

HAM PETROL İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARIN BİYOREMİDASYON SÜRECİNDE YAĞ ASİTLERİNDEKİ (FLYA-FLME) DEĞİŞİMLER

¹Esin (Eraydın) ERDOĞAN, ²Fikrettin ŞAHİN, ¹Ayten NAMLI

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Dışkapı- Ankara, Türkiye

²Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kadıköy-İstanbul, Türkiye

¹esineraydin@hotmail.com

(Geliş/Received: 29.05.2013; Kabul/Accepted in Revised Form: 03.03.2015)

ÖZET: Bu çalışmada amaç ülkemizde petrol bulaşmasından kaynaklanan toprak kirliliği sorunlarına karşı "Biyoremidasyon" olarak bilinen ve biyolojik yöntemler ile toprağın yerinde iyileştirilmesi prensibine dayanan yaklaşımlar geliştirmek ayrıca başlangıç ve final topraklarında bulunan yağ asidi profiline ortaya koymaktır. Bu amaca yönelik olarak laboratuvar koşullarında oluşturulan üç temel biyoremidasyon uygulamasının (biyolojik çoğalm, biyolojik uyarım ve bu iki yaklaşımın birleşik uygulaması) ham petrolden kaynaklanan kirliliğin giderilmesindeki etkinliği test edilerek toprakların yağ asidi profili ortaya konmuştur. Biyolojik çoğalm uygulamaları altında, Adana, Batman ve Adıyaman'ın petrol ile kirlenmiş topraklarından izole edilen ham petrollü ortamda en iyi gelişmeyi gösteren ve ham petrolü parçalama düzeyleri en yüksek olan 6 bakteri seçilmiştir. (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* biotype A, *Citrobacter amalonaticus*-GC subgroup A, *Acinetobacter genomospecies*). Biyolojik uyarım uygulamaları altında hümik-fülvik asit olmak üzere organik materyalin ve birleşik uygulamalarda ise bakteri karışımı ile organik materyalin farklı birleşimlerinin 120 günlük bir inkübasyon sürecinde ne kadar ham petrol ayrıştırdığı niceliksel hidrokarbon analizleri ile belirlenmiştir. En yüksek petrol ayrışmasının %56 ile bakteri karışımı uygulanmış biyolojik çoğalm uygulamaları altında meydana gelmiştir. Değişik organik materyallerin kirli toprağa karıştırıldığı biyolojik uyarım koşullarında ise %18 düzeyinde bir petrol ayrışması görülmüştür. Birleşik uygulamalarda petrol ayrışması açısından %30'luk bir başarı sağlanmıştır. Temiz topraklarda ve petrol ile kirlenmiş topraklarda en fazla 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0, 16:1 w7c, 17:0ai, 18:2w6,9, 18:1w9c yağ asitleri tespit edilmiştir. 18:1w9c yağ asidinin yüksek değerler gösterdiğinden *Pseudomonas* spp. bakterilerine özgü yağ asidi olduğunu vurgulayabiliriz. 15:0 anteiso yağ asidi değerleri temiz topraklara kıyasla petrol ile kirlenmiş topraklarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Petrollü ortamda gram pozitif bakterilerin varlığının arttığını vurgulayabiliriz.

Anahtar Kelimeler: Toprak, ham petrol, bakteri, biyoremidasyon, FLYA-FLME

PLFA-FAME Changes During Bioremediation of Crude Oil Contamination Soil

ABSTRACT: This study aims to develop certain perspectives based on the principle of on-site remediation of the soil through biological means which is known as "bioremediation" against soil pollution issues resulting from fuel contamination in our country and to reveal the fatty acid profile in the final soils. The fatty acid profile of the soils were pointed out by testing the activity of three basic bioremediation applications (biological multiplication, biological excitation and the combined application of these two approaches) established in the laboratory environment for this aim. Under biological multiplication applications, 6 strains of bacteria were selected which exhibit the highest growth in crude oil environment isolated from oil-contaminated soils of Adana, Batman and Adıyaman and which have the highest levels of crude oil degradation. (*Pseudomonas aeruginosa*,

Pseudomonas putida biotype A, *Citrobacter amalonaticus*-GC subgroup A, *Acinetobacter genomospecies*). Under biological excitation applications, the organic materials being humic-fulvic acid and, in combined applications, different combinations of bacteria mixture and organic materials were examined as to the amount of crude oil they degrade in an incubation period of 120 days by qualitative hydrocarbon-type analyses. The highest level of oil degradation, being %56, occurred under biological multiplication applications where the bacteria mixture was applied. Under biological excitation conditions where various organic materials were applied to the contaminated soil, degradation to %18 was observed. In combined applications, oil degradation was achieved to %30. In unpolluted and oil-contaminated soils, max. 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0, 16:1 w7c, 17:0ai, 18:2w6,9, 18:1w9c fatty acids were detected. Because the fatty acid 18:1w9c exhibited high levels, we may emphasize that it is a fatty acid typical to the bacteria *Pseudomonas* spp. It was determined that the levels of the fatty acid 15:0 anteiso is higher in oil-contaminated soils than in unpolluted soils. We may emphasize that the existence of gram positive bacteria increases in oil-contaminated environment.

Key Words: Soil, crude oil, bacteria, bioremediation, PLFA-FAME.

GİRİŞ (INTRODUCTION)

Margesin ve Schinner, (1997) Topraklarda, mevcut mikroorganizma sayıları ve türleri, mikrobiyal ayrışma için uygun şartlar (oksijen, besin maddesi, sıcaklık ve pH), hidrokarbonların mikrobiyal ayrışma oranı, kirleticilerin kantititesi; kalitesi ve biyolojik yararı ve partikül dağılımı gibi toprak özelliklerini içeren biyolojik ve fizikokimyasallar olaylar tarafından etkilenmekte olduğunu açıklamışlardır (Atlas, 1981, Atlas ve Bartha, 1992; Steffan vd., 1997; Morgan ve Watkinson, 1989).

Kapley vd., (1999), hidrokarbonları parçalayan mantarları araştırdıkları bir çalışmada *Emericella nidulans*, *Graphium putredinis*, *Eupenicillium javanicum* ve *Aspergillus flavipes* türlerinin aromatik hidrokarbonların asimilasyonunda aktif olduğunu gözlemişlerdir ve toprak kökenli *Pseudomonas* türü bazı bakteriler (*P. putida*) ham petrolün bazı fraksiyonlarını parçalama yeteneğinde olduklarını açıklamışlardır. Jürgensen vd., (2000) petrol ile kirlenmiş topraklarda kompostlama çalışmasından elde ettikleri izolatlarda 3 numaralı kompost uygulamasından 4 farklı bakteri türü tanımlamışlardır, *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus mycoides*, *Klebsiella oxytaca* ve *Acinetobacter calcoaceticus*, 1 numaralı kompost uygulamasından *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas diminuta*, *Gluconobacter cerenius*, *Pasteurella caballi*, 2 numaralı kompost uygulamasından *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingobacterium multivorum* ve birçok tanımlanamayan bakteri izolasyonu yapmışlardır. Obire ve Okudo (1997), Bailey vd., (2002), yaptıkları çalışmada, mikroorganizma popülasyonlarının petrol ile kirlenen çevrede nispeten temiz çevredeki mikroorganizmalardan farklı oranda bulduklarını açıklamışlardır. Bailey vd., (2002)'e göre toprak mikrobiyal varlığı; toprakta besin maddesi döngüsünden ve taşınımından sorumludur ve bu mikrobiyal varlığı toplam ekstrakte edilebilir fosfolipit yağ asiti (PLFA) yöntemi ile belirlemişlerdir Kishore ve Ashis, (2007) *Bacillus subtilis* (DM-04), *Pseudomonas aeruginosa* (M) ve Güneydoğu Hindistanda petrol ile kirlenmiş bir bölgeden izole ettikleri bakterileri topraksız invitro ve kirli toprak koşullarında test etmişlerdir. Topraksız ortamda *P. aeruginosa* (M) bakterisinin *Bacillus subtilis* (DM-04)'e göre daha etkin olduğunu belirlemiş ve petrolü toprak deneyinde 120 gün süren inkübasyon süreci sonunda *P. aeruginosa* (M) ve kirli toprak izolatının %100'e varan bir ayrışma sağlarken *Bacillus subtilis* DM-04'ün %50 düzeyinde ayrışma sağladığını kaydetmişlerdir.

Petrol ve petrol ürünlerinin (PPÜ) bünyesini oluşturan belirli hidrokarbonlara veya hidrokarbon gruplarına yönelip kısa sürede onları tüketerek bulunduğu ortamdan uzaklaştıran mikroorganizmalar üzerine yapılmış çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte toprak mikroorganizmaları kullanılarak toprakta hidrokarbon ayrışmasının etkin bir şekilde giderilip giderilemeyeceği noktasındaki bilgi birikimimiz henüz sınırlıdır. Ayrıca bu tür mikroorganizmalar veya mikroorganizma karışımları dünyanın farklı coğrafyalarında, farklı çevresel koşullar altındaki toprak ekosistemlerinde incelenmiştir. Türkiye sınırları içinde PPÜ'ne bağlı kirliliğin giderilmesi konusunda ülkemizin bulunduğu çevresel koşullarda, laboratuvar ve arazi çalışmaları ile test edilmesi gerekmektedir. Bu

bağlamda araştırmanın temel hedefi, gelecekte ortaya çıkabilecek petrol ve benzeri organik kirleticilerin ortadan kaldırılmasında faydalanılabilecek bir yöntem ve materyal geliştirmektir. Bunun için temel olarak petrol ve benzeri organik kirleticilerin elimine edilmesinde ekonomik ve çevreye dost "biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon)" yaklaşımı model alınacaktır. Buna ek olarak başlangıç ve final topraklarında bulunan yağ asidi profilini ortaya koymaktır. Bu amaca yönelik olarak laboratuvar koşullarında oluşturulan üç temel biyoremediasyon uygulamasının (biyolojik çoğalm, biyolojik uyarım ve bu iki yaklaşımın birleşik uygulaması) ham petrolden kaynaklanan kirliliğin giderilmesindeki etkinliği test edilerek toprakların yağ asidi profilinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD (Material and Methods)

Materyal (Material)

Deneysel kirlilik koşullarının oluşturulacağı toprak materyalinin temini

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği deneme tarlalarından sağlanan toprak materyali (yaklaşık olarak 40kg, 0-20cm derinlikten alınmıştır) 2mm'lik elekten elenerek laboratuvara getirilmiştir.

Kirletici materyal

Ham petrol, Türkiye Petrolleri Anonim ortaklığı (TPAO)'nın Kırıkkale Rafineri tesislerinden temin edilmiştir.

Biyolojik çoğalm materyalinin temini (BAK :Bakteri)

i) Batman rafinerisi rafineri atıkları biriktirme sahası, 0-20cm derinlikten alınan örnekler: atık1 ve 20-40 cm derinlikten alınan örnekler: atık 2, ii) Adıyaman TPAO petrol kuyuları istasyon içi petrol suyu biriktirme alanından, iii) Adana'da bulunan "BTC ham petrol yükleme terminal sahasından alınan bütün örnekler analiz aşamasına kadar +4°C'de saklanmıştır.

Biyolojik uyarım materyali (HFA)

Biyolojik uyarım materyali olarak piyasada satılan HFA olarak kodladığımız (K- humat) toprak düzenleyicisi kullanılmıştır.

METOD (Method)

Biyoremediasyon amaçlı kullanılan toprağın hazırlığı

Bu çalışmada kullanılmak üzere alınan toprak, biyolojik iyileştirme uygulamaları ile ilgili bütün ön denemeler ve hazırlıklar tamamlandıktan sonra son deneme kurulmadan bir hafta önce alınmış ve oda sıcaklığında korunmuştur. Bunun nedeni toprak özellikleri mümkün olduğunca alındığı andaki koşullara yakın iken çalışmaya başlamaktır.

Bakterilerin petrol ile kirlenmiş topraklardan izolasyonu

Batman rafinerisi rafineri atıkları biriktirme sahası, ii) Adıyaman TPAO petrol kuyuları istasyon içi petrol suyu biriktirme alanından ve iii) Adana'da bulunan "BTC Ceyhan Ham petrol yükleme terminal sahasından alınan örneklerde izolasyon amaçlı aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

10 gr toprak örneği, 1 g KNO₃, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl₂ g, 1 g K₂HPO₄ içeren 1 L besiyerine %1 oranında ham petrol: Triton-X-100 emülsiför (1:1) ilave edilerek 3 gün boyunca 28°C'de 180 dev/dak.'da inkübasyona bırakılmıştır. 3. gün sonunda bu besiyerinden 10 ml alınarak tekrar aynı bileşenleri içeren taze ortama alınmıştır (Rojas-Avelizapa vd., 1999; Erdoğan, 2010; Erdoğan vd., 2011).

İzole edilen bakterilerin MIS (Mikrobiyal Tanımlama Sistemi) tanımlaması

Saf biyoremediasyon bakteri kültürlerinde yapılan FLYA analizi Miller ve Berger, (1985) tarafından bildirildiği gibi Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Microbial Identification System-MIS; MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarlarının (yağ asidi profili) aynı olup çevre koşulları aynı olduğu sürece değişmemesini esas almaktadır (Şahin, 1997; Şahin vd., 1999; Erdoğan vd., 2011).

Biyoremediasyon Uygulamaları

Deneyisel kirlilik koşulların hazırlanması

Fırın-kuru koşullarda 1000 gr'lık plastik saksılara tartılan ve su tutma kapasitesinin %50'si düzeyinde nemlendirilen toprak örnekleri on gün süre ile 25°C'de ön-inkübasyona alınmıştır. Üç günlük ön-inkübasyon sonunda ağırlık bazında %1 (w/w) düzeyinde ham petrol homojen bir şekilde uygulanarak toprak örnekleri kirletilmiştir. Örneklerdeki mikrobiyal aktivitenin petrol ilavesi sonrasındaki yeni koşullara uyum sağlaması açısından 3 – 4 gün süreyle, 25°C'de inkübe edilmiştir (Stabilizasyon). Temiz toprak materyali de oda koşullarında aynı zaman aralıklarında dinlendirilmeye alınmıştır.

Biyoremediasyon bakterileri karışım kültürlerinin hazırlanması

Sıvı kültürde petrol parçalama yetenekleri belirlenerek seçilen 6 adet bakteri suşu 10¹⁰ CFU/ml'lik bakteriyel yoğunluk sağlandıktan sonra homojen bir şekilde temiz ve kirli topraklara püskürtülerek uygulanmıştır (Erdoğan, 2010; Erdoğan vd., 2011).

Deneme Deseni

Çizelge 2.1 Deneme Deseni

Uygulama Numarası	Uygulamalar	Uygulamanın İçeriği
1	*BAK + *BE	Biyolojik Çoğalm,
2	*HFA + *BE	Biyolojik Uyarım
3	*BAK + *HFA + *BE	Kombine Uygulama (1+2)
4	K + *BE	Kontrol (temel gübreleme)

*BAK: Bakteri Karışımı *BE: Besin Elementi *HFA: Humik Fulvik Asit

Deneme 5'er kilogramlık plastik ağzı kapaklı kaplarda kurulmuştur. 1, 30, 60, 90. ve 120. günlerde örneklemeler yapılmıştır. Her örneklemeye de Ham Petrol ayrışmasının izlenmesi için TPH analizleri ve kültürel sayım (1., 30., 60., 90. ve 120. günlerde) ve toprak topluluk yapısının incelenmesi için direkt topraktan ekstrakte yöntemi ile FLYA metil esteri analizi (1., 30., 60., 90. ve 120. günlerde) yapılarak sadece kullanılacak biyoremediasyon bakterilerine özgü "indikatör-yağ asiti metil esteri" belirlemeleri yapılmıştır (Erdogan, 2010).

Biyoremediasyon Uygulamalarının Etkinliğinin Belirlenmesi

Toprakta ham petrol-ayrışmasının izlenmesi

Denemenin 1., 30., 60., 90. ve 120. günlerinde alınan toprak örneklerinde petrol analizleri, kromatografik analiz sonuçları (Toplam Petrol Hidrokarbonları) ham petrolün ne kadarının ayrıştığı mgkg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu analizler ASE cihazı (Dionex ASE 300) ile TPAO-Araştırma Merkezi Jeokimya Laboratuvarlarında yapılmıştır (EPA method 3545).

Kullanılan biyoremediasyon bakterilerinin belirleyici özelliklerinin FLYA metil esteri (FAME) analizi ile belirlenmesi

Laboratuvar koşullarında ham petrole dirençli hale getirilen petrol parçalayan bakterilerin petrol bulaşmış ve bulaşmamış toprak ortamlarında yaşam durumlarının izlenebilmesi için direkt topraktan ekstrakte yöntemi ile FLYA analizi yapılarak sadece kullanılacak biyoremediasyon bakterilerine özgü “gösterge-yağ asiti metil esteri” belirlenmiştir. Bu prosedürün esası topraktan ekstrakte edilen mikrobiyal canlılar orta şiddette bir alkali-hidrolyze maruz bırakılarak hücrelerin parçalanması; ester bağlarının kırılarak yağ asitlerinin lipidlerden ayrılması ve metil esteri formuna dönüştürülen yağ asitlerinin gaz kromatografik sistemde (GC) niceleyici (%) ve niteleyici olarak analiz edilmesi şeklinde ifade edilebilir. Bligh ve Dyer, (1959); Sasser, (1990); Zelles vd., (1992); Frostegard vd., (1993); Bossio vd., (1998); Ibekwe ve Kennedy, (1998)’de bu analiz yöntemini kullanarak çalışmalarına yön vermişlerdir.

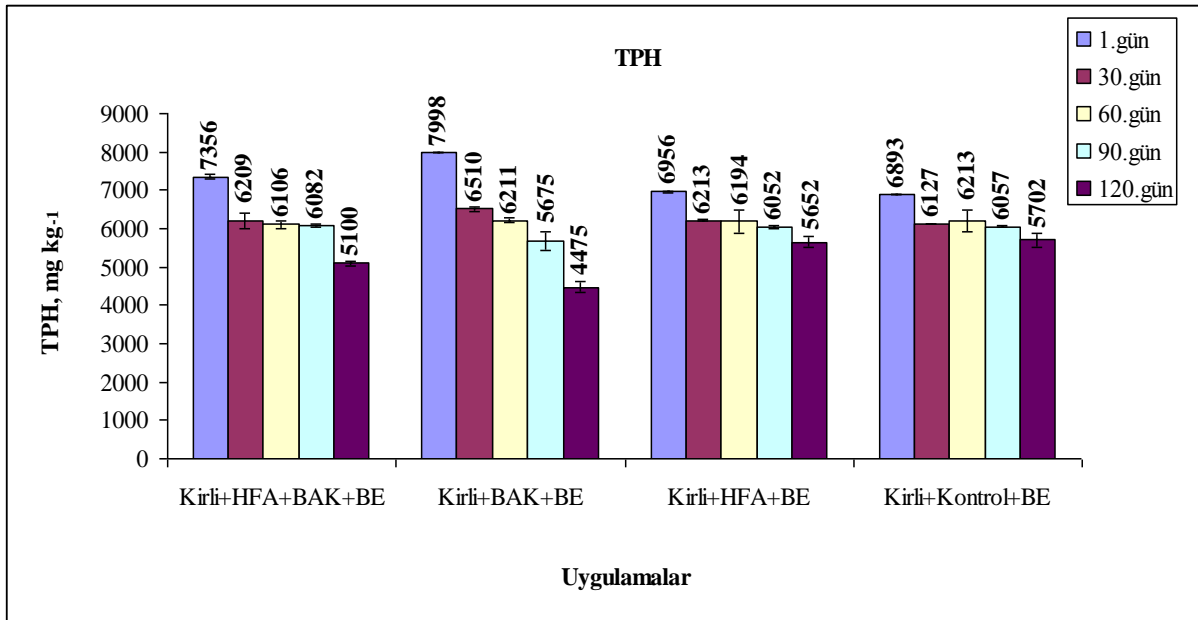
İstatistik Analizler

Araştırma sonuçları, üzerinde durulan özellikler bakımından tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiştir. Tekrarlanan ölçümler zaman faktörünün seviyelerinde yapılmış ve üçer tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Hesaplamalarda “SPSS 12.0”, MSTAT paket bilgisayar programları kullanılmıştır. Ayrıca incelenen parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson Korelasyon Testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde Winer vd., 1991; Gürbüz vd., 2003’den yararlanılmıştır.

BULGULAR

Toplam Petrol Hidrokarbonlarındaki Değişimler (TPH)

120 günlük inkübasyon süresi boyunca petrol ile kirlenmiş topraklara uygulanan BAK, HFA ve BAK+HFA uygulamalarına ilişkin TPH değerleri şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Petrol ile kirlenmiş topraklara uygulanan Kirli+BAK+BE, Kirli+HFA+BE ve Kirli+HFA+BAK+BE uygulamalarına ilişkin TPH değerleri

Petrol ile kirlenmiş topraklarda TPH ile ilgili varyans analiz çizelgesi incelendiğinde zaman-bakteri-HFA üçlü interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Petrol ile kirletilmiş toprakları TPH değerleri açısından kıyasladığımızda, kontrol hariç tüm uygulamalarda zamana bağlı olarak azalma gözlenmektedir. En büyük azalma Kirli+BAK+BE topraklarında gözlenirken en küçük azalma Kontrol topraklarında gözlenmiştir. Uygulama şekilleri kendi aralarında kıyaslanacak olursa, inkübasyon süresince en yüksek TPH değeri Kirli+BAK+BE toprağında 1. gün (7998 mg.kg^{-1}) ve en düşük değer de Kirli+BAK+BE toprağında 120.günde (4500 mg.kg^{-1}) belirlenmiş olup, uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Filauro vd., (1998) yaptıkları çalışmada TPH konsantrasyonunun bakteri uygulaması ile %48 parçalandığını, Peressuttia vd., (2003) %45,48 oranında TPH miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Pokethitiyook vd., (2002) Bangkok bölgesinde petrol bulaşmış bir alandan izole ettikleri farklı bakteriden *Acinetobacter calcoaceticus*, ve üç *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının (MU01, MU02 ve MU03) %0,5 ham petrol düzeyinde yüksek derecede ayrışma sağladığını tespit etmişlerdir. Dört bakteri arasından en iyi olan *Acinetobacter calcoaceticus*, kirli toprakta 20, 40 ve 30°C gibi farklı sıcaklık koşullarında sırası ile %80,76, %68,86 ve %65,18'lik ayrışma değerleri vermiştir. Ghazali vd., (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışma araştırmamızın kurgusu ve sonuçları ile çok yakınlık göstermektedir. Araştırmacılar bakteri kültürü koleksiyonundan temin ettikleri ve kirli topraktan izole ettikleri iki farklı bakteri karışımının topraksız *in vitro* koşullarında birbirine yakın ve yüksek petrol parçalama düzeyi gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmalarında dizel, ham petrol ve makine yağı bulaşmış toprak koşullarında ve altmış günlük bir inkübasyon sürecinde test ettikleri bakteri karışımlarından kirli topraktan izole edilmiş olanının daha yüksek bir ayrışma sağladığı ve bu karışımın içeriğinin de ağırlıklı olarak *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. türlerinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Diğer benzer bir çalışmada Kishore ve Ashis, (2007), *Bacillus subtilis* (DM-04), *Pseudomonas aeruginosa* (M) ve Güneydoğu Hindistanda petrol ile kirlenmiş bir bölgeden izole ettikleri bakterileri topraksız *in vitro* ve kirli toprak koşullarında test etmişlerdir. Topraksız ortamda *P. aeruginosa* (M) bakterisinin *Bacillus subtilis* (DM-04)'e göre daha etkin olduğunu belirlemiş ve petrolü toprak deneyinde 120 gün süren inkübasyon süreci sonunda *P. aeruginosa* (M) ve kirli toprak izolatının %100'e varan bir ayrışma sağlarken *Bacillus subtilis* DM-04'ün %50 düzeyinde ayrışma sağladığını kaydetmişlerdir. Benzer sonuçları Porta vd. (1998) da bulmuşlardır. Diğer yandan başka araştırmacılar kompleks hidrokarbonların, fenollerin, fenantrenin ve benzopirenlerin oksidasyon ürünlerinin parçalanmasında gram pozitif bakterilerinde geniş metabolik yetenek sergilediklerini bildirmişlerdir (Sextone vd., 1978; Song ve Barta, 1990).

İzole edilen bakterilerin cins-tür-takım-familyaları

İzole edilen bakterilerin sonuçları toplu olarak Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 İzole edilen bakterilerin cins-tür-takım-familyaları

Bakteri (Cins-tür)	Takım- Familya
<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadales - Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadales - Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	Pseudomonadales- Pseudomonadaceae
<i>Acinetobacter genomospecies</i>	Pseudomonadales - Moraxellaceae
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadales - Xanthomonadaceae
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Enterobacteriales - Enterobacteriaceae
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Enterobacteriales - Enterobacteriaceae
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Enterobacteriales - Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriales - Enterobacteriaceae
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Sphingobacteriales - Sphingobacteriaceae
<i>Aeromonas caviae</i>	Aeromonadales - Aeromonadaceae
<i>Paucimonas-lemoignei</i>	Burkholderiales - Burkholderiaceae

Fosfo Lipit Yağ Asiti Metil Esteri (FLYA-FLME) Sonuçları

Toprak-FLME analizinin değerlendirmesi çizelge 3.2 - 3.5 üzerinden yapılmıştır ve sonuçların yorumlaması öncesinde toprakta FLME analizinde farklı zamanlarda ölçülebilen indikatör yağ asidi sayısı farklı olmuştur.

Çizelge 3.2 Petrollü koşullarda bakteri (Kirli+BAK+BE) uygulamasının ölçümü yapılabilen yağ asitlerinin zamana göre değişimi

Kirli+BAK+BE					
Yağ asitleri	1.gün	30. gün	60.gün	90. gün	120. gün
9:0 3OH	12,04	-	-	-	-
10:0	-	28,99	-	-	-
12:0 anteiso	-	71,01	-	-	-
13:0 anteiso	-	-	-	-	-
14:0 anteiso	12,44	-	-	-	-
15:0 anteiso	16,93	-	100,00	-	-
18:1 w9c	17,63	-	-	-	-
17:0 anteiso	9,01	-	-	-	-
18:1 w6,9c	7,53	-	-	-	-
18:3 w6c(6,9,12)	7,29	-	-	-	-

Çizelge 3.3 Petrollü koşullarda humik asit ve bakteri (Kirli+HFA+BAK+BE) uygulamasının ölçümü yapılabilen yağ asitlerinin zamana göre değişimi

Kirli+HFA+BAK+BE					
Yağ asitleri	1.gün	30. gün	60.gün	90. gün	120. gün
10:0	-	13,3	-	-	-
11:0	4,07	-	-	-	-
12:0	1,88	-	-	-	-
12:0 iso 3OH	3,39	-	-	-	-
12:0 anteiso	-	30,64	-	-	-
13:0 anteiso	-	21,68	-	-	-
15:0 iso	4,77	-	-	-	-
15:0 anteiso	13,35	34,38	100,00	-	-
16:0	6,23	-	-	-	-
16:0 anteiso	11,35	-	-	-	-
16:0 iso	7,56	-	-	-	-
16:0 10-methyl	5,47	-	-	-	-
17:1 w5c	7,5	-	-	-	-
17:0 anteiso	6,53	-	-	-	-
18:0 anteiso	10,42	-	-	-	-
18:1 w9c	3,91	-	-	-	-
18:3 w6c(6,9,12)	4,18	-	-	-	-

Çizelge 3.4 Petrollü koşullarda humik asit (Kirli+HFA+BE) uygulamasının ölçümü yapılabilen yağ asitlerinin zamana göre değişimi

Kirli+K+BE					
Yağ asitleri	1.gün	30. gün	60.gün	90. gün	120. gün
11:0 anteiso	-	21,59	-	-	-
12:0 anteiso	-	29,57	-	-	-
13:0 anteiso	-	21,03	-	-	-
15:0 anteiso	21,58	27,82	100,00	-	-
16:0 anteiso	20,9	-	-	-	-
17:0 anteiso	11,8	-	-	-	-
18:2 w6,9c	16,3	-	-	-	-
18:3 w6c(6,9,12)	10,61	-	-	-	-
19:1 w6,9c	18,80	-	-	-	-

Çizelge 3.5 Petrollü koşullarda kontrol (Kirli+K+BE) uygulamasının ölçümü yapılabilen yağ asitlerinin zamana göre değişimi

Kirli+HFA+BE					
Yağ asitleri	1.gün	30. gün	60.gün	90. gün	120. gün
12:0 anteiso	20,21	24,88	-	-	-
13:0 anteiso	18,42	16,55	-	-	-
14:0 anteiso	21,65	8,99	-	-	-
15:0 anteiso	22,67	22,83	100,00	-	-
16:0 anteiso	23,53	22,54	-	-	-

Bu bilgiler ışığında tablolara genel olarak baktığımızda, en yoğun yağ asidi bütün uygulamalarda 1. günde görülürken zamana bağlı olarak azalmış ve 90. ve 120. günlerde yağ asidi tespit edilememiştir (Çizelge 3.2 – 3.5). Kirli+BAK+BE uygulamasında inkübasyonun başında (1.gün) beliren FLYA sayısı 8 iken, 30 günde 2'ye, 60. günde 1'e düşmüş ve daha sonraki ölçümlerde yağ asidi tespit edilememiştir (Çizelge 3.2). Bu uygulamada da bakteri ilavesinden kaynaklı olarak FLYA metil esteri miktarı 1. günde diğer uygulamalara göre daha yüksek bulunmuştur. Kirli+HFA+BAK+BE uygulamasında inkübasyonun başında (1.gün) beliren FLYA sayısı 15 iken, 30 günde 4'e, 60. günde 1'e düşmüş ve daha sonraki ölçümlerde yağ asidi tespit edilememiştir (Çizelge 3.3). Bu uygulamada tespit edilen FLYA metil esteri sayısı diğer uygulamalardan daha fazla bulunmuştur. Bunun sebebinin bakteri ilave edilmesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Zamana göre bu miktar azalmış ve 90. günden sonra FLYA metil esteri tespit edilememiştir. Kirli+HFA+BE uygulamasında inkübasyonun başında (1.gün) beliren FLYA sayısı 4 iken, 30 günde yağ asidi sayısı değişmemiş, 60. günde 1'e düşmüş ve daha sonraki ölçümlerde yağ asidi tespit edilememiştir (Çizelge 3.4). Kirli+Kontrol+BE uygulamasında inkübasyonun başında (1.gün) beliren FLYA sayısı 6 iken, 30 günde 4'e, 60. günde 1'e düşmüş ve daha sonraki ölçümlerde yağ asidi tespit edilememiştir (Çizelge 3.5).

SONUÇLARIN İRDELENMESİ

Bu çalışmanın temel düşüncelerden biri toprakta petrol ve benzeri maddelerden kaynaklanan kirlilik şartlarını ortadan kaldırabilecek mikroorganizmaların varlığını belirlemek ve laboratuvar koşullarında etkinliğini değerlendirmektir. Biyoremediasyon olarak bilinen ve çalışmanın başında farklı yönleri ile açıklanan uygulamalar, değişik düzeylerde hidrokarbon parçalama yeteneğine sahip mikroorganizmaların petrol ile kirlenen çevresel ortamlarda kullanımına dayanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan uygulamaların (biyolojik çoğalım, biyolojik uyarım, biyolojik çoğalım+biyolojik

uyarım) biyoremediasyon potansiyelini ortaya koymada baz alınan en önemli ölçüt, toprakta toplam hidrokarbonlar bazında TPH (toplam petrol hidrokarbonları) miktarlarıdır. Zamana göre uygulamalar arasında toplam petrol hidrokarbon oranında en fazla azalma sırası ile bakteri (BAK+BE) uygulamasında, onu bakteri + humik fulvik asit (BAK+HFA+BE) uygulaması takip etmiş, en az azalma ise kontrol uygulamasında görülmüştür. Toplam petrol hidrokarbonları açısından çalışmanın 1. ve 120. günleri dikkate alındığında biyoremediasyon sürecinin en hızlı ilerlediği %56 ile bakteri (BAK+BE) uygulamasında ve sonra sırası ile %30 ile bakteri + humik asit (BAK+HFA+BE) uygulaması, %18 yalnızca humik fulvik asit (HFA+BE) uygulaması, %17 ile kontrol uygulaması takip etmektedir. Bu da göstermektedir ki karışım bakterileri kültürü (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida biotype A*, *Citrobacter-amalonicus-GC subgroup A*, *Acinetobacter-genomospecies*) TPH'nin parçalanmaları bakımından en iyi sonucu vermiştir. Bakteri (BAK+BE) uygulamasında TPH (Toplam Petrol Hidrokarbonları) değerlerindeki azalma düzeylerine bakıldığında en hızlı parçalanma 1. - 30. günler arası ve 90. - 120. günler arasında görülmektedir. İnkübasyonun 30. ve 90. günleri arasında ise çok az değişimin olduğu görülmektedir. Bu durum petrol ayrışmasının sürekli olmadığını ve bazı durağan dönemleri olduğunu göstermektedir. Aynı durağan fazın diğer uygulamalarda da olduğunu görmekteyiz.

Değişik FLYA biyo-indikatörleri, mantar, alg, gr-negatif bakteriler, gr-pozitif bakteriler ve sülfat indirgeyen bakteriler, spingomonadlar, aktinomisetler gibi toprak mikro-florasının pekçok üyesi ile ilgili bilgi toplamada kullanılmıştır. Bu ajan maddeler toprak mikroorganizmalarının pekçok çevre olayı ile ilgili olarak gerçekleştirdikleri lipid sentezi hakkında ipuçları sağladıklarını belirlenmiştir (Vestal ve White, 1989; White vd., 1996a,b; Venosa vd., 2000). 18:1 ω 9c'nin aynı zamanda *Pseudomonas* spp. bakterilerini temsil eden bir indikatör olduğu Olsson ve Persson, (1999) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada Temiz ve kirlili topraklara uyguladığımız bakteri (BAK+BE ve BAK+HFA+BE) uygulamalarında 18:1w9c yağ asidinin yüksek değerler gösterdiğinden *Pseudomonas* spp. bakterilerine özgü yağ asidi olduğunu vurgulayabiliriz. 15:0 iso gram pozitif ve kükürt bakterileri için indikatördür (Olsson ve Persson, 1999). Zamana bağlı olarak bütün uygulamalar genelinde azalma göstermiştir. Başka araştırmacılar (i15:0 ve a15:0) gram pozitif bakteriler için biomarkerlarının arttığını bildirmişlerdir (Ringelberg vd., 2008). 15:0 anteiso yağ asidi değerlerinin temiz topraklara kıyasla petrol ile kirlenmiş topraklarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buna göre petrollü ortamda gram pozitif bakterilerin varlığının arttığını vurgulayabiliriz. 16:0 doymuş yağ asidinin bakterilerin genelinde bulunan bir indikatör olduğunu Pelz vd., 2001 ve Keinanen vd., 2003 bildirmişlerdir fakat Kneif vd., (2006) FLYA 16:0'nin karbon ve enerji kaynağı olarak sadece metan kullanan bakterilere (metanotrof) özgü olduğunu bildirmiştir. Bazı araştırmacılar n16:1w7c, n18:1w9c, n18:1w7c yağ asitlerinin gram negatif bakteriler için biomarkerlarının arttığını belirtmişlerdir (Ringelberg vd., 2008). Bizim çalışmamızda belirlenen 18:1 ω 9c derişimleri açısından incelediğimizde ortak nokta bakteri (BAK+BE) uygulamalarında ortaya çıkan bir yağ asidi olması ve bu FLYA ajanı inkübasyonun başlangıcında yüksek değerlerde olup inkübasyonun sonunda azalma göstermiş ve 120. günde belirlenememiştir. Eğer 18:1 ω 9c Olsson ve Persson, (1999)'nun iddia ettiği gibi *Pseudomonas* spp. türlerinin bir indikatörü ise bu indikatör yağ asidi derişimlerinde zamanla meydana gelen azalmayı ortamdaki hidrokarbon kaynaklarının azalması ile ilişkilendirilebiliriz. 18:1 ω 7c ve 18:1 ω 9c'nin aerobik bakterilere özgü ajanlar olup (Parker ve Taylor, 1983; Guckert vd., 1985) bu yağ asitlerini gram negatif bakteri indikatörü olarak gruplandırılırlar. Bundy vd. 2002 petrol kirliliği olan topraklardan ekstrakte edilen 18:1w9 ve 17:1w8 yağ asitlerini gram pozitif bakterilere atfetmişlerdir 17:0ai yağ asidi petrol ile kirlenmiş topraklara göre temiz topraklarda daha fazla sayıda gözlenmiştir. 18:2w6,9 yağ asitleri sayısı temiz topraklarımızda daha fazla ekstarakte edilmiştir. Bu yağ asitleri yaygın olarak ökaryotik organizmalarda bulunduğunu (Harwood vd., 1984) ve 16:1w11c, 16:1w5c, iso17:1 ve cyclopropyl 19:0 yağ asitlerinin geniş olarak toprak bakteri gruplarını temsil ettiğini (Ratledge ve Wilkinson, 1988) bildirmişlerdir.

SONUÇLAR:

Tespit edilen FLYA ajanlarının (yağ asitlerinin) gram negatif bakteriler için biomarker olup ve bu FLYA ajanının inkübasyonun başlangıcında yüksek değerlerde olup inkübasyonun sonunda ise meydana gelen azalma ortamdaki hidrokarbon kaynaklarının azalması ile ilişkilendirilmiştir. Temiz topraklarda ve petrol ile kirlenmiş topraklarda en fazla 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0, 16:1 w7c, 17:0ai, 18:2w6,9, 18:1w9c yağ asitleri tespit edilmiştir. 18:1w9c yağ asidinin yüksek değerler gösterdiğinden *Pseudomonas* spp. bakterilerine özgü yağ asidi olduğunu belirtebiliriz. Ülkemiz coğrafi konumunun bir yansıması olarak enerji taşımacılığının merkezi haline gelmiş ve bunun sonucunda birçok boru hattı projesi tamamlanmış ve veya halen yürütülmektedir. Bu gelişmeler toprak kirliliği riskinde beraberinde getirmiştir. Buna karşın ülkemizde petrolden kaynaklanan toprak kirliliğinin giderilmesine yönelik bir düzenleme yoktur. Ülkemizde yeni bir konu olan biyoremediasyon uygulamalarının kirliliğin giderilmesinde ne şekilde kullanılacağı da araştırma kurumlarımızın bilimsel çabalarına rağmen net olarak cevap bulunmuş değildir. Tamamlanan bu çalışma yukarıda bahsedildiği üzere ülkemizde potansiyel bir sorunun çözümüne ışık tutacak nitelikte önemli bir çalışmadır. Bu bağlamda orta kireçli, hafif alkali karakterli % 1 (w/w) petrol ile kirlenilen topraklarda en yüksek petrol ayrışmasının %56 ile bakteri karışımı uygulanmış biyolojik çoğalım (bioaugmentation) uygulamaları altında meydana geldiği ve akılda tutulması gereken durum ise uygulanan çoğalım materyalinin yerli bakterilerden olmasıdır.

SEMBOLLER

FLYA-FLME	: Fosfo lipit yağ asidi- Fosfo lipit metil esteri
PLFA-FAME	: Phospholipid fatty acid- Fatty asit metil esteri
PPÜ	: Petrol ve petrol ürünlerinin
TPAO	: Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı
TPH	: Toplam Petrol Hidrokarbonları
MIS	: Microbial Identification System (Mikrobiyal Tanımlama Sistemi)
ASE	: Dionex ASE 300 -Petrol hidrokarbonları ölçüm cihazı
EPA method 3545	: Uluslar arası ASE metodu ASE Sistemi
GC	: Gaz Kromatografisi
BTC	: Bakü-Tiflis-Ceyhan petrol boru hattı
HFA	: Humik Fulvik Asit
BAK	: Bakteri
BE	: Besin Elementi

KAYNAKLAR

- Atlas, R.M., 1981, "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons", *An Environmental Perspective Microbial Rev.*, vol: 45:180-209.
- Atlas, R.M. and Bartha, R., 1992, "Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation" – *Adv. Microb. Ecol.*, 12:287 – 338.
- Bailey, V.L., Peacock, A.D., Smith, J.L. and Bolton, H., 2002, "Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol.34, Issue.9, 1385-1389.
- Bligh E.G. and Dyer, W.J., 1959, " A rapid method of total lipid extraction and purification", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Bossio, D.A., Scow, K.M., Gunapala, N. and Graham, K.J., 1998, "Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles". *Microb. Ecol.*, 36:1-12

- Bundy, J.G., Paton, G.I. and Campbell, C.D., 2002, "Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination", *Journal of Applied Microbiology*, vol: 92: 276-288.
- Erdogan E.E. 2010: Petrol İle Kirlenmiş Toprakların Biyolojik Olarak İyileştirilmesinin Laboratuvar Koşullarında Denenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, (Ph. D. Thesis, p:236), Doktora Tezi, 236 sayfa
- Erdoğan, E.E., Şahin, F. and Karaca, A., 2011, "Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey", *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(21), pp. 4853-4859, 13 March, 2012 .Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> DOI: 10.5897/AJB10.2239 ISSN 1684-5315 © 2012 Academic Journals
- Fierer, N., Schimel, J.P. and Holden, P.A., 2003,"Variations in microbial community composition through two soil depth profiles", *Soil Biology & Biochemistry*, 35; 167-176.
- Filauro, G.G., Andreotti, G., Arlotti, D. and Reisinger, H.J., 1998, "Blow out of Trecate 24 crude oil well: how bioremediation techniques are solving a major environmental emergency in a valuable agricultural area in contaminated soil 98", *Thomas Telford*, pp. 403- 412.
- Frostegard, A., Tunlid, A. and Baath, E., 1993, "Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two different soil types experimentally exposed to different heavy metals", *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3605-3617.
- Ghazali, F.M., Zaliha, R.N., Rahman, A., Salleh, A.B and Basri, M., 2004, "Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54; 61 - 67.
- Guckert, J.B, Antworth C.P., Nichols, P.D. and White, D.C., 1985, "Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments", *FEMS Microbiol Ecol*, 31:147-158
- Gürbüz, F., Başpınar, E., Çamdeviren, H. ve Keskin, S., 2003, Tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi, Van. 120s.Baskı: Yüzyüncü Yıl Üniversitesi, ISBN: 975-92253-0-1.
- Harwood, J.L. and Russell, N.J., 1984, "Lipids in plants and microbes". George, Allen and Unwin,London, England. Hayes, M.H.B. and Wilson, W.S. (1997). *Humic substances, peats and sludges*. The Royal Society of Chemistry Cambridge, pp 496.
- Ibekwe, A.M. and Kennedy, A.C., 1998, "Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils", *Plant Soil*. 206:151-161.
- Jürgensen, K.S., Puustinen, J.A. and Suortti, M., 2000, "Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles", *Environmental Pollution* 107; 245 - 254.
- Kapley, A., Purohit, H.J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabati, T. and Khanna, P., 1999, "Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium", *Biosource Technology*, 67; 241-245.
- Keinonen, M.M., Martikainen, P.J., Korhonen, L.K. and Suutari, M.H., 2003, "Microbial community structure in biofilms and water of a drinking water distribution system determined by lipid biomarkers", *Water Science and Technology*, 47; pp. 143-147.
- Kishore, D. and Ashis, M.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.
- Kneif, C., Kolb, S., Bodelier, P.L.E., Lindri, A. and Dunfield, P.F., 2006, "The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration", *Environmental Microbiology*, 8, 321-333.
- Margesin, R. and Schinner, F., 1997, "Bioremediation of diesel-oil contaminated alpine soils at low temperatures", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47,462-468.
- Miller, I., and Berger, T., 1985, "Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids", *Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note*, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., 228-238.

- Morgan, P. and Watkinson, R.J., 1989, "Hydrocarbon degradation in soils and methods for soils biotreatment", *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 8, 305-333.
- Obire, O. and Okudo, I. V., 1997, "Effects of Crude Oil on a Freshwater Stream in Nigeria" *Discov. Innov.*, 9: 25-32.
- Olsson, S. and Persson, P., 1999, "The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots", *Applied Soil Ecology*, vol 12-3; 205- 215.
- Parker, R.J. and Taylor, J., 1983, "The relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments", *Estuarine Coastal Shelf Sci* 16:173– 189.
- Pelz O., A. Chatzinotas, N. Andersen, S.M. Bemasconi, C. Hesse, W.R. Abraham and J. Zeyer, 2001, "Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to a specific microbial population", *Archives of Microbiology*, 175; pp. 270–281.
- Peressuttia, S.R., Alvarez, H.M. and Oscar, H.P., 2003, "Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil", *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52 (2003) 21 – 30.
- Pokethituyook, P., Sungpetch, A., Upathame, S. and Kruatrachue, M., "Enhancement of *Acinetobacter Calcoaceticus* in biodegradation of Tapis crude oil" *17th WCSS, Symposium* no: 42, paper no. 2309. Thailand, 2002.
- Porta, A., Trovato, A., McCarty, K. Uhler, A. and Andreotti, G., 1998, "Degredation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of their metabolites in bioremediated crude oil containing soils", In: Alleman, B.C. , Leeson, A. (Eds), *In situ and on site Bioremediation* , vol:1. Battelle Press, Columbus, USA, pp. 505-510.
- Ratledge, C. and Wilkinson, S.G. (ed)., 1988, "Microbial lipids", vol:1 Academic Press. London, England. In: Fessica R. Hanson, Jennifer L. Macalady, David Haris and Kate M. Scow 1999. *Linking Toluene degradation with Specific Microbial Populations in soil. Applied and Environmental Microbiology*, p:5403-5408.
- Ringelberg, D., Richmond, M., Foley, K. and Reynolds, C., 2008, "Utility of lipid biomarkers in support of bioremediation efforts at army sites", *Journal of Microbiological Methods*, 74(1): 17-25.
- Rojas-Avelizapa N.G., Rodriguez-Vazquez R., Enriquez-Villanueva F., Martinez-Cruz J. and Poggi-Varaldo, H.M., 1999, "Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil", *Resources, Conservation and Recycling*, 27 ;15-26.
- Sasser, M., 1990, " Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids", *Tech. Note*. 101. Microbial ID, Newark, DE.
- Sextone, A.J., Everett, K., Jenkins, T. and Atlas, R., 1978, "Fate of crude and refined oils in North slope soils", *Arctic* 31, pp. 339-347.
- Song, H.G. and Bartha, R., 1990, "Effects of jet fuel on the microbial community of soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 646-651.
- Steffan, R., McCloy, J. K., Vainberg, S., Condee, C. W. and Zhang, D., 1997, "Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl tert-Butyl Ether, Ethyl tert – Butyl Ether and tert – Amyl Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11):4216-4222.
- Şahin, F., 1997, *Detection, identification and characterization of strains of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria by traditional and molecular methods, and resistance in Capsicum species to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria pepper race6*. (Ph. D. Thesis). The Ohio State University, 182 p. Ohio.
- Şahin, F., Kotan, R. and Dönmez, M.F., 1999, "First report of bacterial blight of Mulberries caused by *Pseudomonas syringae* pv. *mori* in the eastern Anatolia Region of Turkey", *Plant Dis.*, 83, 1176.
- Venosa, A.D., Stephen, J.R., Macnaughton, S.J., Chang, Y. and White, D.C., 2000, "Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill", In *Microbial Biosystems: New Frontiers* ed. Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Green, P. pp. 767-773. Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- Vestal, R.J. and White, D.C., 1989, "Lipid analysis in microbial ecology", *Bioscience* 39: 535-541. Vidali M. 2001. *Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem.* Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172, 2001.

- White, D.C., Pinkart, H.C., and Ringelberg, D.B., 1996a, "Biomass measurements: biochemical approaches" *In Manual of Environmental Microbiology*, 1st edn. Hurst, C.J., Knudsen, 169 G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., and Walter, M.V. (eds). Washington DC: *American Society for Microbiology Press*, pp. 91–101.
- White, D.C., Stair, J.O. and Ringelberg, D.B., 1996b, "Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis", *J Ind Microbiol*, 17: 185–196.
- Winer, B.J., Brown, D.R. and Michels, K.M., 1991, "Statistical Principles in Experimental Design", ISBN: 0-07-070982-3. 3 eds. Page: 1057.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T. and Beese, F., 1992, "Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils", *Soil Biology & Biochemistry*, 24, 317–323.