

Anoksik deniz sedimentlerinde besi maddesi takviyesi ile geliştirilmiş petrol hidrokarbonlarının biyoyıslahı

Mustafa KOLUKIRIK*, Orhan İNCE

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Biyoteknolojisi Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Marmara Denizi petrol hidrokarbonlarıyla yoğun bir şekilde kirlenmektedir. Bu kronik kirliliğin giderilmesi için sürdürülebilir, az insan müdahalesi gerektiren ve ekonomik bir ıslah stratejisi geliştirilmesi şarttır. Eğer Marmara Denizi sedimentlerinde anaerobik hidrokarbon ayrıştırıcı mikroorganizmalar aktif bir şekilde bulunuyorsa ve aktivitelerini arttırmanın bir yolu bulunabilirse, kirliliğin giderilmesi için en iyi yöntem anaerobik koşullarda biyoyıslah uygulanmasıdır. Anoksik koşulların hâkim olduğu, petrol hidrokarbonlarıyla aşırı şekilde kirlenmiş olan Haliç Körfezi sediment süzüntü sularında mevcut N ve P seviyeleri mikrobiyal çoğalmayı destekleyecek seviyelerin çok altındadır. Nutrient takviyesi ile sedimentlerin mikrobiyal aktivitelerinin arttırılabilirliğini sınamak için anaerobik koşullar altında hidrokarbon ayrışım mikrokozmosları kurulmuştur. Mikrokozmoslardaki nutrient seviyelerinin doğal seviyelerden başlanarak giderek arttırılması, hidrokarbon ayrıştırma aktivitesinde $\sim 9 \times$ artışla sonuçlanmıştır. Sedimentlerin doğal hidrokarbon içeriklerinin tümü bu şekilde giderilebilmiştir. Sedimentler bir çok farklı aromatik (18 farklı 1-5 halka aromatikler) ve alifatik (n -C₉₋₃₁ alkanlar ve asiklik isoprenoidler) hidrokarbonları ayrıştırabilmiştir. Mikrokozmoslarda metanojenesis ve dissimilatif sülfat indirgenmesi prosesleri hidrokarbonların ayrıştırmasında rol almıştır. Sonuç olarak, bu çalışma Haliç Körfezi'ndeki yoğun ve kronik kirliliğin, sediment organizmalarının aktivitelerinin nutrient takviyesi ile arttırılması yoluyla giderilebilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın çıktıları, daha az maliyet ve insan müdahalesi gerektiren biyoyıslah uygulamalarının dünya çapında uygulanmaya başlanmasına öncülük edecek niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Petrol hidrokarbonları, deniz kirliliği, biyoyıslah, Haliç Körfezi.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Mustafa KOLUKIRIK. kolukirikm@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 72 55.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Biyoteknolojisi Programı'nda tamamlanmış olan "Anoksik Marmara Denizi sedimentlerinde besi maddesi takviyesi ile geliştirilmiş petrol hidrokarbonlarının biyoyıslahı" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 24.02.2011 tarihinde dergiye ulaşılmış, 10.06.2010 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.08.2011 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Bu makaleye "Kolukirik, M., İnce, O., (2011) 'Anoksik deniz sedimentlerinde besi maddesi takviyesi ile geliştirilmiş petrol hidrokarbonlarının biyoyıslahı', İTÜ Dergisi/E Su Kirlenmesi Kontrolü, 21: 1, 55-65" şeklinde atıf yapabilirsiniz.

Nutrient enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments

Extended abstract

Anoxic Halic Bay sediments have been extremely polluted with petroleum hydrocarbons, and N and P are limited in the sediment porewaters for biological activity. These raised the question that hydrocarbon degradation activity of Halic Bay sediments can be increased by N-P amendment under anaerobic conditions to overcome the pollution. In this study, anaerobic hydrocarbon degradation microcosms were set up to increase activity of Halic Bay sediments by gradually decreasing the natural TOC/N/P ratio of the sediment porewaters to the unlimited nutrient conditions.

Microcosms were set up in an anaerobic cabinet with a regulated atmosphere of nitrogen. Each microcosm was fed with a defined substrate mix consisting of 31 different hydrocarbon types. Two control microcosms were included: (1) hydrocarbon mix was not added to determine the extent of anaerobic degradation on natural hydrocarbon content of the sediments; (2) NaN_3 treatment was applied to suppress microbial activity.

The anaerobic microcosms were incubated for 224 days. Decreasing the natural TOC/N/P ratio of the sediment porewater (1000/5/1) to 1000/40/6 resulted in $\sim 9\times$ increase in gas production ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) and hydrocarbon removal. Addition of external hydrocarbons to the microcosms was also resulted in $\sim 2\times$ higher gas production and hydrocarbon removal. A high proportion (92 %) of aromatic hydrocarbons and all n-alkanes were removed from the microcosms under unlimited nutrient supply conditions without external hydrocarbon addition.

The sediment microorganisms degraded wide range of aliphatic (n-C₉₋₃₁ alkanes and acyclic isoprenoids) and aromatic (18 different 1-5 ring aromatics) hydrocarbons. The anaerobic degradation hierarchy of hydrocarbons was as follows: the most easily degradable n-alkanes, followed by more resistant branched acyclic and monocyclic hydrocarbons, the most resistant polycyclic steroidal and triterpenoidal hydrocarbons, and aromatic hydrocarbons.

Monitoring functional gene and transcript abundances revealed that methanogenesis and dissimilatory sulfate reduction took place simultaneously during the first 126 days, afterwards, only the syntrophic methanogenic consortium was active. Microbial activity and abundance were very high and related to the C removal all through the incubation period. Archaea abundance increases were $\sim 1.5\times$ higher than those of Bacteria. 74 and 67 % of the total C removal occurred between the days 126 and 168 during which period microbial activity levels increased 6-8 \times . Overall microbiological results implied that C removal in this period can be attributable to activities of syntrophic consortium of fermentative bacteria and methanogens.

In this study, we obtained anaerobic hydrocarbon degradation rates (700 ug/gSediment.L.day) as fast as enrichment cultures' rates. Although the obtained rates were comparable to the aerobic ones, they are still much lower than the aerobic hydrocarbon degradation rates. On the other hand, an aerobic bioremediation strategy is unfeasible for Halic Bay since oxygen penetration into the anoxic sediments is poor and oxygen mass transfer enhancement by mechanical means is inappropriate for the inaccessible sediments. Under these conditions anaerobic hydrocarbon degradation is the only alternative.

In summary, we have obtained three lines of evidence for demonstrating anaerobic bioremediation feasibility of petroleum HC pollution in Halic Bay sediments: (1) the anaerobic hydrocarbon degrading microbiota was highly abundant in the sediments; (2) anaerobic hydrocarbon degradation was taking place in the sediments; (3) the sediments were able to degrade wide range of hydrocarbons under anaerobic conditions; (4) high anaerobic hydrocarbon degradation rates were achieved via biostimulation of the sediments through nutrient amendment.

We are now making the preliminary preparations to carry out a field-scale bioremediation trial to remove the accumulated hydrocarbons from the subsurface of Halic Bay through biostimulation of the sediments. Success of this trial will certainly lead to less human intervened and more economical field-scale bioremediation applications for over polluted anoxic marine environments worldwide.

Keywords: Petroleum hydrocarbons, marine pollution, bioremediation, Halic Bay.

Giriş

Mikrobiyal aktivitesi yüksek, anaerobik bir sediment tabakasına sahip Haliç Körfezi petrol hidrokarbonlarıyla uzun yıllardır yoğun ve kronik bir şekilde kirletilmektedir (İnce vd., 2006). 8 km uzunluğundaki ve 2.6 milyon m²'lik bir su yüzeyine sahip körfez Marmara Denizi ile İstanbul Boğaz'ının kesiştiği yerde bulunmaktadır. En derin bölgesi 60 m olmakla birlikte, yoğun kirlilikten kalınlaşan sedimentsyon sebebiyle bazı bölgelerde bu derinlik 2-3 m'ye kadar düşebilmektedir.

İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi (İSKİ) ve Büyükşehir Belediyesi (İBB) tarafından körfezdeki kirliliğin giderilmesi için "Haliç'i Temizleme Projesi" 80'li yılların başında başlatılmıştır. $\sim 5 \times 10^6$ m³ 'lük dip çamuru dipten kazınmış, daha sonra su kolonu havalandırılmıştır. Su kalitesi kısa sürede düzelmesine rağmen, kronik kirliliğin önüne geçilememesi nedeniyle Haliç Körfezi'ndeki su kalitesi son 20 yıllık süreç içerisinde tekrar kötüleşmiştir.

Haliç Körfezi'ndeki kronik kirliliğin ekosistem üzerindeki olumsuz etkilerinin önüne geçilebilir bir ıslah stratejisi geliştirilmesi şarttır. Eğer dip sedimentlerinde petrol hidrokarbonlarını ayrıştırabilecek organizmalar bulunuyorsa ve bu organizmaların aktivitelerini yükseltebilmenin bir yolu varsa, biyoslah bu amaç için en uygun alternatiftir (Head ve Swannel, 1999). Bu teoriyi test etmek için başlatılan bir TÜBİTAK projesinin (105Y307) ilk aşamasında Haliç Körfezi sedimentlerinin mikrobiyolojik ve fizikokimyasal karakteristiklerinin 2 sene süresince izlenmesi sonucunda şu sonuçlar elde edilmiştir: (1) toplam petrol hidrokarbon (TPH) seviyeleri (11000-18000 ppm) aşırı derecede kirletilmiş deniz ortamlarıyla aynı seviyededir; (2) mikrobiyal hücre içerikleri diğer deniz ortamlarının dip sedimentleriyle karşılaştırıldığında çok yüksek seviyelerdedir; (3) sedimentlerde metanajenler ve anaerobik hidrokarbon ayrıştırıcılar baskın halde bulunmaktadır; ve (4) sediment süzüntü sularındaki N ve P seviyeleri biyolojik aktiviteyi destekleyebilecek düzeylerin çok altındadır. Bu göstergeler sedimentlerin anaerobik

hidrokarbon ayrıştırma aktivitelerinin N ve P takviyesi ile arttırılabileceğine dair ipuçları vermiştir. Bu çalışmada, bu teoriyi test etmek amacıyla anaerobik koşullar altında, Haliç sedimentleri kullanılarak, çeşitli N ve P takviyesi koşullarında hidrokarbon ayrıştırma mikrokozmosları kurulmuştur. Mikrokozmosların hidrokarbon, nutrient ve mikrobiyal hücre içerikleri, mikrokozmoslardaki gaz üretimi ve mikrobiyal aktivite inkübasyon süresince izlenmiştir.

Materyal ve yöntem

Mikrokozmos kurulumu

Mikrokozmoslar 120 mL hacmindeki (100 mL ıslak hacim, 20 mL hava boşluğu) serum şişelerine kurulmuştur. Mikrokozmoslar oksijen sensörünün adapte edildiği, içerisinde regüle edilen bir azot gazı atmosferinin oluşturulduğu (%100 N₂) bir anaerobik kabin içerisinde kurulmuş ve inkübe edilmişlerdir. Mikrokozmoslar içerisinde N, P, vitamin ve iz mineralleri bulunan, Widdel ve Bak (1992) tarafından tanımlanmış karbonat-tamponlu anaerobik besi yeri kullanılarak hazırlanmıştır.

Mikrokozmoslara aşırı çamuru olarak 10g sediment, sübstrat olarak da 200 mg petrol hidrokarbonları eklemiştir. Anaerobik koşullar inorganik elektron alıcılarının besi yerine eklenmesiyle ve/veya uzaklaştırılması ile sağlanmıştır.

Kontrol amaçlı 2 mikrokozmos seti daha kurulmuştur: (1) Sedimentlerin doğal hidrokarbon içeriklerinin anaerobik ayrışımını test etmek için dışardan hidrokarbon eklenmemiş mikrokozmoslar (2) aşırı çamurunun ve besi yerinin steril edildiği, fiziksel ve kimyasal proseslerin hidrokarbon kompozisyonu üzerindeki etkisini görmek amacıyla kurulmuş mikrokozmoslar.

Toplam organik karbon (TOK)/N/P oranı doğal koşulları yansıtan $\sim 1000/5/1$ oranından, sınırsız nutrient takviyesini yansıtan 1000/40/6 oranına kadar yükseltilmiştir. Sınırsız nutrient takviyesi koşulları belirlenirken aşağıdaki kabuller yapılmıştır: (1) maksimum biyokütle dönüşüm oranı 0.2 g Hücre/g Hidrokarbon giderilen şeklidir; (2) logaritmik artış fazındaki dip deniz or-

ganizmasının C/N/P oranı 100/20/3'tür (Vrede vd., 2002).

Değişik N ve P takviye koşulları, kontrol mikrokozmosları ve mikrokozmos setlerinin kısaltılmış isimleri Tablo 1'de verilmiştir. Mikrokozmoslar üçlü replikalar halinde hazırlanmıştır. Herbir koşuldan 5 farklı set hazırlanmıştır. Bunun nedeni 5 farklı numune alma eylemi gerçekleştirilecek olmasıdır. Numune alma zamanları mikrokozmoslardaki gaz üretim verilerine göre belirlenmiştir.

2 haftada bir 10 mL hacminde gaz numunesi alınmış, alınan gazın yerine aynı hacimde azot gazı eklenmiştir. Gaz numunelerinin CH₄ ve CO₂ içerikleri INCOS 2300 data değerlendirme sistemine sahip Finnigan Model 4000 GC-MS (Finnigan-MAT, İngiltere) ile tespit edilmiştir.

Kimyasal analizler

Sedimentlerin pH'ı HI 99121 toprak pH test kiti PO₄³⁻, NO₃⁻, NO₂⁻ ve SO₄²⁻ analizleri Dionex İyon Kromatografi (Bannockburn, IL, A.B.D.) kullanılarak yapılmıştır. Numunelerin toplam karbon (TK), toplam organik karbon (TOK), toplam azot (TN) ve toplam sülfür (TS) içerikleri Carlo Erba Model 1108 CHN analizör kullanılarak kuru yakma yöntemine göre yapılmıştır (Polat ve Tugrul, 1995). Sedimentlerin toplam fosfor (TP) içerikleri ise rutin ortofosfat yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Sedimentlerde mevcut TPH kantitatif hızlandırılmış çözücü özütleme (ASE) ile elde edilmiş ve miktarı tespit edilmiştir. TPH fraksiyonları kantitatif ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir. Alifatik hidrokarbon fraksiyonları INCOS 2300 data değerlendirme sistemine sahip Finnigan Model 4000 GC-MS (Finnigan-MAT, İngiltere) ile tespit edilmiştir. Poliario-

matik hidrokarbon (PAH) fraksiyonları ise floresan saptayıcı Hewlett-Packard 1046A HPLC kullanılarak tespit edilmiştir.

DNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Genomik DNA (gDNA) FastDNA Spin Kit for Soil (Qbiogene, İngiltere) kullanılarak, toplam RNA ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit (Invitrogen, Almanya) kullanılarak, üreticinin talimatlarına göre izole edilmiştir. İzole edilen RNA'lar DNA'ya (cDNA) "SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Almanya) kullanılarak dönüştürülmüştür.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR)

Kullanılan primerler, hedef genler ve organizma grupları ve spesifik bağlanma sıcaklıkları Tablo 2'de verilmiştir. Q-PCR için Roche Light Cycler 2.0 cihazı kullanılmıştır. PCR 10 s 95°C, 5 s primerlere özgül bağlanma sıcaklığında ve 10 s 72°C koşullarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 1 U FastStart Taq Polymerase (Roche), her bir primerden 1 pmol, 0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ ve 1 µl SYBR-Green (1:50.000; Molecular Probes, Hollanda) içeren 20 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon sonunda erime eğrisi analizi uygulanarak PCR çoğalmalarının spesifikliği test edilmiştir.

Deneysel çalışma sonuçları

Korelasyon analizi

İstatiksel olarak önemli korelasyonlar Tablo 3'te gösterilmiştir. Sülfat indirgeyici bakteri çoğunluğu ve aktivitesi dışındaki bütün parametreler ve gaz üretimi arasındaki korelasyon katsayıları yüksektir. Bu nedenle sadece gaz üretimi verileri tartışılırken bütün koşullar göz önüne alınmış, diğer parametrelerin sadece kısıtsız nutrient (UL) koşullarındaki sonuçları tartışılmıştır.

Tablo 1. Deney koşulları ve mikrokozmos isim kısaltmaları

TOC/N/P→	1000/40/6	1000/5/6	1000/20/6	1000/40/1	1000/40/3	1000/5/1
Hidrokarbon eklenmiş	HC(+)-UL	HC(+)-NL1	HC(+)-NL2	HC(+)-PL1	HC(+)-PL2	HC(+)-L
Hidrokarbon eklenmemiş	HC(-)-UL	HC(-)-NL1	HC(-)-NL2	HC(-)-PL1	HC(-)-PL2	HC(-)-L
Steril edilmiş	HC(+)-S-UL	HC(+)-S-NL1	HC(+)-S-NL2	HC(+)-S-PL1	HC(+)-S-PL2	HC(+)-S-L

Tablo 2. Q-PCR primer setleri

Primer	Hedef Gen	Hedef organizma	Referanslar
Bac519f	16S rRNA	Bakteri	Ruppel vd., 2006
Bac907r	16S rRNA	Bakteri	Ruppel vd., 2006
Arc349f	16S rRNA	Arke	Takai ve Horikoshi, 2000
Arc806r	16S rRNA	Arke	Takai ve Horikoshi, 2000
mcrA1f	mcrA	Metanojen	Colwell vd., 2008
mcrA1r	mcrA	Metanojen	Colwell vd., 2008
DSRp2060F	dsrB	Sülfat indirgeyiciler	Geets vd., 2006
DSR4R	dsrB	Sülfat indirgeyiciler	Geets vd., 2006

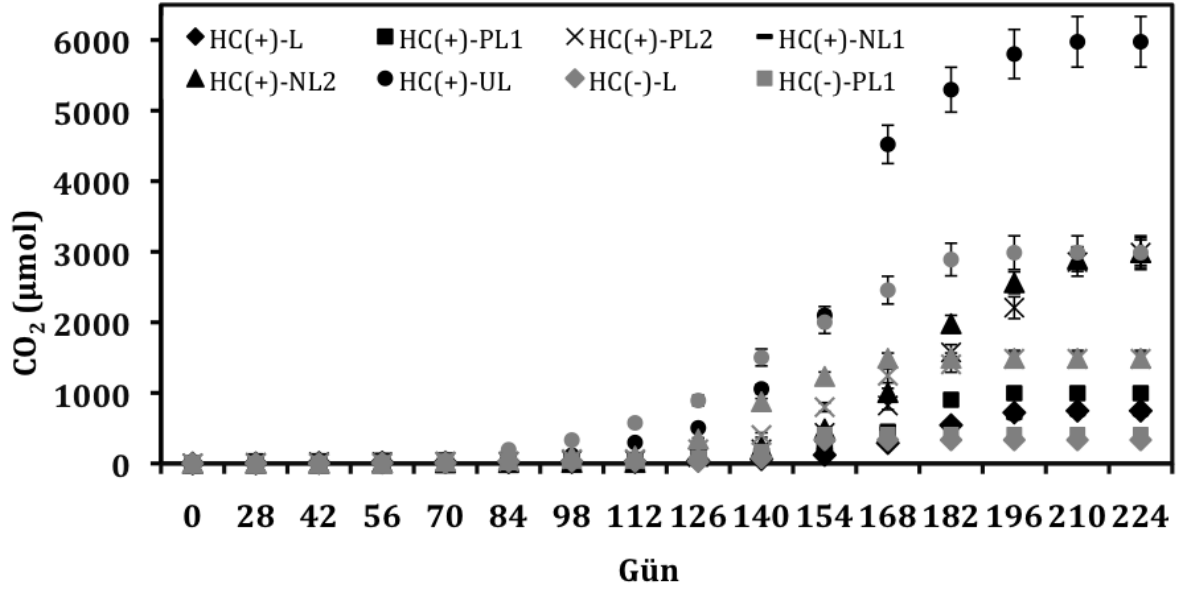
Tablo 3. Ölçülen parametreler ve metan üretimi arasındaki istatistiksel olarak önemli Pearson product-moment korelasyon katsayıları (r) ($p < 0.05$ ve $n = 24$)

		CH ₄ üretimi HC(+)	CH ₄ üretimi HC(-)
Giderim	TOK	0.98	0.99
	HC	0.97	0.96
	N	0.95	0.96
	P	0.95	0.95
CO ₂		1	1
Üretim	assA	0.84	0.82
	bssA	0.87	0.85
	Arke-rRNA	0.9	0.89
	Bakteri-rRNA	0.91	0.89
	mcrA	0.9	0.87
	assA	0.87	0.88
	bssA	0.9	0.86
Transkript	Arke-rRNA	0.94	0.89
	Bakteri-rRNA	0.94	0.92
	mcrA	0.93	0.87
	Alifatik HC %	-0.64	-0.83
	Aromatik HC %	0.64	0.83

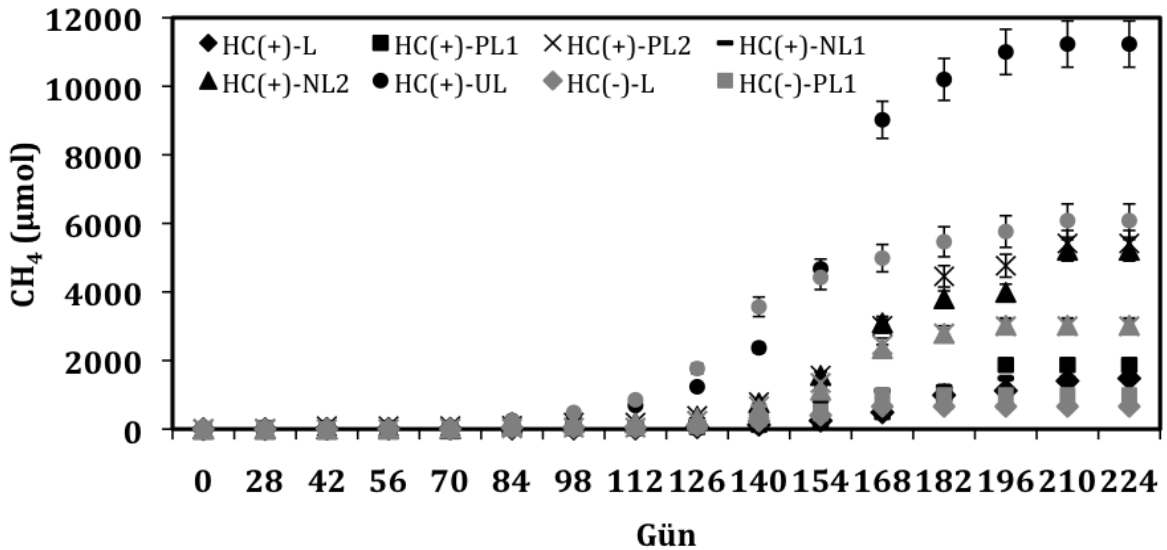
CO₂ ve CH₄ Üretimi

Kümülatif gaz üretim verileri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Steril kontrollerdeki CO₂ ve CH₄ üretimi 21 µmol'dan düşük olduğu için gösterilmemiştir. HC(+) ve HC(-) mikrokozmoslardaki CO₂ ve CH₄ üretimlerinin steril kontrollerden çok daha yüksek çıkması, mikrokozmoslardaki aktivitenin biyolojik olduğunun göstergesidir.

Şekillerden de görüldüğü üzere, daha yüksek N ve P takviyesi daha yüksek gaz üretimine yol açmıştır. HC(+) ve HC(-) L/PL1/PL2/NL1/NL2/UL mikrokozmoslardaki gaz üretim oranları sırasıyla ~ 1/1.3/3.7/1/3.5/7.6 ve ~ 1/1.5/4.5/1/4.6/9.2 şeklindedir. Bu sonuçlar nutrient takviyesi ile Haliç sedimentlerinin mikrobiyal aktivitesinin yaklaşık 9 kat arttırılabileceğini göstermiştir.



Şekil 1. Kümülatif CO₂ üretimi



Şekil 2. Kümülatif CH₄ üretimi

C dengesi

C dengesi Şekil 3 ve Denklem 1'de gösterilmiştir. Hücre sayıları μmol cinsinden C'a çevrilirken bir bakteri hücresinin ağırlığı 1 pg ve moleküler formülü $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ olarak kabul edilmiştir (Madigan 2009).

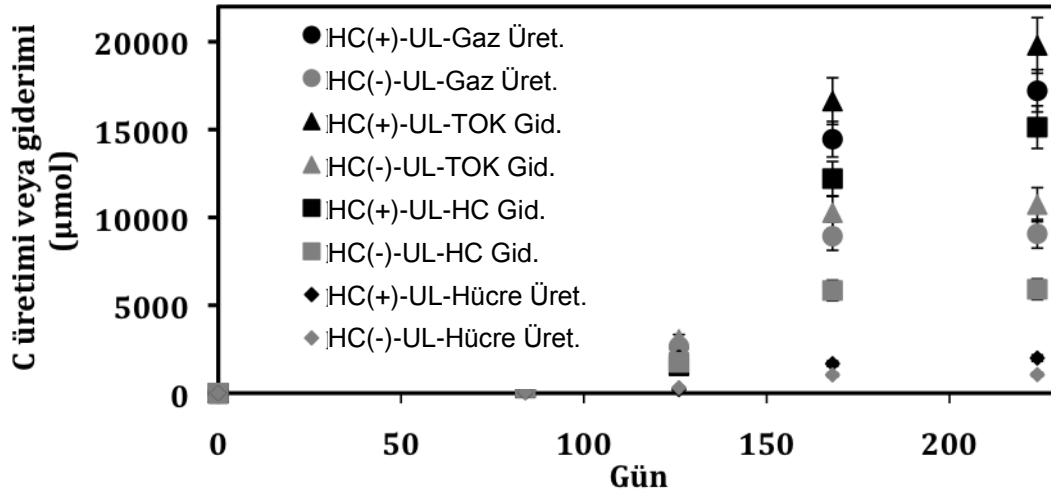
Başlangıçtaki TOK'nun HC(+)-UL ve HC(-)-UL mikrokozmoslarda sırasıyla %51 ve %57'si giderilmiştir. Bu sırasıyla %56 ve %97 hidrokarbon giderim verimlerine denk gelmektedir.

N ve P Giderimi

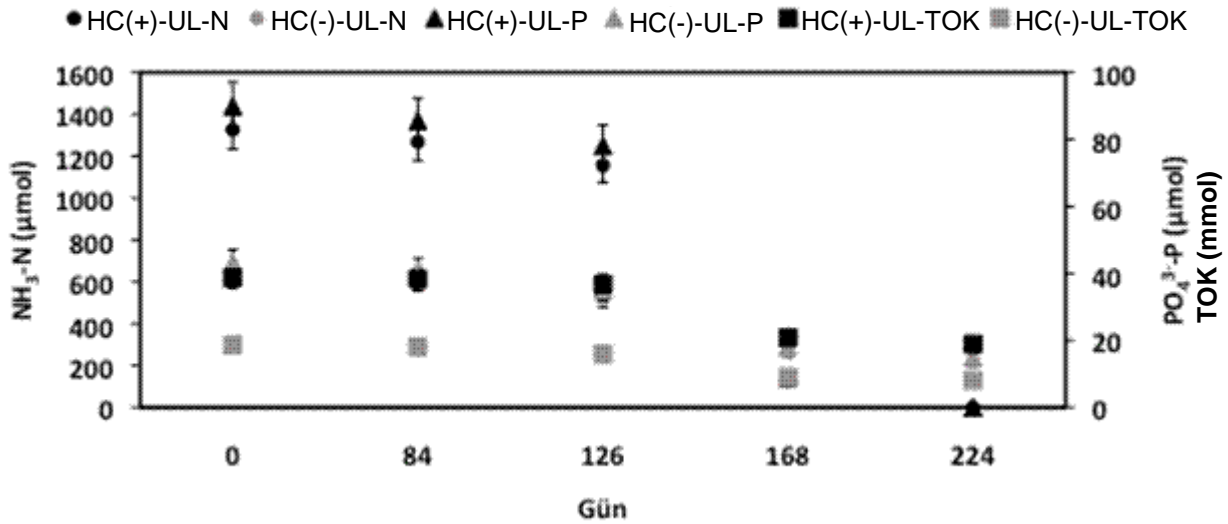
TOK, N ve P içeriklerinin değişimi Şekil 4'te verilmektedir. TOK/N/P HC(+)-UL ve HC(+)-UL mikrokozmoslarda sırasıyla 1000/78/12 ve 1000/47/7 oranlarında giderilmiştir. Bu durum HC(+) mikrokozmoslarda tüm TOK tüketilmeden N ve P'nin tümüyle tüketilmesine ve aktivitenin durmasına, HC(-) mikrokozmoslarda ise, dışarıdan karbon kaynağı eklenmediği için, tüm N ve P tüketilmeden biyolojik olarak ayrıştırılabilir TOK'un tümüyle tüketilmesiyle sonuçlanmıştır.

$$\text{TOK (Hidrokarbon)} + \text{TOK (Hidrokarbon olmayan)} \rightarrow \text{Hücre-TOK} + \text{CH}_4 + \text{CO}_2 \quad (1)$$

HC(+)	%77	%23	%10	%57	%30
HC(-)	%55	%45	%10	%58	%27



Şekil 3. C dengesi



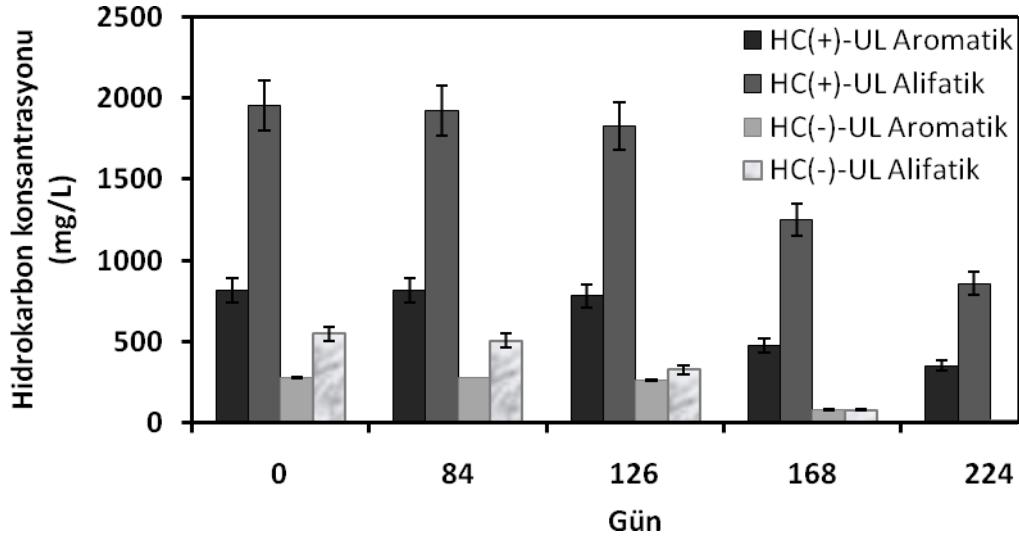
Şekil 4. TOK, N ve P içeriklerinin değişimi

Petrol hidrokarbonlarının bileşenlerinin değişimi

Aromatik ve alifatik hidrokarbon fraksiyonlarının değişimi Şekil 5'te verilmektedir. HC(+) mikrokozmoslarda Aromatik ve alifatiklerin sırasıyla %55 ve %57'si giderilmiştir. HC(-) mikrokozmoslarda ise, sedimentin doğal alifatik hidrokarbon içeriğinin tümü, aromatik hidrokarbon içeriğinin ise %92'si giderilmiştir.

Mikrokozmoslarda tespit edilen hidrokarbon tipleri Tablo 3'te verilmektedir. Tablo 4'te ayrı-

ca tespit edilen hidrokarbon tiplerinin mikrobiyal ayrıştırılması hakkında literatürde daha önce elde edilen bilgiler de özetlenmiştir. Haliç sedimentleri çok geniş bir spektrumda hidrokarbon tiplerini ayrıştırabilmektedir: bu çalışmada tespit edilen hidrokarbon tiplerinin tümünün metanojenik koşullarda mikrobiyal ayrışımı gerçekleşmiştir. Ayrışma hiyerarşisi şu şekildedir: ilk önce kısa zincirli n-alkanlar, daha sonra uzun zincirli n-alkanlar, sonra asiklik isoprenoidler, kısa zincirli aromatikler (BTEX) ve en son poliaromatik hidrokarbonlar (PAH). Tablo 4'ten



Şekil 5. Alifatik ve aromatik hidrokarbon konsantrasyonlarının değişimi

Tablo 4. Mikrokozmoslarda mikrobiyal ayrışımaya uğrayan hidrokarbon tipleri (Hidrokarbonlar hakkında daha önce literatürde mevcut, nitrat indirgeyici (N), sülfat indirgeyici (SR) ve metanojenik (M) koşullarda ayrışımalarına dair bilgi de özetlenmiştir. Daha önce belirtilen koşulda ayrışımaya uğradığı gösterilen hidrokarbonlar "+", deniz sedimentleri tarafından ayrışımaya uğradığı gösterilenler ise "Mar" olarak işaretlenmiştir)

Hidrokarbon	NR	SR	M
n-C ₉₋₂₀ Alkanlar	+	+	+Mar
n-C ₂₀₋₃₁ Alkanlar			+Mar
Fitan and Pristan	+Mar	+Mar	+Mar
Benzen	+Mar	+Mar	+Mar
Toluen	+Mar	+Mar	+Mar
Etilbenzen	+Mar	+Mar	+Mar
m-Xylene	+Mar	+Mar	+Mar
p-Xylene	+Mar	+Mar	+Mar
Naftalin	+Mar	+Mar	+Mar
Asenaftalin			
Asenaftin	+Mar	+Mar	+
Hidrokarbon	NR	SR	M
Floren	+Mar	+Mar	+
Fenantren	+Mar	+Mar	+Mar
Antraken	+	+Mar	+
Floranten	+Mar	+Mar	+
Pirin	+	+Mar	+
Benz(a)Antraken		+Mar	+
Krisen		+Mar	+
Benzo(k)loranten		+Mar	+
Benzo(a)Piren		+Mar	+
DiBenz(a,h)Antraken			+
Benzo(g,h,i)Perilin			

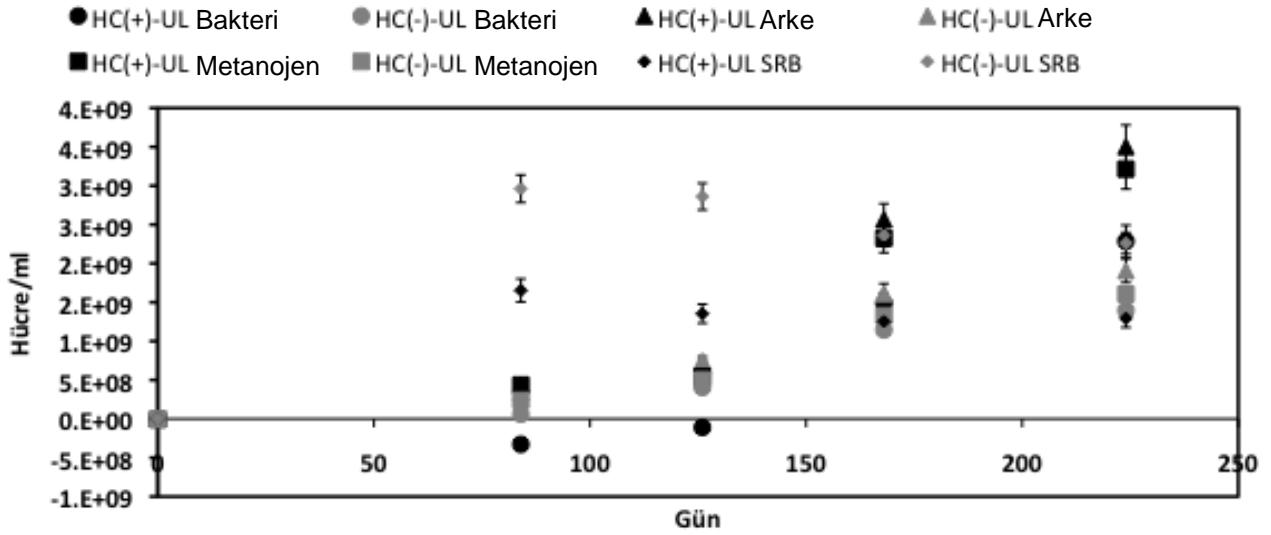
de görüldüğü gibi, tespit edilen hidrokarbonlardan bir kısmının mikrobiyolojik olarak ayrıştırılabildiği ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Mikrobiyal hücre sayısı ve aktivitesindeki değişimler

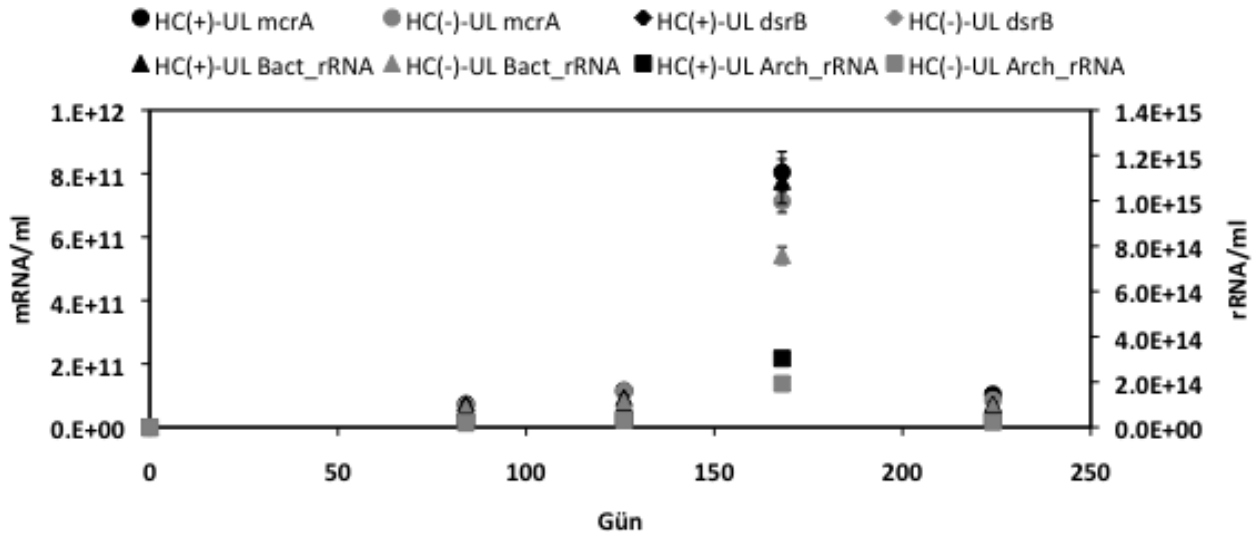
Başlangıçtaki hücre seviyelerine göre hesaplanmış diferansiyel hücre ve aktivite miktar değişimleri Şekil 6 ve 7'de gösterilmektedir. Başlangıçtaki 120-127 $\mu\text{mol SO}_4$ 126. günden önce tümüyle tüketildiği için, 84. günden sonra sülfat indirgeyici bakteri (SRB) aktivitesi gözlemlenmemiştir. Başlangıç seviyesi $\sim 30 \mu\text{M}$ olan nitrat ise başlangıç numunesi dışında hiçbir numunede gözlemlenmediği için nitrat indirgeyici bakterilerin miktar ve aktivitesi izlenmemiştir. Metanojenler ise inkübasyon süresince hem miktar hem de aktivite açısından yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Bu durum, mikrokozmoslardaki karbon gideriminin fermentasyon bakterileri ve metanojenlerin oluşturduğu sentrofik topluluk tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Anaerobik biyoslahın Haliç sedimentlerine uygulanabilirliği

Deniz sedimentlerinden anaerobik koşullarda elde edilen hidrokarbon ayrıştırma hızları Tablo 5'te verilmektedir. Görüldüğü üzere, bu çalışmada elde edilen hızlar zenginleştirilmiş kültürlerden elde edilen hızlarla yarışır seviyede bulunmakla beraber, halen aerobik ayrışım hızlarından çok daha düşük seviyelerdedir. Fakat



Şekil 6. Hücre miktar değişimleri



Şekil 7. Hücre aktivite değişimleri

kronik kirliliğin yaşandığı Haliç sedimentlerine sürekli oksijen transferi hem fiziksel hem de ekonomik olarak imkansız olduğu için tek alternatif anaerobik hidrokarbon degradasyonuna dayanan bir biyoyıslah stratejisi geliştirilmesidir. Bu strateji ile aerobik koşullarda uygulanacak bir ıslah çalışmasından çok daha uzun sürelerde sonuç alınacaktır, fakat sadece sedimentlere N ve P takviyesine dayandırılışı için uzun süre çok az bir maliyetle uygulanabilme olanağı vardır. Bu nedenle Haliç körfezinde yaşanan kronik kirliliğe uzun vadede çözüm getirebileceğini ipuçları bu çalışmayla elde edilmiştir.

Şu anda T.C.Denizcilik Müsteşarlığı, İSKİ ve İBB'nin de katılımıyla, bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Haliç Körfezi dip sedimentlerine N ve P takviyesi ile körfezde petrol hidrokarbonlarından kaynaklanan kirliliğin ıslahına dair yapılacak olan gerçek ölçekli bir uygulama çalışmasının hazırlıklarını yapmaktayız. Bu gerçek ölçekli çalışma başarıyla sonuçlanırsa dünya çapında, deniz ortamlarında petrol hidrokarbonları nedeniyle yaşanan kirliliğin giderilmesinde kullanılabilir, ekonomik ve az insan müdahalesi gerektiren bir biyoyıslah stratejisi geliştirilmiş olacaktır.

Tablo 5. Deniz sedimentlerinden anaerobik/anoksik koşullarda elde edilen hidrokarbon ayrıştırma hızları

Aşı çamuru	Sübatrat	e ⁻ -alıcı eklenmesi	Giderim Hızı - ug/g Sediment.L.gün	Referans
SRB zenginleştirilmiş kültürü	n-alkanlar	Sülfat	0.6	Kniemeyer vd., 2007
SRB zenginleştirilmiş kültürü	Fenantrin	Sülfat	1.4	Davidova vd., 2007
Sediment	Ham petrol	-	7	Miralles vd. 2007
Sediment	PAH	Sülfat	48	Rothermich vd., 2002
Sediment	n-alkanlar	-	60	Jones vd., 2008
Sediment	PAH	-	228	Kim vd., 2008
SRB Enrichment	Naftalin	Sülfat	880	Musat vd., 2009
Sediment	n-alkanlar, PAH ve BTEX	-	700	Bu çalışma
Sediment	Ham petrol	Oksijen	1970	Syakti vd., 2006
Sediment	Ham petrol	Oksijen	4285	Roling vd., 2002

Sonuçlar

Haliç sedimentlerinin anaerobik koşullarda biyoislahının mümkün olduğunu gösteren sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Sedimentlerde hidrokarbon ayrıştırma kapasitesine sahip mikroorganizmalar yüksek miktarda ve aktivitede bulunmaktadır.
- Sedimentlerde mevcut bu mikrobiyal aktivite N ve P takviyesi ile yaklaşık 9× artırılabilir.
- Besi maddesi takviyesi ile iyileştirilen hidrokarbon ayrışım hızları, sedimentlere anaerobik koşullarda biyoislahın uygulanabilmesine olanak verecek kadar yüksektir.

Kaynaklar

- Colwell, F.S., Boyd, S., Delwiche, M.E., Reed, D.W., Phelps, T.J. ve Newby, D.T., (2008). Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at hydrate ridge, Cascadia Margin, *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 3444-3452.
- Davidova, I.A., Gieg, L.M., Duncan, K.E. ve Suflita, J.M. (2007). Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment, *ISME Journal* doi: 10.1038/ismej.2007.48.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. ve Vanbroekhoven, K., (2006). *dsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-

reducing Bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 194-205.

- Ince, O., Akarsubasi, A.T., Sayi, N., Eyice, O., Ovez, S. ve Ince, B.K., (2006). Analysis of anaerobic microbial diversity in Haliç (marine inlet) sediment by molecular tools, *Advances in Molecular Medicine*, **2**, 71-77.
- Jones, D.M., Head, I.M., Gray, N.D., Adams, J.J., Rowan A.K., Aitken, C.M., Bennett, B., Huang, H., Brown, A., Bowler, B.F., Oldenburg, T., Erdmann, M. ve Larter, S.R., (2008). Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs, *Nature*, **45**, 176-80.
- Kim, M., Bae, S.S., Seol, M., Lee, J.H. ve Oh, Y.S., (2008). Monitoring nutrient impact on bacterial community composition during bioremediation of anoxic PAH-contaminated sediment, *Journal of Microbiology*, **46**, 615-23.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel K., Wilkes, H. ve Blumenberg, M., (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by novel marine sulphate-reducing bacteria, *Nature*, **449**, 898-901.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. ve Clark, D.P., (2009). *Brock biology of microorganisms*, 12th edition, Pearson Benjamin-Cummings Press, San Francisco.
- Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Bertrand, J.C. ve Cuny, P., (2007). Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic

- coastal marine sediment artificially contaminated with oil, *Chemosphere*, **68**, 1327-1334.
- Musat, F., Galushko, A.S., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B. ve Rabus, R., (2008). Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria, *Environmental Microbiology*, **11**, 209-219.
- Rothermich, M.M., Hayes, L.A. ve Lovley, D.R., (2002). Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbour sediment, *Environmental Science and Technology*, **36**, 4811-4817.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P. ve Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5537-5548.
- Ruppel, S., Rühlmann, J. ve Merbach, W., (2006). Quantification and localization of Bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting, *Plant Soil*, **286**, 21-35.
- Syakti, A.D., Mazzella, N., Nerini, D., Guiliano, M., Bertrand, J.C. ve Doumenq, P., (2006). Phospholipid fatty acids of a marine sedimentary microbial community in a laboratory microcosm: Responses to petroleum hydrocarbon contamination, *Organic Geochemistry*, **37**, 1617-1628.
- Takai, K. ve Horikoshi, K., (2000). Rapid detection and quantification of members of the Archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5066-5072.
- Vrede, K., Heldal, M., Norland, S. ve Bratbak, G., (2002). Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2965-2971.
- Widdel, F. ve Bak, W., (1992). *The Prokaryotes*, 2nd edition, Springer, New York.