

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Hatice Aysun MERCİMEK

2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN MİKROBİYAL BİYODEGRADASYONU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN MİKROBİYAL BİYODEGRADASYONU

Hatice Aysun MERCİMEK

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 02/12/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof.Dr.Sadık DİNÇER
DANIŞMAN

.....
Yrd.Doç.Dr.Gülcihan GÜZELDAĞ
2. DANIŞMAN

.....
Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Doç.Dr.Fatih MATYAR
ÜYE

.....
Yrd.Doç.Dr. Ayşenur KAYA
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2009D22

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN MİKROBİYAL BİYODEGRADASYONU

Hatice Aysun MERCİMEK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. Sadık DİNÇER
2. Danışman :Yrd. Doç. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ
Yıl: 2011, Sayfa: 137
Jüri :Prof. Dr. Sadık DİNÇER
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
:Doç. Dr. Fatih MATYAR
:Yrd. Doç. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ
:Yrd. Doç. Dr. Ayşenur KAYA

Bu çalışmada, NATO ve Kilis topraklarından izole edilen 4 bakteri kullanılarak çevresel açıdan toksisitesi oldukça yüksek ve nitroaromatik karakterde bir patlayıcı olan trinitrotoluenin minimal besiyerinde biyodegradasyonu araştırılmıştır. Bu topraklardaki TNT kirlilik miktarı kolorimetrik ve HPLC analizleri ile belirlenmiştir.

Biyodegradasyon ortamından periyodik aralıklarla alınan örneklerin sıvı-sıvı ekstraksiyonlarının HPLC analizleri yapılarak TNT miktarları belirlenmiştir. 50 ve 75 ppm TNT içeren abiyotik ortamlarda gerçekleşen kimyasal parçalanma sırasıyla %16 ve %13 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte bakteriyel kültürlerde 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT azalışı AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatları için 50 ppm TNT içeren besiyerinde sırasıyla %46, %35, %68 ve %29, 75 ppm TNT içeren ortamlarda ise %59, %45, %77 ve %41 olarak belirlenmiştir. Bakteriyel ve abiyotik ortamlarda spektrofotometrik analizler yapılarak parçalama sırasında nitrit ve nitrat birikimi araştırılmıştır. Abiyotik ve AD1 ve AD3 izolatlarına ait ortamlarda nitrit oluşumu gözlenirken, hiçbir kültürde nitrata rastlanmamıştır. TLC ve GC-MS analizleri ile degradasyon ürünlerinin tanımlanması yapılmıştır. AD1 ve AD3 kültürlerinde 2,4-DNT ve 4-ADNT; AD2 ve AD4 kültürlerinde ise 4-ADNT birikimleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal parçalama, TNT, Patlayıcılar, Nitroaromatik bileşikler

ABSTRACT

PhD THESIS

MICROBIAL BIODEGRADATION OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE

Hatice Aysun MERCİMEK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Co Supervisor :Asst. Prof. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ
Year: 2011, Pages: 137
Jury: :Prof. Dr. Sadık DİNÇER
:Prof. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ
:Assoc. Prof. Dr. Fatih MATYAR
:Asst. Prof. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ
:Asst. Prof. Dr. Ayşenur KAYA

In this study, biological degradation of TNT which is very high toxicity for environmental and an explosive in nitroaromatic character was researched in minimal medium by four bacteria isolated from soils of NATO and Kilis. The amount of TNT contaminant in these soils was detected by HPLC and colorimetric analyses.

The amounts of TNT in liquid-liquid extraction of samples taken from biodegradation media at periyodic intervals were determined by HPLC analyses. Chemical degradation that is occurred in abiotic media containing 50 ve 75 ppm TNT was determined respectively as 16% and 13%. However, reduction of TNT in minimal media which containing 50 ppm TNT of AD1, AD2, AD3 and AD4 isolates were detected respectively 46%, 35%, 68% and 29%; these percentages in minimal media containing 75 ppm TNT were 59%, 45%, 77% ve 41% at the end of the incubation period of 96 hours. Besides, during biodegradation accumulation of nitrite and nitrate were examined by spectrophotometric analyses in bacterial and abiotic media. While nitrite production was observed in cultures of AD1 and AD3 isolates and abiotic media, nitrate was detected none of the cultures. Identification of degradation productions were performed by TLC ve GC-MS analyses. Accumulations of 2,4-DNT and 4-ADNT in cultures of AD1 and AD3; 4-ADNT in cultures of AD2 ve AD4 were determined.

Key Words: Microbial biodegradation, TNT, Explosives, Nitroaromatic compounds

TEŞEKKÜR

Doktoram süresince bilgisiyle çalışmamı yönlendiren değerli danışmanım Prof.Dr. Sadık DİNÇER'e, ikinci danışmanım olarak akademik desteğinin yanı sıra manevi desteğini esirgemeyerek her koşulda yanımda olduğunu hissettiğim çok değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ'a çok teşekkür ederim.

TNT'nin temin edilmesi sırasındaki desteklerinden dolayı Ç.Ü. Rektörü Prof.Dr. Alper AKINOĞLU'na ve Makine ve Kimya Endüstrisi Müdürlüğü'ne çok teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamalarında benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Ayşenur KAYA'ya ve ayrıca değerli hocalarım Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e ve Doç.Dr. Fatih MATYAR'a teşekkür ederim.

Analitik analizler süresince rahatsızlık verdiğim sevgili hocam Yrd.Doç.Dr. Sibel IRMAK'a çok teşekkür ederim. Prof.Dr. Fatih ÖZOĞUL'a ve laboratuvar çalışanlarına, Ç.Ü.F.E.F. Kimya Bölümü'nde yapılan GC-MS analizleri süresince sabrı ve anlayışından dolayı değerli hocalarım Prof.Dr. Bilgehan GÜZEL, Dr. Murat TÜRK ve Uzman Serkan KARACA'ya teşekkür ederim.

Tezim sırasındaki özvereli tutumundan dolayı sayın hocam Doç.Dr. Nazım ŞEKEROĞLU'na ve manevi desteğinden dolayı Arş.Gör. Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER'e çok teşekkür ederim.

Bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na, tezime mali destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, doktoram sırasında yararlandığım 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı'ndan dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) Değerlendirme ve Destekleme Kurulu'na çok teşekkür ederim.

Başta Uzman Biyolog Melis SÜMENGEN olmak üzere adını yazamadığım bakteriyoloji laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Canım aileme bugüne kadar ki emekleri ve destekleri için annem Cemile MERCİMEK'e, babam Mehmet MERCİMEK'e, abim Tayfun MERCİMEK'e ve canım kuzenim Kimyager Akay MERCİMEK'e ve tez çalışmaları sırasında benimle sabahladığı ve lisanstan bu yana beni yalnız bırakmadığı için sevgili nişanlım Uzman Fizikçi Deniz Kadir TAKCI'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Patlayıcılar.....	1
1.2. Patlayıcıların Tarihi Gelişimi.....	1
1.3. Patlayıcıların Termokimyası.....	3
1.4. Patlayıcı Tipleri.....	5
1.4.1. Patlayıcı Tiplerinin Sınıflandırılması.....	6
1.4.2. Kompozisyona Dayalı Sınıflandırma.....	7
1.4.2.1. Oksitleyici ve Yakıt Karışımları.....	7
1.4.2.2. Saf ve Stabilizatörle Karışım Halde Bulunan Bileşikler.....	7
1.4.3. Materyalin Duyarlılığına Dayalı Sınıflandırma.....	8
1.4.4. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılma.....	8
1.5. Patlayıcıların Canlılar ve Çevre Üzerindeki Toksik Etkisi.....	9
1.6. Toprakların Arındırılmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler.....	12
1.6.1. Yakma.....	12
1.6.2. Kompostlama.....	13
1.7. Nitroaromatik Bileşikler.....	14
1.8. TNT'nin Yapısı ve Özellikleri.....	15
1.9. TNT'nin Toksik Etkileri.....	18
1.10. TNT Atıklarının Fizikokimyasal Arıtımı.....	20
1.10.1. Adsorbsiyon.....	20
1.10.2. Abiyotik Parçalama.....	21
1.10.3. Oksitadif Parçalanma.....	22

1.10.4. Ters Osmoz.....	23
1.11. TNT'nin Biyodegradasyonu	23
1.11.1. Bakteriyel Parçalama	24
1.11.1.1. Aerobik Bakteriyel Parçalama	26
1.11.1.2. Anaerobik Bakteriyel Parçalama.....	27
1.11.2. Fungal Parçalama.....	30
1.11.3. Fitoremidasyon	31
1.12. TNT'nin Degradasyon Ürünleri.....	32
1.13. Biyodegradasyona Enzimsel Bakış	33
1.14. Çalışmanın Amacı	35
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	37
3. MATERYAL VE METOD	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT).....	47
3.1.2. Toprak Örnekleri.....	48
3.1.3. Parçalanma Ürünlerinin Standartları.....	48
3.1.4. Pikrik asit (2,4,6-Trinitrofenol)	49
3.1.5. Besiyerleri.....	49
3.1.5.1. Pikrik Asit İçerikli Minimal Besiyeri	49
3.1.5.2. Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP)	50
3.1.5.3. Plate Count Agar (PCA)	51
3.1.5.4. Nutrient Agar (NA)	51
3.1.5.5. Tryptic Soy Agar (TSA)	51
3.1.5.6. Nitrat Buyyon.....	52
3.1.5.7. Ön Üretim Besiyeri	52
3.1.5.8. Minimal Besiyeri.....	53
3.1.6. Çözeltiler ve Ayıraçlar.....	53
3.1.6.1. TNT Stok Çözeltisi.....	53
3.1.6.2. 50 µM Potasyum Fosfat Tamponu	53
3.1.6.3. Griess-Illosvay Ayırıcı.....	54
3.1.6.4. Renklendirme Çözeltisi	54

3.1.6.5. Standart Nitrit Çözeltisi	54
3.1.6.6. Standart Nitrat Çözeltisi.....	55
3.1.6.7. %5 KOH Çözeltisi.....	55
3.1.6.8. Higg's Griess Ayıracı	55
3.2. Metod.....	56
3.2.1. Toprak Örneklerinde TNT Varlığının Belirlenmesi	56
3.2.2. HPLC Analizleri İçin Toprak Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	56
3.2.3. Bakteri İzolasyonu	57
3.2.4. İzolat Seçimi	57
3.2.5. Bakterilerin Tanımlanması	58
3.2.6. TNT Toleransının Belirlenmesi.....	58
3.2.7. Nitrit Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	58
3.2.8. Nitrat Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi.....	59
3.2.9. Biyodegradasyon Ortamının Hazırlanması	60
3.2.10. Abiyotik Degradasyon Çalışmaları.....	61
3.2.11. Biyodegradasyon Ortamlarının pH Kontrollerinin Yapılması	62
3.2.12. Reaksiyon Ürünlerinin İzolasyonu	62
3.2.13. Bakteri Gelişiminin İzlenmesi	63
3.2.14. Analitik Analizler.....	63
3.2.14.1. Spektrofotometri.....	63
3.2.14.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	64
3.2.14.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi(GC-MS)	65
3.2.14.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	65
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	67
4.1. Toprak Örneklerindeki TNT Kirliliğinin Kolorimetrik Analizi	67
4.2. Toprak Örneklerindeki TNT Varlığının HPLC İle Tespiti.....	68
4.3. Bakteri İzolasyonu.....	68
4.4. İzolatların Nitrat Redüksiyon Aktiviteleri	70
4.5. İzolatların Tanımlanması	72
4.6. TNT Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	74
4.7. TNT'nin Aerobik Biyodegradasyonu.....	74

4.8. TNT'nin Zamana Bağlı Biyolojik Parçalanabilirliğinin Gözlenmesi	75
4.9. Bakteriyel Degradasyon Çalışmalarda pH Değişiminin İzlenmesi.....	80
4.10. Zamana Bağlı Bakteriyel Hücre Gelişimi.....	82
4.11. Toprak Örneklerindeki Nitrit Miktarı.....	89
4.12. Zamana Bağlı Nitrit Oluşumunun Gözlenmesi.....	90
4.13. Zamana Bağlı Nitrat Oluşumunun Gözlenmesi	95
4.14. Parçalanma Ürünlerinin Tanımlanması	97
4.14.1.GC-MS analizleri	97
4.14.2. TLC analizleri	98
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ	127
EKLER.....	128

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. TNT'nin moleküler ve yapısal özellikleri	17
Çizelge 3.1. TNT'nin özellikleri	47
Çizelge 3.2. Parçalanma ürünlerinin özellikleri	48
Çizelge 3.3. Pikrik asitin özellikleri	49
Çizelge 3.4. HPLC çalışma koşulları ve izokratik elüsyon programı	64
Çizelge 3.5. GC-MS çalışma prosedürü	65
Çizelge 4.1. Nitrat redüksiyon test sonuçları	72
Çizelge 4.2. Bakterilerin tanılama sonuçları	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Bazı patlayıcıların kimyasal kompozisyonu.....	4
Şekil 1.2. Patlayıcıların sınıflandırılması.....	7
Şekil 1.3. Toluen'den TNT eldesi	16
Şekil 1.4. TNT'den Meisenheimer kompleksi oluşumu	25
Şekil 1.5. Nitro grupların amino gruplara redüksiyonu	26
Şekil 1.6. TNT'nin aerobik biyodegradasyon mekanizması.....	27
Şekil 1.7. TNT'nin anaerobik bakteriyel biyodegradasyon şeması.....	29
Şekil 3.1. TNT'nin katı haldeki görünümü	47
Şekil 3.2. Nitrit kalibrasyon eğrisi.....	59
Şekil 3.3. Nitrat kalibrasyon eğrisi	60
Şekil 3.4. Biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan deney ortamları (96.saat)	61
Şekil 3.5. Abiyotik degradasyon ortamı (96. saat).....	62
Şekil 4.1. Toprak örneklerinin kolorimetrik analiz sonucu renk değişimi	67
Şekil 4.2. Toprak örneklerindeki TNT miktarı	68
Şekil 4.3. 3.periyot sonundaki sıvı kültürdeki renk değişimi.....	69
Şekil 4.4. Pikrik asit içerikli minimal besiyerinden seçilen bakteri morfolojisi	69
Şekil 4.5. GSP agardan seçilen koloni morfolojileri	70
Şekil 4.6. Nitrat redüksiyon testinin değerlendirilmesi	71
Şekil 4.7. AD1 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi	75
Şekil 4.8. AD2 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi	76
Şekil 4.9. AD3 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi	77
Şekil 4.10. AD4 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi	78
Şekil 4.11. Minimal besiyerinde zamana bağlı pH değişimi	80
Şekil 4.12. 50 ppm TNT içeren kültürlerde pH değişimi	81
Şekil 4.13. 75 ppm TNT içeren kültürlerde pH değişimi	81
Şekil 4.14. TNT'nin AD1 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi	82
Şekil 4.15. TNT'nin AD2 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi	83
Şekil 4.16. TNT'nin AD3 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi	84
Şekil 4.17. TNT'nin AD4 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi	85

Şekil 4.18. AD1 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL).....	86
Şekil 4.19. AD2 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL).....	87
Şekil 4.20. AD3 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL).....	88
Şekil 4.21. AD4 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL).....	89
Şekil 4.22. Toprak örneklerindeki nitrit miktarı	90
Şekil 4.23. AD1 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi	91
Şekil 4.24. AD2 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi	92
Şekil 4.25. AD3 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi	93
Şekil 4.26. AD4 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi	94
Şekil 4.27. 50 ppm TNT içeren kültürlerde nitrat miktarı	96
Şekil 4.28. 75 ppm TNT içeren kültürlerde nitrat miktarı	96
Şekil 4.29. Standartların UV ışığı altındaki görünümü	98
Şekil 4.30. Standartların boyama sonrası görüntüleri.....	99
Şekil 4.31. 0. saate ait örneklerin UV ışığı altındaki görünümü	99
Şekil 4.32. Lekelenmelerin boyama sonrası görünümü.....	99
Şekil 4.33. 96. saate ait örneklerin UV ışığı altındaki görünümü	100
Şekil 4.34. Lekelenmelerin boyama sonrası görünümü.....	100
Şekil.4.35. Bakterilerin TNT'yi indirgeme yolları.....	101
Şekil 4.36. Kültürlerde 96. saat sonundaki renk değişimi	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-ADNT	: 2-amino-4,6-dinitrotoluene
4-ADNT	: 4-amino-2,6-dinitrotoluene
ADNT	: Aminodinitrotoluene
AHANT	: 2-hydroxylamino-4-amino-6- nitrotoluene
ADEPT	: Antibody-directed enzyme pro-drug therapy
AMDNT	: Aminodinitrotoluene
2-AMDNT	: 2-amino-4,6-dinitrotoluene
4-AMDNT	: 4-amino-2,6-dinitrotoluene
AN	: Amonyum nitrat
ANFO	: Amonyum nitrat / yakıt yağ
ATSDR	: Agency of Toxic Substances and Disease Registry
2,2-AZT	: 2,2-azoxytoluene
BHI	: Brain Heart İnfusion Agar
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorit dihidrat
Ca(OCl) ₂	: Kalsiyum hipoklorit
CFU	: Colony Forming Unit
CODH	: Karbon monoksit dehidrogenaz
COOH	: Karboksil
CH ₃	: Metil
DAMNT	: Diaminonitrotoluene
2,6-DAMNT	: 2,6-diaminonitrotoluene
2,4-DAMNT	: 2,4-diaminonitrotoluene
2,4-DANT	: 2,4-diamino-6-dinitrotoluene
2,4-DAT	: 2,6-diamino-4-nitrotoluene
2,4-DA-6-NT	: 2,4-Diamino-6-nitrotoluene
DHANT	: 2,4-dihydroxylamino-6-nitrotoluene
2,4-DNT	: 2,4-Dinitrotoluene
2,6-DNT	: 2,6-Dinitrotoluene
EDGN	: Etilenglikol dinitrat

EPA	: Environmental Protection Agency
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Demir (III) klorit heksahidrat
Fe_2O_3	: Ferrik oksit
GC	: Gas Chromatography
GC-MS	: Gas Chromatography–Mass Spectrophometry
GDEPT	: Gen-directed enzyme pro-drug therapy
GSP	: Glutamate Starch Phenol Red Agar
GTN	: Gliserol trinitrat
HADNT	: Hidroksilamin-dinitrotoluene
2-HA-4-ANT	: 2-hidroksilamin-4-amino-6-nitrotoluene
2-HADNT	: 2-hidroksilamin-4,6-dinitrotoluene
HEXYL	: Heksil
HMTD	: 3,4,8,9,12,13-hexaoxa-1,6-diazabisiklo (4,4,4) tetradekan
HMX	: Oktahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokin
HNO_3	: Nitrik asit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HQDA	: Headquarters, Department of the Army
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IMVIC	: İndol, Metil red, Voges - Proskauer and Citrat
KCN	: Potasyum siyanür
K_2HPO_4	: Dipotassium phosphate
KH_2PO_4	: Monopotassium phosphate
KNO_3	: Potasyum nitrat
MgCl_2	: Magnezyum klorit
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Magnezyum sülfat
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Manganaz klorit tetrahidrat
Mn^{+2}	: Manganaz
MS	: Mass Spectrophometry
NA	: Nutrient Agar
NADH	: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP^+	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAD(P)H	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	: Monosodyum fosfat monohidrat
NaMoO ₄ .2H ₂ O	: Sodyum molibdate
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaNO ₃	: Sodyum nitrat
(NH ₄) ₂ HPO ₄	: Diamonyum fosfat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum nitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaSO ₄	: Sodyum sülfat
NC	: Selüloz nitrat
NG	: Gliserol trinitrat
NH ₂	: Amin
NH ₄	: Amonyum
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
NHOH	: Hidroksilamin
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrit
NO ₃	: Nitrat
OD	: Optik yoğunluk
OH	: Hidroksil
OYE	: Old yellow enzyme
PCA	: Plate Count Agar
ppm	: Milyonda bir
PTN	: Pentaerithritol tetranitrat
RDX	: Siklotrimethilentrinitramin
Rf	: Alıkonma faktörü (Retention factor)
rpm	: Revolutions per minute
SEMTEX	: Sementin ve Explosia
SO ₃ Na	: Sodyum sülfanat
TAT	: Triaminotoluene

TATP	: 3,3,6,6,9,9-heksametil-1,2,4,5,7,8-heksaoksasiklonan
TERYL	: Teril
TLC	: Thin Layer Chromatography
TNB	: 1,3,5-Trinitrobenzene
TNT	: 2,4,6-Trinitrotoluene
¹⁴ C-TNT	: Karbon işaretli 2,4,6-Trinitrotoluen
TSA	: Tryptic Soy Agar
USACHPPM	: Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine
UV	: Ultraviyole
VDEPT	: Virus-directed enzyme pro-drug therapy
VITEK	: Microbial identification system
v/w	: Hacim/ağırlık

1. GİRİŞ

Çevre, insan ve diğer canlıların uyum ve denge içerisinde bir arada varlık ve gelişimlerini sürdürdükleri dış ortam şeklinde tanımlanmaktadır. Çevrenin kapasitesi üzerinde dengeyi bozabilecek her türlü maddenin birikimi çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Teknolojik gelişimler ve sanayileşmenin bir gereği olan fabrikaların atıkları ekosistem içerisindeki doğal dengenin bozulmasının en önemli nedenlerinden biri olarak görülmektedir. Özellikle parçalanmaya dirençli yapıda olan zirai ilaçlar, tekstil boyar maddeler ve patlayıcıların üretim tesislerinden çevreye bırakılan atıklar risk faktörleridir.

1.1. Patlayıcılar

Herhangi bir etkiye maruz kalmadıkları sürece kararlı durumda olan ancak çevresinde oluşabilecek şiddetli ve ani bir basıncın etkisi altında kaldıklarında hızlı bir enerji açığa çıkararak patlama özelliğine sahip kimyasal yapıdaki materyallerdir. Katı özellikteki patlayıcıların patlaması sonucu şiddetli bir gaz yayılması meydana gelmektedir. Bu yayılım çevre üzerine güçlü bir basınç uygulayarak patlama ile sonuçlanan şok dalgaları yaratmaktadır. Genel olarak patlayıcılar patlama sonrasında Karbondioksit, Karbonmonoksit, Oksijen, Azot ve Su buharı gibi gaz içerikli ürünlerin ortaya çıkmasını sağlayan yüksek oranda Azot ve Oksijen içermektedirler (Seth- Smith, 2002).

1.2. Patlayıcıların Tarihi Gelişimi

Patlayıcıların tarihi; barut karışımlarının üretiminden, patlayıcı gelişim endüstrileri ve üretim prosesleri olarak çok geniş bir yelpazede incelenmektedir (Broder ve Westmoreland, 1998).

Barut 19. yüzyılın ortalarında Çinliler tarafından keşfedilmiş olup ve potasyum nitrat, sülfür ve kömür kombinasyonu ile formüllendirilmiş ilk patlayıcıdır (Fordham, 1980; Seth-Smith, 2002; Akhavan, 2004). 1280'li yıllarda Çin'de ilk silah

geliştirilmesinde ana materyal olarak kullanılmıştır. Barut'un 1627'de Macaristan'da maden çıkarma çalışmaları kayda geçmiş ilk kullanımudur (Fordham, 1980; Seth-Smith, 2002).

1847 yılında gliserol trinitrat (nitrogliserin veya GTN) Ascanio Sobrero tarafından geliştirilmiştir (İgnarro, 2002). İlk kez ilaç olarak karakterize edilen GTN 140 yılı aşkın zamandır göğüs ağrısı tedavilerinde kullanılmaktadır. (Guttermann, 2007). GTN, O-NO₂ bağlarıyla karakterize edilen nitrat ester patlayıcılara bir örnektir (White ve Snape, 1993; Seth-Smith, 2002). GTN'nin patlama zamanı tahmin edilemediği için 1863'de Alfred Nobel tarafından dinamit tapası veya ateşleyici parça icat edilmiştir (Fordham, 1980; Dağçimen, 2006). Nobel'in icadından bu yana dinamitin ana maddesi olarak GTN; bir katı içerisine absorpsiyonu ile stabilize edilmiş ve böylelikle düzensiz patlama davranışı kontrol altına alınmıştır (Seth-Smith, 2002; Hummel, 2005).

Savaşlar için bombaların geliştirilmesi ile GTN'den daha az duyarlı patlayıcılara ihtiyaç duyulmuştur. Bununla birlikte 1771'de bir aromatik halkaya bağımlı NO₂ gruplarınca karakterize edilen bir nitroaromatik bileşik 2,4,6-trinitrofenol (pikrik asit) geliştirilmiştir (Seth-Smith, 2002). Patlayıcılık özelliği keşfedilene kadar (1871) boya olarak kullanılan bu bileşik ilk kez 1885'de bomba üretiminde kullanılmıştır (Seth-Smith, 2002; Akhavan, 2004). GTN'den daha stabil olmasına karşın ani şoklar veya sürtünme gibi etkenler ile mermi kovanlarının dış kaplama metalleri ile reaksiyona girerek beklenmedik patlamalara yol açması bu materyalin askeri mühimmat üretiminde kullanımını kısıtlamıştır (Seth-Smith, 2002). Bu nedenle 1863'lerden 1891'lere kadar patlayıcılık özelliği keşfedilememesine rağmen diğer bir nitroaromatik patlayıcı olan 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) Joseph Wilbrand tarafından sentezlenmiştir (Fordham, 1980; Seth-Smith, 2002). 1902'de Almanların bomba yapımında pikrik asit yerine TNT'yi tercih etmelerinden sonra 1916'da Britanya'da genel olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapısal olarak pikrik aside benzerlik gösteren TNT düşük şok duyarlılığı ve düşük asidite avantajlarına karşın güçlü bir tetikleyiciye ihtiyaç duyabilmektedir. Britanya'da I. Dünya Savaşı sırasında 275.000 tonun üzerinde pikrik asit ve TNT üretilmiştir ve şüphesiz TNT

20.yüzyılın en çok kullanılan patlayıcısı olmuştur (Epa, 2002; Seth-Smith, 2002; Mathieu ve Stucki, 2004).

Diğer bir nitrat ester patlayıcı, pentaerithritol tetranitrat (PETN) 1894'de Almanya'da geliştirilmiş ve II. Dünya Savaşı sırasında kullanılmaya başlanmıştır. PETN'nin çok duyarlı olması ve kolayca patlayabilmesi tek başına kullanılmasına olanak sağlamamaktadır. Bu nedenle SEMTEX gibi (RDX ve polihidroksi karbon içeren) plastik patlayıcılar ile kombine edilerek veya bir tetikleyici içerisinde kullanılmaktadır (Epa, 2002; Seth-Smith, 2002).

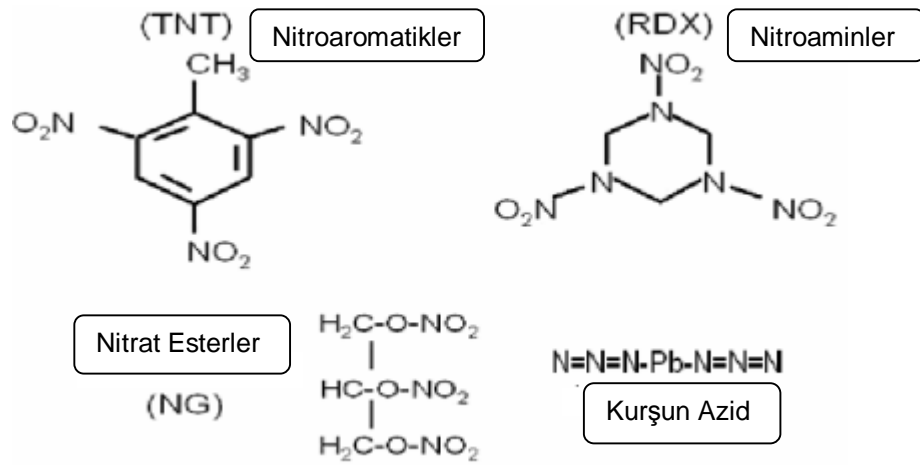
İlk nitroamin patlayıcı heksahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin 1899'da Hans Hemming tarafından geliştirilmiştir. 1920'de patenti alınmış bu patlayıcı Woolwich Savaş Daire'sinde geliştirilerek siklotrimethilentrinitramin (RDX) olarak isimlendirilen güçlü bir patlayıcı üretilmiştir. PETN ve GTN'den çok daha güçlü fakat duyarlılığı oldukça düşük bir patlayıcıdır. Günümüzde RDX çoğunlukla askeri patlayıcı olarak geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. RDX'i 1930'da üretilen ve oktahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokin (HMX) adı verilen stabilitesi daha yüksek ikinci bir sentez ürünü patlayıcı izlemektedir (Seth-Smith, 2002; Mathieu ve Stucki, 2004). Günümüzde HMX'den de daha güçlü nitroamin patlayıcıların yeni jenerasyonlarının üretimi konusunda çalışmalar devam etmektedir. Patlayıcı endüstrisindeki gelişmeler, en güçlü ve en kararlı materyalin üretilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır (Seth-Smith, 2002; EPA, 2002).

1.3. Patlayıcıların Termokimyası

Patlama reaksiyonlarının yıkıcılık etkisi önceleri cm-m/sn (düşük reaksiyon oranı) olarak ifade edilirken yapılan çalışmalar sonucu günümüzde bu etki km/sn (yüksek reaksiyon oranı) ile tanımlanmaktadır. Patlayıcıların reaktifliği kimyasal yapılarına bağlıdır. Nitrat (-ONO₂), nitro (-NO₂), klorat (-ClO₃) ve perklorat (-ClO₄) gibi patlayıcı kimyasalların tümü düşük termodinamik stabilitesi tarafından karakterize edilmektedir (Kubota, 2002; Dursun, 2007).

TNT, RDX, NG (Nitrogliserin) gibi moleküler patlayıcıların kimyasal kompozisyonu Şekil 1.1'de gösterilmektedir. Bu yapılara bağlı oksijen, karbon,

hidrojen ve sülfür gibi diğer elementlerle kombine olmak ve daha kararlı bileşenler oluşturmak için kolayca yapıdan uzaklaşmaktadır. Aynı zamanda yapısında yüksek oranda oksijen eksikliği olan (TNT ve PETN) ya da tamamen oksijen içermeyen patlayıcılarda (kurşun azid) bulunmaktadır. Bunlar kararlı olmayan bileşiklerdir ve gerektiğinde sıcaklık ve gaz çıkışlarına bağlı olarak kolayca bozunabilmektedirler (Kubota, 2002; Dursun, 2007).



Şekil 1.1. Bazı patlayıcıların kimyasal kompozisyonu (Dursun, 2007).

Patlama sürecindeki ana reaksiyon C'nin CO₂'e; H'nin buhar ve suya; N'nin nitrojen gazına; Al'nin alüminyum oksite; S'nin gaz veya katı sülfata; amonyum nitratın su, nitrojen ve oksijene dönüşmesidir. Her proses de nitrojen ve oksijen arasındaki stabil olmayan bağ nitrojeni kendi yapısıyla; oksijeni karbon, hidrojen ve sülfür ile kombine ederek daha kararlı bileşenlere dönüşmektedir (Kubota, 2002; Dursun, 2007).

Tüm patlayıcıların 3 bileşenden oluştuğu düşünülmektedir (Kubota, 2002; Dursun, 2007).

- Yakıt
- Yakıcı madde (oksitleyici)
- Hassaslaştırıcı

Karbon, hidrojen ve sülfür oksitleyici içindeki oksijen için gerekli yakıtı sağlamaktadır. Bir kimyasal veya fiziksel hassaslaştırıcının yapıda bulunması patlayıcının reaksiyon başlatıcıya karşı tepki vererek patlamayı gerçekleştirmesini garantilemektedir. NG ve TNT gibi moleküler patlayıcılar yapılarında hem yakıt (C ve N) hem de oksitleyici içerir ancak hassaslaştırıcı içermezler. Buna karşın, diğer patlayıcılar hassasiyet kazanmak için bazı bileşenlere gereksinim duyarlar (Kubota, 2002; Dursun, 2007).

Ticari patlayıcıların büyük bir kısmı moleküler patlayıcı olmamalarına karşın yine de bu 3 önemli komponentin karışımından oluşmaktadırlar. Sonuç olarak bu tip patlayıcılar moleküler patlayıcılara oranla daha az duyarlıdırlar. Bu nedenle patlama reaksiyonunun başlaması oldukça zor olmanın yanı sıra ek ısıtma gerektirmektedir. Tutuşturucular ve reaksiyonu başlatıcılar genel olarak ateşleyiciler (1 g PETN), ateşleme fitili (ince bir plastik tüp içerisinde 4 g/m'den 40 g/m'e kadar değişen oranlarda PETN), fişekler (200 g-500 g duyarlı patlayıcılar) ve döküm arttırıcılar (20 g-1 kg arasında değişen Pentolit (PETN/TNT 50/50)) olarak bilinmektedir (Kubota, 2002; Dursun, 2007).

1.4. Patlayıcı Tipleri

Patlamalar; yakacaklar ve patlayıcılar gibi kimyasalların yoğunlaştırılmış faza geçişi, toz patlayıcılar, yanıcı gazların tutuşması ve nükleer aygıtların patlamasını içeren pek çok kaynaktan meydana gelebilmektedir Kimyasal patlayıcılar kabaca askeri patlayıcılar ve ticari patlayıcılar olmak üzere iki kategoride gruplandırılabilirler. Bu kategoriler arasında patlayıcıların kullanım alanları ve patlama duyarlılıkları hariç keskin bir ayırım yapılamamaktadır (Dursun, 2007).

Askeri patlayıcılar, patlamayı gerçekleştirebilmek için herhangi bir ek materyale ihtiyaç duymayan moleküler patlayıcılardan oluşmaktadırlar. İkincil patlayıcılar olarak ifade edilmelerinin yanı sıra fünye yapımında kullanılmaktadırlar. Bu gruba TNT, PETN, RDX ve bu kompozisyonların çeşitli kombinasyonları ile üretilen SEMTEX (RDX/PETN) gibi kimyasallar örnek olarak verilebilmektedir. Genel olarak moleküler patlayıcılar kombinasyon patlayıcılara oranla daha duyarlı

olup reaksiyon oranları yani patlama tahribatları daha yüksektir (HQDA 1990; Dursun, 2007).

Ticari patlayıcıların geliştirilmesi son on yıllık sürede çok geniş bir araştırma alanı bulmuş ve askeri patlayıcılar üzerinde yapılan çalışmaların önüne geçmiştir. Bu gruba nitrogliserin (NG) temelli patlayıcılar (dinamitler), sulu patlayıcılar, emülsiyonlar ve ANFO (amonyum nitrat + yağ yakıt) gibi kuru patlayıcı maddeler örnek olarak verilebilmektedir (Dursun, 2007). NG içerikli patlayıcılar dışındakilere ekstra enerji için çeşitli miktarlarda alüminyum eklenmiştir. NG içerikli patlayıcılar ve sulu patlayıcılar hala marketlerde önemli bir yere sahip olmasına rağmen, kuru patlayıcılar, emülsiyon patlayıcılar ve onların çeşitleri çoğu dinamitleme operasyonlarının ana maddeleri olarak kullanılmaktadırlar. Emülsiyon patlayıcılar; basit kompozisyonları, yakıcı madde ve yakıtların karışımından oluşmaları, nispeten su geçirmezlikleri, kolay üretilmeleri ve yüksek patlama hızlarını içeren çeşitli avantajlara sahip olmalarına karşın uygulama alanları kısıtlıdır (Kramer 2004; Mathieu ve Stucki, 2004).

Patlayıcılar, askeri ve ticari patlayıcıların kullanımlarına göre sınıflandırılmalarına ek olarak kimyasal yapılarına, patlayıcı özelliklerine ve materyalin kompozisyonuna göre de sınıflandırılmaktadırlar (Akhavan, 2004).

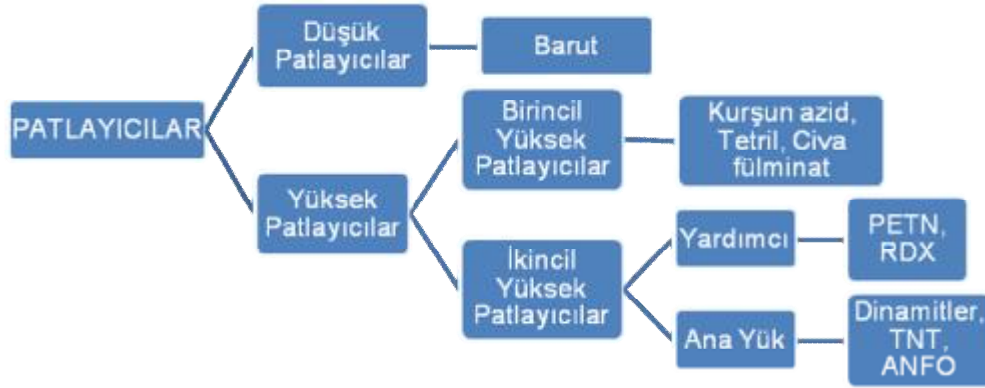
1.4.1. Patlayıcı Tiplerinin Sınıflandırılması

Patlayıcılar patlamalarına göre yüksek patlayıcılar; alev almalarına göre düşük patlayıcılar olmak üzere ikiye ayrılır (Fordham, 1980; Dursun, 2007).

- Düşük patlayıcılar bir infilak dalgasından daha çok tutuşma yolu ile patlamaktadırlar. Genellikle karışım halde kullanılan bu patlayıcılar sıcaklık ile aktive olmakta ve bir patlama oluşturmak için hapsedilmeye gereksinim duymaktadırlar (Davis, 1943; Fordham, 1980; Dursun, 2007) (Şekil 1.2).

- Yüksek patlayıcılar hapsedilmeksizin süpersonik reaksiyonlarda infilak etmektedirler. Genellikle bileşik halde olan bu patlayıcılar sıcaklık ve şok etkisi ile patlama reaksiyonunu başlatırlar ve yüksek tahrip gücüne sahiptirler (Davis, 1943; Fordham, 1980; Dursun, 2007) (Şekil 1.2).

- Bazı patlayıcılar her iki sınıfa dahil edilebilir. Örneğin nitroselüloz ateşlenirse alev alır fakat güçlü bir fünye ile tetiklenirse patlar. Barut hapsedilmemiş ise yanacak, hapsedilmiş ise patlayacaktır (Dursun, 2007).



Şekil 1.2. Patlayıcıların sınıflandırılması

1.4.2. Kompozisyona Dayalı Sınıflandırma

1.4.2.1. Oksitleyici ve Yakıt Karışımları

- Barut: potasyum nitrat, kömür ve sülfür
- Ammonal: amonyum nitrat ve alüminyum tozu
- ANFO: amonyum nitrat ve akar yakıt
- Cheddit: klorat veya perklorat ve yağ (Dursun, 2007).

1.4.2.2. Saf ve Stabilizatörle Karışım Halde Bulunan Bileşikler

- Dinamit: stabilizatör olarak aktivite gösteren toz silika ile kaplanmış hamur içerisindeki nitrogliserin karışımı
- RDX, PETN, TNT: saf olarak kullanılan güçlü patlayıcılar
- C-4: yapışkan özellikte plastik patlayıcı

- Aseton peroksit: asetonun hidroklorik asitle peroksidasyonu sonucu elde edilen beyaz kristalize patlayıcı (Dursun, 2007).

1.4.3. Materyalin Duyarlılığına Dayalı Sınıflandırma

Patlayıcılar reaksiyonu başlatmak için gerekli enerji miktarını ifade eden duyarlılıklarına göre de sınıflandırılmaktadır. Bu enerji bir şok, bir sürtünme, bir çarpma veya darbe, bir elektriksel boşalma veya başka bir patlayıcının infilak etmesi gibi herhangi bir şey olabilir. Duyarlılığa dayalı iki ayırım söz konusudur: birincil ve ikincil patlayıcılar (Akhavan, 2004; Dursun, 2007).

- **Birincil patlayıcılar:** Oldukça duyarlı olan ve küçük bir enerji miktarına gereksinim duyan bu tip patlayıcılar fünye ile kullanıldıklarında ikincil patlayıcılar sınıfına dahil edilebilirler. Bu patlayıcılara tetril, tetrazen, heksanitromannitol, civa fülminat, kurşun azid ve stifik asit örnek olarak verilebilir (Davis, 1943; EPA, 2002; Mathieu ve Stucki, 2004; Dursun, 2007). (Şekil 1.2).

- **İkincil patlayıcılar:** Nispeten duyarsız olup parçalanmayı başlatmak için fazla miktarda enerjiye ihtiyacı olan patlayıcılardır. Patlama için bir fünye ye gerek duyan birincil patlayıcılara göre çok daha güçlü bir sınıf olup genelde yıkımlarda kullanılırlar. TNT, RDX, PETN, HMX, amonyum nitrat, pikrik asit ve nitroselüloz bu sınıfa dahil edilmektedir (EPA, 2002; Mathieu ve Stucki, 2004; Dursun, 2007) (Şekil 1.2).

1.4.4. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılma

- İnorganik tuzlar: Amonyum nitrat (AN)
- Organik peroksitler: 3,3,6,6,9,9-heksametil-1,2,4,5,7,8-heksaoksasiklonan (TATP), 3,4,8,9,12,13-heksaoksa-1,6-diazabisiklo (4,4,4) tetradekan (HMTD)
- Oksitleyici ve indirgeyici ajan karışımları: Barut, potasyum klorat ve şeker
- Organik nitro patlayıcılar:

Ø Nitroaminler: 1,3,5- trinitro-1,3,5-triazosikloheksan (RDX) ve 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazosiklooktan (HMX)

Ø Nitrat esterler: etilenglikol dinitrat (EDGN), gliserol trinitrat (NG), pentaeritritol tetranitrat (PETN) ve selüloz nitrat (NC)

Ø Nitroaromatikler: 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), 2-amino-4,6-dinitrotoluen (2ADNT), 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4ADNT), 2,4-diamino-6-dinitrotoluen (2,4-DANT), 2,6-diamino-4-nitrotoluen (2,4-DAT), 2,4,6-trinitrofenol ve hidroksilaminler (EPA, 2002; Dursun, 2007).

1.5. Patlayıcıların Canlılar ve Çevre Üzerindeki Toksik Etkisi

Yıkıcı kapasitelerinin yanı sıra patlayıcılar biyolojik sistemler üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır. Çoğu potansiyel kanserojen olarak sınıflandırılmakta ve diğer toksik etkileri kobay hayvanları ve işçiler üzerinde yürütülen çalışmalarda gözlenmektedir. Bununla birlikte patlayıcılara maruz kalmayla ilişkilendirilen tehlikeler asla küçümsenmemelidir (Set-Smith, 2002).

PETN ve GTN'yi içeren nitrat esterler memelilerde kırmızı kan hücrelerinin oksijen taşıma kabiliyetini etkileyerek methemoglobinemi oluşturma ve kan damarlarını genişletme etkilerine sahiptirler (ATSDR 1995). GTN'nin metabolizması sonucu oluşan nitrik oksit (NO)'den dolayı 100 yılı aşkın zamandır küçük dozlarda damar açıcı ilaç olarak kullanılmaktadır (Servent ve ark, 1989). İnsanlarda patlayıcıların çok küçük dozları dahi baş ağrısı, mide bulantısı, kusma ve karın ağrılarına yol açmaktadır (ATSDR 1995).

Bu komponentlerin endüstriyel üretimleri süresince deri iltihabı gibi vakalara rastlanmasına karşın herhangi bir ölümcül veya kronik etkiler rapor edilmemiştir (Seth-Smith, 2002). Nitrat esterlerin hayvanlar üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalarda; kan basıncı düşürdüğü ve solunum problemlerine yol açtığı sonucuna varılmıştır. Bu tür patlayıcılara aşırı maruz kalmalar ani kalp durması ve solunum sonlanması ile sonuçlanan ölümlere yol açmaktadır (Midgley ve ark, 2000). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda GTN'nin oral letal dozun 0.5 - 0.9 g/kg olduğu belirlenmiştir. Hayvanlar ve insanlar üzerinde direkt olarak etki ettiğine dair tam bir

bulgu olmamasına rağmen Enviromental Protection Agency (EPA) tarafından GTN C sınıfı bir kanserojen olarak tanımlanmaktadır. PETN'nin şuna kadar kayda geçmiş hiçbir toksik etkisine rastlanmamıştır (Seth-Smith, 2002).

TNT akciğer hasarı oluşturan mutajen bir patlayıcıdır. İnsanlarda, deri iltahabı, kusma, toksik hepatit ve akciğer hasarının yanı sıra kan hücrelerinin üretimini etkileyerek aplastik anemi ve methemoglobinemiye neden olabilmektedir (Seth-Smith, 2002). I. Dünya Savaşı boyunca TNT'ye maruz kalan işçiler TNT kaynaklı sarılığın derilerinin sarılaşmasına neden olmasından dolayı kanaryalar olarak bilinmektedir. Britanya'da bu tarihlerde TNT zehirlenmesi sonucu 96 işçinin öldüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte direkt olarak işçiler üzerinde kanserojenik bir etkiye neden olduğuna yönelik bir kanıt rastlanmamıştır (Seth-Smith, 2002). Bu nedenle C sınıfı bir kanserojen olarak ifade edilmektedir. Benzer bir nitroaromatik patlayıcı pikrik asit ise düşük dozlarda deri iltihabına neden olmakta ancak çok yüksek dozlarda karaciğer ve böbrekleri etkilemektedir. Sırasıyla TNT ve pikrik asitin oral letal doz değerleri 0.8 - 1.3 ve 0.2 g/kg'dır (Seth-Smith, 2002). Sucul organizmalar ve solucanların üreme sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarda TNT'nin çok toksik olduğu belirlenmiştir (Daniels ve Knezovich, 1994).

RDX'nin memeliler üzerindeki etkisi genel olarak kasılma ile karakterize edilmektedir. Köpekler ve sıçanlarda yapılan uygulamalar saldırganlık ve kasılmalar gibi kronik toksisite belirtilerine işaret etmekte olup, sıçanlarda gastrointestinal sistem ve akciğerde tıkanıklık sonucu ölümlere neden olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir (ATSDR, 2010). RDX'in oral letal dozu 0.07 - 0.12 g/kg'dır. Aynı zamanda sıçanlarda besin alınımını azaltmakta ve kilo kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda sıçan zehiri olarak kullanılmaktadır (Seth-Smith, 2002). İnsanlardaki toksik etkisine dair pek çok rapor bulunmaktadır. Almanya, Amerika ve İtalya'da RDX üretim fabrikasında çalışan işçilerin bu patlayıcının tozuna soluma yolu ile maruz kaldıklarında kasılma, bilinç kaybı, vertigo ve kusmayı içeren semptomlardan şikayet ettikleri gözlenmiştir (ATSDR, 2010). Plastize edilmiş RDX'i midesine kazayla alan bir çocuk üzerinde yapılan incelemelerde RDX'in çabucak merkezi sinir sistemine alındığı ve bunun sonucunda çocuğun kasılma nöbetleri geçirdiği görülmüştür (Seth-Smith, 2002). Yüksek düzeyde RDX içeren

SEMTEX veya C-4 patlayıcılarının insanlar üzerinde baş ağrısı veya hafıza kaybı ile ilişkilendirilen nörolojik bozuklukları geliştirdikleri belirtilmektedir (Harrell-Bruder ve Hutchins, 1995). Su omurgasızları, yeşil algler, balıklar, solucanlar ve *Vibrio fischeri* kullanılarak yapılan testlerde RDX'in toksik özellikte olduğu ancak TNT'den daha az toksik olduğu anlaşılmıştır Memeli hücreleri ve bakteriler üzerinde yapılan çalışmalar RDX'in C sınıfı bir kanserojen madde olduğu ancak mutajen olmadığına işaret etmektedir (Burton ve ark, 1994).

HMX'in toksisitesi ile ilgili çok sınırlı bilgiler bulunmasına karşın sıçanlar üzerinde etkili olduğu letal doz 6.5 - 7.5 g/kg'dır. (Set-Smith, 2002). Sucul organizmalar, bakteriler ve solucanlar kullanılarak yapılan testlerde HMX'in bazı toksik özellikleri ortaya konulmuştur. Hayvan çalışmalarında herhangi bir karsinogeniteye rastlanmamakla birlikte HMX D sınıfı bir kanserojen olarak tanımlanmaktadır (Set-Smith, 2002).

Patlayıcılar *in situ* parçalanmaya karşı oldukça dirençli bileşiklerdir. Çoğu ülkelerin hala patlayıcılar kaynaklı kirliliğe çözüm bulamaması çok önemli bir sorun haline gelmiştir (Seth-Smith, 2002). Çevresel kirlilik etkeni patlayıcılar sırasıyla TNT, RDX ve HMX olarak listelenmektedir. RDX ve TNT ortalama olarak benzer konsantrasyonlarda yer altı sularını ve toprakları kirletmekte ancak HMX, RDX ve TNT'ye göre çok düşük düzeylerde kirlilik oluşturmaktadır. Nitrat esterlere ise arındırılmayı gerektirecek kadar yüksek konsantrasyonlarda çok nadir olarak çevrede rastlanmaktadır (Seth-Smith, 2002). Birleşik Devletler'de belirlenmiş 115 bölgenin 25'nin patlayıcılar ile kirlendiği ortaya konmuştur. Bu kirlenmeden etkilenen toprak miktarının 511.517 metre küp olduğu tahmin edilmektedir. Bu miktar ortalama olarak 45.000 tona karşılık gelmektedir. Nebraska Ordnance tesisinde her 1 kg toprakta 5.2 g TNT ve 27 g RDX'in üzerinde konsantrasyonlarda kirlilik rapor edilmiştir. U.S. Environmental Protection Agency (EPA)'nın patlayıcılar ile kirliliği toprakların temizlenmesi için tavsiye ettiği oran her 1 kg toprakta 17.2 mg TNT ve 5.2 mg RDX'dir. Bu istatistikler EPA'nın oranları ile karşılaştırıldığında ne kadar ciddi bir problemle karşı karşıya kalındığı ortaya çıkmaktadır (Seth-Smith, 2002).

Şuana kadar ülkemizde üretilen TNT miktarı ve kirliliğe yönelik resmi herhangi bir rapor bulunmamakla birlikte Hatay'dan Silopi'ye kadar uzanan sınır

hattındaki mayınlı topraklar 300 ile 750 metre genişliğinde, 700 km uzunluğunda ve toplam 3.5 milyon dönüm kadar bir yer arz etmektedir. Mardin, Şanlıurfa, Hatay ve Kilis başta olmak üzere tüm sınırdaki yerleşim yerlerinin arazilerini içine almış durumdadır. Bu mayınlarla çevrili arazilerdeki TNT sızıntıları düşünülecek olursa ne kadar ciddi bir çevre problemi ile karşı karşıya kalındığı anlaşılmaktadır.

Toprakta kalan veya immobilize edilen patlayıcı seviyesi yeraltı sularının çözünürlüğüne bağlı olarak sulardaki seviyelere oranla farklıdır. TNT ve RDX'in su çözünürlükleri sırasıyla 20°C'de maksimum 100 ve 38 mg/L'dir. Bu durum yeraltı sularının sıklıkla patlayıcılar ile doyduğunu göstermektedir TNT toprağa hızla absorbe olurken RDX sıklıkla bağlanamaz. Böylelikle toprakta TNT'ye göre daha az RDX absorbe edildiği için TNT kaynaklı toprak kirliliğine daha sık rastlanmaktadır. Ancak yer altı sularında bu durum tam tersidir (Singh ve ark, 1998). Arıtım teknolojisi olarak kullanılan filtreleme yöntemi patlayıcıların yayılmasına yol açarak yeraltı sularını kirletmekte ve kirlilik problemini ciddi boyutlara taşımaktadır (Singh ve ark, 1998).

1.6. Toprakların Arındırılmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler

Her ne kadar patlayıcı türüne göre arıtma yöntemleri değişiklik gösterse de genel olarak patlayıcılar ile kirlili toprakların temizlenmesine yönelik çalışmalar iki metod üzerinde yoğunlaşmaktadır (Seth-Smith, 2002; Daprato ve ark, 2005; Nyanhongo ve ark, 2006).

1.6.1. Yakma

Yakma patlayıcı kaynaklı kirlili toprakların arıtılmasında genel olarak kullanılan bir metottur; pek çok bölgenin temizlenmesinde hala bu teknolojiye dayanılmaktadır. Bu yöntem kirlili bölgedeki patlayıcıların yakılmak üzere toprağın arındırılmasını içermektedir. Pratikte, tam bir yanma nadiren meydana gelmekte ve bundan dolayı patlayıcıların kalıntılarının temizlenmesi için ek metotlar gerekmektedir. Patlayıcılar tamamen yansa dahi, bazı zararlı bileşikler oluşmaktadır:

nitrik oksit (NO), karbon monoksit (CO), hidrojen klorid (HCl) ve olası dioksinler. Bu bileşiklerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı bu teknolojinin kullanılması risklidir. Sadece insanlar üzerinde değil toprak kimyası ve florası üzerindeki olumsuz etkileri de kullanım riskleri arasındadır. Ayrıca maliyeti oldukça yüksek bu uygulamada her bir ton toprağın arıtılması 800\$'a mal olmaktadır (Seth-Smith, 2002).

1.6.2. Kompostlama

Kirli toprakların kompostlanması kirleticilerin degradasyonu için topraktaki mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Kompostlanmış topraklara kirletici konsantrasyonunu azaltacak ve mikroorganizmalar için karbon kaynağı sağlayacak organik maddeler ilave edilebilir. Ayrıca belli aralıklarla havalandırılarak nem oranı kontrol edilmektedir (Seth-Smith, 2002). Kompostlama süresince mikroorganizma aktivitesinin sonucu olarak sıklıkla sıcaklık artmakta ve bu durum kirletici degradasyonu için daha iyi bir ortam oluşturmaktadır. Kompostlama teknolojisi ile topraktaki RDX ve TNT seviyelerinin önemli düzeyde azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Williams ve ark, 1992). Bu teknolojinin faydası kompostlanmış toprağın toksisitesi, mutajenitesi ve sızıntı suyunun orijinal kirli toprakla karşılaştırıldığında yüksek oranda azalmasıdır. Ancak yığın oluşturmak için toprağın hareketini, toprağın değiştirilmesini ve toprağın havalandırmasını gerektiren bu yöntem pahalı bir prosestir. Yakma kadar pahalı olmamasına rağmen her bir ton toprağın arıtılması yaklaşık 300\$'a mal olmaktadır (Lee, 1996; Seth-Smith, 2002).

Yakma ve kompostlama uygulamaları kirli toprakları patlayıcılardan arındırır. Arıtım sonrası oluşan ve toksik olabilecek yan ürünler bu yöntemler kullanılarak karakterize edilememektedir. Her iki metotta ya karıştırma ya da dışarıdan muamele yapılarak materyalin hareketi söz konusudur. Toprağın arındırılması sırasında yapılan bu tür aşamalar maliyeti arttırarak metotların uygulanabilirliğini azaltmaktadır. Patlayıcılar ile kirlenmiş toprakların temizlenmesi konusunda yapılan çalışmalar maliyeti daha ucuz metotlar üzerinde durmaktadır (Seth-Smith, 2002).

1.7. Nitroaromatik Bileşikler

Toksik bileşikler, organizmaların metabolik aktiviteleri sonucu üretilen doğal ürünler ve endüstriyel prosesler veya diğer insan aktiviteleri tarafından üretilen ksenobiyotik kimyasallar olarak sınıflandırılabilir (Spain, 1995; Jain ve ark, 2005). Çoğu ksenobiyotik bileşik, biyolojik parçalanabilirliğinin sınırlı olması ve doğal ürünler içerisinde yer almayan kimyasal yapılar içermelerinden dolayı parçalanmaya dirençli yapıdadır (Roldán ve ark, 2008).

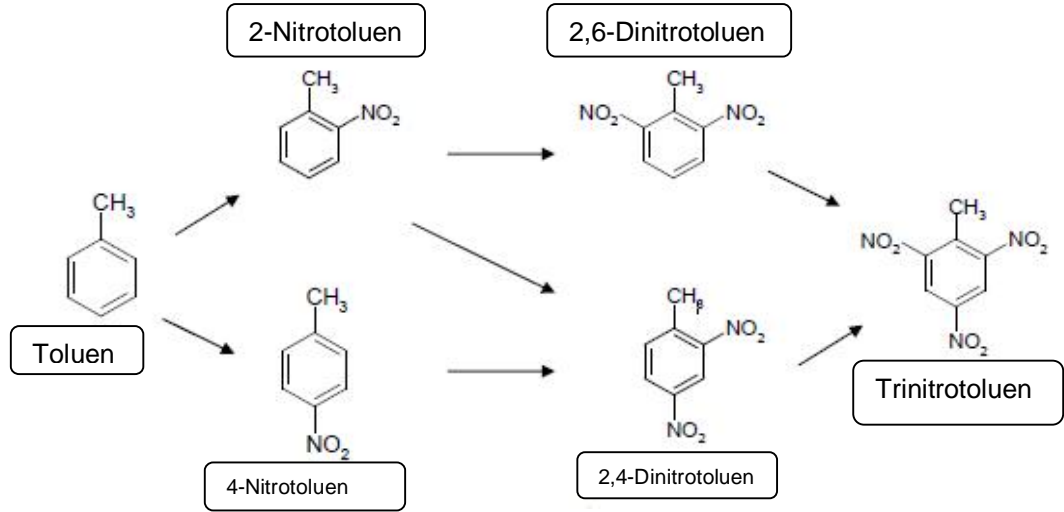
Parçalanmaya dirençli ksenobiyotik kirliliğin önemli bir grubu olan nitroaromatikler bir (mononitroaromatik) veya daha fazla (polinitroaromatik) nitro (NO_2) gruplar içeren aromatik organik bileşiklerdir (Han, 2008). Aromatik nitrobileşikleri, nitro grubunun elektron (\bar{e}) çekici özelliğinden dolayı kimyasal oksidasyon, hidroliz ve biyolojik olarak parçalanmaya karşı direnç gösteren ve biyolojik parçalanma olsa dahi oluşan ürünleri daha toksik olan bileşiklerdir (Çakır, 2010). Patlayıcı olarak kullanılan nitroaromatik bileşiklere azobenzen, nitrobenzen, anilin, amonyak, fenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrotoluen ve TNT örnek olarak verilebilir (Esteve-Núñez ve ark, 2001; Chang ve ark, 2002; Çakır, 2010). Kloromfenikal, nitropiroluteorin, oksipirrolnitrin ve fidolopin gibi yalnızca birkaç tane nitroaromatik bileşik doğal ürünlerdir (Gorontzy ve ark, 1994). Nitroaromatik bileşiklerin kimyasal stabilitesi aromatik halkadaki elektronların delokalizasyonuna (elektronların atomlar üzerine yayılması) bağlıdır (Roldán ve ark, 2008). Bu bileşikler poliüretan, parathion benzeri pestisid, dinoseb ve patlayıcıların (TNT ve pikrik asit) sentezlenmesine odaklanmış endüstriyel proseslerin bir sonucu olarak üretilmişlerdir (Roldán ve ark, 2008). Nitroaromatik ve nitrofenol bileşikler ayrıca pestisid, plastik, boya ve ilaçların üretiminde de kullanılmaktadır (Spain, 1995; Peres ve Agathos, 2000; Samanta ve ark, 2000; Caballero ve ark, 2005; Diwani ve ark, 2009; Gallagher, 2010).

TNT'nin biotransformasyonu sonucu oluşan parçalanma ürünleri TNT'den daha da güçlü bir şekilde adsorbe edilmekle birlikte polinitroaromatik bileşikler toprağın yanı sıra kil ve humus materyalleri tarafından da tutulabilmektedirler (Haderlein ve ark, 1996). İmmobilize edilen nitroaromatik bileşiklerin ve parçalanma

ürünlerinin toksisitelerinin azaldığı görülmüştür (Robertson ve Jjemba, 2005). Nitroaromatik patlayıcılar yakma işlemlerinden dolayı atmosferde; kirli toprakların filtre edilmesinin sonucunda yer altı sularında bulunmaktadır (Roldán ve ark, 2008). Mononitroaromatik bileşikler pek çok farklı bakteri suşları tarafından ayrıştırılmaktadır ancak poliaromatikler parçalanmaları zor inatçı kimyasallardır. Nitrobileşiklerin toksisiteleri nitro gruplarının redüksiyonu sırasında oluşan ürünlerle ilişkilendirilmektedir (Ramos ve ark, 2005). Hidroksilamin yan ürünlerin toksik ve mutajenik etkilerine bağlı olarak DNA dahil birçok biyomolekülle etkileşime girebildikleri belirlenmiştir. Toksik etkiler bu ürünlerin elektrofilik karakterlerinden ileri gelirken mutajenik etkiler ise guaninin esterleşmesi sırasında yapıya hidroksilaminin girmesinden kaynaklanmaktadır. Memelilerde ise, nitroaromatik bileşikler bağırsak florasının indirgediği konjuge metabolitler içerisine transfer olmaktadır (Roldán ve ark, 2008).

1.8. TNT'nin Yapısı ve Özellikleri

Tri, trotil, tolit, triton, tritol, 1-metil-2,4,6-trinitrobenzen şeklinde sinonimleri olan trinitrotoluen, tarihsel açıdan incelendiğinde en önemli ve en geniş uygulama alanı bulan askeri patlayıcıdır (Spain 1995; Lewis ve ark, 1997; Johnson, 1998; Dursun, 2007). 1863'te J. Wilbrand tarafından ilk kez üretilen TNT, 1902 yılında Alman ordusunda Granat dolgusu adıyla kullanılmıştır (Psillakis ve ark, 2000; Nyanhongo ve ark, 2005). II. Dünya savaşında sırasında toluenden elde edilmesine karşın farklı kimyasallar kullanılarak da örneğin petrolden (Amerika), benzen ve metanol'den (Almanya) ve n- heptan'dan dehidrasyonla eldeleri görülmektedir (Üzer, 2004). Şekil 1.3'de toluenden TNT eldesi verilmiştir.



Şekil 1.3. Toluene'den TNT eldesi (Han, 2008).


II. Dünya Savaşı, Kore Savaşı ve Vietnam Savaşı sırasında milyon tonlarca TNT patlayıcıların ana bileşeni olarak üretilmiştir. 1969-1971 yılları arasında sadece Amerika'da her ay yaklaşık olarak 20×10^7 kg TNT üretimi yapılmıştır (Maleki, 1994).

Ulusal güvenliğin sağlanmasında önemli bir yere sahip ve kara mayınlarının temel bileşeni olan bu kimyasal askeri açıdan önemli bir buluş haline gelmiştir. Yalnızca askeri patlayıcı olarak değil aynı zamanda TNT içerikli patlayıcı karışımları maden çıkarma ve tünel açma çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu endüstrilerde kullanılan patlayıcıların %80'lik bir kısmı TNT ile karıştırılarak hazırlanmaktadır (Torres, 2005).

Polynitroaromatik bir bileşik olan TNT 2,4,6 pozisyonlardaki C atomuna bağlı oksitlenmiş 3 adet NO₂ gruplardan ve 1. pozisyonundaki bir metil grubundan oluşmaktadır (Esteve- Nuñez ve ark, 2001). Benzen halkasındaki π -elektronları dört fonksiyonel grup (1 CH₃ ve 3 NO₂) tarafından korunmaktadır (Hawari ve ark, 2000). Çizelge 1.1'de TNT'nin moleküler ve yapısal özellikleri verilmiştir. Aromatik halkadaki çoklu nitrit gruplarının varlığı aromatik halkanın elektron yoğunluğunun azalmasıyla oluşan elektron geri kazanım etkisi sonucu parçalanmaya dirençli bir karakter kazandırarak bu bileşiğe karşı mikrobiyal enzimlerin elektrofilik girişimleri engellenmektedir (Çakır, 2010). Bu yolla her ne kadar mikrobiyal saldırılara karşı

halka yüksek kararlılık gösterse de, mikroorganizmaların enzimatik mekanizmaları bu bileşiği parçalamada oldukça gelişmiştir (Lewis ve ark, 1997; Fiorella ve Spain, 1997; Ho ve ark, 2004).

Çizelge 1.1. TNT'nin moleküler ve yapısal özellikleri

	Moleküler Ağırlığı	227.13 g/mol
	Erime Noktası	80.65°C
	Yoğunluk	1.65 g/mL
	Kaynama Noktası	210°C
	Parlama Noktası	240°C
	Tutuşma Noktası	295°C

Sülfirik asitin varlığında toluen'nin nitrik asitle nitrataştırılması sonucu elde edilen trinitrotoluen ($C_7H_5N_3O_6$)'nin 2,3,4-, 2,4,5-, 2,4,6- ve 2,5,6- gibi farklı izomerleri bulunmaktadır (Üzer, 2004; Dursun, 2007). Patlayıcı endüstrisinde tercih edilen 2,4,6-trinitrotoluen simetrik bir izomerdir. Katı bir nitroaromatik bileşik olan TNT renksiz ortorombik (dik eksenli) kristal veya sarı monoklinik (eğik eksenli) kristal halinde bulunabilir. Bu bileşik suda kısmi çözünmesine karşın asetonitril, aseton, sodyum sülfid ve metanol gibi organik çözücüler de iyi düzeyde çözünebilmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de 10 mg/100 g iken asetonda ise aynı sıcaklıkta 132 g/100 g'dır. 25°C'deki buhar basıncı 5.8×10^{-6} tor'dur (Dursun, 2007). Patlama şiddeti ortalama olarak 6797.04 ms^{-1} dir. TNT kararlı ve hidroskobik olmayan (nem tutmayan) bir bileşiktir darbe, sürtünme, şok ve elektrostatik enerji gibi uyarılara karşı kısmen hassas değildir (Üzer, 2004).

Asitlere karşı dayanıklı olan TNT derişik HNO_3 ile 110°C'nin üzerinde trinitrobenzoik aside yükseltgenir (Üzer, 2004; Dursun, 2007). Alkalilere karşı hassas olan bu kimyasal metal iyonlarıyla reaksiyona girerek çözeltide kırmızı kahve renkli ürünler oluşturmaktadır. TNT'nin endüstrilerce işlenmiş metal ürünleri saf ürünlerle kıyaslandığında darbe, sürtünme ve sıcaklığa karşı daha hassas oldukları görülmektedir. Fe_2O_3 veya kükürt gibi bazı maddelerle karıştırılması, ısıtma başlangıcından patlama başlangıcına kadar olan süreyi kısaltmaktadır (Üzer, 2004).

Yüksek pH'da suyla reaksiyona girerek bozulma gerçekleşir ortalama olarak pH 8 ve yukarısında TNT hidrolize olmaktadır (Maleki, 1994).

Isıtmaya karşı oldukça duyarlı olan TNT'yi doğrudan alevle tutuşturmak oldukça zor olup önce eritilir ve yaklaşık 300°C'ye kadar ısıtmadan sonra tutuşma başlamaktadır. 160°C'ye ısıtıldığında gaz formundaki ayrışma ürünleri oluşmaktadır. Bu işlemler sırasında formu değişmiş TNT, saf ve katı halindeki orana darbelere karşı daha hassastır. Büyük miktarlardaki TNT için kızgın parçaların içine düşmesi ile patlama gerçekleşir. Tutuşma sonucu oluşan patlamanın hasarı TNT'nin saflığına göre de değişmektedir. Ham TNT'nin patlama tehlikesi, saf fabrikasyon ürünlerine göre önemli ölçüde daha büyüktür (Üzer, 2004).

Işığa maruz bırakılması sonucu azotunun bir kısmını kaybeden TNT koyu renkli ve asitle reaksiyon veren yüksek darbe hassasiyetine sahip bir maddeye dönüşür. Bu nedenle uzun süre şiddetli bir ışık etkisinden korunmalıdır (Üzer, 2004).

Sodyum sülfidin sulu çözeltisi ile reaksiyona girer. Sodyum sülfid, meta-nitro grubuyla reaksiyona girerek eliminasyon sonucunda halkaya suda çözünür sodyum sülfonat (SO_3Na) grubu yerleştirir. 3-nitro grubu ile kuvvetli etkileşen metil grupları p-nitrozodimetilanilin ile bir Schiff bazı oluşturarak hızlı ve şiddetli reaksiyon verir. Metil grupları trinitrobenzoik asit oluşturmak üzere reaksiyona girdikten sonra, CO_2 kaybıyla trinitrobenzen meydana gelir. Tüm bu reaksiyonlar alevlenmeye yol açmaktadırlar (Üzer, 2004).

1.9. TNT'nin Toksik Etkileri

TNT gibi patlayıcı kimyasallara maruz kalındığında hangi tür ve ciddiyette sağlık sorunlarına yol açıp açmayacağı çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler arasında hangi miktarda, ne kadar süre ve hangi yolla (solunum, yeme, içme ve deri teması) maruz kalındığı yer almaktadır (ATSDR, 1995). Nitro gruplardan oluşan TNT atık sularının karakteristik özelliği bu kimyasalın üretimi süresince değişmektedir. Kırmızı su, istenmeyen TNT izomerlerinin uzaklaştırılması amacıyla yapılan sıcak sodyum sülfid uygulamaları ile saflaştırma sonucu oluşan atık su; pembe su ise TNT'nin ambalajlanması ve imha edilmesi sürecinde oluşan atık

sular olarak tanımlanmaktadır (Maleki, 1994). Pembe su, hem orijinal patlayıcı bileşiklerini hem de dinitrotoluen ve trinitrobenzen gibi yan ürünleri içermektedir (Maloney ve ark, 2002).

Yüzey sularında TNT güneş ışığının da etkisi sonucu hızlı bir şekilde komponentlerine ayrışmaktadır. Su ve sedimentlerdeki TNT mikroorganizmalar tarafından oldukça yavaş bir şekilde parçalanmaktadır. Bu kimyasalın çok küçük bir miktarı bile balıklarda ve bitkilerde birikmektedir. 2 µg/mL TNT konsantrasyonu balıklar için toksiktir Akuatik organizmalar ve memeliler için sudaki toksik düzeyi 44-60 mg/L'dir (Maleki, 1994). EPA tarafından TNT'nin toprakta ve yer altı sularındaki toksik düzeyi 2.0 ng/mL olarak belirlenmiştir (Charles ve ark, 2010). TNT'nin toprak ve doğal su kaynaklarındaki zararsız konsantrasyonu sırasıyla 30 mg/kg ve 0.14 mg/L'den küçüktür. Buna karşın üretim ve uygulama tesislerinde bu konsantrasyon toprakta 12-20 g/kg ve 0.1 g/L'ye ulaşmaktadır (Çenas, 2001). İçme sularındaki zararsız TNT konsantrasyonu 20 µg/L olarak belirlenmiştir (EPA, 1989).

İmha edildiği bölgelerden içme sularına doğru hareketi sonucu kirli sular, kirli toprak ürünlerinden beslenme, kirli havayı soluma veya meyva ve sebzeler gibi kirli gıdalarla beslenme yolu ile TNT'ye maruz kalınabilir. Bu kimyasalla kirlenmiş suların içilmesi ve askeri bölgelerde yakılma sonucu kirlenmiş hava solunduğunda TNT hızlıca vücuda girebilmektedir. Deriyle temas edildiğinde ağız yolu ile alınandan çok daha yavaş vücut içine alındığı bilinmektedir. Vücuda girdiğinde kan hücreleri içine entegre olan TNT tüm vücuda ve organlara doğru ilerlemektedir. Karaciğerlere vardığında parçalanır ve farklı maddelere dönüşür. Şu ana kadar bu maddelerin hiçbiri tanımlanamadığı gibi zararlı olup olmadıkları da belirlenememiştir. Bu maddelerin çoğu böbreklere varana kadar kanda dolaşır ve sonra idrar yolu ile vücuttan atılır (ATSDR, 1995).

Bu kimyasala en çok maruz kalan üretim tesislerinde çalışan işçiler de en sık görülen etkiler anormal karaciğer fonksiyonları sonucu sarılık ve aplastik anemi gibi kan hastalıklarıdır. Bu etkilerin görülebilmesi için havanın her metre küpünde (mg/m³) 0.5-1.5 düzeylerinde TNT bulunması yeterlidir. Buna karşın havada 0.2 mg/m³ miktarda TNT bulunması eritrosit ve hemoglobin sayısında azalmaya neden

olurken hastalık belirtilerinin hafif seyretmesi olası sınırın 0.5 mg/m^3 olarak belirlenmesine neden olmaktadır. (Çenas, 2001; EPA, 2011).

Bunlara ek olarak bu kimyasalın bağışıklık sisteminde diğer zararlı etkilerinin görülebilmesi ve dalak genişlemesi için gerekli ortalama süre 15-364 gündür (ATSDR, 1995). TNT zehirlenmesinin meydana getirdiği daha az ciddi hastalıklar arasında katarakt, dermatitler, gastrit, siyanozis ve sinir sistemi hastalıkları sayılabilir (Nyanhongo ve ark, 2008). Özellikle kasılma nöbetleri, hepatoksisite ve immun sistem işlev bozukluğu oluşturarak merkezi sinir sistemi toksisitesini indüklemektedir. TNT'nin insanlar için muhtemelen kanserojen etki gösterdiği, uzun süre boyunca TNT yedirilen sıçanların idrar torbasında tümörlerin gelişmesi üzerine ortaya atılmıştır (ATSDR, 1995).

1.10. TNT Atıklarının Fizikokimyasal Arıtımı

1.10.1. Adsorbsiyon

Aktif karbon uygulamaları adsorbsiyon için kullanılan en etkin yöntemdir. Karbon adsorbsiyon yöntemi kullanılarak TNT'nin %99.5'nin parçalanmasına karşın parçalanma ürünlerinin çok katmanlı filtrasyon ile ortamdan uzaklaştırılması ve geri kazanım problemleri metodun uygulanışını zorlaştırmaktadır. Adsorbent (aktif karbon) yüzeyine moleküller bağlandıkça yeni moleküllerin bağlanması için daha az yer kalır ve sonuçta adsorbent etkinliğini kaybeder. Adsorbente yeniden bağlanma özelliğinin kazandırılması geri kazanım olarak ifade edilir (Maleki, 1994).

Geri kazanım kapasitesinin noksanlığı bu sisteme 3 dezavantaj kazandırmaktadır: diğer atık su karbon sistemlerinde kullanılan daha çok karbon ihtiyacı, TNT'yi tutan karbonun tekrar kullanılamaması ve karbon yakılmasının hava kirliliğine neden olması. Günümüzde yapılan çalışmalarda aktif karbon adsorbsiyonuna alternatif sentetik polimerik adsorbentler kullanılmaktadır. Polimerik reçineler aktif karbondan daha düşük adsorbent yeteneği olmasına rağmen uzun yaşam siklusları ve geri kazanım potansiyeli avantaj sağlamaktadır. Ancak polimerik

reçine adsorbsiyon kolonlarındaki TNT'nin parçalanması sonucu oluşan rengin giderilememesi dezavantajdır (Maleki, 1994).

Son yıllarda bilim dünyası TNT ile kirli atık suların arıtılması çalışmalarında biyolojik adsorbentler kullanılmaya başlanmıştır. Nehrenheim ve Odlare, (2010) *Pinus sylvestris*'e ait çam kabuğunu potansiyel adsorbent olarak kullanarak başlangıç TNT kontaminasyonu 21.7 ± 1.5 mg/L olan İsveç'e ait atık suyun ortalama olarak %80 düzeylerinde arıtıldığını gözlemlemiştir.

1.10.2. Abiyotik Parçalama

Doğal koşullarda ne buharlaşma tarafından oluşan emisyon (sulu ortamdan emisyon yarı ömür 10.000 gün) ne de molekülün hidrolizi (yarı ömür > 50 yıl) ile TNT'nin degradasyonu mümkün değildir. Ancak gün ışığı ve suyun bulunduğu ortamda fotoliz yoluyla parçalanabilmektedir (Gorontzy, 1994). Doğal sistemlerde gerçekleşen abiyotik reaksiyonlarda nitroaromatik bileşikleri indirgeyebilen pek çok potansiyel elektron verici bulunmaktadır. Nitro gruplarının abiyotik redüksiyonu sedimentler, topraklar ve yer altı sularında biriken aminlerle ilişkilendirilmektedir. TNT kovalent kompleksler oluşturmak için aynı zamanda killerin siloksan yüzeyi ile de reaksiyona girebilmektedir (Esteve-Núñez ve ark, 2001).

TNT'nin sulu çözeltisi, gün ışığı ve UV ışığına maruz (220-280 nm arasındaki ışımalara) bırakıldığında hızlı bir şekilde parçalanarak tanımlanamayan safsızlıklar ve degradasyon ürünlerini içeren komponentler oluşmaktadır (Meenakshisundaram ve ark, 1999). TNT gibi aromatik parçalayıcıların sulu solüsyonları hidrojen peroksit (H_2O_2) eklenerek 254 nm UV ışığına maruz kaldığında hidrojen peroksinin, kararlı olmayan ara bileşikler üretmek için aromatik patlayıcılardan hidrojen moleküllerini ayrıştırarak serbest radikalleri oluşturduğu bilinmektedir. Ve böylece UV ışığının yanı sıra H_2O_2 kullanılarak daha kısa sürede degradasyon sağlanmaktadır. Hidrojen peroksitli fotoliz sonucu oluşan bu kararsız komponentlerin UV ışığına maruz bırakılmaya devam edilmesi ile karbon dioksit ve amonyuma kadar ayrışması gerçekleşmektedir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için

UV ışığı gereksinimi TNT ile kirli geniş askeri arazilerin temizlenmesini mümkün kılmamaktadır (Maleki, 1994).

UV ile yapılan fotoliz çalışmalarında bitkilerden sentezlenen riboflavinler kullanılarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Bundan yola çıkarak Yang ve ark (2007), doğada fitoplanktonlar tarafından salınan doğal fotosentizer olan riboflavini kullanmışlardır. 1 μ M riboflavin ve 50 μ M TNT içeren fototransformasyon çalışmalarında gün ışığının farklı spektral aralıklarının etkisini inceledikleri bu çalışmada riboflavin varlığında >400 nm dalga boyundaki gün ışığı altında TNT'nin fotoliz yarı ömrünün 21.87 dak. sadece gün ışığı altında ise 38 dak. olduğunu belirlemişlerdir.

TNT'nin ozonla muamale edilerek parçalanmasının yavaş ilerleyen bir süreç olması üzerine ozon ve 254 nm UV ışığı ile kombine bir yöntem oluşturulmuştur. Kombine yöntemle TNT'nin parçalanmasının 8.9 dak. sürdüğü belirlenmiştir. Total organik karbon seviyelerini indirgemede ozonlama H_2O_2 'den daha etkindir. UV- H_2O_2 prosesi ise 2,4-DNT ve 2,6-DNT'li kirli suların temizlenmesinde daha çok tercih edilmektedir (Maleki, 1994).

Sadece hidrojen peroksit değil aynı zamanda ozonlanma ve foto-fenton ayıracı (demirle aktive edilmiş hidrojen peroksit) ile yapılan fotoliz çalışmaları da hızlı bir oksidasyon gerçekleşmektedir (Herrmann ve Popovic, 2007; Kalderis ve ark, 2011). 254 nm UV ışığında yapılan fotoliz çalışmalarında başlangıç TNT miktarının (0.31 mM) 1 saat içinde UV/fenton ayıracı uygulaması sonucu degrade olduğu belirtilmiştir (UV/Fenton > UV/ H_2O_2 > yalnız H_2O_2) (Rodgers, 2000). Diwani ve ark (2009), 1 saat direkt ozonlama ve 3 gün ozonlama-biyolojik degradasyon basamaklarını birlikte uygulayarak TNT'nin %98.3 düzeyinde parçalandığını göstermişlerdir.

1.10.3. Oksitadif Parçalanma

TNT'nin klorlanması üzerine yoğunlaşan oksidatif degradasyon yöntemlerinde iki klor kaynağı araştırılmaktadır. 1. sıvı sodyum hipoklorit ($NaClO$) ve 2. kalsiyum hipoklorit $Ca(OCl)_2$. Sodyum hipokloritin, kalsiyum hipokloritten

daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak parçalanma ürünlerinin tanımlanma sıkıntıları bu metodun uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (Maleki, 1994).

1.10.4. Ters Osmoz

Konsantrasyonu fazla olan sıvıya belli bir basınç (ozmotik basınçtan daha fazla) uygulanarak, sağlanacak ters bir akışla, bu sıvı içerisindeki mineraller, tuzlar ve organik maddelerin membran sistemlerince tutularak arındırılma esasına dayanmaktadır (Maleki, 1994). Bhattacharyya ve ark. (1976), TNT üretim tesislerindeki atık suların nitro bileşiklerin uzaklaştırılması için bu yöntemi kullanmışlardır. Dört farklı membran sistemini inceledikleri bu çalışmada Millipore PSAL sistemiyle %88 düzeyinde başarı elde etmişlerdir. Ancak bu sistemin maliyetinin fazla olması bir dezavantaj olarak görülmektedir.

1.11. TNT'nin Biyodegradasyonu

Maliyet ve etkinlik açısından avantajları, pek çok bilim adamının TNT ile kirli alanların temizlenmesine ilişkin çalışmaların biyolojik yöntemler üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bununla birlikte biyolojik süreçlerin etkinliği, bir toksik bileşiğin biyolojik degradasyonu hedef bileşeni indirgeme kabiliyetine sahip organizmaların adaptasyonuna, hayatta kalabilirliklerine ve bileşiğin toksik olmayan formuna dönüşmesini katalizleyen metabolik aktivitenin varlığına bağlıdır. Reaksiyon başlatıcı özellikle ko-metabolitler gerektiren biyodegradasyon süreci indirgeyici, yükseltgenici veya hidrolitik basamakları içermektedir (Maleki, 1994). TNT'nin redüksiyon basamakları amino türevlerinin birikimine ve polimerleşmesine veya ürünlerin konjugasyonuna yol açmaktadır. Ancak şu ana kadar mineralizasyona dair önemli kanıtlar elde edilememiştir (Walker ve Kaplan, 1992).

Pek çok bakteri, maya ve mantar TNT'nin yapısındaki nitro gruplarını aminlere veya azoksi dimerlere kadar indirgeyebilmektedir (Maleki, 1994; Spain 1995; Popescu ve ark, 2003). Parçalama derecesi organizmaların tipine ve çevresel faktörlere göre değişim göstermektedir. Uygun koşullar sağlandığında genel olarak

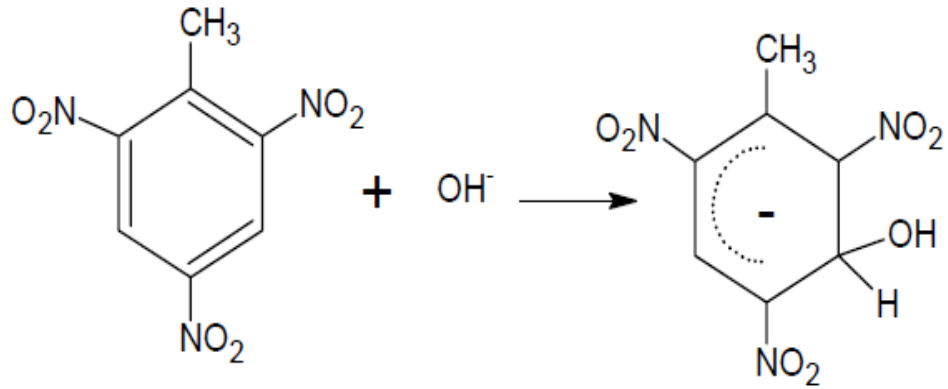
aromatik halkada mineralizasyon olmaksızın redüksiyon gerçekleşerek nitro gruplar parçalanmaktadır (Maleki, 1994).

1.11.1. Bakteriyel Parçalama

Tehlikeli organik bileşiklerin biyolojik yıkımı kimyasal yöntemlere nispeten düşük maliyetli olmasıyla birlikte hedef bileşiğin etkili bir şekilde indirgenmesini sağlayabildiği için bakteriyel parçalama en sık önerilen biyolojik degradasyon prosesidir. Nitroaromatik bileşikler; elektrofilik karakterlerinden dolayı, nitro gruplar toksisiteye sebep olan ve yüksek konsantrasyonda transformasyonu geciktiren nitroaren radikaller gibi reaktif ürünlerin meydana geldiği biyolojik indirgeyicilere kolayca okside olmaktadır (Roldán ve ark, 2008).

Mono- ve di-oksijenazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar ile metabolize edilen polinitroaromatik bileşiklerin mikrobiyal parçalanmasında oksijen reaktif bir molekül olarak kabul edilmektedir (Spain, 1995). Bu bileşiklerdeki nitro grupların elektron kazanım karakterleri aromatik halkada elektron kaybına neden olmaktadır. Bununla birlikte polinitroaromatik bileşiklerdeki nitro grupların elektron kazanım karakterleri başlangıç indirgeme reaksiyonlarını destekler nitelikte aromatik halkada elektron yetersizliğine işaret etmektedir. Halkadaki nitro grupların sayısının artması, oksijenazlar ile gerçekleştirilen oksidatif degradasyon olasılığını azaltmaktadır. Çünkü nitro grupların elektron eksikliği oksijenazların elektrofilik etkisini engellemektedir. Bu nedenle mono- ve di-oksijenazlar ile aromatik halkanın açılmasını takiben gerçekleşen oksidasyon sonucu hidroksil yan ürünlerin oluşması, mononitroaromatiklerin ve bazı dinitroaromatik bileşiklerin aerobik parçalanması için beklenen bir mekanizmadır. Dolayısıyla TNT gibi polinitro bileşikler genellikle indirgeyici yollar ile degrade edilebilmektedirler. Nitroaromatik bileşiklerin indirgenme oranı aromatik halkadaki diğer grupların kimyasal özellikleri tarafından belirlenmektedir (Roldán ve ark, 2008). Böylece para pozisyonda diğer grupların ($\text{NH}_2 < \text{OH} < \text{H} < \text{CH}_3 < \text{COOH} < \text{NO}_2$) bulunması nitro grupların redüksiyon oranını arttırmaktadır (McCormic ve ark, 1976; Roldán ve ark, 2008).

Nitroaromatik bileşiklerin aromatik halkalardan nitro grupların koparılması şeklinde tanımlanan mikrobiyal aktivite ileriki sikluslarda arta kalan karbon iskeletinin metabolizme edilmesini izleyen basamaklar bütünüdür (Sheikh, 2006). Bu aktiviteler genelde üç kategori içinde sınıflandırılmaktadır: 1 nitritlerin ortaya çıkmasına neden olan halka oksijenasyonu, 2 hidrit-Meisenheimer kompleksinin (aromatik halkanın kısmi redüksiyonu ile di-nitro bileşiklere hidrid iyonlarının eklenmesi ile oluşan kompleks) (Kulkarni ve Chaudhari, 2007) oluşabilmesi için bir hidrit iyonu tarafından gerçekleştirilen nükleofilik hücum, 3 bir hidroksilaminin meydana gelmesi için redüksiyon (Spain, 1995). Meisenheimer kompleksinin oluşumu Şekil 1.4’de verilmiştir.

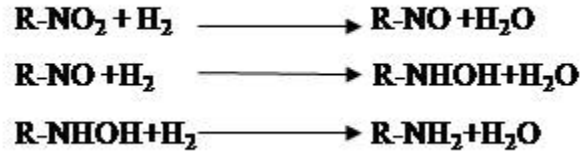


Şekil 1.4. TNT’den Meisenheimer kompleksi oluşumu (Vorbeck, 1994).

Günümüze kadar TNT ve diğer polinitroaromatik bileşikleri oksijenin varlığına ve yokluğuna bağlı olarak gerçekleşen aerobik ve anaerobik prosesler altında parçalama yeteneğine sahip pek çok mikroorganizma tanımlanmıştır (Oh ve ark, 2000). Bu bileşiklerdeki nitro grupların bakteriyel redüksiyonu, indirgeyici eşdeğerleri temin edebilmek için ekzojen bir besin kaynağına gereksinim duyan ko-metabolik bir prosedir (Peres ve Agathos, 2000; Roldán ve ark, 2008). Ayrıca pek çok durumda TNT bakteriyel gelişim için nitrojen veya karbon kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Roldán ve ark, 2008).

1.11.1.1. Aerobik Bakteriyel Parçalama

Nitro grupların elektron geri kazanım özellikleri ve aromatik halkanın stabilitesinden dolayı TNT üzerindeki mikrobiyal etki ancak nitro grupların redüksiyonundan amino gruplar, nitroso ve hidroksilamin ürünlerini oluşturma sürecine kadar sınırlı kalmaktadır (Spain, 1995). Nitro grupların amino gruplarına redüksiyonu Şekil 1.5’de verilmiştir.

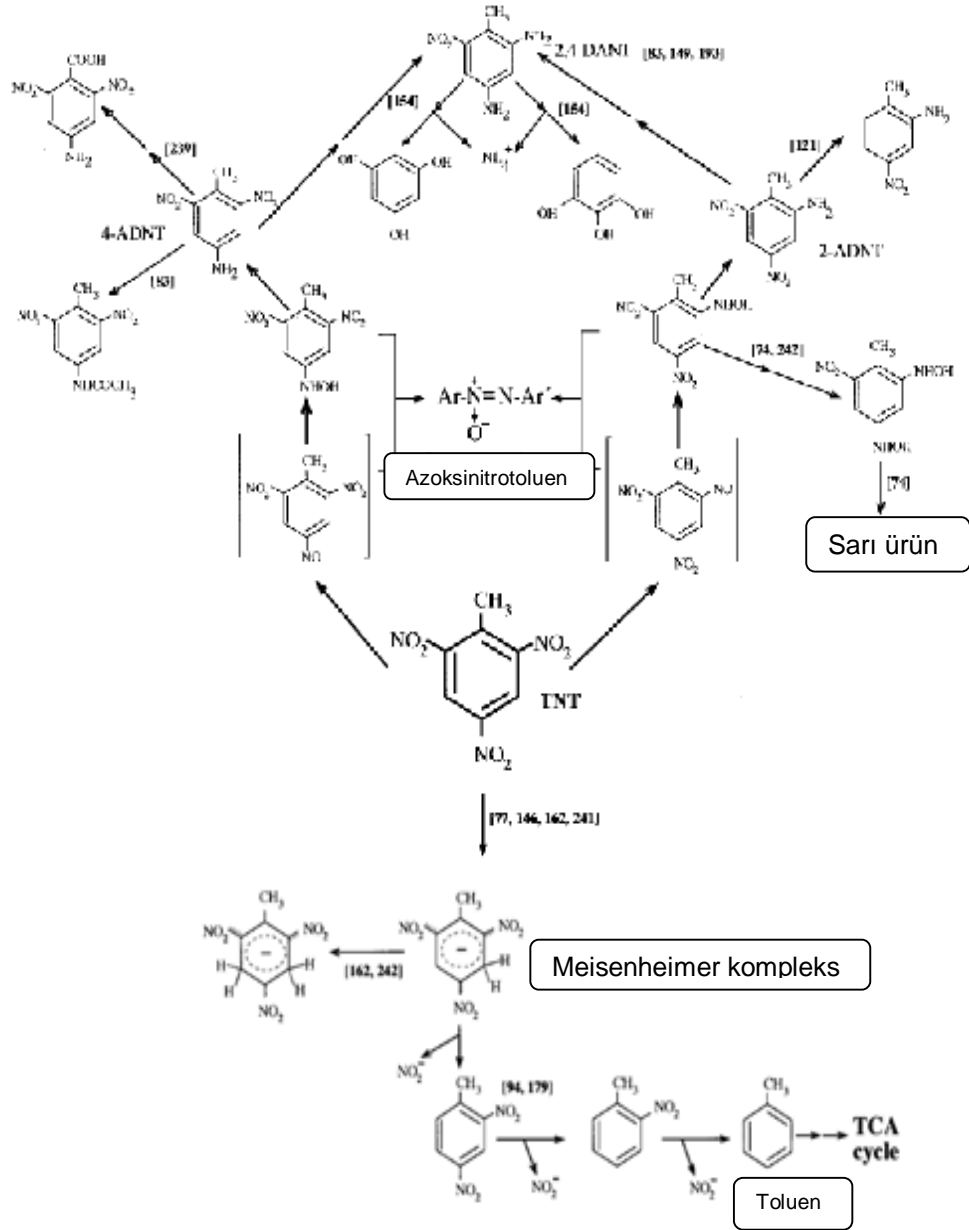


Şekil 1.5. Nitro grupların amino gruplara redüksiyonu.(Torres, 2005).

Nitro grupların elektron alma özellikleri bu bileşiğe yüksek redoks potansiyeli ve π orbitallerindeki elektron eksikliği özelliklerini kazandırmaktadır. Bu özellikler aromatik halkaya bağlı nitro grupların sayısının artmasıyla daha belirgin hale gelmektedir. Nitro grupların varlığı halka redüksiyonuna yol açacak aerobik bakterilerin oksijenazlarınca gerçekleştirilecek eletrofilik etkiyi engellemektedir (Han, 2008). Bundan dolayı TNT’nin aerob biyodegradasyonu sürecinde aromatik halkanın parçalanması yerine nitro gruplar üzerindeki metabolik etki önem kazanmaktadır. Nitro grupların amino gruplarına redüksiyonu ilk olarak para-pozisyondaki gruplarda gerçekleşirken bunu orto-pozisyondaki grup takip etmektedir (Kulkarni ve Chaudhari, 2007). Şekil 1.6’da TNT’nin aerobik biyodegradasyon mekanizması verilmiştir.

Won ve ark (1974), yapmış oldukları çalışmada maya özütü ve glukoz eklenmiş mineral besi ortamında *Pseudomonas* sp.’nin aerob koşullarda 24 saat inkübasyon süresi sonunda maya özütü içermeyen kültürler ile karşılaştırıldığında TNT konsantrasyonunun 100 mg/L’den 1 μ g/L’e kadar azaldığını göstermişlerdir. Popesku ve ark. (2003), karışık aerobik bakteri kültürlerinin karbon kaynağı olarak ham petrol veya diğer hidrokarbonların eklendiği besiyerinde başlangıç TNT

konsantrasyonu %80 oranında parçalayarak ADNT'lere ve azoksi bileşiklere kadar parçaladığı gözlenmiştir.



Şekil 1.6. TNT'nin aerobik biyodegradasyon mekanizması (Esteve-Núñez ve ark, 2001).

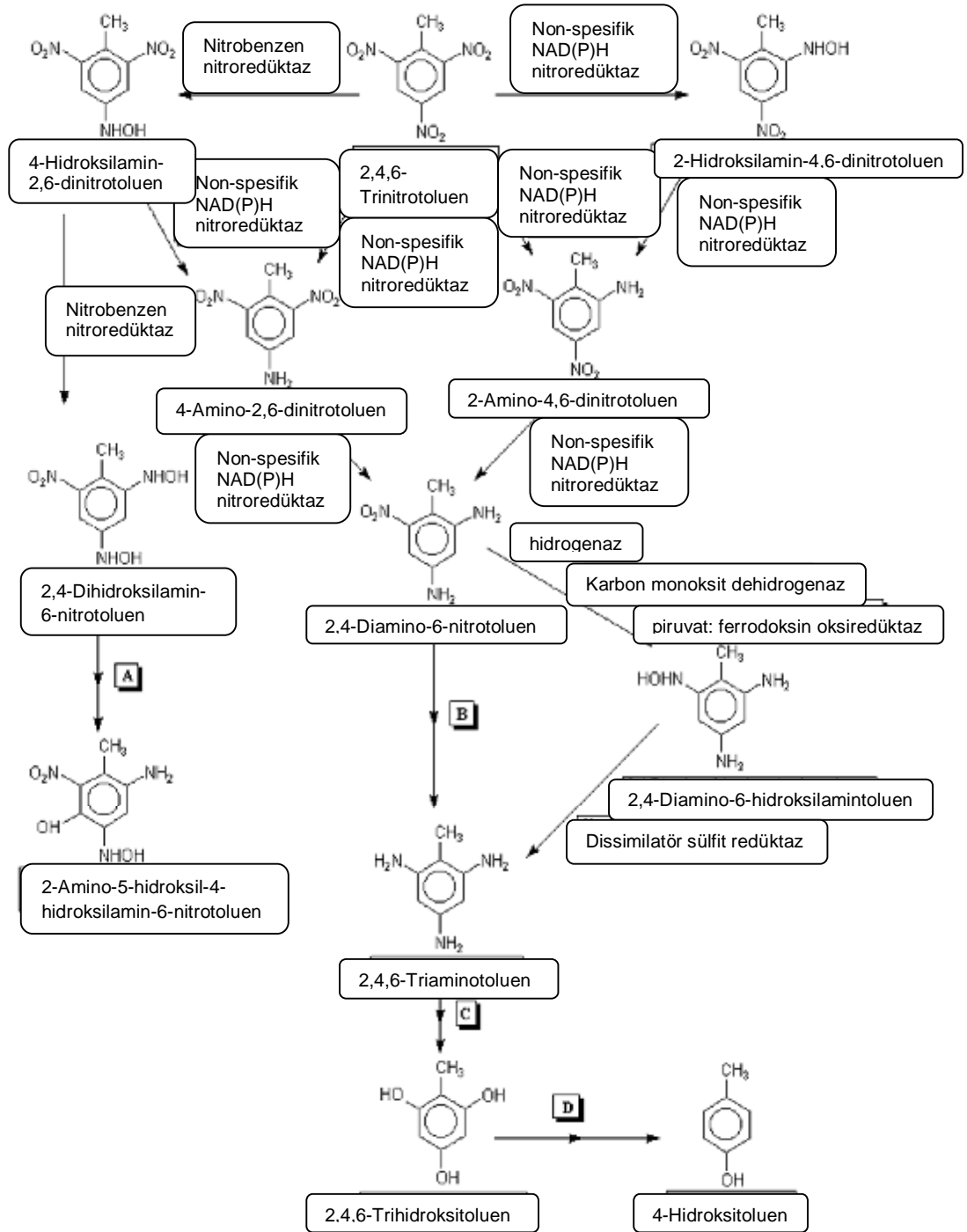
1.11.1.2. Anaerobik Bakteriye Parçalama

Düşük redoks potansiyelinde anaerobik TNT biyotransformasyonunun avantajı oksijen varlığında gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan toksik azoksi-nitrotoluen

bileşikleri ve oksidatif polimerizasyonu minimize etmesidir (Esteve-Núñez ve ark, 2001). Aerobik koşullarda nitro grupların redüksiyonu sonucu oluşan son ürünler arasında hidroksilamin (NHOH) ve amin (NH₂)'ler yer almaktadır (Hawari ve ark, 2000). Ancak anaerobik proseslerde merkezi ara ürün olarak triaminotoluen (TAT)'nın oluştuğu kabul edilmektedir (Boopathy ve Kulpa, 1992; Maloney ve ark, 2002). Triaminotoluen (TAT)'in amino grupları eletrofilik etkiye karşı halka duyarlılığına neden olan güçlü halka aktivatörleridir (Spain, 1995). TAT'ın oksidasyonu Mn⁺² gibi iz elementler tarafından hücre dış ortamda katalize edilebilmektedir (Preuss ve ark, 1993). Fakat bu proses sürecinde bakteriler tarafından degrade edilmesi oldukça güç polimerler oluşmaktadır.

Aerobik sistemlerde oluşan TAT moleküllü anaerob proseselerde oluşan kadar stabil yapıda olmadığı için polinükler azo bileşikler veya tetra-amino-azobenzenler oluşturmak üzere tepkimeye girmektedir (McCormick ve ark, 1976). Aerobik koşullarda reaktif hidroksilamin ürünlerin oluşumu polimerizasyon veya dimerizasyon sonucu azoksi bağların oluşumuna neden olmaktadır. Ancak anaerobik koşullarda redüksiyonun hızlı gerçekleşmesi azoksi bileşiklerin oluşumunu engellemektedir (Lee, 1996). Şekil 1.7'de TNT'nin anaerobik bakteriyel biyodegradasyon şeması verilmiştir.

Anaerobik TNT transformasyonu enzimsel açıdan tam olarak karakterize edilememesine karşın; ferredoksinler, hidrogenazlar, karbon monoksit dehidrogenazlar (CODH), pirüvat-ferredoksin oksidoredüktaz ve sülfid redüktazları içeren çeşitli anahtar proteinlere işaret etmektedir (Zhang ve Bennett, 2005).



Şekil 1.7. TNT'nin anaerobik bakteriyel biyodegradasyon şeması
(www.onlineethics.org)

Clostridium'lar, sülfat parçalayıcılar (*Desulfovibrio* türleri), metanogenezler, ve Fe (III) indirgeyen bakteriler TNT gibi polinitroaromatik bileşikleri anaerobik koşullarda parçalayabilen bakterilerdir (Spain, 1995). TNT'nin anaerobik

metabolizmasına dair ilk kanıtlara McCormick ve ark. (1976), *Veillonella alkalescens*'in saf ekstraktları ve hücre süspansiyonlarının bir elektron vericisi olarak H₂'i kullanarak TNT'nin TAT'a kadar parçaladığını belirttikleri çalışmada rastlanmıştır.

Desulfovibrio sp. karbon kaynağı olarak 30 mM pirüvat ve elektron alıcısı olarak 20 mM sülfat içeren besi ortamına 100 mg/L konsantrasyonda TNT eklenerek 37°C'de 7-10 gün süreyle anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu koşullar altında nitrojen kaynağı olarak TNT'yi kullandığı belirlenen bakteri ilk ara ürün olarak 2,4-diamino-6-nitrotoluen'i oluşturmuş 10 günlük inkübasyon sonrası bu ürünü 2,6-diamino-6-nitrotolen'e dönüştürdüğü belirlenmiştir (Boopthay ve ark, 1993). Yine Boopthany ve ark (1998), *Desulfovibrio* sp. kullanarak RDX, TNB ve HMX'den oluşan nitroaromatik patlayıcı karışımlarının degradasyonu incelenmiştir. Bu çalışma sonunda bakterinin patlayıcıları tek nitrojen kaynağı olarak kullandığı ve 18 günlük inkübasyon sonucunda konsantrasyonlarının <0.5 ppm'e kadar azalttığı gözlenmiştir. Besi ortamında parçalama sonucunda serbest kalan nitro grupların amonyağa dönüştüğü belirlenmiştir.

1.11.2. Fungal Parçalama

Beyaz çürükçül mantarların parçalanmaya dirençli yapıda toksik kimyasallar üzerindeki etkileri dikkate alınarak *Phanerochaete chrysosporium*'un kullanıldığı çalışmalarda önceleri nitrojen kaynağı içermeyen koşullar altında sonra ise farklı besin kaynakları (karbon, nitrojen ve sülfür gibi) eklenerek TNT'yi parçalama kabiliyetleri araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda diğer organizmalara benzer olarak mantarlarında nitro grupların redüksiyonu basamakları ile TNT'yi degrade ettikleri ortaya konmuştur. Bu reaksiyonlardan lignin parçalama sisteminin ekstrasellüler enzimleri sorumlu olup bu enzimler lignin peroksidaz, manganaz peroksidaz, oksidaz, redüktaz ve hidrojen peroksidaz şeklinde sınıflandırılmaktadır (Esteve- Núñez ve ark, 2001). Beyaz çürükçül mantarlar üzerinde yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonda TNT içeren sulu ortamlarda bakterilerin aksine TNT'yi CO₂'e kadar mineralize ettikleri gözlenmiştir (Maleki, 1994).

Kim ve Song (2000), yapmış oldukları çalışmada *Irpex lacteus*'un 5 günlük kültürünü kullanarak minimal besi ortamında 200 mg/L'e kadar yüksek TNT konsantrasyonlarının 12 saat içerisinde tamamen parçalandığını belirtmişlerdir. Parçalanma ürünü olarak 2 adet hidroksilamin-dinitrotoluen izomerinin oluştuğu ortaya çıkarılmıştır.

Hoehamer ve ark (2006), tarafından yapılan çalışmada *Fusarium oxysporum*'un 5 günlük kültürüne son konsantrasyon 30 mg/L olacak şekilde TNT ekleyerek 25°C'de 150 rpm'de çalkalayıcıda 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. 12 saat sonra TNT'nin %70'nin hidroksilamin dinitrotoluenlere veya monoamin-dinitrotoluenlere dönüştüğü, 20 saat sonra hemen hemen tamamın hidroksilamin veya monoamin ürünlerine parçalandığı, 36-48 saatleri arasında hidroksilamin metabolitlerin dinitrotoluenlere kadar yıkıldığı rapor edilmiştir.

1.11.3. Fitoremidasyon

Bitkiler kullanılarak yapılan fitoremidasyon çalışmalarında TNT gibi parçalanmaya dirençli yapıda ksenobiyotikler 3 aşamada metabolize edilmektedir. Bunlar, konversiyon, konjugasyon, ve yapıya katma olarak tanımlanmaktadır. I. aşamada oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonları ile TNT'nin yapıya katılabilecek forma dönüştürülmesi. II. aşama, dönüşümü gerçekleşmiş formun bir şeker veya tripeptid ile konjugasyonun gerçekleşmesi. Konjuge ürünler oldukça stabil, daha az toksik ve daha çok polar hale gelmektedir. III. aşama ise konjugantların vakuol veya hücre duvarı gibi bitki hücresinin diğer bölümleri içerisinde immobilize edilerek çözünemez hale dönüştürülmesi (Mueller ve ark, 1995; De Lorme, 2008). Bununla birlikte ekosistem içerisinde oksijen ve karbonca zengin kök sızıntıları TNT ile kirlenmiş topraklardaki mikrobiyal aktiviteyi uyararak degradasyon hızını arttırmaktadır (Xiang 2001, Gallagher, 2010). Bitkiler üzerindeki TNT toksisitesi yaprak dokularında sararma, anormal kök gelişimi ve gelişimi baskılayıcı etki göstermektedir (De Lorme, 2008).

Hızlı gelişimi ve TNT toleransının yüksek olması nedeniyle fitoremidasyon çalışmalarında en favori bitki olarak *M. aquaticum* gösterilmektedir. Hoehamer ve

ark, (2006) *M. aquaticum* kullanılarak 100 mg/L TNT içeren besi ortamında yaptıkları çalışmada 25°C'de 168 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıç TNT konsantrasyonunun 96 saat sonunda tamamen giderildiği belirlenmiştir.

Son zamanlarda yapılan fitoremidasyon çalışmaları degradatif karakterdeki bakteriyel enzimleri bitkilere aktararak transgenik organizmalar elde etme yönünde ilerlemektedir (Hannink ve ark, 2001; De Lorme, 2008). *Enterobacter cloacae*'den elde edilen PETN redüktaz (pentaeritritol tetranitrat redüktaz) tütün bitkilerine entegre edilmiştir (Hannink ve ark, 2001). Transgenik bitkiler aynı koşullar altında yabani tip bitkilerle karşılaştırarak TNT'ye olan toleransları belirlenmiştir. Her iki bitki tipinin 50, 150, 500, 1500, 4000 mg/kg TNT içeren topraklarda 12 hafta süresince gelişimleri izlenmiştir. Yabani tip bitkinin 150 mg/kg TNT konsantrasyonunun üzerinde gelişiminin durmasına rağmen transgenik bitkinin 4000 mg/kg TNT bulunan toprakta gelişimine devam ettiği gözlenmiştir (Travis ve ark, 2007).

1.12. TNT'nin Degradasyon Ürünleri

Patlayıcıların bulaşmış olduğu bir alandaki patlayıcı kirlilik düzeyinin belirlenmesi için patlayıcılar ile bunların yer altı suları ve topraktaki bozunma ürünlerinin tespit edilip tanımlanması gereklidir.

Nitro grupların aminlere (-NH₂); aminlerinde nitroso (-NO) ve hidroksilaminlere (-NHOH) kadar indirgenmesi sonucu toksisitesi TNT'ye göre daha yüksek olan pek çok yan ürün oluşmaktadır. Bu ürünler: 2,6-Dinitro-4-hidroksiaminotoluen, 2,6-Dinitro-4-aminotoluen, 2-Nitro-4,6-diaminotoluen, 2,4-Dinitro-6-hidroksiaminotoluen, 2,4-Dinitro-6-aminotoluen, 2,2',4,4'-Tetranitro-6,6-azoksitoluen, 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoksitoluen, 2-aminodinitrotoluen (2-ADNT), 2,4-diaminonitrotoluen (2,4-DANT), 1,3,5-trinitrobenzen (TNB), p-dinitrobenzen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen ve 2,4-dinitrotoluen (Gorontzy, 1994).

Patlayıcılar ve parçalanma ürünlerinin tanımlanması için yeni analitik yöntemler geliştirilmekle birlikte mevcut yöntemlerin seçiciliğini ve duyarlılığını

arttıracak uygulamalar da yapılmaktadır. Mevcut yöntemler arasında İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Gaz Kromatografisi (GC), Kütle Spektrofotometresi (MS), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS) ve Yüksek Basınçta Sıvı Kromatografisi (HPLC) gösterilmektedir. Alternatif olarak Katı-Faz Mikroekstraksiyon gibi yeni teknikler; GC için analitlerin ekstraksiyonu ve konsantre edilmesi sürecinde kullanılmaktadır (Torres, 2005).

1.13. Biyodegradasyona Enzimsel Bakış

Polinitroaromatik bileşiklerdeki nitro grupların redüksiyonu NAD(P)H bağımlı geniş bir substrat spesifitesine sahip olan bakteriyel nitroredüktazlar tarafından katalizlenmektedir (Rafii ve ark, 1997). Bu bileşikleri son ürün olarak hidroksilamin veya aminlere kadar parçalayabilen ve prostetik grup olarak flavin mononükleotid içeren bu enzimler NAD(P)H bağımlı flavoenzimler olarak bilinmektedir (Roldán ve ark, 2008).

Polinitroaromatik bileşiklerden nitro grupların redüksiyon tek veya çift elektron mekanizması aracılığıyla gerçekleşmektedir. Oksijen duyarlılıklarına göre bakteriyel nitroredüktazlar tip I veya oksijen-duyarsız ve tip II veya oksijen-duyarlı enzimler olarak sınıflandırılmaktadır. Tip I nitroredüktaz NAD(P)H'dan elektron çiftinin eklenmesi ile nitro grupların ardışık redüksiyonunu katalizlemektedir. Reaksiyon sonucunda nitroso, hidroksilamin ve amino yan ürünler oluşmaktadır. Hidroksilamin yan ürünler genellikle reaksiyonun son ürünü olarak gözlenmiştir. İkinci iki-elektron transferi ilk iki-elektron transferinden daha hızlı gerçekleştiği için nitroso ara ürünler belirlenmemektedir. Memelilerde NAD(P)H: kinon redüktaz veya DT (deoksitimidin)-diaforaz ve ksantin oksidazlar da bu tip reaksiyonları katalizlemektedir. Enzim kofaktöründeki flavin termodinamiğinden dolayı iki-elektron transferi için spesifik olan Tip II nitroredüktazlar dışında NADPH-sitokrom P450 redüktaz, ferredoksin: NADP⁺ redüktaz ve NADH: ubikinon redüktaz gibi enzimler de aynı tip reaksiyonları katalizlemektedir (Roldán ve ark, 2008).

Ayrıca bazı diğer bakteriyel enzimler de nitroredüktaz aktivitesi göstermektedir. Anaerobik bakteri *Clostridium acetobutylicum*'den izole edilen

demir-hidrojenaz asidogenik gelişim fazı sırasında TNT'nin hidroksilaminlere H₂-bağımlı redüksiyonunu katalizlemektedir. Karbon monoksit dehidrogenaz tarafından TNT'nin redüksiyonu *Clostridium thermoaceticum*'da rapor edilmiştir (Roldán ve ark, 2008).

Bununla birlikte nitroredüktaz aktivitesi olan bu klostridial enzimler bakterilerde ayrıca bulunan klasik NAD(P)H-bağımlı nitroredüktazlardan yapısal ve biyokimyasal olarak farklıdır. OYE olarak adlandırılan aileye mensup bazı flavoredüktazların kinon, sitokrom c, metilen mavisi, ferrosiyaniür ve Fe⁺³ü içeren geniş bir substrat aralığı bulunmaktadır. Ayrıca, OYE enzimler TNT dışındaki nitroesterler pentaeritrol tetranitrat (PETN) ve gliserol trinitrat (GTN) gibi bazı patlayıcıları parçalama kabiliyetine de sahiptir. *Enterobacter cloacae*'dan PETN redüktaz, *Escherichia coli*'den NemaA protein, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens*'den ksenobiotik redüktazlar Xen A ve Xen B ve *P. putida*'dan izole edilen morfinon redüktaz OYE ailesinin en iyi bilinen üyeleridir. OYE proteinler TNT gibi polinitroaromatik bileşikler ya aromatik halkaları sonradan nitrit ortaya çıkması ile hidrid ve dihidrid-Meisenheimer kompleksine ya da nitro grupları hidroksilamin yan ürünlerine kadar redüksiyon yolu ile etkilemektedir. Tüm bakteriyel OYE enzimlerin poliaromatik bileşiklerin nitro gruplarını indirgeyebildikleri görülmüştür ancak bu enzimlerin bazıları; PETN redüktaz, Xen B, NemaA protein hem aromatik halkayı hem de nitro grupları etkilemektedir (Williams ve Bruce, 2002).

Bakteriyel nitroredüktazlar çevresel ve klinik biyoteknoloji alanlarında uygulamalarından dolayı son on yıllık süreçte dikkate alınmışlardır. Bakteriyel nitroredüktazların aktarıldığı transgenik bitkilerin kullanıldığı fitoremidasyon çalışmaları polinitroaromatik patlayıcıların biyolojik parçalanması açısından etkili bir arındırma yöntemidir (Spain, 1995). Bu enzim klinik anlamda, bir enzimin antitümör antikora konjuge edilerek bu kompleksin hedeflenen tümör hücrelerine etki etmesi temeline dayanan antikor-bağlı enzim ön-ilaç terapisi (ADEPT), gen-bağlı enzim ön-ilaç terapisi (GDEPT) ve virüs-bağlı enzim ön-ilaç terapisi (VDEPT) olarak bilinen tekniklerde kanser tedavisi için kullanılmaktadır (Springer ve Niculescu-Duvaz, 2002). Bu uygulamalar *Escherichia coli*'den izole edilen nitroredüktazın oluşturduğu

sitotoksik hidroksilamin yan ürünlerin tümör hücrelerini öldürmesi temeline dayanmaktadır (Roldán ve ark, 2008).

1.14. Çalışmanın Amacı

Günümüzde, nitroaminler (heksojen, oktojen), nitro destekli aromatikler (TNT, pikrik asit, HEXYL ve TERYL) ve alifatikler (PETN, nitroguanidin) gibi patlayıcılar ve patlayıcıların kalıntıları ile kirlenmiş toprak ve su kaynakları ciddi çevresel problemler haline gelmiştir. Bu ksenobiyotiklere ve bunların üretimi sırasında ortaya çıkan öncü ürünlere sadece üretim ve işleme tesislerinde değil aynı zamanda imha bölgelerinde de rastlanmaktadır. Ayrıca bu kimyasalların pestisit, ilaç ve boyaların yapımında kullanılması farklı yollarla çevreye hızlı bir şekilde yayılmalarına neden olmaktadır. Bu kimyasalların askeri mühimmat olarak kullanımının sıklığı ve ekosistem üzerindeki etkileri göz önüne alındığında ne kadar ciddi bir sorunla karşı karşıya kalındığını göstermektedir.

Özellikle pek çok sınır bölgelerimizde mayınların imha edilmesi sonucu toprağa ve dolayısıyla yeraltı sularına karışarak önemli bir çevresel problem haline gelen TNT'nin degradasyonu son yıllarda bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Bundan yola çıkarak bu çalışmada patlayıcılar ile kontamine topraklardan TNT'yi parçalayabilme kabiliyetine sahip aerob bakteriyel suşlar izole edilip, *in vitro* geliştirildikleri minimal besi ortamlarına eklenen TNT'yi besin kaynağı olarak kullanmalarını sağlayarak bu suşların degradatif karakterlerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Duque ve ark (1993), azot kaynakları olarak TNT, DNT ve 2-nitrotoluen bulunan ortamlarda gelişen *Pseudomonas* sp. C1S1 izolatını 10 mg/L konsantrasyonda TNT bulunan ortamda geliştirdiklerinde parçalama miktarının az olması üzerine bu bakteriyi karbon kaynağı olarak fruktozla desteklenmiş ve 100 mg/L TNT içeren M8 minimal besi yerinde 30°C'de 12 günlük batch kültüründe geliştirmişlerdir. Degradasyon görülmesi üzerine bu ortamdan toplanan bakteriyi *Pseudomonas* sp. klon A olarak isimlendirmişlerdir. Çalışmaya bu izolat ile devam etmiş olup 28 günlük inkübasyon süresini takiben süşun TNT'yi nitrojen kaynağı olarak kullandığı ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada *Pseudomonas putida*'nın TOL plasmidi pWW0-Km *Pseudomonas* sp. klon A'ya transfer edilerek TNT'yi hem karbon hem de azot kaynağı olarak kullanabilen konjugant bir bakteri üretmişlerdir.

Vanderberg ve ark (1995), *Mycobacterium vaccae* JOB-5 süşunun karbon kaynağı olarak propan varlığında TNT'nin kometabolizme edilmesi üzerine çalışmışlardır. Kometabolik proses süresince geçici kahverengi bir kromofor üretimi gözlenmiştir. Bu bileşim GC-MS analizleri ile 4-amino-2,6-dinitro-benzoik asit olarak tanımlanmıştır. *M. vaccae* radyoaktif işaretli TNT (¹⁴C-TNT) ve propan içeren besi ortamında inkübe edildiğinde mikroorganizmanın radyoaktivitenin %50'sini hücrel lipid fraksiyonuna eklediği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre radyoaktif etiketli karbonların fosfatidil-L-serin, fosfatidiletanolamin, kardiolipin ve diğer polar lipidlerin yapısına katılmadan önce degradasyonun gerçekleştiğini göstermiştir.

Anaerob bir bakteri olan *Clostridium bifermentans* LJP-1 süşunun TNT degradasyon aktivitesi Lewis ve ark (1996), tarafından araştırılmıştır. 50 ppm TNT içeren M9 besi ortamına %0.2 glukoz eklendiğinde bakterinin nitro grupları yıkarak ilk 20 dakika içerisinde TNT'nin tamamen parçalandığı ortamda HADNT 4-ADNT, 2,4-dihidroksilamin-6-nitrotoluen (DHANT), 2-hidroksilamin-4-amino-6- nitrotoluen (AHANT), DANT ve son ürün olarak TAT ve TAT'ın fenolik hidroliz ürünleri HPLC analizleri ile belirlenmiştir.

TNT kontaminasyonlu ve kontaminasyonsuz toprak örneklerinden izole edilen *Actinomyce* süşlarının TNT toleransları ve transformasyon karakterleri

karşılaştırılmıştır. 25, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda TNT Brain Heart Infusion Agar (BHI) ve Yeast Malt Extract Agar olmak üzere iki farklı besiyerine eklenerek sürdürülen tolerans çalışmalarında her iki toprak örneğinden izole edilen suşlar arasında kaydedeğer bir fark gözlenmemiştir. Patlayıcılarla kontamine topraktan izole edilen *Actinomycece* ESA1 ve *Streptomyceces chromofuscus* A11 25 ppm konsantrasyonda TNT içeren BHI sıvı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde her saatte bir alınan örneklerden HPLC analizleri yaparak parçalanma ürünleri belirlenmiştir. Her iki suşun kültürlerinde 4-amino-2,6-Dinitrotoluen (4-A-2,6-DNT) ve 2,4-Diamino-6-nitrotoluen (2,4-DA-6-NT) ürünleri tanımlanmıştır (Pasti-Grigsby ve ark, 1996).

Fiorella ve Spain (1997), tarafından nitrobenzen içeren ortamlarda geliştirilen *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52 suşu kullanılarak 220µM TNT içeren 20mM potasyum fosfat tamponu içerisinde degradasyon yeteneği araştırılmıştır. Bu bakterinin HPLC analizlerinde çok düşük düzeylerde 4-HADNT ve 4-ADNT ürünleri ve nitrit oluşumu gözlenmiştir. Ancak anaerobik koşullar altında ise bu bakterinin kültürlerinde nitrit çıkışına rastlanmamasına karşın, DHANT ve 2-HA-4-ANT'nin birikimi belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda bakterinin O₂ kullanma özelliğine göre oluşan ürünlerin çeşitliliği ortaya konmuştur.

Martin ve ark (1997), Nebraska Ordnance işletmesinden alınan patlayıcı madde ile kirlenmiş atık su örneğinden izole ettikleri *Pseudomonas savastanoi*'nin çeşitli besin kaynaklarının eklendiği ve farklı hücre yoğunluklarının inoküle edildiği 0.31 mM TNT (70 mg/L TNT) içeren mineral besiyerinde degradasyon yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmalar degradasyon periyodu süresince metabolitlerin tanımlanması ve besi ortamındaki nitrit miktarı incelenerek yürütülmüştür. Nitrojen kaynağı olarak NH₄ kaldırılıp NO₂ eklendiğinde 48 saatte TNT miktarı ortalama olarak 0.1 mM düşerken, glukoz eklendiğinde 24 saat içinde TNT'nin HPLC analizlerinde belirlenemediği görülmüştür. Hücre yoğunluğu 9x10⁵ hücre/mL'ye ayarlanmış bakteri kültüründe yapılan çalışmada 40 gün sonunda hücre yoğunluğu 605 hücre/mL olurken ortamdaki TNT miktarı 0.08 µmol seviyelerine kadar düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak bu çalışmada *Pseudomonas savastanoi*'nin

TNT'yi tek karbon veya tek azot kaynağı olarak kullanarak parçaladığı ortaya çıkarılmıştır.

Pestisit kontaminasyonlu tarım topraklarından izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* bakteri kültüründen karbon kaynağı olarak glukoz ve 100 mg/L TNT içeren sıvı minimal besiyerine %10 inokülüm yapılarak 30°C'de 28 gün çalkalamalı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Aerob ortamlarda yapılan bu çalışmada inkübasyon süresi sonunda TNT'nin tamamen parçalandığı gözlenirken degradasyon ürünleri HPLC ve GC-MS analizleri ile belirlenmiştir. Gelişim ortamlarındaki temel degradasyon ürünleri olarak 5.6 ve 13.6 mg/L konsantrasyonlarda sırasıyla 2-ADNT ve 4-ADNT tanımlanmıştır. Karbon kaynağı olarak besi ortamına fruktoz eklendiğinde TNT'nin degradasyon süresinin 16 güne kadar azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Oh ve Kim, 1998).

Yerevan gölünden Khachatryan ve ark (2000), bazı kimyasal toksinlere karşı toleranslı aerobik bakteriler izole ederek bu suşları TNT degradasyon çalışmalarında kullanmışlardır. Minimal besiyerine %0.015 TNT eklenerek 18-20 saat süreyle 25 °C'de 120 rpm'de suşlar inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda ortamdaki TNT miktarı üst fazın 1 mL'sine 0.1 mL 2 M NaOH eklenerek 15 dak. renk değişimi incelenmiştir. Örneklerin 360 nm'de dalga boyunda spektrofotometrik analizi yapılarak suşun degradasyon yetenekleri belirlenmiştir. N8 ve N10 olarak adlandırılmış suşların her ikisinde de başlangıç TNT miktarının 0.4 mM/L olduğu ortama %0.3 NH₄Cl ve %0.3 glukoz eklendiğinde 0.1-0.2 mM/L seviyelerine kadar azaldığı ortaya konmuştur.

Tope ve Jamil (2000), askeri malzeme işleme ünitesine ait toprak örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* sp KA suşunun TNT metabolize yeteneğini araştırmışlardır. 0.25 mM/L TNT içerikli minimal besiyerinde 30°C'de aerobik koşullarda yürütülen bu çalışma sonunda 5 gün içerisinde TNT'nin tamamen transforme olduğu ve GC-MS ve TLC analizleri ile 4-aminodinitrotoluen ve 2-aminodinitrotoluen şeklinde isimlendirilen 2-izomerik monoaminodinitrotoluen belirlenmiştir. Hem izolatın gelişimi hem de biyotransformasyon oranının besiyerine amonyum tuzu ve şeker eklendiğinde arttığı gözlenmiştir. Karbon kaynağı olarak mannozun varlığında maksimum degradasyon verimi elde edilmiştir.

Aktif çamur izolatu olan *Klebsiella* sp C1 suşunun TNT'yi iki farklı degradasyon yolu ile parçaladığı Kim ve ark (2002), tarafından belirlenmiştir. 100 mg/L TNT içeren minimal besi ortamında 30°C'de 130 rpm'de sürdürülen bu çalışmada degradasyonun 20. dakikasında bakteri kültüründe 63 mg/L konsantrasyonda HADNT'lerin birikimi oluşurken, 6. saatte tamamıyla ADNT'lere (35 mg/L) dönüşüm söz konusu olmuştur. 48 saatlik inkübasyon sonunda son ürün olarak besi ortamında diğer metabolitlerin konsantrasyonundan daha az düzeyde ADNT'lere rastlanmıştır.

Savaş malzemeleri ile kontamine topraktan izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* MX suşunun aerobik koşullarda 10 saat içerisinde kültür besi ortamındaki 100 mg/L TNT'yi tamamıyla parçaladığı Oh ve ark (2003), tarafından rapor edilmiştir. pH 5'den 8'e kadar değişen minimal besi ortamlarında sürdürülen bu çalışmada optimal pH aralığı 7-8 olarak belirlenmiştir. Metilen klorit kullanılarak ekstraksiyonu yapılan ürünler GC-MS analizleri ile belirlenmiştir. Temel parçalanma ürünleri 2-ADNT (üst fazdaki temel ürün), 2,2-azoksitoluen (2,2-AZT) hücre fraksiyonu içerisindeki temel ürün ve 2-hidroksilamin-4,6-dinitrotoluen (2-HADNT) olarak belirlenmiş olup besi ortamına maya özütü eklendiğinde ADNT oluşumunun arttığı gözlenmiştir.

Park ve ark (2003), toprak izolatu olan *Pseudomonas putida* KP-T202 suşunu kullandıkları çalışmada TNT degradasyon ortam koşullarını optimize etmişlerdir. Çalkalamalı ortamlarda yürütülen bu çalışmada 100 mg/L TNT içeren besiyerine %1 mısır maserasyon sıvısı, %0.025 NH₄Cl ve %0.1 Tween 80 ilave edilerek pH'sı 7'e ayarlanmış kültür 30°C'de 150 rpm'de inkübe edildiğinde 15 saat içerisinde TNT'nin tamamen degrade edildiği gözlenmiştir. HPLC analizleri sonucunda parçalanma ürünleri olarak 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-ADNT ve 4-ADNT'ler belirlenmiştir. pH'nın değişiminin TNT'nin biyolojik parçalanabilirliğine üzerindeki etkisini 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olmak üzere farklı pH aralıklarında *Pseudomonas putida*'nın davranışları inceleyerek araştırmışlardır. Bakterinin maksimum optik yoğunluğa ulaştığı (OD₆₀₀ 1.5) pH aralığını (pH:7) optimal olarak belirlemişlerdir. Bu aralıkta en yüksek degradasyon verimi elde etmişlerdir.

Ruminal bakteriler kullanılarak anaerob ortamda TNT degradasyon çalışmaları Fleischmann ve ark, (2004) tarafından yürütülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca 0, 1, 2, 4 ve 24. saatlerde alınan örnekler için HPLC analizi yapılarak degradasyon verimi incelenmiştir. 1 saatlik inkübasyonu takiben 2-HADNT, 4-HADNT ve 4-ADNT'lere rastlanmıştır. 2.saat sonunda yalnızca diamino ve dihidroksiamino-nitrotoluen ürünlerin ortamda kaldığı belirlenmiştir. 24. saat sonunda ortamda UV absorbe edebilen bilinen bir parçalanma ürünü belirlenememiştir.

Zaripov ve ark, (2004) tarafından 11 adet Gr(+) 21 adet Gr(-) olmak üzere toplam 32 bakteri suşunun TNT üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gr(+) bakteriler için 15-100 mg/L; Gr(-) için ise 100-200 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda TNT ve %0.5 maya özütü içeren minimal besiyerinde 28°C'de 120 rpm'de sürdürülen degradasyon çalışmalarında 5 saatlik inkübasyon süresinde Gr(-) bakteri suşlarının TNT' nin %90-100'ünü Gr(+) bakteri suşlarının yalnızca %50-80'nini transforme ettiği gözlenmiştir. Bu çalışmada parçalanma ürünleri HPLC analizleri ile belirlenmiş olup temel ürün olarak HADNT'lere rastlanmıştır.

TNT kontaminasyonlu Japonya'nın Kitakyushu şehrinin Yamada Green bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen 6 bakteri suşu (*Pseudomonas* sp. TM15 ve TM30, *Sphingomonas* sp. TM22, *P. putida* TM38, *P. fluorescens* TM42 ve *Pseudomonas* sp. TM55) 440 µM konsantrasyonda TNT ve asetat içeren M8 minimal besi ortamında 30°C'de 120 rpm'de karanlık ortamda 7 gün inkübe edilmiştir. TNT'nin biyodegradasyonu parçalanma ürünlerinin tanımlanması ve ortaya çıkan NO₂ iyonun spektrofotometrik analizleri ile takip edilmiştir. TM42 hariç diğer suşların kültür ortamlarında nitrit çıkışı gözlenmiştir. Tüm *Pseudomonas* suşlarında TNT 2-HADNT, 4-HADNT, 2-ADNT, ve 4-ADNT'lere kadar transforme edilirken TM55 suşunda tek parçalanma ürünü olarak 2ADNT saptanmıştır. TM38 suşu diğer *Pseudomonas*'lardan farklı olarak TNT'nin 2,4-DNT'ye dönüşümü belirlenmiştir. 7 gün sonunda ortamda kalan TNT miktarlarına bakıldığında TM15 (1.8 µM), TM30 (38.0 µM) ve TM22 (2.4 µM) suşlarının TM38 (327.3 µM), TM42 (358.5 µM) ve TM55 (353.4 µM) suşları ile karşılaştırıldıklarında degradasyon yeteneklerinin daha iyi olduğu Maeda ve ark (2006) tarafından rapor edilmiştir.

Tek nitrojen kaynağı olarak TNT'nin bulunduğu besi ortamında geliştirilen *Escherichia coli*'nin aerobik koşullarda TNT'yi kısmi denitrasyon şeklinde degrada ettiği ortaya çıkarılmıştır. 20 mM gliserol veya glukoz eklenen minimal besiyerinde 26 saat sonunda 606 µM TNT'nin tamamen parçalandığını belirlenmiştir. 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-A-2,6-DNT), 4,4,6,6-tetranitro-2,2-azoksitoluen (2,2 azoksi), ve 2,2,6,6- tetranitro-4,4-azoksitoluen (4,4-azoksi) metabolitleri parçalanma ürünleri olarak belirlenirken önemsiz konsantrasyonda 2-A-4,6-DNT'ye rastlanmıştır (Stenuit ve ark, 2006). TNT degradasyonu sonucu biriken nitrit miktarını spektrofotometrik analizlerle incelenmişlerdir. İnkübasyonun süresinin ilk 26. saatinde. besi ortamında 48 µM nitrit oluşumu belirlenmiştir.

Claus ve ark (2007)'nin yapmış olduğu bu çalışmada *Raoultella terrigena* HB suşunun 10-100 mg/L düzeyinde değişen radyoaktif işaretli ¹⁴C-TNT konsantrasyonlarının optimum aerobik koşullar sağlandığında birkaç saat içerisinde tamamıyla degrade edildiği belirtilmiştir. 7 günlük inkübasyon süresince yapılan radyoaktivite ölçümlere göre 3 gün sonunda üst fazdaki başlangıç radyoaktivitenin %30'nun 6 gün sonunda %15'lere kadar düştüğü belirlenmiştir. Geriye kalan %80-90 radyoaktivite ise hücresel pelletlerdeki suda çözünmeyen organik madde olarak tespit edilmiştir. HPLC analizleri ile kültür besiyerindeki parçalanma ürünleri olarak 2-ADNT, 4-ADNT ve 2,4-DNAT; hücre ekstraktlarında ise azoksi-dimerler tanımlanmıştır.

Çeşitli karbon kaynakları (melas, glukoz, süksinat ve sitrat), organik ve inorganik nitrojen kaynakları (üre, KNO₃, NH₄Cl ve (NH₄)₂SO₄) ve sürfaktan olarak Tween 80 ile desteklenen basal salt besiyerine %10 düzeyinde *Pseudomonas putida* HK-6 suşu eklenerek Cho ve ark (2008), tarafından dipten karıştırmalı laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde yürütülen biyodegradasyon çalışmalarında 100 mg/L TNT bulunan minimal ortamlarda karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı kültürlerde bakterinin 6 kat daha hızlı geliştiği ve buna bağlı olarak 4 günde degradasyonun tamamlandığı belirtilmiştir. Ek nitrojen kaynaklarının degradasyon üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir.

De Lorme (2008), tarafından 10 adet bakteri suşunun 100 mg/L TNT bulunan kültürleri 24 saat 39°C'de 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Degradasyon veriminin

incelenmesi için kültürlerde alınan 0.5 mL örneklerin HPLC analizleri yapılmıştır. *Clostridium polysaccharolyticum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, ve *Ruminococcus flavefaciens* için yaklaşık olarak TNT'nin %80-90'nını; *Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans*, *Prevotella albensis* ve *Treponema 23bryantii*'nin ise %50-80'nini degrade ettiği belirtilmiştir. *Anaerovibrio lipolytica*'nın bu konsantrasyonda gelişiminin inhibe olduğu ortaya konmuştur. Parçalanma ürünleri olarak ADNT'ler ve DANT'lerin varlığı belirlenmiştir.

Japonyada Yamada Green Bölgesi, Kitakyushu'ndaki toprak örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* sp. TM15 suşu 100 mg/L TNT içerikli LB besiyerinde 30°C'de 120 rpm'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Çalkalamalı koşullarda yürütülen bu çalışmada parçalanma ürünlerinin birikimi üzerinde besi ortamındaki moleküler oksijenin etkisi araştırılmıştır. 10⁹ hücre/ml kadar yüksek hücre konsantrasyonunda kültürlerde 2 saatlik inkübasyonu takiben 2,4-DHANT ve HADNT'lere rastlanmıştır (Kubota ve ark, 2008).

Logaritmik faza kadar üretilmiş ve yoğunlukları 3.2 absorbansa ayarlanmış *Pseudomonas putida* GG04 ve *Bacillus* SF 200 µM final konsantrasyonda TNT, glukoz ve maya eklenerek zenginleştirilmiş sıvı besiyerinde 30°C'de 150 rpm'de çalkalamalı koşullarda Nyanhongo ve ark (2008)'nin, yürütmüş oldukları çalışmada 4 gün sonunda degradasyon ürünleri olarak aminodinitrotoluenler (AMDNT) ve diaminonitrotoluenlere (DAMNT) rastlanmıştır. HPLC sonuçlarına göre *P. putida* GG04 kültürlerinde 41 µM AMDNT ve 63 µM DAMNT; *Bacillus* SF ise bu oran sırasıyla 73 µM ve 109 µM olarak belirlenmiştir. 800 µM konsantrasyonda farklı humik monomerler (gayakol, katekol ve ferulik asit) eklenerek parçalanma ürünlerinin birikiminin engellenebilmesi sağlanmıştır. Gayakol ve katekolün kullanıldığı *Pseudomonas putida* GG04 kültürlerinde AMDNT ve DAMNT' nin sırasıyla %89 ve %80 oranında azaldığı görülürken bu oran *Bacillus* SF kültürlerinde %91 ve %70 olarak kaydedilmiştir.

Yasin ve ark (2008), tarafından Pakistan Ordinance fabrikasından toplanan atık su ve çamurdan izole edilmiş 14 bakteriyel suş 10-100 ppm arasında TNT içeren minimal besiyerinde geliştirilmiştir. Tüm suşların 30 ppm TNT bulunan ortamda en

iyi gelişim gösterdikleri belirlenmiş olup farklı nitrojen kaynakları (NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), karbon kaynakları (melas, glukoz ve mısır nişastası) ve sürfaktan (Tween 80) gibi çeşitli ko-substratlar çözücü olarak saf su ve nutrient besiyerinin kullanıldığı ortamlara eklenerek TNT degradasyonu optimize edilmeye çalışılmıştır. TNT'deki azalış spektrofotometrik olarak 262 nm'de incelenmiştir. Çözücü olarak nutrient broth kullanıldığında nitrojen kaynağı olarak NH_4NO_3 ve NH_4Cl kullanılarak zenginleştirilen ortamda maksimum degradasyon %88.75; karbon kaynağı olarak melas eklendiğinde %92.64 ve Tween 80 bulunan ortamda ise %92.46 düzeyine ulaştığı belirlenmiştir. Degradasyon sonucu oluşan DNT'lerdeki artış 462 nm dalga boyunda incelenmiştir.

56 izolat arasından seçilen 3 bakteriyel suşun kültürlerinden *Salmonella typhimurim* ve *Klebsiella pneumoniae* için tek nitrojen kaynağı olarak; *Acinetobacter baumannii* için ise ko-substratla (%0.1 maya özütü) birlikte TNT eklenerek aerobik koşullarda nitro grupların redüksiyonu gerçekleştirilmiştir. 0, 2, 10, 18, 24 ve 30 saat aralıklarla degradasyon ortamından alınan örneklerdeki TNT'nin miktar azalışı HPLC analizlerini sonunda belirlenmiştir. Buna göre farklı konsantrasyonlarda tolerans testi yapılarak *S. typhimurim*'un 50 mg/L TNT' nin %100'nü; *K. pneumoniae*' nin 20 mg/L TNT' nin %70'ini ve *Acinetobacter baumannii*' nin 40 mg/L TNT'nin %52'sini degrada ettikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışma yüksek potansiyelde degradasyon yeteneğine sahip *S. typhimurim* üzerine odaklanmıştır. TNT'nin mineralizasyonu minimal ortamda NO_2 iyonunun oluşumu ile incelenmiştir. Spektrofotometrik analizlerin verilerine dayanarak 30 saat sonunda 1.6 $\mu\text{mol/L}$ düzeyinde nitrit oluşumu rapor edilmiştir (Litake ve ark, 2005).

Bu çalışmada mutajen *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5 mt-3 suşunun yabani tip OK-5 ile karşılaştırarak TNT degradasyon yetenekleri araştırılmıştır. Yabani tip OK-5'in 6 gün içerisinde 0.2 mM TNT'yi parçalarken, 0.5 mM TNT'yi tolere etmekte zorlandığı belirlenmiştir. Ancak OK-5 mt-3 mutant suşun 0.5 mM TNT'yi 8 gün, 1.2 mM TNT'yi ise 24 gün içerisinde degrada edebildiği gözlenmiştir. Her iki suşun proteomik analizleri yapıldığında mutant OK-5 mt-3 suşun belli proteinlerin ekspresyon seviyelerinde yabani tipe göre değişimler görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Lee ve ark (2009), *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5 mt-

3 suşunun nispeten yüksek konsantrasyonda TNT içeren endüstriyel atıkların arıtım proseslerinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Ullah ve ark (2010), patlayıcı madde içerikli kırmızı atık sulardan izole ettikleri *Bacillus* sp. YRE1 suşunu kömür granülleri ve polistiren film üzerine immobilize ederek TNT degradasyon yeteneği araştırılmıştır. pH, sıcaklık ve sürfaktanların degradasyon üzerine etkisi araştırılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için farklı pH (7, 7.4, 8 ve 8.5) ve sıcaklık (30°C, 37°C ve 50°C) parametreleri ve sürfaktanlar (Tween 20 ve 80) kullanılarak 50 ppm TNT içeren minimal besiyerinde 168 saat 150 rpm'de sürdürülen çalışmada TNT degradasyonu 262 nm'de örneklerin absorbanlarının ölçülmesi ile incelenmiştir. Kömür ve polistiren uygulamalarının her ikisinde de maximum degradasyon 37°C'de görülmüştür. Sırasıyla %73.35 ve %70.58 olarak TNT degradasyon verimi belirlenmiştir. Kömür immobilizasyonunda maksimum degradasyon pH 7'de %93.81 iken polistirende pH 5'te %94 düzeyinde gözlenmiştir. Sürfaktan olarak Tween 20 varlığında kömür immobilize hücrelerde TNT'de %96 azalma gözlenmesine karşın polistirende bu oran %87.77 seviyelerinde kalmıştır.

TNT ile kirlenmiş topraklardan izole edilen *Claviabacter agropyi* ve *Sphingomonas sanguinis* bakterileri tek nitrojen kaynağı olarak 100 µg/ml TNT ile zenginleştirilmiş minimal besiyerinde 30°C'de 150 rpm'de 7 gün inkübasyona bırakılarak degradasyon yetenekleri incelenmiştir. İnkübasyon periyodu boyunca degradasyon belli aralıklarla alınan örneklerden besiyerindeki nitrit miktarının ve GC analizleri ile TNT'nin azalışının belirlenmesi şeklinde takip edilmiştir. Her iki bakterinin degradasyon kültürlerinde nitrit çıkışı gözlenmiş olup degradasyon ürünleri GC-MS analizleri yapılarak p-toluidin,3,5-dinitro, benzenamin, 2-metil-3,5-dinitro, 2-ADNT ve 4-ADNT şeklinde tanımlanmıştır (Rahal ve Moussa, 2011).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT)

Milli Savunma Bakanlığı'nın izni ile Makine ve Kimya Endüstrisi Kurumu Barutsan Roket ve Patlayıcı Fabrikası Müdürlüğü'nden %100 saflıkta, 60 g TNT, sarı renkli pullar şeklinde temin edilmiştir (Şekil 3.1). Biyodegradasyon çalışmalarında ve analitik analizlerde referans olarak kullanılan bu materyalin özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. TNT'nin katı haldeki görünümü

Çizelge 3.1. TNT'nin özellikleri

TNT'nin Özellikleri	
Cas Numarası	: 118-96-7
EC İndeks Numarası	: 609-008-00-4
Moleküler Ağırlığı	: 227.133 g/mol
Fiziksel durumu	: Katı ve sarı pullar
Saflığı	: %100
Suda çözülebilirliği	: Suda çözülmez (20°C)
Kaynama Noktası	: 240°C
Donma Noktası	: 80.2°C - 80.6°C


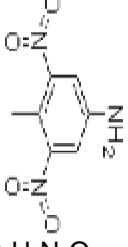
3.1.2. Toprak Örnekleri

2,4,6-trinitrotolueni degrade etme yeteneğine sahip mikroorganizmaların izole edilmesi amacıyla bu materyal ile kontamine olduğu düşünülen NATO Karargahı patlayıcı madde analiz birimi ve Kilis-Suriye sınır bölgesinden (I. Bölge: 117-118 Kule; II. Bölge: 112-113 Kule ve III. Bölge: Saatli köy) alınan toprak örnekleri kullanılmıştır.

3.1.3. Parçalanma Ürünlerinin Standartları

Çalışmada kullanılan TNT'nin biyolojik parçalanma ürünlerinin analitik analizler ile takip edilebilmesi için 2,4-DNT ve 4-ADNT standartları 1000 µg/mL asetonitrilde çözülmüş şekilde 1 mL'lik koyu renkli ampüller içerisinde Sigma-Aldrich'den sağlanmıştır. Standartların özellikleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

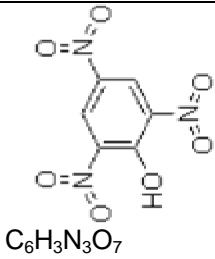
Çizelge 3.2. Parçalanma ürünlerinin özellikleri (USACHPMM, 2005; EPA, 2008)

Ürünün Ticari Adı	Kimyasal Adı	Moleküler Ağırlığı g/mol	Moleküler Formülü	Kaynama Noktası °C
2,4-DNT	2,4-dinitrotoluen	182.13	 C ₇ H ₆ N ₂ O ₄	250–300
4-ADNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen	197.15	 C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	382.6

3.1.4. Pikrik asit (2,4,6-Trinitrofenol)

Bakteri izolasyonu aşamasında bakterilerin nitroaromatik bileşikleri parçalama kabiliyetlerinin araştırılması için minimal besi ortamına eklenmiştir. Pikrik asitin özellikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Pikrik asitin özellikleri (Qasim ve ark, 2007)

Ürünün Ticari Adı	Kimyasal Adı	Moleküler Ağırlığı g/mol	Moleküler Formülü	Kaynama Noktası °C
Pikrik asit	2,4,6-Trinitrofenol	229.10	 C ₆ H ₃ N ₃ O ₇	> 300 C

3.1.5. Besiyerleri

3.1.5.1. Pikrik Asit İçerikli Minimal Besiyeri

Toprak örneklerinden nitroaromatik bileşikleri parçalayabilen izolatların tespiti amacıyla kullanılmıştır (Rajan ve ark, 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.6
K ₂ HPO ₄	1.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
Maya özütü	0.5 (mg/mL)
İz element solüsyonu	10 mL
Agar	15

Stok iz element solüsyonu

<u>Bilesimi</u>	<u>mg/100mL</u>
MgCl ₂	2000
CaCl ₂ .2H ₂ O	400
NaMoO ₄ .2H ₂ O	150
MnCl ₂ .4H ₂ O	80
FeCl ₃ .6H ₂ O	50

pH'sı 7.2±0.1'e ayarlanıp 121°C'de 15 dakika steril edilen bu besiyeri oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra pikrik asitin sulu stok çözeltisinden son hacim 100 mg/L olacak şekilde eklenerek hazırlanmıştır.

Pikrik asit stok çözeltisi: Steril distile su ile pH'sı 7.5±0.1'e ayarlanan ve 0.45µm por çaplı millipore selüloz filtreler ile steril edilmiş 1000 mg/L pikrik asit stok çözeltisi gerektiğinde kullanılmak üzere koyu renkli şişelerde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.5.2. Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP)

Degradasyon çalışmalarında kullanılan *Pseudomonas* sp. bakterisinin izolasyonu amacıyla kullanılmıştır (Akoğlu, 2006).

<u>Bilesimi</u>	<u>g/L</u>
Sodyum L(+)-glutamate	10
Nişasta	20
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Fenol kırmızısı	0.36
Agar	15

İçeriği hazır olan bu besiyeri kullanılacak miktarda distile suda çözülüp 121°C'de 15 dak. steril edilerek petri kutularına dökülmüştür.

3.1.5.3. Plate Count Agar (PCA)

Biyodegradasyon sürecinde minimal besi ortamındaki mililitrede koloni oluşturan birim (Colony Forming Unit, CFU/mL) olarak bakteri sayımının yapılması amacıyla hazırlanmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Kazein peptonu	5
Maya özütü	2.5
Glikoz	1
Agar	14

İçeriği hazır olan bu besiyeri kullanılacak miktarda distile suda çözülüp 121°C'de 15 dak. steril edilerek petri kutularına dökülmüştür.

3.1.5.4. Nutrient Agar (NA)

Bakterilerin saf kültür şeklinde stoklanması amacıyla kullanılmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Et peptonu	5
Et özütü	5
Agar	12

İçeriği hazır olan bu besiyeri kullanılacak miktarda distile suda çözülüp 121°C'de 15 dak. steril edilerek petri kutularına dökülmüştür.

3.1.5.5. Tryptic Soy Agar (TSA)

VITEK II Bakteri tanılama sistemi ile bakterilerin tanımlanması aşamasında bakterilerin taze kültür şeklinde üretilmesi amacıyla kullanılmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Kazein peptonu	15
Soya peptonu	5
NaCl	5
Agar	15

İçeriği hazır olan bu besiyeri kullanılacak miktarda distile suda çözülüp 121°C'de 15 dak. steril edilerek petri kutularına dökülmüştür.

3.1.5.6. Nitrat Buyyon

Biyodegradasyon çalışmaları sırasında kullanılacak bakterilerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Sürücüoğlu, 2003).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
NaNO ₃	0.8
KH ₂ PO ₄	1.17
Na ₂ HPO ₄	1.93

pH'sı 7.0±0.1'e ayarlanıp 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.5.7. Ön Üretim Besiyeri

Bakterilerin degradasyon besi ortamına inoküle edilmeden önce üretilmeleri amacıyla kullanılmıştır (Tope ve ark, 1999).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Et özütü	10
Et peptonu	10
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2

pH'sı 7.2 ± 0.1 'e ayarlanıp 121°C ' de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.5.8. Minimal Besiyeri

İçeriğine son hacim 50 ve 75 ppm olacak şekilde stok TNT çözeltisinden eklenerek hazırlanan besiyeri, bakterilerin TNT üzerindeki parçalama yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla biyodegradasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Tope ve ark, (1999) tarafından kullanılan bu besiyerine maya özütü eklenerek modifiye edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
K_2HPO_4	6.18
KH_2PO_4	1.93
Maya özütü	1

pH'sı 7.2 ± 0.2 'ye ayarlanıp 121°C 'de 1,2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası besiyeri oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra TNT eklenmiştir.

3.1.6. Çözeltiler ve Ayıraçlar:

3.1.6.1. TNT Stok Çözeltisi

1000 mg/L olacak şekilde aseton içerisinde çözülerek hazırlanan bu çözelti kullanılana kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de koyu renkli şişelerde saklanmıştır (French ve ark, 1998; Tope ve ark, 1999).

3.1.6.2. 50mM Potasyum Fosfat Tamponu

Bakterilerin biyodegradasyon ortamına inoküle edilmeden önce besiyeri kalıntılarından arındırılması ve bakteri yoğunluğunun ayarlanması amacıyla kullanılmıştır (Seth-Smith, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
K ₂ HPO ₄	6.18
KH ₂ PO ₄	1.93

pH'sı 7.3±0.1'e ayarlanıp 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.6.3. Griess-Illosvay Ayıracı

NO₂ oluşumunun kolorimetrik olarak belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu ayıraç aşağıda verilen A ve B ayıraçlarından oluşmaktadır (Vikesland ve ark, 2007).

A ayıracı: 0.5 g sülfanilamid 100 mL 2.4 M HCl içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

B ayıracı: 0.3 g N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit 100 mL 0.12 M HCl içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. Ayıraçlar koyu renkli şişelerde +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir

3.1.6.4. Renklendirme Çözeltisi

Biyodegradasyon sürecinde TNT'nin degradasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan NO₂ iyonun spektrofotometrik analizlerinin yapılması için kullanılmıştır. Çözelti I ve II'den oluşmaktadır (Nyanhongo ve ark, 2006).

Çözelti I: 26 mL HCl içerisinde 5g. sülfanilamid çözülerek son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Çözelti II: 0.5 g N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit 500 mL distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır. Çözeltiler koyu renkli şişelerde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.6.5. Standart Nitrit Çözeltisi

Biyodegradasyon ortamında TNT'nin aromatik halka redüksiyonu sonucu ortamda biriken NO₂ iyon miktarının spektrofotometrik analizi için gerekli kalibrasyon eğrisinin çizilmesi amacıyla hazırlanmıştır. 0.75 g NaNO₃ 1 L distile

suda çözülerek stok nitrit çözeltisi hazırlanmıştır (500 µg nitrit/mL). Stok çözeltiden 1 mL alınıp 1 L distile suya tamamlanarak standart nitrit solüsyonu hazırlanmıştır (0.5 µg nitrit/mL) (Jecfa, 1995).

3.1.6.6. Standart Nitrat Çözeltisi

Degradasyon sürecinde zamana bağlı olarak artış gösteren nitrit iyonlarının nitrat iyonlarına oksidasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanılan bu çözelti 0.7218 g KNO₃'ün 1 L distile suda çözünerek elde edilen stok nitrat çözeltisinden (100 µg nitrat/mL) 100 mL alınıp 1 L distile suya tamamlanarak hazırlanmıştır (10 µg nitrat/mL) (Al-Absi, 2008).

3.1.6.7. %5 KOH Çözeltisi

İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında TNT ve parçalanma ürünlerinin renklendirilmesi amacıyla 1:1 oranında distile su - etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır Nam, (1997) tarafından bildirilen bu çözelti tarafımızdan modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.1.6.8. Higg's Griess Ayırıcı

A ve B olmak üzere iki solüsyondan oluşan bu ayırıcı plakaların renklendirmesi için kullanılmıştır. Solüsyonlar koyu renkli şişelerde +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Nam, 1997).

A solüsyonu: 20 mg N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit 100 mL 0.1N'lik HCl içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

B solüsyonu: 200 mg sülfanilik asit 100 mL 2N'lik HCl içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. A ve B solüsyonları kullanılmadan önce eşit hacimlerde karıştırılarak plakaların üzerine püskürtülmesi ile maddelerin boyanması sağlanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Toprak Örneklerinde TNT Varlığının Belirlenmesi

NATO ve Kilis bölgelerinden alınan toprak örneklerinin 20 gramına %96'lık 100 mL aseton ilave edilerek en az 10 dakika süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında bekletilerek toprağın çökmesi sağlanmıştır. Toprak ekstraktlardan alınan 25 mL üst faza 0,2 g KOH ve 0,2 g sodyum sülfid eklenerek karışımın kimyasallarla muamelesi için 1-5 dakika sonikasyonda (Bandelin Sonorex) bekletilmiştir. Sonikasyon sırasında toprakta TNT'ye yönelik bir kirliliğin varlığı, ekstraktta menekşeden-kırmızıya kadar değişen renk oluşumu ile belirlenmiştir. Kolorimetrik olarak nitroaromatik kökenli patlayıcı madde kirliliği belirlenen toprak örnekleri bakteri izolasyonu için kullanılmıştır (Üzer, 2004).

3.2.2. HPLC Analizleri İçin Toprak Örneklerinin Ekstraksiyonu

Kolorimetrik yöntem sonucu renklendirmeye bağlı olarak TNT kirliliği saptanan toprak örneklerindeki kirlilik miktarının HPLC analizleri ile belirlenebilmesi için 1 g toprak örneğine 9 mL asetonitril ilave edilerek oluşan süspansiyon 1 dakika vorteks kullanılarak karıştırılmıştır. Teflon kapaklı koyu renkli şişelere alınan karışımlar 18 saat süresince sonikatörde bekletilerek toprakların ekstraksiyonu sağlanmıştır. Toprak örneklerinin çöktürülmesi için ekstraksiyon sonrası örnekler oda sıcaklığında 30 dakika dinlendirilmiştir. Durulmuş çözeltilerin üst fazının 1 mL'sine 1 mL CaCl₂ (5 g/L) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 15 dak. dinlendirilen bu karışım 9000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj (Sigma 2-16K model) edilmiştir. Santrifüjü takiben alınan üst faz 1.5 mL'lik teflon kapaklı koyu renkli viyallere aktarılarak HPLC analizleri için +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Schuster ve Gratzfeld-Huesgen, 1993; Boopathy, 2000; Fallahi ve ark, 2007).

3.2.3. Bakteri İzolasyonu

1. Toprak örneklerine doğal bir nitroaromatik bileşik olan pikrik asit ilave edilerek nitroaromatik kirlilik düzeyi arttırılmıştır.

2. Her 100 mL'lik minimal besiyerine 1 g toprak örneği eklenerek 30°C'de 180 rpm'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3. 3 periyot şeklinde her 72 saatlik inkübasyon sonunda besi ortamında pikrik asitten kaynaklı sarı rengin turuncuya dönüşüp dönüşmediği gözlenmiştir.

4. Biyolojik parçalanmaya yönelik renk değişimi belirlenmiş kültürlerden %5'lik inokülüm taze minimal besiyerine aktarılarak aynı işlem tekrarlanmıştır.

5. 72 saat sonunda kültürlerden alınan örnekler 10^{-10} sulandırma katsayısından aynı minimal besiyeri içeriğine %1.5-2 agar eklenerek hazırlanmış petri kutularına yayma ekim yapılmıştır.

6. 30°C'de 1-5 gün arası inkübasyona bırakılan plaklardan turuncu-kahverengi koloniler seçilmiştir (Behrend ve Hessche-Wagner, 1999).

Pseudomonas cinsi bakterilerin izolasyonu için;

1. 1 g toprak örneği 9 mL saf su içerisinde homojenize edilerek 30 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2. Homojenizatın 1 mL'si 10^{-3} ve 10^{-5} sulandırma yapılarak GSP agara yayma ekim yapılmıştır.

3. 28°C'de 3 gün inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyon süresi sonunda 2-3 mm çaplı sarı renkli ve etrafı sarı zonlu koloniler *Aeromonas* sp., yine 2-3 mm çaplı kırmızı ve etrafı kırmızı zonlu koloniler *Pseudomonas* sp., olarak değerlendirilmiştir (Akoğlu, 2006).

3.2.4. İzolat Seçimi

İzole edilmiş mikroorganizmalardan biyodegradasyon çalışmalarında kullanılacakların belirlenmesi amacıyla nitrat redüksiyon testi yapılmıştır. Bunun için 2 mL nitrat buyyon içeren tüplere stok katı kültürlerden inoküle edilerek 37°C'de 2

saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplere sırasıyla 100 µL konsantre HCl, %0.2'lik 200 µL sülfanilamid çözeltisi, %0.1'lik 200 µL *N*-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit eklenerek oda sıcaklığında 5 dak. bekletilen örneklerde pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Renk tonuna göre tüpler + ve – şeklinde değerlendirilmeye alınmıştır (Sürücüoğlu, 2003).

3.2.5. Bakterilerin Tanımlanması

VITEK II Bakteri tanılama sistem kullanılarak yapılan tanılama çalışmalarında bakterilerin stok saf kültürlerinden alınan örneklerden TSA agara yayma ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden pH'sı 4.5-7.0 arasına ayarlanmış steril 3 mL %0.45-0.50 NaCl çözeltisi içerisinde süspansiyonları hazırlanmıştır. *Bacillus* cinsi bakteriler için MacFarland bulanıklığı 1.8-2.2; Gr (-) bakteriler için ise bu değer 0.5-0.63 arasına ayarlanmıştır. Bakterilerin Gram boyamaya karşı verdikleri reaksiyona göre uygun VITEK kitleri seçilerek örnekler tanımlanmak üzere cihaza yüklenmiştir.

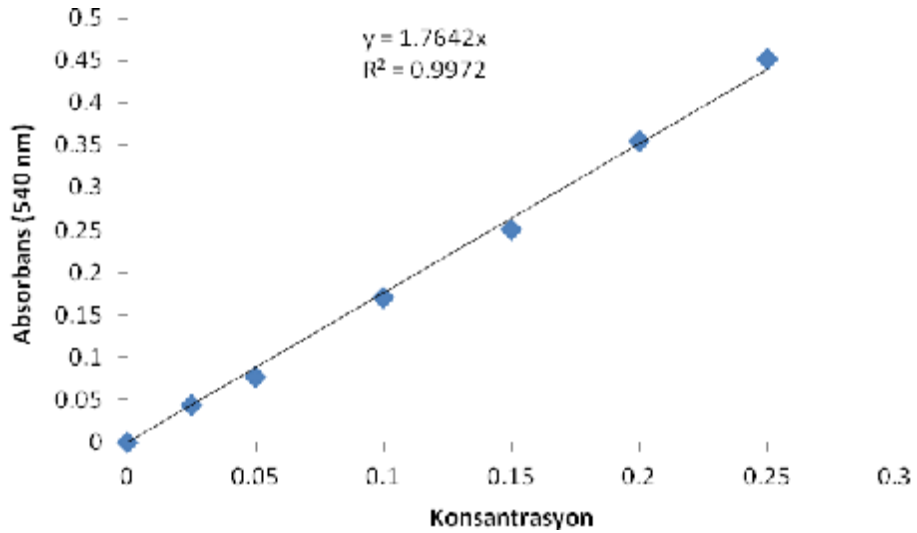
3.2.6. TNT Toleransının Belirlenmesi

Biyodegradasyon çalışmasında kullanılan TNT konsantrasyonun belirlenmesi için bakteriler artan konsantrasyonlarda TNT (0, 5, 10, 15, 30, 50, 75 ve 100 ppm) içeren 5 mL'lik minimal besiyerine inoküle edilerek 24 saat inkübe edilmişlerdir. Sıvı besiyerindeki bulanık ve 0, 12 ve 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden alınan örneklerde nitrit oluşumuna göre bakterilerin tolere edebilecekleri TNT konsantrasyonu belirlenmiştir. Nitrit testi pembe-mor renk oluşumunun gözlenmesi şeklinde yapılmıştır. (Seth-Smith, 2002).

3.2.7. Nitrit Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Biyodegradasyon çalışmaları sırasında TNT'nin redüksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkabilen nitrit miktarının belirlenmesi için standart nitrit çözeltisi kullanılarak

kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve NO₂ iyonlarının miktarı bu eğri baz alınarak hesaplanmıştır. Eğrinin çizilebilmesi için 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 ve 0.3 mg/L konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. 10 mL renklendirme çözeltisi I'den eklenen örnekler 3 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine renklendirme çözeltisi II'den 1 mL ilave edilerek 100 mL saf suya tamamlanan örnekler iyice karıştırılarak 15 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerdeki nitrit oranı 540 nm dalga boyunda Varian Carry 50 Bio UV-Visible model spektrofotometrede referansa (distile su + renklendirme çözeltisi) karşı okutularak belirlenmiştir. Çalışmalar 3 tekrarlı şekilde yürütülmüştür. Bu değerlere göre nitrit kalibrasyon eğrisi aşağıdaki gibi çizilmiştir (Jecfa, 1995). Şekil 3.1'de nitrit kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

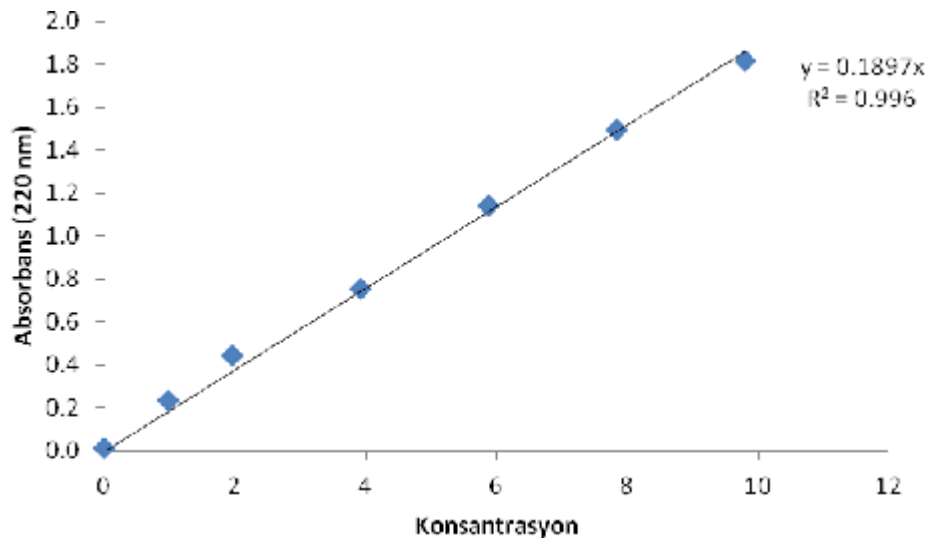


Şekil 3.2. Nitrit kalibrasyon eğrisi

3.2.8. Nitrat Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

Degradasyon çalışmaları sırasında biyodegradasyon sürecinde TNT redüksiyonuna yönelik ortaya çıkan NO₂'nin bakteriler tarafından veya kimyasal bir proses aracılığıyla NO₃ iyonuna oksidasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için örneklerdeki nitrat miktarları ölçülmüştür. Örneklerdeki nitrat miktarlarının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda nitrat içeren standartlar

kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bunun için 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/L konsantrasyonlarda nitrat standartları hazırlanmıştır. Bu çözeltilere 1N'lik HCl çözeltisinden 1 mL eklenerek iyice karıştırılmıştır. Bu sölüsyonlardaki nitrat miktarı 220 nm'de UV-Vıssıble Spektrofotometrede referansa (nitrat içermeyen distile su + 1 mL 1 N'lik HCl çözeltisi) karşı okutularak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Al-Absi, 2008). Şekil 3.2'de nitrat kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Aynı işlemler biyodegradasyon ortamından alınan örneklere de uygulanmıştır.



Şekil 3.3. Nitrat kalibrasyon eğrisi

3.2.9. Biyodegradasyon Ortamının Hazırlanması

50 mL'lik ön üretim besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu takiben gelişen biyomas 450 mL ön üretim besiyerine inoküle edilmiş, son hacim 500 mL'ye tamamlanarak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonu takiben 8500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilen örnekler 50 mM potasyum fosfat tamponu ile 2 kez yıkanarak besi ortamının kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Aynı tampon kullanılarak süspanse edilmiş örnekler degradasyon ortamında kullanılan konsantrasyonun 1/2'sini içeren 500 mL'lik minimal besiyerine %10 oranında inoküle edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 8500 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Çökelti potasyum fosfat tamponu ile 2 kez yıkanarak optik

yoğunlukları 4.8 ± 0.2 'ye ayarlanmıştır. % 10 oranında bakteri inoküle edilen, 50 ve 75 mg/L konsantrasyonlarda TNT içeren ve 2 L'lik şişelerde başlangıç hacmi 500 mL olan minimal besiyerleri biyodegradasyon ortamı olarak kabul edilmiştir (Tope ve ark, 1999). Şekil 3.4'te biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan deney ortamları (96.saat) verilmiştir.



Şekil 3.4. Biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan deney ortamları (96.saat)

3.2.10. Abiyotik Degradasyon Çalışmaları

Bakteriyel biyodegradasyon uygulamalarına eş zamanlı olarak aynı koşullarda 50 ve 75 ppm konsantrasyonlarda TNT içeren degradasyon ortamlarında abiyotik çalışmalar sürdürülmüştür. Bu çalışmalar 0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örnekler ile nitrit, nitrat ve HPLC analizi; 0 ve 96. saatlerden alınan örneklerden de GC-MS ve TLC analizleri yapılarak sürdürülmüştür. Şekil 3.5'de abiyotik degradasyon ortamları verilmiştir (I: 50 ppm TNT içeren abiyotik; II: 75 ppm TNT içeren abiyotik ortam).



Şekil 3.5. Abiyotik degradasyon ortamı (96. Saat)

3.2.11. Biyodegradasyon Ortamlarının pH Kontrollerinin Yapılması

TNT degradasyonu süresince pH değişiminin belirlenebilmesi için degradasyon ortamlarından belirli aralıklarla (0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat) alınan örnekler 8500 rpm'de +4°C'de 1 saat santrifüj edilmiş ve sulu fazın pH'sı ölçülerek kontrol edilmiştir.

3.2.12. Reaksiyon Ürünlerinin İzolasyonu

0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde biyodegradasyon ortamından steril falkon tüplerine alınan 50 mL'lik örnekler 8500 rpm'de +4°C'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Bu örneklerin 20 mL'si ortamdaki TNT ve redüksiyona bağlı olarak oluşan metabolitlerin HPLC, GC-MS ve TLC analizlerinin yapılması için ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon için örneğin her 1 mL'sine 160 µL 1N'lik HCl çözeltisinden eklenmiş ve iyice karıştırılarak ayırma hunisine alınmış süspansiyon, iki kez eşit hacimlerde etil asetat ile yıkanmış ve üst fazlar (etil asetat faz) toplanmıştır. Etil asetat fazı susuz NaSO₄ içeren cam kolonlardan geçirilerek suyundan uzaklaştırılmış ve rotary evaporatörde (Heidoph) vakum altında 35°C sıcaklıkta etil asetat

uçurularak örnekler yoğunlaştırılmıştır. Cam balonun yüzeyine yapışmış halde bulunan örnekler 1 mL asetone ile muamele edilmiştir. Elüsyonu tamamlanmış örnekler 1.5 mL'lik teflon kapaklı koyu renkli viyallerde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Schackmann ve Müller, 1991; Tope ve ark, 1999)

3.2.13. Bakteri Gelişiminin İzlenmesi

Bakteriyel biyodegradasyon çalışmalarında TNT içeren ve içermeyen minimal besiyerindeki bakteri gelişimi PCA'ya yayma ekim yapılarak (10^{-5}) mililitrede koloni oluşturan birim sayılması ve hücre yoğunluğunun 600 nm'deki absorbans değerlerine bakılarak iki şekilde takip edilmiştir. Biyodegradasyonun 0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda minimal besi ortamından steril ependorf tüplerine alınan 1 mL'lik örnekler 10000 rpm'de 30 dak. +4°C'de santrifüj edilmiştir. Üzerine 1 mL distile su eklenen çökeltiler vorteks ile karıştırılarak (VWR International) süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 10000 rpm'de 10 dak. +4°C'de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu işlemler 2 kez tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlanmıştır. 1 mL distile su içerisinde süspansiyon hale getirilen çökeltinin yoğunluğu UV visible spektrofotometrede distile su referansına karşı okunmuştur.

3.2.14. Analitik Analizler

3.2.14.1. Spektrofotometri

Biyodegradasyon ortamından reaksiyon ürünlerinin izolasyonu için santrifüj edilmiş 50 mL'lik örneğin 10 mL'si TNT'nin aromatik halkasındaki nitro grupların yapıdan ayrılması sonucu ortamda biriken nitrit iyonlarının varlığı ve nitritin kimyasal yada mikrobiyolojik proseslerle nitrata oksidasyonu renklendirme ayraçları kullanılarak spektrofotometrik analizler ile kontrol edilmiştir.

Nitrit analizleri için 200 µL örneğe 50 µL renklendirme çözeltisi I'den eklenip 5 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tüplere 50 µL renklendirme çözeltisi II'den ilave edilerek 20 dak. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 700µL saf

su eklenerek UV visible spektrofotometrede 540 nm’de referansa karşı okunmuştur, referans olarak başlangıç degradasyon ortamı kullanılmıştır (Behrend ve Heesche-Wagner, 1999).

Nitrat analizi için 5 mL’lik örneğe 1 mL 1N’lik HCl çözeltisinden ilave edilerek iyice karıştırılmış ve UV visible spektrofotometrede 220 nm’de referansa karşı okunmuştur, referans olarak başlangıç degradasyon ortamı kullanılmıştır (Al-Absi, 2008).

Her iki spektrofotometrik yöntemdeki okumalar 3 tekrar şeklinde yapılmıştır. Abiyotik ortamlardaki nitrit ve nitrat miktarlarının da, aynı yöntemlerle spektrofotometrik analizleri yapılarak biyolojik ve kimyasal degradasyon proseslerindeki nitrit ve nitrat oluşumunun farklılığı belirlenmiştir.

3.2.14.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bakteriyel biyodegradasyon çalışmaları süresince abiyotik ortam ve bakteriyel kültürlerden ekstrakte edilmiş örneklerdeki TNT miktarının zamana bağlı olarak değişimi HPLC analizi yapılarak takip edilmiştir. Boopathy ve ark (1994), tarafından rapor edilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. TNT standardı kullanılarak kalibre edilmiş HPLC’nin çalışma koşulları ve elüsyon programı Çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC çalışma koşulları ve izokratik elüsyon programı

HPLC Çalışma Koşulları	
Model	: Shimadzu
Kolon	: C18
Dedektör	: UV visible
Hareketli faz	: A: Asetonitril (% 21) B: Metanol (% 35) C: Ultra saf su (% 44)
Dedeksiyon	: 254 nm
Akış hızı	: 0.7 mL/min
Enjeksiyon miktarı	: 20 µL
Analiz süresi	: 15 dakika
Kolon sıcaklığı	: 30°C

3.2.14.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS)

TNT'nin bakteriyel biyodegradasyonu sırasında kültürlerde biriken parçalanma ürünlerinin tanımlanması GC-MS kullanılarak yapılmıştır. Oh ve Kim (1998), tarafından uygulanan metod modifiye edilerek GC-MS analizleri sürdürülmüştür. Bu uygulamayla birlikte örneklerin Çizelge 3.5'de verilen çalışma programı doğrultusunda GC-MS analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.5. GC-MS çalışma prosedürü

GC-MS Çalışma Prosedürü	
Cihaz	: Thermo Scientific
Taşıyıcı gaz	: Helyum
Kolon özellikleri	: 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm ID (TR5MS)
Enjeksiyon sıcaklığı	: 240°C
Sıcaklık programı	: 80°C' de 1 dakika bekletilir. Dakikada 10°C artışla 300°C' ye çıkartılır. Burada 12 dakika bekletilir.
Akış hızı	: 1 mL/dakika
Enjeksiyon miktarı	: 1 µL
Analiz süresi	: 35 dakika
İyonizasyon	: Elektron impakt 70 (eV)
Enjeksiyon tipi	: Split oranı 1/50

3.2.14.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Degradasyon ortamlarındaki parçalanma ürünleri ve ortamda kalan TNT'nin saptanması için TLC analizleri yapılmıştır. Bunun için 5x10 cm uzunluğunda UV absorbansına sahip silika jel ile kaplı hazır cam plakalar (silica gel 60 F₂₅₄) kullanılmıştır. Plakanın alt ucundan 0.8 cm yüksekte olacak şekilde kapiller cam borular yardımı ile silika jele örnekler emdirilerek ince tabaka kromatografiye hazırlanmıştır. Tabakaya uygun kromatografi tankı 2 cm yüksekliği geçmeyecek şekilde hareketli faz olarak kullanılan etil asetat:heksan (2:3) karışımı ile doyurulmuştur. Hazırlanan ince tabaka tanka yatay olarak yerleştirildikten sonra hareketli fazın tabakada yükselmesi izlenmiştir. Yükselen çözücü üst uca 1 cm yaklaşınca tabaka tanktan çıkarılmıştır.

Plakalar boyama işlemi öncesinde UV ışığı transilluminatör (VILBER) altında incelenerek örneklerdeki lekelenmeler işaretlenmiştir.

Örneğin belirli bir yürütücü faz içerisinde ince tabaka plakaları üzerinde katettiği mesafe olarak tanımlanan alıkonma faktörü (Rf) numune uygulama çizgisi ve yükselmiş leke merkezi arasındaki uzaklığın, çözücü yükselmesinin ve numune uygulama çizgisi arasındaki uzaklığa oranlanması ile hesaplanmıştır.

Buna göre referans ürünlerinin oluşturduğu lekelenmelerin Rf değerleri ile karışımlardaki metabolitlerin Rf değerleri karşılaştırılarak parçalanma ürünleri tanımlanmaya çalışılmıştır.

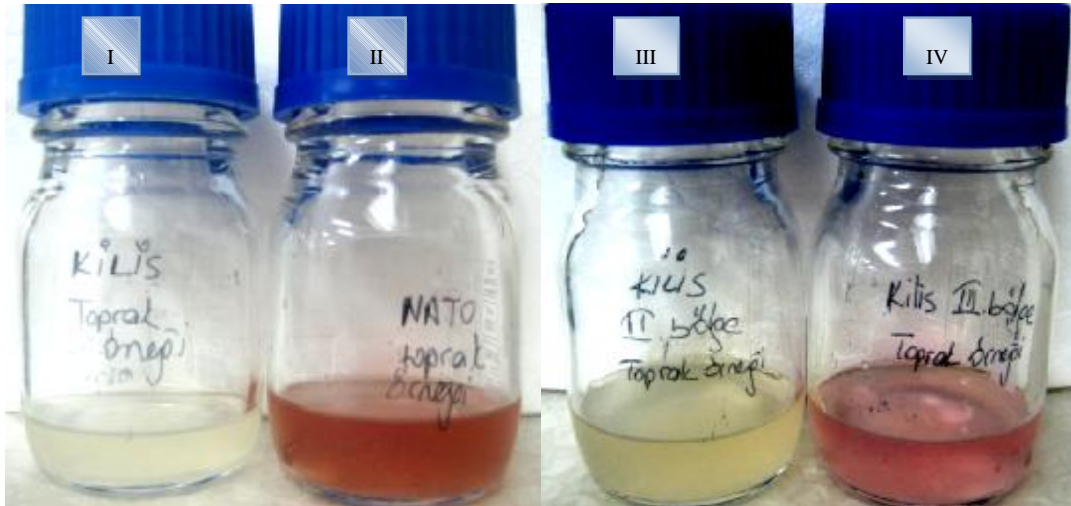
Saç kurutma makinesi kullanılarak kuru sıcak hava ile kurutulmuş plakaların üzerine sırasıyla %5KOH çözeltisi ve Higg's Griess ayracı püskürtülerek boyanmıştır (Nam, 1997).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toprak Örneklerindeki TNT Kirliliğın Kolorimetrik Analizi:

TNT ile kirlenmiş toprak örneklerinin kolorimetrik analizleri, bu komponentin alkali hidroksitler ile reaksiyona girerek ekstraktın rengini menekşeden kırmızıya kadar değiştirebilen Meisenheimer anyonunu oluşturması temeline dayanmaktadır. Çalışmamızda reaksiyon hızlandırıcı olarak sodyum sülfid kullanılmış ve renk değişiminin kararlılığını sağlamak için toprak örnekleri asetonla ekstrakte edilmiştir (Üzer, 2004).

NATO karargahından alınan bir ve Kilis-Suriye sınır bölgesinden alınan üç adet toprak örneğinin kolorimetrik analizleri yapılarak TNT kirliliğı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre NATO karargahı toprak örneğinde koyu kırmızı; Kilis-Suriye sınır bölgelerinden alınan toprak örneklerinin yalnızca bir tanesinde (Kilis III. Bölge) menekşe renk oluşumu görülerek TNT kirliliğı belirlenmiştir. Bu toprak örneklerine ait renk değişimi Şekil 4.1’de verilmiştir (I: Kilis I. Bölge, II: NATO karargahı, III: Kilis II. Bölge, IV: Kilis III. Bölge).

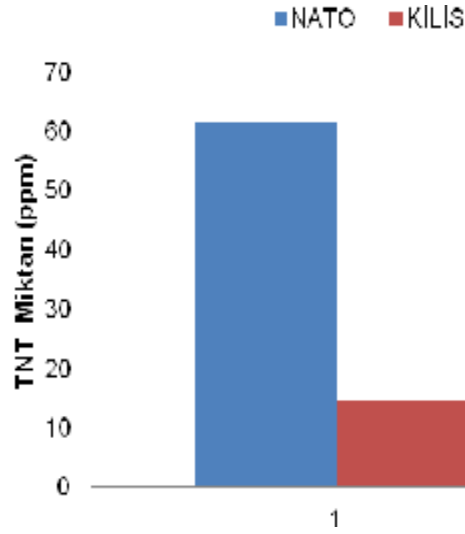


Şekil 4.1. Toprak örneklerinin kolorimetrik analiz sonucu renk değişimi

NATO ve Kilis III. Bölge toprak örnekleri TNT'nin biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan bakteri izolasyonları için materyal olarak kullanılmıştır.

4.2. Toprak Örneklerindeki TNT Varlığının HPLC İle Tespiti

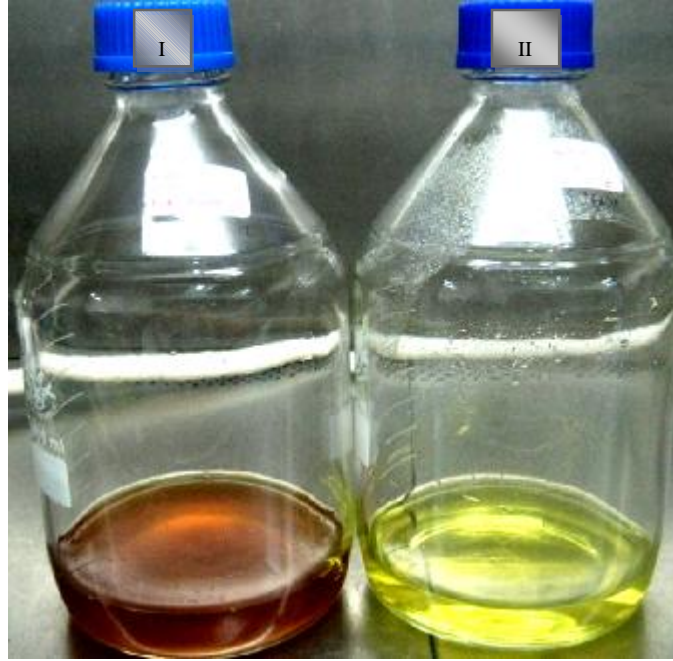
Toprak ekstraktlarındaki TNT miktarı HPLC analizleri yapılarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda NATO ve Kilis toprak örneklerinde sırasıyla 61.35 ve 14.61 ppm TNT varlığı saptanmıştır. Toprak örneklerindeki TNT miktarı Şekil 4.2'de verilmiştir.



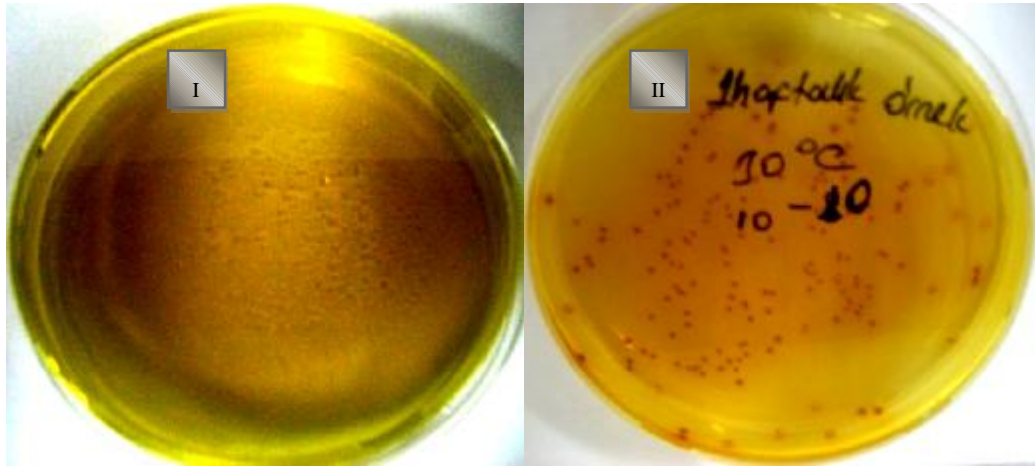
Şekil 4.2. Toprak örneklerindeki TNT miktarı

4.3. Bakteri İzolasyonu

Pikrik asit içerikli minimal besi ortamında biyolojik parçalanma sonucunda oluşan renk değişimine yönelik yürütülen, izolasyon çalışmaları sırasında sıvı ve katı kültürlerle ait renk farklılıkları Şekil 4.3 (I: Pikrik asit içerikli minimal besiyeri + %5 inokülüm, II: Kontrol grubu) ve Şekil 4.4 (I: Ekim yapılmamış plak, II: 2. periyot sonunda inoküle edilen plak)'de verilmiştir. Katı besiyerinde üreyen bakterilerden etrafı zonlu turuncu-kahverengi koloni morfolojisine sahip olanlar seçilmiştir.



Şekil 4.3. 3. periyot sonunda sıvı kültürdeki renk değişimi



Şekil 4.4. Pikrik asit içerikli minimal besiyerinden seçilen bakteri morfolojisi

Bu izolasyon sonunda Kilis III. Bölgeden 24 adet, NATO karargahından 34 adet bakteri izole edilmiştir. Degradasyon çalışmalarında kullanılmak üzere *Pseudomonas* sp. izolasyonları için her iki toprak örneğinden GSP agara yayma ekim yapılarak inkübasyon sonrası 2-3 mm çaplı, kırmızı ve etrafı kırmızı zonlu koloniler seçilerek 10 adet bakteri izole edilmiştir. Kilis III. Bölge toprak örneğinden GSP agarda koloni oluşumu gözlenmemiştir. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* sp.

NATO karargahı toprak örneğinden izole edilmiştir. Şekil 4.5’de GSP agarda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri verilmiştir.



Şekil 4.5. GSP agardan seçilen koloni morfolojileri

Bu bakterilere nitrat redüksiyon testi uygulanarak degradasyon çalışmalarında kullanılan izolatlar seçilmiştir.

4.4. İzolatların Nitrat Redüksiyon Aktiviteleri

Bakteriler sentezledikleri nitroredüktaz enzimi sayesinde nitrat kaynağı içeren besi ortamlarında nitratı nitrit (NO_2), amonyak (NH_3) ve azot gazı (N_2)’na kadar redükte edebilmektedirler. Bu test kullanılarak izolatlar arasından nitoaromatik patlayıcılar üzerinde etki edecek enzim sistemi içeren suşların seçimi yapılmıştır. Bu nedenle 68 adet izolat nitrat redüksiyon testine tabii tutulmuştur. Şekil 4.6’da renk tonuna göre tüplerin + ve – olarak değerlendirilmesi verilmiştir. Kontrol grubunun renk tonu izolatlarda negatif sonuç olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.6. Nitrat redüksiyon testinin değerlendirilmesi

Bu izolatlara ait nitrat redüksiyon test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Nitrat redüksiyon testinin renk tonuna dayanarak yapılan değerlendirmede pozitif sonuç veren izolatlardan NATO karargahı toprak örneğinden 2 adet, Kilis III. Bölge toprak örneğinden ise 2 adet bakteri TNT biyodegradasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.1. Nitrat redüksiyon test sonuçları

Kilis III. Bölge İzolatları		NATO İzolatları		GSP Agar İzolatları	
Bakteri No	Test Sonuçları	Bakteri No	Test Sonuçları	Bakteri No	Test Sonuçları
1	++	1	++	1	-
2	++	2	++	2	-
3	+++	3	++	3	++
4	-	4	++	4	-
5	-	5	-	5	-
6	++	6	-	6	++
7	+++	7	++	7	-
8	++	8	++	8	-
9	-	9	++	9	+++
10	++	10	++	10	-
11	-	11	++		
12	++	12	++		
13	-	13	++		
14	++	14	++		
15	++	15	-		
16	-	16	-		
17	-	17	-		
18	++	18	-		
19	-	19	++		
20	-	20	++		
21	-	21	-		
22	++	22	++		
23	-	23	++		
24	++	24	-		
		25	++		
		26	++		
		27	++		
		28	++		
		29	++		
		30	+++		
		31	++		
		32	++		
		33	++		
		34	-		

4.5. İzolatların Tanılanması

İzolatların tanılanması için ilk önce Gram boyama yapılmıştır. VITEK II Bakteri tanılama sistemi kullanılarak bakteri tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.2’de bakterilerin tanılama sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Bakterilerin tanılama sonuçları

İzolatlar	İdentifikasyon Sonuçları
AD1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AD2	<i>Enterobacter cloacae</i>
AD3	<i>Bacillus cereus</i>
AD4	<i>Enterobacter cloacae</i>

Pseudomonas aeruginosa, hastane enfeksiyonu nedeni olarak bilinen Gr negatif basil veya kokobasil morfolojisine sahip sporsuz bir bakteridir. Tek uçta bulunan kirpikleri sayesinde hareketlilik özelliği kazanmaktadır. Aerob özellikte olup en iyi üreme sıcaklığı 37°C olmasına karşın 42°C’de de üreme davranışı göstermektedir. Sitrat pozitif, oksidaz pozitif, indol negatif, katalaz pozitif ve üre pozitifler. Bu bakteri besiyerlerinde oluşturduğu piyoverdin (yeşil-sarı) ve piyosiyenin (mavi) pigmenti ile karakterize edilen floresan pigmentler üretmektedir. Glikozu oksidatif yolla parçalayıp asit üretmektedir. Doğada su ve toprakta bulunan bu bakteriler pek çok organik bileşiği degrade edebilme yeteneğine sahiptirler (Ustaçelebi, 1999).

Enterobacter cloacae, *Enterobacter* cinsinde bulunan, seyrek olarak insanlarda hastalık etkeni şeklinde izole edilen, genelde toprak, su, insan ve hayvan barsaklarında, kanalizasyon atıklarında ve sütü ürünlerde bulunan bakteridir. Gr negatif basil morfolojisinde bu bakterilere peritriş kirpikleri hareketlilik kazandırmaktadır. Sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif olup nitratı nitrite indirgemektedirler. Fakültatif anaerob olan bu bakteriler TSİ agarda H₂S oluşturmaz. Bu bakteri IMVIC testinde (-,-,+,+) sonuçlar vermektedir. Laktozu fermente eden bu bakteriler KCN varlığında üreyebilmektedirler (Ustaçelebi, 1999).

Toprakta, suda yaygın olarak bulunan kapsülsüz, hareketli, sporlu ve Gr pozitif olan *Bacillus cereus* toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerinde bulunabildiği gibi sporları sayesinde et ve süt ürünlerini kontamine ederek insanda besin zehirlenmesine neden olmaktadır. Basil morfolojisindeki bu bakteri katalaz pozitif olup fakültatif anaerob karakterdedir. Nitratı nitrite indirgeyen bu bakteriler aynı zamanda glikozu fermente etmektedirler (Ustaçelebi, 1999).

4.6. TNT Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

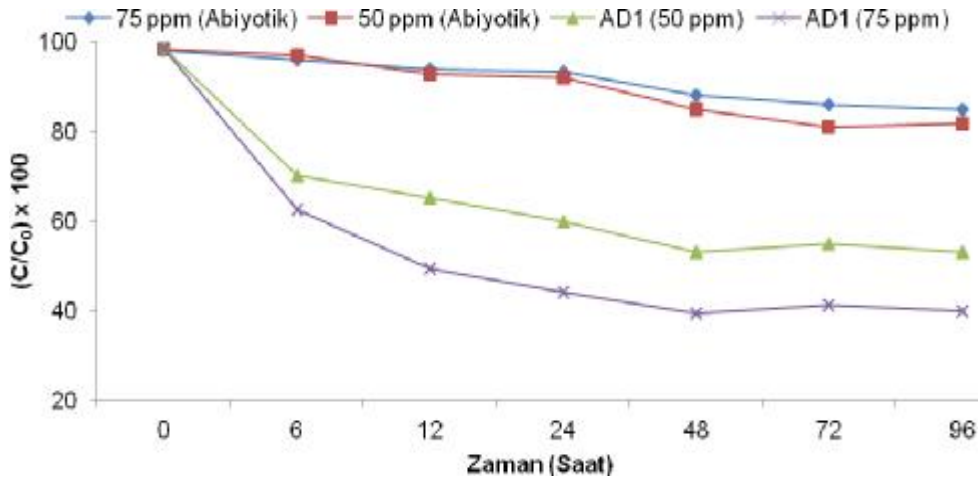
Biyodegradasyon çalışmalarında kullanılan TNT konsantrasyonları bakterilerin artan konsantrasyonlarda TNT (0, 5, 10, 15, 30, 50, 75 ve 100 ppm) içeren minimal besi ortamlarında yapılan TNT tolerans testine göre belirlenmiştir. Bunun için 0, 12 ve 24 saat aralıklarla sıvı ortamdaki bakteri gelişimi ve renklendirme çözeltileri ile nitrit varlığı takip edilmiştir. 100 ppm TNT içeren besi ortamında AD1, AD2, AD3 ve AD4 bakterilerinin gelişim gösteremediği ve bu kültürlerde kimyasal degradasyona bağlı nitrit oluşumu gözlemlendiği belirlenmiştir. 0, 5, 10, 15 ve 30 ppm konsantrasyonda TNT içeren besiyerlerinde ise; AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatları gelişim gösterirken, bu kültürlerde nitrit oluşumu tespit edilememiştir. Buna karşın 50 ve 75 ppm konsantrasyonda TNT içeren kültürlerde tüm izolatlar gelişim gösterirken, sadece AD1 ve AD3 izolatlarına ait kültürlerde nitrit oluşumuna rastlanmıştır. Bu bilgilere dayanarak çalışmada kullanılan konsantrasyonlar 50 ve 75 ppm olarak belirlenmiştir.

4.7. TNT'nin Aerobik Biyodegradasyonu

TNT'nin bakteriyel biyodegradasyon çalışmasında TNT kirliliği içeren topraklardan izole edilen AD1, AD2, AD3 ve AD4 bakterilerinin 50 ve 75 ppm olmak üzere iki farklı TNT konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Batch kültür şeklinde yürütülen bu çalışmada bakterilerin hücre gelişimi OD₆₀₀ ve PCA'da bakteri sayımı şeklinde takip edilmiştir. Biyodegradasyon süresince sıvı ortamdaki TNT azalışının ve ortamda biriken parçalanma ürünlerinin analitik analizlerle belirlenmesi için 0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle alınan örneklerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Biyodegradasyon süresince pH'da meydana gelen değişimler zamana bağlı olarak takip edilmiştir. Yukarıda verilen zaman sürecinde TNT'nin biyolojik ve kimyasal parçalanmasına bağlı olarak ortaya çıkan nitrit miktarı ve nitritin nitrata oksidasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Ekstraktlardaki parçalanma ürünlerinin tanımlanması GC-MS ve TLC analizleri ile yapılmıştır.

4.8. TNT'nin Zamana Bağlı Biyolojik Parçalanabilirliğinin Gözlenmesi

TNT'nin bakteriyel parçalanma çalışmaları tolerans testinin sonuçları doğrultusunda 50 ve 75 ppm olmak üzere iki farklı konsantrasyonda yürütülmüştür. AD1 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. AD1 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi

Abiyotik ortamlardaki TNT'nin zamana bağlı miktar değişimi incelendiğinde 50 ppm TNT içeren ortamda 0. saatte %98 düzeyinde besi ortamında belirlenen TNT'nin 6 ve 12. saat sonundaki azalışı %1 ve %5 iken, ilk 24 saat sonrasında kimyasal degradasyonun hızlandığı ve 48. saat sonunda başlangıca oranla %13 azaldığı gözlenmiştir. 96. saat sonunda TNT kaybının %16 olduğu belirlenmiştir. Bu durum 75 ppm TNT içeren abiyotik ortamda ise ilk 24. saatin sonuna kadar %5 iken, bu saatten sonra hızlı bir kimyasal parçalanma gerçekleşerek toplamda TNT'nin başlangıca oranla %13 azaldığı saptanmıştır.

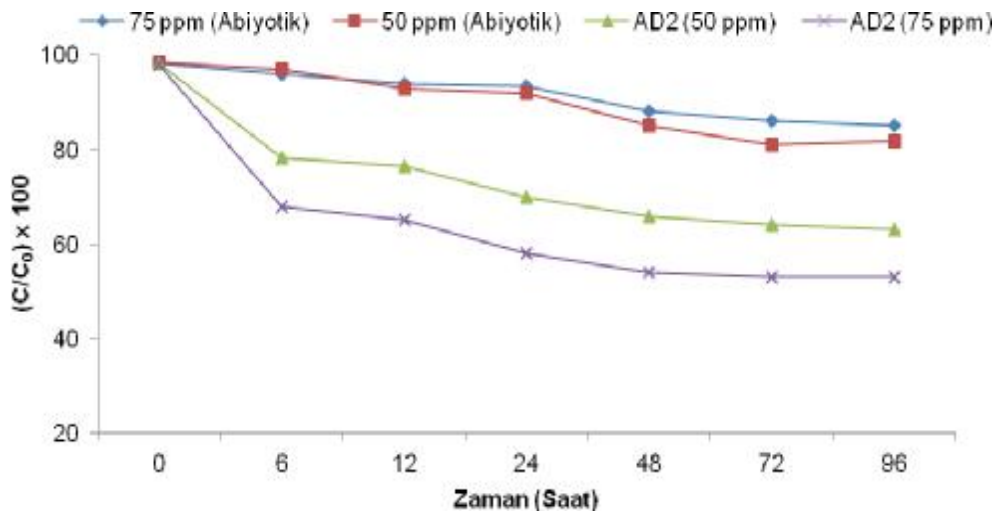
Abiyotik ortamda TNT azalışına yönelik sonuçlarımızı destekler nitelikte çalışmalar rapor edilmiştir. Sembries ve Crawford (1997), tarafından *Clostridium bifermentans*'ın sporları kullanılan çalışmada spor inokülasyonu yapılmamış abiyotik

ortamda TNT azalışı belirlenmiştir. Oh ve ark (2003), tarafından yürütülen çalışmada da TNT'nin kimyasal parçalanması yönünde benzer sonuçlar rapor edilmiştir.

Claus ve ark. (2007), tarafından TNT degradasyon çalışmalarında abiyotik ortam kontrol grubu olarak kullanılmış ve bu kültürde kimyasal parçalanmaya dayalı TNT azalışı tespit edilmiştir. Biyodegradasyon çalışmalarında abiyotik ortamlarda TNT azalışı ile ilgili farklı sonuçlar da bildirilmiştir. Rahal ve Moussa (2011), tarafından yapılan çalışmada bakteri inokülasyonu yapılmamış minimal besi ortamında, 7 günlük inkübasyon süresi boyunca herhangi bir TNT azalışı rapor edilmemiştir.

AD1 izolatına ait kültürlerde ilk 6 saat içerisinde biyolojik degradasyonun başladığı saptanmıştır. Biyolojik parçalanma süreci içerisinde 50 ppm TNT içeren besi ortamında ilk 6. saatin sonunda TNT'nin %29'unun, 75 ppm TNT içeren ortamda ise %36'sının parçalandığı belirlenmiştir 50 ppm TNT içeren ortamda TNT'nin 96. saat sonundaki biyolojik parçalanması %46 düzeyinde saptanırken; 75 ppm TNT içeren ortamda ise AD1 izolatının TNT'nin %59'unu indirgeyerek ortamdaki uzaklaştırdığı belirlenmiştir.

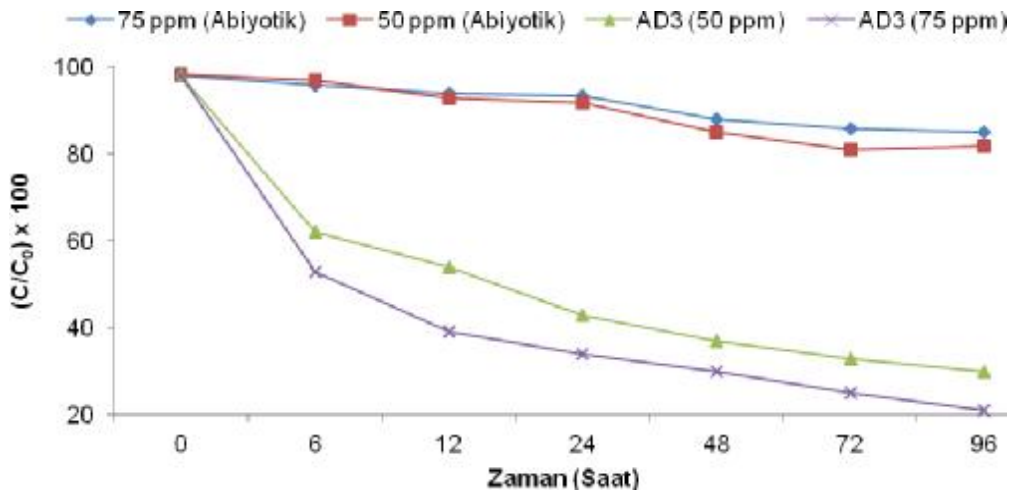
AD2 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. AD2 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi

AD2 izolatu da benzer şekilde AD1 izolatu gibi ilk 6 saatte TNT'yi parçalamış fakat parçalanma AD1 izolatında gözlenenenden daha az düzeyde tespit edilmiştir. AD2 izolatu 50 ve 75 ppm TNT içeren ortamlarda ilk 6 saat sonunda TNT'nin azalış düzeyleri sırasıyla %20 ve % 30 şeklinde kaydedilmiştir. İzolatu 50 ppm TNT içeren besi ortamında ilk 6 saatte gerçekleştirdiği parçalanma hızını devam ettiremediği ve parçalanma yüzdesinin 96. saat sonunda %35 ile sınırlı kaldığı saptanmıştır. 75 ppm TNT içeren besiyerinde ise 96. saat sonundaki TNT azalışı %45 olarak belirlenmiştir. Bu durum izolatların farklı bakteri türleri olmaları ve ortamdaki TNT'yi metabolize etme kapasitelerinde bu farklılığa bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

AD3 izolatu a ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi Şekil 4.9'da verilmiştir.



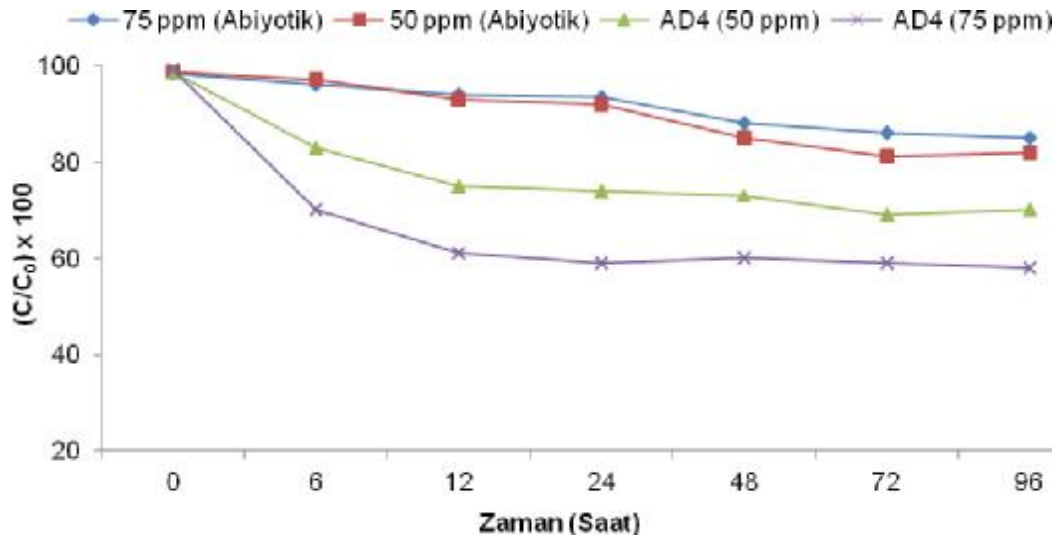
Şekil 4.9. AD3 izolatu a ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi

AD3 izolatu nın çalışmada kullanılan izolatlar arasında TNT üzerinde degradasyon etkinliği en yüksek bakteri olduğu belirlenmiştir. Bu izolatu nın ilk 6 saat sonunda 50 ppm TNT içeren minimal ortamda TNT'nin %36'sını; 75 ppm TNT bulunan ortamda ise %45'ini degrade ettiği saptanmıştır. Bu izolat inkübasyonun sonlandığı 96. saatte 50 ve 75 ppm TNT içeren ortamlarda sırasıyla %68 ve %77 düzeylerinde TNT azalışına neden olmuştur.

Bu izolatin AD1 ve AD2 izolatlarına benzer bir şekilde davranarak TNT konsantrasyonunun artmasına paralel olarak degradasyon oranının arttığı ve sonuç olarak çalışmada kullanılan 75 ppm TNT varlığında izolatin aktif parçalanma kapasitesini ortaya çıkardığı belirlenmiştir.

Bacillus ile yapılan benzer çalışmalar (Ullah ve ark., 2010) yüksek hücre yoğunluklarının indüklenmiş hücresel düzeylerde yada genetik modifikasyonlara bağlı olarak yüksek parçalanma düzeyleri gösterebileceğini ayrıca immobilize sistemlerde yüksek hücre yoğunluklarının yüksek düzeylerde fermentasyon kapasitesiyle de ilişkilendirilebileceğini ve buna bağlı olarak parçalanma kapasitesini arttırabileceğini göstermiştir. Bu da AD3 izolatına ilişkin verilerimizi desteklemektedir.

AD4 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. AD4 izolatına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimi

TNT'nin biyolojik parçalanma çalışmalarında AD4 izolatu, AD2 izolatına benzer bir davranış göstermiştir. AD4 izolatu 50 ppm TNT içeren ortamda ilk 6 saat sonunda TNT'nin %16'sını, 75 ppm TNT içeren kültürlerde ise %29'unu degrade ettiği belirlenmiştir. 96. saat sonunda 50 ve 75 ppm TNT içeren ortamda sırasıyla %29 ve %41 düzeylerinde biyolojik parçalanmaya rastlanmıştır. Bu izolata ait

kültürlerde 24. saatten sonra önemli düzeyde değerlendirilecek bir TNT azalışının gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu izolatın AD2 izolatına göre her iki konsantrasyonda daha düşük oranlarda TNT'yi degrade ettiği ortaya konmuştur.

Abiyotik ortamlardaki TNT azalışı ile karşılaştırıldığında tüm bakteriyel kültürlerde belirgin bir biyodegradasyonun gerçekleştiği saptanmıştır. Çalışmada kullanılan 4 izolatında biyolojik degradasyona ilk 6 saat içerisinde başladığı belirlenmiş olup AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatlarının 50 ppm TNT içeren minimal ortamlarda 96. saat sonunda TNT azalış yüzdeleri sırasıyla %46, %35, %68 ve %29, 75 ppm TNT içeren minimal besi ortamlarında ise %59, %45, %77 ve %41 olarak saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak 50 ve 75 ppm TNT içeren besi ortamında en yüksek TNT parçalanma düzeyinin AD3 izolatına ait olduğu belirlenmiştir. Gr(-) bakteriler arasında ise en iyi parçalama kabiliyetine sahip izolatın AD1 olduğu görülmüştür. AD2 ve AD4 izolatlarının TNT üzerindeki etkileri benzerlik gösterse de en düşük parçalama oranına AD4 izolatının inkübe edildiği kültürlerde rastlanmıştır.

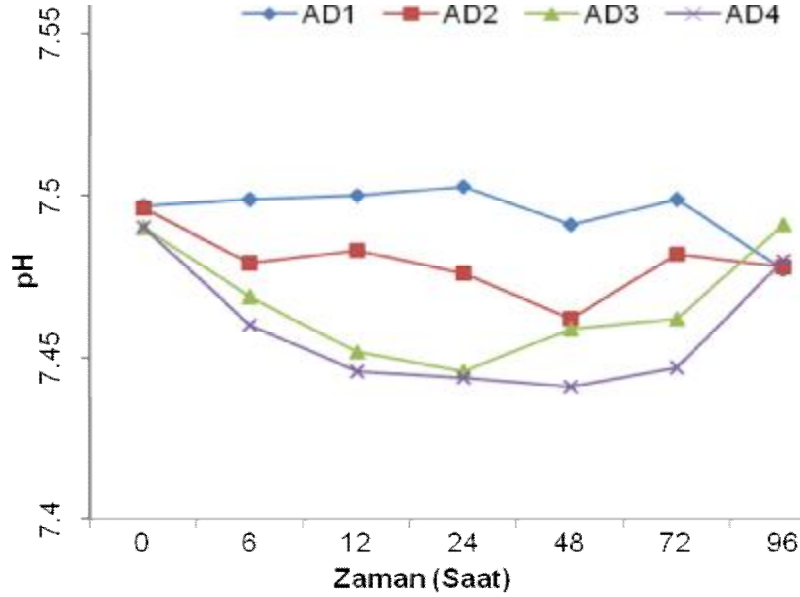
Kurinenko ve ark (2003), tarafından *B. subtilis* SK1 suşunun 200 mg/L konsantrasyonda TNT içeren minimal ortamda degradasyon yeteneğinin araştırıldığı çalışmada 24 saat içinde TNT'nin %20 düzeyinde azaldığı kaydedilmiştir. Bu çalışmada *B. subtilis*'un bakteri hücre yoğunluğunun degradasyon ortamında yüksek konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlenmiş olup, çalışmamızda ise kullandığımız *B. cereus*'un farklı bir davranış göstererek konsantrasyon arttıkça gelişimini hızlandırarak biyolojik parçalamayı gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu çalışma bakteri gelişimine ilişkin verilerimize benzerlik göstermese de, *Bacillus* kültürlerinde nitrit oluşumu ve parçalanma ürünü olarak aminlerin gözlenmesine yönelik sonuçlarımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda en yüksek TNT biyodegradasyon verimi *Bacillus cereus* ile edilmiştir. TNT biyodegradasyonun araştırıldığı bazı çalışmalarda da *Bacillus* sp.'nin yüksek parçalama yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir. Nyanhongo ve ark (2009), 160 µM final konsantrasyonda TNT içeren minimal besiyerinde yürüttükleri biyodegradasyon çalışmasında *Pseudomonas putida* GG04 ve *Bacillus* SF bakterilerini kullanmışlardır. HPLC analizlerinde *P. putida* GG04 TNT'nin tamamını 16 saat içerisinde degrade ederken, bu sürenin *Bacillus* SF için 12 saat olduğu

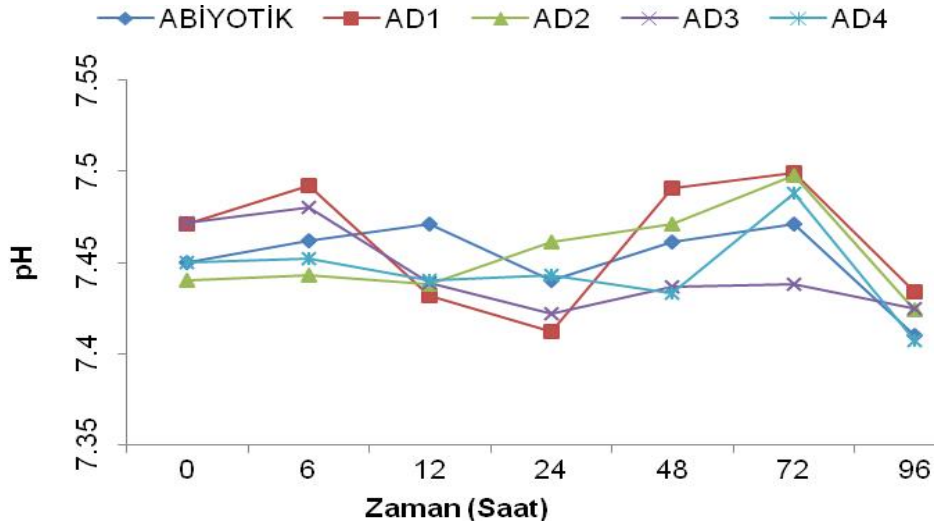
belirlenmiştir. Kalafut ve ark (1998), tarafından yapılan çalışmada ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. ve *Staphylococcus* sp. bakterilerinin TNT'yi degrade kabiliyetleri araştırılmıştır. Bu çalışmada da en yüksek parçalama kabiliyetine sahip bakterinin *Bacillus* sp. olduğu belirlenmiştir.

4.9. Bakteriyel Degradasyon Çalışmalarında pH Değişiminin İzlenmesi

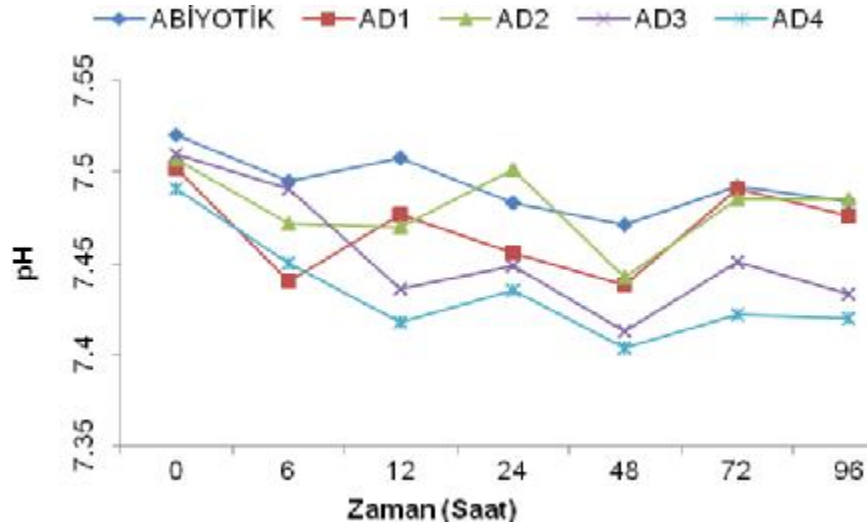
TNT'nin bakteriyel parçalanması sırasında kültür ortamlarındaki pH değişimi Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Minimal besiyerinde zamana bağlı pH değişimi



Şekil 4.12. 50 ppm TNT içeren kültürlerde pH değişimi



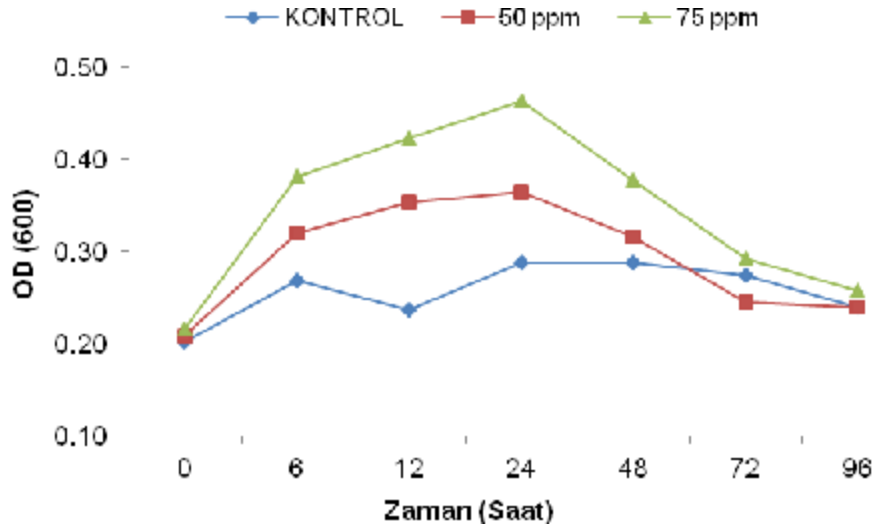
Şekil 4.13. 75 ppm TNT içeren kültürlerde pH değişimi

Bakteriyel kültürlerde ve abiyotik ortamlarda 0. saatte ölçülen pH değeri başlangıç pH değeri olarak kabul edilmiştir. Buna göre abiyotik ve bakteriyel ortamlardaki TNT'nin degradasyon ortamının başlangıç pH'sı 7.4 ± 0.1 olarak kabul edilmiştir. Abiyotik parçalanmanın izlendiği kültürler, bakteriyel kültürler ile karşılaştırıldığında pH'nın 7.4-7.55 arasında kaldığı ve anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda TNT'nin pH 8'in üzerinde kimyasal olarak parçalandığı belirtilmiştir (Maleki, 1994). Buna göre abiyotik ve bakteriyel ortamlarda

aynı pH düzeyinde seyreden değişimler çalışmamızda pH'ya bağımlı herhangi bir abiyotik parçalanma olmadığını göstermiştir.

4.10. Zamana Bağlı Bakteriyel Hücre Gelişimi

Optik yoğunlukları 4.8 ± 0.2 'ye ayarlanmış hücre kültürlerinin TNT içeren minimal besiyerine eklendiği 0. saat başlangıç hücre yoğunluğu olarak ($OD_{600} 0.20 \pm 0.02$) kabul edilmiş olup hücre gelişimi, kültür ortamının spektrofotometrik optik yoğunluğu (OD_{600}) ve PCA'da koloni sayımı şeklinde takip edilmiştir. 50 ve 75 ppm konsantrasyonlarda TNT içeren minimal besiyerinde sürdürülen biyodegradasyon çalışmaları süresince izolatların zamana bağlı hücre gelişimlerinin OD sonuçları Şekil 4.14, Şekil 4.15 Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

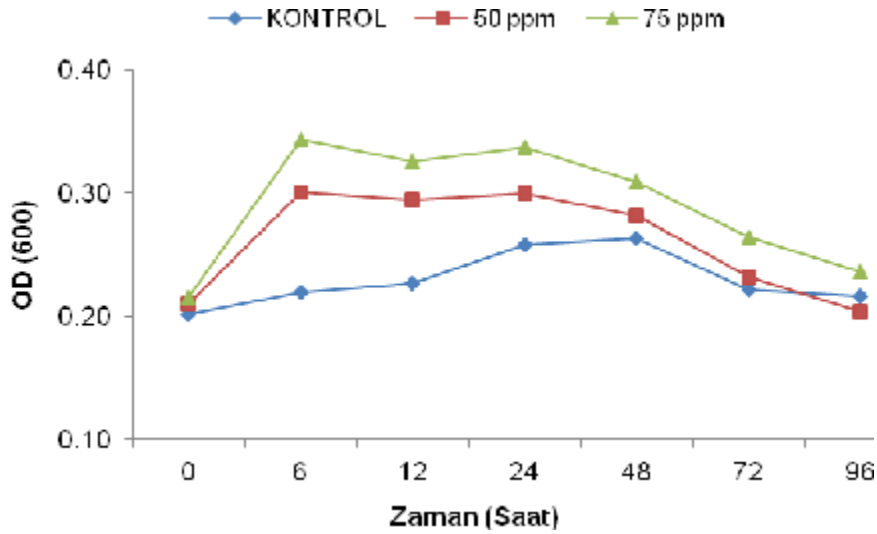


Şekil 4.14. TNT'nin AD1 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi

AD1 izolatı için kontrol grubu olarak kullanılan TNT'siz minimal besiyerinde ilk 6 saat sonunda hücre yoğunluğunda artış gözlenirken, 12. saatin sonunda 0.24'e kadar düştüğü gözlenmiştir. TNT içeren ortamlarda ilk 24. saat içerisinde böyle bir düşüşün gözlenmemesi bu izolatın TNT'yi nitrojen kaynağı olarak kullandığını göstermiştir. AD1 izolatı için 50 ppm TNT içeren besi ortamında 24. saat sonunda maksimum hücre yoğunluğu 0.36 olarak belirlenmiştir. Hücre yoğunluğunun bu

saatten sonra hızla azalarak 96. saatin sonunda bu değer 0.24 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeninin ortamda biriken parçalanmamış TNT'nin ve parçalanma ürünlerinin bakteri üzerindeki toksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 75 ppm TNT içeren minimal ortamda da 24. saatin sonunda hücre yoğunluğu maksimum seviyeye ulaşmıştır. 0.46 olarak belirlenen bu yoğunluğun inkübasyon süresi sonunda 0.26'ya kadar azaldığı belirlenmiştir.

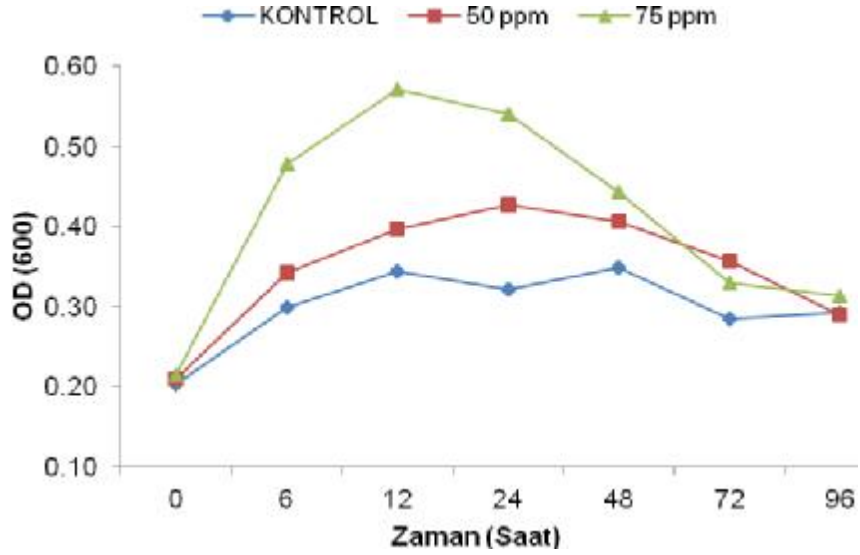
TNT konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak ortamdaki nitrojen kaynağı fazlalığının AD1 izolatının gelişimini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır. Bu bakterinin hücre yoğunluğunun her iki konsantrasyonda da maksimum seviyeye ulaştığı 24. saatin sonunda TNT parçalama kapasitesinin de buna bağlı arttığı gözlenmiştir. Bu saatin sonunda TNT azalışı 50 ve 75 ppm TNT içeren ortamlarda sırasıyla %39 ve %55 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. TNT'nin AD2 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi

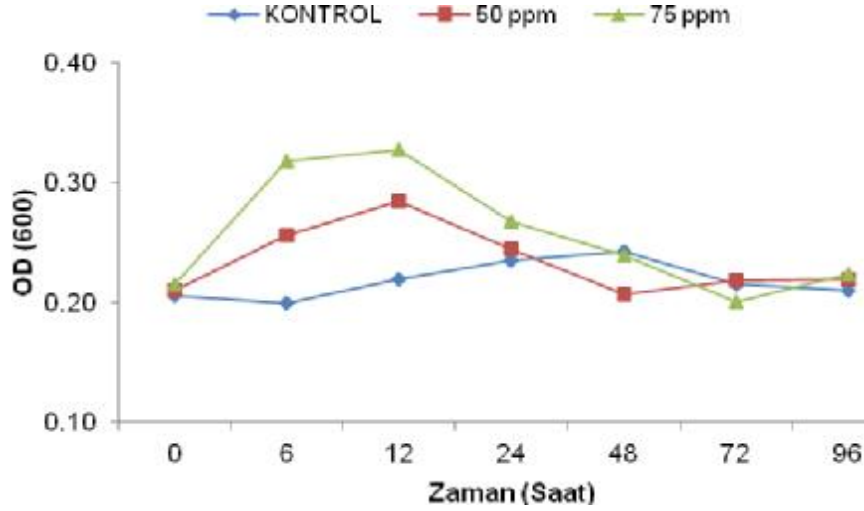
AD2 izolatının 50 ve 75 ppm TNT içeren minimal besiyerlerinde ilk 6 saat sonunda bakteri hücre yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. Bu saatteki bakteri hücre yoğunlukları 50 ve 75 ppm TNT içeren minimal ortamlarda sırasıyla 0.30 ve 0.34 olarak belirlenmiştir. 12. saatten sonra bakteri gelişimi arttığı gözlenirse de bu artış 24. saatten sonra azalma göstermiştir. Buna göre AD2 izolatının AD1 izolatına göre TNT'ye karşı toleransının daha düşük olduğu söylenebilmektedir. Bu izolat TNT'siz

minimal ortamda maksimum gelişimini 24. saatin sonunda göstermiş olup bu yoğunluk 0.26 olarak kaydedilmiştir. AD2 izolatu nitrojen kaynağı olarak TNT içeren besi ortamında TNT'siz kontrol grubuna göre daha hızlı bir gelişim göstermiştir.



Şekil 4.16. TNT'nin AD3 izolatu hücre yoğunluğu üzerine etkisi

AD3 izolatu 50 ve 75 ppm TNT içeren minimal besi ortamlarında maksimum hücre yoğunluğuna sırasıyla 24. ve 12. saatin sonunda ulaşmıştır. Bu değerler 0.43 ve 0.57 şeklinde belirlenmiştir. TNT'siz kontrol grubunda maksimum hücre yoğunluğu 48. saatin sonunda 0.35 olarak saptanmıştır. Bu izolatu da AD1 izolatu gibi hücre yoğunluğunun maksimuma ulaştığı saatlerde TNT üzerindeki parçalama kapasitesinin de arttığı saptanmıştır. Bu izolatu 50 ve 75 ppm TNT içeren minimal besi ortamlarında hücre yoğunluğunun maksimum düzeylere vardığı saatlerdeki TNT miktarında %55 ve %59 azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. TNT'nin AD4 izolatının hücre yoğunluğu üzerine etkisi

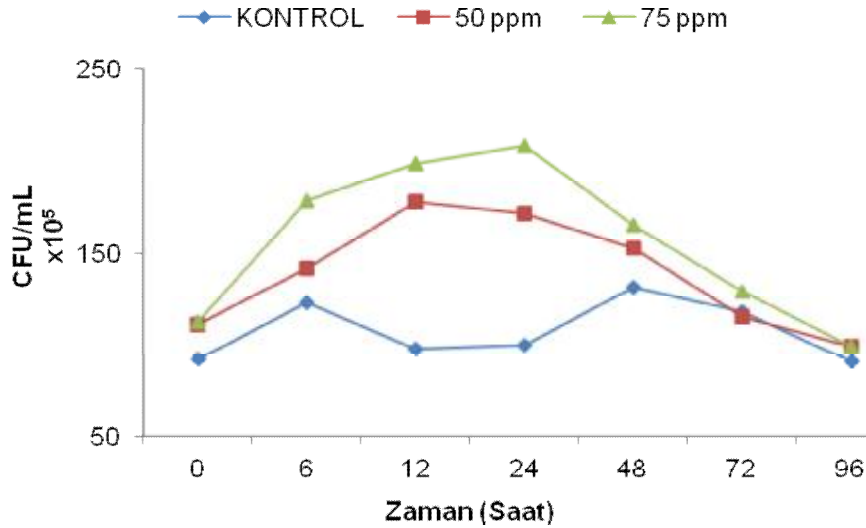
AD4 izolatının TNT içermeyen minimal besiyerinde ilk 6 saatten sonra hücre yoğunluğunda artışlar belirlenmiştir. 48. saatin sonunda maksimum hücre yoğunluğu 0.24 olarak kaydedilmiştir. Ancak akabinde bakteri hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. 50 ve 75 ppm TNT içeren bakteri kültüründe ise 12. saatin sonunda maksimum yoğunluğa (0.28 ve 0.32) ulaşılmıştır. Bu saatten sonra 50 ppm TNT içeren ortamda 0.21'e kadar azalan hücre yoğunluğunun 48. saatten sonra tekrar arttığı belirlenmiştir. Ancak 75 ppm TNT içeren ortamda 12. saatten sonra gelişimin hızlıca azaldığı saptanmış ve 96. saatin sonundaki yoğunluk 0.22 şeklinde ölçülmüştür.

İzolatların TNT'li minimal besi ortamındaki optik hücre yoğunlukları ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, TNT'yi nitrojen kaynağı olarak kullandıkları ve genelde ilk 6 saat içerisinde gelişimlerinin hızla arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte hücre yoğunluğundaki azalışın kültürlerdeki tamamen parçalanmamış TNT'nin varlığı, parçalanma ürünlerinden kaynaklanan toksisite ve bu ortamda bekleme süresiyle orantılı olduğu düşünülmektedir. Ancak bu azalışın her izolatta aynı olmaması tolerans düzeylerinin türden türe değişim gösterdiğine işaret etmektedir.

TNT konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hücre yoğunluğundaki artış çalışmamızı destekler bir şekilde Oh ve Kim (1998)'in yaptığı çalışmayla da bütünlük arz etmektedir. Ko-substrat olarak glukoz ve tek nitrojen kaynağı olarak

farklı konsantrasyonda TNT (25, 50 ve 100 ppm) içeren minimal besiyerlerinde sürdürülen bu çalışmada ilk 16. gün içerisinde bakteri hücre yoğunluğundaki en hızlı artış 100 ppm TNT içeren ortamda belirlenmiş olup bu günü takiben azalan bakteri yoğunluğuna rağmen degradasyonun devam ettiği saptanmıştır. Çalışmamızda zamana bağlı hücre yoğunluğunun azalmasına karşın biyolojik parçalanmanın devam ettiğine yönelik sonuçlarımız Tope ve ark (1999), tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmektedir. Bu çalışmaya göre 0. saatte başlangıç hücre yoğunluğu OD (600) 1.5'e ayarlanmış bakteri kültürlerinde 120 saatlik inkübasyon süresi boyunca hücre yoğunluğunun hızla azaldığı belirlenmiştir. Ancak hücre yoğunluğunun 0.75-1.00 arasında ölçüldüğü 36. saatte minimal ortamda TNT'nin saptanmadığı kaydedilmiştir.

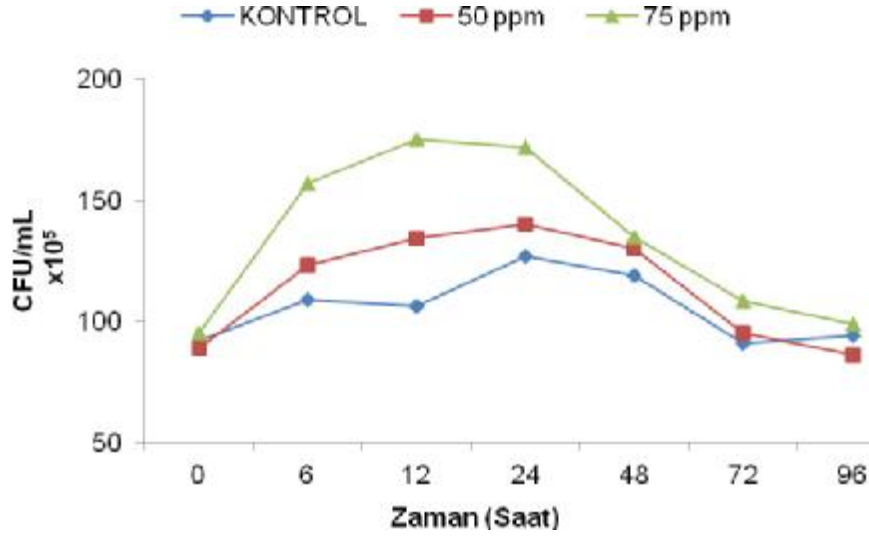
AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatlarında PCA'da koloni sayımı yapılarak bakteri hücre sayısındaki zamana bağlı değişim Şekil 14.18, Şekil 14.19, Şekil 14.20 ve Şekil 14.21'de verilmiştir.



Şekil 4.18. AD1 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL)

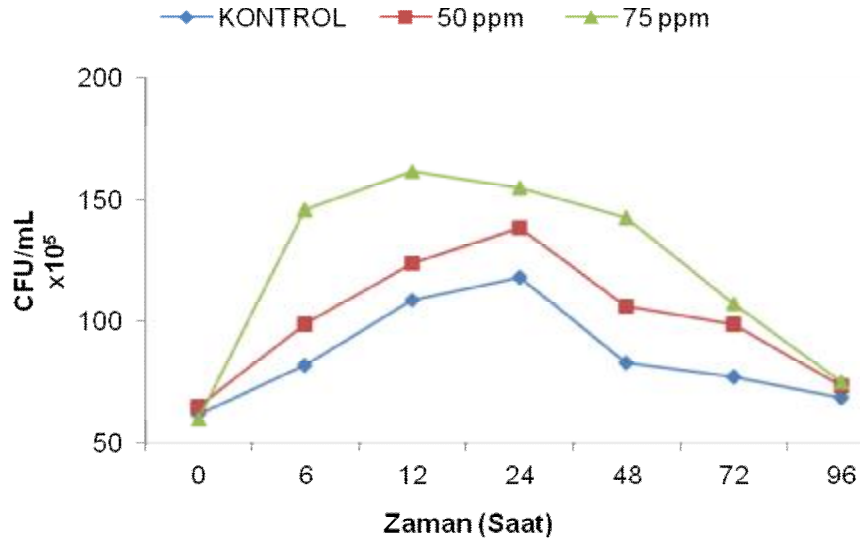
AD1 izolatının 50 ve 75 ppm TNT içeren besiyerindeki başlangıç bakteri sayısı sırasıyla 92×10^5 ve 112×10^5 'tir. AD1 izolatı 50 ppm TNT içeren degradasyon besiyerinde en yüksek bakteri sayısı olan 178×10^5 CFU/mL'ye 12. saatin sonunda ulaşmış, 75 ppm TNT içeren minimal ortamda ise 24. saatin sonunda en yüksek

bakteri sayısı 208.5×10^5 CFU/mL olarak kaydedilmiştir. TNT'siz ortamdaki en yüksek bakteri sayısı 48. saatin sonunda 131×10^5 CFU/mL olarak belirlenmiştir. Buna göre AD1 izolatının TNT içeren besi ortamlarında TNT'siz kontrol grubuna göre daha fazla bakteri sayısına ulaştığı görülmüştür.



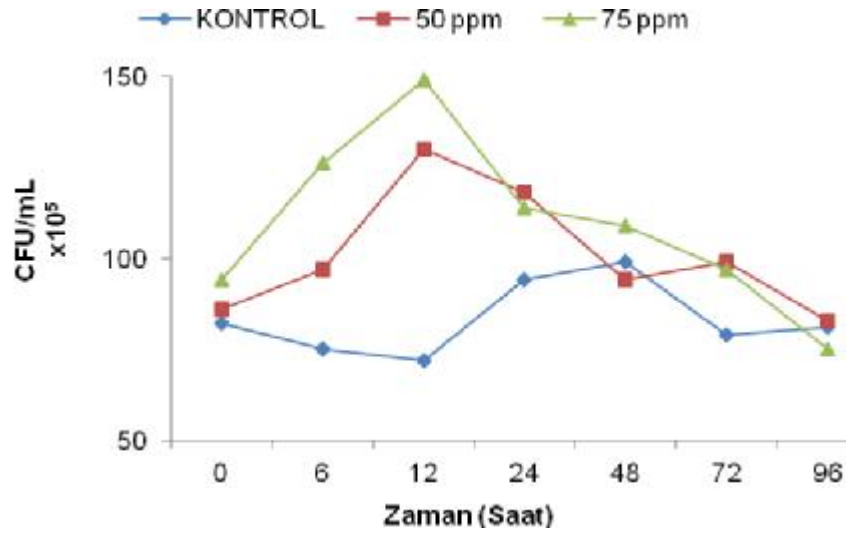
Şekil 4.19. AD2 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL)

AD2 izolatının başlangıç bakteri sayısı 50 ve 75 ppm TNT içeren besiyerleri için sırasıyla 89×10^5 ve 95×10^5 CFU/mL olarak belirlenmiştir. 6. saatin sonunda 50 ve 75 ppm TNT içeren besi ortamında bakteri sayısı sırasıyla 123×10^5 ve 157×10^5 CFU/mL'ye kadar artmıştır. AD2 izolatı TNT'siz ortamda 24. saatin sonunda maksimum bakteri sayısına (127×10^5 CFU/mL) ulaşmıştır. 75 ppm TNT içeren ortamda 12. saatin sonunda en yüksek bakteri sayısı 175×10^5 CFU/mL olarak belirlenmiştir. TNT'siz ortamda bu saatte belirlenen bakteri sayısı 106×10^5 CFU/mL'dir.



Şekil 4.20. AD3 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL)

AD3 izolatının TNT'siz minimal ortamdaki başlangıç bakteri sayısı (62.5×10^5 CFU/mL) 24. saatin sonunda maksimuma ulaşmıştır. Bu sayı 118×10^5 CFU/mL olarak belirlenmiştir. 50 ve 75 ppm TNT içeren besi ortamlarında bakteri sayısındaki artış 6. saatin sonunda görülmüş olup sırasıyla 99×10^5 ve 146×10^5 olarak saptanmıştır. Bu izolatın 50 ppm TNT içeren kültürde maksimum bakteri sayısına 24. saatin sonunda 139×10^5 CFU/mL; yüksek konsantrasyonlu ortamda ise maksimum bakteri sayısına (162×10^5 CFU/mL) 12. saatin sonunda ulaştığı tespit edilmiştir. Bu izolatın ortamdaki TNT konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak bakteri sayısında arttırdığı belirlenmiştir.



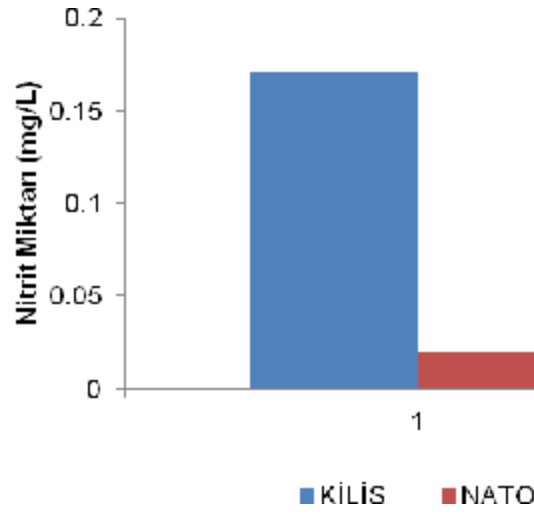
Şekil 4.21. AD4 izolatının zamana bağlı bakteri gelişimi (CFU/mL)

AD4 izolatının TNT'siz kontrol grubunda 82×10^5 CFU/mL olarak belirlenen başlangıç bakteri sayısının 12. saatin sonuna kadar azaldığı akabinde ise artış göstererek maksimum bakteri sayısına 48. saatin sonunda ulaştığı saptanmıştır. Bu sayı 99×10^5 CFU/mL şeklinde belirlenmiştir. 50 ve 75 ppm TNT içeren besi ortamında başlangıç bakteri sayısını (86×10^5 ve 94×10^5 CFU/mL) ilk 6. saatin sonunda 97×10^5 ve 126×10^5 CFU/mL'ye kadar arttığı gözlenmiştir. Maksimum bakteri sayısına ise her iki konsantrasyonda da 12. saatin sonunda ulaşılmış olup sırasıyla 130×10^5 ve 149×10^5 CFU/mL şeklinde rapor edilmiştir.

İzolatların TNT'siz kontrol grubuna kıyasla her iki konsantrasyonda da hücre yoğunluklarını ve bakteri sayılarını arttırdıkları belirlenmiştir. Bu da bakterilerin inkübasyon süresince TNT'yi nitrojen kaynağı olarak kullandığı ve gelişim süreçlerini hızlandırmaya çalıştıklarını göstermektedir.

4.11. Toprak Örneklerindeki Nitrit Miktarı

NATO ve Kilis toprak örneklerinden HPLC analizleri için hazırlanan ekstraktlara nitrit testi uygulanarak bu topraklardaki nitrit miktarı belirlenmiştir. Şekil 4.22'de toprak örneklerindeki nitrit miktarı verilmiştir.

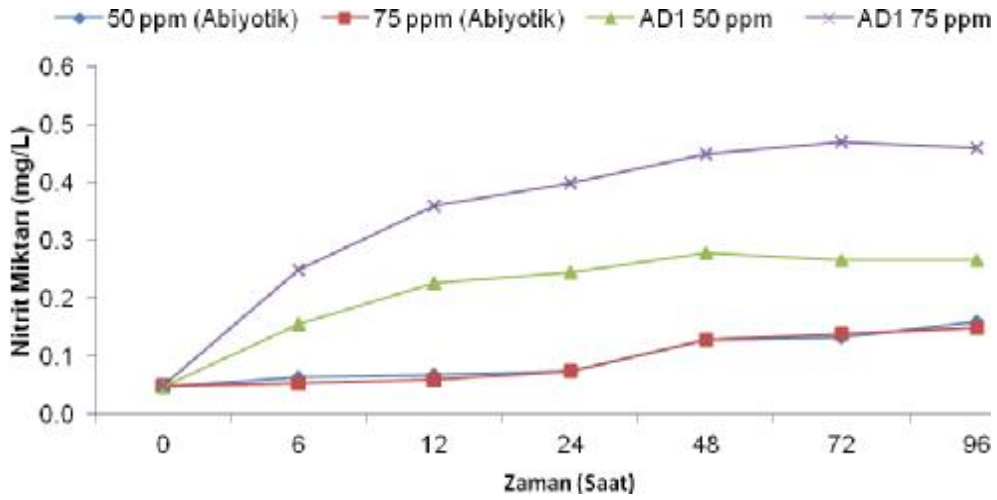


Şekil 4.22. Toprak örneklerindeki nitrit miktarı

Kilis toprak örneğinde 0.17 mg/L, NATO toprak örneğinde ise 0.02 mg/L nitrit miktarına rastlanmıştır. Nitrit miktarlarındaki bu farklılık toprak örneklerinin strüktrü ile ilişkilendirilmektedir.

4.12. Zamana Bağlı Nitrit Oluşumunun Gözlenmesi

TNT'nin aromatik halka redüksiyonu sonucu besi ortamında birikmesi beklenen nitrit miktarı abiyotik ortamlar ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. AD1 izolatu ile TNT'nin biyolojik parçalanması sonucu oluşan nitrit miktarının zamana bağlı değişim grafiği Şekil 4.23'de verilmiştir.



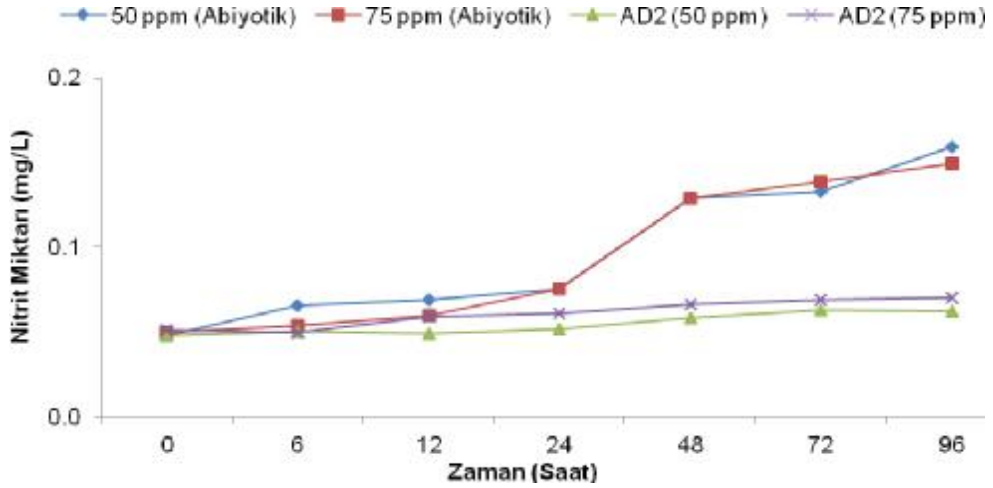
Şekil 4.23. AD1 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi

50 ve 75 ppm TNT içeren abiyotik ortam ve bakteriyel kültürlerde 0. saatteki başlangıç nitrit miktarı 0.05 mg/L olarak belirlenmiştir. 50 ppm TNT içeren abiyotik ortamlarda 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonundaki nitrit miktarları 0.07, 0.07, 0.08, 0.13, 0.13 ve 0.16 mg/L'dir. Buna bağlı olarak abiyotik ortamlarda 24. saatten sonra kimyasal parçalanmanın artmasıyla birlikte nitrit oluşumu gözlenmiştir.

50 ppm TNT içeren besi ortamında AD1 izolatının 6. saatin sonunda nitrit miktarını 0.16 mg/L'ye kadar artırırken 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda sırasıyla 0.23, 0.25, 0.28, 0.27 ve 0.27 mg/L miktarlarında nitrite rastlanmıştır. AD1 izolatı ile gerçekleştirilen biyodegradasyon çalışmalarında 0 ile 48. saatleri arasında nitrit miktarının yükseldiği fakat 48. saatten sonra nitrit miktarının sabit kaldığı belirlenmiştir. AD1 izolatına ait kültürlerde ölçülen en yüksek nitrit miktarı 0.28 mg/L olup abiyotik ortamlarda bu değer 0.16 mg/L olarak kaydedilmiştir.

75 ppm TNT içeren abiyotik ortamlarda 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda nitrit miktarları 0.05, 0.06, 0.08, 0.13, 0.14 ve 0.15 mg/L olarak saptanmıştır. AD1 izolatının 75 ppm TNT içeren besiyerinde sürdürülen biyolojik parçalanma çalışmasında bu saatlerin sonunda oluşan nitrit miktarları sırasıyla 0.25, 0.36, 0.40, 0.45, 0.47 ve 0.46 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu izolata ait biyodegradasyon sürecinde en yüksek nitrit artışı 72. saatin sonunda 0.47 mg/L olarak ölçülmüştür. Biyodegradasyon ortamına eklenen TNT konsantrasyonu arttıkça bu izolata ait kültürlerde nitrit birikiminin de arttığı belirlenmiştir.

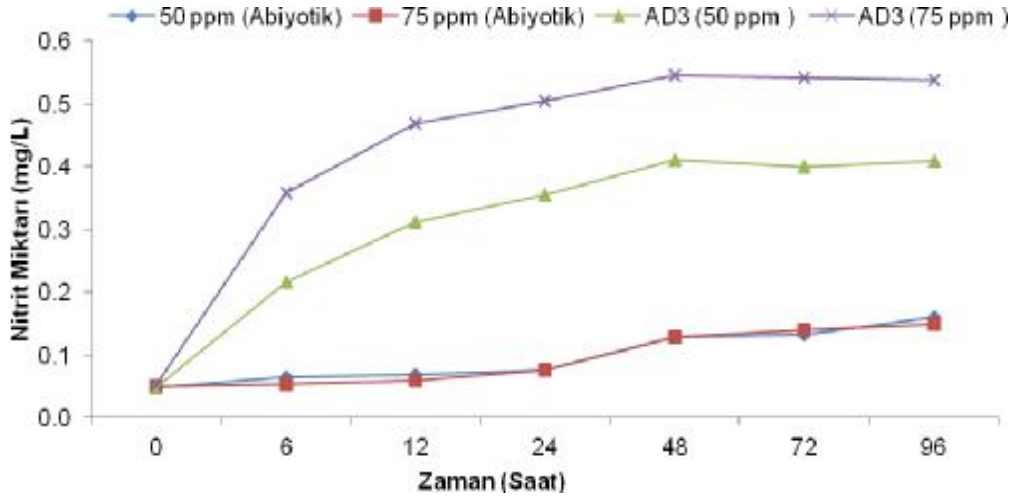
AD2 izolatının kullanıldığı TNT'nin biyolojik parçalanma sürecinde sıvı ortamda biriken nitrit miktarı Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. AD2 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi

AD2 izolatının 50 ppm TNT içeren besi ortamlarında 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda spektrofotometrik nitrit miktarları sırasıyla 0.05, 0.05, 0.05, 0.06, 0.06 ve 0.06 mg/L olarak belirlenmiştir. 75 ppm TNT içeren degradasyon ortamında ise nitrit miktarları 0.05, 0.06, 0.06, 0.07, 0.07 ve 0.07 mg/L olarak saptanmıştır. abiyotik ortamlardaki nitrit miktarları ile karşılaştırıldığında AD2 izolatının parçalama sürecinde biyolojik parçalanmaya yönelik önemli düzeyde nitrit birikimine rastlanmamıştır.

TNT'nin biyolojik parçalanma sürecinde AD3 izolatının oluşturduğu nitrit miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.25'de verilmiştir.

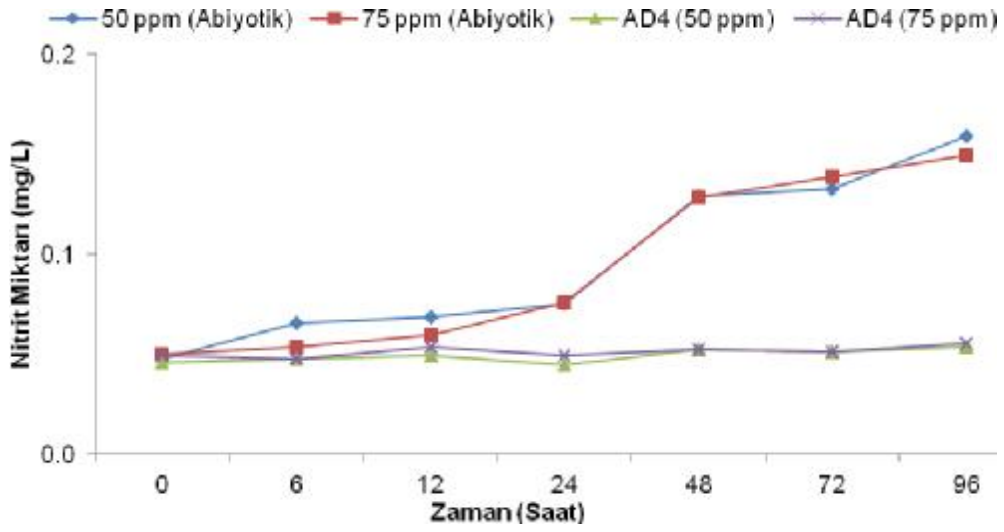


Şekil 4.25. AD3 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi

AD3 izolatının 50 ppm TNT içeren biyolojik degradasyon ortamlarında 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda görülen nitrit miktarları sırasıyla 0.22, 0.31, 0.36, 0.41, 0.40 ve 0.41 mg/L olarak saptanmıştır. 48. saatin sonuna kadar nitrit birikiminin logaritmik bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Bu izolatın 75 ppm TNT içeren sıvı ortamlarda 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda nitrit miktarları 0.36, 0.47, 0.51, 0.55, 0.54 ve 0.54 mg/L şeklinde belirlenmiştir. En yüksek nitrit artışı 48. saatin sonunda görülmüş olup bu miktar 0.55 mg/L olarak kaydedilmiştir.

AD4 izolatı kullanılarak gerçekleştirilen biyolojik parçalanma sürecinde sıvı ortamda biriken nitrit miktarı Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. AD4 kültürlerinde nitrit miktarının zamana bağlı değişimi

AD4 izolatının kullanıldığı 50 ppm TNT içeren minimal besiyerlerinde sürdürülen biyolojik parçalanma sürecinde, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonundaki nitrit miktarı 0.05, 0.05, 0.04, 0.05, 0.05 ve 0.05 mg/L; 75 ppm TNT içeren kültürlerde ise 0.05, 0.05, 0.05, 0.05, 0.05 ve 0.06 mg/L olarak belirlenmiştir. AD4 izolatının da AD2 izolatı gibi TNT'nin parçalanma süreci içerisinde abiyotik ortamlar ile karşılaştırıldığında, biyolojik parçalanmaya yönelik bir nitrit oluşumu saptanmamıştır.

AD1 ve AD3 izolatlarının kültürlerinde inkübasyon süresince biyolojik parçalanmaya yönelik nitrit oluşumu saptanmıştır. AD1 izolatının 50 ve 75 ppm TNT içeren ortamlardaki en yüksek nitrit miktarı 0.28 ve 0.47 mg/L'dir. AD3 izolatı için bu değerler sırasıyla 0.41 ve 0.55 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu bilgilere dayanarak AD1 ve AD3 izolatlarının TNT'yi biyolojik yıkıma uğrattırken nitrit oluşturmamasına rağmen, AD2 ve AD4 izolatlarının oluşturmaması farklı parçalama yollarını kullandıklarını göstermektedir.

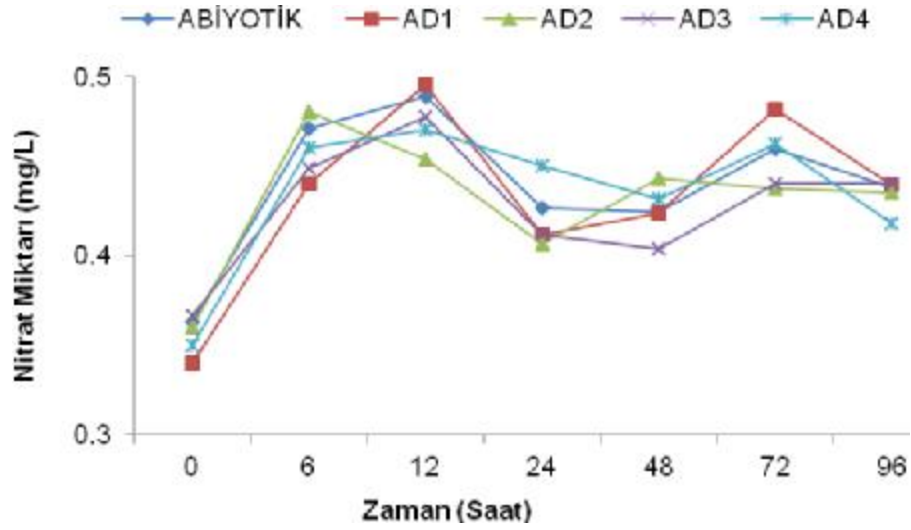
Çalışmamız sonucunda TNT'den nitrit elimine eden izolatların, eliminasyon düzeyleri farklılığının kullanılan suş, ortamdaki bakteri hücre yoğunluğu ve gelişebilen genetiksel modifikasyonlar vb. farklılıklara bağlı olarak ortaya çıktığı belirtilebilir.

Pseudomonas türleri üzerinde yapılan pekçok çalışmada biyolojik parçalanma sürecinde nitrit oluşumu rapor edilmiştir. Duque ve ark (1993), *Pseudomonas* sp. C1S1 suşunu kullanarak yürütmüş oldukları çalışmada bu bakterinin aromatik halkadan nitrit gruplarını elimine ettiği gözlenmiş olup bunun sonucu olarak kültür ortamında NO₂ birikimi belirlenmiştir. Pak ve ark (2000), *Pseudomonas fluorescens* I-C suşunu kullandıkları diğer bir çalışmada TNT'nin parçalanma süreci içerisinde besiyerinde NO₂ oluşumu gözlemişlerdir. Kim ve ark (2002) tarafından yürütülen çalışmada ise ilk 6 saat içerisinde en yüksek miktarda (6 mg/L) nitrit oluşumu gözlenmiştir. Aynı şekilde Oh ve ark (2003), tarafından *P. aeruginosa* MX suşu kullanılarak yapılan çalışmada TNT içeren ortamda 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda degradasyon ortamında 18 µM düzeyinde NO₂ oluşumu rapor edilmiştir. Bu çalışmada abiyotik ortamlarda ise çalışmamıza benzer bir şekilde 20. saatin sonunda nitrit oluşumu gözlenmiştir. Maeda ve ark (2006), *Pseudomonas* TM 42 suşu kullanarak yapmış oldukları çalışmada suşların Meisenheimer kompleksi oluşturarak TNT'den NO₂ gruplarının uzaklaştırılması sonucu besi ortamında NO₂ birikiminin gözlendiğini tespit etmişlerdir.

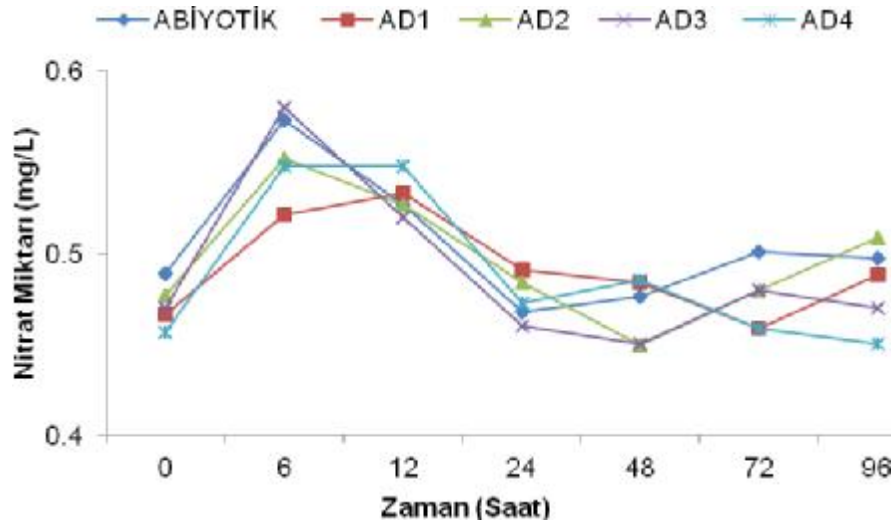
Bazı araştırmacılar tarafından biyolojik parçalanma ile nitrit oluşumuna yönelik farklı sonuçlarda elde edilmiştir. Tope ve ark (1999), tarafından *Arthrobacter* sp.'nin kullanıldığı biyolojik parçalanma sürecinde NO₂ oluşumu tespit edilememiştir. AD2 ve AD4 kültürlerinde nitrit oluşumuna rastlanmaması bu izolatların *Arthrobacter* sp.'ye benzer bir degradasyon davranışı gösterdiklerine işaret etmektedir.

4.13. Zamana Bağlı Nitrat Oluşumunun Gözlenmesi

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de 50 ve 75 ppm TNT içeren abiyotik ortam ve bakteriyel kültürlerdeki biyodegradasyon süresince besi ortamlarındaki nitrat miktarları verilmiştir.



Şekil 4.27. 50 ppm TNT içeren kültürlerde nitrat miktarı



Şekil 4.28. 75 ppm TNT içeren kültürlerde nitrat miktarı

Bakterilerin gelişim süreci içerisinde TNT'nin parçalanması sonucunda ortaya çıkan nitritin nitrata oksidasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği spektrofotometrik nitrat analizi yapılarak incelenmiştir. AD2 ve AD4 izolatlarının kültürlerinde nitrit belirlenemese de, bu izolatlar nitrat testine tabii tutulmuştur. 50 ppm TNT içeren abiyotik ortamda 0. saatteki başlangıç nitrat miktarı 0.31 mg/L; AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatlarında ise 0.29, 0.31, 0.32 ve 0.30 mg/L olarak belirlenmiştir. 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda abiyotik ortamda nitrat miktarı sırasıyla 0.42, 0.44, 0.38, 0.37, 0.41 ve 0.39 mg/L olarak belirlenmiştir. AD1

izolatı için bu değerler 0.39, 0.45, 0.36, 0.37, 0.43 ve 0.39 mg/L; AD2 izolatı için ise 0.43, 0.40, 0.36, 0.39, 0.39 ve 0.38 mg/L şeklinde belirlenmiştir. AD3 ve AD4 kültürlerindeki nitrat miktarları ise sırasıyla 0.40, 0.43, 0.36, 0.35, 0.39 ve 0.39; 0.41, 0.42, 0.40, 0.38, 0.41 ve 0.37 olarak ölçülmüştür.

75 ppm TNT içeren abiyotik ortamdaki başlangıç nitrat miktarı 0.44 mg/L; AD1, AD2, AD3 ve AD4 bakteriyel kültürlerde ise bu değerler 0.42, 0.43, 0.42 ve 0.41 mg/L olarak kabul edilmiştir. Abiyotik ortamda 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonundaki nitrat miktarı 0.48, 0.42, 0.43, 0.45 ve 0.45 mg/L şeklinde belirlenmiştir. AD1 ve AD2 izolatları için ölçülen nitrat miktarları sırasıyla 0.47, 0.48, 0.44, 0.43, 0.41 ve 0.44 mg/L; 0.50, 0.48, 0.43, 0.40, 0.43 ve 0.46 mg/L olarak tespit edilmiştir. AD3 ve AD4 kültürlerinde ise 0.53, 0.47, 0.41, 0.40, 0.43 ve 0.42; 0.50, 0.50, 0.42, 0.44, 0.41 ve 0.40 mg/L miktarlarında ölçülmüştür.

Bakteriyel kültürlerdeki nitrat miktarları abiyotik ortamlar ile karşılaştırıldığında her iki konsantrasyonda da belirgin bir nitrat oluşumu gözlenmemiştir. Bu nedenle AD1 ve AD3 kültürlerinde oluşan nitritin nitrata oksidasyonunun gerçekleşmediği söylenebilmektedir.

4.14. Parçalanma Ürünlerinin Tanımlanması

Çalışmada kullanılan izolatların TNT'yi indirgeyerek besi ortamında birikimine neden oldukları parçalanma ürünlerinin tanımlanması GC-MS ve TLC analizleri yapılarak belirlenmiştir.

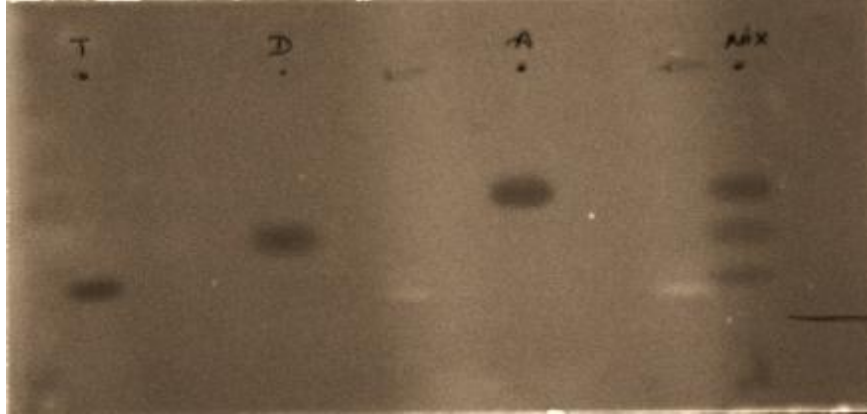
4.14.1. GC-MS analizleri

Abiyotik ortamlar ve bakteriyel kültürlerinden 96. saat sonunda alınan örneklerin GC-MS analizleri yapılarak parçalanma ürünleri tanımlanmıştır. GC-MS analizlerinin sonuçlarına göre, abiyotik ortamlarda TNT varlığı belirlenmiş olup herhangi bir parçalanma ürününe rastlanmamıştır. Her iki konsantrasyondaki bakteriyel kültürlerde ise 4-ADNT birikimi tespit edilmiştir. GC-MS analizlerine ait kromatogram ve kütle spektrumları ekler kısmında verilmiştir.

4.14.2. TLC analizleri

Biyolojik parçalanma sonucunda oluşan metabolitlerin varlığı GC-MS'in yanısıra TLC analizleri ile de incelenmiştir. Bu analizler matabolitlerin UV ışığı altında oluşturdukları lekelenmeler ve bu lekelerin boyanması şeklinde takip edilmiştir. Ancak parçalanma ürünlerinin TLC analizleri, elimizde bulunan standartlar doğrultusunda inceleme ile sınırlı kalmıştır. Hem bakteriyel hem de abiyotik ortamlardan alınan örneklerdeki lekenlenmelerin Rf değerleri ve renklendirme sonuçları, standartlar ile karşılaştırılarak parçalanma ürünleri tanımlanmaya çalışılmıştır.

Şekil 4.29'da standartların ince tabaka kromatografisindeki UV ışığı altındaki görünümü verilmiştir (T: TNT, D: 2,4-DNT, A: 4-ADNT, M: Karışım).



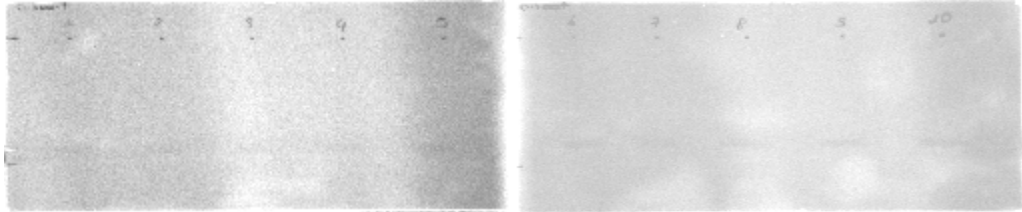
Şekil 4.29. Standartların UV ışığı altındaki görünümü

UV ışığı altındaki lekelenmelere göre TNT, 2,4-DNT ve 4-ADNT'nin Rf değerleri sırasıyla 0.83, 0.67 ve 0.5 olarak belirlenmiştir. Plakalar boyanarak standart TNT'nin portakal rengi ve 4-ADNT'nin ise sarı renkte lekelenmeler vererek çıplak gözle görülmesi sağlanmıştır (Nam, 1997; Wang ve ark, 1997). Şekil 4.30'da standartların boyama sonrası görüntüleri verilmiştir (T: TNT, D: 2,4-DNT, A: 4-ADNT, M: Karışım) Ancak 2,4-DNT renklendirme çözeltisi ile boyanamadığı için yalnızca UV ışığı altındaki lekelenmeler şeklinde görüntülenebilmiştir.

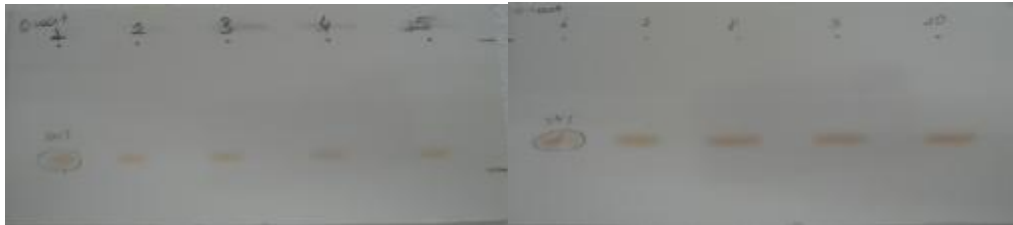


Şekil 4.30. Standartların boyama sonrası görüntüleri

TLC analizleri için 0 ve 96. saatlerde alınan örnekler, incelenerek ortamda parçalanma ürünlerinin birikimi kontrol edilmiştir. 0. saatte ait TLC sonuçları Şekil 4.31 ve 4.32'de verilmiştir (1: 50 ppm TNT (Kontrol), 2: AD3+50 ppm TNT, 3: AD4+50 ppm TNT, 4: AD2+50 ppm TNT, 5: AD1+50 ppm TNT, 6: 75 ppm TNT (Kontrol), 7: AD3+75 ppm TNT, 8: AD4+75 ppm TNT, 9: AD2+75 ppm TNT, 10: AD1+75 ppm TNT).



Şekil 4.31. 0. saatte ait örneklerin UV ışığı altındaki görünümü

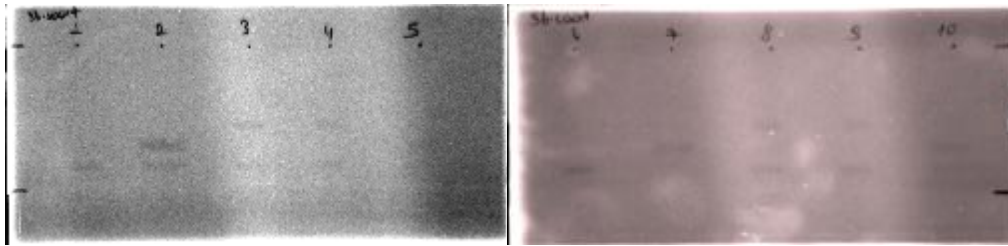


Şekil 4.32. Lekelenmelerin boyama sonrası görünümü

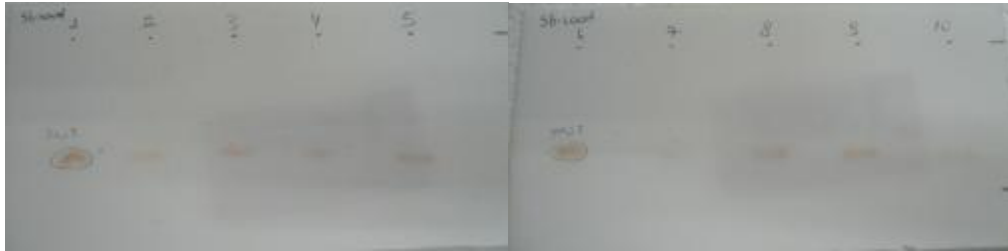
Lekelenmelerin R_f değerleri (0.8) ve renk tonu standartlar ile karşılaştırıldığında, 0. saatte var olan örneklerin sadece TNT olduğuna karar

verilmiştir. Bu sonuçlar TNT'nin sıvı besi ortamına eklendiğinde, herhangi bir kimyasal bozunmaya uğramadığını göstermektedir.

Biyodegradasyon sürecinin sonunda, besiyerinde biriken parçalanma ürünlerinin belirlenmesi için yapılan 96. saate ait TLC sonuçları Şekil 4.33 ve 4.34'te verilmiştir (1: 50 ppm TNT (Kontrol), 2: AD3+50 ppm TNT, 3: AD4+50 ppm TNT, 4: AD2+50 ppm TNT, 5: AD1+50 ppm TNT, 6: 75 ppm TNT (Kontrol), 7: AD3+75 ppm TNT, 8: AD4+75 ppm TNT, 9: AD2+75 ppm TNT, 10: AD1+75 ppm TNT).



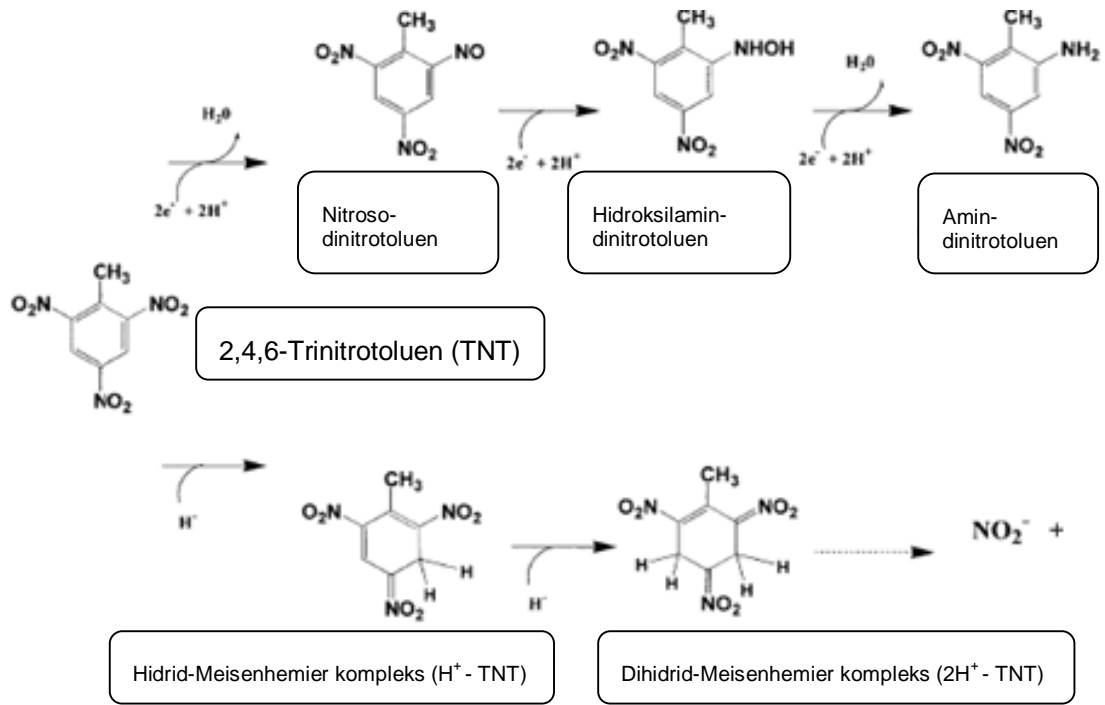
Şekil 4.33. 96. saate ait örneklerin UV ışığı altındaki görünümü



Şekil 4.34. Lekelenmelerin boyama sonrası görünümü

50 ve 75 ppm TNT içeren AD1 ve AD3 izolatına ait kültürlerdeki lekelenmelerin Rf değerleri 0.8 ve 0.63 olarak bulunmuştur. AD2 ve AD4 izolatına ait kültürlerdeki lekelenmelerin Rf değerleri ise 0.8 ve 0.46 olarak belirlenmiştir. Bu değerler standartlar ile karşılaştırıldığında, tüm izolatlara ait kültürlerde TNT'nin tamamen parçalanmaması sonucu degradasyon ortamında TNT varlığı belirlenmiştir. AD1 ve AD3'ün TNT'yi 2,4-DNT ve 4-ADNT'ye; AD2 ve AD4'ün ise 4-ADNT'ye kadar indirgeyebildiği saptanmıştır. Lekelenmelerin boyanması sonucu TNT'ye yönelik portakal rengi gözlenirken, 4-ADNT'ye yönelik sarı renge rastlanmamıştır. Abiyotik ortamlarda ise sadece TNT varlığı belirlenmiştir.

Biriken parçalanma ürünleri karakterize edildiğinde bakterilerin TNT'yi farklı parçalanma yolları ile indirgelediği belirlenmiştir. Şekil 4.35'te bakterilerin TNT'yi indirgeme yolları verilmiştir.



Şekil.4.35. Bakterilerin TNT'yi indirgeme yolları (Hannink ve ark, 2003).

AD1 ve AD3 kültürlerinde bakteriyel aktiviteler sonucu TNT'den 6.C atomuna bağlı nitrit grubunun koparılması ile gerçekleşen aromatik halkanın redüksiyonu sonucu parçalanma ürünü olarak 2,4-DNT belirlenmiş olup besi ortamında nitrit birikimi tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatların kültürlerinde 4-ADNT'lere de rastlanması nitrit gruplarında redüksiyonunu gerçekleştirdiklerini göstermektedir. AD2 ve AD4 izolatlarına ait kültürlerde ise aromatik halkadaki 4.C atomuna bağlı nitrit grubunun sırasıyla nitroso, hidroksilamin ve amino grubuna kadar indirgenmesi sonucu 4-ADNT varlığı belirlenmiş olup besi ortamında herhangi bir nitrit birikimi saptanmamıştır.

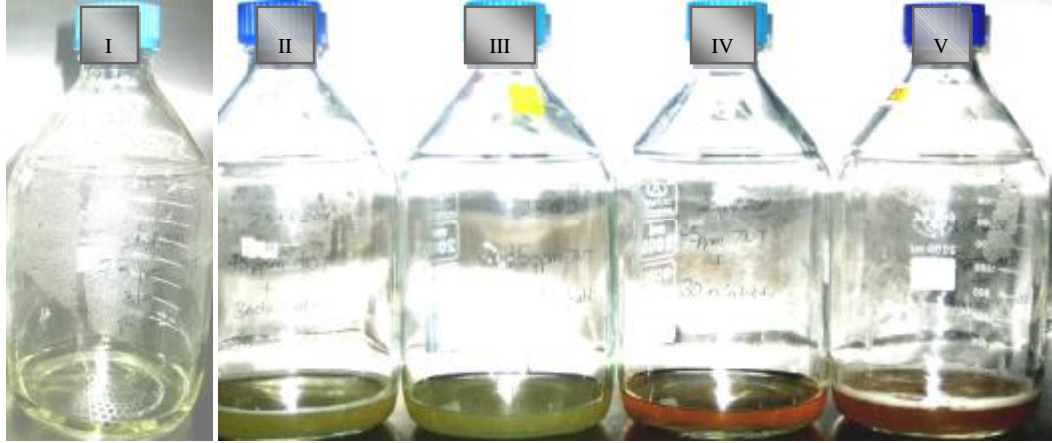
Pseudomonas türleri üzerinde yapılan çalışmalarda parçalanma ürünleri açısından farklılıklar gözlenmiştir. Boopathy ve ark (1994), tarafından yapılan çalışmada *Pseudomonas* sp.'nin aerobik kültürüne glukoz eklendiğinde parçalanma ürünleri olarak 4-ADNT ve 2-ADNT'nin birikimi belirlenmiştir. Martin ve ark

(1997), tarafından *Pseudomonas savastanoi*'nin kullanıldığı diğer bir biyodegradasyon çalışmasında nitro grupların halkadan koparılması sonucu nitrit çıkışında artış belirlenirken; glukoz bulunan kültürde 2-ADNT ve 4-ADNT, azot kaynağı içeren ortamlarda ise NO₂ çıkışı ile birlikte 2,4-DNT metabolitleri tanımlanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* MX suşunun kullanıldığı diğer bir çalışmada da sonuçlarımıza benzer veriler, Oh ve ark (2003), tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada ADNT ve DNT parçalanma ürünlerinin birikimi gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus* kültürlerinden, izole ettiğimiz parçalanma ürünlerine yönelik benzer sonuçlar Nyanhongo ve ark (2009), tarafından da bildirilmiştir. *Pseudomonas* ve *Bacillus* bakterilerini kullandıkları bu çalışmada parçalanma ürünü olarak DNT'lerin yanı sıra amino bileşiklerine de rastlanmıştır

AD2 ve AD4 izolatlarında biyolojik parçalanma sonucunda nitrit oluşumunun gözlenmemesine yönelik sonuçlarımızı destekleyen *Arthrobacter* sp.'nin kullanıldığı çalışmada da parçalanma ürünleri 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-ADNT), 2-amino-4,6-dinitrotoluen (2-ADNT), 2,4-diamino-6-nitrotoluen (2,4-DANT) şeklinde tanımlanmıştır (Tope ve ark, 1999).

TNT'nin DNT bileşiklerine kadar indirgenme sürecinde TNT'nin hidritlenmesi gerçekleşmektedir. Bu hidritlenme sırasında ortaya çıkan Meisenheimer kompleksi, kültürde kırmızı-kahverengimsi renk oluşumuna neden olmaktadır. Çalışmamızda AD1 ve AD3 kültürlerinde bu renk oluşumunun gözlenmesine karşın, AD2 ve AD4 izolatlarında metabolitler sarımsı kültürden izole edilmiştir. Ancak abiyotik ortamlarda herhangi bir renk değişimine rastlanmamıştır.

Şekil 4.36'da TNT içeren biyodegradasyon ortamındaki 96. saat sonundaki renk değişimi verilmiştir (I: Abiyotik ortam, II:AD4, III:AD2, IV: AD3 ve V: AD1 izolatlarının kültürleri).



Şekil 4.36. Kültürlerde 96. saat sonundaki renk değişimi

İnkübasyon süresi sonunda oluşan renk değişimlerine yönelik pek çok çalışma rapor edilmiştir. Vorbeck ve ark (1994), *Mycobacterium* sp. suşlarını kullandıkları biyodegradasyon çalışmasında parçalanma ürünlerini koyu kırmızı-kahverengimsi sıvı kültürlerden izole etmişlerdir. *Pseudomonas fluorescens* I-C suşundan izole edilen ksenobiyotik redüktaz enziminin kullanıldığı çalışmada ise biyodegradasyon sürecini takiben TNT-Meisenhemier kompleksinden kaynaklı kırmızı-kahverengimsi renk oluşumu rapor edilmiştir (Pak ve ark, 2000).

Litake ve ark (2005), yapmış oldukları çalışmada kültürasyon süresince sarımsı renkteki minimal degradasyon ortamının renginin 4 saat sonra turunculaştığı, 8 saat sonra rengin koyulaştığı ve 10. saate kadar kırmızı-kahverengimsiye dönüştüğü tespit edilmiştir. Nyanhongo ve ark (2008), *Pseudomonas putida* GG04 ve *Bacillus cereus* izolatlarını kullanarak sürdürdükleri çalışmada da benzer bir şekilde degradasyon sonunda parçalanma ürünlerini kırmızı renkli kültürden elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından elde edilen bu veriler AD1 ve AD3 izolatlarında inkübasyon süresi sonunda belirlenen renk değişimlerine yönelik sonuçlarımızı desteklemektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ksenobiyotikler olarak bilinen nitroaromatik bileşikler kimyasal endüstride çok geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Pek çok ilaç ve boyar maddelerin nitroaromatik içeriklerinin yanı sıra bu bileşiklerin en geniş uygulama alanları pestisitler, insektisitler ve TNT gibi patlayıcı maddelerdir. Patlayıcıların mutajenik ve karsinojenik potansiyelleri canlılar açısından önemli risk faktörleri olarak görülmelerine neden olmaktadır.

TNT insanlarda dahil pek çok organizma üzerinde toksikolojik etkileri ve patlayıcı karakterinden dolayı önemli bir kirleticidir. İnhalasyonla vücuda alındığında akciğer hasarı ve anemi gibi toksik etkilerinin yanı sıra patlayıcılar ile deri kontakları sonucu dermatitler oluşabilmektedir. Bunlara ilave olarak baş ağrıları ve zehirlenmeler de rapor edilmiştir. I. Dünya Savaşından bu yana askeri amaçlı olarak sürekli üretimine devam edilen TNT'nin diğer patlayıcı yapılarına katılması, depolama prosesleri ve/veya hatalı giderim teknolojileri aracılığıyla kirleticinin toprak ve yer altı sularına doğru göçü gerçekleşebilmektedir. Bu bileşiğin canlılar üzerindeki toksik etkileri yalnızca kirli bölgelerin temizlenmesi ile değil aynı zamanda yer altı sularına doğru hareketlerinin kontrol altına alınması yoluyla gerçek bir degradasyon sağlanarak engellenebilir.

TNT'nin topraktaki kil ve humus tarafından tutulması ve suda kısmen çözülebilmesi yer altı sularına doğru ilerlemeden uygun arıtım teknolojilerinin kullanılması ile redükte edilebilmesi önemli bir avantaj olarak görülmektedir. Bu patlayıcının tamamen etkili bir şekilde arıtılması için fiziksel, kimyasal ve/veya TNT ile kirlenmiş toprakların yakılması gibi fizikokimyasal teknikler şeklinde günümüze dek pek çok yöntem geliştirilmiştir. Ancak mevcut teknolojiler ile etkin bir arıtım sağlanamaması ve bu yöntemlerin patlayıcılar ile kirlenmiş geniş sınır arazilerin sanitasyon çalışmaları sırasında maliyet açısından pahalı olması biyoteknolojik uygulamaların önem kazanmasına neden olmaktadır. Uygulanabilirliğinin kolay olması, ucuz ve tehlikeli bileşiklerin zararsız biyomaslara dönüşümünü garanti eden biyoteknolojik yöntemler TNT gibi patlayıcılar ile kirlenmiş toprak ve suların temizlenmesinde bilim dünyasının ilgi odağı haline gelmiştir.

Patlayıcıların inatçı yapıları fizikokimyasal açıdan benzen halkasının tamamen parçalanmasına imkan tanımamaktadır. Buna karşın bakteri, mantar ve mayalar gibi pek çok organizma sahip oldukları enzim sistemleri sayesinde N₂ içeriği fazla olan TNT gibi patlayıcıları nitrojen kaynağı olarak kullanarak metabolize edebilmektedir. Bir mikrobiyal parçalamanın kalitesi ve avantajı toprakların kirlilik miktarı, oksijen varlığı-yokluğu, sıcaklık ve ko-substrat gibi parametrelere göre değişim göstermektedir. Bundan dolayı, arındırılma çalışmalarında öncelikle laboratuvar ölçekli batch kültürlerde geliştirilen ve rekombinant tekniklerin yardımıyla TNT'yi tamamen nitrotoluenlere kadar mineralize edebilecek spesifik suşlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bundan yola çıkarak çalışmamızda TNT'nin bakteriyel kültürler ile biyodegradasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan toprak örneklerindeki TNT kirliliği HPLC analizleri yapılarak belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda NATO ve Kilis III bölge toprak örneklerinde sırasıyla 61.35 ve 14.61 ppm düzeylerinde kirleticiye rastlanmıştır. Toprak örnekleri bu kirleticiyi doğal ortamında da degrade etme kabiliyetine sahip bakterilerin izolasyonu için materyal olarak kullanılmıştır. İzole edilen 68 adet bakterinin nitrat redüksiyon testleri yapılarak çalışmada kullanılacak izolatlar seçilmiştir.

Bu doğal izolatların ko-substrat olarak maya özütü içeren minimal besiyerinde yapılan tolerans testi ile çalışmada kullanılacak TNT konsantrasyonları belirlenmiştir. 50 ve 75 ppm olmak üzere iki farklı TNT konsantrasyonunda izolatların biyodegradasyon yetenekleri incelenmiştir. Biyodegradasyon süresince bakteriyel ve abiyotik ortamlardan 0, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda alınan örneklerden spektrofotometrik analizler ile kültürlerdeki nitrit ve nitrat birikimi, bakteriyel hücre gelişimleri ve HPLC analizleri ile TNT miktar azalışı takip edilmiştir. 96 saatlik inkübasyon sonunda kültürlerden alınan örneklerin GC-MS ve TLC analizleri yapılarak parçalanma ürünleri tanımlanmıştır.

AD1, AD2, AD3 ve AD4 izolatları ile minimal besi ortamında gerçekleştirilen bu çalışma 96 saat süren inkübasyon sonunda 50 ve 75 ppm TNT içeren kültürlerde sırasıyla yüzdelerim %46, %35, %68 ve %29; %59, %45, %77 ve %41 olarak saptanmıştır. Abiyotik ortamlarda ise kimyasal degradasyon %16

ve %13 olarak belirlenmiştir. NATO toprak örneğinden izole edilen AD1 ve AD3 izolatlarının yüzdellik parçalama verimlerine bakıldığında Kilis toprak izolatlarına göre TNT toleranslarının daha yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Bu sonuçlara dayanarak TNT üzerindeki en etkin izolatın AD3 olduğu belirlenmiş ve VITEK analizleri sonucunda bu bakteri *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter cloacae*'nin *Bacillus cereus*'a göre TNT üzerindeki etkinliklerinin daha az olduğu saptanmıştır.

Zamana bağlı olarak bakteri hücre gelişimlerinde kontrol gruplarına göre artmalar gözlenmesi bu bakterilerin TNT'yi nitrojen kaynağı olarak kullandığını göstermektedir. Ancak bu artışı zamanla ortamda kalan TNT'nin ve parçalanma ürünlerinin toksik özelliklerinden dolayı bakteri hücre gelişiminde azalmaların takip ettiği tespit edilmiştir.

Biyodegradasyon çalışmaları sırasında zamana bağlı olarak kültürlerdeki pH değişimleri incelenmiştir. Başlangıç pH'nın 7.4 ± 0.1 olduğu kültürlerde inkübasyon sırasında abiyotik ve bakteriyel ortam pH'larının 7.4-7.55 arasında gözlenmesi bakteriyel aktiviteler sonucunda ekstrem bir pH değişiminin söz konusu olmadığını ortaya çıkarmıştır.

İnkübasyon süresini takiben biyodegradasyona bağlı nitrit ve nitrat birikimi olup olmadığı spektrofotometrik analizler ile takip edilmiştir. Bu analizler sonucunda AD1 ve AD3 izolatlarında nitrit oluşumu gözlenirken, AD2 ve AD4 kültürlerinde nitrit saptanmamıştır. AD1 ve AD3 izolatlarının kültürlerinde 0 ve 6. saatler arasında başlayan nitrit oluşumuna abiyotik ortamlarda 24 saat sonra rastlanmıştır. 50 ve 75 ppm TNT içeren minimal besiyerinde AD1 ve AD3 kültürlerinde gözlenen en yüksek nitrit miktarları sırasıyla 0.28 ve 0.47 mg/L; 0.41 ve 0.55 mg/L şeklinde kaydedilmiştir. Nitrat testleri sonunda biyodegradasyon ortamında nitritin nitrate oksidasyonun söz konusu olmadığı belirlenmiştir.

TNT, 2,4-DNT ve 4-ADNT standartları ile stabilize edilmiş GC-MS ve TLC analizleri yapılarak biyodegradasyon sonucunda oluşan parçalanma ürünleri tanımlanmıştır. Bu analizler sonucunda AD1 ve AD3 izolatında 2,4-DNT, 4-ADNT; AD2 ve AD4 izolatlarının kültürlerinde ise 4-ADNT'ye rastlanmış olup abiyotik ortamlarda gerçekleşen kimyasal parçalanmaya rağmen herhangi bir parçalanma

ürünü belirlenememiştir. AD1 ve AD3 izolatlarının TNT'nin biyolojik parçalanmasını aroomatik halka ve bu halkaya bağlı nitrit gruplarının redüksiyonu; AD2 ve AD4 izolatlarının ise sadece benzen halkasına bağlı nitrit gruplarının redüksiyonu şeklinde gerçekleştirdikleri saptanmıştır.

Ülkemizde uluslararası ticareti yapılan TNT, Makine ve Kimya Endüstrisi Kurumu Barutsan Roket ve Patlayıcı Fabrikası Müdürlüğü tarafından üretilmekte olup, yıllık üretim miktarı ve üretim alanlarındaki kirlilik konusunda resmi herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bununla birlikte sınır arazilerimiz göz önünde bulundurulduğunda Hatay'dan Silopi'ye kadar uzanan sınır hattındaki mayınlı topraklar 300 ile 750 metre genişliğinde, 700 km uzunluğunda ve toplam 3.5 milyon dönüm kadar bir yer arz etmektedir. Mardin, Şanlıurfa, Hatay ve Kilis sınır bölgelerindeki yerleşim yerlerini içine almış durumdadır. TNT'nin mayının ana maddesi olması, bu bölgelerdeki TNT kirliliğini olası sonuç olarak karşımıza çıkarmaktadır.

Mayın sızıntılarının araştırılması ve sınır arazilerinin temizlenmesi çalışmalarında biyosensör olarak bakteriler ve transgenik bitkiler kullanılmaktadır. Ancak bakteri hücre gelişiminin TNT kirliliği fazla olan topraklarda yetersiz kalması, transgenik bitkilerin ise gelişimleri açısından zaman zaman tohumlarının püskürtüldüğü arazilerde gübreleme ve sulama faaliyeti gibi gereksimler, bu tarz çalışmalarda gerek bakteriyel gerekse transgenik bitki kullanımını güçlendirmekte ve biyoteknolojik enzimlerin kullanımına yön kazandırmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin izolasyon ve çalışma standardizasyon kolaylığı, bu organizmalara hem hücresel boyutta hem de enzimsel düzeyde çalışılma avantajı sağlamaktadır. Başta nitroredüktaz enzim izolasyonu olmak üzere enzimin çalışma koşullarının optimizasyonu ve biyoreaktör teknolojileri kullanarak, geniş toprak parçalarının TNT kirliliğinden arındırılması mümkün olacaktır. Böylelikle verimli sınır arazileri, organik tarıma açılarak artan nüfusa paralel gelişen besin kıtlığı gibi sorunlardan ülkemizin en az zararlı çıkması sağlanabilecektir.

Bu yöntemlerle sadece TNT ile kirlenmiş sınır topraklarımızın değil aynı zamanda üretim tesislerinde kurulabilecek büyük ölçekli biyoreaktörler ile üretim

tesislerindeki havanın temizlenmesi sonucu işçilerin bu kimyasala maruz kalması ve toprağa sızıntıların minimize edilmesi sağlanabilecektir.

Degradasyon çalışmalarında her ne kadar sonuçlar çalışılan izolatin türüne ve irdelenen faktörlere göre farklılık teşkil etse de temelde hedef bakteriyel faaliyetin polinitro grupları parçalayarak doğaya tabii bir arıtım süreci kazandırmasıdır. Dünyada bu tarz çalışmalar yoğunlukla devam etse de çalışmamız Türkiye şartlarında bir ilk arz etmektedir. İlerleyen dönemlerde benzer çalışmalara ışık tutacağı inancını taşıdığımız bu çalışmanın benzer yönde ilerleyecek diğer çalışmalara referans olabilecektir.

KAYNAKLAR

- AKHAVAN, J., 2004. The Chemistry of Explosives. Royal Society of Chemistry. Royal Society of Chemistry (Great Britain), 180s.
- AKOĞLU, A. Ş., 2006. Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 1-68.
- AL-ABSI A, 2008. Nitrate contamination of ground water and Methemoglobinemia in Gaza Strip. J. Al-Aqsa Univ., 12: 1-14.
- ATSDR, 1995. U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 2,4,6-trinitrotoluene. Georgia, 1-208.
- ATSDR, 2010. U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft Toxicological Profile for RDX. Georgia, 1-215.
- BEHREND, C., and HEESCHE-WAGNER, K., 1999. Formation of Hydride-Meisenheimer Complexes of Picric Acid (2,4,6-trinitrophenol) and 2,4-Dinitrophenol during Mineralization of Picric Acid by *Nocardioides* sp. Strain CB 22-2. . Applied and Environmental Microbiology, 65: 1372-1377.
- BHATTACHARYYA, D., GARRISON, K. L., and GRIEVES, R. B., 1976. Membrane Ultrafiltration of Nitrotoluenes From Industrial Wastes. Proceedings of the 31st Industrial Waste Conference, Purdue University, 139-148.
- BOOPATHY, R, and KULPA, C. F., 1992. Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B Strain) isolated from an anaerobic digester. Current Microbiology, 25: 235-241.
- BOOPATHY, R., KULPA, C. F., and WILSON, M ., 1993. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Desulfovibrio* sp . (B strain). Applied Microbial Biotechnology, 39: 270-275.

- BOOPATHY, R., WILSON, M., MONTEMAGNO, C. D., MANNING, Jnr, J. F., and KULPA, C. F., 1994. Biological Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated from TNT-Contaminated Soil. *Bioresource Technology*, 47: 19-24.
- BOOPATHY, R., GURGAS, M., ULLIAN, J., and MANNING, J. F., 1998. Metabolism of Explosive Compounds by Sulfate-Reducing Bacteria. *Current Microbiology*, 37: 127-131.
- BOOPATHY, R., 2000. Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46: 29-36.
- BRODER, M. F., and WESTMORELAND, R. A., 1998. An estimate of soils contaminated with secondary explosives. Report SFIM-AEC-ET-CR-98002, Tennessee Valley Authority, Alabama.
- BURTON, D. T., TURLEY, S. D., and PETERS, G.T., 1994. The acute and chronic toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere*, 29: 567-579.
- CABALLERO, A., ESTEVE-NÚÑEZ, A., ZYLSTRA, G. J., and RAMOS, J. L., 2005. Assimilation of Nitrogen from Nitrite and Trinitrotoluene in *Pseudomonas putida* JLR11. *Journal of Bacteriology*, 187: 396-399.
- ČĚNAS, N., NEMEIKAITĖ-ČĚNIENĖ, A., MAROZIENĖ, A., ŠARLAUSKAS, J., VILUTIENĖ, V., and BAUBLYS, J., 2001. Explosives as toxic environmental pollutants: The level of contamination, toxicity, and its mechanisms. *EU Excert*, 1-8.
- CHANG, C. S., KIM, H. Y., KANG, Y. M., BAE, K. S., and SONG, H. G., 2002. Transformations of 2,4,6-trinitrotoluene in Various Conditions by *Klebsiella* sp. Strain C1 Isolated from Activated Sludge. *The Journal of Microbiology*, 40: 193-198.
- CHARLES, P. T., ADAMS, A. A., HOWEL, P. B., TRAMMELL, S. A., DESCHAMPS, J. R., and KUSTERBECK, A. W., 2010. Fluorescence-based Sensing of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) Using a Multi-channelled Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Microimmunosensor. *Sensors*, 10: 876-889.

- CHO, Y. S., LEE, B. U., and OH, K. H., 2008. Simultaneous degradation of nitroaromatic compounds TNT, RDX, atrazine, and simazine by *Pseudomonas putida* HK-6 in bench-scale bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 1211-1217.
- CLAUS, H., BAUSINGER, T., LEHMLER, I., PERRET, N., FELLS, G., DEHNER, U., PREUB, J., and KÖNIG, H., 2007. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation*, 18: 27-35.
- ÇAKIR, A., 2010. Atık Sulardan Nitrobenzen Gideriminin Araştırılmasında Uzun Havalandırmalı ve Kesikli Aktif Çamur Sistemlerinin Kullanılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 1-91.
- DAĞÇİMEN, A., 2006. Patlama Tasarımı İçin Geliştirilen Bir Bilgisayar Programı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 131s.
- DANIELS, J. I., and KNEZOVICH, J. P., 1994. Human Health Risks From TNT, RDX and HMX in Environmental Media and Consideration of The U.S. Regulatory Environment. Lawrence Livermore National Laboratory, 1-17.
- DAPRATO, R. C., ZHANG, C., SPAIN, J. C., and HUGHES, J. B., 2005. Modeling aerobic bioremediation of 2,4-dinitrotoluene in a bioslurry reactor. *Environmental Engineering Science*, 22: 676-688.
- DAVIS, T. L., 1943. *The Chemistry of Powder and Explosives*. Volume II. Angriff Press, Hollywood, Ca., 490s.
- DE LORME, M., 2008. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by Ruminant Organisms. Doctor of Philosophy Thesis in Oregon State University, 1-104.
- DIWANI, G. E., RAFIE, S. E., and HAWASH, S., 2009. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in aqueous solution by ozonation and multi-stage ozonation biological treatment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6(4): 619-628.
- DUQUE, E., HAIDOUR, A., GODOY, F., and RAMOS, J. L., 1993. Construction of a *Pseudomonas* Hybrid Strain That Mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology*, 175: 2278-2283.

- DURSUN, H., 2007. Determination of the Postexplosion Residues of Nitro Group Containing Explosives in Soil with Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Thermal Energy Analyser. Master of Science Thesis in Chemistry Department in University of Middle East Technical University, Ankara, 1-71.
- EPA, 1989. U. S. Environment Protection Agency. Trinitrotoluene Health Advisory. Office of Drinking Water, Washington, DC: 133-137.
- EPA, 2002. U. S. Environment Protection Agency. Handbook on the Management of Ordnance and Explosives at Closed, Transferring, and Transferred Ranges and Other Sites. Washington, DC: 1-222.
- EPA, 2008. U. S. Environment Protection Agency. Drinking Water Health Advisory for 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene. Washington, DC: EPA Document Number: 822-R-08-010.
- EPA, 2011. U. S. Environment Protection Agency. Emerging Contaminants – 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Washington, DC: EPA 505-F-10-010.
- ESTEVE-NÚÑEZ, A., CABALLERO, A., and RAMOS, J. L., 2001. Biological Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 335-352.
- FALLAHI, S., HABIBI-REZAEI, M., KHAYAMI, M., and HEYDARI, R., 2007. Soil Decontamination of 2, 4, 6-Trinitrotoluene by Alfalfa (*Medicago sativa*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(24): 4406-4412.
- FIGLIOLA, P. D., and SPAIN, J. C., 1997. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2007-2015.
- FLEISCHMANN, T. J., WALKER, K. C., SPAIN, J. C., HUGHES, J. B., and CRAIG, A. M., 2004. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT by bovine ruminal microbes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314: 957-963.
- FORDHAM, S., 1980. High Explosives and Propellants. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford OX3 0BV, England, 207s.

- FRENCH, C. E., NICKLIN, S., and BRUCE, N. C., 1998. Aerobic Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. . Applied and Environmental Microbiology, 64: 2864-2868.
- GALLAGHER, E. M., 2010. Anaerobic Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): Molecular Analysis of Active Degraders and Metabolic Pathways. Doctor of Philosophy Thesis in The State University of New Jersey, U.S.A, 1-115.
- GORONTZY, T., DRZYZGA, O., KAHL, M. W., BRUNS-NAGEL, D., BREITUNG, J., LOEW, E. V., and BLOTEVOGE, K. H., 1994. Microbial Degredation of Explosives and Related Compounds. Critical Reviews in Microbiology, 20(4): 265-284.
- GUTTERMAN, D. D., 2007. Combating Nitrate Tolerance: A Novel Endogenous Mechanism. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 27:1673-1676.
- HADERLEIN, S., WEISSMAHR, K. W., and SCHWARZENBACH, R. P., 1996. Specific Adsorption of Nitroaromatic Explosives and Pesticides to Clay Minerals. Environ. Sci. Technol., 30: 612-622.
- HAN, S., 2008. In Situ Bioremediation and Natural Attenuation of Dinitrotoluenes and Trinitrotoluene. Doctor of Philosophy Thesis in Georgia Institute of Technology, 1-238.
- HANNINK, N., ROSSER, S. J., FRENCH, C. E., BASRAN, A., MURRAY, J. A. H., NICKLIN, S., and BRUCE, N. C., 2001. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. Nature Biotechnology, 19: 1168-1172.
- HANNINK, N. K., ROSSER, S. J., FRENCH, C. E., and BRUCE, N. C., 2003. Uptake and Metabolism of TNT and GTN by Plants Expressing Bacterial Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. Water, Air, and Soil Pollution, 3: 251-258.
- HARRELL-BRUDER, B., and HUTCHINS, K. L., 1995. Seizures caused by ingestion of composition C-4. Ann. Emerg. Med. 26: 746-748.

- HAWARI, J., BEAUDET, S., HALASZ, A., THIBOUTOT, S., and AMPLEMAN, G., 2000. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 605-618.
- HERRMANN, S., and POPOVIĆ, M. K., 2007. Mineralization and Uptake of TNT by Microorganisms: Effect of Pretreatment with Alkali. *Central European Journal of Energetic Materials*, 4(4): 45-58.
- HQDA, 1990. Headquarters, Department of the Army. *Military Explosives*. Washington, DC., 1-355.
- HO, E. M., CHANG, H. W., KIM, S. I., KAHNG, H. Y., and OH, K. H., 2004. Analysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)-Inducible Cellular Responses and Stress Shock Proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Current Microbiology*, 49: 346-352.
- HOEHAMER, C. F., WOLFE, N. L., and ERIKSSON, K. E. L., 2006. Differences in the Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) Between Wild and Axenically Grown Isolates of *Myriophyllum aquaticum*. *International Journal of Phytoremediation*, 8: 107-115.
- HUMMEL, S. G., 2005. Nitroglycerin: Exploding Biology. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Spring 77:222, 1-8.
- IGNARRO, L. J., 2002. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *PNAS*, 99: 7816-7817.
- JAIN, R. K., KAPUR, M., LABANA, S., LAL, B., SARMA, P. M., BHATTACHARYA, D., and THAKUR, I. S., 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science*, 89: 101-112.
- JECFA, 1995. 44th The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. TRS 913-JECFA 59/20.
- JOHNSON, M. S., 1998. Development and Application of Non-Traditional Vertebrate Models to Investigate Terrestrial Ecological Risk to 2,4,6-trinitrotoluene Exposure. Doctor of Philosophy Thesis in Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1-137.

- KALAFUT , T., WALES, M. E., RASTOGI, V. K., NAUMOVA, R. P., ZARIPOVA, S. K., and WILD, J. R., 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Curr. Microbiol*, 36: 45-54.
- KALDERIS, D., JUHASZ, A. L., BOOPATHY, R., and COMFORT, S., 2011. Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 83: 1407–1484.
- KHACHATRYAN, G. E., MKRTCHYAN, N. I., SIMONYAN, N. V., KHACHATRYAN, T. V., and TATIKYAN, S. SH., 2000. Two unidentified aerobic bacterial strains that transform 2,4,6-trinitrotoluene. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 393-395.
- KIM, H. Y., and SONG, H. G., 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnology letters*, 22: 969-975.
- KIM, H-Y., BENNETT, G., and SONG, H-G., 2002. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Klebsiella* sp. isolated from activated sludge. *Biotechnology Letters*, 24: 2023–2028.
- KRAMER, D. A., 2004. Explosives. U.S. Geological Survey Minerals Yearbook, 24: 1-6.
- KUBOTA, N., 2002. Propellants and Explosives: Thermochemical Aspects of Combustion. Copyright WILEY-VCH GmbH, Weinheim, Germany, 245s.
- KUBOTA, A., MAEDA, T., NAGAFUCHI, N., KADOKAMI, K., and OGAWA, H. I., 2008. TNT biodegradation and production of dhydroxylaminonitrotoluene by aerobic TNT degrader *Pseudomonas* sp. strain TM15 in an anoxic environment. *Biodegradation*, 19: 795-805.
- KULKARNI, M., and CHAUDHARI, A., 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*, 85: 496-512.
- KURINENKO, B. M., YAKOVLEVA, G. Y., DENIVAROVA, N. A., and ABREĪMOVA, Y. V., 2003. Specific Toxic Effects of 2,4,6-trinitrotoluene on *Bacillus Subtilis* SK1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39: 275-278.

- LEE, T., 1996. Trinitrotoluene (TNT) Biotransformation Pathways Under Aerobic and Anaerobic Condition. *Kor. Soc. Environ. Eng.*, 1: 81-87.
- LEE, B-U., CHO, Y-S., PARK, S-C., and OH, K-H., 2009. Enhanced Degradation of TNT by Genome-Shuffled *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5. *Curr. Microbiol.*, 59: 346-351.
- LEWIS, T. A., GOSZCZYNSKI, S., CRAWFORD, R. L., KORUS, R. A., and ADMASSU, W., 1996. Products of Anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) Transformation by *Clostridium bifermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4669-4674.
- LEWIS, T. A., EDERER, M. M., CRAWFORD, R. L., and CRAWFORD, D. L., 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18: 89-96.
- LITAKE, G. M., JOSHI, S. G., and GHOLE, V. S., 2005. TNT biotransformation potential of the clinical isolate of *Salmonella typhimurium*- potential ecological implications. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 9: 29-34.
- MAEDA, T., KADOKAMI, K., and OGAVA, H. I., 2006. Characterization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-Metabolizing Bacteria Isolated from TNT-Polluted Soils in the Yamada Green Zone, Kitakyushu, Japan. *Journal of Environmental Biotechnology*, 6: 33-39.
- MALEKI, N., 1994. Treatment and Biodegradation of High Explosives A Literature Review. Doctor of Philosophy Thesis in University of California, Los Angeles, 1-76.
- MALONEY, S. W., ADRIAN, N. R., HICKEY, R. F., and HEINE, R. L., 2002. Anaerobic treatment of pinkwater in a fluidized bed reactor containing GAC. *Journal of Hazardous Materials* 92: 77-88.
- MARTIN, J. L., COMFORT, S. D., SHEA, P. J., and DRÏJBER, R. A., 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can. J. Microbiol.*, 43: 447-455
- MATHIEU, J., and STUCKI, H., 2004. Military High Explosives. *Chimia*, 58: 383-389.

- McCORMICK, N. G., FEEHERRY, F. E., and LEVINSON, H. S., 1976. Microbial Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and Other Nitroaromatic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 949-958.
- MEENAKSHISUNDARAM, D., MEHTA, AM., PEHKONEN, S., and MALONEY, S. W., 1999. Electrochemical Reduction of Nitro-Aromatic Compounds. US Army Corps of Engineers, 1-72.
- MIDGLEY, L. P., JOHNSON, M. S., and JANUS, E. R., 2000. Wildlife toxicity assessment for nitroglycerin. Report 39-EJ-1138-01F, U.S. Army Center for Health Promotion and Preventative Medicine, Maryland.
- MUELLER, W. F., BEDELL, G. W., SHOJAEI, S., and JACKSON, 1995. Bioremediation of TNT Wastes by Higher Plants. Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research. 222-230.
- NAM, S-I., 1997. On-Site Analysis of Explosives in Soil Evaluation of Thin-Layer Chromatography for Confirmation Analyte Identity. Cold Regions Research and Engineering Laboratory, Special Report 97-21.
- NEHRENHEIM, E., and ODLARE, M., 2010. Treatment of Explosives Contaminated Water by Using Pine Bark a Batch Process-Potentials and Kinetics. School of Mälardalen University, Sustainable Development of Society and Technology, Box. 883, SE-721 23 Västerås, Sweden.
- NYANHONGO, G. S., SCHROEDER, M., STEINER, W., and GUEBITZ, G. M., 2005. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(2): 53-69.
- NYANHONGO, G. S., ERLACHER, A., SCHROEDER, M., and GUEBITZ, G. M., 2006. Enzymatic immobilization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) biodegradation products onto model humic substances. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1197-1204.
- NYANHONGO, G. S., AICHERNIG, N., ORTNER, M., STEINER, W., and GUEBITZ, G. M., 2008. A Novel Environmentally Friendly 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) Based explosive. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 27: 107-116.

- NYANHONGO, G. S., AICHERNIG, N., ORTNER, M., STEINER, W., and GUEBITZ, G. M., 2009. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 285-290.
- OH, K. H., and KIM, Y. J., 1998. Degradation of Explosive 2,4,6-trinitrotoluene by s-Triazine Degrading Bacterium Isolated from Contaminated Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 702-708.
- OH, B. T., SARAH, G., SHEA, P. J., DRIJBER, R. A., and COMFORT, S. D., 2000. Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a *Pseudomonas* enzyme assay. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 149-158.
- OH, B., SHEA, P. J., DRIJBER, R. A., VASILYEVA, G. K., SARATH, G., 2003. TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *USDA Agricultural Research Service*, 14: 309-319.
- QASIM, M. M., MOORE, B., TAYLOR, L., HONEA, P., GORB, L., and LESZCZYNSKI, J., 2007. Structural Characteristics and Reactivity Relationships of Nitroaromatic and Nitramine Explosives – A Review of Our Computational Chemistry and Spectroscopic Research. *Int. J. Mol. Sci.*, (8): 1234-1264.
- PAK, J. W., KNOKE, K. L., NOGUERA, D. R., FOX, B. G., and CHAMBLISS, G. H., 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by Purified Xenobiotic Reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4742-4750.
- PARK, C., KIM, T-H., KIM, S., KIM, S-W., LEE, J., and KIM, S-H., 2003. Optimization for Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95: 567-571.
- PASTI-GRIGSBY, M. B., LEWIS, T. A., CRAWFORD, D. L., and CRAWFORD R. L., 1996. Transformation of 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) by *Actinomycetes* Isolated from TNT-Contaminated and Uncontaminated Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1120-1123.

- PERES, C. M., and AGATHOS, S. N., 2000. Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation. *Biotechnol. Annual. Rev.*, 6: 197-220.
- PREUSS, A., FIMPEL, J., and DIEKERT, G., 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.*, 159: 345-353.
- PSILLAKIS, E., NAXAKIS, G., and KALOGERAKIS, N., 2000. Detection of TNT-Contamination in Spiked-Soil Samples Using SPME and GC/MS. *Global Nest: The Int. J.*, 2: 227-236.
- POPESKU, J. T., SINGH, A., ZHAO, J-S., HAWARI, J., and WARD, O. P., 2003. High TNT-transforming activity by a mixed culture acclimated and maintained on crude-oil-containing media. *Can. J. Microbiol.*, 49: 362-366.
- RAFII, F., RUSELER-VAN EMBDEN, J. G. H., and ASAD, Y. F., 1997. Azoreductase and Nitroreductase Activity of Bacteria in Feces from Patients with an Ileal Reservoir. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(1): 133-136.
- RAHAL, A. G., and MOUSSA, L. A., 2011. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. *Aust. J. Basic and Appl. Sci.*, 5(2): 8-17.
- RAJAN, J., VALLI, K., PERKINS, R. E., SARIASLANI, F. S., BARNS, S. M., REYSENBACH, A-L, REHM, S., EHRINGER, M., and PACE, N. R., 1996. Mineralization of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid): characterization and phylogenetic identification of microbial strains. *Journal of Industrial Microbiology*, 16: 319-324.
- RAMOS, J. L., GONZÁLEZ-PÉREZ, M. M., CABALLERO, A., and DILLEWIJN, P. V., 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 275-281.
- ROBERTSON, B. K., and JJEMBA, P. K., 2005. Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere*, 58: 263-270.
- RODGERS, J. D., 2000. Electrochemical Treatment of Recalcitrant Waste: A study of Chlorophenols and Nitroaromatic Compounds. Doctor of Philosophy Thesis in University of Guelph, Canada, 1-222.

- ROLDÁN, M. D., PÉREZ-REINADO, E., CASTILLO, F., and MORENO-VIVIÁN, C., 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 474-500.
- SAMANTA, S. K., BHUSHAN, B., CHAUHAN, A., and JAIN, R. K., 2000. Chemotaxis of *Ralstonia* sp. SJ98 toward Different Nitroaromatic Compounds and Their Degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269: 117-123.
- SCHACKMANN, A., and MULLER, R., 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 809-813.
- SCHUSTER, R., and GRATZFELD-HUESGEN, A., 1993. HPLC Analysis of Explosive Constituents in Soil Samples. *Agilent Technologies*, 5091-7626E.
- SEMBRIES, S., and CRAWFORD, R. L., 1997. Production of *Clostridium bifermentans* Spores as Inoculum for Bioremediation of Nitroaromatic Contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2100-2104.
- SERVENT, D., DELAFORGE, M., DUCROCQ, C., MANSUY, D. and LENFANT, M., (1989) Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163: 1210-1216.
- SETH-SMITH, H. M. B., 2002. Microbial Degredation of RDX. Doctor of Philosophy Thesis in University of Cambridge, England, 1-139.
- SHEIKH, K. S., 2006. Kinetics of 2,4,6-trinitrotolene Reduction by *Pseudomonas putida*. Master Thesis in University of Ohio, USA, 1-89.
- SINGH, J., COMFORT, S. D., HUNDAL, L. S., and SHEA, P. J., 1998. Long-term RDX sorption and fate in oil. *J. Environ. Qual.*, 27:572-577.
- SPAIN, J. C., 1995. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 523-555.
- SPRINGER, J. C., NICULESCU-DUVAZ, I., 2002. Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Anticancer Drug Development*. Chapter 8: 137-155.

- STENUIT, B., EYERS, L., ROZENBERG, R., HABIB-JIWAN, J-L., and AGATHOS, S. N., 2006. Aerobic Growth *Escherichia coli* with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the Sole Nitrogen Source and Evidence of TNT Denitration by Whole Cells and Cell-Free Extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7945-7948.
- SÜRÜCÜOĞLU, S., 2003. Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 300-310.
- TOPE, A. M., JAMIL, K., and BAGGI, T. R., 1999. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) By Immobilized And Resting Cells of *Arthrobacter* sp. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2: 3-9.
- TOPE, A. M., and JAMIL, K., 2000. Isolation of TNT Tolerant *Pseudomonas* Species (Strain KA) from TNT Contaminated Soil-Biotransformation of TNT. *Indian Institute of Chemical Technology*, 500 007: 141-145.
- TORRES, S. N. C., 2005. Improved Detection of TNT Using SPME-TEEM-GC/MS Mode Immersion in Water and Soil. Master of Science Thesis in University of Puerto Rico, Mayaguez Campus, 1-96.
- TRAVIS, E. R., HANNINK, N. K., VAN DER GAST, C. J., THOMPSON, I. P., ROSSER, S. J., and BRUCE, N. C., 2007. Impact of Transgenic Tobacco on Trinitrotoluene (TNT) Contaminated Soil Community. *Environ. Sci. Technol.*, 41: 5854-5861.
- ULLAH, H., SHAH, A. A., HASAN, F., and HAMEED, A., 2010. Biodegradation of Trinitrotoluene by Immobilized *Bacillus* SP. YRE1. *Pak. J. Bot.*, 42(5): 3357-3367.
- USACHPPM, 2005. U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine. Wildlife Toxicity Assessment for 2-Amino-4,6-Dinitrotoluene and 4-Amino- 2,6-Dinitrotoluene. Document No: 39-EJ-1138-01D.
- USTAÇELEBİ, Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1339s.

- ÜZER, A., 2004. Bazı Nitrofenollerin Temel ve Türev Spektrofotometrik Analizi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1-77.
- VANDERBERG, L. A., PERRY, J. J., and UNKEFER, P. J., 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43: 937-945.
- VIKESLAND, P. J., LOVE, N. G., CHANDRAN, K., FISS, E. M., REBODOS, R., ZAKLIKOWSKI, A. E., DIGIANO, F. A., and FERGUSON, B., 2007. Seasonal Chlorination Practices and Impacts to Chloraminating Utilities. American Water Works Association, 168s.
- VORBECK, C., LENKE, H., FISCHER, P., SPAIN, J. C., and KNACKMUSS, H-J, 1994. Identification of a Hydride-Meisenheimer Complex as a Metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* Strain. Journal of Bacteriology, 176: 932-934.
- WALKER, J. E., and KAPLAN, D .L., (1992). Biological Degradation of Explosives and Chemical Agents. Biodegradation, 3: 369-385.
- WANG, C. Y., BHADRA, R., and HUGHES, J. B., 1997. Rapid separation of reduction products of 2,4,6-trinitrotoluene using TLC. Biotechnology Techniques, 11: 519-521.
- WHITE, G., and SNAPE, J., 1993. Microbial cleavage of nitrate esters: defusing the environment. Journal of General Microbiology, 139: 1947-1957.
- WILLIAMS, R. T., ZIEGENFUSS, P. S., and SISK, W. E., 1992. Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. J. Ind. Microbiol., 9: 137-144.
- WILLIAMS, R. E., and BRUCE N. C., 2002. 'New uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. Microbiology, 148: 1607–1614.
- WON, W. D., HECKLY, R. J., GLOVER, D. J., and HOFFSOMMER, J. C., 1974. Metabolic Disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Microbiology, 27: 513-516.

- XIANG, X., 2001. Treatment of Trinitrotoluene (TNT)-contaminated Wastewater in Constructed Wetland. Doctor of Philosophy Thesis in München Technical University, 1-119.
- YANG, X., ZHAO, X., and HWANG, H-M., 2007. Phototransformation of 2,4,6-trinitrotoluene: Sensitized by riboflavin under different irradiation spectral range. *Journal of Hazardous Materials*, 143: 271-276.
- YASIN, M., SHAH, A. A., HAMEED, A., AHMED, S., ve HASAN, F., 2008. Use of Microorganisms for the Treatment of Trinitrotoluene (TNT) Containing Effluents. *J. Chem. Soc. Pak.*, 30: 442-448.
- ZARIPOV, S. A., NAUMOV, A. V., SUVOROVA, E. S., GARUSOV, A. V., and NAUMOVA, R. P., 2004. Initial Stages of 2,4,6-trinitrotoluene Transformation by Microorganisms. *Microbiology*, 73: 398-403.
- ZHANG, C., and BENNETT, G. N., 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 600-618.

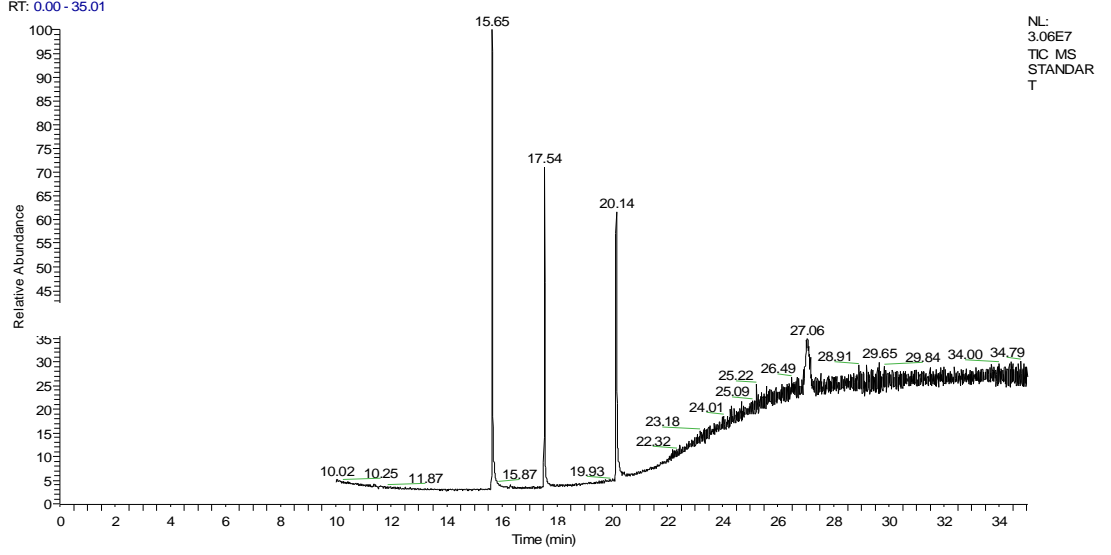
www.onlineethics.org

ÖZGEÇMİŞ

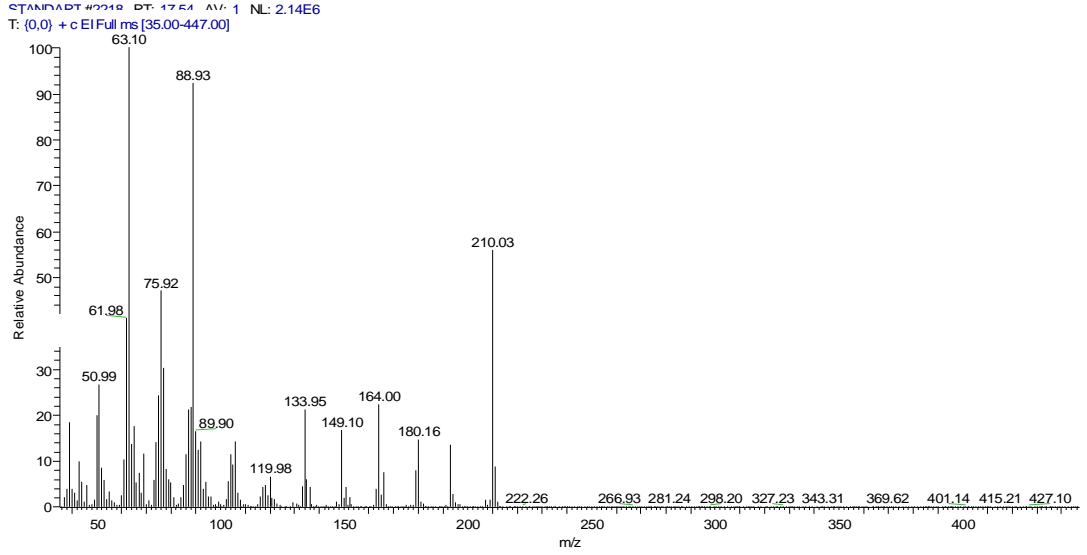
1981 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programını tamamladı. Aynı yıl içerisinde Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Doktora öğrenimine başladı.

EKLER

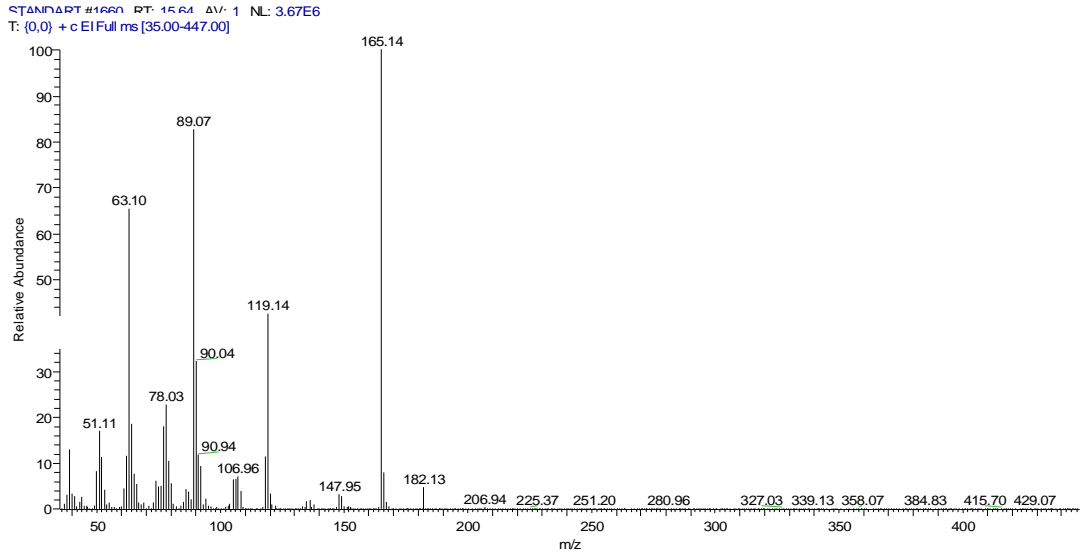
EK 1. Standart çözeltideki TNT, 2,4-DNT ve 4-ADNT'nin GC-MS sonuçları



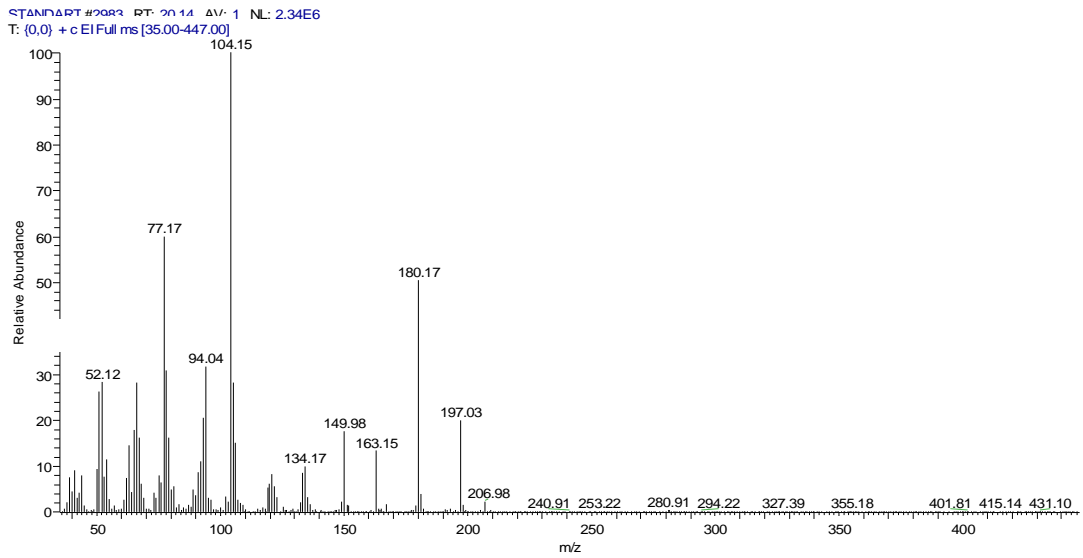
EK 2. Standart çözeltideki TNT'nin kütle spektrumu



EK 3. Standart çözeltideki 2,4-DNT'nin kütle spektrumu

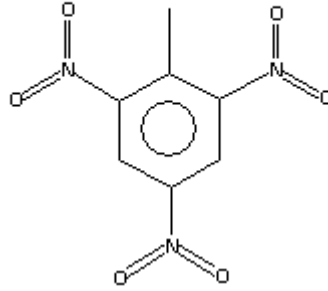


EK 4. Standart çözeltideki 4-ADNT'nin kütle spektrumu



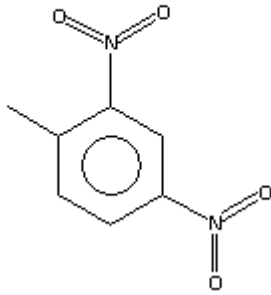
EK 5. TNT ve parçalama ürünlerinin kimyasal yapıları ve GC-MS' deki alkonma zamanları (Retention times: RT)

Benzene, 2-methyl-1,3,5-trinitro-
Formula C₇H₅N₃O₆, Mw 227, CAS# 118-96-7, Entry# 24354
Toluene, 2,4,6-trinitro-



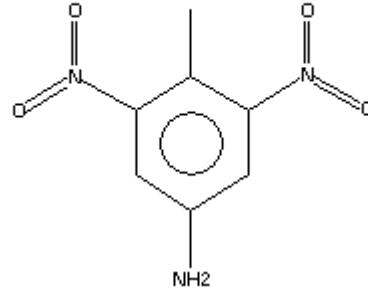
TNT
RT: 17.54

Benzene, 1-methyl-2,4-dinitro-
Formula C₇H₆N₂O₄, Mw 182, CAS# 121-14-2, Entry# 21284
Toluene, 2,4-dinitro-



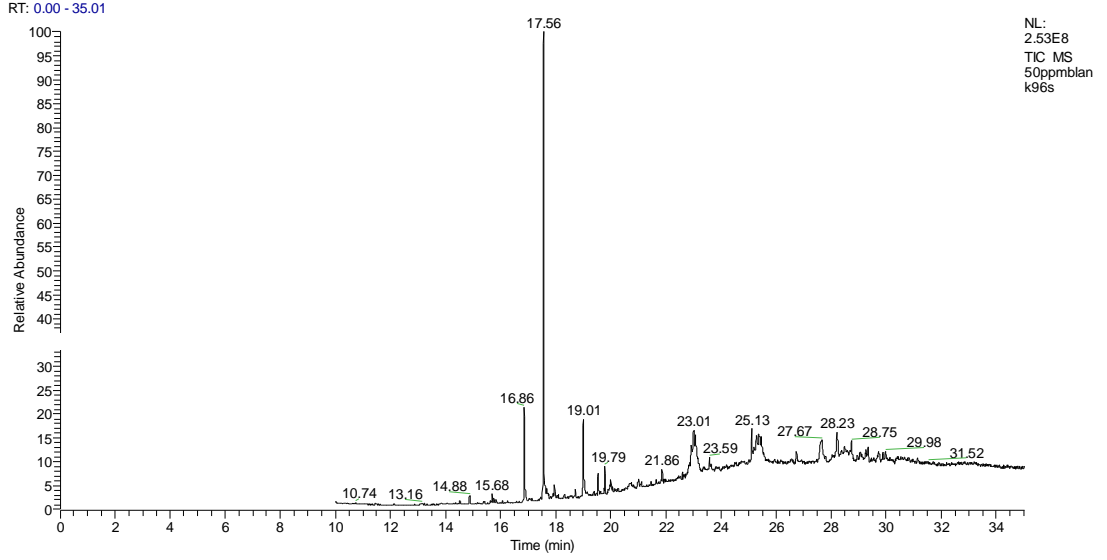
2,4-DNT
RT: 15.65

p-Toluidine, 3,5-dinitro-
Formula C₇H₇N₃O₄, Mw 197, CAS# 19406-51-0, Entry# 65896
Benzenamine, 4-methyl-3,5-dinitro-

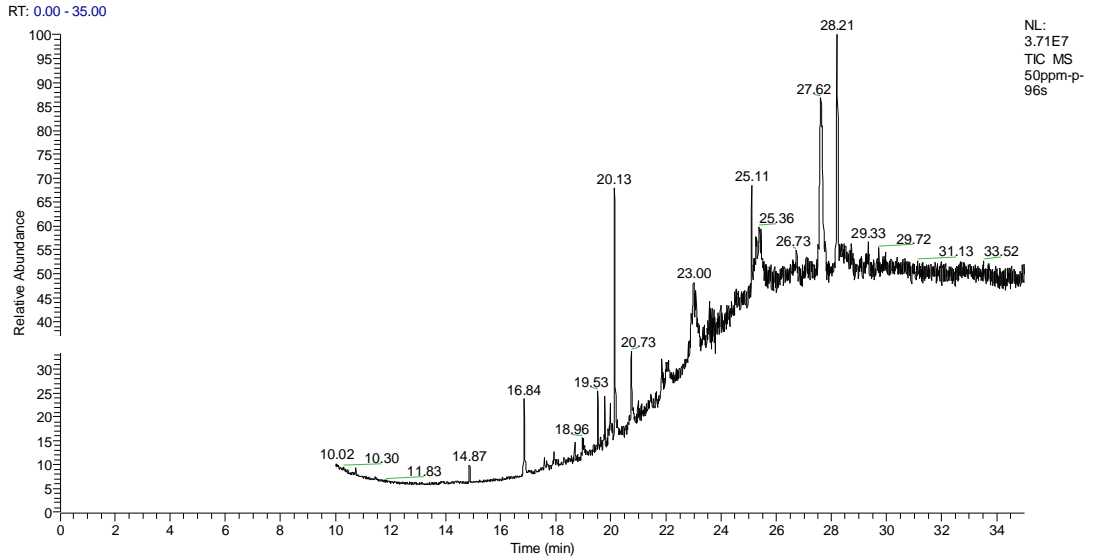


4-ADNT
RT: 20.14

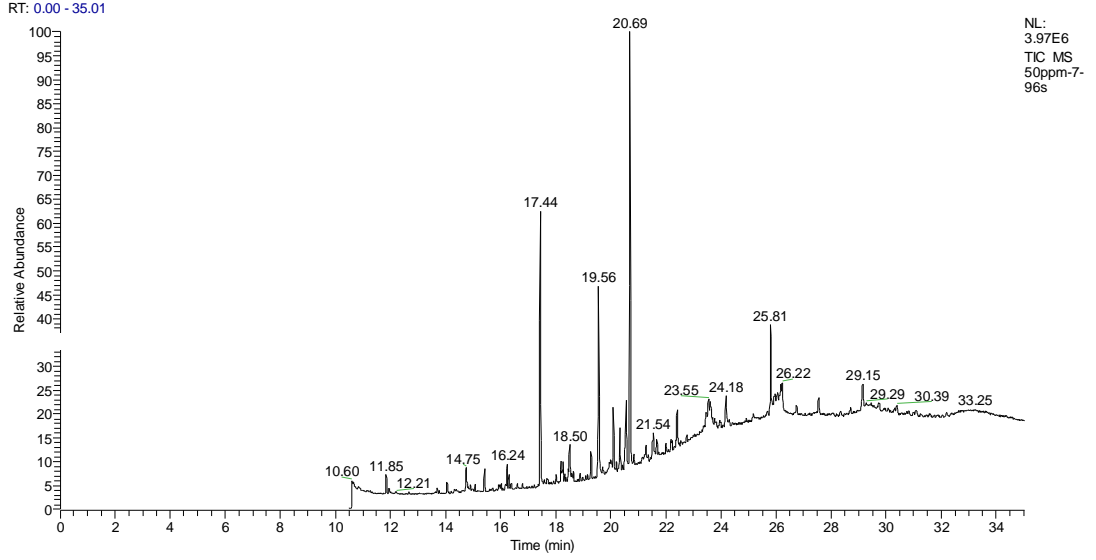
EK 6. 50 ppm TNT içeren abiyotik kültürün GC-MS sonucu



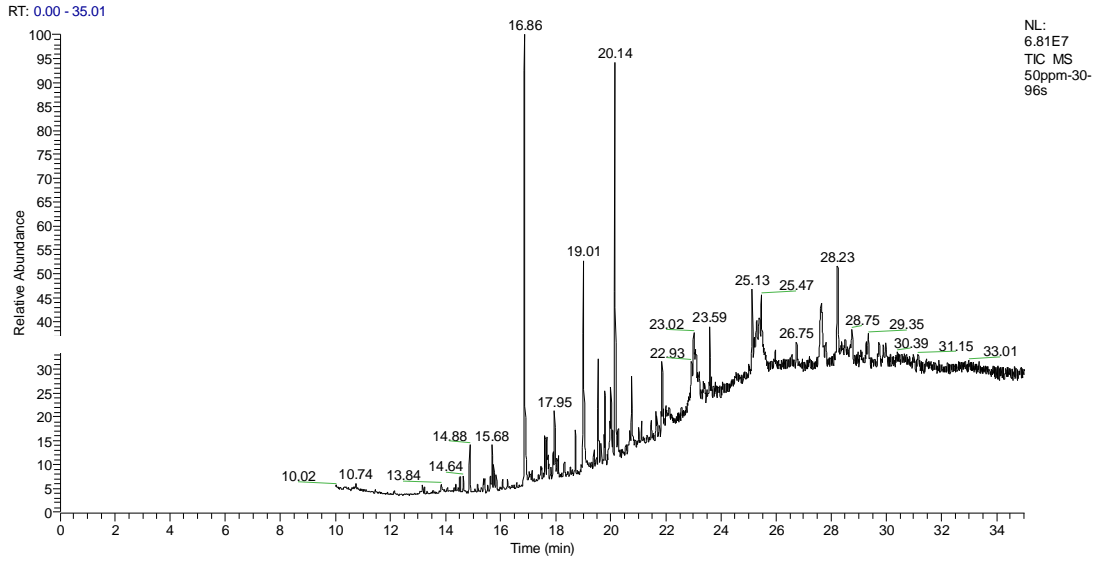
EK 7. 50 ppm TNT içeren AD1 kültürünün GC-MS sonucu



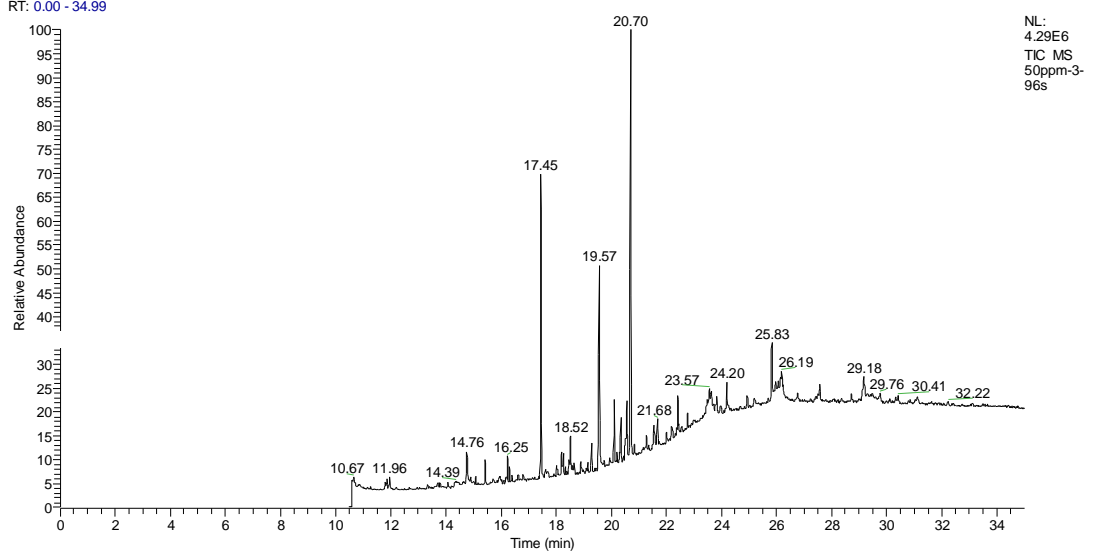
EK 8. 50 ppm TNT içeren AD2 kültürünün GC-MS sonucu



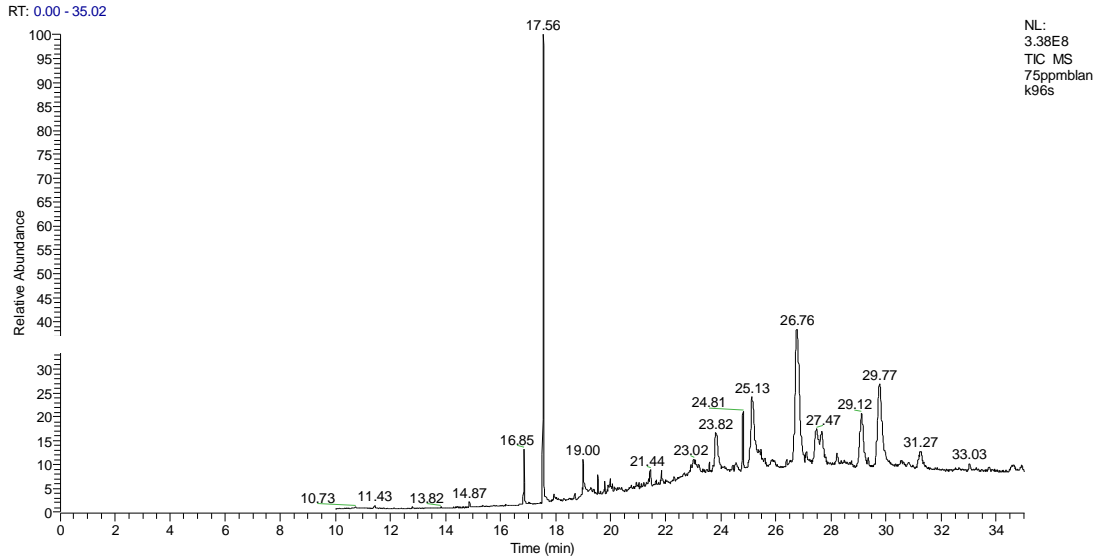
EK 9. 50 ppm TNT içeren AD3 kültürünün GC-MS sonucu



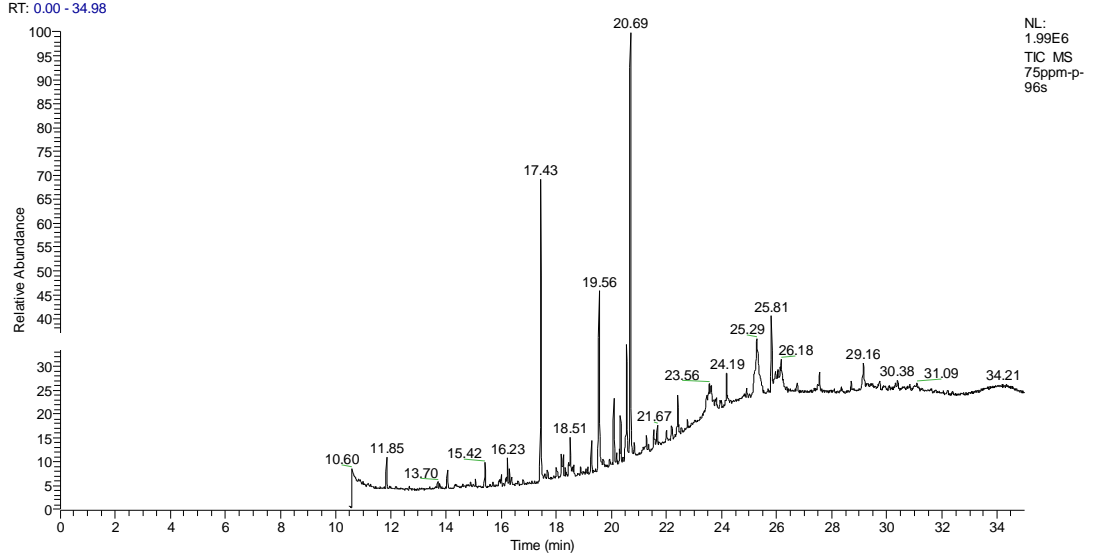
EK 10. 50 ppm TNT içeren AD4 kültürünün GC-MS sonucu



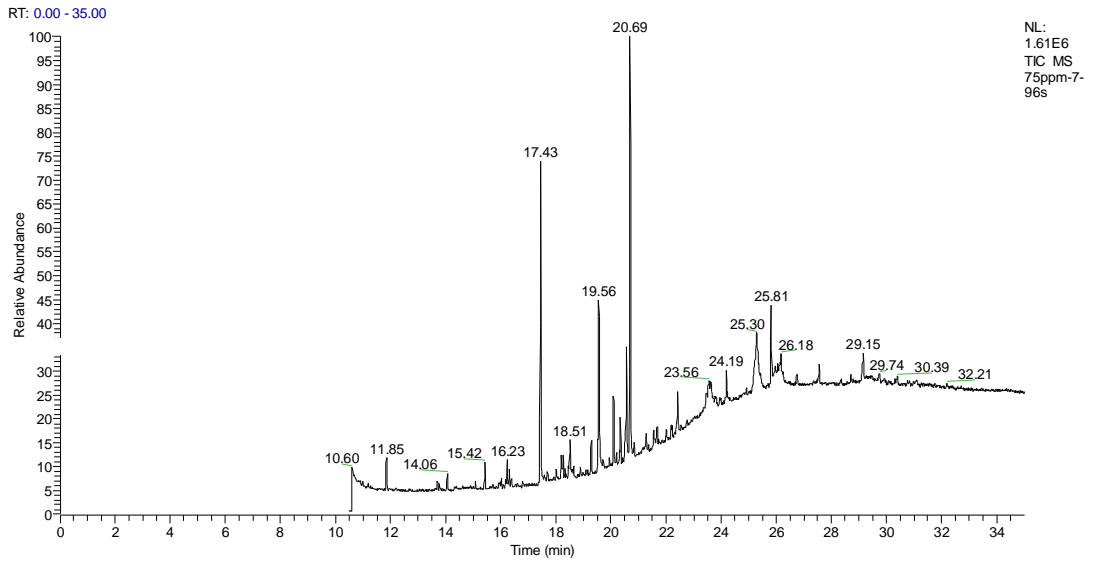
EK 11. 75 ppm TNT içeren abiyotik kültürün GC-MS sonucu



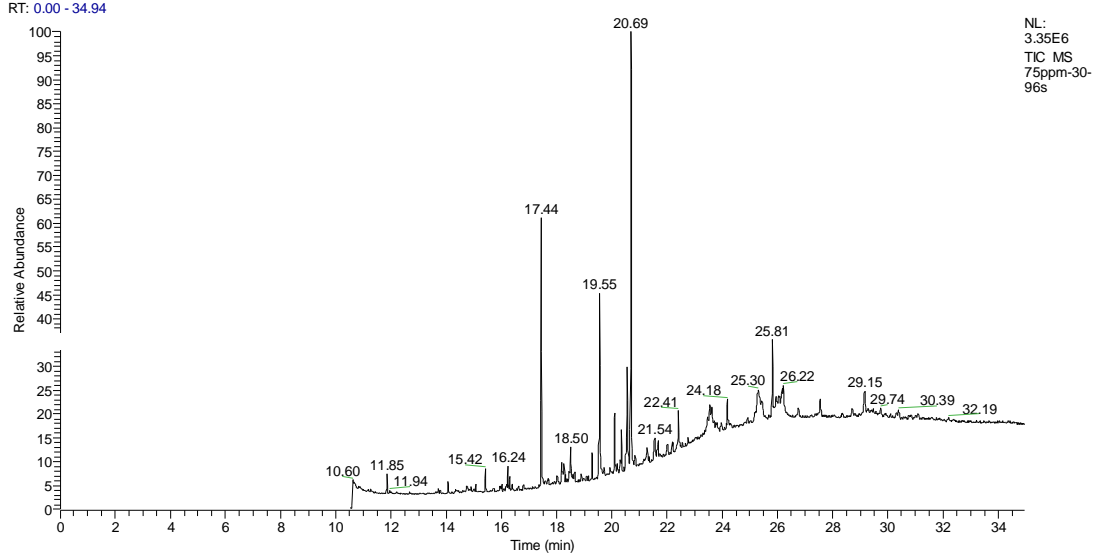
EK 12. 75 ppm TNT içeren AD1 kültürünün GC-MS sonucu



EK 13. 75 ppm TNT içeren AD2 kültürünün GC-MS sonucu



EK 14. 75 ppm TNT içeren AD3 kültürünün GC-MS sonucu



EK 15. 75 ppm TNT içeren AD4 kültürünün GC-MS sonucu

