T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOSÜRFAKTAN/ BİYOEMÜLSİFİYE EDİCİ ÜRETEN BAKTERİLERİN PETROL TÜREVLERİYLE KİRLENMIŞ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tuba AVCI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2021

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOSÜRFAKTAN/ BİYOEMÜLSİFİYE EDİCİ ÜRETEN BAKTERİLERİN PETROL TÜREVLERİYLE KİRLENMIŞ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tuba AVCI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2021

Dr. Öğr. Üyesi Ebru UYAR danışmanlığında, Tuba AVCI'nın hazırladığı **"Biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici bakterilerin petrol türevleriyle kirlenmiş topraklardan izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu"** konulu bu çalışma 14/01/2021tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ebru UYAR …….

Üye : Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN …….

Üye : Doç. Dr. Hatice AKTAŞ …….

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

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 19264

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
1.1. Sürfaktanlar (Yüzey Aktif Maddeler) 1
1.1.1.Katyonik sürfaktanlar 3
1.1.2. Anyonik sürfaktanlar 4
1.1.3.İyonik olmayan sürfaktanlar 5
1.1.4.Amfoterik sürfaktanlar 6
1.1.5.Gemini sürfaktanlar 6
1.2. Biyosürfaktanların Genel Özellikleri 6
1.2.1. Yüzey/Arayüzey gerilimini düşerebilme 7
1.2.2. Düşük toksisite 8
1.2.3. Biyouyumluluk ve sindirilebilirlik 8
1.2.4. Biyoparçalanabilirlik 8
1.2.5. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı 8
1.2.6. Anti- Adesif (Yapışmayı önleyici) Aktivite 9
1.2.7. Anti- Mikrobiyal Aktivite 9
1.2.8.Özgüllük ve kimyasal çeşitlilik 9
1.2.9. Maliyet 10
1.3. Biyosürfaktanların Sınıflandırılması 10
1.3.1. Glikolipidler 11
1.3.1.1. Ramnolipidler 11
1.3.1.2. Trehalolipidler 12
1.3.1.3. Soforolipidler 12
1.3.2. Lipopeptidler ve lipoproteinler 13
1.3.3. Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötrallipidler 13
1.3.4. Polimerik biyosülfaktanlar 13
1.3.5. Partiküler biyosülfaktanlar 14
1.4. Biyosürfaktan Üreten Mikroorganizmalar 15
1.5. Biyosürfaktanların Kullanım Alanları 17
1.5.1. Petrol endüstrisi 18
1.5.2. Biyodegredasyon/biyoremediasyon teknolojileri 20
1.5.3. Farmasötik endüstrisi 21
1.5.4. Gıda endüstrisi 23
1.5.5. Kozmetik endüstrisi 23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 26
3. MATERYAL ve YÖNTEM 33
3.1. Materyal 33
3.1.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan çevresel örnekler 33
3.1.2. Kullanılan besiyerleri 33
3.1.3. Kullanılan çözeltiler,kimyasallar, tamponlar, kitler 35
3.1.4. Kullanılan cihazlar 37
3.2. Yöntem 38
3.2.1. Bakteri izolasyonu 38
3.2.2. Bakterilerin biyosürfaktan üretimi açısından taranması 38
3.2.2.1. Oil displacement denemesi 39
3.2.2.2. Drop collopse denemesi 39
3.2.2.3. Parafilm M testi 40

3.2.2.4. Emülsifikasyon indeksi (E24)'nin belirlenmesi 40
3.2.3. Biyosürfaktan üretimi pozitif olan izolatların moleküler tanılaması 40
3.2.3.1. Genomik DNA'nın izolasyonu ve görüntülenmesi 40
3.2.3.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması 42
3.2.3.3. PCR ürünlerinin elektroforezle görüntülenmesi 43
3.2.3.4. 16S rDNA bölgesinin sekans analizi 44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 45
4.1. Bakteriyal izolatların izolasyonu 45
4.2. Tarama testleri ile biyosürfaktan üretiminin belirlenmesi 48
4.2.1. Oil displacement (yağ yer değiştirme) testi 48
4.2.2. Parafilm M testi 49
4.2.3. Drop collapse testi 51
4.2.4. Emülsifikasyon indeksi (E24)'nin belirlenmesi 54
4.3. Biyosürfaktan Üreten Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu 57
4.3.1. Kültürel ve makroskobik karakterizasyon 57
4.3.2. Moleküler karakterizasyon 58
4.3.2.1. Genomik DNA'nın izolasyonu 58
4.3.2.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu 58
4.5. Biyosürfaktan üretimi pozitif olan bakteriyal izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizi sonuçları 63
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 73
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 83

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOSÜRFAKTAN/ BİYOEMÜLSİFİYE EDİCI ÜRETEN BAKTERİLERİN PETROL TÜREVLERİYLE KİRLENMIŞ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tuba AVCI

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebru UYAR
Yıl:2021, Sayfa:84

Petrol hidrokarbonları ile kontamine olan toprak örnekleri Adıyaman il sınırları içerisinde bulunan bazı petrol kuyularının çevresinden toplanılarak biyoemülsifiye edici ve biyosürfaktan üreten bakterilerin elde edilmesi için izolasyona tabi tutulmuştur. Toplam 71 bakteri izolatı elde edilmiştir. Bakteriyal izolatların biyosürfaktan üretme yetenekleri drop collapse testi, yağ yer değiştirme denemesi ve parafilm M testi olmak üzere 3 farklı teknik kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca, biyosürfaktan içerikli hücresiz kültür ortamlarının ksilen, kerosen ve benzen gibi çeşitli hidrofobik bileşiklere karşı emülsifikasyon indeksleri (E_{24}) de belirlenmiştir. Biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilen bakteriyal izolatların moleküler karekterizasyonu için genomik DNA'ları saflaştırılmış ve 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Dizi analiz sonuçlarına göre; *Pseudomonas* (5), *Bacillus* (3) ve *Acinetobacter* (5) olmak üzere 3 faklı cinse ait toplamda 13 bakteri suşu biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici üreticisi olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyosürfaktan, bakteri, izolasyon, tarama, moleküler tanılama

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF BIOSURFACTANT/BIOEMULSIFIER PRODUCING BACTERIA FROM SOIL SAMPLES CONTAMINATED WITH PETROLEUM DERIVATIVES

Tuba AVCI

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ebru UYAR
Year: 2021, Page:84

Soil samples contaminated with petroleum hydrocarbons were collected from the close vicinity of some oil wells in Adıyaman province and subjected to isolation to obtain bioemulsifying and bio-surfactant-producing bacteria. A total of 71 bacterial isolates were obtained. Biosurfactant production ability of bacterial isolates was tested using 3 different techniques including drop collapse test, oil displacement test and parafilm M test. Furthermore, emulsification indexes (E_{24}) of biosurfactant-containing cell-free culture medium against various hydrophobic compounds such as xylene, kerosene and benzene were also determined. Genomic DNAs were purified for molecular characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacterial isolates and 16S rDNA regions were amplified by PCR. According to the sequencing analysis, 13 bacterial strains belong to 3 different genera including *Pseudomonas* (5), *Bacillus* (3), and *Acinetobacter* (5) were determined as biosurfactant/bioemulsifier producer.

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

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde çok fazla emeği olan değerli bilgilerini benden esirgemeyen, her daim bana destek veren, yol gösterip farklı bakış açıları kazandıran, saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ebru UYAR'a,

Yüksek lisans eğitimime başlamak için beni cesaretlendiren Ecem YETİM'e,

Beni her zaman destekleyen, güvenen ve her kararımda arkamda olan kıymetli aileme,

Yol arkadaşım Şahin İLHAN'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Kübra KORKMAZ, Nüket ÇALIŞKAN ve Amine YÜCEL'e,

Ayrıca maddi destek sağlayan HÜBAK'a teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Polar (hidrofilik) ve apolar (hidrofobik) kısımları olan sürfaktan molekülü.....1
Şekil 1.2.Biyosürfaktan konsantrasyonuna bağlı olarak misel oluşumu, KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu 2
Şekil 1.3. Yüzey aktif madde (sürfaktan) yapısının basitleştirilmiş şematik diyagramı 3
Şekil 1.4. (a) Katyonik yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik bir katyonik yüzey madde örneği 4
Şekil 1.5. (a) Anyonik yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik bir anyonik yüzey madde örneği 5
Şekil 1.6. (a) İyonik olmayan yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik bir iyonik olmayan yüzey madde örneği 5
Şekil 1.7. Basitleştirilmiş gemini sürfaktan yapısı 6
Şekil 1.8. Bilinen bazı biyosürfaktanların kimyasal yapıları (a) Ramnolipid, (b) Trehalolipid, (c) Soforolipid, (d) Mannozileritritol lipid, (e) Sürfaktin, (f) Emülsan.....14
Şekil 1.9. Ham petrolün MEOR yöntemiyle geri kazanımı.....20
Şekil 1.10.Ham petrolün biyodegradasyonu.....21
Şekil 1.11. Kozmetik ürünlerde biyosürfaktan olarak kullanılan prebiyotiklerin akne tedavisi ...25
Şekil 4.1. Bakteriyal izolatlardan bazılarına (TBA B18, TBA B29, TBA B32, TBA B38, TBA B60, TBA B62) ait saf kültürlerin nutrient agar petrilerindeki genel görünüşleri 47
Şekil 4.2. Bazı bakteriyal izolatların hücresiz kültür ortamlarıyla elde edilen yağ yerdeğiştirme alanları 49
Şekil 4.3. Bazı izolatların hücresiz kültür ortamlarıyla elde edilen parafilm M test sonuçları 49
Şekil 4.4. Bazı hücresiz kültür ortamları ile pozitif ve negatif kontroller için elde edilen drop collapse test sonuçları 52
Şekil 4.5. Bazı bakteriyal izolatların ürettiği ham biyosürfaktan içeren hücresiz kültür ortamlarının ksilen, kerosen ve benzene ile oluşturdukları emülsiyonlar 55
Şekil 4.6. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarına ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü 58
Şekil 4.7. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarına ait genomik DNA'ların 16S %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü 59
Şekil 4.8. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarının PCR ile amplifiye 16S rDNA bölgelerine ait ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü 60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Biyosürfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar 16
Çizelge 1.2. Biyosürfaktanların kullanım alanları 17
Çizelge 1.3. Biyosürfaktanların farmasötik endüstrisinde kullanımı 22
Çizelge 3.1.Biyosürfaktan üreten bakterilerin izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri ve bu örneklerin toplandığı lokasyonlar 33
Çizelge 4.1. Bakteriyal izolatlara ilişkin yağ yer değiştirme denemesi ve parafilm M testi sonuçları 50
Çizelge 4.4. Bakteriyal izolatların kültür ortamlarına ait drop collapse test sonuçları 53
Çizelge 4.5.Biyosürfaktan içeren hücresiz fermentasyon sıvılarının farklı hirdokarbonlar üzerindeki emülsifikasyon indeksleri 56
Çizelge 4.6.Moleküler tanılaması yapılan bakteriyal suşların 16S rDNA bölgesinin sekans analizine göre temsil ettiği türler 61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

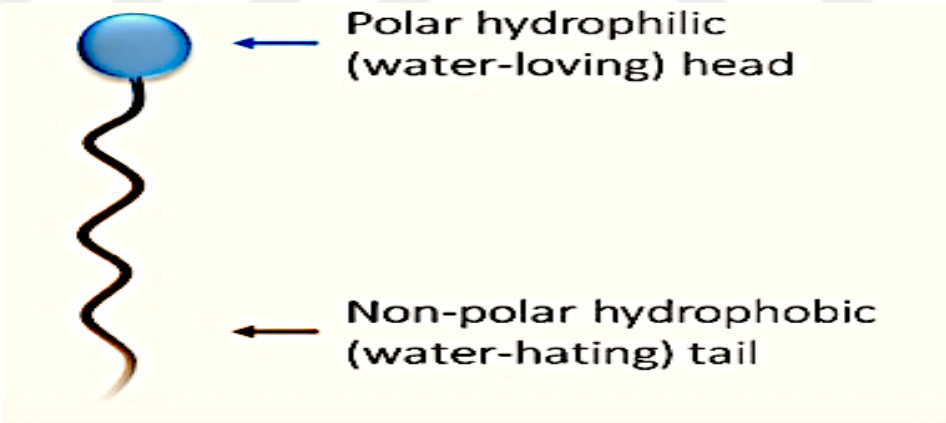
E_{24}	Emülsifikasyon indeksi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EM	Zenginleştirme ortamı
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, Gaz Kromotografisi-Kütle Spektroskopisi
MBC	Minimum Bactericidal Concentration,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

1.GİRİŞ

1.1. Sürfaktanlar (Yüzey Aktif Maddeler)

Su, gaz veya sıvı bir çözeltide çözündükleri zaman yüzey gerilimini düşürebilen maddelere yüzey aktif maddeler (sürfaktanlar) denir (Kronberg ve Lindman 2003). Sürfaktanlar; ara yüzeylerde biriken, ara yüzey gerilimlerini azaltan miseller gibi agregat yapıları oluşturan amfipatik moleküllerdir (Hamme ve ark., 2006). Bu maddeler (petrol-su, su-petrol gibi) farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik gösterirler (Hamme ve ark., 2006). Sürfaktanlar; deterjan, boya, kâğıt ürünleri, ilaç, kozmetik, petrol, gıda ve su arıtımı gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan çok yönlü kimyasal gruplardır (Güçlü ve ark., 2007; Elazzazy ve ark., 2015; Lu ve ark., 2017).

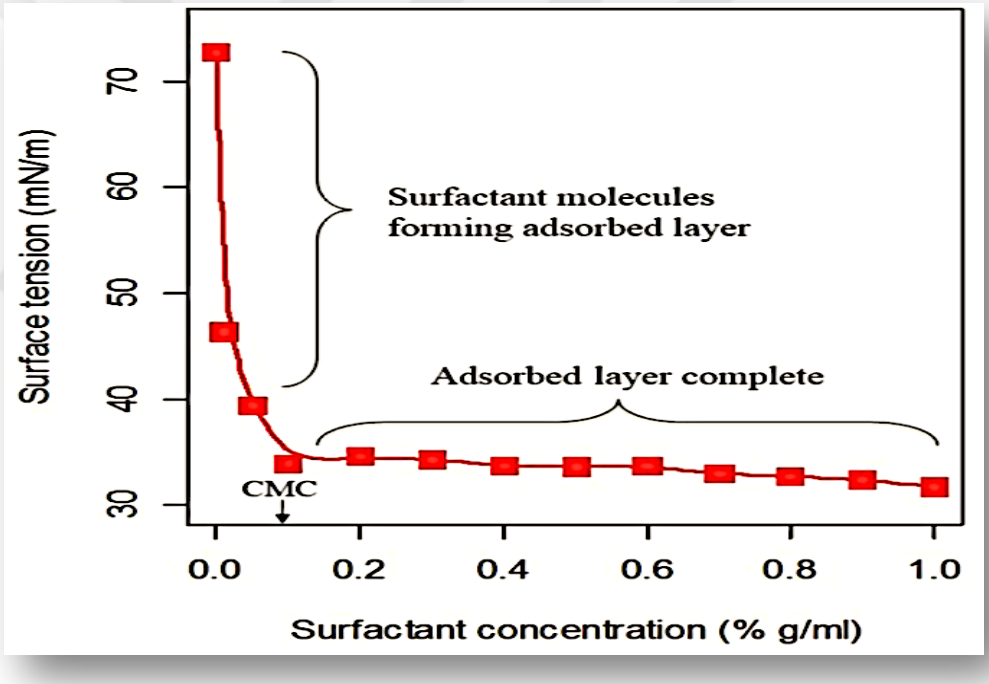
Yüzey aktif maddeler, suyu seven hidrofilik (suyu seven) bir baş kısım ile suyu sevmeyen hidrofobik (yağ seven) kuyruk kısımlarından oluşur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Polar (hidrofilik) ve apolar (hidrofobik) kısımları olan sürfaktan molekülü

Hidrofilik ve hidrofobik kısımların nispi boyutları ve şekilleri sürfaktanların özelliklerini belirlemektedir (Porter, 1994). Hidrofobik baş kısımları polar çözücüde çözünmeyen hidrokarbon zincirlerinden oluşmaktadır (Farn, 2008; Rosen ve Kunjappu, 2012). Sürfaktanlar, sulu çözeltilerde kolloidal elektrolit özelliği göstermektedirler (Moroi, 1992).

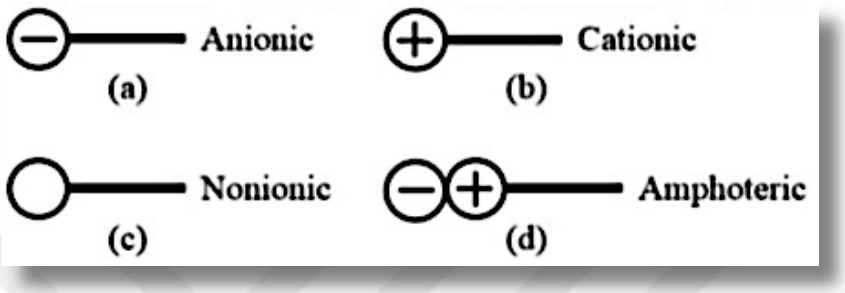
Kritik misel konsantrasyonu (KMK); miseller, ışığın dalga boyuna göre küçük kolloidal parçacıklardır. KMK'nın değeri sürfaktan konsantrasyonu arttıkça, çözeltinin fizikokimyasal özelliklerindeki değişim ile belirlenebilmektedir. Miseller oluştuğunda sulu yüzey aktif çözeltisi monomer ve polimer durumları arasında geçiş yapabilmektedir. Deneysel olarak KMK, yüzey aktif madde konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak uygun bir fiziksel özelliğe sahip grafik çizilerek bulunabilmektedir. Ani eğim değişikliği KMK'yı belirler (Dominguez ve ark., 1997). Kritik misel konsantrasyonu, apolar grupların artan hidrokarbon zincir uzunluğuna bağlı olarak azalır. İyonik sürfaktanlar için ise çözeltideki karşıt iyonların konsantrasyonuna ve yapısına bağlıdır, eklenen elektrolitler KMK'yı azaltır, iyon yükünün konsantrasyonunun azalması ile artar (Dominguez ve ark., 1997).



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

Hidrofilik grubun özellikleri sürfaktanları 5 gruba ayırmaktadır. Bunlar;

1. Katyonik sürfaktanlar
2. Anyonik sürfaktanlar
3. İyonik olmayan sürfaktanlar
4. Amfoterik sürfaktanlar
5. Gemini sürfaktanlar



Şekil 1.3. Yüzey aktif madde (sürfaktan) yapısının basitleştirilmiş şematik diyagramı (Xu ve ark., 2018)

1.1.1. Katyonik sürfaktanlar

Hidrofiliik baş kısmında pozitif yüke sahiptir. Su içerisinde amfifilik bir katyon ve bir anyon halinde ayrıştırılabilirler.

Katyonik yüzey aktif maddelerde klorür, bromür ve metalsülfat iyonları bulunmaktadır. Bu iyonlar, pozitif yüklü kuarterner azot bileşikleriyle birlikte molekülün polar grubunu oluşturmaktadır (Şekil 1.4) (Kırbıyık ve ark., 2018). Katyonik sürfaktanlar genellikle anyonik sürfaktanlar ile uyumlu değildir. Günümüzde çelik yüzeylerde anti-korozyon ajanı, plastik yüzeylere antistatik ajan ve altın gibi değerli madenlerde ayırıştırıcı olarak kullanılabildiği gibi kozmetik sektöründe de saç kremi yapımında kullanılmaktadır (Lindman ve ark., 2003).

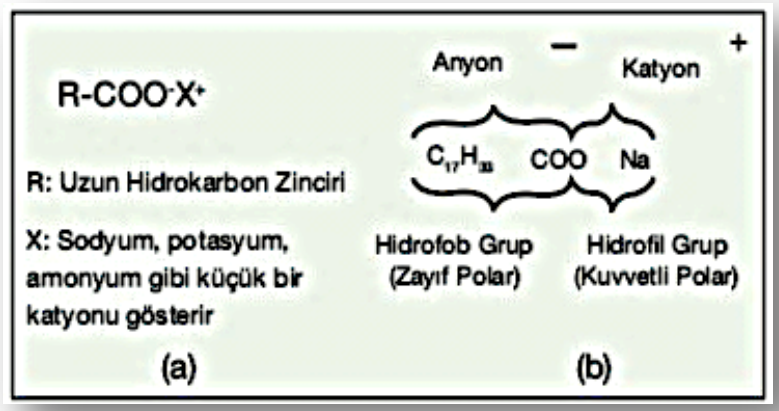


Şekil 1.4. (a) Katyonik yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik bir katyonik yüzey madde örneği (Kırbıyık ve ark., 2018)

1.1.2. Anyonik sürfaktanlar

Hidrofilik baş kısmında negatif yüke sahiptir. Su içerisinde amfifilik bir katyon ve anyon halinde ayrıştırılabilirler. Anyonik sürfaktanlarda bulunan Na, K, NH_4 gibi katyonlar negatif yüklü polar gruplarla beraber (sülfat, fosfat gibi) sürfaktanın polar grubunu oluşturmaktadır (Şekil 1.5) (Kırbıyık ve ark., 2018).

Anyonik sürfaktanlar diğer sürfaktanlara oranla daha fazla kullanılır. Dünya çapında sürfaktan üretimi yılda yaklaşık 10 bin ton olup, bunların %60'ı anyoniktir. Anyonik sürfaktanların bu kadar çok tercih edilmesinin ana nedenleri arasında üretim kolaylığı ve düşük maliyet yer almaktadır. Anyonik sürfaktanların çoğu deterjan formülasyonlarında kullanılır ve en iyi deterjan C_{12}-C_{18} aralığındaki alkil ve alkil yan zincirleri ile elde edilir. Genellikle katyonik sürfaktanlarla uyumlu değillerdir (Lindman ve ark., 2003). Bilinen en yaygın anyonik sürfaktanlar ise saponinlerdir.

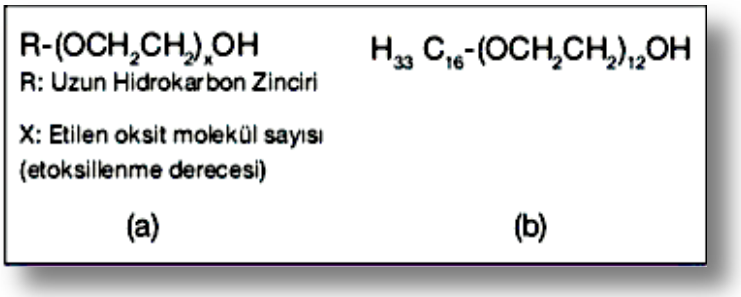


Şekil 1.5. (a) Anyonik yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik anyonik yüzey madde örneği

1.1.3. İyonik olmayan sürfaktanlar

İyonik olmayan sürfaktanlar, hidrofilik baş kısımlarında hiçbir yüke sahip değildir (Şekil 1.6). Suda iyonize olmazlar ve çözünürlükleri, hidrojen bağı ve Van der Waals etkileşimleri gibi farklı faktörlerden etkilenir (Zhao ve ark., 2005).

Etilen oksit veya propilen oksit grupları bulunmaktadır. İyonik olmayan yüzey aktif maddelerde çözünürlük etkisi etilen oksit ile sağlanmaktadır (Kırbıyık ve ark., 2018). İyonik olmayan sürfaktanlar, tüm sürfaktan grupları ile uyumludurlar. Aynı zamanda iyonik sürfaktanların aksine fizikokimyasal özellikleri belirgin değildir. Sudaki çözünürlükleri sıcaklık artışına göre azalma gösterir (Lindman ve ark., 2003). İyonik olmayan sürfaktanlardan en bilinen örnek sodyum dodesil sülfat (SDS)' tır.



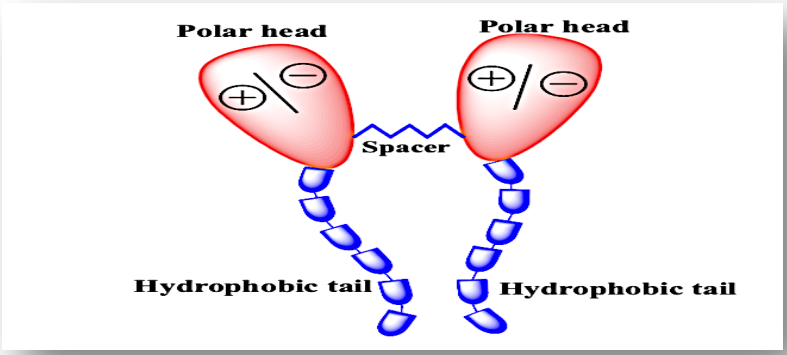
Şekil 1.6. (a) İyonik olmayan yüzey aktif maddenin genel formülü, (b) Tipik bir iyonik olmayan yüzey madde örneği (Kırbıyık ve ark., 2018)

1.1.4. Amfoterik sürfaktanlar

Amfoterik sürfaktanlar hem pozitif hem de negatif yüke sahiptir. Molekülün yükü bulunduğu çözeltinin pH'sına bağlıdır. Doğal saponinler, lipidler ve betainler bu grubun önemli örnekleridir. Çoğu amfoterik sürfaktanların göz ve ciltte iritasyon yapma ihtimali düşüktür. Bu nedenle de şampuan ve krem gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Lindman ve ark., 2003).

1.1.5. Gemini sürfaktanlar

Gemini sürfaktanlar, bir alkil aralayıcı ile birleştirilmiş birden fazla hidrofilik (anyonik, katyonik, non iyonik ve zwitter iyonik) ve hidrofobik grup içeren sürfaktanlardır (Şekil 1.6) (Esumi ve ark., 1996). Gemini sürfaktanların KMK değerleri normal sürfaktanlardan 10 ile 100 kat daha azdır. Gemini sürfaktanlar bu özellikleri sayesinde örneğin; PAH'ları (poliaromatik hidrokarbon) çözmek için gereken sürfaktan miktarını en aza indirir (Chorro ve ark., 1998).



Şekil 1.7. Basitleştirilmiş gemini sürfaktan yapısı (Mondal ve ark., 2015)

1.2. Biyosürfaktanların Genel Özellikleri

Biyosürfaktanlar, bakteriler mantarlar ve mayalarında dahil olduğu çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir.

Biyosürfaktanların hidrofilik kısımları aminoasit, anyon ya da katyon peptitlerinden oluşur (Gautam ve ark., 2006).

Hidrofobik kısımları ise doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşur. Katı, sıvı ve gaz molekülleri arasındaki yüzey ve iç yüzey gerilimini azaltabilme özelliğine sahip moleküllerdir (Gautam ve ark., 2006).

Mikrobiyal yüzey aktif maddeler; petrol üretimi, ziraat, maden teknolojileri gibi alanlarda ıslatıcı ajan ve köpük yapıcı ajan olarak kullanımlarının yanı sıra ilaç ve kozmetik sanayinde emülsifiye edici madde olarak kullanılırlar (Gautam ve ark., 2006).

Petrol türevlerinden üretilen sürfaktanların aksine biyosürfaktanlar çevreyi kalıcı olarak kirletmezler ve diğer mikroorganizmalara karşı anti-mikrobiyal aktivite sergilerler (Desai ve ark., 1997; Banat ve ark., 2000).

Biyosürfaktanların;

- Yüzey ara /yüzey gerilimini düşürme
- Düşük toksisite
- Biyouyumluluk ve sürdürülebilirlik
- Biyoparçalanabilirlik
- Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı gibi özellikleri bulunmaktadır (Chandran ve ark., 2010).

1.2.1. Yüzey/ara yüzey gerilimini düşürebilme

Biyosürfaktanlar yüzey/ara yüzey gerilimini düşürmede yardımcı olur. Örneğin *B. subtilis* tarafından üretilen sürfaktin suyun yüzey gerilimini 25 mN m^{-1}'e, ara yüzey gerilimini ise 1 mN m^{-1}'e düşürebilir (Cavelero ve ark., 2003). Ayrıca biyosürfaktanların KMK değerleri, kimyasal sürfaktanlara kıyasla yaklaşık 10-40 kat daha düşük olduğundan dolayı yüzey gerilimini düşürmek için ihtiyaç duyulan biyosürfaktan miktarı da daha az olmaktadır (Banat ve ark., 1997).

1.2.2. Düşük toksisite

Biyosürfaktanların düşük toksisiteye sahip olduğunu gösteren az çalışma olmasına rağmen düşük toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. Kimyasal türevli sürfaktanların *Photobacterium phosphoreum*' a karşı rhamnolipidlerden daha yüksek toksisiteye sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Poremba ve ark., 2013). Düşük toksisite profilleri dolayısıyla biyosürfaktanlar, farmasötik ve gıda endüstrisi için uyumlu olarak kabul edilmektedirler (Guerra ve ark., 1984).

1.2.3. Biyouyumluluk ve sindirilebilirlik

Biyosürfaktanların biyouyumluluk ve sindirilebilirlik özelliği kozmetik, farmasötik ve fonksiyonel gıda katkıları olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rahman ve ark., 2008).

1.2.4. Biyoparçalanabilirlik

Biyosürfaktanlar, sentetik sürfaktanlara göre daha kolay bozunabilir olduğundan biyoremediasyon/biyosorpsiyon gibi uygulamalar için daha uygundur (Desai ve ark., 1997). Son yıllarda giderek artan ekolojik endişeler biyosürfaktanların özellikle biyoparçalanabilirlik özelliklerinden dolayı daha çok tercih edilmesini sağlamıştır. Deniz bakterilerinden elde edilen biyosürfaktanlar hidrokarbonları biyolojik olarak parçalayabilir. Özellikle marin bakterilerinin ürettiği sophorolipid karakterindeki biyosürfaktanlar denizlerde balık ölümlerine sebebiyet *Cochlodinium polykrikodies*'in biyodegradasyonunda %90 verimliliğe sahiptir (Lee ve ark., 2008).

1.2.5. Sıcaklık, pH ve iyonik güç toleransı

Biyosürfaktanların çoğu sıcaklık ve pH gibi ortam şartlarına karşı geniş bir tolerans göstermektedirler. Bir biyosürfaktan üreticisi olan *B. licheniformis*'in 50 °C'e sıcaklığa, 4.5-9 civarında pH'a ve 25-50 g/L'ye kadar NaCl ve Ca konsantrasyonuna karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *Arthrobacter protophormiae* tarafından

üretilen bir başka biyosürfaktanın hem termostabil (30-100 ℃) hem de geniş bir pH aralığında (2-12) stabil olduğu gözlemlenmiştir (Das ve ark., 2007).

1.2.6 Anti-adesif (Yapışmayı önleyici) aktivite

Biyosürfaktanların, patojenik organizmaların katı yüzeylere veya enfeksiyon bölgelerine yapışmayı engellediği bilinmektedir (Singh ve ark., 2004).

Bu özelikleri sayesinde biyosürfaktanlardan; ameliyat kateterleri, implantlar gibi birçok sağlık uygulamalarında faydalanılabilmektedir.

1.2.7. Anti-mikrobiyal aktivite

Biyosürfaktanlar, gıda ve tıbbi ürünler endüstrisinde antimikrobiyal ajanlar olarak yaygın kullanılmaktadır. Biyo-yüzey aktif maddelerde doğal olarak oluşan glikolipidler ve lipopeptitler biyosürfaktanların antimikrobiyal özelliklerini arttırır (Nitschke ve ark., 2007; Mulligan ve ark., 2011; Gudina ve ark., 2013). Doheim ve Gomma (2015) biyosürfaktanların anti mikrobiyal aktivitesini incelemiş ve çeşitli bakteri ve fungal türlere karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite sergilediklerini öne sürmüşlerdir. Ayrıca biyosürfaktanların anti mikrobiyal aktiviteleri sayesinde, terapötik uygulamalar için umut verici bileşikler olduklarını bildirmişlerdir (Gomma ve ark., 2015).

1.2.8. Özgüllük ve kimyasal çeşitlilik

Çeşitli mikroorganizmaların spesifik biyosürfaktan ürettiği bilinmektedir. Bu özgüllük esas olarak üretilen biyosürfaktanın türünün bileşimine bağlıdır. Biyosürfaktanlar faaliyetlerinde de kendilerine özgüdürler ve bu özellikleri sayesinde belirli kirleticilerin detoksifikasyonunda, endüstriyel emülsiyonların giderilmesinde, spesifik kozmetik, farmasötik ve gıda uygulamalarında önem sergilemektedir (Rahman ve ark., 2008).

1.2.9. Maliyet

Biyosürfaktanlar, çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedirler. Ancak üretim maliyetinin yüksek olması biyosürfaktanların kullanımını sınırlayan en belirgin nedendir. Atıkların (zirai atıklar gibi) enerji kaynağı olarak kullanılması ile hem çevre dostu geridönüşüm sağlayan proseslerle biyosürfaktan üretilebilecek hem de maliyet düşürülerek daha yaygın kullanımı sağlanabileceği öngörülmektedir (Marchant ve ark., 2012; Henkel ve ark., 2012).

1.3. Biyosürfaktanların Sınıflandırılması

Biyosürfaktanlar, kimyasal yapılarına veya molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılmaktadır. Molekül ağırlıklarına göre düşük molekül ağırlıklı (glikolipidler ve lipopeptidler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polisakkaridler, proteinler ve lipoproteinler) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar (Ron ve ark., 2005; Rosenberg ve ark., 1999; Banat ve ark., 2010). Kimyasal yapılarına göre ise şu şekilde gruplandırılmaktadırlar;

1.Glikolipidler

- Ramnolipidler
- Trehalolipidler
- Soforolipidler

2.Lipopeptidler ve Lipoproteinler

3.Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler

4.Polimerik Biyosürfaktanlar

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

1.3.1. Glikolipidler

Glikolipidler kolay temin edilebilen biyosürfaktanlar olmalarından dolayı en yaygın biyosürfaktan grubudur. Uzun zincirli alifatik asitler veya hidroksi alifatik

asitlerin karbohidratlarla oluşturduğu kompleks moleküllerdir. Günümüzde en yaygın bilinen glikolipidler; ramnolipidler, trehalolipidler, soforolipidler'dir (Jarvis ve ark.,1949).

1.3.1.1. Ramnolipidler

Ramnolipidler, bir veya iki ramnoz molekülünün bir veya iki hidroksidekanoik asit molekülüne bağlandığı glikolipidlerdir. Ramnolipidler *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Candida bombicola* gibi organizmalar tarafından sentezlenmektedir (Mata ve ark. 1999). En çok çalışılan glikolipidler, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen ramnolipidlerdir (Jarvis ve ark., 1949).

Ramnolipidler, hücre duvarının yapısında bulunuyorlar ise hidrokarbonlu bileşiklerin periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışına salınıyorlarsa hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özelliklerine sahiptirler. Ayrıca, ramnolipidler bulundurdukları ramnoz şekerinin sayısına göre (monoramnolipid veya diramnolipid) adlandırılmaktadırlar. Mikroorganizmanın sentezleyeceği ramnolipidin miktarı ve yapısı; pH, sıcaklık, besiyerinde kullanılan karbon ve azot kaynağı gibi etkenlere bağlı olarak değişebilir (Guerra ve ark., 1945; Guerra ve ark., 1986).

Sıvı fazlar arasındaki yüzey gerilimini ve ara yüzey gerilimini önemli ölçüde azaltabilirler. Örneğin suyun yüzey gerilimini 76 mN m^{-1}'den 25-30 mN m^{-1}' ye düşürebilirler (Guerra ve ark., 1984). Bu özellikleri sayesinde petrol atıklarının giderilmesi, gıda ve kozmetik alanında emülsifiye edici ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadırlar.

1.3.1.2. Trehalolipidler

Glikolipidlerin başka bir çeşidi de trehalolipidlerdir. Trehalolipid sentezi gerçekleştiren *Mycobacterium, Corynebacterium, Nocardia* cinslerine ait birçok türün disakkarit therahaloza C-6 ve C-6 mikolitik asit kısımlarından bağlanmasıyla oluşur.

Mikolik asitler, α yayılımlı uzun zincirli β-hidroksi doymamış yağ asitleridir. Trehalolipidlerin varlığı mikolik asitlerin büyüklüğüne, yapısında bulunan karbon moleküllerinin miktarına ve doymamışlık derecesine göre değişir. *Rhodococcus erythropolis* ve *Arthrobacter* sp. kültürlerinden elde edilen trehaloz lipidleri yüzey ve ara yüzey gerilimini azaltmaktadır (Arpita Roy, 2017).

Trehalolipidler yüzey aktiviteleri nedeniyle daha iyi petrol geri kazanımı için, çevre alanında kirliliğin çözünürlüğünü ve kirlenmiş toprağın desorpsiyonunu geliştiren maddeler olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Chang ve ark., 2004; Franzetti ve ark., 2010). Ayrıca, antimikrobiyal, antiviral, anti-adhezif, antikanser veya immünmodülatör gibi çeşitli biyolojik özellikleri sayesinde biyomedikal alanında da kullanılmaktadırlar (Franzetti ve ark., 2010).

Rhodococcus erythropolis SD-74 tarafından üretilen süksinoil trehalolipidlerin, insan lösemik hücre hattı olan U937'nin büyümesini belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve morfolojik değişimini indüklediği gösterilmiştir (Isoda ve ark., 1995; Takumoto ve ark., 2009). Buna ilave olarak, insan HL-60 promiyelositik lösemi hücre hattının da farklılaşmasını indüklediği rapor edilmiştir (Sudo ve ark., 2000).

1.3.1.3. Soforolipidler

Soforolipidler, *Candida bombicola*, *C. magnoliae, C. apicola* ve *C. bogoriensis* gibi maya suşları tarafından üretilmektedirler. Genellikle yağ asitlerinin sondan bir önceki karbondaki hidroksil grubuna β glikosidik olarak bağlı disakkarit soforozları formunda bulunurlar. Terminal karboksil grubu laktonik formda olabilir veya anyonik bir yüzey aktif madde vermek üzere hidrolize edilebilir (Kurtzman ve ark., 2010). Van Bogaert ve Soetart (2011) lakton soforolipidlerinin asidik soforolipidlere göre suyun yüzey gerilimini daha etkili bir biçimde düşürdüğünü öne sürmüşlerdir. Soforolipidlerin suyun yüzey gerilimini düşürme özelliklerinin yanı sıra çeşitli biyolojik aktiviteleri sayesinde kozmetik, eczacılık ve tıp alanlarında da kullanılabilmektedir (Bogaert ve ark., 2011).

1.3.2. Lipopeptidler ve lipoproteinler

Lipopeptidler grubu biyosürfaktanların en iyi bilinen örnekleri sürfaktinlerdir. Dekapeptid anti-toksinler (gramisidinler) ve lipopeptid anti-toksinler (polimiksinler)'in de dahil olduğu çok sayıda siklik (halkalı) lipopetid bulunmaktadır. Bunlar, polipeptid zincire bağlı olan bir lipid içermektedirler (Roy, 2017). Sürfaktin adı verilen ve *Bacillus* sp. tarafından üretilen biyosürfaktan, C13-C15 karbon atomu uzunluğunda hidroksi yağ asidi ve yedi amino asit içerir. Sürfaktinin önemli bir özelliği, memeli eritrositlerini parçalama ve sferoplast oluşturma yeteneğidir (Bernheimer ve ark. 1970).

1.3.3. Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral lipidler

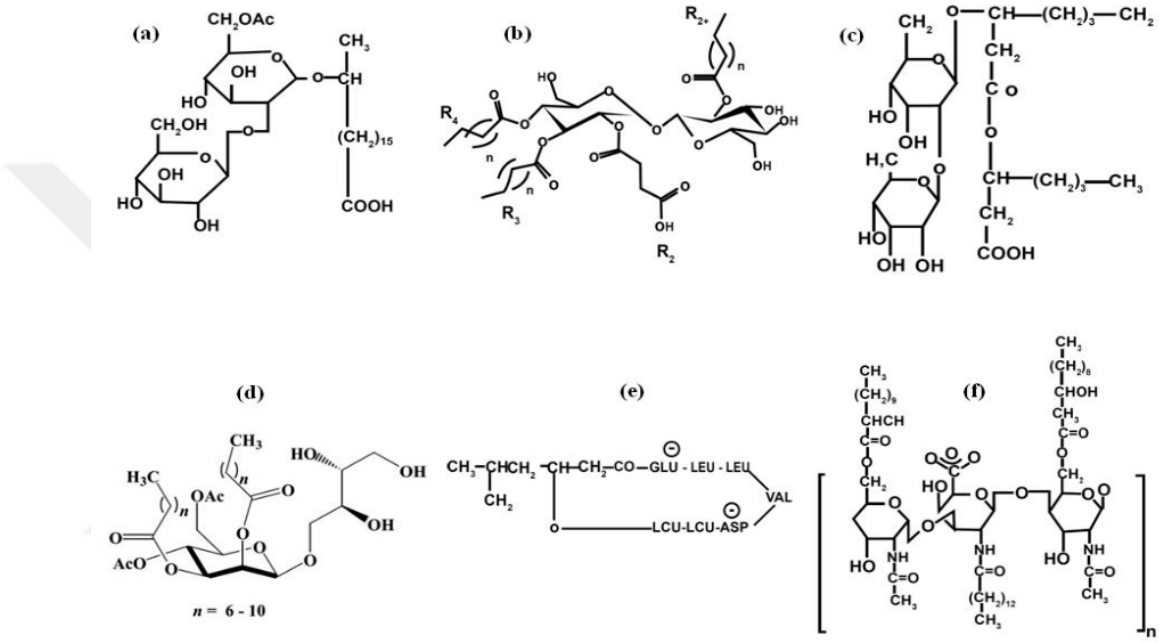
Birçok bakteri ve maya, n-alkanlardaki büyümeleri sırasında büyük miktarlarda yağ asitleri ve fosfolipid içerikli yüzey aktif maddeleri sentezler (Cirigliano ve ark., 1985). Hidrofilik ve lipofilik denge (HLB), yapılarındaki hidrokarbon zincirinin uzunluğu ile doğru orantılıdır. Alkanlar gibi hidrofobik substratlar üzerinde büyüyebilen birkaç mantar, maya ve bakteri, karbon kaynağının alımını kolaylaştırmak için büyük miktarlarda fosfolipid, yağ asidi veya nötr lipid salgılar. Bu canlı gruplarına *Nocardia erythropolis, Thiobacillus thiooxidans, Candida lepus*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Mycococcus* sp., *Candida* sp., *Penicillium* sp. ve *Aspergillus* sp. örnek verilebilir (Kappeli ve ark., 1979).

1.3.4. Polimerik biyosürfaktanlar

En iyi çalışılan polimerik biyosürfaktanlar alasan, liposan, lipomanan, emülsan ve diğer bazı polisakkarit-protein kompleksleridir (Rosenberg ve ark., 1979). Alasan, liposan, lipomanan emülsan ve diğer bazı polisakkarit protein yapıları en etkili polimerik biyosürfaktanlar olarak düşünülmektedirler. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, hücre dışı güçlü bir polianyonik amfipatik heteropolisakkarit biyoemülsiye edici entegre eder. Emulsan, sudaki hidrokarbonlar için %0.001 ila 0.01 kadar düşük bir oranda bile güçlü bir emüsifiye edicidir (Roy, 2017).

1.3.5. Partiküler biyosürfaktanlar

Hücre dışı membran kesecikleri, mikrobiyal hücreler tarafından alkan alımında çok önemli rol oynayan mikroemülsiyonları oluşturmak için hidrokarbonları bölmektedir. 20-50 nm çapında ve 1.158 kübik g/cm kaldırma yoğunluğuna sahip *Acinetobacter* sp. vezikülleri proteinler, fosfolipidler ve lipopolisakkaritlerden oluşur (Kappeli ve ark., 1979).



Şekil 1.8. Bilinen bazı biyosürfaktanların kimyasal yapıları (a) Ramnolipid, (b) Trehalolipid (c) Soforolilid, (d) Mannozeritritol lipid, (e) Sürfaktin, (f) Emulsan, (Uyar ve Yalçın, 2013)

1.4. Biyosürfaktan Üreten Mikroorganizmalar

Biyosürfaktanlar, başta bakteri, mantar ve maya olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir. Biyo-yüzey aktif maddelerin üretimi esas olarak mikroorganizmaların türüne ve kaynağına bağlıdır (Shekhar, 2015). Aynı zamanda üretilen biyosürfaktanın miktarı ve kalitesi, karbon substratının doğasından, ortamdaki

N, P, Mg, Fe ve Mn iyonlarının konsantrasyonundan ve pH, sıcaklık, çalkalama ve seyreltme oranı dahil olmak üzere birçok koşuldan etkilenir (Banat, 1995). Örneğin sürfaktin ve likenisin gibi lipopeptid biyosürfaktanların üretiminde nötral pH civarındaki başlangıç pH değerleri ile fermentasyona başlanmalıdır (Joshi ve ark., 2007; Joshi, 2008; Al-Bahry ve ark., 2013). Bununla birlikte soforolipid türündeki glikolipid biyosürfaktanların üretimi için asidik pH, ramnolipidlerin üretimi için de başlangıç pH değerinin 7.0 civarında olması gereklidir (Silva ve ark., 2013; Elshafie ve ark., 2015).

Atık ürünlerin uzaklaştırılması için endüstriyel uygulamada kullanılan birçok mikroorganizma, kirlenmiş topraklardan, atık sulardan ve atık su boşaltım noktasındaki kaynaklardan izole edilmiştir. Birçok mikroorganizma için zararlı olan substratlar, biyosürfaktan üretimini gerçekleştiren organizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Shekhar, 2015).

Çizelge 1.1 Biyosürfaktanların sınıflandırılması ve üretici mikroorganizmalar (Desai ve ark., 1997; Pacwa ve ark., 2011; Sekhan ve ark., 2012)

Biyosürfaktan		**Üretici mikroorganizma**
Grup	**Sınıf**	
	Ramnolipidler	*Pseudomonas aeruginosa, P. chlororaphis*

Glikolipidler	Trehalolipidler	*Mycobacterium tuberculosis, Rhodococcus erythropolis, Arthrobacter sp., Nocardia sp., Corynebacterium sp.*
	Soforolipidler	*Torulopsis bombicola, Torulopsis petrophilum, Torulopsis apicola, Candida*
	Mannosileritritol lipidler	*Pseudozyma aphidis Ustilago maydis*
Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral yağlar	Korinomikolik asit	*Corynebacterium lepus*
	Spikulisporik asit	*Penicillium spiculisporum*
	Fosfatidilethanolamin	*Acinetobacter sp., Rhodococcus erythropolis*
Lipopeptitler ve lipoproteinler	Sürfaktin/Subtilisin/Subsporin	*Bacillus subtilis*
	Likensin	*Bacillus licheniformis*
	Serravettin	*Serratia marcescens*
	Viskosin	*Pseudomonas fluorescens*
	Gramisidin	*Bacillus brevis*
	Polimiksin E1	*Bacillus polymyxa*
	İturin A	*Bacillus subtilis*
	Putisolvin I ve II	*Pseudomonas putida*
	Artrofaktin	*Arthrobacter*
Polimerik biyosürfaktanlar	Emülsan	*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1
	Alasan	*Acinetobacter radioresistens* KA-53
	Biodisperan	*Acinetobacter calcoaceticus* A2
	Liposan	*Candida lipolytica*
	Mannoprotein	*Saccharomyces cerevisiae*
Partikül sürfaktan	Membran vesikülleri	*Acinetobacter sp. H01-N*
	Fibrin ve tüm hücreler	*Acinetobacter calcoaceticus*

1.5. Biyosürfaktanların Kullanım Alanları

Biyosürfaktanlar, kimyasal yollarla elde edilen sentetik sürfaktanlara kıyasla çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenmesi sayesinde önem kazanmıştır (Singh ve ark., 2007). Biyosürfaktanlar biyolojik olarak, sürfaktanlara oranla kolay

bozunabildikleri ve düşük toksisiteye sahip oldukları için çevre dostu kabul edilirler. Biyosürfaktanların bu eşsiz özellikleri, çok sayıda endüstriyel işlemde kimyasal olarak sentezlenmiş yüzey aktif maddelerin yerine kullanılmasına olanak tanır. Çoğu biyo-yüzey aktif madde eczacılık/ilaç, gıda, kozmetik, böcek ilacı, petrol ve biyodegradasyon endüstrilerinde potansiyel uygulamalara sahiptir (Fiechter, 1992).

Çizelge 1.2 Biyosürfaktanların kullanım alanları (Yüksel ve ark., 2015)

Endüstri	Uygulama	Biyosürfaktanın rolü
Petrol	Petrol iyileştirilmesinin arttırılması	Silindir kuyu içindeki petrol direnajını geliştirme, kapiller içine sıkışmış petrolün serbest kalmasını sağlama, katı yüzeylerin ıslatılması, yağ viskozitesinin ve yağ akış özelliğinin azalması, arayüzey geriliminin azalması ve yağların çözünmesi
	De-emülsifikasyon	Yağ emülsiyonlarının de-emülsifikasyonu, yağların çözünmesi, vizkozitenin azalması, ıslatıcı madde
Çevresel	Biyolojik ıslah	Hidrokarbonların emülsifikasyonu, arayüzey geriliminin düşürülmesi, metal ayrılması
	Yağların iyileştirilmesi ve yıkanması	Hidrokarbonlara tutunarak emülsifikasyon, dağıtım, köpük yapıcı ajan, deterjan ve katı maddelerin yıkanması
Gıda	Emülsifikasyon ve de-emülsifikasyon	Emülsifiye edici, çözücü, de-emülsifiye edici, süspansiyon, ıslatıcı, köpürme, yoğunlaştırıcı ve yağlayıcı ajan
Biyolojik	Mikrobiyolojik	Hücre hareketliliği, hücreler arası iletişim, nutrientlerin ulaşımı, hücrelerin rekabeti, bitki ve hayvan patogenezi gibi fizyolojik davranışlar
	Farmasötik	Antibakteriyal, antifungal, antiviral, adhezif ajanlar, immun modülator moleküller, aşı maddesi, gen terapisi

Çizelge 1.2. (**devam**)

Tarım	Biyolojik kontrol	Parazitlik, antibiyosiz, rekabet, sistemik direnç ve hipovirülanslığın uyarılması gibi biyokontrol mekanizmaların kolaylaştırılması
Biyoişlem	Down-stream Süreç'	İki fazlı sulu sistemlerin ve mikroemülsiyonların biyokatalizi, biyotransformasyon, hücreiçi ürünlerin geri kazanımı, hücredışı enzimlerin ve fermentasyon ürünlerinin üretiminin artması
Kozmetik	Sağlık ve güzellik ürünleri	Emülsifiye edici, köpük yapısı ajan, çözücü, ıslatıcı ajan, temizlik maddesi, antimikrobiyal ajan, enzim etkisinin ayarlanması

1.5.1. Petrol endüstrisi

Petrol endüstrisinde şu anda kullanılmakta olan termal, fiziksel ve kimyasal yöntemleri içeren birkaç gelişmiş petrol geri kazınım (EOR) süreci bulunmaktadır. Hava/gaz veya su enjeksiyonu geleneksel olarak kullanılır (Wahaibi ve ark., 2014). Ayrıca sürfaktanlar, özellikle EOR'da olmak üzere, farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler potansiyel olarak pahalı, çevreye zararlı olarak bilinir ve daha düşük verim ile sonuçlanır.

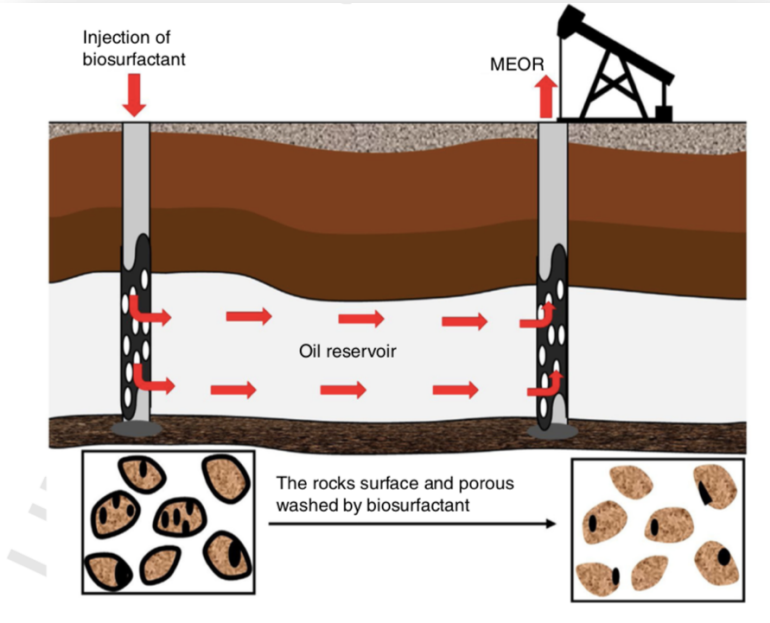
Kaya matrikslerinin gözenekli yapısına hidrokarbonların sıkışması, yüksek yağ viskozitesi ve enjekte edilen su ile yağ arasındaki ara yüzey gerilimi gibi faktörler nedeniyle EOR'da düşük yağ geri kazanımı gerçekleşir (Zou ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2017; Fernandes ve ark., 2018). Ayrıca, kimyasal sürfaktanların yağ rezervuarına enjeksiyonu, yeraltı suyunun ve toprağın kirlenmesine neden olur ki bu da insanlar, bitkiler ve hayvan türleri için ciddi sağlık risklerine yol açabilir (Jha ve ark., 2016).

Farklı çalışmalar, etkin bir EOR için biyosürfaktan üreten mikroorganizmaların kullanımının uygun olduğunu bildirmiştir. Bu yönteme mikrobiyal geliştirilmiş petrol geri kazanımı (MEOR) denir (Banat ve ark., 1995; Banat ve ark., 2000; Banat ve ark., 2015). MEOR tekniğinde, petrol geri kazanımını arttırmak için biyosürfaktan üretmek üzere *Bacillus megaterium, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens* gibi çeşitli mikrobiyal türler kullanılmıştır (Wahaibi ve ark., 2014; Dhanajaran ve ark., 2017).

Bu tekniğin temel prensibi, mikropların enjekte edilmesi ile petrol hidrokarbonları ve kaya matrisinin yüzeyi arasındaki petrol viskozitesinin ayrıca ara yüzey geriliminin azalması sonucunda petrolün hareketliliğini ve petrol geri kazanımını daha da artırabilmesidir (Akbari ve ark., 2017).

Genel olarak yüksek molekül ağırlıklı biyosürfaktanlar emülsifiye edici özellikleriyle bilinirler ve ağır petrol hareketliliğini ve geri kazanımını arttırabilirler. Bununla birlikte düşük molekül ağırlıklı biyosürfaktanlar ise yüzey/ara yüzey geriliminin azaltılması ve petrol geri kazanımını arttırır (Banat ve ark., 2010). Temel olarak, mikroorganizmaların MEOR için biyo-yüzey aktif maddelerin oluşumuna katkıda bulunabilmesinin ex-situ ve in-situ uygulamalar olarak bilinen iki yolu vardır. Ex-situ uygulamalarda biyosürfaktan üretimi bir biyoreaktör içerisinde aerobik fermantasyon yoluyla gerçekleştirilir. Daha sonra petrol geri kazanımını arttırmak için, yağ haznelerine enjekte edilir. Ancak in-situ uygulamalarda biyosürfaktan üretimi, bakterilerin ve bakteriler için gerekli olan besin maddelerinin direkt olarak haznelere enjekte edilmesiyle gerçekleşir (Geetha ve ark., 2018).

Ex-situ uygulamalarla karşılaştırıldığında in-situ uygulamaların biyosürfaktan madde üretimi için düşük üretim maliyetinden dolayı daha avantajlı olduğu düşünülmektedir (Cui ve ark., 2007). Daha iyi MEOR uygulamaları yapmak için kullanılacak mikroorganizmaların özellikleri dikkate alınarak in-situ koşullarının basınç, sıcaklık, oksijen miktarı, pH ve tuzluluk oranları açısından optimize edilmesi gerekmektir (Liang ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2017).



Şekil 1.9 Ham petrolün MEOR yöntemiyle geri kazanımı (Akbari ve ark., 2017)

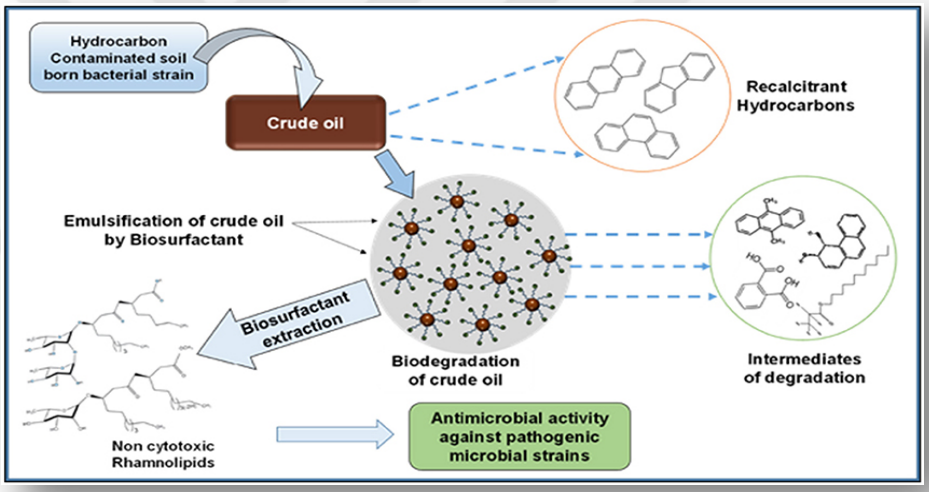
1.5.2. Biyodegredasyon/Biyoremediasyon Teknolojileri

Son yıllarda, su ve toprakların hidrofobik organik bileşikler (HOC) ve ağır metaller tarafından kirlenmesi kamuoyunun dikkatini çekmiştir. HOC'ların ve ağır metallerin çevreden uzaklaştırılması önemli bir sorun haline gelmiştir (Heng ve ark., 2013). Günümüzde ağır metallerin ve HOC'ların uzaklaştırılmasında sürfaktanlar kullanılmaktadır. Fakat sürfaktanların toprak matrisine tutunmadaki dayanıklılıkları farklı çevresel sorunlara yol açmaktadır. Ancak sürfaktanlara karşılık bitkiler ve çeşitli mikoorganizmalar tarafından üretilen biyosürfaktanların toprak matrisine tutunmadan kolay bozunabilmesi, düşük toksisiteye sahip olması ve çevresel uyumlulukları gibi özellikleri sayesinde daha iyi performans göstermektedir (Mulligan ve ark., 2005; Mnif ve ark., 2015).

Biyosürfaktan üreten mikroorganizmalar yağla ilgili bileşikleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri hidrofobik kirleticilerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Biyosürfaktanlar, hidrokarbon zincirini parçalayarak kirleticileri, CO_2, su ve minerallere dönüştürürler (Lima ve ark., 2011).

Ramnolipidler ve diğer biyosürfaktan çeşitleri kirli su ve toprağın biyoremediasyonunda önemli rol oynarlar. Ramnolipidler de-iyonize suya kritik misel konsantrasyonundan daha yüksek seviyede eklendiğinde petrol bileşenlerinin çözünürlüğünü, biyokütle büyümesini ve biyodegredasyon yüzdesini sırasıyla 1000 ile 2500 mg/L ve %40-100 arasında artırmıştır (Whang ve ark., 2005).

Biyosürfaktanlar, ayrıca kirletici maddeleri emülsifiye ederek hidrokarbon biyodegradasyonunu artırabilirler. *Acinetobacter haemolyticus* Zn01 bakterisi tarafından üretilen biyosürfaktanın, %60 emülsifikasyon indeksi ile kirli sudan mazotun elemine edilmesi için yüksek bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Onur ve ark., 2015).



Şekil 1.10 Ham petrolün biyodegradasyonu (Patowary ve ark., 2017)

1.5.3. Farmasötik endüstrisi

Biyosürfaktanların tıp ve farmasötik alanda son derece yaygın kullanım alanları bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda biyosürfaktanların medikal alanda kullanımı ve potansiyel ticari uygulaması artmıştır. Antimikrobiyal, antibakteriyal, antifungal, antiviral aktiviteleri biyosürfaktanları terapötik birer ajan haline getirir. Ek olarak yapışma önleyici (anti-adhezif) ajanlar olması, biyomedikal alanda yapışma önleyici

ve kaplama malzemesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Rodriguez ve ark., 2006).

Birçok biyosürfaktan, mikroskobik organizmalara, parazitlere ve enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal etki gösterir. *B. subtilis* tarafından üretilen ve bir lipopeptid olan iturin antifungal etkiye sahiptir. Mannozileritritol lipid, özellikle Gram-pozitif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterir (Roy ve ark., 2017).

Çizelge 1.3 Biyosürfaktanların farmasötik endüstrisinde kullanımı

Mikroorganizma	**Ürettiği biyosürfaktan**	**Aktivite/Uygulama**
Pseudomonas aeruginosa	Ramnolipid	*Mycobacterium tuberculosis'*e karşı antimikrobiyal aktivite, konuşma cihazlarından izole edilen çeşitli bakteri ve maya suşlarında antiadhesif etki
Bacillus subtilis	Sürfaktin	Antimikrobiyal-antifungal aktivite, fibrin pıhtı oluşumu inhibisyonu, hemoliz ve lipid membranlarda fibrin iyon kanalları oluşumu, Ehrlich's asit karsinom hücrelerine karşı antitümoral aktivite, HIV'e karşı antiviral aktivite
Bacillus pumilis	Pumilosidin	Herpes simpleks'e karşı antiviral aktivite
Bacillus subtilis	Utirin	H^+, K^+ ve ATPaz'a inhibitör aktivite ve *in vivo* da mide ülserine karşı koruma, antimikrobiyal ve antifungal aktivite, maya hücrelerinin membran yapısı ve morfolojisi üzerine etki, biyomoleküler lipid membranların elektrik iletkenliğini artırma
Bacillus licheniformis	Linchenysin	Toksik ve pirojenik olmayan immünolojik adjuvan, antimikrobiyal aktivite, lipopeptidlerin membran bozucu etkisini açıklayabilecek şelat özellikleri
Candida antartica	Mannosylerythritol lipid	Antimikrobiyal, immünolojik ve nörolojik özellik
Rhodococcus erythropolis *Streptococcus thermophilus*	Trehaloz lipid Glikolipid	İnsan promiyelostitk lösemi hücre çizgisinde HL60 hücre faklılaşma indüksiyonu PCI12 hücrelerinde nöronal farklılaşmanının uyarılması HSV (herpes simplex virüs) ve influenza virüsüne karşı antiviral aktivite Konuşma cihazlarından izole edilen çeşitli bakteri ve maya suşlarında antiadhesif aktivite
Streptococcus mitis *Lactobacillus*	Tanımlanmamış Sürfaktin	*Streptococcus mutant*'a karşı anti-adhesif aktivite Enterik bakteriler de dahil çeşitli patojenlere karşı anti-adesif aktivite

1.5.4. Gıda endüstrisi

Biyosürfaktanların, gıda endüstrisinde geniş uygulama alanları vardır. Lesitin ve türevleri, gliserol, sorbitol veya etilen glikol içeren yağ asidi esterleri ve yakın zamanda keşfedilen oligopeptid içeren monogliseritlerin etiloksillenmiş türevleri gıda endüstrisinde emülsüfiye edici olarak kullanılır (Besson ve ark.,1992).

Unun reolojik özelliklerini veya kısmen parçalanmış yağ dokularının emülsifikasyonunu etkilemek biyosürfaktanların fırıncılık ve et ürünlerindeki diğer kullanımlarındandır (Fiechter, 1992). Busscher ve ark. (1996), termofilik *Streptococcus sp.* tarafından üretilen biyosürfaktanların pastörizasyon cihazlarındaki ısı eşanjörü plakalarında kirliliğe neden olan *Streptococcus thermophilus* kolonizasyonunu geciktirmek suretiyle kontrol altına alabildiğini göstermiştir.

Biyosürfaktanların yüzey/arayüzey gerilimini azaltan, böylece emülsüfiye etme ve stabilizasyonu teşvik eden ajanlar olarak kullanılmaları gibi farklı işlevlere de sahiptir. Örneğin; yağ globüllerinin kümelenmesini kontrol etmek, gazlı sistemleri stabilize etmek, nişasta içeren ürünlerin dokusunu ve raf ömrünü iyileştirmek, buğday hamurunun reolojik özelliklerini değiştirmek ve yağ bazlı ürünlerin kıvamını ve dokusunu geliştirmek gibi işlevleri de vardır (Kachhoz ve ark., 1987). Aynı araştırmacılar tereyağı, kruvasan ve dondurulmuş şekerleme ürünlerinin özelliklerini geliştirmek için ramnolipidlerin kullanılmasını önermiştir. Son zamanlarda *Enterobacter cloacae*'nin denizel suşundan elde edilen biyosürfaktanların, sitrik veya askorbik asit içeren ürünlerde asidik pH'ya gösterdiği viskozite nedeniyle viskozite attırıcı olarak tanımlanmıştır (Iyer ve ark., 2006).

1.5.5. Kozmetik endüstrisi

Mikrobiyal sürfaktanlar olarak da adlandırılan biyo-yüzey aktif maddeler, kozmetik endüstrisi de dahil olmak üzere farklı alanlarda halihazırda kullanılan ve gelişmekte olan bir biyomolekül sınıfıdır (Rodrigues ve ark., 2015). Biyosürfaktanlar kimyasal olarak sentezlenmiş yüzey aktif maddeler ile aynı şekilde kullanılır.

Kullanım alanları ise oldukça geniş olup, deterjan, emülsifikasyon, ıslatma, köpürme, dağıtma, hidrofobik maddelerin çözündürülmesi veya yüzeylerin modifiye edilmesinde kullanılabilirler (Marchat ve ark., 2012; Banat ve ark., 2010; Holmberg ve ark., 2001).

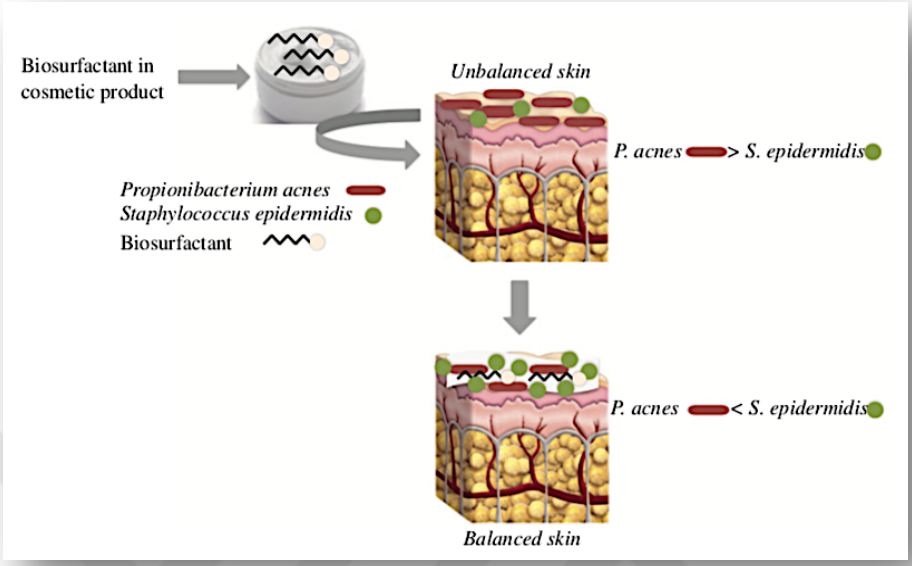
Biyosürfaktanların emülsifiye etme özelliği kozmetik sektörü için oldukça önemlidir. Biyosürfaktaların, uygulaması kolaydır ve nispeten ucuzdur (yüksek su oranı nedeniyle) ve aynı anda suda ve lipozolde çözünen maddelerin kullanımına izin verir. Düşük molekül ağırlıklı biyo-yüzey aktif maddelerin hava/su arayüzlerindeki yüzey gerilimini ve yağ/su (O/W) arayüzlerindeki yüzey gerilimini azaltır, yüksek moleküler ağırlıklı biyo-yüzey aktif maddeler ise O/W'yi stabilize etmede daha etkilidir (Banat ve ark., 2010).

Çeşitli patojenlere karşı biyosürfaktanların sergilediği antibakteriyel aktivitelerine ek olarak antiadhesif, antifungal ve antiviral aktiviteler kozmetik ve kişisel bakım uygulamaları için son derece ilgi çekicidir (Bourdichon ve ark., 2014).

Kozmetik sektöründe prebiyotik bileşikler cildin mikroflorasını yeniden dengeleme yeteneğine sahip maddeler olarak tanımlanabilir. Örneğin, *Propionibacterium acnes*'in aşırı büyümesi ile meydana gelen akneli bir cildin mikrobiyotası, *S. epidermidis* gibi faydalı bakterilerin büyümesi teşvik edilerek, *P. acnes* gibi zararlı bakterilerin büyümesi engellenebilir (Krutmann ve ark., 2009; Shimmering ve ark., 2011).

Bourdichan ve ark. (2014), *Lactobacillus* cinsi *(L. pentosus, L. paracasei, L. casei, L. brevis, L. rhamnosus, L. plantorum, L. helveticus)* laktik asit bakterilerinden elde edilen biyosürfaktanların kozmetik formülasyonlarına prebiyotikler olarak dahil edilebileceğini rapor etmişlerdir. Biyosürfaktan üretebilen diğer GRAS mikroorganizmaları arasında yer alan *Bacillus* cinsi (*B. amyloliquefaciens, B. coagulans ve B. subtilis*), *Candida* cinsi (*C. rugosa, C. tropicalis*), *Kluyveromyces* cinsi (*K. marxianus*) veya *Saccharomyces* cinsi (*S. cerevisiae*) mikroorganizmalar da

kozmetik sektöründe kullanılmak üzere prebiyotikler olarak dahil edilebilir (Bourdichon ve ark., 2014).



Şekil 1.11. Kozmetik ürünlerde biyosürfaktan olarak kullanılan prebiyotiklerin akne tedavisi (Kurtman ve ark., 2009)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyosürfaktanlar, çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen (bakteri, mantar ve fungus), moleküler ağırlıklarına ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılan, başta petrol, çevre, medikal, tıp, farmasötik, gıda ve kozmetik gibi endüstrilerde geniş kullanım alanına sahip amfifilik biyomoleküllerdir. Biyosürfaktanların yüzey/ara yüzey gerilimini düşürebilme, düşük toksisiteye sahip olma, biyouyumluluk ve sindirilebilirlik, sıcaklık ve pH gibi ortam koşullarına gösterdikleri tolerans gibi özellikleri kullanım alanlarını genişletmiştir. Bu özellikleri sayesinde biyosürfaktanlar biyoremediasyon, biyodegredasyon, yağ geri kazınımı (MEOR), kişisel bakım, biyomedikal, kozmetik, farmasötik ve gıda alanlarında sürfaktanlara alternatif olarak gösterilmektedir.

Son zamanlarda biyosürfaktanlar ile ilgili olarak, fizikokimyasal özellikleri, çevre dostu olması, topraktan hidrofobik bileşiklerin (HOC) ve ağır metallerin uzaklaştırılmasını sağlaması gibi özellikleri sayesinde çevresel uygulamalarına özellikle odaklanılmakta ve çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde gerek yurt içinde gerek yurt dışında yapılan çalışmalara bazı örnekler verilebilir. Bu örnekler şöyledir;

Mikrobiyal olarak iyileştirilmiş petrol geri kazanımı (MEOR), biyosürfaktanların birçok kullanım alanlarından sadece bir tanesidir. MEOR, düşük enerji tüketimi, daha yüksek biyobozunurluk, düşük toksisite, ekonomik olarak daha verimli olma ve emülsifikasyon aktivitesi gibi özellikleri sayesinde geleneksel iyileştirilmiş petrol geri kazanımı (EOR) ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir (Siva ve ark., 2014; Speight ve ark., 2017). Bununla birlikte MEOR için kullanılacak biyosürfaktanların, yağ rezervuarlarının yüksek sıcaklık ve yüksek tuzluluk ortamına dayanabilmesi gerekir (Maya ve ark., 2020).

Biyosürfaktan içerisinde yer alan glikolipidler ve lipopeptidler MEOR için öne çıkan kimyasal sınıflardır. Özellikle yapılan çalışmalar lipopeptidlerin, yüzey ve ara yüzey gerilimini düşürmede daha etkili olduğunu göstermiştir (Getha ve ark., 2018).

Sürfaktin, *Bacillus subtilis*'in çeşitli suşları tarafından üretilen lipopeptid karakterinde olduğu bilinen en güçlü yüzey aktif maddedir (Wei ve ark., 2004; Yeh ve ark., 2005; Wei ve ark., 2005).

Sürfaktinler, sentetik yüzey aktif maddelere kıyasla daha düşük kritik misel konsantrasyonuna sahiptirler (Arima ve ark., 1963; Shaligram ve ark., 2010). Ayrıca sürfaktinlerin yüksek ısıya karşın dirençli olduğu bilinmektedir.

Al Bahry ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* suşu tarafından üretilen sürfaktinin yüksek tuzluluklarda (20 g/L NaCl) 100 ℃' ye kadar sıcaklıklarda stabil olduğunu gözlemlemiştir.

Sekonder bir metabolit olan sürfaktin, ilk olarak 1968 yılında et suyundan izole edilmiştir ve dört izomerden oluşur. Fibrin pıhtılaşmasının inhibitörü, hücre lizat maddesi olması da dahil pek çok fizyolojik aktiviteye sahiptir (Arima ve ark., 1968). Sürfaktin, 20 μM konsantrasyonda suyun yüzey gerilimini 72'den 27 mN m^{-1}'ye düşürür (Wei ve ark., 2004; Yeh ve ark., 2005; Wei ve ark., 2005). Sürfaktinin yüzey ve emülsifikasyon faaliyetleri, çevresel biyolojik iyileştirme, petrol geri kazanımı gibi uygulamalarda kullanılması yolunu açar ve sürfaktinin hidrokarbonların biyodegredasyonunu hızlandırdığı rapor edilmiştir (Muligan ve ark., 2005; Sen ve ark., 2008; Lai ve ark., 2009).

Nanji ve ark. (2019), *Bacillus subtilis*' in liyofilize özütünün iyileştirilmiş petrol geri kazanım (EOR) uygulamalalarındaki potansiyelini araştırmışlardır. Sürfaktin karışımını fermantasyon yoluyla üretmiş ve sıvı kromotografi, kütle spektrofoskobisi (LC-MS) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) teknikleriyle karakterize etmişlerdir. HPLC ve MALDI-TOF MS ile yaptıkları analizler sonucunda sürfaktin izomerlerinin varlığını gözlemlemişledir. Sürfaktinin ham petrol ile tuzlu su arasındaki yüzey gerilimini (IFT) düşürdüğünü, ham petrol için ağırlıkça %0.025 sürfaktin konsantrasyonu ile

0.056 mN m^{-1} IFT gözlemlendiğini, temas açısı ölçümlerine dayanarak sürfaktinin cam yüzeylerin ıslanılabilirliğinin neredeyse nötr ıslaktan ıslağa

değiştirebildiğini ve cam mikromodel deneyi ile ise sürfaktinin ham petrolü emülsifiye etme kabiliyetini rapor etmişlerdir.

Naya ve ark. (2020), Endonezya, Orta Java'daki Bledug Kuwu kraterlerinden topladıkları örneklerden çeşitli bakteriler izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakterilerden halofilik bir bakteri olan *Halomanas meridiana* BK-AB 4'ün hemoliz testinde kanlı agardaki kolonilerin çevresinde yeşilimsi renk oluşumu nedeniyle α-hemolitik olduklarını gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda Du Nouy halka yöntemini kullanarak ara yüzey gerilimini 0.014 dyne cm^{-1} olarak ölçmüşlerdir. Sonuç olarak *Halomanas meridiana* BK-AB 4'ün petrol geri kazanımı (MEOR) için uygun biyosürfaktan üretme kabiliyetine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2016) petrol ile kontamine olmuş topraklardan topladıkları örneklerden 37 adet bakteri izole etmişlerdir. İzole ettikleri bu bakterilerden yüzey gerilimini azaltması, emülsifikasyon indeksi, modifiye edilmiş drop collapse ve yağ yer değiştirme aktivitesini esas alarak seçtikleri en iyi 9 adet biyosürfaktan üreticisi belirlemişlerdir. FKOD36 nolu izolatın %66.7 emülsifikasyon indeksi, 3.7 mm yağ yer değiştirme aktivitesi ile yüzey geriliminde (35.15 dyne cm^{-1}) maksimum azalma gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu izolatı, kısmi 16S rRNA sekans analizi ile *Klebsellasp*. olarak tanılamışlardır. Elde ettikleri bu sonuçlar doğrultusunda *Klebsiella sp*. FKOD36'nın ham petrol ve birçok hidrokarbonla kirlenmiş bölgenin biyolojik ıslahında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Resende ve ark. (2017), deniz suyundan örnekler izole ettikleri bakterilerin farklı karbon kaynakları (glikoz, soyafulyesi yağı ve kullanılmış soya fasulyesi yağı) ve azot kaynakları (sodyum nitrat, potasyum nitrat, pepton, üre) deneyerek tarama testlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonrasında izolatların tanımlanmasını Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) kullanarak kütle spektrofotometresi ile yapmışlardır. İdentifikasyon sonrası *Bacillus* sp.'yi en iyi büyüme koşulları, büyüme süresi ve karıştırma hızında tekrar incelemişlerdir. Sonuç olarak motor yağı ile kirlenmiş toprağı içeren yıkama deneylerinde %90'dan daha yüksek geri kazanım oranları görüldüğünü bildirmişlerdir. Aynı zamanda

biyosürfaktanın deniz suyunda ham petrol damlacıklarının %74'ünü dağıtabildiğini ve bu sayede biyosürfaktanların endüstriyel işlemlerde gelecekteki uzaklaştırma testlerinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Supattra ve ark. (2016), tarım arazilerinden izole ettikleri *Gordonia westfalica* GY40 ve *Gordonia* spp. JC11 olarak tanıladıkları mikroorganizmalar için karbon kaynağı olarak gliserol, kitosan, substrat olarak ise %2 soya yağı kullanarak biyosürfaktan üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ürettikleri biyosürfaktanı Tayland kıyı bölgesi boyunca topladıkları petrol ile kontamine olmuş üç farklı deniz suyunun degredasyonu için test etmişlerdir. Altı günün sonunda deniz suyundaki 1 g/L^{-1} akaryakıtın %60 ile 70'inin degrede olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda *Gordonia westfalica* GY40 ve *Gordonia* spp. JC11 inoküle edildiğinde deniz sularındaki petrol sızıntılarını temizlemek için uygun olduklarını bildirmişlerdir.

Biyosürfaktanların ıslatıcı, köpürtücü, çözündürücü ve emülsüfiye edici olma özelliklerinin potansiyel kullanımları sebebiyle sadece çevre ve petrol endüstrisinin değil aynı zamanda kozmetik ve farmasötik endüstrilerinin de ilgisini çekmiştir ve bu alanda da çalışmalar mevcuttur. Birçok çalışma kozmetik formülasyonlarında kimyasal bazlı yüzey aktif cisimlerinin kullanılmasının cilt alerjisi ve tahriş riskine neden olduğunu rapor etmiştir (Bujak ve ark., 2015; Nitschke ve ark., 2007; Sil ve ark., 2017; Rodrigues ve ark., 2017). Son yıllarda biyosürfaktanların cilt bariyerinde bulunan seramidlere benzer yapıda olması nedeniyle nemlendirme özellikleri keşfedilmiştir (Kitawaga ve ark., 2011).

Ferreria ve ark. (2017), *Lactobacillus paracasei*'den elde ettikleri biyosürfaktnı uçucu yağlar ve doğal antioksidan özü içeren su içinde yağ emülsiyonlarında dengeleyici madde olarak kullanmış ve yüksek emülsiyonlaştırma kapasitesine sahip sodyum dodesil sülfat (SDS) ile karşılaştırmışlardır. Biyosürfaktan varlığında emülsiyon hacimlerinin maksimum yüzdede olduğunu (EV=%100) ve damlacık boyutlarının yaklaşık 199 nm olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca biyosürfaktanların ve emülsiyonlarının sitotoksisitesini fare fibroblast hücre çizgisini kullanarak değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda 5 g/L biyosürfaktan içeren çözeltiler

%97 oranında hücre çoğalma değerleri sunarken, 0.5 g/L SDS'in güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak biyosürfaktanların kozmetik formülasyonlarda yeni fırsatlar sunduğunu rapor etmişlerdir.

Biyosürfaktanlar; unlu mamüller ve dondurma formülasyonlarında kıvam arttırıcı, yağ çözündürücü, katı ve sıvı yağların pişirilmesi sırasında yağ dengeleyici ve sıçramaya karşı koruma maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Kosarik, 2001). Van ve ark. (2004), ramnolipid karakterdeki biyosürfaktanların ilave edilmesiyle hamur dokusunda, hacminde ve unlu mamüllerin korunmasında iyileşmeler olduğunu tespit etmişlerdir. *Enterobacter cloacae*'nin deniz suşundan izole edilen biyoemülsifiye ediciler, özellikle sitrik veya askorbik asit içeren ürünlerde asidik pH'da gösterdiği viskotize nedeniyle gıda endüstrisinde potansiyel viskozite arttırıcı ajan olarak tanımlanmıştır (Iyer ve ark., 2004).

Biyosürfaktanlar, ilginç bir biyolojik aktivite sergiler ve antikanser ilaçları olarak yararlı olabilir. Moleküller birçok bulaşıcı hastalığa karşı son derece uygun ilaç adayı olma yolunda ilerlemektedir. Biyosürfaktanlar, insan akciğer kanseri hücre hatlarına karşı anti-proliferatif (*in vitro*) aktiviteye ve seçilen patojenlere karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir (Karpaludi ve ark., 2018).

Karpaludi ve ark. (2018), *Actinobacter indicus* M6'dan izole ettikleri biyösürfaktanın suyun yüzey gerilimini 72.0'dan 39.8 mN m^{-1}'e düşüren bir biyosürfaktan izole etmişlerdir. Termofilik, halofitik ve asidofilik özelliklere sahip bu biyosürfaktan glikolipoprotein karakterinde olduğunu belirlemişlerdir. Ekstraksiyonu yapılan biyosürfaktanın A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerine anti-proliferatif etkisinin yanı sıra Metisilin direçli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesini de incelemişlerdir. Artan biyosürfaktan konsantrasyonu ve inkübasyon süreleri ile canlı kanser hücrelerinin yüzdesinde azalma tespit etmişlerdir. 200 mg/mL konsantrasyon ile elde edilen bu azalmanın, hücre proliferasyonunun G1 fazındaki inhibisyonundan kaynaklandığını bulmuşlardır.

Sümengen ve ark. (2016), toprak örneğinden izole ettikleri *Bacillus subtilis*'den alkali proteaz ve biyosürfaktan üretimini ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, alkali proteaz enzimini maksimum miktarda üretebilmek için enzim üretim ortamının optimizasyonunu sağlamışlardır. Maksimum alkali proteaz üretimi için en iyi karbon kaynağını %1 ekmek tozu, en iyi azot kaynağını %1 kazein olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, optimum pH 10.5, sıcaklık 37 ℃, çalkalama hızı 200 rpm, inokulum miktarı %5, inokulum yaşı 4 saat olarak saptamışlardır. Aynı zamanda *Bacillus subtilis*'den biyosürfaktan üretimi de çalışılmıştır. Hemolitik aktivitede *Bacillus subtilis* çok iyi hemoliz zonu göstermiş ve hemolitik zon çapı 3 cm'den büyük olduğu için tam hemoliz şeklinde değerlendirmişlerdir. Emülsifikasyon için en iyi substrat ksilen (%68) olarak belirlenmiş, pendant drop yöntemi ile biyosürfaktanın yüzey gerilimini 48.64 mN m^{-1} olarak tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, *Bacillus subtilis* alkali proteaz ve biyosürfaktanı sahip olduğu özelliklerden dolayı deterjan katkı maddesi olarak birlikte kullanılması ile yıkama verimliliğini geliştirdiğini rapor etmişlerdir.

Yılmaz ve ark. (2010), Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamülleri Fabrikası'ndan aldıkları atık su örneklerinden izole ettikleri organizmaların, biyosürfaktan üretme yeteneklerini ve peynir altı suyunun biyolojik kullanılabilirliğini çalışmak amacıyla identifikasyonunu yapmışlardır. İdentifikasyonu yapılan *Yarrowia lipolytica, Micrococcus luteus ve Burkholderia cepacia*'nın biyosürfaktan üretme yeteneklerini drop collapse testi ile tespit etmişleridir. Bu organizmalar tarafından sentezlenen biyosürfaktanları sırasıyla BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlayıp, izolatların MSM kültür ortamında ürettikleri biyosürfaktan miktarlarını fenol sülfirik asit yöntemiyle belirlemiş ve BS-I, BS-II, BS-III için sırasıyla 728, 827 ve 656 mg/L olarak bulmuşlardır. Biyosürfaktan madde üretimi koşullarını belirlemek amacıyla azot ve karbon kaynağı, pH, EDTA konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Biyosürfaktan üretiminde temel besiyeri olarak, önceden belirledikleri optimum koşullarda, peyniraltı suyu kullanmışlardır. İzolatları bu besiyerinde 10 gün boyunca 35 ℃'de inkübe etmiş sonrasında BS-I, BS-II, BS-III miktarlarını sırasıyla 946 mg/L, 992 mg/L ve 1115 mg/L olarak bildirmişlerdir. Peynir altı suyunun, biyosürfaktan

madde üretimi için uygun maliyetli mikrobiyal büyüme sağladığını ve sentetik biyosürfaktan üretim ortamına göre daha iyi bir substrat olduğunu rapor etmişlerdir.

Kahyaoğlu ve ark. (2006), şeker fabrikası atık maddesi olan melas ve şilempeyi karbon kaynağı olarak kullanıp *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen glikolipid karakterinde biyosürfaktan üretmeyi amaçlamışlardır. Çalışmaları için *Pseudomonas aeruginosa* 50071'i kullanmışlardır. *Pseudomonas aeruoginosa* 50071'den %5'lik melas ortamında 0.78 gr/L ramnolipid biyosürfaktan elde etmişler ve kimyasal oksijen yükünün %35 ile %45 aralığında azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonunda uygun maliyetle ve kolay elde edilebilir şeker fabrikası atık suyundan elde edilen melas ile ramnolipid biyosürfaktanı üretilebileceğini göstermişlerdir.

Özetlenmeye çalışıldığı gibi yurt içi ve yurt dışında mikroorganizmaların biyosürfaktan üretme kabiliyetlerine yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde biyosürfaktan üretimi yapan mikroorganizmalara ilişkin çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle, mevcut çalışmada bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlamak amacıyla Adıyaman ili çevresinde muhtemel ham petrol kirliliğinin olduğu toprak örnekleri toplanmıştır. İzole edilen bakterilerin biyosürfaktan üretme kapasitesi ve moleküler identifikasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri izolasyonunda kullanılan çevresel örnekler

Çevresel örnekler, Adıyaman il sınırları içerisinde bulunan petrol kuyularının çevresindeki ham petrol ile kontamine olmuş topraklardan toplanmıştır (Eylül, 2019). Toplanan örnekler, aseptik koşullarda laboratuvara getirilerek biyosürfaktan üretme yeteneğine sahip bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır. Toprak örneklerinin toplandığı lokasyonlar Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

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

Örnek No	Alındığı Yer	Konum
1	Adıyaman/Merkez	37°47′33″N 38°12′45″E
2	Adıyaman/Merkez	37°47′33″N 38°12′45″E
3	Adıyaman/Merkez	37°47′38″N 38°13′29″E
4	Adıyaman/Merkez	37°46′51″N 38°13′38″E
5	Adıyaman/Merkez	37°46′51″N 38°13′38″E
6	Adıyaman/Merkez	37°46′52″N 38°13′38″E

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

Luria-Bertani (LB) Broth

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

LB broth, genomik DNA'nın izolasyonunun gerçekleştirileceği bakteri hücrelerinin elde edilmesinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, izole edilen bakterilerin

gliserol stoklarının hazırlaması için %20 (v/v) oranında gliserol ilavesi yapılarak kullanılmıştır.

Nutrient Agar

Nutrient agar	20 g/L
Distile su	1000 mL

121 ℃ de 15 dakika otoklavda steril edilen nutrient agar izolatların izolasyonunda, saf kültürlerin elde edilesinde ve rutin ekimlerde kullanılmıştır.

Biyosürfaktan Üretim ortamı (MSM)

KH_2PO_4	0.14 g/L
K_2HPO_4	2.2 g/L
NaCl	10 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g/L
$FeSO_4.7H_2O$	0.04 g/L
Et ekstraktı	2 g/L
Soya yağı	1% (v/v)
Gliserol	100 mL
Distile su	900 mL

Saf kültürleri elde edilen bakteriyel izolatların biyosürfaktan üretme kabiliyetlerini belirlemek için kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler, kimyasallar, tamponlar, kitler

Çalışmada kullanılan kimyasallar analitik seviyede saflık göstermekte olup Sigma, Merck gibi tedarikçilerden temin edilmiştir. Farklı deney basamaklarında kullanılan soya yağı ise Abalıoğlu Yağ Sanayi ve Ticaret A.Ş. (İzmir)' den temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan diğer çözeltiler ve kullanım amaçları aşağıda belirtildiği gibidir.

Fizyolojik tuzlu su (FTS)

NaCl	8.5 g/L
Distile su	1000 mL

121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilen FTS çözeltisi aseptik koşullarda laboratuvara getirilen toprak örneklerinin tüp dilüsyon yöntemiyle seyreltilmesinde kullanılmıştır.

Kristal violet boyası

Kristal violet	2 g
Etanol (%95)	20 mL
Amonyum okzalat	0.8 g
Distile su	80 mL

Etanol içerisinde çözündürülmüş olan kristal violet boyasına distile suda çözündürülen amonyum okzalat ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu boya, bakteriyal izolatların Gram boyama ile mikroskobik karakterizasyonun yapılması için kullanılmıştır.

% 0.5'lik safranin boyası

Safranin	0.5 g
Distile su	100 mL

Gram boyama ile izolatların mikroskobik karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Gram iyodür (Lugol) çözeltisi

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

Gram boyama prosedüründe renk sabitleştirici olarak kullanılmıştır.

5X TAE Tamponu

Tris base	24.2 g/L
Glasiyal asetik asit	5.71 g/L
EDTA (0.5 M, pH: 8.0)	10 mL

750 mL Tris base distile suda çözündürülerek, diğer bileşenler eklenmiştir, toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştr. PCR ürünlerinin elektroforezinde tampon çözelti olarak ve agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Lizis tamponu

Tris-HCI	25 mM
EDTA	2.5 mM
Triton X-100	%1 (v/v)

Gram pozitif bakterilerin DNA izolasyonunda hücre çeperini parçalamak ve hücre lizatını hazırlamak için kullanılmıştır. Tampon çözeltiye 20 mg/mL lizozim eklenmiştir. Bakteri pelleti 200 µL lizis tamponu içerisinde süspanse edilmiştir.

Genomik DNA izolasyon kiti

Genomik DNA'ların saflaştırılmasında Pure Link genomik DNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılmıştır. Genomik DNA'ların izolasyonu kit içinde bulunan talimatlara göre gerçekleştirilmiştir.

16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve görüntülenmesinde kullanılan materyaller

- $MgCl_2$ (2.5 mM, Thermo Scientific)
- dNTP karışımı (10 mM, Thermo Scientific)
- Primerler (Invitrogen) 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
  1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
- TrueStart Hot Start Taq DNA polimeraz (500 Unit, Thermo Scientific)
- 6X DNA yükleme tamponu (Thermo Scientific)
- DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)
- SafeView Classic nükleik asit boyası (Applied Biological Materials)
- Agaroz (Sigma)

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar; steril kabin (Nüve MN-120), inkübatör (Nüve, EN-055), etüv (Nüve FN-120), otoklav (Nüve OT-90L), hassas terazi (Shimadzu AW320), çalkalamalı su banyoları (GFL 1086 ve Nüve ST-30), derin dondurucu (Nüve DF-490), santrifüj (Hettich Rotina 420R), mikrosantrifüj (Eppendorf 5415R), pH metre (Hanna HI-2210), vorteks (Daihan WiseMix VM-10), mikroskop

(Olympus), PCR cihazı (Veriti 96-well thermal cycler, Applied Biosystems), yatay elektroforez (Biorad), güç kaynağı (Biorad) ve görüntüleme cihazı (Major Science, SmartView Pro 1100 Imager)'dır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

6 farklı lokasyondan toprak örnekleri toplanarak aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Toprak örnekleri seyreltici olarak fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak seri dilüsyonu (10^{-1}-10^{-7}) hazırlanmıştır. Daha sonra 10^{-5}-10^{-7} aralığında seyreltilmiş örnekler petrilere aktarılmış ve üzerlerine yaklaşık 20 mL Nutrient Agar ilave edildikten sonra dökme plaka yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Petriler 37 ℃'de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda üreyen kolonilerin saf kültürlerinin elde edilmesi amacıyla ardışık olarak en az 3 defa pasajları yapılmıştır. Saflığından emin olunan kültürlerden bir miktar alınarak %20 gliserol (v/v) içeren LB besiyerine koyulmuş ve gliserol stokları hazırlanmıştır.

3.2.2. Bakterilerin biyosürfaktan üretimi açısından taranması

Bakteri izolatlarının biyosürfaktan üretme kabiliyetlerini belirlemek amacıyla bakteri kültürleri, %1'lik soya yağı içeren 30 mL'lik biyosürfaktan üretim ortamına (MSM) ekilmiştir. Fermantasyon, 5 gün boyunca 30 ℃'de 150 rpm'de çalkalamalı su banyosunda devam etmiştir. 5. günün sonunda fermantasyon sıvıları steril tüplere aktarılarak 4 ℃'de 4600 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda tüplerin dibine çöken hücre pelleti alınmadan fermantasyon sıvısının üst kısmı steril tüpe aktarılmıştır. Hücresiz fermantasyon sıvıları 4 ℃'de muhafaza edilerek daha sonra gerçekleştirilecek olan tarama testlerinde kullanılmıştır.

Biyosürfaktan üretme kabiliyetlerini belirlemek amacıyla oil displacement, drop collapse, parafilm M ve emülsifikasyon indeksi olmak üzere 4 farklı tarama testi uygulanmıştır.

3.2.2.1. Oil displacement (Yağ yer değiştirme) denemesi

Morikawa ve ark., (2000) tarafından geliştirilen yağ yer değiştirme denemesi kısmen değişirtirilerek uygulanmıştır. Petri kaplarına 40 mL saf su koyulmuş ve her bir petri için 3 mL kullanılmış motor yağı ilave edilerek ince bir film tabakası oluşturulmuştur. Petrilere 500 µL hücresiz fermantasyon sıvılarından eklenerek meydana gelen açılmalar gözlemlenmiş ve 2 dakika sonunda meydana gelen zon çapları ölçülmüştür. MSM besiyeri ile distile su negatif kontrol olarak, %1'lik SDS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2.2. Drop collapse denemesi

Youssef ve ark., (2004) ile Plaza ve ark. (2006) tarafından kullanılan drop collapse denemesi kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakalara 20 µL kullanılmış motor yağı transfer edilerek 24 saat oda sıcaklığında denge haline gelmesi beklenmiştir. Daha sonra motor yağı ile oluşturulan yağ filminin yüzeyinin merkezine 20 µL hücreleri uzaklaştırılmış fermantasyon sıvısından eklenmiştir ve 1 dakika belenerek fermantasyon sıvısının oluşturduğu damlacık boyutu ölçülmüştür. Biyosürfaktan içeren hücresiz kültür ortamları yağ damlaları üzerinde yayılma özelliği gösterirken, biyosürfaktan içermeyen hücresiz kültür ortamları ise kullanılmış motor yağı üzerinde yayılmamıştır. Damlacığın çapı negatif kontrol olarak kullanılan MSM besiyeri ile distile suyun oluşturduğu çaptan büyük ise sonuç pozitif kabul edilmiştir. Ayrıca %1'lik SDS (w/v) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2.3. Parafilm M testi

25 µL hücresiz kültür ortamı parafilm M'nin hidrofobik yüzeyine damlatılmıştır. Bir dakikanın sonunda damlacık çapları ölçülmüştür. MSM besiyeri ve distile su negatif kontrol, %1'lik SDS (w/v) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2.4. Emülsifikasyon indeksi (E_{24})'nin belirlenmesi

İlk olarak Iqbal ve ark. (1995) tarafından gerçekleştirilen bu yöntem, biyosürfaktan içeren hücresiz kültür sıvılarının çeşitli hidrofobik bileşikler ile emülsiyon oluşturma kabiliyetine dayanmaktadır. 2 mL hidrofobik substrat içeren deney tüplerine oda sıcaklığındaki hücresiz kültür sıvılarından 2 mL eklenmiş ve daha sonra 2 dakika süreyle yüksek hızda vorteks yapılmıştır. Denemede kullanılan hidrofobik substratlar ksilen, kerosen, benzen'dir. Pozitif kontrol olarak 1% (w/v) SDS, negatif kontrol olarak ise distile su ve MSM besiyeri kullanılmıştır. Tüpler 24 saat sarsılmadan dikey bir şekilde oda sıcaklığında bırakılmıştır ve bu sürenin sonunda E_{24} değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{E24} = \frac{\text{Emülsifiye olan fazın yüksekliği (mm)}}{\text{Sıvı kolonun toplam yüksekliği (mm)}} \text{ x } 100$$

3.2.3. Biyosürfaktan üretimi pozitif olan izolatların moleküler tanılaması

3.2.3.1. Genomik DNA'nın izolasyonu ve görüntülenmesi

Bakteriyal izolatlardan farklı tarama testlerinde en iyi sonuçları verenler seçilmiştir. Seçilen izolatların genomik DNA'sını saflaştırmak için LB besiyerine izolatlar ekilmiştir. 24 saat boyunca 37 ℃'de 160 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücre kültürü eppendorf tüplere aktarılarak 12000 rpm'de 25 ℃'de santrifüj yapılarak hücre pelleti elde edilmiştir. Gram pozitif izolatların gDNA izolasyonu için Pure Link gDNA kiti kullanım talimatları uygulanmıştır.

Bu talimatlar şu şekildedir;

- 200 µL lizis tamponu ve lizozim karışımı hücre pelletiyle birlikte flash vortex ile karıştırılmıştır. 37 ℃'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

- 20 µL proteinaz K eklenerek tekrar flaş vortex yapılmıştır. Gram negatif bakterilerin gDNA izolasyonu için bu basamaktan başlayarak protokol uygulanmıştır.
- 200 µL Pure Link genomik lizis/buffer eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 55 ℃'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve daha sonra oluşan hücre lizatına 200 µL saf etanol ilavesi yapılmıştır. 5 saniye vortekslenerek homojen bir karışım elde edilmiştir.
- Pure Link spin kolonu bir toplama tüpüne yerleştirilerek etanol içerikli lizat karışımı kolona transfer edilmiştir.
- Kolon 10400 rpm'de santrifüj edilmiş ve tekrar temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Etanol ilavesi yapılmış Wash Buffer I'den 500 µL kolona transfer edilerek 10400 rpm'de santrifüj edilerek bir dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece DNA'nın ilk yıkama basamağı gerçekleştirilmiştir.
- Spin kolon temiz bir toplama tüpüne alınmış ve yine kit içinde bulunan etanol ilaveli Wash Buffer II'den 500 µL transfer edilerek 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece ikinci yıkama işlemi gerçekleştirilerek safsızlıklar uzaklaştırılmıştır.
- Spin kolon steril eppendorf tüpüne alınarak 75 µL Pure Link genomik Elüsyon Buffer solüsyonu ilave edilmiştir. Genomik DNA'nın elüsyon tamponuna geçmesi için 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
- Son basamak olarak 13000 rpm'de 25 ℃'de 2 dakika süreyle santrifüj yapılmış ve gDNA'ların kolondan geri kazanımı sağlamıştır.
- Ürün varlığını saptamak için hazırlanan %1'lik agaroz jelle saflaştılan gDNA örneklerinden 3 µL yüklenerek 50 dk boyunca 90 volt akım uygulanmıştır. DNA'yı görünür hale getirmek için agaroz jele SafeView Classic nükleik asit boyası (Applied Biological Materials, USA) ilave edilmiştir. gDNA örneklerinin varlığı görüntüleme cihazı (Major Science, SmartView Pro 1100 Imager) ile tespit edilmiştir.

3.2.3.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Biyosürfaktan üretme kabiliyeti bulunan bakteriyal izolatların moleküler identifikasyonu için ilk olarak prokaryotik canlılarda tanılayıcı olan 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Primer olarak universal primer çifti olan; 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer çifti kullanılmıştır.

PCR bileşenleri ise aşağıdaki miktar ve konsantrasyonlarda dahil edilmiştir.

PCR KARIŞIMI	100 µL
dNTP Mix (10 mM for each)	2 µL
$MgCl_2$ (25 mM; 2 mM final konsantrasyon)	8 µL
10X Truestart Hot Start Buffer	10 µL
27F (2 pmol/µL)	10 µL
1492R (2 pmol/µL)	10 µL
Taq Polimeraz	0.8 µL
Genomik DNA (kalıp)	12 µL
(Her örnek için 3 µL)	
Ultra saf su (steril)	47.2 µL

Her izolat için toplam hacim 25 µL olacak şekilde PCR gerçekleştirilmiş ve toplam miktar saf su ile 100 µL' ye tamamlanmıştır. Sıcak başlangıç yapan TrueStart Hot Start Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilen amplifikasyon işlemi için optimize edilmiş PCR koşulları şöyledir;

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

Primerler ile çoğaltılması hedeflenen ~1500 bp uzunluğundaki 16S rDNA bölgesine ait PCR ürünlerinin sentezleni teyit etmek için mikropipet ile her PCR tüpünden alınan 3 µL örnek %2'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenme işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.3.3. PCR ürünlerinin elektroforezle görüntülenmesi

PCR ürünlerinin elektroforezde görüntülenmesi için agaroz jel 1X TAE'de mikro dalga yardımıyla çözündürülmüştür. 100 mL jel karışımı için 4 µL SafeView classic ilave edilerek homojenizasyon sağlanmıştır. Agaroz jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel tablasına dökülerek kuyucuk oluşması için taraklar yerleştirilmiştir. Katılaşan agaroz jel, elektroforez tankına transfer edilmiştir. Üzeri 1X TAE tampon çözeltisiyle kaplanacak şekilde doldurulmuştur. 3 µL PCR ürünü ile 3 µL 6X yükleme tamponu homojenize edilerek kuyucuklara ayrı ayrı yükleme yapılmıştır. Örnek boyutlarının belirlenmesi için DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) da bir kuyucuğa yüklenir. Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra 90 voltta 40 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir. Major Science görüntüleme cihazında agaroz jel görüntülenmiş ve PCR ürünlerinin varlığı doğrulanmıştır.

3.2.3.4. 16S rDNA bölgesinin sekans analizi

PCR ile çoğaltılan bakteriyal izolatların 16S rDNA bölgelerinin sekans analizlerinin yapılması amacıyla, örnekler MeDSanTek laboratuvarına gönderilmiştir. Dizi analizi, Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir bakteriyal izolatın 16S rDNA bölgesi için elde edilen çift yönlü sekans sonuçlarının montajı ve doğruluğu, MEGA7.0 (Kumar ve ark., 2016) ile teyit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

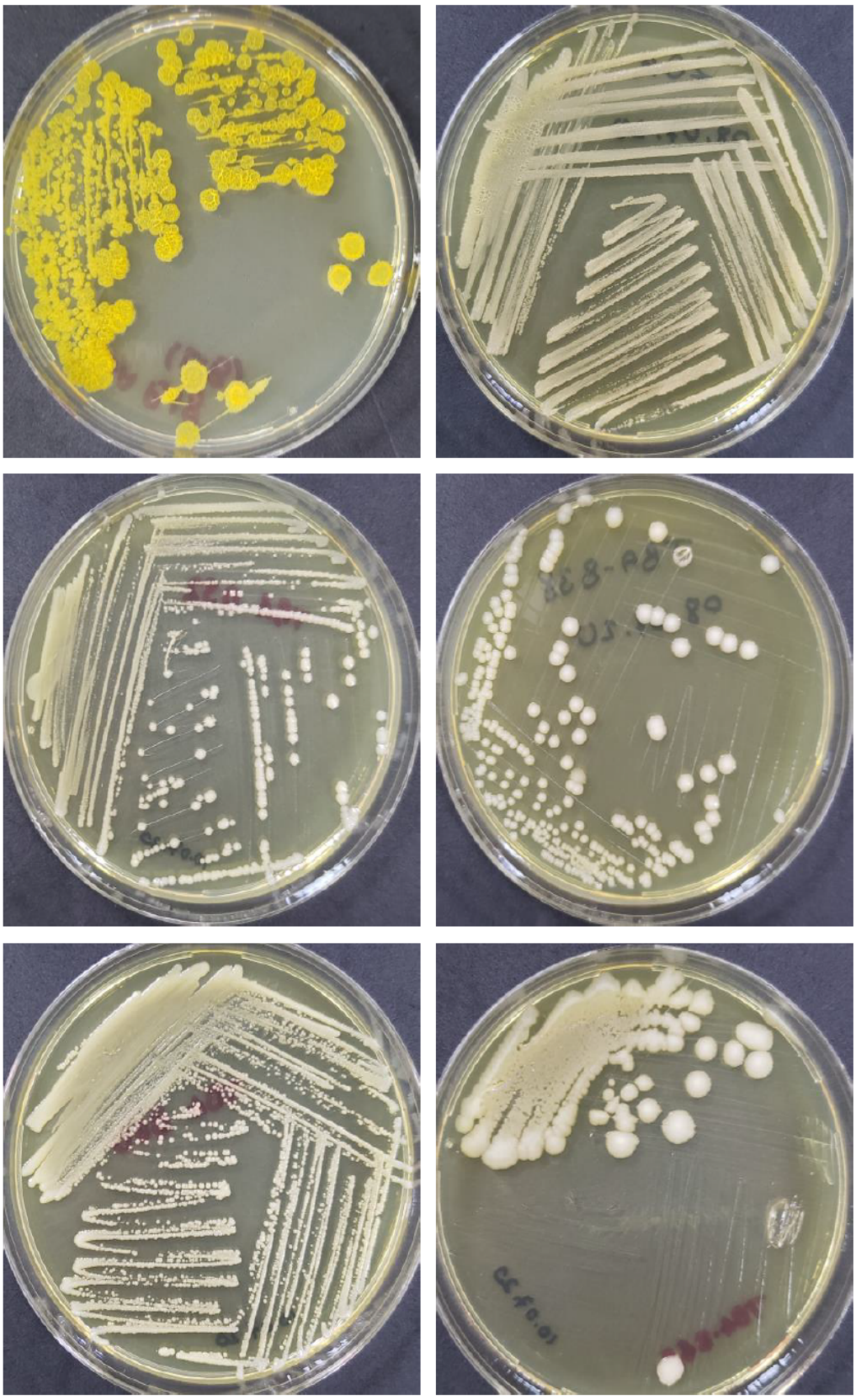
4.1. Bakteriyal izolatların izolasyonu

Ham petrol ve türevleri, karasal ve sucul ekosistemleri olumsuz etkileyen sayısız kirleticiler arasında önemli bir yere sahiptir (Okoh and Trejo-Hernandez, 2006). Petrole bağımlı enerji üretimi dolayısıyla petrol transportu sırasında toksik bileşenlerin çevreye saçılması kaçınılmaz bir sonuçtur. Parçalanması yada toksik olmayan forma dönüşümü uzun yıllar alan bu kirleticilerin saçılmaları, hem denizel hem de karasal canlılar üzerinde zararlı etkiler oluşturmaktadır (Martínez-Palouve ark., 2013).

Yüzey aktif madde üreten mikroorganizmaların kontamine çevrelerdeki basit şekerler, petrol ve hidrokarbonları kullanma yeteneğinde olduğu bilinmektedir. Ürettikleri yüzey aktif maddelerle, sıvı-sıvı yada katı-sıvı arasındaki yüzey gerilimini düşürerek söz konusu organik kirleticilerin de biyomevcudiyetini artırarak biyodegradasyonuna yardımcı olmaktadırlar. Literatürde petrol kontaminasyonunun olduğu bölgelerden izole edilen ve gelecek vaad eden çok çeşitli mikroorganizmalar identifiye edilmiştir (Nwaguma ve ark., 2016; Talukdar ve ark., 2016; Yadav ve ark., 2016; Batool ve ark., 2017; Kaur ve ark., 2017; Batool ve ark., 2017; Yalçın ve ark., 2018; Sun ve ark., 2018; Derguine-Mecheri ve ark., 2018;). Bu sebeple, ham petrol ile kontaminasyonun olduğu örneklerinden biyosürfaktan üretme yeteneğine sahip bakterilerin izolasyonunu ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla Adıyaman ilinde bulunan petrol kuyuları çevresinden toprak örnekleri toplanmıştır. Fizyolojik tuzlu suda seyreltilen örnekler dökme plaka yöntemi ile ekilmiş ve inkübasyon sonucunda farklı tekstüre sahip olduğu belirlenen bakteri izolatları seçilmiştir. En az 3 defa pasajlamak suretiyle toplamda 71 bakteri izolatı elde edilmiş ve daha sonraki çalışmalar için gliserol stokları hazırlanmıştır. Şekil 4.1'de bu izolatlardan bazılarına ait genel koloni görünümü verilmiştir.

İzole edilen bakterilerin en iyi biyosürfaktan üretim kapasitesini belirlemek amacıyla çeşitli hidrokarbon ve azot kaynakları kullanılarak, rastgele seçilen izolatlar ön tarama testlerine (oil displacement test ve emülsifikasyon indeksi) tabi tutulmuştur.

Biyosürfaktan üretim ortamının gerçekleşmesi için hazırlanan %1 soya yağı ilave edilmiş mineral besiyeri için karbon kaynağı olarak gliserol ve gliserol+D-glukoz olmak üzere 2 farklı karbon kaynağı denenmiştir. Ayrıca azot kaynağı olarak et ekstraktı ve maya ekstraktı denenmiştir. Yapılan tarama testleri sonucunda karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak ise et ekstraktının kullanılmasına karar verilmiştir.



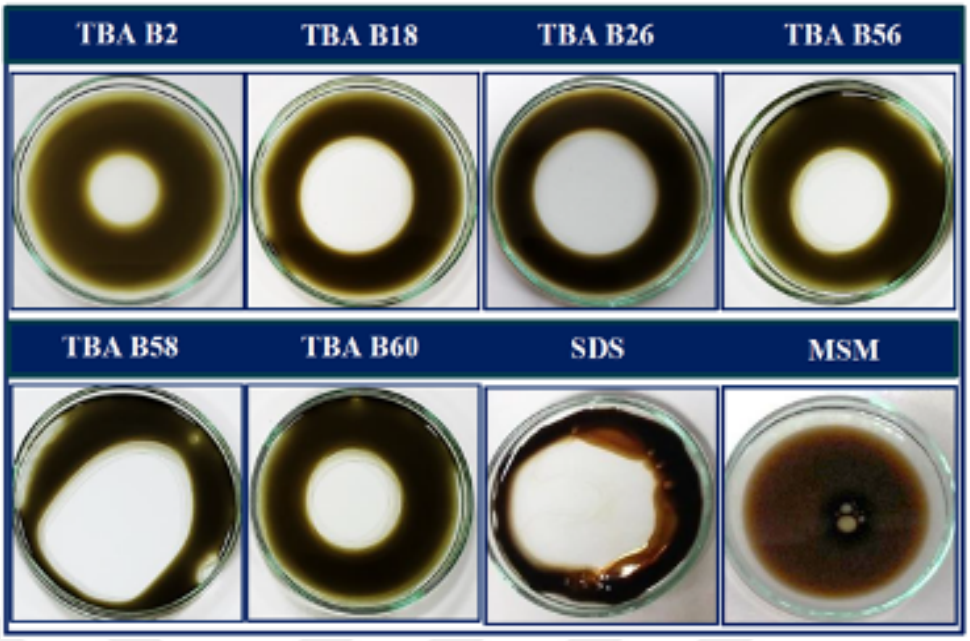
Şekil 4.1. Bakteriyal izolatlardan bazılarına (TBA B18, TBA B29, TBA B32, TBA B38, TBA B60, TBA B62) ait saf kültürlerin Nutrient agar petrilerindeki genel görünüşleri

4.2. Tarama testleri ile biyosürfaktan üretiminin belirlenmesi

Biyosürfaktan üretiminin belirlenmesinde kullanılan sayısız çeşitli kalitatif ve kantitatif tarama testleri bulunmaktadır. Bunlardan sıklıkla kullanılanlar arasında oil displacement (yağ yer değiştirme) testi, parafilm M, drop collapse, hemoliz testi, CTAB-blue agar yöntemi, lipolitik aktivite ve hemolitik aktivitenin belirlenmesi şeklinde sıralanabilmektedir. Ancak, her test ile ilgili sınırlamalar dolayısıyla biyosürfaktan üretiminin belirlenmesinde birden fazla tarama testi uygulamak daha avantajlıdır (Walter ve ark., 2010; Sidkey ve ark., 2016). O nedenle bu çalışmada birden fazla testi kullanmak suretiyle bakteriyal izolatlar tarafından biyosürfaktan/biyoemülsifiye edicilerin üretiminin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

4.2.1. Oil displacement (Yağ yer değiştirme) testi

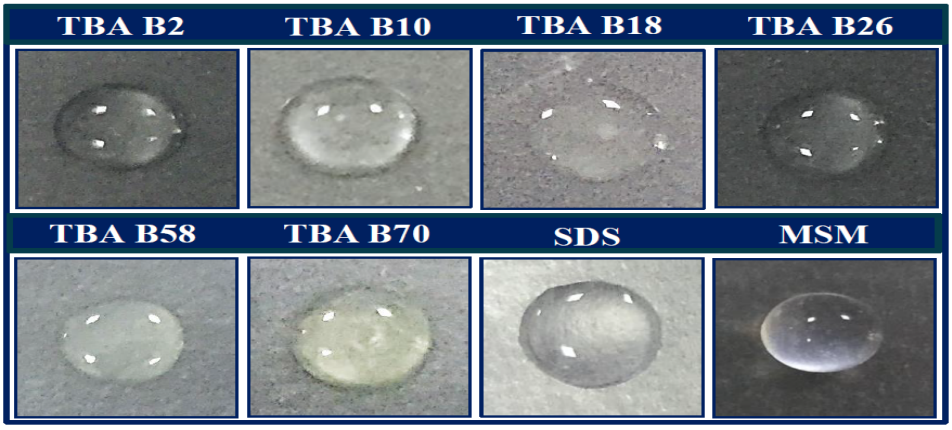
Bu yöntem Morikawa ve ark. (2000) tarafından geliştirilmiştir. Yağ yer değiştirme testi hızlı ve yüzey aktif bileşiklerin tespitinde yaygın olarak kullanılan hassas bir tarama testidir. (Satpute ve ark., 2008; Walter ve ark., 2010). Bu test hücresiz kültür ortamında biyosürfaktan varlığını ve etkinliğini test etmek amacıyla yapılmıştır. Petri kaplarına aktarılan distile su yüzeyinde yağ tabakası oluşurulmuş ve test solüsyonu uygulamasıyla meydana gelen açılma zonları ölçülmüştür. Aynı zamanda dairenin alan formülü de kullanılarak açılmanın olduğu yağ yer değiştirme alanı (Oil Displacement Area: ODA) da hesaplanarak elde edilen sonuçlar arasında kantitatif kıyaslama apılmıştır. 71 adet bakteri izolatı için bu değerlerin 0.79 ile 33.18 cm^2 arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En yüksek yağ yer değiştirme çapı (6.5 cm) ve alanı (33.18 cm^2) izolat TBA B58 için elde edilmiştir. 20 cm^2 ve üzeri yağ yer değiştirme alanına sahip izolatlar ise TBA B26 ve TBA B18 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Bazı bakteriyal izolatların hücresiz kültür ortamlarıyla elde dilen yağ yerdeğiştirme alanları

4.2.2. Parafilm M testi

25 µL fermantasyon sıvısı kullanılarak hidrofobik bir yüzey olan parafilm M üzerinde oluşan damlacık çapının değerlendirildiği bu teste ait bazı sonuçlar Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.3. Bazı izolatların hücresiz kültür ortamlarıyla elde edilen parafilm M test sonuçları

Damlacık çapları için ölçülen değerler skorlama yapılarak (4mm < R : - , 4mm ≤ R ≤ 4.9 mm: + , 5mm ≤ R ≤ 5.9 mm: ++, 6mm ≤ R ≤ 6.9 mm:+++) Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yapılan skorlama sonucunda en yüksek izolat TBA B18 nolu izolat olmuştur. TBA B18 nolu izolatın yağ yer değiştirme alanı ise 20.48 cm^2'dir. Sonuç olarak parafilm M testi ve yağ yer değiştirme testlerinin sonuçlarıyla uyumluluk göstermiştir.

Çizelge 4.1. Bakteriyal izolatlara ilişkin yağ yer değiştirme denemesi ve parafilm M testi sonuçları

İzolat no	Yağ yer değiştirme denemesi		Parafilm M testi
	Yağ yer değiştirme çapı (R, mm)	Yağ yer değiştirme alanı (cm^2)	Damlacık çapı (R, mm)
TBA B1	10	0.79	++
TBA B2	33	8.55	++
TBA B3	4	0.13	++
TBA B4	8	0.5	++
TBA B5	9	0.64	++
TBA B6	13	1.33	++
TBA B7	7	0.38	+++
TBA B8	3	0.07	+
TBA B9	11	0.95	+++
TBA B10	13	1.33	++
TBA B11	8	0.5	++
TBA B12	4	0.13	++
TBA B13	5	0.2	++
TBA B14	14	1.54	++
TBA B15	13	1.33	++
TBA B16	17	2.27	++
TBA B17	18	2.54	++
TBA B18	51	20.43	+++
TBA B19	5	0.2	++
TBA B20	4	0.13	++
TBA B21	12	1.13	++
TBA B22	15	1.77	++
TBA B23	7	0.38	++
TBA B24	7	0.38	++
TBA B25	12	1.13	++
TBA B26	52	21.24	++
TBA B27	5	0.2	++
TBA B28	12	1.13	++
TBA B29	12	1.13	++
TBA B30	7	0.38	++
TBA B31	7	0.38	+
TBA B32	34	9.08	+
TBA B33	5	0.2	++
TBA B34	7	0.38	++
TBA B35	12	1.13	++
TBA B36	9	0.64	++
TBA B37	30	7.07	++
TBA B38	25	4.91	++

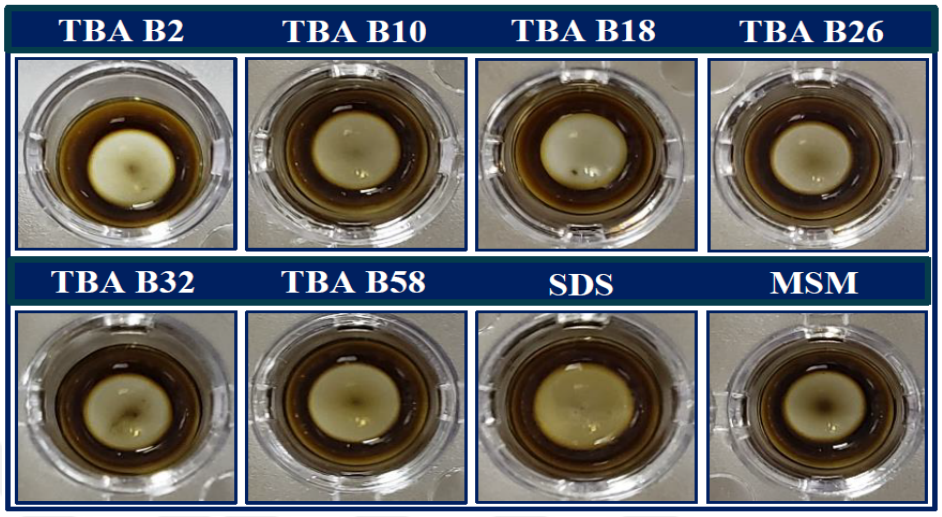
Çizelge 4.1. **(devam)**

TBA B39	12	1.13	++
TBA B40	5	0.2	++
TBA B41	9	0.64	++
TBA B42	5	0.2	++
TBA B43	10	0.79	++
TBA B44	10	0.79	++
TBA B45	10	0.79	++
TBA B46	15	1.77	++
TBA B47	5	0.2	++
TBA B48	5	0.2	++
TBA B49	5	0.2	++
TBA B50	19	2.84	++
TBA B51	7	0.38	++
TBA B52	10	0.79	++
TBA B53	10	0.79	++
TBA B54	35	9.62	++
TBA B55	22	3.8	++
TBA B56	37	10.75	++
TBA B57	10	0.79	+++
TBA B58	65	33.18	+++
TBA B59	10	0.79	++
TBA B60	37	10.75	++
TBA B61	8	0.5	++
TBA B62	22	3.8	++
TBA B63	11	0.95	++
TBA B64	12	1.13	++
TBA B65	11	0.95	++
TBA B66	20	3.14	++
TBA B67	12	1.13	++
TBA B68	9	0.64	++
TBA B69	14	1.54	+
TBA B70	10	0.79	+++
TBA B71	14	1.54	++
SDS	70	38.48	++
MSM	4	0.13	-
DW	5	0.2	-

4.2.3. Drop collapse testi

Drop collapse testi, biyosürfaktan varlığını test etmek için küçük hacimde hücresiz kültür sıvısı gerektiren hassas ve kolay bir yöntemdir (Thavasi ve ark., 2011). Kuyucuklarda denge haline getirilmiş hidrofobik substrat üzerine hücresiz kültür süpernatantından transfer edilip damlacığın yüzeydeki yayılma özelliğinin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Süpernatant biyosürfaktan içeriyorsa polar su molekülleri hidrofobik yüzeyden itilir ve damlalar sabit kalır. Süpernatant aktif biyomolekül içeriyorsa damla yayılır veya dibe çöker. Çünkü hidrofobik yüzey

arasındaki ara yüzey gerilimi azalır (Walter ve ark., 2010). Bu çalışmada, distile su ve MSM ortamı negatif kontrol olarak SDS pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Bazı hücresiz kültür ortamları ile pozitif ve negatif kontroller için elde edilen drop collapse test sonuçları

Sonuçlar kısmen veya tamamen yayılmayı temsil edecek şekilde (R≤3 mm:-, 3mm< R ≤ 3.5 mm:+, 3.5 mm<R≤4 mm:++, R > 4 mm:+++) skorlanmıştır. Negatif kontroller ve yayılma göstermeyen örnekler (R≤3 mm:-) olarak skorlanmıştır. Bu test sonucuna göre bakteriyal izolatlardan 69 tanesi pozitif sonuç verirken, 3 tanesi negatif sonuç vermiştir. TBA B2, TBA B10, TBA B18, TBA B26, TBA B32 ve TBA B58 nolu izolatlar (++, +++) skor ile en yüksek sonuçları vermişlerdir.

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

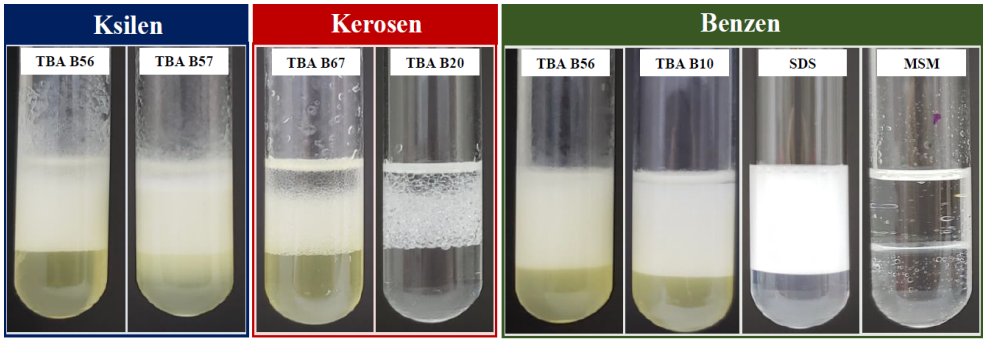
İzolat no	Damlacık çapı	İzolat no	Damlacık çapı
TBA B1	+	**TBA B37**	++
TBA B2	++	**TBA B38**	+
TBA B3	++	**TBA B39**	+
TBA B4	++	**TBA B40**	++
TBA B5	+	**TBA B41**	+
TBA B6	+	**TBA B42**	+
TBA B7	++	**TBA B43**	+
TBA B8	+	**TBA B44**	+
TBA B9	+	**TBA B45**	+
TBA B10	+	**TBA B46**	-
TBA B11	+	**TBA B47**	-
TBA B12	+	**TBA B48**	++
TBA B13	+	**TBA B49**	+
TBA B14	+	**TBA B50**	+
TBA B15	+	**TBA B51**	++
TBA B16	-	**TBA B52**	+
TBA B17	+	**TBA B53**	+
TBA B18	++	**TBA B54**	+
TBA B19	+	**TBA B55**	+
TBA B20	+	**TBA B56**	+
TBA B21	+	**TBA B57**	+
TBA B22	+	**TBA B58**	+++
TBA B23	+	**TBA B59**	+
TBA B24	+	**TBA B60**	+
TBA B25	+	**TBA B61**	+
TBA B26	+	**TBA B62**	+
TBA B27	+	**TBA B63**	+
TBA B28	+	**TBA B64**	+
TBA B29	++	**TBA B65**	+
TBA B30	+	**TBA B66**	+
TBA B31	+	**TBA B67**	++
TBA B32	++	**TBA B68**	+
TBA B33	+	**TBA B69**	+
TBA B34	+	**TBA B70**	++
TBA B35	++	**TBA B71**	++
TBA B36	+	**SDS**	+++
MSM	-	**DW**	-

4.2.4. Emülsifikasyon indeksinin belirlenmesi

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfaktanlar hava-su gibi ara yüzeylerdeki yüzey gerilimini azaltanlar (biyosürfaktan) ve birbirine karışmayan sıvılar arasında katı-sıvı ara yüzeyindeki yüzey gerilimini azaltanlar (biyoemülsifiye ediciler) olmak üzere iki çeşittir (Karanth ve ark., 1999). Biyoemülsifiye ediciler, çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük konsantrasyonda su içinde yağ emülsiyonlarını verimli bir şekilde stabilize eden yüksek ağırlıklı biyopolimerlerdir (Uzoig ve ark., 2015).

Biyosürfaktanlar ve biyoemülsifiye ediciler özellikle petrol endüstrisinde biyoremediasyon teknolojileri için, kuyudan petrol geri kazanımını arttırmak, ağır petrol viskozitesini azaltmak, petrol depolama tanklarını temizlemek, boru hatlarında akışı arttırmak ve akaryakıt-su-yağ emülsiyonlarını stabilize etmek için kullanılabilir (Ghurye ve ark., 1994; Makkar ve ark., 1997; Bognolo ve ark., 1998). Biyoemülsifiye edicilerin potansiyel avantajlarına rağmen, yüksek saflaştırma maliyetleri ve düşük ürün eldesi pratikte uygulanmalarını engellemektedir. Bu sorunları çözmek için birçok araştırmacı düşük konsantrasyonlarda kullanılabilen daha verimli biyoemülsifiye edicileri üretme ve kullanma konusunda çalışmalar yapmaktadır (Tao ve ark., 2019).

Bu çalışmada, biyosürfaktanların hidrokarbonları emülsifiye etme yetenekleri toksik çevresel kirleticilerden olan ksilen, kerosen ve benzen hidrokarbonlarına karşı emülsifikasyon indekslerinin belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Eşit miktarda hidrofobik hidrokarbon ve hücresiz biyosürfaktan üretim ortamının vorteklenmesi ile oluşan emülsifikasyon tabakasının 24 saat sonraki görünümleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Bazı bakteriyal izolatların ürettiği ham biyosürfaktan içeren hücresiz kültür ortamlarının ksilen, kerosen ve benzene ile oluşturdukları emülsiyonlar

Kullanılan hidrokarbon kaynaklarından ksilen için E_{24} değeri en yüksek sonucu veren izolatlar; TBA B56 (%57), TBA B17 (%50) ve TBA B57 (%50)' dir. Kerosene karşı en iyi emülsifiye etme kapasitesi TBA B20 (%41) ve TBA B67 (%39) izolatları için hesaplanmıştır. Benzen ile en yüksek emülsifikasyonu veren izolatlar ise TBA B38 (%65), TBA B56 (%65) ve TBA B62 (%61), TBA B10 (%60), TBA B37 (%59) olarak kaydedilmiştir.

Moleküler karakterizasyonu yapılarak *Bacillus sp'*.ye ait olduğu belirlenen TBA B38 (%65), TBA B56 (%65) ve TBA B62 (%61) nolu izolatlar benzen hidrokarbonunda en yüksek sonuçları vermişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olacak şekilde Zhi ve ark., (2010), *Bacillus sp* olarak tanıladıkları suşların biyoemülsifikasyon yüzdelerini hesaplamak için altı farklı karbon kaynağı kullandıkları çalışmalarında en yüksek emülsifikasyon indeksini (%70) benzene karşı olduğunu rapor etmişlerdir.

71 adet bakteri izolatının tamamının emülsifikasyon yetenekleri taranmış ve ksilen için emülsifikasyon indeksinin %0 (TBA B58) ile %57 (TBA B56) aralığında olduğu, kerosen için emülsifikasyon indeksinin %0 (TBA B6) ile %41 (TBA B20, TBA B34) aralığında olduğu belirlenmiştir. Denenen hidrofobik karakterdeki hidrokarbonlar arasında en yüksek sonuçların elde edildiği benzen için ise emülsifikasyon indesklerinin %0 (TBA B36) ile %65 (TBA B56) aralığında olduğu belirlenmiştir. Yağ yer değiştirme denemesinde en yüksek sonucu veren TBA B58

(33.18 cm^2) nolu izolat denenen hidrokarbon kaynaklarında neredeyse hiç aktivite göstermemiştir.

Çizelge 4.5. Biyosürfaktan içeren hücresiz fermentasyon sıvılarının farklı hirdokarbonlar üzerindeki emülsifikasyon indeksileri

İzolat no	Emülsifikasyon İndeksleri (E_{24})		
	Ksilen	Kerosen	Benzen
TBA B1	37	10	13
TBA B2	43	37	48
TBA B3	14	10	25
TBA B4	30	0	24
TBA B5	0	0	25
TBA B6	33	13	40
TBA B7	0	0	39
TBA B8	21	0	31
TBA B9	31	10	20
TBA B10	7	17	60
TBA B11	20	0	13
TBA B12	11	0	35
TBA B13	34	13	38
TBA B14	33	20	48
TBA B15	43	0	54
TBA B16	41	30	36
TBA B17	50	37	55
TBA B18	47	33	50
TBA B19	30	23	14
TBA B20	40	41	55
TBA B21	7	17	36
TBA B22	33	17	0
TBA B23	30	10	47
TBA B24	28	0	36
TBA B25	30	20	39
TBA B26	27	33	50
TBA B27	40	13	24
TBA B28	30	13	34
TBA B29	13	13	34
TBA B30	17	0	28
TBA B31	33	13	40
TBA B32	50	0	45
TBA B33	33	0	31
TBA B34	47	41	54
TBA B35	45	40	61
TBA B36	17	10	0
TBA B37	27	20	59
TBA B38	40	27	45
TBA B39	40	20	52
TBA B40	33	20	41
TBA B41	27	0	59
TBA B42	33	33	48
TBA B43	33	20	41
TBA B44	34	13	34
TBA B45	37	0	57

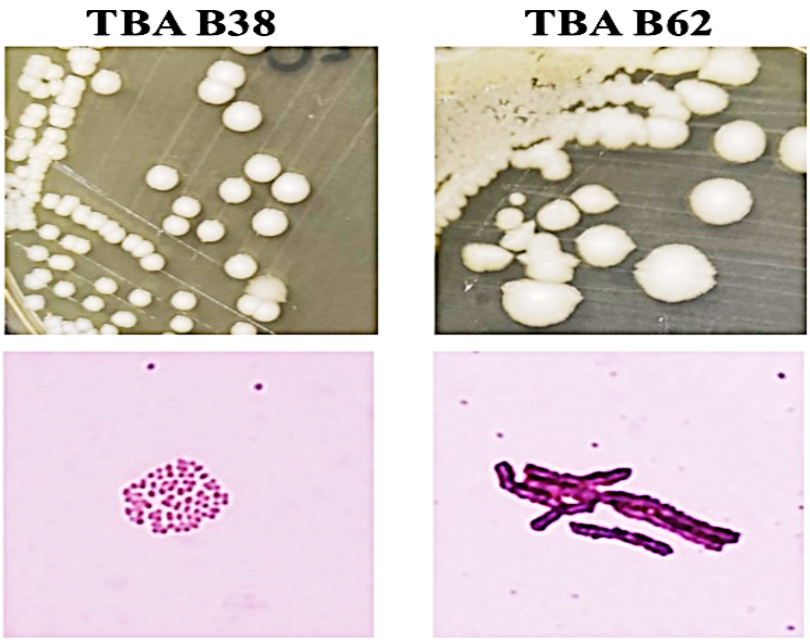
Çizelge 4.5. (**devam**)

TBA B46	33	17	45
TBA B47	27	17	17
TBA B48	33	20	38
TBA B49	30	23	24
TBA B50	33	0	52
TBA B51	20	10	35
TBA B52	33	10	43
TBA B53	43	37	40
TBA B54	37	10	57
TBA B55	31	13	42
TBA B56	57	14	65
TBA B57	50	23	59
TBA B58	0	0	14
TBA B59	0	0	0
TBA B60	40	0	53
TBA B61	41	13	48
TBA B62	47	17	61
TBA B63	40	0	50
TBA B64	47	10	45
TBA B65	31	0	34
TBA B66	33	10	41
TBA B67	47	39	46
TBA B68	40	17	44
TBA B69	40	27	30
TBA B70	43	33	45
TBA B71	48	37	45
SDS	63	63	63
MSM	0	0	0

4.3. Biyosürfaktan Üreten Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu

4.3.1. Kültürel ve makroskobik karakterizasyon

Yapılan tarama testleri sonucunda en yüksek aktiviteyi sergileyen ve emülsiyon kapasitesine sahip olan 13 bakteriyal izolat (TBA B2, TBA B10, TBA B18, TBA B26, TBA B29, TBA B32, TBA B37, TBA B38, TBA B45, TBA B56, TBA B58, TBA B60, TBA B62), ileri moleküler identifikasyon için seçilmiştir. Molekül identifikasyon öncesinde gram boyama prosedürü ile izolatların gram reaksiyonları belirlenmiştir. Moleküler tanılaması yapılacak bazı izolatların hücre morfolojileri ve gram boyama görüntüleri Şekil 4.6. da gösterilmiştir.

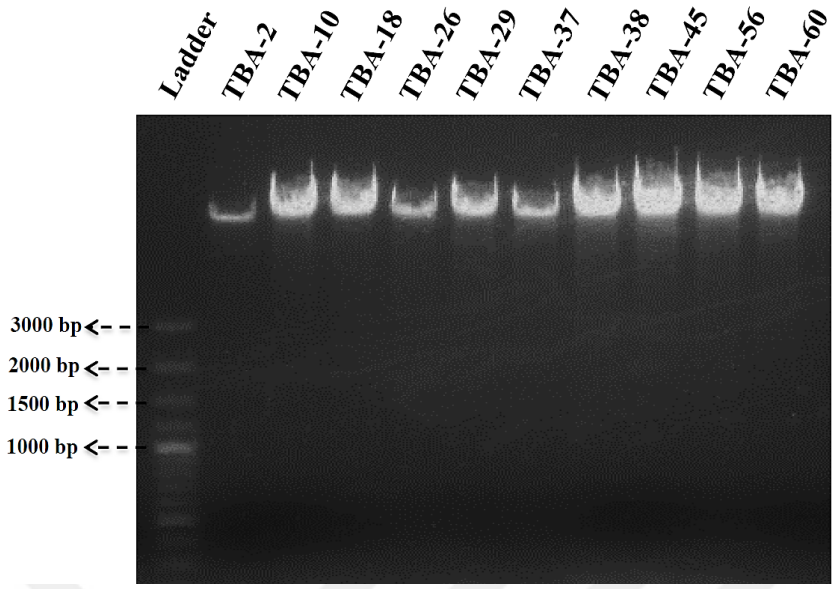


Şekil 4.6. TBA B38 ve TBA B62 nolu izolatların genel petri görünümü (üstte) ve Gram boyama ile elde edilen mikroskop görüntüsü (altta)

4.3.2. Moleküler karakterizasyon

4.3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Karakterizasyonu yapılan bakteriyal izolatlardan genomik DNA'nın saflaştırılması için ticari olarak temin edilen DNA izolasyon kiti (PureLink, Invitrogen) kullanılmıştır. Kullanım talimatları doğrultusunda Gr(+) ve Gr(-) suşlara ait genomik DNA'lar ilgili saflaştırma protokolü uygulanarak elde edilmiştir. Genom bütünlüğü ve ürünlerin saflaştırıldığından emin olmak için elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmüş ve her bir bakteri kültürü için tek bir bant elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6.).



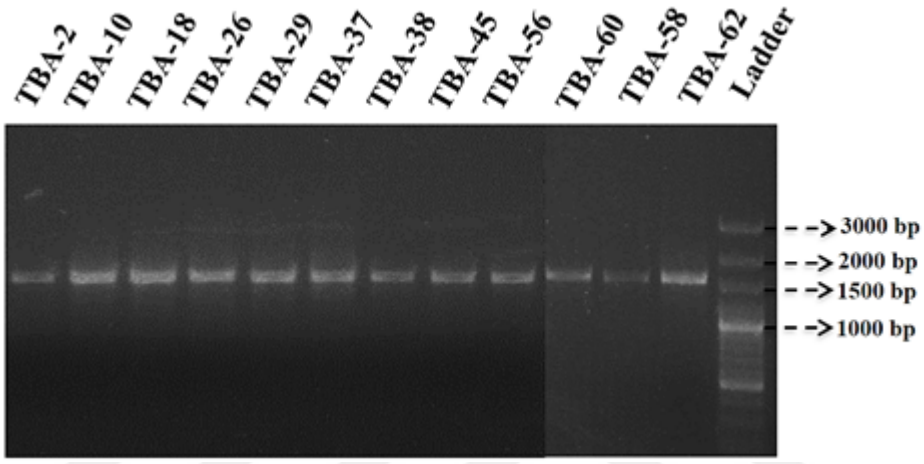
Şekil 4.7. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarına ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

4.3.2.2. 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

DNA yapılarının aydınlatılmasından sonra evrimsel tarihin DNA dizi analizlerinde kayıtlı olduğu fark edilmiştir. Carl Woose 1970'lerde rRNA moleküllerinin dizilerinin ve genlerinin organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya çıkarmakta kullanılabileceğini fark etmiştir. Woose rRNA genlerinin filogenetik analizler için; evrensel olarak yaygın olması, işlevsel olarak sabit olması ve korunmuş olmasından dolayı mükemmel adaylar olduklarını belirtmiştir (Çökmüş, 2016).

Woose pekçok mikroorganizmanın rRNA küçük alt birimini (Small Subunit-SSU rRNA) karşılaştırmıştır. SSU RNA genlerinin dizi analizini, tüm hücreler arasındaki evrimsel ilişkileri ortaya çıkararak mikroorganizmaların sınıflandırılması için kullanılabilecek en etkili yol olarak göstermiştir. 1977'den bu yana oluşturulan 2.3 milyondan fazla SSU RNA dizi analizi mikrobiyal çeşitliliği karakterize etmekte kullanılmaktadır (Çökmüş, 2016).

Gram boyama prosedürü ile hem gram reaksiyonları hem de morfolojileri belirlenen bakteriyal izolatların ileri taksonomik karakterizasyonları için 16S rDNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Hedef bölgenin amplifikasyonunda universal primerler olan bilinen 27F (ileri) ve 1492R (geri) primer çifti kullanılmıştır. 35 döngünün sonunda elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve ürünün varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7)



Şekil 4.8. Moleküler tanılaması yapılan bakterilerden bazılarının PCR ile amplifiye 16S rDNA bölgelerine ait ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Kalıp olarak görüntülenen PCR ürünleriyle birlikte aynı primer setinin kullanıldığı bir diğer sekanslama PCR işleminden sonra elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi ABI (Applied Biosystem) dizileme cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü yapılan dizileme sonuçlarının montajı DNA Baser Sequence Assembler V4 (Heracle BioSoft, Romania) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA bölgesine ait dizileme sonuçları, NCBI veri tabanında blastn suite kullanılmak suretiyle veri tabanında bulunan mevcut rDNA sekanslarıyla karşılaştırılarak moleküler tanımama gerçekleştirilmiştir. Biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici üretimi açısından pozitif olan bakteriyal suşlara ilişkin moleküler tanılama sonuçları yapılarak Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Moleküler tanılaması yapılan bakteriyal suşların 16S rDNA bölgesinin sekans analizine göre temsil ettiği türler

İzolat no	Temsil ettiği tür	16S rDNA (PCR ürününün uzunluğu-bp)	Homoloji (%)
TBA B2	*Pseudomonas balearica*	1383	99.64
TBA B10	*Bacillus sp.*	1401	99.87
TBA B18	*Pseudomonas sp.*	1394	99.86
TBA B26	*Pseudomonas balearica*	1385	99.78
TBA B29	*Pseudomonas balearica*	1386	99,93
TBA B32	*Acinetobacter radioresistens*	1393	99.86
TBA B37	*Acinetobacter radioresistens*	1393	99.86
TBA B38	*Bacillus sp.*	1397	97.00
TBA B45	*Acinetobacter baumannii*	1389	99.93
TBA B56	*Acinetobacter baumannii*	1386	100,00
TBA B58	*Pseudomonas aeruginosa*	1399	100,00
TBA B60	*Acinetobacter baumannii*	1393	99.93
TBA B62	*Bacillus sp.*	1411	99.00

Yapılan moleküler karakterizasyon sonucunda *Acinetobacter* (5), *Bacillus* (3), *Pseudomonas* (5) olmak üzere 3 farklı cinse ait 13 bakteriyal suş tanımlanmıştır. Bu suşların izole edildiği çevresel örnekler ve bu suşlara ait yapılan tarama testlerinin sonuçları literatürde yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz sonuçları doğrular niteliktedir.

Biyosürfaktanların bilinen en önemli özellikleri yüzey gerilimini düşürme ve emülsifiye etme yeteneğidir. Moleküler tanılaması yapılan bu bakteriler içerisinde test edilen farklı hidrokarbonlara karşı en etkin emülsifikasyon aktivitesine sahip izolat *Acinetobacter baumannii* strain TBA B56'dır. Goveas ve ark. (2020) izole ettikleri *Acinetobacter baumannii* türünü çeşitli hidrokarbonlar (PCO ve glikoz) varlığında büyüterek, ayçiçek yağı ve jambon yağına karşı emülsifikasyon aktivitesini belirledikleri çalışmalarında, 0 ve 24 saat sonrasındaki emülsiyon hacmini karşılaştırmışlardır. Çalışmada bildirilen en yüksek emülsifikasyon aktivitesi 24 saat sonrasında her iki yağ için %50 olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmamızda ise *Acinetobacter baumannii* TBA B56 olarak moleküler tanılamasını gerçekleştridiğimiz bakteriyal suşun, gliserol varlığında ve %1 soya yağı ilave edilen mineral tuz ortamında büyümesiyle ürettiği yüzey aktif maddenin benzene karşı %57 emülsifikasyon aktivitesine sahip olduğu ve oluşan emülsiyonların 7 gün boyunca stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ksilen için %57'lik emülsifikasyon

aktivitesi de hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, *Acinetobacter baumannii* strain TBA B56 tarafından üretilen biyosürfaktanın farklı hidrokarbonları emülsifiye etme kapasitesinde olduğuna işaret ederek söz konusu suşun ve ürettiği biyoaktif molekülün çevresel uygulamalar için potensiyel bir aday olduğunu ortaya koymaktadır.

Aynı zamanda moleküler tanılaması yapılan bu bakteriler içerisinde en etkin yüzey aktivitesine sahip bakteri *Pseudomonas aeuruginosa* strain TBA B58 olarak belirlenmiştir.

Deepika ve ark (2016) izole ettikleri *Pseudomonas aeuruginosa* türünü çeşitli hidrokarbon (benzene, n-hexadecane, toluene) kaynaklarında büyüterek, oil displacement testini gerçekleştirmişlerdir. Ham petrole karşı yüzey gerilimini yağ film tabakası üzerinde oluşan zon çapını ölçerek yağ yer değiştirme alanı (Oil Displacement Area:ODA), dairenin alan formülünden hesaplayarak 22.7 cm^2 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmamızda ise *Pseudomonas aeuruginosa* strain TBA B58 olarak moleküler tanılamasını gerçekleştirdiğimiz bakteriyal suşun, gliserol varlığında ve %1 soya yağı ilave edilen mineral tuz ortamında büyümesiyle ürettiği biyosürfaktan içeren hücresiz kültür ortamının maddenin kullanılmış motor yağı ile oluşturulan film tabakası üzerinde oluşturduğu yağ yer değiştirme alanı çok daha yüksek (33.18 cm^2) bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmalar, *Pseudomonas aeuruginosa* strain TBA B58 tarafından üretilen biyosürfaktanın farklı hidrokarbonların yüzey gerilimini düşürdüğünü göstermekte ve söz konusu suşun ve ürettiği biyoaktif molekülün başta biyodegredasyon çalışmaları olmak üzere çevresel uygulamalar için potensiyel bir aday olduğunu ortaya koymaktadır.

4.4. Biyosürfaktan Üretimi Pozitif Olan Bakteriyal İzolatların 16S rDNA Bölgelerinin Dizi Analizi Sonuçları

Tarama testleri sonucunda moleküler karakterizasyon için seçilen 13 bakteriyal izolatın 16S rDNA bölgesinin 27F/1492R primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen DNA fragmanlarının sekans analizi aşağıda verilmiştir.

- *Pseudomonas balearica* strain TBA B2 (1383 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGAT
TACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGAC
TACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTT
GTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTA
GAGTGCCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTT
ACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGCCATGCAG
CACCTGTGTCAGAGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTC
TGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTT
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAA
GATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGNTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCNTTCGCACCTCAGTGTCAGT
ATTAGCCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGC
ATTTCACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGTCA
GACAGTTTTGGATGCAATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAA
CTTATCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGC
TTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTT
ATTCTGTCGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCT
CCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCA
TGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCC
CGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTC
AGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTACCTCACCAACTAGC
TAATCCGACCTAGGCTCATCTGGTAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCT
TTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCTCGAGTTTCCCCGAGTTATCCC
CCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGCCG
GCATCCCGAAGGACCCGCTGCCGCTCGAC

- *Bacillus* sp. strain TBA B10 (1401 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

TCGAGCGATCGAYGGGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAAC
CGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAA
GACGGTTTACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGKGAACGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCANCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG
GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC
TGTAACTGACACTGAGGCGCGNAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT
CCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACCAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCCTTCGGGGGAYAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAA
AGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG
GTGAGGTAACCTTCATG

- *Pseudomonas sp.* strain TBA B18 (1394 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GCAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCTTCGATTCAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAA
AGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC
GGACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGG
TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCA
GTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT

GTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGC
TCATAGCGAATACCTGTGAGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGTTGGATG
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGTCTGGCTAG
AGTGCGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATTGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGACACTG
ACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTA
GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACCAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCT
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
TAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACT
CTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGT
ACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATC
GTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGTGAATCAGAACGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTA
ACCCTCGGGAG

- *Pseudomonas balearica* strain TBA B26 (1385 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GTCGAGCGGCAGCGGGTCCTTCGGGATGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACTCGGGGAAACT
CGAGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCGGGGGATCTTCGGA
CCTCGCGCTACCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
AGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGT
AAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGATAAGTTGGATGTGA
AAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATCCAAAACTGTCTGGCTAGAGT
ATGGCAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCGCCTGGGCTAATACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGT
GGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACCAGCGGTGGAGCATGT

GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAG
AGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTA
ACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCT
AAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTA
CAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCG
TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAA
CCT

- *Pseudomonas balearica* strain TBA B29 (1386 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

TTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTA
CTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTA
CGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGT
ACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGA
GTGCCCACCTTAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCT
GCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTG
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAG
ATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTA
TTAGCCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCA
TTTCACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGCCAG
ACAGTTTTGGATGCAATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAAC
TTATCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCT
TGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTA
TTCTGTCGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTC
CCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCAT
GGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCA
GACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT
AATCCGACCTAGGCTCATCTGGTAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTT
TCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCTCGAGTTTCCCCGAGTTATCCC
CCACTACCAGG

- *Acinetobacter radioresistens* strain TBA 32 (1393 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CAGTCGAGCGGATGAAGTAGCTTGCTACYGGATTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAG
GAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG
GCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTA
AAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACC
TAGATTAATACTTTAGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGC
TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATC
GGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCCAATTAAGTCAAATGT
GAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTGGCTAGA
GTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGA
CGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCCTTGAGGCTTTA
GTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAA
GACTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACA
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTTT
AAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGT
CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTAC
AAAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGT
AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTGCACCAGAAGTAGGTAGTCTAAC
CGCAAGGAG

- *Acinetobacter radioresistens* strain TBA B37 (1393 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CAGTCGAGCGGATGAAGGTAGCTTGCTACCGGATTCAGCGGCGGACGGG
TGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAG
GAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGG
GCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTA
AAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACC

TAGATAATACTTTAGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCT
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCG
GATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCCAATTAAGTCAAATGTG
AAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTGGCTAGAG
TATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGAC
GCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCCTTGAGGCTTTAG
TGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ACTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACAGA
GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTTTAA
GGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAA
AGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGT
CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTGCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCGC
AAGGAGG

- *Bacillus sp.* strain TBA B38 (1397 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

AGTCGAGCGAACTGATSAGAAKCTTGCTTCTATGACGTTGCGGCGGAGGG
TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAA
ACCGAAGCTMATACCGGAYAGGATCTTCTCCTTCAKGGGAGATGATTGA
AAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCAKTAKCTAG
KTSGTGAGGTAACRGCTCACCAAGGCAACGATRCAKARCCAACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCARTAGGGAATCTTCCGCARTGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGYGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTACRARAGTAACTGCTYGTACCTTGACGGTACCTAACCARA
AWGCCACGGCTAACTACSTGCCAKCMGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGT
CTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCATACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTYTC
CGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCMAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTYGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT

GACATCCTCTGACAACTYTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGAYAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTYAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAA
AACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG
GTGGAGTAACCGT

- ***Acinetobacter baumannii*** **strain TBA B45 (1389 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları**

CGAGCGGGGGAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGAT
GCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCT
TGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
GCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTA
GTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA
ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGG
ATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAA
ATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTGAGCTAGAGTA
TGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGC
TGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTG
GCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCGGATGGGAACTTTAAGG
ATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAA
GGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTC
CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGGGAGTTTGTTGCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCA
AAGAGG

- *Acinetobacter baumannii* TBA B56 (1386 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

GCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAAACTCCCATGGTGTGACGGG
CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGG
ACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACCCTs
TTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGA
TGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTT
AAAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGC
AGCACCTGTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTT
CTAGTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTC
TTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACT
AAAGCCTCAAAGGCCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGAC
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTC
AGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCCATACTCTAG
CTCACCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTCACATC
CGACTTAATAAGCCGCCTACGCACGCTTTACGCCCAGTAAATCCGATTAA
CGCTCGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG
CTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATCTCTAGGTATTAACTAAAGTAGCC
TCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTTACAACCATAAGGCCTTCTTCACACACGC
GGCATGGCTGGATCAGGGTTCCCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCGGATCATC
CTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCCACCAA
CTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCC
CTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCATCCCTTTCGAGATGTT
GTCCCCCACTAATAGGCAGATTCCTAAGCATTACTCACCCGTCCGCCGCT
AGGTCCAGTAGCAAGCTACCTTCCCCCGCTCGAC

- *Pseudomonas aeruginosa* strain TBA B58 (1399 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CCGTCCCCCTTGCGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCAT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACA
TTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAG
ACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGG
CTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCG
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCAC
CGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCCGAGGTGCTGGTAACTAAGGACAA
GGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATC

TCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
TCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAT
TTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTATCGCGTT
AGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
CTTCCTATATCTACGCATTTCACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCT
ACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGG
GGATTTCACATCCAACTTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGT
AATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGA
AGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAA
CTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCT
TCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTC
CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTT
ACCCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTC
CGAAGATCCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCGGTATTAGCGCCCGT
TTCCGGACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACC
CGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTGC

- *Acinetobacter baumannii* TBA B60 (1393 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CCTCTTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAAACTCCCATGGTG
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCT
GATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC
CAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACATCGCTGTGTA
GCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAG
GGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGC
AGTATCCTTAAAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AGCCATGCAGCACCTGTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTG
GAAAGTTTCTAGTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGA
ATTAAACCACATGCTCCACCGCTCGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA
GTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCT
GCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACG
GCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACC
TCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCC
AGATCTCTACGCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCCA
TACTCTAGCTCACCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGAT
TTCACATCCGACTTAATAAGCCGCCTACGCACGCTTTACGCCCAGTAAAT
CCGATTAACGCTCGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTT
AGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATCTCTAGGTATTAACTA

AAGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTTACAACCATAAGGCCTTCTTC
ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTCCCCCCATTGTCCAATATTCCC
CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC
GGATCATCCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTAC
CCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGTCCG
AAGATCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCATCCCTTTC
GAGATGTTGTCCCCCACTAATAGGCAGATTCCTAAGCATTACTCACCCGT
CCGCCGCTAGGTCCAGTAGCAAGCTACCTTCCCCCGCTCGAC

- *Bacillus sp.* TBA B62 (1411 bp) olarak tanılanan bakterinin 16S rDNA dizi analizi sonuçları

CAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGG
GAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATT
GAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTACRAGAGTAACTGCTYGTACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC
TGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAANGGCGGCTTTTT
GGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGNCGTNAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGG
ACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
YAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCC
ATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAA
GTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTA

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sürfaktanlar, genellikle sıvı-sıvı, katı-sıvı gibi birbirine karışmayan yüzeyler arasında ara yüzey gerilimini düşürmek için kullanılan petrol kaynaklı bileşiklerdir. Bu özellikleri sayesinde sürfaktanlar neredeyse sanayinin her alanında kullanılmaktadır. Artan biyoteknolojik gelişmeler ve sanayileşmeyle birlikte sürfaktanlara olan talebin de arttığı gözlenmektedir.

Büyük ölçekli ham petrolün üretimi ve nakliyesi sırasında kazara gerçekleşen petrol saçılmaları, başta toprak ve deniz kirliliği olmak üzere çevreye ciddi zararlar vermektedir. Özellikle ham petrolün taşınması sırasında meydana gelen petrol sızıntıları ve kazaları, denizel ve karasal canlıların hayatlarında ciddi derecede risk oluşturmaktadırlar. Bununla birlikte, transferler sırasında meydana gelen kazalar sonrasında yürütülmesi gereken arıtım prosesleri de son derece maliyetlidir. Sentetik sürfaktanların toksik ve degredasyona dayanıklı nitelikte oluşu, uygulanacak çevresel remediasyon proseslerinin maliyetli olması gibi dezavantajları nedeniyle daha çevreci fakat sürfaktanlarla eşit verimlilikte alternatiflerinin aranmasını gereklilik haline getirmiştir. Sürfaktanlarla eş fonksiyona sahip olan ve özellikle bakteri, maya gibi farklı mikrobiyal gruplar tarafından üretilen biyosürfaktanlar ise çevre dostu nitelikteki biyomoleküller olarak son yıllarda giderek önem kazanmıştır. Sentetik yüzey aktif maddelere göre daha düşük toksisite, daha yüksek biyolojik bozunabilirlik, daha iyi çevresel uyumluluk, daha yüksek köpüklenme, aşırı sıcaklıklarda spesifik aktivite, yenilenebilir ham maddelerden sentezlenebilme gibi çeşitli avantajları nedeniyle biyosürfaktanlar; başta petrol endüstrisi olmak üzere gıda, kozmetik ve farmasötik endüstrisi, biyodegredasyon ve biyoremediasyon teknolojileri gibi birçok alanda kullanılabilmektedir. Farklı proseslerde kullanılacak aday biyosürfaktanların keşfi, genellikle bu biyosürfaktanları üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve üretilen biyosürfaktanların saflaştırılarak aktivitelerinin tayin edilmesi ile mümkün olmaktadır. Bu çalışmada, sentetik biyosürfaktanlarla kıyaslanabilecek düzeyde biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici üretim potansiyeline sahip bakterilerin petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş toprak örneklerinden izolasyonu ve moleküler

karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu sayede, araştırma konusuyla ilgili az miktardaki yurt içi çalışmalara da katkı sağlanmıştır.

Uygulanan tarama testleri içerisinde en iyi sonuçların emülsifikasyon indeksinin belirlenmesi ve yağ yer değiştirme testi ile elde edildiği gözlenmiştir. Tarama testleri sonucunda biyosürfaktan/biyoemülsifiye edici üretimi yaptığı belirlenen bakteriyal izolatların moleküler tanılaması sonucunda *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine üye oldukları belirlenmiştir. Bu cinslere üye bakteriler tarafından yüzey aktif madde üretimini rapor eden sayısız yurt dışı çalışma elde ettiğimiz verileri doğrular niteliktedir.

Yüzey gerilimini düşürme ve biyosemülsifiye etme yeteneğine sahip biyosürfaktanlar, özellikle hidrokarbon kirliliğinin olduğu bölgelerde uygulanan biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları için önem arzetmektedir. Bu çalışmada, izole edilen bakteri suşlarının ürettiği biyosürfaktanlar hem yüzey gerilimini düşürme hem de biyoemülsifiye etme yetenekleri açısından bilinen en iyi sentetik sürfaktanlardan olan SDS ile karşılaştırmak suretiyle değerlendirilmiştir. Özellikle *Pseudomonas sp.* TBA B18 ve *P. aeruginosa* TBA B58 suşları ile elde edilen yüzey gerilimini düşürme aktivitesi SDS'e yakın değerler vermiştir. Ayrıca, toksik çevresel kirleticilerin biyomevcudiyetini arttıracak olan biyoemülsifiye etme yetenekleri de ksilen, kerosen ve benzen gibi hidrofobik substratlara karşı test edilmiştir. *Pseudomonas sp.* TBA B18 suşundan elde edilen hücresiz kültür sıvısı ile ksilen, kerosen ve benzen hidrokarbonları için ölçülen emülsifikasyon indeksi (E_{24}) sırasıyla %47, %33 ve %50 olarak hesaplanmıştır. Bunun beraber; *Bacillus sp*. TBA B10 ile benzene karşı %60, *Acinetobacter radioresistens* TBA B32 ile ksilen ve benzene karşı sırasıyla %50 ve %45, *Acinetobacter baumanni* TBA B56 ile ksilen ve benzene karşı sırasıyla %57 ve %65, *Bacillus sp* TBA B62 suşu ile ksilen ve benzene karşı sırasıyla %47 ve %61 emülsifikasyon indeksi veren hücresiz kültür sıvılarında biyoemülsifiye edicilerin mevcudiyeti tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, SDS ile karşılaştırılabilir seviyede yüksek olduğu için tanılamasını yaptığımız bakterilerin ve/veya ürettikleri biyosürfaktan/biyoemülsifiye

edicilerin biyoremediasyon ve biyodegredasyon çalışmalarında kullanılabilecek çevre dostu adaylardır.

Üretilen biyosürfaktan/ biyoemülsifiye edicilerin miktarını arttıracak optimum üretim koşullarının belirlenmesi, bu ürünlerin saflaştırılması, karakterizasyonu ve diğer biyolojik aktivitelerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilecek daha ileri çalışmalarla elde edilen biyomoleküllerin önemi daha da vurgulanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

AL-BAHRY, S. N., 2013. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. International Biodeterioration & Biodegradation, 81: 141-146.

AL-WAHAIBI and YAHYA, 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 114: 324-333.

ARIMA, K., 1968. Surfactin, acrystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31: 488-494.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S. and CAMEOTRA, S. S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 53(5): 495-508.

BANAT, I. M., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied microbiology and biotechnology, 87.2: 427-444.

BANAT, I. M., 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresource technology, 51.1: 1-12.

BANAT, I. M.,1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal–State of the Art. Acta Biotechnologica, 15.3: 251-267.

BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M. G., FRACCHIA, L. and MARCHANT, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied microbiology and biotechnology, 87(2): 427-444.

BATOOL, R., AYUB, S. and AKBAR, I., 2017. Isolation of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated sites and their characterization. *Soil & Environment*, *36*(1).

BESSON, F. and MICHEL, G., 1992. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: Evidence for amino acid activating enzymes. Biotechnology letters, 14(11): 1013-1018.

BOGNOLO, G.,1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152(1-2): 41-52.

BOURDICHON, F., CASAREGOLA, S., FARROKH, C., FRISVAD, J. C., GERDS, M. L. and HAMMES, W. P., 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. International journal of food microbiology, 154(3): 87-97.

BUSSCHER, H. J., VAN HOOGMOED, C. G., GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. I., VAN DER KUIJL-BOOIJ, M. and VAN DER MEI, H. C., 1997. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. Applied and environmental microbiology, 63(10): 3810-3817.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S., KAUR, J. and MEHTA, S. K., 2010. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In Biosurfactants (pp. 261-280). Springer, New York, NY.

CAVALERO, D. A. and COOPER, D. G., 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. Journal of biotechnology, 103(1): 31-41.

CHANDRAN, P. R. E. E. T. H. Y. and Das, N., 2010. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. Int J Eng Sci Technol, 2(12): 6942-6953.

CHANG, J. S., RADOSEVICH, M., JIN, Y. and CHA, D. K., 2004. Enhancement of phenanthrene solubilization and biodegradation by trehalose lipid biosurfactants. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 23(12): 2816-2822.

CHORRO, C., CHORRO, M., DOLLADILLE, O., PARTYKA, S. and ZANA, R., 1998. Adsorption of dimeric (gemini) surfactants at the aqueous solution/silica interface. Journal of colloid and interface science, 199(2): 169-176.

CIRIGLIANO, M. C. and CARMAN, G. M., 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and environmental microbiology, 50(4): 846-850.

CUI, Q. F., SUN, S. S., LUO, Y. J., YU, L. and ZHANG, Z. Z., 2017. Comparison of in-situ and ex-situ microbial enhanced oil recovery by strain *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 in laboratory sand-pack columns. Petroleum Science and Technology, 35(21): 2044-2050.

ÇÖKMÜŞ, C., (Çeviri editörü) 2017. Mikroorganizmaların Biyolojisi (14. Baskıdan çeviri). Palme Yayıncılık, Ankara, 1002.

DAS, K. and MUKHERJEE, A. K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource technology, 98(7): 1339-1345.

DERGUINE-MECHERI, L., KEBBOUCHE-GANA, S., KHEMILI-TALBI, S. and DJENANE, D., 2018. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic Cryptococcus strain YLF isolated from crude oil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, *162*: 712-724.

DESAI, J. D. and Banat, I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular biology reviews, 61(1): 47-64.

DEEPIKA, K. V., KALAM, S., SRIDHAR, P. R., PODILE, A. R. and BRAMHACHARI, P. V., 2016. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 5: 38-47.

DHANARAJAN, G., RANGARAJAN, V., BANDI, C., DIXIT, A., DAS, S., ALE, K. and SEN, R., 2017. Biosurfactant-biopolymer driven microbial enhanced oil recovery (MEOR) and its optimization by an ANN-GA hybrid technique. Journal of biotechnology, 256: 46-56.

DOMINGUEZ, A., FERNÁNDEZ, A., GONZÁLEZ, N., IGLESIAS, E. and MONTENEGRO, L., 1997. Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. Journal of chemical education, 74(10): 1227.

ELAZZAZY, A. M., ABDELMONEIM, T. S. and ALMAGHRABI, O. A., 2015. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 22(4): 466-475.

ESUMI, K., GOINO, M. and KOIDE, Y., 1996. Adsorption and adsolubilization by monomeric, dimeric, or trimeric quaternary ammonium surfactant at silica/water interface. Journal of colloid and interface science, 183(2): 539-545.

FERNANDES, P. L., RODRIGUES, E. M., PAIVA, F. R., AYUPE, B. A. L., MCINERNEY, M. J. and TÓTOLA, M. R. 2016. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. Fuel, 180: 551-557.

FIECHTER, A., 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Food Science & Technology, 3: 286-293.

FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., SMYTH, T. J. and BANAT, I. M., 2010. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. European Journal of Lipid Science and Technology, 112(6): 617-627.

GEETHA, S. J., BANAT, I. M. and JOSHI, S. J., 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 14: 23-32.

GHURYE, G. L., VIPULANANDAN, C. and WILLSON, R. C., 1994. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering, 44(5): 661-666.

GOVEAS, L. C. and SAJANKILA, S. P., 2020. Effect of yeast extract supplementation on halotolerant biosurfactant production kinetics coupled with degradation of petroleum crude oil by *Acinetobacter baumannii* OCB1 in marine environment. Bioresource Technology Reports, 100447.

GUCLU-USTUNDAG, O. and MAZZA, G., 2007. Saponins: properties, applications and processing. Critical reviews in food science and nutrition, 47(3): 231-258.

GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O., and FIECHTER, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Applied and environmental microbiology, 48(2): 301-305.

HADIA, N. J., OTTENHEIM, C., LI, S., HUA, N. Q., STUBBS, L. P. and LAU, H. C., 2019. Experimental investigation of biosurfactant mixtures of surfactin produced by *Bacillus Subtilis* for EOR application. Fuel, 251: 789-799.

HENKEL, M., MULLER, M. M., KUGLER, J. H., LOVAGLIO, R. B., CONTIERO, J., SYLDATK, C. and HAUSMANN, R., 2012. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, *47*(8): 1207-1219.

HSU, H. J., 2013. U.S. Patent Application No. 13/742: 288.

ISODA, H., SHINMOTO, H., MATSUMURA, M. and NAKAHARA, T., 1995. Succinoyl trehalose lipid induced differentiation of human monocytoid leukemic cell line U937 into monocyte-macrophages. Cytotechnology, 19(1): 79-88.

ISIK, S. G., KIRBIYIK, M., CEVIK, A., KALKAN, E. B., SERKAN, O. K. U. R. ve YILMAZ, M., 2018. Yüzey Aktif Organik Maddelerin Tayini. Gümrük ve Ticaret Dergisi, (12): 75-80.

IYER, A., MODY, K. and JHA, B., 2006. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. Enzyme and Microbial Technology, 38(1-2): 220-222.

JARVIS, F. G. and Johnson, M. J., 1949. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Chemical Society, 71(12): 4124-4126.

JHA, S. S., JOSHI, S. J. and SJ, G., 2016. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. Brazilian journal of microbiology, 47(4): 955-964.

JUWARKAR, A. A., NAIR, A., DUBEY, K. V., SINGH, S. K. and DEVOTTA, S., 2007. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere, 68(10): 1996-2002.

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G. and VEENANADIG, N. K. 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science, 116-126.

KÄPPELI, O. and FINNERTY, W. R., 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. Journal of bacteriology, 140(2): 707-712.

KAUR, K., SANGWAN, S. and KAUR, H., 2017. Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments. *Environmental monitoring and assessment*, *189*(12): 603.

KRONBERG, B. and LINDMAN, B., 2003. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

KRUTMANN, J., 2009. Pre-and probiotics for human skin. Journal of dermatological science, 54(1): 1-5.

KUMAR, S., STECHER, G. and TAMURA, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, *33*(7): 1870-1874.

LIMA, T. M., PROCÓPIO, L. C., BRANDÃO, F. D., CARVALHO, A. M., TÓTOLA, M. R. and BORGES, A. C., 2011. Biodegradability of bacterial surfactants. Biodegradation, 22(3): 585-592.

LU, B., MIAO, Y., VIGNERON, P., CHAGNAULT, V., GRAND, E., WADOUACHI, A. and VAYSSADE, M., 2017. Measurement of cytotoxicity and irritancy potential of sugar-based surfactants on skin-related 3D models. Toxicology in Vitro, 40: 305-312.

MAKKAR, R. S. and CAMEOTRA, S. S., 1997. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74(7): 887-889.

MARCHANT, R. and BANAT, I. M., 2012. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants. Biotechnology letters, 34(9): 1597-1605.

MARTÍNEZ-PALOU, R., CERÓN-CAMACHO, R., CHÁVEZ, B., VALLEJO, A. A., VİLLANUEVA-NEGRETE, D. and CASTELLANOS, J., Aburto, J., 2013. Demulsification of heavy crude oil-in-water emulsions: a comparative study between microwave and thermal heating. *Fuel*, *113*: 407-414.

MATA-SANDOVAL, J. C., KARNS, J. and TORRENTS, A., 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. Journal of Chromatography A, 864(2): 211-220.

MNIF, I., MNIF, S., SAHNOUN, R., MAKTOUF, S., AYEDI, Y., ELLOUZECHAABOUNI, S. and GHRIBI, D., 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. Environmental Science and Pollution Research, 22(19): 14852-14861.

MONDAL, M. H., MALIK, S., ROY, A., SAHA, R. and SAHA, B., 2015. Modernization of surfactant chemistry in the age of gemini and bio-surfactants: a review. RSC advances, 5(112): 92707-92718.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D., ANDRADE, R. F., RIBEIRO, D. L. R., RUBIO-RIBEAUX, D., LIMA, R. A., ARAÚJO, H. W. and CAMPOS-TAKAKI, G. M., 2015. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. Int J Curr Microbiol Appl Sci, 4, 550-562.

MORIKAWA, M., HIRATA, Y. and IMANAKA, T., 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1488(3): 211-218.

MOROI, Y., 1992. Micelles: theoretical and applied aspects. Springer Science & Business Media.

MULLIGAN, C. N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution, 133(2): 183-198.

NWAGUMA, I. V., CHIKERE, C. B. and OKPOKWASILI, G. C., 2016. Isolation, characterization, and application of biosurfactant by *Klebsiella pneumoniae* strain IVN51 isolated from hydrocarbon-polluted soil in Ogoniland, Nigeria. *Bioresources and Bioprocessing*, *3*(1): 40.

OKOH, A. I. and TREJO-HERNANDEZ, M., R., 2006. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. African Journal of Biotechnology, 5(25).

ONUR, G., YILMAZ, F. and ICGEN, B., 2015. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. Journal of Surfactants and Detergents, 18(4): 707-717.

PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. and CAMEOTRA, S. S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. International journal of molecular sciences, 12(1): 633-654.

PORTER, M. R., 2013. Handbook of surfactants. Springer.

PUTRI, N. P., SARI, C. N. and GOZAN, M., 2020. Biosurfactant Screening of *Halomonas meridiana* BK-AB4 for Microbial Enhanced Oil Recovery. In Materials Science Forum (Vol. 988, pp. 95-100). Trans Tech Publications Ltd.

RAHMAN, P. K. S. M. and GAKPE, E., 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. Biotechnology, 7(2): 360-370.

RODRIGUES, L., BANAT, I. M., TEIXEIRA, J. and OLIVEIRA, R., 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(4), 609-618.

RON, E. Z. and ROSENBERG, E., 2001. Natural roles of biosurfactants: Minireview. Environmental microbiology, 3(4): 229-236.

ROSENBERG, E. and RON, E. Z., 1999. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 52(2): 154-162.

ROY, A., 2017. A review on the biosurfactants: Properties, types and its applications. Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications, 8, 1-14.

SEKHON, K. K., KHANNA, S. and CAMEOTRA, S. S., 2011. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. Microbial cell factories, 10(1): 49.

SHALIGRAM, N. S. and SINGHAL, R. S., 2010. Surfactin–a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. Food technology and biotechnology, 48(2): 119-134.

SHEKHAR, S., SUNDARAMANICKAM, A. and BALASUBRAMANIAN, T., 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 45(14): 1522-1554.

SIDKEY, N. M., MOHAMED, H. F. and ELKHOULY, H. I., 2016. Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples grown on industrial olive oil processing waste. *Microbiology Research Journal International*, 1-19.

SUDO, T., ZHAO, X., WAKAMATSU, Y., SHIBAHARA, M., NOMURA, N., NAKAHARA, T. and YOKOYAMA, K. K., 2000. Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. Cytotechnology, 33(1-3): 259-264.

SUMENGEN, M., SADIK, U. ve UMIT, M., 2016. *Bacillus subtilis* kullanılarak atık ekmeklerden alkali proteaz ve biyosurfektan üretimi.

SUN, W., CAO, W., JIANG, M., SAREN, G., LIU, J., CAO, J. and NAZ, I., 2018. Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas sp.* CQ2 from Changqing oil field, China. RSC advances, 8(69): 39710-39720.

TALUKDAR, P., SHARMA, C., DOLEY, A., BARUAH, K., BORAH, A., AGARWAL, P. and DEORI, P., 2017. Isolation and characterization of biosurfactant producing microorganisms from petroleum contaminated soil samples for EOR and bioremediation. *Petroleum Science and Technology*, *35*(22): 2102-2108.

TAO, W., LIN, J., WANG, W., HUANG, H. and LI, S., 2019. Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from *Bacillus subtilis* CICC 20034. Microbial cell factories, 18(1): 173.

THAVASI, R., SHARMA, S. and JAYALAKSHMI, S., 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. J Pet Environ Biotechnol S, 1.2.

TOKUMOTO, Y., NOMURA, N., UCHIYAMA, H., IMURA, T., MORITA, T., FUKUOKA, T. and KITAMOTO, D., 2009. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus sp*. SD-74. Journal of oleo science, 58(2): 97-102.

UCHIDA, Y., TSUCHIYA, R., CHINO, M., HIRANO, J. and TABUCHI, T., 1989. Extracellular accumulation of mono-and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of Rhodococcus erythropolis grown on n-alkanes. Agricultural and biological chemistry, 53(3): 757-763.

UZOIGWE, C., BURGESS, J. G., ENNIS, C. J. and RAHMAN, P. K., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. Frontiers in microbiology, 6, 245.

VECINO, X., CRUZ, J. M., MOLDES, A. B. and RODRIGUES, L. R., 2017. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. Critical reviews in biotechnology, 37(7): 911-923.

YADAV, A. K., MANNA, S., PANDIYAN, K., SINGH, A., KUMAR, M., CHAKDAR, H. and SRIVASTAVA, A. K., 2016. Isolation and characterization of biosurfactant producing Bacillus sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology*, *85*(1): 56-62.

YALÇIN, H. T., ERGIN-TEPEBASI, G., ve UYAR, E., 2018. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *Journal of basic microbiology*, *58*(9): 782-792.

YUKSEL, F. N. ve AKCELIK, M., 2015. Mikrobiyal biyosürfektanlar: Yüzey aktif bileşikler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 31(3): 1-9.

WALTER, V., SYLDATK, C. and HAUSMANN, R., 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In Biosurfactants (pp. 1-13). Springer, New York, NY.

WHANG, L. M., LIU, P. W. G., MA, C. C. and CHENG, S. S., 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of hazardous materials, 151(1): 155-163.

XU, G., CHEN, Y., EKSTEEN, J. and XU, J., 2018. Surfactant-aided coal dust suppression: A review of evaluation methods and influencing factors. Science of the Total Environment, 639: 1060-1076.

ZHAO, G., KHIN, C. C., CHEN, S. B. and CHEN, B. H., 2005. Nonionic surfactant and temperature effects on the viscosity of hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose solutions. The Journal of Physical Chemistry B, 109(29): 14198-14204.

ZHAO, J., CAO, Q., BAI, Y., ER, C., LI, J., WU, W. and SHEN, W., 2017. Petroleum accumulation: From the continuous to discontinuous. Petroleum Research, 2(2): 131-145.

ZOU, C. N., YANG, Z., TAO, S. Z., YUAN, X. J., ZHU, R. K., HOU, L. H. and WANG, L., 2013. Continuous hydrocarbon accumulation over a large area as a distinguishing characteristic of unconventional petroleum: The Ordos Basin, North-Central China. Earth-Science Reviews, 126:358-369.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** TUBA AVCI

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	**:** Adıyaman YDA Lisesi	2007
Üniversite	**:** Harran Üniversitesi /Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü Haliliye/ŞANLIURFA	2013
Yüksek Lisans	**:** Harran Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü /Biyoloji Anabilim Dalı Haliliye /ŞANLIURFA	2020

TEKNİK YETENEKLER

Moleküler Biyoloji: PCR, Biyokimya analiz cihazları

Bilgisayar: Microsoft Office

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Uyar E, Avcı T. Biosurfactant production abilities and molecular identification of bacteria isolated from petroleum-contaminated soils. 5th International Engineering and Natural Sciences Conference (IENSEC 2020), 5-6/11/2020, Diyarbakır-TÜRKİYE.
2. Avcı T, Uyar E. Antimicrobial Peptides from Microorganisms: Promising Bioactive Molecules. 3rd International Euroasia Congress on Multidisciplinary Studies, 4-7/04/2019, Gaziantep-TÜRKİYE.