T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PETROLLE KİRLETİLMİŞ TOPRAKLARDAN PETROLÜ PARÇALAYAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Ömer ACER

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Eylül-2014

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ömer ACER tarafından yapılan **"Petrolle Kirletilmiş Topraklardan Petrolü Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu"** konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. Kadri GÜL

Üye : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Prof. Dr. Fikret UYAR

Üye : Doç. Dr. Veysel TOLAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 12/09/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı, Prof.Dr. Kemal GÜVEN danışmanlığında yapılmıştır. Bana bu araştırmada çalışma olanağı sağlayan, ihtiyaç duyduğum her an değerli bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN'e;

İtalya'nın Napoli Kentinde bulunan Ulusal Araştırma Merkezi (C.N.R.) Biyomoleküler Kimya Enstitüsü'nde (ICB) bakterilerin yağ asidi, lipid ve kinon analizi çalışmalarını gerçekleştirebilmem için olanak sağlayan, çalışmalarım sırasında fikir alışverişinde bulunduğum, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak beni cesaretlendiren Dr. Annarita POLI ve Dr. Barbara NICOLAUS'a;

Çalışmalarıma fikirleri ile katkı sağlayan ve bazı çalışmalarımı gerçekleştirmem için laboratuar imkanları sağlayan sayın Doç. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN'e;

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Dr. Fatma MATPAN BEKLER ve Dr. Özlem DEMİRCİ'ye;

Tez İzleme Komitesi'nde bulunan ve fikirleri ile katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Kadri GÜL ve Doç. Dr. Veysel TOLAN'a;

Biyomoleküler Kimya Enstitüsün'de (ICB) laboratuar çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Eduardo PAGNOTTA ve Post Doktora öğrencileri Gianluca ANZELMO ve Ilaria FINORE'ye;

Çalışmalarım süresince her zaman manevi desteğini gördüğüm sevgili arkadaşım Süleyman ÖZAKIN'a;

İtalya'da bulunduğum süre zarfında beni hiç yalnız bırakmayan ve manevi desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Valentina TAURISANO, Gianluca ANZELMO, Roberto ABBAMONDI, Marta ALMADA, Vincenza MASTASCUSA, Ilaria FINORE, Mariana DELGADO, Soledad MORILLO, Luigi LEONE ve yakın alakasından dolayı Dr. Ida ROMANO'ya;

Çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve beni koşulsuz destekleyerek en büyük teşekkürü hakeden başta babam Mehmet ACER ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak çalışmamıza vermiş olduğu maddi destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP-12-FF-149) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR ..... **I**

İÇİNDEKİLER ..... **II**

ÖZET ..... **VI**

ABSTRACT ..... **VII**

ÇİZELGE LİSTESİ ..... **VIII**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **X**

KISALTMA VE SİMGELER ..... **XIX**

1. GİRİŞ **1**

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR **3**

2.1. Bakteri Sistematiği 3

2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu 5

2.2.1. Fenotipik Yöntemler 7

2.2.1.1. Morfolojik Özellikler 7

2.2.1.2. Fizyolojik Özellikler 8

2.2.1.3. Biyokimyasal Özellikler 8

2.2.2. Genotipik Yöntemler 8

2.2.2.1. GC Oranları 8

2.2.2.2. 16S rRNA Analizi 9

2.2.2.3. DNA-DNA Hibridizasyonu 9

2.2.3. Kemotaksonomik Yöntemler 10

2.2.3.1. Yağ Asidi ve Lipit Analizi 10

2.2.3.2. Kinon Analizi 13

2.3. Bakterilerin Sınıflandırılması 15

2.4. Proteobakteriler 17

2.4.1. *Acinetobacter* Cinsi 21
2.4.2. *Steneotrophomonas* Cinsi 23
2.4.3. *Cronobacter* Cinsi 25
2.5. Petrol Kirliliği 28
2.6. Mikrobiyal Degradasyon 29
2.7. Konu Kapsamı ile İlgili Literatür Özetleri 32
3. MATERYAL VE METOT 39
3.1. Materyal 39
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimleri 40
3.2. Metot 40
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Saf Kültür Üretimi 40
3.2.2. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi 41
3.3. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler 41
3.3.1. Gram Boyama 41
3.3.2. Spor Boyama 42
3.3.3. Hareketlilik ve Oksijen Gereksinimi 42
3.3.4. Nişasta Hidroliz Testi 42
3.3.5. Katalaz Testi 43
3.3.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi 43
3.3.7. Oksidaz Aktivitesi 43
3.3.8. Tirozin Degradasyonu 44
3.3.9. Üreaz Testi 44
3.3.10. Sitrat Testi 44
3.3.11. İndol Testi 45
3.3.12. Sodyum Azid Duyarlılığı 45
3.3.13. NaCl Toleransı 45
3.3.14. Antibiyotik Duyarlılık Testi 45

3.4. Kemotaksonomik Analizler 46
3.4.1. Lipit Analizi 46
3.4.2. Yağ Asidi Analizi 47
3.4.3. Kinon Analizi 48
3.5. 16S rRNA Gen Dizi Analizi 49
3.6. Bakterilerin Ham Petrol ve Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi 49
3.7. Sıvı Kültürde Ham Petrol ve n-Hegzadekan Degradasyonunun Belirlenmesi 50
3.7.1. Numune Hazırlama 50
3.7.2. Gaz Kromatografisi Analizi 51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 53
4.1. Bakteri İzolasyonu 53
4.2. Morfolojik Analizler 53
4.3. Optimum Üreme Şartlarının Tespiti 57
4.4. Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler 68
4.4.1. Hareketlilik ve Oksijen Gereksinimi 68
4.4.2. Nişasta Hidroliz Testi 73
4.4.3. Katalaz Testi 76
4.4.4. Jelatin Hidrolizasyon Testi 79
4.4.5. Oksidaz Aktivitesi 81
4.4.6. Tirozin Degradasyonu 84
4.4.7. Üreaz Testi 87
4.4.8. Sitrat Testi 90
4.4.9. İndol Testi 93
4.4.9.1. Sodyum Azid Duyarlılığı 94
4.4.10. NaCl Toleransı 94
4.4.11. Antibiyotik Duyarlılık Testi 96

4.5. Kemotaksonomik Analizler 110
4.5.1. Lipit Analizi 110
4.5.2. Yağ Asidi Analizi 128
4.5.3. Kinon Analizi 149
4.6. 16S rRNA Gen Dizi Analizine Göre İzolatların Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi 155
4.7. Bakterilerin Ham Petrol ve Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi 161
4.8. Sıvı Kültürde Ham Petrol ve n-Hegzadekan Degradasyonunun Belirlenmesi 164
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 175
6. KAYNAKLAR 198
ÖZGEÇMİŞ 211

ÖZET

PETROLLE KİRLETİLMİŞ TOPRAKLARDAN PETROLÜ PARÇALAYAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

ÖMER ACER

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2014

Mutajenik, karsinojenik ve güçlü immünotoksik olan petrol bileşiklerinin toprağa ve yeraltı sularına kontrolsüz bir şekilde salınımı insan ve hayvan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Kapsamlı petrol arama, işleme, depolama ve taşıma faaliyetleri, yeterince önlem alınmadığı vakit sık sık çevre kirliliğine yol açarak ekosistemin biyotik ve abiyotik bileşenleri için yıkıcı hasarlara yol açmaktadır. Petrolle kirlenmiş sistemlerin remediasyonu ya fiziko-kimyasal ya da biyolojik yöntemlerle başarılmaktadır. Petrolle kirlenmiş toprakların biyodegradasyonu etkili, ekonomik ve çok yönlü olarak kurulmuştur.

Bu çalışmanın amacı, petrolle kirlenmiş topraklardan petrolü parçalayan bakteri izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmektir. Diyarbakır ve Batman'daki petrol sahalarında bulunan petrolle kirlenmiş topraklardan sırasıyla *Acinetobacter*, *Cronobacter* ve *Stenotrophomanas* cinslerine ait beş bakteri türü izole edilmiştir. Bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve kemotaksonomik özelliklerine bakılmıştır. Sırasıyla ST5, GC2, BT1A, BT1B ve 2TP1A şeklinde etiketlendirilen bakterilerin 16S rRNA gen dizi analizine göre *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter lwofii*, *Acinetobacter baumannii*, *Cronobacter malonaticus* ve *Stenotrophomonas maltophilia* türlerine yakın oldukları belirlenmiştir.

Hemen hemen tüm bakteri türlerinin gelişmek için ham petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları bulunmuştur. Bakterilerin alifatik hidrokarbonlardan, sadece uzun zincirli n-alkanlarda (tridekan, pentadekan, hegzadekan) ürediği görülmüştür. Kısa zincirli n-alkanlarda (heptan) üreme kaydedilmemiştir. Test edilen uzun zincirli alkanlar arasında, genel olarak en çok tercih edilen hekzadekan olmuştur. GC-MS analizi, BT1A, ST5, 2TP1A ve GC2'nin 7 günlük inkübasyon ile ham petrolde bulunan n-alkanları sırasıyla yaklaşık olarak %83, %41, %41 ve %6 oranlarında degrade ettiklerini göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, izole edilen bakterilerin petrolle kirlenmiş bölgelerde hidrokarbon biyodegradasyonunda etkili bir şekilde kullanılabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu, petrolü parçalayan bakteriler, 16S rRNA dizi analizi, GC-MS

ABSTRACT

ISOLATION and CHARACTERIZATION of PETROLEUM-DEGRADING BACTERIA from PETROLEUM CONTAMINATED SOILS

PhD THESIS

ÖMER ACER

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2014

Uncontrolled releases of petroleum compounds that are carcinogenic, mutagenic and potent immunotoxicants into soil and groundwater poses a serious threat to human and animal health. Extensive petroleum exploration, processing, storage and transportation activities often result in the pollution of the environment, which could lead to disastrous consequences for the biotic and abiotic components of the ecosystem if not taken enough precaution. Remediation of hydrocarbon-contaminated systems could be achieved by either physicochemical or biological methods. Biodegradation of hydrocarbon-contaminated soils has been established as an efficient, economic and versatile.

The aim of this study is to perform the isolation and characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated soils. Five bacterial strains belong to *Acinetobacter*, *Cronobacter* and *Stenotrophomonas* genus were isolated from petroleum contaminated soils in Diyarbakır and Batman petroleum fields respectively. Morphological, physiological, biochemical and chemotaxonomical characterization of bacterial strains were carried out. According to 16S rRNA gene sequencing analysis, five strains designated as ST5, GC2, BT1A, BT1B and 2TP1A were found to be closely related to *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter lwofii*, *Acinetobacter baumannii*, *Cronobacter malonaticus* and *Stenotrophomonas maltophilia* respectively.

Almost all bacterial strains were found to use crude petroleum as carbon and energy sources in order to grow. With the aliphatic hydrocarbons, growth was seen only in the long-chain alkanes tested (tridecane, pentadecane and hexadecane). No growth was recorded in the short-chain alkanes tested (hexane). Among the long-chain alkanes tested, generally hexadecane was the most preferred. GC-MS analysis showed that BT1A, ST5, 2TP1A and GC2 were able to degrade 83%, 41%, 41% and 6% n-alkanes in the crude oil in 7 days respectively.

As a result, the present study indicates that the isolated strains can well be used for biodegradation of hydrocarbons in oil-contaminated sites.

Keywords: Bacterial isolation and characterization, petroleum degrading bacteria, 16S rRNA sequencing, GC-MS

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Bakteri ve Arkeaların Sınıflandırma Tarihçesi	5
Çizelge 2.2.	Bakterilerin Sistematiğinde Kullanılan Bazı Kategori ve Karakterler	6
Çizelge 2.3.	Yağ Asitlerinin Yapısı	12
Çizelge 2.4.	rRNA Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Proteobakteriler Sınıfında Kabul Edilen Bakter Cinsleri	18
Çizelge 3.1.	Lipit Analizi İçin Kullanılan Bakteri Miktarları	47
Çizelge 3.2.	Gaz Kromatografisi Fırın Sıcaklık Programı	51
Çizelge 4.1.	Sodyum Azid Duyarlılığı (OD 600 nm)	94
Çizelge 4.2.	İzolatların Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl'ye Toleransları (OD 600)	95
Çizelge 4.3.	İzolatlara Ait Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	110
Çizelge 4.4.	İzolatlara Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC Analiz Sonuçları	128
Çizelge 4.5.	ST5 ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri	147
Çizelge 4.6.	GC2 ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri	148
Çizelge 4.7.	BTB ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Cronobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri	148
Çizelge 4.8.	2TP1A'ya Ait Yağ Asidi Profili	149
Çizelge 4.9.	İzolatların ^{1}HNMR ve LC-MS Analizleri Sonucu Tespit Edilen Kinon Sistemleri	154
Çizelge 4.10.	ST5'in 1523 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi	155
Çizelge 4.11.	GC2'nin 1516 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi	156
Çizelge 4.12.	BT1B'nin 1525 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi	156
Çizelge 4.13.	2TP1A'nın 1525 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi	157
Çizelge 4.14.	İzolatların Ham Petrolde Bulunan Alkanları Degradasyonu Sonundaki Yüzde Alanlar	169

Çizelge 4.15. İzolatların %1'lik Hegzadekanı Biyodegradasyonları Sonucundaki Hegzadekan Yüzde Alanları 173

Çizelge 5.1. ST5, GC2 ve BT1A'nın Fenotopik Özelliklerinin Diğer Bazı *Acinetobacter* Türleri ile Karşılaştırılması 177

Çizelge 5.2. ST5, GC2 ve Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profillerinin Karşılaştırılması 180

Çizelge 5.3. 2TP1A'nın Fenotipik Özelliklerinin Diğer Bazı *Acinetobacter* Türleri ile Karşılaştırılması 185

Çizelge 5.4. 2TP1A ve Diğer Bazı *Stenotrophomonas* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profillerinin Karşılaştırılması. 188

Çizelge 5.5. C18 ve Daha Uzun Zincirli Alkanları Karbon ve Enerji Kaynağı Olarak Kullanma Yeteneğinde Olan Bakteri Türleri 193

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Menakinonların Yapısı	14
Şekil 2.2.	Ubikinonların Yapısı	14
Şekil 2.3.	Bakterilerin İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler	15
Şekil 2.4.	Canlıların 16S ve 18S rRNA Tabanlı Filogenetik Analizi	16
Şekil 2.5.	16S rRNA Dizi Analizine Göre Bakterilerin Sınıflandırılması	17
Şekil 2.6.	16S rRNA Dizi Analizine Göre *Acinetobacter* Cinsine Ait Bakteriler Arasındaki İlişki	23
Şekil 2.7.	Tanımlanmış Geçerli 8 Tane *Stenotrophomonas* Türü ve İlişkili Taksonların Filogenetik Analizi	25
Şekil 2.8.	*Cronobacter* ve Yakın Türlere Ait 16S rRNA Gen Filogenetik Ağacı	27
Şekil 2.9.	Ülkemizde Petrolden Kaynaklı Oluşan Kirlilik (Batman-İluh Deresi)	29
Şekil 3.1.	Örneklerin Alındığı Petrol Kuyuları Çevresi	39
Şekil 4.1.	ST5'in Gram Boyama Özelliği	54
Şekil 4.2.	GC2'nin Gram Boyama Özelliği	54
Şekil 4.3.	BT1A'nın Gram Boyama Özelliği	55
Şekil 4.4.	BT1B'nin Gram Boyama Özelliği	55
Şekil 4.5.	2TP1A'nın Gram Boyama Özelliği	56
Şekil 4.6.	Sıcaklığın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi	57
Şekil 4.7.	Sıcaklığın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi	58
Şekil 4.8.	Sıcaklığın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi	58
Şekil 4.9.	Sıcaklığın BT1B'nın Üremesi Üzerine Etkisi	59
Şekil 4.10.	Sıcaklığın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi	60
Şekil 4.11.	pH'nın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi	60
Şekil 4.12.	pH'nın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi	61

Şekil 4.13. pH'nın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi 62
Şekil 4.14. pH'nın BT1B'nin Üremesi Üzerine Etkisi 62
Şekil 4.15. pH'nın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi 63
Şekil 4.16. Zamanın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi 64
Şekil 4.17. Zamanın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi 64
Şekil 4.18. Zamanın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi 65
Şekil 4.19. Zamanın BT1B'nin Üremesi Üzerine Etkisi 66
Şekil 4.20. Zamanın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi 67
Şekil 4.21. ST5'in Hareket Testi 68
Şekil 4.22. GC2'nin Hareket Testi 69
Şekil 4.23. BT1A'nın Hareket Testi 70
Şekil 4.24. BT1B'nin Hareket Testi 71
Şekil 4.25. 2TP1A'nın Hareket Testi 72
Şekil 4.26. ST5'e Ait Nişasta Hidroliz Testi 73
Şekil 4.27. GC2'ye Ait Nişasta Hidroliz Testi 73
Şekil 4.28. BT1A'ya Ait Nişasta Hidroliz Testi 74
Şekil 4.29. BT1B'ye Ait Nişasta Hidroliz Testi 74
Şekil 4.30. 2TP1A'ya Ait Nişasta Hidroliz Testi 75
Şekil 4.31. ST5'in Katalaz Testi 76
Şekil 4.32. GC2'nin Katalaz Testi 76
Şekil 4.33. BT1A'nın Katalaz Testi 77
Şekil 4.34. BT1B'nin Katalaz Testi 77
Şekil 4.35. 2TP1A'nın Katalaz Testi 78
Şekil 4.36. ST5'e Ait Jelatin Hidrolizi Testi 79
Şekil 4.37. GC2'ye ait Jelatin Hidrolizi Testi 79
Şekil 4.38. BT1A'ya Ait Jelatin Hidrolizi Testi 80
Şekil 4.39. BT1B'ye Ait Jelatin Hidrolizi Testi 80

Şekil 4.40. 2TP1A'ya Ait Jelatin Hidrolizi Testi 81
Şekil 4.41. ST5'in Oksidaz Aktivitesi 82
Şekil 4.42. GC2'nin Oksidaz Aktivitesi 82
Şekil 4.43. BT1A'nın Oksidaz Aktivitesi 83
Şekil 4.44. BT1B'nin Oksidaz Aktivitesi 83
Şekil 4.45. 2TP1A'nın Oksidaz Aktivitesi 84
Şekil 4.46. ST5'in Tirozin Degradasyon Testi 85
Şekil 4.47. GC2'nin Tirozin Degradasyon Ttesti 85
Şekil 4.48. BT1A'nın Tirozin Degradasyon Testi 86
Şekil 4.49. BT1B'nin Tirozin Degradasyon Testi 86
Şekil 4.50. 2TP1A'nın Tirozin Degradasyon Testi 87
Şekil 4.51. ST5'e Ait Üreaz Testi 88
Şekil 4.52. GC2'ye Ait Üreaz Testi 88
Şekil 4.53. BT1A'ya Ait Üreaz Testi 89
Şekil 4.54. BT1B'ye Ait Üreaz Testi 89
Şekil 4.55. 2TP1A'ya Ait Üreaz Testi 90
Şekil 4.56. ST5'in Sitrat Testi 91
Şekil 4.57. GC2'nin Sitrat Testi 91
Şekil 4.58. BT1A'nın Sitrat Testi 92
Şekil 4.59. BT1B'nin Sitrat Testi 92
Şekil 4.60. 2TP1A'nın Sitrat Testi 93
Şekil 4.61. ST5'in B10, CN10 ve NS100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 97
Şekil 4.62. ST5'in NV5, FD10 ve K5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 97
Şekil 4.63. ST5'in P10, AMP10 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 98
Şekil 4.64. ST5'in MY15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 98
Şekil 4.65. ST5'in P 2, TE 30 ve N10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 99
Şekil 4.66. GC2'nin NS 100, AMP 10 ve B10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 99

Şekil 4.67. GC2'nin NV 5, MY 15 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 100

Şekil 4.68. GC2'nin FD 10, P, 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 100

Şekil 4.69. GC2'nin CN 10, N 10 ve P 2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 101

Şekil 4.70. GC2'nin S 10, C 30 ve TE 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 101

Şekil 4.71. BT1A'nın B 10, CN 10 ve NS 100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 102

Şekil 4.72. BT1A'nın NV 5, FD 10 ve K5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 102

Şekil 4.73. BT1A'nın P 10, AMP 10, TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 103

Şekil 4.74. BT1A'nın MY 15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Olan Duyarlılığı..... 103

Şekil 4.75. BT1A'nın P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 104

Şekil 4.76. BT1B'nin P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 104

Şekil 4.77. BT1B'nin NV 5, MY 15 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 105

Şekil 4.78. BT1B'nin FD 10, P 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 105

Şekil 4.79. BT1B'nin CN 10, N 10 ve P 2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 106

Şekil 4.80. BT1B'nin S 10, C 30 ve TE 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 106

Şekil 4.81. 2TP1A'nın B 10, CN 10 ve NS 100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 107

Şekil 4.82. 2TP1A'nın NV 5, FD 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 107

Şekil 4.83. 2TP1A'nın P 10, AMP 10 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 108

Şekil 4.84. 2TP1A'nın MY 15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı..... 108

Şekil 4.85. 2TP1A'nın P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı 109

Şekil 4.86. İzolatlara Ait Glikolipitlerin Tek Yönlü TLC ile Gösterimi 111

Şekil 4.87. İzolatlara Ait Fosfolipitlerin Fosfolipit Standartlarıyla Karşılaştırılması 112

Şekil 4.88. İzolatlara Ait Aminolipitlerin Tek yönlü TLC ile gösterimi..... 112

Şekil 4.89. İzolatlara Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin Tek Yönlü TLC ile Gösterimi 113

Şekil 4.90. ST5'e Ait Glikolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Glikolipitleri İle Karşılaştırılması 113

Şekil 4.91. ST5'e Ait Fosfolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması 114

Şekil 4.92. ST5'e Ait Aminolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması 114

Şekil 4.93. ST5'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması 115

Şekil 4.94. GC2'ye Ait Glikolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'e Ait Glikolipitleri ile Karşılaştırılması 115

Şekil 4.95. GC2'ye Ait Fosfolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403 Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması..... 116

Şekil 4.96. GC2'ye Ait Aminolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'a Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması..... 116

Şekil 4.97. GC2'ye Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'a Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması ... 117

Şekil 4.98. BT1B'ye Ait Glikolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Glikolipitleri ile karşılaştırılması..... 117

Şekil 4.99. BT1B'ye Ait Fosfolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması..... 118

Şekil 4.100. BT1B'ye Ait Aminolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması..... 118

Şekil 4.101. BT1B'ye Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması 119

Şekil 4.102. ST5'e Ait Fosfolipitlerin iki Yönlü TLC ile Analizi..... 120

Şekil 4.103. GC2'ye Ait Fosfolipitlerin iki Yönlü TLC ile Analizi..... 120

Şekil 4.104. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a1)..... 121

Şekil 4.105. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a2)..... 121

Şekil 4.106. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (b)..... 122

Şekil 4.107. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (c) 122

Şekil 4.108. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (d) 123

Şekil 4.109. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (e) 123

Şekil 4.110. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (f) 124

Şekil 4.111. BT1B'ye Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi 124

Şekil 4.112. Fosfolipit Standartları Kullanılarak BT1B'ye Ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a) 125

Şekil 4.113. Fosfolipit Standartları Kullanılarak BT1B'ye Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (b) 125

Şekil 4.114. 2TP1A'ya Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi 126

Şekil 4.115. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (a) 126

Şekil 4.116. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (b) 127

Şekil 4.117. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (c) 127

Şekil 4.118. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili) 129

Şekil 4.119. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi) 130

Şekil 4.120. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi) 130

Şekil 4.121. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi) 131

Şekil 4.122. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi) 131

Şekil 4.123. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi) 132

Şekil 4.124. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi) 132

Şekil 4.125. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (h: Yağ Asidi Çeşidi) 133

Şekil 4.126. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (i: Yağ Asidi Çeşidi) 133

Şekil 4.127. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili)... 134

Şekil 4.128. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi)..... 134

Şekil 4.129. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi)..... 135

Şekil 4.130. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi)..... 135

Şekil 4.131. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi)..... 136

Şekil 4.132. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi) 136

Şekil 4.133. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi)..... 137

Şekil 4.134. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili) 137

Şekil 4.135. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi) ... 138

Şekil 4.136. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi).... 138

Şekil 4.137. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi) ... 139

Şekil 4.138. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi).... 139

Şekil 4.139. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi) 140

Şekil 4.140. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a:Total Fame Profili) 140

Şekil 4.141. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi) 141

Şekil 4.142. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi) 141

Şekil 4.143. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi) 142

Şekil 4.144. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi) 142

Şekil 4.145. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi) 143

Şekil 4.146. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi) 143

Şekil 4.147. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (h: Yağ Asidi Çeşidi) 144

Şekil 4.148. *A. calcoaceticus* DSM 30006'nın Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu 144

Şekil 4.149. *A. pittii* DSM 25618'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu ... 145

Şekil 4.150. *A. beijerinckii* DSM 22901'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu 145

Şekil 4.151. *A. lwoffi* DSM 2403'ün Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu ... 146

Şekil 4.152. *C. malonaticus* DSM 18702'nin Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu 146

Şekil 4.153. *C. sakazakii* DSM 4485'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu 147

Şekil 4.154. İzolatların İçerdiği Kinonların tek yönlü TLC'de UV Altındaki Görüntüsü 150

Şekil 4.155. ST5'in Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi 151

Şekil 4.156. GC2'nin Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi 151

Şekil 4.157. BT1B'nin Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi 152

Şekil 4.158. 2TP1A'nın Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi 152

Şekil 4.159. ST5'e Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi 153

Şekil 4.160. GC2'ye Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi 153

Şekil 4.161. BT1B'ye Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi 154

Şekil 4.162. 2TP1A'ya Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi 154

Şekil 4.163. ST5'in 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Acinetobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç 158

Şekil 4.164. GC2'nin 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Acinetobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç 159

Şekil 4.165. BT1B'nin 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Cronobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç 160

Şekil 4.166. 2TP1A'nın 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Stenotrophomonas* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç 161

Şekil 4.167. ST5'in Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm) 162

Şekil 4.168. GC2'nin Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm) ... 163

Şekil 4.169. BT1A'nın Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm) 163

Şekil 4.170. 2TP1A'nın Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm) 164

Şekil 4.171. %1'lik Ham Petrol Ortamında İnkübasyona Bırakılan Bakterilerin Üreme Görüntüleri 165

Şekil 4.172. % 1'lik Ham Petrolün (Kontrol) GC Analizi 166

Şekil 4.173. ST5'in %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi 166

Şekil 4.174. GC2'nin %'1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi 167

Şekil 4.175. BT1A'nın %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi 167

Şekil 4.176. 2TP1A'nın %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi 168

Şekil 4.177. %1'lik Hegzadekan Ortamında İnkübasyona Bırakılan Bakterilerin Üreme Görüntüleri 170

Şekil 4.178. %1'lik Hekzadekanın (Kontrol) GC Analizi 171

Şekil 4.179. ST5'in %1'lik Hekzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi 171

Şekil 4.180. GC2'nin %1'lik Hekzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi 172

Şekil 4.181. BT1A'nın %1'lik Hegzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi 172

KISALTMA VE SİMGELER

BSM	: Bazal Mineral Ortam
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
g	: Gram
g/L	: Gram/litre
mg	: Miligram
mg/mL	: Miligram/mililitre
dk	: Dakika
mL/dk.	: Mililitre/dakika
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)
nm	: Nanometre
µm	: Mikrometre
N	: Normal
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
K_2HPO_4	: Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
$Na_2HPO_4.7H_2O$	: Di sodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NH_4Cl	: Amonyum klorür
$MgSO_4$	: Magnezyum sülfat
$CaCl_2$	: Kalsiyum klorür
$FeCl_3$	: Demir (III) klorür
$MnSO_4$	: Mangan (II) sülfat
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	: Çinko sülfat heptahidrat
$(NH_4)6\ Mo_7O_{24}.4H_2O$	: Amonyum hepta molibdat tetrahidrat
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
GC-MS	: Gaz Kromotografisi/Kütle Spektrometresi
LC-MS	: Likit Kromatografisi /Kütle Spektrometresi
I_2	: İyot
KI	: Potasyum iyodür
H_2O_2	: Hidrojen peroksit

NaCI	: Sodyum klorür
H_2O	: Su
$Ce(SO_4)_2$	: Seryum sülfat
H_2SO_4	: Sülfürik Asit
M_OO_3	: Molibden trioksit
M_O	: Molibden
$CHCl_3$	: Kloroform
CH_3OH	: Metanol
CH_3COOH	: Asetik Asit
PG	: 1-(3-sn phosphatidyl)-rac-glycerol sodium salt
AP	: L-α- phosphatidic acid, dipalmitoyl
PS	: 1,2-Diacyl-sn glycero-phospho-L-serine
PC3	: 1,2Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine monohidrate
PC1	: Dipalmitoyl-om-glycerol1- phosphocholine
CLBH	: Cardiolipin Disodium salt from bavine heart
PI	: α-phosphatidic acid, dipalmitoyl, Phosphatidylinositol Sodium
PEA	: Rac-1,2 Dipalmytol-glycero-3-phosphoethanolamine
TLC	: İnce tabaka kromotografisi
TPAO	: Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı

1. GİRİŞ

Kirleticilerin topraklarda birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil, aynı zamanda besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Toprak kirliliği endüstri, madencilik ve diğer insan aktivitelerinin gelişmesi ve yaygınlaşmasıyla küresel bir problem halini almaktadır (Türkoğlu 2006). Teknolojinin gelişmesiyle hızla büyüyen sanayi ve endüstri çalışmaları daha fazla enerji gereksinimini doğurmuştur. Bu artan enerji talebi petrol ve petrol ürünlerinin kullanımını arttırarak, petrolün çıkarılmasını, işlenmesini ve nakliyesini gündeme getirmiştir (Erdoğan 2010). Petrol, son yıllarda çok büyük bir üretim serisine tanıklık eden temel bir enerji kaynağıdır. Birçok farklı sektörde kullanılan stratejik bir ürün olması; petrolü, yaşamsal bir emtia ve global ekonominin merkezi haline getirmiştir. Ancak, bu materyalin aşırı kullanımı çok ciddi çevresel sorunlara yol açmıştır. Petrol ürünlerinin çevreye dökülmesi, insan sağlığını ve ekolojik sistemleri doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek çevresel hasarlara sebep olmaktadır (Mahjoubi ve ark. 2013).

Kirletici özelliklerinden dolayı biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen petrol hidrokarbonlarından çevrenin temizlenmesi, çevre ve uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemlidir. Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi, bakterilerin metabolik yollardaki rolünün daha net ortaya konmasını sağlamıştır (Altuğ ve ark. 2007). Bakteriler, doğal yaşam ortamlarında kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Gülcan 2006).

Kirlenmiş bölgeler genellikle kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanan geniş bir mikrobiyal florayı bünyelerinde barındırır (Sing ve Lin 2008). Mikroorganizmalar ortamdaki atık organik maddeleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmakta ve yeni organik maddelere dönüştürmektedirler. Ortama verilen bu organik maddeler ise başka organizmaların besin ve enerji kaynağını oluşturmaktadır. Ancak günümüzde bu doğal denge olumsuz yönde bozulmuştur. İnsanoğlu ilerde sağlıklı bir

yaşam ve daha temiz bir dünya için ya atık üretimini azaltmalı ya da çevresel kontaminant yaratan maddeleri ortamdan temizlemelidir (Gülcan 2006). Besin zinciri üzerinde karbon ve enerji akışında bakterilerin payının anlaşılmasından sonra mikrobiyal ekoloji çalışmalarında bakteriler petrol hidrokarbonları gibi bazı kirleticilerin daha zararsız formlara dönüşmesindeki doğal mekanizmadan yararlanarak, aracı rollerinin tanımlanması açısından sıklıkla çalışmalara konu olmuşlardır (Altuğ ve ark. 2007).

Petrolle kirlenmiş alanlarda yaşayan bakteri popülasyonlarının karakterizasyonu ve degradasyon değerlerinin araştırılması, bu alanların iyileştirilmesi için yol gösterebilir. Toprağın solunum ve enzim aktivite ölçümleri, mikrobiyal sayımları ve moleküler teknoloji uygulamaları gibi kültür bağımlı veya kültür bağımsız yaklaşımlar, bu çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ile ilgili bilgi sağlayabilir. Fakat kültüre bağımlı olmayan yöntemlerle yapılan çalışmalar, sadece bakterilerin genetik kompozisyonlarını ve kominitelerin bakteriyel dağılımlarını göstermektedir. Populasyonların biyokimyasal kapasiteleri hakkında bilgi sağlayamamaktadır (Zhang ve ark. 2010).

Türkiye'de petrol, ağırlıklı olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki sahalardan üretilmektedir. Batman ve Diyarbakır'da Türkiye'nin önemli petrol yatakları bulunmaktadır. Dolasıyla bu yataklardan petrolün üretimi, depolanması ve taşınması ile petrol etrafa yayılmakta ve topraklarda petrolden kaynaklanan kirlilik oluşmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, Diyarbakır ve Batman'daki petrolle kirlenmiş alanlardan bakteri izolasyonu, tanımlanması ve bunlara ek olarak bu bakterilerin ham petrolü ve hidrokarbonları kullanabilme kapasiteleri ve parçalama karakteristiklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede bu alanlarda petrolden kaynaklanan kirliliği ortadan kaldırabilecek bakterilerin varlığı tespit edilerek bu bakterilerin petrolü parçalama kapasitelerinin belirlenmesi ve bu bakteri kominitelerinin tanımlanması ile bölgemizde petrolden kaynaklanan kirliliği gideren biyodegradasyon çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteri Sistematiği

Güvenilir bir sınıflandırma sistemi, mikroorganizmaların muazzam çeşitliliğini izlemek amacıyla, mikroorganizmalarla ilgilenen bilim adamları için bir ön koşuldur. Biyolojik sınıflandırmanın nihai hedefi; organizmaların karakterizasyonunu yapmak ve onları gruplar içerisinde kurallı bir şekilde düzenlemektir (Schleifer 2009). Sistematik ve identifikasyon, mikrobiyoloji disiplinlerinde merkezi rol oynamaktadır (Ludwig, 2007). Mikroorganizmaları belli, geçerli ve devamlı bir klasifikasyona tabi tutma fikri eskiden başlamış olmasına karşın, yeni mikroorganizmaların bulunması ve bunların değişik karakterlere sahip olmaları nedeniyle yapılan sistematikler devamlı değişmekte ve yerlerine yeni bulgulara uygun olanları hazırlanmakta ve konulmaktadır (Arda 2011).

Mikropları ilk bulan, şekillerini çizen ve hareketlerini izleyen **A.van Leeuwenhoek'**dan sonra, isveçli bir botanist olan **Carl von Linne (Carolus Linneaus)** bakterileri kendi yaptığı bir sınıflandırmaya dahil etmiş ve ilk defa **binomial sistem** içinde sınıflandırmaya çalışmıştır. **Linne ''Species Plantarum ve Systema Nature''** adlı eserlerinde binomial sisteme göre isimlendirmeye özen göstermiştir. Bu sistemde, bir mikroorganizma iki bilimsel adla belirlenmektedir. Bunlardan biri **cins (genus)** diğeri de **tür (species)** ismidir (Arda 2011). Ancak **Linne**, zamanının mikroskop değerlerinden emin olamadığı için **Antonie van Leeuwenhoek** tarafından tanımlanan mikroskobik canlıları ve istenen diğer karakterleri sınıflandıramamıştır. Tümünü omurgasızların bir sınıfına yerleştirmiş ve bu durumu Kaos olarak nitelendirmiştir. (Logan 1994).

İlk kez Danimarkalı doğa bilimci **Otto Müller,** 1773 ve 1774'te yayınlamış olduğu çalışmalarında, bu mikroskobik organizmaları sınıflandırmaya çalışmıştır. Fakat günümüzde protozoa ve bakteria olarak adlandırdığımız canlıları net olarak birbirinden ayıramamıştır. Ancak ölümünden sonra, 1876'da yayınlanan son çalışmasında, bakterileri içine alan *Monas* ve *Vibrio* olmak üzere iki form cinse yer vermiştir (Logan 1994). 1-*Monas*: oval ve yuvarlak bakteri türlerini ve 2-*Vibrio*: uzun formlu olanları içine almaktadır. Bir Alman zoolojist olan **C.G. Ehrenberg** 1828 ile 1838 yılları arasında, sınıflandırmayı biraz genişletmiş, içine bakterilerin yanı sıra protozoaları da

katmış ve bunların bazı özelliklerini de tanımlamıştır. **Ehrenberg,** mikroorganizmaları 4 cinse ayırmıştır **(*Bacterium, Sprillum, Spirochaeta, Spirodiscus*).** Alman bir biyolog olan **E. H. Haekel,** tek hücreli canlıları, gerçek hayvan ve bitkilerden ayırmak için, bunları üçüncü ve ayrı bir grup içinde **(Protista)** toplamıştır (1886) (Arda 2011).

19. yüzyılın sonları, bakteriyel taksonomi ve **Ferdinand Cohn** döneminin başlangıcı olmuştur (Schleifer 2009). Mikroorganizmaların morfolojik karakterlerini esas alan bir klasifikasyon **F. Cohn** tarafından 1872'de yapılmıştır (Arda 2011). **Ferdinand Cohn,** bakterileri 6 cins şeklinde düzenlemiş (Bitkilerin üyeleri olarak) ve bu sınıflamaya bazı sporlu bakterileri de dahil etmiştir (Logan 1994, Schleifer 2009). O dönemde morfolojinin yanı sıra, üreme gereksinimleri ve patojenik potansiyelleri, en önemli taksonomik belirteçler olarak görülüyordu. Migula**,** 1897'de mikropları sadece morfolojilerine göre değil, aynı zamanda renk (koloni) ve bazı fizyolojik karakterlerini dikkate alan (nitrojen fikzasyonu gibi) bir sistem geliştirmiş ve bunu **'' System of the Bacteria''** adı altında yayımlamıştır. Aynı yıllarda **Lehmann** ve **Neumann, ''Atlas for the Diagnostic Bacteriology''** adı altında bir yayın da yapmışlardır (1886). **D.F. Chester,** 1899 ve 1901 yılları arasında, **''Manual of Determinative Bacteriology''** yi yayımlamışlar ve bu eser, **Society of American Bacteriologists**'in kurulmasına önderlik etmiştir (Arda 2011).

20. yüzyılın başında, morfolojik özelliklerin yanı sıra daha fazla fizyolojik ve biyokimyasal özellikler, mikroorganizmaların sınıflandırılması ve tanımlanmasında önemli belirteçler olarak kullanılmıştır. Daha sonra, enzimler çalışılmış ve metabolik yollar açıklığa kavuşturulmuştur (Schleifer 2009). **Orla-Jensen** 1909'da bakterilerin fizyolojik özelliklerini içine alan bir sistematik hazırlamış ve bu klasifikasyon sonrakilere örnek teşkil etmiştir. Bakterileri modern anlamda ilk olarak sistematize etmek, 1917 yılında **Buchanan** ile başlamıştır. Başta **Buchanan** olmak üzere kendinden önce yüzden fazla mikrobiyoloğun teşviki ve yardımı ile ilk defa, 1923'de **Society of American Bacteriologists** tarafından **"Manual of Determinative Bacteriology"** yayımlanmıştır. Bu kitabı hazırlayan komitenin başına da **D.H. Bergey** getirilmiştir (Arda 2011). Bu çalışmada bakteriler, fenotopik özellikleri temel alınarak tek hücreli bitkiler olarak sınıflandırılmıştır. 1957'de yayımlanan 7. baskısında, bakteriler hala bitkiler içerisinde sınıflandırılmıştır. 1977'de kısmi 16S ribozomal RNA (rRNA) gen dizilerine dayanarak, Arkealar (orjinal ismi Arkebakteriler), ayrı bir alem (kingdom)

olarak sınıflandırılmıştır. Fransız protistologist **Edouard Chatton**, 1925'te ilk kez iki kategori şeklinde prokaryot ve ökaryotlardan bahsetmiştir. Fakat sadece prokaryotik protistleri ökaryotik protistlerden ayırmak amacıyla bu kategoriyi yapmıştır. Daha sonra 1962'de **A. Lwoff, R. Stanier ve C.B. van Niel** birlikte detaylı bir şekilde prokaryotik (bakteriler) ve ökaryotik (hayvanlar ve bitkiler) organizmaları birbirinden ayırmış ve bu önerileri büyük ölçüde kabul görmüştür (Schleifer 2009). Bergey's Manual, zamanla geliştirilerek 1974'de 8. baskısını yapmıştır. Bu baskıda, bakterilerin artık bitki olarak düşünülmeyip, Prokaryot alemine ait üyeler olduğu kabul edilmiştir (Schleifer 2009). 1984-1986 yıllarında "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"** adı altında ve 4 ciltlik bir kitap yayınlanmıstır. **Determinative Bacteriology'**nin 1994'te 9. baskısı yapılmıştır. Bakteri ve arkeaların sınıflandırma tarihçesi çizelge 2.1'de verilmiştir (Schleifer 2009).

Çizelge 2.1. Bakteri ve Arkeaların Sınıflandırma Tarihçesi

Zaman Süreci	Sınıflandırmada Temel Alınan Özellikler
19. Yüzyılın Sonları	Morfoloji, üreme koşulları, Patojenik potansiyeli
1900-1960	Morfoloji, fizyoloji, biyokimya
1960-1980	Kemotaksonomi, Sayısal Sınıflandırma, DNA-DNA Hibridizasyonu
1980-Günümüz	Genotipik Analizler, Multilokus dizi analizleri, Nükleotit benzerlikleri, Tüm Genom Analizi

2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Birçok makroskobik organizma, gözle görülebilen yapısal özelliklerine göre sınıflandırılabilmektedir. Bunun yanında mikroskobik organizmaları özellikle de bakterileri sınıflandırmak oldukça güçtür. Çünkü bakterilerin çoğu, benzer yapılara sahiptir. Bakterileri; hücre şekli ve boyutu, flagella, endospor ya da kapsül gibi özel yapılara göre sınıflandırmak yeterli olmamaktadır. Bu yüzden başka kriterlerin

kullanılması gerekmektedir. Boyama reaksiyonları, özellikle gram boyama, morfoloji, üreme özellikleri, besin gereksinimleri, fizyolojik özellikler, biyokimyasal özellikler, genetik ve moleküler analizler bakterileri sınıflandırmada kullanılan yöntemlerdir (Black 1996, Schleifer 2009). Bakterilerin sistematiğinde kullanılan bazı kategorler, karakterler ve yöntemler Çizelge 2.2 (Busse ve ark.1996 ve Black 1996' dan modifiye edilmiştir.) ve Şekil 2.3'te (Vandamme ve ark. 1996'dan modifiye edilmiştir) verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bakterilerin Sistematiğinde Kullanılan Bazı Kategori ve Karakterler

Kategoriler	**Örnekler**
Üreme	Sıvı ve katı kültürlerdeki ayırt edici özellikleri, koloni morfolojisi, koloni rengi, pigment oluşumu
Morfolojik Özellikler	Hücre morfolojisi, hücre boyutu, hareket, Gram boyama, asit fast boyama, flagella tipi, endospor, kapsül
Fizyolojik Özellikler	Sıcaklık (optimum ve aralık), pH (optimum ve aralık), oksijen gereksnimi, tuz gereksinimi ve toleransı
Biyokimyasal Özellikler	Karbon kaynağı kullanımı, karbonhidrat oksidasyonu, karbonhidrat fermantasyonu, enzim profili
İnhibitör Testleri	Seçici ortam, antibiyotik dirençliliği ve duyarlılığı
Serolojik Testler	Aglütinasyon
Kemotaksonomik Analizler	Yağ asidi, polar lipid, kinon sistemleri, lipopolisakkarit kompozisyonu, hücre aminoasit kompozisyonu, tüm hücre şekerleri, hücre duvarı şekerleri, hücre proteinleri
Genetik Analizler	DNA baz oranı (G+C oranı), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), RFLP (Restriction fragment lenght polymorphism), PFGE (Pulsedfield gel electrophoresis of DNA fragments)
Filogenetik Analizler	DNA-DNA hibridizasyonu, DNA-RNA hibridizasyonu, 16S rRNA dizi analizi, 23S rRNA dizi analizi

2.2.1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemler, DNA ya da RNA ile direkt bağlantılı olmayan testleri kapsamaktadır. Klasik ya da geleneksel fenotipik testler çoğunlukla identifikasyonda, temel mikrobiyoloji laboratuarlarında kullanılan testlerdir. Bakterilerin klasik fenotipik özellikleri; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini kapsamaktadır. Bu özelliklerin çoğunun genetik ilişkiler için ilgisiz parametreler olduğu gösterilmiştir. Ancak bir bütün olarak taksonları tanımlamak için açıklayıcı bilgiler sağlamaktadır (Vandamme ve ark. 1996).

2.2.1.1. Morfolojik Özellikler

Morfolojik ya da yapısal özellikler, taksonomistlere organizmaları sınıflandırmak için yardımcı olmuştur. Yüksek yapılı organizmalar genellikle anatomik detaylarına göre sınıflandırılır. Fakat birçok mikroorganizma yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması için mikroskopta aynı görünebilirler. Hücre morfolojisi filogenetik ilişkiler hakkında bize az bilgi verir. Ancak morfolojik özellikler bakterileri identifiye etmek için hala kullanılan araçlardır (Güven ve ark. 2011). Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle ancak mikroskoplar (ışık mikroskobu, karanlık saha, faz kontrast, elektron mikroskop, vd.) altında gözlenerek, saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin **bireysel formları** (yuvarlak, oval, kokoid, çomak, kokobasil, virgül, spiral, pleomorfik, vd.), **büyüklüğü** (küçük, büyük, vs.), **kenarları** (düz, köşeli, eğri, paralel, vd.), **dizilişi** (küme, zincir, flament, vd.), **spor durumu** (var veya yok, varsa terminal, subterminal, sentral, lateral, vd.) ve boyanma özelliği (Gram-negatif veya pozitif, asido rezistans, homojen boyanma, vd.), **flagella** ve **fimbria** muayeneleri çok iyi incelenir. Ayrıca taze sıvı ortamlardan hazırlanan natif preparatlarla da **hareket muayenesi** de yapılabilir. Bu muayenede aynı zamanda hem morfoloji hem de hareketli olup olmadıkları hakkında bir fikir edinilebilir (Arda 2011).

2.2.1.2. Fizyolojik Özellikler

Bakterilerin cinslerine göre fizyolojik karakterleri de değişmektedir. Üreme sıcaklıkları, inkübasyon süreleri, oksijene ihtiyaç durumları, besiyerinin bileşimi ve diğer fizyolojik özelliklerinin araştırılması ve saptanması gereklidir.

2.2.1.3. Biyokimyasal Özellikler

Mikroorganizmaların tayininde biyokimyasal aktivitenin belirlenmesinin önemi çok fazladır. Bu amaçla, çok değişik testler kullanılır. Bunlar arasında, nişasta, jelatin, katalaz, üre, oksidaz, nitrat ve nitrit redüksiyonu, karbonhidrat kullanımı gibi testler, mikroorganizmaların türüne göre seçilerek kullanılır.

2.2.2. Genotipik Yöntemler

Tam bir tür teşhisi için morfolojik ve fizyolojik testler tek başına yeterli değildir. Bakteri sınıflandırılmasında kullanılan metotlar (fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik) çok zahmetli olduğundan birçok yeni metot geliştirilmeye çalışılmıştır (Gül-Güven 2007). Doğru teşhis için genetik analizlerin de yapılması gerekmektedir. Bakteri sınıflanmasında genetik inceleme yöntemleri önemli bir yer tutmaktadır (Bilgehan 1999). Bakterilerin genetik materyalleri, kompozisyon bakımından farklar gösterirler (Arda 2011). Genotipik yöntemler, DNA ya da RNA moleküleriyle direkt ilişkili olan yöntemlerdir. Bu yöntemler, teknolojik ilerlemelerin bir sonucu olarak, günümüzde modern taksonomik çalışmalarda baskın rol oynamaktadır.

2.2.2.1. GC Oranları

Bakteriyal taksonların belirlenmesinde kullanılan klasik genotipik yöntemlerden biri DNA'da bulunan guanin (G) + sitozin (C) içeriğinin belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır (Vandamme ve ark. 1996, Busse ve ark. 1996, Ludwig 2007). GC oranı bir organizmanın DNA'sındaki guanin ve sitozin bazlarını içeren toplam nükleik asit yüzdesi olarak tanımlanır. Bu oran, DNA'nın erime sıcaklığının ölçümü veya kromotografi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir (Madigan ve Martinko 2010). Genel olarak, bir türde G+C oranlarının %5'ten ve bir cinste ise %10'dan fazla farklılık göstermemesi gerekmektedir (Busse ve ark. 1996, Schleifer 2009). Tayin için bu metot,

diğer metotlara oranla daha az önemlidir. Çünkü birçok taksonda G+C içerik değerleri aynı aralıkta bulunmaktadır (Busse ve ark. 1996).

2.2.2.2. 16S rRNA Analizi

Uzun bir süre bakteriyel taksonomi, mikrobiyolojinin en sıkıcı alanlarından biri olarak kabul edilip bilim adamlarının tercih ettikleri bir bilim dalı olmamıştır. Son zamanlarda 16S rRNA dizi analizi ile ilgili çarpıcı gelişmeler bu tutumun değişmesine yol açmıştır (Vandamme ve ark. 1996). Günümüzde rRNA, prokaryotik canlıların filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında en iyi hedef olarak kabul edilmekte ve birçok filogenetik araştırma, RNA'ya bağlı olarak yapılmaktadır (Vandamme ve ark. 1996, Busse ve ark. 1996, Schleifer 2009). Çünkü tüm bakterilerde bulunan, fonksiyonel olarak sabit, son derece korunmuş ve aynı zamanda değişken domainlerdir (Vandamme ve ark. 1996). rRNA yaklaşımı, günümüzde birçok mikrobiyoloji disiplinlerinde en yaygın kullanılan standart tekniklerden biridir (Ludwig ve ark. 1998). Bu alandaki ilerlemeler, PCR'ın geliştirilmesi ile elde edilmiştir. Bu sayede spesifik genlerin hem izole edilen bakterilerden hem de kültürü yapılmayan bakterilerden amplifikasyonu (16S rDNA), sekanslama ve filogenetik değerlendirmeler için hızlı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Busse ve ark. 1996, Schloter 2000). Birbirlerine çok yakın olan türlerin 16S rRNA dizilerinin karşılaştırılması ile bu molekülde filogenetik araştırmalar için önemli olan korunmuş bölgelerin yanı sıra oldukça değişken olan fragmentlerin varlığı tespit edilmiştir. 16S rRNA'da bulunan bu değişken fragmentlerin dizileri, birbirlerine çok yakın olan türleri birbirlerinden ayırmak için kullanılabilir (Busse ve ark. 1996). Prokaryotlarda 16S rRNA dizi benzerliği %98.7 ve daha az ise bu organizmaların farklı türlere ait olduğu düşünülebilir. Çünkü bu rRNA'daki farklılık, DNA-DNA hibridizasyonundaki %70'ten daha düşük olan benzerlikle yakından ilişkilidir (Schleifer 2009).

2.2.2.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Tür düzeyinde kesin tanımlama yapabilmek için genelde DNA-DNA hibridizasyonu tavsiye edilmektedir (Busse ve ark. 1996). Genomik hibridizasyon, iki DNA arasındaki dizi benzerliğinin derecesini ölçer ve rRNA dizilemesinin ayırım sağlayamadığı durumlarda çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde kullanılır. DNA-DNA hibridizasyonu, iki organizmanın genlerindeki küçük farklılıkları

ortaya çıkarmak için kullanılan hassas bir yöntemdir. Taksonomik çalışmalarda kullanılan genomik hibridizasyon aslında SSU ribozomal RNA dizilemesi ve fenotopik analizlerin, iki farklı tür olduğundan şüphelenilen organizmalar arasında belirgin bir farklılık ortaya koyamadığı durumlarda kullanılır (Madigan ve Martinka 2010). Aynı türden gelen iki organizma arasında, DNA-DNA hibridizasyonu sonucu DNA benzerliği genelde %70 ve üzerindedir. Farklı türden geliyorsa bu oran % 70'in altındadır (Cohan 2002, Madigan ve Martinka 2010). %20 ile %60 arasındaki benzerlik ise cins düzeyinde kanıt sağlar (Busse ve ark. 1996). Bu değerleri elde etmek için gerekli olan teknikler, pahalı, zaman alıcı ve genelde özel aletler ve radyoaktif etiketler gerektiren tekniklerdir (Zeigler 2003).

2.2.3. Kemotaksonomik Yöntemler

Hücre bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu, prokaryotların sınıflandırılmasında ve tayininde kullanılan oldukça kullanışlı özelliklerdir. Kemotaksonomik yöntemler, özellikle morfolojik ve fizyolojik analizlerin tanımlamada yeterli olmadığı durumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

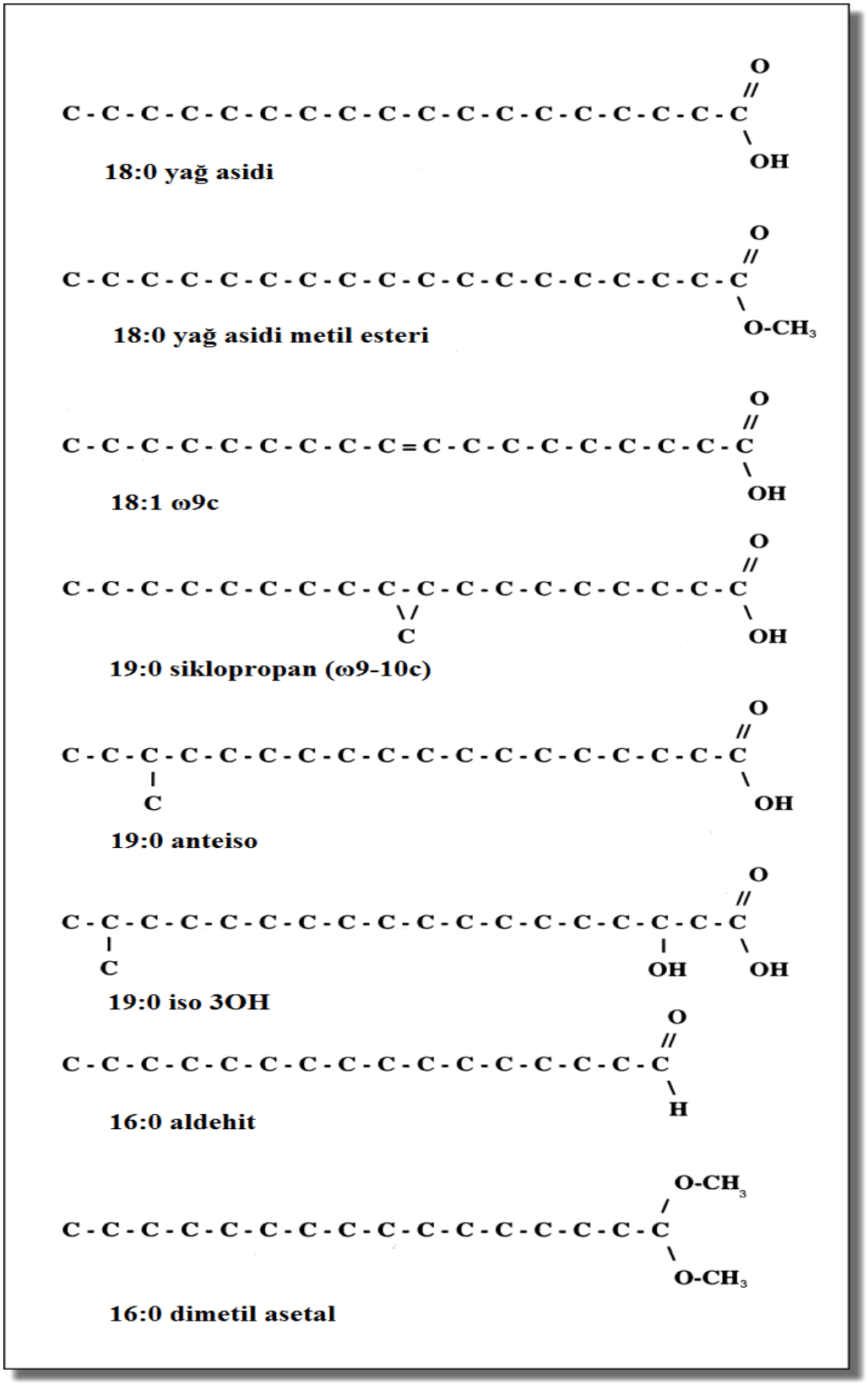
2.2.3.1. Yağ Asidi ve Lipit Analizi

Bakteriyel sınıflandırmadaki diğer popüler yöntemlerden biri de, hücrelerin stoplazmik membranlarındaki ve dış membranlarındaki (Gram-negatif bakteriler) lipitlerde bulunan yağ asidi tiplerinin ve oranlarının karakterizasyonudur. Bu teknik yağ asidi metil esterin **FAME** (Fatty acid metil ester) şeklinde kısaltılması ile adlandırılır (Madigan ve Martinko 2010). Yağ asitleri genel olarak Gram-negatif bakterilerin dış membranında, fosfolipitlerin ve lipopolisakkaritlerin bileşenleri olarak ve Gram-pozitif bakterilerde, lipoteikoik asidin bileşenleri olarak stoplazmik membrana yerleşmişlerdir (Busse ve ark. 1996). Prokaryotlardaki yağ asidi içerikleri oldukça çeşitlilik gösterip bu değişiklikler yağ asidinin zincir uzunluğu, çift halka yapısı, dallanmış zincirler ve hidroksil grup içerip içermemesi gibi farklılıkları kapsar (Çizelge 2.3 (Sasser 2010)). Bu nedenle yağ asidi profili genellikle belirli bir bakteri türünü teşhis edebilir (Madigan ve Martinko, 2010) ve taksonomide yaygın olarak kullanılır (Vandamme ve ark. 1996). Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan bu yöntemin önemi, bu moleküllerdeki büyük orandaki yapısal farklılıklara dayanmaktadır (Busse ve ark. 1996). Yağ asitlerinin 300'den fazla farklı kimyasal yapıları tespit edilmiştir

(Vandamme ve ark. 1996, Sasser 2009). Bu yapısal farklılıklar: Doymuş ve doymamış (genellikle tekli doymamış) yağ asitlerinin varlığı, yağ asidi zincir uzunluğundaki farklılıklar (çoğunlukla bakterilerde, 8-20 C-atomu içeren yağ asitleri bulunur), dallanmış yağ asitlerinin bulunuşu (iso ve anteiso ve moleküldeki metillenmeler), siklopropan yağ asitlerinin oluşumu (C17:0, C19:0) ve moleküldeki 2. veya 3. pozisyonda bir OH-grubu ile hidroksi-yağ asitinin bulunmasıdır. Bakterilerin sınıflandırılması ve identifikasyonu için, bakterilerin ve yakın türlerinin yağ asitlerinin varlığı analiz edilir ve referans türlerin yağ asidi profilleri ile karşılaştırılır (Busse ve ark. 1996). Hücresel yağ asidi metil ester içeriği oldukça standardize şartlarda elde edilen sabit parametrelerdir. Bu yöntem, ucuz ve hızlı bir yöntem olup oldukça yüksek derecede otomasyona ulaşmaktadır (Vandamme ve ark. 1996). Rutin analizlerde, standart koşullar altında üretilmiş bir bakteri kültürünün hücre hidrolizatlarından eksaktre edilen yağ asitleri, kendi metil esterlerini oluşturmak için kimyasal olarak türevlendirilir. Uçucu hale getirilen bu türevler daha sonra gaz kromotografisi ile teşhis edilir. Tanımlanmamış bakterilerden elde edilen yağ asitlerinin tipini ve miktarını gösteren kromotogram daha sonra aynı koşullar altında geliştirilmiş referans bakterilere ait binlerce yağ asidi profili içeren bir veri tabanı ile karşılaştırılır. Bilinmeyen bakteriye en çok uygunluk gösterenler seçilir (Madigan ve Martinko 2010).

Bakteri hücrelerinde çok çeşitli lipit bulunmaktadır. Polar lipitler, bilayer bakteriyel membranların en önemli bileşenleridir. Sınıflandırma ve identifikasyonda sıklıkla kullanılmaktadır. Sfingofosfolipit gibi diğer lipit çeşitleri, az sayıdaki taksonlarda bulunmakta ve bu gruplar içerisinde değerlendirilebilmektedir (Vandamme ve ark. 1996). Bakterilerde en yaygın bulunan polar lipitler fosfolipit, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilgliserol, difosfatidilgliserol, fosfatidilkolin, fosfatidilinositol ve diğer fosfatidilglikolipidlerdir. Ayrıca fosfor içermeyen, ornitin, serin ve glikolipid içeren polar lipitler bakterilerde yaygın olarak bulunur. Polar lipitler, sadece polar baş ile değil aynı zamanda farklı yağ asitlerinin (hidroksi ve non-hidroksi yağ asidi) bulunması ile farklılık gösterir. Aynı organizmada bulunduğu zaman; bu farklılık, iki boyutlu ince tabaka kromotografisinden sonra fosfatidil-etanolaminin 2 spot şeklinde gözükmesi ile sonuçlanır. Tekli polar lipitlerin varlığı ya da polar lipit kompozisyonu taksonların ayırıcı özelliğini gösterebilmektedir (Busse ve ark. 1996).

Çizelge 2.3. Yağ Asitlerinin Yapısı

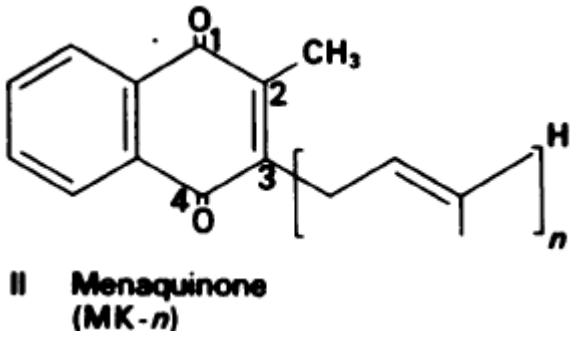


2.2.3.2. Kinon Analizi

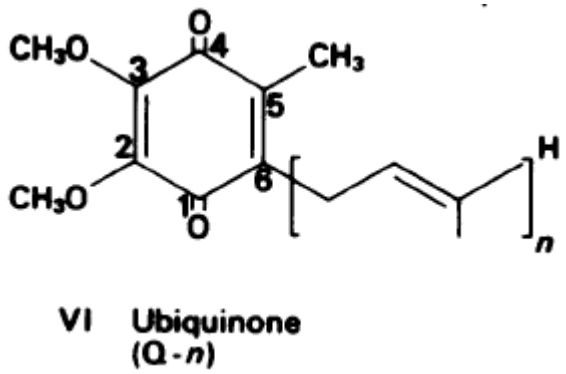
Kinonların en önemli yönleri, solunum zincirinde ve fotosentetik elektron sisteminde elektron taşıyıcıları olarak işlev görmesidir. Biyolojik önemlerinin yanı sıra kinonlar, mikrobiyal sistematikle olan önemli ilişkileri nedeniyle dikkat çekmiştir (Hiraishi 1999). İzoprenoid kinonlar, bakterilerde stoplazmik membranların bileşenleri olarak bulunmakta ve elektron taşıma sisteminde önemli rol oynamaktadırlar (oksidatif fosforilasyon ve aktif transportta) (Collins ve Jones 1981, Vandamme ve ark. 1996, Busse ve ark. 1996). İzoprenoid kinonlar bakterilerde geniş yayılış gösterirler (Collins ve Goodfellow 1979). Mikrobiyal kinonlar, yapısal olarak naftokinon ve benzokinon olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır (Collins ve Jones 1981, Hiraishi 1999). Bunlar sırasıyla menakinon (Önceleri Vitamin K1 olarak adlandırılmaktaydı) ve ubikinon (Önceleri KoenzimQ olarak adlandırılmaktaydı) olarak temsil edilmektedir. Menakinon bakteriyel olarak ilk kez çürümüş balık yeminden 1939'da izole edilmiş ve kimyasal yapısı 1959'da tespit edilmiştir. Menakinon molekülleri, 3. pozisyonda bir poliizoprenil yan zincir taşıyan 2-metil-1,4-naftokinon türevleridir (Şekil 2.1 (Collins ve Jones 1981)). Yan zincirlerindeki izopren sayısına (n) göre adlandırılır ve MK-n şeklinde isimlendirilir. Eğer menakinon, yan zincirlerinde kısmi olarak hidrojenlenme varsa MK-n(H_X) şeklinde adlandırılır (Hiraishi 1999). Menakinonlar, Gram-negatif, Gram-pozitif ve arkebakterilerde bulunur (Hedrick ve White 1986). Filokinon, ilk kez 1939'da alfalfadan izole edilmiştir. Vitamin K'nın diğer grubunu oluşturmakta ve 3. pozisyonda tekli doymamış bir phytl grubu içermektedir (Hiraishi 1999).

Ubikinonlar, naftokinondan sonra bulunmuş olup tam olarak 1958'de karakterize edilmiştir. 6. pozisyonda bir poliizoprenil yan zincirine sahip olan 2,3-dimetoksi-5-metil-l,4-benzokinon türevidir (Şekil 2.2 (Collins ve Jones 1981)). Ubikinonlar, menakinonlarda olduğu gibi, yan zincirlerdeki izopren ünitelerin sayısına (n) ve hidrojenlenme derecesine göre adlandırılır ve sırasıyla Q-n ve Q-n(H_x) şeklinde isimlendirilir. (Hiraishi 1999). Genellikle ökaryotlarda ve bazı Gram-negatif bakterilerde bulunur (Hedrick ve White 1986). Mikrorganizmalarda bulunan en yaygın ubikinon çeşitleri, Q-6-Q-14'tür. Diğer temel benzokinon sınıfı, ilk olarak 1946'da alfalfadan izole edilen plastokinondur. Plastokinonlar, poliizoprenil bulunan bir yan zincire sahip olan 2,3-dimetil-1,4-benzokinon türevleridir (Hiraishi 1999).

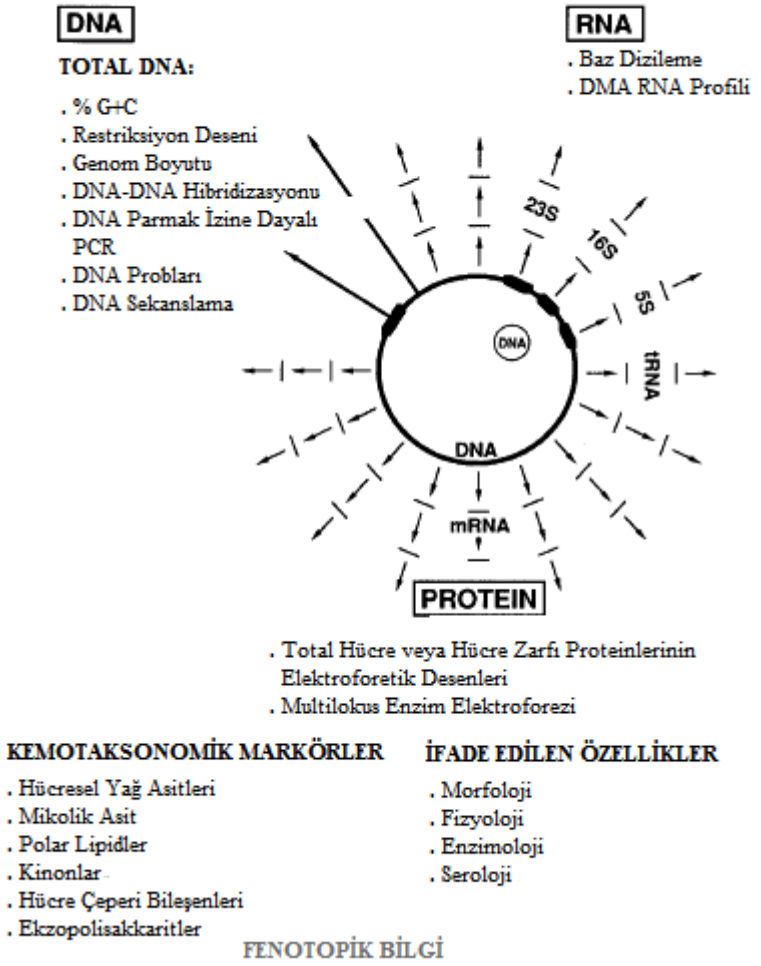
Farklı bakteriler sadece farklı kinon çeşitleri sentezlemez aynı zamanda poliprenil yan zincirlerin uzunluğu ve doymuşluk derecesi, bakteriyel sınıflandırma için oldukça önemlidir (Schleifer 2009). Bakterilerin karakterizasyonunda kinon analizi farklı kinon tiplerine (Ubikinon, menakinon ve onların türevleri olan dihidromenakinon, dimetilmenakinon ve rhodokinon), izoprenoid yan zincirlerin uzunluğu ve doymuş izoprenoid ünitelerinin sayısına dayanmaktadır (Busse ve ark. 1996). Zorunlu aerobik Gram-negatif bakteriler sadece ubikinon üretirken, fakültatif anaerobik Gram-negatif bakteriler ek olarak menakinon da içermektedir. Aerobik ve fakültatif anaerobik Gram-pozitif bakteriler sadece menakinon üretmektedir. Zorunlu anaerobik bakteriler izoprenoid kinonları ya hiç içermezler ya da sadece menakinonları içerirler (Schleifer 2009).



Şekil 2.1. Menakinonların Yapısı



Şekil 2.2. Ubikinonların Yapısı



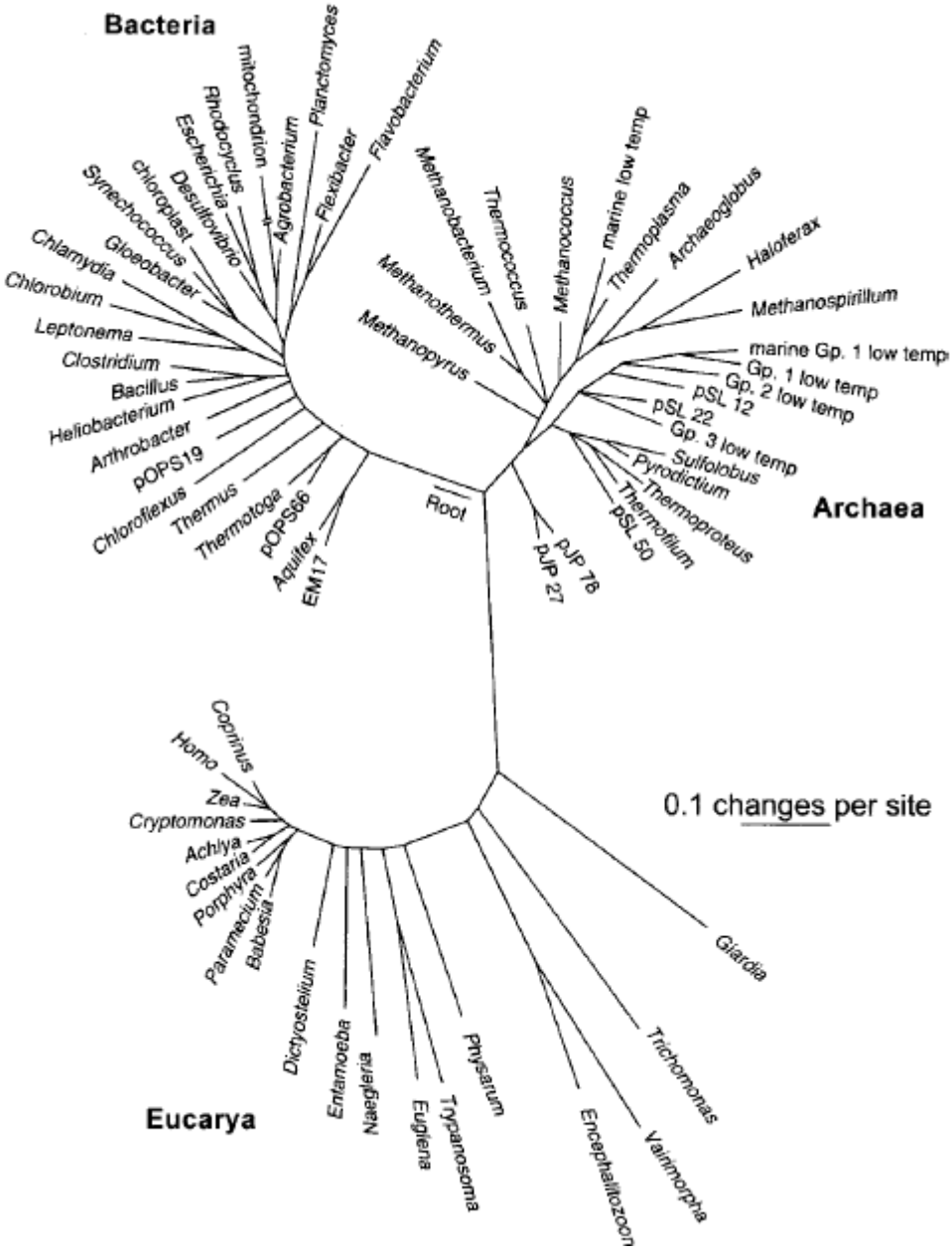
Şekil 2.3. Bakterilerin İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler

DMA: düşük molekül ağırlıklı

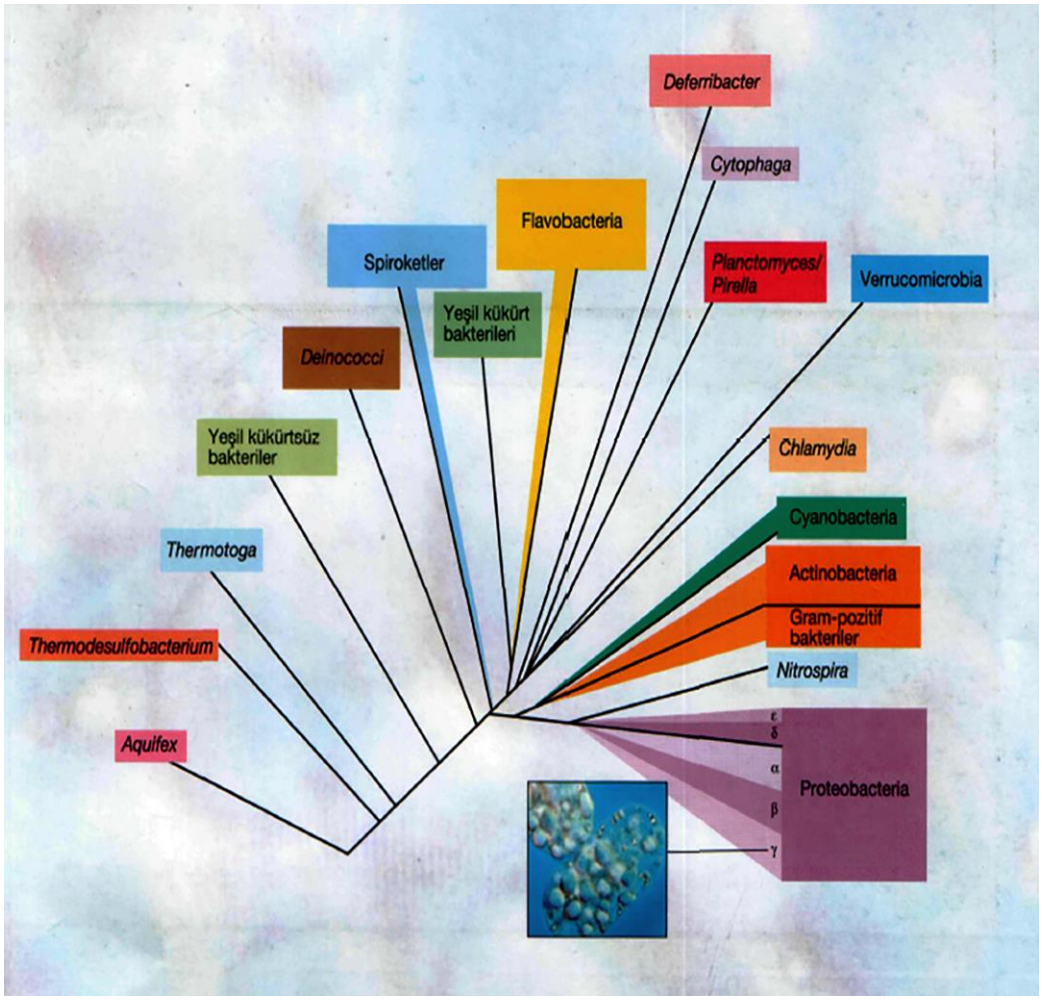
2.3. Bakterilerin Sınıflandırılması

Sınıflandırma, genellikle identifikasyon ile karıştırılır. Aslına bakılırsa sınıflandırma, identifikasyon için bir ön koşuldur (Schleifer 2009). Daha önceleri biyologlar, canlılar dünyasını beş alem içerisinde gruplandırıyordu: bitkiler, hayvanlar, funguslar, protistalar ve monera (prokaryotlar). Moleküler filogeni, beş alem sisteminin beş temel evrimsel soyu temsil etmediğini ortaya çıkarmıştır. Bunun yerine, yeryüzündeki hücresel yaşam, ikisi kendisine has şekilde sadece mikrobiyal ve sadece prokaryotik hücrelerden oluşan domain adı verilen üç temel soy üzerinden evrimleşti. Üçüncü soy ise ökaryotları içerip monera hariç özgün beş alem sisteminin hepsini

kapsar. Prokaryot gruplar, *Bacteria ve Archea*'dir; ökaryotik domain *Eukaryatlar* olarak adlandırılır (Şekil 2.4 (Clarridge 2004)). Bu terimler yaşamın üç domainini temsil eder ki domain biyolojik taksonların en üst seviyesidir (Madigan ve Martinko 2010). Bakterilerin sınıflandırılması, bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi Alem, Bölüm, Sınıf, Takım, Familya, Cins ve Tür esasına göre yapılmaktadır (Özçelik 1998). Şekil 2.5, 16S rRNA dizi analizine göre bakterilerin sınıflandırılmasını göstermektedir (Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 2.4. Canlıların 16S ve 18S rRNA Tabanlı Filogenetik Analizi



Şekil 2.5. 16S rRNA Dizi Analizine Göre Bakterilerin Sınıflandırılması

2.4. Proteobakteriler

Proteobakteriler (Proteobacteria), bakterilerin ana gruplarından birini temsil etmektedir. Çeşitli patojenleri ve bilimsel olarak diğer pek çok dikkate değer bakteri cinslerini içerir. Bazıları bağımsız olarak yaşarlar ve azot fiksasyonundan sorumlu olan pek çok bakteri türünü içerirler. Proteobakteriler, bakteriler içerisinde en geniş yayılış sergileyen ve en fazla çeşitliliğin görüldüğü gruptur. Bu grup, Carl Woese tarafından 1987'de ribozomal RNA (rRNA) dizinlerine göre tanımlanmıştır. Bakteri biçimlerinin çeşitliliğinden dolayı grup ismini Yunan mitolojisinde yer alan, her şekle girebilen tanrı Proteus'tan almıştır (Proteus aynı zamanda Proteobakterilerde yer alan bir cinsin de adıdır). Proteobakterilerin tümü Gram-negatiftir. Dış zarları başlıca lipopolisakkaritlerden oluşur. Çoğu flagella ile hareket eder ama bazıları hareketsizdir

ya da bakteriyel kayma hareketi ile hareket ederler. Metabolizma tipleri bakımından da bu grupta büyük bir çeşitlilik vardır. Çoğu fakültatif veya zorunlu anaerobik ve heterotrofiktir. Fakat pek çok istisnai durum da mevcuttur. Birbiriyle yakın ilişkisi olmayan bazı cinsler fotosentez yoluyla ışığı enerjiye dönüştürürler. Bunlar kırmızımsı pigmentlerini kullanan mor bakterilerdir. Ribozomal RNA dizileri arasındaki benzerliklere bağlı olarak proteobakteriler, Alfaproteobakteriler, Betaproteobakteriler, Gammaproteobakteriler, Deltaproteobakteriler ve Epsilonproteobakteriler olmak üzere beş sınıfa ayrılmıştır (Çizelge 2.4 (Stackebrandt ve ark. 1988)) (Stackebrandt ve ark. 1988, Kersters ve ark. 2006, http://en.wikipedia.org/wiki/Proteobacteria#External links).

Çizelge 2.4. rRNA Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Proteobakteriler Sınıfında Kabul Edilen Bakter Cinsleri

Takson	**Bulunduğu Altsınıf**
Rhodohacter	**Alfa**
Rhodomicrobium	
Rhodopseudomonas	
Rhodopila	
Rhodospirillum	
Acetobacter	
Acidiphilium	
Agrobacteriurn	
Ancalornicrobium	
Aquaspirillum	
Azospirillurn	
Beijerinckia	
Blastobacter	
Brady rh izo bium	
Caulobacter	
Erythrobacter	
Filornicro bium	
Gemmobacter	
Gluconohacter	
Hyphomicrobiurn	
Hyphornonas	
Me thy lobacteriurn	
Mycoplana	
Nitrobacter	
Paracoccus	
Pedornicrobium	
Phy llobacterium	
Phenylobacterium	
Prosthecornicrobium	
Rhizohium	
Rochalimaea	
Stella	

Çizelge 2.4'ün devamı

Takson	Bulunduğu Altsınıf
Xanthobacter	
Zymornonas	
Rhodocyclus	**Beta**
Achromohacter	
Alcaligenaceae	
Alcaligenes	
Bordetella	
Aquaspirillum	
Chrornobacteriurn	
Comamonas	
Derxia	
Janthinobacterium	
King ella	
Leptothrix	
Methylomonas Clara	
Methanolomonas	
Methanomonas	
Neisseria	
Nitrosococcus	
Nitrosolobus	
Nitrosospira	
Nitrosovibrio	
Oligella	
Pseudornonas acidovorans complex	
Pseudornonas solanacearum complex	
Sirnonsiella	
Sphaerotilus	
Sp irill urn	
Tuy lorella	
Thiobucillusd	
Vitreoscilla	
Xy lophilus	
Chrornatiaceae	**Gamma**
Amoehohacter	
Chrornatiurn	
Larnprocystis	
Th iocapsa	
Thiocystis	
Thiodictyon	
Th iospirillurn	
Ectothiorhodospiraceae	
Eciothiorhodospira	
Acinetobacter	
Aeromonadaceae	
Aerornonas	
Alterornonas	
Alysiella	
Azornonas	
Azotobacter	
Beggiatoa	
Branhamella	
Deleya	
Enterohacteriaceae	
Budvicia	
Buttiauxella	

Çizelge 2.4'ün devamı

Takson	Bulunduğu Altsınıf
Cedecea	**Gamma**
Citrobacter	
Edwardsiella	
Enterohacter	
Erwinia	
Esch erichia	
Hafnia	
Klebsiella	
Kluyvera	
Leclercia	
Leminorella	
Moellerella	
Morganella	
Obesurnbacterium	
Proteus	
Providencia	
Rahnella	
Salmonella	
Serratia	
Shigella	
Taturnella	
Yersinia	
Yokenella (= *Koserella)*	
Xenorhabdus	
Frateuria	
Halornonas	
Legionella	
Leucothrix	
Lysohacter	
Marinornonas	
Moraxella	
Oceanospirillurn	
Pasteurellaceue	
Pasteurella	
Plesiornonas	
Pseudomonas juorescens complex	
Psychrobacter	
Ruminobacter	
Serpens	
Th iorn icrospir	
Thiothrix	
Vibrionaceae	
Enhydrobacter	
Listonella	
Vibrio	
Photobacterium	
Skewanella	
Xanthomonas	
Xylella	
Bdellovibrio	**Delta**
Desulfobucter	
Desulfobulbus	
Desulfococcus	
Desulfonema	
Desulfovibrio	
Desulfuromonas	

Çizelge 2.4'ün devamı

Takson	Bulunduğu Altsınıf
Myxococcuceae	**Delta**
Chondromyces	
Cy stobacter	
Myxococcits	
Nannocystis	
Sorangium	
Stigmatella	
Pelobacter	

2.4.1. *Acinetobacter* Cinsi

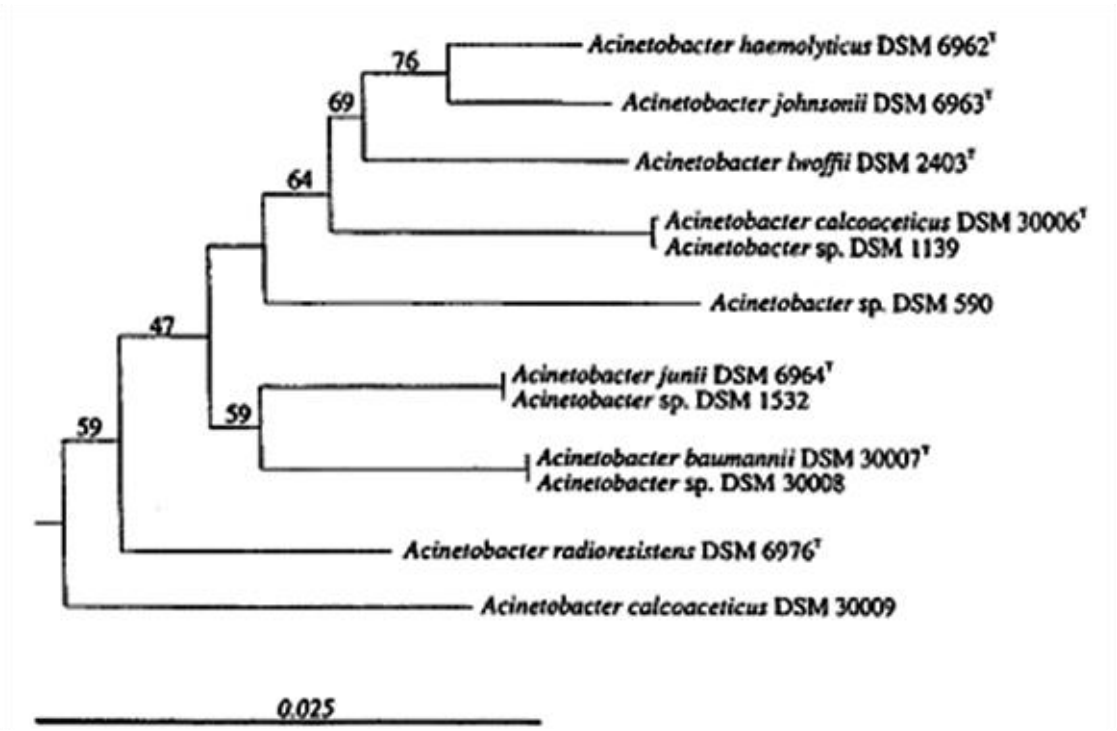
Acinetobacter cinsi doğada yaygın olarak bulunur ve topraktan, su yüzeyinden, kanalizasyon sularından, aynı zamanda sağlıklı insanların derilerinden de izole edilebilmektedir (Berlau ve ark. 1999). *Acinetobacter* cinsine ait olan ilk suş 1911'de Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır. Bu cinse ait bakteriler önceleri uzun bir süre yetersiz bir şekilde tanımlanmış ve bir düzineden fazla bakteri cinsi içerisinde kafa karıştırıcı bir şekilde sınıflandırılmıştır (*Achromobacter, Alcaligens, Cytophaga, Diplococcus, Bacterium, Herellea, Lingelsheimia, Mima, Micrococcus, Moraxella* ve *Neisseria*). Bu cins ilk olarak 1954'te Brisou ve Prevot tarafından oluşturulmuştur. Hareketli olan *Achromobacter*'den ayırılmış ve hem oksidaz pozitif hem de oksidaz negatif türleri kapsayan, pigment oluşturmayan Gram-negatif saprofitik bakterilerden oluştuğu düşünülmüştür (Doughari ve ark. 2011). Kapsamlı besinsel çalışmalar, oksidaz-negatif türlerin oksidaz pozitif türlerden farklı olduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Bunun üzerine *Acinetobacter* cinsinin sadece oksidaz-negatif türleri içerdiği önerilmiştir. Bu ayırım transformasyon testleri ile de desteklenmiştir (Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Başlangıçta üç tür bu cins içerisine dahil edilmiştir. Fakat fizyolojik özelliklerine göre bunları birbirinden ayırmakta güçlük çekildiği için tüm türler *Acinetobacter calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır. Aslında ''Bergy's Manual of Bacteriology'', bu bakterileri *Neisseriaceae* familyası içerisine sadece tür olarak *A. calcoaceticus* ve alt tür olarak *Acinetobacter anitratum* ve *Acinetobacter lwoffii*'yi yerleştirmiştir. Bir kaç yıl sonra Bouvet ve Grimont, *Acinetobacter baumannii, Acinetobacter haemolyticus,*

Acinetobacter junii, *Acinetobacter johnsonii* ve *Acinetobacter radioresistens* türlerini kapsayan 15'ten fazla genomik türü tanımlamıştır (Doughari ve ark. 2011). Şekil 2.6'da, 16S rRNA dizi analizine göre bazı *Acinetobacter* türleri arasındaki ilişki gösterilmiştir (Brener ve ark. 2007).

Zaman içerisinde bu türlerin isimleri, moleküler tekniklerin gelişmesi sayesinde bu gruptaki organizmaların genetik yapılarının anlaşılmasıyla büyük ölçüde değişikliğe uğramıştır. Günümüzde bu bakteriler için kabul gören sınıflandırma; Domain—*Bacteria*, Phylum—*Proteobacteria*, Class—*Gammaproteobacteria*, Order—*Pseudomonadales*, Family—*Moraxellaceae*, Genus—*Acinetobacter* (DNA G+C oranı % 39–47) ve species (*A. baumannii*, *A. haemolyticus* ve *A. calcoaceticus* vb.). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak 32 *Acinetobacter* türü tanımlanmıştır. Bunlardan 22 türün geçerli isimleri bulunmakta, geri kalanlarına da numaralar verilmiş ve genomik grup olarak bahsedilmiştir (Doughari ve ark. 2011).

Acinetobacter cinsine ait bakteriler günümüzde; Gram negatif, zorunlu aerobik, kokobasil, fakat çoğu zaman durağan fazda kokoid şeklinde olan, non-fermentatif, spor oluşturmayan, indol-negatif, oksidaz-negatif özelliğinde olan bakteriler şeklinde tanımlanmaktadır (Bouvet ve Grimont 1986, Tankoviç ve ark. 1994, Bergogne-Berezin ve Towner 1996, Guardabassi ve ark. 1999, Garrity ve ark. 2007, Doughari ve ark. 2011). Hareketli olmamalarına karşın, titreme (twich) hareketi ile hareket etmektedirler (Doughari ve ark. 2011). Bu hareket çeşidinin fimbria varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Garrity ve ark. 2007). Son zamanlarda *Acinetobacter* cinsine ait üyelerin hidrokarbonları parçalama özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Bu özellikleri, toprak biyoremediasyonu için dikkat çekmektedir (Doughari ve ark. 2011). Normal toprak ve su habitatlarında yaşayan *Acinetobacter* cinsine ait bakteriler birçok organik bileşiği parçalama kapasitesine sahip olduğu için, bu durum onları biyoremediasyon için kullanılabilir kılmaktadır. Hidrokarbonları kullanabilme yeteneklerinden dolayı *Acinetobacter*, ham petrolün degradasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca insanlarda hastane enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler. Hernekadar birçoğu patojenik olsa da birçok organik bileşik, *Acinetobacter* ve bazende taşıdıkları plazmitler tarafından degradasyona uğratılmaktadır. Petrolle kirlenmiş bölgelerden izole edilen *Acinetobacter* türleri, alkanları parçalamaktadır (Garrity ve ark. 2007).

Doğada geniş alanlara yayılış gösteren *Acinetobacter* cinsi üyelerinin türlerinin hem çevresel hem de biyoteknolojik uygulama potansiyeline sahip oldukları kanıtlanmıştır (Sing ve Lin 2008, Huang ve ark. 2013).

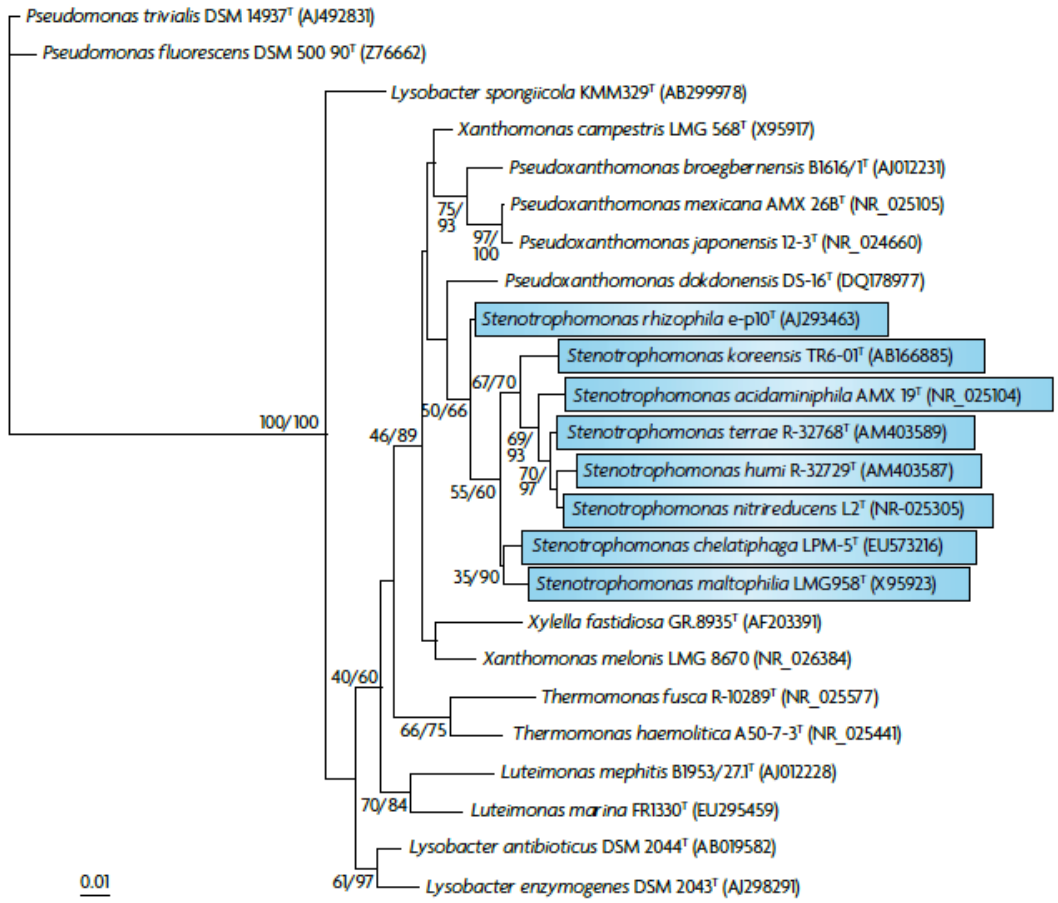


Şekil 2.6. 16S rRNA Dizi Analizine Göre *Acinetobacter* Cinsine Ait Bakteriler Arasındaki İlişki

2.4.2. *Steneotrophomonas* Cinsi

Stenotrophomonas cinsi, filogenetik olarak Gammaproteobacteria sınıfı içerisinde bulunmaktadır. İlk olarak 1961'de Hugh ve Ryschenko tarafından *Pseudomonas maltophilia* olarak isimlendirilmiş fakat daha sonra kendi cinsi içerisinde sınıflandırılmadan önce *Xanthomonas* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. *Stenotrophomonas maltophilia, Stenotrophomonas nitritireducens, Stenotrophomonas rhizophila, Stenotrophomonas acidaminiphila, Stenotrophomonas koreensis, Stenotrophomonas chelatiphaga, Stenotrophomonas terrae* ve *Stenotrophomonas humi* olmak üzere şu anda geçerli olan 8 tür içermektedir (Ryan ve ark. 2009). Şekil 2.7'de tanımlanmış geçerli 8 tane *Stenotrophomonas* türünün ve ilişkili taksonların filogenetik ilişkileri görülmektedir (Ryan ve ark. 2009).

Stenotrophomonas cinsi düz veya kavisli fakat helikal olmayan çubuk şeklinde, genellikle hareketli (iki ya da daha fazla polar flagella ile), Gram-negatif, aerobik bakterilerdir (Garrity ve ark. 2007). Doğada her yerde bulunmasına rağmen temel çevresel rezervuarlarını toprak ve bitkiler oluşturmaktadır (Ryan ve ark. 2009). *S. maltophilia,* bitkilerde bulunan mikroorganizmalar arasında baskın rol oynamakta ve dünya genelinde dağılım göstermektedir (Denton ve Kerr 1998). *Stenotrophomanas* cinsine ait üyeler nitrojen ve sülfür döngülerinde ekolojik bir öneme sahiptirler. Bu cinse ait bir kaç tür özellikle de *S. maltophilia* ve S. *rihizophila* bitkilerle faydalı etkileşimlere girerler. *Stenotrophomonas* spp. tarımda biyoteknolojik uygulamalar için umut verici adaylardır. Bunların yanında biyoremediasyon ve bitkisel ıslahta umut verici uygulamalara sahiptirler. Bu bakteriler, bitki kök sıvısında bulunan fenolik bileşikler de dahil olmak üzere rizosfer içinde mevcut olan birçok organik bileşiği metabolize edebilmektedirler. *S. maltophilia,* p-nitrofenol ve 4-klorofenol, polisiklik aromatik hidrokarbonları, benzen, toluen, etilbenzen ve ksenobiyotikleri degradasyona uğratabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde insanlar için patojen olarak bilinen tek tür *S. maltophilia*'dır (Ryan ve ark. 2009).

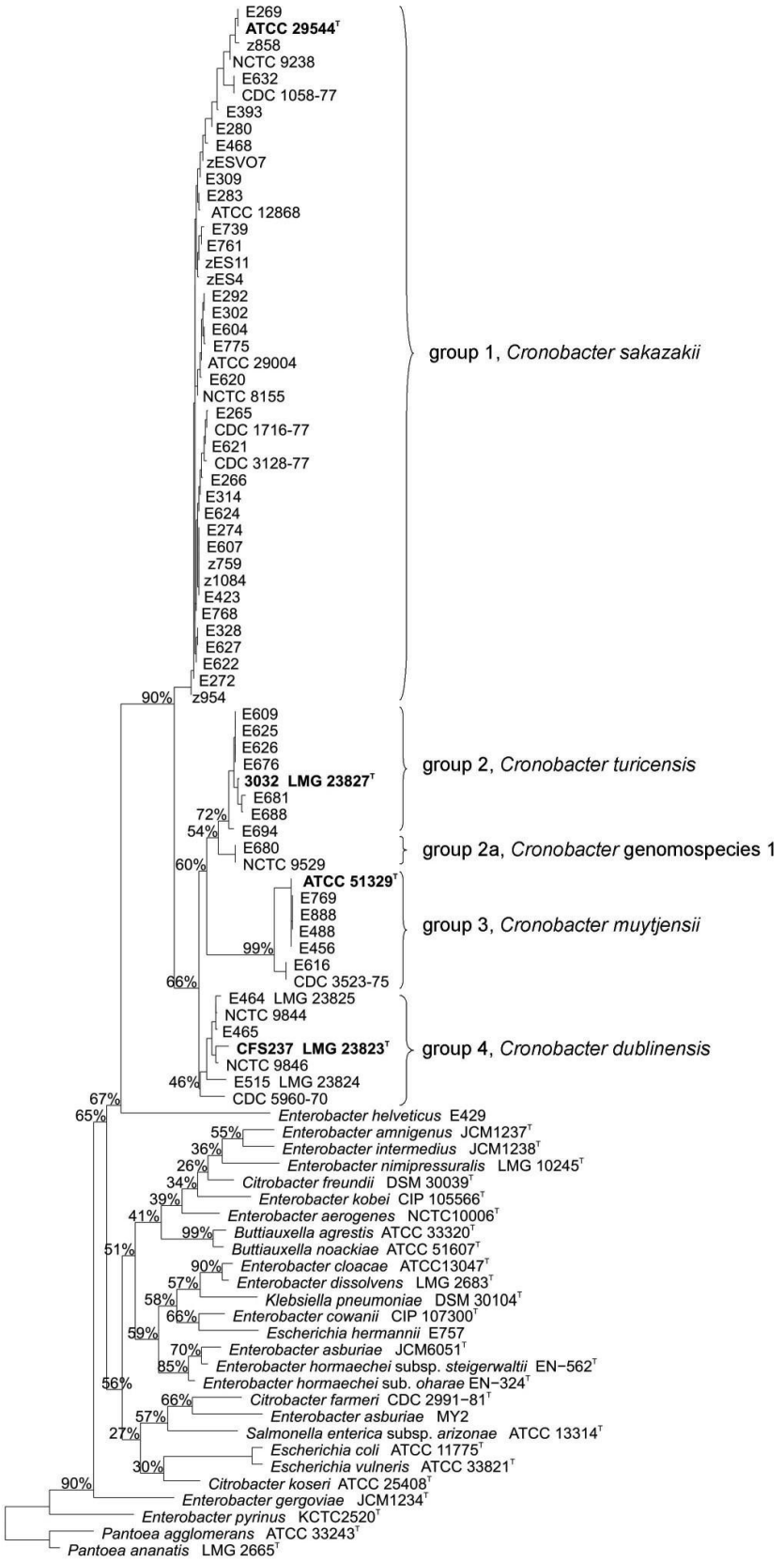


Şekil 2.7. Tanımlanmış Geçerli 8 Tane *Stenotrophomonas* Türü ve İlişkili Taksonların Filogenetik Analizi

2.4.3. *Cronobacter* Cinsi

Cronobacter, *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir cinstir. *Enterobacter* ve *Ctirobacter* cinsleri ile yakından ilişkilidir (Chenu ve Cox 2009, Forsythe 2010, Kucerova ve ark. 2011, Grim ve ark. 2012). Bu cinse ait bakteriler hareketli, spor oluşturmayan, Gram-negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerob bakterilerdir (Iversen ve ark. 2008, Jaradat ve ark. 2009, Jaradat ve ark. 2011, Joseph ve ark. 2012). Başlangıçta *Cronobacter* spp. sarı pigment oluşturan *Enterobacter cloacea* şeklinde tanımlanmıştır. Daha sonra DNA-DNA homolojisi, antibiyotik duyarlılığı ve katalaz üretimi, oksidaz yokluğu ve sarı pigment oluşturma gibi farklı biyokimyasal sonuçlara dayanarak Farmer, yeni bir tür olarak yeniden sınıflandırmış ve *Enterobacter sakazakii* şeklinde isimlendirmiştir. 16S rRNA dizi analizi, ribotiplendirme, floresan-çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan son

çalışmalar, *Cronobacter* türleri arasında genetik ve fenotipik çeşitliliğin yüksek derecede görüldüğü heterojen bir cins olduğu tespit edilmiştir (Jaradat ve ark. 2011). *Cronobacter* cinsi *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* ve *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*), *Cronobacter universalis* ve *Cronobacter condiment* olmak üzere 7 tür ve 3 alt tür içermektedir (Grim ve ark. 2012). Şekil 2.8'de *Cronobacter* ve kendisine yakın olan türlere ait 16S rRNA gen filogenetik ağacı görülmektedir (Iversen ve ark. 2007). Yapılan bazı çalışmalar, *Cronobacter* cinsine ait bakterilerin, silikon, cam, çelik ve lateks içeren çeşitli yüzeylerde biofilm oluşturduklarını göstermiştir (Hartman ve ark. 2010, Strydom 2011). Ayrıca bu bakteriler fırsatçı patojenler olup özellikle yeni doğan bebeklerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (El-Sharoud ve ark. 2009).



Şekil 2.8. *Cronobacter* ve Yakın Türlere Ait 16S rRNA Gen Filogenetik Ağacı

2.5. Petrol Kirliliği

Petrol, potansiyel olarak mikrobiyal degradasyon ile elemine edilebilen hidrokarbonlar ve diğer organik bileşklerin kompleks bir karışımıdır (Barathi ve Vasudevan 2001, Zheng ve ark. 2011). Her zaman sabit bir kimyevi bileşimi yoktur. Doğal akaryakıt olan ham petrol, bulunduğu memleketlere göre değişen bileşimler gösterir. Çeşitli tipteki petrollerin kendine has ağırlıkları 0.80-0.96; alevlenme noktaları 15-120°C ve ortalama ısıtma kuvvetleri 10.500 kcal/kg'dır. Ortalama elementel bileşimleri ise; karbon %84, hidrojen %12, oksijen %1 olup çok az miktarda da kükürt bulunur (http://tr.wikipedia.org/wiki/Petrol). Petrol, mikrobiyal üremeyi destekleyen substratlar olarak kabul edilmektedir (Zheng ve ark. 2011). En önemli enerji kaynaklarından biri olmasının yanında kimyasal endüstride kullanılan en önemli ham madde kaynakalarından biridir (Zhang ve ark. 2011). Petrol ve türevlerinin neden olduğu çevresel kirlilik, son yüzyılda ciddi bir sorun halini almıştır (Wongsa ve ark. 2004, Das ve Mukherjee 2007, Di Martino ve ark. 2012).

Petrol kirliliği petrolün üretildiği, taşındığı, depolandığı işlendiği veya denizde ve karada kullanıldığı süreçlerde, kazayla veya işlevsel olarak ortaya çıkabilmektedir (Rahman ve ark. 2002, Margesin ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2011, Hassanshahian ve ark. 2012). Petrol kirliliği sorunu, özellikle petrol üreten bölgelerde yaygın olarak görülmektedir (Hassanshahian ve ark. 2012). Uğruna yıllarca savaşların yapıldığı "kara inci" (petrol) ve türevlerinin çevreye dökülmeleri, çevre kirliligi oluşturmaları yönünden de bunları dünya gündeminde birinci sıraya yükseltmiştir (Demir ve Demirbağ 1999). Petrol sızıntıları, 1970'ten günümüze çevreye 5.6 milyon tonun üzerinde petrol salınmasına neden olmuştur (Batista ve ark. 2006). Bu sızıntılar, karasal ve denizel ekosistemler için büyük bir tehlike teşkil etmektedir (Zhang ve ark. 2011, Hassanshahian ve ark. 2012). Bu durum sağlığı ve çevrenin sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir (Batista ve ark. 2006). Petrol, temel enerji kaynağı olarak hizmet vermeye devam etmektedir ve hem çevredeki yaygınlığı hem de nicelliği onu bir kirletici yapmıştır. Bir ekosistemde bulunan petroldeki benzen, toluen, etilbenzen, ksilen gibi hidrokarbon içerikleri, sonuç olarak çevre için bir kirletici haline gelebilmektedir (Singh ve Lin 2008, Mehdi ve Giti 2008, Lin ve ark. 2009, Di Martino ve ark. 2012). Petrol hidrokarbonları önemli enerji kaynaklarıdır. Endüstride ve günlük yaşamda

kullanılmaktadır. Bunun yanında en yaygın olan çevresel kirleticilerdir (Mehdi ve Giti 2008, Zhang ve ark. 2011, Hassanshahian ve ark. 2012)



Şekil 2.9. Ülkemizde Petrolden Kaynaklı Oluşan Kirlilik (Batman-İluh Deresi)

2.6. Mikrobiyal Degradasyon

Kirleticiler çevreden çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla uzaklaştırılabilmektedir. Günümüzde kirleticilerin hızlı bir şekilde uzaklaştırılması için bakteriyel biyoremediasyon önerilmektedir (Cormack ve ark. 1997). Petrol döküntüleriyle başa çıkmaya yönelik geleneksel yöntemler; fiziksel çevre ile sınırlanmıştır. Kirlenmiş ortamlarda bulunan petrol türevlerinin mikrobiyolojik dekontaminasyonu fizokokimyasal yöntemlere alternatif etkili, ekonomik ve verimli bir yöntem olarak düşünülmektedir (Mehdi ve Giti 2008). Kompleks hidrokarbon karışımlarından olan ham petrol ve diğer organik bileşikler, dökülmeler meydana geldiği zaman ciddi çevresel sorunlar oluşturabilirler (Zhang ve ark. 2010). Bu yüzden bakteri kullanımı ile gerçekleşen biyoremediasyon, petrol döküntülerinin temizlenmesinde ve petrol kalıntılarının giderilmesinde potansiyel olarak yararlı bir araç olarak önem arz

etmektedir (Yuste ve ark. 2000). Son yıllarda yoğun araştırmalar, petrolle kirlenmiş alanlardan izole edilen saf kültür veya karışık bakteriyel konsorsiyumlar ile gerçekleştirilen petrol biyoremediasyonu ve ham petrol degradasyonu üzerine odaklanmıştır (Zhang ve ark., 2010). Kontamine olmuş su ve toprak ortamlarındaki biyoremediasyon daha geleneksel yöntemlere kıyasla, bir dizi avantaj ile etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Toledo ve ark. 2006). Petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş toprakların biyoremidasyonu etkili, ekonomik, çok yönlü ve çevrenin iyileştirilmesine dayalı olarak kurulmuştur (Margesin ve ark. 2007). Hidrokarbon ve türevlerini içeren atık madde biyoremediasyonu, mikroorganizmaların bu substratları kullanarak biyokütlelerini arttırmasına ve onları H_2O ve CO_2 gibi toksik olmayan substratlara parçalamalarına dayanmaktadır (Toledo ve ark. 2006).

Doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından gerçekleştirilen, petrol ve diğer hidrokarbon kirleticilerini çevreden uzaklaştıran biyodegradasyon en temel, güvenilir ve birincil mekanizmadır (Atlas 1991, Al-Sharidah ve ark. 2000, Yuste ve ark. 2000, Hassanshahian ve ark. 2012). Bu sayede ham petrolü de içeren binlerce ksenobiyotik kirletici, çevreden elemine edilir. Çevresel şartların mikrobiyal hidrokarbon degradasyonuna olan etkileri ve hidrokarbon kontaminasyonunun mikrobiyal kominitelere olan etkileri büyük ilgi çekmektedir (Huy ve ark. 1999, Hassanshahian ve ark. 2012). Biyoremediasyon, çevresel kirleticilerin hızla ortadan kaldırılması için mümkün olan en geniş ölçüde biyolojik aktivitelerin kullanıldığı bir stratejidir. Bu mikroorganizmaların üretiminin uyarılması ve petrolü degrade eden bakterilerin inokülasyonu ekolojik sistem üzerine en az etkisi olan ve petrolle kirlenmiş alanların detoksifikasyonunun hızlandırılması için umut verici bir durumdur (Hassnshahian ve ark. 2012, Huy ve ark. 1999).

Ham petrolü degrade edebilen mikroorganizmalar, genel olarak toprak ve deniz ortamlarında yayılış gösterir (Di Cello ve ark. 1997, Al-Sharidah ve ark. 2000, Chaudhary ve Borah, 2011). Saf bakteri kültürleriyle gerçekleştirilen hidrokarbon biyodegradasyonu geniş olarak çalışılmış ve metabolik yolları tanımlanmıştır (Richard ve Vogel 1999). Hidrokarbonları, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğinde olan birçok mikroorganizma bilinmektedir. Bu mikroorganizmalar, doğaya yaygın olarak dağılmışlardır (Chaineau ve ark. 1999, Jyothi ve ark. 2012). Doğada petrolü parçaladığı bilinen yaklaşık 70 bakteri cinsi bilinmektedir. *Pseudomonas*,

Acinetobacter, Stenotrophomonas, Achromobacter, Actinomyces, Bacillus, Burkholderia, Exiguobacterium, Klebsiella, Microbacterium, Nocardia, Spirillum, Streptomyces, Vibrio, Alcaligenes, Roseomonas, Flavobacter, Corynebacterium, Streptococcus, Providencia, Sphingobacterium, Capnocytophaga ve *Moraxella* gibi bakteri cinsleri bunlardan bazılarıdır (Kato ve ark.2001, Mandri ve Lin 2007, Joo ve ark. 2008, Wang ve ark. 2011).

Mikrobiyal degradasyon çeşitli fiziksel ve kimyasal metodların kullanıldığı, çok miktarda petrol çıkarma işlemleri sonrası oluşan petrol sızıntılarının çevreden elemine edilmesine yardımcı olur. Mikroorganizmalar, petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmeleri için petrolü parçalamalarına yardımcı olan enzim sistemlerine sahiptirler (Nwaogu ve ark. 2008). Mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinin kaynağının kromozomal DNA, plazmid DNA veya transpozonlar üzerinde taşınan genler olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmid DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Gülcan 2006). Toprakta ve suda yaşayan her mikroorganizmanın, petrolün hidrofobik ve flotasyon özelliklerinden dolayı petrolde üreme ve petrolü kullanma yetenekleri yoktur. Kontamine olmuş toprak, yer altı sularının ve deniz alanlarının biyoremediasyonu için; hidrofobik özellik, yüzeye tutunma ve petrolü degrade etme yetenekleri olan özel bakteriler gerekmektedir. Bakterilerin petrolü biyodegradasyon verimliliği, çevresel faktörlerin dışında, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Lin ve ark. 2009).

Mikroorganizmaların, hidrokarbonlu ortamlarda üretilmesi, belirli problemler sunmaktadır. Çünkü hidrokarbonlar suda çözünmeyen bileşiklerdir. Birçok bakteri çözeltilerde bulunan hidrokarbonları ürettikleri yüzey aktif maddeleri sayesinde emülsifiye edebilmektedirler. Biyosürfektanlar bunlardan biridir. Hücrelerin substrat yüzeyine yapışmasını arttırırlar. Biyosürfektanlar çözünmeyen bileşimlerin yüzey alanını arttırmak suretiyle, karışmayan sıvıların arasında birikerek yüzey gerilimini azaltırlar. Bu da hidrokarbonların bakteriler tarafından biyodegradasyonuna yol açar (Hassanshahian ve ark. 2012, Zheng ve ark. 2011, Barathi ve Vasudehan 2001, Mehdi ve Giti 2008).

2.7. Konu Kapsamı ile İlgili Literatür Özetleri

Cormack ve ark. (1997), Antarktika'daki gaz yağına maruz kalmış topraklardan Gram-negatif, hareketsiz, spor oluşurmayan, hidrokarbon parçalayan, psikrotrof, *Acinetobacter* cinsine ait olan ve *Acinetobacter* ADH-1 olarak adlandırdıkları bir bakteri türü izole etmişlerdir. Bakterinin ürediği optimum pH'yı 7.0, 7.5, 8.0, optimum sıcaklık değerini 25-30^{o}C olarak tespit edilmiştir. Bakterinin %3.5 oranındaki NaCl'de üreyebildiğini ve ham petrol, hekzadekan ve dodekanı karbon kaynağı olarak kullanmalarına karşın daha kısa zincirli olan hekzan, heptan ve oktanı içeren mineral ortamda üreyemediğini tespit etmişlerdir.

Di Cello ve ark. (1997), Venedik'teki lagünlerden 25 bakteri türü izole etmişlerdir. 16S rRNA ve RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) ile bunlardan birinin yeni bir tür olarak belirledikleri *Acinetobacter venetianus* olduğunu belirlemişlerdir. Bakterinin C10, C14 ve C20 hidrokarbonlu alkanların bulunduğu ortamda üreyebildiklerini tespit etmişlerdir.

Huy ve ark. (1999), petrolü parçalayan 4 tane bakteri türünü Vietnam'daki petrolle kirlenmiş alanlardan izole etmişlerdir. 16S rRNA dizi analizi sonucu bunlardan birinin *Acinetobacter* sp., diğer üçünün ise *Pseudomanas* sp. olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan analizde *Acinetobacter* sp.'nin %5 oranındaki ham petrolü 1 günlük inkübasyon sonunda %95 oranında parçaladığını belirlemişlerdir.

Razak ve ark. (1999), ham petrolün bulunduğu ortamda üreyebilen ve ham petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan *Acinetobacter* sp. E11 olarak adlandırdıkları bakteriyi Malezya'daki Port Dickson sahilinden izole etmişlerdir. Çalışmada bakterinin %1 oranındaki ham petrol ve uzun zincirli dodekan, pentadekan ve hekzadekan hidrokarbonlarının bulunduğu ortamda üreyebildiği buna karşın kısa zincirli olan pentan, hekzan ve heptanın bulunduğu ortamda üreyemediğini tespit etmişlerdir. GC analizi ile 37^{o}C'de 15 günlük inkübasyon sonrası bakterinin ham petrolün içeriğinde bulunan hidrokarbonların %60'ını degrade ettiğini tespit etmişlerdir.

Yuste ve ark. (2000), petrolle kontamine olmuş topraklardan izole ettikleri Gram- negatif, kok/çubuk şeklindeki bakteriyi, yağ asidi profili ve 16S rRNA dizi analizine göre *Acinetobacter calcoaceticus* olarak belirlemişlerdir. Yapılan analizler

sonucunda bakterinin C10-C34 aralığındaki düz zincirli alkanları parçaladığını tespit etmişlerdir.

Malatova (2005), aralarında *Acinetobacter baumannii*'nin de bulunduğu 20 farklı bakteri türünü New York'un batısındaki üç bölgeden izole etmiştir. Bu bakterilerin ham petrolü ve çeşitli hidrokarbonları parçaladıklarını bildirmiştir.

Mandri ve Lin (2007), petrol bulaşmış topraklardan, biyokimyasal testler ve 16S rRNA dizi analizleri sonucu *Acinetobacterium calcoaceticum* olarak tanımladıkları petrolü parçalayan bir bakteri türü izole etmişlerdir. Yapılan analiz sonucu bakterinin besiyeri ortamında bulunan petrolü, 30^{o}C'deki laboratuar ortamında %80 oranında kullandığını tespit etmişlerdir.

Al-Saleh ve ark. (2009), Kuveyt'teki sahillerden *Acinetobacter* cinsini de içeren ham petrolü parçalayan 6 farklı cinse ait 272 tane bakteri türü izole etmişlerdir.

Hassanshahian ve ark. (2012), petrolle kirlenmiş alanlardan petrolü parçalayan 25 bakteri türü izole etmişlerdir. Bu türlerin ham petrolü ve hidrokarbonları parçalama karakteristiklerine GC-MS ile incelemişlerdir. Bakterilerin ham petrolde yüksek oranda üredikleri ve hidrokarbonları parçaladıklarını belirlemişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda *Acinetobacter calcoaceticus*'a yakın bulunan iki türün, GC-MS analizi ile ham petrol içeriğinde bulunan C9-C25 düz zincirli alkanları parçalayabildeklerini tespit etmişlerdir.

Mara ve ark. (2012), petrolle kirlenmiş alanlardan fizyolojik ve moleküler teknikler kullanarak, petrolü parçalayan 17 tane *Acinetobacter* türü izole etmişlerdir. İzole edilen türlerin petrolü değişik ölçülerde parçaladıklarını bildirmişlerdir.

Samei ve ark. (2012), İran'daki petrolle kirlenmiş topraklardan n-hekzadekanı parçalayan 3 bakteri türünü izole etmişlerdir. 16S rRNA analizi sonuçlarına göre bu bakterilerin *Acinetobacter radioresistens* ve *Pseudomonas aeruginosa* ait türler olduğunu bildirmişlerdir.

Mahjoubi ve ark. (2013), Tunus'un kuzeyinde bulunan Bizerte kıyısındaki bir rafineri bölgesinden, kontamine olmuş sediment ve deniz suyundan ham petrolü kullanan 125 bakteri suşu izole etmişlerdir. Yapılan 16S rRNA ve 23S rRNA dizi analizleri sonucu *Acinetobacter* ve *Stenotrophomonas* cinslerinin en yaygın bulunan bakteri cinsleri arasında yer aldığını belirlemişlerdir.

Liu ve ark. (2014), petrol alanlarından izole ettikleri ve *Acinetobacter* sp. LS1 olarak adlandırdıkları bakterinin 7 günlük inkübasyon sonucunda %1'lik ham petrolün %70.3'ünü ve 3 günlük inkübasyon ile %0.2'lik hegzadekanın %65.4'ünü degradasyona uğrattığını GC analizi ile tespit etmişlerdir.

van Niel ve ark. (1999), *Acinetobacter johnsonii* 210A'da temel yağ asitlerini, palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1) ve oleik asit (C18:1) olarak sırasıyla 1.1.2 molar oranlarında tespit etmişlerdir.

Busse ve ark. (1996), *Acinetobacter calcoaceticus*'da bulunan majör yağ asitlerinin C16:0, C18:1, C16:1 olduğunu belirtmişlerdir.

Garrity ve ark. (2007), *Acinetobacter radioresistens*'ta bulunan temel yağ asitlerinin C18:1, C16:1 ve C16:0 olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (2008), hareketsiz, kısa çubuk şeklinde, Gram-negatif, katalaz-pozitif, oksidaz negatif olan ve strain $B1^T$ olarak etiletlendirdikleri bakteriyi topraktan izole etmişlerdir. $B1^T$'deki temel yağ asitlerini: 9-oktadekenoik asit (C18:1ω9c; %42) ve hekzadekanoik asit (C16:0; %25.9) ve (iso-C15:0 2-OH ve/ya da C16:1ω7c; %10) olarak belirlemişlerdir. Bakterinin 10-37^oC'de ürediğini ve ürediği optimum sıcaklık değerini de 30^oC olarak belirlemişlerdir. Yapılan 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonucu $B1^T$'nin *Acinetobacter* cinsi içerisinde yer alan yeni bir tür olarak değerlendirmişler ve *Acinetobacter soli* sp. nov. olarak adlandırmayı önermişlerdir.

Lee ve Lee (2010), yaptıkları çalışmada, Kore'deki Gwangju'da bulunan bir arıtma tesisinden Gram-negatif, hareketsiz, kısa çubuk şeklinde, oksidaz-negatif, katalaz pozitif olan ve KSL5401-037^T olarak adlandırdıkları *Acinetobacter* cinsine ait bir bakteri türü izole etmişlerdir. Üremenin nutrient agar ortamında 15-30^oC arasında gerçekleştiğini ve optimum üreme sıcaklığını 30 ^oC olarak belirlemişlerdir. Bakterinin nutrient broth ortamında pH 6.0-10.0 aralığında ürediğini ve optimum üreme pH'sını 7.0 olarak tespit edilmiştir. Kemotaksonomik analizler ile bakterinin sahip olduğu kinon tipini Q-8, temel yağ asitlerini, C16:0 (%19.2), C18:1ω9c (%19.5), C16:1ω6c/C16:1ω7c (%34.1), başlıca lipitleri de difosfogliserol (DPG), fosfatidiletanolamin (PEA), fosfatidilgliserol (PG) ve orta derecede fosfatidilkolin ve fosfatidilserin olarak tespit etmişlerdir. Yapılan 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridazasyonu sonucunda bu türün *Acinetobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılması

gereken yeni bir tür olduğunu ve *Acinetobacter kyonggiensis* sp. şeklinde isimlendirmeyi önermişlerdir.

Vaz-Moreira ve ark. (2011), ham süt ve atık sulardan, G30(T) ve A1PC16 olarak adlandırdıkları *Acinetobacter* cinsine ait iki bakteri türü izole etmişlerdir. Bakterilere kinon tiplerini sırasıyla Q-8 ve Q-9, temel yağ asitlerini de C16:0, C18:1ω9c ve C16:1 ω7c/iso-C15:0 2-OH olarak tespit etmişlerdir. Yapılan 16S rRNA ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçlarına dayanarak bu iki bakterinin *Acinetobacter* cinsi içerisinde sınıflandırmayı ve *Acinetobacter rudis* sp. nov. olarak adlandırmayı uygun görmüşlerdir.

Collins ve Jones (1981), *Acinetobacter anitratum*'da 7 türde Q-9, 1 türde, Q-8, iki türde Q-9 ve Q-8, *Acinetobacter lwoffii*'de Q-9 ve Q-8 *Acinetobacter* sp.'de Q-9 isoprenoid kinon sistemlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Busse ve ark. (1996), *Acinetobacter calcoaceticus*'da bulunan isoprenoid kinon tipinin Q-9 olduğunu rapor etmişlerdir.

Fuije ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada *Acinetobacter* cinsine ait bakterilerdeki kinon sistemini Q-8 ve Q-9 olarak tespit etmişlerdir.

Garrity ve ark. (2007), *Acinetobacter radioresistens'*te bulunan kinon sisteminin Q-9 olduğunu bildirmişlerdir.

Singer ve ark. (1985), *Acinetobacter* sp. strain HO1-N'de, kardiolipin, triaçil-lizokardiolipin, fosfatidilgliserol, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ve açil-fosfatidilgliserol fosfolipidlerini tespit etmişlerdir.

Ratledge ve Wilkinson (1988), *Acinetobacter* cinsine ait türlerde bulunan fosfolipitleri PE, PG, DPG olarak bildirmişlerdir.

Kaparullina ve ark. (2009), Gram-negatif, çubuk şeklinde, hareketli ve aerobik olan LPM-5^T şeklinde etiketlendirdikleri, *Stenotrophomonas* cinsine ait olan yeni bir türü kentsel atık sulardan izole etmişlerdir. Bakterinin ürediği sıcaklık aralığını, 25-40^{o}C, pH aralığını 5.5-9.5, optimum üreme sıcaklığı ve pH'yı da sırasıyla 28-37^{o}C ve 6.5-8.5 olarak belirlemişlerdir. Yapılan biyokimyasal test sonuçlarına göre katalaz, oksidaz, nişasta ve jelatin hidrolizasyonu pozitf, üreaz test sonucunu negatif olarak belirlemişlerdir. Bakterinin %2.5'un üzerindeki NaCl'de üreyemediğini tespit etmişlerdir. Bakteride bulunan temel yağ asitlerini, iso-C15:0, anteiso-C15:0, C14:0 ve C16:1ω7c, majör fosfolipitlerini de fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol ve

difosfatidilgliserol (kardiolipin) olarak belirlemişlerdir. Bakterinin oksasilin ampisilin, novobiyosin, neomicin, streptomisin ve nalidiksik aside karşı dirençli fakat kanamisin, gentamisin ve linkomisine karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarına dayandırılarak LPM-5^T'nin yeni bir tür olduğu belirlenmiş olup *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov. olarak isimlendirilmesi uygun görülmüştür.

Urszula ve ark. (2009), Gram-negatif, hidrokarbonları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan, morfolojik ve fizikokimyasal testler ve 16S rRNA dizi analizi sonucundan *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 olarak tanımlanan yeni bir tür izole etmişlerdir.

Kim ve ark. (2010), Gram-negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, aerobik, katalaz ve oksidaz test sonuçları pozitif olan ve nişastayı hidrolize eden, DCY01^T olarak isimlendirdikleri *Stenotrophomonas* cinsine ait yeni bir bakteri türü izole etmişlerdir. Bakterinin ürediği optimum sıcaklığı 30^{o}C, pH'yı 7.0 olarak belirlemişlerdir. DCY01^T'in temel yağ asitlerini iso-C15:0, C16:0 10-methyl, iso-C15:1 ve C15:0, temel polar lipitleri de fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol ve difosfatidilgliserol olarak tespit etmişlerdir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler, 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarına dayanarak DCY01^T'nin *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde sınıflandırılması gerektiğini ve *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov. şeklinde isimlendirmeyi önermişlerdir.

Yi ve ark. (2010), Gram-negatif, hareketsiz, çubuk şeklinde ve MK06^T olarak adlandırdıkları *Stenotrophomonas* cinsine ait olan bir bakteri türünü topraktan izole etmişlerdir. MK06^T'nin 4-40^{o}C arasında ürediğini ve optimum üreme sıcaklığı 25-30^{o}C olarak belirlemişlerdir. MK06^T'nin temel yağ asitlerini iso-C15:0 (%41.1), anteiso C15:0 (%12.6) ve iso-C17:1ω9c (%8.6), kinon sistemini de Q-8 olarak tespit etmişlerdir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler, MK06^T'nın *Stenotrophomonas* cinsine ait olduğunu göstermiştir. Yaptıkları 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonucu bakterinin *Stenotrophomonas* cinsine ait yeni bir tür olduğunu ve *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov. şeklinde isim vermeyi uygun görmüşlerdir.

Verma ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, pestisit sanayinin atık su arıtma tesisinden izole edilen *Stenotrophomonas* HPC383'ün ham petrolü parçalama karakteristiğine GC-MS ile bakmışlardır. Analiz sonucu, 7 günlük inkübasyon

sonrasında bakterinin %0.5 oranındaki ham petrolü %94 oranında degrade ettiğini ve 8 tane alkanı (dodekan, nanodekan, dodecane, 6-siklohekzil, heptadekan nitril, 1-dekanol, 2-hekzil; heptadekan, tetrametil, 2-Pentakosan ve karboksilat,1-dotriakontan) 5 tane aromatik hidrokarbonu (benzaldehit, 24-dimetil, benzin, 1-izopentil-2,4,5-trimetil, benzen, fenantren ve naftalin) parçaladığını belirlemişlerdir. 16S rRNA dizi analizi ile *Stenotrophomonas* HPC383'ün yakın zamanda izole ettikleri S. *Sacidaminiphila* strains HPC320 ile yakın benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hassanshahian ve ark. (2013), İran'daki petrol rezervuarlarındaki atık sulardan 16S rRNA dizi analizi sonucunda aralarında *Stenotrophomonas maltophilia*'nın da bulunduğu alkanları parçalayan 8 farklı bakteri türü izole etmişlerdir. Yapılan çalışmada bakterilerin hekzadekanı karbon kaynağı olarak kullandıklarını ve bir haftalık inkübasyon sonunda %2.5 oranındaki hekzadekanı %50 oranında kullandıklarını tespit etmişlerdir.

Iversan ve ark. (2008), *Cronobacter* cinsine ait üyelerin Gram-negatif, çubuk şeklinde, genel olarak hareketli olduklarını bildirmişlerdir. 6-45^{o}C ile 5.0-10.0 pH aralığında ve %7'nin üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında üreyebildiklerini fakat hiçbir izolatın %10'un üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında üreyemediklerini belirtmişlerdir.

Whittaker (2011), *Cronobacter*, cinsine ait 6 türün (*C. sakazakii, C. malonaticus, C. dublinensis, C. muytjensii, C. turicensis* ve *Cronobacter genomospecies*) yağ asitlerini GC ile analiz etmiştir. Bakterilerdeki temel yağ asitlerini düz zincirli; C12:0, C14:0, C16:0, doymamış; C18:1ω7c ve orta sıklıkta C16:1ω7c/C16:1ω6c, C14:0 3-OH/iso-C16:1 ve C17:0ωcyclo 7-8 şeklinde belirlemiştir. Brady ve ark. (2013), *Cronobacter* cinsini çubuk şeklinde, Gram-negatif, genel olarak hareketli, fakültatif anaerob şeklinde rapor etmişlerdir. Temel yağ asitlerini C16:0, C18:1ω7c olduğunu ve orta sıklıkta 2 (iso-C16:1 ve/ya da C14:0 3-OH) ve 3 (C16:1ω7c ve/ya da iso-C15:0 2-OH) ve C18:1ω7c şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Diyarbakır ve Batman'daki petrolle kirlenmiş toprak ve çamur alanlarındaki (Şekil 3.1) petrol istasyonlarından (Diyarbakır: Beykan 27, Bozkuş 1, Güney Kırtepe 10, Yeniköy 40, Sarıcak 11 petrol istasyonları, Batman Batı Raman Sahası: 2TP1, 3TP2, AP1 ve AP2 petrol istasyonları) izole edilen 15 bakteri varyetesi arasından seçilen beş bakteri varyetesi kullanıldı.



Şekil 3.1. Örneklerin Alındığı Petrol Kuyuları Çevresi

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimleri

Sıvı besiyerinin bilesimi:

BSM:

5.0 mL Sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0)

19.7 g/L K_2HPO_4, 8.7 g/L KH_2PO_4, 3.744 g/L Na_2HPO_4 .$7H_2O$, 5.0 g/L NH_4Cl

3.0 mL magnezyum sülfat çözeltisi (22.5 g/L $MgSO_4$)

1.0 mL Kalsiyum klorür çözeltisi (36.4 g/L $CaCl_2$)

1.0 mL ferrik klorür çözeltisi (0.25 g/L $FeCl_3$)

1.0 mL iz mineral element çözeltisi ($MnSO_4$ (39.9 mg/L), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (42.8mg/L) ve $(NH_4)_6$ Mo_7O_{24} .$4H_2O$ (34.7 mg/L))

Nutrient Broth (Merck):13 g

Saf su:1000 mL

Katı besiyerinin bilesimi:

Nutrient Broth (NB): 8g

Agar (Sigma): 15 g

Saf su:1000 mL

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Saf Kültür Üretimi

Diyarbakır ve Batman'daki petrolle kirlenmiş, 9 farklı alandan alınan toprak ve çamur örnekleri soğuk şartlarda muhafaza edilerek laboratuara getirildi. Örnekler steril ortamda muhafaza edilerek toprak ve çamur örneklerinden birer gram tartıldı ve tartılan bu örneklerin ekimi için ham petrolü içeren minimal besiyeri hazırlandı. Bunun için, ham petrol 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirildi ve 121^oC'de 21 dakika süreyle otoklavda 3 kez steril edildi. Daha sonra besiyerlerine ortamda %1 olacak şekilde ham petrol eklendi. Petrolü kullanan bakterilerin seçimi için tartılan toprak ve çamur örnekleri %1 ham petrol içeren besiyerlerine inoküle edildi ve 30^oC'de 120 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. 2 gün sonunda bu örnekten 1 mL alınıp tekrar aynı

besi ortamına aktarıldı ve bu işlem 3 kez daha tekrarlandı. Daha sonra bu besiyerlerinden 1 mL alınıp zenginleştirilmiş NB ortamına inoküle edildi. 30^{o}C'de 120 rpm'de 24 saatlik inkübasyon sonrası tek koloni düşürmek için, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltmeler yapılarak NB katı besiyerine ekim yapıldı ve 30^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra petrilerde üreyen ve farklı görünüm sergileyen bakteri kolonilerinden tek koloni alınıp çizgi ekim yapılarak saf kültür elde edildi.

3.2.2. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi

Bakterilerin optimum üreme sıcaklığını belirlemek için 25 mL'lik NB sıvı besiyerinde 10-50ºC sıcaklık aralığında bakteriler inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra 600 nm'de bakteri OD'lerine bakıldı. Belirlenen optimum üreme sıcaklığında optimum pH değleri tespit edildi. Bunun için pH 4.0-12.0 aralığına sahip besiyerleri hazırlandı ve ekim yapılarak inkübasyona bırakıldı. Bir günlük inkübasyondan sonra OD değerleri 600 nm'de okundu. Bakterilerin uygun üreme zamanını tespit etmek için optimum pH'da besiyerleri hazırlandı ve optimum üreme sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3-72 saat aralığında 3 saatte bir örnek alınarak spektrofotometrede üreme oranlarına bakıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.3. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

3.3.1. Gram Boyama

Temiz bir lam üzerine 1-2 damla su bırakıldı. Bir günlük bakteri kültüründen 1-2 damla lam üzerinde su ile karıştırılıp yaydırıldı. Daha sonra lam havada kurutulup alevden geçirilerek fikse ediltikten sonra lam kristal viyole şalesinde 1 dakika tutuldu. Boya döküldükten sonra lam üzerine lügol çözeltisi damlatılıp 2 dakika beklendi ve lügol çözeltisi döküldükten sonra lam kurutulup %96'lık etil alkole daldırılıp çıkarıldı. Daha sonra lam saf su ile yıkanıp kurutma kağıdı ile kurutuldu. Karbol fuksin lam üzerine damlatıldıktan sonra 0.5 dk. boyama yapıldı. Lam su ile yıkanıp kurutma kağıdı ile kurutuldu. Preparatlar kurutma kağıdında kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

Değerlendirme: Mikroskop altında inceleme esnasında bakterilerin mavi veya mor renkte görülmesi durumunda bakteriler Gram-pozitif, pembe renkli görülmesi durumunda ise bakteriler Gram-negatif olarak değerlendirildi.

3.3.2. Spor Boyama

Spor boyama için bakteriler katı NB besiyerine ekildi. Bir gecelik inkübasyon sonunda bakteri kültürü iki gece +4^{o}C'de bekletildi. Daha sonra temiz lamın bir kenarına su damlatılıp öze yardımıyla bakteri kolonisi alınarak yayma işlemi gerçekleştirildi. Preparatlar havada kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparatlar önce karbol fuksin ile 5 dakika ısıtılarak boyandı. Preparatlar yıkandıktan sonra %10'luk nitrik asitle 10 sn. muamele edildi ve su ile yıkandı. Daha sonra metilen mavisi ile 2 dakika boyanan preparatlar yıkanıp kurutularak immersiyon yağı damlatıldı ve mikroskopta immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

3.3.3. Hareketlilik ve Oksijen Gereksinimi

Bu test mikrorganizmaların hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemede kullanılır. Bunun için; %0.4 berrak yarı katı agarlı besiyeri, tüplerin içinde kapiler tüplerin bulundugu besi ortamına döküldü. İzolatların gecelik taze kültürlerinden tek koloni iğne öze yardımıyla alınarak kapiler tüp içerisine daldırmak suretiyle ekim yapıldı ve her izolat için optimum sıcaklıkta 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

Değerlendirme: Eğer besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz kabul edildi, fakat inokülasyon hattından etrafa doğru agarın içine dogru bir yayılma gözlenmesi durumunda hareketli kabul edildi. Mikroorganizmalar besin gereksinimlerini karşılamak için hareket ederler ve dolayısıyla oksijen burada etkili olur üstte doğru çıktıklarında aerobik, alt kısımda kalmaları durumunda anerobik, üremenin inokülasyon hattının tüm kısmında görülmesi sebebiyle fakültatif anaerob olarak değerlendirilir.

3.3.4. Nişasta Hidroliz Testi

Bu test, bir polisakkarid olan nişastanın bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstraselüler amilaz enzimi tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapılır. Bunun için petri kutularında %3'lük nişastalı agar hazırlandı

ve bir günlük katı besiyerlerinde üretilen bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ayrı ayrı ekim yapıldı. Her bakteri için optimum sıcaklıkta 1-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda agarların üzerine 0,5 g I_2 ve 1g KI (150 mL) ile hazırlanan çözelti dökülerek reaksiyon 5 dakika içinde değerlendirildi. Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşur. Negatif durumlarda ise besiyeri mavi-mor renkte görülür.

3.3.5. Katalaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların katalaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini saptamak amacıyla yapılır. Bunun için NB sıvı besiyerlerinde 24 saat üretilen bakteri numunelerinden 5 mL alınıp cam tüplere bırakıldı. Bu tüplere %3 oranında 10 mL olarak hazırlanmış H_2O_2'den yaklaşık 5 damla ilave edildi. Tüpler baloncuk oluşumunu gözlemek için hafifçe karıştırıldı.

Değerlendirme: Gaz çıkışının olması veya baloncuk gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.3.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test mikroorganizmaların, jelatini hidrolizleyen jelatinaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini ölçmek için yapılır. Bunun için %12 jelatin içeren besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Her bakteri için 9 mL jelatinli besiyeri ve 1 mL taze kültürden ekim yapıldı. Tüpler optimum sıcaklıkta 1-3 gün inkübatürde tutuldu. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabında 1-2 saat bekletilerek katı olan tüpler negatif, eriyenler pozitif olarak değerlendirildi.

3.3.7. Oksidaz Aktivitesi

%1(v/v) tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür'den bir damla ile filtre kağıdının ortası ıslatıldı. Bunun üzerine öze ile bir günlük bakteri kolonisinden alınan bakteri kültürü filtre kağıdının üzerine yayıldı. 10 sn. içinde koyu mavi bir rengin oluşup oluşmadığı gözlendi.

Değerlendirme: Koyu mavi bir rengin 10 sn. içinde oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.3.8. Tirozin Degradasyonu

10 mL distile suda 0.5 g L-Tirozin çözündü. Çözünmüş L-Tirozin ve 90 mL agarlı NB besiyeri 121°C de 20 dakika ayrı ayrı steril edildi. Tirozin ve NB besiyeri steril şartlarda karıştırıldı. Her bir bakteri için 50 mL'lik tüplere 10 mL Tirozinli NB besiyeri bırakıldı. Tüplere bir günlük bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ekim yapıldı. Tüpler 10 gün inkübatörde tutuldu ve kontrol tüpüne göre değerlendirildi.

Değerlendirme: Kontrol tüpüne göre L-Tirozinli tüpte daha koyu rengin oluşması durumunda L-Tirozin degradasyonu pozitif olarak değerlendirildi.

3.3.9. Üreaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek amacıyla yapılır. Üreaz hidrolizasyon testi bakterilerin cins ve tür tayininde kullanılır. Bu test için 2.4 g üre agar ve 2 g saf üre sırasıyla 95 mL ve 5 mL saf suda çözündü. Üre agar otoklavlandı ve yeterince soğuduktan sonra 0.2 μm por çapındaki steril filtreden geçirilen saf üre eklendi. Tüpler yatık bir şekilde tutularak besiyerinin katılaşması beklendi. Daha sonra taze kültüre edilmiş bakterilerden ekim yapılarak 2-5 gün bakteriler optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi.

Değerlendirme: Rengin sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif, renk değişiminin gözlemlenmemesi negatif olarak değerlendirildi.

3.3.10. Sitrat Testi

Bu test, mikroorganizmaların besiyerlerine katılan sitratı karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır. Bu test için 2.25 g Simmons citrate agar 100 mL saf suda çözülerek otoklavlandı. Daha sonra tüpler yatık bir şekilde tutularak besiyerinin katılaşması beklendi ve daha sonra taze bakteri kültüründen ekim yapılarak 2-5 gün bakteriler optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi.

Değerlendirme: Simmons citrate besiyerinde, uygun bir inkubasyon süresi sonunda hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif

reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.3.11. İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda bakterilerde cins ve türlerin ayırımında kullanılır. Bunun için; içinde 10 g/L / tripton ve 5 g/L NaCI bulunan sıvı besiyeri 7-9 mL olacak sekilde tüplerde hazırlandı. Bir günlük taze ve saf bakteri kültüründen 1 mL ekim yapıldı ve optimum sıcaklıkta 1-5 gün inkubasyona bırakıldı. Kültürlerin üzerine 2.5 g para amino benzaldehit, 37.5 mL etil alkol, 12.5 mL HCl ve 0.5 mL eterden hazırlanan kovaks ayıracından 0.5 mL ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

Değerlendirme: Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade eder. Sarımsı halka indolun oluşmadığını gösterir (negatif indol testi). Renk, indol içinde bulunan pyrrole'den ileri gelir.

3.3.12. Sodyum Azid Duyarlılığı

Hazırlanan NB sıvı besiyerlerine %0.02 olacak şekilde sodyum azid ilave edildi. 1 mL inokulum bakteri kültüründen ekim yapıldı ve çalkamalı su banyosunda 1-2 gün inkübe edildi. Sonuçlar 600 nm'de spektrofotometrede okunarak kontrolle karşılaştırıldı.

3.3.13. NaCl Toleransı

Bakterilerin NaCl toleransını saptamak için NB sıvı besiyeri saf su ile hazırlanıp % 0.5, %1, %2, %3, % 4, %5, % 7 ve % 10 konsantrasyonlarında NaCI eklendi. Hazırlanan besiyerlerinin içine 1 mL inokulum ekim yapıldı ve bir gün inkübe edildi. Bu süre sonunda değerler 600 nm'de spektrofotometrede okunarak kontrolle karşılaştırıldı.

3.3.14. Antibiyotik Duyarlılık Testi

NB sıvı besiyerinde gecelik kültürü hazırlanan bakterilerden 100 µL alınarak nutrient agar katı besiyerine yayma ekim yapıldı. Daha sonra kuruyan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 2 gün inkübatörde tutuldu. İnkübasyon süresi

sonunda antibiyotik disklerinin etrafında zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi ve zon büyüklüğü ölçüldü.

Değerlendirme: Disk etrafında boş bir zonun oluşması durumunda antibiyotik duyarlılığı pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. Kemotaksonomik Analizler

3.4.1. Lipit Analizi

Kullanılan Çözeltiler:

α-Naftol:

2.2 g α-Naftol (Sigma) 10.5 mL etil alkolde yavaş yavaş çözündü. Daha sonra 40.5 mL etil alkol eklendi yavaşça ve 4 mL H_2O damla damla eklendi.

$Ce(SO4)_4$:

120 mL H_2SO_4 damla damla 1000 mL H_2O'ya eklendi. Daha sonra 2 spatul $Ce(SO_4)_2$ (Sigma) yavaşça eklenip çözündü.

Ninhidrin:

1 spatul ninhidrin (Sigma) alınıp 100 mL asetonda çözündü.

Ditmer-Lester:

Çözelti A: 40.11 g M_OO_3 25N- H_2SO_4'e (%70 v/v) eklendi ve M_OO_3 çözününceye kadar kaynatıldı.

Çözelti B: 1.78 g M_O 500 mL çözelti A'ya eklendi ve 15 dk. kaynatıldı ve soğutuldu.

Soğuyan Çözelti B'den 50 mL ve Çözelti A'dan 50 mL olmak üzere eşit hacimde alınıp karıştırıldı ve kombine çözeltiye 200 mL distile su ilave edilerek hazırlandı.

Lipit analizi için bakterilerden her biri 3 L NB sıvı besiyerinde 1 gün üretildi. Daha sonra bakteri kültürü 10000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve pelet ayrı bir tüpte toplandı. Daha sonra pelet 2 defa yıkanarak tekrar 10000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Darası alınmış tüpte yaş bakteriler tartıldı ve 60^oC'de kurutuldu.

Çizelge 3.1. Lipit Analizi İçin Kullanılan Bakteri Miktarları

İzolat	Besiyeri (mL)	Yaş Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)
ST5	3000	12	1,2
GC2	3000	11	1,150
BT1B	3000	18	3
2TPIA	3000	10	1,5

Lipidler, NB ortamında üretilerek kurutulan bakteri nümunelerinden elde edildi (Çizelge 3.1). Hücreler, 80 mL hekzan içinde çözündü ve oda sıcaklığında 1 gece karıştırıcı üzerinde tutuldu. Daha sonra süpernatant kısmı filtre edildi ve rotavapordan (40^oC) geçirilerek kurutuldu. Kurutulan hücrelerin ağırlıkları tespit edildi ve $CHCl_3$ /CH_3OH/H_2O (65/25/4)'da çözündü. Daha sonra oda sıcaklığında 24 saat karıştırıcı üzerinde tutuldu. Hücreler filtre edildi ve ekstraktlar rotavaporda (40^oC) kurutularak ağırlıkları ölçüldü. Ağırlıkları tespit edilen ekstraktlar 1 mL $CHCl_3$/CH_3OH/H_2O (65/25/4)'da çözündü. Lipit ekstraktları ve standartlar 20x20 ebatındaki TLC'lere (Thin Layer Chromatography, Silika jel 60F254, 0.25 mm, Merck) uygulandı. Uygulanan bu numuneler $CHCl_3$/CH_3OH/H_2O (65/25/4) solventinde yürütüldükten sonra kurutuldu ve TLC'lere bakterilerin fosfolipitleri için Ditmer ve Lester solüsyonu, glikolipitleri için alfa-naftol, aminolipitleri için ninhidrin solüsyonu ve gliko-fosfo-aminolipitleri için $Ce(SO_4)_2$ ile muamele edilerek bakterilerin lipit profillerine bakıldı.

Ayrıca sırasıyla $CHCl_3$/CH_3 (65:25:4) ve $CHCl_3$/CH_3OH/CH_3COOH/H_2O (85:12:15:4) solvent sistemleri kullanılarak iki yönlü TLC ile 8 tane fosfolipit standartı kullanılarak bakterilerin içerdikleri fosfolipit çeşitleri tespit edildi. Bunun için 10x10 ebatındaki TLC'lere bakterilere ait numuneler ve 1:1 oranında hazırlanan 8 farklı fosfolipit standartı (PG, PS, PC3, PC1, CLBH, PI, AP, PEA) uygulandı.

3.4.2. Yağ Asidi Analizi

Yağ asidi metil esterleri lipit kompleksinden metanoliz ile elde edildi. Lipid ekstraktları, tartıldıktan sonra CH_3OH+HCl (9:1) solventinde çözündü ve 85^oC'de bir gece bekletildi. Daha sonra örnekler nitrojen altında kurutuldu ve 3 kez metanol ile

yıkandı. Kurutulan örnekler $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1) solventinde çözündü ve 20X20 ebadındaki TLC'ye yüklenerek hekzan/etil asetat (96/4) solvent sistemi ile yürütüldü. Daha sonra solventten çıkarılan TLC 5 dk. I_2 ile muamele edildi. Oluşan metil-ester bantları çizildi ve kazılarak $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1) solventinde çözündü. Daha sonra içinde silika (0.040-0.063 mm) olan cam kolona uygulandı. Filtre edilen örnekler azot altında kurutuldu ve ağırlıkları tespit edildi. Bakterilerin içerdiği yağ asitlerinin tiplerini ve miktarlarını tespit etmek için numuneler metanolde 1mg/mL olacak şekilde çözündü ve GC-MS (Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi) ile analiz edildi. FID dedektörü ile donatılmış bir HP-V kolonu bulunan Hewlett-Packard 5890A gaz kromatografisi kullanıldı. Akış oranı 45 mL/dk. ile 120^{o}C (1 dk.) sıcaklık programı kullanıldı (120^{o}C'den 250^{o}C dakikada 2^{o}C artan). Bileşiklerin tanımlanması standartlar kullanılarak kütle spektrumlarının yorumlanması ile elde edildi (Nicolaus ve ark. 2001).

3.4.3. Kinon Analizi

Bakterilerdeki kinon varlığını saptamak amacıyla, NB besiyerlerinde üretilip kurutulan bakteri numunelerine hekzan ilave edildikten sonra bir gece oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde tutuldu. Süpernatant kısmı filtre edildikten sonra rotavaporda (40°C) kurutuldu. Hekzan ekstraktları 500 µL $CHCl_3$' te çözündü ve 10x20 ebatındaki TLC'de hekzan/etil asetat solvent sisteminde yürütüldükten sonra TLC'ler kurutuldu ve TLC'ler üzerindeki kinon bantları UV altında tutularak işaretlendi. Daha sonra $Ce(SO_4)_2$ ile muamelesi ile kinon bantları tespit edildi.

Kinon analizi için, azot altında kurutulmuş bakteri numunelerine kloroform-d 99.8 atom %D'den 800 µL bırakıldı. Bu karışım özel NMR (Nükleer manyetik rezonans) tüpüne bırakıldı. Numunelerin ^{1}H NMR, (300 MHz) analizleri yapıldı. NMR analizi sonucunda elde edilen pikler, kinon tiplerinin verdiği spesifik pik değerleri ile karşılaştırarak bakterilerin kinon tipi tespit edildi. ^{1}H NMR analizinden sonra örnekler nitrojen altında kurutuldu ve LC- MS (Likit kromatografisi-kütle spektrometresi) ile kinonların içerdiği izopren üniteleri tespit edildi. Bunun için örnekler 10 µg/mL olacak şekilde metanolde çözünerek kinonların içerdiği izopren ünitelerini tespit etmek amacıyla LC-MS ile kinonların ağırlıklarının tespiti için analiz yapıldı (hekzan/etilasetat (99:1, v/v) ile yıkanmış akış oranı 1.0 mL/dak. olan Reverse Phase RP-18 Lichrospher (25064 mm) kolonu, 254 nm. dalga boyu) (Nicolaus ve ark. 2001).

3.5. 16S rRNA Gen Dizi Analizi

Full 16S ribozomal RNA dizi analizi için bakteriler Almanya'daki DSMZ'e gönderildi. Full 16S rRNA dizi analizi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Genomik DNA ekstraksiyonu MasterPure Gram Positive DNA Purification Kiti kullanılarak yapıldı. Daha sonra Rainey ve ark (1996)'na göre 16S rRNA amplifikasyonu PCR'la gerçekleştirildi. Sonrasında CEQ 8000 Genetic Analysis System kullanılarak dizi analizi yapıldı. Elde edilen 16S rRNA dizi analizi, *Enterobacteriaceae* ve *Gammproteobacteria* organizmalarına ait EMBL veri tabanındaki 16S rRNA dizi analizi ile karşılaştırılarak Maidak ve ark. (1999) göre 16S rRNA dizi benzerlikleri belirlendi.

Filogenetik ağaç olusturmak için, Her bir izolat için gönderilen 4 adet full 16S rDNA ham sekans verileri CLC Workbench v 4.0 Software (CLC bio, Aarhus,Denmark) programı ile tek bir sekans dizisi haline getirildi. Yakın türler NCBI (The National Center for Biotechnology Information) web sayfasından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) BLAST programında incelendi ve karşılaştırmaları yapıldı. Tüm izolatların sekans benzerliği ise ClustalW2 multiplesekans alignment programı kullanılarak gerçekleştirildi. Filogenetik ağaç dendogramı ise EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute) web sayfasından (http://www.ebi.ac.uk/tools/phylogeny/) neighboor joining method ile oluşturuldu. Oluşturulan ağacın güvenilirliği bootstrap 1000 ile değerlendirildi.

3.6. Bakterilerin Ham Petrol ve Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Bakterilerin hidrokarbonlarda üremeleri için BSM ortamı oluşturulmuştur (Nie ve ark. 2010'da modifiye edilmiştir). Bunun için;

1 litrede 5.0 mL sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0), 19.7 g K_2HPO_4, 8.7 g KH_2PO_4, 3.744 g $Na_2HPO_4.7H_2O$, 5.0 g NH_4Cl, 3.0 mL magnezyum sülfat çözeltisi (22.5 g/L $MgSO_4$), 1.0 mL kalsiyum klorür çözeltisi (36.4 g/L $CaCl_2$), 1.0 mL ferrik klorür çözeltisi (0.25 g/L $FeCl_3$), 1.0 mL iz mineral element çözeltisi ($MnSO_4$ (39.9 mg/L), $ZnSO_4.7H_2O$ (42.8 mg/L) ve $(NH_4)_6$ $Mo_7O_{24}.4H_2O$ (34.7 mg/L)) olacak şekilde hazırlanan BSM ortamına 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirilen %1 oranındaki squalen, toluen, benzen, n-hegzan, n-heptan, n-tridekan, n-pentadekan, n-

hegzadekan, fenantren, flüoranten, naftalin (Sigma) ve 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirilen ve 121^{o}C'de 21 dakika süreyle 3 kez steril edilen %1 oranındaki ham petrol eklendi. Daha sonra NB ortamında üretilen bir günlük taze kültür santrifüj edilerek NB'den kurtarıldı ve pelet BSM ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Yıkama işleminden sonra %1'lik hidrokarbon ve %1'lik ham petrol bulunan BSM ortamına NB'den kurtarılan bakteri kültüründen ekim yapıldı. Optimum üreme şartlarında 120 rpm'de bakteriler hidrokarbonlarda 2 gün, ham petrolde 7 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve 600 nm'de OD ölçümü yapıldı.

3.7. Sıvı Kültürde Ham Petrol ve n-Hegzadekan Degradasyonunun Belirlenmesi

Ham petrol biyodegradasyonu için; ham petrol, 121^{o}C'de 21 dakika süreyle 3 kez steril edildi ve 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirildi. Daha sonra hazırlanan BSM ortamına %1 olacak şekilde eklendi. n-Hegzadekan biyodegradasyonu için de bazal mineral ortamda alınan sonuçlarına göre n-hekzadekanda en yüksek OD değerleri elde edilen ST5, GC2 ve BT1A'nın n-hekzadekanı parçalama karekteristikleri incelendi. Bunun için; BSM'ye 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirilen %1 oranındaki hekzadekan eklendi. Daha sonra NB ortamında üretilen bir günlük taze kültür santrifüj edilerek NB'den kurtarıldı ve pelet BSM ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Daha sonra %1'lik ham petrol ve n-hegzadekan bulunan BSM ortamına yıkanan bakteri kültüründen ekim yapıldı ve her bir bakteri optimum şartlarda 120 rpm'de hegzadekanda 2 gün, ham petrolde 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası nümuneler 10000 rpm'de santrifüj yapılarak üst sıvı alındı ve GC analizi için Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı'na (TPAO) (Ankara) gönderildi. GC analizi aşağıdaki gibi yapılmıştır;

3.7.1. Numune Hazırlama

Suyla karışmış numuneler 15 mL n-hekzan ile karıştırılıp hidrokarbonların n-hekzan içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Üst fazı oluşturan n-hekzan çözeltisi alınmış ve içindeki n-hekzan uçurularak hidrokarbonlar elde edilmiştir. Elde edilen hidrokarbonlar karbon sülfür (CS_2) ile çözünerek gaz kromatografisi analizi yapılmıştır. Gaz kromatografisi analizi ile ilgili bilgiler aşağıdadır.

3.7.2. Gaz Kromatografisi Analizi

GC analizi, petrol veya bitüm örneği içerisindeki hidrokarbon bileşikleri varlığının tespiti ve bu bileşiklerin genel dağılımını görmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir.

Tüm petrol GC analizi FID dedektörlü Agilent 6850 GC cihazı ile yapılmaktadır. HP-1 (100m×0.250mm i.d.×0.50m) kapiler kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmaktadır.

Analiz için asfalteni giderilmemiş numune kullanılmaktadır. Her bir analiz için söz konusu numunelerden 1 µL numune gaz kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Analiz koşulları aşağıdadır.

Enjektör sıcaklığı: 300^{o}C

Dedektör sıcaklığı: 350^{o}C

Çizelge 3.2. Gaz Kromatografisi Fırın Sıcaklık Programı

	Sıcaklık Artış hızı, ^{0}C/dk	Sıcaklık, ^{0}C	Bekleme Süresi, dk
Başlangıç		35	8
Artış 1	3	320	60

Toplam analiz süresi: 163 dk.

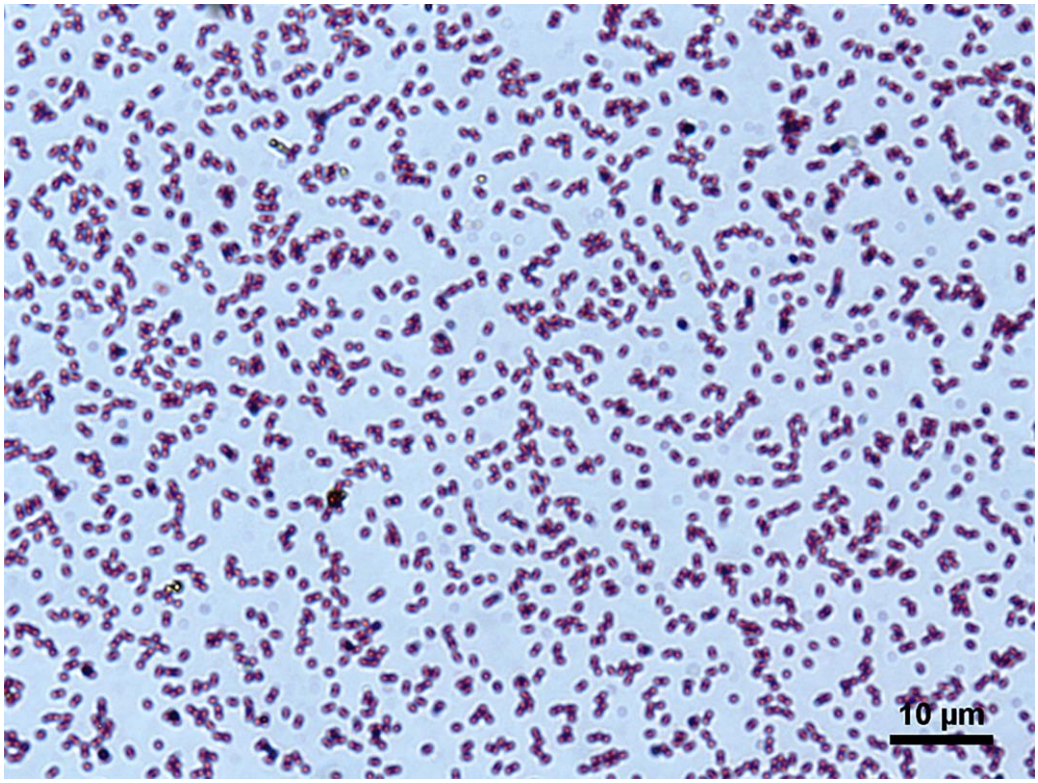
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri İzolasyonu

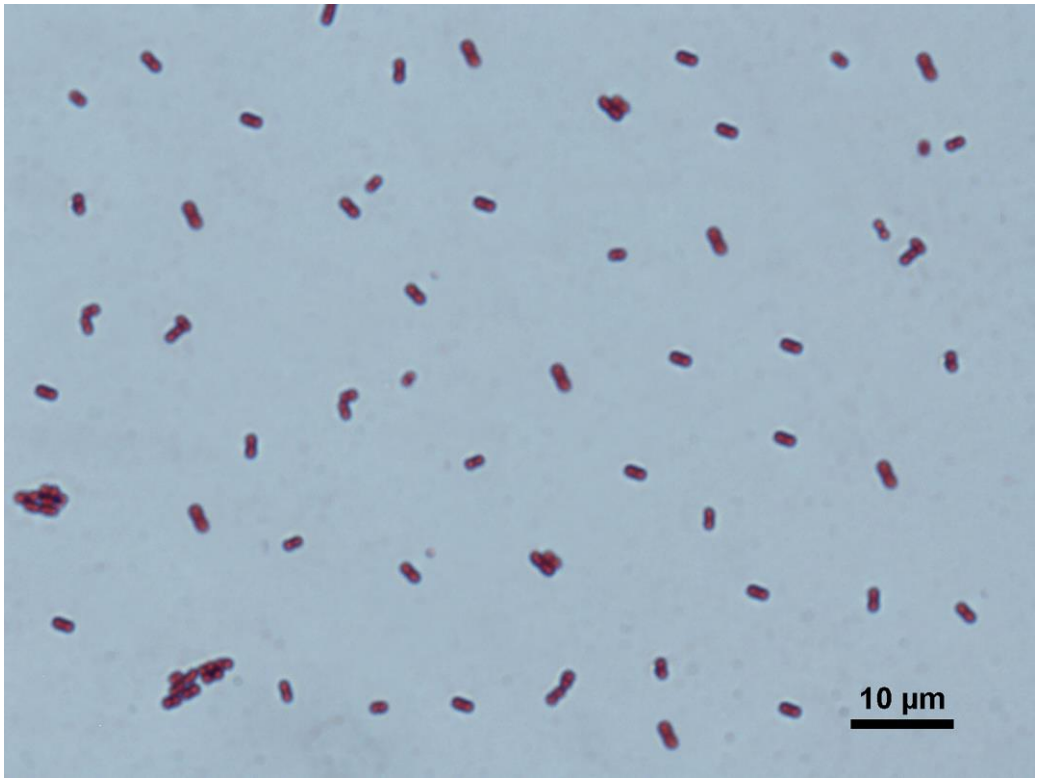
Diyarbakır ve Batman'daki 9 farklı petrol istasyonundan onbeş bakteri varyetesi izole edildi. 16S rRNA dizi analizi sonucunda yeni tür olabilecek ve petrolde gelişme özelliği bulunan 5 izolat üzerinde çalışmalar sürdürüldü. Diyarbakır'daki, Sarıcak 11 petrol istasyonundan ST5, Bozkuş 1 petrol istasyonundan GC2, Beykan 27 petrol istasyonundan BT1A ve BT1B ve Batman'daki 2TP1 petrol istasyonundan 2TP1A olarak adlandırılan izolatlar elde edildi.

4.2. Morfolojik Analizler

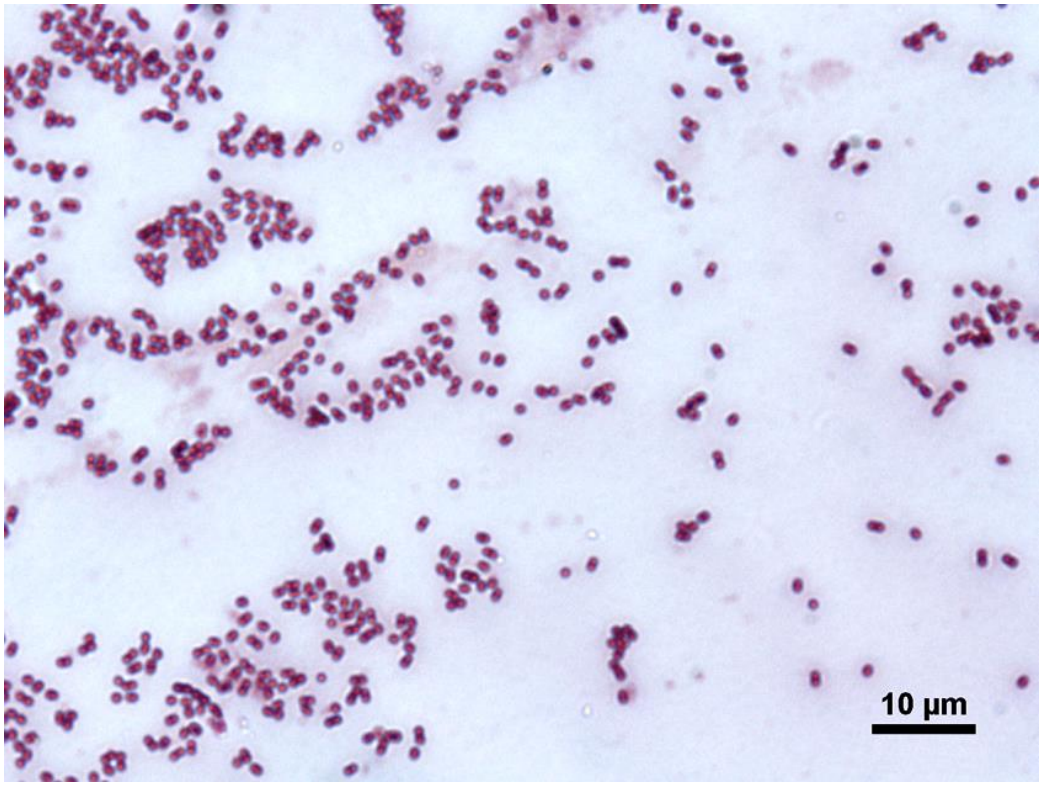
Diyarbakır Sarıcak 11 petrol istasyonundan izole edilen ST5'in Gram-negatif (Şekil 4.1), spor oluşturmayan, aerobik, hareketli ve kokobasil; Bozkuş 1 Petrol İstasyonu'ndan izole edilen GC2'nin Gram-negatif (Şekil 4.2), spor oluşturmayan, aerobik, hareketsiz ve kokobasil; Beykan 27 Petrol İstasyonu'ndan izole edilen BT1A'nın Gram-negatif (Şekil 4.3), spor oluşturmayan, aerobik, hareketli ve kokobasil; BT1B'nin Gram-negatif (Şekil 4.4), spor oluşturmayan, fakültatif anaerob, hareketli ve hücrelerinin çubuk şeklinde olduğu tespit edildi. Batman Petrolleri Batı Raman Sahası 2TP1 Petrol istasyonu'ndan izole edilen 2TP1A'nın ise Gram-negatif (Şekil 4.5), spor oluşturmayan, aerobik, hareketsiz ve hücrelerinin çubuk şeklinde olduğu tespit edildi.



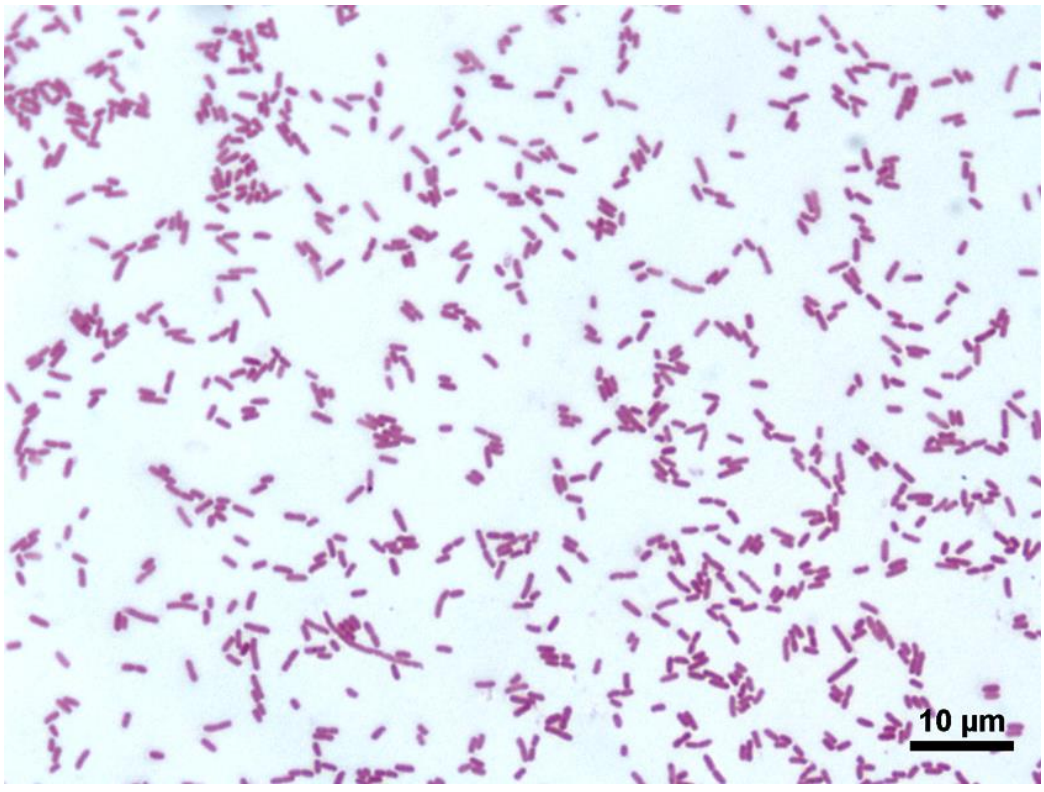
Şekil 4.1. ST5'in Gram Boyama Özelliği



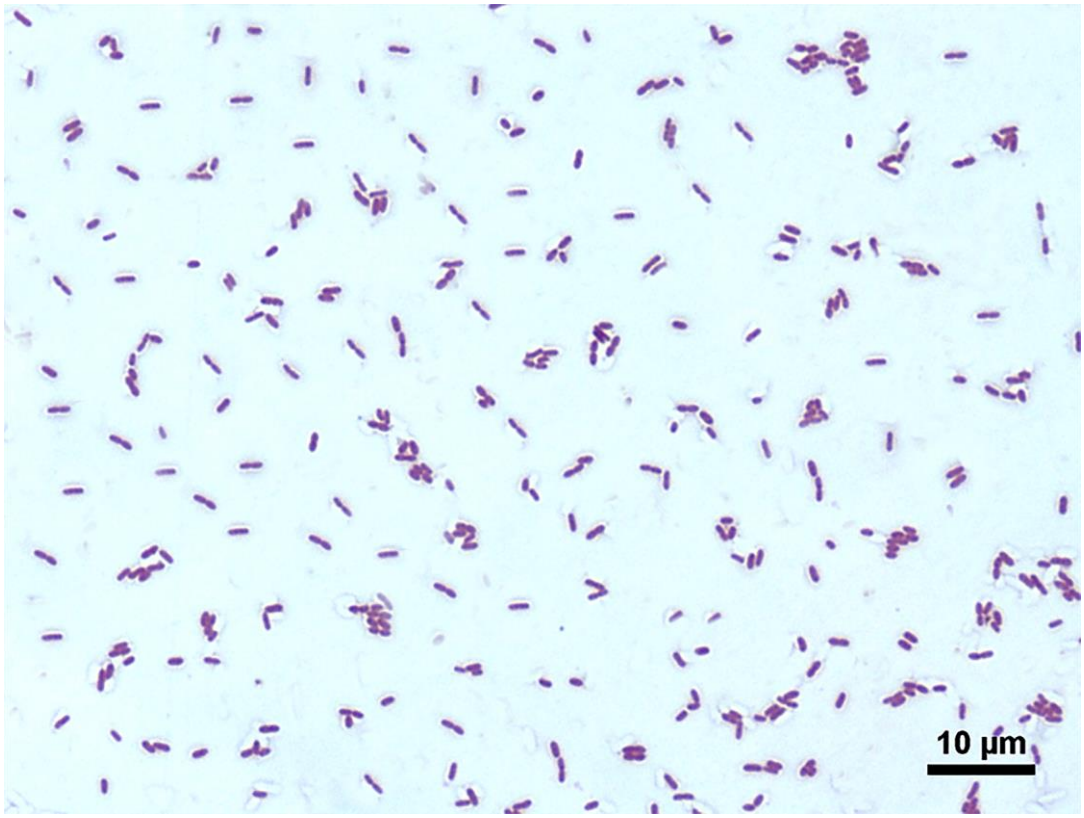
Şekil 4.2. GC2'nin Gram Boyama Özelliği



Şekil 4.3. BT1A'nın Gram Boyama Özelliği

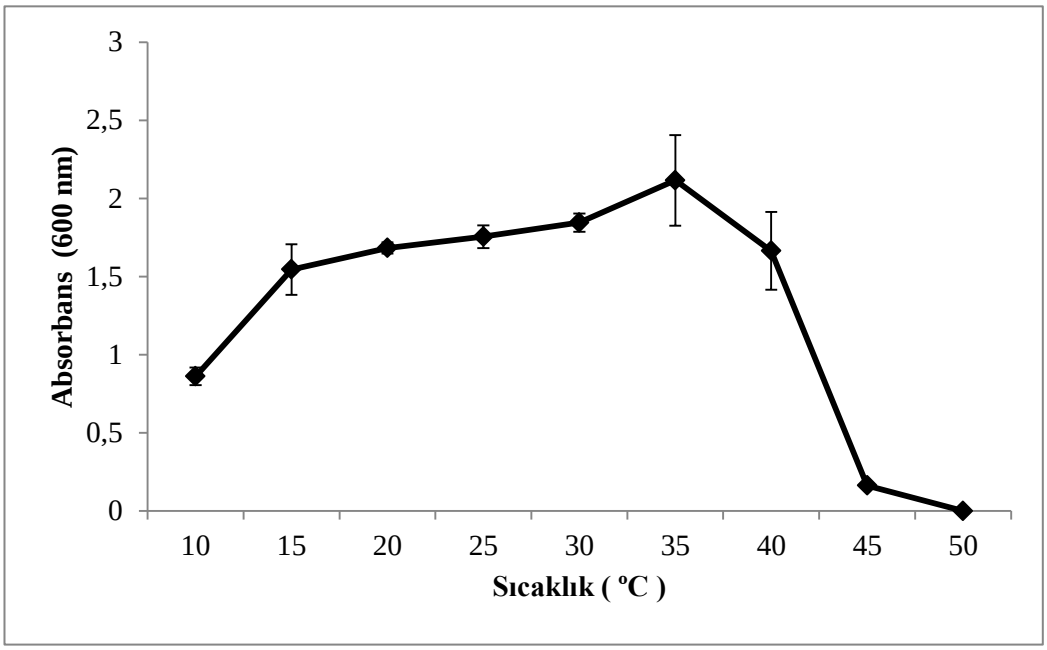


Şekil 4.4. BT1B'nin Gram Boyama Özelliği



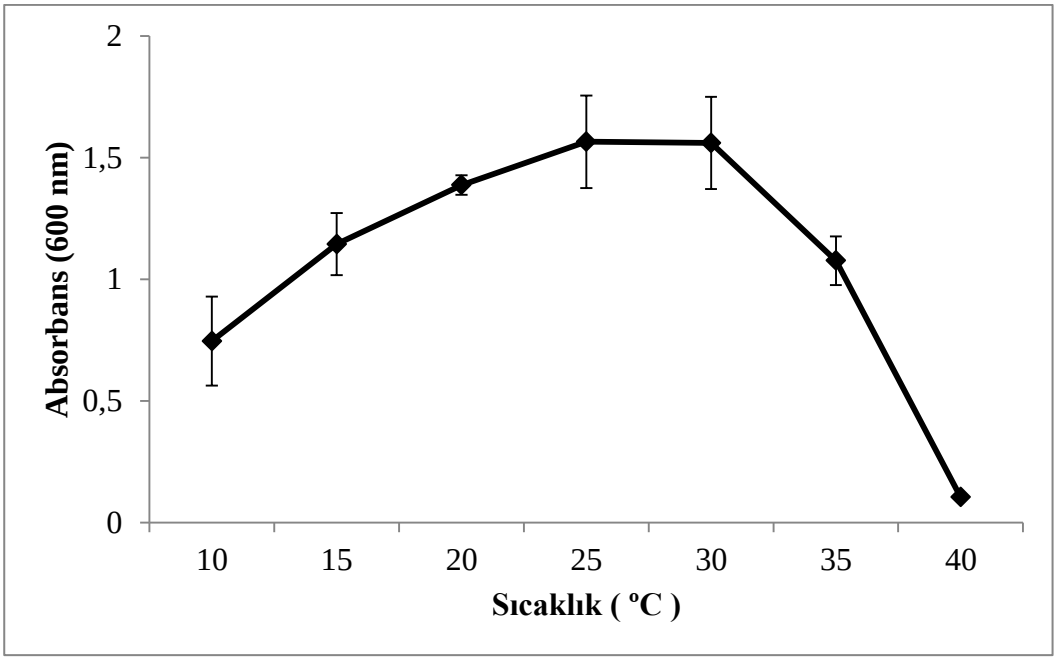
Şekil 4.5. 2TP1A'nın Gram Boyama Özelliği

4.3. Optimum Üreme Şartlarının Tespiti



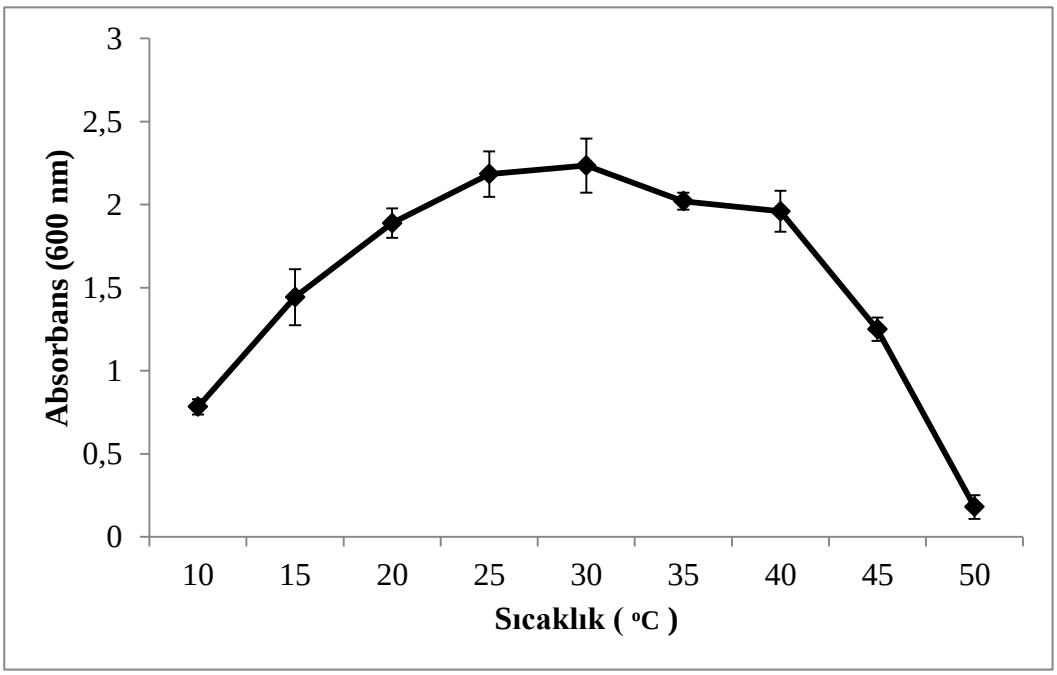
Şekil 4.6. Sıcaklığın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.6'da ST5'in sıcaklığa bağlı üreme grafiği görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ST5'in 10-40^{o}C sıcaklık aralığında ürediği tespit edilmiş olup optimum üreme sıcaklığı 35^{o}C olarak belirlenmiştir.



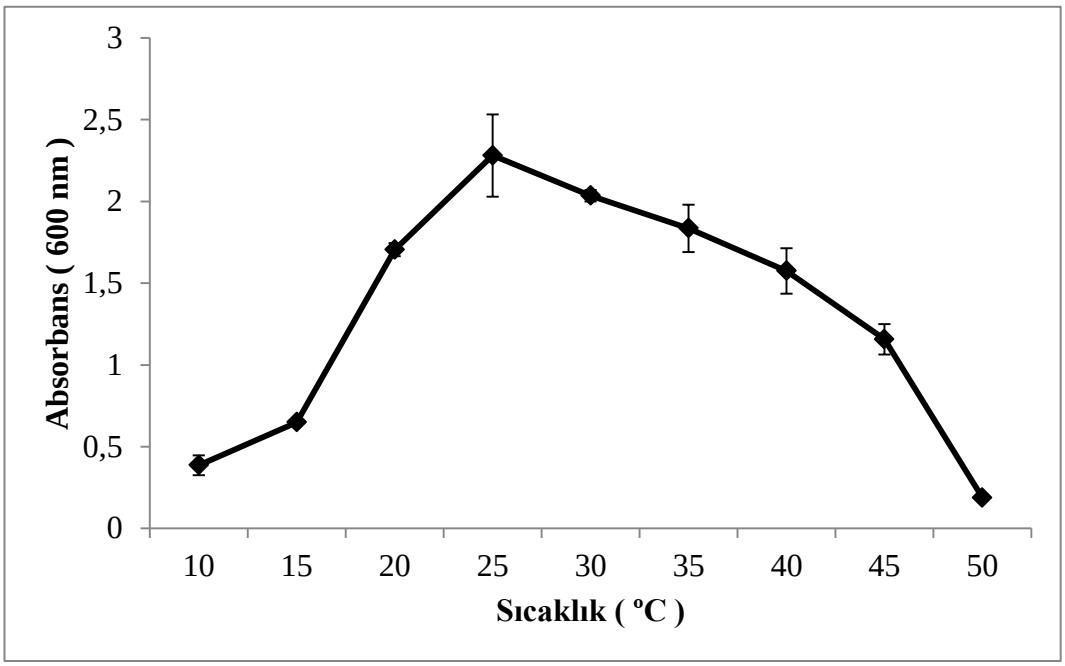
Şekil 4.7. Sıcaklığın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.7'de GC2'nin sıcaklığa bağlı üreme grafiği görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi GC2'nin 10-35^{o}C sıcaklık aralığında ürediği tespit edilmiştir. Optimum üreme sıcaklığı ise 25-30^{o}C olarak belirlenmiştir.



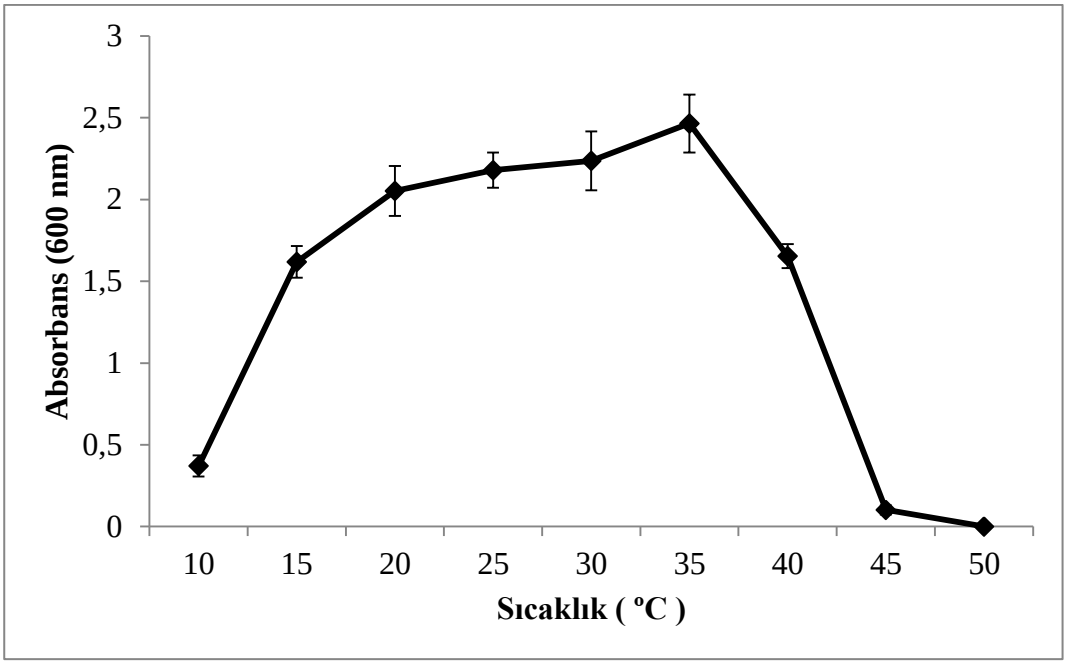
Şekil 4.8. Sıcaklığın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.8'de sıcaklığın BT1A'nın üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi BT1A'nın 10-45^{o}C sıcaklık aralığında ürediği belirlenmiştir. Ürediği optimum sıcaklık değeri ise 30^{o}C olarak tespit edilmiştir.



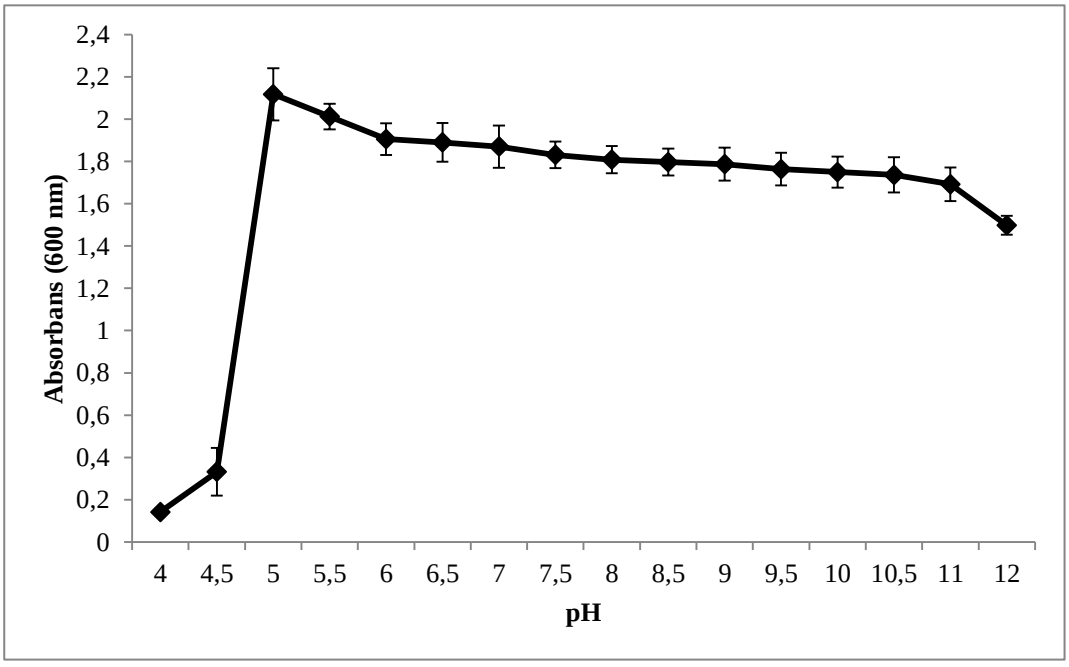
Şekil 4.9. Sıcaklığın BT1B'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.9, BT1B'nin sıcaklığa bağlı üreme grafiğini göstermektedir. BT1B'nin 10-45^{o}C sıcaklık aralığında ürediği belirlenmiştir. Optimum üreme sıcaklığı ise 25^{o}C olarak tespit edilmiştir.



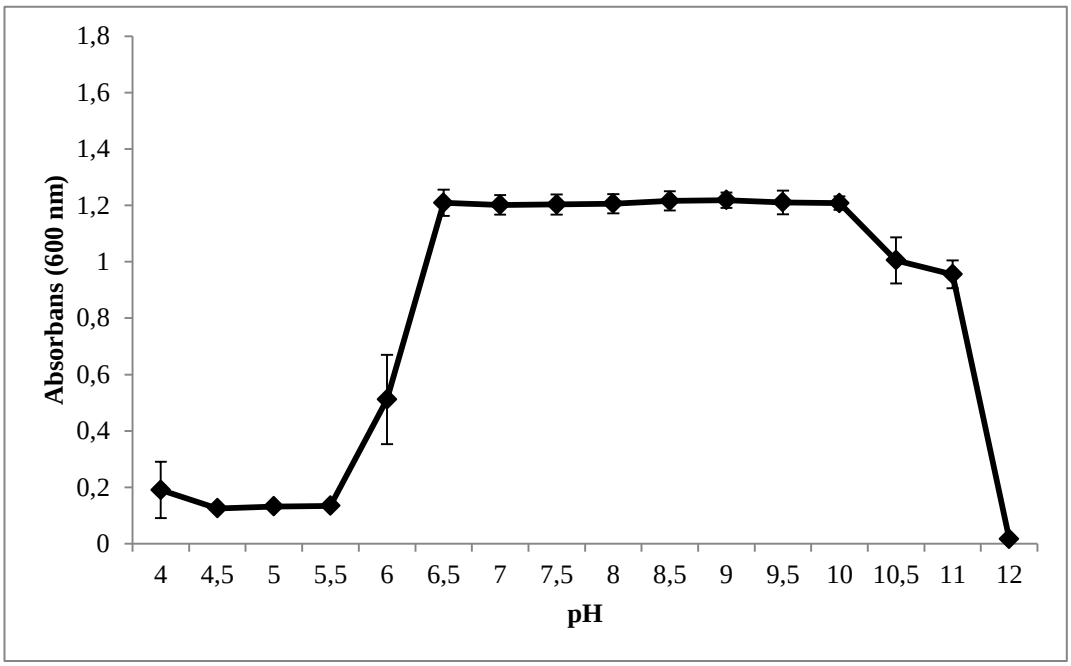
Şekil 4.10. Sıcaklığın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.10, sıcaklığın 2TP1A'nın üremesi üzerine olan etkisini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi BT1B, 10-40^{o}C sıcaklık aralığında ürediği ve optimum üreme sıcaklığı 35^{o}C olarak tespit edilmiştir.



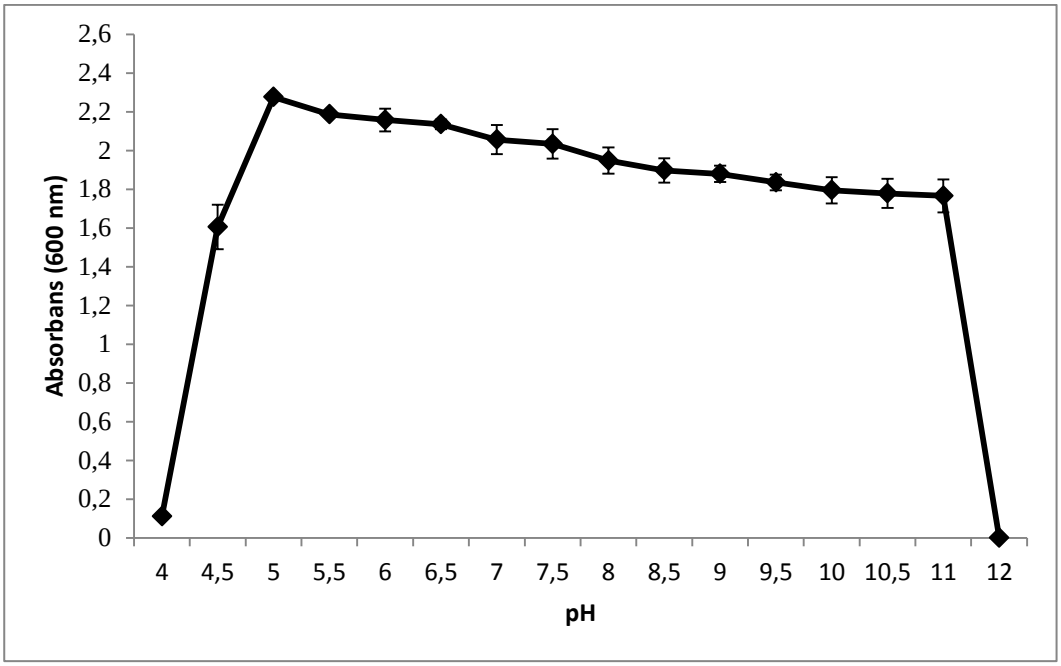
Şekil 4.11. pH'nın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.11'de pH'nın ST5'in üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ST5, 5.0-12.0 gibi geniş pH aralığında üremekte olup optimum üreme pH'sı 5.0 olarak tespit edilmiştir.



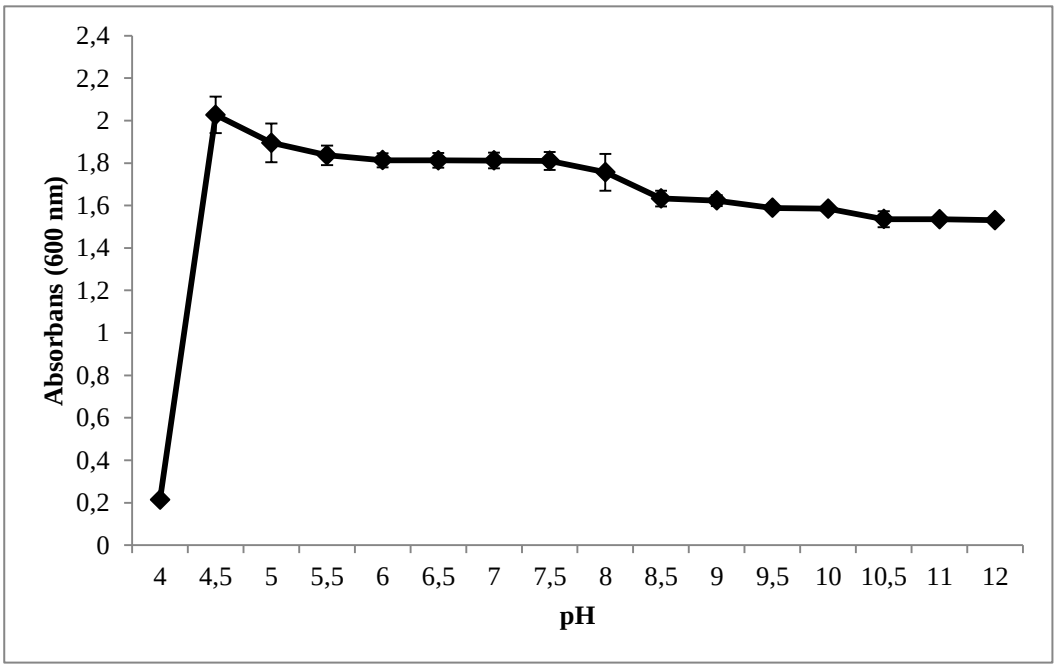
Şekil 4.12. pH'nın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.12, pH'nın GC2'nin üremesi üzerine olan etkisini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi GC2, 6.0-11.0 pH aralığında üremekte olup en yüksek üremeyi pH 6.5-10.0 aralığında gerçekleştirmiştir.



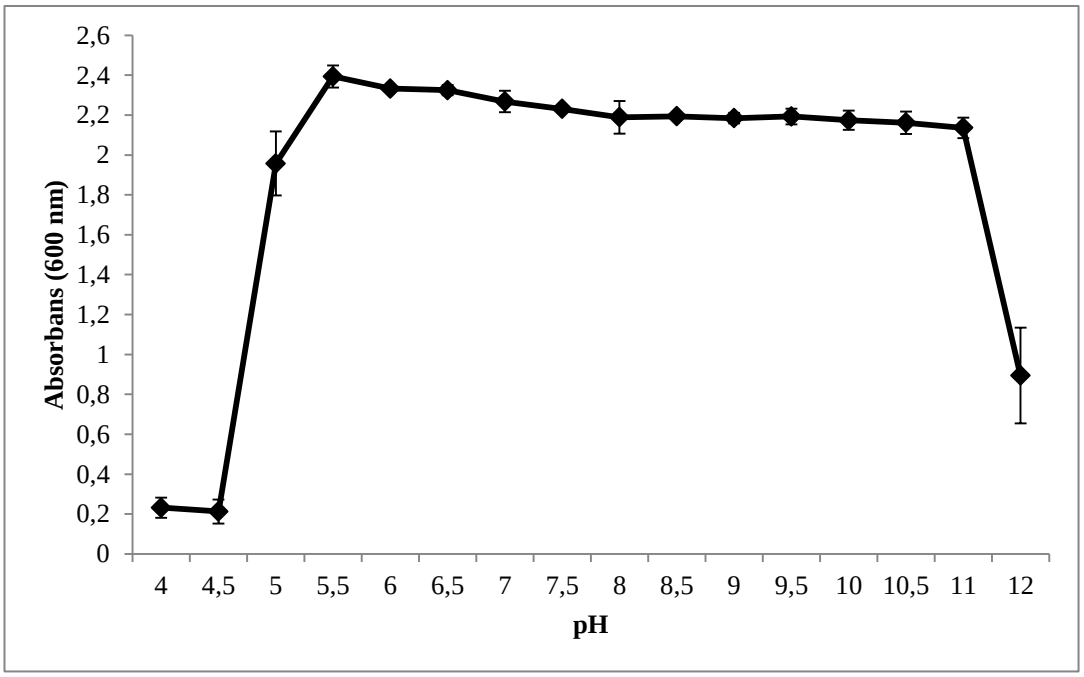
Şekil 4.13. pH'nın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.13'te pH'nın BT1A'nın üremesi üzerindeki etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi BT1A, 4.5-11.0 gibi geniş bir pH aralığında üremekle beraber optimum üreme pH'sı 5.0 olarak tespit edilmiştir.



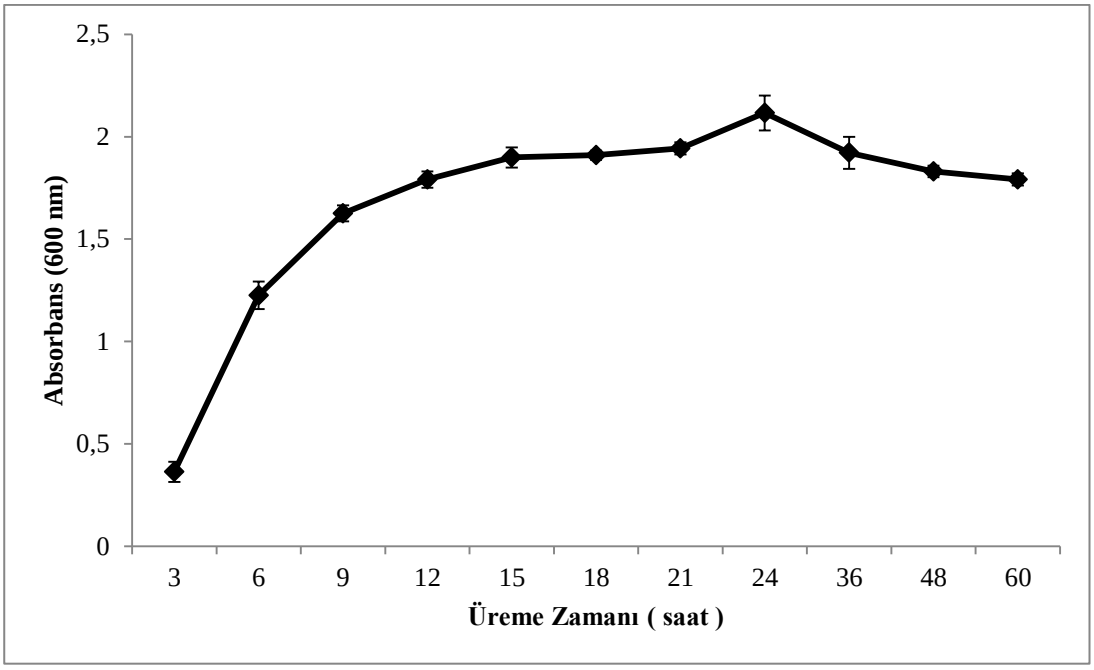
Şekil 4.14. pH'nın BT1B'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.14, BT1B'nin pH'ya bağlı üreme eğrisini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi BT1B'nin 4.5-12.0 gibi geniş pH aralığında ürediği belirlenmiştir. Optimum üreme pH'sı ise 4.5 olarak tespit edilmiştir.



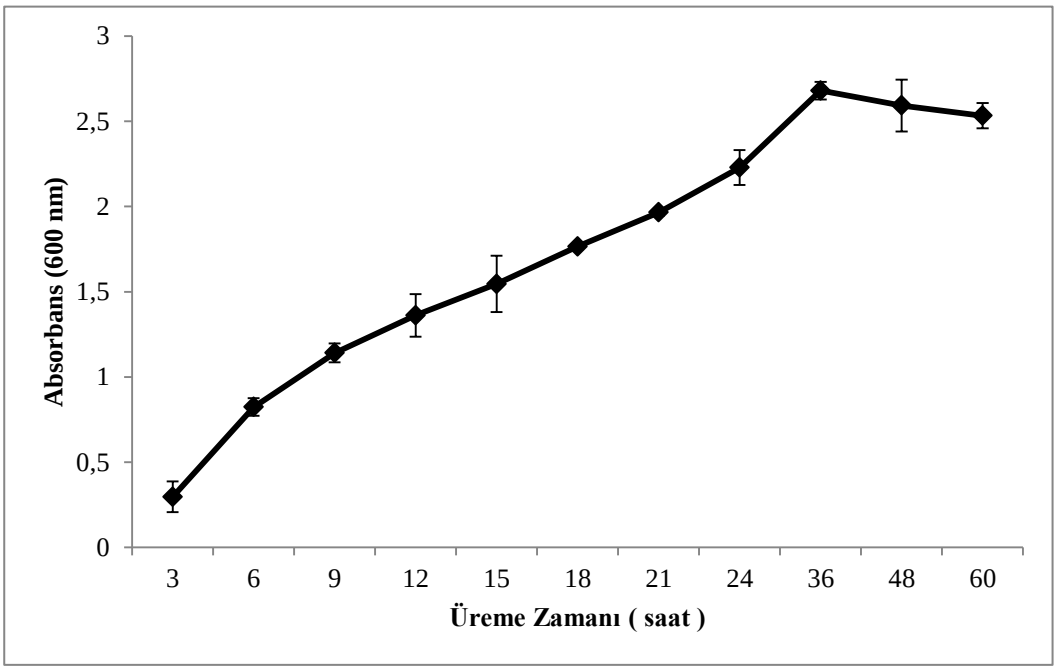
Şekil 4.15. pH'nın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.15, pH'nın 2TP1A'nın üremesi üzerine olan etkisini göstermektedir. Şekilde de görüldüğü gibi 2TP1A'nın 5.0-12.0 gibi geniş bir pH aralığında ürediği tespit edilmiş olup optimum üreme pH'sı da 5.5-6.5 olarak belirlenmiştir.



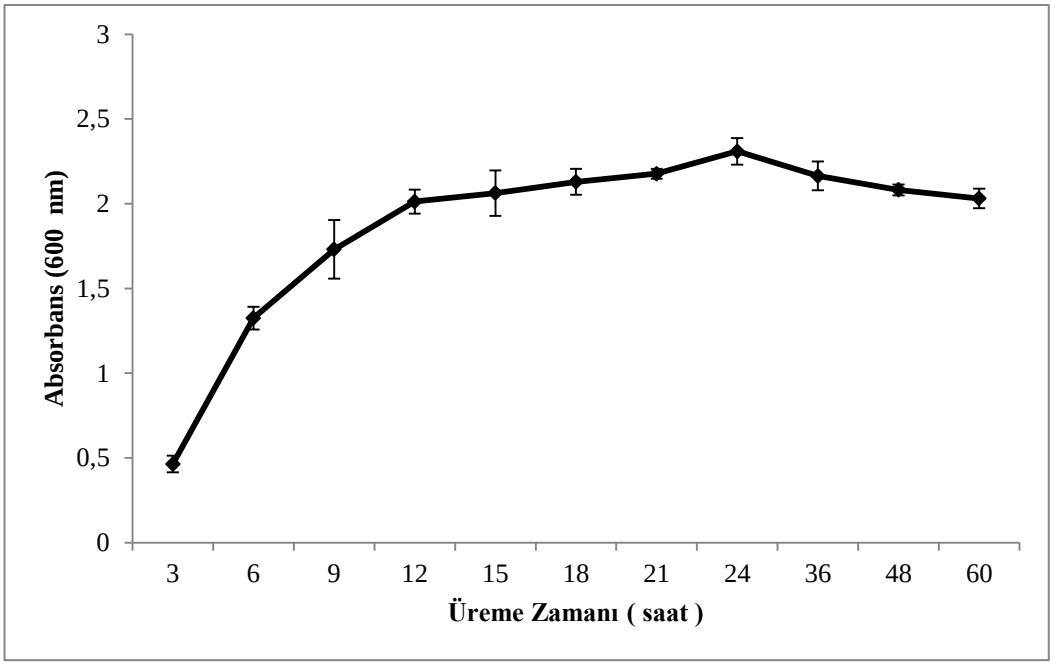
Şekil 4.16. Zamanın ST5'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.16'da inkübasyon süresinin ST5'in üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ST5'in üremesinin 24. saate kadar arttığı ve sonrasında da düşme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. En yüksek üreme 24. saatte tespit edildi.



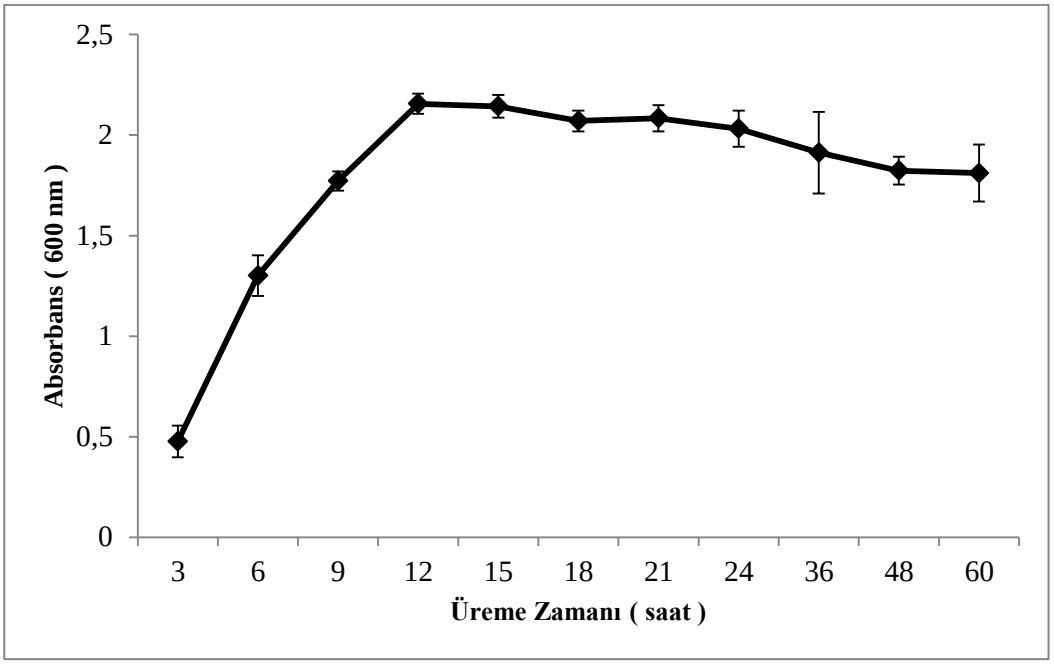
Şekil 4.17. Zamanın GC2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.17, inkübasyon süresinin GC2'nin üremesi üzerine olan etkisini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi GC2'nin üremesinin, 36. saate kadar arttığı ve sonrasında da düşme eğiliminde olduğu görülmüştür. En yüksek üreme ise 36. Saatte elde edilmiştir.



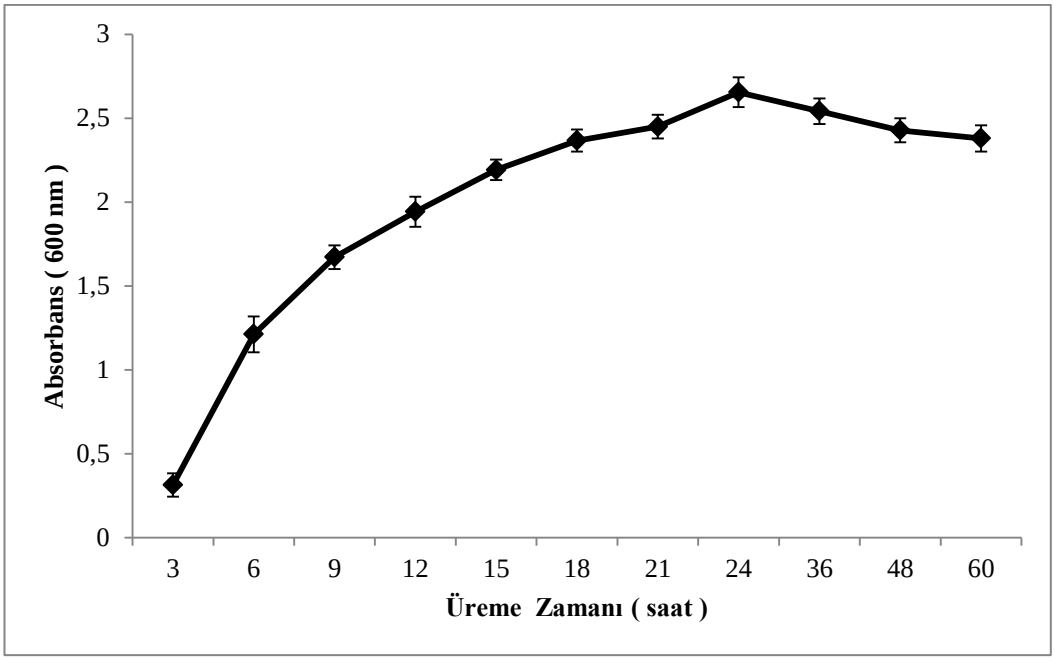
Şekil 4.18. Zamanın BT1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.18'de BT1A'nın zamana bağlı üreme grafiği görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi 24. saate kadar üremede artış görülmüş olup sonrasında düşme eğilimi görülmüştür. En yüksek üreme 24. saatte elde edilmiştir.



Şekil 4.19. Zamanın BT1B'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.19, BT1B'nin zamana bağlı üreme grafiğini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi BT1B'nin üremesinde 12. saate kadar hızlı bir artış görülmüştür. Daha sonraki saatlerde ise düşme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek üreme, 12-15. saatlerinde tespit edilmiştir.

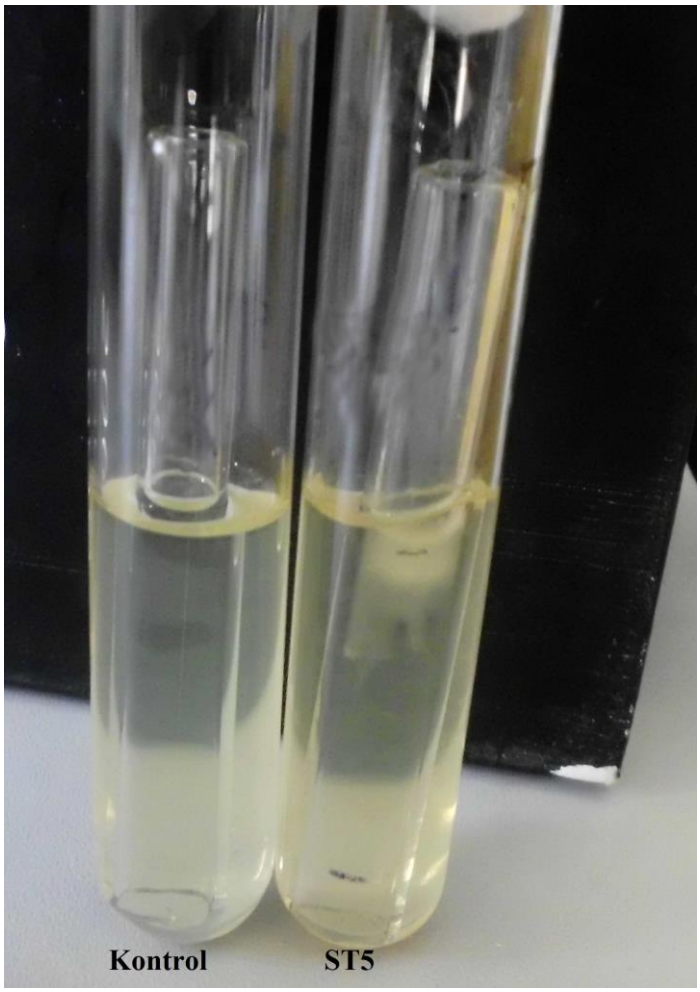


Şekil 4.20. Zamanın 2TP1A'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.20'de inkübasyon süresinin 2TP1A'nın üremesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi 2TP1A'nın 24. saate kadar üremesinde hızlı bir artış görülmekle beraber 24. saatten sonra düşüş gözlenmiştir. En yüksek üreme 24. saatte elde edilmiştir.

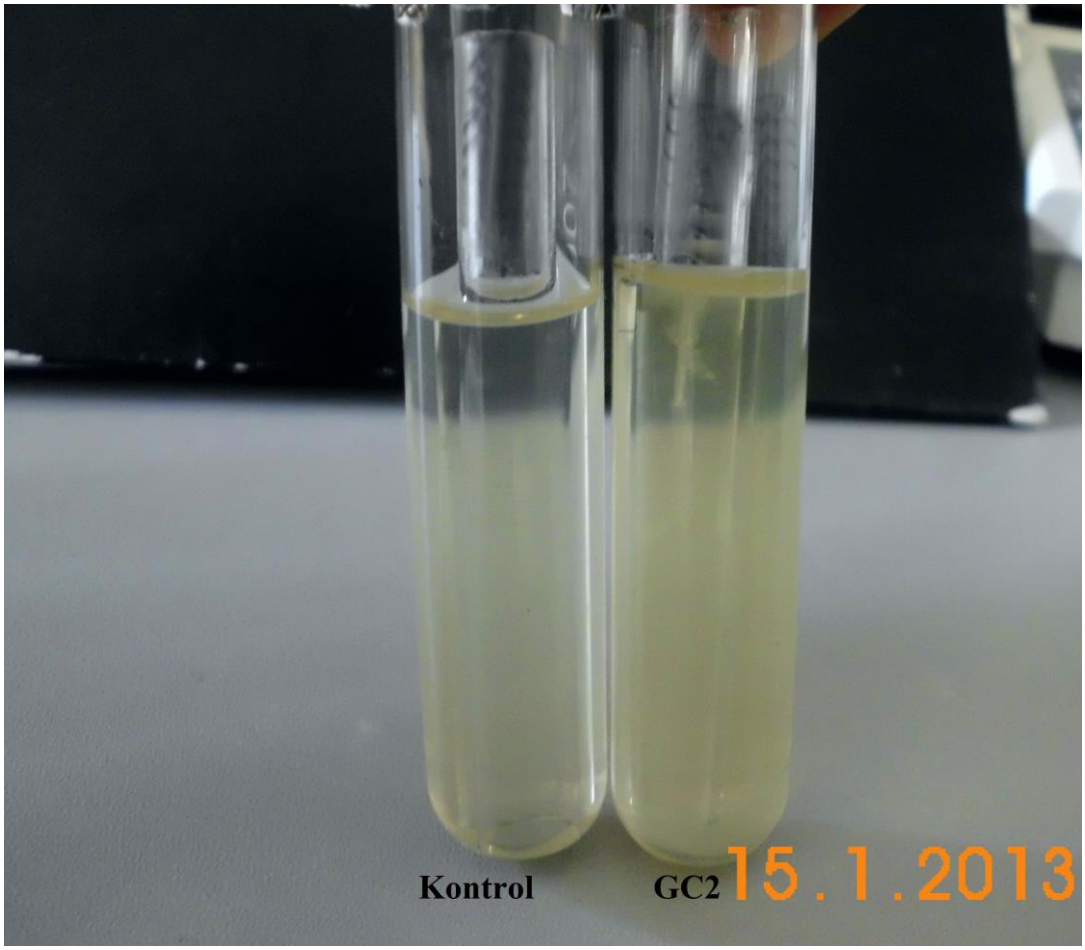
4.4. Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

4.4.1. Hareketlilik ve Oksijen Gereksinimi



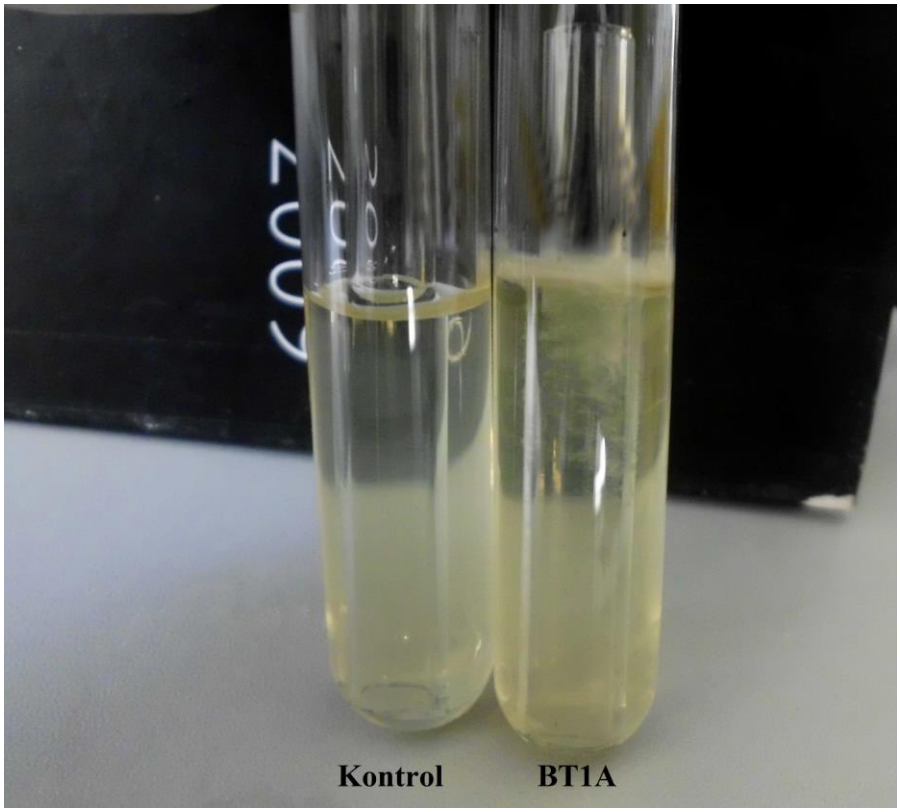
Şekil 4.21. ST5'in Hareket Testi

Şekil 4.21'de ST5'e ait hareket testi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi inokülasyon hattı boyunca üremenin olduğu ve inokülasyon hattından agarın içine doğru bir yayılma gözlenmektedir. Bu da ST5'in hareketli olduğunu göstermektedir. Ayrıca üremenin inokülasyon hattı boyunca üste doğru oluşu ST5'in oksijen gereksinimi bakımından aerobik olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22. GC2'nin Hareket Testi

Şekil 4.22, GC2'ye ait hareket testini göstermektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma görülmemesi GC2'nin hareketsiz olduğunu göstermektedir. Üremenin inokülasyon hattı boyunca yukarıya doğru olması da GC2'nin oksijen gereksinimi yönünden aerob olduğunu kanıtlamaktadır.



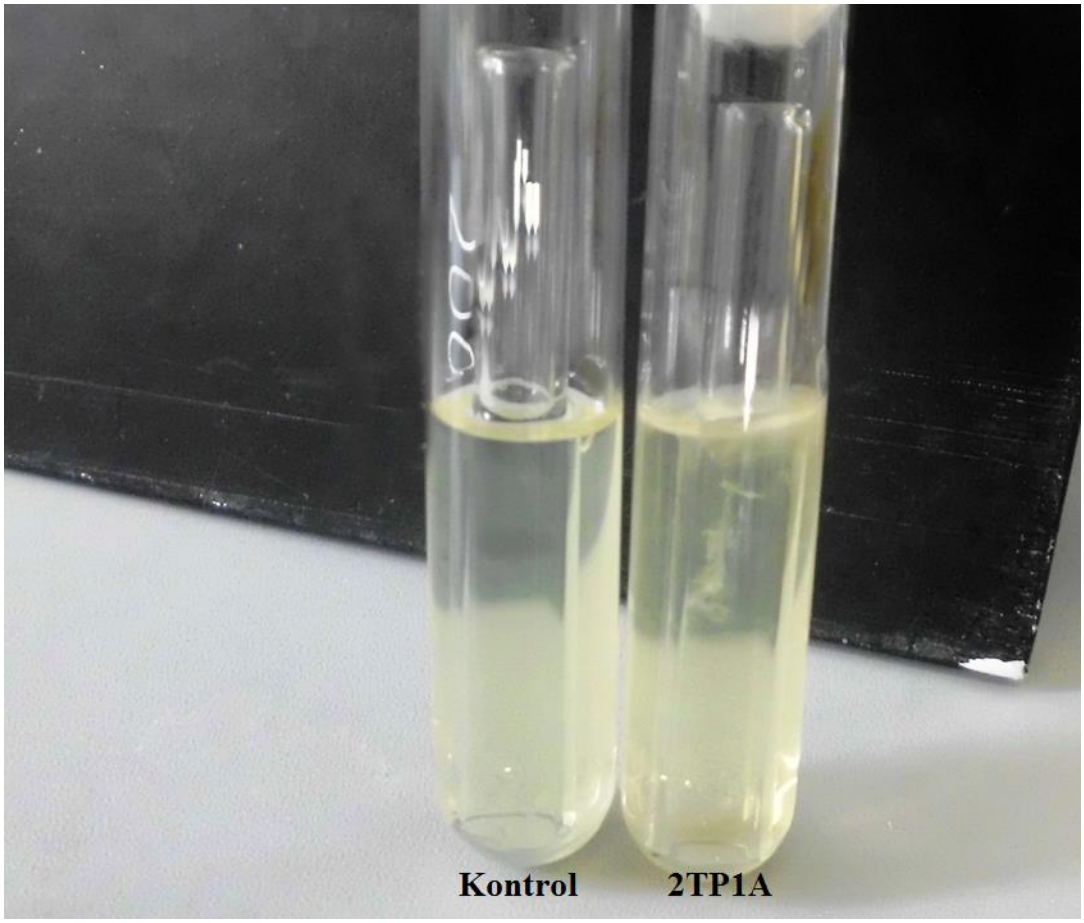
Şekil 4.23. BT1A'nın Hareket Testi

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ve inokülasyon hattından etrafa doğru agarın içine dogru bir yayılma gözlenmesi BT1A'nın hareketli, üremenin yukarıya doğru olması da oksijen gereksinimi bakımından aerob olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.24. BT1B'nin Hareket Testi

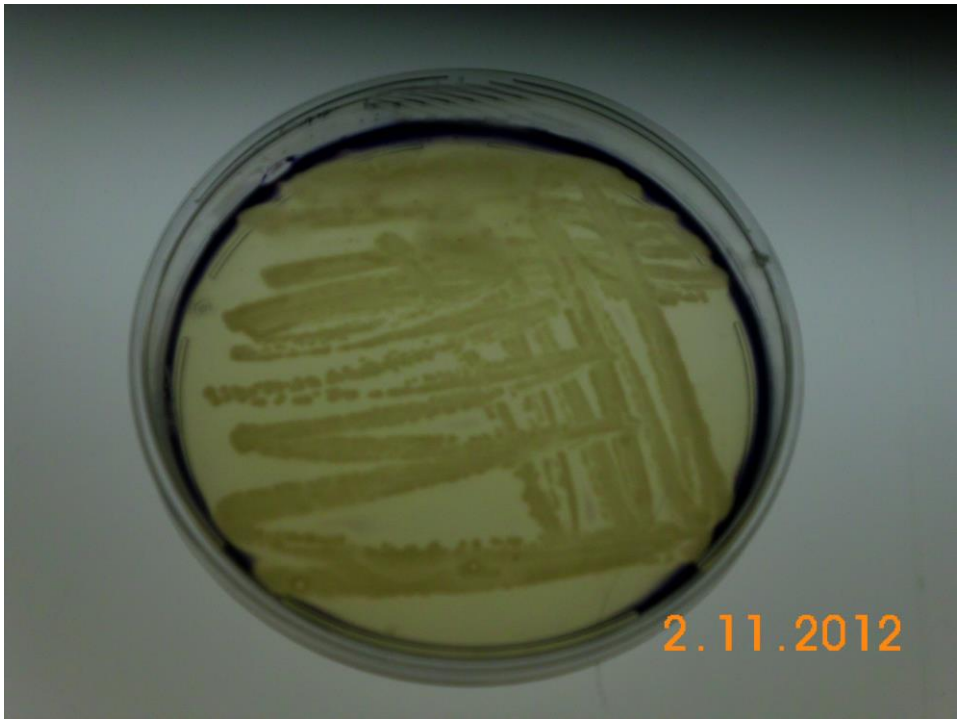
Şekil 4.24'te BT1B'ye ait hareketlilik testi görülmektedir. İnokülasyon hattı boyunca üreme var ve sağa sola doğru yayılma ve dallanmalar görüldüğü için BT1B hareketli ve üremenin inokülasyon hattının tüm kısmıda görülmesi sebebiyle oksijen gereksinimi bakımından fakültatif anaerob olarak değerlendirildi.



Şekil 4.25. 2TP1A'nın Hareket Testi

Şekil 4.25'te görüldüğü gibi, inokülasyon hattı boyunca üreme var ve inokülasyon hattından agarın içine doğru bir yayılma gözlenmediğinden dolayı 2TP1A hareketsiz olarak değerlendirildi. Üreme inokülasyon hatının yukarısına doğru gerçekleştiği için de oksijen gereksinimi bakımından 2TP1A'nın aerob olduğu tespit edildi.

4.4.2. Nişasta Hidroliz Testi



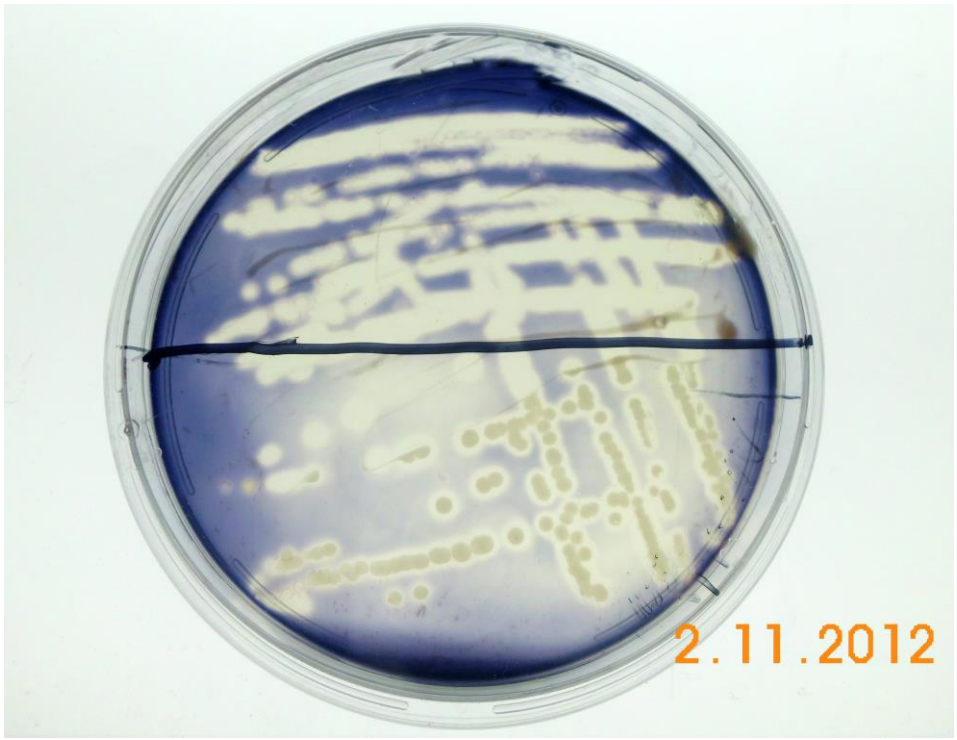
Şekil 4.26. ST5'e Ait Nişasta Hidroliz Testi



Şekil 4.27. GC2'ye Ait Nişasta Hidroliz Testi



Şekil 4.28. BT1A'ya Ait Nişasta Hidroliz Testi



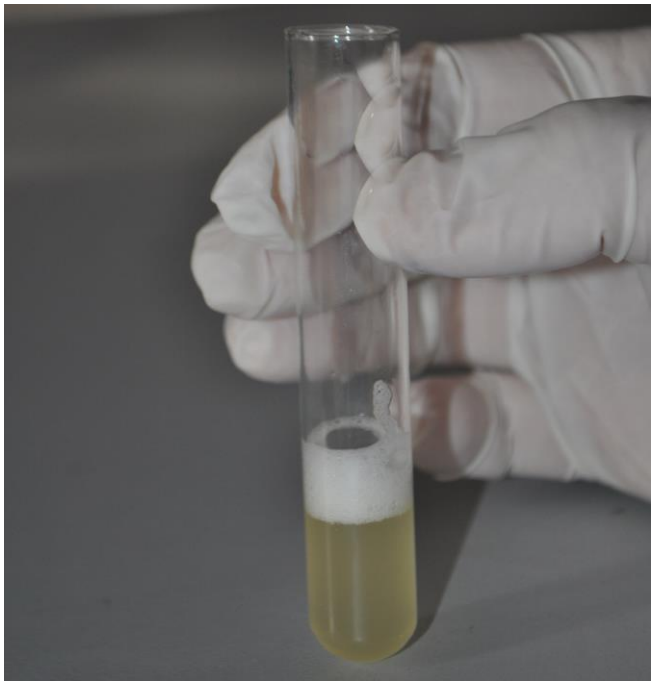
Şekil 4.29. BT1B'ye Ait Nişasta Hidroliz Testi



Şekil 4.30. 2TP1A'ya Ait Nişasta Hidroliz Testi

İzolatların, nişastayı parçalayan ekstraselüler amilaz enzimini üretip üretmediğini ortaya koymak amacıyla nişastalı besiyerlerine bu izolatlardan ekim yapıldı ve inkübasyon sonucunda petri üzerine iyodür solüsyonu damlatılarak renk değişimi gözlendi. Şekil 4.26-4.30'da sırasıyla ST5, GC2, BT1A, BT1B ve 2TP1A'ya ait nişasta hidroliz test sonuçları görülmektedir. Şekillerden de görüldüğü gibi ST5, GC2, BT1A ve BT1B'de besi ortamının iyodürle koyu menekşe rengine boyandığı ancak kolonilerin etrafında açık renkli zonlar oluştuğu, 2TP1A'da ise tüm besiyerinin koyu renge boyandığı gözlendi. Bu sonuçlara göre ST5, GC2, BT1A ve BT1B'nin nişasta hidrolizi bakımından güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği, 2TP1A'nın ise negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

4.4.3. Katalaz Testi



Şekil 4.31. ST5'in Katalaz Testi



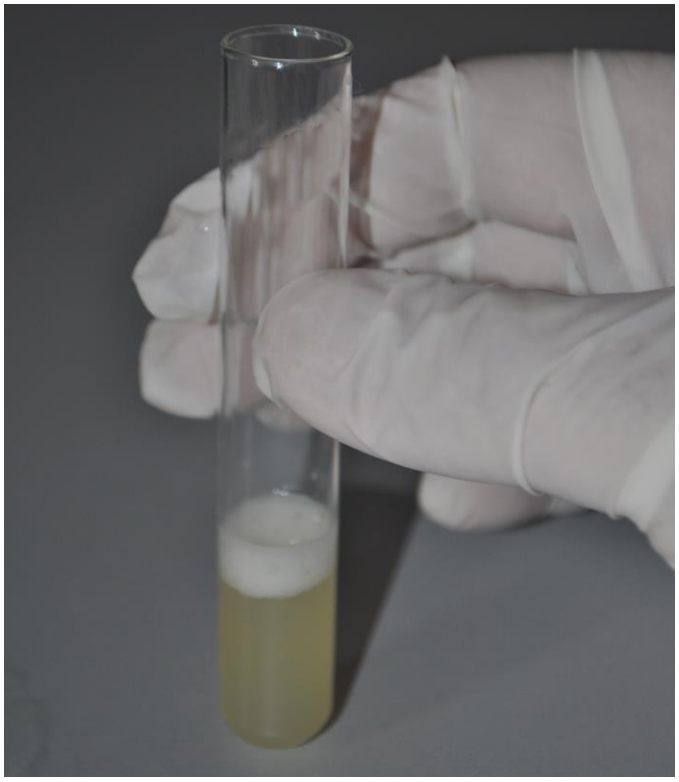
Şekil 4.32. GC2'nin Katalaz Testi



Şekil 4.33. BT1A'nın Katalaz Testi



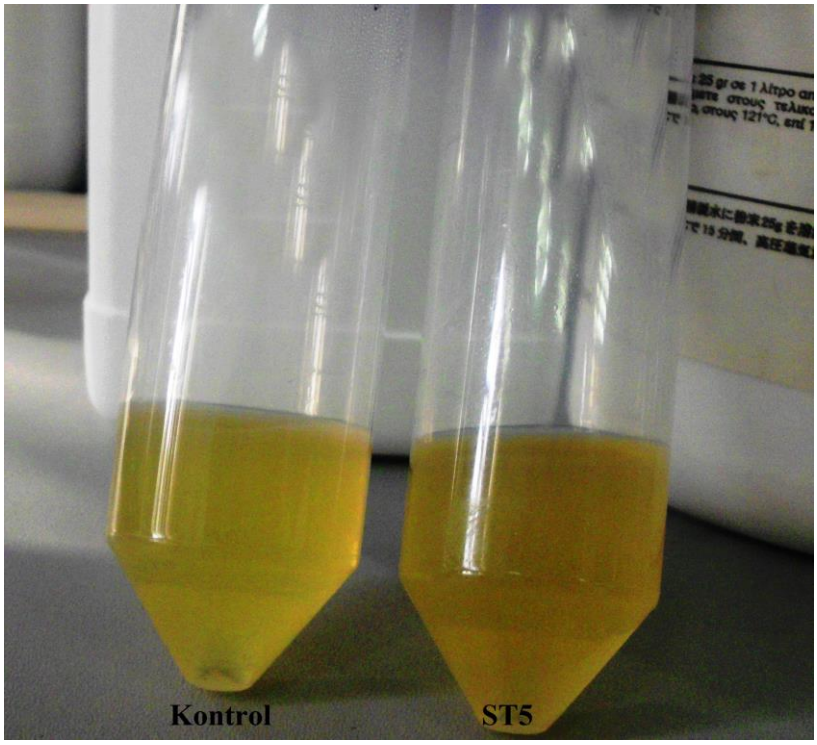
Şekil 4.34. BT1B'nin Katalaz Testi



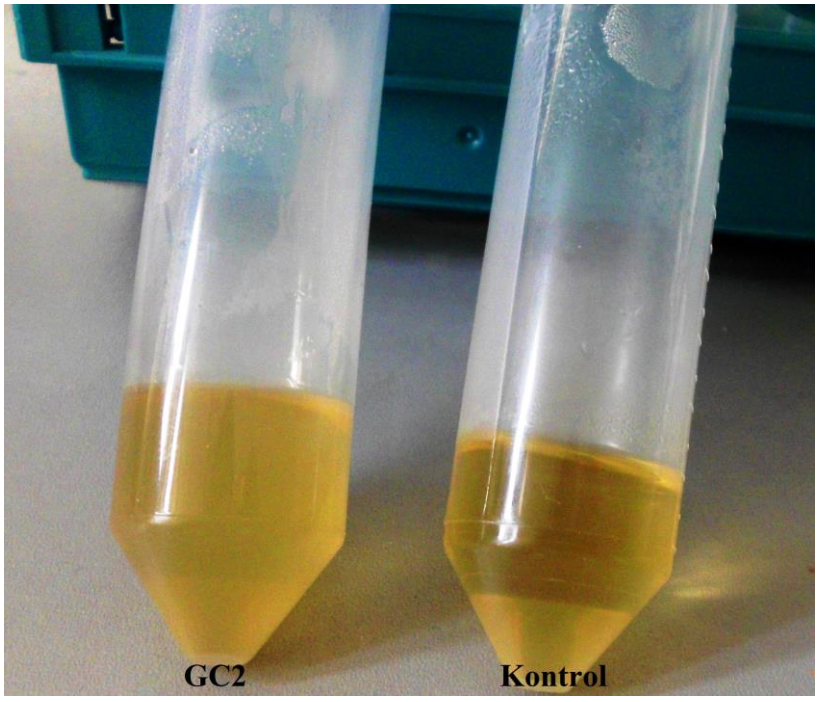
Şekil 4.35. 2TP1A'nın Katalaz Testi

Şekil 4.31-4.35'te sırasıyla ST5, GC2, BT1A, BT1B ve 2TP1A'ya ait katalaz testi sonuçları görülmektedir. Şekillerde görüldüğü gibi tüm izolatlarda H_2O_2 ilavesinden sonra kabarcık oluşumu gözlenmiştir. Bu da katalaz enziminin sentezlendiğini göstermektedir.

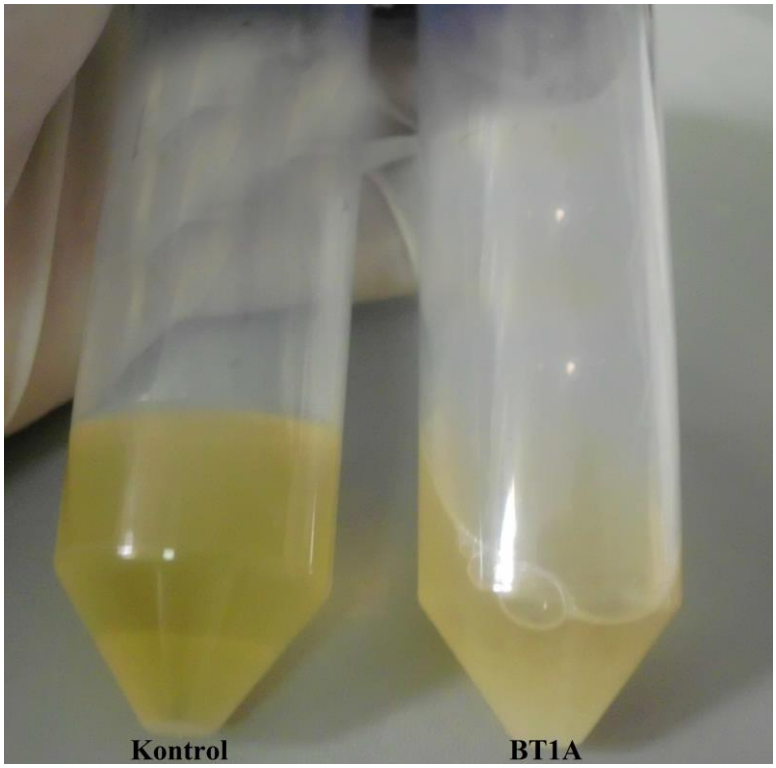
4.4.4. Jelatin Hidrolizasyon Testi



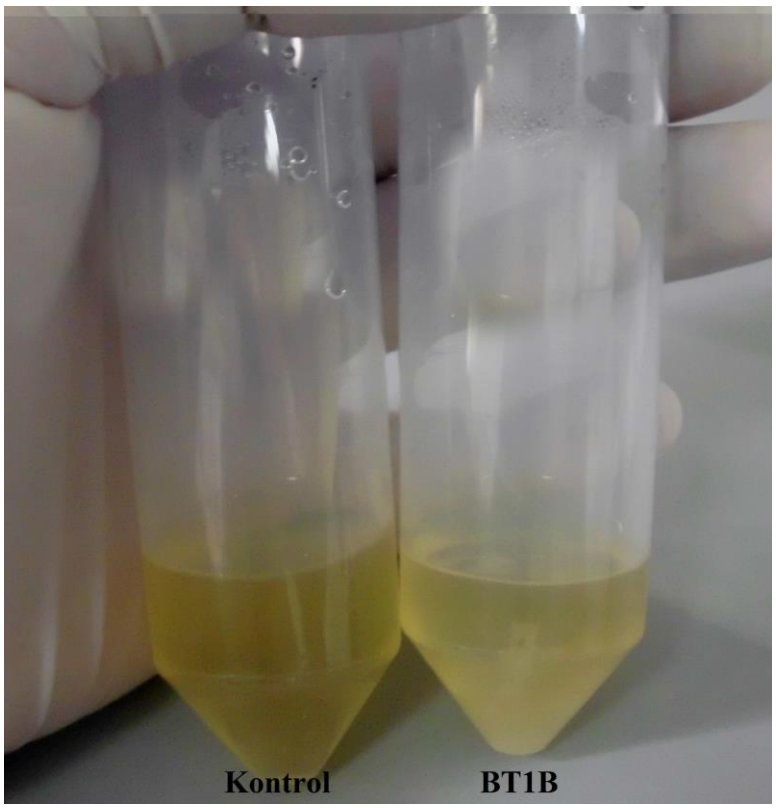
Şekil 4.36. ST5'e Ait Jelatin Hidrolizi Testi



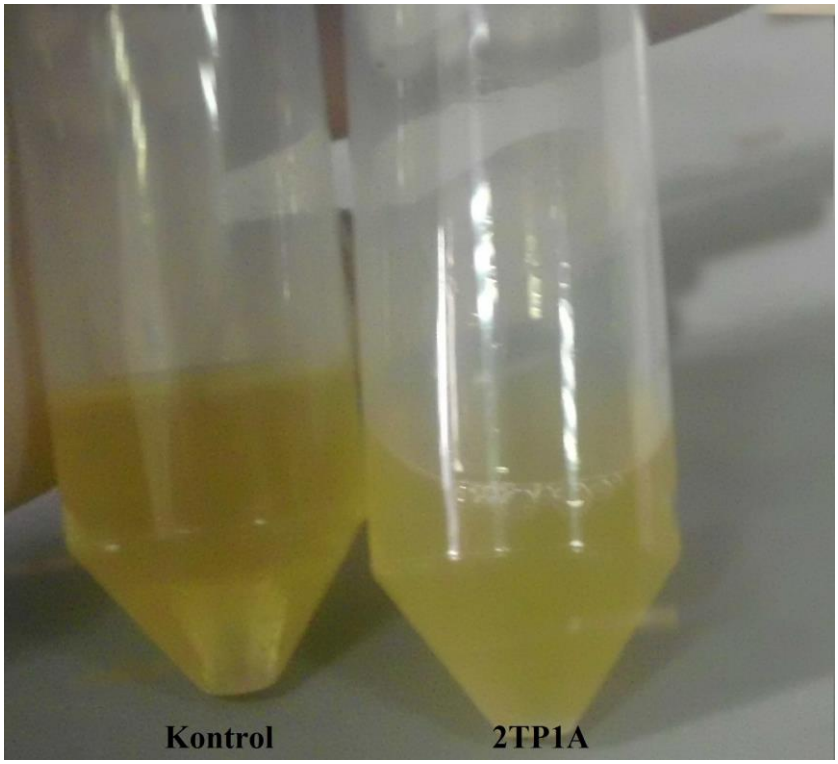
Şekil 4.37. GC2'ye ait Jelatin Hidrolizi Testi



Şekil 4.38. BT1A'ya Ait Jelatin Hidrolizi Testi



Şekil 4.39. BT1B'ye Ait Jelatin Hidrolizi Testi

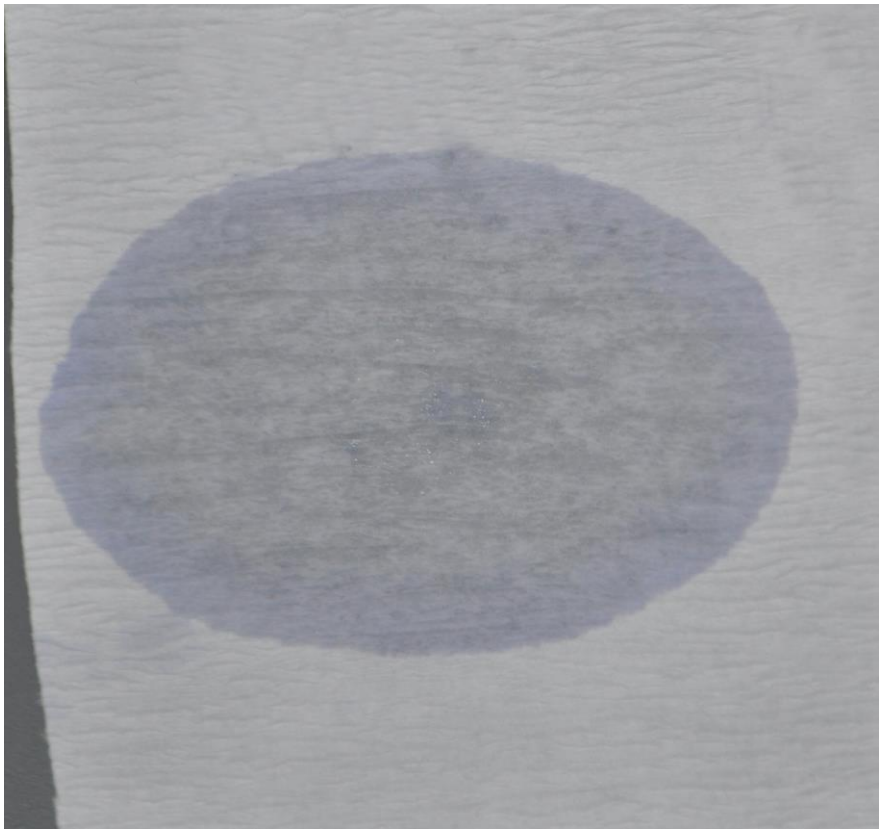


Şekil 4.40. 2TP1A'ya Ait Jelatin Hidrolizi Testi

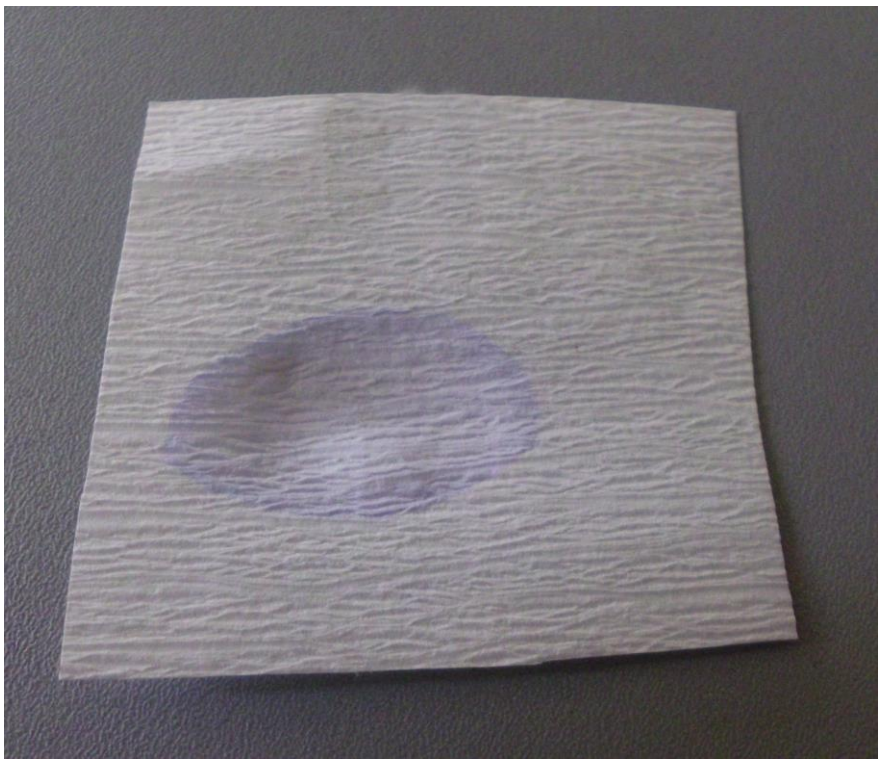
Şekil 4.36-4.40'ta izolatlara ait jelatin hidrolizi test sonuçları görülmektedir. Şekillerde de görüldüğü gibi BT1A ve 2TP1A'da jelatin hidrolizi pozitif sonuç verirken ST5, GC2 ve BT1B'de ise negatif sonuç verdiği görüldü.

4.4.5. Oksidaz Aktivitesi

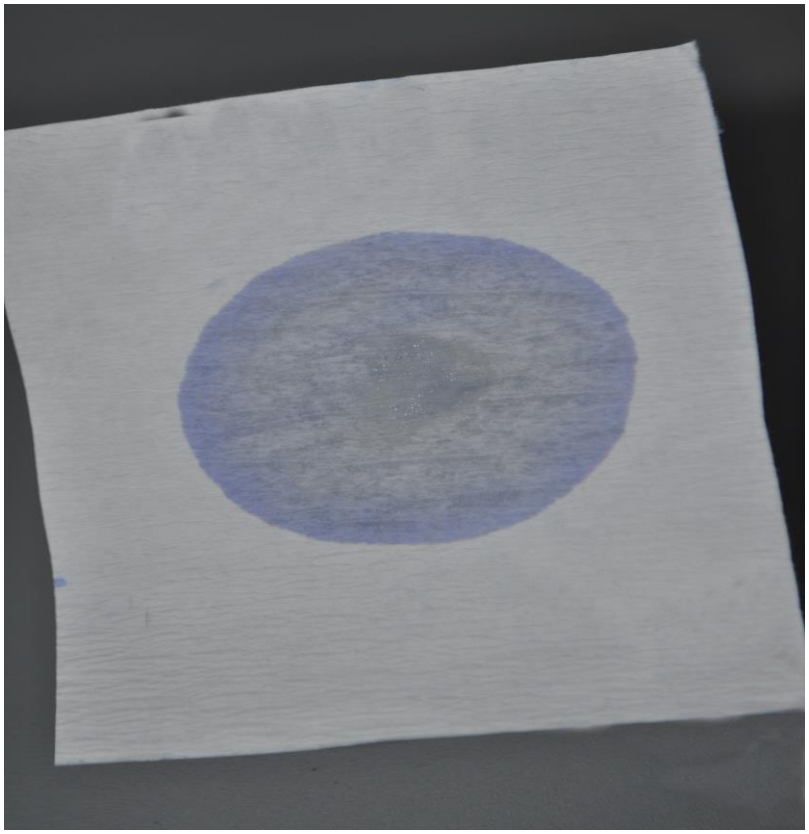
Şekil 4.41-4.45'te izolatlara ait oksidaz testi sonuçları görülmektedir. Oksidaz testi ST5, GC2, BT1A ve BT1B için negatif reaksiyon verirken 2TP1A için güçlü pozitif reaksiyon vermiştir.



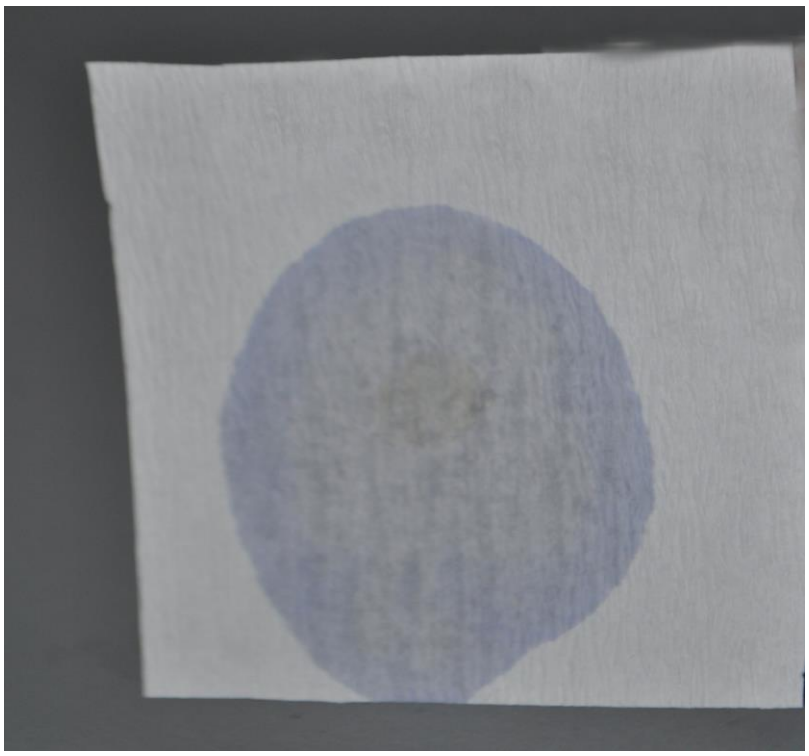
Şekil 4.41. ST5'in Oksidaz Aktivitesi



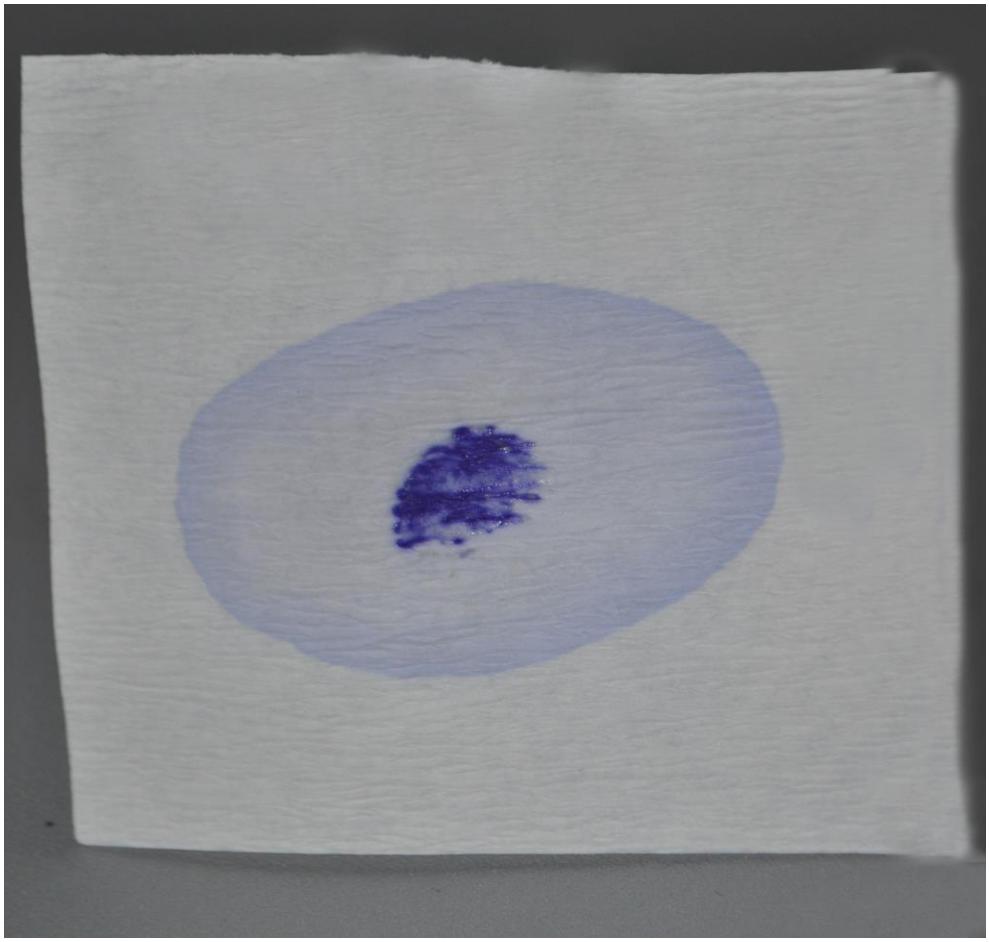
Şekil 4.42. GC2'nin Oksidaz Aktivitesi



Şekil 4.43. BT1A'nın Oksidaz Aktivitesi



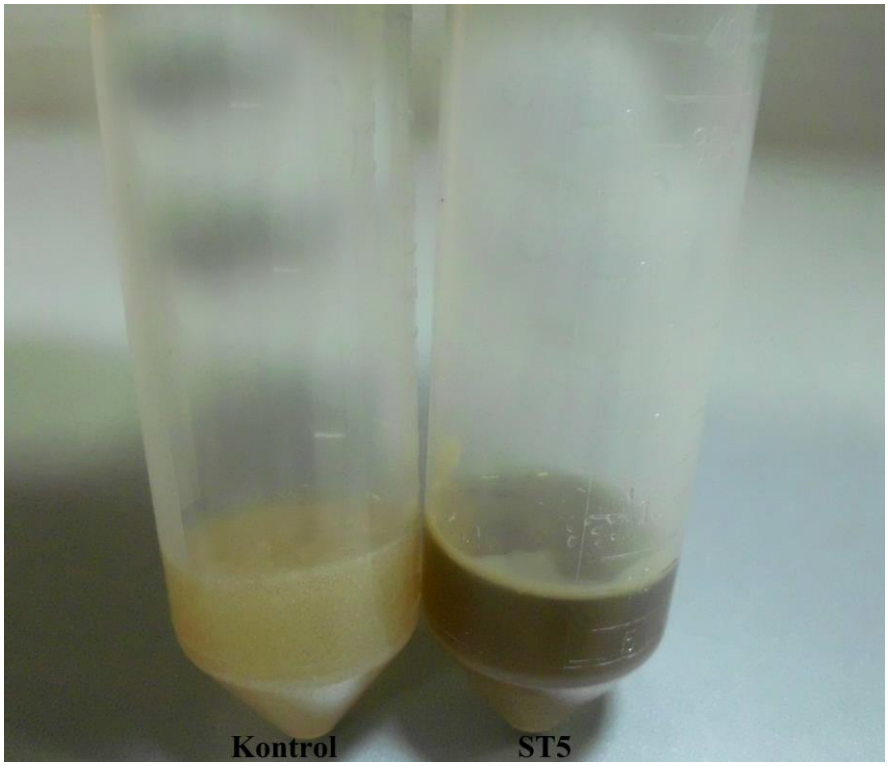
Şekil 4.44. BT1B'nin Oksidaz Aktivitesi



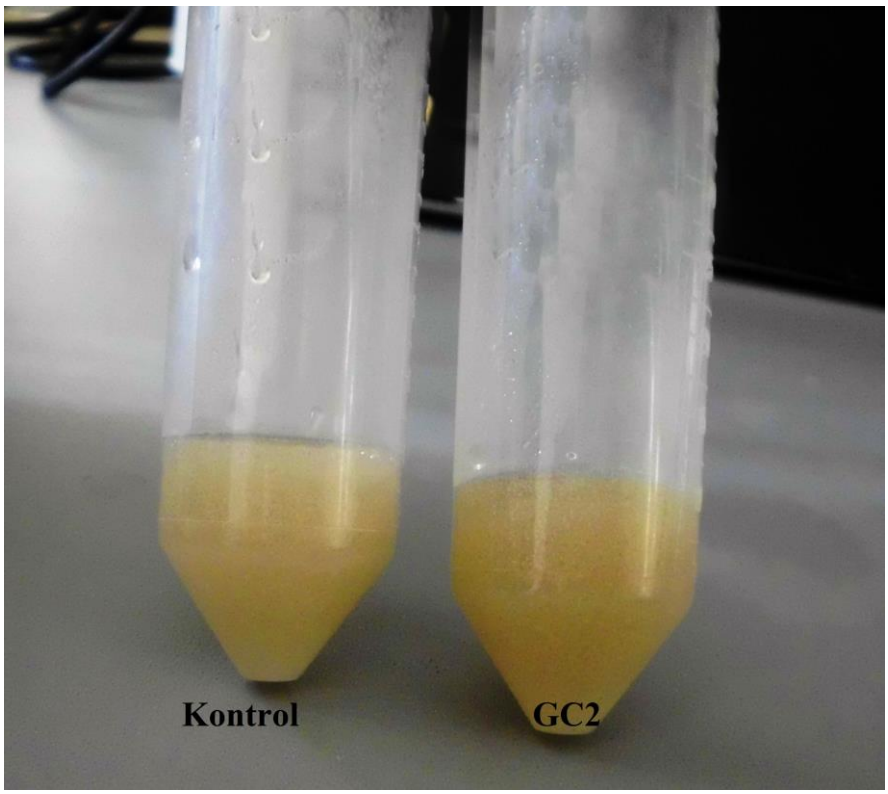
Şekil 4.45. 2TP1A'nın Oksidaz Aktivitesi

4.4.6. Tirozin Degradasyonu

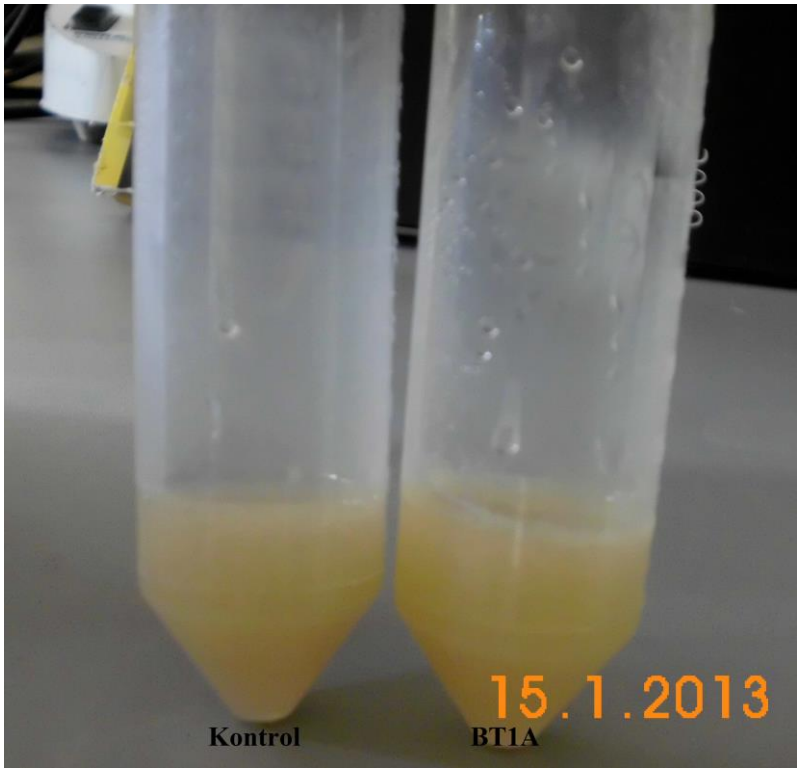
Şekil 4.46-4.50'de izolatlara ait tirozin degradasyon testi sonuçları görülmektedir. Şekillerde görüldüğü gibi ST5 ve 2TP1A'da tirozin degradasyon testi güçlü pozitif sonuç verirken GC2, BT1B ve BT1A'da ise negatif sonuç elde edilmiştir.



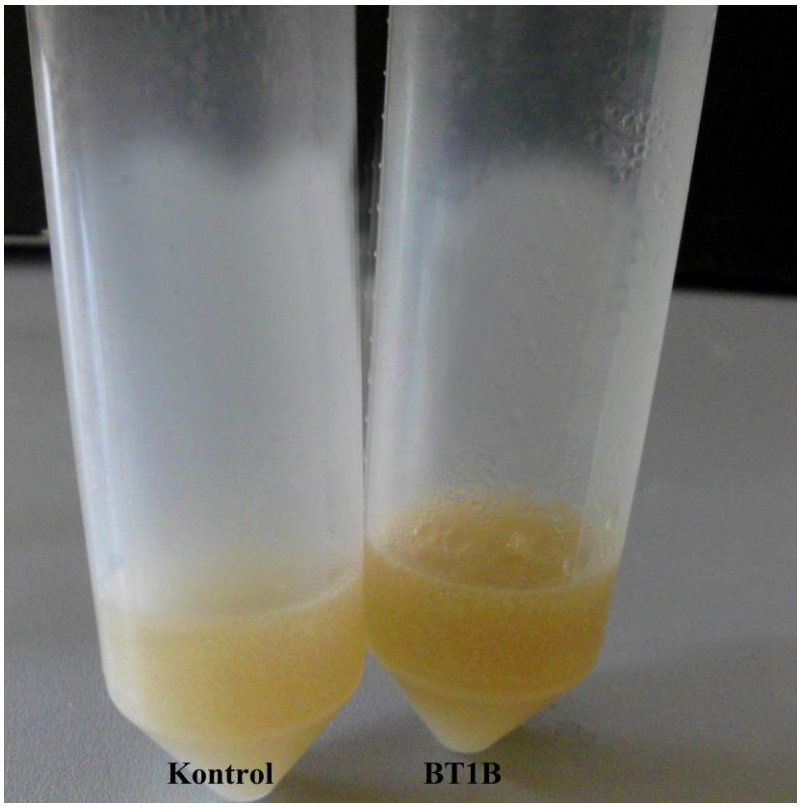
Şekil 4.46. ST5'in Tirozin Degradasyon Testi



Şekil 4.47. GC2'nin Tirozin Degradasyon Ttesti



Şekil 4.48. BT1A'nın Tirozin Degradasyon Testi



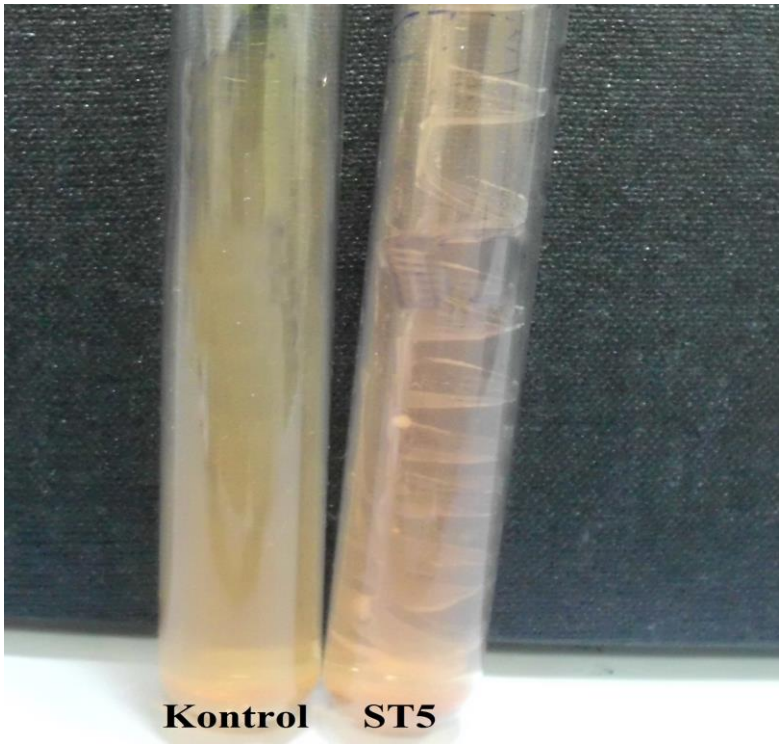
Şekil 4.49. BT1B'nin Tirozin Degradasyon Testi



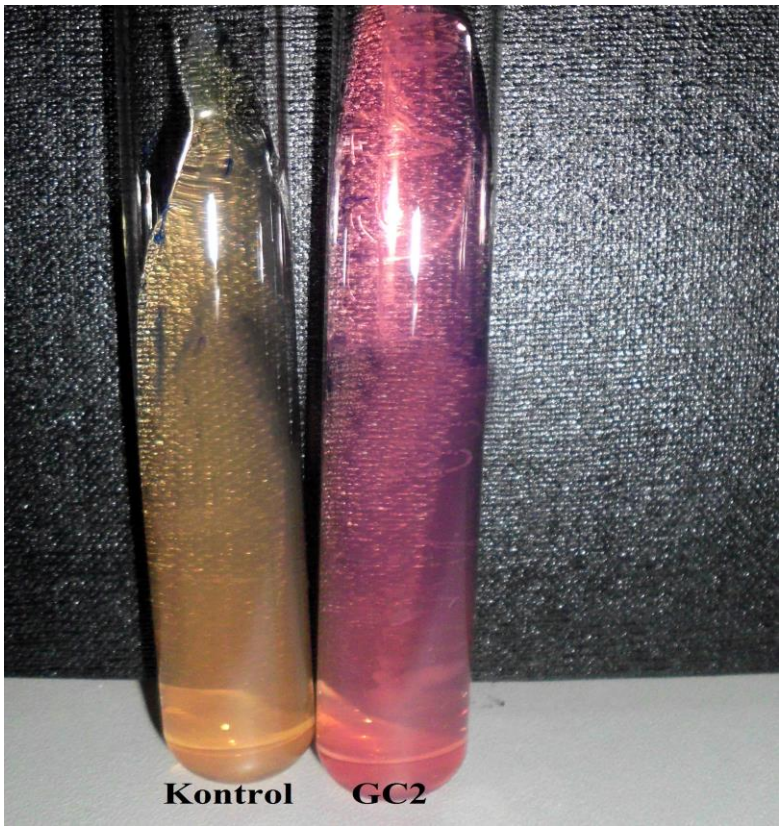
Şekil 4.50. 2TP1A'nın Tirozin Degradasyon Testi

4.4.7. Üreaz Testi

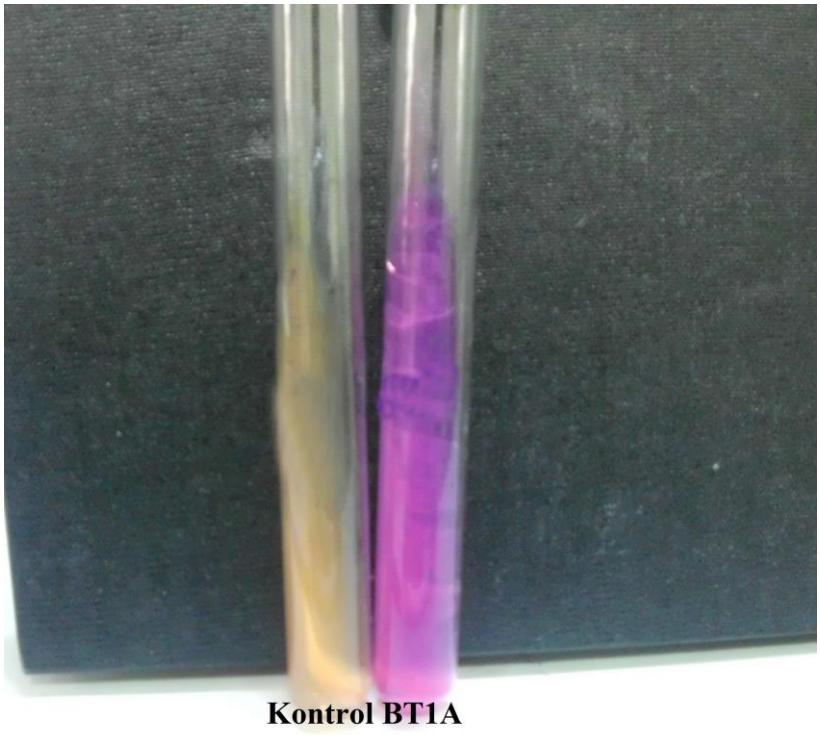
Şekil 4.51-4.55'te izolatlara ait üreaz testi sonuçları görülmektedir. Şekillerde de görüldüğü gibi üreaz testi, ST5 ve BT1B'de pozitif sonuç verirken GC2, BT1A ve 2TP1A'da güçlü pozitif sonuç vermiştir.



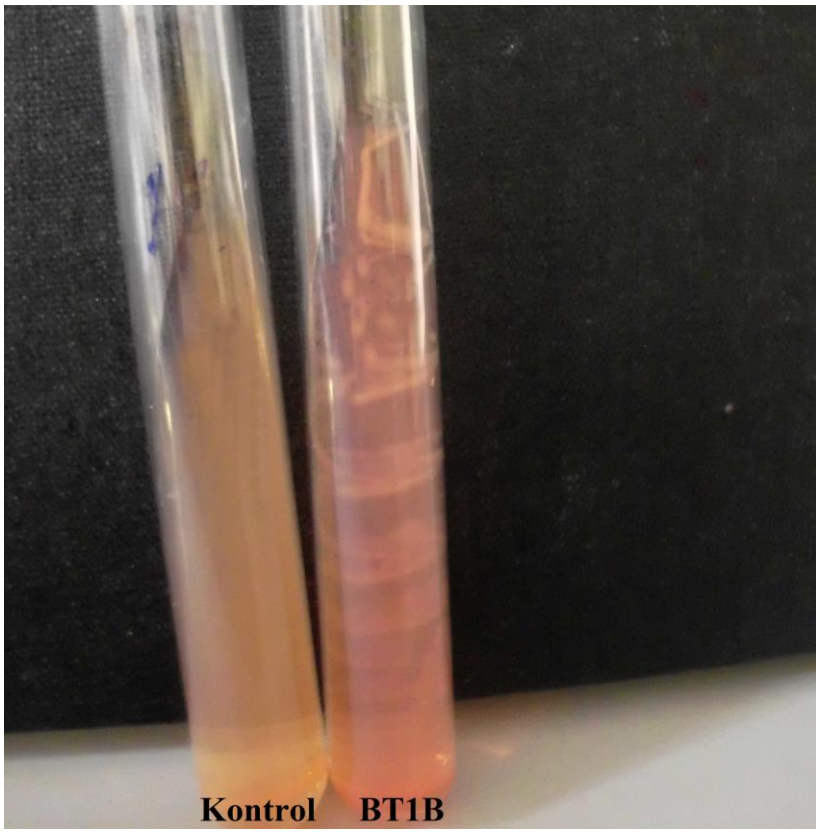
Şekil 4.51. ST5'e Ait Üreaz Testi



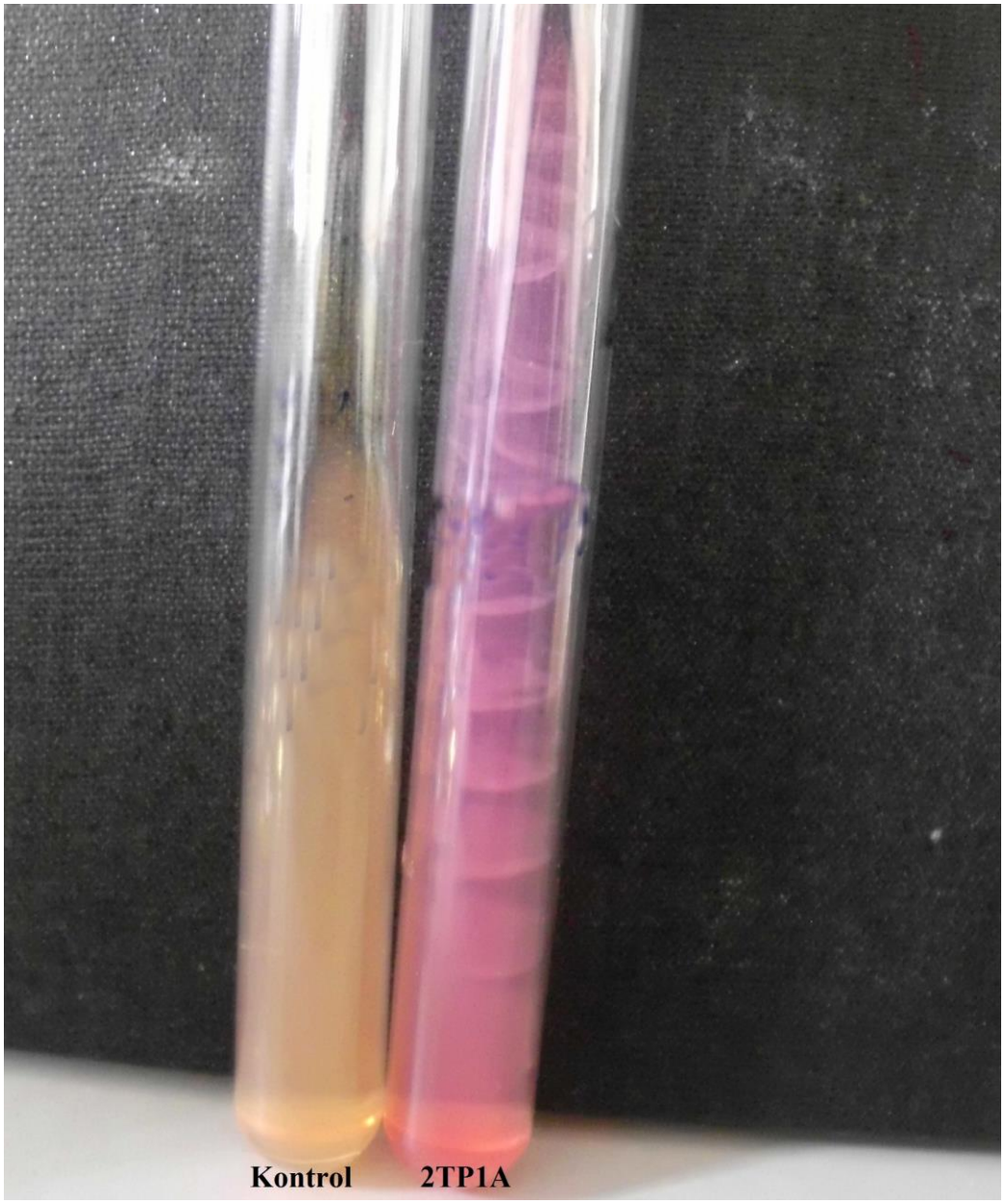
Şekil 4.52. GC2'ye Ait Üreaz Testi



Şekil 4.53. BT1A'ya Ait Üreaz Testi



Şekil 4.54. BT1B'ye Ait Üreaz Testi



Şekil 4.55. 2TP1A'ya Ait Üreaz Testi

4.4.8. Sitrat Testi

Şekil 4.56-4.60, İzolatlara ait sitrat testi sonuçlarını göstermektedir. Şekillerde görüldüğü gibi sitrat testi, GC2'de negatif reaksiyon verirken ST5, BT1A, BT1B ve 2TP1A'da güçlü pozitif reaksiyon vermiştir.



Şekil 4.56. ST5'in Sitrat Testi



Şekil 4.57. GC2'nin Sitrat Testi



Şekil 4.58. BT1A'nın Sitrat Testi



Şekil 4.59. BT1B'nin Sitrat Testi



Şekil 4.60. 2TP1A'nın Sitrat Testi

4.4.9. İndol Testi

İzolatların triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirip getiremediklerini belirlemek için, tripton içeren sıvı besiyerine taze bakteri kültüründen ekim yapılarak optimum şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürlerin üzerine kovaks ayıracı eklenerek 1-2 dakika beklendi. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade eder. Yapılan incelemede hiçbir izolatta renk değişimi gözlenmedi. Bu da indol testinin tüm izolatlar için negatif sonuç verdiğini gösterdi.

4.4.9.1. Sodyum Azid Duyarlılığı

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi bir günlük inkübasyon süresi sonunda tüm izolatların Sodyum azide karşı duyarlı olduğu tespit edildi. Çizelgede verilen OD değerleri üç tekrarın ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Sodyum Azid Duyarlılığı (OD 600 nm)

İzolatlar	**Kontrol**	**% 0.02 Sodyum Azid**
ST5	1,786	0,205
GC2	1,935	0,083
BT1A	1,937	0,091
BT1B	1,822	0,352
2TP1A	2,105	0,152

4.4.10. NaCl Toleransı

İzolatların NaCl toleransı, farklı NaCl konsantrasyonlarında bir günlük inkübasyon süresinden sonra kontrollerle karşılaştırılması ile değerlendirildi. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi ST5'in %4, GC2'nin %3, BT1A'nın %4, BT1B'nin %7 ve 2TP1A'nın %5 oranındaki NaCl konsantrasyonlarını tolere ettiği tespit edildi. OD değerleri 3 ayrı tekrarın ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.2. İzolatların Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl'ye Toleransları (OD 600)

NaCl (%) / İzolatlar	Kontrol	%0.5	%1	%2	%3	%4	%5	%7	%10
ST5	2.157	2.159	2.118	2.163	2.045	1.740	0.480	ND	ND
GC2	1.277	1.309	1.339	1.244	1.172	0.461	ND	ND	ND
BT1A	2.008	2.210	2.277	2.271	2.056	1.629	0.250	ND	ND
BT1B	2.154	2.172	2.171	2.286	2.288	2.275	2.225	1.462	ND
2TP1A	2.398	2.392	2.462	2.417	2.307	2.448	2.262	ND	ND

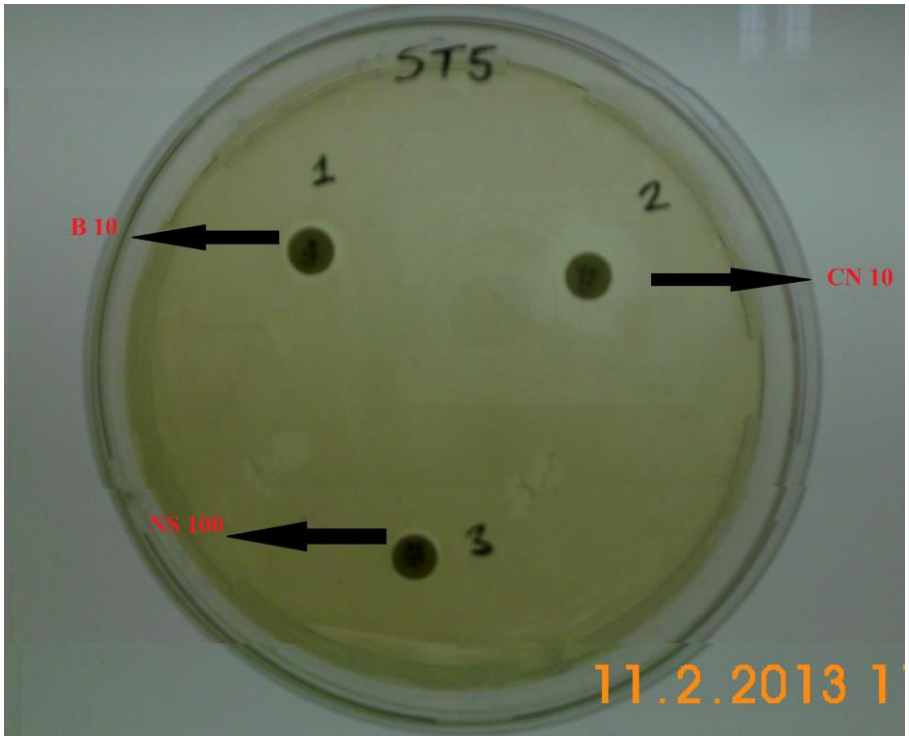
ND: Üreme tespit edilmedi.

4.4.11. Antibiyotik Duyarlılık Testi

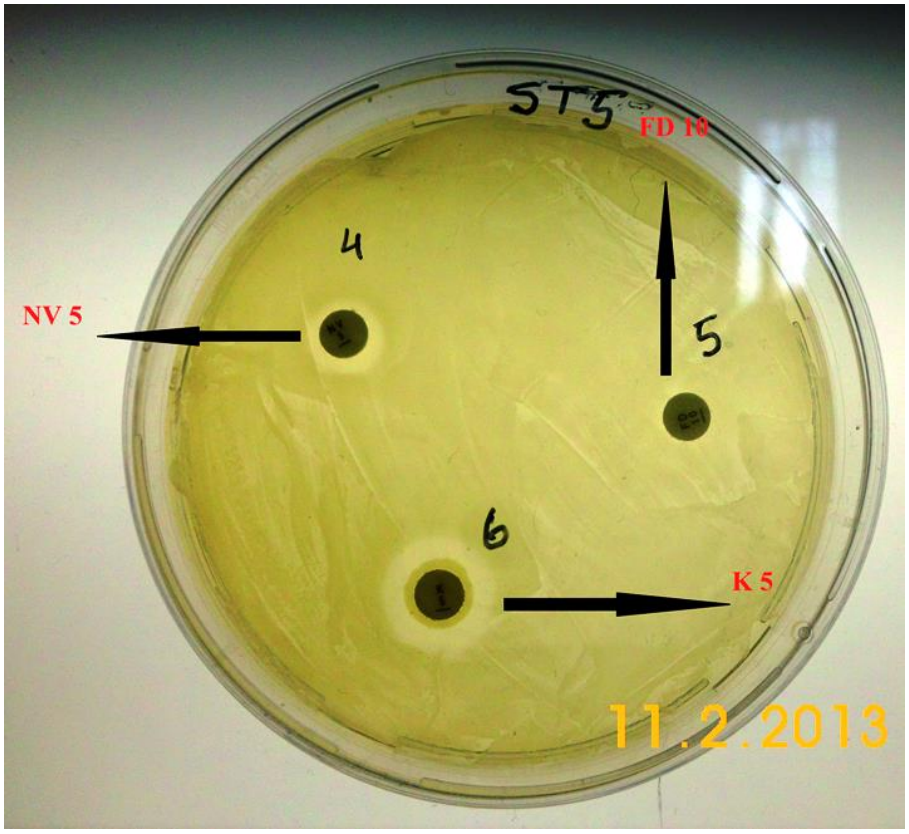
Antibiyotik duyarlılık testi için, gecelik kültürleri hazırlanan izolatlardan nutrient agar katı besiyerine yayma ekim yapıldı. Daha sonra kuruyan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafında zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi ve zon büyüklüğü ölçüldü. Disk etrafında boş bir zonun oluşması durumunda antibiyotik duyarlılığı pozitif olarak değerlendirildi. Testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Değerlendirme sonucunda ST5'in kanamisin 5, gentamisin 10, tilmikosin 15, Streptomisin 10, tetrasiklin 10 ve neomisin 10'a duyarlı, novobiyosin 5 ve basitrasin 10'a az duyarlı, Fusidik asit 10, nistatin 100, ampisilin 100, kloramfenikol 30, linkomisin 15, Penisilin 2 ve Penisilin 10'a dirençli olduğu (Çizelge 4.3, Şekil 4.61-4.65), GC2'nin kanamisin 5, gentamisin 10, streptomisin 10, kloramfenikol 30 ve tetrasiklin 10'a duyarlı, fusidik asit 10, basitrasin 10, tilmikosin 15 ve neomisin 10'a az duyarlı, novobiyosin 5, nistatin 100, ampisilin 10, linkomisin 15, penisilin 2 ve penisilin 10' a dirençli (Çizelge 4.3, Şekil 4,66-4.70), BT1A'nın neomisin 10, tilmikosin 15, streptomisin 10, kanamisin 5 ve gentamisin 10'a duyarlı, novobiyoasin 5 ve tetrasiklin 10'a az duyarlı, fusidik asit 10, nistatin 100, basitrasin 10, ampisilin 100, kloramfenikol 30, linkomisin 15, penisilin 2 ve penisilin 10'a dirençli (Çizelge 4.3, Şekil 4,71-4.75), BT1B'nin kanamisin 5, gentamisin 10, tilmikosin 15, ampisilin 10, streptomisin 10, kloramfenikol 30, tetrasiklin 30 ve neomisin 10'a duyarlı, novobiyosin 5, fusidik asit 10, nistatin 100, basitrasin 10, linkomisin 15, penisilin 2 ve penisilin 10'a dirençli (Çizelge 4.3, Şekil 4.76-4.80) ve 2TP1A'nın tilmikosin 15 ve kloramfenikol 30'a duyarlı, basitrasin 10 ve gentamisin 10'a az duyarlı, novobiyosin 5, fusidik asit 10, kanamisin 5, nistatin 100, ampisilin 10, streptomisin 10, linkomisin 15, penisilin 2, tetrasiklin 30, neomisin 10 ve penisilin 10'a dirençli oldukları tespit edildi (Çizelge 4.3, Şekil 4.81-4.85) .

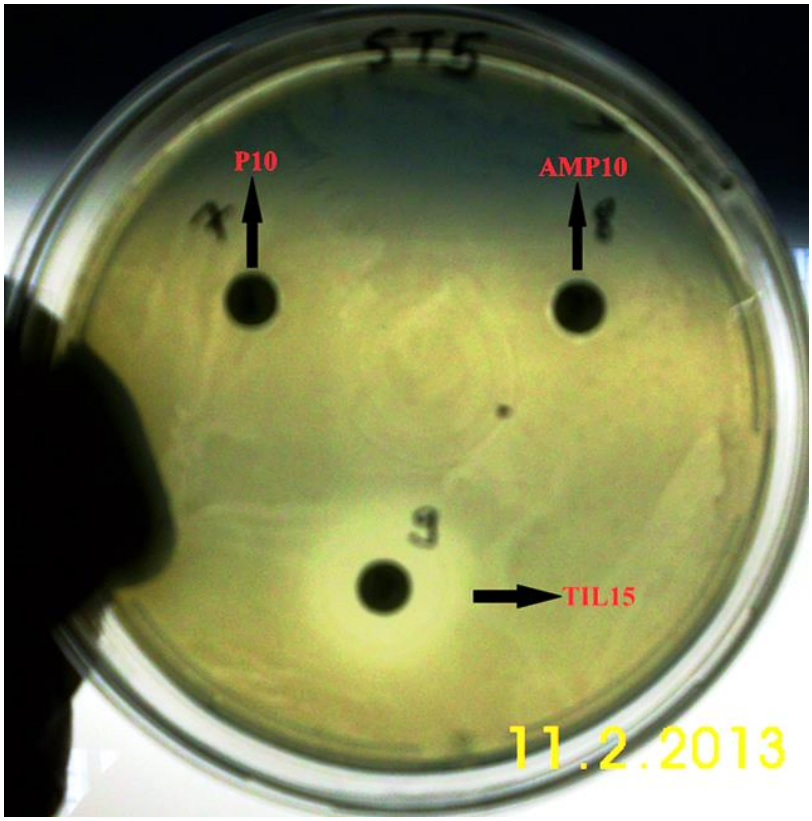
.



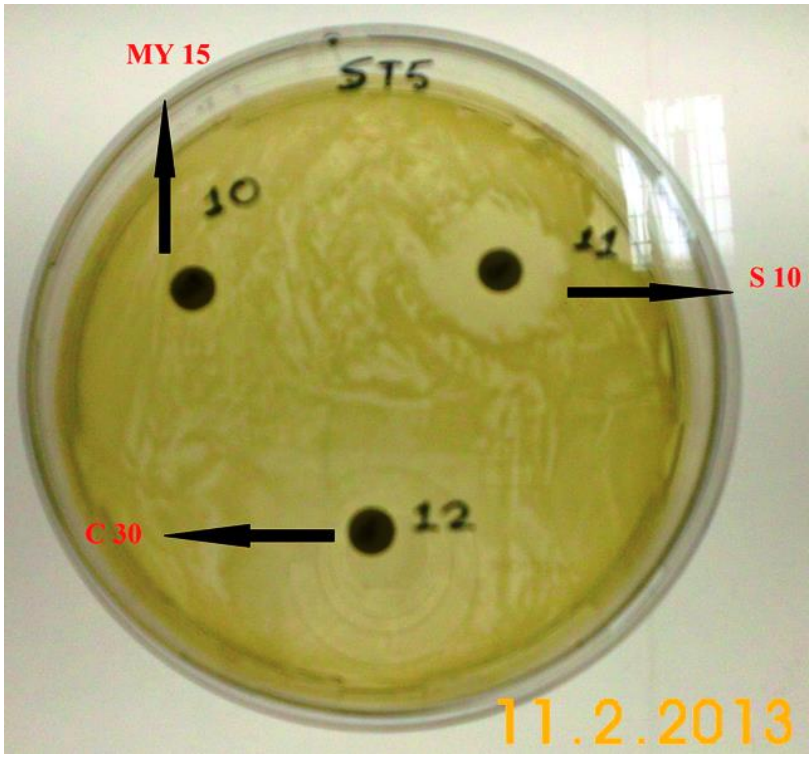
Şekil 4.61. ST5'in B10, CN10 ve NS100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



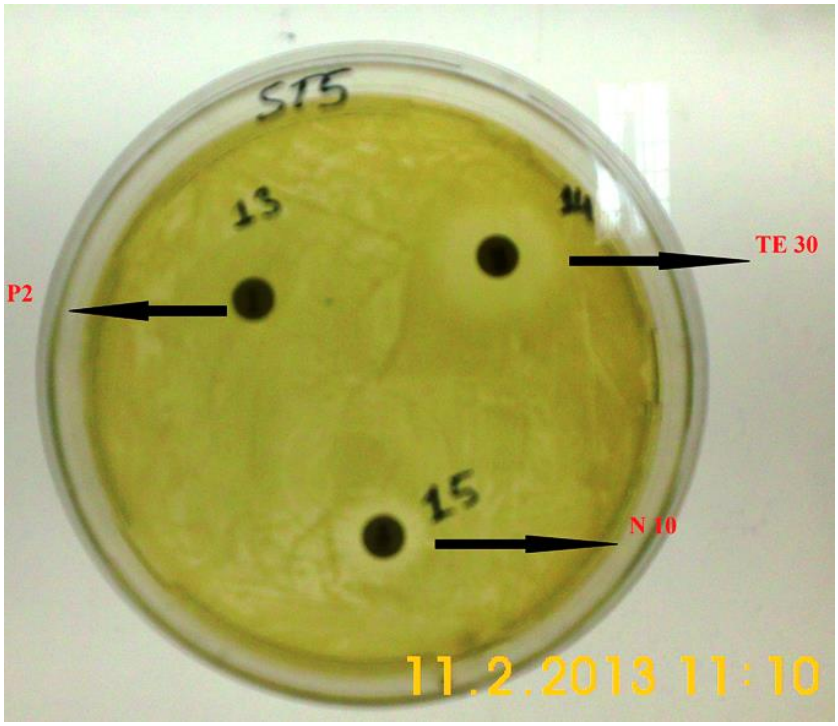
Şekil 4.62. ST5'in NV5, FD10 ve K5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



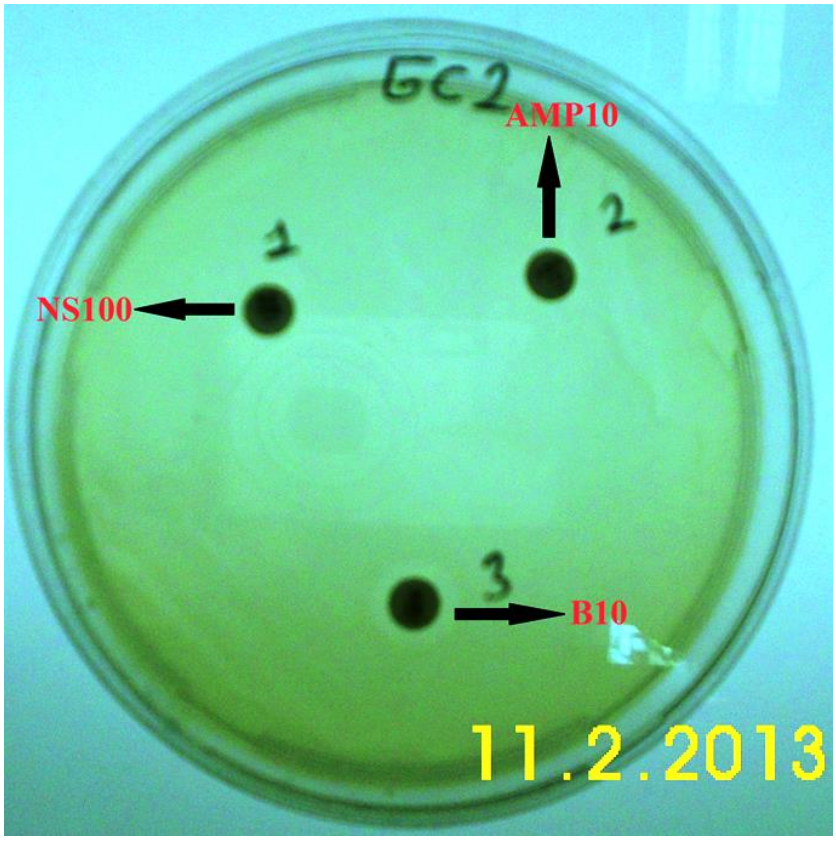
Şekil 4.63. ST5'in P10, AMP10 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



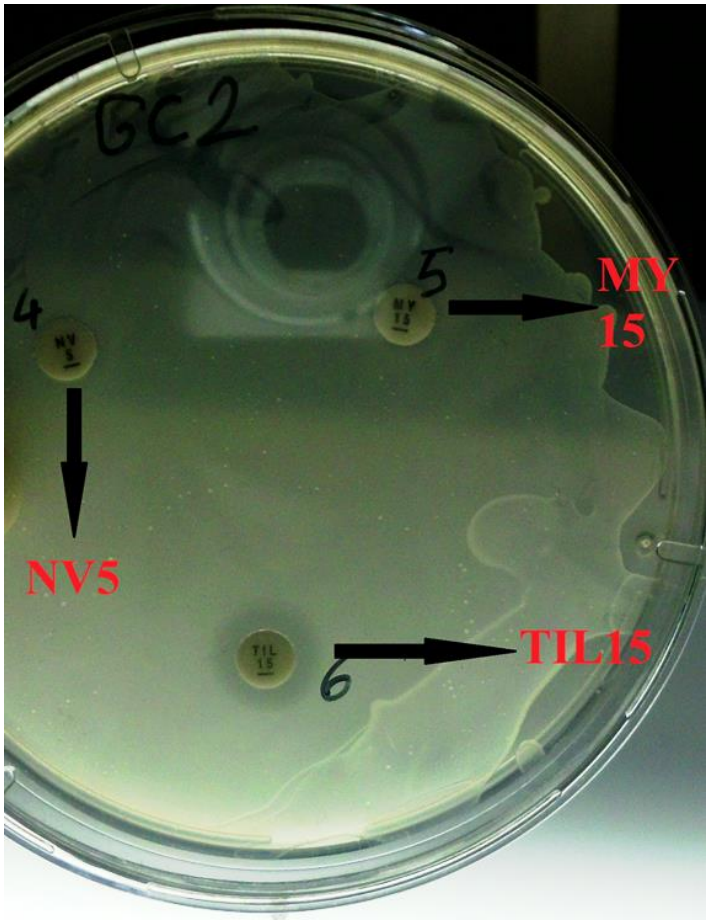
Şekil 4.64. ST5'in MY15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



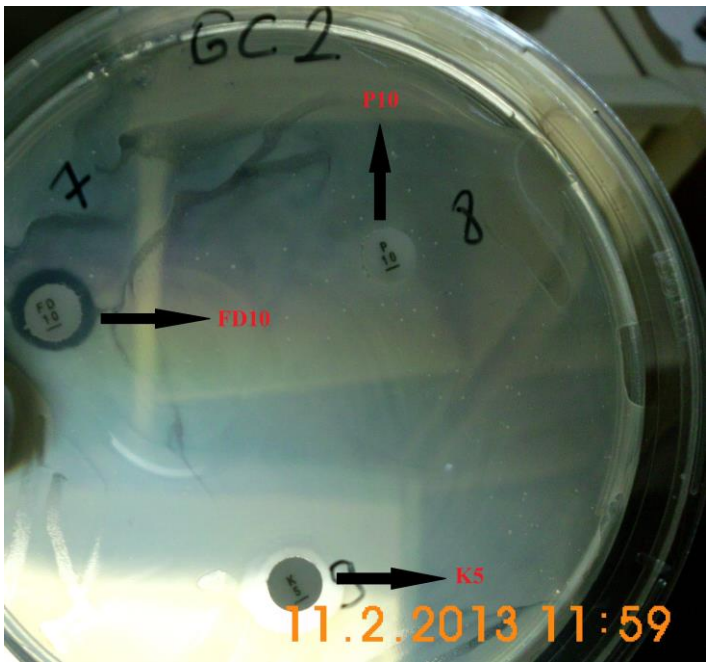
Şekil 4.65. ST5'in P 2, TE 30 ve N10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



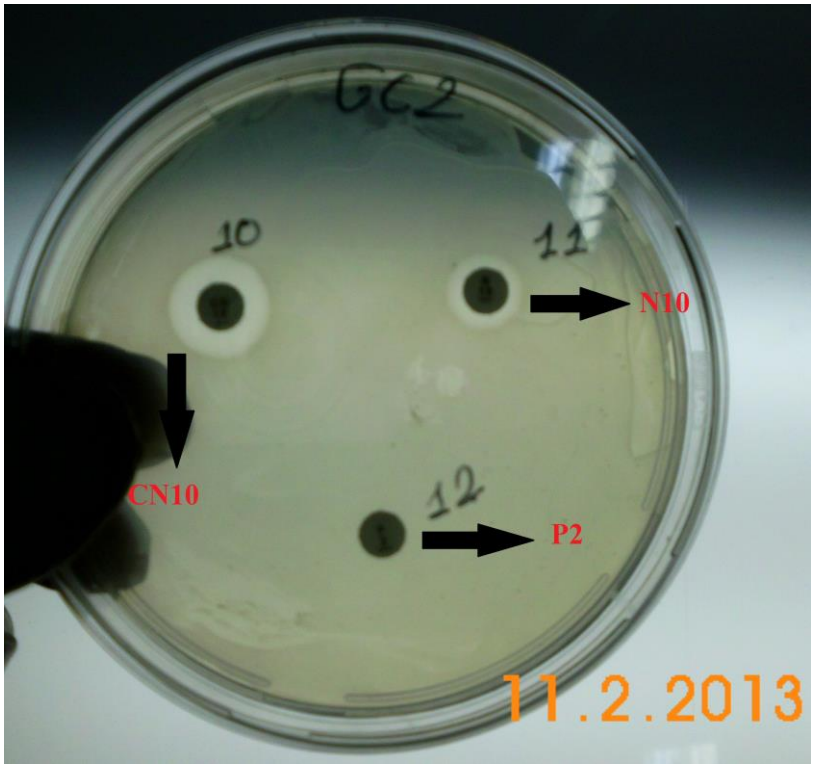
Şekil 4.66. GC2'nin NS 100, AMP 10 ve B10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



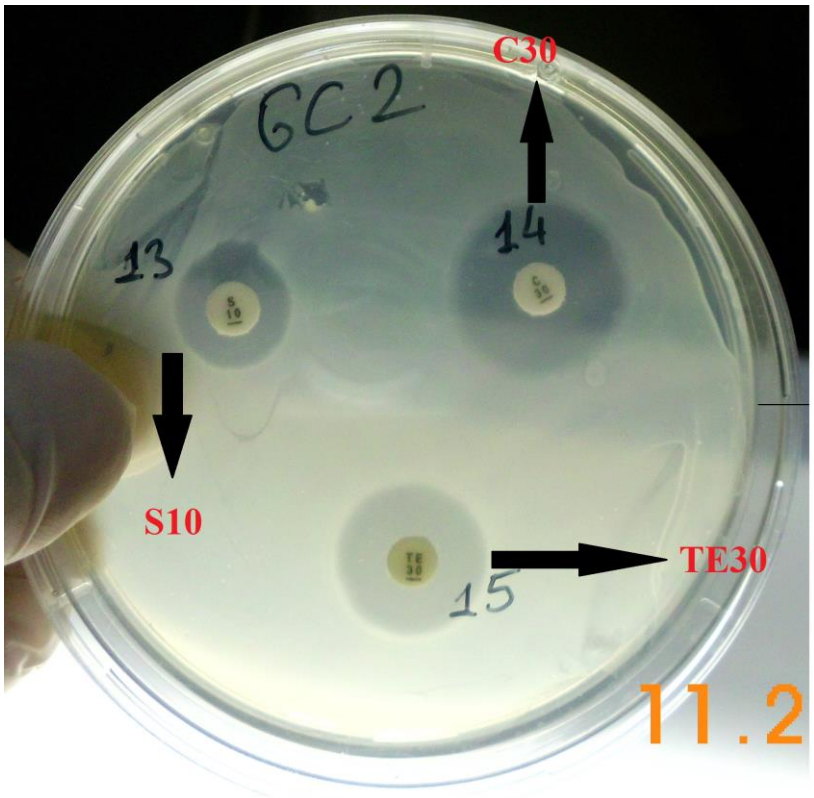
Şekil 4.67. GC2'nin NV 5, MY 15 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



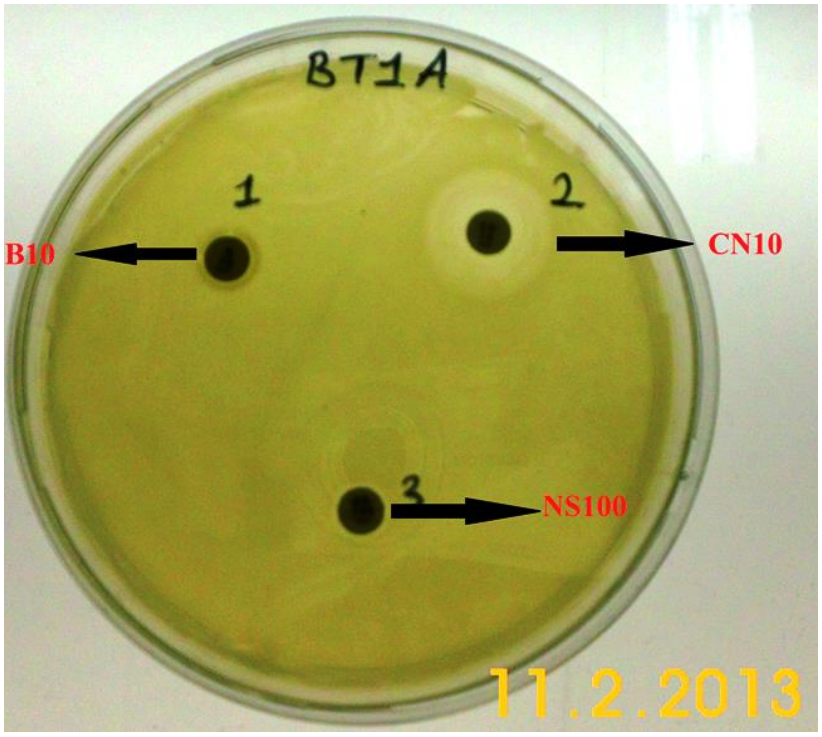
Şekil 4.68. GC2'nin FD 10, P, 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



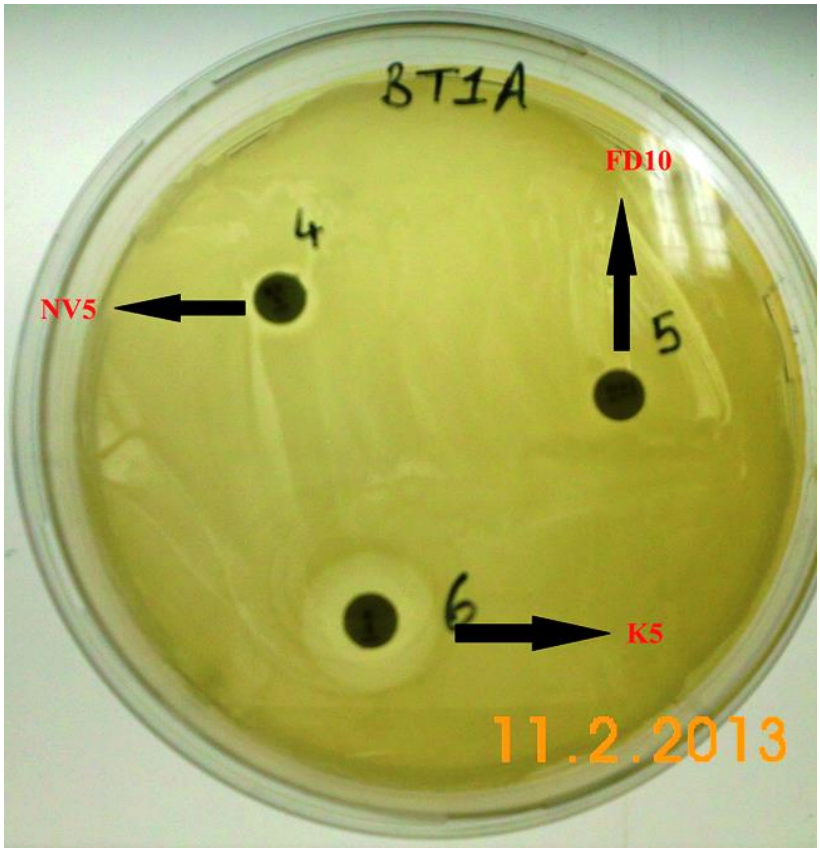
Şekil 4.69. GC2'nin CN 10, N 10 ve P 2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



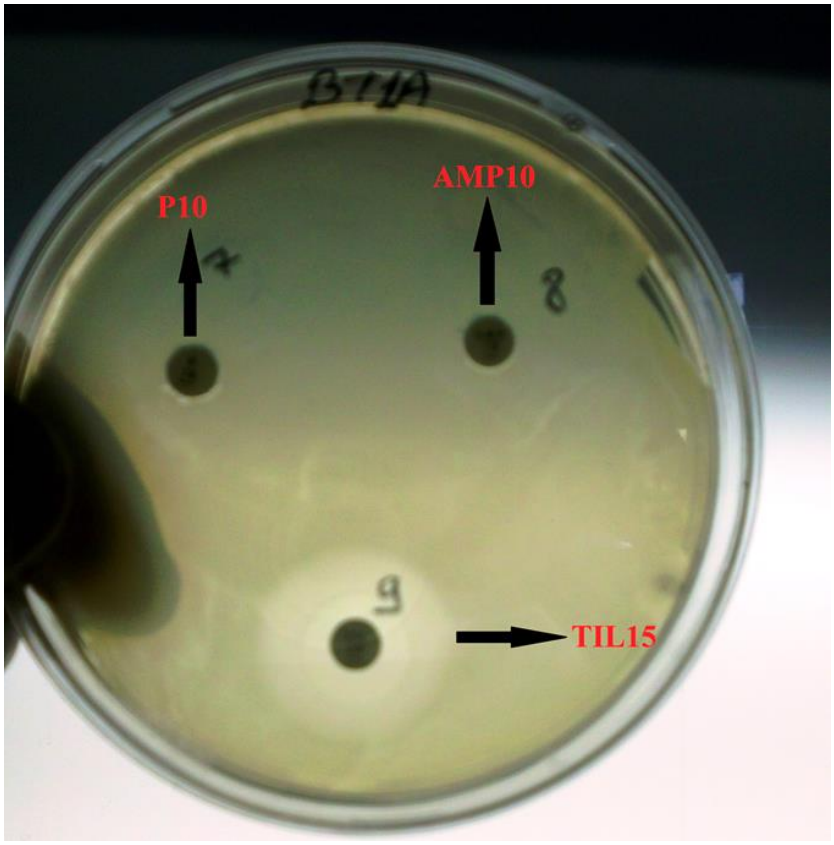
Şekil 4.70. GC2'nin S 10, C 30 ve TE 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



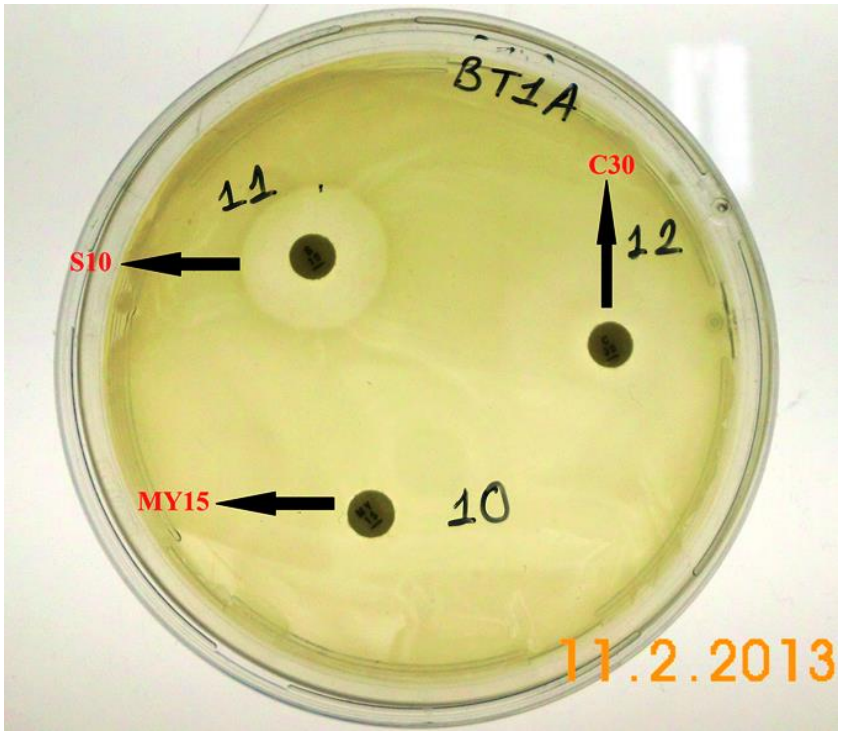
Şekil 4.71. BT1A'nın B 10, CN 10 ve NS 100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



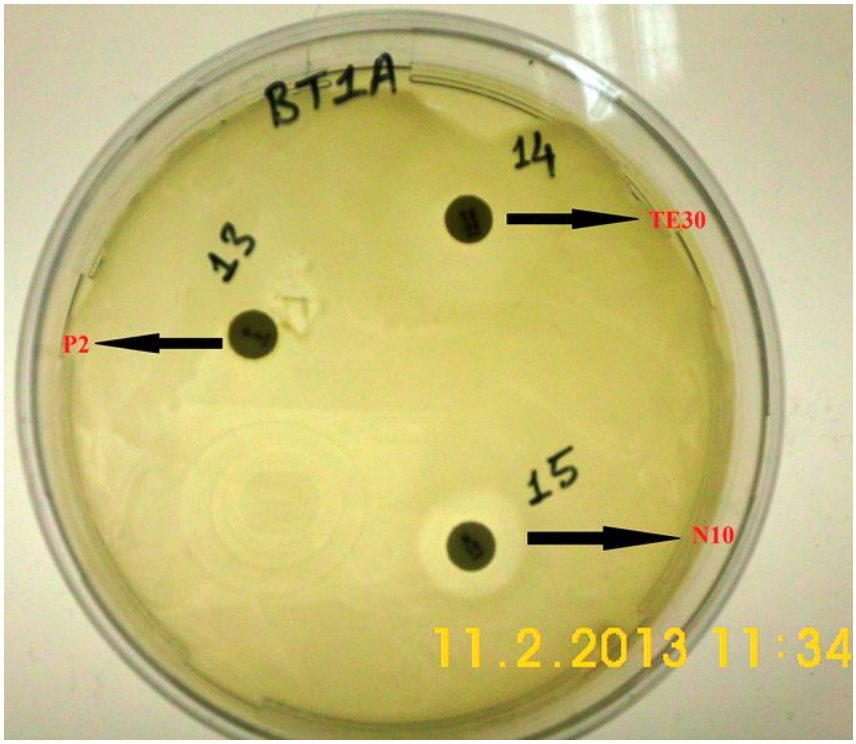
Şekil 4.72. BT1A'nın NV 5, FD 10 ve K5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



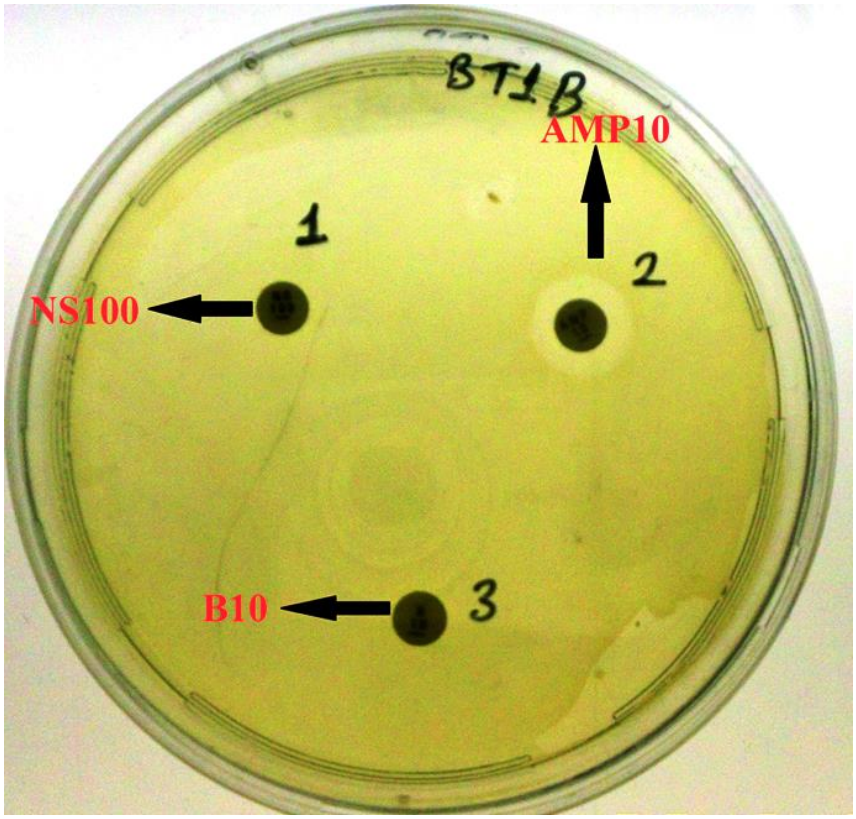
Şekil 4.73. BT1A'nın P 10, AMP 10, TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



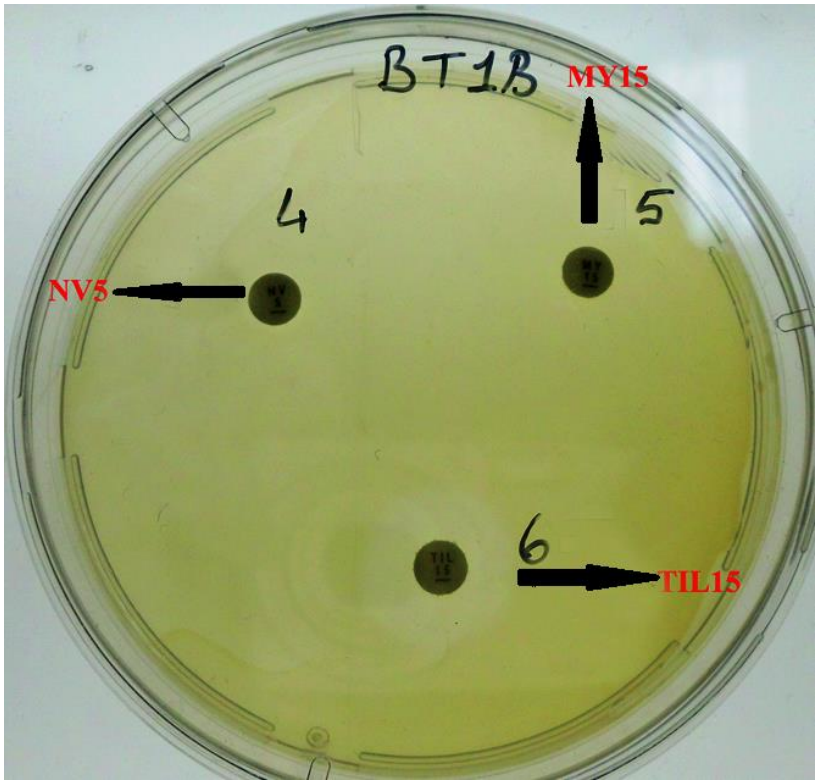
Şekil 4.74. BT1A'nın MY 15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Olan Duyarlılığı



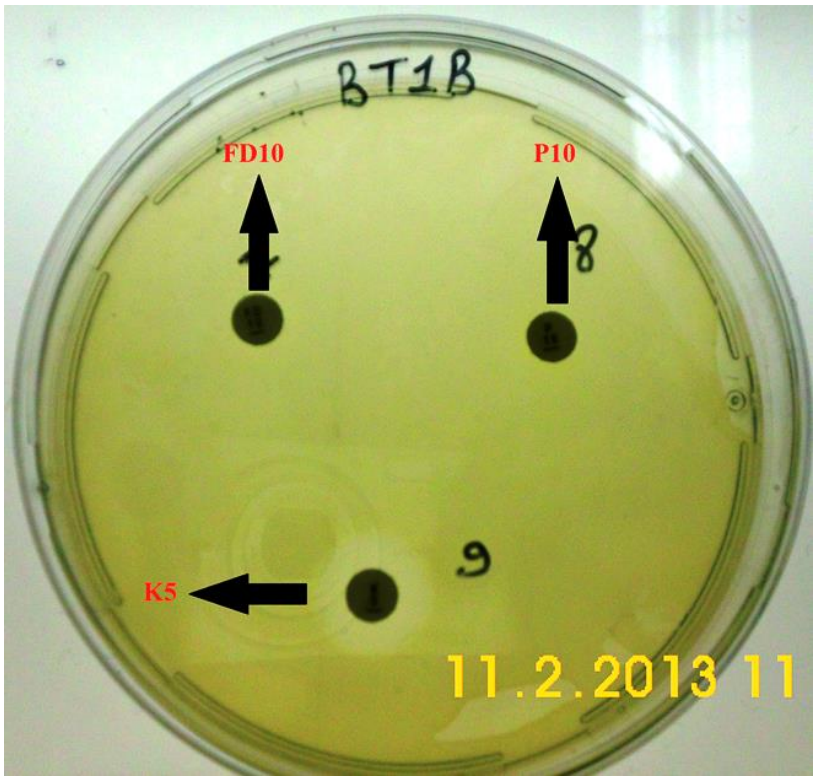
Şekil 4.75. BT1A'nın P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



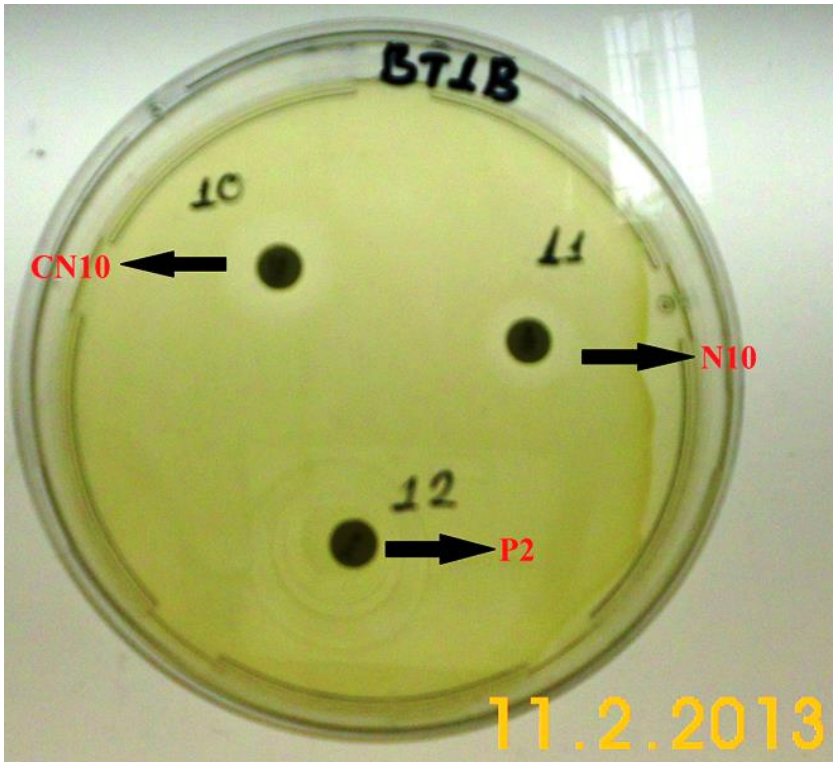
Şekil 4.76. BT1B'nin P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



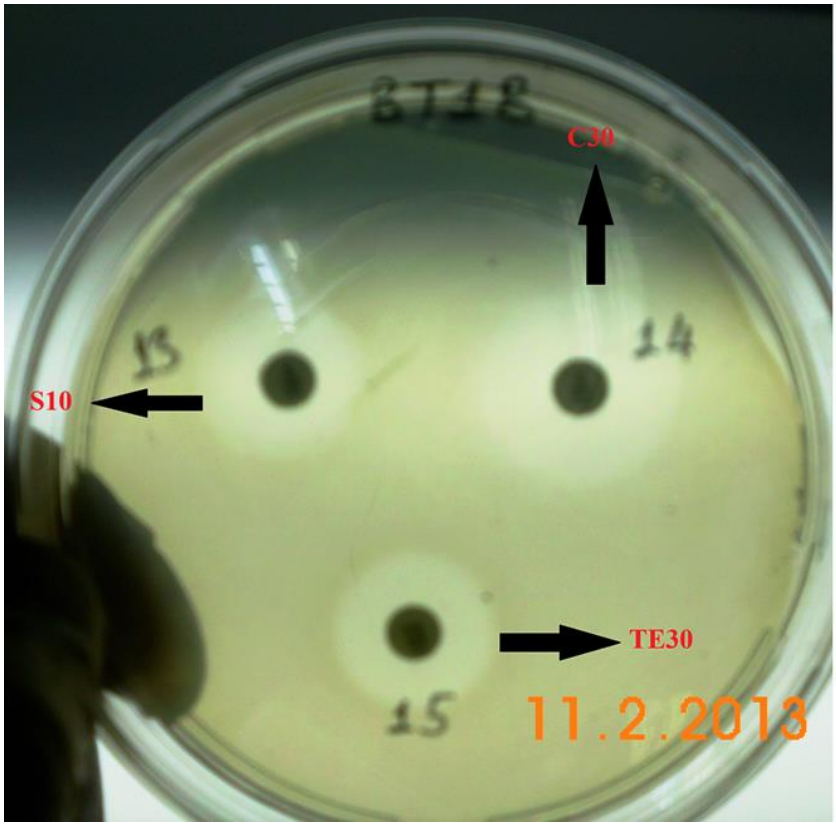
Şekil 4.77. BT1B'nin NV 5, MY 15 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



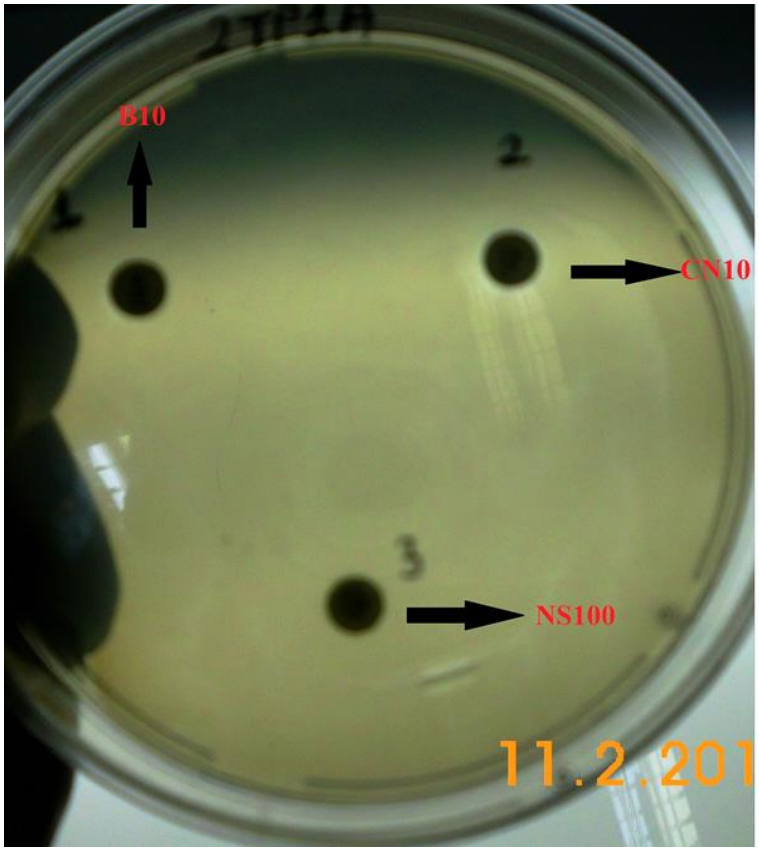
Şekil 4.78. BT1B'nin FD 10, P 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



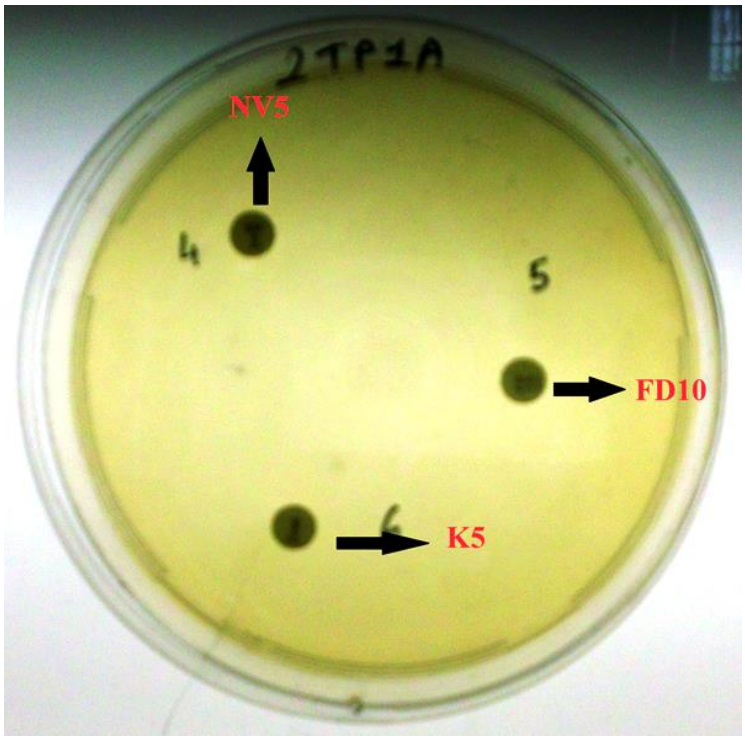
Şekil 4.79. BT1B'nin CN 10, N 10 ve P 2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



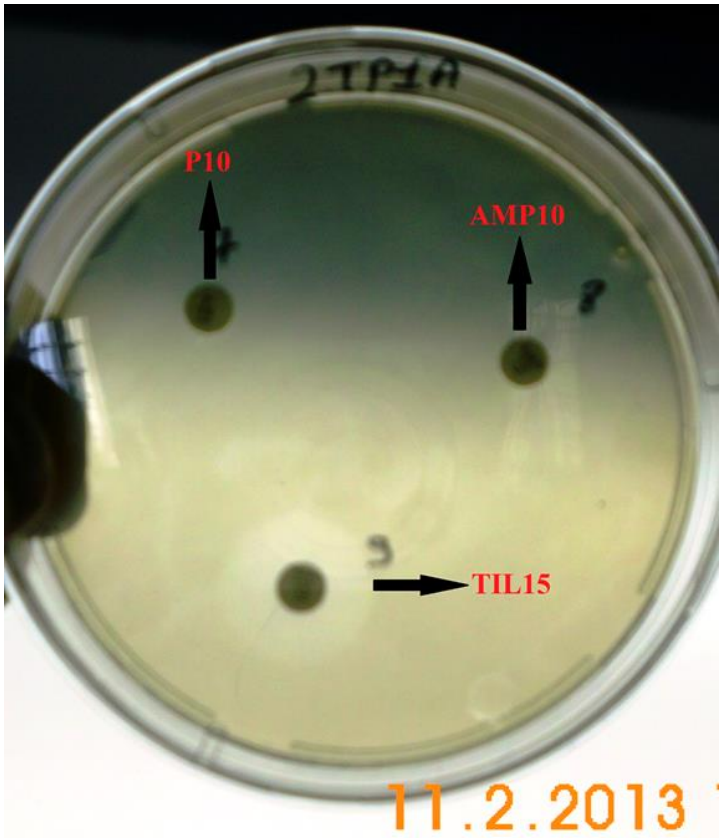
Şekil 4.80. BT1B'nin S 10, C 30 ve TE 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



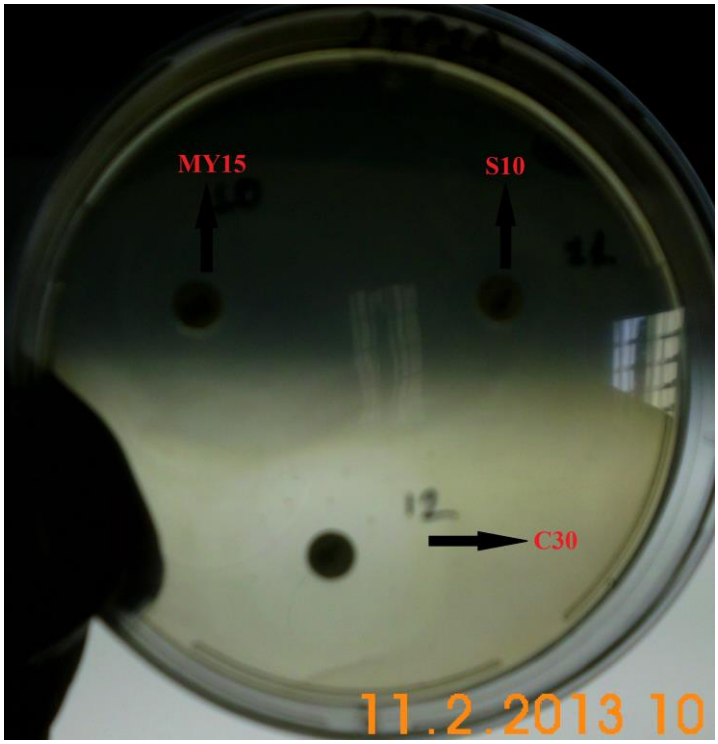
Şekil 4.81. 2TP1A'nın B 10, CN 10 ve NS 100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



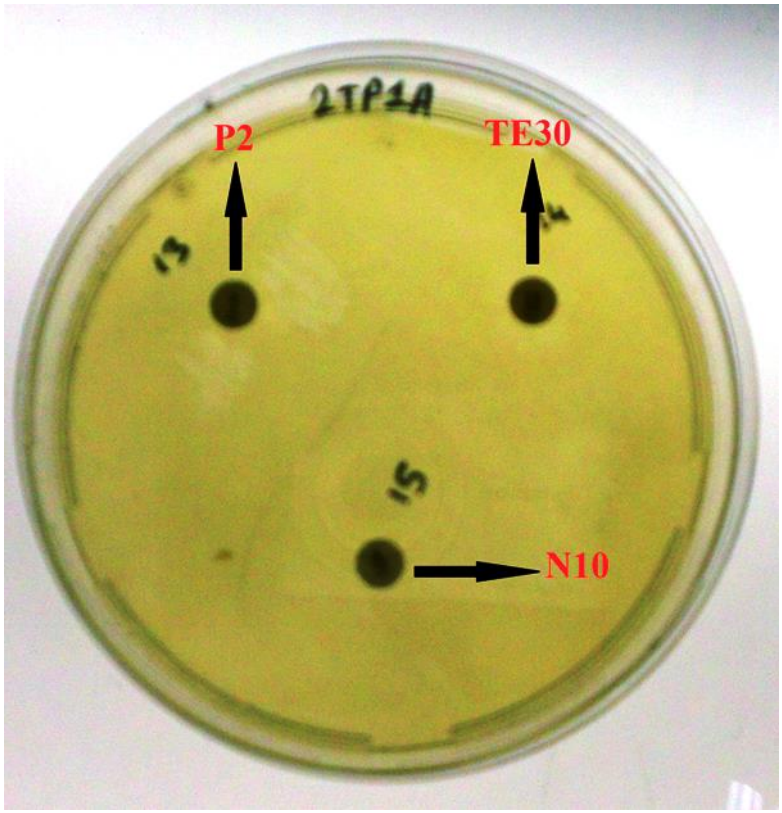
Şekil 4.82. 2TP1A'nın NV 5, FD 10 ve K 5 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.83. 2TP1A'nın P 10, AMP 10 ve TIL 15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.84. 2TP1A'nın MY 15, S 10 ve C 30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.85. 2TP1A'nın P 2, TE 30 ve N 10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı

Çizelge 4.3. İzolatlara Ait Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotikler	Strain ST5	Strain GC2	Strain BT1A	Strain BT1B	Strain 2TP1A
NV5 mcg Novobiyosin	±	+	±	+	+
FD10 mcg Fusidik asit	+	±	+	+	+
K5 mcg Kanamisin	-	-	-	-	+
NS100 iu Nistatin	+	+	+	+	+
B10 iu Basitrasin	±	±	+	+	±
CN10 mcg Gentamisin	-	-	-	-	±
TIL15 Tilmikosin	-	±	-	-	-
AMP10 mcg Ampisilin	+	+	+	-	+
S10 mcg Streptomisin	-	-	-	-	+
C30 mcg Kloramfenikol	+	-	+	-	-
MY15 mcg Linkomisin	+	+	+	+	+
P2 iu Penisilin G	+	+	+	+	+
TE30 mcg Tetrasiklin	-	-	±	-	+
N10 mcg Neomisin	-	±	-	-	+
P10 iu Penicilin G	+	+	+	+	+

+ Dirençli, - Duyarlı, ± Az duyarlı

4.5. Kemotaksonomik Analizler

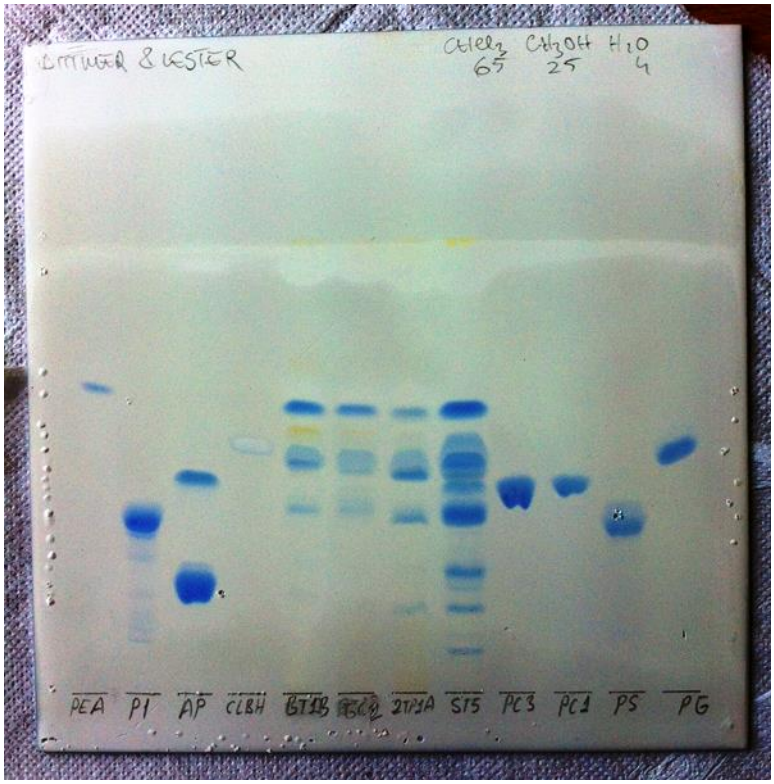
4.5.1. Lipit Analizi

Şekil 4.86'da izolatlara ait glikolipit, Şekil 4.87'de fosfolipit, Şekil 4.88'de aminolipit ve Şekil 4.89'da fosfo-gliko-aminolipit profilleri görülmektedir. Ayrıca ST5, GC2 ve BT1B'ye ait glikolipit, fosfolipit, aminolipit ve gliko-fosfo-aminolipitleri 16S rRNA dizi analizine göre kendilerine yakın olan türlerle karşılaştırıldı. Yapılan analizler sonucunda ST5'in glikolipit ve fosfolipitlerinin, *Acinetobacter pittii* DSM 25618'e ait glikolipit ve fosfolipitleri ile benzerlik gösterdiği (Şekil 4.90-4.91) ve aminolipitlerinin ise *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006 ve *Acinetobacter pittii* DSM 25618'e ait aminolipitlere benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.92). GC2'nin glikolipit,

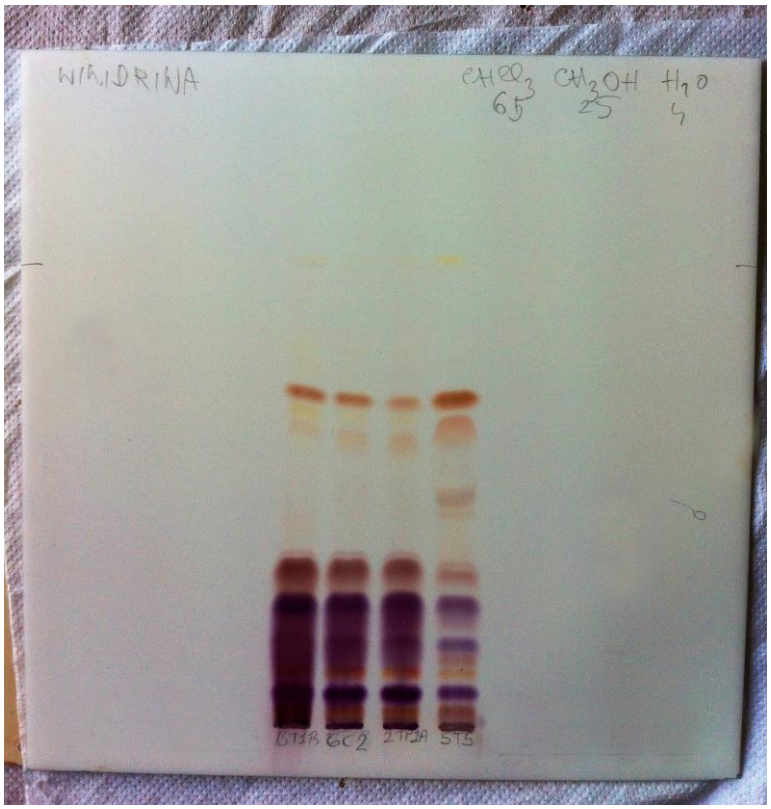
fosfolipit ve aminolipitlerinin *Acinetobacter beijerinckii* DSM 22901 ve *Acinetobacter lwoffii* DSM 2403'e ait glikolipit, fosfolipit ve aminolipitleri ile karşılaştırılması sonucunda glikolipitlerinin her iki türden farklılık gösterdiği, fosfolipit ve aminolipitlerinin ise genel olarak her iki türe benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.94-4.96). BT1B'ye ait glikolipit, fosfolipit ve aminolipitlerin, *Cronobacter malonaticus* DSM 18702 ve *Cronobacter sakazakii* DSM 4485'e ait glikolipit, fosfolipit ve aminolipitlere benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.98-4-100).



Şekil 4.86. İzolatlara Ait Glikolipitlerin Tek Yönlü TLC ile Gösterimi



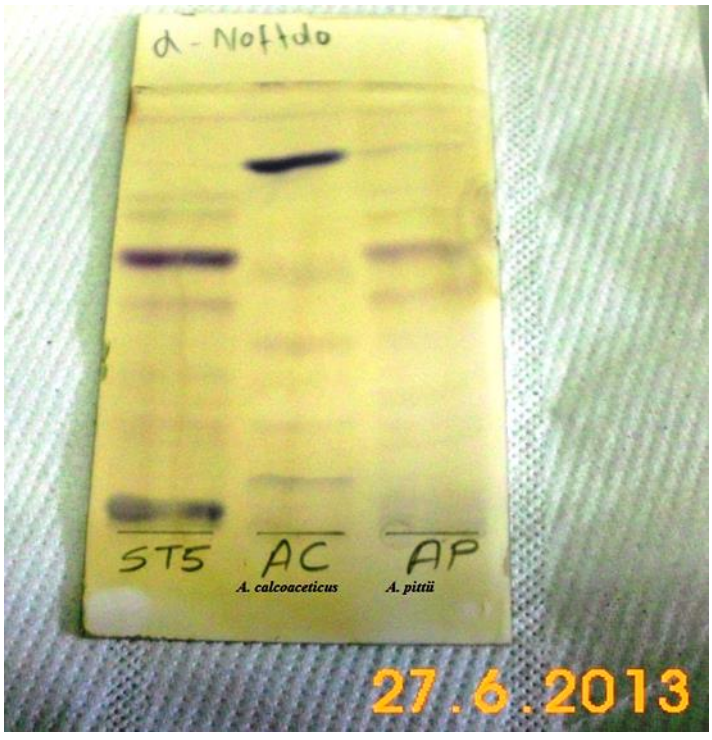
Şekil 4.87. İzolatlara Ait Fosfolipitlerin Fosfolipit Standartlarıyla Karşılaştırılması



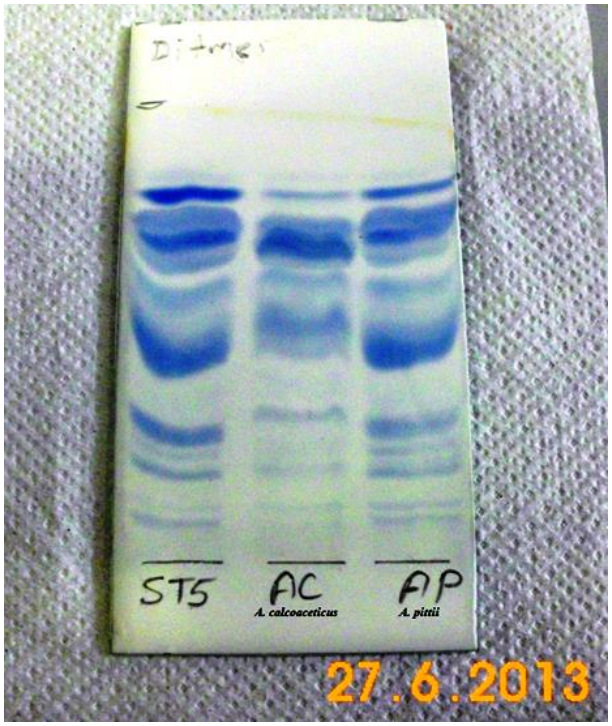
Şekil 4.88. İzolatlara Ait Aminolipitlerin Tek yönlü TLC ile gösterimi



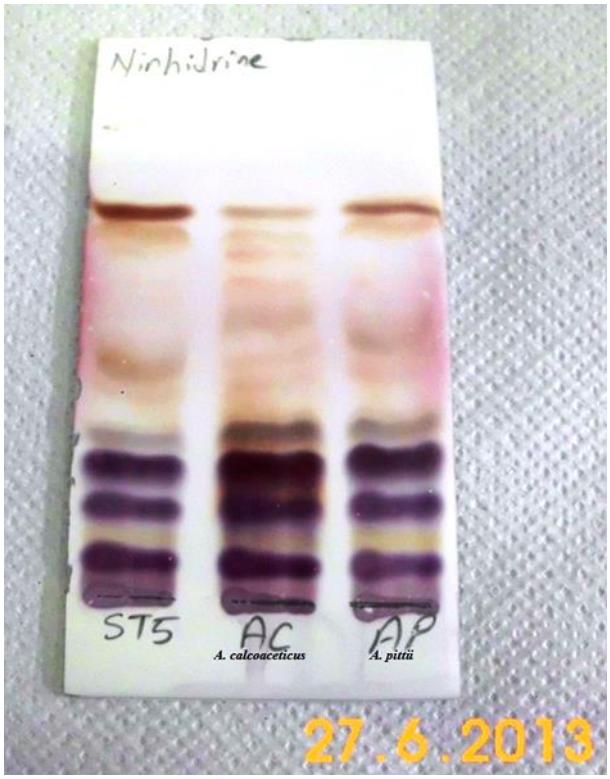
Şekil 4.89. İzolatlara Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin Tek Yönlü TLC ile Gösterimi



Şekil 4.90. ST5'e Ait Glikolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Glikolipitleri İle Karşılaştırılması



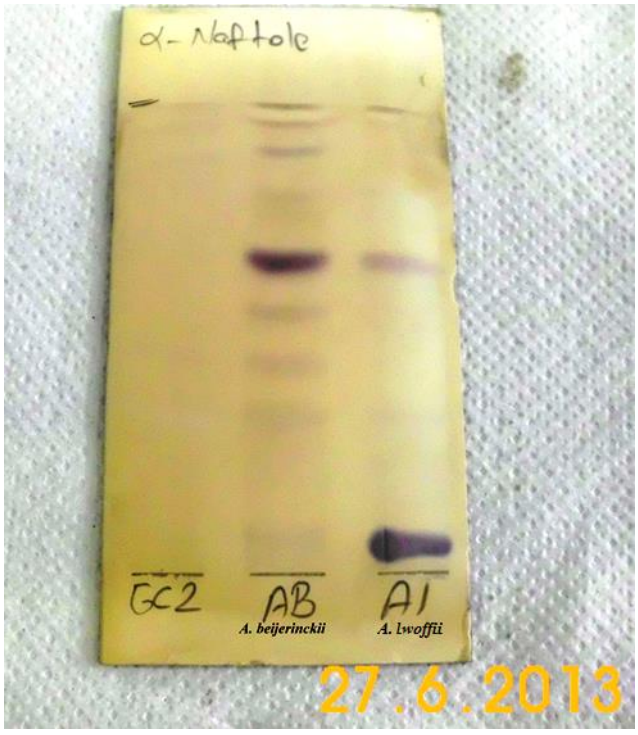
Şekil 4.91. ST5'e Ait Fosfolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması



Şekil 4.92. ST5'e Ait Aminolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması



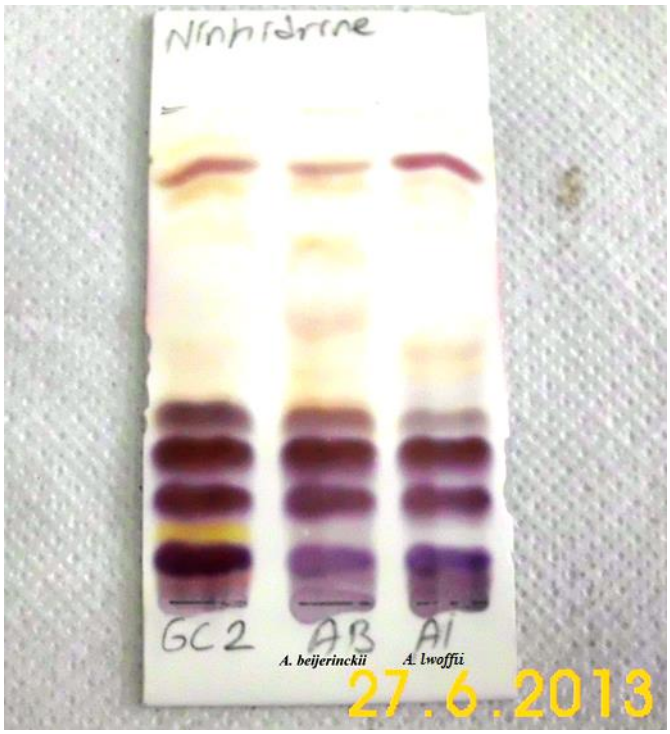
Şekil 4.93. ST5'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması



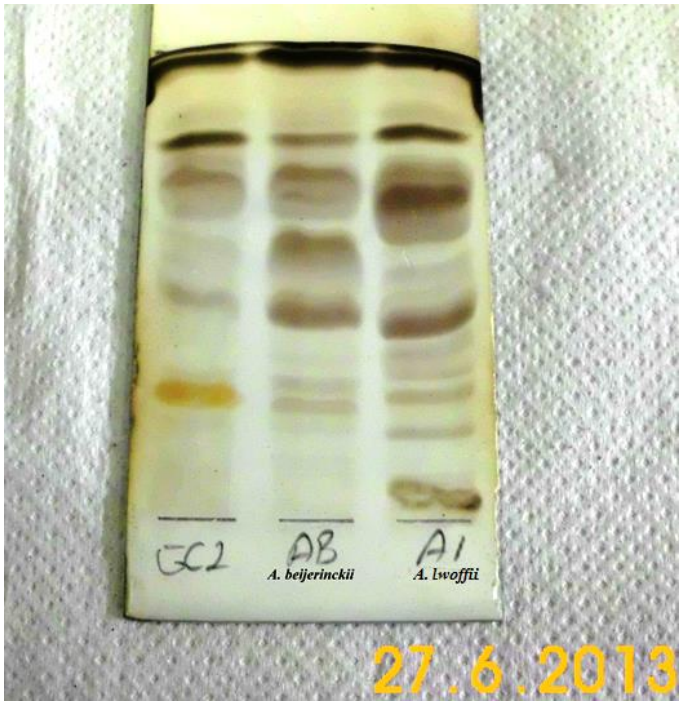
Şekil 4.94. GC2'ye Ait Glikolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'e Ait Glikolipitleri ile Karşılaştırılması



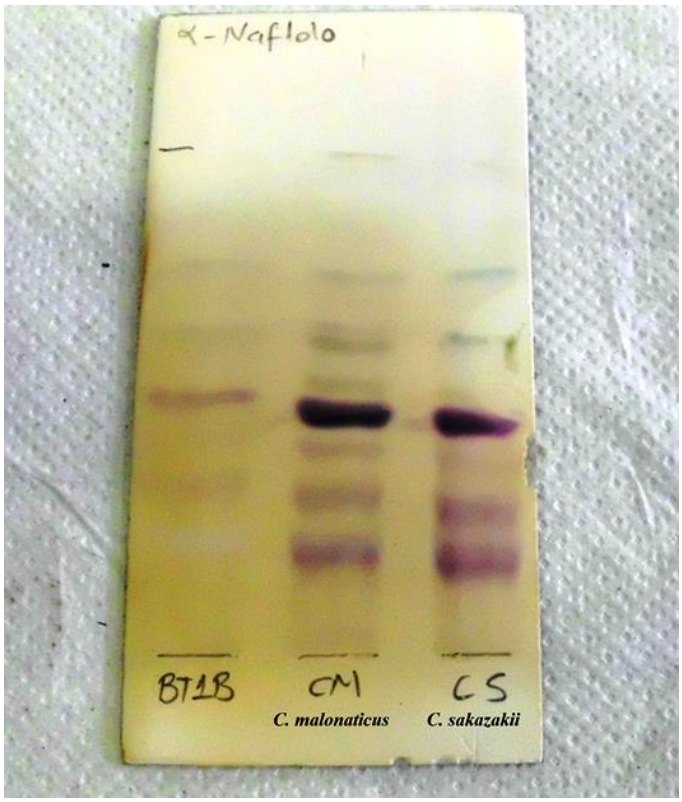
Şekil 4.95. GC2'ye Ait Fosfolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403 Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması



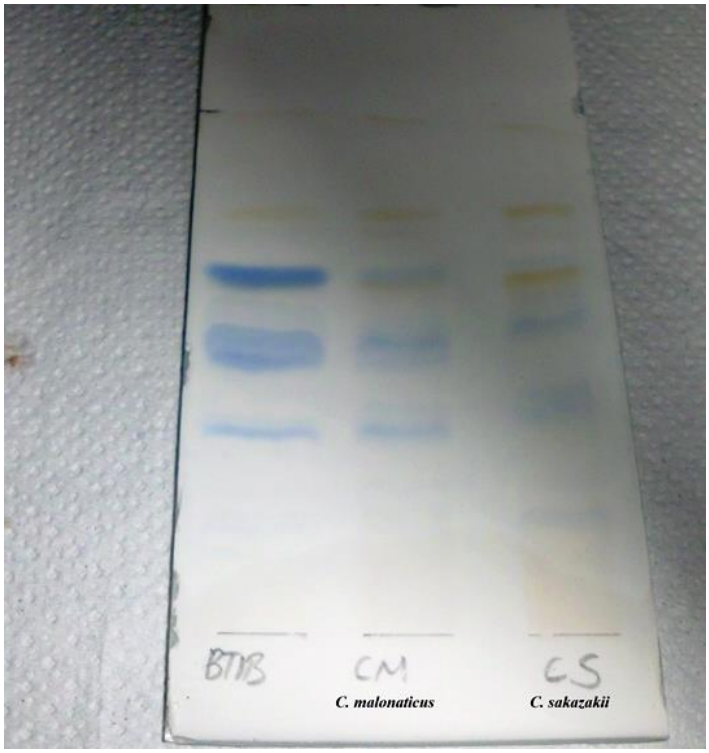
Şekil 4.96. GC2'ye Ait Aminolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'a Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması



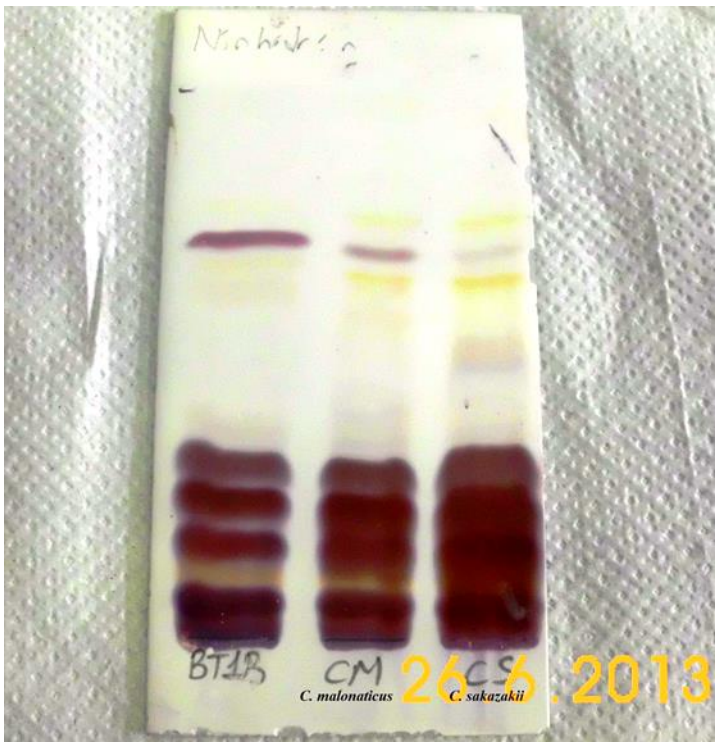
Şekil 4.97. GC2'ye Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *A. beijerinckii* DSM 22901 ve *A. lwoffii* DSM 2403'a Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması



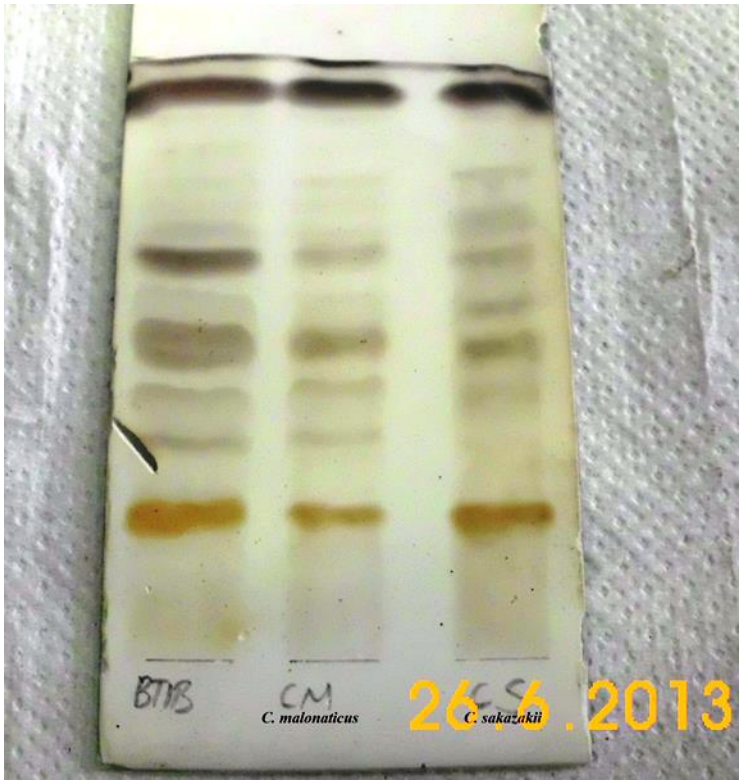
Şekil 4.98. BT1B'ye Ait Glikolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Glikolipitleri ile karşılaştırılması



Şekil 4.99. BT1B'ye Ait Fosfolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması

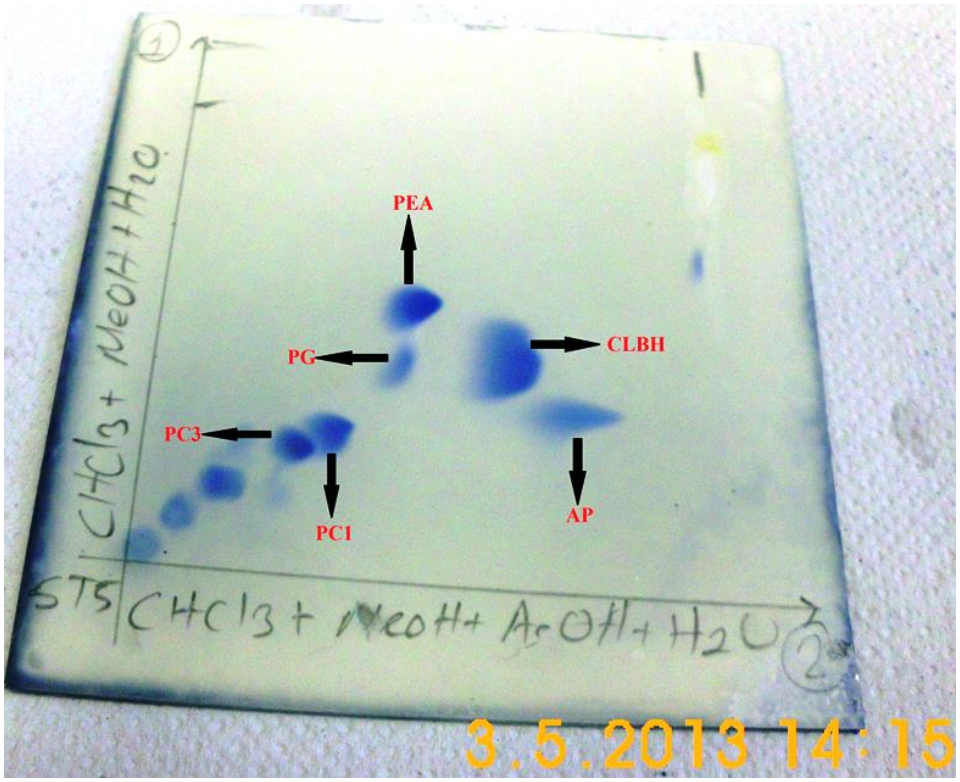


Şekil 4.100. BT1B'ye Ait Aminolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Aminolipitleri ile Karşılaştırılması

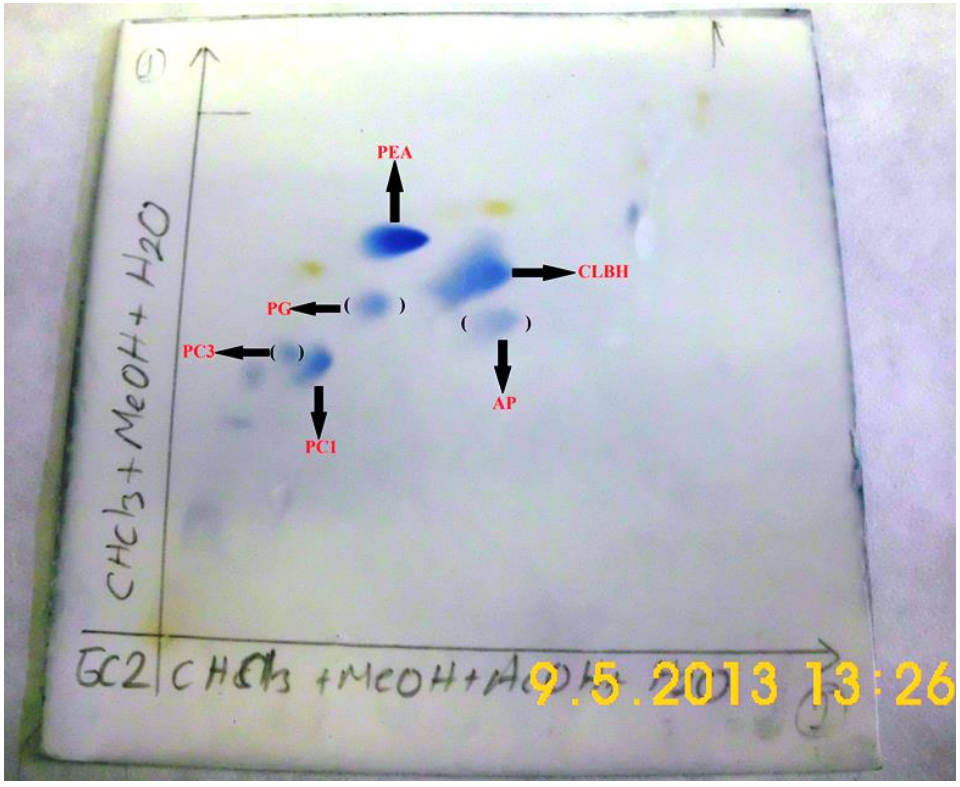


Şekil 4.101. BT1B'ye Ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *C. malonaticus* DSM 18702 ve *C. sakazakii* DSM 4485'e Ait Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması

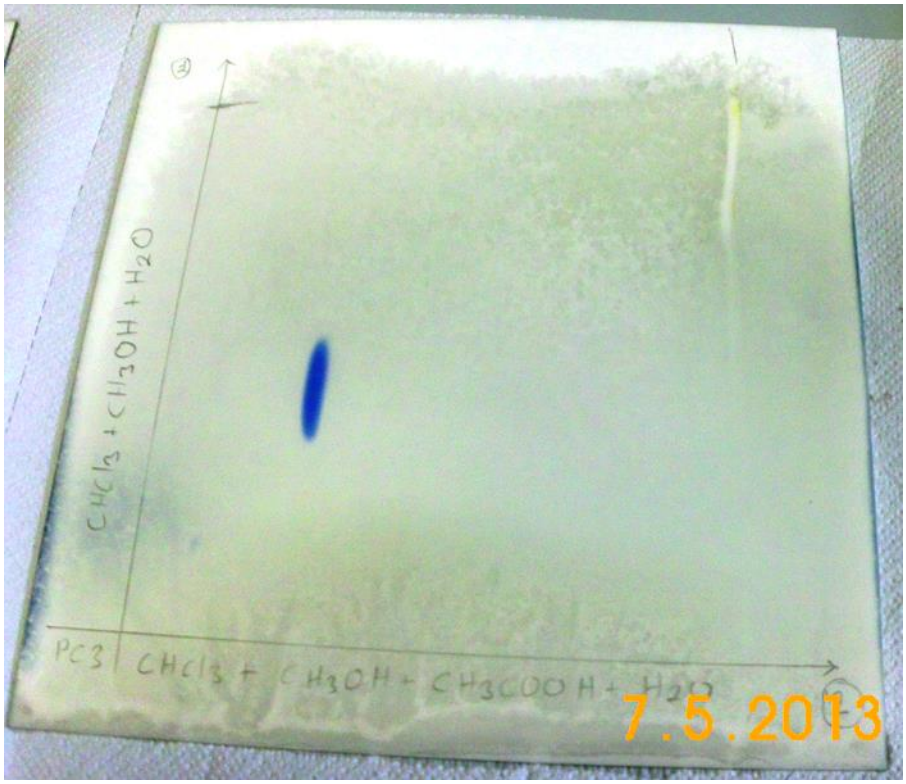
İzolatlara ait fosfolipit çeşitleri, 8 tane lipit standartı kullanılarak iki yönlü TLC ile tespit edildi. Yaplan analiz sonucunda ST5 ve GC2'nin PG, PC1, PC3, CLBH, AP ve PEA (Şekil 4.102-4.110, Çizelge 4.4) (ST5 ve GC2'nin fosfolipitlerinin iki yönlü TLC analizi sonucunda, fosfolipitleri aynı profili sergilediğinden GC2'nin standartlarla birlikte analizine gerek duyulmamıştır), BT1B'nin PG, PEA (Şekil 4.111-4.113, Çizelge 4.4) ve 2TP1A'nın PG, CLBH ve PEA (Şekil 4.114-4.117, Çizelge 4.4) fosfolipitlerini içerdikleri tespit edildi.



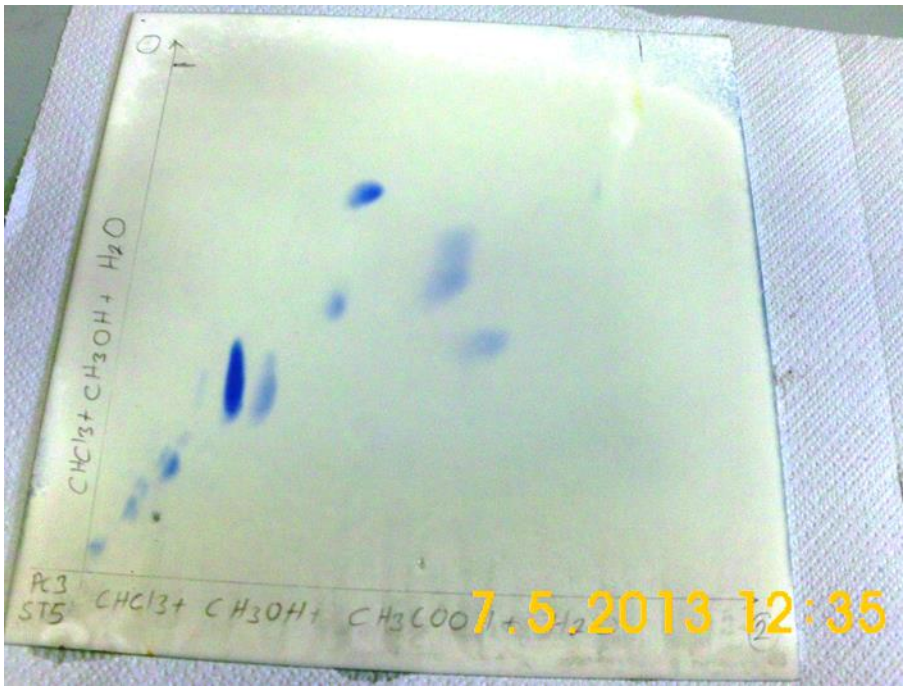
Şekil 4.102. ST5'e Ait Fosfolipitlerin iki Yönlü TLC ile Analizi



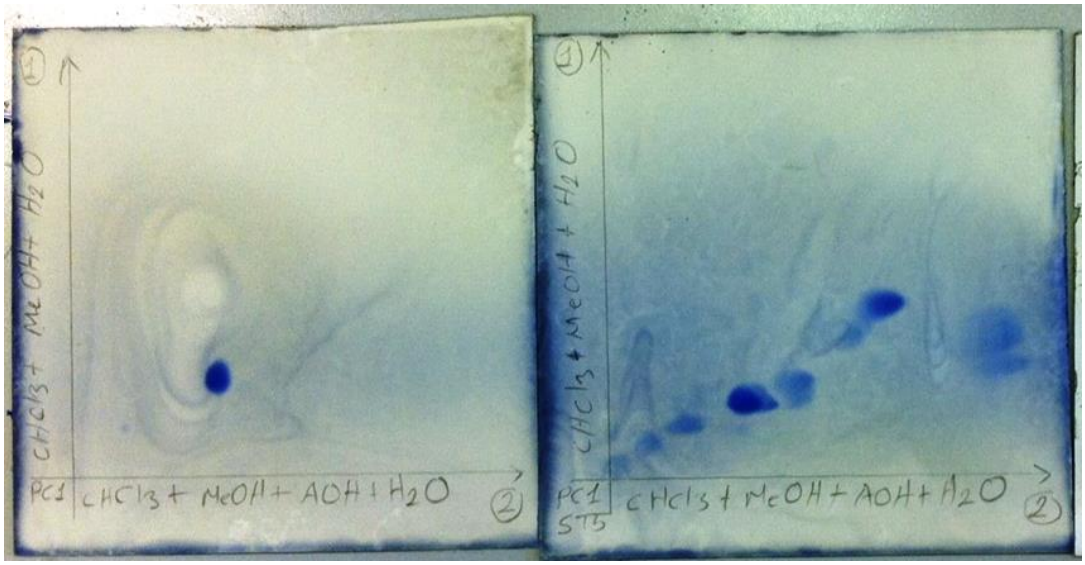
Şekil 4.103. GC2'ye Ait Fosfolipitlerin iki Yönlü TLC ile Analizi



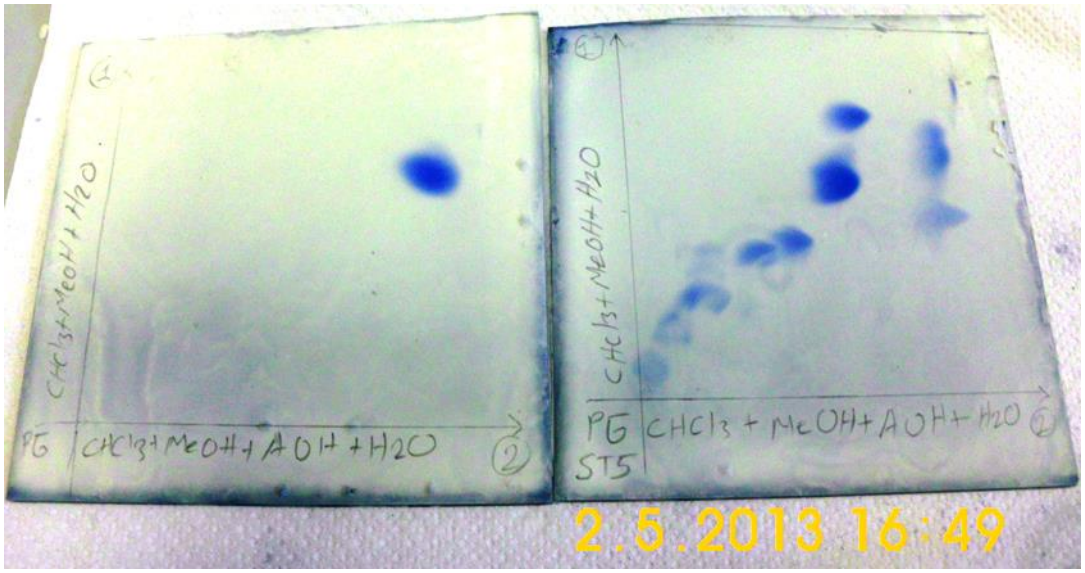
Şekil 4.104. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a1)



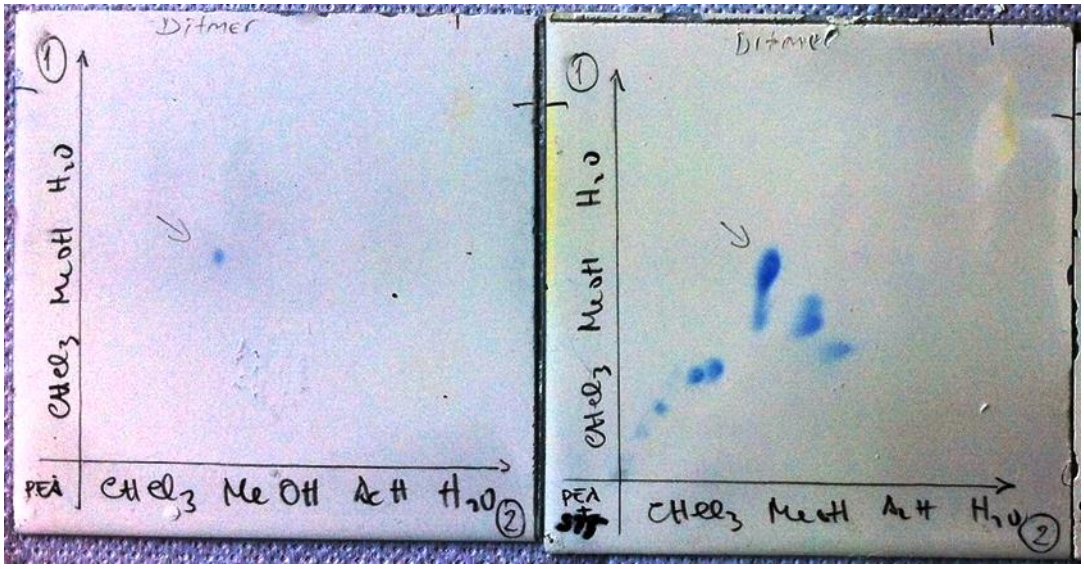
Şekil 4.105. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a2)



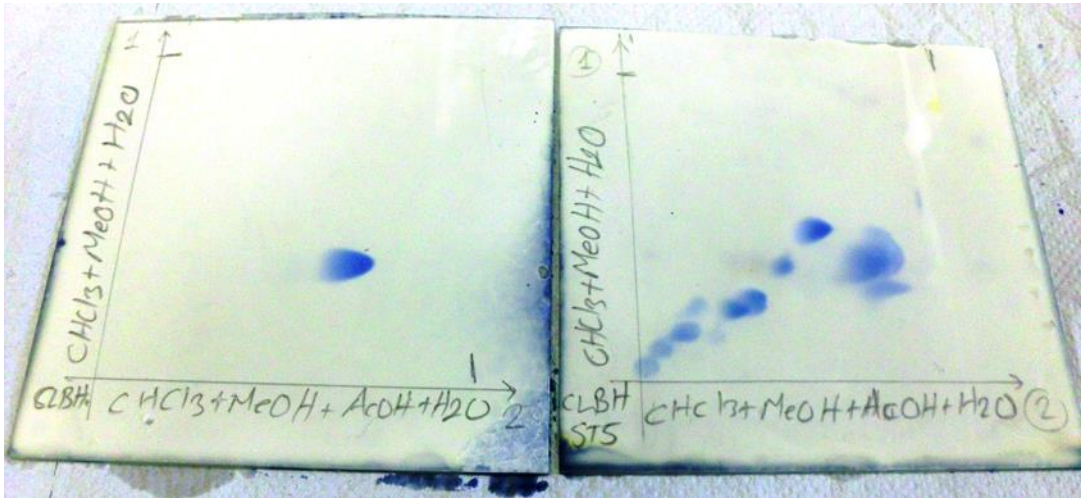
Şekil 4.106. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (b)



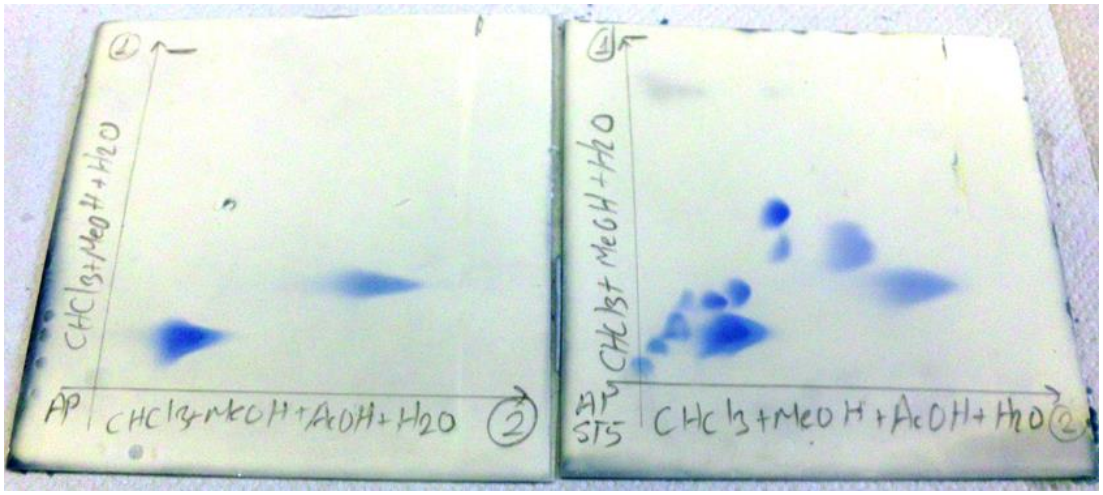
Şekil 4.107. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (c)



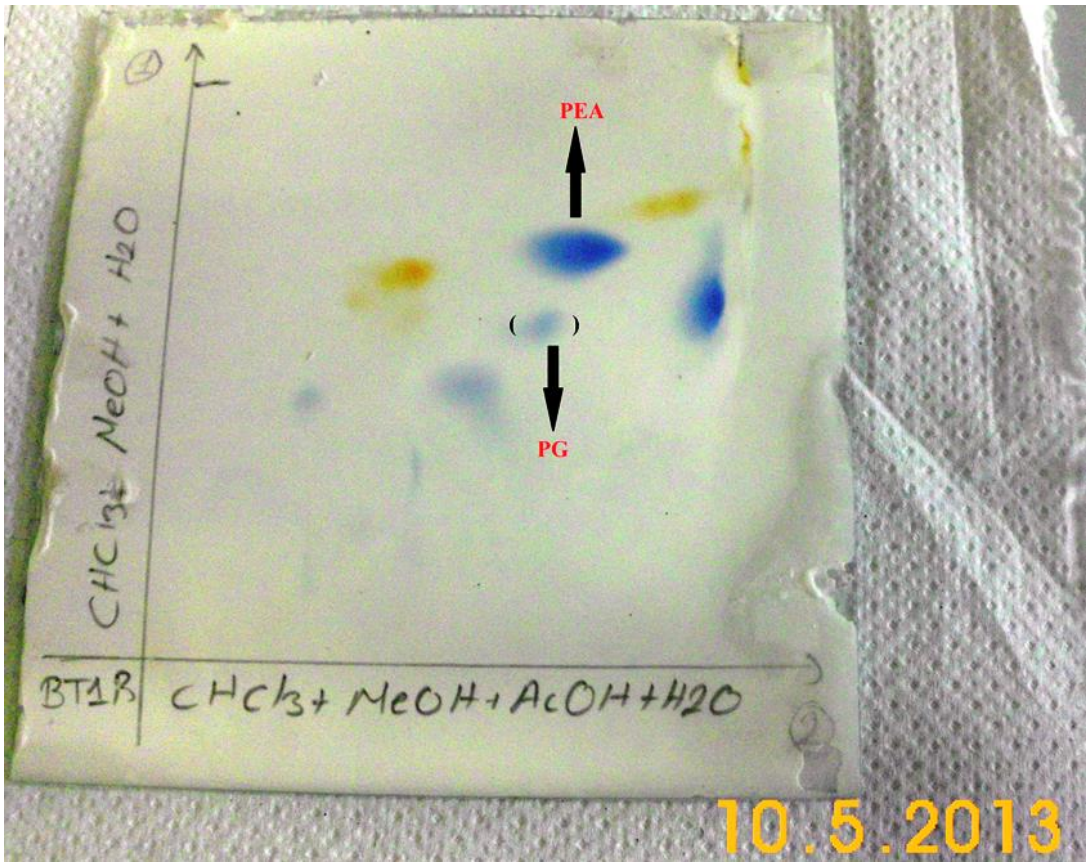
Şekil 4.108. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (d)



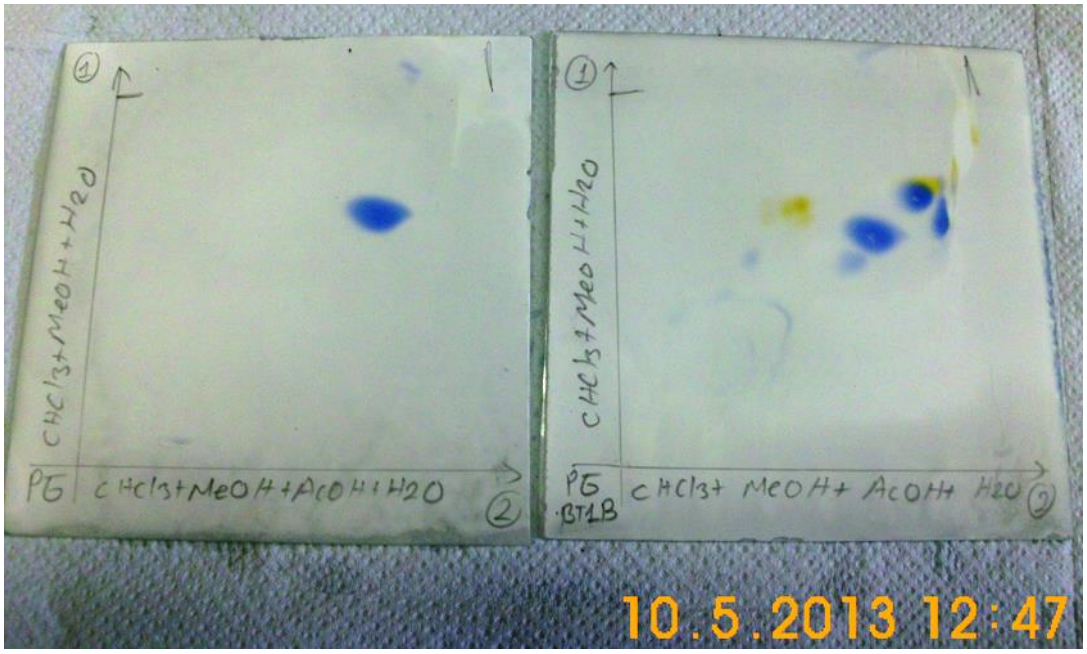
Şekil 4.109. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (e)



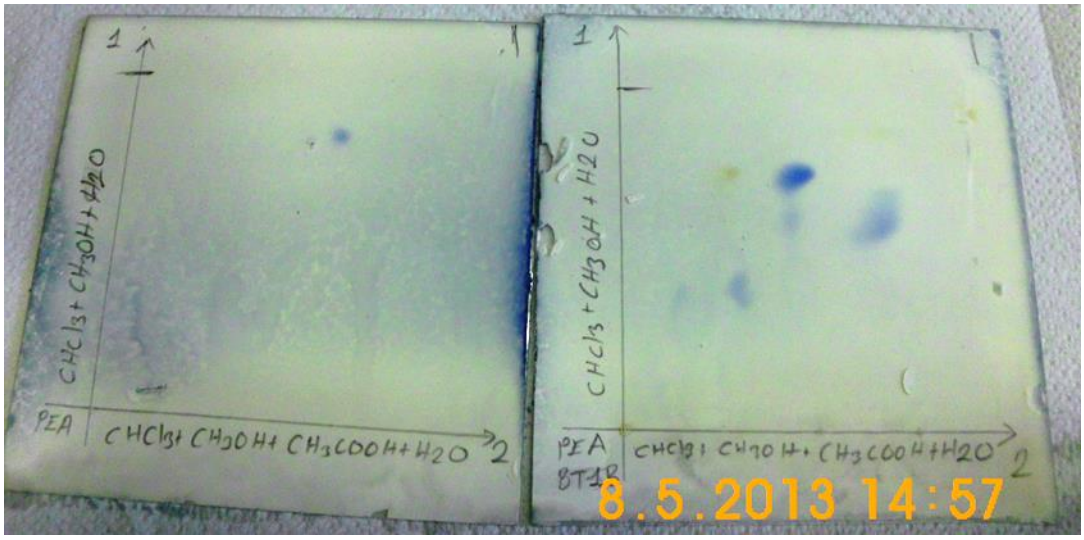
Şekil 4.110. Fosfolipit Standartları Kullanılarak ST5'e Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (f)



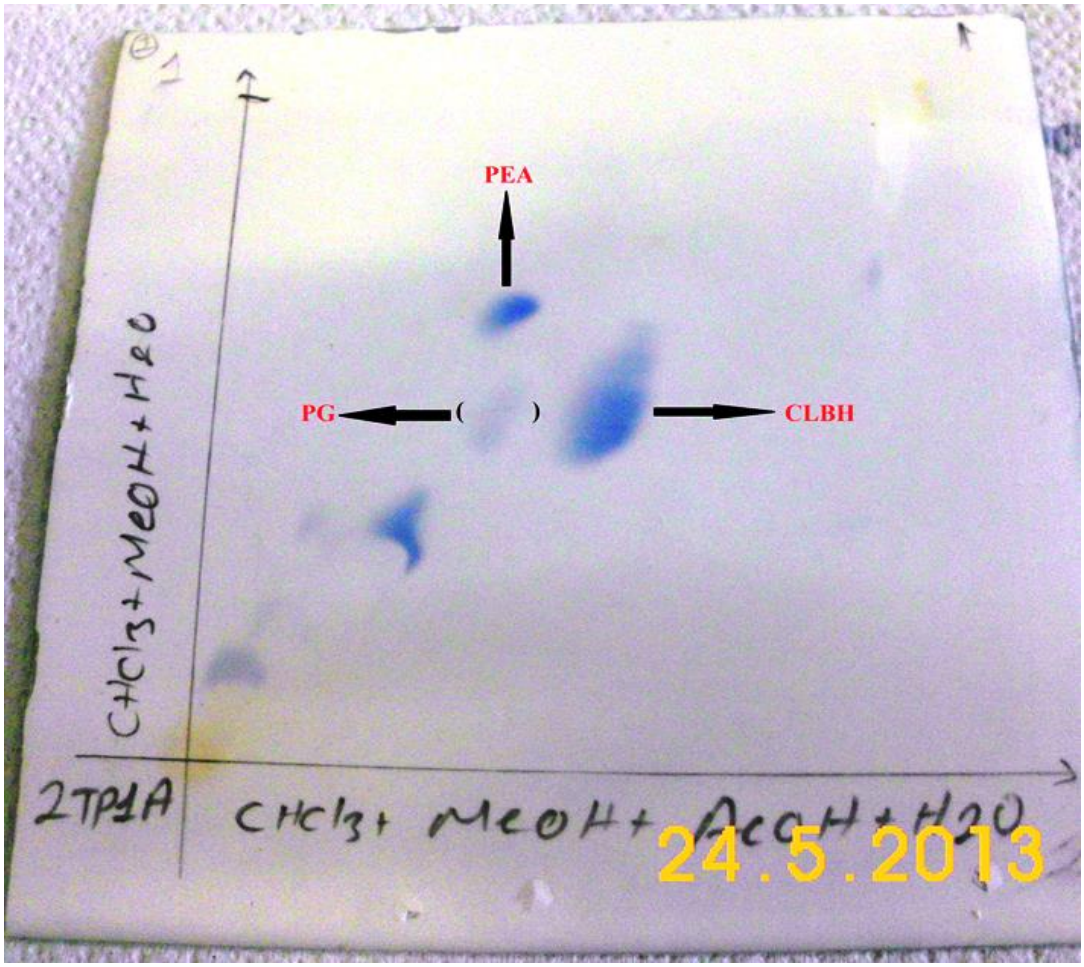
Şekil 4.111. BT1B'ye Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi



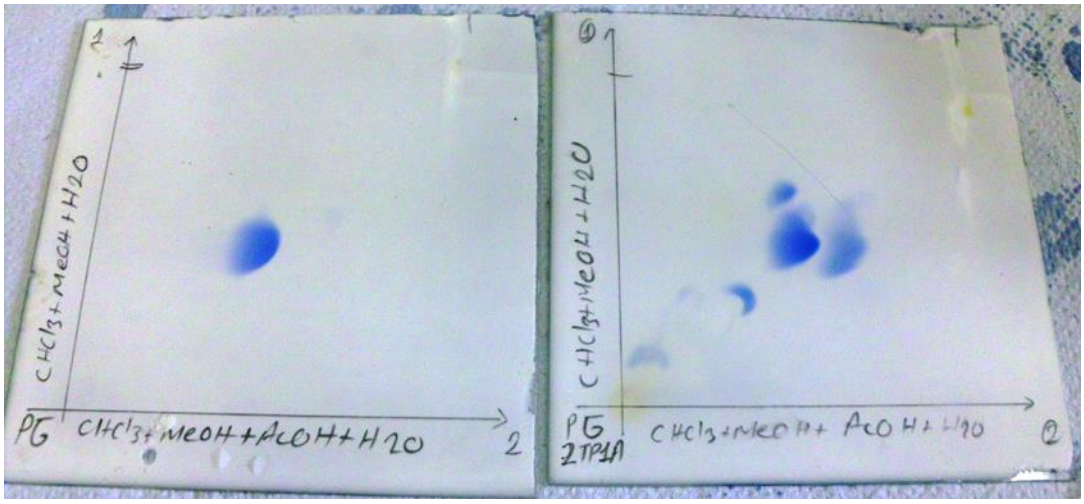
Şekil 4.112. Fosfolipit Standartları Kullanılarak BT1B'ye Ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a)



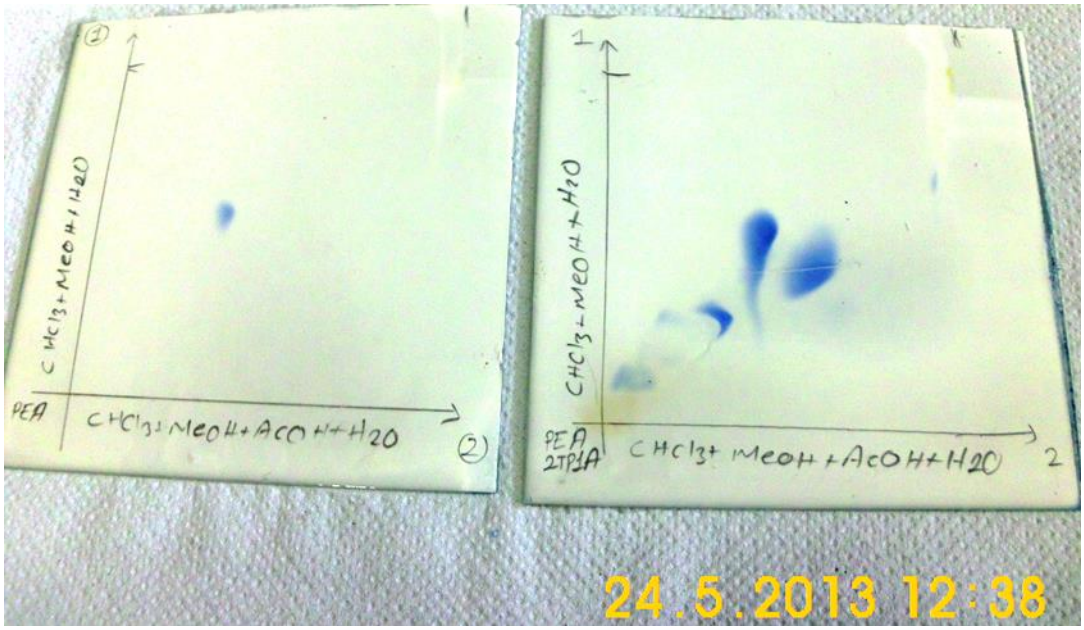
Şekil 4.113. Fosfolipit Standartları Kullanılarak BT1B'ye Ait Fosfolipit Çesitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (b)



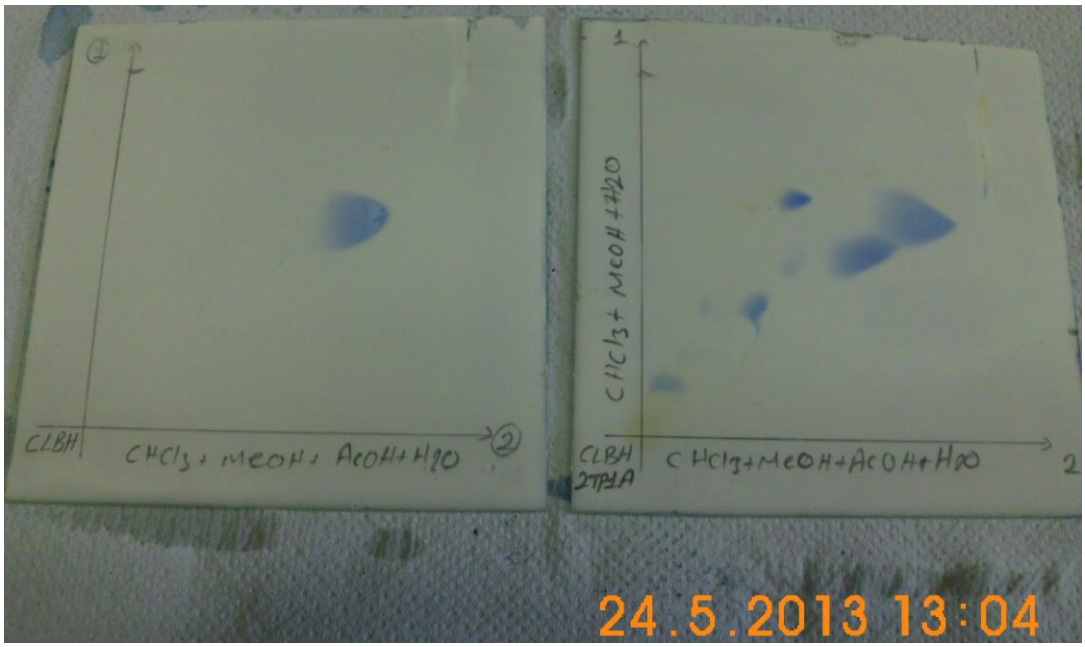
Şekil 4.114. 2TP1A'ya Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi



Şekil 4.115. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (a)



Şekil 4.116. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (b)



Şekil 4.117. Fosfolipit Standartları Kullanılarak 2TP1A'ya Ait Fosfolipit Çesitlerinin iki Yönlü TLC ile Analizi (c)

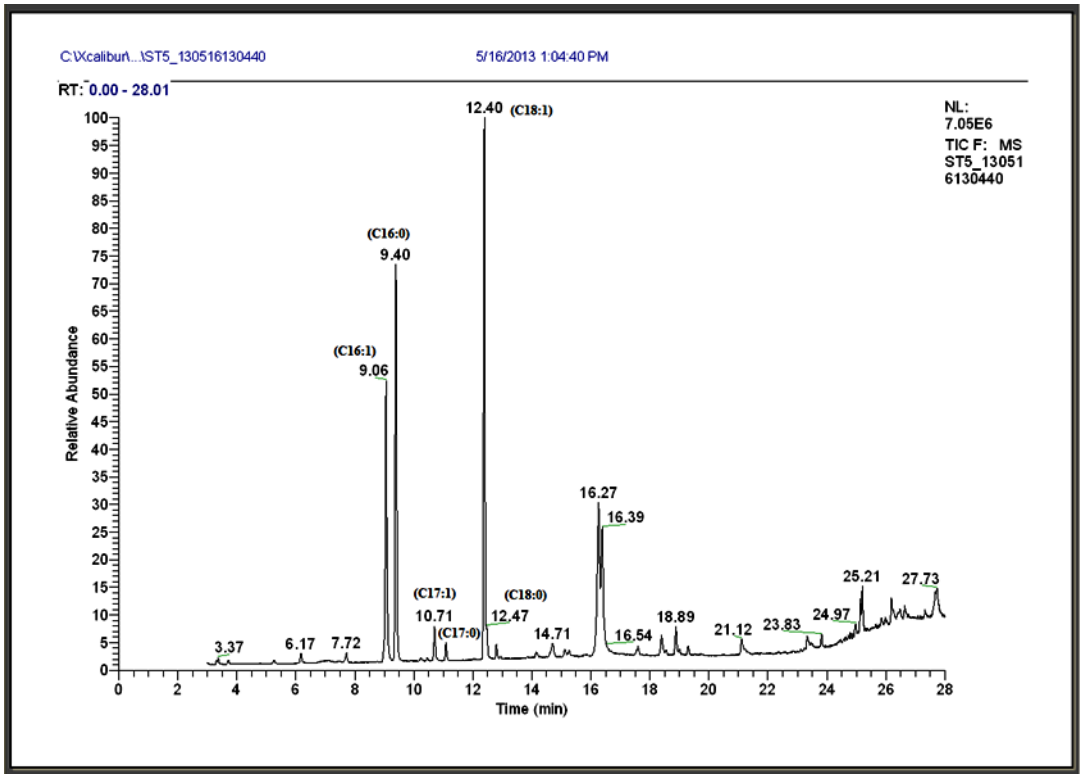
Çizelge 4.4. İzolatlara Ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC Analiz Sonuçları

Fosfolipit	ST5	GC2	BT1B	2TP1A
PG	+	+	+	+
PS	-	-	-	-
PC3	+	+	-	-
PC1	+	+	-	-
CLBH	+	+	-	+
AP	+	+	-	-
PI	-	-		-
PEA	+	+	+	+

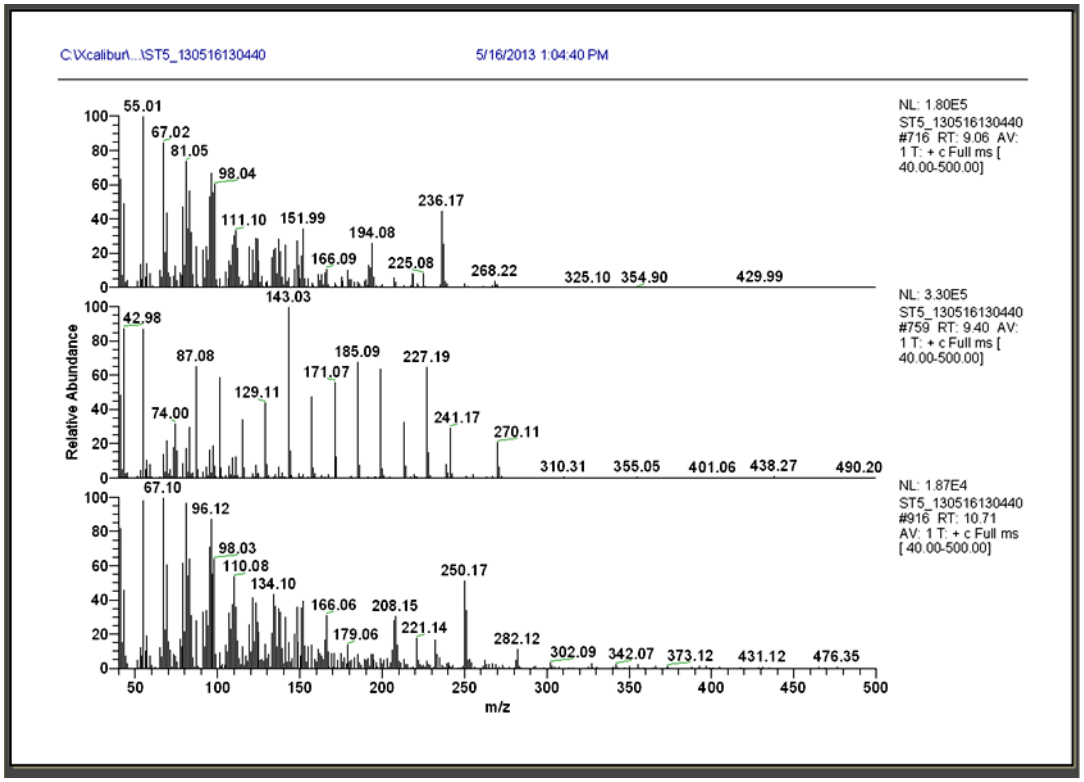
4.5.2. Yağ Asidi Analizi

İzolatlara ait total hücre yağ asidi çeşitleri ve yüzde oranları (FAME kompozisyonu) tespit edildi. ST5, GC2, BT1B ve 2TP1A ve 16S rRNA dizi analizleri ile ST5'e yakın olan, *A. calcoaceticus* ve *A. pittii*, GC2'ye yakın olan, *A. beijerinckii* ve *A. lwoffii* ve BT1B'ye yakın olan, *C. malonaticus* ve *C. sakazakii* varyetelerine ait yağ asitlerinin GC-MS spektrumları incelenerek yağ asidi çeşitleri tespit edildi (Şekil 4.118-4.153). Yüzde oranları ise otomatik olarak bilgisayar programından elde edildi (Çizelge 4.5-4.8). Yapılan analiz sonucunda, ST5'te bulunan temel yağ asitleri C18:1 (%41.56), C16:0 (%31,76) ve C16:1 (%22.02), GC2'de bulunan temel yağ asitleri C16:0 (%36.1), C18:1 (%32.49 (C18:1ω9c: %24.8)) ve C16:1 (%20.38), BT1B'de bulunan temel yağ asitleri C16:0 (%37.44), C18:1 (%36.98) ve C16:1 (%20.08) ve 2TP1A'da bulunan temel yağ asitleri de C16:0 (%27.9), iC15:0 (%23.76), C18:1 (%18.08) ve C16:1 (%10.67) olarak tespit edildi. Ayrıca *A. calcoaceticus* DSM 30006'da C18:1 (%32.5), C16:0 (% 26.2) ve C16:1 (%13), *A. pittii* DSM 25618'de C16:0 (%39.7), C18:1 (%38.62) ve C16:1 (%21.6), *A. beijerinckii* DSM 22901'de C18:1 (%51.6), C16:0 (%28.72) ve C16:1 (%18.66), *A. lwoffii* DSM 2403'de C16:1 (%39.37), C18:1(%29.12) ve C16:0 (%28.87), *C. sakazakii* DSM 4485'de C16:0 (%50.31), C18:1 (% 31.46) ve

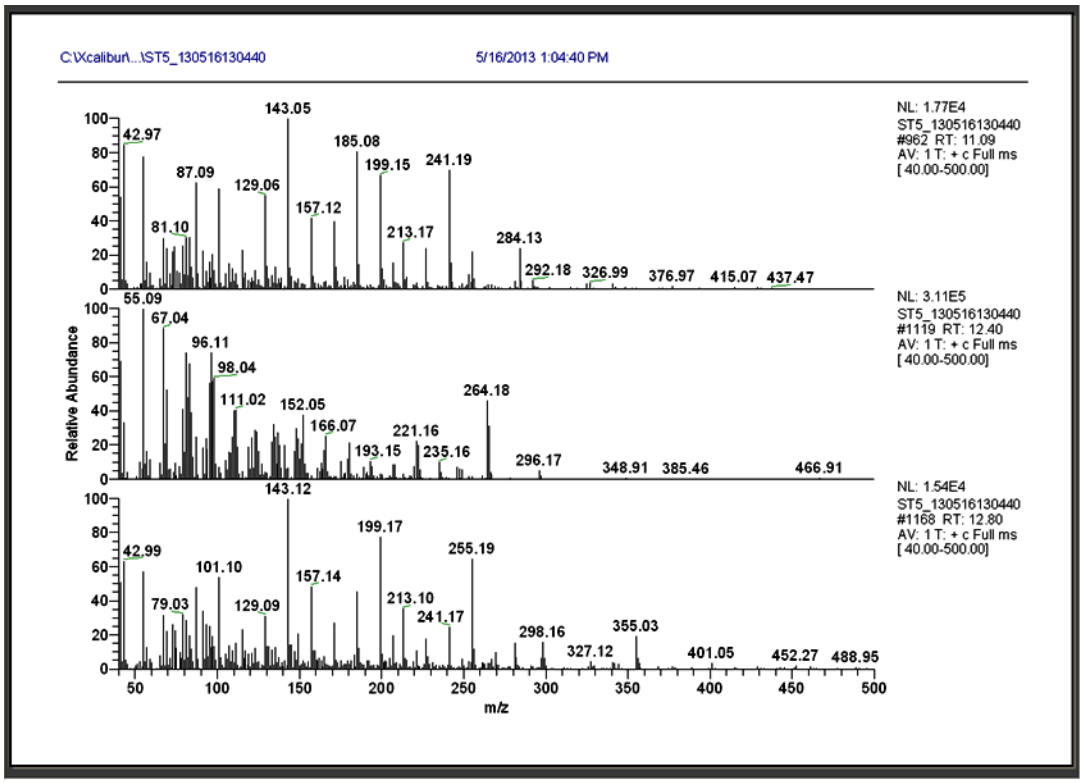
C16:1 (%16.07) ve *C. malonaticus* DSM 18701'de C16:0 (%65.25), C18:1 (%21.34) ve C16:1 (%11.05) yağ asitleri ağırlıklı olarak tespit edildi.



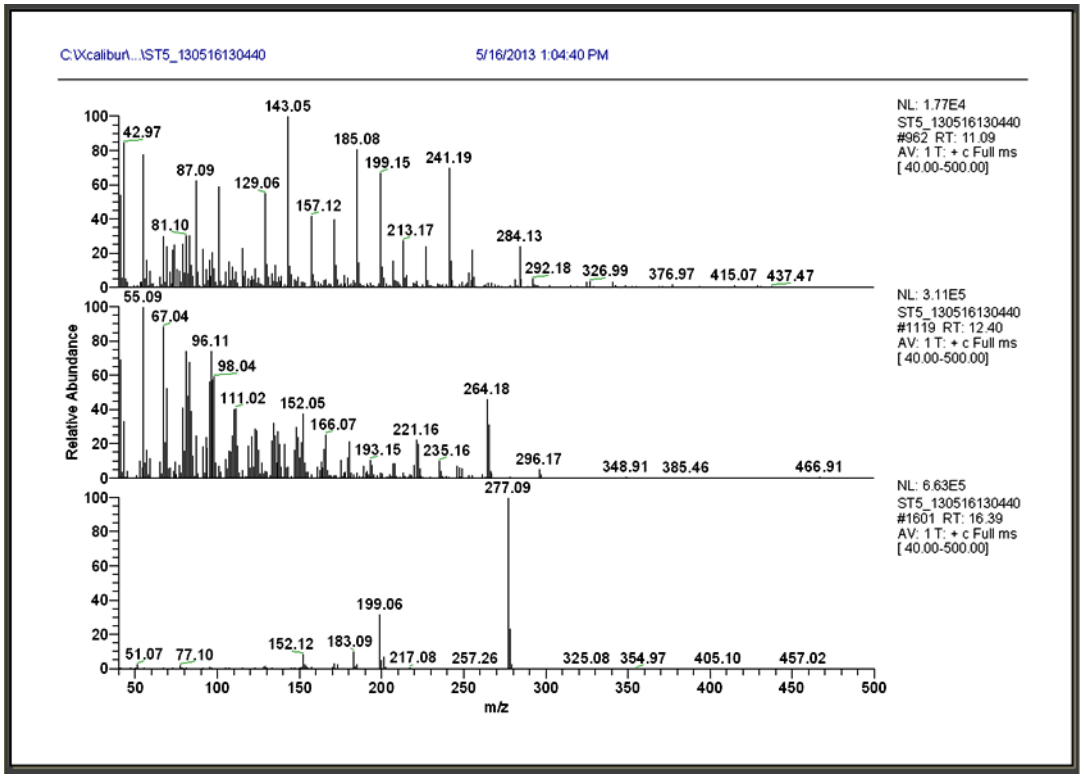
Şekil 4.118. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili)



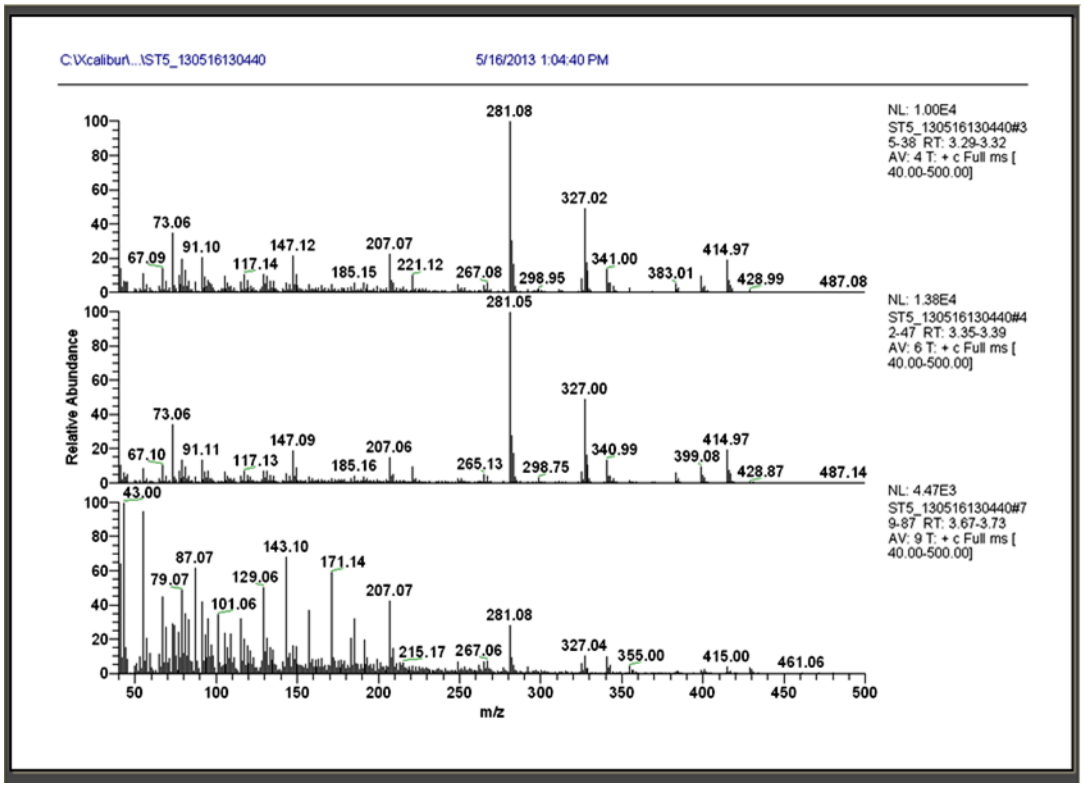
Şekil 4.119. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi)



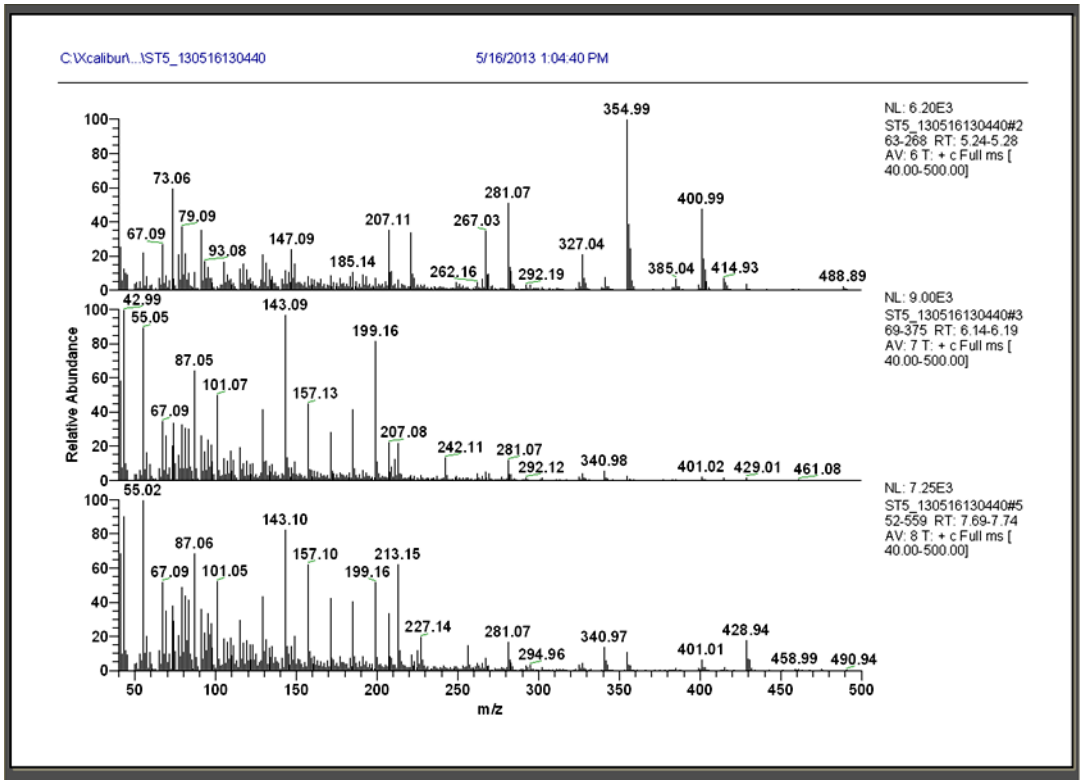
Şekil 4.120. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi)



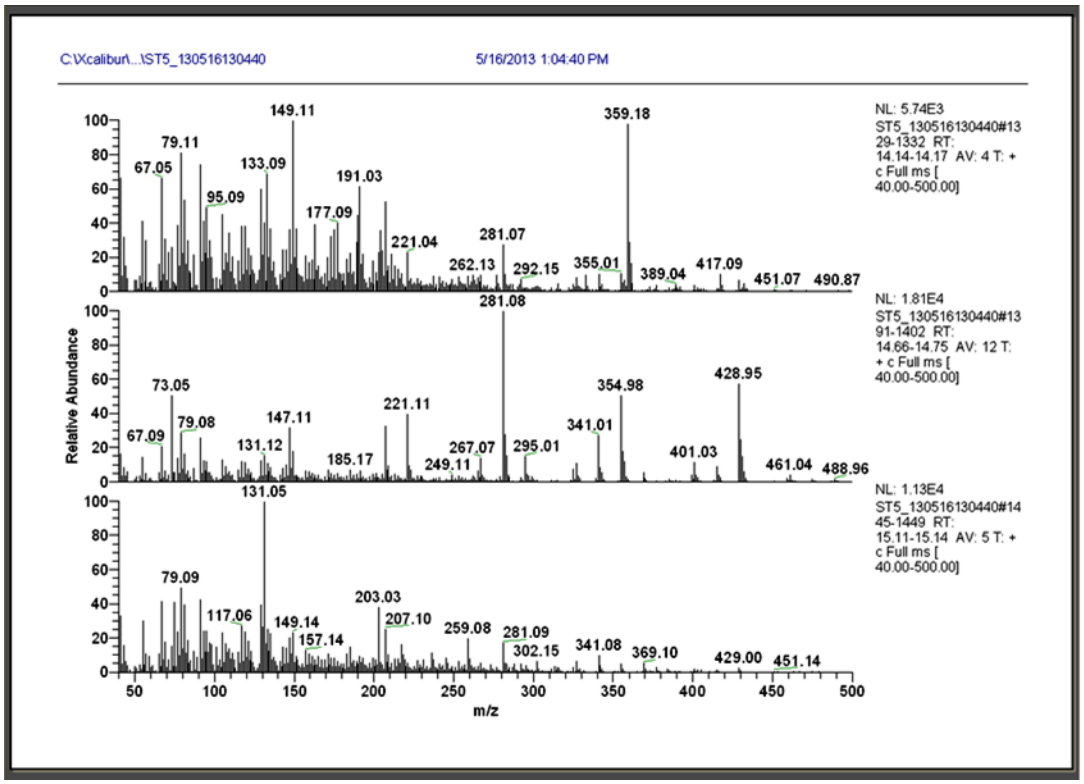
Şekil 4.121. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi)



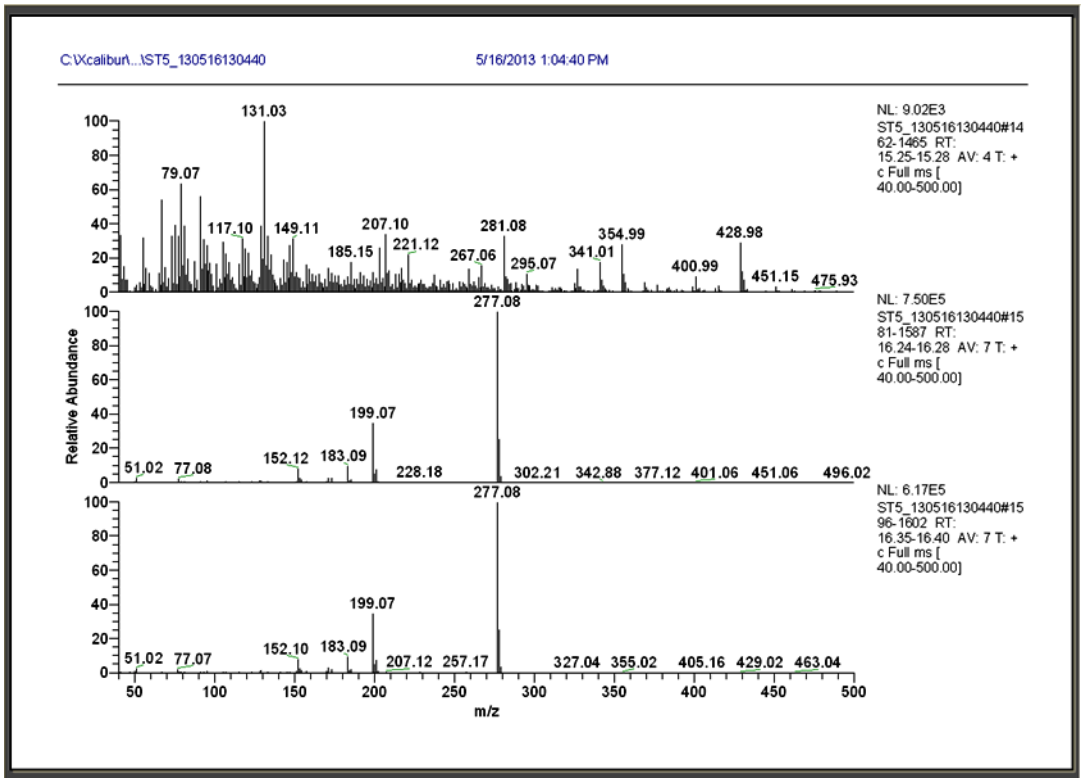
Şekil 4.122. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi)



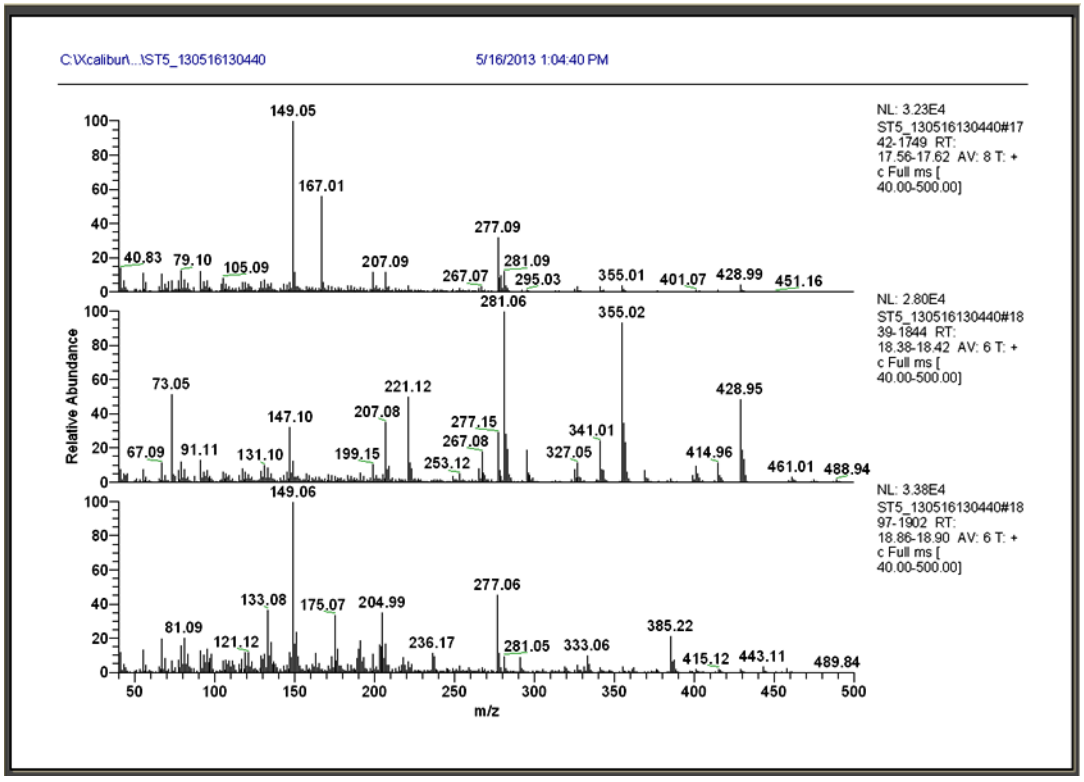
Şekil 4.123. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi)



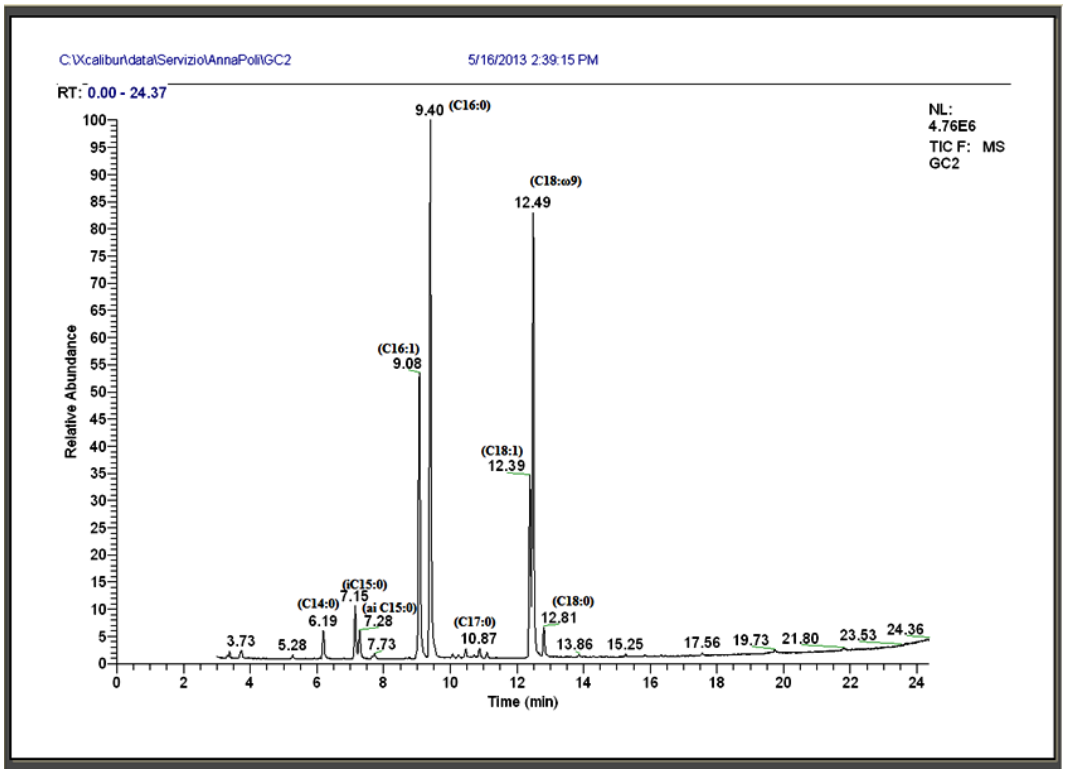
Şekil 4.124. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi)



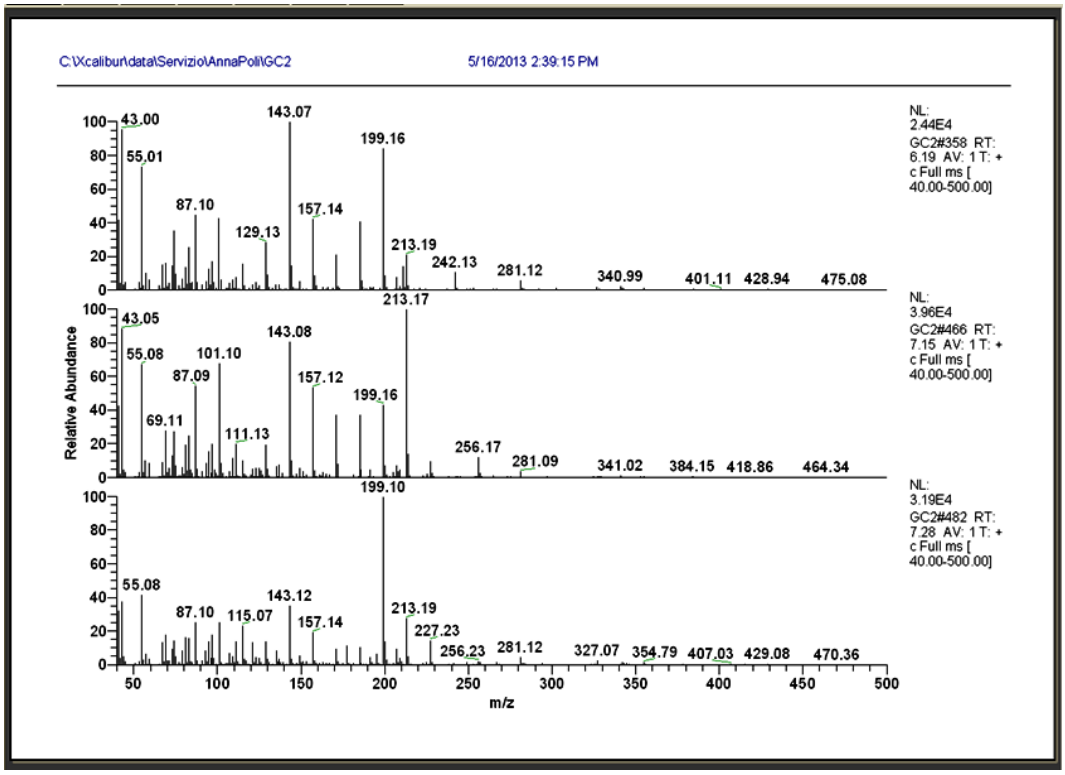
Şekil 4.125. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (h: Yağ Asidi Çeşidi)



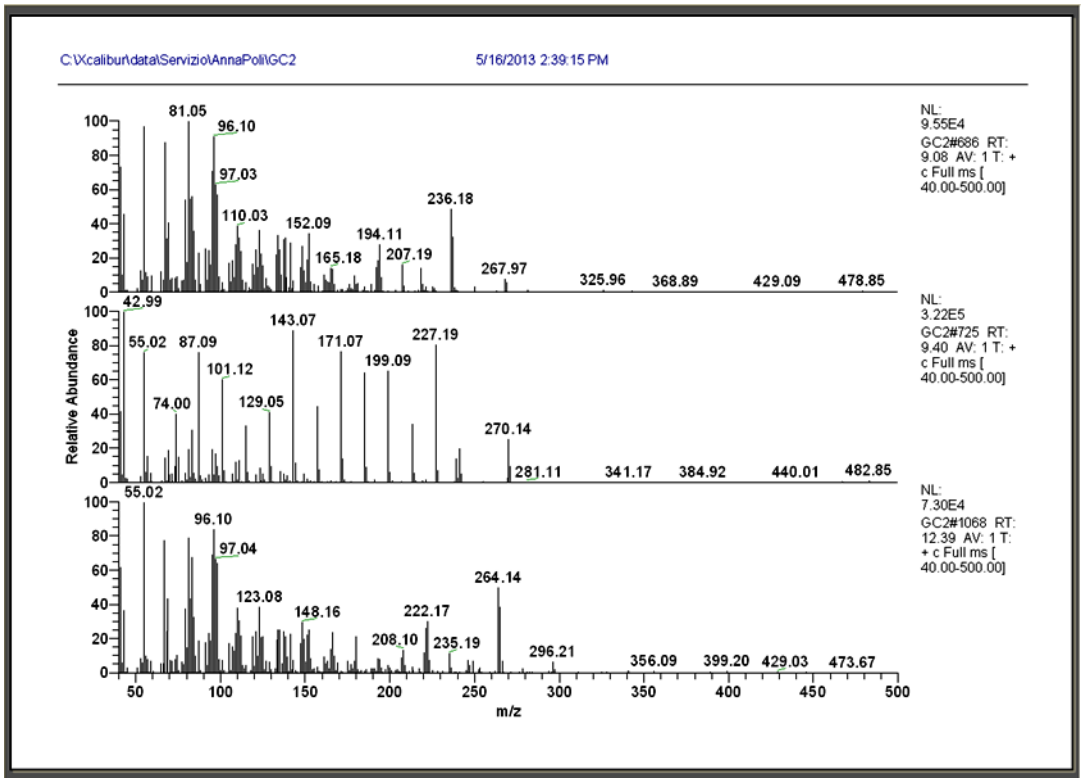
Şekil 4.126. ST5'e Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (i: Yağ Asidi Çeşidi)



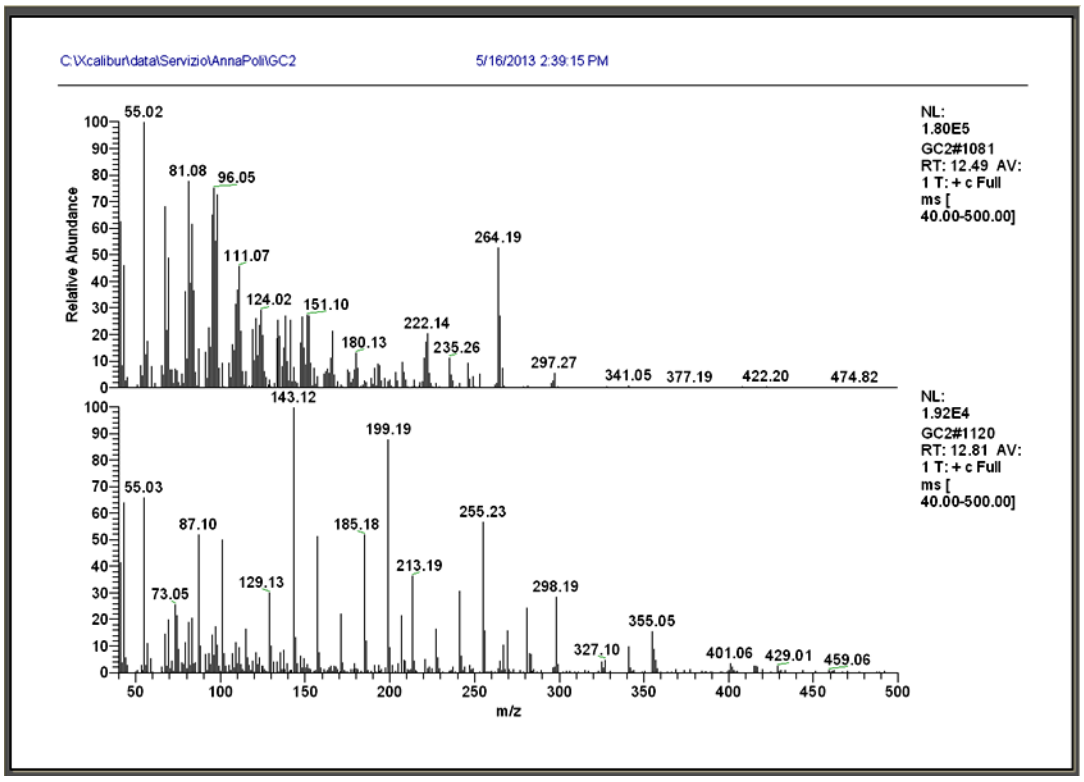
Şekil 4.127. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili)



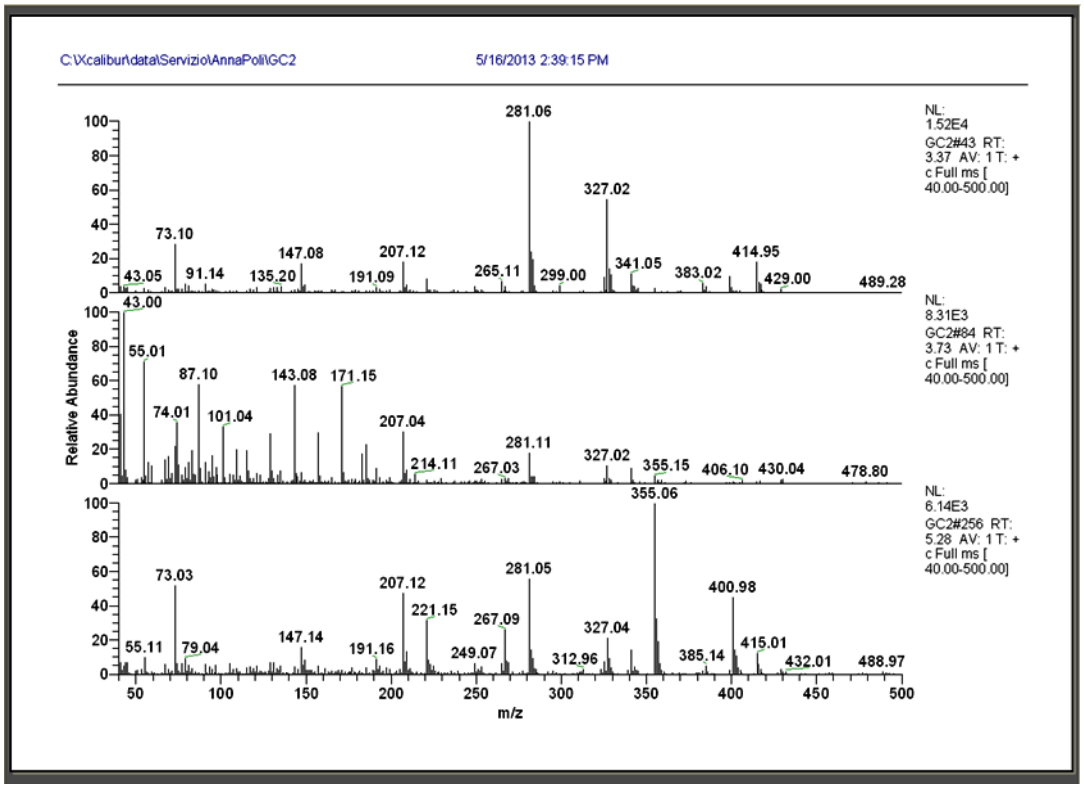
Şekil 4.128. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi**)**



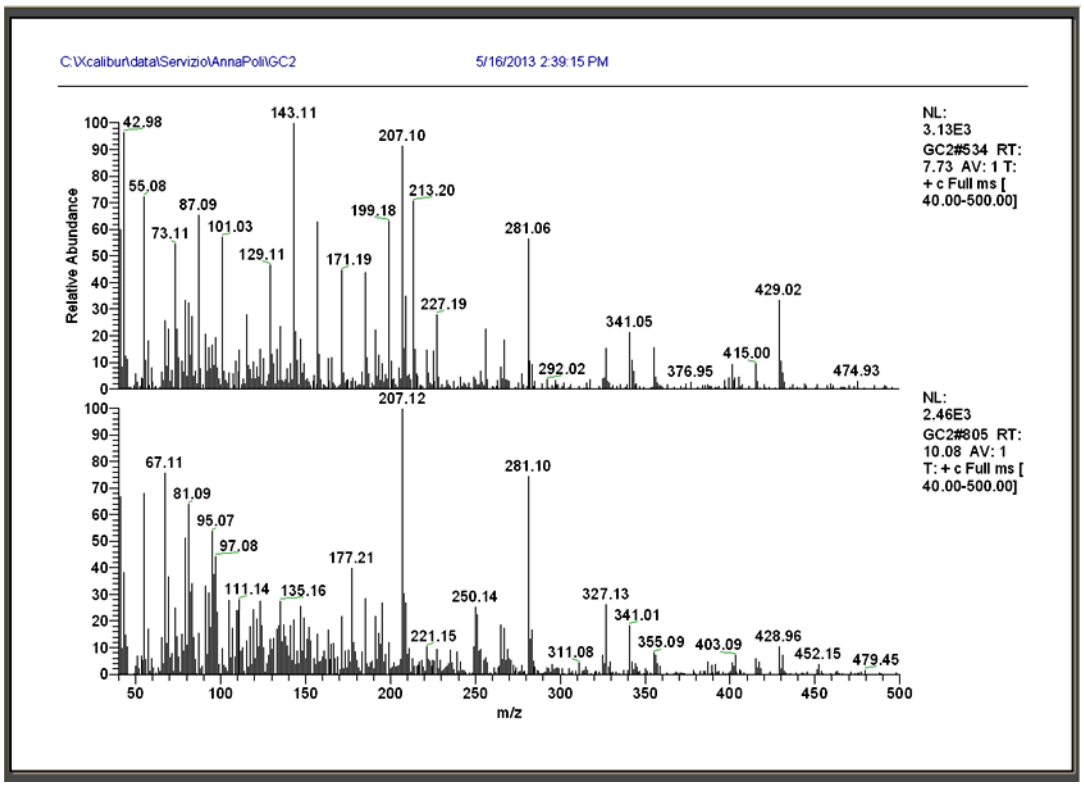
Şekil 4.129. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi)



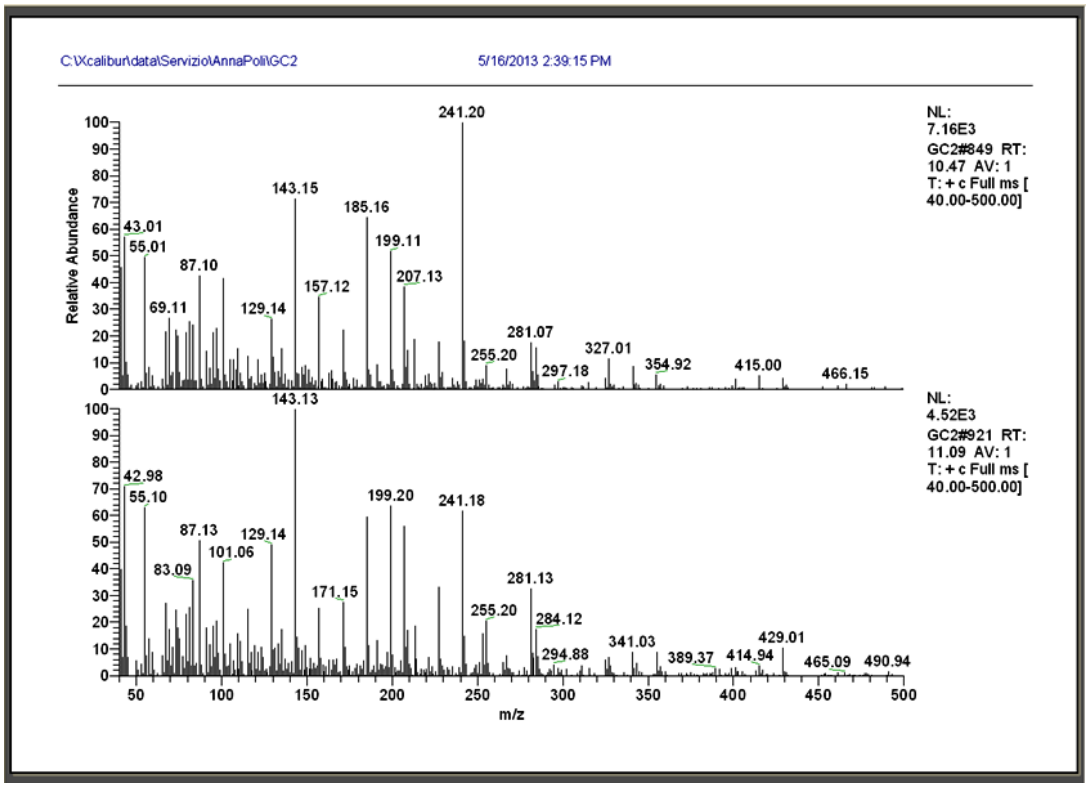
Şekil 4.130. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi)



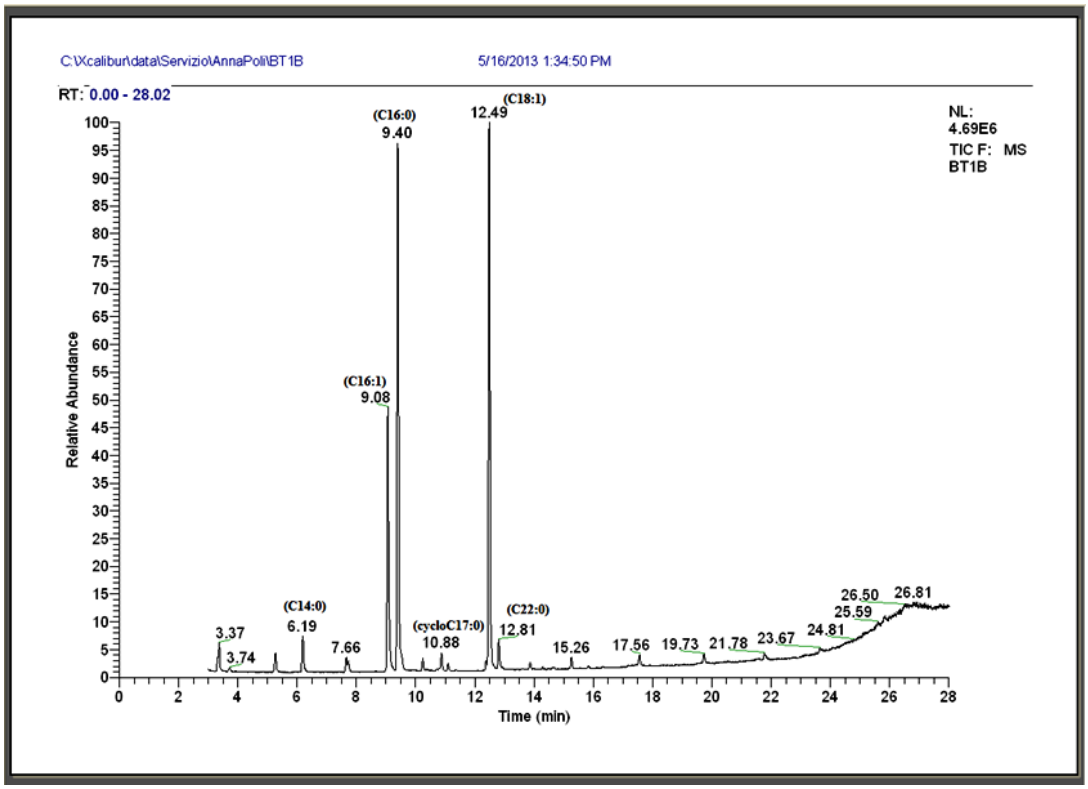
Şekil 4.131. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi)



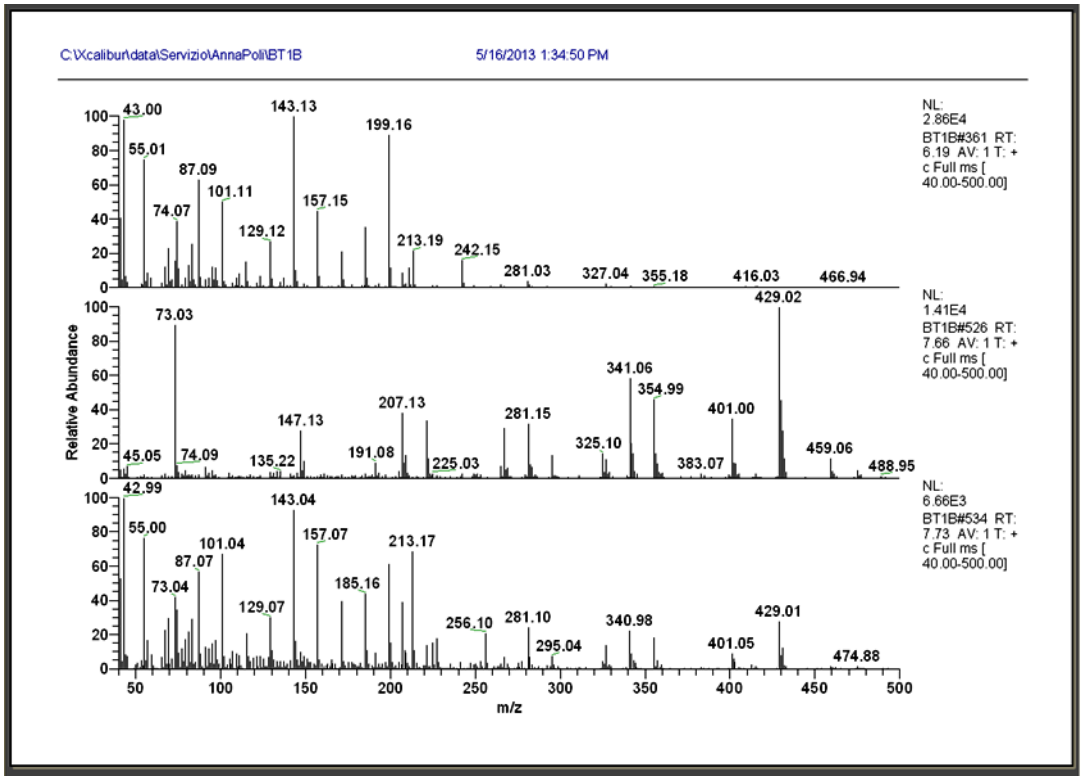
Şekil 4.132. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi)



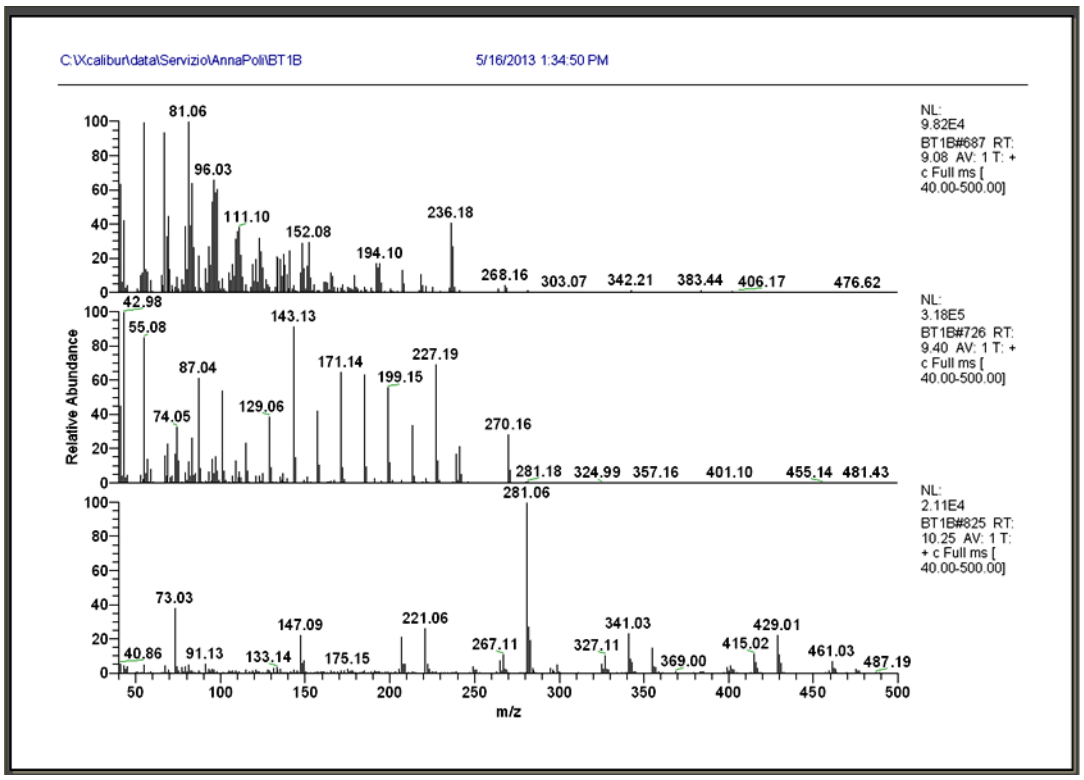
Şekil 4.133. GC2'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi)



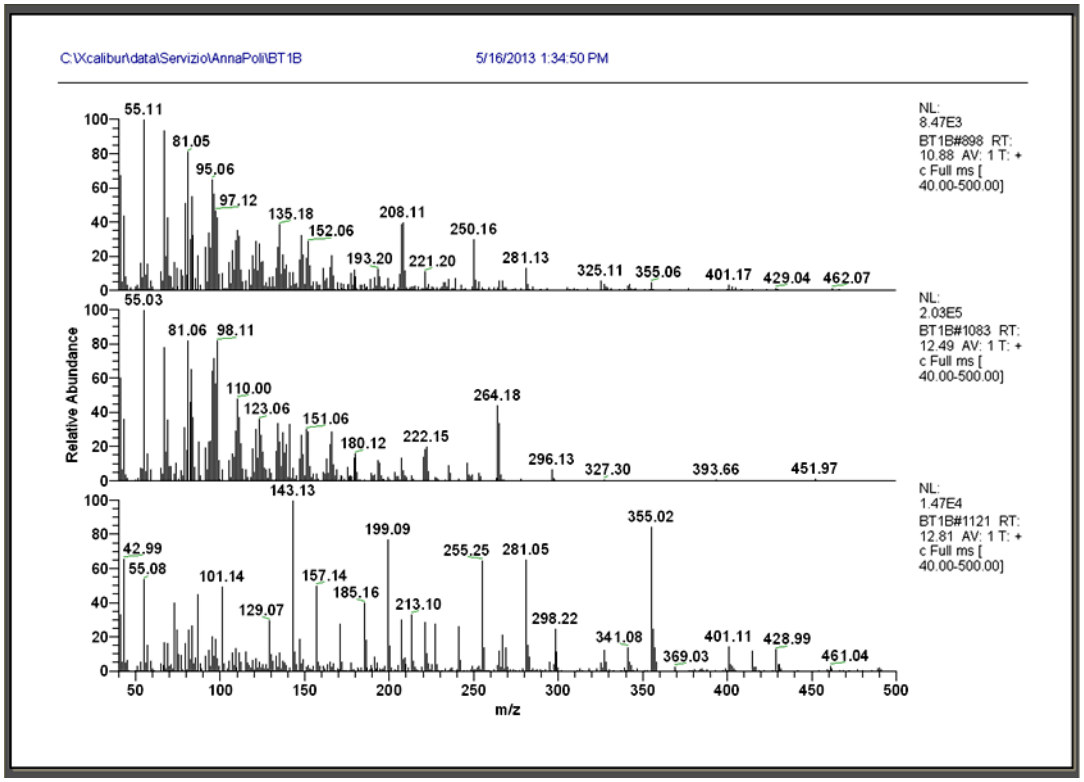
Şekil 4.134. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili)



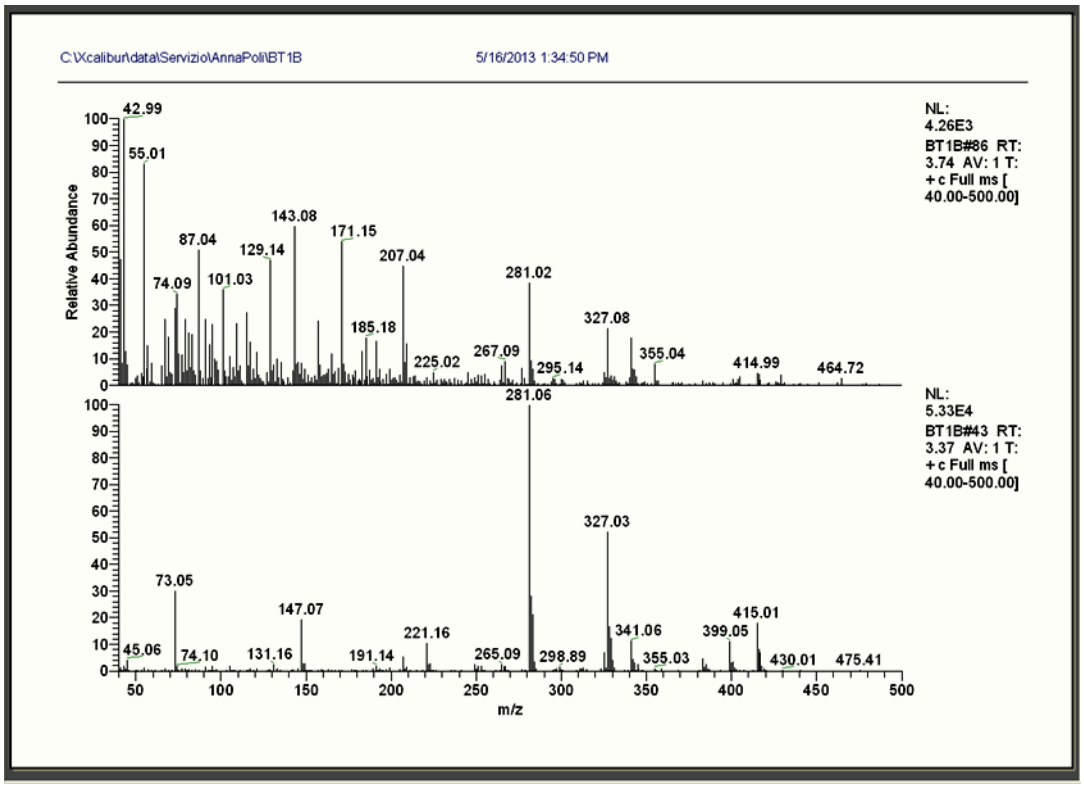
Şekil 4.135. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi)



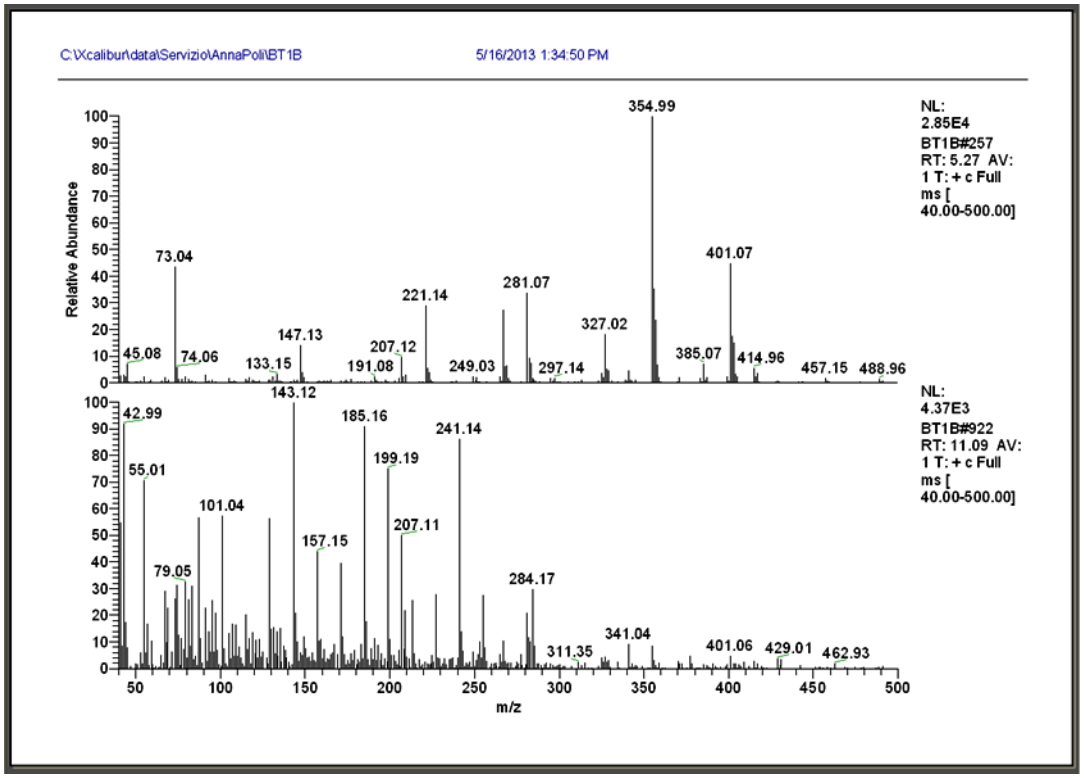
Şekil 4.136. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi)



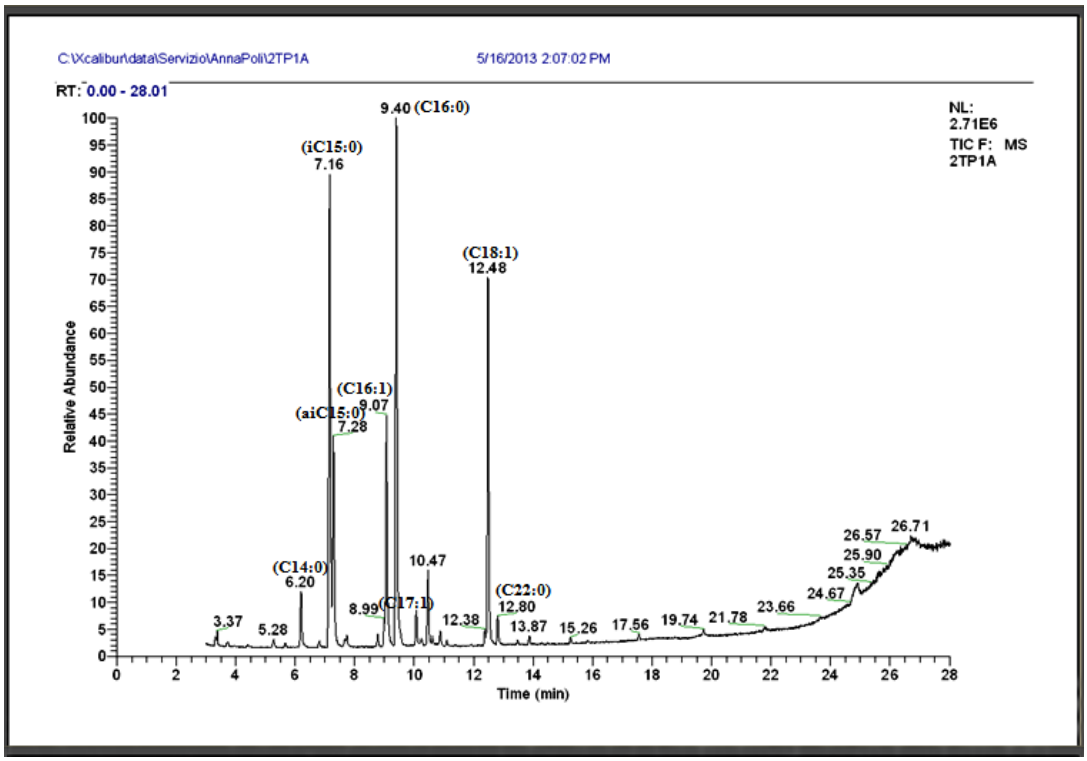
Şekil 4.137. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi)



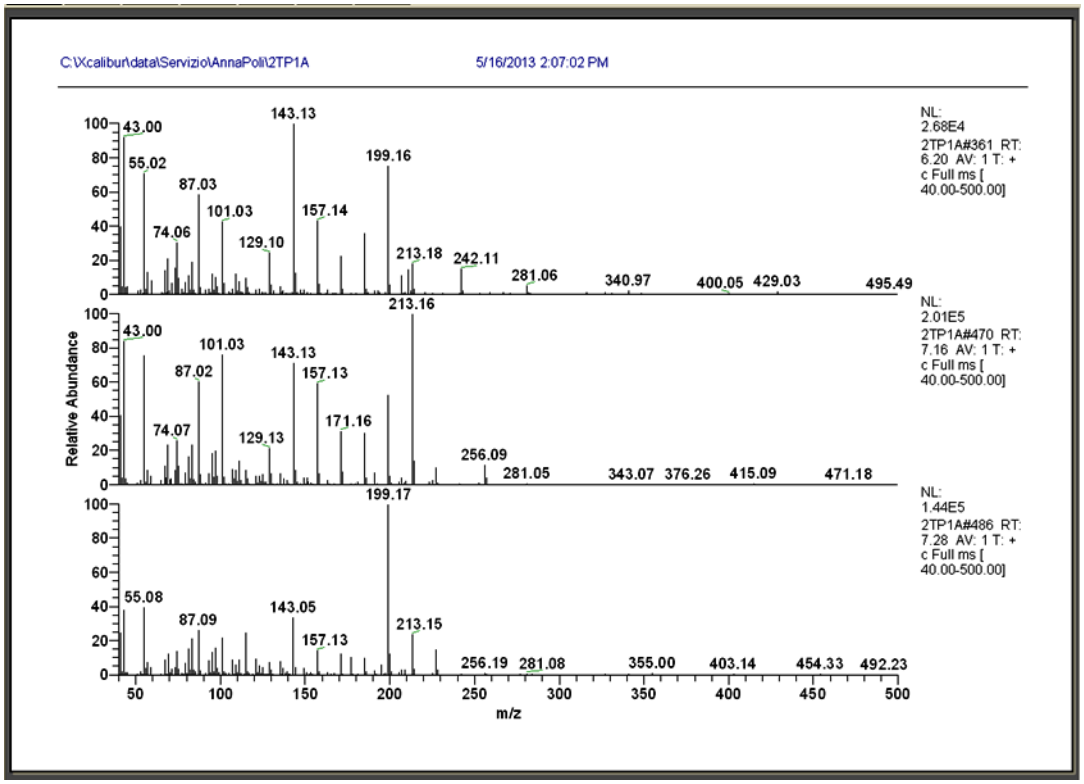
Şekil 4.138. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi)



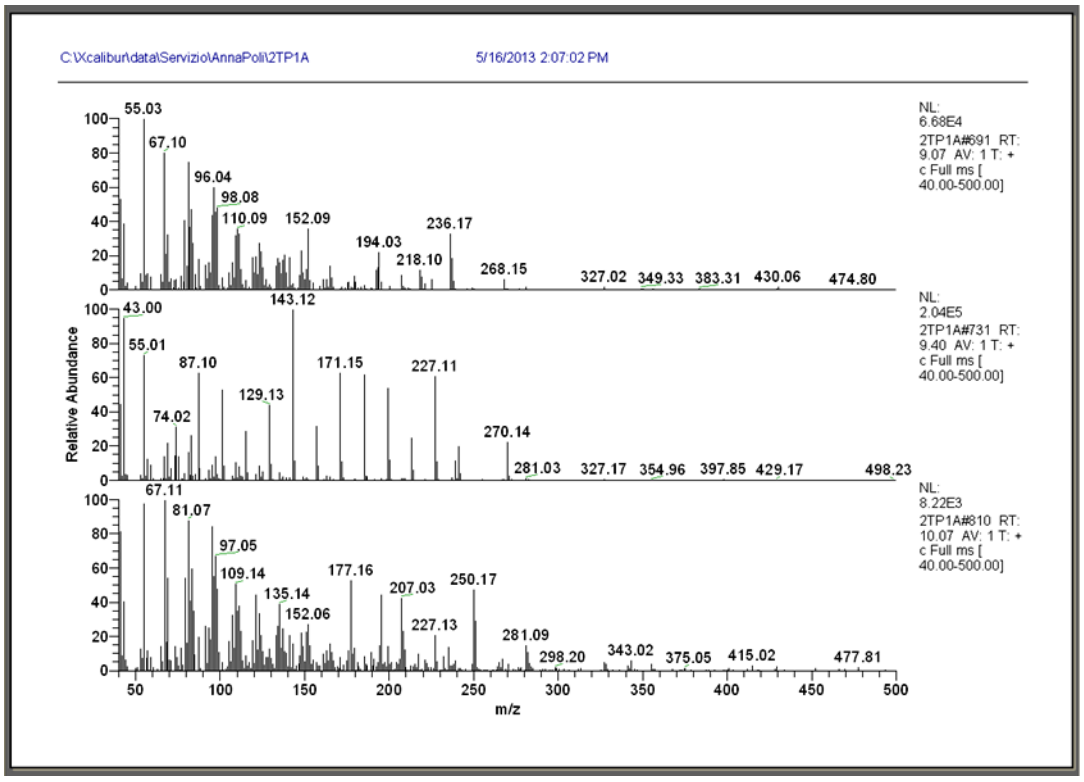
Şekil 4.139. BT1B'ye Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi)



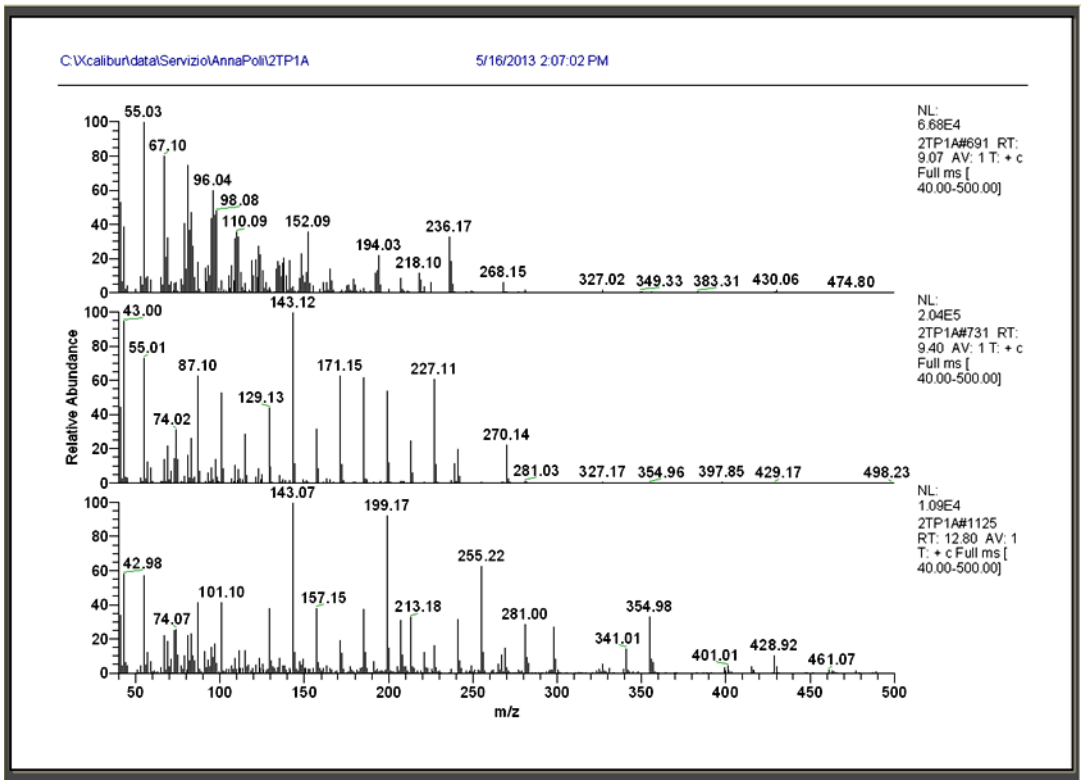
Şekil 4.140. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a: Total Fame Profili)



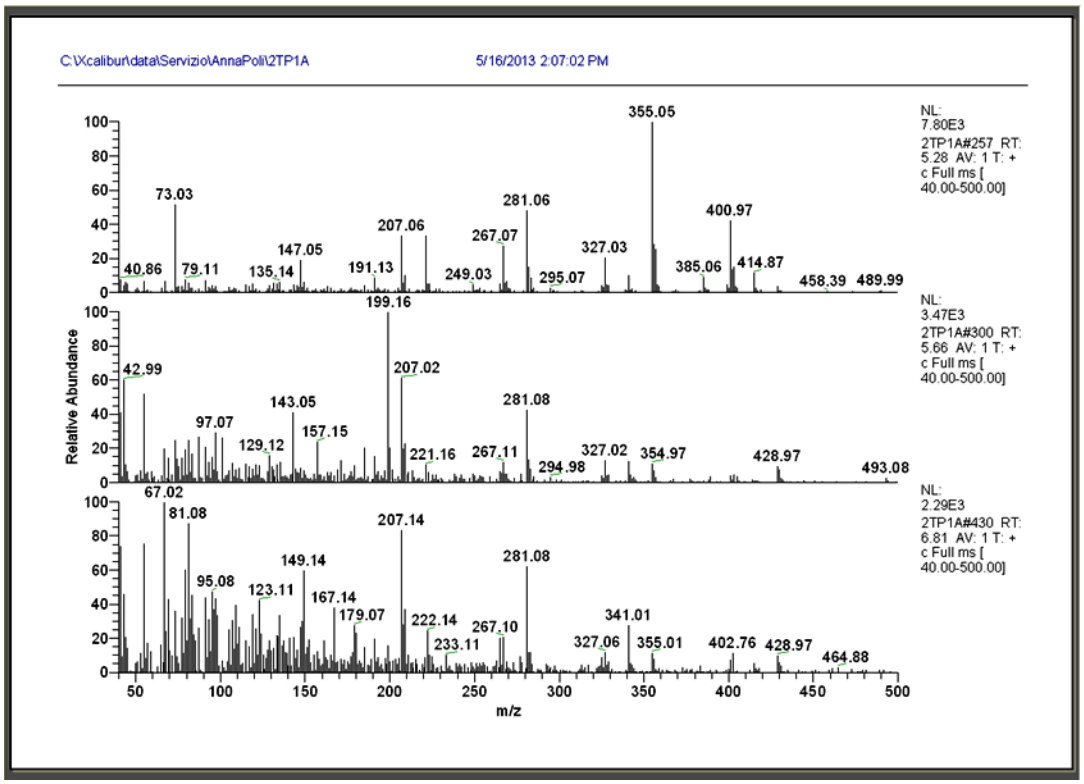
Şekil 4.141. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (b: Yağ Asidi Çeşidi)



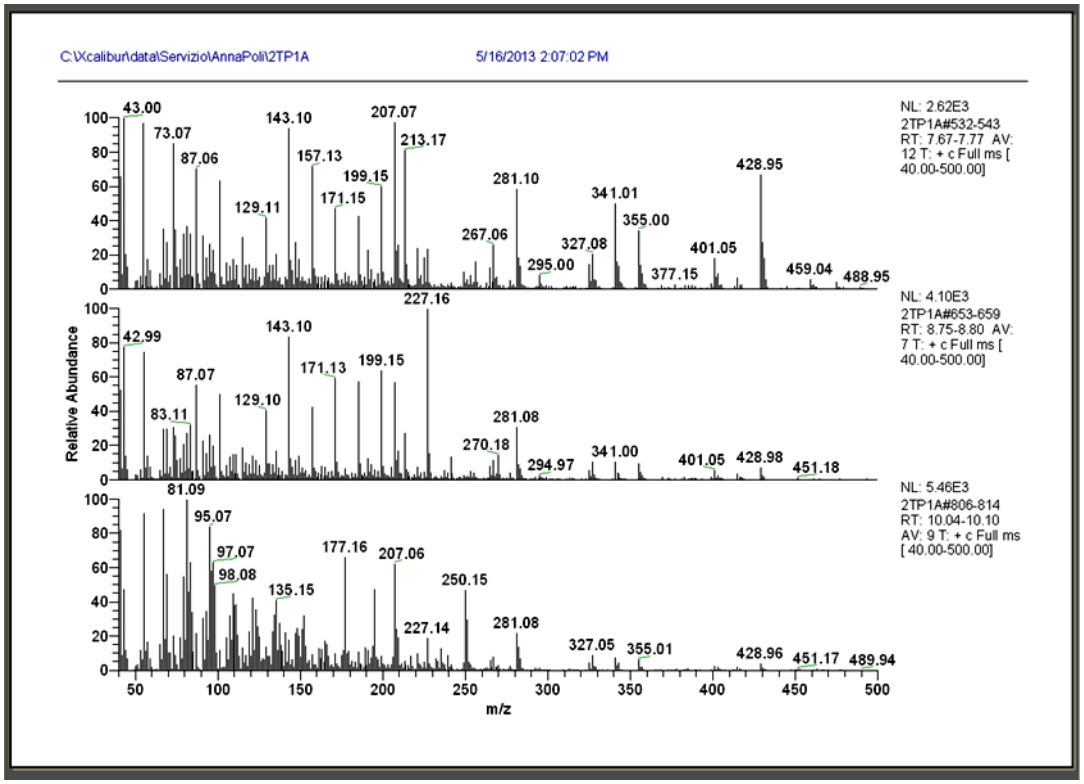
Şekil 4.142. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (c: Yağ Asidi Çeşidi)



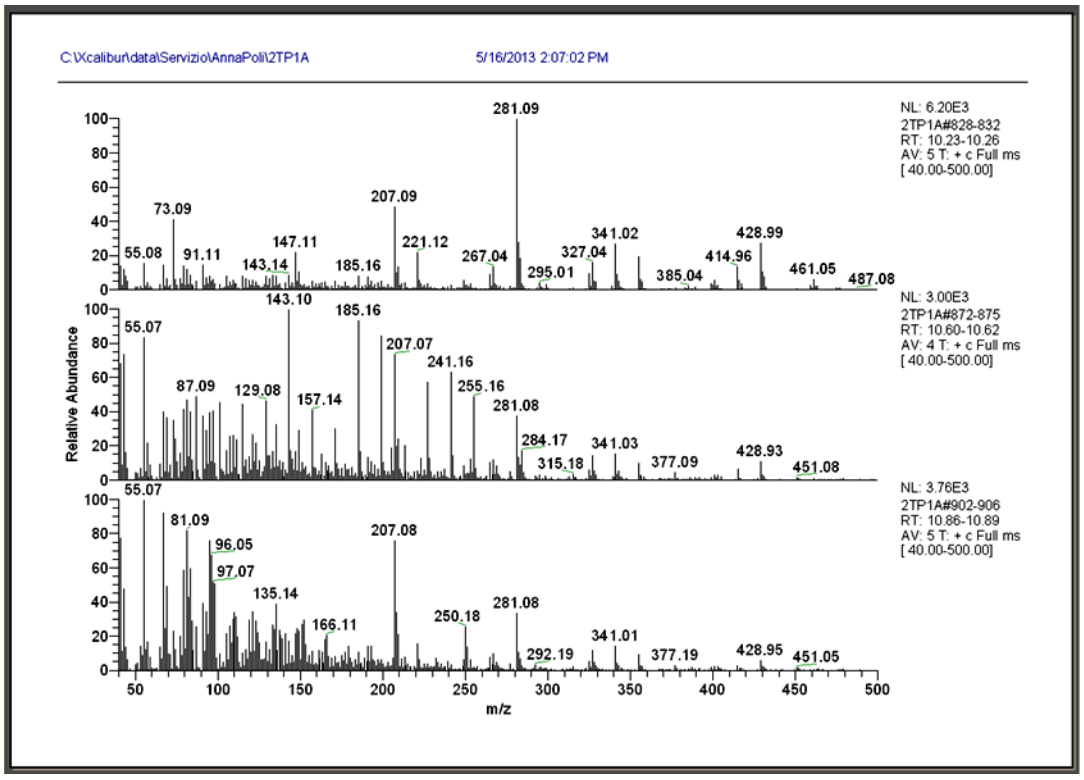
Şekil 4.143. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (d: Yağ Asidi Çeşidi)



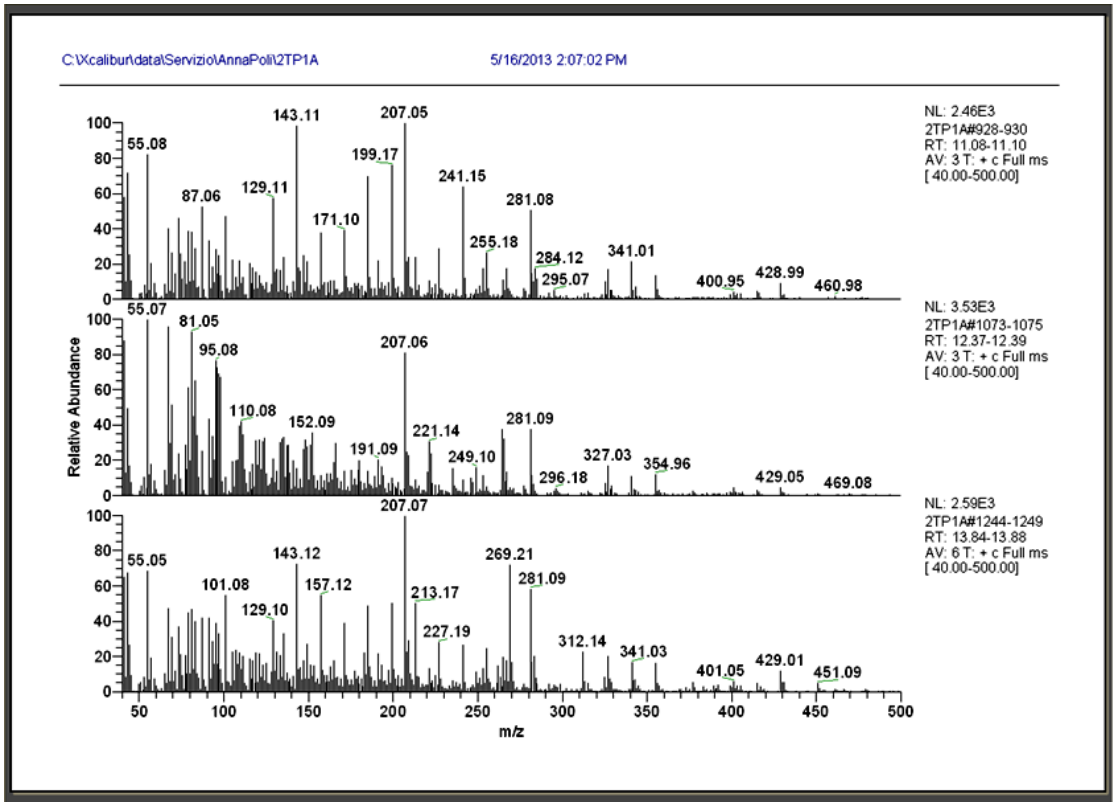
Şekil 4.144. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (e: Yağ Asidi Çeşidi)



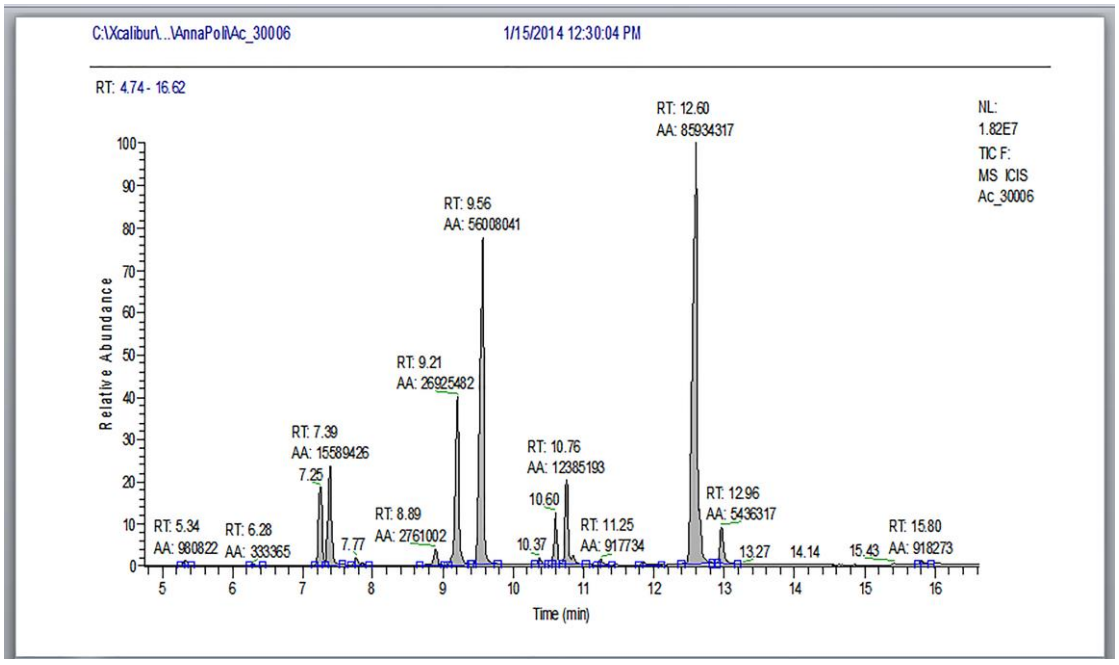
Şekil 4.145. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (f: Yağ Asidi Çeşidi)



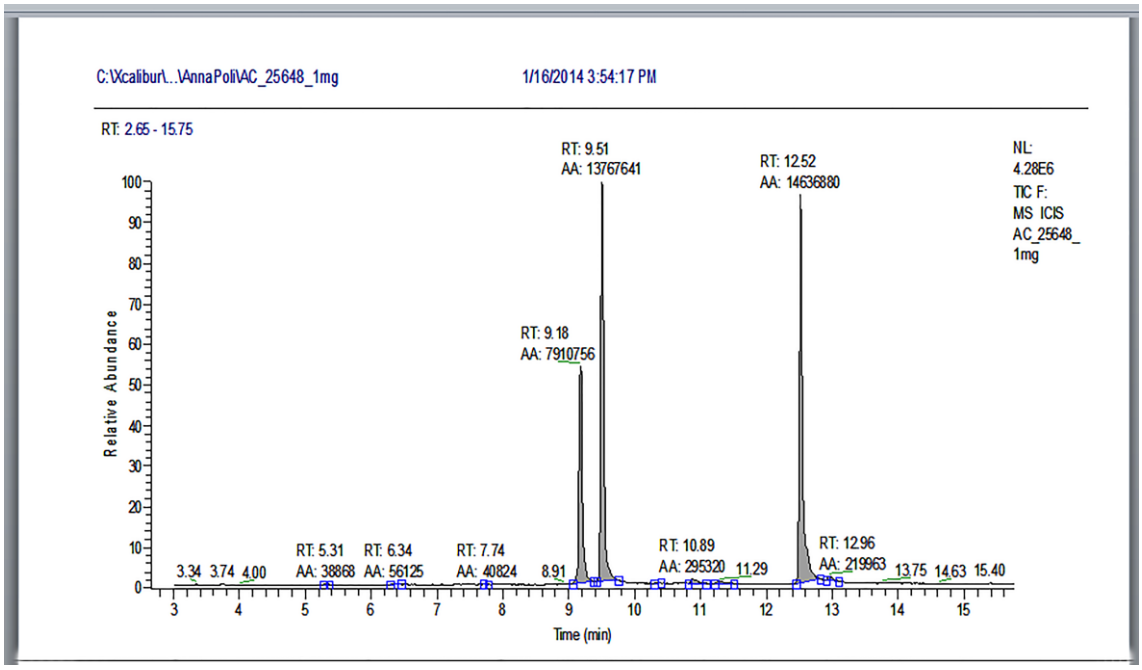
Şekil 4.146. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (g: Yağ Asidi Çeşidi)



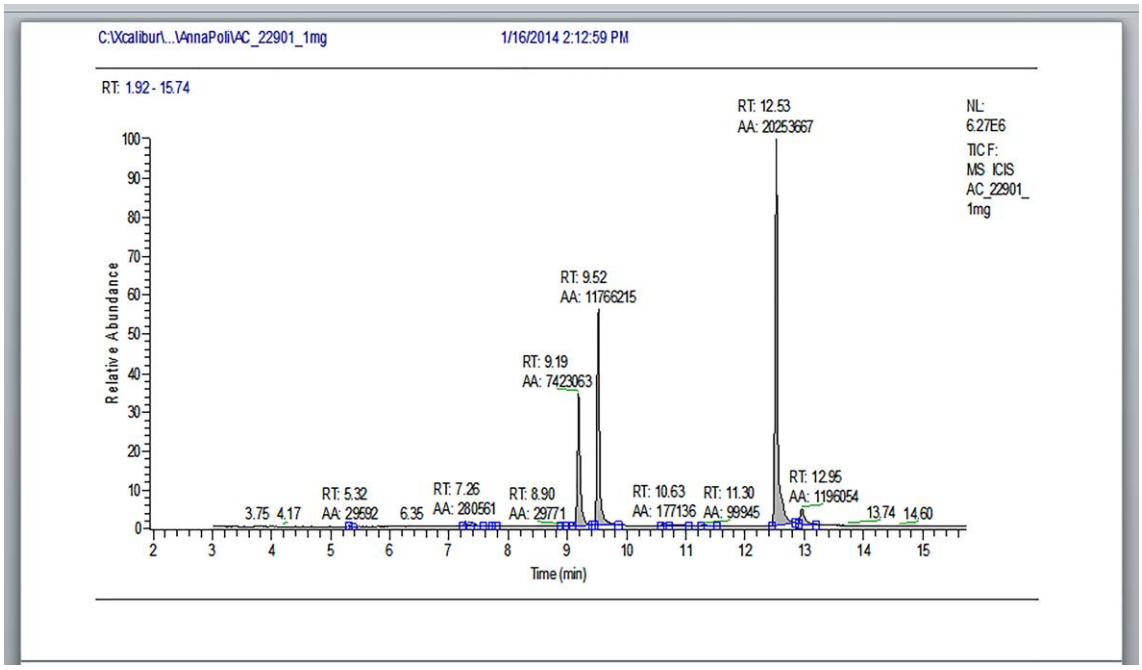
Şekil 4.147. 2TP1A'ya Ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (h: Yağ Asidi Çeşidi)



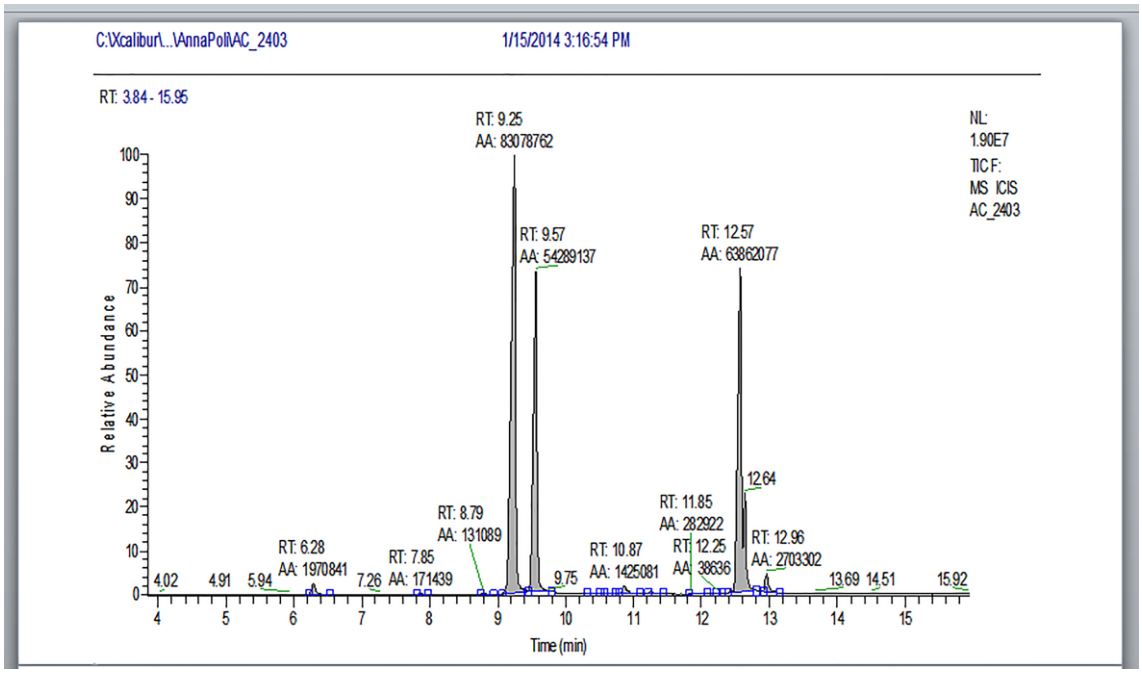
Şekil 4.148. *A. calcoaceticus* DSM 30006'nın Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu



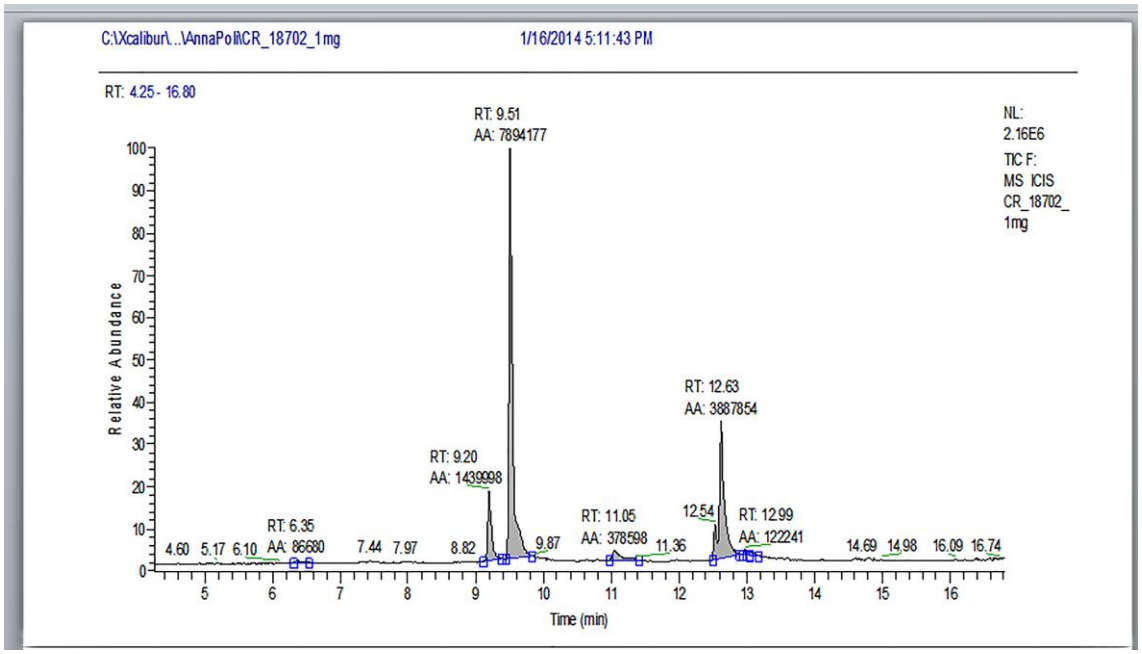
Şekil 4.149. *A. pittii* DSM 25618'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu



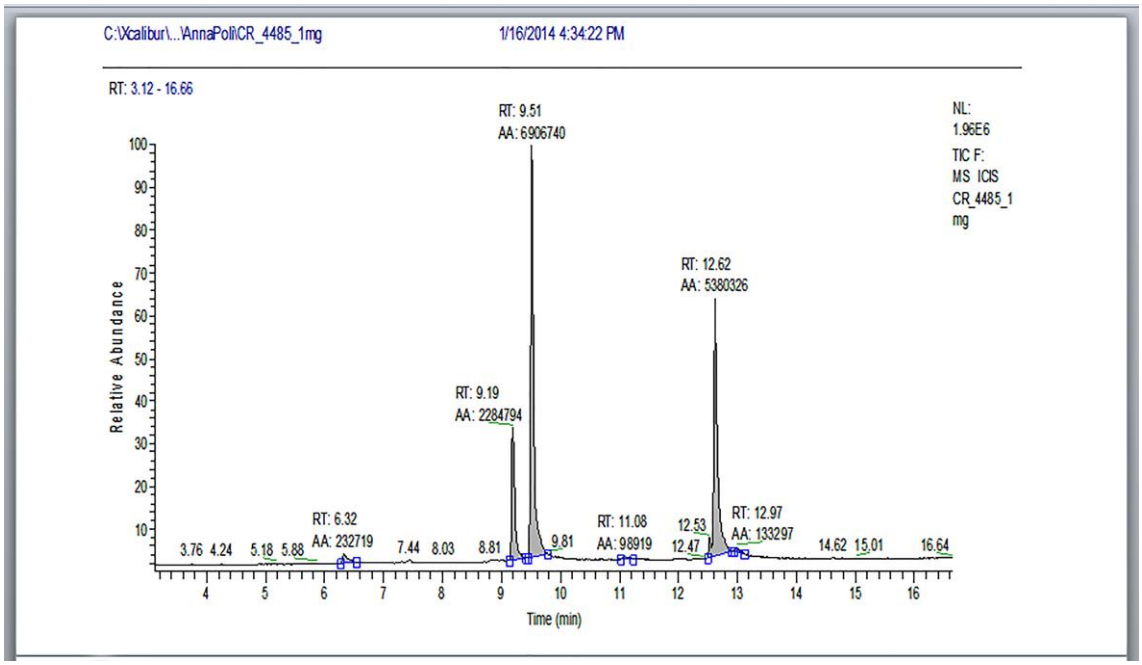
Şekil 4.150. *A. beijerinckii* DSM 22901'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu



Şekil 4.151. *A. lwoffi* DSM 2403'ün Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu



Şekil 4.152. *C. malonaticus* DSM 18702'nin Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu



Şekil 4.153. *C. sakazakii* DSM 4485'in Total Fame Profilini Gösteren GC-MS Spektrumu

Çizelge 4.5. ST5 ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri

Yağ Asidi	**ST5 % FAME**	***A. calcoaceticus* DSM 30006 % FAME**	***A. pittii* DSM 25618 % FAME**
C14:0	-	0.15	-
iC15:0	-	**6.1**	-
aiC15:0	-	**7.7**	-
C16:1	**22.02**	**13**	**21.56**
C16:0	**31.76**	**26.2**	**39.7**
iC17:0	-	**4.05**	-
aiC17:0	-	**6.5**	-
nC17:0	1.06	0.45	-
C17:1	2.6	-	-
C18:1	**41.56**	**32.5**	**38.62**
C18:0	1	2.85	0.41

i: iso, ai: anteiso, n: normal

Çizelge 4.6. GC2 ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri

Yağ Asidi	**GC2 % FAME**	***A. beijerinckii* DSM 22901 % FAME**	***A.lwoffii* DSM 2403 % FAME**
C14:0	1.91	-	1.03
iC15:0	**3.52**	-	-
aiC15:0	**1.41**	-	-
nC15:0	0.78	-	-
C16:1	**20.38**	**18.36**	**39.37**
C16:0	**36.51**	**28.72**	**28.87**
iC17:0	0.51	-	-
nC17:0	0.39	-	-
C18:1(C18:1ω9c: %24.8)	**32.49**	**51.6**	**29.12**
C18:0	2.11	1.94	1.62

i: iso, ai: anteiso, n: normal

Çizelge 4.7. BTB ve 16S rRNA Analizine Göre Kendisine Yakın Olan Diğer *Cronobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profilleri

Yağ Asidi	**BT1B % FAME**	***C. sakazakii* DSM 4485 % FAME**	***C. malonaticus* DSM 18701 % FAME**
C14:0	**2.3**	-	-
C16:1	**20.08**	**16.07**	**11.05**
C16:0	**37.44**	**50.31**	**65.25**
C17:0 cyclo	**1.06**	-	-
C17:0	-	0.38	1.51
C18:1	**36.98**	**31.46**	**21.34**
C18:0	-	0.65	0.85
C22:0	**2.14**	-	-

i: iso, ai: anteiso, n: normal cyclo: siklopropan

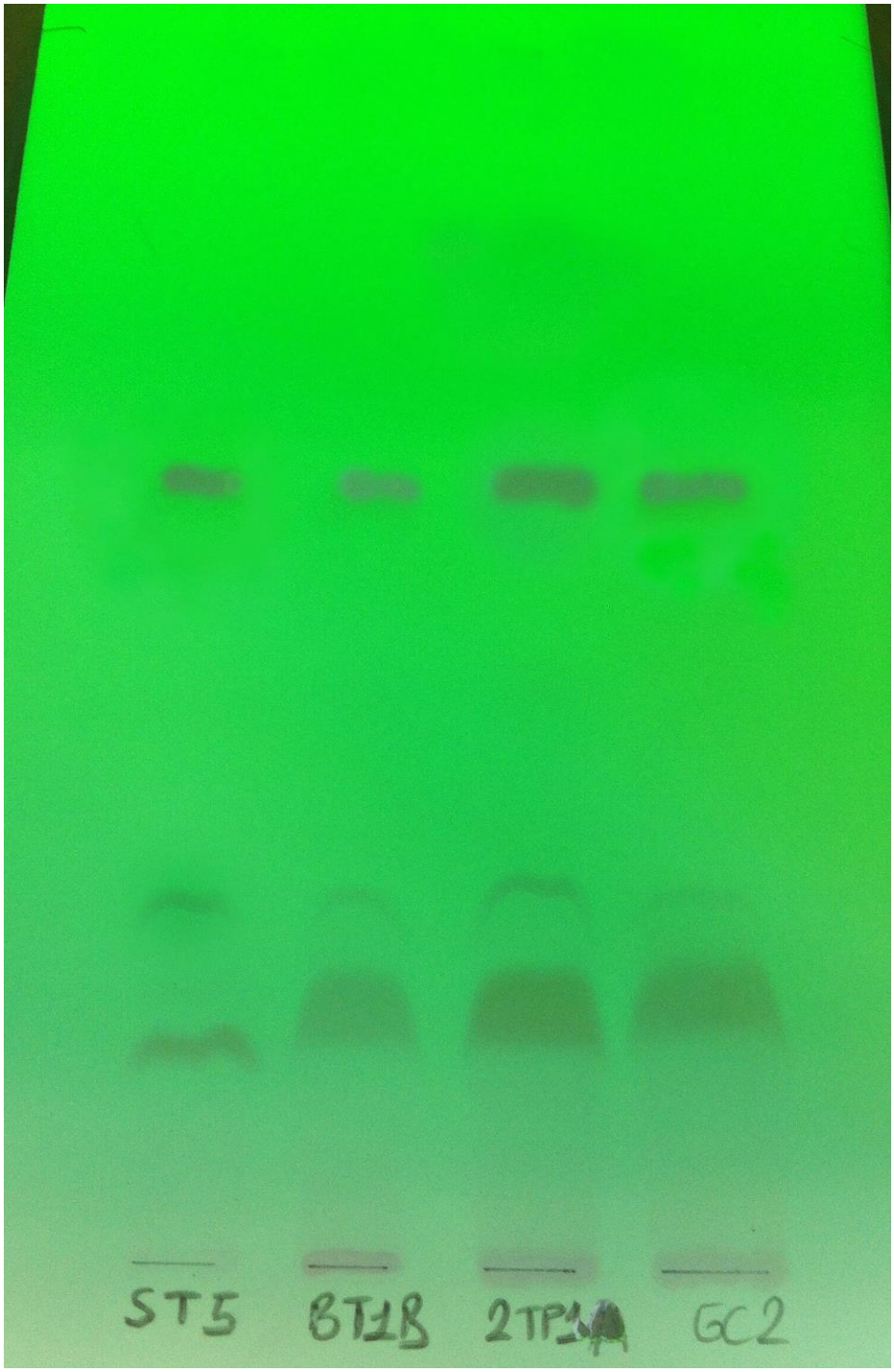
Çizelge 4.8. 2TP1A'ya Ait Yağ Asidi Profili

Yağ Asidi	**2TP1A**
	% FAME
C14:0	2.98
iC15:0	**23.76**
aiC15:0	8.58
C16:1	**10.67**
C16:0	**27.9**
C17:1	2.05
C18:1	**18.08**
C22:0	1.64

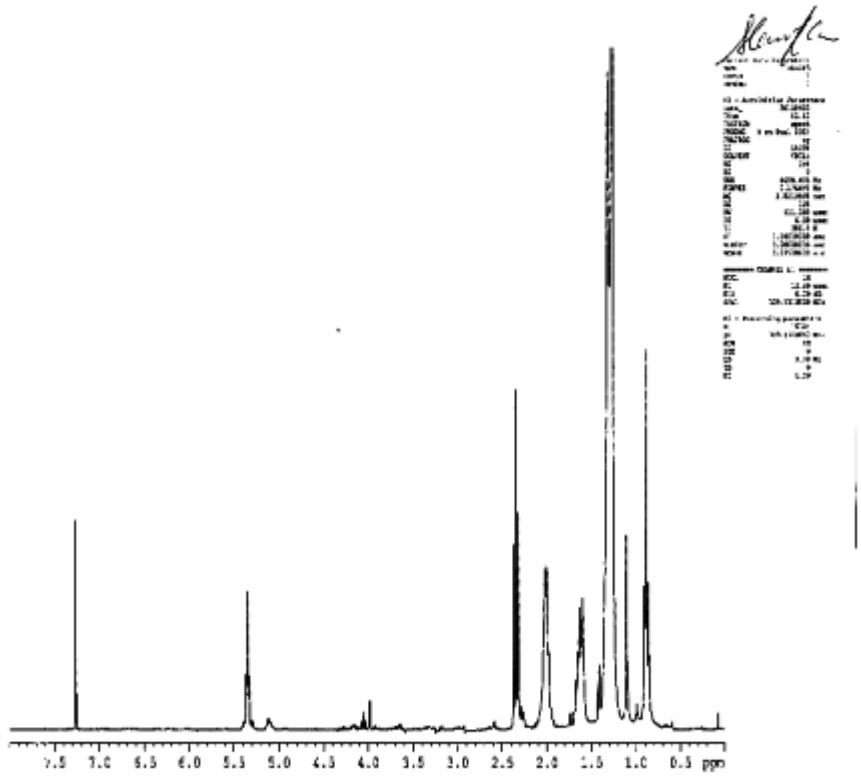
i: iso, ai: anteiso, n: normal

4.5.3. Kinon Analizi

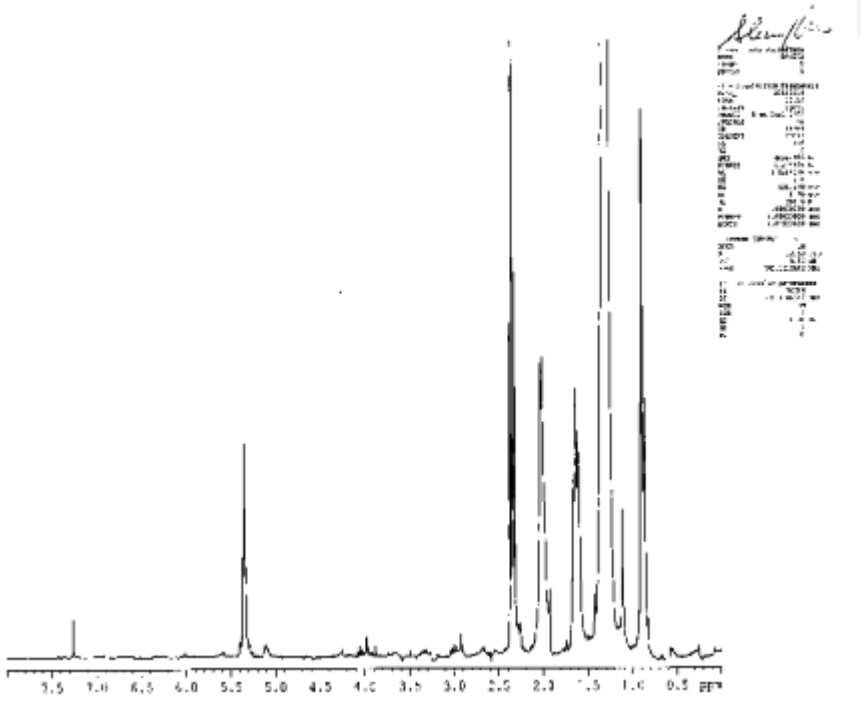
Tek yönlü TLC ile izolatların tek tip kinon içerdiği UV altında tespit edildi (Sekil 4.154). ^{1}H-NMR (300 MHz) kullanılarak izolatların içerdiği kinon tipleri tespit edildi. Analiz sonucunda bakterilerin UK tipi kinonlar içerdiği bulundu (Sekil 4.155-4.158). LC-MS ile izolatlara ait kinon tipinin izopren sayısı tespit edildi (Şekil 4.159-4-162). Yapılan analiz sonucunda ST5'in sahip olduğu kinon tipi Q-9, GC2, BT1B ve 2TP1A'nın sahip olduğu kinon tipi ise Q-8 olarak tespit edildi (Çizelge 4.9).



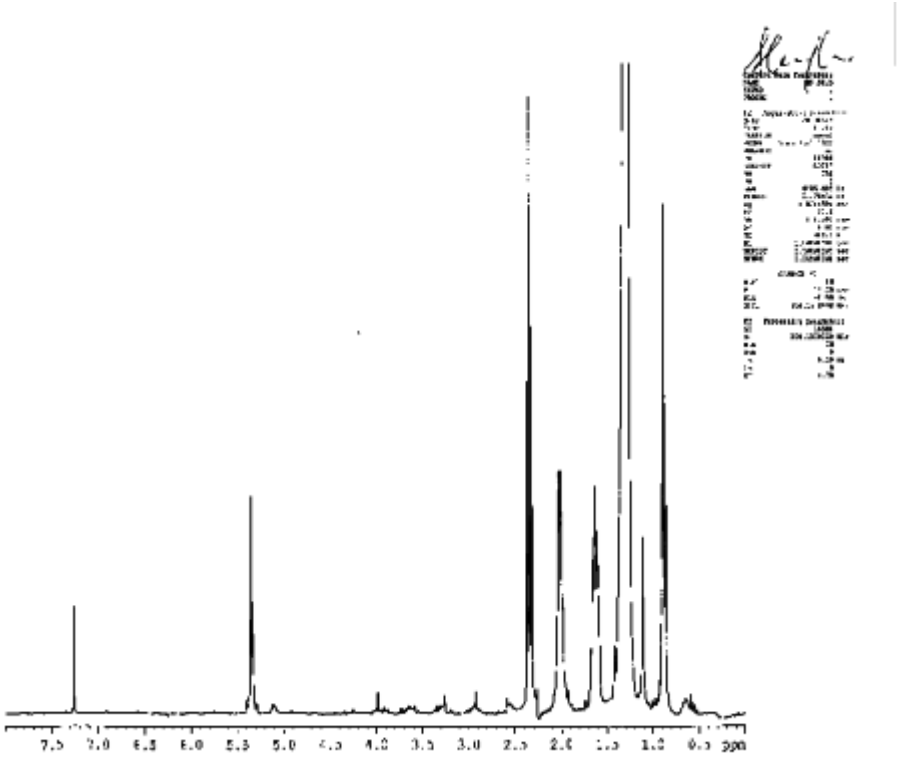
Şekil 4.154. İzolatların İçerdiği Kinonların tek yönlü TLC'de UV Altındaki Görüntüsü



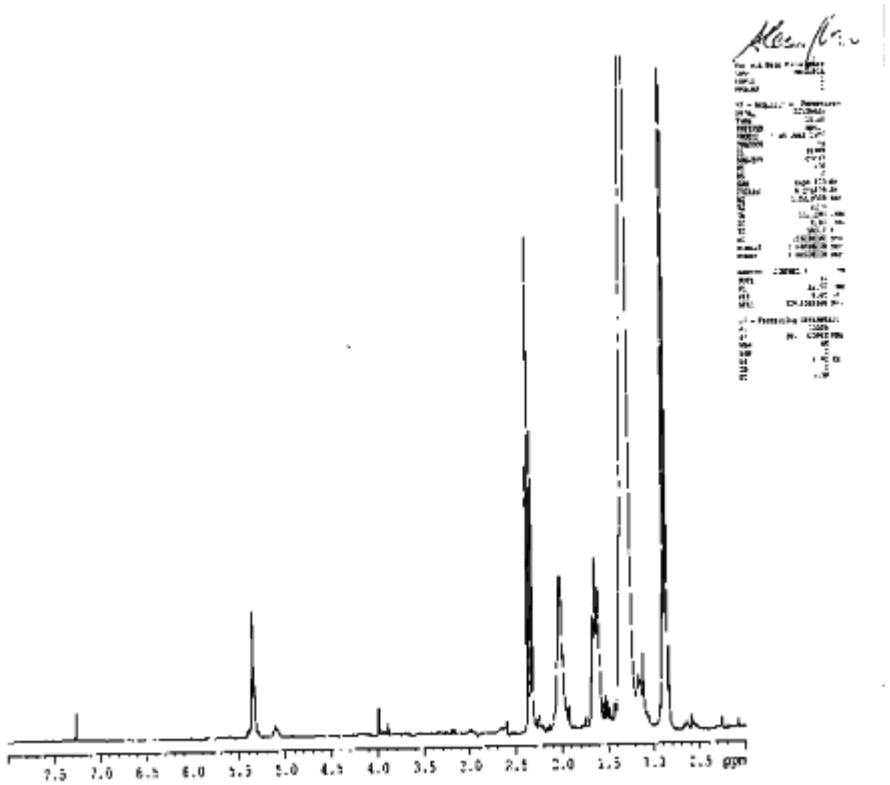
Şekil 4.155. ST5'in Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi



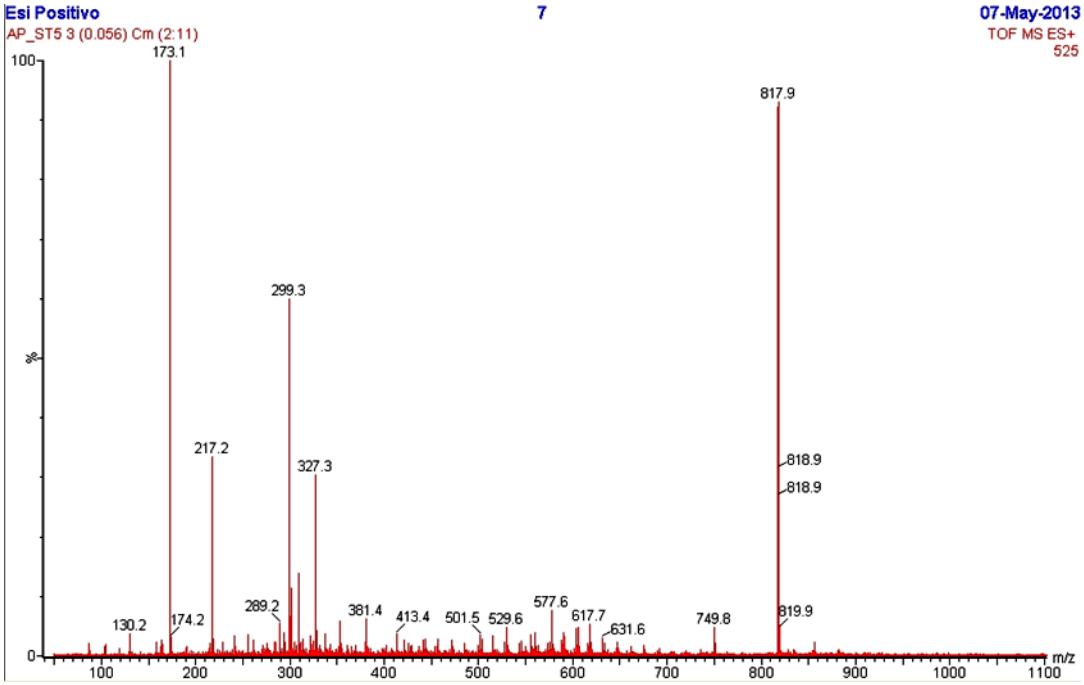
Şekil 4.156. GC2'nin Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi



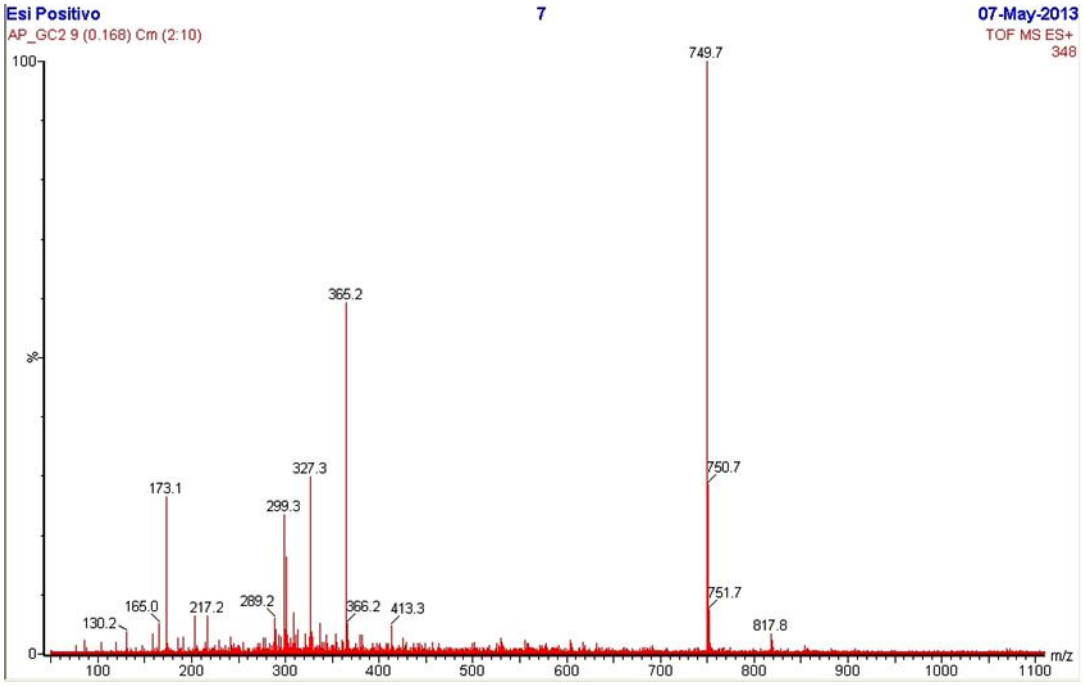
Şekil 4.157. BT1B'nin Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi



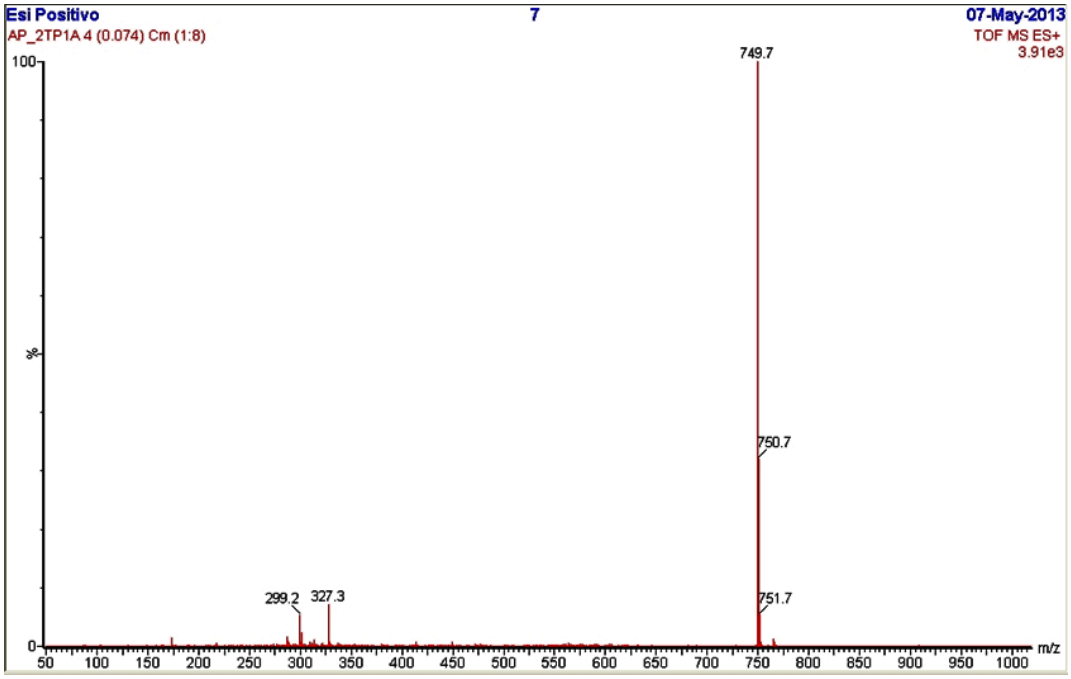
Şekil 4.158. 2TP1A'nın Kinon Tipinin ^{1}HNMR Analizi



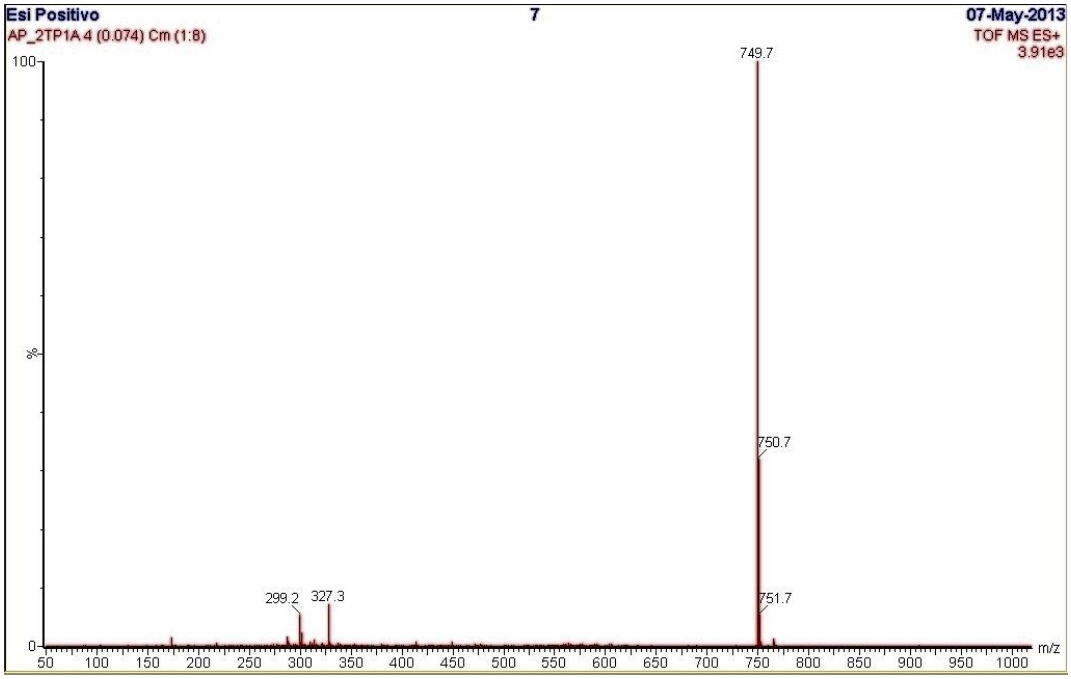
Şekil 4.159. ST5'e Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi



Şekil 4.160. GC2'ye Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi



Şekil 4.161. BT1B'ye Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi



Şekil 4.162. 2TP1A'ya Ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi

Çizelge 4.9. İzolatların ^{1}HNMR ve LC-MS Analizleri Sonucu Tespit Edilen Kinon Sistemleri

İzolatlar	**ST5**	**GC2**	**BT1B**	**2TP1A**
Kinon Sistemleri	Q-9	Q-8	Q-8	Q-8

4.6. 16S rRNA Gen Dizi Analizine Göre İzolatların Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi

16S rRNA dizi analizi ile ST5'in 1523, GC2'nin 1516, BT1B ve 2TP1A'nın 1525, ve BT1A'nın ise 500 nükleotitlik gen dizisi Almanya'daki DSMZ'de tespit edildi (Çizelge 4.10-4.13). Bakterilerin filogenetik pozisyonlarını belirlemek için tespit edilen 16S rRNA gen dizileri gen bankasında (EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute) mevcut olan diğer bakterilere ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı.

Çizelge 4.10. ST5'in 1523 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```
   1 TTTGATCCTG GCTCAGATTG AACGCTGGCG GCAGGCTTAA CACATGCAAG TCGAGCGGGG
  61 TGATGGTGCT TGCACTATCA CCTAGCGGCG GACGGGTGAG TAATGCTTAG GAATCTGCCT
 121 ATTAGTGGGG GACAACATTT CGAAAGGAAT GCTAATACCG CATACGTCCT ACGGGAGAAA
 181 GCAGGGGATC TTCGGACCTT GCGCTAATAG ATGAGCCTAA GTCGGATTAG CTAGTTGGTG
 241 GGGTAAAGGC CTACCAAGGC GACGATCTGT AGCGGGTCTG AGAGGATGAT CCGCCACACT
 301 GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG
 361 GCGCAAGCCT GATCCAGCCA TGCCGCGTGT GTGAAGAAGG CCTTATGGTT GTAAAGCACT
 421 TTAAGCGAGG AGGAGGCTAC TTTAGATAAT ACCTAGAGAT AGTGGACGTT ACTCGCAGAA
 481 TAAGCACCGG CTAACTCTGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC AGAGGGTGCA AGCGTTAATC
 541 GGATTTACTG GGCGTAAAGC GCGCGTAGGC GGCTAATTAA GTCAAATGTG AAATCCCCGA
 601 GCTTAACTTG GGAATTGCAT TCGATACTGG TTAGCTAGAG TGTGGGAGAG GATGGTAGAA
 661 TTCCAGGTGT AGCGGTGAAA TGCGTAGAGA TCTGGAGGAA TACCGATGGC GAAGGCAGCC
 721 ATCTGGCCTA ACACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCATGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC
 781 CTGGTAGTCC ATGCCGTAAA CGATGTCTAC TAGCCGTTGG GGCCTTTGAG GCTTTAGTGG
 841 CGCAGCTAAC GCGATAAGTA GACCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGACTA AAACTCAAAT
 901 GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGATG CAACGCGAAG
 961 AACCTTACCT GGCCTTGACA TAGTAAGAAC TTTCCAGAGA TGGATTGGTG CCTTCGGGAA
1021 CTTACATACA GGTGCTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC
1081 CCGCAACGAG CGCAACCCTT TTCCTTATTT GCCAGCGAGT AATGTCGGGA ACTTTAAGGA
1141 TACTGCCAGT GACAAACTGG AGGAAGGCGG GGACGACGTC AAGTCATCAT GGCCCTTACG
1201 GCCAGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGTCG GTACAAAGGG TTGCTACCTA GCGATAGGAT
1261 GCTAATCTCA AAAAGCCGAT CGTAGTCCGG ATTGGAGTCT GCAACTCGAC TCCATGAAGT
1321 CGGAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGAATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
1381 ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTTGTT GCACCAGAAG TAGCTAGCCT AACTGCAAAG
1441 AGGGCGGTTA CCACGGTGTG GCCGATGACT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG TAGCCGTAGG
1501 GGAACCTGCG GCTGGATCAC CTC
```

Çizelge 4.11. GC2'nin 1516 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```
   1 TGGCTCAGAT TGAACGCTGG CGGCAGGCTT AACACATGCA AGTCGAGCGG GGAAAAGTAG
  61 CTTGCTACTT TACCTAGCGG CGGACGGGTG AGTAATGCTT AGGAATCTGC CTATTAGTGG
 121 GGGACAACAT CTCGAAAGGG ATGCTAATAC CGCATACGTC CTACGGGAGA AAGCAGGGGA
 181 CCTTCGGGCC TTGCGCTAAT AGATGAGCCT AAGTCGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
 241 GCCTACCAAG GCGACGATCT GTAGCGGGTC TGAGAGGATG ATCCGCCACA CTGGGACTGA
 301 GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGGACAAT GGGGGGAACC
 361 CTGATCCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTTTGG TTGTAAAGCA CTTTAAGCGA
 421 GGAGGAGGCT ACCGAGATTA ATACTCTTGG ATAGTGGACG TTACTCGCAG AATAAGCACC
 481 GGCTAACTCT GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACAGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGATTTAC
 541 TGGGCGTAAA GCGCGCGTAG GTGGCCAATT AAGTCAAATG TGAAATCCCC GAGCTTAACT
 601 TGGGAATTGC ATTCGATACT GGTTGGCTAG AGTATGGGAG AGGATGGTAG AATTCCAGGT
 661 GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATCTGGAGG AATACCGATG GCGAAGGCAG CCATCTGGCC
 721 TAATACTGAC ACTGAGGTGC GAAAGCATGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT
 781 CCATGCCGTA AACGATGTCT ACTAGCCGTT GGGGCCTTTG AGGCTTTAGT GGCGCAGCTA
 841 ACGCGATAAG TAGACCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC TAAAACTCAA ATGAATTGAC
 901 GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA TGCAACGCGA AGAACCTTAC
 961 CTGGTCTTGA CATAGTAAGA ACTTTCCAGA GATGGATTGG TGCCTTCGGG AACTTACATA
1021 CAGGTGCTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG
1081 AGCGCAACCC TTTTCCTTAT TTGCCAGCGG GTTAAGCCGG GAACTTTAAG GATACTGCCA
1141 GTGACAAACT GGAGGAAGGC GGGGACGACG TCAAGTCATC ATGGCCCTTA CGACCAGGGC
1201 TACACACGTG CTACAATGGT CGGTACAAAG GGTTGCTACC TCGCGAGAGG ATGCTAATCT
1261 CAAAAAGCCG ATCGTAGTCC GGATTGGAGT CTGCAACTCG ACTCCATGAA GTCGGAATCG
1321 CTAGTAATCG CGGATCAGAA TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
1381 CGTCACACCA TGGGAGTTTG TTGCACCAGA AGTAGGTAGT CTAACCTTAG GGGGGACGCT
1441 TACCACGGTG TGGCAGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA GGGGAACCTG
1501 CGGCTGGATC ACCCCT
```

Çizelge 4.12. BT1B'nin 1525 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

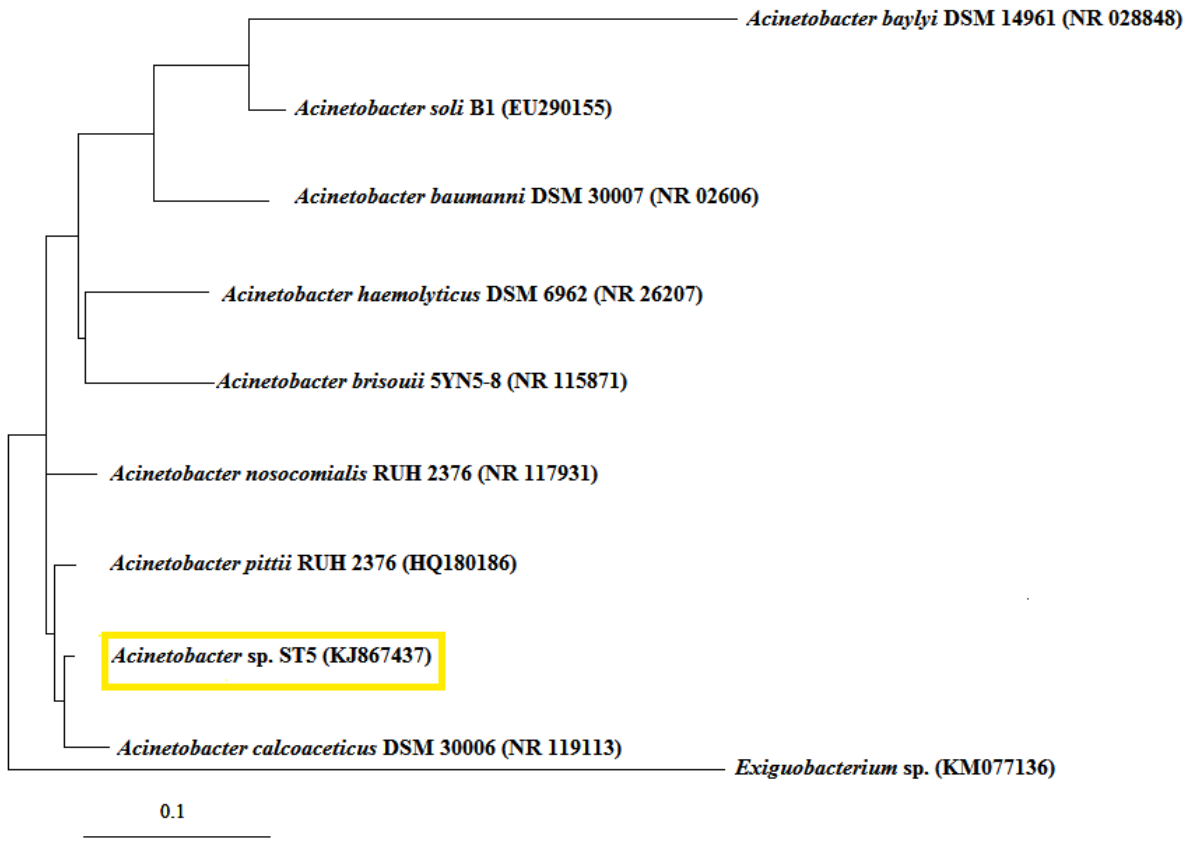
```
   1 ATCCTGGCTC AGATTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA TGCAAGTCGA ACGGTAACAG
  61 GGAGCAGCTT GCTGCTCTGC TGACGAGTGG CGGACGGGTG AGTAATGTCT GGGAAACTGC
 121 CTGATGGAGG GGGATAACTA CTGGAAACGG TAGCTAATAC CGCATAACGT CTTCGGACCA
 181 AAGTGGGGGA CCTTCGGGCC TCATGCCATC AGATGTGCCC AGATGGGATT AGCTAGTAGG
 241 TGAGGTAACG GCTCACCTAG GCGACGATCC CTAGCTGGTC TGAGAGGATG ACCAGCCACA
 301 CTGGAACTGA GACACGGTCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT
 361 GGGCGCAAGC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTATGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGTA
 421 CTTTCAGCGG GGAGGAAGGY GKTGWGGTTA ATAACCNYAK CRATTGACGT TACCCGCAGA
 481 AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC AAGCGTTAAT
 541 CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCACGCAGG CGGTYKRTTA AGTCAGATGT GAAATCCCCG
 601 GGCTCAACCT GGGAACTGCA TTTGAAACTG GCAGGCTTGA GTCTCGTAGA GGGGGGTAGA
 661 ATTCCAGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATCTGGAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC
 721 CCCCTGGACG AAGACTGACG CTCAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC
 781 CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGTCGA CTTGGAGGTT GTGCCCTTGA GGCGTGGCTT
 841 CCGGAGCTAA CGCGTTAAGT CGACCGCCTG GGGAGTACGG CCGCAAGGTT AAAACTCAAA
 901 TGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAT GCAACGCGAA
 961 GAACCTTACC TGGTCTTGAC ATCCAGAGAA TCCTGCAGAG ATGCGGGAGT GCCTTCGGGA
1021 ACTCTGAGAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT TGTGAAATGT TGGGTTAAGT
1081 CCCGCAACGA GCGCAACCCT TATCCTTTGT TGCCAGCGGT TCGGCCGGGA ACTCAAAGGA
1141 GACTGCCGGT GATAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCATCAT GGCCCTTACG
1201 ACCAGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGC ATACAAAGAG AAGCGACCTC GCGAGAGCAA
1261 GCGGACCTCA TAAAGTGCGT CGTAGTCCGG ATTGGAGTCT GCAACTCGAC TCCATGAAGT
1321 CGGAATCGCT AGTAATCGTG GATCAGAATG CCACGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
1381 ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTGGGTT GCAAAAGAAG TAGGTAGCTT AACCTTCGGG
1441 AGGGCGCTTA CCACTTTGTG ATTCATGACT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG TAACCGTAGG
1501 GGAACCTGCG GCTGGATCAC CTCCT
```

Çizelge 4.13. 2TP1A'nın 1525 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```
   1 CTGGCTCAGA GTGAACGCTG GCGGTAGGCC TAACACATGC AAGTCGAACG GCAGCACAGG
  61 AGAGCTTGCT CTCTGGGTGG CGAGTGGCGG ACGGGTGAGG AATACATCGG AATCTACTCT
 121 GTCGTGGGGG ATAACGTAGG GAAACTTACG CTAATACCGC ATACGACCTA CGGGTGAAAG
 181 CAGGGGACCT TCGGGCCTTG CGCGATTGAA TGAGCCGATG TCGGATTAGC TAGTTGGCGG
 241 GGTAAAGGCC CACCAAGGCG ACGATCCGTA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACACTG
 301 GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG
 361 CGCAAGCCTG ATCCAGCCAT ACCGCGTGGG TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGCCCTT
 421 TTGTTGGGAA AGAAATCCAG CTGGCTAATA CCCGGTTGGG ATGACGGTAC CCAAAGAATA
 481 AGCACCGGCT AACTTCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGA AGGGTGCAAG CGTTACTCGG
 541 AATTACTGGG CGTAAAGCGT GCGTAGGTGG TTATTTAAGT CCGTTGTGAA AGCCCTGGGC
 601 TCAACCTGGG AACTGCAGTG GATACTGGAT GACTAGAATG TGGTAGAGGG TAGCGGAATT
 661 CCTGGTGTAG CAGTGAAATG CGTAGAGATC AGGAGGAACA TCCATGGCGA AGGCAGCTAC
 721 CTGGACCAAC ATTGACACTG AGGCACGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT
 781 GGTAGTCCAC GCCCTAAACG ATGCGAACTG GATGTTGGGT GCAATTTGGC ACGCAGTATC
 841 GAAGCTAACG CGTTAAGTTC GCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGACTGA AACTCAAAGG
 901 AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTT AATTCGATGC AACGCGAAGA
 961 ACCTTACCTG GCCTTGACAT GTCGAGAACT TTCCAGAGAT GGATGGGTGC CTTCGGGAAC
1021 TCGAACACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC
1081 CGCAACGAGC GCAACCCTTG TCCTTAGTTG CCAGCACGTA ATGGTGGGAA CTCTAAGGAG
1141 ACCGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCATCATG GCCCTTACGG
1201 CCAGGGCTAC ACACGTACTA CAATGGTAGG GACAGAGGGC TGCAAGCCGG CGACGGTAAG
1261 CCAATCCCAG AAACCCTATC TCAGTCCGGA TTGGAGTCTG CAACTCGACT CCATGAAGTC
1321 GGAATCGCTA GTAATCGCAG ATCAGCATTG CTGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
1381 ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTTGTT GCACCAGAAG CAGGTAGCTT AACCTTCGGG
1441 AGGGCGCTTG CCACGGTGTG GCCGATGACT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG TAGCCGTATC
1501 GGAAGGTGCG GCTGGATCAC CTCCT
```

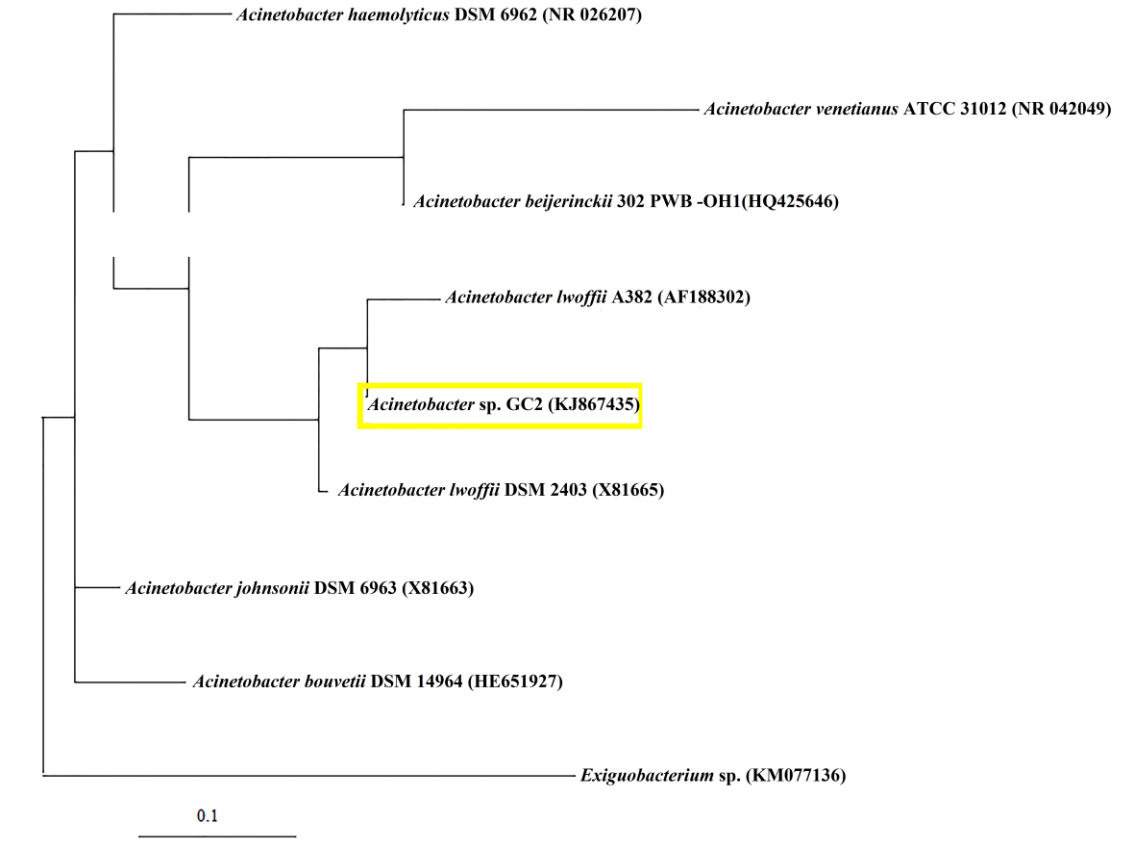
İzolatların tespit edilen 16S rRNA gen dizileri, gen bankasında (EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute) mevcut olan diğer mikroorganizmalara ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. ST5'in tespit edilen 1523 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre, %99.5 oranında *A. pittii* DSM RUH 2206^{T} ve *A. calcoaceticus* DSM 30006^{T} ile, GC2'nin tespit edilen 1516 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizine göre %99.9 oranında *A. lwoffii* DSM 2403^{T} ve %98.2 oranında *A. beijerinckii* CCUG 51249^{T} ile, BT1B'nin tespit edilen 1525 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizi sonucu %99.7 oranında *C. malonaticus* DSM 18702^{T} ve *C. sakazakii* ATCC 29544^{T} ile, 2TP1A'nın tespit edilen 1525 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizi sonucunda %99.8 oranında *S. maltophilia* (*Pseudomonas beteli*) ATCC 19861^{T}, %99.2 oranında *S. maltophilia* ATCC 19867^{T} (*Pseudomonas hibiscola*), *S. geniculata* ATCC 19374^{T} ve *S. maltophilia* LMG 958^{T} ve BT1A'nın yapılan 500 baz uzunluğundaki 16S rRNA dizi analizi sonucu %100 oranında *Acinetobacter baumannii* DSM 30007^{T} ile gen benzerlikleri tespit edilmiştir.

Mesafe matriksi hesaplandıktan sonra filogenetik ağaçlar neighbour-joining metodu ile çizilmiştir (Şekil 4.163-4.166). BT1A'ya ait 500 baz dizisi filogenetik dendrogram çizimi için yeterli olmadığından filogenetik ağaç oluşturulamamıştır.



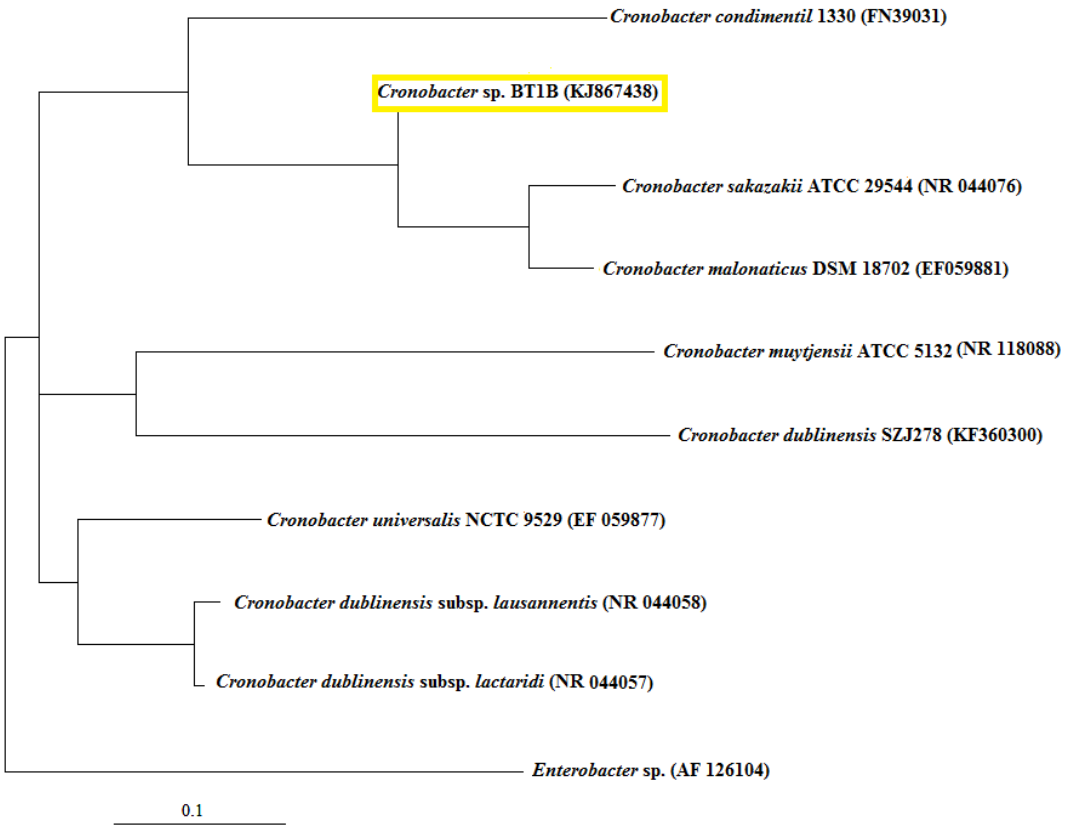
Şekil 4.163. ST5'in 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Acinetobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç

Boostrap değerleri 1,000 olarak gösterilmiştir. Out-grup olarak *Exiguobacterium* sp. (KM077136) kullanılmıştır. Bar değerleri 0.1 nükleotitlik dizilimi göstermektedir.



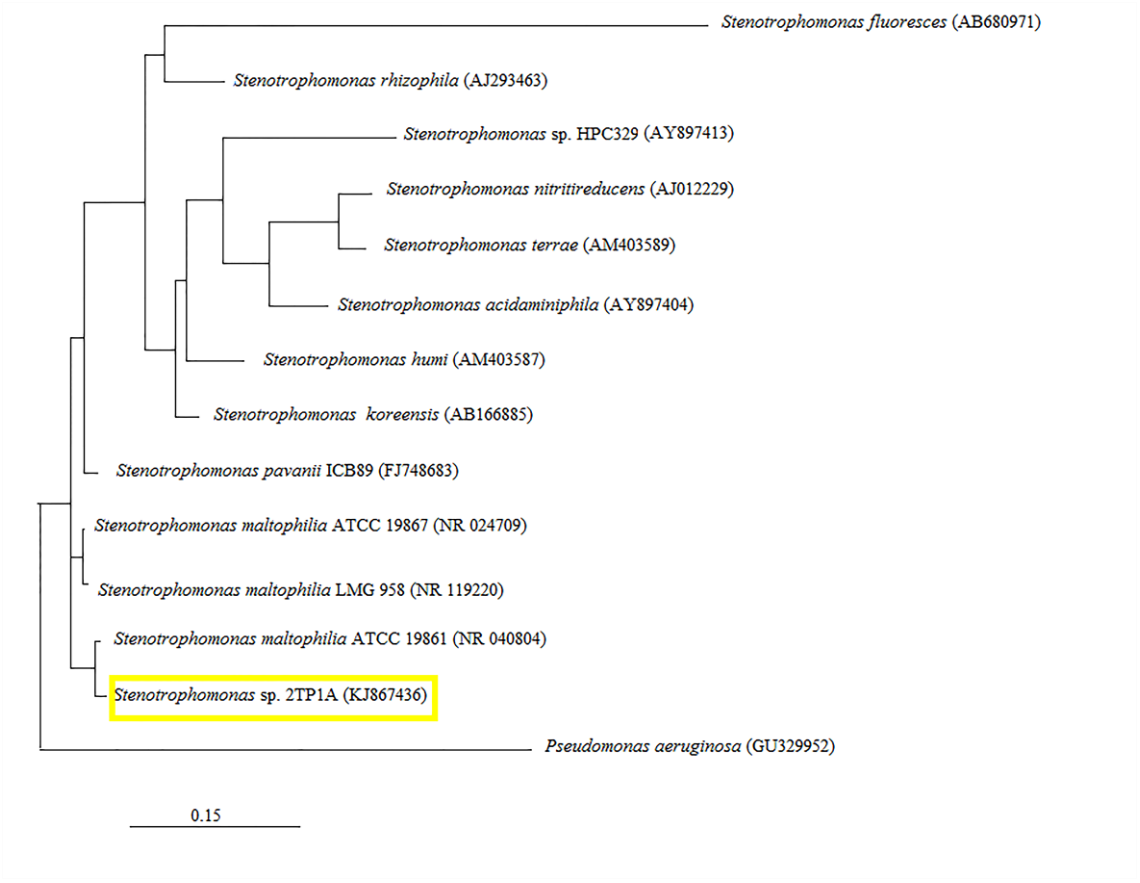
Şekil 4.164. GC2'nin 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Acinetobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç

Boostrap değerleri 1,000 olarak gösterilmiştir. Out-grup olarak *Exiguobacterium* sp. (KM077136) kullanılmıştır. Bar değerleri 0.1 nükleotitlik dizilimi göstermektedir.



Şekil 4.165. BT1B'nin 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Cronobacter* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç

Boostrap değerleri 1,000 olarak gösterilmiştir. Out-grup olarak *Enterobacter* sp. (AF 126104) kullanılmıştır. Bar değerleri 0.1 nükleotitlik dizilimi göstermektedir.



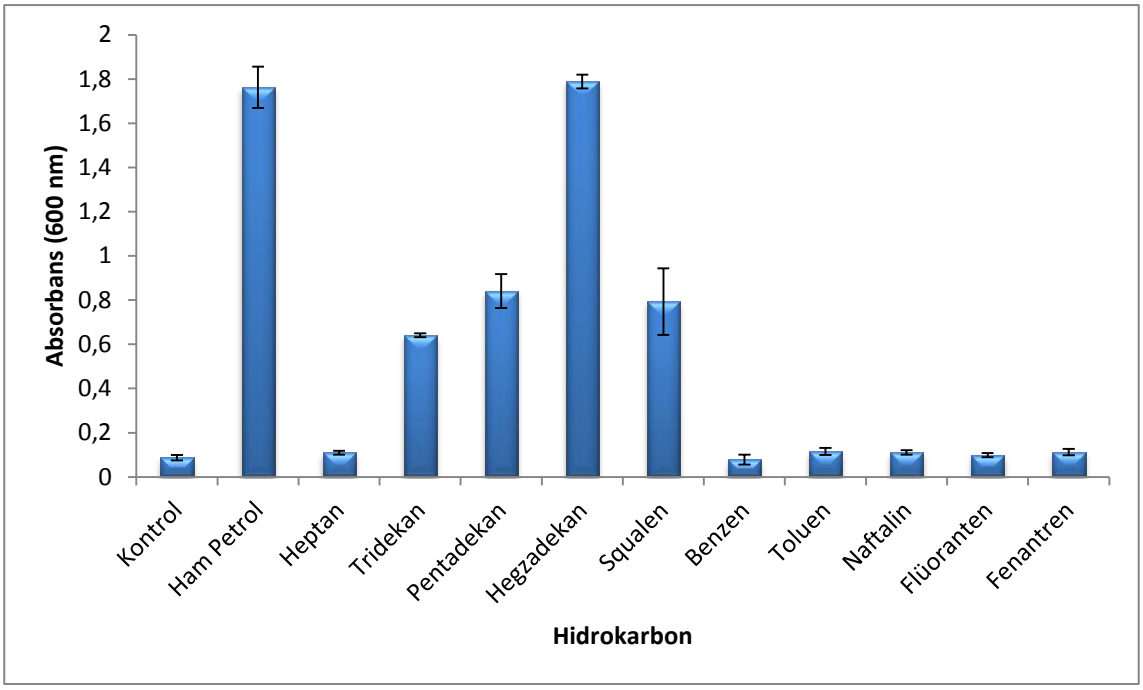
Şekil 4.166. 2TP1A'nın 16S rRNA Dizi Analizine Göre Çizilen Diğer *Stenotrophomonas* Türleriyle Yakınlığını Gösteren Filogenetik Ağaç

Boostrap değerleri 1,000 olarak gösterilmiştir. Out-grup olarak *Pseudomonas aeruginosa* (GU329952) kullanılmıştır. Bar değerleri 0.15 nükleotitlik dizilimi göstermektedir.

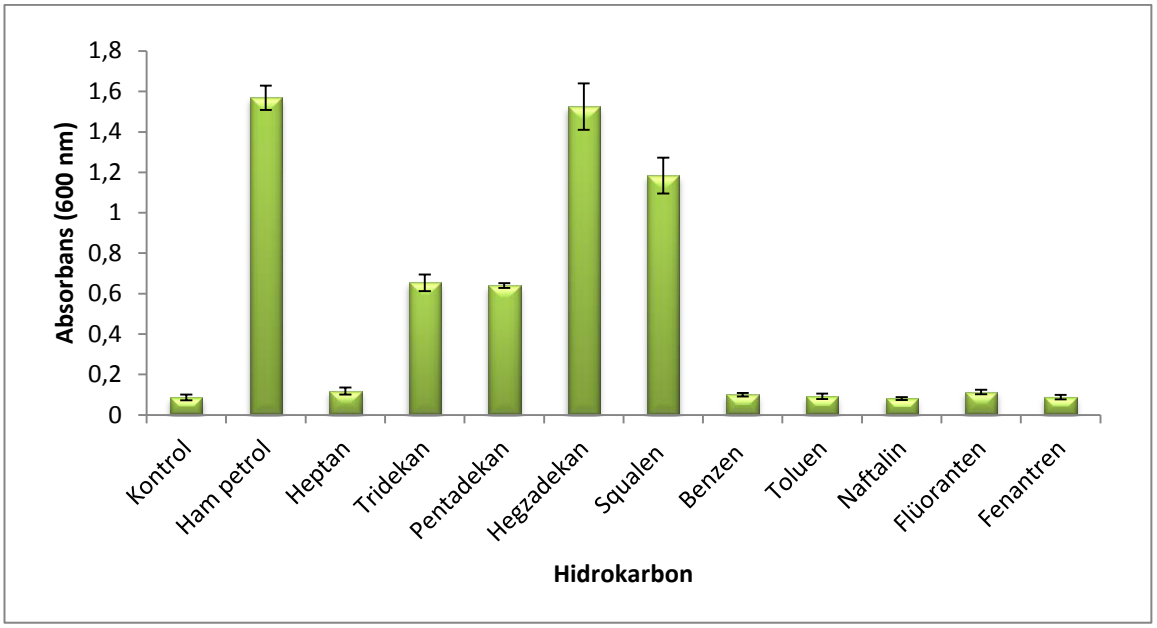
4.7. Bakterilerin Ham Petrol ve Hidrokarbonlarda Çoğalma Yeteneklerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzolatların ham petrolü ve değişik hidrokarbonları kullanıp kullanamadıklarını saptamak için materyal metotta ayrıntılı birşekilde açıklandığı gibi, hazırlanan BSM ortamına %1'lik değişik hidrokarbon çeşitleri ve ham petrol eklenerek taze bakteri kültüründen ekim yapıldı. İzolatlar, hidrokarbonlar için 2 gün, ham petrol için 7 gün optimum şartlarda 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 600 nm'de OD ölçümü alındı ve sonuçlar kontrolle karşılaştırılarak değerlendirildi. OD değerleri 3 ayrı tekrarın ortalamasından elde edilmiştir. Bakterilerin ham petrolde üremeleri sonucu elde edilen OD değerlerine göre ST5, GC2, BT1A ve 2TP1A'nın ham petrolde

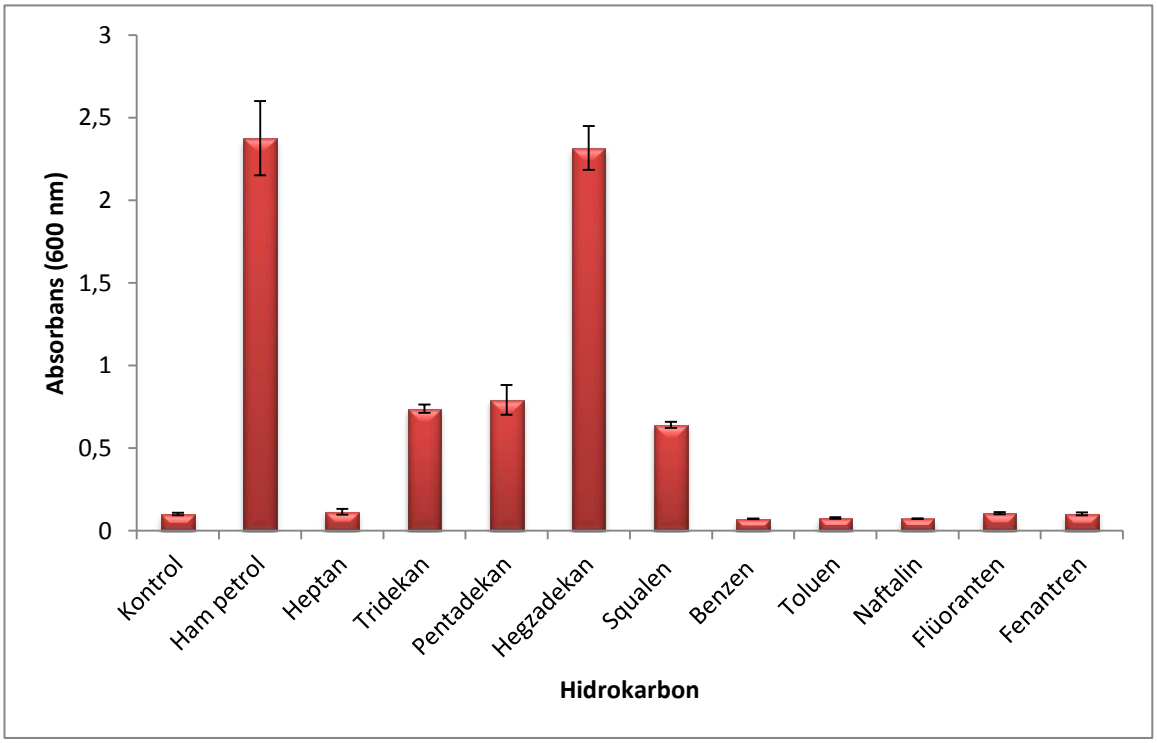
üreyebildikleri görülürken BT1B'nin ise üreyemediği gözlemlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında ham petrolde en iyi üremenin BT1A'da gerçekleştiği tespit edildi. Hidrokarbonlarda üreme yeteneklerine bakıldığı zaman; ST5, GC2, BT1A ve 2TP1A'nın uzun düz zincirli alkanları ve squaleni karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları, kısa düz zincirli ve diğer hidrokarbonlarda ise üreme yeteneklerinin olmadığı belirlenmiştir. ST5, GC2 ve BT1A'da en yüksek üreme, n-hekzadekan bulunan ortamda tespit edilirken 2TP1A'da en yüksek üreme n-pentadekan bulunan ortamda tespit edildi (Şekil 4.167-4.170). BT1B'nin ise hem ham petrolde hem de hidrokarbonlarda üreyemediği tespit edildi.



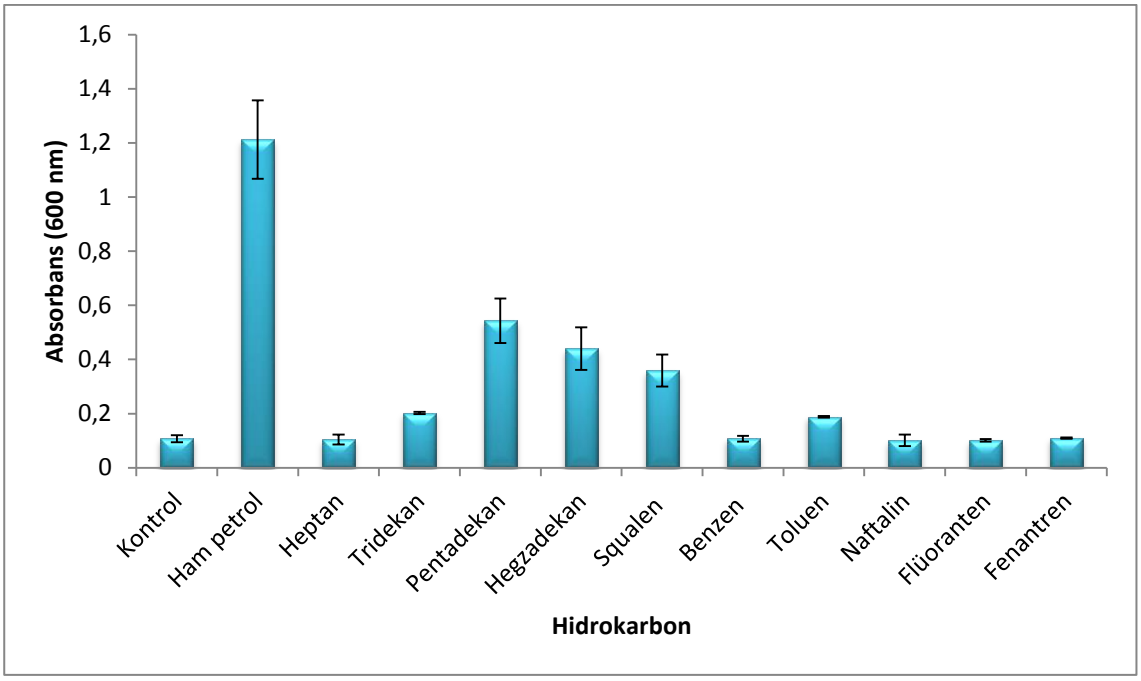
Şekil 4.167. ST5'in Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm)



Şekil 4.168. GC2'nin Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm)



Şekil 4.169. BT1A'nın Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm)

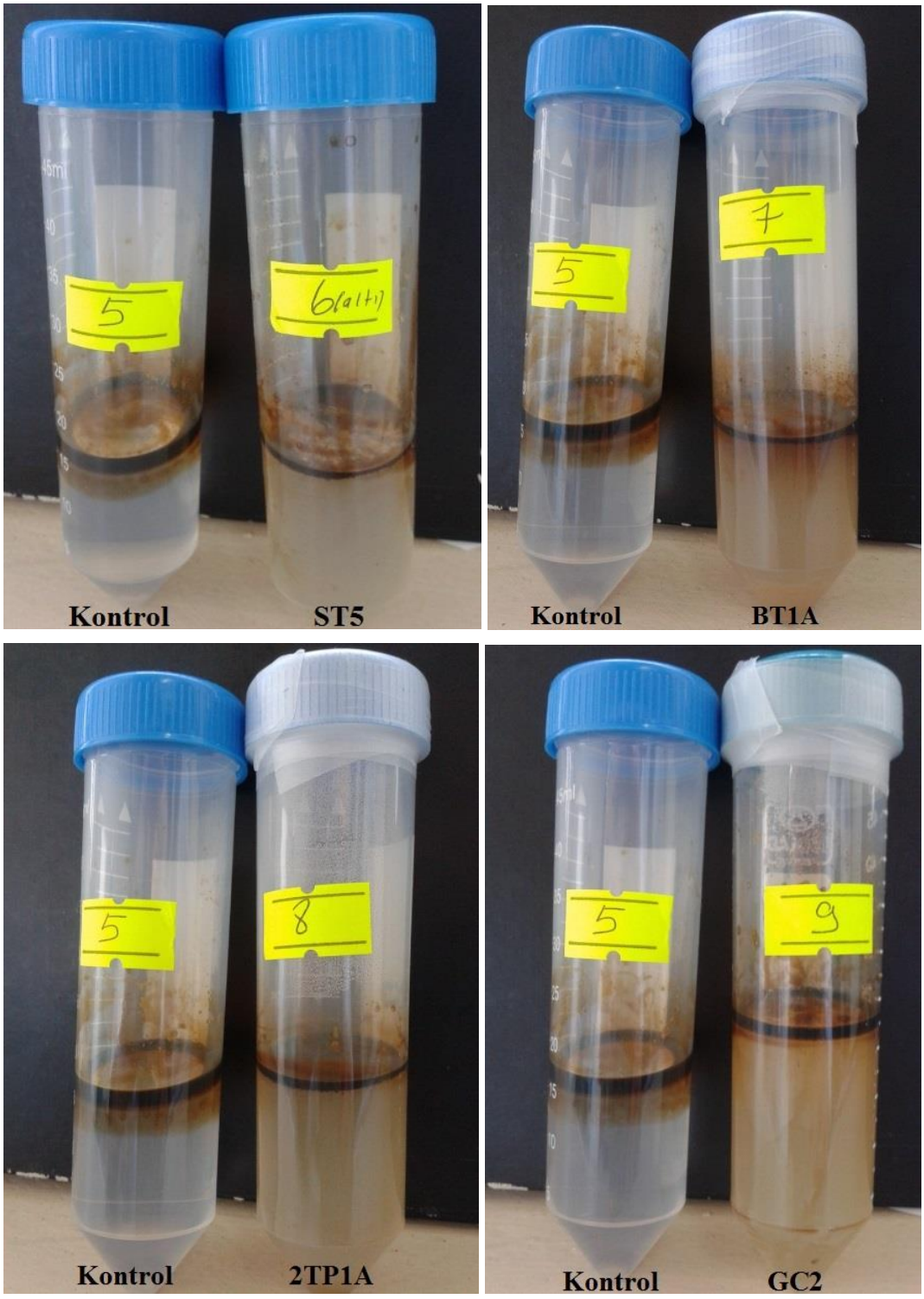


Şekil 4.170. 2TP1A'nın Ham Petrol ve Değişik Hidrokarbonlarda Üremesi (OD 600 nm)

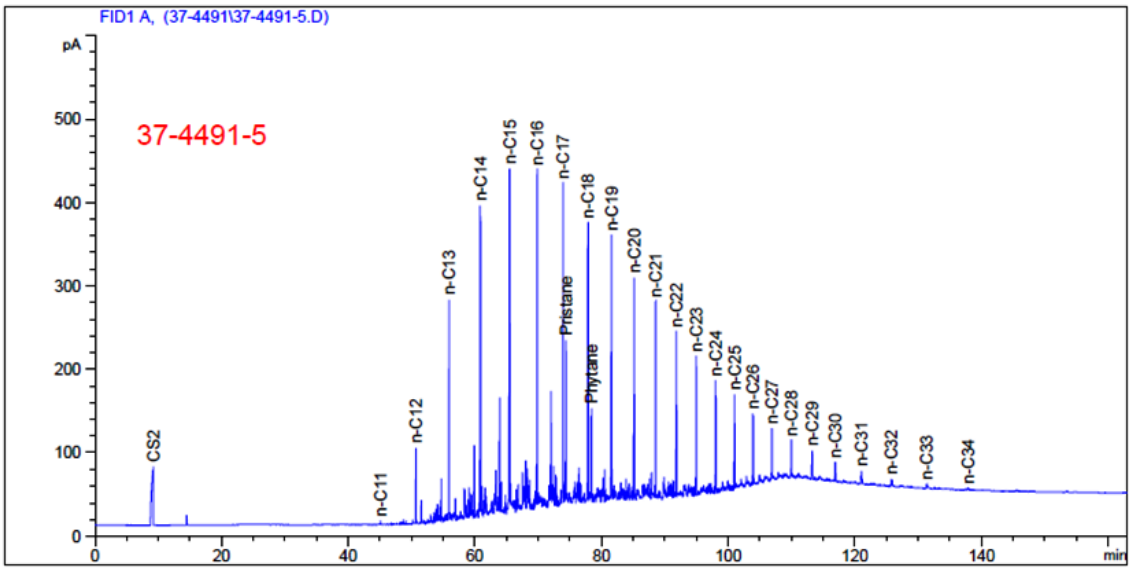
4.8. Sıvı Kültürde Ham Petrol ve n-Hegzadekan Degradasyonunun Belirlenmesi

İzolatların ham petrolü biyodegradasyonu için, hazırlanan BSM ortamına %1 oranında ham petrol eklendi ve bakteri ekimi yapılarak 7 gün optimum şartlarda 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Kontrol için BSM ortamına eklenen %1'lik ham petrol, bakteri ekimi yapılmadan aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.171'de görüldüğü gibi kontrolle karşılaştırıldığında bakterilerin ham petrolde inkübasyon sonrasında, üstteki petrol bantlarının kalınlığının kontrole göre azaldığı gözlendi. İnkübasyon sonunda nümuneler 10000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı alınarak GC analizi yapıldı (Şekil 4.172-4.176). Çizelge 4.14, İzolatların ham petrolde inkübasyonu sonucunda GC-MS analizi ile elde edilen ham petroldeki n-alkanların yüzde alanlarını göstermektedir. GC analizi sonucu ST5'in C11-C27, GC2'nin C15-C32, BT1A'nın C11-C34 ve 2TP1A'nın C13-C34 aralığındaki n-alkanları parçaladığı tespit edildi. 7 günlük inkübasyon sonucunda ham petrolde bulunan C11-C34 aralığındaki düz zincirli n-alkanları ST5'in yaklaşık olarak %41, BT1A'nın %83, 2TP1A'nın %41 ve GC2'nin ise %6 oranında biyodegradasyona uğrattıkları tespit edilmiştir. Ham petrolü en iyi

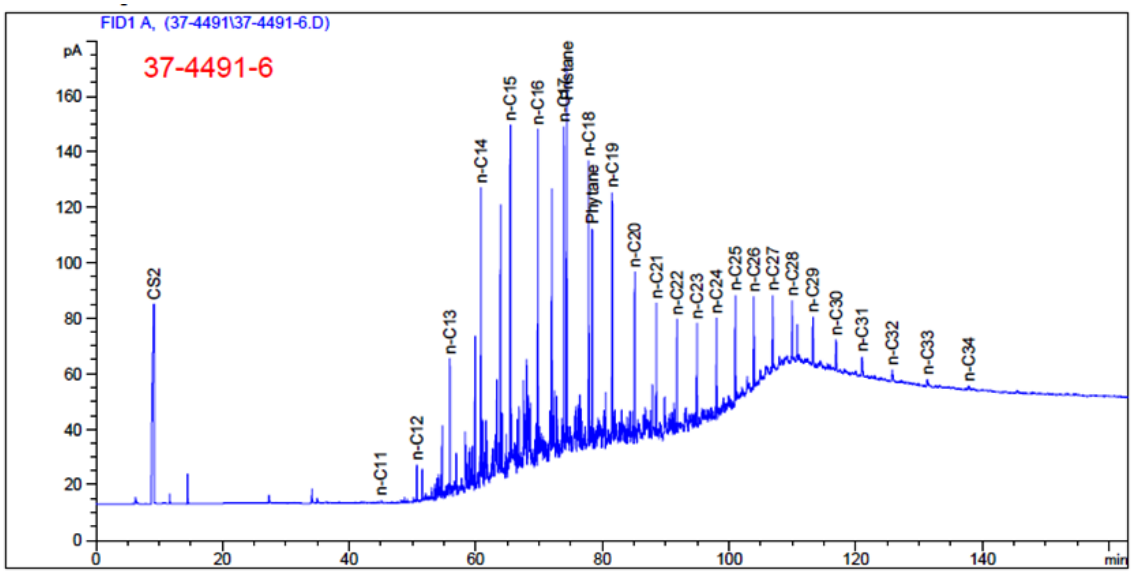
degradasyona uğratma oranına sahip izolat BT1A, en düşük izolat ise GC2 olarak tespit edildi.



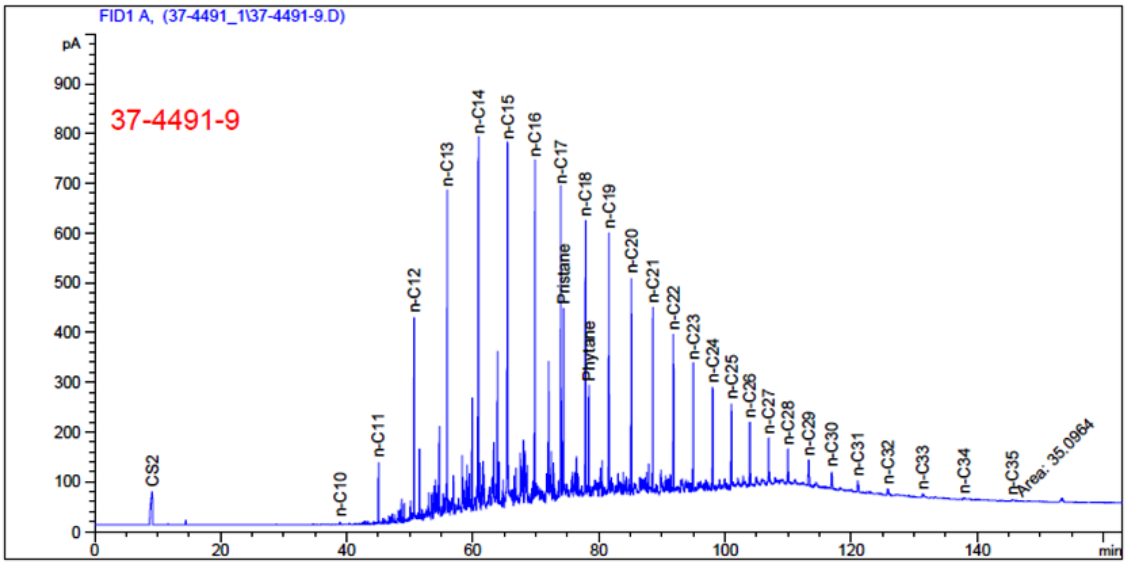
Şekil 4.171. %1'lik Ham Petrol Ortamında İnkübasyona Bırakılan Bakterilerin Üreme Görüntüleri
5: kontrol, 6: ST5, 7: BT1A, 8: 2TP1A, 9: GC2



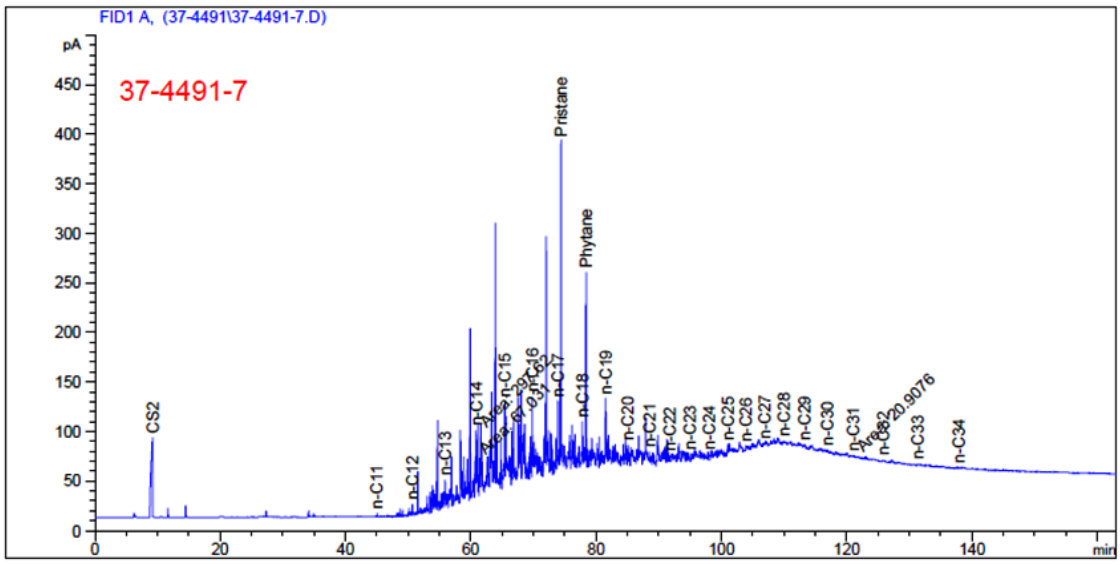
Şekil 4.172. % 1'lik Ham Petrolün (Kontrol) GC Analizi



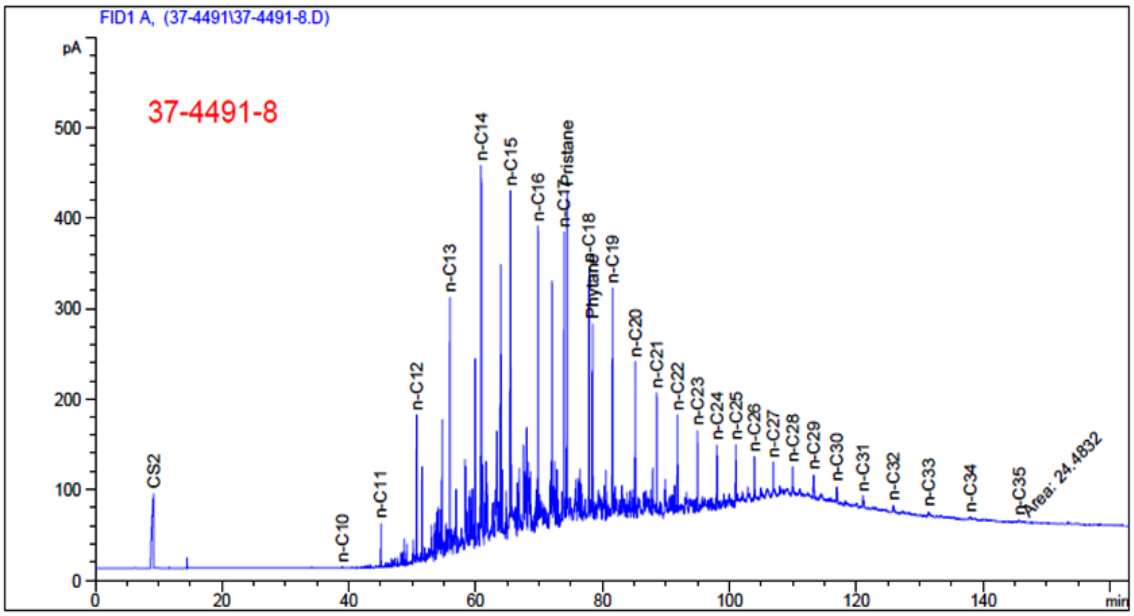
Şekil 4.173. ST5'in %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi



Şekil 4.174. GC2'nin %'1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi



Şekil 4.175. BT1A'nın %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi

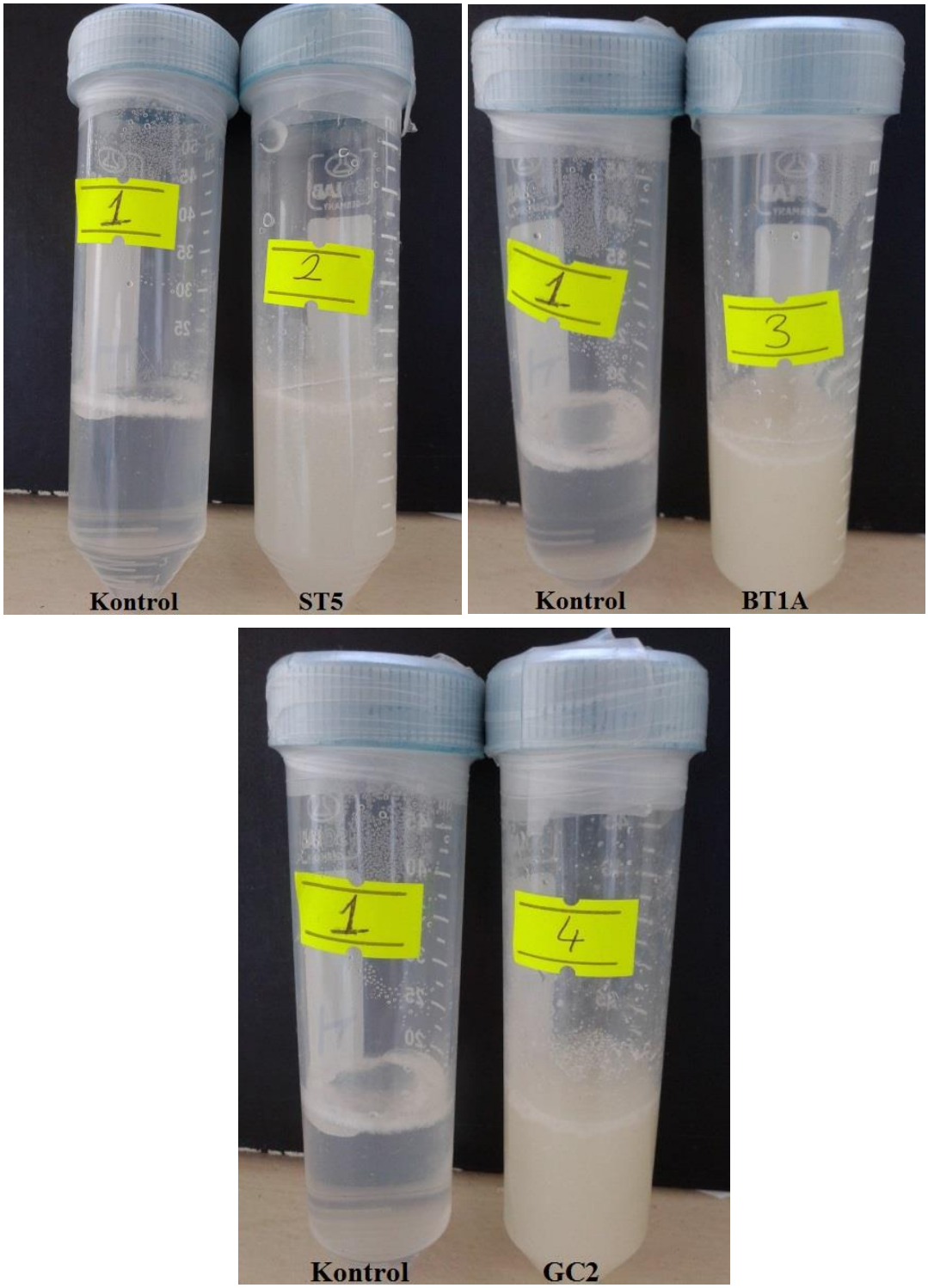


Şekil 4.176. 2TP1A'nın %1'lik Ham Petrolü Biyodegradasyonu sonucundaki GC Analizi

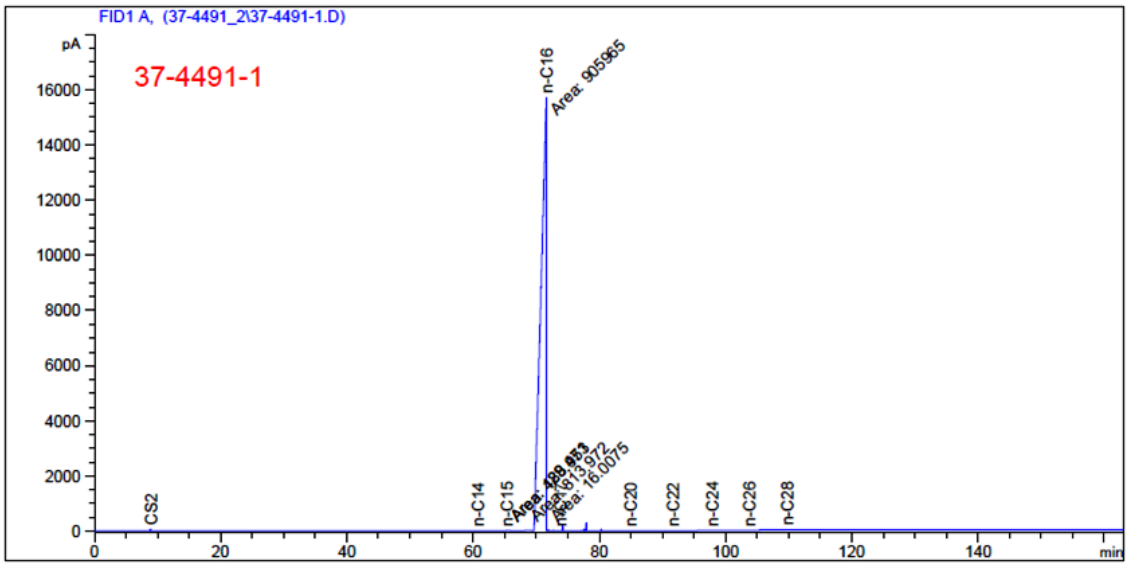
Çizelge 4.14. İzolatların Ham Petrolde Bulunan Alkanları Degradasyonu Sonundaki Yüzde Alanlar

Hidrokarbonlar	**Kontrol**	**ST5**	**GC2**	**BT1A**	**2TP1A**
	% Alan	**% Alan**	**% Alan**	**% Alan**	**%Alan**
n-C11	0.04248	0.01487	0.51010	0.03447	0.29301
n-C12	0.80653	0.22345	1.87631	0.1035	1.00792
n-C13	2.66650	0.99742	3.60500	0.29196	2.07057
n-C14	4.02138	2.16261	4.31016	0.80347	3.00303
n-C15	4.46404	2.51352	4.28344	0.92206	2.87481
n-C16	4.41371	2.61576	3.96552	0.96495	2.53702
n-C17	4.1736	2.47931	3.61038	0.88070	2.40165
n-C18	3.69627	2.26992	3.12500	0.53210	2.19617
n-C19	3.78205	2.44007	3.21497	1.37846	2.31906
n-C20	2.81300	1.32516	2.33487	0.28314	1.26936
n-C21	2.47325	0.97789	2.01178	0.11563	0.98786
n-C22	2.14447	0.89867	1.74943	0.10777	0.83954
n-C23	1.87854	0.91999	1.51979	0.10820	0.74234
n-C24	1.54815	0.86765	1.25366	0.09613	0.61741
n-C25	1.40435	1.00560	1.15429	0.22897	0.66412
n-C26	1.19869	0.98623	0.96420	0.05043	0.57796
n-C27	0.88072	0.83207	0.73653	0.08116	0.38460
n-C28	0.82237	0.85950	0.69006	0.14595	0.49229
n-C29	0.65601	0.67797	0.54849	0.12813	0.40971
n-C30	0.46972	0.50436	0.39266	0.09693	0.30915
n-C31	0.39758	0.39597	0.33101	0.05644	0.28966
n-C32	0.27808	0.30110	0.24408	0.07419	0.23123
n-C33	0.14942	0.17146	0.19308	0.03675	0.14606
n-C34	0.08883	0.09916	0.06786	0.01278	0.07310

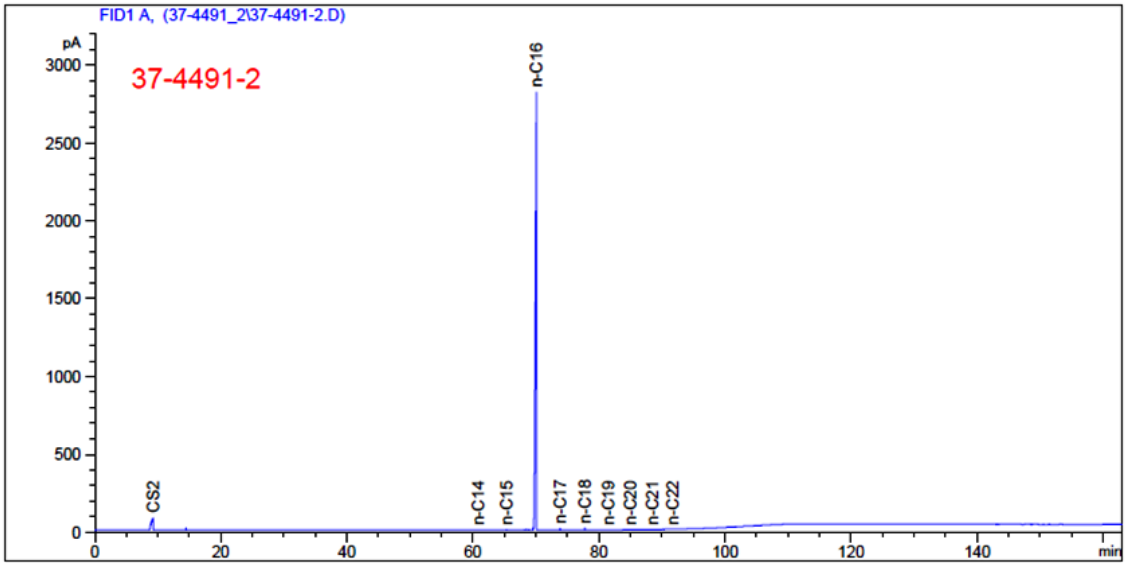
n-Hekzadekan biyodegradasyonu için, hekzadekanı en iyi kullanan 3 izolat kullanıldı (ST5, GC2 ve BT1A). %1 oranında n-hegzadekan içeren BSM ortamına bakteri ekimi yapıldı ve optimum şartlarda 2 gün 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.177). Kontrol için de %1'lik hegzadekan içeren minimal ortam, bakteri ekimi yapılmadan aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda nümuneler 10000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı alınarak GC analizi yapıldı (Şekil 4.178-4.181). GC analizi ile, 2 günlük inkübasyon sonunda ST5'in %1'lik n-hekzadekanı yaklaşık olarak %5, GC2'nin %6 ve BT1A'nın ise %3 oranında parçaladıkları tespit edildi (Çizelge 4.15).



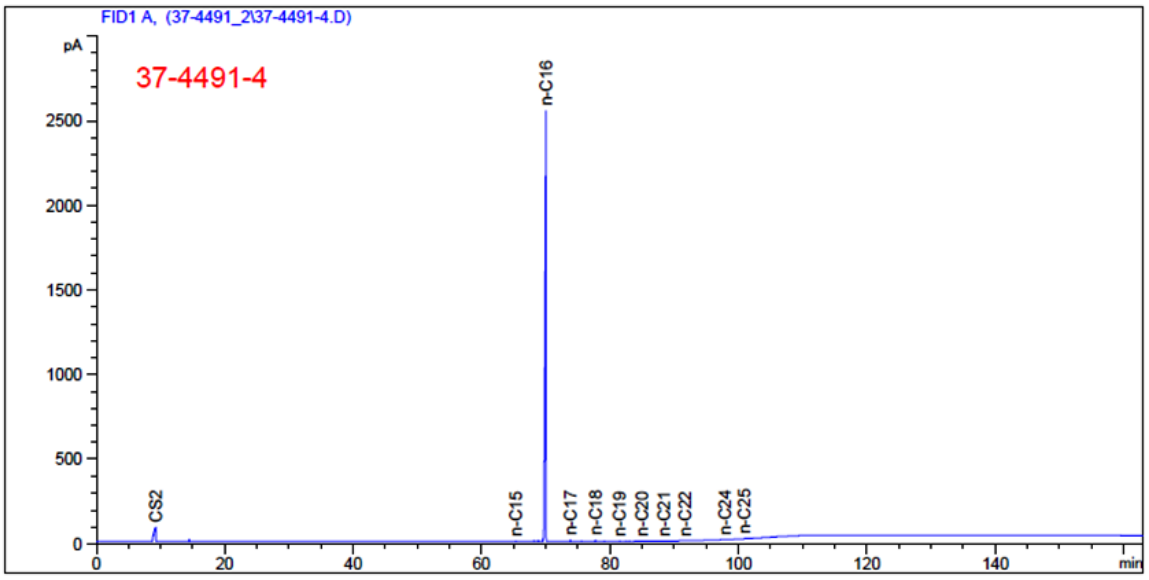
Şekil 4.177. %1'lik Hegzadekan Ortamında İnkübasyona Bırakılan Bakterilerin Üreme Görüntüleri
1: kontrol, 2: ST5, 3: BT1A, 4: GC2



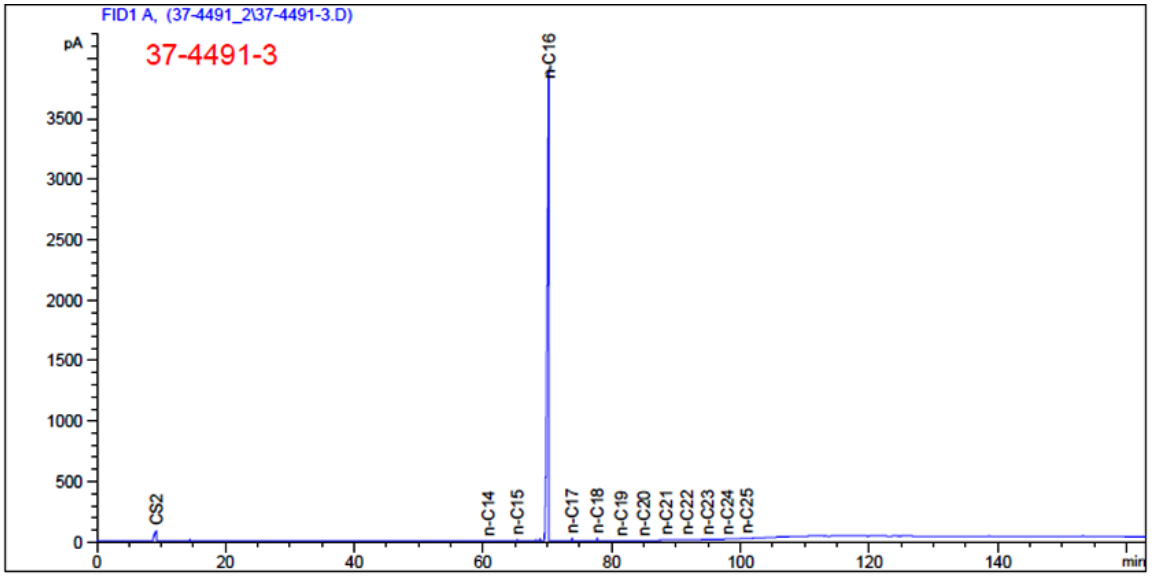
Şekil 4.178. %1'lik Hekzadekanın (Kontrol) GC Analizi



Şekil 4.179. ST5'in %1'lik Hekzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi



Şekil 4.180. GC2'nin %1'lik Hekzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi



Şekil 4.181. BT1A'nın %1'lik Hegzadekanı Biyodegradasyonu Sonundaki GC Analizi

Çizelge 4.15. İzolatların %1'lik Hegzadekanı Biyodegradasyonları Sonucundaki Hegzadekan Yüzde Alanları

İzolat	**% Alan**
Kontrol	99.34099
ST5	94.74970
GC2	93.24202
BT1A	96.66009

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hemen hemen tüm insan faliyetleri temel enerji kaynağı olarak petrole gereksinim duyar. Fakat petrolün endüstriyel kullanımı çevresel felaketlere yol açabilmektedir. Petrol üretiminin yaygın olduğu bölgelerde, petrolün üretimi, taşınması, depolanması veya işlenmesi ile toprak, su ve hava kaynaklarımız büyük ölçüde kirlenmektedir. Her yıl milyonlarca litre petrol doğal ya da antropojenik kaynaklardan çevreye yayılmaktadır.

Yeni birçok sanayi dalının gelişmesi, var olanların etkinliğini artırması ve sürekli artan şehir nüfusu, bu yüzyılın başından itibaren doğal kaynakların kirlenmesine neden olmuş ve beraberinde çevre sorunlarının oluşmasını kaçınılmaz kılmıştır. Günümüzde en önemli çevre kirliliği etmenlerinden biri petrol ve petrol türevlerinin oluşturduğu kirliliktir. Petrol endüstrisinin ve petrol pazarının genişlemesiyle; patlama sonucu petrol saçılması, tanklardan veya boşaltım esnasında tankerlerden sızma ve atık petrol ürünlerinin dağılması çevre kirliliği ile sonuçlanmıştır (Ceyhan ve Esmeray 2012).

Bazı mikroorganizmalar parçalayıcı enzim sistemlerinin adaptasyonu sayesinde birçok kompleks molekülü parçalama yeteneğine sahiptirler. Petrol kirliliği ile mücadele yollarından olan geleneksel yöntemler, fiziksel çevre ile sınırlı kalmıştır. Kirlilik etkeni olan petrolün mikrobiyolojik degradasyonu fizikokimyasal yöntemlere alternatif, daha etkili, ekonomik ve verimli bir yöntem olarak göze çarpmaktadır.

Zhang ve arkadaşları (2010), son zamanlarda petrolle kirlenmiş alanlardan izole edilen bakterilerle gerçekleştirilen ham petrol degradasyonu üzerine yoğun araştırmalar yapıldığını belirtmişlerdir. Hidrokarbonları degradasyona uğratan bakteriler ilk olarak izole edilişinin üzerinden neredeyse bir yüzyıl geçmiştir. Son zamanlarda yayınlanan bir derleme hidrokarbonları enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilen 79 bakteriyel cinsi aynı zamanda 9 siyanobakteryel cinsi, 103 mantar cinsi ve 14 alg cinsini listelemiştir (Head ve ark. 2006, Hassanshahian ve ark. 2012).

Bu çalışmanın temel düşüncelerinden biri toprakta petrolden dolayı oluşan kirliliği ortadan kaldırabilen mikroorganizmaların varlığını tespit etmek ve laboratuar ortamında biyodegradasyon etkinliklerini belirlemektir.

Diyarbakır, Sarıcak 11 petrol istasyonundan izole edilen ST5, Bozkuş 1 petrol istasyonundan izole edilen GC2 ve Beykan 27 petrol istasyonundan izole edilen BT1A, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria'da *Acinetobacter* cinsi için verilen özelliklere büyük oranda uygunluk göstermektedir (Garrity ve ark. 2007).

Diyarbakır Sarıcak 11 petrol istasyonundan izole edilen ST5'in Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerobik, hareketli ve kokobasil, Bozkuş 1 petrol istasyonundan izole edilen GC2'nin Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerobik, hareketsiz ve kokobasil, Beykan 27 petrol istasyonundan izole edilen BT1A'nın Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerobik, hareketli ve kokobasil şeklinde olduğu, ST5'in 10-40^{o}C (Optimum 35^{o}C) ve pH 5.0-12.0 (Optimum pH 5.0), GC2'nin 10-35^{o}C (Optimum 30^{o}C) ve pH 6.0-11.0 (Optimum pH 6.5-10.0) ve BT1A'nın 10-45^{o}C (Optimum 30^{o}C) ve pH 5.0-11.0 (Optimum pH 5.0) aralıklarında üredikleri tespit edilmiştir. Çizelge 5.1'de görüldüğü gibi ST5, GC2 ve BT1A'nın fenotopik özellikleri genel olarak *Acinetobacter* türlerine benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda ST5 ve BT1A'nın hareketli, GC2'nin ise hareketsiz olduğu belirlenmiştir. Doughari ve arkadaşları (2011), *Acinetobacter* cinsine ait üyelerin hareketli olmamalarına karşın titreme (twich) hareketi ile hareket edebildiklerini bildirmişlerdir. Garrity ve arkadaşları (2007), bu hareket çeşidinin fimbria varlığından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Acinetobacter cinsi üyelerinin en belirgin özelliklerinden biri oksidaz testinin negatif reaksiyon vermesidir (Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Çalışmamızda ST5, GC2 ve BT1A'nın oksidaz testi sonucu negatif çıkmıştır. Lee ve Lee (2010), Nishimura ve arkadaşları (1988), Guardabassi ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları çalışmalarda da aynı sonuçlar elde elde edilmiştir.

Çizelge 5.1. ST5, GC2 ve BT1A'nın Fenotopik Özelliklerinin Diğer Bazı *Acinetobacter* Türleri ile Karşılaştırılması

Özellikler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Hücre şekli	Kokobasil	Kokobasil	Kokobasil	N.D.	N.D.	Çubuk	Kokobasil	Kokobasil
Gram özelliği	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareketlilik	+	-	+	-	ND	-	ND	ND
Oksijen gereksinimi	Aerob	Aerob	Aerob	ND	ND	Aerob	ND	Aerob
Ürediği sıcaklık aralığı (^{o}C)	10-40	10-35	10-45	ND	ND	10-40	ND	25-37
Optimum üreme sıcaklığı (^{o}C)	35	25-30	30	25-30	ND	30	ND	ND
Ürediği pH aralığı	5.0-12.0	6.0-11.0	5.0-11.0	ND	ND	5.0-10.0	ND	ND
Optimum üreme pH'sı	5.0	6.5-10.0	5.0	7.0-8.0	ND	6.0-8.0	ND	ND
Nişasta hidrolizi	+	+	+	ND	ND	-	ND	ND
Jelatin hidrolizi	-	-	+	ND	-	ND	ND	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	ND	-
Katalaz	+	+	+	+	ND	+	ND	+
Tirozin	+	-	-	ND		+	ND	ND
Sitrat	+	-	+	+	+	+	ND	+
Üre	+	+	+	+	-	ND.	ND	ND
İndol	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
NaCl Direnci	%5	%3	%4	%5	ND	%5	ND	ND

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

1: ST5, **2:** GC2, **3:** BT1A **4:** *Acinetobacter* ADH1(*Acinetobacter lwoffii)* (Walter ve ark. (1997), **5:** *Acinetobacter baumanii* (ChaÎneau ve ark. (1999), **6:** *Acinetobacter soli* sp. nov. (Kim ve ark. (2008), **7:** *A*cinetobacter *calcoaceticus* strain RR8 (Yuste ve ark. (2000). **8:** A.*beijerinckii* sp. nov. NIPH 838^{T} (Nemec ve ark. (2009).

Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık testi sonucunda ST5'in gentamisin 10'a duyarlı, ampisilin 100 ve kloramfenikol 30'a dirençli olduğu, GC2'nin gentamisin 10 ve kloramfenikol 30'a duyarlı, ampisilin 10'a dirençli olduğu, BT1A'nın, gentamisin 10'a duyarlı, ampisilin 100 ve kloramfenikol 30'a dirençli olduğu tespit edilmiştir. Guardabassi ve arkadaşları (1999), yaptıkları çalışmada çeşitli su kaynaklarından izole ettikleri *Acinetobacter* cinsine ait 99 tane bakteri türünde yaptıkları antibiyotik duyarlılığı testi ile izolatların %50'sinin kloramfenikole ve %7'sinin gentamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada Wisplinghoff ve arkadaşları (2000), 78 adet *Acinetobacter baumannii* türünün %26'sının ampisiline, %80'ininin gentamisine ve *Acinetobacter baumannii* dışındaki *Acinetobacter* cinsine ait 18 adet türün, %61'inin ampisiline ve %100'ünün gentamisine duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada fosfolipit analizi ile ST5 ve GC2'nin PG, PC1, PC3, CLBH, AP ve PEA fosfolipitlerini içerdikleri tespit edilmiştir. Ratledge ve Wilkinson (1988), *Acinetobacter* cinslerine ait türlerde genel olarak bulunan fosfolipitlerin PEA, PG, DPG (CLBH) olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Lee ve Lee (2010), *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov.'da bulunan temel fosfolipitleri PE, PG ve DPG şeklinde tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.5'te ST5 ve 16S rRNA dizi analizi sonucu kendisine yakın olan *A. calcoaceticus* DSM 30006 ve *A. pittii* DSM 25618'in aynı şartlarda üretilmesi ve aynı şartlarda GC analizi ile elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) profilleri karşılaştırılmıştır. ST5'in majör yağ asidi C18:1 (%41.56), ikinci büyük yağ asidi C16:0 (%31.76), *A. calcoaceticus* DSM 30006'da majör yağ asidi C18:1 (%32.5), ikinci büyük yağ asidi C16:0 (%26.2) ve *A. pittii* DSM 25618'de bulunan majör yağ asidi C16:0 (%39.7), ikinci büyük yağ asidi C18:1 (%38.62) olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar her üç bakterinin de yağ asidi profili bakımından genel olarak benzer olduklarını göstermekle beraber C17:1, ST5'te %2.6 oranında bulunurken diğer izolatlarda tespit edilmemiştir. Ayrıca *A.* calcoaceticus'ta iC15:0 ve aiC15:0 sırasıyla %6.1 ve %7.7 oranında belirlenmiş olup ST5 ve *A. pittii*'de tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.6'da GC2 ve 16S rRNA dizi analizi sonucu kendisine yakın olan *A. beijerinckii* ve *A. lwoffii*'nin aynı şartlarda üretilmesi ve aynı şartlarda GC analizi ile elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) profilleri karşılaştırılmıştır. GC2'de majör yağ asidi C16:0 (%36.51), ikinci büyük yağ asidi C18:1 (%32.49), *A.beijerinckii*'de majör yağ asidi C18:1 (%51.6), ikinci büyük yağ asidi C16:0 (%28.72) ve *A. lwoffii*'de majör yağ asidi C16:1 (%39.37), ikinci büyük yağ asidi C18:1 (%29.12) olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi her üç bakterinin de majör ve ikinci büyük yağ asitleri arasında farklılık görülmektedir. Ayrıca GC2'de iC15:0 ve aiC15:0'in sırasıyla %3.52 ve %1.42 oranında tespit edilip diğer iki bakteride hiç bulunmaması dikkat çekici bir sonuç olarak göze çarpmaktadır.

Çizelge 5.2'de ST5, GC2 ve diğer *Acinetobacter* türlerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profilleri karşılaştırılmaktadır. Tüm türlerde C16:0 yüksek miktarda bulunarak benzerlik göstermektedir. Bunun yanında C18:1ω9c'nin ST5 dışındaki tüm türlerde yüksek miktarda bulunması, C16:1'in sadece ST5 ve GC2'de yüksek miktarda bulunup tabloda bulunan diğer *Acinetobacter* türlerinde bulunmaması dikkat çekici bir sonuç olarak göze çarpmaktadır.

Çizelge 5.2. ST5, GC2 ve Yakın Olan Diğer *Acinetobacter* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profillerinin Karşılaştırılması

Yağ Asidi	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
C14:0	ND	1.96	tr	1	Tr	1,8	ND	ND	ND
iC15:0	ND	3.52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
aiC15:0	ND	1.41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
nC15:0	ND	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C16:1	**22.02**	**20.38**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C16:0	**31.76**	**36.51**	**14.0**	**15.4**	**17.5**	**17.4**	**21.3**	**23.5**	**16.8**
iC17:0	ND	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
aiC17:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
nC17:0	1.06	tr	3.5	2.4	1.3	ND	1.2	tr	1.1
C17:1	2.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C17:1ω8c	ND	ND	2.6	5.4	1.2	ND	1.7	ND	1.4
C18:1	**41.56**	**32.49**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:0	1	2.11	1.4	1.5	tr	1.3	3.4	1.4	3.5
C18:1ω7c	ND	ND	tr	2.9	ND	3.1	tr	1.0	2.5
C18:1ω9c	ND	**24.8**	**39.6**	**24.4**	**45.9**	**18.5**	**38**	**38.4**	**31.1**

i:iso,ai:anteiso,n:normal,ω:omega, ND: Tespit edilmedi, tr: %1'den düşük miktarı göstermektedir.

1: ST5, **2:** GC2 **3:** *A. beijerinckii* CCUG 51249^{T}, **4:** *A. calcoaceticus* KCTC 2357^{T}, **5:** *A. haemolyticus* KCTC 12404^{T}, **6:** *A. lwoffii* KCTC 12407^{T}, **7:** *A. baumannii* KACC 12454^{T}, **8:** *A. baylyi* KACC 12224^{T}, **9:** *A. calcoaceticus* KACC11541^{T} Değerler her bir varyete için toplam yağ asitleri yüzdesi olarak verilmiştir. Tablodaki veriler Lee ve Lee 2010 ve Kim ve ark. 2008'den elde edilmiştir.

Çalışmamızda ST5'in kinon tipi Q-9, GC2'nin kinon tipi ise Q-8 olarak tespit edilmiştir. Collins ve Jones (1981), referans aldıkları çalışmalarda *A. anitratum*'da Q-9 (7 türde), Q-8 (1 türde) , Q-9 ve Q-8 (iki türde), *A. lwoffii*'de Q-9 ve Q-8 ve *Acinetobacter* sp.'de Q-9 kinon tiplerinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Benzer çalışmalarda Fuije ve ark. (1998), *Acinetobacter* cinsine ait bakterilerdeki kinon sistemini Q-8 ve Q-9, Busse ve arkadaşları (1996), *Acinetobacter calcoaceticus*'ta bulunan kinon tipinin Q-9 olduğunu bildirmişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada Vaz-Moreira ve arkadaşları (2011), *Acinetobacter rudis* sp. nov. G30$^{(T)}$ ve *Acinetobacter rudis* sp. nov. A1PC16 'daki kinon sistemini sırasıyla Q-8 ve Q-9 olarak bildirmişlerdir.

16S rRNA dizi analizine göre %99.5 oranında *A. calcoaceticus* DSM 30006^{T} ve *A. pittii* RUH DSM 2206^{T} ile benzerlik gösteren ST5'in yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri ve kinon tipleri yönünden genel olarak *Acinetobacter* cinsinin özelliklerini taşımaktadır. ST5'in, 16S rRNA yönünden yüksek benzerlik oranına sahip olduğu *A. calcoaceticus* ve *A. pittii* ile aynı ortam ve şartlarda üretilmesi sonucu GC analizi ile elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) profilleri yönünden genel olarak benzer oldukları saptanmıştır. Yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin 16S rRNA dizi analizi bakımından yakın olan diğer *Acinetobacter* türlerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profilleri ile karşılaştırıldığında (Çizelge 5.2) tüm türlerde C16:0 yüksek miktarda bulunurak benzerlik göstermiştir. Bunun yanında C18:1ω9c'nin ST5 dışındaki tüm türlerde yüksek miktarda bulunması dikkat çekicidir. ST5'in *A. calcoaceticus* ve *A. pittii* ile yapılacak DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatın yeni bir tür veya alt tür olup olmadığı kesin olarak ortaya çıkacaktır.

16S rRNA dizi analizine göre %99.9 oranında *A. lwoffii* DSM 2403^{T} ve *A. lwoffii* strain A382 ve % 98.2 oranında *A. beijerinckii* CCUG 51249^{T} ile benzerlik gösteren GC2'nin yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri ve kinon tipleri yönünden genel olarak *Acinetobacter* cinsinin özelliklerini taşıdığı belirlenmekle beraber bazı özellikleri ile diğer türlerden ayrı bir karakter sergilemektedir. GC2'nin diğer türlere göre daha düşük sıcaklık aralığında (10-35^{o}C) ve 6.0-11.0 pH aralığında ürediği belirlenerek asidik pH'ya karşı daha dayanıksız olduğu tespit edilmiştir. Diğer

Acinetobacter türlerinin çoğu pH 5.0'da yüksek oranda ve optimum üreme sergilemektedir (Çizelge 5.1). Bunun yanında glikolipid profili, 16S rRNA yönünden yüksek benzerlik oranına sahip olduğu *A. lwoffii* ve *A. beijerinckii*'ye ait glikolipit profillerinden farklılık göstermiştir. Ayrıca GC2'nin bu iki yakın türle aynı ortam ve şartlarda çoğaltılması sonucu GC analizi ile elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) profilleri karşılaştırıldığında majör ve ikinci büyük yağ asitleri arasında da farklı sonuçlar elde edilmiş ve diğer bazı yağ asitleri yönünden farklılık tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar GC2'nin *Acinetobacter* cinsine ait yeni bir tür olabileceğini göstermektedir. GC2'nin *A. lwoffii* ve *A. beijerinckii* türleri ile DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatın yeni bir tür veya alt tür olup olmadığı kesin olarak ortaya çıkacaktır.

Kısmi 16S rRNA dizi analizi sonucunda BT1A'nın %100 *Acinetobacter baumannii* DSM 30007^T'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yukarıda açıklandığı gibi BT1A'nın fenotopik özelliklerinin genel olarak *Acinetobacter* türlerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. BT1A için tanımlamaya yönelik ek analizlere gerek duyulmamıştır. Çalışmamızda BT1A, daha çok petrol biyodegradasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Çalışmamızda Beykan 27 petrol istasyonundan izole edilen BT1B'nin Gram-negatif, spor oluşturmayan, fakültatif anaerob, hareketli ve hücrelerinin çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal test sonuçları oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol üretimi negatif, üre hidrolizi pozitif ve sitrat kullanımı pozitif olarak elde edilmiştir. Full 16S rRNA dizi analizi sonucu, BT1B'nin %99.7 *C. malonaticus* DSM 18702^T ve %99.6 *C. sakazakii* ATCC 29544^T ile gen benzerliği tespit edilmiştir.

Iversen ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada *Cronobacter* cinsine ait türlerin; Gram-negatif, fakültatif anaerob, genel olarak hareketli ve çubuk şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Oksidaz testinin negatif, katalaz, sitrat ve üre hidroliz testinin pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada Iversen ve arkadaşları (2008), *Cronobacter* cinsine ait türlerin Gram-negatif, fakültatif anaerob, genel olarak hareketli ve çubuk şeklinde olduğunu rapor etmişlerdir. Oksidaz testinin negatif, katalaz, sitrat kullanımı ve üre hidroliz testlerinin pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Bu cinse ait türlerin 6-45^oC

ile 5.0-10.0 pH aralığında ve %7'nin üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında üreyebildiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda BT1B'nin 10-45^{o}C sıcaklık, 4.5-12.0 pH aralığında ve %7'lik NaCl ürediği tespit edilmiştir.

Iversen ve arkadaşları (2008), tanımlanmış 8 tane *Cronobacter* cinsine ait türlerin indol üretimini karşılaştırdıklarında *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis* ve *C. genomospecies*1'de sonucun negatif, *C. muytjensii*, C. dublinensis subsp. dublinensis, *C. dublinensis* subsp. *Lactaridi*'de pozitif *ve C. dublinensis* subsp. *Lausannensis*'de zayıf pozitif reaksiyon verdiğini belirlemişlerdir.

Çalışmamızda BT1B'nin indol üretimi testi negatif sonuç vermiştir. BT1B'nin indol üretim testi, 16S rRNA analizi sonucu gen benzerliği yüksek oranda saptanan *C. sakazaki* ve *C. malonaticus* ile aynı sonucu vermiştir.

Çalışmamızda BT1B'nin gentamisin 10, ampisilin 10, streptomisin 10, kloramfenikol 30, ve neomisin 10'a duyarlı, penislin 2 ve Penisilin 10 antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir.

El-Sharoud ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada izole ettikleri *Cronobacter* cinsine ait 16 adet bakteri türünün streptomisin, ampisilin ve gentamisine duyarlı, *C. sakazakii* ve *C. malonaticus* olarak tanımladıkları iki türün de neomisine duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir.

Strydom (2011), *Cronobacter* cinsine ait türlerin penisiline dirençli, bazı türlerin de kloramfenikol ve ampisiline duyarlı olduklarını belirtmiştir.

Çizelge 4.7'de BT1B ve 16S rRNA dizi analizi sonucu kendisine yakın olan *C. sakazakii* ve *C. malonaticus*'un aynı şartlarda üretilmesi ve aynı şartlarda GC analizi ile elde edilen yağ asidi metil ester (FAME) profilleri karşılaştırılmıştır. Görüldüğü gibi sonuçlar her üç bakterinin de yağ asidi profilleri bakımından genel olarak benzer olduklarını göstermekle beraber C14:0, C17:0 cyclo ve C22:0 BT1B'de sırasıyla %2.3, %1.06 ve %2.14 oranlarında belirlenmiş olup diğer iki türde tespit edilmemiştir.

Benzer bir çalışmada Whittaker (2011), *Cronobacter* cinsine ait 6 türde (*C. sakazakii, C. malonaticus, C. dublinensis, C. muytjensii, C. Turicensis ve C.* bildirmişlerdir.

16S rRNA dizi analizi ile *C. sakazakii* ve *C. malonaticus* ile yüksek oranda gen benzerliği saptanan BT1B, Yapılan yağ asidi analizi ile de yağ asitlerinin yakın olan iki türle yüksek oranda benzerlik gösterdiği saptanmakla beraber bazı yağ asitleri yönünden farklılıklar da tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). BT1B'nin *C. sakazakii* ve *C. malonaticus* türleri ile yapılacak DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatın hangi türün bir üyesi olduğu kesin olarak tespit edilecektir.

Çalışmamızda Batman Petrolleri Batı Raman Sahası 2TP1 petrol istasyonundan izole edilen 2TP1A'nın, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria'da *Stenotrophomonas* cinsi için verilen özelliklere büyük oranda uygunluk göstermektedir (Garrity ve ark. 2007).

2TP1A'nın Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerob, hareketsiz ve hücrelerinin çubuk şeklinde olduğu tespit edilmiştir. 15-40^{o}C sıcaklık ve 5.0-12.0 pH aralığında ve %5'e kadar olan tuz konsantrasyonlarında ürediği gözlemlenmiş olup optimum üreme sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla 35^{o}C ve 5.5-6.5 olarak tespit edilmiştir. Biyokimyasal test sonuçları; oksidaz, katalaz, üre hidrolizi, tirozin testi, Jelatin hidrolizi pozitif, indol üretimi ve nişasta hidroliz testinin ise negatif reaksiyon verdiğini göstermiştir. Full 16S rRNA dizi analizi ile %99.8 *S. maltophilia* (*Pseudomonas beteli*) ATCC 19861^{T} ile gen benzerliği saptanmıştır.

Çizelge 5.3'te, 2TP1A ve diğer bazı *Stenotrophomonas* türlerinin bazı fenotopik özelliklerini karşılaştırılmaktadır. Tüm türlerde hücre şekli, Gram özelliği, oksijen ihtiyacı, katalaz ve oksidaz testi gibi *Stenotrophomonas* cinsine ait temel bazı özellikler ortakken diğer bazı özellikler de türden türe değişiklik göstermektedir. 2TP1A'nın çizelgedeki diğer *Stenotrophomonas* türlerinden ayırt edilebilen en belirgin özelliği daha geniş pH aralığında üreyebilmesi olmuştur.

Çizelge 5.3. 2TP1A'nın Fenotipik Özelliklerinin Diğer Bazı *Acinetobacter* Türleri ile Karşılaştırılması

Özellikler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Gram özelliği	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareketlilik	-	+	-	+	-	+	+	+
Oksijen gereksinimi	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob
Ürediği sıcaklık aralığı (^{o}C)	10-40	ND	4-40	20-42	10-40	15–37	15-37	25–40
Optimum üreme sıcaklığı (^{o}C)	35	ND	25-30	30-35	30	ND	ND	28–37
Ürediği pH aralığı	5.0-12.0	ND	ND	5.0-9.0	5.5-8.5	5.0-10.5	5.0-10.5	5.5–9.5
Optimum üreme pH'sı	5.5-6.5	ND	ND	6.0-7.0	6.0-7.0	ND	ND	6.5–8.5
Nişasta hidrolizi	-	ND	ND	-	-	ND	ND	+
Jelatin hidrolizi	+	+	w	ND	+	w	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	ND	+	+	+	+	+
Tirozin	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
Sitrat	+	+	+	-	-	+	+	+
Üre	+	-	-	-	-	ND	ND	+
İndol	-	-	ND	-	-	ND	ND	+
NaCl Direnci	% 5	ND	ND	ND	% 6	% 4	% 5	% 2.5

+: pozitif, -: negatif, ND test edilmemiş, w: zayıf

1: Strain 2TP1A **2:** *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (Urszula ve ark. 2009), **3:** *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov. MK06^{T} (Yi ve ark. 2010), **4:** *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov. (Assih ve ark. 2002), **5:** *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov.(Yoon ve ark. 2006), **6:** *Stenotrophomonas humi* sp. nov (Heylen ve ark. 2007), **7:** *Stenotrophomonas terrae* sp. nov (Heylen ve ark. 2007), **8:** *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov (Kaparullina ve ark. 2009).

Yaptığımız çalışmada 2TP1A'nın kloramfenikol 30'a duyarlı, gentamisin 10'a az duyarlı novobiyosin 5, kanamisin 5, ampisilin 10, streptomisin 10 linkomisin 15, tetrasiklin 30 ve neomisin 10'a dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Kaparullina ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov.'un ampisilin, novobiyosin, neomisin ve streptomisine dirençli, kanamisin, gentamisin ve linkomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada Naem ve arkadaşları (2012), izole ettikleri 222 adet *S. maltophilia* türünün %87.39'unun gentamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada Samonis ve arkadaşları (2012), 68 adet *S. maltophilia*'nın 57 tanesinin kloramfenikole duyarlı, 7 tanesinin az duyarlı, 56 tanesinin gentamisine duyarlı, 3 tanesinin az duyarlı ve 47 tanesinin tetrasikline duyarlı, 8 tanesinin ise az duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda 2TP1A'nın PG, CLBH (DPG) ve PEA fosfolipitlerini içerdiği tespit edilmiştir. Benzer çalışmalarda Kaparullina ve arkadaşları (2009), *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov.'da fosfolipit içeriğini PG, DPG (CLBH) ve PEA, Kim ve arkadaşları (2010), *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov.'da temel fosfolipitleri PG, DPG (CLBH) ve PEA olarak tespit etmişlerdir. Görüldüğü gibi 2TP1A ve diğer *Stenotrophomonas* türlerinin fosfolipit içerikleri benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda 2TP1A'ya ait kinon tipinin Q-8 olduğu belirlenmiştir. Garrity ve arkadaşları (2007), The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria'da *S. maltophilia*'da bulunan temel kinon sistemini Q-8 olduğunu belirtmişlerdir. Benzer çalışmalarda Yi ve arkadaşları (2010), *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., Yang ve arkadaşları (2006), *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov. ve Lee ve arkadaşları (2011), *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov.'daki kinon sistemlerinin Q-8 olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 5.4, 2TP1A ve diğer bazı *Stenotrophomonas* türlerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerini karşılaştırmaktadır. Görüldüğü gibi iC15:0 diğer tüm türlerde majör yağ asidi, 2TP1A'da ikinci büyük yağ asidi olarak tespit edilmiştir (%30.58). iC16:0'ın tüm türlede düşük miktarlarda bulunması, 2TP1A'da ise majör yağ asidi

olarak saptanması ve C18:1'in 2TP1A'da %18.08 gibi yüksek bir oranda saptanıp verilen diğer türlerde hiç bulunmaması dikkat çekmektedir.

2TP1A, genel olarak *Stenotrophomonas* cinsine ait özellikleri taşımakla beraber bu cins içerisndeki türler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Ayrıca yağ asidi profili bakımından da literatürdeki diğer *Stenotrophomonas* cinsine ait türlerden bazı farkılıklar sergilemektedir (Çizelge 5.4). 2TP1A'nın 16S rRNA dizi analizi ile yakınlık gösterdiği diğer *Stenotrophomonas* türleri ile yapılacak DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatın yeni bir tür veya alt tür olup olmadığı kesin olarak tespit edilecektir.

Çizelge 5.4. 2TP1A ve Diğer Bazı *Stenotrophomonas* Türlerine Ait Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Profillerinin Karşılaştırılması.

Yağ Asidi	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
iC:14:0	ND	tr	2.3	3.52	tr	6.0	3.5	1,73
nC14:0	4.15	2.7	2.0	1.37	2.00	2.5	2.4	3.33
iC15:1	ND	2.1	12.1	2.67	tr	5.8	8.8	ND
iC15:0	**30.58**	**39.9**	**25.4**	**35**	**36.35**	**18.1**	**30.9**	**20.61**
aiC15:0	**10.87**	**10.1**	**7.8**	**2.67**	**10.60**	**4.7**	**3.8**	**17.81**
nC15:0	tr	1.6	1.7	1.83	ND	1.8	1.2	1.8
iC16:0	**35.21**	**2.7**	2.6	5.38	1.37	2.4	3.6	4.22
C16:1	**13.71**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
nC16:0	ND	ND	3.5	4.80	4.29	5.2	4.6	ND
iC17:1ω9c	ND	4.9	ND	12.87	5.14	6.7	ND	ND
iC17:0	ND	ND	1.8	3.33	3.59	ND	2.6	ND
C17:1 ω8c	ND	ND	8.9	1.02	tr	ND	ND	ND
C17:1	2.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
nC17:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.2	ND
C18:1	**18.08**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C22:0	1.49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

i:iso,ai:anteiso,n:normal,ω:omega, ND: Tespit edilmedi, tr: %1'den düşük miktarı göstermektedir

1: 2TP1A, **2:** *Stenotrophomonas. maltophilia* KCTC 1773^T (Lee ve ark. 2011), **3:** *Stenotrophomonas humi* DSM 18929^T (Yi ve ark. 2010), **4***: Stenotrophomonas nitritireducens* DSM 12575^T (Assih ve ark. 2002), **5:** *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958^T (Kaparullina ve ark. 2009), **6:** *Stenotrophomonas terrae* DSM 18941^T (Lee ve ark. 2011), **7:** *Steneotrophomonas. rhizophila* e-p10^T (Yi ve ark. 2010), **8:** *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5^T (Kaparullina ve ark. 2009). Değerler her bir varyete için toplam yağ asitleri yüzdesi olarak verilmiştir.

Çalışmamızda izolatların ham petrol ve değişik hidrokarbonlarda çoğaltılması sonucunda ST5, BT1A ve GC2'de en yüksek OD değerleri, ham petrol ve hegzadekanda elde edilirken 2TP1A'da en yüksek OD değeri ham petrolde tespit edilmiştir. Ham petrolde üreme sonuçları bakımından izolatlar karşılaştırıldığında en yüksek üreme BT1A'da gözlenirken en düşük üreme ise 2TP1A'da tespit edilmiştir. Hidrokarbonlarda üreme sonuçlarına bakıldığında tüm izolatlarda tridekan, hegzadekan, pentadekan ve squalende kontrole göre daha yüksek üreme gözlenmiştir. ST5, BT1A ve GC2'de en yüksek üreme hegzadekanda, 2TP1A'da ise pentadekanda tespit edilmiştir. İzolatların hegzadekanda üreme sonuçları karşılaştırıldığında en yüksek üreme BT1A'da en düşük üreme ise 2TP1A'da tespit edilmiştir. GC2'nin squalen bulunan ortamda kontrole göre kayda değer bir üreme oranına sahip olduğu belirlenmiş olup diğer izolatlara göre daha yüksek oranda ürediği tespit edilmiştir. Tüm izolatların heptan, benzen, toluen, naftalin, flüoranten ve fenantrende üremediği belirlenmiştir.

Çalışmamızda izolatların ham petrolü biyodegradasyon oranlarını belirlemek amacıyla izolatlar %1'lik ham petrol bulunan BSM ortamında 7 gün inkübasyona bırakılarak İnkübsayon sonunda GC analizi yapılmıştır. GC analizi ile 7 günlük inkübasyon ile ST5'in C11-C27, GC2'nin C15-C32, BT1A'nın C11-C34 ve 2TP1A'nın C13-C34 aralığındaki n-alkanları parçaladığı tespit edilmiştir. 7 günlük inkübasyon sonucunda ham petrolde bulunan C11-C34 aralığındaki düz zincirli n-alkanları ST5'in yaklaşık olarak %41, BT1A'nın %83, 2TP1A'nın %41 ve GC2'nin ise %6 oranında degradasyona uğrattıkları tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ham petrolü en iyi degradasyona uğratma oranına sahip izolat BT1A, en düşük izolat ise GC2 olarak belirlenmiştir.

n-Alkanlar biyolojik olarak en fazla parçalanabilen petrol hidrokarbonlarıdır. Aromatik ve naftenik hidrokaronlara göre mikrobiyal türler tarafından daha çok saldırıya uğramaktadırlar. Ancak C5-C10 aralığındaki normal alkanların yüksek konsantrasyonları, degradasyon yapan mikroorganizmalar için inhibitör etkisi yapmaktadır. Çünkü solvent olarak hücre membranının yapısını bozmaktadırlar. Ayrıca alifatik hidrokarbonlar fermente edilemezler ve sadece oksijen varlığında degradasyonları gerçekleşmektedir. Petrol hidrokarbonlarının başlangıç bozulması genellikle oksijenaz enzimlerinin etkisini gerektirir ve bu da moleküler oksijenin varlığına bağlıdır. Aerobik şartlar petrol hidrokarbonlarının başlangıç bozulması için bu

yüzden gereklidir. Sonraki adımlarda nitrat ya da sülfat, elektron alıcısı olarak görev yapabilse de bu aşamalarda da en çok oksijen tercih edilmektedir (Chaerun ve ark. 2004).

Çalışmamızda ST5'in 2 günlük inkübasyon süresinde %1'lik hekzadekanı yaklaşık olarak %5, GC2'nin %6 ve BT1A'nın ise %3 oranında parçaladıkları tespit edilmiştir. Hekzadekanı en yüksek parçalama oranı GC2'de en düşük oran ise BT1A'da elde edilmiştir. Hegzadekan analizi, ham petrol biyodegradasyon analiziyle karşılaştırıldığında GC2 ham petrolü ve içeriğindeki C16'yı en düşük oranda parçalarken sadece hegzadekan bulunan ortamda hegzadekanı en yüksek oranda parçalamıştır. Aynı şekilde BT1A, ham petrolü ve içeriğindeki C16'yı en yüksek oranda parçalarken sadece hegzadekan bulunan ortamda hegzadekanı en düşük oranda parçalamıştır.

Singh ve Lin (2008), literatürde hidrokarbonları parçalayan en yaygın bakteri türlerinin *Acinetobacter* türleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Cormack ve arkadaşları (1997), yaptıkları çalışmada petrol bulaşmış topraktan izole ettikleri, *Acinetobacter* ADH1 olarak etiketlendirdikleri ve *Acinetobacter lwoffii* olarak tanımladıkları bakterinin ham petrol ve orta uzunluktaki düz zincirli dodekan ve hekzadekan gibi alkanlarda ürediği fakat heptan gibi kısa zincirli alkanlarda üreyemediğini belirlemişlerdir.

Benzer bir çalışmada Razak ve arkadaşları (1999), petrolle kirlenmiş topraklardan izole ettikleri ve *Acinetobacter* sp. E1 şeklinde etiketlendirdikleri bakterinin ham petrolü içeren ortamda çoğalarak ham petrolü enerji ve karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. İzolatın sadece alifatik hidrokarbonları içeren ortamda üreyebildiği aksine aromatik ve siklik hidrokarbonların bulunduğu ortamın bakteri üremesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bakterinin alifatik hidrokarbonlardan sadece dodekan, pentadekan ve hekzadekan gibi uzun zincirli alkanların bulunduğu ortamda çoğaldığı fakat pentan, heptan ve dekan gibi kısa zincirli alkanların bulunduğu ortamda çoğalamadığını ve uzun zincirli alkanlardan en fazla hekzadekanı tercih ettiğini rapor etmişlerdir. İzolatın 15 günlük inkübasyon ile %1'lik ham petrol içeriğindeki hidrokarbonların yaklaşık %60'ını degrade ettiğini GC analizi ile belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Hassanshahian ve arkadaşları (2012), petrolle kirlenmiş topraklardan izole ettikleri, BS ve PG3 olarak etiketlendirdikleri iki tane *Acinetobacter calcoaceticus* türünün bir haftalık inkübasyon sonucunda, %1'lik ham petrolü sırasıyla %82 ve %65 oranında parçaladıklarını GC analizi ile belirlemişlerdir. İzolatların ham petrol içeriğindeki uzun zincirli hidrokarbonları kısa zincirli olanlara nazaran daha fazla degradasyona uğrattıklarını rapor etmişlerdir.

Mara ve arkadaşları (2012), petrolle kirlenmiş bölgelerden izole ettikleri *Acinetobacter* türlerinin çoğunun petrolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını belirlemişlerdir. Yapılan analizde hemen hemen tüm izolatların uzun zincirli alkanlarda (C20) kısa zincirli olanlara (C10, C14) oranla daha iyi çoğaldıklarını rapor etmişlerdir.

Yukarıda açıklandığı gibi çalışmamızda *Acinetobacter* cinsine ait oldukları belirlenen ST5, BT1A ve GC2'nin ham petrol ve uzun zincirli alkanlarda üredikleri, en fazla hekzadekanı tercih ettikleri, aromatik ve kısa zincirli alkanlarda üreyemedikleri belirlenmiştir. Görüldüğü gibi yaptığımız çalışma, *Acinetobacter* türleri için yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Samei ve arkadaşları (2012), *Acinetobacter radioresistens*'ın 31 günlük inkübasyon sonrasında %1'lik hekzadekanı %55.27 oranında parçaladığını rapor etmişlerdir.

Tanase ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada petrolle kirlenmiş topraklardan izole ettikleri *Acinetobacter baumanii* MH102'nin dodekan ve dekana oranla hekzadekanı karbon kaynağı olarak daha fazla tercih ettiğini rapor etmişlerdir.

Liu ve arkadaşları (2014), petrol alanlarından izole ettikleri ve *Acinetobacter* sp. LS1 olarak adlandırdıkları bakterinin 7 günlük inkübasyon sonucunda %1'lik ham petrolün %70.3'ünü ve 3 günlük inkübasyon ile %0.2'lik hegzadekanın %65.4'ünü degradasyona uğrattığını rapor etmişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada Phan ve arkadaşları (2013), petrol bulaşmış bölgelerden izole ettikleri *Acinetobacter baumanii* UKMP-12T'nin ham petrolde bulunan hidrokarbonları yaklaşık olarak %62.8 oranında parçaladığını bildirmişlerdir.

Hassanshahian ve arkadaşları (2013), petrol rezervuarlarından izole ettikleri alkanları parçalayan *Stenotrophomonas maltophilia* strain M2 ve *Stenotrophomonas maltophilia* strain Q1'in hekzadekan bulunan mineral ortamda yüksek oranda ürediği ve GC analizi ile %1'lik hegzadekanı 7 günlük inkübasyon sonucunda sırasyıla %74 ve %68 oranında degrade ettiklerini rapor etmişlerdir.

Benzer bir çalışmada Verma ve arkadaşları (2011), pestisit sanayinin atık su arıtma tesisinden izole ettikleri *Stenotrophomonas* strain HPC383'ün 7 günlük inkübasyon sonrasında %0.5'lik ham petrolü GC analizi yöntemini kullanarak %94 oranında parçaladığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 5.5, C18 ve daha uzun zincirli n-alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğinde olan bakteri türleri (Wentzel ve ark. 2007) ve çalışmamızdan elde ettiğimiz ST5, BT1A, GC2 ve 2TP1A'ya ait sonuçları karşılaştırmaktadır. Görüldüğü gibi elde ettiğimiz sonuçlara göre ST5, BT1A, 2TP1A ve GC2, C18 ve daha uzun zincirli alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğinde olan bakteri türleri arasına girmektedir. Bu da çalışmamızda elde ettiğimiz izolatların biyodegradasyon çalışmalarında etkili olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 5.5. C18 ve Daha Uzun Zincirli Alkanları Karbon ve Enerji Kaynağı Olarak Kullanma Yeteneğinde Olan Bakteri Türleri

Bakteri Türü	**n-Alkan Substrat Aralığı**
ST5	C11-C27
BT1A	C11-C34
2TP1A	C13-C34
GC2	C15-C32
Acinetobacter baylyi ADP1	-C36
Acinetobacter calcoaceticus EB104	C9-C18
Acinetobacter calcoaceticus RR8	C10-C34
Acinetobacter lwoffii	C12-C28
Acinetobacter sp. M-1	C13-C44
Acinetobacter sp. ODDK71	C12-C30
Acinetobacter sp. S30	-C33
Acinetobacter sp. DSM17874	C10-C40
Alcaligenes odorans P20	-C33
Alcanivorax borkumensis AP1	C10-C20
Alcanivorax borkumensis SK2	C8-C32
Arthrobacter nicotianae KCC B35	C10-C40
Bacillus thermoleovorans B23 ve H41	C9-C30
Bacillus thuringiensis/cereus A2	C6-C28
Brachybacterium sp.	C10-C20
Burkholderia cepacia RR10	C12-C34
Desulfatibacillum aliphaticivorans CV2803	C13-C18

Dietzia cinnamea P4	C11-C24
Dietzia psychralcaliphila	C13-C24
Geobacillus thermodenitrificans NG80-2	C15-C36
Gordonia sp. TY-5	C3, C13-C22
Marinobacter hydrocarbonoclasticus 617	C16-C30
Marinobacter sp. BC36, BC38 ve BC42	C18
Mycobacterium sp. CH1	C12-C28
Mycobacterium sp. HXN 600	C6-C24
Mycobacterium sp. OFS	C11-C28
Paracoccus sereniphilus/marcusii A7	C6-C28
Paracoccus sp. strains Ophe1ve Sphe1	C10-C28
Planococcus alkanoclasticus MAE2	C11-C33
Pseudomonas aeruginosa PAO1	C12-C24
Pseudomonas aeruginosa RR1	C12-C34
Pseudomonas aeruginosa strains A1, A3, A4, A5, A6	C6-C28
Pseudomonas fluorescens CHA0	C12-C32
Pseudomonas sp. PUP6	C12-C28
Rhodococcus erythropolis	C10-C30
Rhodococcus erythropolis 23-D	C6-C36
Rhodococcus erythropolis	C6-C36
Rhodococcus erythropolis strains 42-O ve 50-V	C6-C32
Rhodococcus fascians 115-H	C6-C32
Rhodococcus fascians 154-S	C6-C24
Rhodococcus rhodochrous	C12-C20
Rhodococcus sp. 1BN	C6-C28

Rhodococcus sp. NCIM5126	C13-C20
Rhodococcus sp. RR12 ve RR14	C14-C34
Rhodococcus sp. strain Q15	C10-C32
Rhodococcus sp. strains T12 ve TMP2	C9-C22
strain AK01	C13-C18
strain HdN1	C14-C20
strain Hxd3	C12-C20
Thalassolituus oleivorans	C7-C20
Thermooleophilum album	C13-C20
Thermus sp. C2	C9-C39
Weeksella sp. RR7	C12-C34
Xylella fastidiosa RR15	C14-C34

Çizelge: Wentzel ve ark. 2007'den modifiye edilmiştir. ST5, BT1A, GC2 ve 2TP1A'ya Ait sonuçlar yaptığımız çalışmadan elde edilmiştir.

Türkiye'nin petrol ihtiyacının çoğu bölgemizden temin edilmektedir. Bölgemiz topraklarında var olan, petrol ve türevlerini ayrıştırma yeteneğindeki bakterilerin izole edilerek teşhis edilmesi, petrol kirliliği bulunan bölgemiz veya kirlilik tehdidi altında olan topraklarımız için ekonomik ve biyolojik biyoremediasyon ürünü elde edilmesi aşamasında önemli bir adım oluşturmaktadır.

Çalışmamızda 7 günlük inkübasyon ile sadece %1'lik ham petrolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı BSM ortamında, ham petrol içeriğindeki düz zincirli alkanları ST5'in yaklaşık %41, BT1A'nın %83, 2TP1A'nın %41 gibi yüksek oranlarda degrade etmeleri bu izolatların biyoremediasyon çalışmaları için oldukça yüksek kullanılma potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre ST5, BT1A, 2TP1A ve GC2, C18 ve daha uzun zincirli alkanları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğinde olan bakteri türleri arasına girmektedir. Bu da çalışmamızda elde ettiğimiz izolatların biyodegradasyon çalışmalarında etkili olabileceğini göstermektedir.

Tüm izolatlar ile yapılan çalışmalara ek olarak gerçekleştirilecek DNA-DNA Hibridizasyonu ile bu izolatların tam olarak tanımlanması sağlanarak adı geçen varyetelerin yeni tür veya alt tür olup olmadıkları tespit edilecektir.

Ayrıca hidrokarbonların etkili bir şekilde biyodegradasyonu için farklı tuz ve mineral konsantrasyonlarında optimizasyonu ve bu biyodegradasyonda görev alan enzimler ile ilgili çalışmalar bu izolatların bu alanda kullanılma potansiyelini ve önemini ortaya çıkaracaktır.

6. KAYNAKLAR

Al-Saleh, E., Drobiova, H., Obuekwe, C. 2009. Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait. ***International Biodeterioration & Biodegradation,*** 63: 400–406.

Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, R.J., Dierstein, R., Tadros, H.M. 2000. Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. ***Microbiological Research***, 155: 157-164.

Altuğ G., Cardak, M., Ciftci P.S., Gürün S. 2007. Petrol hidrokarbonlarının ölüdeniz lagünü ve Marmara Denizi'nden izole edilen bazı bakteriler üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC). ***Türk Sucul Yaşam Dergisi*** 5 (8): 761-766.

Arda, M., 2011. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Serisi no: 71, Sayfa: 551, ANKARA.

Assih, E.A., Ouattara, A.S., Thierry, S., Cayol, J-L., Labat, M., Macarie, H. 2002. *Stenotrophomonas acidaminiphila sp*. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 52: 559–568.

Atlas, R.M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. ***J. Chem. Tech. Biotechnol,*** (52), 149-156.

Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. ***Bioresource Technology*** 97: 868–875.

Barathi, S., Vasudevan, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. ***Environment International***, 26: 413-416

Bergogne-Berezin, E., Towner, K.J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. ***Clinical Microbiology Reviews,*** 9 (2): 148-165.

Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E.,. Pitt, T.L. 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp. İncluding *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. ***Journal of Hospital Infection***, 42: 201–204.

Bilgehan, H. 1999. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, Sayfa: 598, İzmir

Black, J.G. 1996. Microbiology Principles and Applications. Prentice-Hall, Sayfa: 790, New Jersey, USA.

Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P. 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii, E. radicincitans, E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. ***Systematic and Applied Microbiology,*** 36 (5): 309-319.

Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D. 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp**.** nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. ***International Journal of Systematic Bacteriology,*** 36 (2): 228-240.

Busse, H.J, Denner, B.M.E., Lubitz, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. ***Journal of Biotechnology,*** 47: 3- 38.

Ceyhan, N., Esmeray, E. 2012. Petrol kirliliği ve biyoremediasyon***. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,*** 5 (1): 95-101.

Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada R., Kogure, K. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. ***Environment International,*** 30: 911 – 922.

Chaineau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., Oudot, J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. ***The Science of the Total Environment,*** 227: 237-247.

Chaudhary, V.K., Borah, D. 2011. Isolation and molecular characterization of hydrocarbon degrading bacteria from Tannery Effluent. ***International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences,*** 1(2): 110-114.

Chenu, J.W., Cox, J.M. 2009. *Cronobacter ('Enterobacter sakazakii'):* current status and future prospects. ***Letters in Applied Microbiology,*** 49: 153-159.

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ***Clinical Microbiology Reviews***. 17: 840-862.

Cohan, F.M. 2002. What are bacterial apecies. ***Annu. Rev. Microbiol***., 56:457–87.

Collins, M.D., Jones, D., 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. ***Microbiological Reviews***. 45 (2): 316-354.

Collins, M.D., Goodfellow, M. 1979. Isoprenoid quinones in the classification of *Coryneform* and Related Bacteria***. Journal of General Microbiology****,* 110: 127-136.

Cormack, W.P.M., Fraile, E.R. 1997. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. Antarctic Science, 9 (2): 150-155.

Das, K., 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: 1339–1345.

Denton, M., Kerr, K. G. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. ***Clin. Microbiol. Rev.***, 11: 57–80.

Demir, I., Demirbağ, Z. 1999. Polisiklik aromatik hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanması. ***Tr. J. of Biology,*** 23: 293–302.

Di Cello, F., Pepi, M., Bald, F., Fani ,R. 1997. Molecular characterization of an n-alkanedegrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. ***Res. Microbiol,*** 148: 237-249.

Di Martino, C., I. López, I.N., Laura J., Iustman, R. 2012. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas sp.* selected as candidates for bioremediation. ***International Biodeterioration & Biodegradation,*** 67: 15-20.

Doughari, H.M., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. ***Microbes Environ.,*** 26 (2): 101–112.

El-Sharoud, W.M., Brein, S.O., Negredo, C., Iversen, C., Fanning, S., Healy, B. 2009. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. ***BMC Microbiology,*** 9: 24-33.

Erdoğan, E.E. 2010. Petrol ile kirlenmiş toprakaların biyolojik olarak iyileştirilmesinin laboratuvar koşullarında denenmesi. Doktora Tezi, Ankara. 236.

Forysthe, S. 2010. *Cronobacter* species. ***Oxoid,*** 31: 0965-0989.

Fujie, K., Hu, H-Y., Tanaka, H., Urano, K., Saitou, K., Katayama, A. 1998. Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota. ***Soil Sci. Plant Nutr.,*** 44 (3): 393-404.

Garrity, G., Brener, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. 2007. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Second Edition Volume Two, Sayfa: 1134.

Guardabassi L., Dalsgaard A., Olsen J.E. 1999. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. ***Journal of Applied Microbiology,*** 87: 659-667.

Gül Güven, R., 2007. Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmanii*'nin β-galaktozidaz enziminin saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 198.

Gülcan, S. 2006. Çeşitli kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ağır metal ve naftalin toleransı. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsi, Denizli. 80.

Güven, K., Kıvanç, M., Güven, K., Mutlu, M.B., Sarıözlü, N., Demirel, R., Yılmaz, M. 2011. Genel Mikrobiyoloji. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 1961, Sayfa: 256, Eskişehir.

Grim, C.J., Kothary, M.H., Gopinath, G., Jarvis, K.G., Jean-Gilles Beaubrun, J., Mcclelland, M., Tall, B.D., Franco, A.A. 2012. Identification and characterization of *Cronobacter* iron acqouisition systems. ***Applied and Environmental Microbiology,*** 78 (17): 6035-6050.

Hartman, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., Riedel, K. 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. ***Applied and Environmental Microbiology,*** 76 (7): 2251-2261.

Hassanshahian, M., Ahmedinejat, M., Tebyanian, H., Kariminik, A. 2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). ***Marine Pollution Bulletin,*** 73: 300–305.

Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. ***Marine Pollution Bulletin,*** 64: 7–12.

Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. ***Rev. Microbiol.,*** 4: 173–182.

Hedrick, D.B., White, D.C. 1986. Microbial respiratory quinones in the environment. ***Journal of Microbiological Methods***, 5: 243-254.

Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaele, F., Lebbe, L., De Vos, P. 2007. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 57: 2056–2061.

Hiraishi, A. 1999. Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 88(5): 449-460.

Huang, L., Xie, j., Lv., B., Shi, X., Li, G., Liang, F., Lian, J. 2013. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. ***Marine Pollution Bulletin,*** 76: 325–332.

Huy, N.Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Bahuu, N., Hang, D.T., Camha, D., Imanaka, T., Morikava, M., Kanaya, S. 1999. Characterization of petroleum- degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. ***Journal of Bioscience and Bioengineerig,*** Vol. 88 (1): 100-102.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp.

nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. ***BMC Evolutionary Biology,*** 7:64.

Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 58: 1442–1447.

Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M. 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii)* from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. ***BMC Microbiology,*** 9: 225-236.

Jaradat, Z.W., Rashdan, A.M., Ababneh, Q.O., Jaradat, S.A., Bhunia, A.K. 2011. Characterization of surface proteins of *Cronobacter muytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry**. *BMC Microbiology,*** 11: 148-161.

joo, H.S., Ndegwa, P.M., Shoda, M., Phae, C.G. 2008. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. ***Environmental Pollution,*** 156: 891-896.

Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., Forysthe, S.J. 2012. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence Typing. ***Journal of Clinical Microbiology,*** 50 (9): 3031-3039.

Jyoth, K., Babu, S.K., Clara, N., Kashyap, A. 2012. Identification and isolation of hydrocarbon degrading bacteria by molecular characterization. ***Heli,.*** 2: 105-111.

Kaparullina, E., Doronina, N., Chistyakova, T., Trotsenko, Y. 2009. *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. ***Systematic and Applied Microbiology,*** 32: 157–162.

Kato, T., Haruki, M., İmanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S. 2001. Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep

subterranean petroleum reservoirs. ***Journal of Bioscience and Bioengineering,*** 91(1): 64-70.

Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. ***Prokaryotes,*** 5: 3-37.

Kim, D., Baik, K.S., Kim, M.S. Park, S.C., Kim, S.S., Rhee, M.S., Kwak, Y.S., Seong, C.N. 2008. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. ***The Journal of Microbiology,*** 46 (4): 396-401.

Kim, H.B., Srinivasan, S., Sathiyaraj, G., Quan, L.H., Kim, S.H., Bui, T.P. N., Liang, Z., Kim, Y.J., Yang, D.C. 2010. *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 60: 1522–1526.

Kucerova, E., Joseph, S., Forysthe, S. 2011. The *Cronobacter* genus: ubiquityand diversity. ***Quality Assurance and Safety of Crops & Foods,*** 3: 104-122.

Lee, H.J., Lee, S.S. 2010. *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a β-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment Plant. ***The Journal of Microbiology,*** 48 (6): 754-759.

Lee, M., Woo, S-G., Chae, M., Shin, M-C., Jung, H-M., Ten, L.N. 2011. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 61: 598–604.

Lin, T-C., Shen, F-T., Chang, J-S., Young, C-C., Arun A.B., Lin, S-Y., Chen, T-L. 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. ***Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,*** 40: 580–582.

Logan, N.A. 1994. Bacterial Systematic, google elektronik kitap, Sayfa: 272.

Ludwig, W. 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. ***International Journal of Food Microbiology,*** 120: 225–236.

Ludwig, W., Strunkb, O., Klugbauer, S., Klugbaueri, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. ***Eiectrophoresis***, 19: 554-568.

Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y., Chen, H., Wang, F., Masakorala, K., Yu, C., Cai, M., Blake, R.E., Choi, M.M.F. 2014. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oil field, China. ***International Biodeterioration & Biodegradation,*** 87: 52-59.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Sayfa: 992, Ankara.

Mahjoubi, M., jaouani, A., Guesmi, A., Amor, S.B., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N., Cherif , A. 2013. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. ***New Biotechnology,*** 30: 723-733.

Maidak, B. L., Cole, J.R., Parker, C.T.J., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M. & Woese, C.R. 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). ***Nucl. Acids Res.*** 27: 171-173.

Malatova, K. 2005. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in western New York State. Yüksek Lisans Tezi, Rochester Institute of Technology, Rochester. 102.

Mandri, T. Lin, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. ***African Journal of Biotechnology,*** 6(1): 023-027.

Mara, K., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Papaleo, M.C., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M., Vaneechoutte, M., Nemec, A., van den Barselaar, M., Dijkshoorn, L., Fani, R. 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. ***Research in Microbiology,*** 163: 161-172.

Margesin, R., Hammerle, M., Tscherko, D. 2007. Microbial cctivity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. ***Microbial Ecology,*** 53: 259-269.

Mehdi, H., Giti, E. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. ***International Biodeterioration & Biodegradation,*** 62: 170–178.

Naeem, T., Absar, M., Somily, A.M. 2012. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* at a teaching hospital in Riyadh, Saudi Arabia. ***J Ayub Med Coll Abbottabad,*** 24(2): 30-33.

Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., De Baere, T., van der Reijden, T.J.K., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L. 2009. *Acinetobacter beijerinckii sp.* nov. and *Acinetobacter gyllenbergii sp.* nov., haemolytic organisms isolated from humans. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 59: 118–124.

Nicolaus, B., Manca, M. C., Lama, L., Esposito, E., Gambacorta, A. 2001. Lipid modulation by environmental stresses in two models of extremophiles isolated from Antarctica. ***Polar Biol.*** 24: 1-8.

Nishimura, Y., Ino, T., IIzuka, H. 1988. *Acinetobacter radioresistens sp.* nov. isolated from cotton and soil. ***İnternational Journal of Systematic Bacteriology*** 38 (2): 209-211.

Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., Shen, Q. 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3**. *Biotechnology Advances,*** 28: 635–643.

Nwaogu, A.L., Onyeze, G. O. C., Nwabueze, R. N. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. ***African Journal of Biotechnology,*** 7 (12): 1939-1943.

Özçelik, S. 1998. Genel Mikrobiyoloji (İkinci Basım) Süleyman Demirel Üniversitesi Yayını No: 1. Atabey / Isparta, 259 sayfa.

Petrol erişim [http://tr.wikipedia.org/wiki/Petrol]. Erişim tarihi: 04.08.2014.

Phan, C.W., Bakar, N.F.A., Hamzah, A. 2013. A comparative study on biosurfactant activity of crude oil-degrading bacteria and its correlation to total petroleum hydrocarbon degradation. ***Bioremediation Journal,*** 17(4): 240-251.

Proteobacteria. Erişim[http://en.wikipedia.org/wiki/Proteobacteria#Externallinks]. Erişim Tarihi: 06.11.2013.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. ***Bioresource Technology,*** 85: 257–261.

Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage; proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. ***Int. J. Sys. Bacteriol.,*** 46: 1088-1092.

Ratledge, C., Wilkinson, S.G. 1988. Microbial Lipids. Volume: 1, Sayfa: 488, London.

Razak, C.N.A., Wang, W., Rahman, S.H.S.A., Basri, M., Salleh, A.B. 1999. Isolation of the crude oil degrading marine *Acinetobacter sp.* Ell. ***Acts Biotcchnol.,*** 19 (3): 213-223.

Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., Van der Lelie, D., Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas.* ***Nature Reviews Mikrobiology,*** 7: 514-525.

Richard, J.Y., Vogel, T.M. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. ***International Biodeterioration & Biodegradation***, 44: 93-100.

Samaei, M.R., Mortazavi, S.B., Bakhshi, B., Jafari, A.J. 2012. Isolation and characterization of bacteria degrading n-hexadecane from Soil**.** ***International Conference on Biological and Life Sciences IPCBEE,*** 40: 132-135.

Samonis, G., Karageorgopoulos, D.E., Maraki, S., Levis, P., Dimopoulou, D. 2012. Spernovasilis, N.A., Kofteridis, D.P., Falagas, M.E. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. ***Plos one,*** 7(5): 1-7.

Sasser, M. 2009. Microbial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical note, Sayfa: 1-6.

Schleifer, K.H. 2009. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. ***Systematic and Applied Microbiology,*** 32: 533–542.

Schloter, M., Lebuhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. ***FEMS Microbiology Reviews***, 24: 647-660.

Singer, M.E., Tyler, S.M., Finnerty, W.R. 1985. Growth of *Acinetobacter* sp. strain HOI-N on n-hexadecanol: physiological and ultrastructural characteristics. ***Journal of Bacteriology,*** 162 (1): 162-169.

Singh, C., Lin, J. 2008. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South. ***African Journal of Biotechnology,*** 7 (12): 1927-1932.

Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., Trüper, H.G. 1988. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple Bacteria and Their Relatives". ***International Journal of Systematic Bacteriology,*** 38(3): 321-325.

Strydom, A. 2011. Phylogeny and Molecular İdentification of *Cronobacter* strains isolated from South African food products. Yüksek Lisans Tezi, Stellenbosch University Department of Food Science Faculty of AgriSciences, Stellenbosch. 95.

Tanase, A.M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., Stoica, I. 2013. Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. ***International Biodeterioration & Biodegradation,*** 84: 150-154.

Tankoviç, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Buisson-Brun, C., Duval, J. 1994. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* characterization of a hospital outbreak of by phenotypic and genotypic typing methods. ***Journal of Clinical Microbiology,*** 32 (11): 2677-2681.

Toledo, L.F., Calvo, C., Rodelas, B., Gonzalez-Lopez, J. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. ***Systematic and Applied Microbiology,*** 29: 244–252.

Türkoğlu, B. 2006. Kirlenmiş topraklar ve kirlenmiş toprakların ıslahı. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.134.

Urszula, G., Izabela, G., Danuta, W., Sylwia, L. 2009. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilla* Possesing a varioıs dioxygenases for monocyclic hydrocarbon ***Degradation. Brazilian Journal of Microbiology,*** 40: 285-291.

van Niel, E. W. J., de Best, J. H., Kets, E. P. W., Bonting, C. F. C., Kortstee, G. J. J. 1999. Polyphosphate formation by *Acinetobacter johnsonii* 210A: effect of cellular energy status and phosphate-specific transport system. ***Appl Microbiol Biotechnol,*** 51: 639-646.

Vaz-Moreira I., Novo A., Hantsis-Zacharov E., Lopes A.R., Gomila M., Nunes OC., Manaia C.M., Halpern M. 2011. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater**. *Int J Syst Evol Microbiol.,*** 61: 2837-2843.

Verma, V., Raju, S.C., Kapley, A., Kalia, V.C., Kanade, G.S., Daginawala, H.F., Purohit, H.J. 2011. Degradative potential of *Stenotrophomonas* strain HPC383 having genes homologous to dmp operon. ***Bioresource Technology,*** 102: 3227–3233.

Vandamme,P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. ***Microbiological Reviews,*** 60(2): 407–438.

Wang, X. B., Chi, X. O., Nie, Y., Tang, Y-Q., Tan, Y., Wu, G., Wu, L. X. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. ***Bioresource Technology,*** 102: 7755–7761.

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

Whittaker P. 2011. Identification of six species in the new genus *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) from culture using gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters***. Journal of AOAC International,*** 94: 1581-1584.

Wisplinghoff, H., Edmond, M.B., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenze, R.P., Seifert, H. 2000. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* Species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. ***Clinical Infectious*** Diseases**,** 31: 690–697.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating Oil. ***Current Microbiology,*** 49: 415-422.

Yang, H-C., Im, W.T., Kang, M.S., Shint, D-Y**.,** Lee, S.T. 2006. *Stenotrophomonas koreensis sp.* nov., isolated from compost in South Korea. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,*** 56: 81–84.

Yi, H., Srinivasan, S., Kim, M.K. 2010. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., Isolated from soil of a ginseng field. ***The Journal of Microbiology,*** 48(1): 30-35.

Yoon, J-H., Kang, S.J., Oh, H.W., Oh, T.K. 2006. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** 56: 1363–1367.

Yuste, L., Corbella, M. E., Jesus Turiegano, M., Karlson U., Puyet A., Rojo, F. 2000. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing***. FEMS Microbiology Ecology,*** 32: 69-75.

Zhang, Z., Hou, Z., Yang C., Ma, C., Tao F., Xu, P. 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8**.** ***Bioresource Technology,*** 102: 4111-4116.

Zhang Z., Gai, L., Hou Z., Yang, C., Mab. C., Wangd, Z., Sun, B., He, X., Tang, H., Xu, P. 2010. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. ***Bioresource Technology***, 101: 8452–8456.

Zeigler, R.D. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 53: 1893–1900.

Zheng, C., He, J., Wang, Y., Wang, M., Huang, Z. 2011. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus strains*. ***Bioresource Technology,*** 102: 9155–9161.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Ömer ACER

Doğum tarihi ve yeri : 28.12.1980/ Diyarbakır

Elektronik posta adresi : oacer21@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Eğitim derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Dicle Ünv./ Fen Bilimleri Enstitüsü	2014
Yüksek Lisans	Dicle Ünv./Fen Bilimleri Enstitüsü	2010
Lisans	Dicle Ünv. Eğitim Fak. Biyoloji Öğretmenliği	2008

Yurt Dışı Mesleki Deneyim

Institute of Biomolecular Chemistry of the National Council of Research ICB-CNR (Pozzuoli, Naples, Italy). 17 Nisan -17 Temmuz 2013

Yabancı Dil: ÜDS (İngilizce) sınav puanı: 87.5

Yayınlar

1 Annarita Poli, Kemal Guven, Ida Romano, Hamsi Pirinccioglu, Reyhan Gul Guven, Jean Paul Marie Euzeby, Fatma Matpan, Omer Acer, Pierangelo Orlando, Barbara Nicolaus, 2012. *Geobacillus subterraneus* subsp. aromaticivorans subsp. nov., a novel thermophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a hot spring in Sırnak, Turkey. ***The Journal of General and Applied Microbiology***, Volume: 58, Pages: 437-446.

Bildiriler

1. Acer, O., Matpan-Bekler, F., Gul-Guven, R., Pirinccioglu, H., Kaplan, A., Guven, K. 2010. Effects of various inhibitors on α-amylase in *Anoxybacillus sp.* AH1 isolated from hotspring, 35th Febs Congress Molecules of life, Göteborg (Gothenburg)/ Sweden. ***The Febs Journal***, Volume: 277 Pages: 267-267 Suppl. 1

2. Acer, Ö., Pirinççioğlu, H., Kaplan, A., Matpan, F., Güven, K. 2010. Termofilik *Anoxybacillus sp.* AH1'in α-amilaz enzimi üzerinde çalışmalar, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli. Kongre bildiri özet kitabı syf: 233

3. Kaplan, A., Gul-Guven, R., Matpan-Bekler, F., Acer, O., Guven, K. 2010. Characterization of an extracellular β-galactosidase produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* KG9 isolated from hot spring in Batman-Turkey, 35th Febs Congress Molecules of life, Göteborg (Gothenburg)/ Sweden. ***The Febs Journal,*** Volume: Volume: 277 Pages: 200-200 Supp. L

4. Pirinççioğlu, H., Matpan, F., Gul-Guven, R., Acer, Ö., Güven, K. 2010. Güçlükonak (Şırnak) sıcak su kayanaklarından *Geobacillus* sp. izolasyonu ve karakterizasyonu, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli. Kongre bildiri özet kitabı syf: 930

5. Alevcan Kaplan, Reyhan Gül Güven, Fatma Matpan, Ömer Acer, Kemal Güven, Sıcak su kaplıcasından izole edilen termofilik *Bacillus licheniformis* KG9'un ekstrasellüler β-galaktozidaz enzimi üzerine çeşitli inhibitörlerin etkisi, 2010. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi.

6. Nazenin Ahmetoglu, Fatma Matpan Bekler, Reyhan Gul Guven,Omer Acer, Kemal Guven. 2011. Characterisation of a partially purified protease from Bacillus cereus KG5 isolated from a hot spring, European Biotechnology Congreess 2011 Istanbul. ***Abstracts/Current Opinion in Biotechnology,*** 22S Pages: 588-588.

7. Reyhan Gul Güven, Fatma Matpan Bekler, Hasan Kaya, Omer Acer Kemal Guven, Hamdi Temel. 2011. Isolation and identification of petroleum degrading bacteria, European Biotechnology Congreess 2011 Istanbul. ***Abstracts/Current Opinion in Biotechnology***, 22S Pages: 573-573

8. Ömer Acer, Reyhan Gül Güven, Fatma Matpan Bekler, Kemal Güven. 2012. Diyarbakır ve Batman'dan petrolle kirletilmiş topraklardan petrol parçalayan bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Kongre bildiri özet kitabı syf: 87.

9. Fatma Matpan Bekler, Kemal Güven, Peter Stougaard, Reyhan Gül-Güven, Ömer ACER. 2012. Termofilik *Bacillus licheniformis* KG9'dan termostabil β-galaktosidaz geninin izolasyonu ve *Escherichia coli*'de ekspresse olan rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Kongre bildiri özet kitabı syf: 106.

10. Ömer Acer, Annarita Poli, Fatma Matpan-Bekler, Reyhan Gül Güven, Kemal Güven, Barbara Nicolaus. 2014. Isolation and characterisation of petroleum-degrading bacteria from petroleum contaminated soils. 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress 2014 Bosna-Herzigovina. ***Abstract Book***, Pages: 236-236

11. Reyhan Gul-Guven, Kemal Guven, Mehmet Dogru, Fatma Matpan Bekler, Omer Acer. 2014. Characterization of polyphenoloxidase isolated from portulaca oleracea. ***Abstract Book,*** Pages: 90-90.

Proje Bilgileri

1. DÜBAP-09-FF-51 Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin biyoteknolojik açıdan önemli enzimleri üzerinde çalışmalar-araştırmacı.2009-2011
2. DÜBAP-09-FF-50 Dargeçit ile Göçlükonak sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri izolasyonu ve karakterizasyon-araştırmacı. 2009—2012
3. DÜBAP-12-FF-10 Termofilik *Bacillus licheniformis* KG9'a ait β-galaktosidaz geninin *Escherichia coli*'ye aktarılması ve enzimin karakterizasyonu-araştırmacı. 2012-2012
4. DÜBAP-12-FF-87 Çeşitli pestisitlerin *Gammarus kischineffensis*'in antioksidan enzim sistemi ve bazı biyobelirteçler üzerine etkisi-araştırmacı. 2012-2013
5. DÜBAP-12-FF-149 Diyarbakır ve Batman'dan petrolle kirletilmiş topraklardan petrolü parçalayan bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu. 2012-2014