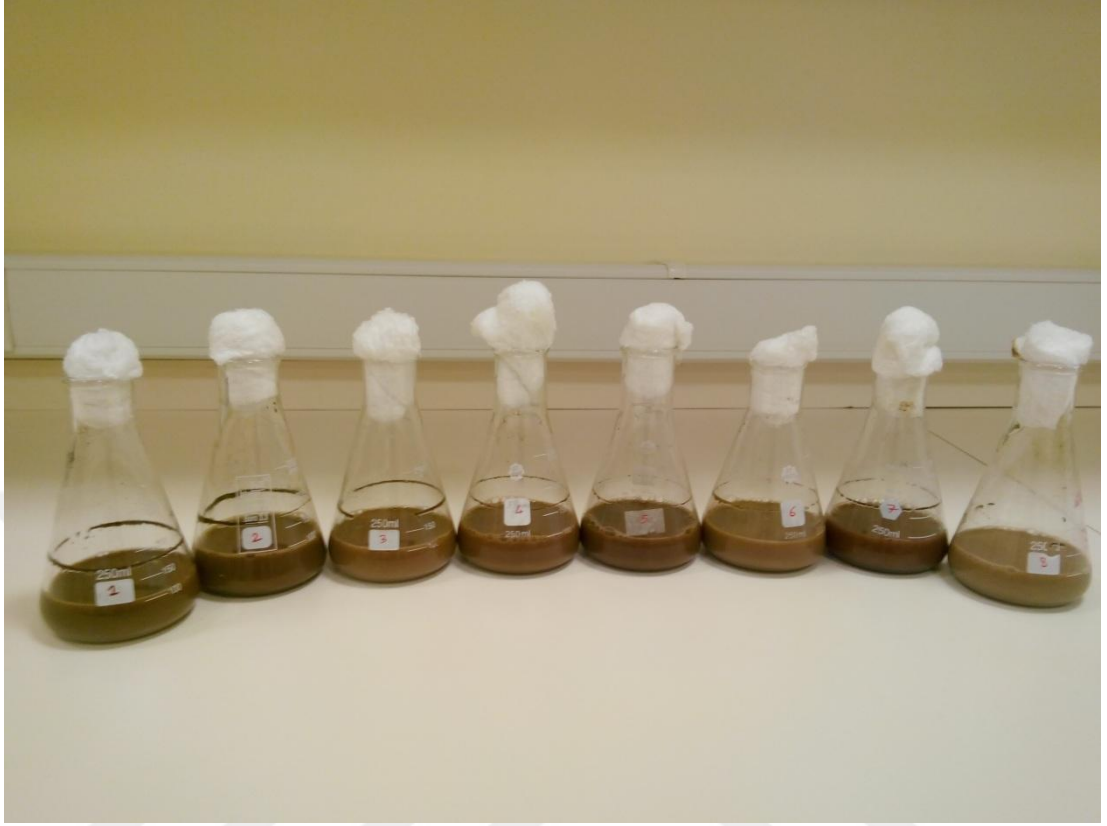
Resim 3.3. Toprak rneği eklenmiş ham petrol içeren besiyerleri



Resim 3.4. Çalkalayıcı inkübatör (180 rpm`de 28 °C`de 72 saat inkübasyon)



Resim 3.5. Inkübasyon sonrası ham petrol içeren steril taze besiyelerine aktarım



Resim 3.6. Üçüncü inkübasyon sonucundaki besiyerleri



Resim 3.7. Çizgi ekim ile izolasyon



Resim 3.8. Saf kültür eldesi

3.2.2. Bakterilerin Muhafaza Edilmesi

Nutrient broth besiyerinde 18 saat aktifleştirilen bakteri kültürleri daha sonra Nutrient agar katı besiyerine inoküle edilerek 37°C`de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden birer koloni alınarak %20`lik gliserol içeren TSB`li besiyerine aktarılmıştır.

Stok tüpleri daha sonra - 80°C`de (Nüve DF 490) muhafaza edilmiştir. İzolatlar altı ayda bir aktifleştirilmiş ve tekrar muhafaza edilmiştir.

3.2.3. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri

3.2.3.1. Kültür Özellikleri

Bakteriler gelişimlerine izin verecek besin ve mineral madde içeriğine sahip katı besiyerlerinde geliştirilirlerse kendilerine özgü koku, renk ve şekillerde gelişim gösterirler. Bu gelişim öğeleri mikroorganizmaların genetik kontrolü altında kalıtılır ve türe bağlı olarak değişiklik gösterir. Mikroskop olmaksızın çıplak gözle görülen gelişim özellikleri mikroorganizmaların tanınmasının ve tanılanmasının ilk basamağını oluşturması nedeniyle oldukça önemlidir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001; Bal, 2012) .

Bakteri izolatlarının kültürel özelliklerini incelemek için katı ortamlardaki saf kültürleri kullanılmıştır. Katı kültür özelliklerinin belirlenmesi için izolatlar geliştikleri katı besiyerlerine 3-4 faz çizgi ekim şeklinde ekilmiş, inkübasyona bırakılarak koloni meydana getirmeleri beklenmiştir. Oluşan koloniler, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi tespit edilmiştir (Temiz, 2010; Barış, 2008; Orhan, 2013).

3.2.3.2.Gram Boyama

Gram boyama sayesinde bakterilerin hücre duvarlarındaki farklılığın ortaya çıkması sağlanmıştır. Gram boyama için 18-24 saat boyunca Nutrient agarda gelişen kültürlerden preparat hazırlanmıştır (daha yaşlı kültürlerden yanlış sonuçlar alınabilir; Gram pozitif bakteriler Gram negatifmiş gibi değerlendirilebilir). Preparat havada kurutulup fikse edildikten sonra kristal viyole ile kaplanmış ve 1 dakika

bekletilmiştir. Süre sonunda bol damıtık su ile kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Yıkanan preparat lugol (Gram iyot çözeltisi) solüsyonu ile kaplanmış ve 1 dakika muamele edilmiştir (iyot mordant olarak görev alır). Lugol akitılarak preparat bol su ile yıkanmıştır. Preparatın üzeri % 96`lık etil alkol ile kaplanmış ve 10-15 saniye boyunca alkolde boya giderimi sağlanmıştır. Preparat hemen damıtık su ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra preparat safranin boyası ile kaplanmış ve 30-45 saniye bekletilmiştir. Süre sonunda bol damıtık su ile preparat yıkanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra preparat kurutma kağıdıyla kurutulmuştur. Işık mikroskopunun immersiyon objektifinde preparat üzerine sedir yağı damlatılarak hücreler incelenmiştir. Mikroskopik inceleme sonunda mor renkte görülen mikroorganizmalar Gram pozitif olarak değerlendirilirken pembe renkte görülenler Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2010).

3.2.3.3. % 3`lük KOH Testi

Gram boyama testini desteklemek amacıyla yapılan bu test Gram (-) bakterilerin % 3`lük KOH ile muamelesi sonucu, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve DNA`nın açığa çıkması nedeniyle, bir viskoz yapının oluşması esasına dayanır (Sezen, 2015).

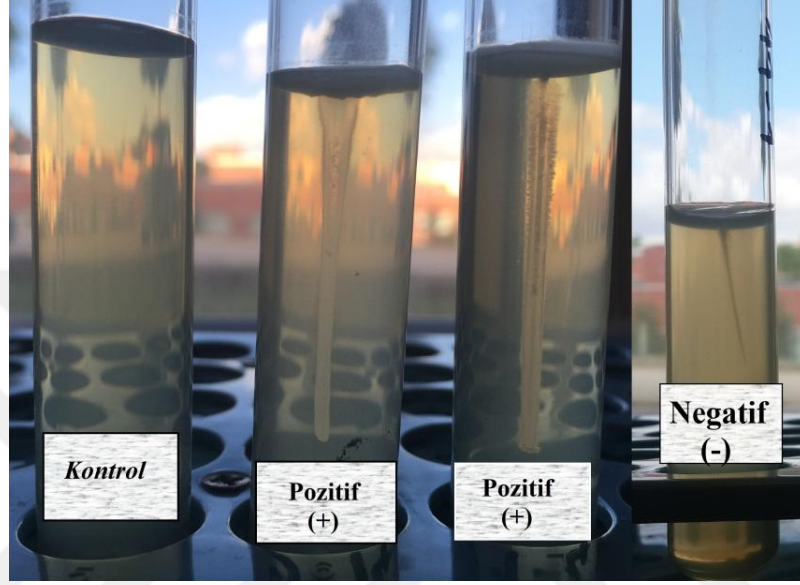
Temiz bir lam üzerine 1 damla % 3`lük potasyum hidroksit çözeltisi damlatılarak üzerine Nutrient agar da geliştirilen 24 – 48 saatlik bakteri kültürlerinden bir öze dolusu konulmuş ve bir cam çubukla karıştırılmıştır. Süspansiyondan cam çubuğu çekince bir uzama söz konusu ise KOH pozitif, uzama söz konusu değilse KOH negatif olarak değerlendirilmiştir. Uzama söz konusu olan izolatların Gram (-) olduğu kabul edilmiştir (Bal, 2012; Saygılı, 2012; Orhan, 2013; Hündür, 2015).

3.2.3.4.Hareketlilik Testi

Bazı bakteriler, flagella adı verilen hücre organelleri sayesinde aktif hareket yeteneğine sahiptirler. Bakterilerde hareket daha çok flagella varlığının belirlenmesi değil, hareketin gösterilmesi şeklinde ortaya konmaktadır (İpek-Erbey, 2015).

Hareket muayenesi yarı katı besiyeri ortamında yapılmıştır. İçerisinde % 0,4 – 0,5 agar bulunan dik nutrient agar besiyerine iğne uçlu öze ile dibe kadar düz bir hat boyunca ekim yapılmış ve 24-48 saat 32 °C`de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda, inokülasyon hattından sağa ve sola doğru bir dallanma var ise veya agarın içine doğru bir yayılma varsa mikroorganizma hareketli, besiyerinin yüzeyinde ve inokülasyon hattı boyunca üreme varsa, sağa ve sola doğru bir dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz olarak değerlendirilmiştir (Çelebi, 2012; Orhan, 2013 ; Öğütçü ve ark., 2014; İpek-Erbey, 2015).



Resim 3.9. Hareketlilik testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu

3.2.4. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testleri

3.2.4.1. Katalaz Testi

Genellikle aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırıştırır. Katı veya sıvı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne H_2O_2 ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla ortamdaki bakteride katalaz enziminin varlığını gösterir (Temiz, 2010).

Yatık Nutrient Agar`da $30^{\circ}C$ `de 24 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3` lük 1ml H_2O_2 çözeltisi damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt, 1981; Tamer ve ark. 1989; Temiz, 1994; Saygılı, 2012).

3.2.4.2.Oksidaz Testi

Bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle belirlenmiştir. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum olayında görev almakta ve elektron transfer sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla hücresel enerji (ATP) oluşumuna sebep olmaktadır. Test; organizmanın sitokrom-c oksidaz enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bakteride sitokrom c proteini varsa substratıyla reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. (Harley and Prescott, 2002; Adıgüzel, 2006; Bal, 2012; Sezen, 2015).

Bir parça filtre kağıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün %1`lik solüsyonunun birkaç damlası ile ıslatılarak 24 saatlik Nutrient agar kültüründen bir öze dolusu organizma, bir öze ile alınarak filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu test için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu solüsyon kullanılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır (Gerhardt, 1981; Tamer ve ark., 1989; Saygılı, 2012).

3.2.5. İzole Edilen Bakterilerin Moleküler Testleri

3.2.5.1.Bakteri Hücrelerinden Genomik DNA`ların İzolasyonu

Araştırmada kullanılacak olan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Adıgüzel 2006 tarafından uyarlanan izolasyon metoduna göre aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

- ✚ DNA`sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekilmiş ve petriler 28-32°C`ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- ✚ Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml`lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü eklenmiştir.
- ✚ Tüplerin 2500 rpm`de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.
- ✚ Vortekslenen tüpler 10 000 rpm`de 10 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atılmış ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu

eklenerek, 10 dk 10 000 rpm`de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edilmiştir.

- ✚ Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak pelletin üzerine 500 µl STE tamponu eklendikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek suretiyle tamponun pelletle iyice karışması sağlanmıştır.
- ✚ Tüpler 75 °C`ye ayarlı su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 15. dk`da tüpler alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübe edilmiştir.
- ✚ Su banyosundan çıkartılan tüplere 50 µl %10`luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40 °C`ye ayarlı su banyosunda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- ✚ İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5 M NaCl ve 0,1 hacim %10`luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA`yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) ilave edilmiştir.
- ✚ Tüpler 65 °C`ye ayarlı su banyosunda 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- ✚ Su banyosundan alınan tüplere eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Fenol proteinleri çok iyi ayırır. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıyla çalkalanmıştır.
- ✚ Tüpler 16 000 rpm`de 15 dk santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere konulmuştur. Her bir tüpe 0,1 hacim %10CTAB / 0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elimine etmede kullanılır) ilave edilmiştir.
- ✚ 65 °C`ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dk bekletilmiştir.
- ✚ Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol ilave edilmiş ve tüpler 15 dk oda sıcaklığında, çalkalayıcıyla karıştırılmıştır.
- ✚ Tüpler bir daha 16 000 rpm`de 15 dk santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz tekrar yeni steril bir ependorfa konulmuştur.
- ✚ Tüpler üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA`yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) ilave edilmiştir.

- ✚ Tüpler -20 °C`de 1 gece süresince bekletilmiştir.
- ✚ Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.
- ✚ Üzerine -20 °C`de bekletilen %70 lik etanolden (DNA`yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklenmiş ve 15 000 rpm de 15 dk süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı dikkatlice atılmıştır.
- ✚ Peletin üzerine tekrar %70`lik etanolden 500-600 µl ilave edilerek, 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılarak tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA`nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✚ Kuruma işlemi gerçekleştikten sonra, DNA`lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, iyice çözümleri sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNase eklenmiştir.
- ✚ DNA`lar %0,6`lık agaroz jelinde yürütülmüş ve jelde tek parça bant veren örnekler + 4 °C`ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için saklanmıştır (Orhan 2013).

3.2.5.2. Bakteri İzolatlarının 16S rDNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

Test izolatlarından elde edilen genomik DNA`lardan, bakteri sistematigi için önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Orhan 2013).

3.2.5.3. Reaksiyonun (Master mix`in) Hazırlanması

PCR`ı yapılacak her bir örnek için 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 3 µl UNI 16S-L (forward ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA), 3 µl 16S-R (reverse ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA), 1.2 µl DMSO, 0.6 µl MgCl₂(50 µM), 0.3 µM / ml *Taq* DNA polimeraz ve 15.3 µl sdH₂O ile 27 µl`lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) ilave edilerek son hacim 30 µl`ye tamamlanmıştır. Master mix ve template DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek için 15 µl mineral yağ eklenmiştir (Orhan 2013).

3.2.5.4. PCR Programı

PCR için hazırlanan örnekler, 95 °C`de 2 dk ön denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94 °C`de 1 dk denatürasyon, 54 °C`de 1 dk bağlanma ve 72 °C`de 2 dk uzama basamakları ve son olarak 72 °C`de 5 dk uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına konuldu. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı (Orhan, 2013).

3.2.5.5. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektrofrez

1.50 gr agaroz üzerine 150 ml 0.5X TBE (%1`lik agaroz jel) tamponu eklenerek karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50 °C`ye kadar soğutulan agaroz jele 0.8 µg/ml olacak miktarda ethidium bromür eklenerek içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektrofrez jel küvetine dökülmüştür. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlanmış, donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmış ve içerisinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektrofrez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500 2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektrofrez jel düzeneğı 90 volta ayarlanarak örnekler 2 saat yürütülmüştür. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilmiştir (Orhan, 2013).

3.2.5.6. 16S rDNA Sekans Analizi

16S rDNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilerinin analizi, Hollanda`da bulunan Macrogen firmasına gönderilerek yapılmıştır. Elde edilen 16S rDNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Orhan 2013).

3.2.6. Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Antibakteriyal hassasiyet testi, agarda disk difüzyon testi ile 10 farklı antibiyotik grubunu temsil eden antibiyotik diskler ile Mueller Hinton Agar kullanılarak belirlenmiştir.

Kullanılan antibiyotikler; Ampicilin (AM, 10 µg), Nalidixic acid (NA, 30 µg), Chloramphenicol (C, 30 µg), Tetracycline (TE, 30 µg), Nitrofurantoin (F/M, 300 µg), Gentamicin (GM, 10 µg), Imipenem (IPM, 10 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Cefotaxime(CTX, 30 µg) ve Erythromycin (E, 15 µg) dir.

Antibakteriyal etkinin doğrulanması için referans suş olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır (NCCLS, 1997; Akkan, 2009).

İzolatlar Nutrient broth besiyerlerinde aktifleştirilerek 0,5 McFarland'a ayarlanıp Mueller Hinton Agara yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Bakterilerin farklı yapılarını etkileyecek olan antibiyotik diskleri bir pens yardımıyla ekim yapılmış olan besiyeri üzerine belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Ekim ve antibiyotiklerin yerleştirilmesinden sonra petriyerler 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları ölçülmüş ve not edilmiştir.

3.2.7. Ağır Metal Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi

Ağır metal dirençliliklerin belirlenmesinde well difüzyon yöntemi kullanılmış ve oluşan zon çapları ölçülmüştür (Nithya ve ark., 2011). Daha önce düşük konsantrasyonlarla yapılan ön denemeler sonucunda verimli sonuç alınmadığı için konsantrasyonlar 5mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olarak belirlenmiştir. Bu sayede en yüksek dirence sahip mikroorganizmalar seçilebilecektir. Metallerin sulu çözeltileri besi ortamına eklenmeden önce steril filtre (PTFE 0, 2 µm çapında) ile steril edildikten sonra besiyerine konulmuştur. Kullanılan metallerin molekül formülleri $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve HgCl_2 dir. Kontrol mikroorganizma olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart suşu seçilmiştir. Denenen bakteri suşları kontrol mikroorganizmanın direnç değerlerinden daha yüksek bir ortamda üreme gösterirse dirençli sayılmıştır.

Bakteri izolatları aşılınmış Mueller Hinton Agarlı besiyerlerinde kuyucuk açmak için steril içi boş 6 mm ağız çapına sahip küçük bir metal aparat kullanılmıştır. Öncelikle aparatın ağız kısmı etil alkole daldırılmış ve daha sonra alevden geçirilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra aparat dik vaziyette besiyerinin dibine kadar daldırılmış ve kendi eksenini etrafında hafifçe sağa ve sola döndürülmüştür. Bu hareketle agarlı besiyeri halka şeklinde kesilmiştir. Aparat yine dik vaziyette besiyerinden çıkarılmıştır. Bu işlem sonrasında, kesilmiş agarlı besiyeri çoğunlukla aparatın içine geçer ve aparatla birlikte uzaklaştırılır ve böylece de besiyeri içinde bir kuyucuk açılmıştır. Kesilmiş agarlı besiyeri aparat içine geçmediği takdirde, bu kesik kısım etil alkol kullanılarak alevde sterilize edilmiş bir pens yardımıyla besiyerinden aseptik koşullarda uzaklaştırılmıştır (Temiz, 2010).

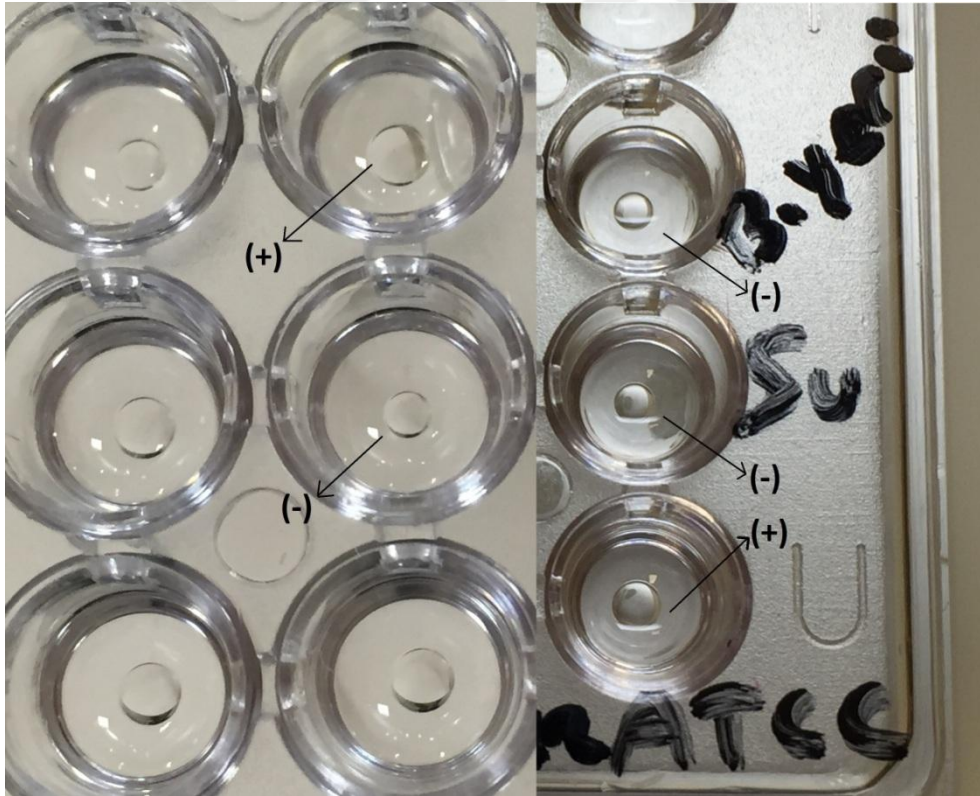
Besiyerinde yukarıda anlatıldığı şekilde hareket edilerek uygun aralıklarla ve belli sayıda delikler açılmıştır. Petri kutusundaki agarlı besiyerinde, kontrol de dahil olmak üzere 5 delik açılmıştır. Ortadaki kontrol ve yanlarda ikişer paralel olmak üzere 4 delik açılmıştır. Deliklerin her ikisine aynı madde uygulanarak çalışmanın ikişer paralel olarak ilerlemesi sağlanmıştır. Bir numaralı besiyerine 5mM ve 10 mM ağır metal solüsyonları ve kontrol olarak çözücü madde eklenmiştir. İki numaralı besiyerine 15mM ve 20mM ağır metal solüsyonları konulmuş ve besiyerlerinin orta kısmına kontrol olarak çözücü madde eklenmiştir. Ağır metal solüsyonlarının eklenmesinden sonra besiyerleri 37⁰C`de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülüp not edilmiştir.

3.2.8. Biosürefektan Üretimi İçin Ekim ve Kültürasyon

Modifiye edilmiş bir yöntemle biosürefektan üretimi için ekim ve kültürasyon gerçekleştirilmiştir. Daha önceden hazırlanan stok kültürler Tryptic Soy Broth besiyerine ekim yapılarak aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen suşlar Mineral Salt Medium besiyerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. Inkübasyon 35⁰C` de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (Thermo MAXQ 4450) gerçekleştirilmiştir (Yalçın, 2008).

3.2.9. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Varlığının Saptanması

Mikroorganizma kùltùrlerinde biyosùrfektan üretiminin belirlenmesi için Bodour ve Miller, 1998`de rapor ettiği "Drop Collapse" yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem için 96 kuyucuğa (microwell plate) sahip bir platform kullanılmıştır. Kùltürler 10000 rpm`de 20 dakika süre ile santrifüjlenecektir (Micro CL 17). Santrifüjleme sonrasında süpernant Millipore Filtrasyon sistemi (PTFE 0,2 µm) ile filtre edilmiştir. Elde edilen son filtrat biyosùrfektan varlığı için test sıvısı, steril su ve ekim yapılmamış besiyeri ise kontrol sıvısı olarak kullanılmıştır. Drop Collapse yöntemi için ilk olarak kuyucuklar 7 µl mineral yağ ile kaplanarak bir gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Test ve kontrol sıvılarından alınan 25µl`lik örnekler 45°C`lik açılı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma ya da stabil kalma durumları gözlenerek biyosùrfektan varlığı değerlendirilmiştir (Yalçın, 2008).

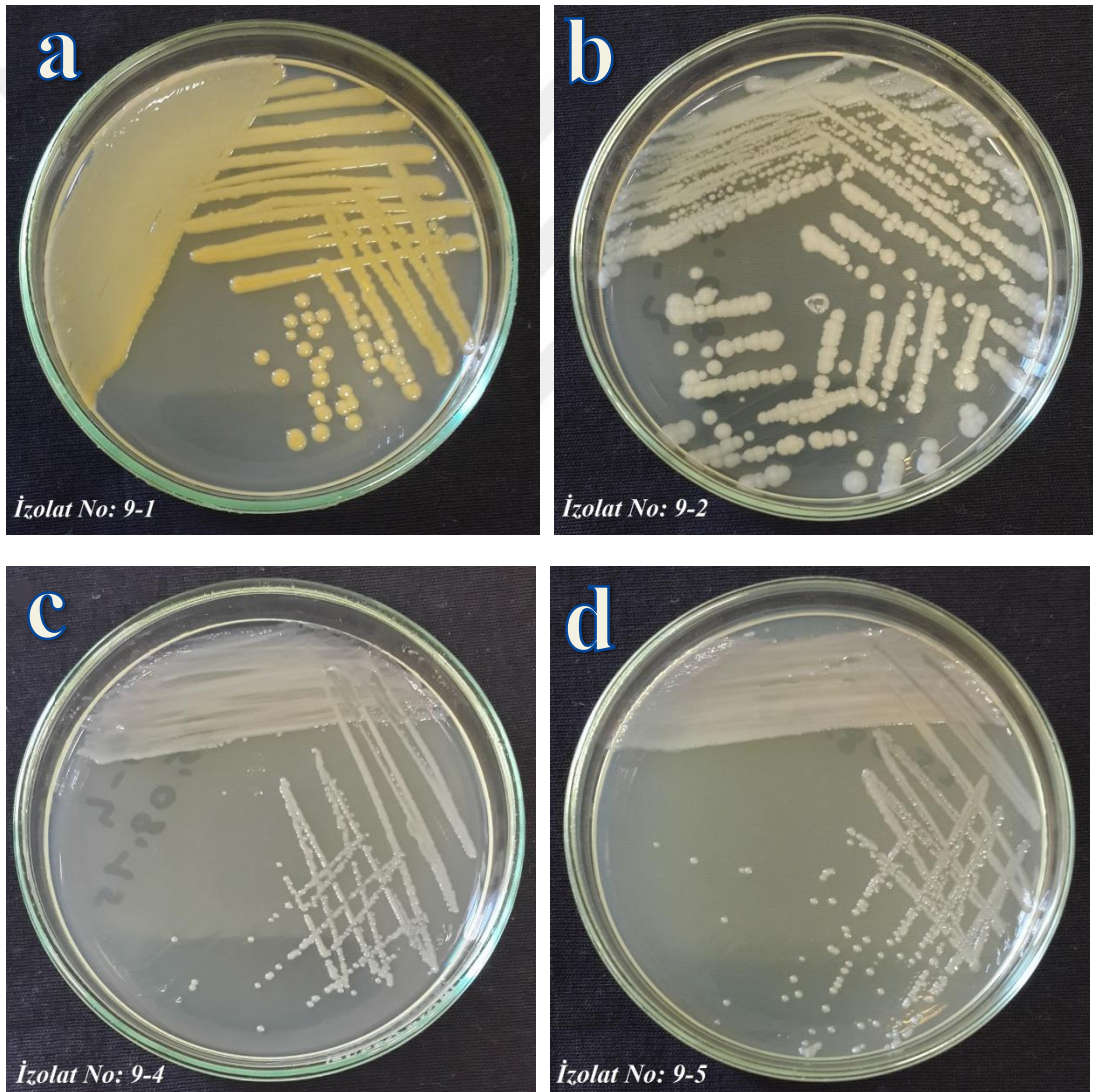


Resim 3.10. Drop Collapse testine göre (+) ve (-) sonuç veren örnekler ve kontrol grubu

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

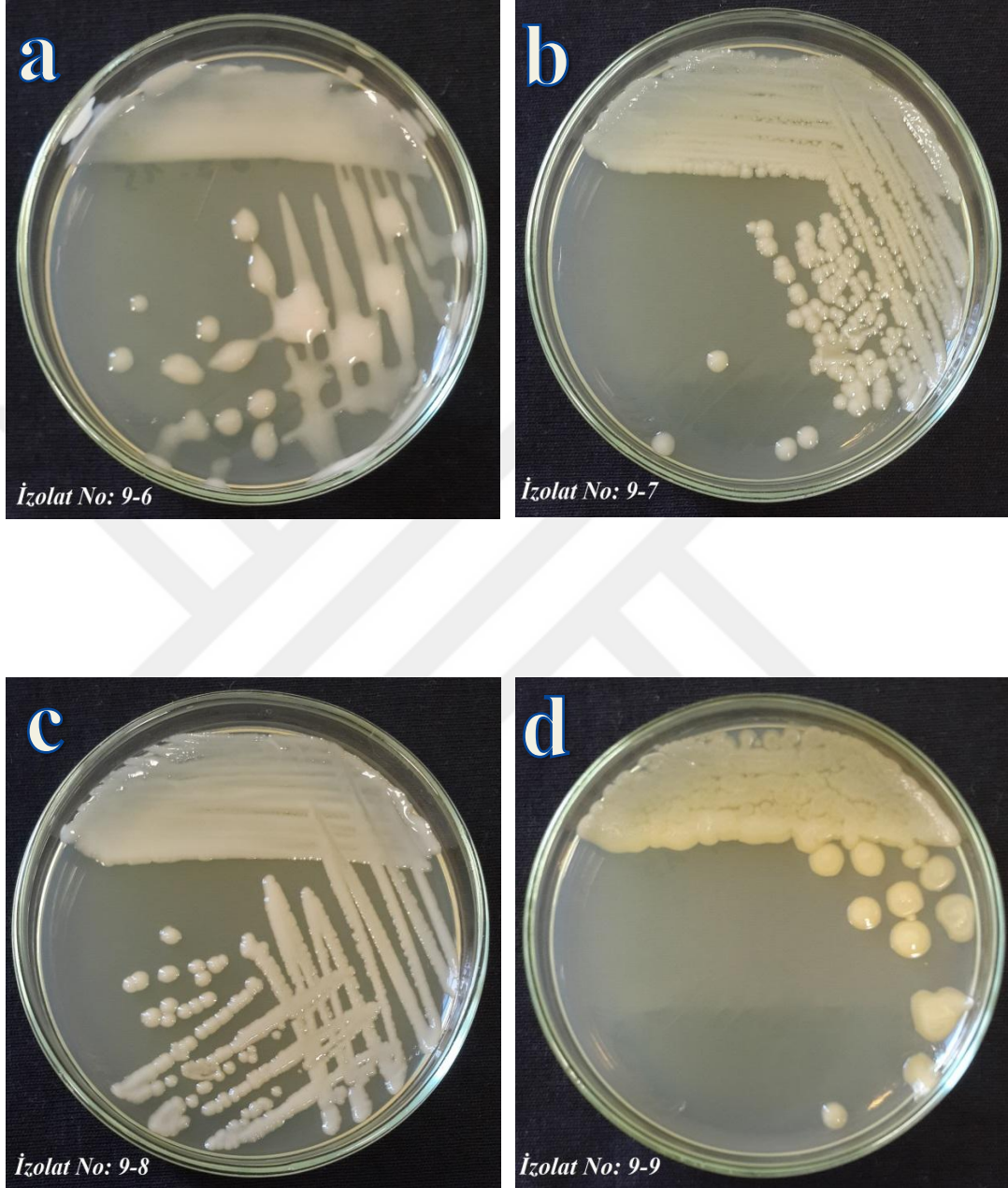
4.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışmada Kırşehir ilindeki Lastik Fabrikası'ndan alınan toprak örneklerinden 12 adet, Mersin Krom Fabrikası'ndan alınan toprak örneklerinden 10 adet ve Mersin ili Kazanlı ve Karaduvar mevkiinde rafineri bölgesinden alınan toprak örneklerinden 18 adet bakteri izolatu olmak üzere toplam 40 adet bakteri izole edilmiştir. Alınan toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin TSA besiyerinde gelişmelerinin fotoğrafları Resim 4.1. - Resim 4.10.'da gösterilmiştir.



Resim 4.1. a. Tanımlanmamıştır (YH9-1) b. *Bacillus megaterium* (YH9-2)

c. *Diaphorobacter* sp. (YH9-4) d. *Diaphorobacter* sp. (YH9-5)

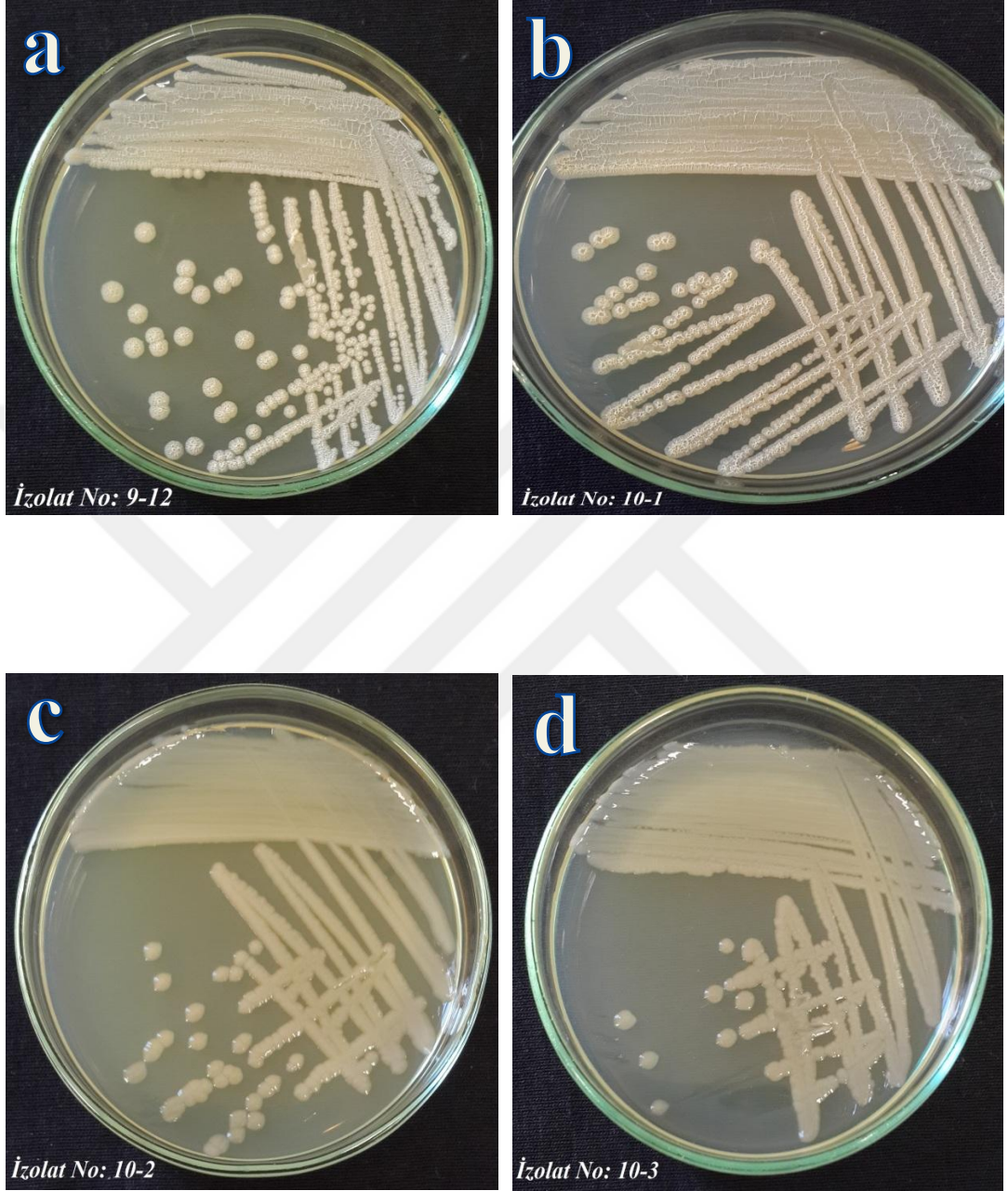


Resim 4.2. a. *Cupriavidus* sp. (YH 9-6)

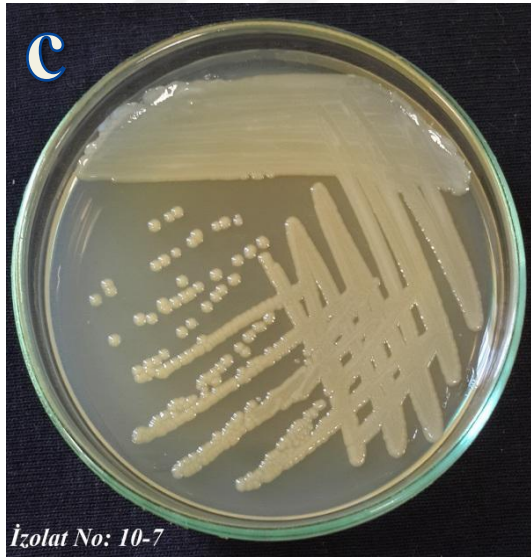
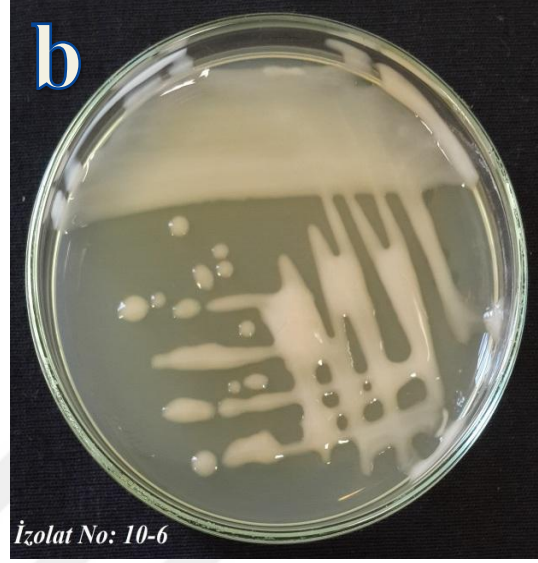
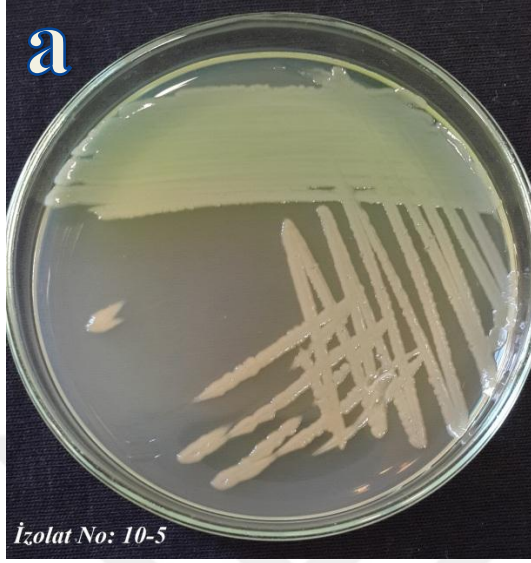
b. Tanımlanmamıştır (YH 9-7)

c. *Acinetobacter calcoaceticus* (YH 9-8)

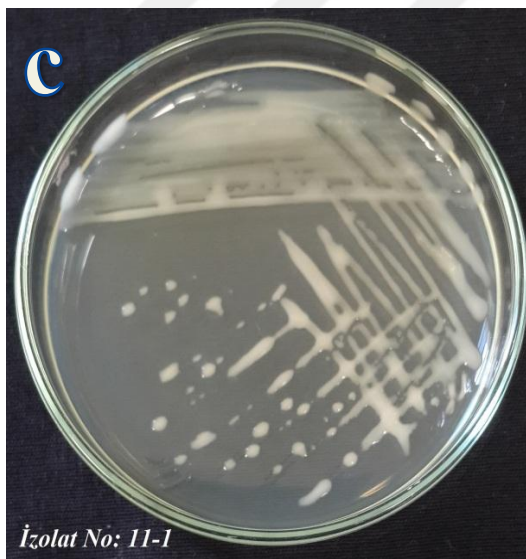
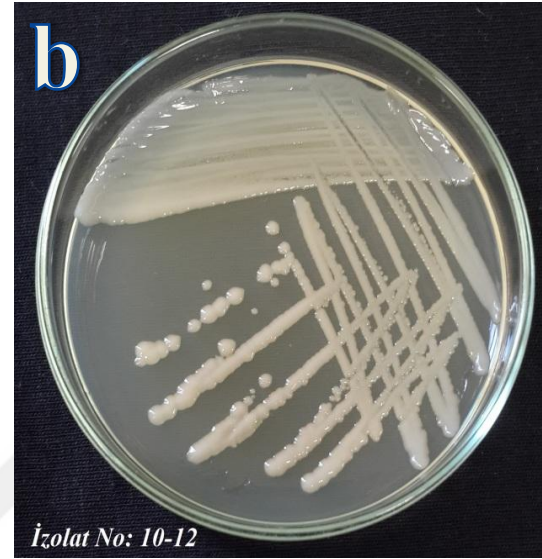
d. Tanımlanmamıştır (YH 9-9)



Resim 4.3. a. *Bacillus megaterium* (YH 9-12) **b.** Tanımlanmamıştır (YH 10-1)
c. Tanımlanmamıştır (YH 10-2) **d.** Tanımlanmamıştır (YH 10-3)

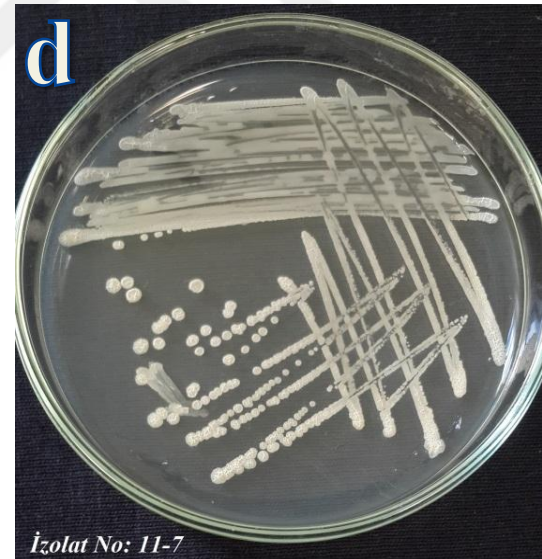
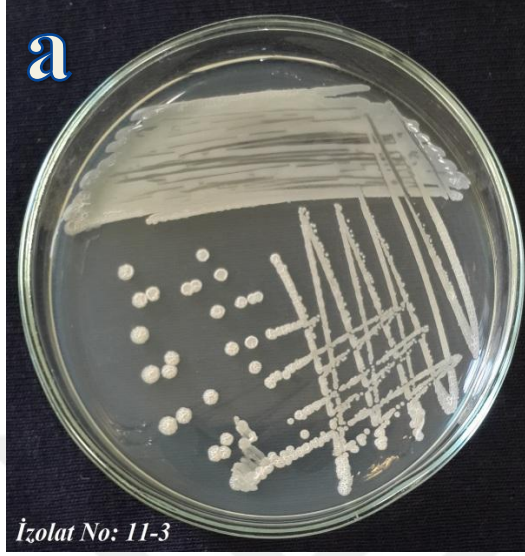


Resim 4.4. a. Tanımlanmamıştır (YH 10-5) **b.** Tanımlanmamıştır (YH 10-6)
c. Tanımlanmamıştır (YH 10-7) **d.** Tanımlanmamıştır (YH 10-8)



Resim 4.5. a. *Bacillus subtilis* (YH 10-11) b. *Acinetobacter calcoaceticus* (YH 10-12)

c. *Cupriavidus* sp. (YH 11-1) d. *Acinetobacter calcoaceticus* (YH 11-2)

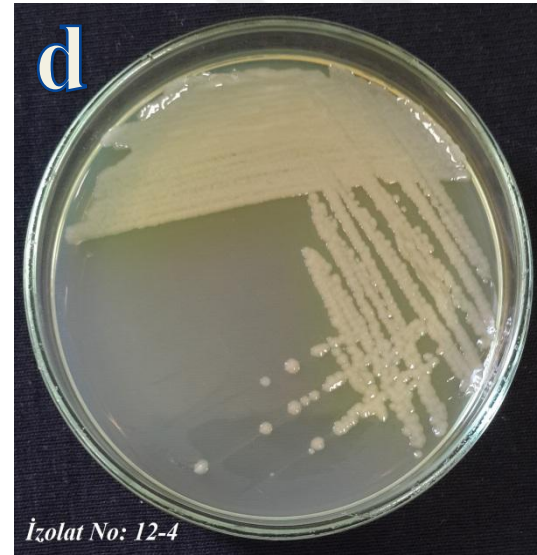
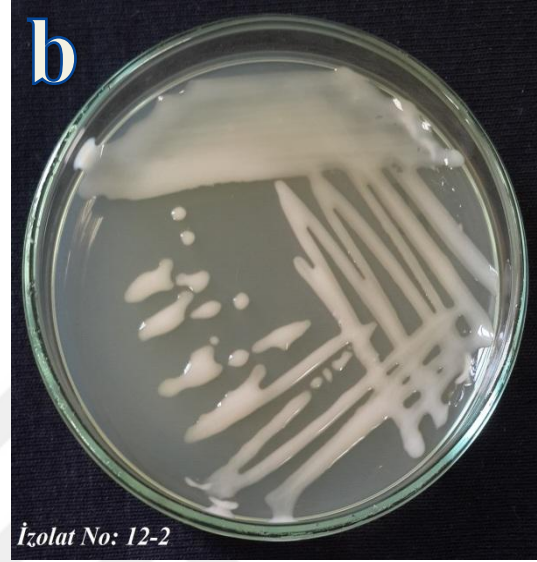
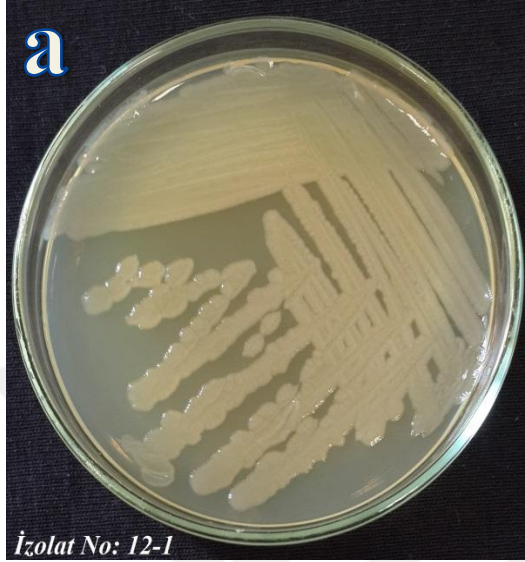


Resim 4.6. a. Tanımlanmamıştır (YH 11-3)

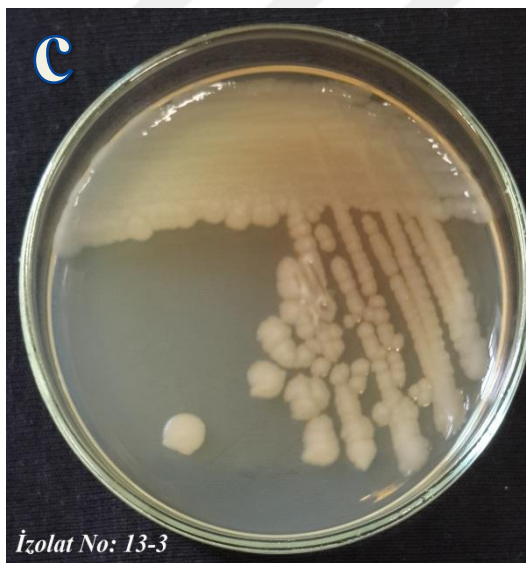
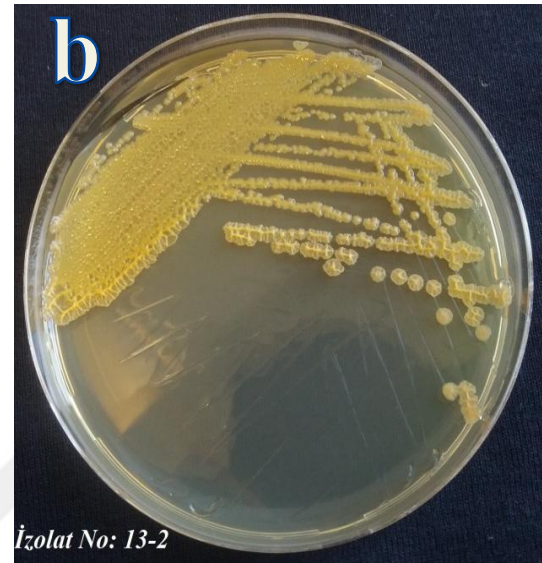
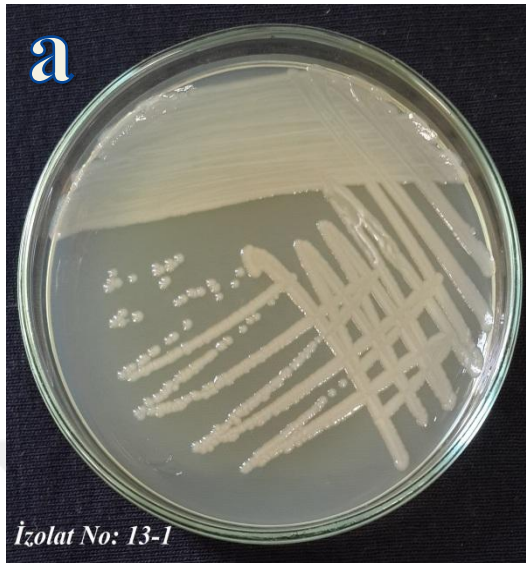
b. Tanımlanmamıştır (YH 11-4)

c. Tanımlanmamıştır (YH 11-5)

d. Tanımlanmamıştır (YH 11-7)

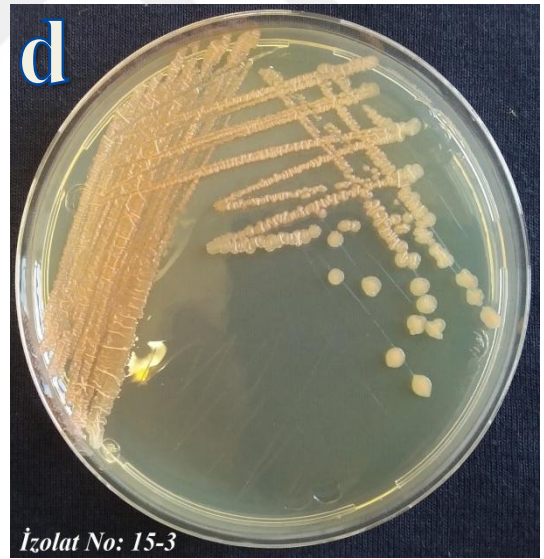
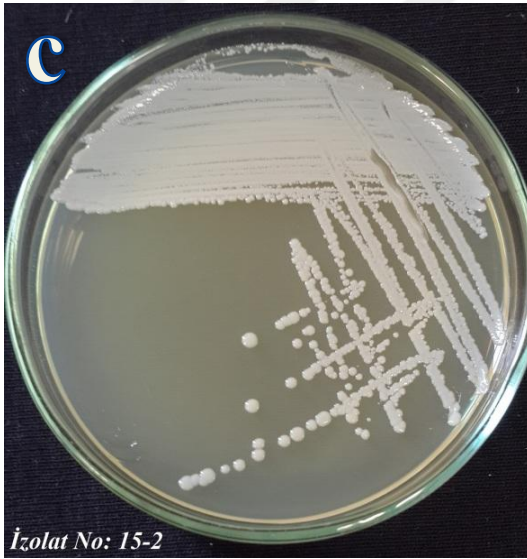
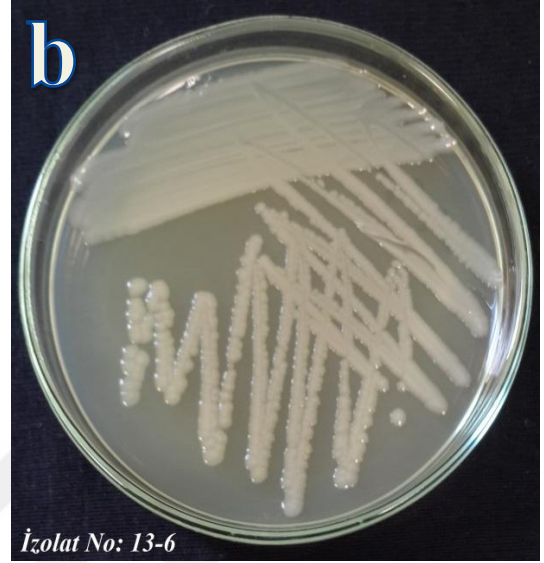
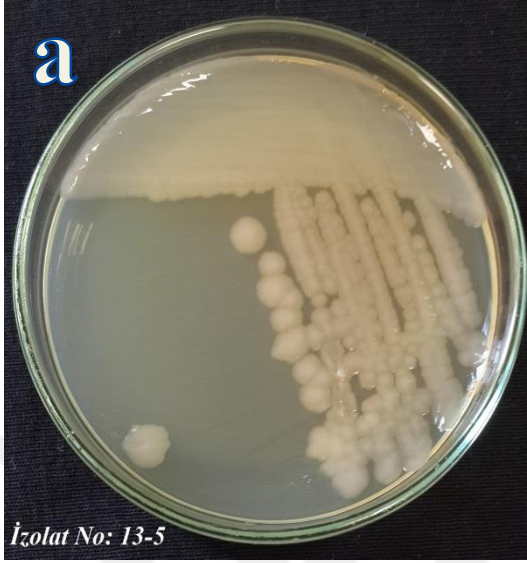


Resim 4.7. a. Tanımlanmamıştır (YH 12-1) **b.** Tanımlanmamıştır (YH 12-2)
c. Tanımlanmamıştır (YH 12-3) **d.** Tanımlanmamıştır (YH 12-4)



Resim 4.8.

- a.** *Achromobacter xylosoxidans* (YH 13-1) **b.** *Massilia alkalitolerans* (YH 13-2)
c. *Bacillus simplex* (YH 13-3) **d.** *Massilia alkalitolerans* (YH 13-4)

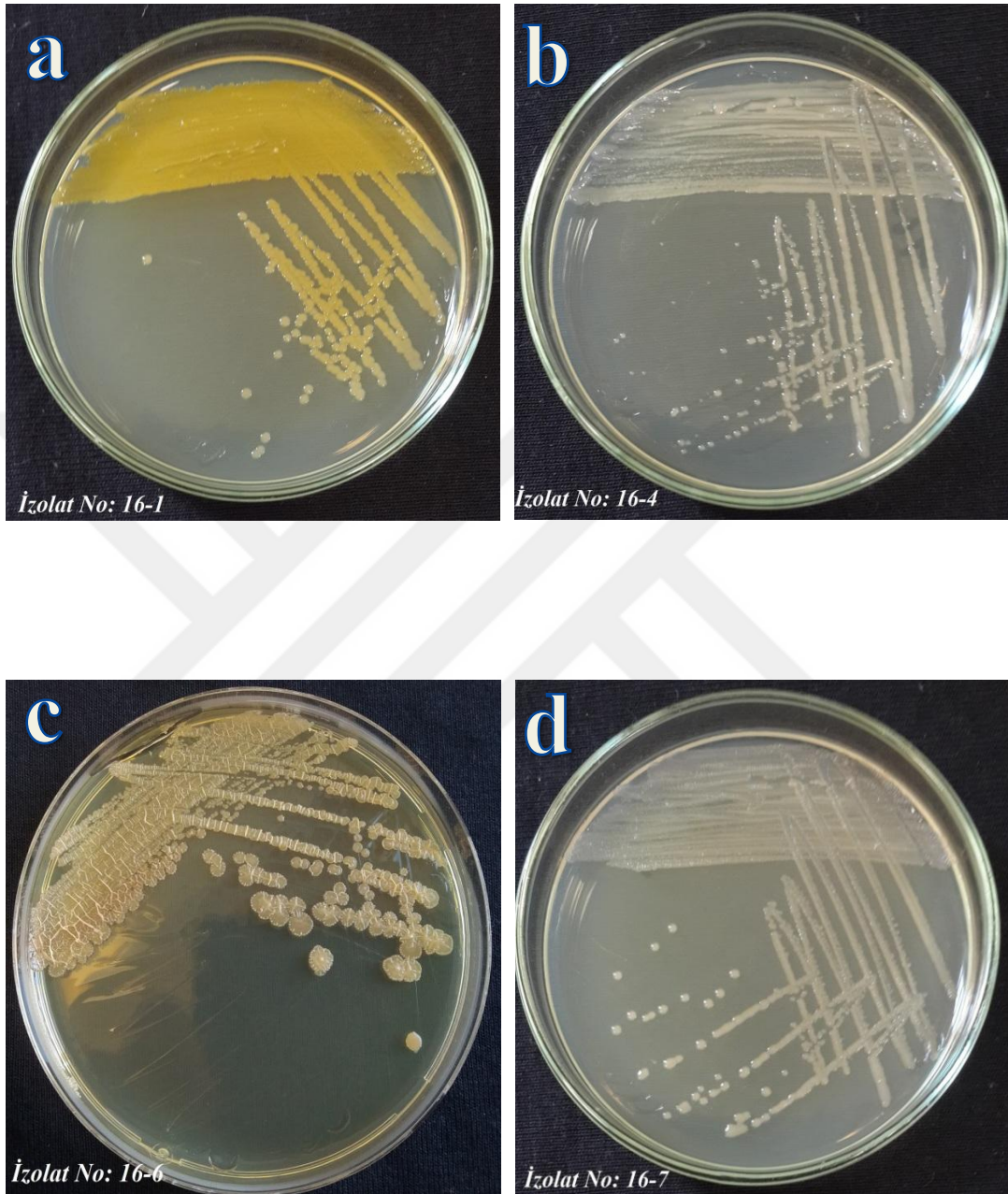


Resim 4.9. a. *Bacillus simplex* (YH 13-5)

b. Tanımlanmamıştır (YH 13-6)

c. *Staphylococcus* sp. (YH 15-2)

d. *Azospirillum brasilense* (YH 15-3)



Resim 4.10. a.*Massilia alkalitolerans*(YH16-1) **b.** *Azospirillum brasilense* (YH16-4)
c. *Azospirillum brasilense* (YH 16-6) **d.** *Azospirillum brasilense* (YH 16-7)

4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri

İzole edilen bakterilerin koloni renkleri ve koloni şekilleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Bakteri izolatlarının Tablo 4.1. 'deki sonuçlarına göre 25 adet S tip koloni, 12 adet R tip koloni, 2 adet M tip koloni ve 1 adet L tip koloni gözlemlenmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların Kültür Özellikleri

<i>İzolat Numarası</i>	<i>Koloni Rengi</i>	<i>Koloni Şekli</i>	<i>İzolat Numarası</i>	<i>Koloni Rengi</i>	<i>Koloni Şekli</i>
YH 9-1	Sarı	S Tip	YH 11-3	Beyaz	R Tip
YH 9-2	Kirli Beyaz	R Tip	YH 11-4	Buzlu Beyaz	R Tip
YH 9-4	Şeffaf Pembe	S Tip	YH 11-5	Beyaz	M Tip
YH 9-5	Şeffaf Pembe	S Tip	YH 11-7	Beyaz	R Tip
YH 9-6	Kirli Beyaz	S Tip	YH 12-1	Krem Rengi	R Tip
YH 9-7	Kirli Beyaz	S Tip	YH 12-2	Kirli Beyaz	S Tip
YH 9-8	Beyaz	S Tip	YH 12-3	Beyaz	S Tip
YH 9-9	Açık Sarı	L Tip	YH 12-4	Açık Sarı	S Tip
YH 9-12	Bembeyaz	R Tip	YH 13-1	Açık Pembe	S Tip
YH 10-1	Beyaz	R Tip	YH 13-2	Hardal Sarısı	R Tip
YH 10-2	Krem Rengi	S Tip	YH 13-3	Krem Rengi	R Tip
YH 10-3	Krem Rengi	S Tip	YH 13-4	Sarı	S Tip
YH 10-5	Yeşil	R Tip	YH 13-5	Krem Rengi	R Tip
YH 10-6	Soluk Beyaz	S Tip	YH 13-6	Beyaz	S Tip
YH 10-7	Açık Sarı	S Tip	YH 15-2	Bembeyaz	S Tip
YH 10-8	Beyaz	R Tip	YH 15-3	Pembe	S Tip
YH 10-11	Beyaz	M Tip	YH 16-1	Sarı	S Tip
YH 10-12	Beyaz	S Tip	YH 16-4	Açık Pembe	S Tip
YH 11-1	Kirli Beyaz	S Tip	YH 16-6	Pembe	S Tip
YH 11-2	Beyaz	S Tip	YH 16-7	Pembe	S Tip
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853				Yeşil	R Tip

Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.`te görülen veriler incelendiğinde; izolatların 17 tanesinin Gram pozitif ve 23 tanesinin ise Gram negatif olduğu tespit edilmiştir. Gram negatif bakterilerin Gram boyamalarını desteklemek için yapılan %3`lük KOH testinde 23 adet pozitif ve 17 adet negatif sonuç elde edilmiştir. Yine izole edilen bakterilerin 24 tanesinin hareketli olduğu 16 tanesinin de hareketsiz olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 kontrol suşu bu sonuçlara dahil edilmemiştir.

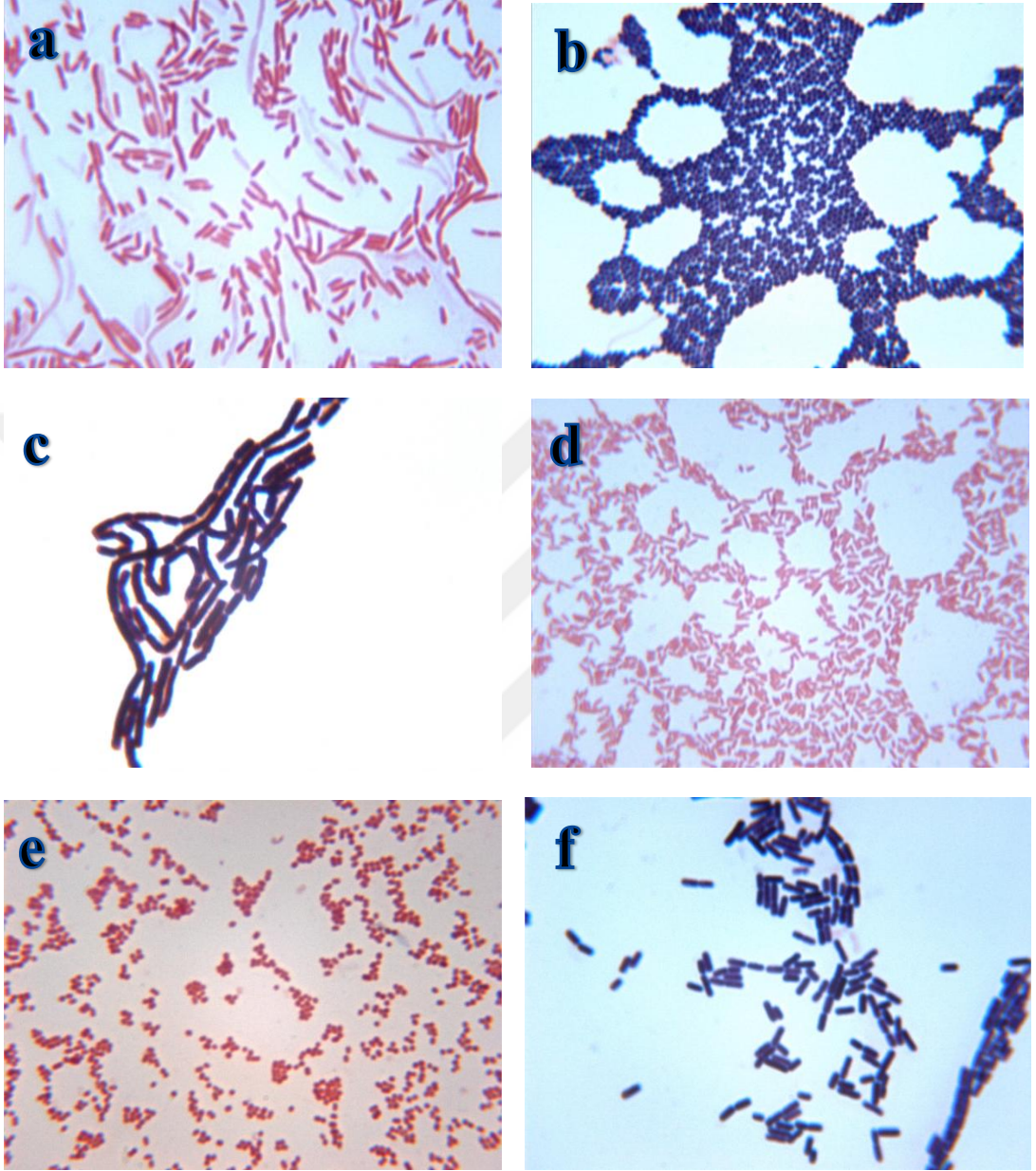
Tablo 4.2. İzole Edilen Bakterilerin Gram Boyama, Morfoloji, %3`lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları

<i>İzolat Numarası</i>	<i>Gram Boyama</i>	<i>Morfoloji</i>	<i>%3`lük KOH</i>	<i>Hareketlilik</i>
<i>YH 9-1</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 9-2</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 9-4</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 9-5</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 9-6</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 9-7</i>	Gram (+)	Kok	-	-
<i>YH 9-8</i>	Gram (-)	Kokobasil	+	-
<i>YH 9-9</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 9-12</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 10-1</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 10-2</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 10-3</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 10-5</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 10-6</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 10-7</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 10-8</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 10-11</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 10-12</i>	Gram (-)	Kokobasil	+	-
<i>YH 11-1</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 11-2</i>	Gram (-)	Kokobasil	+	-

Tablo 4.3. İzole Edilen Bakterilerin Gram Boyama, Morfoloji %3`lük KOH ve Hareketlilik Test Sonuçları (Devamı)

<i>İzolat Numarası</i>	<i>Gram Boyama</i>	<i>Morfoloji</i>	<i>%3`lük KOH</i>	<i>Hareketlilik</i>
<i>YH 11-3</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 11-4</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 11-5</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 11-7</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 12-1</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 12-2</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 12-3</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 12-4</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 13-1</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 13-2</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 13-3</i>	Gram (+)	Basil	-	-
<i>YH 13-4</i>	Gram (+)	Basil	-	-
<i>YH 13-5</i>	Gram (+)	Basil	-	+
<i>YH 13-6</i>	Gram (-)	Kok	+	+
<i>YH 15-2</i>	Gram (+)	Kok	-	-
<i>YH 15-3</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 16-1</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 16-4</i>	Gram (-)	Basil	+	-
<i>YH 16-6</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>YH 16-7</i>	Gram (-)	Basil	+	+
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	Gram (-)	Basil	+	+

Ayrıca izolatların Gram boyama sonuçlarının mikroskopik görüntüleri Resim 4.11`de gösterilmiştir.



Resim 4.11. İzole edilen bakterilerin Gram boyama görüntüleri (100x)

- | | |
|---|---|
| a. <i>Massilia alkalitolerans</i> (YH 16-1) | b. <i>Staphylococcus</i> sp. (YH 15-2) |
| c. <i>Bacillus megaterium</i> (YH 9-2) | d. Tanımlanmamıştır (YH 10-5) |
| e. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (YH 9-8) | f. Tanımlanmamıştır (YH 11-4) |

4.3. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testleri

İzole edilen bakterilerin 2 tanesinin katalaz negatif ve 38 tanesinin ise hidrojen peroksiti serbest oksijene ayrıştırarak gaz kabarcıkları oluşturup pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Oksidaz testinde 25 izolat p-amino dimetilanilin ayırıcını oksidaz enzim varlığında okside ederek mor-mavi renk oluşturup pozitif sonuç verirken 15 izolatin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. İzolatların Katalaz ve Oksidaz Test Sonuçları

<i>İzolat Numarası</i>	<i>Katalaz</i>	<i>Oksidaz</i>	<i>İzolat Numarası</i>	<i>Katalaz</i>	<i>Oksidaz</i>
<i>YH 9-1</i>	+	+	<i>YH 11-3</i>	+	+
<i>YH 9-2</i>	+	-	<i>YH 11-4</i>	+	+
<i>YH 9-4</i>	+	+	<i>YH 11-5</i>	+	-
<i>YH 9-5</i>	+	+	<i>YH 11-7</i>	+	+
<i>YH 9-6</i>	+	+	<i>YH 12-1</i>	+	+
<i>YH 9-7</i>	+	-	<i>YH 12-2</i>	+	+
<i>YH 9-8</i>	+	-	<i>YH 12-3</i>	+	-
<i>YH 9-9</i>	+	-	<i>YH 12-4</i>	+	+
<i>YH 9-12</i>	+	+	<i>YH 13-1</i>	+	+
<i>YH 10-1</i>	+	-	<i>YH 13-2</i>	+	+
<i>YH 10-2</i>	-	+	<i>YH 13-3</i>	+	-
<i>YH 10-3</i>	+	+	<i>YH 13-4</i>	+	-
<i>YH 10-5</i>	+	+	<i>YH 13-5</i>	+	-
<i>YH 10-6</i>	+	+	<i>YH 13-6</i>	+	-
<i>YH 10-7</i>	+	+	<i>YH 15-2</i>	+	-
<i>YH 10-8</i>	+	+	<i>YH 15-3</i>	+	+
<i>YH 10-11</i>	+	+	<i>YH 16-1</i>	+	+
<i>YH 10-12</i>	+	-	<i>YH 16-4</i>	-	-
<i>YH 11-1</i>	+	+	<i>YH 16-6</i>	+	+
<i>YH 11-2</i>	+	-	<i>YH 16-7</i>	+	+
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>				+	+

4.4. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları

Kırşehir ilindeki Lastik Fabrikası, Mersin ilindeki Krom Fabrikası ve Mersin ili Kazanlı ve Karaduvar mevki Rafineri bölgesinden elde edilen 40 izolatın 16S rDNA genlerinin baz dizileri tespit edilmiştir. Tür tayini ise Gen Bankası'nın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) nükleotid dizilerinin kıyaslanarak ve benzerlik oranları incelenerek yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunda elde edilen tanı sonucu, baz sayısı ve benzerlik oranı Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.`da verilmiştir. Ayrıca bu izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin baz sıraları da EK-1` de verilmiştir.

Tablo 4.5. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları

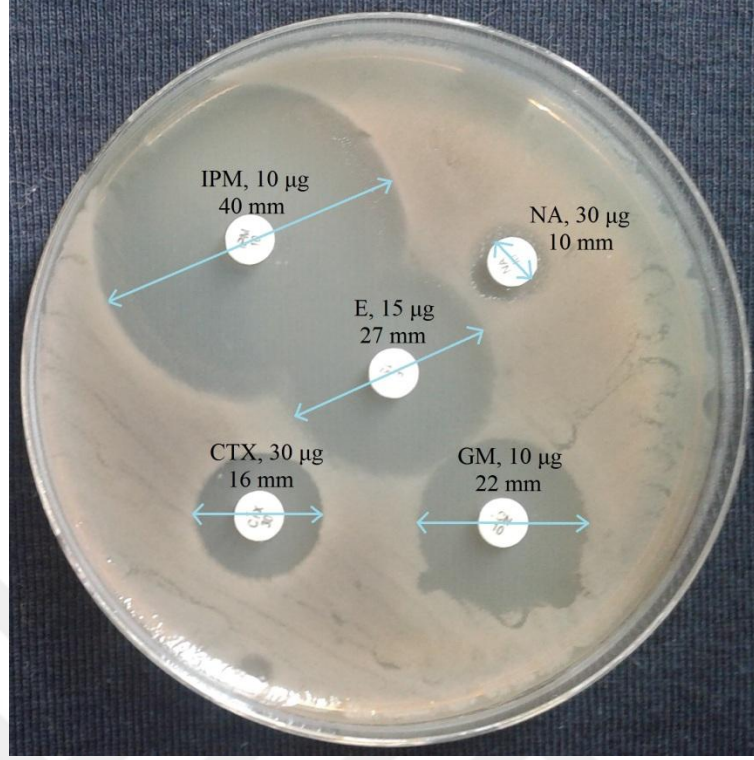
<i>Kod</i>	<i>Tanı</i>	<i>Baz Sayısı</i>	<i>Benzerlik %</i>	<i>Genbank No</i>
<i>YH 9-1</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 9-2</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	1418	100	KY010267
<i>YH 9-4</i>	<i>Diaphorobacter</i> sp.	1344	100	KY010268
<i>YH 9-5</i>	<i>Diaphorobacter</i> sp.	1346	100	KY010269
<i>YH 9-6</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	1392	99	KY010270
<i>YH 9-7</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 9-8</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1396	99	KY010271
<i>YH 9-9</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 9-12</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	1415	100	KY010272
<i>YH 10-1</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-2</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-3</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-5</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-6</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-7</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-8</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 10-11</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	1429	100	KY010273
<i>YH 10-12</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1379	100	KY010274
<i>YH 11-1</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	1373	99	KY010275
<i>YH 11-2</i>	Tanımlanmamıştır			

Tablo 4.6. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları (Devamı)

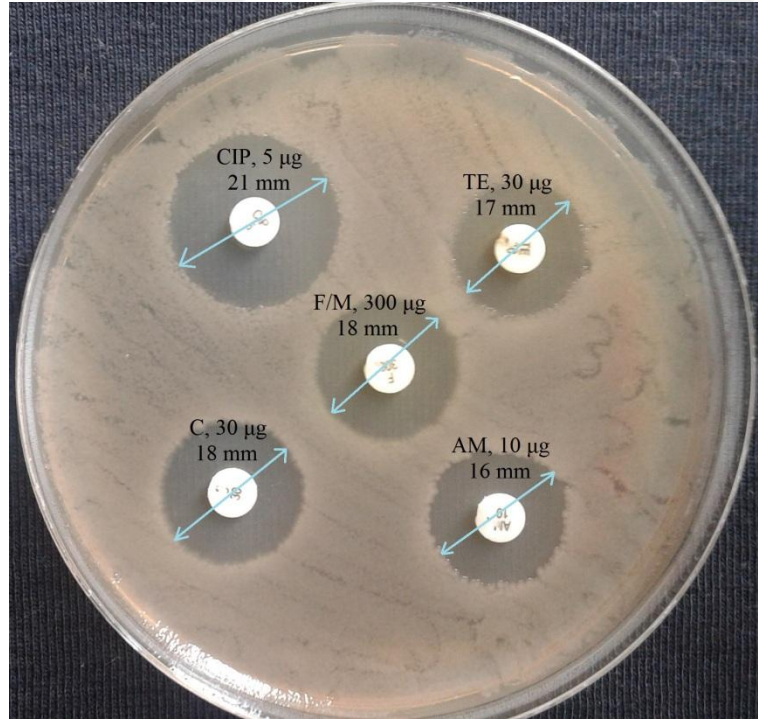
<i>Kod</i>	<i>Tanı</i>	<i>Baz Sayısı</i>	<i>Benzerlik %</i>	<i>Genbank No</i>
<i>YH 11-3</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 11-4</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 11-5</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 11-7</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 12-1</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 12-2</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 12-3</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 12-4</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 13-1</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1380	100	KY010276
<i>YH 13-2</i>	<i>Massilia alkalitolerans</i>	1382	99	KY010277
<i>YH 13-3</i>	<i>Bacillus simplex</i>	1399	100	KY010278
<i>YH 13-4</i>	<i>Massilia alkalitolerans</i>	1364	99	KY010279
<i>YH 13-5</i>	<i>Bacillus simplex</i>	1421	99	KY010280
<i>YH 13-6</i>	Tanımlanmamıştır			
<i>YH 15-2</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	1422	100	KY010281
<i>YH 15-3</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	1303	99	KY010282
<i>YH 16-1</i>	<i>Massilia alkalitolerans</i>	1352	99	KY010283
<i>YH 16-4</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	1015	100	KY010284
<i>YH 16-6</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	1017	99	KY010285
<i>YH 16-7</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	1329	98	KY010286

4.5. İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Disk diffüzyon yöntemine göre yapılmıştır. YH13-5 izolatının antibiyotik duyarlılık testine ait görüntüler Resim 4.12. ve 4.13. de gösterilmektedir.



Resim 4.12. İzolat YH 13-5 `in antibiyotik direnç değerleri (Nalidixic Acid, Imipenem, Cefotaxime, Gentamicin ve Erythromycin)



Resim 4.13. İzolat YH 13-5 `in antibiyotik direnç değerleri (Tetracycline, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Ampicilin ve Nitrofurantoin)

İzole edilen bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direnç göz önüne alınarak toplam direnç yüzdeleri hesaplanmıştır. İzolatların % 72,5`inin Nalidixic Acid (NA, 30µg)`e, % 15`inin İmipenem (IPM, 10 µg)`e, % 45`inin Cefotaxime (CTX, 30 µg)`e, % 32,5`inin Gentamicin (GM, 10 µg)`e, % 65`inin Erythromycin (E, 15 µg)`e, % 82,5`inin Tetracycline (TE, 30 µg)`e, % 60`ının Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)`e, %52,5`inin Chloramphenicol (C, 30 µg)`a, %70`inin Ampicilin (AM, 10 µg)`e ve % 80`inin Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)`e dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7.). Bu bağlamda Tablo 4.7. incelendiğinde en yüksek toplam direnç değeri % 82,5 olarak Tetracycline (TE, 30 µg)`inde gözlenirken en düşük değer ise % 15 ile Imipenem (IPM, 10 µg)` de gözlenmiştir.

İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençleri CLSI 2015`e göre belirlenmiş ve toplam yüzdelerik dirençleri Tablo 4.7.` da gösterilmiştir.

Tablo 4.7. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Değerleri

<i>Kullanılan Antibiyotikler</i>	<i>İzolatların Antibiyotik Direnç Değer Yüzdeleri (%)</i>
<i>Nalidixic Acid (NA, 30µg)</i>	% 72,5
<i>İmipenem (IPM, 10 µg)</i>	% 15
<i>Cefotaxime (CTX, 30 µg)</i>	% 45
<i>Gentamicin (GM, 10 µg)</i>	% 32,5
<i>Erythromycin (E, 15 µg)</i>	% 65
<i>Tetracycline (TE, 30 µg)</i>	% 82,5
<i>Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)</i>	% 60
<i>Chloramphenicol (C, 30 µg)</i>	% 52,5
<i>Ampicilin (AM, 10 µg)</i>	% 70
<i>Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)</i>	% 80

Tablo. 4.8. İzolatlarının Direnç Gösterdikleri Antibiyotik Sayısı

Antibiyotik Sayısı (10)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dirençli Bakteri Sayısı	2	1	2	2	2	6	9	8	2	5	1

Antibiyotik sayısı ile bu antibiyotiklere direnç gösteren izolat sayısı Tablo 4.8.`de gösterilmiştir. Tablodaki veriler incelendiğinde hiçbir antibiyotiğe direnç göstermeyen 2 izolat bulunmaktadır. Ayrıca izolatlardan; 1 tanesinin 1 antibiyotiğe, 2 tanesinin 2 antibiyotiğe, 2 tanesinin 3 antibiyotiğe, 2 tanesinin 4 antibiyotiğe, 6 tanesinin 5 antibiyotiğe, 9 tanesinin 6 antibiyotiğe, 8 tanesinin 7 antibiyotiğe, 2 tanesinin 8 antibiyotiğe, 5 tanesinin 9 antibiyotiğe ve 1 tanesinin de tüm antibiyotiklere karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen izolatların antibiyotik direnç sonuçları Tablo 4.9. ile Tablo 4.10.`da gösterilmiştir.

Akkan (2009), çalışmasında İskenderun Körfezi`nde 3 farklı bölgeden 356 Gr (-) bakteri izole etmiş, en yüksek antibiyotik direncin 1 ve 3 numaralı bölgelere ait olduğunu izolatların %94,9`unun Eritromisin`e direnç gösterdiğini belirtmiştir.

Yine antibiyotik dirençliliğin belirlenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada ise; arsenik dirençli suşların %60 oranında sefoksitin, % 40 oranında terimetoprim, streptomisin ve nalidiksilik asite duyarlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca % 20 oranında Eritromisin, Kloramfenikol, Pensilin ve Tetrasiklin antibiyotiklerine direnç tespit edilirken Amoksisilin, Genatmisin, Kanamisin ve Netilmisin`e hiçbir direnç gözlenmemiştir.

Tablo 4.9. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

<i>Numune Numarası</i>	<i>Nalidixic Acid (NA, 30 µg)</i>	<i>İmipenem (IPM, 10 µg)</i>	<i>Cefotaxime (CTX, 30 µg)</i>	<i>Gentamicin (GM, 10 µg)</i>	<i>Erythromycin (E, 15 µg)</i>
<i>YH 9-1</i>	R	S	S	R	R
<i>YH 9-2</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 9-4</i>	S	S	S	S	R
<i>YH 9-5</i>	S	S	R	R	R
<i>YH 9-6</i>	S	R	S	R	R
<i>YH 9-7</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 9-8</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 9-9</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 9-12</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 10-1</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 10-2</i>	R	S	S	S	R
<i>YH 10-3</i>	R	S	S	S	R
<i>YH 10-5</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 10-6</i>	S	R	S	R	R
<i>YH 10-7</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 10-8</i>	R	S	S	S	R
<i>YH 10-11</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 10-12</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 11-1</i>	R	S	S	R	S
<i>YH 11-2</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 11-3</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 11-4</i>	S	R	S	R	S
<i>YH 11-5</i>	R	S	R	S	S
<i>YH 11-7</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 12-1</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 12-2</i>	R	S	S	R	R
<i>YH 12-3</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 12-4</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 13-1</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 13-2</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 13-3</i>	R	S	R	S	S
<i>YH 13-4</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 13-5</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 13-6</i>	R	R	R	S	R
<i>YH 15-2</i>	R	S	S	S	R
<i>YH 15-3</i>	R	S	R	S	S
<i>YH 16-1</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 16-4</i>	S	S	S	S	R
<i>YH 16-6</i>	S	S	S	S	R
<i>YH 16-7</i>	R	S	R	S	R
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	R	R	R	S	R

Tablo 4.10. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları (Devamı)

<i>Numune Numarası</i>	<i>Tetracycline (TE, 30 µg)</i>	<i>Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)</i>	<i>Chloramphenicol (C, 30 µg)</i>	<i>Ampicilin (AM, 10 µg)</i>	<i>Nitrofurantoin (F/M, 300 µg)</i>
<i>YH 9-1</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 9-2</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 9-4</i>	R	S	S	R	R
<i>YH 9-5</i>	R	S	S	R	R
<i>YH 9-6</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 9-7</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 9-8</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 9-9</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 9-12</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 10-1</i>	R	S	R	S	R
<i>YH 10-2</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 10-3</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 10-5</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 10-6</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 10-7</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 10-8</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 10-11</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 10-12</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 11-1</i>	R	R	S	S	R
<i>YH 11-2</i>	R	S	S	S	R
<i>YH 11-3</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 11-4</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 11-5</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 11-7</i>	S	R	R	S	R
<i>YH 12-1</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 12-2</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 12-3</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 12-4</i>	R	S	R	R	R
<i>YH 13-1</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 13-2</i>	R	S	S	S	S
<i>YH 13-3</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 13-4</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 13-5</i>	S	R	S	S	S
<i>YH 13-6</i>	R	R	R	R	R
<i>YH 15-2</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 15-3</i>	R	R	S	R	R
<i>YH 16-1</i>	S	S	S	S	S
<i>YH 16-4</i>	S	S	S	R	S
<i>YH 16-6</i>	R	S	R	S	S
<i>YH 16-7</i>	S	S	R	R	S
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	R	R	R	S	R

Yaptığımız çalışmada ise en yüksek antibiyotik direnç oranı Tetracycline`e karşı gözlenmiş ve izolatların % 82,5`inin bu antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık izolatların % 15`inin ise Imipenem`e karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Ayrıca 9 tane izolatın 6 farklı antibiyotiğe, 8 tane izolatın ise 7 farklı antibiyotiğe dirençli oldu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde izolatlarımızın çoğunun antibiyotiklere dirençli olduğu (Tablo 4.7. ve Tablo 4.8.) ve benzer bulgulara daha önce yapılan araştırmalarda da ulaşıldığı görülmektedir.

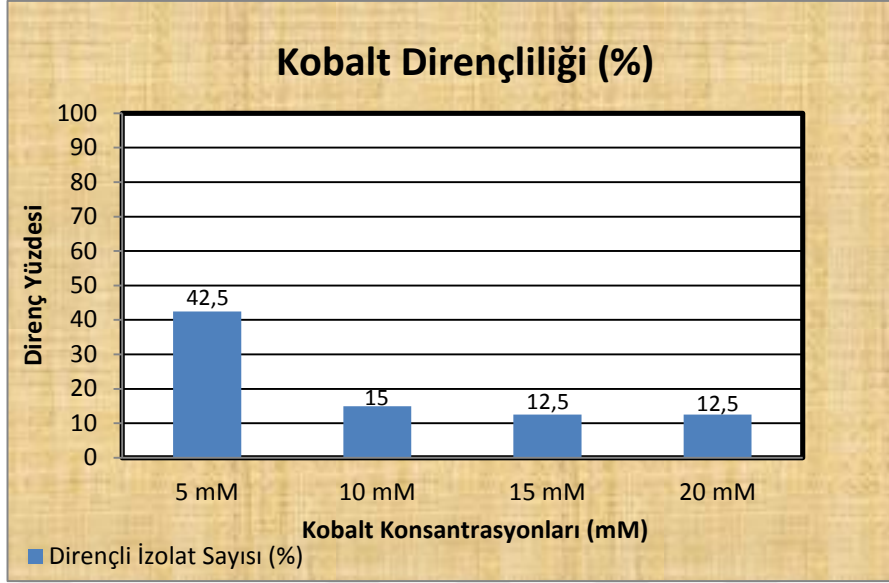
4.6.Bakterilerin Ağır Metal Dirençliliği

İzole edilen bakterilerin ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Tüm ağır metal konsantrasyonları “mM” cinsinden hesaplanmıştır. Kontrol suş *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşuna ait zon çapları Tablo 4.11.`de gösterilmiştir.

Tablo 4. 11. *P. aeruginosa* ATCC 27853 Suşuna Ait Zon Çapları (mm)

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5mM	10mM	15mM	20mM
CoCl₂ 6H₂O	12	13	14	16
ZnSO₄ 7H₂O	-	12	14	15
MnCl₂ 2H₂O	-	-	-	13
HgCl₂	20	22	23	24

İzole edilen bakterilerin kobalta karşı gösterdikleri direnç oranları (%) incelendiğinde; toplam izolatların %42,5`inin 5 mM`a, %15`inin 10 mM`a, %12,5`inin 15 mM`a ve %12,5`inin de 20 mM`a dirençli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).

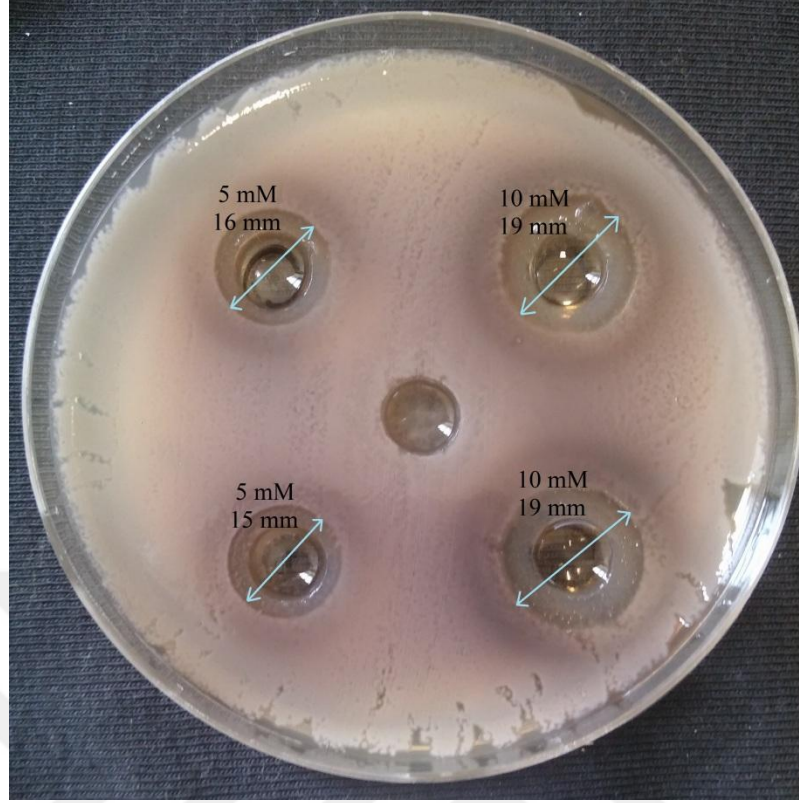


Şekil 4.1. İzolatların kobalt direnç yüzdeleri

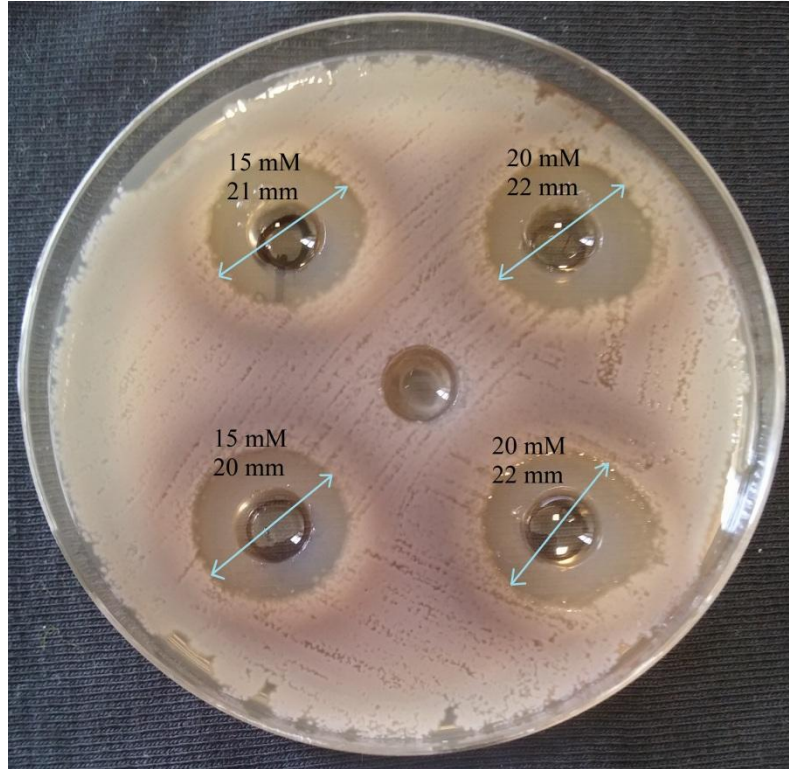
Tablo 4.12`deki veriler incelendiğinde; kobaltın tüm konsantrasyonlarına dirençli toplam 5 adet izolat (YH 10-5, YH 10-7, YH 11-2, YH 13-1 ve YH 13-4) belirlenirken duyarlı olan 23 adet izolat (YH 9-2, YH 9-6, YH 9-8, YH 9-9, YH 10-1, YH 10-2, YH 10-3, YH 10-6, YH 10-12, YH 11-1, YH 11-3, YH 11-4, YH 11-5, YH 11-7, YH 12-1, YH 12-4, YH 15-2, YH 15-3, YH 16-1, YH 16-4, YH 16-6 ve YH 16-7) tespit edilmiştir. Diğer izolatların ise farklı konsantrasyonlara dirençlilik ve duyarlılık gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Tablo 4. 12. İzolatların Kobalt Dirençlilikleri

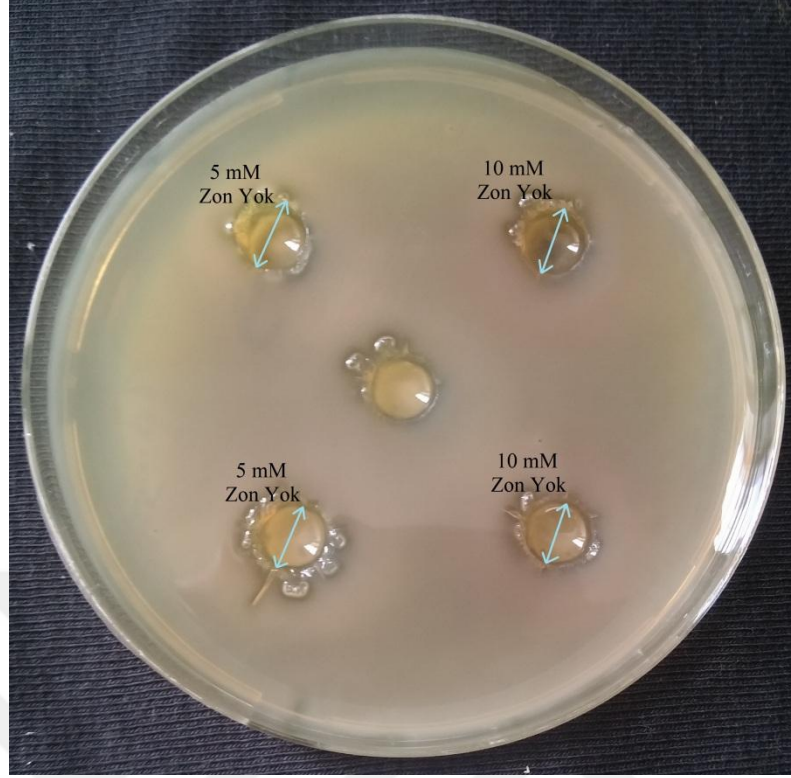
<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	<i>5mM</i>	<i>10mM</i>	<i>15mM</i>	<i>20mM</i>
<i>YH 9-1</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-4</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-5</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-7</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-8</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-9</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-12</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-5</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-7</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-8</i>	R	S	S	S
<i>YH 10-11</i>	R	S	S	S
<i>YH 10-12</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-2</i>	R	R	R	R
<i>YH 11-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-7</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-2</i>	R	S	S	S
<i>YH 12-3</i>	R	S	S	S
<i>YH 12-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 13-2</i>	R	R	S	S
<i>YH 13-3</i>	R	S	S	S
<i>YH 13-4</i>	R	R	R	R
<i>YH 13-5</i>	R	S	S	S
<i>YH 13-6</i>	R	S	S	S
<i>YH 15-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 15-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-7</i>	S	S	S	S



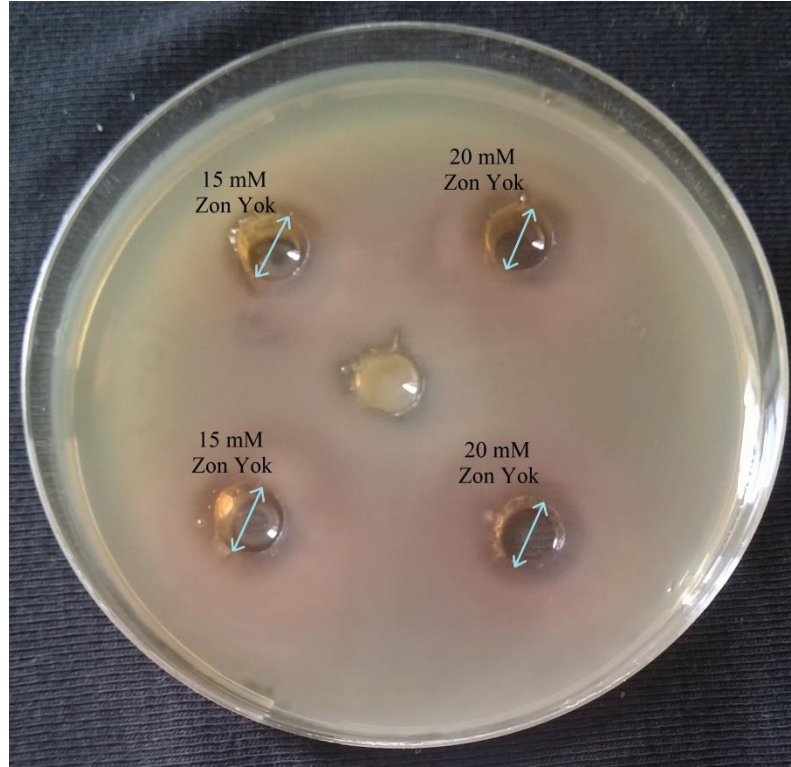
Resim 4.14. İzolat YH 9-9'un kobalt dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.15. İzolat YH 9-9'un kobalt dirençliliği (15 mM, 20 mM)

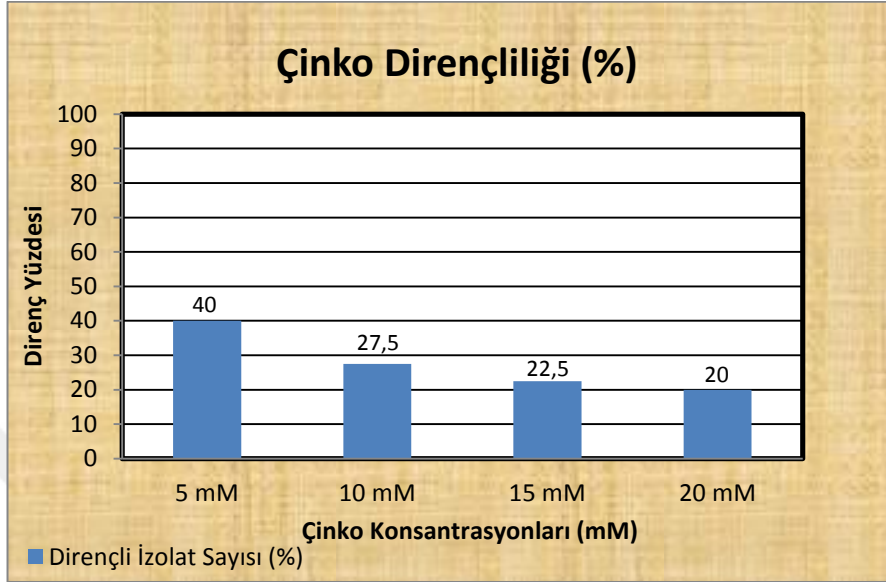


Resim 4.16. İzolat YH 10-5'inin kobalt dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.17. İzolat YH 10-5'inin kobalt dirençliliği (15 mM, 20 mM)

İzolatların çinkoya karşı gösterdikleri direnç oranları (%) incelendiğinde; toplam izolatların %40'ının 5 mM'a, %27,5'inin 10 mM'a, %22,5'inin 15 mM'a ve %20'sinin ise 20 mM'a dirençli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).

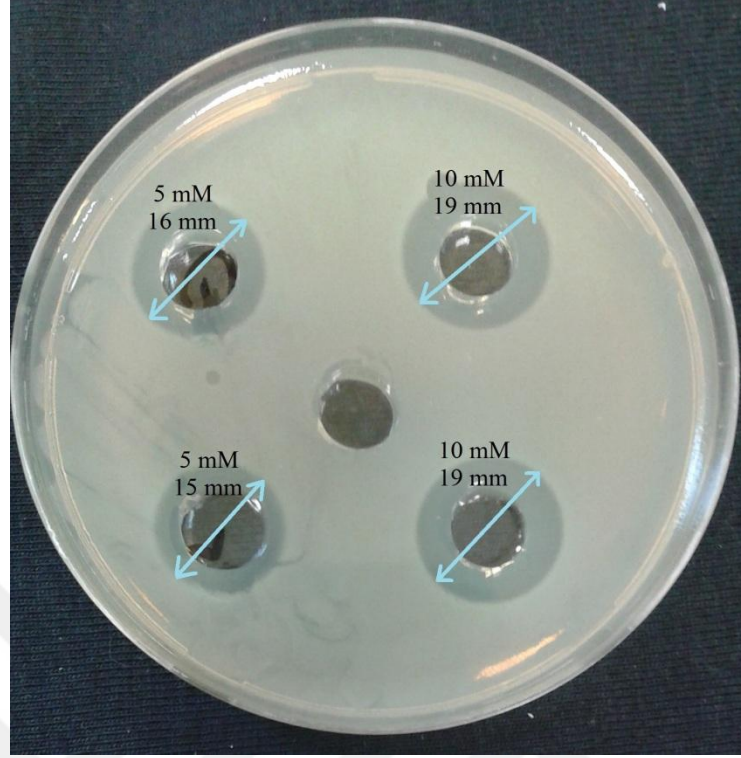


Şekil 4.2. İzolatların çinko direnç yüzdeleri

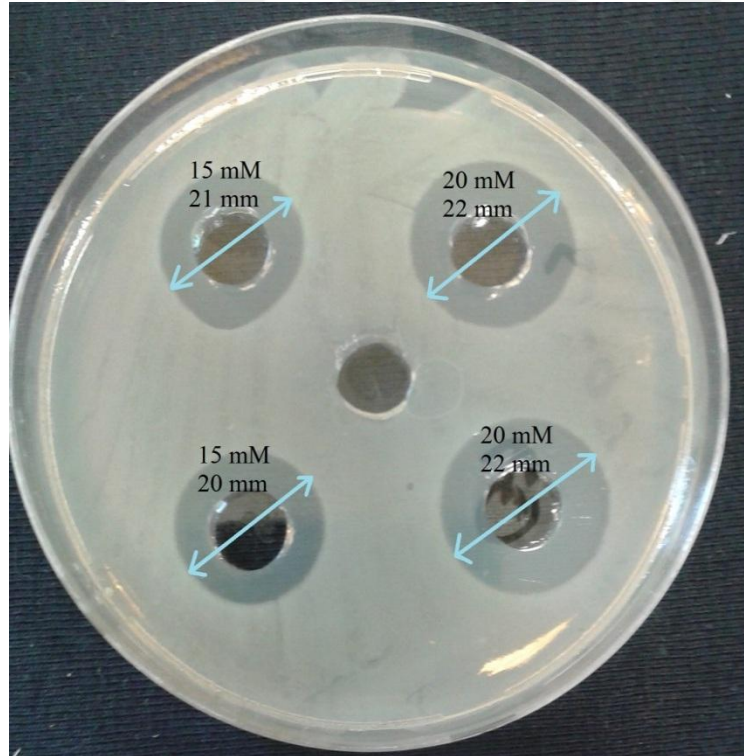
İzole edilen bakterilerin çinkoya karşı gösterdikleri direnç Tablo 4.13.'de incelendiğinde; tüm konsantrasyonlara dirençli toplam 8 adet izolat (YH 9-6, YH 10-6, YH 10-7, YH 10-12, YH 11-2, YH 12-2, YH 12-3 ve YH 13-1) görülürken yine tüm konsantrasyonlarına duyarlı olan 24 adet izolat (YH 9-1, YH 9-2, YH 9-4, YH 9-5, YH 9-9, YH 9-12, YH 10-1, YH 10-2, YH 10-3, YH 10-8, YH 10-11, YH 11-3, YH 11-5, YH 11-7, YH 12-1, YH 12-4, YH 13-3, YH 13-4, YH 13-5, YH 15-2, YH 15-3, YH 16-4, YH 16-6 ve YH 16-7) tespit edilmiştir. Diğer izolatların ise farklı konsantrasyonlara dirençlilik ve duyarlılık gösterdikleri gözlenmiştir.

Tablo 4.13. İzolatların Çinko Dirençlilikleri

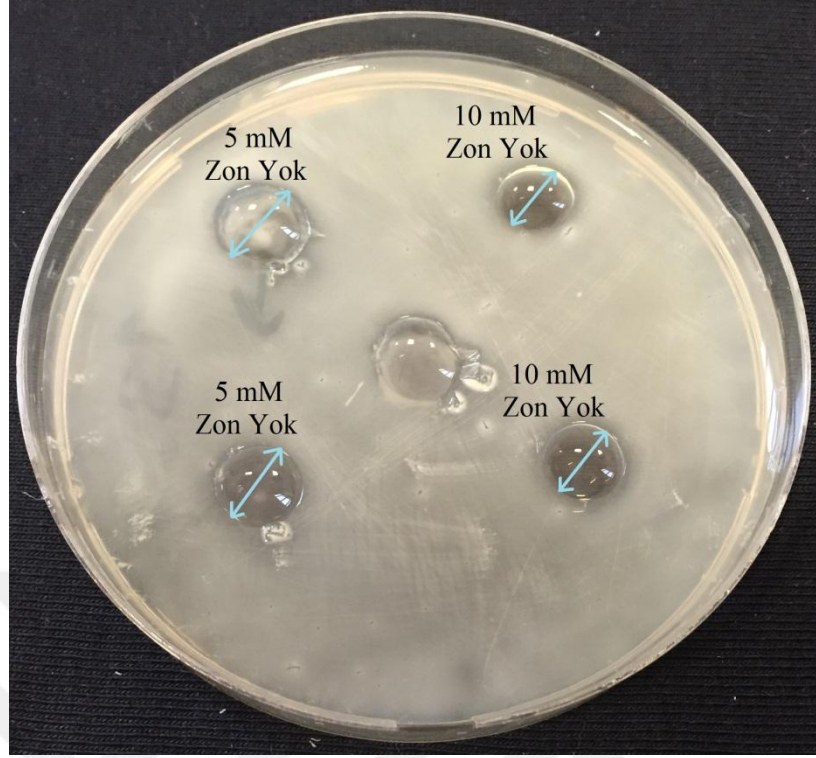
<i>ZnSO₄·7H₂O</i>	<i>5mM</i>	<i>10mM</i>	<i>15mM</i>	<i>20mM</i>
<i>YH 9-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-6</i>	R	R	R	R
<i>YH 9-7</i>	R	R	R	S
<i>YH 9-8</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-9</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-12</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-5</i>	R	S	S	S
<i>YH 10-6</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-7</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-8</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-11</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-12</i>	R	R	R	R
<i>YH11-1</i>	R	S	S	S
<i>YH 11-2</i>	R	R	R	R
<i>YH 11-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-4</i>	R	S	S	S
<i>YH 11-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-7</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-2</i>	R	R	R	R
<i>YH 12-3</i>	R	R	R	R
<i>YH 12-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 13-2</i>	R	R	S	S
<i>YH 13-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-6</i>	R	S	S	S
<i>YH 15-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 15-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-1</i>	R	R	S	S
<i>YH 16-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-7</i>	S	S	S	S



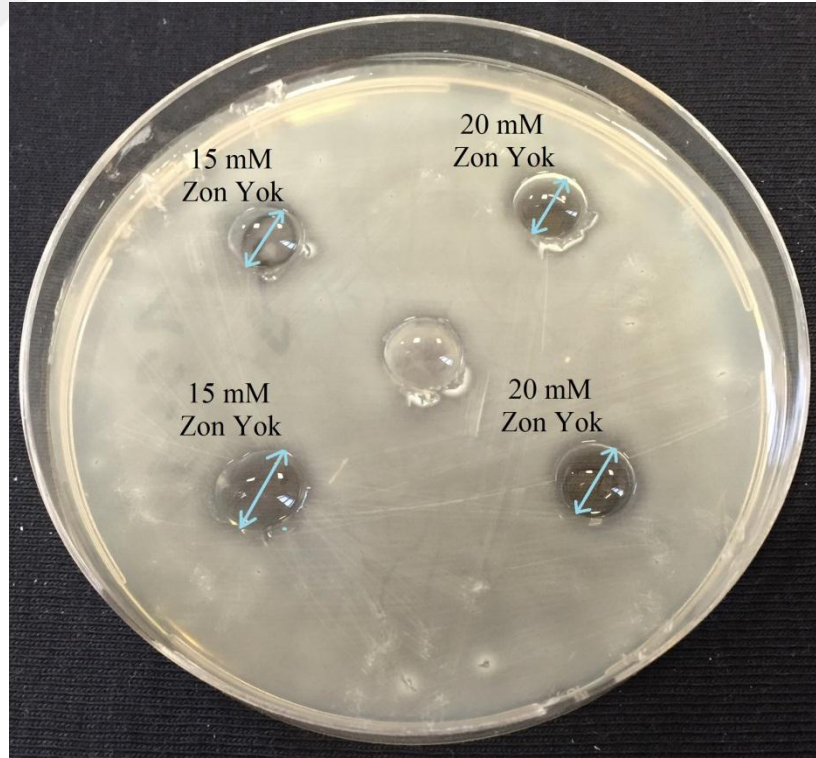
Resim 4.18. İzolat YH 10-3'ün çinko dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.19. İzolat YH 10-3'ün çinko dirençliliği (15 mM, 20 mM)

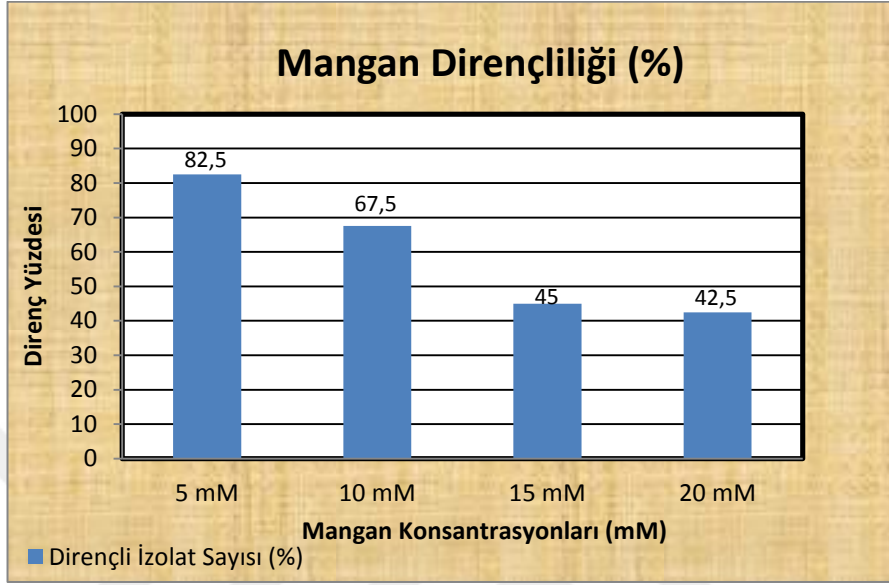


Resim 4.20. İzolat YH 13-1'in çinko dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.21. İzolat YH 13-1'in çinko dirençliliği (15 mM, 20 mM)

İzolatlardan mangana karşı gösterdikleri direnç oranları incelendiğinde; toplam izolatlardan %82,5'inin 5 mM'a, %67,5'inin 10 mM'a, %45'inin 15 mM'a ve %42,5'inin ise 20 mM'a dirençli olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3.).

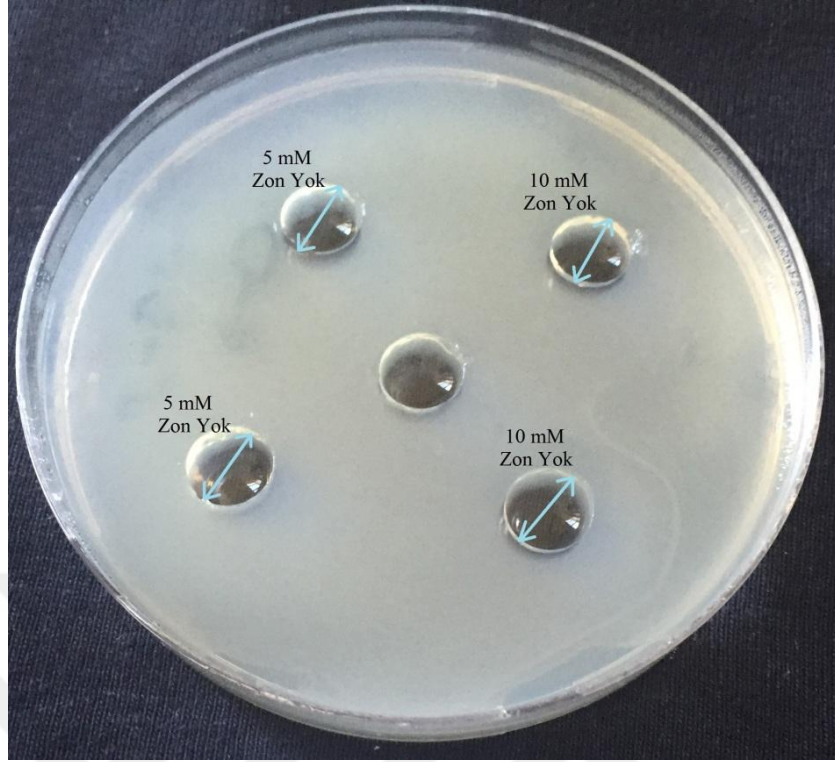


Şekil 4.3. İzolatların mangan direnç yüzdeleri

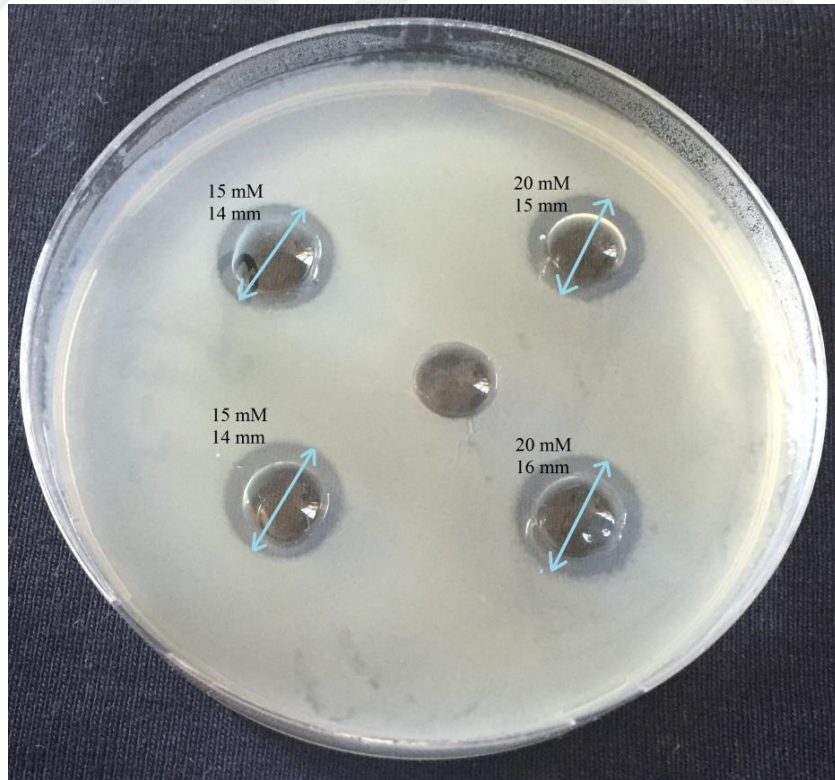
İzole edilen bakterilerin mangana karşı gösterdikleri direnç Tablo 4.14. incelendiğinde; tüm konsantrasyonlara dirençlilik gösteren toplam 17 adet izolat (YH 9-1, YH 9-2, YH 9-6, YH 9-9, YH 9-12, YH 10-1, YH 10-7, YH 10-8, YH 11-1, YH 11-3, YH 11-4, YH 11-7, YH 12-2, YH 13-1, YH 16-4, YH 16-6 ve YH 16-7) bulunurken tüm konsantrasyonlara duyarlı 7 adet izolat (YH 10-6, YH 10-11, YH 12-1, YH-12-4, YH-13-2, YH-13-4 ve YH-13-6) belirlenmiştir.

Tablo 4.14. İzolatların Mangan Dirençlilikleri

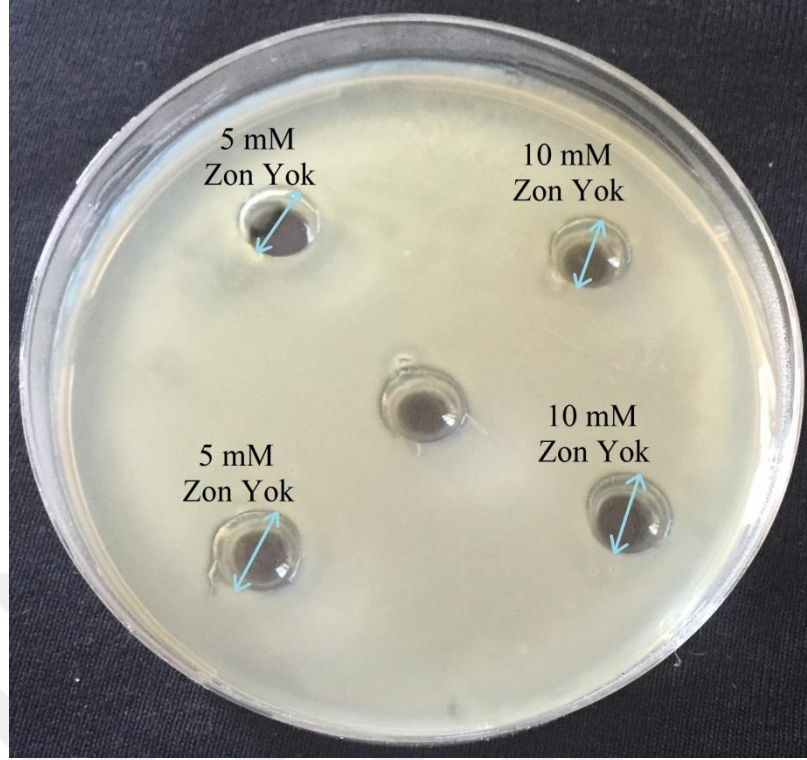
<i>MnCl₂·2H₂O</i>	<i>5mM</i>	<i>10mM</i>	<i>15mM</i>	<i>20mM</i>
<i>YH 9-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 9-2</i>	R	R	R	R
<i>YH 9-4</i>	R	R	S	S
<i>YH 9-5</i>	R	S	S	S
<i>YH 9-6</i>	R	R	R	R
<i>YH 9-7</i>	R	R	S	S
<i>YH 9-8</i>	R	R	S	S
<i>YH 9-9</i>	R	R	R	R
<i>YH 9-12</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-2</i>	R	S	S	S
<i>YH 10-3</i>	R	S	S	S
<i>YH 10-5</i>	R	R	S	S
<i>YH 10-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-7</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-8</i>	R	R	R	R
<i>YH 10-11</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-12</i>	R	R	S	S
<i>YH 11-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 11-2</i>	R	R	S	S
<i>YH 11-3</i>	R	R	R	R
<i>YH 11-4</i>	R	R	R	R
<i>YH 11-5</i>	R	R	S	S
<i>YH 11-7</i>	R	R	R	R
<i>YH 12-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-2</i>	R	R	R	R
<i>YH 12-3</i>	R	R	S	S
<i>YH 12-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-1</i>	R	R	R	R
<i>YH 13-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-3</i>	R	R	S	S
<i>YH 13-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-5</i>	R	R	S	S
<i>YH 13-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 15-2</i>	R	S	S	S
<i>YH 15-3</i>	R	R	R	S
<i>YH 16-1</i>	R	S	S	S
<i>YH 16-4</i>	R	R	R	R
<i>YH 16-6</i>	R	R	R	R
<i>YH 16-7</i>	R	R	R	R



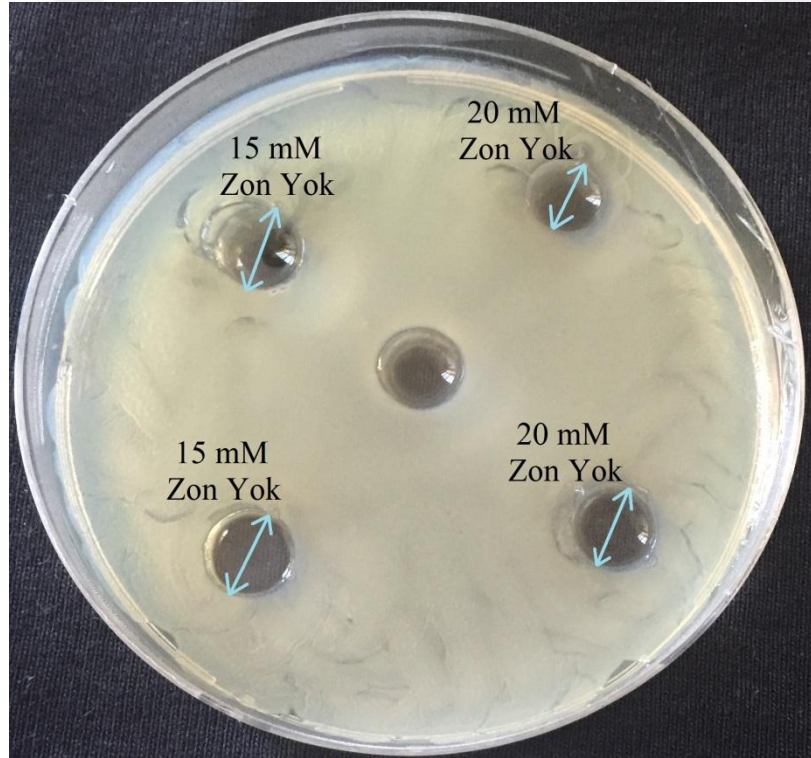
Resim 4.22. İzolat YH 13-5`in mangan dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.23. İzolat YH 13-5`in mangan dirençliliği (15 mM, 20 mM)

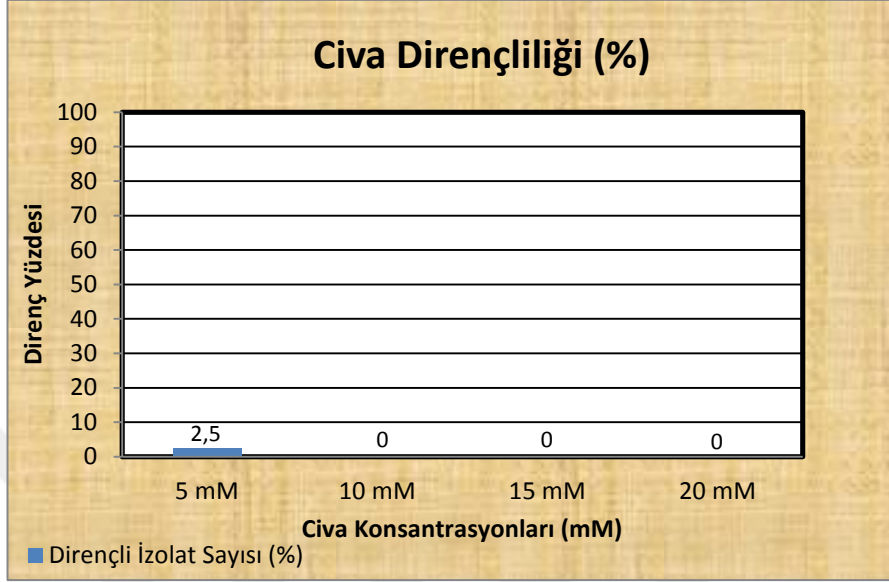


Resim 4.24. İzolat YH 10-7'nin mangan dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.25. İzolat YH 10-7'nin mangan dirençliliği (15 mM, 20 mM)

İzolatların cıvaya karşı gösterdikleri direnç oranları (%) incelendiğinde; toplam izolatların %2,5`inin 5mM`a dirençli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4.).

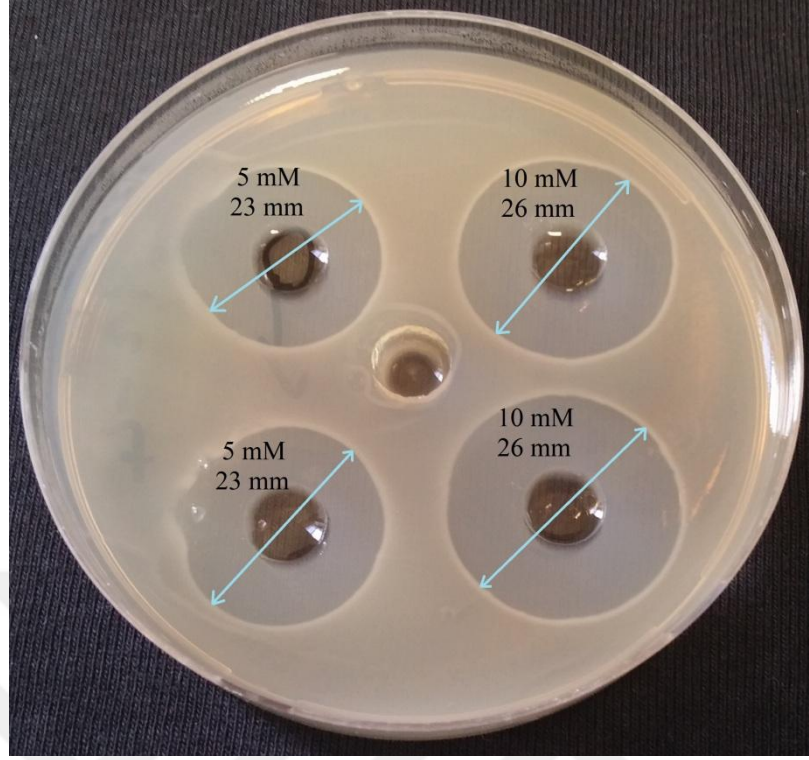


Şekil 4.4. İzolatların cıva direnç yüzdeleri

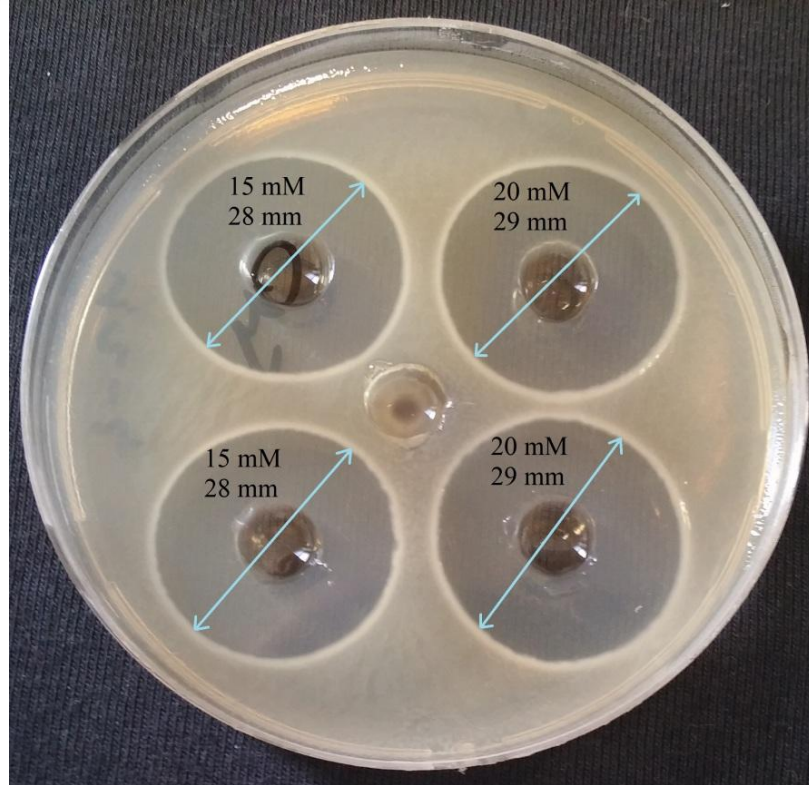
İzole edilen bakterilerin cıvaya karşı gösterdikleri direnç Tablo 4.15. incelendiğinde; tüm konsantrasyonlara dirençlilik gösteren hiçbir izolata rastlanılmamıştır. Ancak izolat YH 10-12`nin ise 5mM`lık konsantrasyona dirençlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer konsantrasyonlar için izolatların tümünün duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.15. İzolatların Civa Dirençliliği

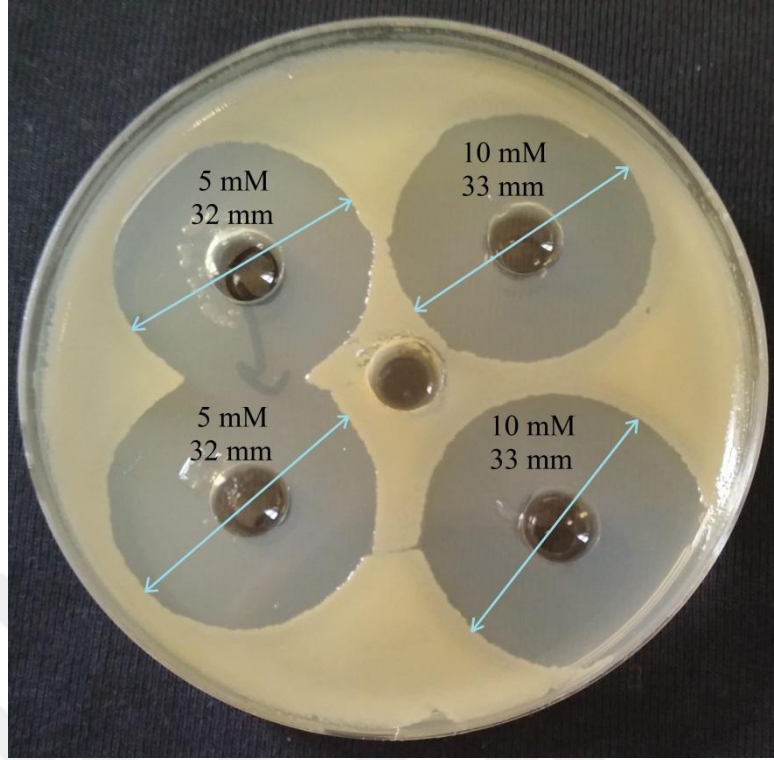
<i>HgCl₂</i>	<i>5mM</i>	<i>10mM</i>	<i>15mM</i>	<i>20mM</i>
<i>YH 9-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-7</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-8</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-9</i>	S	S	S	S
<i>YH 9-12</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-7</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-8</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-11</i>	S	S	S	S
<i>YH 10-12</i>	R	S	S	S
<i>YH 11-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 11-7</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 12-4</i>	S	S	S	S
<i>YH13-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-5</i>	S	S	S	S
<i>YH 13-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 15-2</i>	S	S	S	S
<i>YH 15-3</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-1</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-4</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-6</i>	S	S	S	S
<i>YH 16-7</i>	S	S	S	S



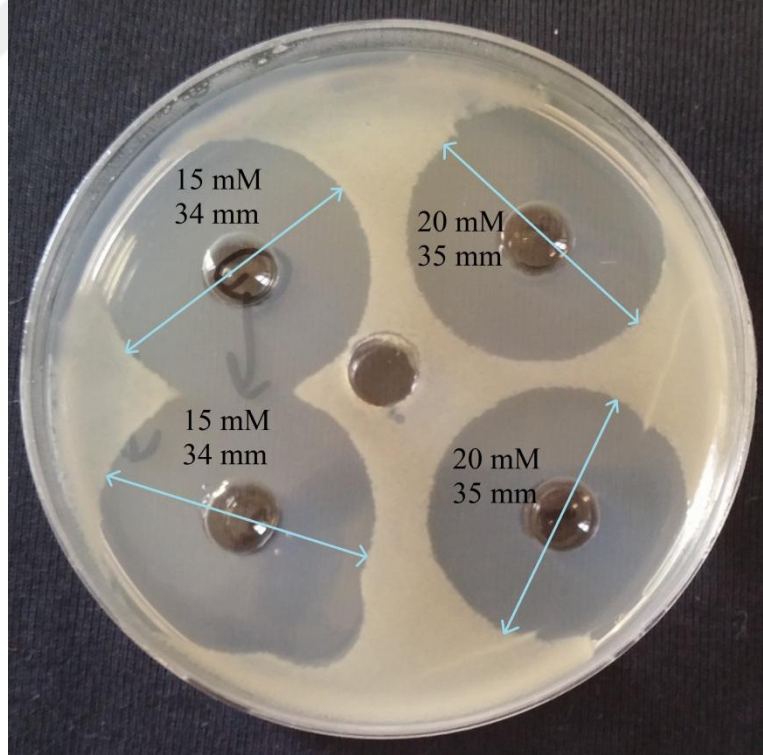
Resim 4.26. İzolat YH 12-4'ün civa dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.27. İzolat YH 12-4'ün civa dirençliliği (15 mM, 20 mM)



Resim 4.28. İzolat YH 9-9'un civa dirençliliği (5 mM, 10 mM)



Resim 4.29. İzolat YH 9-9'un civa dirençliliği (15 mM, 20 mM)

Endüstrinin ve madencilik aktivitelerinin gelişmesiyle birlikte topraklardaki ağır metal kirliliği global bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Kocaer, 2003; Sevgi, 2007).

İnsanoğlunun çeşitli aktiviteleri sonucu ağır metaller çevreye yayılmaktadır. Bu yayıldıkları ortamlarda ise yaşamını sürdüren çoğu organizmaların hayat döngüsüne katılarak zararlı veya faydalı olabilmektedir. Ağır metal bulaşmış topraklarda yaşayan ve metal dirençliliği bulunan popülasyonun gelişmesini; a- dikey gen transferi (reproduction), b- yatay gen transferi (transpozonlar ve plazmid), c- kendiliğinden oluşan mutantlar üzerindeki seçici baskılar etkilemektedir. Bu etkilerin sonuçlarından birisi ise metallere karşı dirençliliğin oluşmasıdır. Bakterilerin geliştiği tüm habitatlarda metaller bulunduğu için prokaryotların görülmeye başlamasından sonra metallere karşı direnç mekanizmaları da hemen gelişmiştir (Ji ve Silver, 1995). Genellikle metallere karşı gözlenen dirençlilik ile antibiyotiklere karşı gösterilen dirençlilik mekanizmalarının ilişkili olduğu belirtilmektedir (Harnett ve Gyles, 1984; McEntee ve ark., 1986). Her iki direnç geninin organizmalar arasında transdüksiyon yada konjugasyon aracılığıyla taşınabileceği bildirilmekte olup bazen antibiyotik dirençlilik ile metal dirençliliğin aynı plazmidten kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Sevgi, 2007).

Çok sayıdaki bakteri türünde; Hg^{+2} , Ag^{+} , AsO_2^{-} , AsO_4^{-3} , Bi^{+3} , BO_3^{-3} , Cd^{+2} , Co^{+2} , CrO_4^{-2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+3} , Sb^{+2} , TeO_3^{-2} , Tl^{+} , Zn^{+2} ve bazı metallere karşı direnç gösterme özelliği saptanmıştır. Bakterilerdeki dirençlilik mekanizmaları özellikle bazı ilaçlara ve kimyasal maddelere karşı gösterilen spesifik özelliklerdir (Wiener ve ark., 2003). Bu özellikler ise genetik etkenlerle kontrol edilmekte ve bu dirençlilik etkenleri ise plazmid ve transpozonlar üzerinde bulunmaktadır (Sevgi, 2007).

Ağır metal ve antibiyotik dirençliliğinin her ikisi bazen birlikte görülebilmektedir. Bu bağlamda birkaç klinik izolatta civa dirençliliği ile antibiyotik dirençliliğinin birlikte görüldüğü bildirilmektedir. *Staphylococcus aureus* (MRSA) da metisilin kodlu genlerin hem civa ve kadmiyuma hem de bazı antibiyotiklerin birkaçına direnç gösterdiği bildirilmiştir (Silver ve Phung, 1996).

Bakterilerde görülen bazı dirençlilik mekanizmalarının metaller ve antibiyotiklerle tetiklenerek antibiyotik dirençliliklerinin ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bu bağlamda hidrokarbonların bulaştığı bölgelerden alınan örneklerde kinolon direncinin tespit edildiği bildirilmiştir (Alonso ve ark., 1999; Deredjianın, 2011; Torabi, 2013).

Sevgi ve ark.(2010) yaptıkları çalışmada; Mersin Kazanlı endüstri bölgesinden 272 adet *Pseudomonas* spp. ve 161 *Bacillus* spp. izole etmişlerdir. İzolatlardan %73,9'u Cr'a, %26'sı Ni'e, %18,4'ü Zn'ya, %11,5'i Cd'a, % 9,2'si Co'a ve %7,3'ü Cu'a karşı dirençli bulunmuşlardır. Ayrıca en yüksek MTC oranlarının (Maximum tolerable metal concentrations); Cr için 2mM, Ni için 3mM ve Zn ile Cu için 5mM olduğu bildirilmiştir.

Farklı bir çalışmada ise; Chile'de Valparaiso bölgesinden ham petrol ile kirletilmiş alanlardan toprak örnekleri alınarak bakteri izolasyonu yapılmıştır. 16S rRNA gen sekans analizi sonucunda; *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Kocuria* genuslarına ait türler tanımlanmış ve bunlardan *Acinetobacter* türlerinin ağır metallerle karşı dirençli oldukları belirlenmiştir (Mendez ve ark., 2010).

Başka bir çalışmada ise araştırmacılar; petrolle kirlenmiş topraklardan *Escherichia fergusonii* KLU01 izole etmişlerdir. Yine bu suşun manganez, demir, kurşun, nikel, bakır ve çinkoya karşı dirençlilik gösterdiğini de bildirmişlerdir (Sriram ve ark., 2011).

Dülger (2012), Çan Termik Santral bölgesinden belirlediği 4 istasyondan 345 bakteri izolasyonu yapmış ve bu izolatların *Enterobacter*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* genuslarına ait olduğu belirlemiştir. Ağır metal dirençliliklerinin belirlenmesinde $ZnCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ ve $CuSO_4$ metal çözeltilerinin 8µg/ml- 8192 µg/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda denemiş ve 37 adet dirençli tür belirleyerek plazmid profillerini çıkarmıştır.

Bizim araştırmamızda ise; elde edilen izolatlardan % 42,5`inin kobalta, %40`ının çinkoya, % 82,5`inin mangana ve % 2,5`inin ise civanın 5 mM`lik konsantrasyonuna dirençli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ağır metallerin 20 mM`lik konsantrasyonu incelendiğinde izolatların % 12,5`inin kobalta, % 20`sinin çinkoya, % 42,5`inin mangana dirençli olduğu gözlenirken civanın bu konsantrasyonuna dirençli hiçbir izolatın olmadığı tespit edilmiştir (şekil 4.1., şekil 4.2., şekil 4.3., şekil 4.4.).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda da grldėėu üzere benzer habitatlarda yapılmış araştırmalarda bizim bulgularımıza yakın sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir.

4.7. İzole Edilen Bakterilerde Biyosürfektan retiminin Saptanması

İzolatların biyosürfektan üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılan ‘‘Drop Collapse’’ yöntemine göre; elde edilen 40 izolattan 11 adetinin (YH-9-1, YH-9-4, YH-9-6, YH-9-9, YH-10-6, YH-12-1, YH-12-3, YH-13-3, YH-13-4, YH-13-6 ve YH-15-2) biyosürfektan üretme yeteneğine sahip olmadığı, diğer 29 adet izolatın ise biyosürfektan üretebildiği tespit edilmiştir (Tablo 4.16.).

Tablo 4.16. İzolatların Biosüpfektan Üretebilme Yetenekleri

İzolat Numarası	Sonuç	İzolat Numarası	Sonuç
YH 9-1	-	YH 11-3	+
YH 9-2	+	YH 11-4	+
YH 9-4	-	YH 11-5	+
YH 9-5	+	YH 11-7	+
YH 9-6	-	YH 12-1	-
YH 9-7	+	YH 12-2	+
YH 9-8	+	YH 12-3	-
YH 9-9	-	YH 12-4	+
YH 9-12	+	YH 13-1	+
YH 10-1	+	YH 13-2	+
YH 10-2	+	YH 13-3	-
YH 10-3	+	YH 13-4	-
YH 10-5	+	YH 13-5	+
YH 10-6	-	YH 13-6	-
YH 10-7	+	YH 15-2	-
YH 10-8	+	YH 15-3	+
YH 10-11	+	YH 16-1	+
YH 10-12	+	YH 16-4	+
YH 11-1	+	YH 16-6	+
YH 11-2	+	YH 16-7	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			+

Biosüpfektanlar yüzey aktif maddelerdir ve uygulama alanlarının çeşitliliğinden dolayı da biyoteknolojik önemi gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda tıp, eczacılık, tarım ve gıda sektörü gibi çeşitli alanlarda kullanılabilirlerdir.

Bu çalışmada Kırşehir ve Mersin illerinin endüstriyel atıklarla özellikle de petrol ve petrol türevi hidrokarbonlar bakımından zengin olduğu tahmin edilen topraklardan örnekler alınmıştır. Klasik mikrobiyolojik izolasyon yöntemleri kullanılarak ve makroskopik koloni morfolojileri incelenip birbirinden farklı olanlar seçilerek 40 farklı bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatların biosüpfektan üretme yetenekleri pratik ve hızlı bir metod olan “Drop-Collapse” yöntemi ile belirlenmiştir. Bu metod biosüpfektan varlığının belirlenmesinde kolay, ekonomik, hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Yine bu yöntemde mikrowell plate kullanılmakta ve

buradaki kuyucuklar dairesel yapıda olduğu için damlacıkların yağlı yüzeyde hareketleri engelenerek sonuçta damlacıkların şekli sabit kalır (Yalçın, 2008).

Bodour ve Miller (1998) biyosümfektanların kantitatif tayini için Drop Collapse yönteminin kullanılabilceğini bildirmişlerdir. Yine Plaza ve ark., (2006) petrol bulaşmış topraklardan 16 tür izole etmişler ve bu yöntemle biyosümfektan varlığını tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise; Christova ve ark., (2004) hidrokarbonla kirlenmiş endüstriyel atık su örneklerinden *Renibacterium salmoninarium* 27BN türünü izole ederek ve bu suşun biyosümfektan üretme yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir. Yine üretilen biyosümfektanın *Pseudomonas aeruginosa* suşu için tipik olan RLL ve RLLL iki ramnolipiti ürettiğini analizler sonucunda belirlemişlerdir.

Yalçın (2008), rafineri atık sularından *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ve *Burkholderia cepacia* türlerini izole etmiştir. Biyosümfektan varlığını belirlemek amacıyla “ Drop Collapse” yöntemini kullanmış ve sonuçta izolatların hepsinin biyosümfektan üretme yeteneğinde olduğunu tespit etmiştir.

Yine benzer bir çalışmada; Ramos ve ark., (2010) hidrokarbonla kirlenmiş alanlardan 324 adet bakteri izole etmişler ve izolatlardan 17 tanesinin “Drop Collapse” yöntemine göre biyosümfektan ürettiğini tespit etmişlerdir.

Çelikdemir (2012), Eskişehir ilindeki sanayii bölgesinden hidrokarbonlar ile kirlenmiş topraklardan örnekler toplayıp 70 adet bakteri izole etmiştir. Bakteri suşlarının biyosümfektan üretimini “Drop Collapse” yöntemi ile belirlemiş ve izolatlardan 33 tanesinin biyosümfektan üretebilme yeteneğine sahip olduğunu tespit etmiştir.

Hindistanın Assam bölgesinde Sivasagar şehrinde Lakowa petrol sahasından ham petrol ile kirlenmiş topraklarından izole edilen bakterinin 16S rDNA gen sekans analizine göre *P. aeruginosa* KS3 suşu olduğu bildirilmiştir. KS3 suşunun biyosümfektan üretimi ise besiyerinin yüzey geriliminin azalmasına bakılarak ölçülmüştür (Patowary ve ark., 2015).

Yağ ve hidrokarbon türevleri gibi suda çözünmeyen bileşikleri içeren su ve toprak habitatlarında biyosürefektan üreten mikroorganizma bulunabilme olasılığının yüksek olduğu bildirilmektedir (Çelikdemir, 2012). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile yukarıda belirtilen çalışmalar incelendiğinde bu görüşü doğrular nitelikte olduğu görülmektedir.

Biyosürefektanların metallerle kompleks yapılar oluşturma eğiliminde olduğu buradan yola çıkılarak özellikle ağır metallerle kirlenmiş toprakların ve suların temizlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Günümüzde ise ağır metallerin biyolojik iyileştirilmesinde (biyoremediasyon) mikroorganizmaların kullanılması endüstriyel alanda oldukça ilgi görmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında doğal alanlardan elde edilen mikroorganizmaların izolasyonu, tanılanması, ağır metal ve antibiyotik dirençlilikleri ile biyosüpfektan üretme yeteneklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan araştırma sonucunda; biyosüpfektan üretebilen, ağır metal ve antibiyotiklerin birçoğuna direnç gösterebilen 5 tane izolat tespit edilmiştir (YH 9-6, YH 10-7, YH 11-2, YH 12-2 ve YH 13-1).

Yağ ve hidrokarbon türevlerini içeren ve suda çözünmeyen bileşikleri bol miktarda bulundurarak topraklarda biyosüpfektan üreten mikroorganizmaları elde etmenin mümkün olduğu düşünülmektedir. Bu mikroorganizmalar beslenmeleri için gerekli maddelerin olduğu durumlarda temel besin (C ve N vb.) ihtiyaçlarını ortamda bulunan organik maddelerden elde etmektedir.

Yine suda çözünmeyen bileşenlerin hücre içerisine alınması ancak molekülün su içerisine süspanse edilmesiyle gerçekleştirebilmektedir. Bundan dolayı mikroorganizmalar ortama biyosüpfektan sentezlerler ve suda çözünmeyen hidrofobik bileşikleri emülsifiye edip hücre içerisine alarak metabolize etmeleri mümkündür. Bu amaçla Kırşehir ve Mersin ilindeki PAH bakımından zengin olduğu düşünülen topraklardan örnekler alınmıştır. Bu izolatların biyosüpfektan üretme yetenekleri pratik kolay, ekonomik ve çok az miktarda örnekle çalışılabilirdiği belirtilen “Drop Collapse” yöntemi ile tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 40 izolattan 29'unun biyosüpfektan üretme yeteneği tespit edilmiştir. Bu elde edilen bulgular ışığında hidrokarbonlarca kirlenmiş topraklarda biyosüpfektan üreten mikroorganizmalara rastlanması olasılığının fazla olduğu görüşü de doğrulanmaktadır.

Sonuç olarak; petrol ve petrol türevlerini bulunduran topraklardan izole edilen bakteriler kullanılarak biyosüpfektan elde edilmesi bilimsel açıdan önemli olmasının yanı sıra endüstriyel olarak kullanılması bakımından da oldukça önemlidir.

21. yüzyılda sanayinin gelişmesi sonucunda oluşan endüstriyel kirliliklerin bertaraf edilmesi amacıyla ekosistem koruma çalışmaları hızlanmıştır. Bu bağlamda

petrol ve petrol türevinden olan atıklar bu kirliliklere neden olan ajanlardan birisidir. PAH'ların çevreye yayılmasında fabrika atıkları tanker sızıntıları petrol kazaları gibi etmenler önemli rol oynamaktadır. Yine özellikle PAH ve türevlerinden oluşan atıklar doğada kendi kendine parçalanmadıkları için buldukları bölgelerde yaşayan canlılara ciddi anlamda zararlar vermektedir.

PAH ve türevlerini bulduran endüstriyel atıklarla kirlenmiş habitatlarda çok farklı mikroorganizmalar bulunmaktadır. Literatür araştırması sonucunda; PAH'ların mikroorganizmalar tarafından parçalanarak çevresel kirliliğin yok edilmesinde etkili olacağı görülmektedir.

Bu araştıma özellikle PAH'lardan kaynaklanan çevre kirliliğinin giderilmesi ve iyileştirilmesi için pahalı teknikler kullanılması yerine doğada hazır bulunan mikroorganizmalar (biyolojik sistemler) kullanılarak bertaraf edilebileceğinin mümkün olduğunu göstermektedir.

Metallerle kirlenmiş topraklardan izole edilen bakterilerde ağır metallere karşı tolerans görülmesi çevrenin bunlarla kirlendiğini göstermektedir. Bundan dolayı ağır metallere direnci olan bakterilerin özellikle bu alanlarda biyoparçalamada kullanılacağı da düşünülmektedir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen türlerin özellikle PAH atıklarının ve ağır metal kirliliğinin yoğun olduğu bölgelerde biyoremediasyon amacıyla tek veya karışık kültür hazırlanarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Buna ilaveten mikroorganizmalar tarafından sentezlenen biosümfektanlarında biyoremediasyon da büyük bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Acun, N. *Dünya Petrol Tarihi ve Türk Petrolü*, Şaka Matbaası, İstanbul, **1949**.

Adıgüzel, A. *Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2006**, 1-123.

Akkan, T. *İskenderun Körfezi'ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2009**, 1-77.

Ali H.; Khan E.; Sajad M.A.; *Phytoremediation of Heavy Metals-Concepts and Applications*, *Chomosphere*, **2013**. 91, 869-881.

Altay, Ö. *Niğde İli Topraklarının Ağır Metal İçeriğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, **2016**, 1-39.

Al-Thani, R. F.; Abd-El-Haleem, D. A. M.; Al-Shammri, M. *Isolation and Characterization of Polyaromatic Hydrocarbons-Degrading Bacteria from Different Qatari Soils*, *African Journal of Microbiology Research*, **2009**, 3(11), 761-766.

Alver, E.; Demirci, A.; Özcimder, M. *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri*, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, **2012**, 3(1), 45-52.

Arı, A. *Eskişehir Atmosferindeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH'ların) Derişimlerinin ve Kaynaklarının Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, **2008**, 1-110.

Arora M.; Kiran B.; Rani S.; Rani A.; Kaur B.; Mittal N. *Heavy Metal Accumulation in Vegetables Irrigated With Water from Different Sources*, *Food Chemistry*, **2008**, *111*, 811-815.

Arvanitidou, M.; Tsakris, A.; Constantinidis, T.C.; Katsouyannopoulos, V.C. *Transferable Antibiotic Resistance Among Salmonella Strains Isolated from Surface Waters*, *Wat. Res.*, **1997**, *31*, 1112- 1116.

ATSDR, *Formation in Induced Carcinogenesis*, Agency For Toxic Substances and Disease Registry, *Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs)*, Department of Health And Human Services, Public Health Service, USA, **1995**, 65–79.

Bal, T. *Aşkale Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2012**, 1-102.

Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. *Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2000**, *53*, 495-508.

Banat, I.M. *Biosurfactant Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation*, *Biores. Technol.*, **1995**, *51*, 1-12.

Barış, Ö. *Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2008**, 1-135.

Baskaya, H.S. ve Teksoy, A. *Topraklarda Ağır Metaller ve Ağır Metal Kirliliği, I. Uludağ Çevre Mühendisliği Sempozyumu*, Bursa, **1997**, 763-771.

Benedek, T.; Vajna, B.; Ta'Ncsics, A.; Marialigeti, K.; La'Nyi, S.; Ma'The, I. *Remarkable Impact of Pahs And Tphs on The Richness And Diversity of Bacterial Species in Surface Soils Exposed to Long-Term Hydrocarbon Pollution*, *World J Microbiol Biotechnol*, **2013**, DOI 10.1007/S11274-013-1362-9.

Bento, F.M.; Oliveira Camargo, F.A.; Okeke, B.C.; Franberger Jr, W.T. *Diversity of Biosurfactant Producing Microorganisms Isolated from Soils Contaminated with Diesel Oil*, *Microbiological Research*, **2005**, 160, 249-255.

Bingham, E.; Cohrssen, B.; Powell, C. H. *Patty's Toxicology (5th Edition) Toxicological Issues Related to Metals Neurotoxicolgy and Radiation Metals and Metal Compounds*, John Wiley & Sons, **2001**, Vol II, ISBN: 0-471-31943-0.

Bodour, A.A. ve Miller, R. M. *Application of A Modified Drop-Collapse Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms*, *Journal of Microbiological Methods*, **1998**, 3, 32, 273-280.

Bolanos, P.; Frenich, A.G.; Vidal, M. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food and Beverages Analytical Methods and Trends*, *Journal Of Chromatography A*, **2010**, 1217, 6303–6326.

Bruins M.R.; Kapil S.; Oehme F.W. *Microbial Resistance to Metals in the Environment*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2000**, 45: 198-207.

Castellano A.V.; Cancio, J.L.; Aleman, P.S.; Rodriguez, J.S. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Air Particle in The City of Las Palmas De Gran Canaria*, *Environment International*, **2003**, 29, 475-480.

Cerniglia, C. E. *Aromatic Hydrocarbons Metabolism By Bacteria, Fungi and Algae*. E., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (Ed.), *Reviews in Biochemical Toxicology*, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York, **1981**, 321-361.

Chehregani A. ve Malayeri B.E. *Removal of heavy metals by native accumulator plants, International Journal of Agriculture and Biology*, **2007**, 9, 462-465.

Choudhury R. ve Srivastava S., *Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria, Curr. Sci.* **2001**, 81, 768- 775.

Christova, N.; Tuleva, B.; Lalchev, Z.; Jordanova, A.; Jordanov, B. *Rhamnolipid Biosurfactants Produced by Renibacterium Salmoninarum 27bn During Growth on N Hexadecane, Verlag Der Zeitschrift Für Naturforschung.* **2004**, 59,70-74.

Coral, G. ve Karagöz, S. *Isolation and Characterization of Phenanthrene-Degrading Bacteria from A Petroleum Refinery Soil, Annals of Microbiology*, **2005**, 55, 255-259.

Çay, S. *Ağır Metal İyonlarıyla Kirletilmiş Toprakların Karadeniz Bölgesinde Yetişen Bazı Süs Bitkileri Kullanılarak Temizlenebilirliğinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, **2014**, 1-130.

Çelebi, Ö. *Eurygaster integriceps (Put.) (Hemiptera: Scutelleridae)`in Bakteriyal Florasının ve Mikrobiyal Mücadele Etmenlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, **2012**, 1-83.

Çelikdemir, M. *Hidrokarbon Kirliliği Bulunan Topraklardan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosümfektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **2012**, 1-126.

Danyi, S.; Brose, F.; Brasseur, C.; Schneider, Y. J.; Larondelle, Y.; Pussemier, L.; Scippo M. L. *Analysis of EU Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Supplements Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to an Ultraviolet, Diode Array or Fluorescence Detector, Analytica Chimica Acta*, **2009**, 633, 293–299.

Das, K. ve Mukherjee, A. K. *Crude Petroleum-Oil Biodegradation Eyciency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil from North-East India, Bioresource Technology*, **2007**, 98, 1339-1345.

Davies, J. *Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes, Science*, **1994**, 264, 375-381.

Demirdögen, E. *Tekstil Fabrikası Atık Sularından Mikroorganizma İzolasyonu ve Biyosüpfektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş. **2012**, 1-54.

Demirezen, D. ve Aksoy, A. *Accumulation of Heavy Metals in Typha Angustifolia (L.) and Potamogeton Pectinatus (L.) Living in Sultan Marsh, Chemosphere*, **2004**, 56, 85-96.

Desai J. D. and Banat I. M. *Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, American Society for Microbiology*, **1997**, 61, 47–64.

Desai, J. D. ve Desai, A. J. *Production of Biosurfactants in Biosurfactants - Production, Properties, Applications of Biosurfactants, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, Inc., New York*, **1993**,48, 65-98.

Doelman, P.; Jansen, E.; Michels, M.; Van Tıl, M. *Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Diversity and Activity as Shown by The Sensitivity-Resistance İndex, an Ecologically Relevant Parameter, Biology Fertility of Soils*, **1994**, 17, 177-184.

Doğanay, H. *Enerji Kaynakları*, Şafak Yayınevi, Erzurum, **1998**.

Domingo J.L. *Metal-Induced Developmental Toxicity in Mammals, J. Toxicol Environ. Health*, **1994**, 42,123–41.

Douben, P.E.T. *Pahs: An Ecotoxicological Perspective. Introduction*, **2003**, 1–6.

Dülger, G. *Termik Santral Bölgesindeki (Çan-Çanakkale) Topraklardan Ağır Metale Karşı Dirençli Bakterilerin İzolasyonu, Tanınması ve Plazmid Profillerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, **2012**, 1-91.

Eckenfelder, W. W. *Industrial Water Pollution Control*, McGraw-Hill International Editions, **1989**.

Eddouaouda, K.; Mnif, S.; Badis, A.; Younes, S. B.; Cherif, S.; Ferhat, S.; Mhiri, N.; Chamkha, M.; Sayadi, S. *Characterization of A Novel Biosurfactant Produced by Staphylococcus sp. Strain 1E with Potential Application on Hydrocarbon Bioremediation*, *Journal of Basic Microbiology*, **2011**, 51, 1–11.

Eraydın-Erdoğan, E. *Petrol İle Kirlenmiş Toprakların Biyolojik Olarak İyileştirilmesinin Laboratuvar Koşullarında Denenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**, 1-236.

Esedafe, W. K.; Fagade, O. E.; Umaru, F. F.; Akinwotu, O. *Bacterial Degradation of The Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (Pah) -Fraction of Refinery Effluent*, *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, **2015**, 3, 23-27.

Esen, F. *Bursa Atmosferindeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (Pah'ların) Gaz/Partikül Konsantrasyon Dağılımları ve Kuru Çökeltme Miktarları*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa **2006**, 1-158.

Facchinelli, A.; Sacchi, E.; Mallen, L. *Multivariate Statistical and GIS-Based Approach to Identify Heavy Metal Sources in Soils*, *Environ. Pollut.*, **2001**, 114, 313–324.

Faschchuk, D. Y. *Forms of Anthropogenic Impact on The Black Sea Ecosystem and Modern State, Ekologia Morya, Kiev, Naukova Dumka, 1991, 38,19- 27.*

Ferrarese, E.; Andreottola, G.; Oprea, I. A. *Remediation of PAH-Contaminated Sediments by Chemical Oxidation, Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(1), 128–139.*

Freedman, B. *Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses, Academic Press, San Diego, CA. 1995.*

Freeman J.L.; Persans M.W.; Nieman K.; Salt D.E. *Nickel and Cobalt Resistance Engineered in Escherichia coli by Over-expression of Serine Acetyltransferase from the Nickel Hyperaccumulator Plant Thlaspi goesingense, Appl. And Envir. Microbiol. 2005, 71, 8627-8633.*

Gadd, G.M., *Microbial Control of Heavy Metal Pollution. Cambridge Press, Cambridge, 1992, 59–88.*

Garcia, T. *Polycyclic Hydrocarbons from Coal Atmospheric Fluidised Bed Combustion, Organic Atmospheric Pollutants, (AFBC), 1999, 1(2), 111–119.*

Gerber G.B.; Leonard A.; Hantson P.H. *Carcinogenicity, Mutagenicity and Teratogenicity of Manganese Compounds, Critical Reviews in Onc./Hem. 2002. 42, 25–34.*

Gerhardt, P. *Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981, 791.*

Glasfeld E. ve Schimmel P. *Zinc-Dependent Trna Binding by A Peptide Element Within A Trna Synthetase, Biochemistry, 1997, 36, 6739–6744.*

Gohre V. ve Paszkowski U. *Contribution of The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis to Heavy Metal Phytoremediation. Planta*, **2006**, 223, 1115-1122.

Golomb, D.; Ryan, D.; Underhill, J.; Wades, T.; Zemba, S. *Atmospheric Deposition of Toxics Onto Massachusetts Bay-It Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Atmospheric Environment*, **1997**, 31, 1361-1368.

Gorin, P.A.J.; Spencer, J.F.T.; Tulloch, A.P. *Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose from Torulopsis magnoliae, Can J Chem*, **1961**, 39, 846–855.

Gupta, A. *Studies on Oil Degradation Potential of Bacillus megaterium; Cloning and Expression of Oil Degradation Gene Into E. coli, International Journal of Biotechnology and Allied Fields (Ijbah)*, **2016**, 4(5), 277-284.

Guzzo J.; Diorio D.C.; Alexander D.C.; DuBow M.S. *Toward Understanding Metal Stres in Environment Microbial Flora, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Canada*, **1999**, 277-284.

Gülcan S. *Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye, **2006**, 1-80.

Güven. A.; Kahvecioğlu, Ö.; Kartal, G.; Timur, S. *Metallerin Çevresel Etkileri –III*, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, **2009**.

Habashi F. *Handbook of Extractive Metallurgy, Wiley-Vch, Germany*, **1997**, 2, 892-922.

Harley, J.P. ve Prescott, L.M. *Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition* New York: The McGraw–Hill Companies, **2002**, 1-466.

Harnett, N. M. ve Gyles, C. L. *Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine Escherichia coli Strains*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1984**, 48, 930-945.

Hasenekoğlu. İ. ve Yeşilyurt, S. *Mikrobiyoloji*, Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, **2001**, 1-692.

Helbert, J.R. ve Brown, K.D. *Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids*, *Analytical Chemistry*, **1957**, 29, 1464.

Hemalatha, S. ve Veeramanikanda, P. *Characterization of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petroleum Contaminated Sites*, *Journal of Environmental Protection*, **2011**, 2, 243-254.

Heyd, M.; Kohnert, A.; Tan, T.H.; Nusser, M.; Kirschhöfer, F.; Brenner-Weiss, G.; Franzreb, M.; Berensmeier, S. *Development and Trends of Biosurfactant Analysis and Purification Using Rhamnolipids as an Example Anal Bioanal Chem*, **2008**, 391, 1579–1590.

Hodge, J.E. ve Hofreiter, B.T. in: *Whistler RL, Wolfrom ML (Eds) Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol 1. Academic., New York, 1962*, 380.

Hornbuckle, K.C.; Achman, D.R.; Eisenreich, S. J. *Over-Water and Over-Land Polychlorinated Bipheyls in Green Bay, Lake Michigan*, *Environmental Science and Technology*, **1993**, 5, 87-98.

Hunter, R. D.; Ekunwe, S. I. N.; Dodor, D. E.; Hwang, H. M.; Ekunwe, L. *Bacillus subtilis is a Potential Degradar of Pyrene and Benzo[A]Pyrene*, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2005**, 2(2), 267–271.

Hündür, S. *Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin ve Küfrelere İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2015**, 1-119.

İpek-Erbey, Y. *Bazı Curculonidae (Coleoptera) Familyası Bireylerinin Sindirim Sistemlerindeki Bakteri Florasının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, **2015**, 1-63.

Jain, D.K.; Collins-Thompson, D.L.; Lee, H.; Trevors, J.T. *A Drop-Collapsing Test for Screening Surfactant Producing Microorganisms*, *Journal of Microbiological Methods* **1991**, *13*, 271–279.

Jeremason, J. D.; Hornbuckle, K. C.; Eisenreich, S. J. *PCBs in Lake Superior, 1978-1992: Decreases in Water Concentrations Reflect Loss by Volatilization*, *Environmental Science and Technology*, **1994**, *28* (5), 903-914.

Ji, G. ve Silver, S. *Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concern*, *J. Ind. Microbiol.*, **1995**, *14*, 61-168.

Johnson, M.K. ve Boese-Marrazzo, D. *Production and Properties of Heat-Stable Extracellular Hemolysin from Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, **1980**, *29*, 1028-1033.

Kabadayı, F. *Sigara İzmarit Zifiri ve Isıl İşlem Görmüş Çeşitli Yiyeceklerdeki Bazı PAH'ların Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2003**, 1-82.

Kafilzadeh, F. ve Pour, F. H. *Degradation of Naphthalene, Phenanthrene and Pyrene by Pseudomonas sp. and Corynebacterium sp. in The Landfills*, *International Journal of Biosciences (IJB)*, **2012**, *2*, 77-84.

Kahvecioğlu, Ö.; Kartal, G.; Güven, A.; Timur, S. *Metallerin Çevresel Etkileri-I*, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, **2007**.

Kalkan, S.T. *PAH Analizine Yönelik Optik Sensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2012**, 1-73.

Kara, Y. *Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the Wastewater by Treated Nasturtium officinale*, *International Journal of Environmental Science and Technology*, **2005**, 2, 63-67.

Karakaş, D. ve Pekey B. *Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of İzmit Bay*, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Turkey, **2005**, 85(7), 433–442.

Karakaya, A. *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Maruz Kalan Bir Grup İşçide Hücresel İmmün Fonksiyonların İncelenmesi*, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, **2003**.

Kawanishi S.; Inoue S.; Yamamoto K. *Active Oxygen Species in DNA Damage Induced by Carcinogenic Metal Compounds*, *Env. Health Persp.*, **1994**, 102, 17- 20.

Kaya, T. *Çeşitli Endüstriyel Atık Maddelerde Bazı Mikroorganizmaların Yüzey Aktif Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**, 1-110.

Khan, J. A. ve Asthana, A. *A Study on Oil Degradation Potential of Bacillus megaterium Isolated from Oil Contaminated Sites in Lucknow*, *Archives of Applied Science Research*, **2011**, 3 (4), 513-517.

Kılıç, S. *İstanbul Haliç'i Midye ve Sediment Örneklerinde PAH Düzeylerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, **2015**, 1-100.

Klankeo, P.; Nopcharoenkul, W.; Pinyakong, O. *Two Novel Pyrene-Degrading Diaphorobacter sp. and Pseudoxanthomonas sp. Isolated from Soil*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2009**, 108(6), 488–495.

Kocaer F.O. ve Baskaya H.S. *Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Uygulanan Teknolojiler*, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, **2003**, 8, 121-131.

Kordybach, M.B. *Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in The Environment*, *Polish Journal of Environmental Studies*, **1999**, 8(3), 131-136.

Kosaric N. *Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation*, *Food Technol. Biotechnol*, **2001**, 39 (4), 295–304.

Köseler, M. D. *Büyükçekmece Gölü`nde Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) Konsantrasyonunun Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, **2008**, 1-74.

Krystofova O.; Shestivska V.; Galiova M.; Novotny K.; Kaiser J.; Zehnalek J.; Babula P.; Opatrilova R.; Adam V.; Kizek R. *Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions*, *Sensors*, **2009**. 9, 5040-5058.

Kumar, G.; Singla, R.; Kumar, R. *Plasmid Associated Anthracene Degradation by Pseudomonas sp. Isolated from Filling Station Site*, *Nature and Science*, **2010**, 8(4), 89-94.

Küce, P. *2,4-Dinitrotoluen`in Bir Arthrobacter cholorophenicus Suşu ile Biyodegradasyonu ve İlgili Katabolik Genlerin Fish Tekniği ile Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2010**, 1-75.

Lang, S. ve Wagner, F. *Structure and Properties of Biosurfactants, Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, **1987**, 21-45.

Lehndorff, E. ve Schwark, L. *Biomonitoring of Air Quality in The Cologne Conurbation Using Pine Needles as A Passive Sampler - Part II: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)*, *Atmospheric Environment*, **2004**, 38, 3793-3808.

Li G.; Xia X.; Yang Z.; Wang R.; Voulvoulis N. *Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in The Middle and Lower Reaches of The Yellow River*, *Environmental Pollution*, China, **2006**, 144, 985- 993.

Li, J.; Shang, X.; Zhao, Z.; Tanguay, R.L.; Dong, Q.; Huang, C. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water, Sediment, Soil, and Plants of The Aojiang River Waterway in Wenzhou*, *Journal of Hazardous Materials*, China, **2010**, 173, 75–81.

Ling, J.; Zhang, G.; Sun, H.; Fan, Y.; Ju, J.; Zhang, C. *Isolation and Characterization of A Novel Pyrene-Degrading Bacillus vallismortis Strain JY3A*, *Science of The Total Environment*, **2011**, 409, 1994–2000.

Liu Y.; Borchert G.L.; Donald S.P.; Surazynski A.; Hu C.; Weydert C.J.; Oberley L.W.; Phang J.M. *MnSOD Inhibits Proline Oxidase-Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells*, *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 1335-1342.

Luch, A. and Baird, W.M. *Carcinogenic Effects Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Metabolic Activation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Imperial College Pres, USA, **2005**, 19–96.

Manoli, E. and Samara C., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Natural Waters, Sources, Occurrence and Analysis*, *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, 18(6), 417-428.

Marce, R.M. ve Borrull, F. *Solid Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Compounds, Journal of Chromatography A*, **2000**, 885, 273–290.

Market, B. *Plant as Biomonitors, Indicators for Heavy Metals in The Terrestrial Environment*, VCH Publisher, Weinheim, **1993**, 644.

Martinez, E.; Gros, M.; Lacorte, S.; Barcelo, D. *Simplified Procedures For He Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water, Sediments and Mussels, Journal of Chromatography A*, **2004**, 1047, 181–188.

Mccall K.A.; Huang C.; Fierke C.A. *Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes, Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 1437-1446.

McEntee, J. D.; Woodrow, J. R.; Quirk, A. V. *Investigation of Cadmium Resistance in Alcaligenes sp., Appi. Environ. Microbiol.*, **1986**, 51, 515-520.

Mendez, V.; Fuentes, S.; Hernandez, M.; Morgante, V.; Gonzalez, M.; Seeger, M. *Isolation of Hydrocarbon-Degrading Heavy-Metal-Resistant Bacteria from Crude Oil-Contaminated Soil in Central Chile, Special Abstracts/ Journal of Biotechnology*, **2010**, 150, 1–576.

Mirdamadian, S. H.; Emtiazi, G.; Golabi, M. H.; Ghanavati, H. *Biodegradation of Petroleum and Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Isolated from Petroleum-Contaminated Soil, Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, **2010**, 1, 2-5.

Mudipalli A. *Metals (Micro Nutrients or Toxicants) and Global Health, Indian Journal of Medical Research*, **2008**, 128, 331–334.

Mujahid, T.Y.; Wahab, A.; Padhiar, S. H.; Subhan, S. A.; Baloch, M. N.; Pirzada, Z. A. *Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petrol Contaminated Soil, Journal of Basic & Applied Sciences*, **2015**, 11, 223-231.

NCCLS. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Approved Standards M2 A6, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6th edn., NCCLS., Wayne, Pennsylvania. **1997**.

Neu, T.R. ve Marshall, K.C. *Bacterial Polymers: Physicochemical Aspects of Their Interactions at Interfaces. J. Biomater. Appl.* **1990**, 5, 107-33.

Nies D.H. *Microbial Heavy-Metal Resistance, Appl. Microbiol Biotechnol.*, **1999**. 51, 730-750.

Nithya, C.; Gnanalakshmi, B.; Pandian, S. K. *Assessment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment Bacteria, Marine Environmental Research*, **2011**, 71, 283-294.

Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, M. *Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes, Brazilian Journal of Microbiology*, **2004**, 35, 81-85.

Noordman, W.H.; Brusseau, M.L.; Janssen, D.B. *Adsorption of A Multicomponent Rhamnolipid Surfactant to Soil, Environmental Science & Technology*, **2000**, 34, 832-838.

Orhan, F. *Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2013**, 1-201.

Öğütçü, H.; Algur, Ö. F. *Yabani Baklagil Bitkilerinden, Mikrobiyal Gübre Olarak Kullanılan Rhizobium spp. Bakterilerinin İzolasyonu, Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **2014**, 2(4), 181-184.

Önertürk, F. *Petrol ve Ekonomisi Üzerine*, Maliye Bakanlığı Yayınları, Ankara **1983**, 1-259.

Özdemir, S. *Ağır Metallerin Değişik Termofilik Bakterilerdeki Akümüasyonu, Biyosorbsiyonu ve Çevre Biyoteknolojisinde Kullanımı Üzerine Çalışmalar*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. **2008**, 1-198.

Parker, M.W.; Blake, C.C.; Barra, D.; Bossa, F.; Schinina, M.E.; Bannister, W.H.; Bannister, J.V. *Structural Identity Between The Iron and Manganesecontaining Superoxide Dismutases*, *Protein Engineering*, **1987**, *1*, 393-397.

Patowary, K.; Kalita, M. C.; Deka, S. *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Employing Biosurfactant Producing Pseudomonas aeruginosa KS3*, *Indian Journal of Biotechnology*, **2015**, *14*, 208-215.

Perfumo, A.; Banat, I.; Canganella, F.; Marchant, R. *Rhamnolipid Production by A Novel Thermophilic Hydrocarbon-Degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1*, *Appl. Microbiol Biotechnol*, **2006**, *72*, 132-138.

Plaza, G. A.; Zjawiony, I.; Banat, I. M. *Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon Ontaminated and Bioremediated Soils*, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **2006**, *50*, 71-77.

Poeton, T.; Stensel, H.; Strand, S. *Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons By Marine Bacteria; Effect of Solid Phase on Degradation Kinetics*, *Water Res.*, **1999**, *33*, 868-880.

Prakash, A.; Bisht, S.; Singh, J.; Teotia, P.; Kela, R.; Kumar, V. *Biodegradation Potential of Petroleum Hydrocarbons by Bacteria and Mixed Bacterial Consortium Isolated from Contaminated Sites*, *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, **2014**, *38*, 41-50.

Ramos, S. V.; Ruiz, M. C. P.; Casarrubias, M. L. B.; Muñoz, J. V. T.; Chavira, B. E. R.; Moorillón, G. V. N. *Selection of Biosurfactant/Bioemulsifier-Producing Bacteria from Hydrocarboncontaminated Soil, Brazilian Journal of Microbiology*, **2010**, *41*, 668-675.

Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A; Oliveira, R. *Low-Cost Fermentative Medium for Biosurfactant Production by Probiotic Bacteria, Biochemical Engineering Journal*, **2006**, *32*, 135-142.

Rojas-Avelizapa N.G.; Rodriguez-Vazquez R.; Enriquez-Villanueva F.; Martinez-Cruz J.; Poggi-Varaldo, H. M. *Transformer Oil Degradation by An Indigenous Microflora Isolated from A Contaminated Soil, Resources, Conservation and Recycling*, **1999**, *27*, 15-26.

Ron, E.Z. and Rosenberg, E. *Biosurfactants and Oil Bioremediation, Environ. Microbiol.*, **2001**, *13*, 249–252.

Rosenberg, E. and Ron, E. Z. *High- and Low Molecular-Mass Microbial Surfactants, Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, *52*, 154-162.

Sabiha-Javied M.T.; Tufai M.; Irfan N. *Heavy Metal Pollution from Phosphate Rock Used for The Production of Fertilizer in Pakistan, Microchemical Journal*, **2009**, *91*, 94-99.

Sanchez-Chardi A.; Ribeiro C.A.O.; Nadal, J. *Metals in Liver and Kidneys and The Effects of Chronic Exposure to Pyrite Mine Pollution in The Shrew Crocidura russula Inhabiting The Protected Wetland of Donana, Chemosphere*, **2009**, *76*, 387-394.

Sandaa, R.A.; Torsvik, V.L.; Goksùyr, J. *Transferable Drug Resistance in Bacteria from Fish Farm Sediments, Can J Micro-Biol.*, **1992**, *38*, 1061±1065.

Saygılı, B. *Aseñaften ve Floren Biyoparçalama Kapasitesindeki Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Parçalama Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2012**, 1-81.

Saylers, A. A. ve Shoemaker, N.B. *Broad Host Range Gene Transfer: Plasmids and Conjugative Transposons*, *FEMS Microbiol Ecol*, **1994**, *15*, 15-22.

Scott, J.R. *Sex and The Single Circle: Conjugative Transposition*, *J. Bacteriol*, **1992**, *174*, 6005-6010.

Sevgi, E. *Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin. **2007**, 1-115.

Sevgi, E.; Coral, G.; Gizir, A. M.; Sangün, M. K. *Investigation of Heavy Metal Resistance in Some Bacterial Strains Isolated from Industrial Soils*, *Turk J Biol (Tübitak)*, **2010**, *34*, 423-431.

Sevil, Y. *Dünyada ve Türkiyede Petrol*, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Ekonomik Araştırmalar ve Değerlendirme Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara, **2003**.

Sezen, S. *Afşin-Elbistan Linyit Madeninden Linyit İyileştirme Teknolojisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2015**, 1-90.

Shulga, A.; Karpenko, E.; Vildanova-Martshishin, R.; Turovsky, A.; Soltys, M. *Biosurfactant Enhanced Remediation of Oil-Contaminated Environments, Adsorpt. Sci. Technol.*, **1999**, *18*, 171–176.

Siegmund, I. ve Wagner, F. *New Method for Detecting Rhamnolipids Excreted by Pseudomonas Species During Growth on Mineral Agar, Biotechnol. Tech.*, **1991**, *5*, 265-268.

Silver, S. ve Phung, L. T. *Bacterial Heavy Metals Resistance: New Surprises, Annu. Rev. Microbiol.*, **1996**, *50*, 753-789.

Singh, A.; Van Hamme, J. D.; Ward, O. P. *Surfactants in Microbiology and Biotechnology, Part 2, Application Aspects*, **2006**.

Singh, S. N.; Kumari, B.; Upadhyay, S. U.; Mishra, S.; Kumar, D. *Bacterial Degradation of Pyrene in Minimal Salt Medium Mediated by Catechol Dioxygenases: Enzyme Purification and Molecular Size Determination, Bioresource Technology*, **2013**, *133*, 293–300.

Sprovieri, M.; Feo, M. L.; Prevedello, L.; Manta, D. S.; Sammartino, S.; Tamburrino, S.; Marsella E. *Heavy Metals, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls in Surface Sediments of The Naples Harbour, Chemosphere, Southern Italy*, **2007**, *67*, 998-1009.

Sriram, M. I.; Gayathiri, S.; Gnanaselvi, U.; Jenifer, P. S.; Jenifer, S. M.; Gurunathan, S. *Novel Lipopeptide Biosurfactant Produced by Hydrocarbon Degrading and Heavy Metal Tolerant Bacterium Escherichia fergusonii Klu01 as A Potential Tool for Bioremediation, Bioresource Technology*, **2011**, *102*, 9291–9295.

Tamer, A.Ü.; Uçar, F.; Ünver, E.; Karaboz, İ.; Bursalıoğlu, M.; Oğultekin, R. *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teksirler Serisi No:55, İzmir, **1989**, 260.

Taşdemir, Y. *Modification and Evaluation of a Water Surface Sampler to Investigate the Deposition and Air Water Exchange of Polychlorinated Bipheyls (PCBs)*, Doktora Tezi, Illinois Institute of Technology, **1997**.

Telli-Karakoç, F.; Tolun, L.; Henkelmann, B.; Klimm, C.; Okay, O.; Schramm, K.W. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (Pcbs) Distributions in The Bay of Marmara Sea: Izmit Bay. Environmental Pollution*, **2002**, 119, 383–397.

Temiz, A. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **1994**, 266.

Temiz, A. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hatipoğlu Yayıncılık, Ankara, **2010**, 277.

Torabi, S. F. *Ağır Metal Dirençli Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2013**, 1-81.

Tuğrul, T., ve Cansunar, E. *Detecting Surfactant-Producing Microorganisms by The Drop Collapse Test*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2005**, 21, 851–853.

Tulloch, A.P.; Spencer, J.F.T.; *Fermentation of Long-Chain Compounds by Torulopsis apicola IV. Products From Esters And Hydrocarbons with 14 and 15 Carbon Atoms and from Methyl Palmitolate*, *Can J Chem*, **1968**, 46, 1523-1528.

Uysal, A. ve Türkman, A. *Klorofenollü Bileşiklerin Ayrışabilirliğinin Biyosümfektan Kullanımı ile Hızlandırılması*, *SKKD*, **2004**, 14, 23-30.

Üşümezsoy, Ş. ve Şen, Ş. *Yeni Dünya Petrol Düzeni ve Körfez Savaşları*, İnkılap Yayınları, İstanbul, **2003**.

Valsala, H.; Prakash, P.; Elavarasi, V.; Pugazhendhi, A.; Thamaraiselvi, K. *Isolation of Staphylococcus nepalensis for Degradation of Pyrene from Diesel Contaminated Site, International Journal of Computer Applications (IJCA)*, **2014**, 975 – 8887.

Vural H. *Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler, Çevre Dergisi*, **1993**, 8, 3-8.

Wackett L.P.; Dodge, A.G.; Ellis L.B.M. *Microbial Genomics and The Periodic Table, Appl Environ Microbiol*, **2004**, 70, 647-655.

Wang, H.; Lou, J.; Gu, H.; Luo, X.; Yang, L.; Wu, L.; Liu, Y.; Wu, W.; Xu, J. *Efficient Biodegradation of Phenanthrene by A Novel Strain Massilia sp. WF1 Isolated from A PAH Contaminated Soil, Environ Sci Pollut Res*, **2016**, 23, 13378–13388.

Wang, X. Y.; Li, Q. B.; Luo, Y. M.; Ding, Q.; Xi, L. M.; Ma, J. M.; Cheng, C. L. *Characteristics and Sources of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Shanghai, Environmental Monitoring and Assessment, China*, **2010**, 165(1-4), 295–305.

Wcisłło, E. *Soil Contamination with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Poland - A Review, Polish Journal of Environmental Studies*, **1998**, 7(5), 267–272.

Wenzl, T.; Simon, R.; Anklam, E.; Kleiner, J. *Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food and The Environment Needed for New Food Legislation in The European Union, Trac - Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25(7), 716–725.

WHO, *Selected Non Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Environmental Health Criteria, International Programme on Chemical Safety*, World Health Organisation, Geneva, **1998**, 202.

Wiener, P.; Müller-Graf, C.; Barcus, V. *Bacterial Evolution in Modern Times:Trends and Implications for Research, Reviews in Undergraduate Research*, **2003**, 2, 1-6.

World Health Organization, *Air Quality Guidelines –Second Edition, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, **2000**, 288.

Yalçın, E. *Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosülfektan Eldesi ve Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması*, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, **2008**, 1-136.

Yang, H.; Lee, W.; Chen, S.; Lai, S. *PAH Emission from Various Industrial Stacks* , *Journal of Hazardous Materials* , **1998**, 60, 159–17.

Yanto, D. H. Y. ve Tachibana, S. *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by A Newly Isolated Pestalotiopsis sp. NG007*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2013**, 85, 438-450.

Yılmaz, F. *Süt Fabrikası Atık Sularından Mikroorganizma İzolasyonu ve Biyosülfektan Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, **2008**, 1-120.

Yunker, M.B. and Macdonald R.W. *Petroleum Biomarker Sources in Suspended Particulate Matter and Sediments from The Fraser River Basin and Strait of Georgia*, *Organic Geochemistry*, Canada, **2003**, 34, 1525– 1541.

Yücel, D. *Sakarya İli Sanayi Bölgesinin Yakın Çevresinde ve Şehir Merkezinde Oluşturduğu Atmosferik Ağır Metal Birikim Seviyelerinin Bir Biyomonitör*

Karayosunu (Hypnum cupressiforme Hedw.) ve Toprak Örnekleri Üzerinden Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, **2010**, 1-103.

Zafra, G.; Absalón, Á. E.; Cuevas, M. D. C.; Cortés-Espinosa, D. V. *Isolation and Selection of A Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils*, *Water Air Soil Pollut*, **2014**, 225, 1826-1844.

Zhang Y. and Miller, R. M. *Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant)*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, 58, 3276-3282.

Zhang Y. and Miller, R. M. *Effect of A Pseudomonas Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, 60, 2101-2106.

Zhang, J. L. G.; Li, X. D.; Qi, S. H.; Liu, G. Q.; Peng, X. Z. *Source Seasonality of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Subtropical City*, *Science of The Total Environment*, Guangzhou, South China, **2006**, 355(1-3), 145–155.

Zhao, Z., ve Wong, J. W. C. *Biosurfactants from Acinetobacter calcoaceticus Bu03 Enhance The Solubility and Biodegradation of Phenanthrene*. *Environmental Technology*, **2009**, 30(3), 291-299.

EKLER

EK-1: YH9-2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz Sayısı: 1418

Baz İçeriği: 364 A 329 C 432 G 293 T

Gen Bankası No: KY010267

```
1 TGCAGTCGAG CGAACTGATT AGAAGCTTGC TTCTATGACG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT
61 AACACGTGGG CAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTTCG GGAAACCGAA GCTAATACCG
121 GATAGGATCT TCTCCTTCAT GGGAGATGAT TGAAGATGG TTTTCGGCTAT CACTTACAGA
181 TGGGCCCGCG GTGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCA ACGATGCATA
241 GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGAAGTCTG ACGGCCAGCA CTCCTACGGG
301 AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCCGGTGAG
361 TGATGAAGGC TTTTCGGGTCG TAAAACCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAGTA CGAGAGTAAC
421 TGCTCGTACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC
481 GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG CGTAAAGCGC GCGCAGGCGG
541 TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCACGGC TCAACCGTGG AGGGTCATTG GAAACTGGGG
601 AACTTGAGTG CAGAAGAGAA AAGCGGAATT CCACGTGTAG CGGTGAATG CGTAGAGATG
661 TGGAGGAACA CCAGTGGCGA AGGCGGCTTT TTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCGCGAAA
721 GCGTGGGGAG CAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG ATGAGTGCTA
781 AGTGTTAGAG GGTTCGGCC CTTTAGTGCT GCAGCTAACG CATTAGCAC TCCGCCTGGG
841 GAGTACGGTC GCAAGACTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG
901 CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCTCTGACAA
961 CTCTAGAGAT AGAGCGTCC CTTTCGGGGG ACAGAGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT
1021 CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCTT TGATCTTAGT
1081 TGCCAGCATT TAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGTG ACAACCCGGA GGAAGGTGGG
1141 GATGACGTC AATCATCATG CCCCATTATG CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGATGG
1201 TACAAAGGGC TGCAAGACCG CGAGGTCAAG CCAATCCCAT AAAACCATTC TCAGTTCGGA
1261 TTGTAGGCTG CAACTCGCCT ACATGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC
1321 CGCGGTGAAT ACGTTCGGG GCCTTGTTACA CACCGCCGT CACACCAGCA GAGTTTGTA
1381 CACCCGAAGT CCGTGGAGTA ACCGTAAGGA GCTAGCCG
```

EK-2: YH9-4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz Sayısı: 1344

Baz İçeriği: 338 A 313 C 429 G 264 T

Gen Bankası No: KY010268

```
1 GGATGCTGAC GAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ATACATCGGA ACGTGCCCGA TCGTGGGGGA
61 TAACGAGGCG AAAGCTTTCG TAATACCGCA TACGATCTAC GGATGAAAGC GGGGGATCTT
121 CGGACCTCGC GCGGACGGAG CCGCCGATGG CAGATTAGGT AGTTGGTGGG ATAAAAGCTT
181 ACCAAGCCGA CGATCTGTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCCACTGG GACTGAGACA
241 CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATTTTG GACAAATGGG GAAAGCCTGA
301 TCCAGCCATG CCGCGTGCAG GATGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGTCTTT TGTACGGAAC
361 GAAAAGCCTC TTTCTAATAA AGAGGGTCA TGACGGTACC GTAAGAATAA GCACCGGCTA
421 ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC
481 GTAAAGCGTG CGCAGGCGGT TTTGTAAAGC AGAGGTGAAA TCCCCGGGCT CAACCTGGGA
541 ACTGCCTTTG TGAAGCAAG GCTGGAGTGC GGCAGAGGGG GATGGAATTC CGCGTGTAGC
601 AGTGAATGCG GTAGATATGC GGAGGAACAC CGATGGCGAA GGCAATCCCC TGGGCCTGCA
661 CTGACGCTCA TGCACGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGTACCCTG GTAGTCCACG
721 CCCTAAACGA TGTCAACTGG TTGTTGGGTC TTCACTGACT CAGTAACGAA GCTAACGCGT
781 GAAGTTGACC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGAC
841 CCGCACAAGC GGTGGATGAT GTGGTTAAT TCGATGCAAC GCGAAAAACC TTACCCACCT
901 TTGACATGGC AGGAAGTTTC CAGAGATGGA TTCGTGCCCG AAAGGGAACC TGCACACAGG
961 TGCTGCATGG CTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG
1021 CAACCTTTCG CATTAGTTGC TACGAAAGGG CACTCTAATG GGACTGCCGG TGACAAAACCG
1081 GAGGAAGGTG GGGATGACGT GAGTCCCTCA TGGCCCTTAT AGTGGGGGCT ACACACGTCA
1141 TACAATGGCT GGTACAGAGG GTTGCCAACC CGCGAGGGGG AGCTAATCCC ATAAAAGCCAG
1201 TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
1261 GGATCAGAAT GTCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGTCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT
1321 GGGAGCGGGT TCTGCCAGAA GTAG
```

EK-3: YH9-5 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1346**Baz İçeriği:** 338 A 313 C 430 G 265 T**Gen Bankası No:** KY010269

```
1 GGATGCTGAC GAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ATACATCGGA ACGTGCCCGA TCGTGGGGGA
61 TAACGAGGCG AAAGCTTTCG TAATACCGCA TACGATCTAC GGATGAAAGC GGGGGATCTT
121 CGGACCTCGC GCGGACGGAG CCGCCGATGG CAGATTAGGT AGTTGGTGGG ATAAAAGCTT
181 ACCAAGCCGA CGATCTGTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCACACTGG GACTGAGACA
241 CCGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATTTG GACAATGGGC GAAAGCCTGA
301 TCCAGCCATG CCGCGTGCAG GATGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAC TGCTTT TGTACGGAAC
361 GAAAAGCCTC TTTCTAATAA AGAGGGGTCA TGACGGTACC GTAAGAATAA GCACCGGCTA
421 ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC
481 GTAAAGCGTG CGCAGGCGGT TTTGTAGAC AGAGGTGAAA TCCCGGGGCT CAACCTGGGA
541 ACTGCCTTTG TGA CTGCAAG GCTGGAGTGC GGCAGAGGGG GATGGAAATC CGCGTGTAGC
601 AGTCAAATGC GTAGATATGC GGAGGAACAC CGATGGCGAA GGCAATCCCG TGGGCCTGCA
661 CTGACGCTCA TGCACGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCTCG GTAGTCCACG
721 CCCTAAACGA TG TCAACTGG TTGTTGGGTC TTCACTGACT CAGTACGAA GCTAACGCGT
781 GAAGTTGACC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGAC
841 CCGCACAAGC GGTGGATGAT GTGGTTAAT TCGATGCAAC GCGAAAAC TTACCACCT
901 TTGACATGGC AGGAAGTTTC CAGAGATGGA TTCGTGCCCG AAAGGGAACC TGCACACAGG
961 TGCTGCATGG CTGTCTCAG CTCGTCTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG
1021 CAACCTTGC CATTAGTTGC TACGAAAGGG CACTCTAATG GGACTGCCGG TGACAAAACCG
1081 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCTCA TGGCCCTTAT AGGTGGGGCT ACACACGTCA
1141 TACAATGGCT GGTACAGAGG GTTGCCAACC CGCGAGGGGG AGCTAATCCC ATAAAGCCAG
1201 TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
1261 GGATCAGAAAT GTCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGTCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT
1321 GGGAGCGGGT TCTGCCAGAA GTAGGT
```

EK-4: YH9-6 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1392**Baz İçeriği:** 351 A 320 C 450 G 271 T**Gen Bankası No:** KY010270

```
1 AGTCGAACGG CAGCGCGGGC TTCGGCCTGG CCGCGAGTGG CGAACGGGTG AGTAATACAT
61 CGGAACGTGC CCTGTCTGTT GGGATAACTA GTCGAAAGAT TAGCTAATAC CGCATAACGAC
121 CTGAGGTGTA AAGCGGGGGA CCGGTAACGG CCTCGCGCGA TAGGAGCGGC CGATGCTGTA
181 TTAGCTAGTT GGTGGGGTAA AGGCCTACCA AGGCGACGAT CAGTAGCTGG TCTGAGAGGA
241 CGATCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGG
301 ATTTTGGACA ATGGGGGCAA CCCTGATCCA GCAATGCCCG GTGTGTGAAG AAGGCCTTCG
361 GGTTGTAAAG CACTTTTGTC CGGAAAGAAA TGGCTCTGGT TAATACCCGG GGTGATGAC
421 GGTACCGGAA GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT
481 GCGAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGTGC GCA GCGGTTTG TAAGACAGGC
541 GTGAAATCCC CGAGCTCAAC TTGGGAATGG CGCTTGAGC TGCCAGGCTA GAGTAGTCA
601 GAGGGGGGTA GAATTCACG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG AGATGTGGAG GAATACCGAT
661 GGCGAAGGCA GCCCCCTGGG ACGTCACTGA CGTCACTGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC
721 AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT AAACGATGTC AACTAGTTGT TGGGATTCA
781 TTTCTTCAAG AACGTAGCTA ACGCGTGAAG TTGACCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT
841 TAAAAC TCAA AGGAATTGAC GGGGACCCGC ACAAGCGGTG GATGATGTGG ATTAATTCTGA
901 TGCAACGCGA AAAACCTTAC CTACCCTTGA CATGCCACTA ACGAAGCAGA GATGCATTAG
961 GTGCCCGAAA GGGAAAGTGG ACACAGGTGC TGCAATGGCTG TCGTCAAGCTC GTGTCTGAG
1021 ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTGCTCT TAGTTGCTAC GAAAGGGCAC
1081 TCTAGAGAGA CTGCCGTTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAG GTCCATCTGG
1141 CCCTTATGGG TAGGGCTTCA CACGTCATAC AATGGTGCCT ACAGAGGGTT GCCAACC CGC
1201 GAGGGGGAGC TAATCCCGA AAACGCATCG TAGTCCGGAT CGTAGTCTGC AACTCGACTA
1261 CGTGAAGCTG GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCGCCGG
1321 TCTTGTACAC ACCGCCCGTC ACACCATGGG AGTGGGTTTT GCCAGAAGTA GTTAGCTTAA
1381 CCGCAAGGAG GG
```

EK-5: YH9-8 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1396****Baz İçeriği: 361 A 306 C 428 G 301 T****Gen Bankası No: KY010271**

```
1  GTCGAGCGGA  GTGGTGGTGC  TTGCACTATC  ACTTAGCGGC  GGACGGGTGA  GTAATGCTTA
61  GGAATCTGCC  TATTAGTGGG  GGACAACATT  TCGAAAGGAA  TGCTAATACC  GCATACGTCC
121  TACGGGAGAA  AGCAGGGGAT  CTTTCGACCT  TGCGCTAATA  GATGAGCCTA  AGTCGGATTA
181  GCTAGTTGGT  GGGGTAAAGG  CCTACCAAGG  CGACGATCTG  TAGCGGGTCT  GAGAGGATGA
241  TCCGCCACAC  TGGGACTGAG  ACACGGCCCA  GACTCCTACG  GGAGGCAGCA  GTGGGGAATA
301  TTGGACAATG  GGCGCAAGCC  TGATCCAGCC  ATGCCCGGTG  TGTGAAGAAG  GCCTTATGGT
361  TGTAAGCAC  TTTAAGCGAG  GAGGAGGCTA  CTGAAGTTAA  TACCTTCAGA  TAGTGGACGT
421  TACTCGCAGA  ATAAGCACCG  GCTAACTCTG  TGCCAGCAGC  CGCGGTAATA  CAGAGGGTGC
481  AAGCGTTAAT  CGGATTTACT  GGGCGTAAAG  CGCGCGTAGG  CGGCTAATTA  AGTCAAATGT
541  GAAATCCCCG  AGCTTAACTT  GGGAAATGCA  TTCGATACTG  GTTAGCTAGA  GTGTGGGAGA
601  GGATGGTAGA  ATTCCAGGTG  TAGCGGTGAA  ATGCGTAGAG  ATCTGGAGGA  ATACCGATGG
661  CGAAGGCAGC  CATCTGGCCT  AACACTGACC  CTGAGGTGCG  AAAGCATGGG  GAGCAAACAG
721  GATTAGATAC  CCTGGTAGTC  CATGCCGTAA  ACGATGTCTA  CTAGCCGTTG  GGGCCTTTGA
781  GGCTTTAGTG  GCGCAGCTAA  CGCGATAAGT  AGACCGCCTG  GGGAGTACGG  TCGCAAGACT
841  AAAACTCAA  TGAATTGACG  GGGGCCCGCA  CAAGCGGTGG  AGCATGTGGT  TTAATTCGAT
901  GCAACGCGAA  GAACCTTACC  TGGCCTTGAC  ATAGTAAGAA  CTTTCAGAG  ATGGATTGGT
961  GCCTTCGGGA  ACTTACATAC  AGGTGCTGCA  TGGCTGTCGT  CAGCTCGTGT  CGTGAGATGT
1021  TGGGTTAAGT  CCCGCAACGA  GCGCAACCTT  TTTCCCTATT  TGCCAGCGAG  TAATGTCGGG
1081  AACTTTAAGG  ATACTGCCAG  TGACAACTG  GAGGAAGGCG  GGGACGACGT  CAAGTCATCA
1141  TGGCCCTTAC  GGCCAGGGCT  ACACACGTGC  TACAATGGTC  GGTACAAAGG  GTTGCTACCT
1201  AGCGATAGGA  TGCTAATCTC  AAAAAGCCGA  TCGTAGTCCG  GATTGGAGTC  TGCAACTCGA
1261  CTCCATGAAG  TCGGAATCGC  TAGTAATCGC  GGATCAGAAT  GCCGCGGTGA  ATACGTTCCC
1321  GGGCCTTGTA  CACACCGCCC  GTCACACCAT  GGGAGTTTGT  TGCACCAGAA  GTAGTGTAGT
1381  TAACCGCAAG  GAGGAC
```

EK-6: YH-9-12 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1415****Baz İçeriği: 364 A 327 C 431 G 293 T****Gen Bankası No: KY010272**

```
1  TGCAGTCGAG  CGAACTGATT  AGAAGCTTGC  TTCTATGACG  TTAGCGGCGG  ACGGGTGAGT
61  AACACGTGGG  CAACCTGCCT  GTAAGACTGG  GATAACTTCG  GGAAACCGAA  GCTAATACCG
121  GATAGGATCT  TCTCCTTCAT  GGGAGATGAT  TGAAAGATGG  TTTTCGGCTAT  CACTTACAGA
181  TGGGCCCGCG  GTGCATTAGC  TAGTTGGTGA  GGTAACGGCT  CACCAAGGCA  ACGATGCATA
241  GCCGACCTGA  GAGGGTGATC  GGCCACACTG  GGACTGAGAC  ACGGCCCAGA  CTCTACGGG
301  AGGCAGCAGT  AGGGAATCTT  CCGCAATGGA  CGAAAGTCTG  ACGGAGCAAC  GCCGCGTGAG
361  TGATGAAGGC  TTTTCGGGTCG  TAAAACCTCTG  TTGTTAGGGA  AGAACAGTA  CGAGAGTAAC
421  TGCTCGTACC  TTGACGGTAC  CTAACCAGAA  AGCCACGGCT  AACTACGTGC  CAGCAGCCGC
481  GGTAATACGT  AGGTGGCAAG  CGTTATCCGG  AATTATGGGG  CGTAAAGCGC  GCGCAGGCGG
541  TTTCTTAAGT  CTGATGTGAA  AGCCCACGGC  TCAACCGTGG  AGGGTCATTG  GAAACTGGGG
601  AACTTGAGTG  CAGAAGAGAA  AAGCGGAATT  CCACGTGTAG  CGGTGAAATG  CGTAGAGATG
661  TGGAGGAACA  CCAGTGGCGA  AGGCGCTTT  TTGGTCTGTA  ACTGACGCTG  AGGCGGAAAA
721  CGGTGGGGAG  CAAACAGGAT  TAGATACCTT  GGTAGTCCAC  GCCGTAAACG  ATGAGTGCTA
781  AGTGTTAGAG  GGTTCGGCC  CTTTAGTGCT  GCAGCTAACG  CATTAGCAC  TCCGCTGGG
841  GAGTACGGTC  GCAAGACTGA  AACTCAAAGG  AATTGACGGG  GGCCCGCAC  AGCGGTGGAG
901  CATGTGTTT  AATTCGAAGC  AACGCGAAGA  ACCTTACCAG  GTCTTGACAT  CCTCTGACAA
961  CTCTAGAGAT  AGAGCGTTCC  CCTTCGGGGG  ACAGAGTGAC  AGGTGGTGCA  TGTTGTGCTG
1021  CAGTCGTGT  CGTGAGATGT  TGGGTTAAGT  CCCGCAACGA  GCGCAACCTT  TGATCTTAGT
1081  TGCCAGCATT  TAGTTGGGCA  CTCTAAGGTG  ACTGCCGGTG  ACAAACCGGA  GGAAGGTGGG
1141  GATGACGTCA  AATCATCATG  CCCCTTATGA  CCTGGGCTAC  ACACGTGCTA  CAATGGATGG
1201  TACAAAGGGC  TGCAAGACCG  CGAGGTCAAG  CCAATCCCAT  AAAACCATT  TCAGTTCGGA
1261  TTGTAGGCTG  CAACTCGCCT  ACATGAAGCT  GGAATCGCTA  GTAATCGCGG  ATCAGCATGC
1321  CGCGGTGAAT  ACGTTCCCGG  GCCTTGTA  CACCGCCGT  CACACCAGGA  GAGTTTGTA
1381  CACCCGAAGT  CGGTGGAGTA  ACCGTAAGGA  GCTAG
```

EK-7: YH10-11 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1429**Baz İçeriği:** 359 A 339 C 448 G 283 T**Gen Bankası No:** KY010273

```
1 TGCAAGTCGA GCGGACAGAT GGGAGCTTGC TCCCTGATGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA
61 ACACGTGGGT AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG
121 ATGGTTGTTT GAACCGCATG GTTCAAACAT AAAAGGTGGC TTCGGCTACC ACTTACAGAT
181 GGACCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA CGATGCGTAG
241 CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA
301 GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT
361 GATGAAGGTT TTCGGATCGT AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAC CGTTCGAATA
421 GGGCGGTACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC
481 GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCGG AATTATGGG CGTAAAGGGC TCGCAGCGCG
541 TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCCGGC TCAACCGGGG AGGGTCATTG GAAACTGGGG
601 AACTTGAGTG CAGAAGAGGA GAGTGAATT CCACGTGTAG CGGTAAAATG CGTAGAGATG
661 TGGAGGAACA CCAGTGGCGA AGGCGACTCT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGAGCGAAA
721 GCGTGGGGAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG ATGAGTGCTA
781 AGTGTTAGGG GGTTCGCC CTTAGTGCT GCAGCTAACG CATTAGCAC TCCGCTGGG
841 GAGTACGGTC GCAAGACTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCAC AGCGGTGGAG
901 CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCTCTGACAA
961 TCCTAGAGAT AGGACGTCCC CTTCCGGGGC AGAGTGACAG GTGGTGCATG GTTGTCTGTA
1021 GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTG ATCTTAGTTG
1081 CCAGCATPCA GTTGGGCACT CTAAGGTGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA
1141 TGACGTCAA TCATCATGCC CTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGTACA ATGGACAGAA
1201 CAAAGGGCAG CGAAACCGCG AGGTTAAGCC AATCCCACAA ATCTGTTCTC AGTTCGGATC
1261 GCAGTCTGCA ACTCGACTGC GTGAAGCTGG AATCGTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG
1321 CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCGTCA CACCAGAGA GTTTGTAAACA
1381 CCCGAAGTCG GTGAGGTAAC CTTTAGGAGC CAGCCGCCGA AGTGACAGA
```

EK-8: YH10-12 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1379**Baz İçeriği:** 358 A 304 C 419 G 298 T**Gen Bankası No:** KY010274

```
1 GCTTGCTACC GATCTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAATGCT TAGGAATCTG CCTATTAGTG
61 GGGGACAACA TTTCGAAAGG AATGCTAATA CCGCATACTG CCTACGGGAG AAAGCAGGGG
121 ATCTTCGGAC CTTGCGCTAA TAGATGAGCC TAAGTCGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA
181 GGCCTACCAA GGCGACGATC TGTAGCGGGT CTGAGAGGAT GATCCGCCAC ACTGGGACTG
241 AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG
301 CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGCCTTATG GTTGTAAAGC ACTTTAAGCG
361 AGGAGGAGGC TACTTTAGTT AATACCTAGA GATAGTGGAC GTTACTCGCA GAATAAGCAC
421 CGGCTAACTC TGTGCCAGCA GCCGCGTAA TACAGAGGGT GCAAGCGTTA ATCGGATTTA
481 CTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GGCGGTAAT TAAGTCAAAT GTGAAATCCC CGAGCTTAAC
541 TTGGGAATTG CATTGATAC TGTTAGCTA GAGTGTGGGA GAGGATGGTA GAATTCAGG
601 TGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATCTGGAG GAATACCGAT GCGGAAGGCA GCCATCTGGC
661 CTAACACTGA CGCTGAGGTG CGAAAGCATG GGGAGCAAAC AGGATTAGT ACCCTGGTAG
721 TCCATGCCGT AAACGATGTC TACTAGCCGT TGGGGCCTTT GAGGCTTTAG TGGCGCAGCT
781 AACCGGATAA GTAGACCGCC TGGGGAGTAC GGTGCGAAGA CTAAACTCA AATGAATTGA
841 CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG ATGCAACCGG AAGAACCTTA
901 CCTGGCCTTG ACATAGTAAG AACTTTCCAG AGATGGATTG GTGCCTTCGG GAACTTACAT
961 ACAGGTGCTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC
1021 GAGCGCAACC CTTTTCTTA TTTGCCAGCG AGTAATGTCG GGAACTTTAA GGACTACTGCC
1081 AGTGACAAAC TGGAGGAAGG CGGGGACGAC GTCAAATCAT CATGGCCCTT ACGGCCAGGG
1141 CTACACACGT GCTACAATGG TCGGTACAAA GGGTTGCTAC CTAGCGATAG GATGCTAATC
1201 TCAAAAAGCC GATCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC
1261 GCTAGTAATC GCGGATCAGA ATGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC
1321 CCGTCACACC ATGGGAGTTT GTTGACCAG AAGTAGCTAG CCTAACTGCA AAGAGGGCG
```

EK-9: YH11-1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1373****Baz İçeriği: 346 A 320 C 439 G 268 T****Gen Bankası No: KY010275**

```
1 GCAGCGCGGG CTTCGGCCTG GCGGCGAGTG GCGAACGGGT GAGTAATACA TCGGAACGTG
61 CCCTGTCGTG GGGGATAACT AGTCGAAAGA TTAGCTAATA CCGCATAACGA CCTGAGGGTG
121 AAAGCGGGGG ACCGCAAGGC CTCGCGCGAT AGGAGCGGCC GATGTCTGAT TAGCTAGTTG
181 GTGGGGTAAG AGCCTACCAA GGCGACGATA AGTAGCTGGT CTGAGAGGAC GATCAGCCAC
241 ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TTTTGACAA
301 TGGGGGCAAC CCTGATCCAG CAATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGCCTTCGG GTTGTAAAGC
361 ACTTTTGTCC GGAAAGAAAT GGCGCTGGTT AATACCCGGC GTCGATGACG GTACCGGAAG
421 AATAAGCACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGTG CGAGCGTTAA
481 TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGTGCGCAG GCGGTTTGAT AAGACAGGCG TGAATCCCC
541 GAGCTCAACT TGGGAATGGC GCTCGTGACT GTCAGGCTAG AGTATGTCAG AGGGGGGTAG
601 AATTCACGCT GTAGCACTGA AATGCGTAGA GATGTGGAGG AATACCGATG GCGAAGGCAG
661 CCCCCTGGGA CGTCACTGAC GTCATGCAC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA
721 CCCTGGTAGT CCACGCCCTA AACGATGCA ACTAGTTGTT GGGGATTCAT TTCTTCAGTA
781 ACGTAGCTAA CGCGTGAAGT TGACCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA
841 GGAATTGACG GGGACCCGCA CAAGCGTGG ATGATGTGGA TTAATTCGAT GCAACGCGAA
901 AAACCTTACC TACCCTTGAC ATGCCACTAA CGAAGCAGAG ATGCATTAGG TGCCCGAAAG
961 GGAAAGTGGA CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTGGGGTTA
1021 AGTCCCACAA CGAGCGCAAC CCTTGCTCTT AGTTGCTACG CAAGGGCACT CTAGAGAGAC
1081 TGCCCGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAG TCCTCATGGC CCTTATGGGT
1141 AGGGCTTAC ACGTCATACA ATGGTGCGTA CAGAGGGTTG CCAACCCGCG AGGGGGAGCT
1201 AATCCAGAAA AACGCATCGT AGTCCGATC GTAGTCTGCA ACTCGACTAC GTGAAGCTGG
1261 AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGT CTTGTACACA
1321 CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTGGGTTTTG CCAGAAGTAG TTAGCTAACC CGC
```

EK-10: YH13-1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1380****Baz İçeriği: 350 A 326 C 438 G 266 T****Gen Bankası No: KY010276**

```
1 GCAGCACGGA CTTCGGTCTG GTGGCGAGTG GCGAACGGGT GAGTAATGTA TCGGAACGTG
61 CCCAGTAGCG GGGGATAACT ACGCGAAAGC GTAGCTAATA CCGCATAACGC CCTACGGGGG
121 AAAGCAGGGG ATCGCAAGAC CTTGCACTAT TGGAGCGGCC GATATCGGAT TAGCTAGTTG
181 GTGGGGTAAC GGCTCACCAA GGCGACGATC CGTAGCTGGT TTGAGAGGAC GACCAGCCAC
241 ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TTTTGACAAA
301 TGGGGGAAAC CCTGATCCAG CCATCCCGCG TGTGCGATGA AGGCCTTCGG GTTGTAAAGC
361 ACTTTTGGCA GGAAAGAAAC GTCGCGGGTT AATACCTCGC GAAACTGACG GTACCTGCAG
421 AATAAGCACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGTG CAAGCGTTAA
481 TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGTGCGCAG GCGGTTTCGGA AAGAAAGATG TGAATCCCA
541 GAGCTTAACT TTGGAAGTGC ATTTTAACT ACCGGGCTAG AGTGTGTCAG AGGGAGGTGG
601 AATTCGCGCT GTAGCAGTGA AATGCGTAGA TATGCGGAGG AACACCGATG GCGAAGGCAG
661 CCTCCTGGGA TAACACTGAC GTCATGCAC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA
721 CCCTGGTAGT CCACGCCCTA AACGATGCA ACTAGCTGTT GGGCCTTCG GGCCTGGTA
781 CGCAGCTAA CGCGTGAAGT TGACCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA
841 GGAATTGACG GGGACCCGCA CAAGCGTGG ATGATGTGGA TTAATTCGAT GCAACGCGAA
901 AAACCTTACC TACCCTTGAC ATGTCTGGAA TGCCGAAGAG ATTTGGCAGT GCTCGCAAGA
961 GAACCGAAC ACAGGTGCTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA
1021 GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTGTCAATTA GTTGCTACGA AAGGGCACTC TAATGAGACT
1081 GCGGTTGACA AACCGGAGGA AGTGGGGAT GACGTCAAGT CCTCATGGCC CTTATGGGTA
1141 GGGCTTACAA CGTCATACAA TGGTCCGGAC AGAGGGTTCG CAACCCGCGA GGGGAGCCA
1201 ATCCAGAAA CCCGATCGTA GTCCGGATCG CAGTCTGCAA CTCGACTGCG TGAAGTCGGA
1261 ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCATGTCGC GGTGAATACG TTCCCGGGTC TTGTACACAC
1321 CGCCCGTAC ACCATGGGAG TGGGTTTTAC CAGAAGTAG TAGCCTAACC GCAAGGGGGG
```

EK-: YH13-2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz Sayısı: 1382

Baz İçeriği: 358 A 313 C 434 G 277 T

Gen Bankası No: KY010277

```
1 GCACGGGCTT CGGCCTGGTG GCGAGTGGCG AACGGGTGAG TAATACATCG GAACGTACCC
61 AGAAGTGGGG GATAACGCAG CGAAAGTTGC GCTAATACCG CATACTTCT ACGGAAGAAA
121 GTGGGGGATC GCAAGACCTC ATGCTTTTGG AGCGGCCGAT GTCTGATTAG CTAGTTGGTG
181 GGGTAAAGGC CTACCAAGGC GACGATCAGT AGCTGGTCTG AGAGGACGAC CAGCCACACT
241 GGAACGTAGA CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT TGGACAATGG
301 GCGCAAGCCT GATCCAGCAA TGCCCGGTGA GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCTCT
361 TTTGTCAAGG AAGAAACGGC TCCGGCTAAT ATCCGGGGCT AATGACGGTA CCTGAAGAAT
421 AAGCACCAGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CCGTAATACG TAGGGTGCAA GCGTTAATCG
481 GAATTACTGG GCGTAAAGCG TGCGCAGGCG GTTTTGTAAG TCTGACGTGA AAGCCCAGGG
541 CTCAACCTGG GAATTGCGTT GGAGACTGCA AGGCTTGAAT CTGGCAGAGG GGGGTAGAAT
601 TCCACGTGTA GCAGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCGATGGCG AAGGCAGCCC
661 CCTGGGTCAA GATTGACGCT CATGCACGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC
721 TGGTAGTCCA CGCCCTAAAC GATGTCTACT AGTTGTCTGGG TTTTAATTAA CTTGGTAACG
781 CAGCTAACGC GTGAAGTAGA CCGCTGGGG AGTACGGTCG CAAGATTAAA ACTCAAAGGA
841 ATTGACGGGG ACCCGCACAA GCGGTGGATG ATGTGGATTA ATTCGATGCA ACGCGAAAAA
901 CCTTACCTAC CCTTGACATG GAAGGAATCC CGAAGAGATT TGGGAGTGCC CGAAAGGGAA
961 CCTTCACACA GGTGCTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC
1021 CCGCAACGAG CGCAACCCTT GTCATTAGTT GCTACGCAAG AGCACTCTAA TGAGACTGCC
1081 GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCCT CATGGCCCTT ATGGGTAGGG
1141 CTTACACACG CATACAATGG TACATACAGA GGGCCGCCAA CCCGCGAGGG GGAGCTAATC
1201 CCAGAAAGTG TATCGTAGTC CGGATTGTAG TCTGCAACTC GACTACATGA AGTTGGAATC
1261 GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGTCGCGGT GAATACGTTT CCGGGTCTTG TACACACCGC
1321 CCGTCACACC ATGGGAGCGG GTTTTACCAG AAGTAGGTAG CTTAACCGCA AGGAGGGCGC
1381 TA
```

EK-12: YH13-3 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz Sayısı: 1399

Baz İçeriği: 355 A 330 C 431 G 283 T

Gen Bankası No: KY010278

```
1 CAGTCGAGCG ATCGATGGGA GCTTGCTCCC TGAGATTAGC GGCGGACGGG TGAGTAAACAC
61 GTGGGCAACC TGCCATAAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAC
121 GTTCTTTTCT CGCATGAGAG AAGATGGAAA GACGGTTTAC GCTGTCACTT ATAGATGGGC
181 CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA TGGCTCACCA AGGCGACGAT GCGTAGCCGA
241 CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA
301 GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAACGAAG
361 AAGGCCCTCG GGTGCTAAAAG TTCTGTGTGTT AGGGAAGAAC AAGTACCAGA GTAACGCTG
421 GTACCTTGAC GGTACCTAAC CAGAAAGCCA CCGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCCGGTAA
481 TACGTAGGTG GCAAGCGTTG TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGCGCGCA GGTGGTTCCT
541 TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC CGTGGAGGGT CATGGAAAC TGGGGAACCTT
601 GAGTGCAGAA GAGGAAAGTG GAATTCCAAG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATTTGGAG
661 GAACACCAGT GCGGAAGGCG ACTTTCTGTT CTGTAAGTGA CACTGAGGCG CGAAAGCGTG
721 GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAG TGCTAAGTGT
781 TAGAGGGTTT CCGCCCTTTA GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCACTCCGC CTGGGGAGTA
841 CCGCCGCAAG GCTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT
901 GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT GACATCCTCT GACAACCTTA
961 GAGATAGGGC TTTCCCTTTC GGGGGACAGA GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT
1021 CGTATCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTGATC TTAGTTGCCA
1081 GCATTCAGTT GGGCACTCTA AGGTGACTGC CCGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA
1141 CGTCAAATCA TCATGCCCTT TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GATGGTACAA
1201 AGGGCTGCAA ACCTGCGAAG GTAAGCGAAT CCCATAAAGC CATTTCTCAGT TCGGATTGCA
1261 GGCTGCAACT CGCCTGCATG AAGCCGGAAT CGCTAGTAAT CGCGGATCAG CATGCCGCGG
1321 TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTACAC CACGAGAGTT TGTAACACCC
1381 GAAGTCGGTG AGGTAACCT
```

EK-13: YH13-4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1364****Baz İçeriği: 356 A 308 C 423 G 277 T****Gen Bankası No: KY010279**

```
1  CTTCGGCCTG  GTGGCGAGTG  GCGAACGGGT  GAGTAATACA  TCGGAACGTA  CCCAGAAGTG
61  GGGGATAACG  CAGCGAAAGT  TGGCCTAATA  CCGCATAACG  TCTACGGAAG  AAAGTGGGGG
121  ATCGCAAGAC  CTCATGCTTT  TGGAGCGGCC  GATGTCTGAT  TAGCTAGTTG  GTAGGGTAAA
181  GGCCTACCAA  GGCGACGATC  AGTAGCTGGT  CTGAGAGGAC  GACCAGCCAC  ACTGGAACGT
241  AGACACGGTC  CAGACTCCTA  CGGGAGGCAG  CAGTGGGGAA  TTTTGACAA  TGGGCGCAAG
301  CCTGATCCAG  CAATGCCGCG  TGAGTGAAGA  AGGCCTTCGG  GTTGTAAAGC  TCTTTTGTCA
361  GGGAAGAAAC  GGCTCCGGCT  AATATCTGGA  GCTAATGACG  GTACCTGAAG  AATAAGCACC
421  GGCTAACTAC  GTGCCAGCAG  CCGCGGTAAT  ACGTAGGGTG  CAAGCGTTAA  TCGGAATTAC
481  TGGGCGTAAA  GCGTGCCGAG  GCGGTTTGT  AAGTCTGTCG  TGAAAGCCCC  GGGCTCAACC
541  TGGGAATTGC  GATGGAGACT  GCAAGCCTTG  AATCTGGCAG  AGGGGGGTAG  AATTCACCGT
601  GTAGCAGTGA  AATGCGTAGA  GATGTGGAGG  AACACCGATG  GCGAAGGCAG  CCCCCTGGGT
661  CAAGATTGAC  GCTCATGCAC  GAAAGCGTGG  GGAGCAAACA  GGATTAGATA  CCCTGGTAGT
721  CCACGCCCTA  AACGATGTCT  ACTAGTTGTC  GGGTTTAAAT  TAACTTGGTA  ACGCAGCTAA
781  CGCGTGAAGT  AGACCGCCTG  GGGAGTACGG  TCGCAAGATT  AAAACTCAAA  GGAATTGACG
841  GGGACCCGCA  CAAGCGGTGG  ATGATGTGGA  TTAATTCGAT  GCAACGCGAA  AAACCTTACC
901  TACCCTTGAC  ATGGAAGGAA  TCCTGGAGAG  ATCTGGGAGT  GCCCGAAAGG  GAACCTTCAC
961  ACAGGTGCTG  CATGGCTGTC  GTCAGCTCGT  GTCGTGAGAT  GTTGGGTTAA  GTCCCGCAAC
1021  GAGCGCAACC  CTTGTCATTA  GTTGCTACGC  AAGAGCACTC  TAATGAGACT  GCCGGTGACA
1081  AACC GGAGGA  AGGTGGGGAT  GACGTCAAGT  CCTCATGGCC  CTTATGGGTA  GGGCTTCACA
1141  CGTCATACAA  TGGTACATAC  AGAGGGCCGC  CAACCCGCGA  GGGGGAGCTA  ATCCAGAAA
1201  GTGTATCGTA  GTCCGGATTG  TAGTCTGCAA  CTCGACTACA  TGAAGTTGGA  ATCGCTAGTA
1261  ATCGCGGATC  AGCATGTCGC  GGTGAATACG  TTCCCGGGTC  TTGTACACAC  CGCCCGTCAC
1321  ACCATGGGAG  CGGGTTTAC  CAGAAGTAGG  TAGCTAACC  GCAA
```

EK-14: YH13-5 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1421****Baz İçeriği: 362 A 336 C 437 G 286 T****Gen Bankası No: KY010280**

```
1  GCAGTCGAGC  GAATCGATGG  GAGCTTGCTC  CCTGAGATTA  GCGGCGGACG  GGTGAGTAAC
61  ACGTGGGCAA  CCTGCCTATA  AGACTGGGAT  AACTTCGGGA  AACCGGAGCT  AATACCGGAT
121  ACGTTCTTTT  CTCGCATGAG  AGAAGATGGA  AAGACGTTT  ACGCTGTCAC  TTATAGATGG
181  GCCCGCGGCG  CATTAGCTAG  TTGGTGAGGT  AATGGCTCAC  CAAGGCGACG  ATGCCTAGCC
241  GACCTGAGAG  GGTGATCGGC  CACACTGGGA  CTGAGACACG  GCCCAGACTC  CTACGGGAGG
301  CAGCAGTAGG  GAATCTTCCG  CAATGGACGA  AAGTCTGACG  GAGCAACGCC  GCGTGAACGA
361  AGAAGGCCTT  CGGGTCGTAA  AGTTCTGTTG  TTAGGGAAGA  ACAAGTACCA  GAGTAACTGC
421  TGGTACCTTG  ACGGTACCTA  ACCAGAAAGC  CACGGCTAAC  TACGTGCCAG  CAGCCCGGTT
481  AATACGTAGG  TGGCAAGCGT  TGTCCGGAAT  TATTGGGCGT  AAAGCGCGCG  CAGGTGGTTC
541  CTTAAGTCTG  ATGTGAAAGC  CCACGGTCA  ACCGTGGAGG  GTCATTGGAA  ACTGGGGAAC
601  TTGAGTGCAG  AAGAGGAAAG  TGGAAATCCA  AGTGTAGCGG  TGAATGCGT  AGAGATTTGG
661  AGGAACACCA  GTGGCGAAGG  CGACTTTCTG  GTCTGTAAC  GACTGAGG  CGCGAAAGCG
721  TGGGGAGCAA  ACAGGATTAG  ATACCCTGGT  AGTCCACGCC  GTAAACGATG  AGTGCTAAGT
781  GTTAGAGGGT  TTCCGCCCTT  TAGTGCTGCA  GCTAACGCAT  TAAGCACTCC  GCCTGGGGAG
841  TACGGCCGCA  AGGCTGAAAC  TCAAAGGAAT  TGACGGGGGC  CCGCACAAAG  GGTGGAGCAT
901  GTGGTTTAAAT  TCGAAGCAAC  GCGAAGAACC  TTACCAGGTC  TTGACATCCT  CTGACAACCC
961  TAGAGATAGG  GCTTTCCTT  TCGGGGAC  GAGTGACAGG  TGGTGCATGG  TTGTCGTCAG
1021  CTCGTGTCGT  GAGATGTTGG  GTTAAGTCCC  GCAACGAGCG  CAACCCCTGA  TCTTAGTTGC
1081  CAGCATTGAG  TTGGGCACTC  TAAGGTGACT  GCCGGTGACA  AACCGGAGGA  AGGTGGGGAT
1141  GACGTCAAAT  CATCATGCC  CTTATGACCT  GGGCTACACA  CGTGCTACAA  TGGATGGTAC
1201  AAAGGGCTGC  AAACCTGCGA  AGGTAAGCGA  ATCCCATAAA  GCCATTCTCA  GTTCGGATTG
1261  CAGGCTGCAA  CTCGCCTGCA  TGAAGCCGGA  ATCGCTAGTA  ATCGCGGATC  AGCATGCCGC
1321  GGTGAATACG  TTCCCGGGCC  TTGTACACAC  CGCCCGTCAC  ACCACGAGAG  TTTGTAACAC
1381  CCGAAGTCGG  TGAGGTAACC  TTCATGGAGC  CAGCCGCATA  A
```


EK-15: YH15-2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1422****Baz İçeriği: 383 A 317 C 411 G 311 T****Gen Bankası No: KY010281**

```
1 TGCAGTCGAG CGAACAGATA AGGAGCTTGC TCCTTTGACG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT
61 AACACGTGGA TAACCTACCT ATAAGACTGG GATAACTTCG GGAAACCGGA GCTAATACCG
121 GATAACATAT TGAACCGCAT GGTTC AATAG TGAAAGGCGG CTTTGTCTGTC ACTTATAGAT
181 GGATCCGCGC CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACGGCTT ACCAAGGCAA CGATACGCTAG
241 CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA
301 GGCAGCAGTA GGGAATCTTC CGCAATGGGC GAAAGCCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT
361 GATGAAGGTC TTCGGATCGT AAAACTCTGT TATCAGGGAA GAACAAATGT GTAAGTAACT
421 GTGCACATCT TGACGGTACC TGATCAGAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG
481 GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTATCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGCGCG CGTAGCCGGT
541 TTTTTAAGTC TGATGTGAAA GCCCACGGCT CAACCGTGGA GGGTCATTGG AAACCTGGAAA
601 ACTTGAGTGC AGAAGAGGAA AGTGGAAATC CATGTGTAGC GGTGAAATGC GCAGAGATAT
661 GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GCGCACTTTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA TGTGCCAAAG
721 CGTGGGGATC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA
781 GTGTTAGGGG GTTCCGCC CTTAGTGCTG CAGCTAACGC ATTAAGCACT CCGCCTGGGG
841 AGTACGACCG CAAGGTTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG ACCCGCACAA GCGGTGGAGC
901 ATGTGGTTTA ATTCAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAA TCTTGACATC CTTTGACCGC
961 TCTAGAGATA GAGTTTTC CTTCCGGGGA CAAAGTGACA GGTGGTGCAT GGTGTGCTGC
1021 AGTCGTGTGC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT AAGCTTAGTT
1081 GCCATCATA AGTTGGGCAC TCTAAGTTGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG
1141 ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAT TTGGGCTACA CACGTGTAC AATGGACAAT
1201 ACAAAGGGCA GCTAAACCGC GAGGTCAAGC AAATCCATA AAGTTGTTCT CAGTTCGGAT
1261 TGTAGTCTGC AACTCGACTA CATGAAGCTG GAATCGCTAG TAATCGTAGA TCAGCATGCT
1321 ACGGTGAATA CGTTCCCGGG TCTTGTACAC ACCGCCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAAC
1381 ACCCGAAGCC GGTGGAGTAA CCATTTATGG AGCTAGCCGT CG
```

EK-16: YH15-3 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1303****Baz İçeriği: 300 A 320 C 430 G 253 T****Gen Bankası No: KY010282**

```
1 TAGTGGCGCA CGGGTGAGTA ACACGTGGGA ACCTGCCTTT CGGTTCCGGGA TAACGTCTGG
61 AAACGGACGC TAACACCGGA TACGTCTTTC GGGAGAAAGT TTACGCCGAG AGAGGGGCC
121 GCGTCCGATT AGGTAGTTGG TGGGGTAATG GCCCACC AAG CCGACGATCG GTAGCTGGTC
181 TGAGAGGATG ATCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC
241 AGTGGGGAAT ATTGGACAAT GGGGGCAACC CTGATCCAGC AATGCCGCGT GAGTGATGAA
301 GGCCTTAGGG TTGTAAAGCT CTTTCGCACG CGACGATGAT GACGGTAGCG TGAGAAGAAG
361 CCCC GGCTAA CTTCTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGAAG GGGGCGAGCG TTGTTCCGAA
421 TTA CTGGGCG TAAAGGGCGC GTAGGCGGCC CGATCAGTCA GATGTGAAAG CCCC GGCTC
481 AACCTGGGAA CTGCATTTGA TACTGTGCGG CTTGAGTTCC GGAGAGGATG GTGGAATTCC
541 CAGTGTAGAG GTGAAATTCG TAGATATTGG GAAGAACACC GGTGGCGAAG GCGGCCATCT
601 GGACGGACAC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG
661 TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAATGCTAGA CGTGGGGTG CATGCACTTC GGTGTGCGCC
721 CTAACGCATT AAGCATTC CGTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGTTAAACT CAAAGGAATT
781 GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG CGCAGAACCT
841 TACCAACCCT TGACATGTCC ACTACCGGCT CGAGAGATCG GGCTTTCAGT TCGGCTGGGT
901 GGAACACAGG TGCTGCATGG CTGTCTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAAGTCCC
961 GCAACGAGCG CAACCCCTAC CGCCAGTTGC CATCATTCAG TTGGGCACTC TGGTGGAACT
1021 GCCGGT GACA AGCCGGAGGA AGCGGGGAT GACGTCAAGT CCTCATGGCC CTTATGGGTT
1081 GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCGGTGAC AGTGGGATGC GAAGTCGCAA GATGGAGCCA
1141 ATCCCCAAA GCCGTCTCAG TTCGGATTGC ACTCTGCAAC TCGGGTGCAT GAAGTTGGAA
1201 TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCACGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC
1261 GCCCGTACACA CCATGGGAGT TGGCTTTACC CGAAGGTGTT GCG
```

EK-17: YH16-1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1352**Baz İçeriği:** 348 A 307 C 422 G 275 T**Gen Bankası No:** KY010283

```
1  CTTCGGCCTG  GTGGCGAGTG  GCGAACGGGT  GAGTAATACA  TCGGAACGTA  CCCAGAAGTG
61  GGGGATAACG  CAGCGAAAGT  TGGCGTAATA  CCGCACACGT  TCTACGGAAG  AAAGTGGGGG
121  ATCTCCGGAC  CTCATGCTTT  TGGAGCGGCC  GATGTCTGAT  TAGCTAGTTG  GTAGGGTAAA
181  GGCCTACCAA  GGCGACGATC  AGTAGCTGGT  CTGAGAGGAC  GACCAGCCAC  ACTGGAAGTG
241  AGACACGGTC  CAGACTCCTA  CGGGAGGCAG  CAGTGGGGAA  TTTTGACAA  TGGGCGCAAG
301  CCTGATCCAG  CAGTGCCGCG  TGAGTGAAGA  AGGCCCTCGG  GTTGTAAAGC  TCTTTTGTCA
361  GGGAAGAAAC  GGCTCCGGCT  AATATCTGGG  GCTAATGACG  GTACCTGAAG  AATAAGCACC
421  GGCTAACTAC  GTGCCAGCAG  CCGCGGTAAT  ACGTAGGGTG  CAAGCGTTAA  TCGGAATTAC
481  TGGGCGTAAA  GCGTGCCGAG  GCGGTTTGT  AAGTCTGTCG  TGAAAGCCCC  GGGCTCAACC
541  TGGGAATTGC  GATGGAGACT  GCAAGGCTTG  AATCTGGCAG  AGGGGGGTAG  AATTCACCGT
601  GTAGCAGTGA  AATGCGTAGA  TATGTGGAGG  AACACCGATG  GCGAAGGCAG  CCCCCTGGGT
661  CAAGATTGAC  GCTCATGCAC  GAAAGCGTGG  GGAGCAAACA  GGATTAGATA  CCCTGGTAGT
721  CCACGCCCTA  AACGATGTCT  ACTAGTTGTC  GGGTTTAAAT  TAACTCGGTA  ACGCAGCTAA
781  CGCGTGAAGT  AGACCGCCTG  GGGAGTACGG  TCGCAAGATT  AAAACTCAAA  GGAATTGACG
841  GGGACCCGCA  CAAGCGGTGG  ATGATGTGGA  TTAATTCGAT  GCAACGCGAA  AAACCTTACC
901  TACCCTTGAC  ATGGAAGGAA  TCCTGGAGAG  ATCTGGGAGT  GCCCGAAAGG  GAACCTTCAC
961  ACAGGTGCTG  CATGGCTGTC  GTCAGCTCGT  GTCGTGAGAT  GTTGGGTTAA  GTCCCGCAAC
1021  GAGCGCAACC  CTTGTCATTA  GTTGCTACGC  AAGAGCACTC  TAATGAGACT  GCCGGTGACA
1081  AACCGGAGGA  AGGTGGGGAT  GACGTCAAGT  CCTCATGGCC  CTTATGGGTA  GGGCTTCACA
1141  CGTCATACAA  TGGTACATAC  AGAGGGCCGC  CAACCCGCGA  GGGGGAGCTA  ATCCAGAAA
1201  GTGTATCGTA  GTCCGGATTG  TAGTCTGCAA  CTCGACTACA  TGAAGTTGGA  ATCGCTAGTA
1261  ATCGCGGATC  AGCATGTCGC  GGTGAATACG  TTCCCGGGTC  TTGTACACAC  CGCCCGTCAC
1321  ACCATGGGAG  CGGGTTTAC  CAGAAGTAGG  TA
```

EK-18: YH16-4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı:** 1015**Baz İçeriği:** 234 A 249 C 329 G 203 T**Gen Bankası No:** KY010284

```
1  CGTGAGTGAT  GAAGGCCTTA  GGGTTGTAAA  GCTCTTTCGC  ACGCGACGAT  GATGACGGTA
61  GCGTGAGAAG  AAGCCCCGGC  TAACTTCGTG  CCAGCAGCCG  CGGTAATACG  AAGGGGGCGA
121  GCGTTGTTCG  GAATTACTGG  GCGTAAAGGG  CGCGTAGGCG  GCCCGATCAG  TCAGATGTGA
181  AAGCCCCGGG  CTCAACCTGG  GAACTGCATT  TGATACTGTC  GGGCTTGAGT  TCCGGAGAGG
241  ATGGTGAAT  TCCCAGTGTA  GAGGTGAAAT  TCGTAGATAT  TGGGAAGAAC  ACCGGTGGCG
301  AAGGCGGCCA  TCTGGACGGA  CACTGACGCT  GAGGCGCGAA  AGCGTGGGGA  GCAAACAGGA
361  TTAGATACCC  TGGTAGTCCA  CGCCGTAAAC  GATGAATGCT  AGACGCTGGG  GTGCATGCAC
421  TTCGGTGTG  CCGCTAACGC  ATTAAGCATT  CCGCCTGGGG  AGTACGGCCG  CAAGGTTAAA
481  ACTCAAAGGA  ATTGACGGGG  GCCCGCACAA  GCGGTGGAGC  ATGTGGTTTA  ATTGGAAGCA
541  ACGCGCAGAA  CCTTACCAAC  CCTTGACATG  TCCATTGCCG  GTCCGAGAGA  TTGGACCTTC
601  AGTTCGGCTG  GATGGAACAC  AGGTGCTGCA  TGGCTGTCGT  CAGCTCGTGT  CGTGAGATGT
661  TGGGTTAAGT  CCCGCAACGA  GCGCAACCCC  TACCGCCAGT  TGCCATCATT  CAGTTGGGCA
721  CTCTGGTGA  ACTGCCGGTG  ACAAGCCGGA  GGAAGCGGG  GATGACGTCA  AGTCTCATG
781  GCCCTTATGG  GTTGGGCTAC  ACACGTGCTA  CAATGGCGGT  GACAGTGGGA  CGCGAAGTCG
841  CAAGATGGAG  CAAATCCCA  AAAGCCGTCT  CAGTTCGGAT  TGCACTCTGC  AACTCGGGTG
901  CATGAAGTTG  GAATCGCTAG  TAATCGCGGA  TCAGCACGCC  GCGGTGAATA  CGTTCGGGG
961  CCTTGTACAC  ACCGCCCGTC  ACACCATGGG  AGTTGGCTTT  ACCGGAAGGT  GGTGC
```

EK-19: YH16-6 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1017****Baz İçeriği: 233 A 248 C 331 G 205 T****Gen Bankası No: KY010285**

```
1  TGCCGCGTGA  GTAATGAAGG  CTTAGGGTT  GTAAAGCTTT  TTCGCACGCG  ACGATGATGA
61  CGGTAGCGTG  AGAAGAAGCC  CCGGCTAACT  TCGTGCCAGC  AGCCGCGGTA  ATACGAAGGG
121  GGCGAGCGTT  GTTCGGAATT  ACTGGGCGTA  AAGGGCGCGT  AGGCGGCCTG  TTTAGTCAGA
181  AGTAAAAGCC  CCGGGCTTAA  CCTGGGAACG  GCTTTTGATA  CTGGCAGGCT  TGAGTTCCGG
241  AGAGGATGGT  GGAATTCCCA  GTGTAGAGGT  GAAATTCGTA  GATATTGGGA  AGAACACCGG
301  TGGCGAAGGC  GGCCATCTGG  ACGGACACTG  ACGCTGAGGC  GCGAAAACGT  GGGGAGCAAA
361  CAGGATTAGA  TACCCTGGTA  GTCCACGCCG  TAAACGATGA  ATGCTAGACG  CTGGGGTGCA
421  TGCACCTCGG  TGTCGCCGCT  AACGCATTAA  GCATTCCGCC  TGGGGAGTAC  GGCCGCAAGG
481  TTAAAACTCA  AAGGAATTGA  CGGGGGCCCG  CACCAGCGGT  GGAGCATGTG  GTTTAATTTCG
541  AAGCAACGCG  CAGAACCCTA  CCCACCCCTG  ACATGTCCAT  TGCCGGTCCG  AGAGATTGGA
601  CCTTCAGTTC  GGCTGGATGG  AACACAGGTG  CTGCATGGCC  GTCGTCAGCT  CGTGTCTGTA
661  GATGTTGGGT  TAAGTCCCGC  AACGAGCGCA  ACCCTACCG  CCAGTTGCCA  TCATTCAAGTT
721  GGGCACTTTG  GTGGAAGTGC  CCGTGACAAG  CCGGAGGAAG  GCGGGATGTA  CGTCAAGTCC
781  TCATGGCCCT  TATGGGTTGG  GCTACACACG  TGCTACAAAAG  GCGGTGACAG  TGGGATGCGA
841  AGTCGCAAGA  GGGAGCCAAT  CCCCCAAAAGC  CGTCTCAGTT  CGGATTGCAC  TCTGCAACTC
901  GGGTGCATGA  AGTTGGAATC  GCTAGTAATC  GCGGATCAGC  ACGCCGCGGT  GAATACGTTC
961  CCGGGCCTTG  TACACACCGC  CCGTCACACC  ATGGGAGTTG  GCTTTACCCG  AAGGTGG
```

EK-20: YH16-7 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası**Baz Sayısı: 1329****Baz İçeriği: 310 A 329 C 429 G 261 T****Gen Bankası No: KY010286**

```
1  ATGCAAGTCG  AACGAAGGCT  TCGGCCTTAG  TGGCGCACGG  GTGAGTAACA  CGTGGGAACC
61  TGCCTTTCGG  TTCGGGATAA  CGTCTGGAAA  CGGACGCTAA  CACCGGATAC  GCCCTATGGG
121  GGAAAGTTTA  CGCCGAGAGA  GGGGCCCGCG  TCCGATTACG  TAGTTGGTGG  GGTAAATGGCC
181  CGCCAAGCCG  ACCATCGGTA  GCTAGTCTGA  GAGGATGATC  AGACACGCTG  AGACTGACAC
241  AGGGCCAGGA  CTCTACGGG  AGGCACCAGT  GGGGAATATT  GGACAATGGG  GGCAACCCTG
301  ATCCACCAAT  GCCACGTGAG  TGATGAAGGC  CTTAGGGTTG  TAAAGCTCTT  TCGCACGCGA
361  CGATCATCAC  GGTCCGCTGA  GAAGAAGCCC  CGGCTAACTT  CGTGCCAGCA  GCCGCGGTAA
421  TACGAAGGGG  GCGAGCGTTG  TTCGGAATTA  CTGGGCGTAA  AGGGCGCGTA  TGCCGCCTGT
481  TTAGTCAGAA  GTGAAAGCCC  CAGGCTTAAC  CTGGGAACGG  CTTTTGATAC  TGGCAGGCTT
541  GAGTTCGGGA  GAGGATGGTG  GAATTCCCAG  TGTAGAGGTG  AAATTCGTAG  ATATTGGGAA
601  GAACACCGGT  GCGGAAGGCG  GCCATCTGGA  CGGACACTGA  CGCTGAGGCG  CGAAAGCGTG
661  GGGAGCAAAC  AGGATTAGAT  ACCCTGGTAG  TCCACGCCGT  AAACGATGAA  TGCTAGACGC
721  TGGGGTGCAT  GCACTTCGGT  GTCGCCGCTA  ACGCATTAAAG  CATTCGCCCT  GGGGAGTACG
781  GCCGCAAGGT  TAAAAC TCAA  AGGAATTGAC  GGGGGCCCGC  ACAAGCGGTG  GAGCATGTGG
841  TTTAATTTCGA  AGCAACGCGC  AGAACCTTAC  CAACCCTTGA  CATGTCCATT  GCCGGTCCGA
901  GAGATTGGAC  CTTCAGTTCG  GCTGGATGGA  ACACAGGTGC  TGATGGCTG  TCGTCAGCTC
961  GTGTCGTGAG  ATGTTGGGTT  AAGTCCCAG  ACGAGCGCAA  CCCCTACCGC  CAGTTGCCAT
1021  CATTCAAGTTG  GGCACCTG  TGGAAGTCC  GGTGACAAGC  CGGAGGAAGG  CGGGGATGAC
1081  GTCAAGTCC  CATGGCCCTT  ATGGGTGGG  CTACACACGT  GCTACAATGG  CGGTACAGT
1141  GGGATGCGAA  GTCGCAAGAT  GGAGCCAATC  CCCCCAAAAGC  GTCTCAGTTC  GGATTGCACT
1201  CTGCAACTCG  GGTGCATGAA  GTTGAATCG  CTAGTAATCG  CCGATCAGCA  CGCCGCGGTG
1261  AATACGTTC  CCGGCCTTGT  ACACACCGCC  CGTCACACCA  TGGGAGTTGG  CTTTACCCGA
1321  AGGTGGTGC
```

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KARAMAN, Muhammed Yunus Emre
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 19.08.1991 KOCAELİ
e-mail : yunuskaraman35@gmail.com

Eğitim

Lise : Karşiyaka Gazi Lisesi
Lisans : Ahi Evran Üniversitesi
Lisans Derecesi : 2009-2013 Biyoloji Bölüm Birincisi
Yüksek Lisans : Ahi Evran Üniversitesi
Yüksek Lisans Tezi : Endüstriyel Atıklarla Kirlenmiş Alanlardan
Petrol Türevi Hidrokarbonların Biyodegradasyonunu Yapan Bakterilerin
İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi

Yabancı Dil : İngilizce