

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN BAKTERİLER ARACILIĞIYLA  
PARÇALANMASI

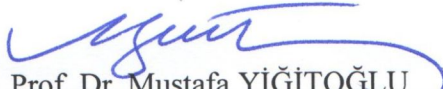
Zehra GÜN GÖK


MAYIS 2016

**Biyomühendislik Anabilim Dalında** Zehra GÜN GÖK tarafından hazırlanan 2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN BAKTERİLER ARACILIĞIYLA PARÇALANMASI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

  
Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

  
Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU  
Danışman


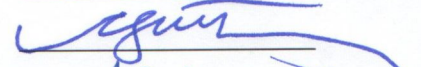

  
Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL  
2. Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Üye : Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

17/05/2016

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### 2,4,6-TRİNİTROTOLUEN'İN BAKTERİLER ARACILIĞIYLA PARÇALANMASI

GÜN GÖK, Zehra

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

2. Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL

Mayıs 2016, 95 sayfa

2,4,6-trinitrotoluen (TNT) şok ve sürtünmeye karşı kısmen duyarsız olması nedeniyle en yaygın kullanılan askeri yüksek patlayıcılardan biridir. Birçok aktif ve eski askeri tesislerdeki patlayıcı kirliliğinin büyük bir kısmı TNT'den kaynaklanmaktadır. Askeri bölgelerde toprak ve yeraltı sularındaki TNT kirliliğinin biyolojik temelli teknolojiler ile remediasyonu insan sağlığı ve ekosistem açısından oldukça önemlidir, çünkü bu teknolojiler doğal yollarla gerçekleşen, düşük maliyetli ve çevre dostu yaklaşımlardır.

Bu çalışmada, TNT'yi azot kaynağı olarak kullanabilen ve yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip bakteri suşları mikrobiyolojik yöntemlerle yıllardır TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen Kırıkkale'nin bir bölgesinden alınan toprak ve su örneklerinden izole edilmiştir. Alınan toprak ve su örneklerindeki TNT miktarının spektrofotometrik analizlerle 49-346 mg/kg arasında olduğu belirlenmiştir. Toprak örneklerinden 19, su örneğinden 5 toplamda 24 bakteri suşu elde edilmiştir. İzole edilen bakteriler azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde kültür edilmiş ve izolatların TNT yıkım kapasiteleri besiyerinden belirli aralıklarla alınan örneklerin spektrofotometrik analizleri ile tespit edilmiştir. Yapılan analizlerin sonucuna göre, izolatlar arasında yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip 6 bakteri izolatu seçilmiş

ve seçilen izolatlar önce Gram-boyama sonrasında 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile tanımlanmıştır. 16S rRNA dizi bölgelerine göre, toprak izolatları *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella planticola*, *Pseudomonas putida* olarak ve su izolatları ise *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella planticola* olarak tanımlanmıştır. Bu suşlarla yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 100 mg/L TNT içeren besiyerinde TNT'nin parçalanma oranı toprak izolatları SÇ1 K1, SÇ1 K4 ve SÇ1 K5 için sırasıyla % 90, % 95 ve % 84, su izolatları SU K2, SU K3 ve SU K4 için sırasıyla % 70, % 96 ve % 93 olarak belirlenmiştir. İzolatlar tarafından TNT'nin parçalanması sırasında oluşan ara ürünler HPLC analizleri ile tespit edilmiştir. Bütün bakteri izolatlarının kültürlerinde 4-aminodinitrotoluen ve 2-aminodinitrotoluen birikimleri tespit edilmiş, hiçbir kültürde 2,4-dinitrotoluen veya 2,6-dinitrotoluen birikimlerine rastlanmamıştır. Ayrıca, bütün izolatların kültür ortamında nitrit birikimi tespit edilmiştir. Bu çalışmada, izolatlar tarafından TNT'nin parçalanmasına sıcaklık ve pH'in etkisi de araştırılmıştır. SÇ1 K1 ve SU K2 izolatlarının 35 °C'de, diğer izolatların 30 °C'de, en yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip olduğu ve bütün izolatların pH 7'de TNT'yi en hızlı parçaladıkları, daha asidik veya daha bazik kültür ortamlarında bütün izolatların TNT parçalama kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan araştırma sonucunda izole edilen bakteri türlerinin, yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip oldukları ve TNT ile kirlenmiş bölgelerin arıtılmasında güvenli ve etkili bir şekilde kullanılabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** 2,4,6-trinitrotoluen, Biyolojik Parçalanma, Biyoremediasyon, Patlayıcılar, Bakteri, İzolasyon

## ABSTRACT

### DEGRADATION OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE WITH BACTERIA

GÜN GÖK, Zehra

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Professor Mustafa YİĞİTOĞLU

2. Supervisor: Assist. Prof. Murat İNAL

May 2016, 95 pages

2,4,6-trinitrotoluene (TNT) is one of the most widely used military high explosives because of its relatively insensitive against shock and friction. A large part of explosive contaminations at many active and former military plants has been arisen from TNT. Remediation of TNT contaminations in soil and groundwater at military sites with biologically based technologies is very important in terms of human health and ecosystem, because these technologies are cost-effective and environmentally friendly approaches that occur naturally.

In this study, bacterial strains that can use TNT as nitrogen source and have high TNT degradation capacity were isolated with microbiological methods from soil and water samples collected from a region in Kırıkkale that has been known to be exposed TNT contamination for years. The amounts of TNT in collected samples were determined to be between 49-346 mg/kg by spectrophotometric analysis. 19 from soil samples, 5 from water sample, totally 24 bacterial strains were obtained. Isolated bacteria were cultured in medium containing TNT as a sole nitrogen source and TNT degradation capacities of isolates were determined by spectrophotometric analysis of samples taken at regular intervals from the medium. According to the results of the analysis that have done, 6 bacterial isolates that have high TNT degradation capacity were selected between isolates and selected isolates have been identified with firstly Gram-staining then with 16S rRNA sequence analysis method.

According to the sequence of 16S rRNA, soil isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella planticola*, *Pseudomonas putida* and water isolates were identified as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella planticola*. During the TNT degradation studies with these strains, at the end of 24 h incubation time, in the medium containing 100 mg/L TNT, TNT degradation rate for soil isolates SÇ1 K1, SÇ1 K4 and SÇ1 K5 were determined 90 %, 95 % and 84 % respectively, TNT degradation rate for water isolates SU K2, SU K3 and SU K4 were determined 70 %, 96 % and 93 % respectively. Intermediate products formed during the degradation of TNT by the isolates were determined by HPLC analysis. 4-aminodinitrotoluene and 2-aminodinitrotoluene accumulations were detected in the culture medium of all bacterial isolates, but 2,4-dinitrotoluene or 2,6-dinitrotoluene accumulations were not found in any culture. Additionally, nitrite accumulation was detected in the culture medium of all isolates. In this study, the influence of temperature and pH on the degradation of TNT by the isolates was also investigated. It was determined that SÇ1 K1 and SU K2 isolates have the highest TNT degradation capacity at 35 °C, the others have at 30 °C and all isolates degraded TNT fastest at pH 7, toward to more acidic or more basic culture mediums the TNT degradation capacity of all isolates decreased. At the end of the research, it was concluded that the isolated strains have high TNT degradation capacity and they can be used safely and effectively in the remediation of contaminated areas with TNT.

**Key Words:** 2,4,6-trinitrotoluene, Biodegradation, Bioremediation, Explosives, Bacteria, Isolation

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve değerli bilgileri ile bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YİŐİTOęLU'na, tez çalıŐmalarım esnasında, bilimsel konularda ve laboratuvar çalıŐmalarım sırasında daima yardımını gördüğüm 2. danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL'a, bana her türlü konuda destek olan sevgili iŐ arkadaŐım ArŐ. Gör. Beste AęDAŐ TUNALI'ya ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen biricik eŐim İsa GÖK'e ve aileme çok teşekkür ederim.

Bu Yüksek Lisans Tezi Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2014/62 nolu proje ile desteklenmektedir. Desteklerinden dolayı Kırıkkale Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine ve yüksek lisansım sırasında yararlandığım 2211-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'ndan dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire BaŐkanlıęı (BİDEB) Deęerlendirme ve Destekleme Kurulu'na çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Nitroaromatik Bileşikler.....	2
1.2. TNT .....	3
1.2.1. TNT'nin Yapısı ve Özellikleri .....	3
1.2.2. TNT'nin Canlılar ve Çevre Üzerindeki Toksik Etkileri.....	6
1.3. TNT ile Kirlenmiş Alanların Fizikokimyasal Yöntemlerle Arıtımı.....	9
1.3.1. Yakma .....	9
1.3.2. Adsorpsiyon .....	10
1.3.3. Kompostlama .....	11
1.3.4. İleri Oksidasyon .....	11
1.3.5. Kimyasal İndirgenme .....	12
1.4. TNT'nin Bakteriler Tarafından Parçalanması .....	13
1.5. TNT'nin Biyoremediasyonu.....	21
1.5.1. Biyoreaktörler.....	21
1.5.2. Kompostlama .....	22
1.5.3. Arazi Düzenleme.....	23
1.5.4. Fitoremediasyon .....	24
1.6. Nitroredüktazlar.....	25



1.7. TNT'nin Mikrobiyal Parçalanması ile İlgili Çalışmalar .....	28
1.8. Çalışmanın Amacı .....	34
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>35</b>
2.1. Materyal.....	35
2.1.1. Parçalanma Ürünlerinin Standartları .....	35
2.1.2. Besiyerleri .....	35
2.1.3. Diğer Kimyasallar .....	37
2.1.4. Toprak ve Su Örnekleri .....	37
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	38
2.3. Yöntem .....	39
2.3.1. Toprak ve Su Örneklerindeki TNT Miktarının Belirlenmesi.....	39
2.3.2. TNT ile Kirlenmiş Toprak ve Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ..	40
2.3.3. TNT'nin Spektrofotometrik Analizi.....	41
2.3.4. En Yüksek TNT Yıkım Kapasitesine Sahip İzolatların Seçilmesi.....	41
2.3.5. İzolatların Tanımlanması.....	42
2.3.6. TNT'nin Bakterilerle Parçalanması .....	43
2.3.7. Parçalanma Ürünlerinin HPLC ile Belirlenmesi .....	44
2.3.8. Nitrit ve Amonyum Testleri .....	45
2.3.9. Sıcaklık ve pH'ın TNT'nin Parçalanmasına Etkisinin Belirlenmesi....	46
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
3.1. Toprak ve Su Örneklerindeki TNT Miktarının Analizi.....	47
3.2. Bakteri İzolasyonu.....	48
3.3. TNT Yıkım Kapasitesi En İyi Olan İzolatların Seçilmesi.....	48
3.4. TNT Yıkım Kapasitesi En İyi Olan İzolatların Tür Tayinleri.....	50
3.5. TNT'nin Mikrobiyal Parçalanması .....	52
3.6. Parçalanma Ürünlerinin Analizi .....	58

3.7. TNT'nin Parçalanması Sırasında Oluşan Nitrit ve Amonyum Miktarlarının Belirlenmesi .....	67
3.8. Sıcaklığın TNT'nin Biyolojik Parçalanmasına Etkisi .....	72
3.9. pH'ın TNT'nin Biyolojik Parçalanmasına Etkisi .....	76
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>82</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Başlangıç materyali toluenden TNT'nin sentezlenmesi .....	5
1.2. TNT'nin yapısında bulunan nitro grubun indirgenmesi.....	15
1.3. Aerobik bakterilerde TNT'nin parçalanma mekanizması.....	16
1.4. Anaerobik bakterilerde TNT'nin parçalanma mekanizması.....	17
1.5. TNT'ye hidrit iyonunun eklenmesi ile Meisenheimer kompleksinin oluşması.....	18
1.6. Tip I ve Tip II nitroredüktaz enzimlerinin aromatik halkada bulunan nitro gruplarını indirgeme mekanizmaları.....	27
2.1. TNT ile kirlenmiş bölgeden alınan toprak ve su örnekleri .....	38
3.1. <i>K. pneumoniae</i> SÇ1 K1 (a), <i>R. planticola</i> SÇ1 K4 (b) ve <i>P. putida</i> SÇ1 K5 (c) izolatlarına ait kültürlerdeki TNT miktarının zamana bağlı değişimine karşı optik yoğunlukları (30 °C'de).....	54
3.2. <i>S. maltophilia</i> SU K2 (a), <i>K. pneumoniae</i> SU K3 (b) ve <i>R. planticola</i> SU K4 (c) izolatlarına ait kültürlerdeki TNT miktarının zamana bağlı değişimine karşı optik yoğunlukları (30 °C'de).....	56
3.3. Standart maddelerin karışımının kromatogramı .....	59
3.4. Kontrolün 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	60
3.5. <i>K. pneumoniae</i> SÇ1 K1 izolatının (35 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	61
3.6. <i>R. planticola</i> SÇ1 K4 izolatının (30 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	62
3.7. <i>P. putida</i> SÇ1 K5 izolatının (30 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	63
3.8. <i>S. maltophilia</i> SU K2 izolatının (35 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	64
3.9. <i>K. pneumoniae</i> SU K3 izolatının (30 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	65
3.10. <i>R. planticola</i> SU K4 izolatının (30 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları.....	66

- 3.11. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) kültürlerinde TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında biriken  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  miktarları.....68
- 3.12. *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) kültürlerinde TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında biriken  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  miktarları..... 70
- 3.13. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) izolatlarının TNT'yi parçalama oranlarının 24. saatin sonunda farklı sıcaklık değerlerine bağlı değişimi (pH 7'de)..... 73
- 3.14. *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) izolatlarının TNT'yi parçalama oranlarının 24. saatin sonunda farklı sıcaklık değerlerine bağlı değişimi (pH 7'de)..... 75
- 3.15. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) bakteri suşlarının TNT'yi parçalama oranlarına pH'ın etkisi (30 °C'de)..... .77
- 3.16. *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) bakteri suşlarının TNT'yi parçalama oranlarına pH'ın etkisi (30 °C'de) .....78

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. TNT'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	4
1.2. TNT'yi aerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri.....	20
1.3. TNT'yi anaerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri .....	20
2.1. İzolatların 16S rRNA genlerinin PZR ile çoğaltılıp, dizilenmesinde kullanılan primerler ve dizileri.....	43
2.2. TNT parçalanma ürünlerinin HPLC ile analizinde HPLC analiz koşulları .....	45
3.1. Alınan toprak ve su örneklerinin TNT miktarları .....	47
3.2. İzole edilen bakterilerin 1, 3 ve 7. günün sonunda besiyerinden alınan örneklerin TNT miktarı.....	49
3.3. İzolatların UNI27F/1492R primeri ile elde edilen 16S rRNA dizilerinin NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri .....	51
3.4. İnkübasyondan önce (0. saat) ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerindeki TNT, 2-ADNT ve 4-ADNT miktarları (mg/L).....	58

## KISALTMALAR DİZİNİ

$^{14}\text{C}$ -TNT	Radyo aktif karbon işaretli TNT
16S rDNA	16S ribosomal DNA
16S rRNA	16S ribosomal RNA
2,2-AZT	2,2-azoksitoluen
2,4-DNT	2,4-dinitrotoluen
2,6-DNT	2,6-dinitrotoluen
2-ADNT	2-amino-4,6-dinitrotoluen
4-ADNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen
ADNT	Aminodinitrotoluen
ATSDR	Agency of Toxic Substances and Disease Registry
CFU	Colony forming unit
CO	Karbon monoksit
CO <sub>2</sub>	Karbon dioksit
DAMNT	Diaminonitrotoluen
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNT	Dinitrotoluen
dNTP	Serbest nükleotitler
EMB	Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar
EPA	Environmental Protection Agency
FAD	Flavinadeninükleotid
FMN	Flavinmononükleotid
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HADNT	Hidroksilamindinitrotoluen
HCl	Hidroklorik asit
HMX	Nitroamine high explosive
HNO <sub>3</sub>	Nitrik asit

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Potasyum sülfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
log K <sub>OW</sub>	Oktanöl-su bölünme katsayısı
log K <sub>OC</sub>	Organik karbon/su dağılım katsayısı
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mg	Miligram
mM	Mili molar
MNT	Monodinitrotoluen
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
NA	Nutrient Agar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NATO	Kuzey Atlantik Antlaşması Örgütü
Ni	Nikel
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>2</sub>	Amin
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonyum
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum klorür
NHOH	Hidroksilamin
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub>	Nitrit
NO <sub>x</sub>	NO ve NO <sub>2</sub> için genel bir terim
O <sub>3</sub>	Ozon gazı
OD	Optik yoğunluk
OH	Hidroksil

HO·	Hidroksil radikali
OYE	Old yellow enzyme
PCA	Plate Count Agar
PETNr	Pentaeritrol tetranitrat redüktaz
Pd	Paladyum
pK <sub>a</sub>	Asidik iyonlaşma sabitenin negatif logaritması
pH	Hidrojen derişiminin negatif logaritması
pmol	Pikomol
ppm	Milyonda bir
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RDX	Royal Demolition Explosive
rpm	Revolutions per minute (devir/dakika)
SiO <sub>2</sub>	Silisyum dioksit
TAT	Triaminotoluen
TiO <sub>2</sub>	Titanyum dioksit
TNB	1,3,5-Trinitrobenzen
TNT	2,4,6-Trinitrotoluen
TSA	Trypticase Soy Agar
UV	Ultraviyole
VİTEK	Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi
XenB	Ksenobiyotik redüktaz B
µM	Mikro molar



## 1. GİRİŞ

Geçen 150 yıl içinde, milyonlarca ton nitroaromatik patlayıcı bileşikler askeri amaçlar için üretilmiş ve enerjik malzemelerin bir kısmı çeşitli sebeplerle toprak ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olmuştur (Ayoub vd., 2010). En yaygın olarak kullanılan nitroaromatik bileşik TNT'dir. TNT toksik bir kimyasal maddedir ve yapısında bulunan nitro gruplarının simetrik düzeninden dolayı doğada uzun süre bozunmadan (parçalanmadan) kalabilmektedir (Esteve-Núñez vd., 2001). Mutajenik özelliklerinden, doğada bertaraf edilememesinden ve TNT ile kirlenmiş alanların çok fazla olmasından dolayı TNT nitro bileşikler arasında en tehlikeli patlayıcı madde olarak bilinmektedir (Fant vd., 2001).

TNT insanlarda dahil birçok organizma üzerinde toksik etkilere sahip önemli bir çevre kirleticisidir (Gallagher, 2010). Doğada bulunan TNT kirlilik seviyesinden dolayı, TNT endişe verici bir ksenobiyotik kimyasal olarak sınıflandırılmaktadır. TNT diğer nitroaromatik bileşiklere nazaran suda yüksek çözünürlüğe sahiptir ve bundan dolayı doğada hem toprak hem de yeraltı sularının kirlenmesine neden olmaktadır (Esteve-Nuñez vd., 2001). İnsanlar, TNT ile kirlenmiş sudan doğrudan ya da TNT ile kirlenmiş toprakta veya TNT ile kirlenmiş su ile sulaması yapılan toprakta yetiştirilen tarım ürünleriyle beslenmesi durumunda dolaylı olarak TNT kirliliğine maruz kalabilmektedir. TNT kirliliğine maruz kalan insanların kanı, karaciğeri, bağışıklık ve üreme sistemi TNT'nin toksik etkilerinden etkilenmektedir (Gallagher, 2010). Söz konusu TNT kirliliğinin insanlar ve ekosistem üzerindeki olumsuz etkilerini gidermek için çevre dostu arıtım yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. TNT ile kirlenmiş bölgelerin temizlenmesi için birkaç fizikokimyasal yöntem geliştirilmiştir, ancak bu yöntemlerin istenmeyen sera gazlarının ve yeni çevre atıkların oluşması veya yüksek maliyetli olma gibi dezavantajları vardır (Park vd., 2003; Claus, 2014). Bu sebeplerden dolayı, son araştırmalar TNT kirliliğine maruz kalmış askeri bölgelerin temizlenmesinde çevre dostu ve düşük maliyetli olma gibi avantajlara sahip olan, kirleticilerin doğadan uzaklaştırılması için canlı organizmaların (daha çok mikroorganizmaların) kullanıldığı biyolojik temelli prosesler olan biyoremediasyon prosesleri üzerine odaklanmıştır (Ayoub vd., 2010).

## 1.1. Nitroaromatik Bileşikler

Nitroaromatik bileşikler günümüzde kullanılan endüstriyel kimyasalların en büyük ve en önemli grubunu oluşturmaktadır. Nitroaromatik bileşikler aromatik halkaya bağlı en az bir nitro grubu (-NO<sub>2</sub>) bulduran organik moleküllerdir. Biyolojik olarak üretilen birkaç nitroaromatik bileşik dışında büyük çoğunluğu sentetiktir. Nitro grubun güçlü elektronegatifliği elektronca fakir iki tane oksijen atomunun kısmi pozitif yüklü azot atomuna bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Nitro grup benzen halkasına bağlı olduğunda kendi elektron eksikliğini karşılamak için halkadaki elektronların yerlerini değiştirebilmektedir. Buda moleküle nitro grubu kimyasal sentezde önemli bir fonksiyonel grup yapan eşsiz özellikler kazandırmaktadır (Ju ve Parales, 2010).

Nitrobileşikler daha çok endüstriyel prosesler ya da diğer insan faaliyetleri ile üretilmektedir ve çevresel kirleticilerin önemli bir grubu haline gelmişlerdir. Bu bileşiklerin metabolizasyonu güçlü genotoksik ve mutajenik ara ürünlerin oluşumuna ve kolaylıkla biyolojik makro moleküller ile reaksiyona girebilen reaktif nitrojen oksit türlerin oluşmasına yol açmaktadır. Bundan dolayı, bu bileşiklerin kullanımının artması insan sağlığı ve ekosistem için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Birkaç nitro bileşiklerinden kaynaklanan mutagenenin moleküler mekanizmasını tanımlamak ve açıklamak için birçok genotoksik testler *Salmonella typhimurium* gibi bakterilerin mutant suşları (enzimleri üretmiyor ya da çok fazla üretiyor) kullanılarak yapılmıştır. Birçok nitroaromatik bileşik toksik, mutajenik ve kanserojenik olarak rapor edilmiştir. Buna rağmen nitrofuranlar ve nitrobenzenler gibi çeşitli nitroaromatik bileşikler farmasötik madde, antimikrobiyal madde, gıda katkı maddesi, tarım ilacı, patlayıcı, boya ve hammadde olarak bir çok uygulamada kullanılmaktadır (Oliveira vd., 2010).

Nitrasyon, nitroaromatik bileşiklerin sentezlenmesindeki ana tepkimedir. Nitronyum iyonları (NO<sub>2</sub>) sülfürik asit ve nitrik asidin karma asit tepkimesi sonucu oluşturulmakta ve aromatik halkaya elektrofilik yer değiştirme ile eklenmektedirler. Bu şekilde benzen, toluen ve fenol bileşikleri en basit nitroaromatik bileşikler olan nitrobenzen, nitrotoluenler ve nitrofenollere dönüştürülmektedirler. Reaksiyon

koşulları değiştirilerek orto, meta ya da para konumlarına da doğrudan nitrasyon yapılabilmektedir. TNT, RDX (Royal Demolition Explosive) veya pikrik asit gibi birçok patlayıcı nitroaromatik bileşik bu yolla sentezlenmektedir (Ju ve Parales, 2010). TNT diğer nitroaromatik patlayıcı bileşiklerin elde edilmesi için başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Örneğin, TNT'nin metil grubunun eliminasyonu ile 1,3,5-trinitrobenzen (TNB) elde edilmektedir (Oxley, 2002).

## **1.2. TNT**

1800'lü yıllarda, organik kimyanın gelişimi ile kimyagerler, nitrolama yöntemiyle birçok yeni kimyasal bileşik sentezlemiştir. Nitrolama işlemi ile sentezlenen bu nitratlı bileşiklerden bazılarının patlayıcı özelliklerinin ortaya çıkması ile bu bileşiklerin patlayıcı madde olarak askeri ve endüstriyel kullanım alanları aranmıştır (Lewis vd., 2004). TNT yaygın olarak kullanılan bir nitroaromatik bileşiktir ve kararlı bir patlayıcı olması nedeniyle, 19. yüzyılın sonlarında sentezlenmesinden bu yana askeri ve endüstriyel uygulamalarda popülerlik kazanan bir kimyasal olmuştur (Lewis vd., 2004; Gümüşçü, 2012).

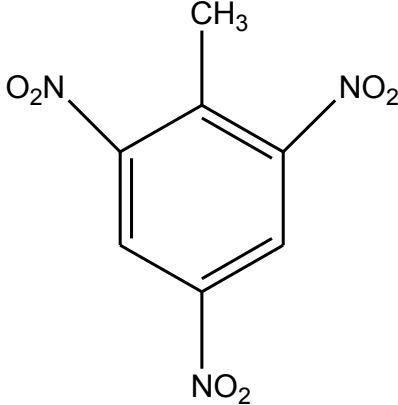
TNT güvenli üretimi ve depolanması, düşük erime noktası, kimyasal ve termal kararlılığı, darbe, yüksek sıcaklık ve sürtünmeye karşı düşük hassasiyet göstermesi gibi özelliklerinden dolayı her iki dünya savaşında ana patlayıcı madde olarak kullanılmış (Park vd., 2003; Kalderis vd., 2008) ve günümüzde de en çok kullanılan askeri patlayıcıların başında gelmektedir.

### **1.2.1. TNT'nin Yapısı ve Özellikleri**

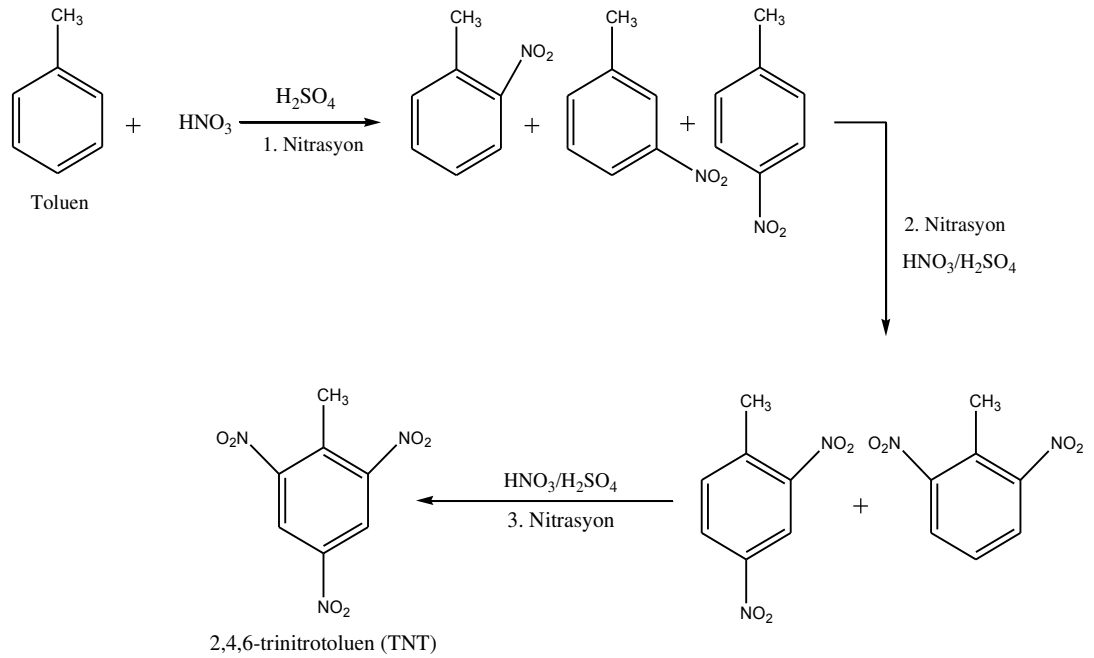
1863 yılında, Alman kimyager Joseph Wilbrand önemli bir nitroaromatik bileşik olan TNT'yi sentezlemiş, ancak o yıllarda patlayıcı özelliği keşfedilemeyen TNT boyar madde olarak kullanılmıştır. 1902 yılında, TNT'nin patlayıcı özelliğinin Alman ordusu tarafından keşfedilmesinden sonra, TNT ana patlayıcı madde olarak bombaların, fişeklerin ve el bombaların yapımında kullanılmıştır. Alman askeri

sanayisinde TNT'nin patlayıcı madde olarak kullanılmasından kısa süre sonra diğer ülkelerde TNT'yi patlayıcı olarak kullanmaya başlamış ve her iki dünya savaşında milyonlarca ton TNT kullanılmıştır (Yinon, 1990). TNT benzen halkası üzerinde 2, 4 ve 6. pozisyonlarında bulunan nitro gruplarından ve 1. pozisyonda bulunan metil grubundan oluşmaktadır (Ayoub vd., 2010). TNT oda sıcaklığında katı halde bulunan yüksek bir patlayıcı maddedir. TNT'nin yapısında bulunan nitro gruplarında, hem oksijen atomu hem de azot atomu elektronegatifdir ancak oksijen daha fazla elektronegatifdir. Bundan dolayı N-O bandı polarize olmaktadır ve bu da nitro grubunu kolayca indirgenebilir yapmaktadır (Esteve-Nuñez vd., 2001). TNT'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir. Çizelge 1.1'de verilen oktanol-su bölünme katsayısı ( $\log K_{ow}$ ) değerine göre, TNT molekülünün hidrofobik ve hidrofilik özellikleri arasında bir ara karaktere sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir. Bundan dolayı TNT güçlü bir şekilde toprakta emilememekte ve bulunduğu çevrede nispeten hareketli olabilmektedir (Khan vd., 2013).

**Çizelge 1.1.** TNT'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (ATSRD, 1995'ten ve Ayoub vd., 2010'dan değiştirilerek)

<p><b>TNT'nin yapısal formülü</b></p> 	<b>Moleküler Formülü:</b> $C_7H_5N_3O_6$
	<b>IUPAC Numarası:</b> 2-metil-1,3,5-trinitrobenzen
	<b>Moleküler Ağırlığı:</b> 227,13 g/mol
	<b>Kristal Formu:</b> TNT renksiz ortorombik kristallar ya da soluk sarı renkli monoklinik kristaller şeklinde mevcuttur
	<b>Erime Noktası :</b> 80,65 °C
	<b>Kaynama Noktası:</b> 210 °C
	<b>Parlama Noktası:</b> 240 °C
	<b>Tutuşma Noktası:</b> 295 °C
	<b>Yoğunluk :</b> 1,65 g/mL
	<b>Çözünürlüğü:</b> 20 °C'de g/100 g çözücüde; suda 0,013, etanolde 1,23, eterde 3,29, toluende 55, benzende 67, asetonda 109
	<b>Patlama Şiddeti:</b> 6900 m/s
	<b>Buhar Basıncı:</b> $1,99 \times 10^{-4}$ mm Hg
	<b>log <math>K_{ow}</math>:</b> 1,6
	<b>log <math>K_{oc}</math>:</b> 3,2
<b>Henry yasası sabiti :</b> $4,57 \times 10^{-7}$ atm·m <sup>3</sup> /mol (20 °C'de)	

TNT doğal olarak meydana gelmeyen, kokusuz ve sarı renkli kristallerden oluşan yapay bir kimyasaldır. TNT, 80,65 °C’de erimekte ve donduğunda iğne gibi kristallere dönüşmektedir. Oda sıcaklığında, sudaki çözünürlüğü 130 ppm’dir ve diğer nitroaromatik bileşiklere göre sudaki çözünürlüğü nispeten daha yüksektir ancak etanol, metanol ve aseton gibi çözücülerde oldukça yüksek çözünürlüğe sahiptir. TNT sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle kararlı ve nem tutmayan bir kimyasaldır (Üzer, 2004; Mercimek, 2011). TNT asitler ile etkileşim göstermemektedir ama alkali çözeltiler TNT çözeltisini pembe, kırmızı veya kahverengine dönüştürmekte ve daha hassas yapmaktadır (Dursun, 2007). TNT toluenin nitrik ve sülfürik asitle tepkimesi sonucu elde edilmektedir (ATSDR, 1995; Ayoub vd., 2010). Toluenden TNT sentezi üç adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda, toluenden, sülfürik-nitrik asit ( $H_2SO_4-HNO_3$ ) karışımı bir çözeltide nitrasyon işlemi ile mononitrotoluen (MNT) sentezlenmektedir. İkinci adımda, sentezlenen MNT tekrar nitrolanarak dinitrotoluen (DNT) elde edilmekte ve üçüncü adımda, oluşan DNT’lerden son nitrolama işlemi ile TNT elde edilmektedir (Üzer, 2004). Toluenden TNT’nin sentezlenme mekanizması Şekil 1.1’de verilmiştir.



**Şekil 1.1.** Başlangıç materyali toluenden TNT’nin sentezlenmesi (Anonim, 2015)

Sülfürik asit katalizörlüğünde toluenin nitrik asitle nitrolanması ile elde edilen trinitrotoluen ( $C_7H_5N_3O_6$ )'nin 2,4,6- dışında, 2,3,4-, 2,4,5- ve 2,5,6- gibi farklı izomerleri bulunmaktadır (Üzer, 2004). Simetrik olmayan bu izomerler sodyum sülfite çözeltisi ile yıkanarak uzaklaştırılmaktadır (Fischer ve Taylor, 1983). Patlayıcı endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan TNT'nin simetrik izomeri 2,4,6-trinitrotoluen'dir (Mercimek, 2011). TNT saf olarak ya da ikili karışımlar halinde patlayıcı olarak kullanılmaktadır. TNT'nin en yaygın kullanılan ikili karışımları RDX, HMX, amonyum nitrat ve alüminyum kullanılarak yapılmaktadır. TNT askeri kullanımına ek olarak, tünel açma, maden kazma ve su altı kazıları gibi endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır (ATSRD, 1995).

Mühimmat üretimi, bomba gibi malzemelerin üretilmesi, imha edilmesi ve patlayıcıların geri dönüşüm işlemleri sırasında açığa çıkan atık sular ve katı atıklar doğada TNT kontaminasyonuna sebep olmaktadır. Atık suların ihtiva ettiği TNT toprağa ve oradan da yeraltı sularına karışmaktadır. Yüzey sularında bulunan TNT güneş ışığı ile parçalanmakta iken, yeraltı sularında ve sedimentlerde bulunan mikroorganizmalar TNT'yi daha yavaş yıkmaktadırlar. TNT'nin aromatik halkasında bulunan nitro gruplarının simetrik düzeni nedeni ile TNT, MNT ve DNT'lere göre mikroorganizmalar tarafından daha zor parçalanmaktadır, çünkü TNT'nin mikrobiyal metabolizmasında görev alan dioksijenaz enzimlerinin nitro gruplara erişmesi daha zordur (Gallagher, 2010). Bundan dolayı TNT'nin kimyasal yapısı biyolojik parçalanmasını zorlaştırmaktadır (Esteve-Nuñez vd., 2001).

### **1.2.2. TNT'nin Canlılar ve Çevre Üzerindeki Toksik Etkileri**

TNT çevreye askeri mühimmatların yanmasıyla, ordu donatım malzemelerin atılması veya infilak edilmesiyle, kullanılmayan mühimmatların imha edilmesiyle sızmaktadır. Ayrıca, TNT mühimmat işleme tesislerinde patlayıcı maddelerin üretilmesi aşamasında da çevreye sızabilmektedir. Ulusal Öncelikler Listesinde (National Priorities List) yer alan 1338 tehlikeli atık bölgelerinden en az 20 tanesinde TNT kirliliği tespit edilmiştir (ASTDR, 1995).

TNT'nin ve TNT'nin parçalanması sırasında açığa çıkan bileşiklerin toksisitesi kapsamlı olarak araştırılmış ve belgelenmiştir. TNT'den kaynaklanan riskin tahmini TNT'nin toksisitesinin veya ekotoksisitesinin belirlenmesine ve maruz kalma potansiyeline dayanmaktadır. Son yıllarda bu kimyasalın toksisitesi solucanlar, memeliler ya da insan monositleri gibi türler kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen toksisite değerlerinin farklı organizmalarda çeşitlilik göstermesi organizmaların TNT'ye karşı duyarlılıklarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. TNT'nin insanlar üzerindeki toksik dozları, maruz kalma durumuna ve maruz kalma süresine göre değişmektedir, ancak yapılan çalışmalardan insanların TNT'ye maruz kalma durumunda referans bir toksik doz değeri saptanmıştır. US EPA'nın (Amerika Çevre Koruma Ajansı) sağlık önerisine göre içme suyundaki TNT miktarı  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ 'dir (Ayoub vd., 2010).

TNT yapısında bulunan nitro grupların simetrik düzeninden dolayı doğada uzun süre bozunmadan kalabilmektedir ve yüksek derişimlerde TNT toksik, mutajenik ve potansiyel kanserojen bir bileşiktir (EPA, 1989; Esteve-Nunez vd., 2001; Qasim vd., 2007). TNT suda çözülebilen bir bileşik olduğu için, TNT ile kirlenmiş yüzey suları ve yeraltı su havzaları pembemsi bir renk alır ve literatürde pembe su olarak adlandırılmaktadır. Pembe su oluşumu çözülmüş TNT moleküllerinin fotolizi ve boya benzeri kompleks moleküllerin birikmesi sonucu meydana gelmektedir. Tarımsal sulama kuyuları TNT ile kirlenmiş pembe suların kontaminasyon olasılığına karşı ciddi risk altındadır (Gümüüşü, 2012).

Az miktarlarda TNT'ye maruz kalan insanlarda baş ağrısı, anemi ve alerjik reaksiyonlar sebebiyle deri tahrişi tespit edilmiştir. TNT toksisitesinin sebep olduğu en sık şikayet anemi olarak rapor edilmiştir. TNT'nin kan değerleri üzerindeki negatif etkileri köpeklerde, sığanlarda ve farelerde de rapor edilmiştir (ATSDR, 1995). İnsanlarda, yüksek derişimlerde TNT'ye maruz kalma sonucu karaciğerde, gözde ve sinir sisteminde hasarlar meydana gelmektedir. Bütün bu toksik etkilerinin yanı sıra, vücudumuzda TNT ve TNT'nin parçalanması sonucu oluşan ara ürünler deoksiribonükleik asit (DNA) gibi moleküllerle etkileşmekte ve bu etkileşmeden dolayı mutasyonlara sebep olmaktadır. TNT ve TNT'nin metabolitlerinin insan ve

ekosistem üzerindeki toksik etkileri bu bileşiklerin doğada birikmesi ile artmaktadır (Qasim vd., 2007).

Tarihte, yüksek patlayıcıların üretildiği işletmelerde çalışan işçiler TNT'ye maruz kalmadan dolayı birçok sağlık sorunu yaşamışlardır. Bu sağlık sorunları anormal karaciğer fonksiyonları ve anemi gibi kan hastalıklarıdır. Bu sağlık sorunlarının görüldüğü işletmelerde havadaki TNT miktarının bir metreküp havada 0,01-1,49 mg aralığında değiştiği görülmüştür. TNT ile beslenen ya da TNT'ye nefes alma yolu ile maruz bırakılan hayvanlarda da kan ve karaciğer üzerinde benzer etkiler görülmüştür. Buna ek olarak, TNT ile beslenen hayvanlarda (15-364 gün boyunca) dalak genişlemesi ve bağışıklık sistemi üzerinde TNT'nin diğer zararlı etkileri de görülmüştür (ATSDR, 1995).

İnsan cildi uzun süre TNT'ye maruz bırakıldığında, deride alerjik reaksiyonlar meydana gelmekte ve kaşıntı, tahriş gibi semptomlar oluşmaktadır. Uzun süreli TNT'ye maruz kalma ise insanlarda katarakt gelişimine sebep olmaktadır. TNT'ye maruz kalmanın insanlarda doğum özürlerine sebep olduğunu gösteren bir çalışma yoktur, ancak hayvanlarla yapılan çalışmalarda, yüksek doz TNT'ye maruz bırakılan hayvanların erkek üreme sistemi üzerinde TNT'nin ciddi negatif etkilere sebep olduğu görülmüştür. TNT'nin insanlarda kansere sebep olduğunu gösteren çalışmalar sınırlıdır, ancak uzun süre TNT ile beslenen farelerde mesane tümörleri geliştiği rapor edilmiştir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmaya göre, EPA TNT'yi olası bir insan kanserojen maddeler grubu olan C sınıfı kanserojen madde olarak sınıflandırmıştır (ATSDR, 1995).

Tarihsel olarak, mühimmat üretiminde çalışan işçilerinin ölümlerine en çok TNT'nin karaciğer üzerindeki olumsuz etkileri sebep olmuştur. İlk klinik semptomlar mide bulantısı, kusma, karın ağrısı, yorgunluk, baş dönmesi ve sarılıktır (ATSDR, 1995).

1. Dünya Savaşı sırasında ABD'de, 475'i ölüm vakası dahil toplam 17000 TNT zehirlenme vakası rapor edilmiştir. İngiltere'de, 1916 ve 1917 yılları boyunca 96 ölüm dahil 310 sarılık vakası rapor edilmiştir. Almanya'da 1916-18 yılları boyunca 113 ölüm vakası dahil 1000 sarılık vakası rapor edilmiştir. TNT'nin toksik etkilerinin



ve tedavi yöntemlerinin anlaşılmasından dolayı birinci dünya savaşının sonlarına doğru TNT zehirlenme vakaları azalmıştır (Yinon, 1990).

Birçok çalışma, TNT ve TNT'nin parçalanma ürünlerinin balıklar, sıçanlar, alg ve sucul bitkiler, maya ve Gram-pozitif bakterilerde dahil çeşitli mikroorganizma ve insanlar üzerinde toksik etkilere sahip olduklarını göstermiştir (Claus, 2014). TNT ile kirlenmiş bölgelerin remediasyonu TNT'nin canlı organizmalar üzerindeki etkilerini azaltmak ve çevre üzerindeki bu kirleticinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için oldukça önemlidir.

### **1.3. TNT ile Kirlenmiş Alanların Fizikokimyasal Yöntemlerle Arıtımı**

Nitrobileşikler yüzünden meydana gelen çevre kirliliği önemli bir sorun haline gelmiştir, çünkü bu patlayıcı maddeler büyük ölçeklerde üretilmekte, kullanılmakta ve test edilmektedir. TNT üretimi sırasında saflaştırma işlemleri için çok fazla su kullanılmakta ve pembe-kırmızı su olarak bilinen bu atık sularda TNT'nin yanı sıra 30'a yakın nitroaromatik bileşik de bulunmaktadır. Buna ek olarak mühimmatların paketlenmesi ve taşınması sırasında açığa çıkan pembe su yüksek derişimlerde nitroaromatik patlayıcı madde içermektedir (Rodgers ve Bunce, 2001). Bu nedenle, TNT gibi nitroaromatik patlayıcı maddelerle kirlenmiş alanların remediasyonu kaçınılmazdır. TNT ile kirlenmiş bölgelerin temizlenmesinde kullanılan fizikokimyasal yöntemler başlıca yakma, adsorpsiyon, kompostlama, ileri oksidasyon ve kimyasal indirgeme olarak gruplandırılmaktadır (Park vd., 2003; Claus, 2014).

#### **1.3.1. Yakma**

Tehlikeli atıkları yakarak uzaklaştırmak kullanılan en yaygın metottur. Bu işlem için döner fırın, kızılötesi fırınlar, akışkan yatak gibi farklı yakma fırınları geliştirilmiştir. Atıklar bu fırınlarda yakılarak tehlikeli maddeler 870-1200 °C sıcaklıklarda buharlaştırılmaktadır. Bu sıcaklıklarda yakma işlemi organik bileşiklerin kimyasal

bağlarını yıkmaktadır. Yakarak bazı organik bileşikler uzaklaştırılabilir, ancak nitrik oksit (NO), karbon monoksit (CO), hidrojen klorür (HCl) gibi bazı zararlı bileşikler oluşmaktadır. Zararlı bileşiklerin oluşumunun yanı sıra toprağın kazılması, taşınması ve yakma için gerekli olan enerjinin maliyeti nedeni ile yakma işlemi oldukça pahalı bir yöntemdir. Ayrıca, patlayıcılardan kurtulmak için toprağın yakılması yakma işlemini yapan işçilerin yüksek düzeyde toksinlere maruz kalmasına da sebep olmaktadır (Hamby, 1996; Park vd., 2003; Mercimek, 2011; Claus, 2014).

### **1.3.2. Adsorpsiyon**

Bu alandaki remediasyon teknolojileri zararlı bileşikleri parçalama yerine ayırma işlemi üzerine odaklanmıştır. Adsorpsiyon yöntemi reçine adsorpsiyonu, yüzey kompleksi, sıvı-sıvı ayırma, ultrafiltrasyon ve ters osmoz işlemlerini içermektedir. Bu işlemlerin hepsinde patlayıcılarla kirlenmiş toprak veya sudan, patlayıcılar başka bir yüzeye aktarılmakta ve patlayıcı maddeler zararsız bileşiklere metabolize edilmemektedir. Granül aktif karbon spesifik olmayan bir adsorban maddedir ve patlayıcı maddeler ile kirlenmiş üretim tesisi atıklarının ve yeraltı sularının temizlenmesinde kullanılmaktadır, ama pembe suların temizlenmesi için uygun değildir. Bu işlemde, su kirleticileri adsorbe eden karbon ile kaplanmış bir kolon veya kutuya pompalanmaktadır. Silikon ile modifiye edilmiş karbon adsorbanları daha yüksek verimliliğe sahiptir. Karbon adsorbanı ile yapılan adsorpsiyon uygulamaları kullanılan karbonun tipine, partikül boyutuna, gözenek büyüklüğüne, çözeltinin kolona verilmiş hızına ve çalışma sıcaklığına bağlıdır (Rodgers ve Bunce, 2001). Karbon adsorpsiyonu nitroaromatiklerle kirlenmiş alanların temizlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir, ancak bu işlemde kullanılan matriks pahalı ve kullanılan granül aktif karbon zararlı atık (K045) olarak sınıflandırılmakta ve tehlikeli atıkların oluşumuna sebep olmaktadır (Levsen vd., 1993; Claus, 2014).

### 1.3.3. Kompostlama

Kompostlama toprakta var olan mikroorganizmalar yardımı ile kirleticileri topraktan arındırmak için kullanılan bir yöntemdir (Seth-Smith, 2002). Kompostlama işleminde durgun yığın (static piles) ve gübrelerin sıra sıra yığılması (windrow composting), patlayıcılarla kirlenmiş alanların temizlenmesinde kullanılan en sıradan yöntemlerdir. Kompostlanan toprak mikroorganizmaların gelişimi ve kirletici konsantrasyonunu düşürmek için organik maddeler ile zenginleştirilmekte ve böylece mikrobiyal aktivite ve mikrobiyal solunum artmakta ve mikroorganizmalar toprağa adsorbe olmuş kirleticilerin parçalanmasını sağlamaktadır. Kompostlanan toprakların nem içeriği, oksijen seviyesi ve sıcaklığı takip edilirken, havalandırmayı sağlamak için topraklar periyodik olarak döndürülmektedir. Kompostlama yönteminde maliyete etki eden faktörler arasında, arıtma tesisinin yapısı, organik ilaveler, yığının döndürülmesi amacıyla kullanılacak ekipmanlar, nakliye ve toprağın kazılması yer almaktadır (Lewis vd., 2004; Özcan ve Türkdöğen, 2014).

Kompostlama ile ilgili çalışmalar mikroorganizmaların patlayıcıları yıktığını ve detoksifiye ettiğini göstermiştir. Buda patlayıcılarla kirlenmiş bölgelerin arıtılmasında toprak mikroorganizmaların arıtım kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir, ancak iyi karakterizasyondan sonra kompostlama daha verimli bir arıtım prosesi olacaktır (Seth-Smith, 2002).

### 1.3.4. İleri Oksidasyon

İleri oksidasyon işlemlerinde katalizör veya fotoliz katkılı-katkısız hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve ozon ( $O_3$ ) gibi oksitleyici maddeler kullanılmaktadır. Birçok oksidasyon teknolojisinde, aromatik halkaya bağlanıp halkayı parçalayan ve aromatik bileşikleri su ve karbondioksit'e mineralize eden hidroksil radikalleri üretilmektedir. Homojen fotolizlerde, UV (290-200 nm) radyasyonları  $H_2O_2$ 'yi veya  $O_3$ 'ü yıkarak hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ) üretmek için kullanılmaktadır. Heterojen fotolizlerde ise OH radikalleri UV (400-320 nm) varlığında yarı-iletken bir yüzeyde (genellikle  $TiO_2$ ) oluşturulmaktadır (Rodgers ve Bunce, 2001).

Hidrojen peroksit ile UV oksidasyonu atık suların arıtılmasında ilk olarak Koubek (1975) tarafından kullanılmış ve daha sonra nitroaromatik patlayıcıların arıtılmasında Ho (1986) tarafından kullanılmıştır. Bu işlemde, fotoliz genellikle düşük basınç, 254 nm’de asıl emisyonu sahip (6-60 kW) yüksek güç lambaları ile gerçekleştirilmektedir (Rodgers ve Bunce, 2001).

Ozon ile UV oksidasyon işlemi kesikli veya sürekli modlarda nitroaromatiklerle kirlenmiş yüzey ve yer altı sularının arıtılmasında kullanılmaktadır. Bu sistemle % 99,9 oranında TNT ve TNB patlayıcıları imha edilmektedir. Bu sistem birkaç alanda test edilmiş olsa da granül aktif karbon adsorpsiyon işleminin gerisinde kalmaktadır. UV-ozon sisteminin bir dezavantajı ise ortamdan TNT’yi uzaklaştırırsa bile toksisiteyi azaltmıyor olmasıdır (Rodgers ve Bunce, 2001). Bunun yanı sıra, bütün kimyasal oksidasyon proseslerinin patlayıcı maddelerin arıtılmasında kullanımı zordur çünkü reaktif olmayan materyallerin kullanılması gerekmektedir (Park vd., 2003).

### **1.3.5. Kimyasal İndirgenme**

Aromatik nitro bileşiklerin yapısında bulunan nitro gruplar, asidik ortamda katalizörler varlığında amin gruplarına dönüştürülebilmektedir. Nitro grupların hidrojenlenerek amin gruplarına dönüştürülmesi tek başına yeterli bir arıtım prosesi değildir, çünkü anilinler toksik kimyasaldır ve oksidatif polimerizasyonla çöktürme ya da biyolojik transformasyon gibi ileri arıtım işlemleri gerekmektedir. Paladyum (Pd) gibi metal katalizörleri, laboratuvarında arıtım prosesleri için kullanılabilir ama büyük ölçekli atıkların arıtılması için oldukça pahalıdır. Buna ek olarak katalizörler bazı durumlarda nitroaromatik patlayıcı varlığında çözülebilmektedir. En uygun katalizörlerin formülasyonu Pd karbon, demir ya da alüminyum oksit birleşimi, Ni/Zeolite Y, Ni/SiO<sub>2</sub> birleşimleridir (Rodgers ve Bunce, 2001).

Doğada uzun süre bozunmadan kalabilen atıkların elektrokimyasal yöntemlerle temizlenmesi hem enerji maliyeti hem de basit ekipmanların kullanımından dolayı verimli olabilmektedir (Rodgers ve Bunce, 2001). Hintze ve Wagner (1992) elektrokimyasal bir hücrenin katot bölmesinde, nitroaromatik patlayıcı bileşikleri

aminlere indirgemıştır, ancak toksik olan amin bileşiklerinin birikmesini tartışmamışlardır. Rodgers vd. (1999) çeşitli katot yüzeylerde TNT ve DNT izomerlerini indirgemişler ve daha sonra elektro-kimyasal oksitlenme prosesi ile aminleri çözünmeyen yan ürünlere polimerize etmişlerdir.

#### **1.4. TNT'nin Bakteriler Tarafından Parçalanması**

Mikroorganizmalar, birçok kaynaktan gelen organik molekülleri katalitik olarak karbon dioksit ve suya yıktıkları için biyosferdeki organik moleküllerin temel geri dönüşücüsü olarak düşünülebilirler. Doğada daha önce var olmayan insanlar tarafından üretilen ve mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan birçok sentetik materyal vardır (Lewis vd., 2004). TNT de mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebilen sentetik bir kimyasaldır ve aerobik ve anaerobik bakteriler sentezledikleri nitroredüktaz enzimleri ile TNT'yi hidroksilamindinitrotoluenlere (HADNT), aminodinitrotoluenlere (ADNT), diaminomononitrotoluenlere (DAMNT) ve DNT'lere indirgemekte ve azot kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Esteve-Nuñez vd., 2001; Rylott vd., 2011). Günümüze kadar, TNT gibi polinitroaromatik bileşikler aerobik ve anaerobik prosesler ile parçalama kapasitesine sahip pek çok mikroorganizma tanımlanmıştır (Oh vd., 2000; Mercimek, 2011) ve TNT kontaminasyonuna maruz kalmış bölgelerin arıtılmasında, biyoremediasyon tekniklerinin daha uygulanabilir olmasını sağlayacak mikroorganizmaların keşfi amacı ile aerobik bakteriler (Rahal ve Moussa, 2011; Gümüşçü ve Tekinay, 2013; Lin vd., 2013; Mercimek vd., 2013) ve anaerobik bakteriler (Ederer vd., 1997; Esteve-Nuñez vd., 2000) tarafından TNT'nin parçalanması birçok bilim insanı tarafından yıllarca ilgi çeken bir konu olmuştur.

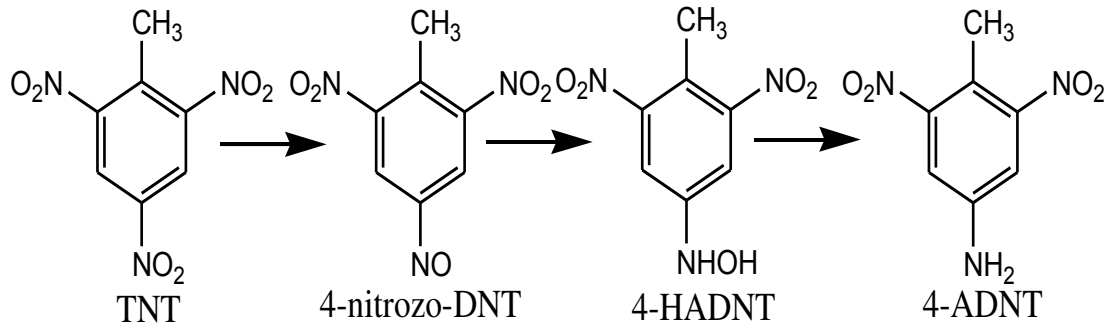
TNT'nin bakteriler tarafından indirgenmesindeki ana problem, yapısında bulunan nitro grupların simetrik düzeninden dolayı aromatik halkadaki elektron fakirliğidir. Bundan dolayı TNT'nin oksidatif bozunması ya da karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi (yani benzen halkasının yıkılması) mümkün değildir. Bu bağlamda parçalanma, TNT'nin transformasyonu veya bozunması anlamına gelmektedir,

mineralizasyon ya da TNT'nin tek başına bir büyüme substratı olması anlamına gelmemektedir (Claus, 2014; Singh, 2014).

Eski Sarı Enzim (Old Yellow Enzyme-OYE) ailesinin *Enterobacter cloacae* PB2'de bulunan pentaeritrol tetranitrat redüktaz (PETNr) ve *Pseudomonas fluorescens* I-C'de bulunan ksenobiyotik redüktaz B (XenB) gibi bazı üyeleri de nitroderüktaz enzimleri gibi görev görmekte ve TNT'yi aromatik halkaya bir hidrit eklenmesi yolu ile monohidrit-Meisenheimer veya dihidrit-Meisenheimer komplekslerine dönüştürmektedirler. TNT'nin bu komplekslere dönüştürülmesi nitrit iyonunun açığa çıkmasına sebep olmakta ve böylece TNT transformasyona uğramaktadır (Williams vd., 2004; Khan vd., 2013).

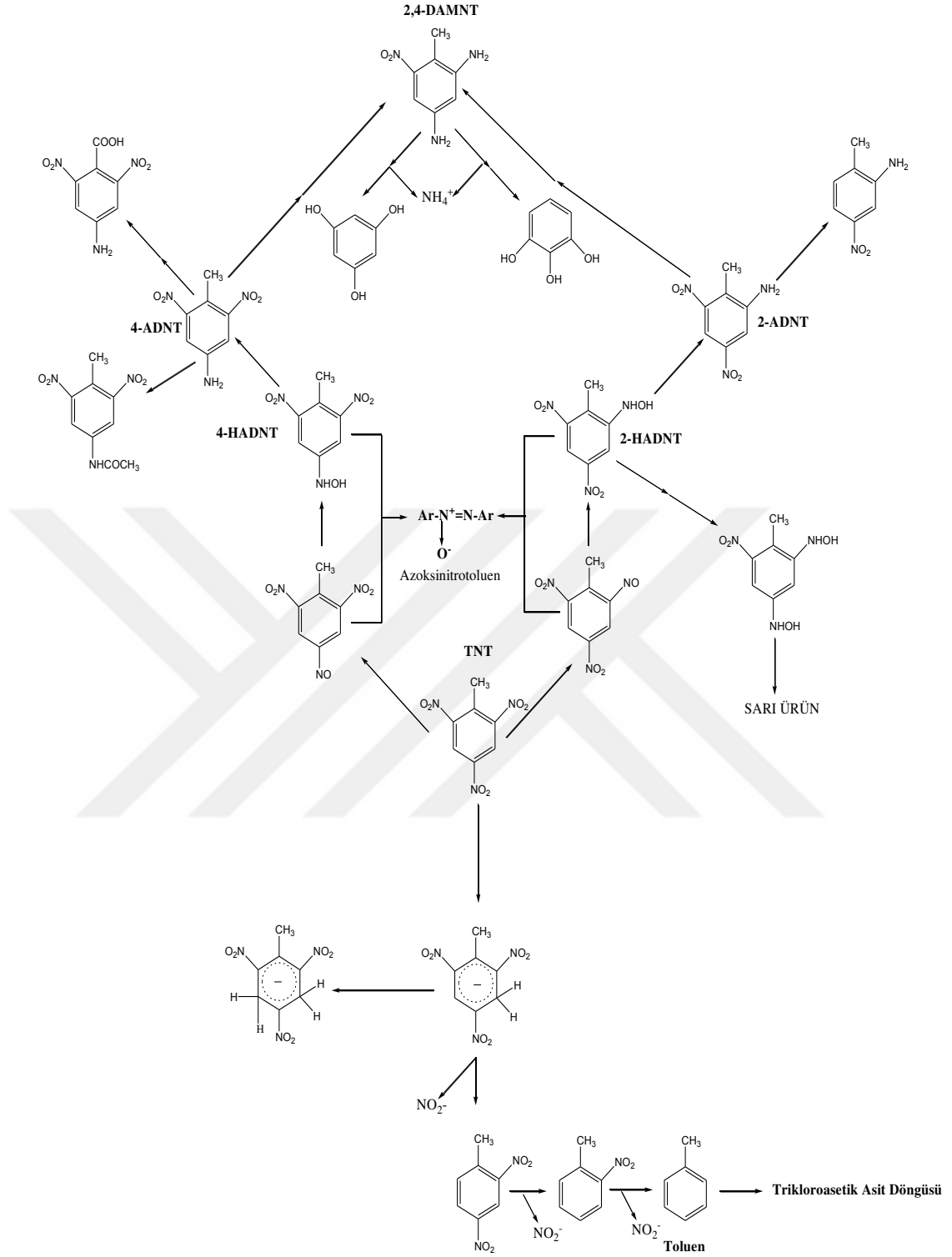
Birçok bakteri, TNT'nin benzen halkasında bulunan nitro grupları hidroksilamin ve amin gruplarına indirgeyerek TNT'yi aminonitroaromatik bileşiklerin farklı izomerlerine dönüştürmektedir (Esteve-Nuñez vd., 2001; Claus, 2014). TNT'nin indirgenmesi sonucu oluşan aminonitroaromatik bileşikler TNT'nin mikrobiyal parçalanmasının birincil ürünleridir. Ancak pH gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak oluşan aminonitroaromatik bileşiklerinin farklı izomerleri biyotik ve abiyotik mekanizmalarla -azo, -azoksi, -hidrazon ve fenol-asetil türevlerine dönüştürülebilmektedir (Hawari vd., 2000; Claus, 2014).

TNT'nin mikrobiyal parçalanması, genellikle bir nitro grubunun indirgenmesi ile başlamaktadır (Khan vd., 2013). Aerobik ve anaerobik bakteriler tarafından TNT'nin parçalanması sırasında, yapısında bulunan nitro grubu önce nitrozo (-NO), sonra hidroksilamin (-NHOH) ve sonrasında ise amin (-NH<sub>2</sub>) grubuna indirgenmektedir (Şekil 1.2) (Claus, 2014). Bu reaksiyonu katalizleyen enzimler spesifik olmayan Nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NAD(P)H) bağlı nitroredüktaz enzimleridir ve büyük çoğunluğu karakterize edilmemişlerdir (Khan vd., 2013).



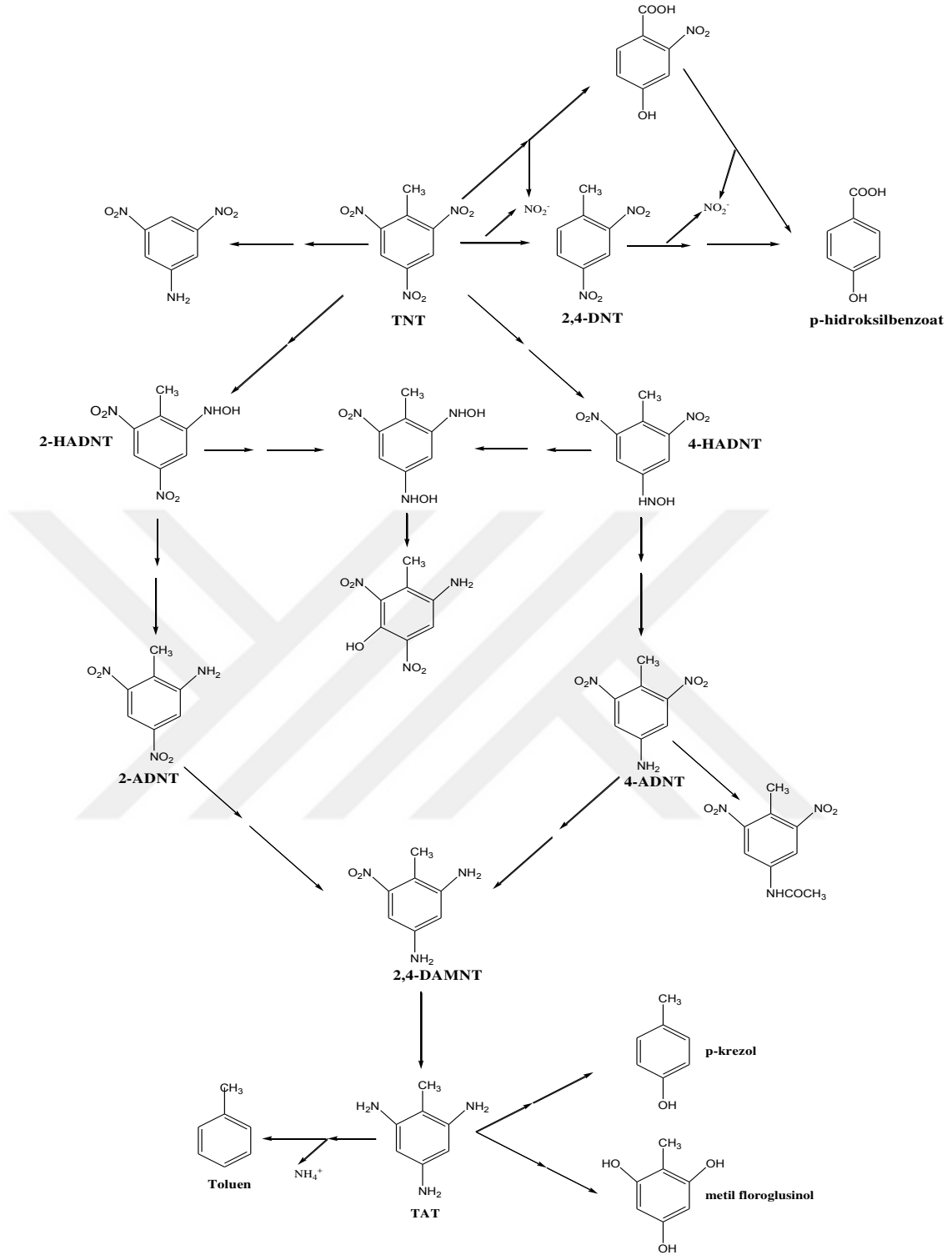
**Şekil 1.2.** TNT'nin yapısında bulunan nitro grubun indirgenmesi (Claus, 2014'ten değiştirilerek)

Aerobik bakteriler TNT'nin yapısında bulunan 3 nitro grubundan en fazla ikisini indirgeyebilmektedirler, ancak üçüncü nitro grubun indirgenmesi için anaerobik koşullar gerekmektedir. Çünkü ilk nitro grubun indirgenmesi aromatik halkanın elektron eksikliğini azaltmakta ve bu nedenle diğer nitro gruplarının amin gruplarına dönüştürülmesi için daha düşük redoks potansiyeli gerekmektedir (Funk vd., 1993; Hofstetter vd., 1999; Esteve-Núñez vd., 2001; Khan vd., 2013; Claus, 2014). Oksijensiz ortamda düşük redoks potansiyelinin oluşturulması ile TNT, *Clostridium* sp., *Desulfovibrio* sp., *Methanoccus* sp. ve *Moorella thermoacetica* gibi anaerobik bakteriler tarafından triaminotoluen (TAT) molekülüne dönüştürülmektedir (Boopathy ve Kulpa, 1994; Ederer vd., 1997; Khan vd., 2013; Claus, 2014). Şekil 1.3 ve Şekil 1.4'te sırasıyla aerobik ve anaerobik koşullar altında TNT'nin bakteriler tarafından parçalanma mekanizmaları verilmiştir.



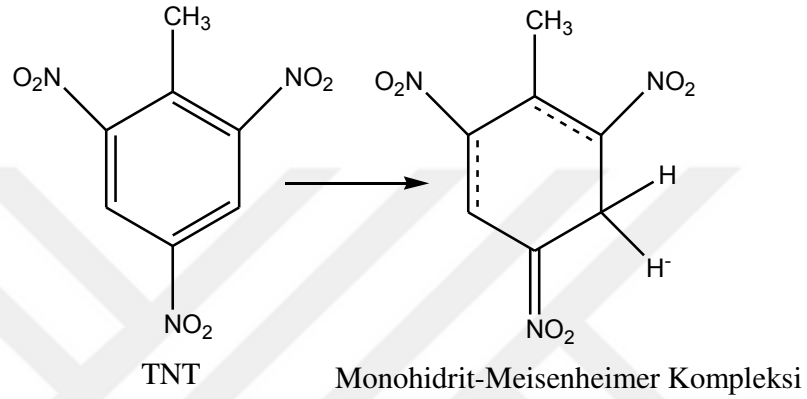
Şekil 1.3. Aerobik bakterilerde TNT'nin parçalanma mekanizması (Esteve-Nuñez vd., 2001'den değiştirilerek)





**Şekil 1.4.** Anaerobik bakterilerde TNT'nin parçalanma mekanizması (Esteve-Nuñez vd., 2001'den değiştirilerek)

Aerobik ve anaerobik bakteriler nitro gruplarını indirgeyerek TNT'yi metabolize edebilmektedir, ancak buna ek olarak bu bakteriler aromatik halkaya hidrit iyonları ekleyerek monohidrit ve dihidrit-Meisenheimer komplekslerinin oluşumu ile TNT'nin doğrudan indirgenmesini de sağlamaktadırlar (Şekil 1.5). Aynı hücre içerisinde her iki parçalanma mekanizması (nitro grupların indirgenmesi ve aromatik halka-indirgenmesi) da gerçekleşebilmektedir (Wittich vd., 2009; Claus, 2014).



**Şekil 1.5.** TNT'ye hidrit iyonunun eklenmesi ile Meisenheimer kompleksinin oluşması (Claus, 2014'ten değiştirilerek)

TNT'nin mikrobiyal parçalanması sırasında, TNT hücre içine büyük olasılıkla pasif difüzyonla girmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas putida* KT2440 bakterisi suşunda, TNT'nin varlığında çoklu ilaç akış pompalarının indüklenmesi, bakterinin TNT toksisitesini engellemek için hücre içi düşük TNT konsantrasyonunu sağlamada aktif ekstrüzyon sistemlerini kullandığı gösterilmiştir (Stenuit ve Agathos, 2010; Claus, 2014). TNT'nin parçalanması sonucu farklı miktarlarda dönüşüm ürünleri (ADNT, DAMNT) hücre dışında da bulunmuştur (Claus vd., 2007). Dolayısıyla, aktif taşıma sistemlerinin, aynı zamanda, bu bileşikler için de mevcut olduğu düşünülmektedir (Claus, 2014).

Bakteriler TNT'nin nitro gruplarını indirgeyerek TNT'yi parçalamaktadırlar ancak saf bakteri kültürleri ile TNT'nin mineralizasyonu oldukça nadirdir. Genellikle

mineralizasyon sadece bakteriyel konsorsiyumlar ile sağlanabilmektedir. TNT'nin parçalanma ürünlerinin çoğu oldukça reaktiftir ve hücre organellerine ya da toprak gibi katı desteklere kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Birkaç çalışmada TNT'nin parçalanması sırasında tanımlanamayan bileşiklerin oluşumu da rapor edilmiştir (McFarlan ve Yao, 2011). Bütün bunlara rağmen TNT'nin bakterilerle parçalanması avantajlıdır çünkü bakteriyel enzimatik reaksiyonlar çeşitlidir ve bakteriyel enzimler geniş bir yelpazede biyokimyasal reaksiyonları katalize edebilmektedirler (Muter vd., 2012; Khan vd., 2013). Dahası iki aşamalı bir aerobik/anaerobik bakteriyel parçalanma prosesinin (aerobik işlemi takiben bir anaerobik işlem) TNT'nin parçalanmasında son derece başarılı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (EPA, 1995; Breitung vd., 1996).

Son yirmi yıl içerisinde, TNT'nin mikrobiyal parçalanması üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarla, TNT'nin parçalanmasında yer alan çeşitli enzimler tanımlanmış, saflaştırılmış ve TNT ile kirlenmiş alanların biyoremediasyonunda kullanılacak pek çok mikroorganizma keşfedilmiştir (Ayoub vd., 2010; Khan vd., 2013). Bu çalışmaların sonucu olarak, TNT ve diğer patlayıcıları metabolize edebilen birçok bakteri türü TNT ve çeşitli patlayıcılarla kirlenmiş çevrelerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. TNT'yi metabolize edebilme yeteneğine sahip literatürde rapor edilen aerobik ve anaerobik bakteriler sırası ile Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te verilmiştir.

TNT'yi parçalayabilen bakteri türleri genellikle besin maddelerince zengin ortamlarda bulunan ve hızlı büyüeyebilen *Pseudomonas* gibi türlerdir (copiotroph), çünkü TNT yavaş büyüyen ve besince fakir ortamlarda yaşayabilen (oligotrophic) *Acidobacteria* gibi bakteri türlerini ciddi bir şekilde etkilemektedir. Buna ek olarak, TNT ile kirlenmiş bölgelerde yapılan tür analizlerinde mikrobiyal ve bitki popülasyon çeşitliliğinin azaldığı da görülmüştür ve bu sonuçlarda, TNT kirliliğinin ekosistemin işlevselliğini azalttığını göstermektedir (Stenuit ve Agathos, 2010).

**Çizelge 1.2.** TNT'yi aerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri

<b>Aerobik Bakteriler</b>	<b>Referans</b>
<i>Achromobacter spanius</i> STE 11	Gümüştü ve Tekinay, 2013
<i>Acinetobacter noscomialis</i>	Sangwan vd., 2015
<i>Bacillus cereus</i>	Mercimek vd., 2013
<i>Bacillus</i> sp.	Kalafut vd., 1998
<i>Bacillus mycoides</i>	Lin vd., 2013
<i>Clavibacter agropyi</i>	Rahal ve Moussa, 2011
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	French vd., 1998
<i>Enterobacter</i> sp.	Bae vd., 1995
<i>Klepsiella</i> sp.	Kim vd., 2002
<i>Mycobacterium vaccae</i>	Vanderberg vd., 1995
<i>Mycobacterium</i> sp. strain HL4NT-1	Vorbeck vd., 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kalafut vd., 1998; Mercimek vd., 2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MA101	Alvarez vd., 1995
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pak vd., 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B3468	Naumova vd., 1988
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Fiorella ve Spain, 1997
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Martin vd., 1997
<i>Pseudomonas</i> sp. clone A	Duque vd., 1993
<i>Pseudomonas putida</i>	Park vd., 2002
<i>Pseudomonas</i> sp. suşu FR2	McCormick vd., 1976
<i>Pseudomonas</i> sp. suşu CBS3	Schackmann ve Müller, 1991
<i>Pseudomonas</i> sp. suşu IIBx	Traxler vd., 1974
<i>Pseudomonas</i> sp. suşu 1-2wt	Traxler vd., 1974
<i>Pseudomonas</i> sp.	Jones vd., 1995; Chien vd., 2014
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Vorbeck vd., 1998
<i>Serratia marcescens</i>	Montpas vd., 1997
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	Rahal ve Moussa, 2011
<i>Sphingomonas</i> sp.	Maeda vd., 2006
<i>Raoultella terrigena</i>	Claus vd., 2007
<i>Staphylococcus</i> sp.	Kalafut vd., 1998
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Oh ve Kim, 1998

**Çizelge 1.3.** TNT'yi anaerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri

<b>Anaerobik Bakteriler</b>	<b>Referans</b>
<i>Bacillus mycoides</i>	Lin vd., 2013
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Ederer vd., 1997
<i>Clostridium bifermentans</i> CYS-1	Shim ve Crawford, 1995
<i>Clostridium bifermentans</i> LJP-1	Lewis vd., 1997
<i>Clostridium pasterianum</i>	McCormick vd., 1976
<i>Clostridium sordelii</i>	Ederer vd., 1997
<i>Clostridium</i> sp.	Hughes vd., 1998
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	Kalderis vd., 2011
<i>Desulfovibrio</i> sp. suşu B	Boopathy ve Kulpa, 1992
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Preuss vd., 1993
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Drzyzga vd., 1998
<i>Escherichia coli</i>	Ederer vd., 1997
<i>Lactobacillus</i> sp.	Ederer vd., 1997
<i>Methanococcus</i> sp. suşu	Boopathy ve Kulpa, 1994
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Kalderis vd., 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. suşu JLR11	Esteve-Nuñez ve Ramos, 1998
<i>Serratia marcescens</i>	Kalderis vd., 2011
<i>Veillonella alcalescens</i>	McCormick vd., 1976

## **1.5. TNT'nin Biyoremediasyonu**

Mikroorganizmalar yıllardır kentsel ve endüstriyel atıkların arıtılmasında kullanılmaktadırlar (Rodgers ve Bunce, 2001). Doğada var olan kirleticileri daha az zararlı maddelere dönüştürmek için canlı organizmaların daha çok mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik temelli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmemektedir (Chaundry, 1994; Ayoub vd., 2010). Kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından parçalanması çevre dostu bir yöntemdir ve doğal yollarla meydana geldiği için çevre kirliliğine maruz kalmış toprağın yapısını ve biyolojisini de bozmamaktadır (Claus, 2014). Ayrıca biyoremediasyon yöntemleri patlayıcılarla kirlenmiş bölgelerin arıtılmasında kullanılan yakma gibi geleneksel yöntemlere göre daha düşük maliyetlidir ve uygulaması kolaydır. Bu yöntemlerde parçalanma doğal yollarla gerçekleştiği için biyolojik temelli arıtım prosesleri çevre dostu bir arıtım prosesi olarak son yıllarda önem kazanmıştır (Haselhorst, 1999; Rodgers ve Bunce, 2001; Park vd., 2003; Dindar vd., 2010; Claus, 2014).

Bir toksik bileşiğin biyolojik olarak muamele edilebilirliği bu bileşiğin biyolojik olarak parçalanmasının mümkün olmasına bağlıdır. TNT doğada uzun süre bozunmadan kalabilmesine rağmen mikrobiyal ataklar karşısında hassastır (Park vd., 2003). Günümüze kadar, çeşitli patlayıcılarla kirlenmiş çevrelerin arıtılması için geliştirilen çeşitli biyoremediasyon yöntemleri vardır (Esteve-Nuñez vd., 2001; Lewis vd., 2004; Claus, 2014). Biyolojik temelli bu yöntemlerden en sık kullanılan yöntemler biyoreaktörler, toprak kompostlama, arazi düzenleme ve fitoremediasyon olarak sınıflandırılmaktadırlar (Haselhorst, 1999; Esteve-Nuñez vd., 2001). TNT ile kirlenmiş bölgelerin ıslahında kullanılan bu teknolojilerin kullanım şekilleri, uygulamadaki avantajları ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir.

### **1.5.1. Biyoreaktörler**

Uzun süre doğada bozunmaya uğramadan kalan kirleticilere maruz kalmış toprakların arıtılmasında uygulama şartlarının kontrol edilebildiği biyoreaktör yöntemi en uygun ve etkili yaklaşımdır (Mohan vd., 2006; Dindar vd., 2010). Bu

yöntemde, kirli toprak, su ve besinler ile karıştırılarak farklı şekilde tasarlanmış biyoreaktörlerin içinde karıştırılan bir bulamaç elde edilmektedir (Lewis vd., 2004). Biyoreaktörlerde, su ve besin ilavesi ile toprakta var olan mikroorganizmaların büyümesi teşvik edilirken, mikroorganizmaların aktivitelerini etkileyecek sıcaklık, pH, besin ve oksijen derişimi gibi uygulama koşulları da kontrol edilmektedir (Haselhorst, 1999; Özcan ve Türkdoğan, 2014).

Biyoreaktörlerle arıtım uygulaması diğer yöntemlere göre çok daha hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, toprakta kirleticiler varlığında doğal olarak bulunan mikroorganizmaların aktivitelerini korumak için kirleticilerle kirlenmiş toprak kazılarak alınmakta ve biyoreaktörlerde su ile karıştırılmaktadır. Mikroorganizmaların aktivitesini artırmak için oksijen, besin ilavesi yapılmakta ve kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından optimum koşullarda parçalanması için ısı, besin, pH ve oksijen miktarı gibi uygulama koşulları kontrol altında tutulmaktadır. Bu yöntemin, kütle transfer hızının ve mikroorganizma/kirletici/besin miktarı oranlarının artırılabilir olması, çeşitli elektron alıcılarının kullanılabilmesi, yüzey aktif maddeler ve farklı çözücülerin kullanımı ile kirleticinin parçalanmasının artırılması, sıcaklık, pH gibi uygulama koşullarının optimizasyonunun ve kontrolünün sağlanması gibi üstünlükleri vardır (Fuller ve Manning 2004, Dindar vd., 2010).

### **1.5.2. Kompostlama**

Kompostlama askeri bölgelerdeki patlayıcı kirliliğinin arıtılmasında kullanılmak üzere seçilen, test edilen ve uygulanan ilk biyolojik arıtım prosesidir (Lewis vd., 2004; Kalderis vd., 2011). Yapılan araştırmalarla askeri alanlarda var olan TNT kirliliğinin topraktan giderilebileceği gösterilmiştir (Williams vd., 1992; Esteve-Nuñez vd., 2001). Bütün kompostlama sistemlerinde, kolayca parçalanabilen bitkisel atıklar, gübre ya da saman gibi tarımsal işlemlerin yan ürünleri, toprağın optimum havalandırmasını sağlayacak hacim artırıcı maddeler ile birlikte kirlenmiş toprak ile karıştırılmaktadır (Bruns-Nagel vd., 2000; Lewis vd., 2004). Organik maddelerin kirli toprağa eklenmesi ile topraktaki patlayıcı konsantrasyonu düşürülmekte ve

yüksek konsantrasyonlardaki patlayıcı maddelerin mikrobiyal popülasyon üzerindeki toksik etkileri önlenmektedir (Lewis vd., 2004). Organik materyallerle ve kalınlaştırıcı ajanlarla karıştırılan toprak yığınları düzenli olarak havalandırılmakta ve toprağın nem içeriği, oksijen seviyesi ve sıcaklık gibi toprakta var olan mikroorganizmaların aktivitesini etkileyecek faktörler takip edilmektedir (Haselhorst, 1999; Özcan ve Türkdoğan, 2014). TNT ile kirlenmiş bölgelerin arıtılması için gübrelerin sıra sıra yığınlanması (windrow composting) ve anaerobik-aerobik kompostlama sistemleri son derece verimli proseslerdir (Bruns-Nagel vd., 2000). Bu kompostlama sistemleri ile anaerobik fazda TNT, ADNT ve DAMNT bileşiklerine indirgenmekte ve sonrasında havalandırma fazında TNT'nin parçalanması ile açığa çıkan birçok ara ürün muhtemelen kovalent bağlarla toprağa bağlanarak ortadan kaldırılmaktadır (Bruns-Nagel, 1998; Esteve-Nuñez vd., 2001). Kompostlama yöntemi ile TNT gibi patlayıcıların topraktan arıtılması bazen karmaşık olabilmektedir, çünkü TNT veya TNT'nin parçalanma ürünleri kompost karışımına bağlandıysa geri toprağa sızabilmektedir. Ayrıca kalınlaştırıcı ajanların kullanılması sebebiyle toprak orijinal hacminin 30 katına kadar çıkabilmektedir (Haselhorst, 1999). Kompostlama tekniğinin uzun inkübasyon süresi, uygulama maliyeti (organik materyallerin ve kalınlaştırıcı ajanların maliyeti) ve patlayıcıların parçalanmasında yer alan mikroorganizmaların tanımlanamaması gibi başlıca dezavantajları da vardır (Esteve-Nuñez vd., 2001).

### **1.5.3. Arazi Düzenleme**

Toprakta var olan mikroorganizmaların aktivitesi ile toprağın kirleticilerden arındırılmasını sağlayan bir toprak arıtım prosesi de arazi düzenleme yöntemidir (Esteve-Nuñez vd., 2001; Clark ve Boopathy, 2007; Dindar vd., 2010). Katı-faz arıtma yöntemi olan arazi düzenleme yönteminde, kirlili toprak yerinden kazılır, ince tabaka halinde başka bir alana yayılır ve toprağa besin, nem ilavesi yapılarak toprak belirli periyodik aralıklarla döndürülerek havalandırılır (Esteve-Nuñez vd., 2001; Dindar vd., 2010). Besin ve nem ilavesi ve havalandırma ile toprakta bulunan mikroorganizmaların aktivitesi teşvik edilmektedir. Bu yöntemde, yerli mikrobiyal

aktiviteyi en üst düzeye çıkarmak için gerek duyulduğu takdirde belirli aralıklarla toprağa besin ilavesi de yapılmaktadır (Widrig vd., 1997; Dindar vd., 2010).

#### **1.5.4. Fitoremediasyon**

Yeşil bitkiler kullanılarak kirlenmiş toprak ve suların arıtılması fitoremediasyon olarak bilinmektedir (Cole, 1997; Esteve-Nuñez vd., 2001). Bu yöntem diğer biyoremediasyon yöntemleri gibi düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve yüksek derişimlerde kirleticilere maruz kalmış bölgelerde bile uygulanabilir olmasından dolayı avantajlıdır. Fitoremediasyon yöntemi çeşitli teknolojileri içerir. Bu teknolojiler: fitoekstraksiyon; bitkilerin hasat bölgelerinde kirleticileri konsantre etmesi, fitostabilizasyon; kirleticileri bitkisel dokulara bağlayarak kirleticilerin kullanılabilirliğinin azaltılması, fitodegradasyon; bitkilerin enzim sistemi ya da bitkilerle ilişkili mikroorganizmaların enzim sistemi ile toksik kirleticilerin parçalanması ve son olarak fitovolatilizasyon; kirleticilerin bitkiler kullanılarak buharlaştırılmasıdır (Rodgers ve Bunce, 2001; Kalderis vd., 2011).

Bitkiler kimyasalları gaz, sıvı ve katı fazda almalarına rağmen organik moleküllerin bitkilere taşınması genellikle çözelti içerisinde meydana gelmektedir. Bu şekilde taşınmaya elverişli kimyasallar 0,5-3,0 arasında su dağılım katsayısına ( $\log K_{ow}$ ) sahip moleküllerdir (Rodgers ve Bunce, 2001). Çoğu bitkinin kök sistemleri yüksek konsantrasyonlarda TNT kirliliğine sahip bölgelerin arıtımı için verimsizdir çünkü bitkilerin TNT'yi metabolize edebilen enzim sistemleri yoktur. Ancak TNT bu aralıkta su dağılım katsayısına sahip olduğu için bitkiler TNT'yi kolayca bünyelerine alabilmektedirler (Stenuit ve Agathos, 2010).

Fitoremediasyon sırasında, bitkiler TNT'yi hücre kofullarına ve hücre duvarlarına dahil etmektedir (Haselhorst, 1999). Bitkilerin kofulları ve hücre duvarları yardımıyla TNT gibi kirleticileri bünyelerine dahil etmesinin yanı sıra, çeşitli mikroorganizma topluluklarının gelişmesine yardımcı olan bitki kök yapıları da TNT'yi detoksifiye ve mineralize edebilmektedir. TNT'nin bitkiler tarafından immobilizasyonu ve parçalanması, TNT'nin toprağa ve su kaynaklarına sızmasını



engelleyebilmektedir (Hasehorst, 1999). Fitoremediasyon kontaminasyon seviyesi orta seviyede olan bölgelerin arıtılmasında iyi bir arıtım yöntemidir ve uygulamada özel ekipman gereksiniminin olmaması ve ortama yeni kimyasalların eklenmesi gerekmediğinden dolayı avantajlı bir yöntemdir (Panz ve Miksch, 2012; Özcan ve Türkdoğan, 2014).

Son on yılda, çevre kirleticilerin bitkilere karşı olan detoksifikasyonunu engellemek için bitkiler genetik olarak transgenik mahsul gelişimine benzer bir strateji izleyerek modifiye edilmiştir. Nitroredüktaz ve sitokrom P450 gibi patlayıcıların parçalanmasında görev alan bakteriyel enzimler çeşitli bitkilere aktarılmış ve oluşturulan transgenik bitkilerin patlayıcılara karşı olan toleransının, patlayıcıları bünyelerine alımlarının ve bitkiler tarafından patlayıcıların detoksifikasyonunun arttığı belirlenmiştir. Mikroorganizmaların biyolojik parçalama yeteneklerini sergileyen transgenik bitkilerin kirlenmiş bölgelerin arıtımı için kullanılması verimli ve çevre dostu bir teknoloji olarak ümit vermektedir (Kalderis vd., 2011). Transgenik bitkiler ile yapılan bir çalışmada, Zhu vd. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* OYE3 (Old yellow enzyme) geninin aktarıldığı *Arabidopsis* bitkisini kullanarak bir TNT fitoremediasyon sistemi oluşturmuşlardır. OYE3 geninin aktarılması ile elde edilen transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin TNT toleransının ve ortamda bulunan TNT'yi ayırma kapasitelerinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

## 1.6. Nitroredüktazlar

Nitroredüktazlar nitroaromatik bileşikleri metabolize edebilen enzimlerdir. Nitroredüktaz protein ailesi, flavinadenindinükleotide (FAD) veya flavinmononükleotide (FMN) bağlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) indirgenme gücünü kullanarak çeşitli nitroaromatik ve nitroheterohalkalı türevleri metabolize edebilen bir gruptan oluşmaktadır. Bu enzimler çeşitli bakteri türlerinde ve daha nadiren ökaryotlarda bulunabilir. Nitroredüktaz proteinleri, nitrobileşiklerin aktivasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır ve nitro grubu bulunduran bileşiklerin toksisitesini azaltmakta kullanıldığı için insan ve çevre sağlığı açısından, biyoremediasyon gibi biyoteknolojik uygulamalarda katalizör olarak kullanılmaları,

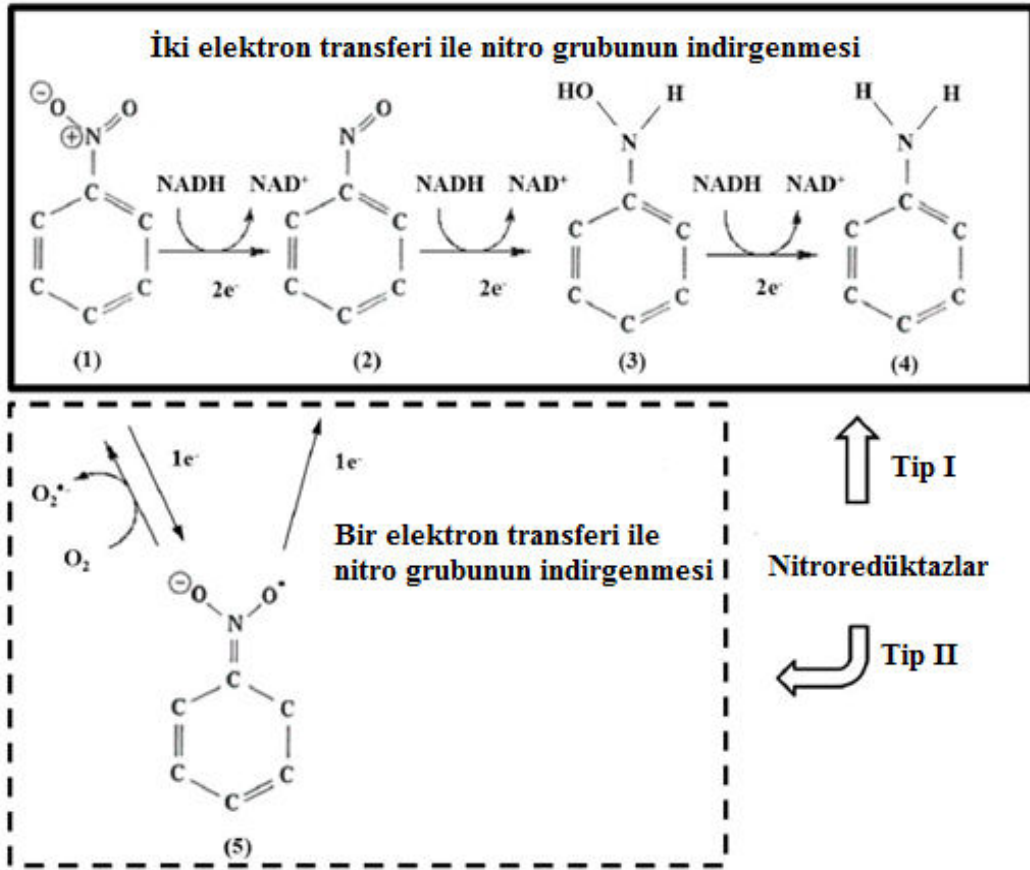
kemoterapötik tümör tedavisinde, spesifik hücrelerin ablasyonunda (ablasyon toksik madde ile bir vücut kısmının veya fonksiyonunun kaybedilmesi) ve antibiyotik direnci gibi klinik uygulamalarda kullanılmaları sebebiyle son yıllarda önem kazanmıştır (Oliveira vd., 2010).

Nitro grubunda bulunan azot ve oksijen atomları arasındaki bağ polardır, çünkü oksijen azottan daha elektronegatifdir ve azotun elektronlarını çekerek kısmi negatif ve pozitif kutuplar oluşturmaktadır. Pozitif kutup elektronları çekme eğilimindedir ve bu nedenle indirgenme için büyük bir eğilime sahiptir (Spain, 1995). Nitro grupların indirgenmesi bir veya iki elektron transferi yapabilen nitroredüktazlar tarafından kataliz edilmektedir (Bryant vd., 1981). Bundan dolayı, nitroredüktazlar, nitro gruplarını indirgeme kabiliyetlerine göre (oksijen varlığında bir veya iki elektron transferi yapmalarına göre) iki grup altında sınıflandırılmaktadırlar (Oliveira vd., 2010).

Tip I nitroredüktaz (oksijen-duyarsız) enzimi: Oksijen varlığında veya yokluğunda NAD(P)H'dan nitro gruba ardışık iki elektron transferini kataliz etmekte ve nitrozo ve hidroksilamin ara maddelerinin ve son olarak birincil aminlerin oluşumunu sağlamaktadır. Hidroksilamin ara ürününün oluşumu çok iyi tanımlanmıştır, çünkü nitro grubunun indirgenmesiyle ilgili birkaç çalışmada tespit edilmiştir. Ancak, nitrozo ara grubunun çok reaktif olması ve ikinci-elektron transferi reaksiyonunun çok hızlı olmasından dolayı, oluşan nitrozo ara ürünlerinin izolasyonu çok zordur (Bryant vd., 1981; Spain, 1995).

Tip II nitroredüktaz (oksijen-duyarlı) enzimi: Oksijen varlığında nitro grupların bir elektron transferi ile indirgenmelerini kataliz etmekte ve daha sonra moleküler oksijenle tepkimeye girecek bir nitro anyonun oluşmasını sağlamaktadır. Bu gruptaki nitroredüktazlar, tek-elektron transferi reaksiyonlarını gerçekleştirmektedirler, nitro anyon radikallerinin oluşumunu stabilize etmektedirler ve oksijene bir elektron transfer ederek süperoksit anyonunu oluşturmaktadırlar (Oliveira vd., 2010).

Tip I ve Tip II nitroredüktaz enzimlerinin benzen halkasına bağlı nitro grubu indirgeme tepkimeleri Şekil 1.6'da verilmiştir.



**Şekil 1.6.** Tip I ve Tip II nitroredüktaz enzimlerinin aromatik halkada bulunan nitro gruplarını indirgeme mekanizmaları (Oliveira vd., 2010'dan değiştirilerek)

Nitroredüktaz proteinleri bakterilerde yaygın olarak bulunmakta ve aynı zamanda nitroredüktaz benzeri proteinler ökaryot hücrelerde de bulunmaktadır (Bryant vd., 1981). Tip I nitroredüktazları, nitrofuran, nitrobenzen, nitrofenol, nitrobenzoat ve nitrotoluen (TNT) gibi çeşitli nitrobileşiklerin indirgenmesinde görev almaktadır. Bu enzimlerin öneminden dolayı farklı organizmalardan izole edilmiş nitroredüktazlar üzerine birçok klonlama, gen izolasyonu, yapısal analiz ve fonksiyonel karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hemen hemen tüm nitroredüktazlar benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. Genellikle, yaklaşık 30 kDa'luk proteinlerdir ve geniş substrat özelliğine sahip, kofaktör olarak FMN içeren ve iki elektron transfer mekanizması kullanılarak çok çeşitli nitro bileşiklerin indirgenmesini katalizleyen proteinlerdir (Oliveira vd., 2010).

### 1.7. TNT'nin Mikrobiyal Parçalanması ile İlgili Çalışmalar

Duque vd. (1993) azot kaynağı olarak TNT'li ortamda büyüeyebilen ve kültür ortamında nitrit birikimi yapmayan *Pseudomonas* sp. clone A bakterisini izole etmişlerdir. İzole edilen bakterinin, TNT'yi azot kaynağı olarak kullanırken, nitro grupları uzaklaştırarak TNT'yi 2,4-DNT'ye, 2,6-DNT'ye, 2-nitrotoluene ve toluene metabolize ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmada, *Pseudomonas putida* TOL pWWO-Km plazmitinin izole edilen *Pseudomonas* sp. clone A'ya aktarılması ile azot ve karbon kaynağı olarak sadece TNT'nin bulunduğu ortamda büyüeyebilen bakteri suşu elde edilmiştir.

Oh ve Kim (1998) atrazin uygulamalarında kullanılan bir bölgeden TNT'yi parçalamak için, azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerini kullanarak M91-3 olarak isimlendirdikleri bakteri suşunu izole etmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen bakteri suşu Gram boyama ve Trypticase Soy Agar (TSA) üzerinde büyüyen bakterilerin yağ asit analizleri ile *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanımlanmıştır. İzolat 100 ppm (mg/L) TNT içeren besiyerinde büyütülmüş ve izolat tarafından 28 gün sonra başlangıçtaki TNT'nin tamamının metabolize edildiği belirlenmiştir. HPLC ve GC-MS analizleri ile parçalanma ürünleri 2-ADNT ve 4-ADNT olarak tanımlanmıştır.

Esteve-Nuñez ve Ramos (1998) bir toprak izolatu olan *Pseudomonas* sp. JLR11 bakteri suşu ile anaerobik olarak TNT'nin metabolizasyonunu çalışmışlardır. *Pseudomonas* sp. JLR11 bakteri suşu Granada (İspanya) şehrinde bulunan bir atık su arıtım tesisinden, M8 minimal besiyeri kullanılarak izole edilmiştir. İzolat azot kaynağı olarak sadece TNT ve nitrat bulunan besiyerlerinde ayrı ayrı büyütülmüş ve hücre ekstraktları SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. TNT'li ortamda büyüyen bakterilerin hücre ekstraktlarında dört farklı protein bandı tespit edilmiş ve yazarlar bu farkın TNT metabolizmasının, *Pseudomonas* sp. JLR11 bakteri suşunda bazı özel proteinlerin indüklenmesinde görev aldığını göstermekte olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, anaerobik koşullar altında, M8 besiyerinde 60 mg/L TNT varlığında, pH 7,0'de, 25-30 °C'de ve 400-1000 rpm çalkalama hızında, *Pseudomonas* sp.

JLR11 bakteri suşunun 7 gün içinde başlangıçtaki TNT'nin % 95'ini parçaladığı belirlenmiştir.

Khachatryan vd. (2000) tarafından bazı toksik kimyasallara toleranslı birkaç bakteri suşu Yerevan (Ermenistan) gölünden, Yerevan şehrinin farklı bölgelerindeki su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu bakteri suşlarından bazılarının TNT'yi parçalayabildikleri tespit edilmiş ve diğer bakteri suşlarına göre TNT parçalama kapasitesi daha iyi olan iki farklı bakteri suşu belirlenmiştir. Seçilen bu izolatlar minimal besiyerine % 0,015 TNT eklenerek 18-20 saat süreyle 25 °C'de ve 120 rpm'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür ortamındaki TNT miktarı spektrofotometre ile 360 nm dalga boyunda renk değişimi ölçülerek belirlenmiştir. N8 ve N10 olarak adlandırılmış suşların her ikisinde de başlangıç TNT miktarının 0,4 mM/L olduğu ortamda TNT seviyesinin 0,1-0,2 mM/L'ye kadar azaldığı tespit edilmiştir.

Oh vd. (2003) savaş mühimmatları ile kirlenmiş bölgeden izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* MX bakteri suşu ile besiyerinde bulunan 100 mg/L TNT'nin tamamının 10 saat içinde parçalandığını belirlemişlerdir. Bu bakteri izolatu ile farklı pH değerlerinde yapılan TNT metabolizasyon çalışmalarında, TNT'nin metabolizasyonu için optimal pH aralığının 7-8 olduğu bulunmuştur. Metilen klorit kullanılarak parçalanma ürünleri ekstrakte edildikten sonra GC-MS ile 2-ADNT, 2,2-azoksitoluen (2,2-AZT) ve 2-HADNT olarak tanımlanmıştır.

Park vd. (2003) TNT ile kontamine olmuş bölgeden izole ettikleri *Pseudomonas putida* KP-T202 bakteri izolatının TNT'nin parçalanması için ticari olarak elverişli hale getirilmesi amacıyla izolatın TNT bozunmasının optimal koşullarını belirlemişlerdir. Başlangıç konsantrasyonu olarak 100 mg/L TNT'li ortamda, izolatın aerobik koşullar altında 15 saat içinde kültür ortamında bulunan TNT'nin tamamını parçaladığını belirlemişlerdir. Bu izolatın TNT metabolizasyonunun optimal koşullarını belirlemek için izolat 20-37 °C ve pH 4-9 aralığında farklı karbon kaynaklarıyla (glukoz, gliserol, mısır maserasyon sıvısı gibi) inkübe edilmiş ve besiyerinde yüzey aktif madde olarak Tween 80 kullanılmıştır. TNT'nin biyolojik parçalanması için izolatın optimal koşulları 30 °C, pH 7, % 1 mısır maserasyon

sıvısı, % 0,025 NH<sub>4</sub>Cl, % 1 Tween 80 ve reaksiyon hız sabiti 0,348 s<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. TNT ve TNT'nin ara ürünlerinin analizleri HPLC ile yapılmış ve izolatin kültür ortamında TNT metabolizasyonu sonucu ara ürün olarak 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT ve 2,6-DNT bileşiklerinin oluştuğu belirlenmiştir.

Maeda vd. (2006) Japonya'nın Kitakyushu şehrinin Yamada Green bölgesinden alınan TNT ile kirlenmiş toprak örneklerinden TNT'yi metabolize edebilen bakteri türleri izole etmişlerdir. Bu çalışmada, altı tane TNT'yi parçalayabilen bakteri izolatu elde edilmiştir (*Pseudomonas* sp. TM15 ve TM30, *Sphingomonas* sp. TM22, *P. putida* TM38, *P. fluorescens* TM42 ve *Pseudomonas* sp. TM55). Bu izolatlar tarafından TNT'nin parçalanması, parçalanma ürünlerinin tanımlanması ve ortaya çıkan NO<sub>2</sub> iyonun spektrofotometrik analizleri ile takip edilmiştir. Bu bakterilerden, *Pseudomonas* sp. TM15 ve TM30 ve *Sphingomonas* sp. TM22'nin TNT'yi diğer bakteri suşlarından daha iyi yıkabildikleri belirlenmiştir. İzolatların TNT'yi 2-HADNT, 4-HADNT, 2-ADNT ve 4-ADNT ara ürünlerine dönüştürdükleri tespit edilmiştir.

Claus vd. (2007) Almanya'da bulunan iki eski mühimmat üretim tesisinden alınan toprak ve su örneklerinden izole ettikleri, 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile tanımladıkları *Raoultella terrigena* izolatu ile TNT'nin parçalanmasını araştırmışlardır. Bu izolat ile minimal besiyerinde  $\geq$  % 0,05 nutrient broht ya da glikoz derişimlerinde, başlangıçtaki TNT'nin (100 mg/L) tamamının 7 gün içinde uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. İzolat radyoaktif işaretli <sup>14</sup>C-TNT ile 7 günlüğüne inkübe edildiğinde, radyoaktivite ölçümlerine göre 3. günün sonunda kültür ortamından alınan üst fazın radyoaktivitesinin, başlangıçtaki radyoaktivitenin % 30'unu oluşturduğu ve 6. gün sonunda üst fazın radyoaktivitesinin % 15'lere kadar düştüğü belirlenmiştir. Başlangıçtaki radyoaktivitenin % 80-90'ının ise hücresel pellet içerisinde suda çözünmeyen organik bileşiklerde olduğu bildirilmiştir. HPLC analizleri ile TNT'nin izolat tarafından parçalanması sonucu bakteri kültüründe çözülmüş halde 2-ADNT, 4-ADNT ve 2,4-DNT birikimleri ve hücre pelletlerinde ana ürün olarak azoksi-dimerler tespit edilmiştir.

Nyanhongo vd. (2009) TNT ile kirlenmiş toprak ve atık sularından izole ettikleri *Pseudomonas putida* GG04 ve *Bacillus* SF bakterilerini kullanarak TNT'nin mikrobiyal parçalanmasını çalışmışlardır. Bakteriler karbon kaynağı olarak glikoz ve maya özütünün kullanıldığı besiyerinde, 160 µM TNT konsantrasyonunda, 30 °C'de ve 150 rpm çalkalama hızında kültür edilmiştir. Başlangıçtaki TNT miktarının tamamının *Bacillus* SF tarafından 12 saatte, *P. putida* GG04 tarafından ise 16 saatte yıkıldığı yapılan HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Bu bakterilerin, TNT'yi 4-ADNT, 2-ADNT, farklı azoksi bileşiklere, 2,4-DAMNT ve 2,6-DAMNT bileşiklerine indirgediği yine yapılan HPLC analizleri ile belirlenmiştir. TNT'nin parçalanması sırasında 600 µM derişimlerinde farklı maddeler eklenerek (gayakol, ferulik asit, siringik asit ve katekol) ara ürünlerin birikimi engellenmiştir. Ancak gayakol ve katekolün kullanıldığı kültürlerde ADNT ve DAMNT birikimlerinin engellendiği tespit edilirken, ferulik asit ve siringik asit ilaveli kültürlerde bu ara ürünlerin birikiminin engellenmediği tespit edilmiştir.

Rahal ve Moussa (2011) Kaliobeia (Mısır) bölgesinde bulunan cephan fabrikasından aldıkları toprak örneklerinden TNT'yi aerobik olarak etkili bir şekilde yıkabilen 20 tane bakteri suşu izole etmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen bakteri suşları arasından TNT'yi en iyi yıkan iki bakteri suşunun tanımlanması yapılmıştır (*Clavibacter agropyi* ve *Sphingomonas sanguinis*). Bu iki bakteri suşu, TNT'nin azot kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde büyütülmüş ve TNT'nin parçalanma ürünleri GC-MS analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen izolatlar tarafından TNT'nin parçalanması yapılan nitrit, nitrat ve amonyum testleri ile de gözlemlenmiştir. İzole edilen bu bakterilerin besiyerinde bulunan TNT'nin tamamını 7 gün içinde parçaladıkları ve TNT'nin parçalanması sonucu 2-ADNT ve 4-ADNT ara ürünlerinin oluştuğu tespit edilmiştir. TNT metabolizasyonu sırasında ise, bakteriyel kültürlerde, nitrit, nitrat ve amonyum birikimleri de tespit edilmiştir.

Gümüüşü ve Tekinay (2013) Ankara Elmadağ bölgesinde bulunan askeri alandan aldıkları TNT ile kirlenmiş toprak örneklerinden izole ettikleri *Achromobacter spanius* STE 11 bakterisi ile aerobik olarak TNT'nin parçalanmasını araştırmışlardır. İzole edilen bakterinin tanımlanması 16S rDNA yöntemi ile yapılmıştır. Alınan toprak örneklerindeki TNT miktarının 20 ile 245 mg/kg arasında olduğu HPLC

analizleriyle belirlenmiştir. İzole edilen *A. spanius* STE 11 bakterisi azot kaynağı olarak sadece TNT (100 ppm) bulunan M8 besiyerinde 30°C'de ve 125 rpm'de kültür edilmiş ve 20 saatin sonunda izolat tarafından kültür ortamında bulunan TNT'nin tamamen yıkıldığı belirlenmiştir. TNT'nin biyolojik parçalanması HPLC ve yapılan nitrit, nitrat ve amonyum testleri ile takip edilmiştir. TNT'nin yıkımı sonucu oluşan ara ürünler HPLC analizi ile belirlenmiştir. Bu izolatla yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 4-ADNT ve 2-ADNT ara ürünlerinin oluştuğu ve parçalanma sırasında nitrit, nitrat ve amonyum iyonlarının açığa çıktığı belirlenmiştir.

Mercimek vd. (2013) TNT ile kirlenmiş NATO (İzmir) topraklarından izole ettikleri ve VİTEK bakteri tanımlama sistemi ile tanımladıkları *Bacillus cereus* izolatını kullanarak TNT'nin minimal besiyerinde parçalanmasını araştırmışlardır. Alınan toprak örneklerindeki TNT kirlilik miktarı yapılan kolorimetrik ve HPLC analizleri ile 61,35 mg/L olarak belirlenmiştir. TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında kalan TNT miktarı HPLC ile belirlenmiş ve TNT'nin parçalanma ürünleri GC-MS analizleri ile tespit edilmiştir. Bu izolatla yapılan TNT parçalama çalışmalarında, başlangıç konsantrasyonu 50 ve 75 mg L<sup>-1</sup> TNT olan besiyerinde, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT parçalanma oranı sırası ile % 68 ve % 77 olarak bulunmuştur. Elde edilen izolatın TNT'yi metabolize etmesi sonucu 2,4-DNT ve 4-ADNT ara ürünlerinin oluştuğu tespit edilmiştir.

Chien vd. (2014) karbon, azot ve enerji kaynağı olarak TNT ile zenginleştirilmiş kültür teknikleri ile TNT ile kirlenmiş topraktan çeşitli mikroorganizma suşları izole etmişlerdir. Toprak örneğindeki TNT miktarı HPLC analizi ile 1860 ppm olarak belirlenmiştir. Elde edilen izolatların 16S rRNA gen karşılaştırılması ile *Pseudomonas* türleri oldukları belirlenmiştir. Daha ileri çalışmalar için iki suş (*Pseudomonas putida* TP1 ve *Pseudomonas aeruginosa* TP6) seçilmiştir. Her iki suş karbon, azot ve enerji kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde büyüme yeteneği göstermiş ve TNT'yi metabolize etmişlerdir. 22 günlük inkübasyonun ardından elde edilen izolatlar tarafından kültür ortamında bulunan TNT'nin % 90'nının yıkıldığı yapılan HPLC analizleri ile belirlenmiştir.



Hannah Elizabeth ve Panneer Selvam (2014) Tamil, Nadu (Hindistan) Vellore bölgesinden 3 farklı bakteri türü izole etmişler ve bu bakteriler arasında en yüksek TNT yıkım kapasitesine sahip izolatu 16S rDNA dizi analizi ile *Pseudomonas aeruginosa* sp. TUHP1 olarak tanımlamışlardır. İzolatu TNT metabolizasyonu sonucu açığa çıkan ara ürünleri, HPLC analizleri ile 2-HADNT ve 4-HADNT ve GC-MS analizleri ile 2-ADNT ve 4-ADNT olarak belirlenmiştir. İzolatu TNT'nin biyolojik parçalanması sırasında en iyi gelişim gösterdiği optimal koşulların 27 °C ve pH 7 olduğu tespit edilmiştir.

Mercimek vd. (2015) İzmir'de bulunan (Türkiye) NATO askeri endüstri bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole ettikleri ve VİTEK bakteri tanımlama sistemi ile tanımladıkları *Pseudomonas aeruginosa* bakteri izolatu ile TNT'nin bakteriyel parçalanmasını araştırmışlardır. Bu izolatla yapılan TNT parçalama çalışmalarında 50 ve 75 mg/L TNT içeren besiyerinde, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'nin sırası ile % 46 ve % 59 oranında parçalandığı yapılan HPLC analizleri ile belirlenmiştir. TNT'nin parçalanması sırasında 2,4-DNT ve 4-ADNT birikimleri de yapılan GC-MS ve TLC analizleri ile tespit edilmiştir.

Sangwan vd. (2015) TNT ile kirlenmiş alandan izole edilen *Acinetobacter noscomialis* bakteri suşunu kullanarak atık su içerisinde bulunan TNT'nin parçalanmasını araştırmışlardır. Üç proses değişkeni olan pH, başlangıçtaki TNT konsantrasyonu ve parçalanma süresi Box-Behnken tasarımını içeren cevap yüzey yöntemi (response surface methodology) kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan araştırmaların sonunda 50-60 mg/L başlangıç TNT konsantrasyonunun, 8-9 pH aralığının ve 48-72 saat parçalanma süresinin *A. noscomialis* kültürleri ile TNT'nin parçalanması için optimal olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullar altında atık su içerisinde bulunan başlangıçtaki TNT'nin % 99'unun parçalandığı belirlenmiştir.

## 1.8. Çalışmanın Amacı

TNT'nin yaygın olarak kullanılan bir patlayıcı olması bu kimyasal ile ilişkili çeşitli çevre problemlerini de beraberinde getirmektedir. TNT'nin üretimi, depolanması ve imhası için kullanılan bölgelerde toprak ve yer altı suları TNT kirliliğine maruz kalmaktadır. TNT'den kaynaklı bu kirliliğin çevreye daha az zarar veren ve daha ekonomik olan biyolojik yöntemlerle giderilmesi insan sağlığı ve ekosistemin korunumu açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, uzun yıllardır kullanılmayan mühimmatların imhası sırasında TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen bölgeden alınan toprak ve atık su örneklerinden, mikrobiyolojik yöntemlerle azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besi ortamında büyüeyebilen, etkili bir şekilde TNT'yi metabolize edebilen, TNT ile kirlenmiş bölgelerin arıtılmasında kullanılma kapasitesine sahip bakteri suşları izole etmek, elde edilen bakterilerin karakterizasyonunu ve stoklamasını yapmak ve TNT'yi en iyi yıkan bakteri suşları için pH, sıcaklık gibi uygun inkübasyon koşullarını belirleyerek izolatların TNT'yi parçalama sürelerini azaltmaktır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Parçalanma Ürünlerinin Standartları

Parçalanma ürünlerinin standartlarından 2,4-DNT (safılık % 100) ve 2,6-DNT (safılık % 100) katı halde Fluka (Almanya), 4-ADNT (safılık % 100) ve 2-ADNT (safılık % 100) katı halde Cerilliant (Amerika) firmasından temin edildi.

#### 2.1.2. Besiyerleri

İzolasyon ve TNT'nin biyolojik parçalanması çalışmalarında aşağıda içerikleri verilen nutrient broth, nutrient agar, plate count agar, cetrimide agar, EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar) ve TNT parçalanma besiyerleri kullanıldı. Bütün besiyerleri kullanılmadan önce 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavla steril edildi.

##### 2.1.2.1. Nutrient Broth

Nutrient broth (NB) genel besiyeri bakterilerin TNT'li besiyerine kültür edilmeden önce çoğaltılması amacıyla kullanıldı. Kullanılan NB'nin içeriği (g/L), pepton (Sigma, Amerika), 5; maya özütü (Sigma, Amerika), 3; NaCl (Sigma, Amerika), 5'tir.

##### 2.1.2.2. Nutrient Agar

Nutrient agar (NA) genel besiyeri bakterilerin izolasyonu ve saf kültür olarak +4 °C'de saklanması için kullanıldı. Kullanılan NA'nın içeriği (g/L) pepton, 5; maya özütü, 3; NaCl, 5; agar agar (Sigma, Amerika), 12'dir.

### **2.1.2.3. Plate Count Agar (PCA)**

TNT'nin biyolojik parçalanması çalışmalarından önce ön üretim besiyerinde büyütülen bakterilerin mililitredeki koloni oluşturan birimlerinin (colony forming unit; cfu) bulunması için kullanıldı. Kullanılan PCA (Biokar Diagnostics, Fransa) (g/L) tripton, 5; maya özütü, 2,5; glikoz, 1; bakteriyel agar, 12'den oluşmaktadır.

### **2.1.2.4. Cetrimide Agar**

*Pseudomonas* bakteri türünün izolasyonunda ve saf kültür olarak stoklanmasında kullanıldı. Kullanılan Cetrimide Agar (Biokar Diagnostics, Fransa) besiyerinin içeriği (g/L) pankreas özütünün jelatini, 20; setrimid, 0,3; MgCl<sub>2</sub>, 1,4; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 ve bakteriyel agar 15'tir. Susuz olan katı besiyeri hazırlanırken otoklavdan önce besiyerine 10 mL/L gliserol ilave edildi.

### **2.1.2.5. EMB Agar**

İzolatların çeşitli özelliklerini belirlemede selektif katı besiyeri olarak kullanıldı. Kullanılan EMB agar (Biokar Diagnostics, Fransa) besiyerinin içeriği (g/L) pankreas özütünün jelatini, 10; laktoz, 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2; eosin Y, 0,4; metilen mavisi, 0,065; agar agar 15'tir.

### **2.1.2.6. TNT Parçalanma Besiyeri**

TNT parçalanma besiyeri Oh ve Kim, 1998'den ve Gümüşçü ve Tekinay, 2013'ten değiştirilerek oluşturuldu ve izolatların TNT yıkım kapasiteleri bu besiyeri ile belirlendi. TNT'nin biyolojik parçalanması çalışmalarında kullanılan minimal besiyeri (g/L) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Amerika), 6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, Amerika), 3; NaCl (Sigma, Amerika), 0,5; MgSO<sub>4</sub> (Sigma, Amerika), 0,24; glikoz (Sigma, Amerika), 10 ve TNT, 0,1'den oluşmaktadır.

### 2.1.3. Diğer Kimyasallar

Besiyeri ve standart çözelti hazırlanmasında kullanılan TNT, HPLC analizlerinde kullanılan metanol, TNT'nin spektrofotometre ile tayininde kullanılan KOH ve aseton, besiyerlerinin pH'ının ayarlanmasında kullanılan HCl ve NaOH, 0,22 µm Millex-GP şırınga filtreleri Sigma (Amerika), TNT'nin parçalanması sırasında açığa çıkan nitrit ve amonyum iyonlarının tayininde kullanılan Spectroquant test kitleri Merck (Almanya) firmasından sağlandı.

### 2.1.4. Toprak ve Su Örnekleri

TNT'yi azot kaynağı olarak kullanabilen bakteri suşlarının izolasyonu için toprak ve su örnekleri yaklaşık on yıldır TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen Kırıkkale'de bir bölgeden alındı. Toprak ve su örneklerinin alındığı bölgede uzun yıllardır kullanılmayan askeri mühimmatların imhası yapılmaktadır. Bundan dolayı mühimmatın imha edildiği alandaki topraklar ve birikmiş sular TNT kirliliğine maruz kalmaktadır. TNT kontaminasyonuna uzun süre maruz kalan bu topraklarda bu bileşiğe adapte olmuş mikroorganizma popülasyonlarının olması öngörülmektedir (Ayoub vd., 2010).

Pembe su TNT'nin ambalajlanması ve imha edilmesi sırasında oluşan atık sular olarak tanımlanmaktadır (Maleki, 1994). Bu nedenle, numuneler görünür renk değişikliği olan bölgelerden (pembeleşmiş), pembeleşmiş sulardan ve pembeleşmiş su bölgelerinin alt çökeleklerinden toplandı (Gümüüşü ve Tekinay, 2013). Toprak örnekleri 5-10 cm derinlikten alındı ve +4 °C'de muhafaza edildi. TNT kirliliğine maruz kalan bölgeden beş farklı örnek alındı ve alınan örnekler aşağıdaki gibi isimlendirildi (Şekil 2.1).

- SÇ1: Sulu çamur 1
- SÇ2: Sulu çamur 2
- KT1: Kuru toprak 1
- SYT: Suyu yakın kuru toprak
- SU: TNT ile kirlenmiş pembe atık su



**Şekil 2.1.** TNT ile kirlenmiş bölgeden alınan toprak ve su örnekleri

## 2.2. Kullanılan Cihazlar

**Otoklav:** Bütün besiyerlerinin sterilizasyonu Nüve OT 4060 (Türkiye) otoklav modeli ile yapıldı.

**İnkübatör:** Bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması ve TNT'nin parçalanması çalışmalarında Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Almanya) marka inkübatör kullanıldı.

**Santrifüj:** TNT ve TNT'nin ara ürünlerinin analizi için bakteri kültürlerinin çöktürülmesinde Nüve NF-800 (Türkiye) marka santrifüj kullanıldı.

**UV spektrofotometre:** TNT'nin biyolojik parçalanması çalışmalarında TNT'nin analizi ve nitrit-amonyum tayinleri Libra S70 UV/Vis Spektrofotometresi (Biochrom, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirildi.

**HPLC:** Parçalanma ürünlerinin analizi HPLC (Shimadzu, Japonya) cihazı ve Ultra Aromax kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5 um) (Restek Corporation Bellefonte, PA, ABD, Kat. No 9127565) ile yapıldı.

Yukarıda belirtilen cihazların dışında, TNT'nin biyolojik parçalanması çalışmalarında aşağıdaki cihazlar da kullanıldı:

- Çalkalamalı su banyosu (Jeiotech BS-21, Kore)
- Manyetik karıştırıcı (Corning PC-420, Amerika)
- Etüv (Nüve FN-055, Türkiye)
- pH metre (Hanna instruments HI 221, Romanya)
- Analitik terazi (Precisa XB 220A, Amerika)
- Ultrasonik sonikatör (Sonorex Digital 10 P, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Almanya)

## **2.3. Yöntem**

### **2.3.1. Toprak ve Su Örneklerindeki TNT Miktarının Belirlenmesi**

TNT ile kirlenmiş örneklerin kolorimetrik analizi TNT'nin alkali hidroksitlerle reaksiyona girip kırmızı renkli Meisenheimer iyonunu oluşturmasına dayanmaktadır. Bu analizde, örneklerin içerdiği TNT asetonla özütlenip her bir örneğin içerdiği TNT miktarı elde edilen özütlerin KOH ile reaksiyona sokulması sonucu tespit edildi (Üzer vd., 2008; Mercimek vd., 2013). Bunun için, her örnekten 4 gram alındı ve 20 mL % 96'lık asetonla karıştırıldı. Karışım sonikatörde 20 dakika karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında bekletildi. Sedimentasyondan sonra karışımın üst kısmından 5 mL alındı, 0,45 µL'lik filtrelerden geçirildikten sonra karışımın üzerine 1 M KOH çözeltisinden 1 mL eklenerek sonikatörde karıştırıldı ve elde edilen çözeltinin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu olan 530 nm'de asetona karşı absorbansı okundu (Oh vd., 2000; Üzer vd., 2008). Ölçülen absorbans değerlerinden örneklerin içerdiği TNT miktarını saptamak için derişimi bilinen TNT çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bunun için, 0,01 g TNT 100 mL % 96'lık asetonda çözüldü, 100 ppm'lik stok çözeltiden 5-100 mg/L derişim aralığında 7 farklı standart TNT çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerden 5 mL alınarak 1 M KOH çözeltisinden her birine 1 mL eklenip, sonikatörde karıştırıldıktan sonra çözeltilerin 530 nm'de asetona karşı absorbans değerleri ölçüldü. TNT derişimi

bilinmeyen su ve toprak örneklerinin içerdikleri TNT miktarı standart çözeltilerle oluşturulan eğrinin eğiminden yararlanılarak belirlendi.

### **2.3.2. TNT ile Kirlenmiş Toprak ve Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu**

**Toprak örneklerinden bakteri izolasyonu:** Azot kaynağı olarak sadece TNT bulduran besiyeri kullanarak seçici zenginleştirme prosedürü, TNT ile kirlenmiş toprak örneklerinden bakteri izolatları elde etmek için kullanıldı. İzolasyon için, 1 gram toprak örneği 9 mL steril su ile homojenize edildi, daha sonra süspansiyon iyice karıştırılıp toprağın çökmesi ve süpernatantın durulması için oda sıcaklığında bekletildi (Rahal ve Moussa, 2011). Karışımın üst kısmından 1 mL, azot kaynağı olarak (100 mg/L) sadece TNT bulunan 100 mL'lik parçalanma besiyerine inoküle edildi ve erlenler aerobik koşullar altında 30 °C'de ve 120 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. 3 günlük inkübasyondan sonra, azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde büyüeyebilen inokülantlar yeniden taze parçalanma ortamına aktarıldı ve aynı koşullarda inkübe edildi. Elde edilen bakteri kültürleri çizgi ekim yöntemi ile nutrient agara ekildi ve 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben katı besiyerinde ayrı düşmüş ve morfolojik olarak farklı olan koloniler seçildi ve saf kültür olarak izole edildi. TNT ile kontamine olmuş toprak örneklerinden toplam 19 bakteri izolatu elde edildi.

**Su örneğinden bakteri izolasyonu:** TNT ile kontamine olmuş pembe su örneğinden bakteri izolasyonu için, 1 mL su örneği 9 mL steril su ile homojenize edildi ve daha sonra iyice karıştırılıp süpernatantın durulması için karışım oda sıcaklığında bekletildi. Homojenizat çeşitli dilüsyonlardan sonra 100 mL'lik TNT'li besiyerine inoküle edildi ve erlenler aerobik koşullar altında 30 °C'de ve 120 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. 3 günlük inkübasyondan sonra, azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde büyüeyebilen inokülantlar yeniden taze besi ortamına aktarıldı. Elde edilen bakteri kültürleri çizgi ekim yöntemi ile nutrient agara ekildi ve 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben katı besiyerinde ayrı düşmüş ve morfolojik olarak farklı olan koloniler seçildi ve saf kültür olarak izole edildi. TNT ile kontamine olmuş su örneğinden toplam 5 bakteri izolatu elde edildi.



TNT'li ortamda büyütülerek izole edilen kolonilerin -80 °C'de saklanmak üzere gliserol stok çözeltileri hazırlandı. TNT'li ortamdan izole edilen bakteri kültürlerinin ayrı düşmüş tek kolonileri katı besiyerine aktararak +4 °C'de buzdolabında saklandı ve 3 ayda bir taze katı besiyerine aktarıldı. Bundan sonraki çalışmalara örneklerden izole edilen 24 bakteri izolatu ile devam edildi.

### **2.3.3. TNT'nin Spektrofotometrik Analizi**

TNT'nin biyolojik parçalanması deneylerinde, TNT'nin tayini için, parçalanma besiyerine KOH eklendiğinde oluşan çözeltinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 447 nm olarak belirlendiği için KOH ile TNT'nin oluşturduğu kırmızı-pembe çözeltinin 447 nm'de ki renk yoğunluğu ölçüldü (Oh vd., 2000; Hannah ve Panneer, 2014). İzolatların TNT parçalama oranlarını belirlemek için düzenli aralıklarla besiyerinden alınan örnekler 15 dakika boyunca 10000xg'de santrifüjenip hücreler uzaklaştırıldı. Sonrasında 5 mL'lik üst faza 1 mL 1 M KOH eklenip karıştırıldı. Çözelti içindeki TNT miktarı santrifügasyondan sonra üstte kalan sıvı kısma KOH çözeltisi ilave edildikten 5 dakika sonra 447 nm dalga boyunda absorbansın ölçülmesi ile tespit edildi. Kalibrasyon grafiği için parçalanma besiyeri içerisinde 5-100 mg/L derişim aralığında TNT çözeltileri hazırlanarak, 5 mL standart TNT çözeltilerine 1 mL 1 M KOH ilavesinden 5 dakika sonra çözeltilerin absorbansları ölçüldü ve grafiğe geçirildi. TNT'nin parçalanması sırasında besiyerinde kalan TNT miktarı oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlendi.

### **2.3.4. En Yüksek TNT Yıkım Kapasitesine Sahip İzolatların Seçilmesi**

Yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip bakteri izolatlarının belirlenmesi için bütün izolatlar azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde kültür edildi ve her bir izolatın TNT parçalama kapasitesi, belirli aralıklarla besiyerinden alınan örneklerin TNT miktarının belirlenmesi ile tespit edildi (Rahal ve Moussa, 2011; Gümüüşü ve Tekinay, 2013). İnokülasyon için kullanılan bakteri hücreleri NB içerisinde 30 °C'de, 120 rpm çalkalama hızında gece boyunca kültür edildi (600

nm'deki absorbanları~1,5 ve hücre sayıları~10<sup>8</sup> hücre/mL olana kadar) ve bu kültürlerden % 2'lik inokulum (hacim/hacim) 100 mL'lik TNT'li besiyerine aktarıldı. 1, 3 ve 7. inkübasyon gününün sonunda besiyerinden alınan örneklerin TNT miktarı yapılan spektrofotometrik analizlerle belirlendi. TNT'nin parçalanması sırasında bakterilerin büyümesi 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü ile takip edildi. İzole edilen bakteriler arasından TNT parçalama kapasitesi en yüksek 6 bakteri izolatu ileri çalışmalar için seçildi.

### 2.3.5. İzolatların Tanımlanması

Yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip 6 bakteri izolatının tanımlanması için ilk önce Gram boyama yapıldı (Claus, 1992). Sonrasında izolatların belirli özelliklerini belirlemek için bakteriler çeşitli seçici ve diferansiyel besiyerlerine ekildi. TNT yıkım kapasitesi en iyi olan bakteri suşlarının tür tayinleri ise 16S rRNA dizi analizi yöntemi (Lin vd., 2013; Küce vd., 2015) ile Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında hizmet alımı yolu ile yaptırıldı. Bu kapsamda NB'de büyütülen izolatların genomik DNA'ları Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kiti kullanılarak izole edildi. İzole edilen DNA'ların 16S rRNA bölgesi UNI27F/1492R (Frank vd., 2008) (16S rRNA geninin tümünü çoğaltan) primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu için tüp başına;

Miktar (µL)	Bileşen	Derişim
39,5	Su	-
5	Taq buffer (Applied Biosystems)	1x
1	0,25 mM dNTP (Fermantas)	0,2 mM
0,5	Forward primer	0,4 pmol
0,5	Reverse primer	0,4 pmol
0,5	Taq DNA polimeraz (Applied Biosystems)	0,05 ünite (U)
1	Bakteriyel genomik DNA	200 pg/µL
2	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
50 µL	Toplam reaksiyon hacmi	

yukarıda belirtilen miktarlarda bileşenler karıştırıldı ve PZR tüpleri 95 °C’de 10 dakika inkübe edildi. PZR çalışma koşulları 30 döngü için denatürasyon 95 °C’de 30 saniye, primer bağlanması 55 °C’de 30 saniye, primerlerin uzaması 72 °C’de 1 dakika ve son primerlerin uzaması 72 °C’de 5 dakika olacak şekilde yapılarak izolatların 16S rRNA genleri çoğaltıldı. PZR ürünleri Qiagen QIAquick PCR Purification Kiti kullanılarak temizlendi. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi Bigdye Cycle Sequencing kit v3.1 ile 3130 Applied Biosystem Genetic Analyzer cihazı kullanılarak yapıldı. Örneklerden elde edilen dizilerin NCBI Gen Bankası sonuçları ile blastlanması sonrası elde edilen % benzerlikleri ile her bir bakterinin 16S rRNA dizi analizine göre gen bankasında kayıtlı olan bakterilere olan benzerlikleri belirlendi. İzolatların 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılmasında ve dizilenmesinde kullanılan primerlerin dizileri ve 16S rRNA geni üzerindeki lokalizasyonları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** İzolatların 16S rRNA genlerinin PZR ile çoğaltılıp, dizilenmesinde kullanılan primerler ve dizileri (M:A/C)

<b>Primer Adı</b>	<b>Dizi (5'-3')</b>	<b>Lokalizasyon</b>
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1492-1510

### **2.3.6. TNT’nin Bakterilerle Parçalanması**

Aerobik koşullar altında yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip bakteri izolatlarının (seçilen 6 bakteri izolatının) 24 saatlik inkübasyon süresi içinde TNT yıkım oranlarını belirlemek için, izolatlar TNT’li besi ortamında kültür edildi, bakteriyel büyümeleri 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümleri ile takip edildi ve kültür ortamındaki TNT miktarı belirli aralıklarla besiyerinden alınan örneklerin spektrofotometrik analizleri ile belirlendi. TNT’li besi ortamına ekilmeden önce izolatlar NB içerisinde 30 °C’de ve 120 rpm çalkalama hızında bir gece

boyunca inkübe edildi (600 nm'deki absorbanları~1,5 ve hücre sayıları~10<sup>8</sup> hücre/mL olana kadar) ve bu kültürden % 2'lik inokulum (hacim/hacim) 100 mL TNT'li besiyerine aktarıldı. İzolatlar aerobik koşullar altında 30 °C'de ve 120 rpm çalkalama hızında karanlıkta 24 saat boyunca inkübe edildi. Her dört saatte bir besiyerinden alınan örnek santrifüj edilip (15 dk., 10000xg), hücreler uzaklaştırıldıktan sonra sıvı kısımdaki TNT miktarı spektrofotometik analizlerle takip edildi.

### **2.3.7. Parçalanma Ürünlerinin HPLC ile Belirlenmesi**

Bakteri hücreleri azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerinde kültür edildiğinde besiyerinde biriken TNT'nin parçalanma ürünleri HPLC ile analiz edildi. Parçalanma ürünlerinin analizleri için SÇ1 K1 ve SU K2 35 °C'de, diğer izolatlar 30 °C'de TNT'li besi ortamında inkübe edildi ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, bakteri kültürlerinden alınan örnekler santrifüj edildikten sonra, HPLC analizleri için numuneler 1,5 mL süpernatanta 3,5 mL metanol ilavesi ile hazırlandı, karışım 5 dakika süreyle sonikatörde karıştırıldı ve 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntü HPLC analizleri için kullanıldı. Örnekler 35 °C'de, 10 µL'lik elüsyonlar halinde Ultra Aromax (150 mm x 4.6 mm, 5 µm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA, Cat. No. 9127565) kolonuna enjekte edildi ve 1,2 mL/dakika akış hızı ile % 30 deiyonize su ve % 70 metanol (hacim/hacim) izokratik mobil fazı ile ayrıldı. Parçalanma ürünlerinin alıkonma zamanları 210 nm'de UV detektörü ile belirlendi ve miktarları standartlarla karşılaştırılarak tespit edildi. HPLC çalışma koşulları Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

**Çizelge 2.2.** TNT parçalanma ürünlerinin HPLC ile analizinde HPLC analiz koşulları

Model	Schimadzu
Kolon	Ultra Aromax (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Dedektör	UV visible-210 nm
Haraketli Faz	Metanol-Su (% 70-30 hacim/hacim)
Akış Hızı	1,2 mL/dakika
Analiz Süresi	30 dakika
Kolon Sıcaklığı	35°C

### 2.3.8. Nitrit ve Amonyum Testleri

Mikroorganizmaların TNT'li besiyerinde büyümesi sırasında, TNT'nin denitrasyonunu takip etmek için kültür ortamında açığa çıkan nitrit ve amonyum iyon miktarları Spectroquant test kitleri (Merck, Almanya) kullanılarak belirlendi. İzolatlar azot kaynağı olarak sadece TNT bulunan besiyerine inoküle edildi, her dört saatte bir izolatların kültür ortamlarından örnekler alındı ve örnekler 15 dakika 10000xg'de santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı. Üstte kalan sıvı kısım nitrit ve amonyum miktarlarını tespit etmek için kullanıldı. Nitrit testi için, 5 mL süpernatant, içerisinde Reaktif NO<sub>2</sub>-1 bulunan tüpe eklendi ve reaktif tamamen çözünene kadar sonikatörde karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı, pH indikatör kağıdı kullanılarak kontrol edildi ve 1 N HCl ile 2-2,5'e ayarlandı. 10 dakika sonra oluşan pembe çözeltinin absorbansı 10 mm'lik cam küvet kullanılarak 525 nm dalga boyunda suya karşı ölçüldü. Ölçülen absorbans değeri kitin protokolünde bulunan faktörle çarpılarak çözeltinin nitrit miktarı hesaplandı. Amonyum testi için, 5 mL süpernatanta 0,6 mL Reaktif NH<sub>4</sub>-1 ve Reaktif NH<sub>4</sub>-2 eklendi ve Reaktif NH<sub>4</sub>-2 tamamen çözülene kadar çözelti karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra karışıma 4 damla Reaktif NH<sub>4</sub>-3 eklendi. Karışım tekrar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra çözeltinin absorbansı 10 mm'lik cam küvet kullanılarak 690 nm dalga boyunda TNT'li besiyerine karşı ölçüldü. Ölçülen absorbans değeri faktörle çarpılarak çözeltinin NH<sub>4</sub><sup>+</sup> miktarı belirlendi.

### **2.3.9. Sıcaklık ve pH'ın TNT'nin Parçalanmasına Etkisinin Belirlenmesi**

Sıcaklığın izolatların TNT'yi parçalamasına etkisini araştırmak için izolatlar pH 7'de 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C inkübasyon sıcaklıklarında TNT'li besi ortamında 120 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edildi ve 24 saatin sonunda besi ortamından alınan örneklerin TNT miktarı spektrofotometre ile analiz edilerek belirlendi. Yapılan TNT parçalanma analizleri sonucuna göre her bir izolat için optimal inkübasyon sıcaklık değeri belirlendi.

İzolatların TNT'yi parçalamasına pH'ın etkisini araştırmak için TNT'li besi ortamının pH'ı 1N HCl ve 1N NaOH ile 5, 6, 7, 8, 9 değerlerine ayarlandıktan sonra izolatlar 30 °C'de 120 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edildi ve 24 saatin sonunda besi ortamından alınan örneklerin TNT miktarı spektrofotometre ile analiz edilerek belirlendi. TNT'nin parçalanması çalışmalarını sırasında besiyerinin pH'ı pH metre ile ölçülerek takip edildi. Yapılan TNT parçalanma analizleri sonucuna göre her bir izolat için optimal pH değeri belirlendi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 3.1. Toprak ve Su Örneklerindeki TNT Miktarının Analizi

Bakteri izolasyonu için alınan toprak ve su örneklerindeki TNT miktarının 49-346 mg/kg aralığında olduğu spektrofotometrik analizlerle belirlenmiştir. Her bir örneğin içerdiği TNT miktarı Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Alınan toprak ve su örneklerinin TNT miktarları (mg/kg-mg/L)

Örnek Adı	TNT Miktarı (mg/kg)
SÇ1	95
SÇ2	346
KT	49
SYT	134
SU	134

Son yıllarda, Avrupa ve Amerika’da TNT ile kontamine olmuş bölgelerde TNT’nin topraktaki miktarının 200 g/kg seviyesine ulaştığı saptanmıştır (Gümüşçü, 2012). Türkiye’de de TNT kirliliğine maruz kalındığı bilinen bölgelerden alınan örneklerin TNT miktar analizlerini yapan çalışmalar mevcuttur. Gümüşçü ve Tekinay (2013)’ın yayınladığı bir çalışmada Ankara Elmadağ bölgesinden alınan toprak ve su örneklerindeki TNT miktarının 20-245 mg/kg aralığında olduğu belirlenmiştir. Mercimek vd. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada, İzmir NATO bölgesinden alınan örnekteki TNT miktarı 61,35 mg/L olarak belirlenmiştir. Kırıkkale’de TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen bölgeden elde ettiğimiz örneklerinin TNT kirliliğinin literatürde belirtilen sınırlar arasında olduğu görülmüştür.

### 3.2. Bakteri İzolasyonu

Mikroorganizmalar askeri bölgeden alınan toprak ve su örneklerinden azot kaynağı olarak sadece 100 mg/L TNT içeren besiyeri kullanılarak izole edilmiştir. Toprak örneklerinden 19 bakteri, su örneğinden 5 bakteri toplamda 24 bakteri izolatu elde edilmiştir. 100 mg/L TNT derişimi birçok mikroorganizma için toksiktir (Fuller ve Manning, 1997), ancak bu çalışmada, TNT kirliliğine maruz kalmış örneklerden izole edilen bakteri suşlarının, 100 mg/L TNT varlığında büyüme yeteneğine sahip oldukları görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen bakteri suşları uzun yıllardır TNT kontaminasyonuna maruz kaldığı bilinen örneklerden izole edildikleri için, muhtemelen bir ölçüde TNT varlığına dayanabilmektedirler. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi, uzun süre TNT ile kirlenmiş bölgelerde yaşayan mikroorganizmaların enzimatik aktivitesi TNT varlığında artabilmektedir (Muter vd., 2012). Muter vd. (2012) yapmış oldukları kompostlama çalışmasında, inokülasyon için kullandıkları bakterilerin TNT kirliliğine maruz kalmış bölgeden izole edildikleri için kompost materyaline TNT eklenmesi ile konsorsiyumdaki bakterilerin enzimatik aktivitelerinin değiştiğini belirlemişlerdir.

### 3.3. TNT Yıkım Kapasitesi En İyi Olan İzolatların Seçilmesi

İzole edilen bakterilerin TNT parçalama oranlarını belirlemek için NB'de büyütülen bakteriler TNT'li besiyerinde inkübe edilmiş, TNT miktarı ve bakteri büyümesi belirli aralıklarla besiyerinden alınan örneklerle takip edilmiştir. Genel olarak, bütün izolatlar için besiyerinde TNT miktarı azalırken, hücre büyümesinin arttığı görülmüştür (Rahal ve Moussa, 2011). Toprak ve su örneklerinden izole edilen bakteriler arasından en yüksek TNT yıkım kapasitesine sahip 6 bakteri türü seçilmiş, bu izolatlar sırası ile SÇ1 K1, SÇ1 K4, SÇ1 K5, SU K2, SU K3 ve SU K4 olarak adlandırılmıştır. Aerobik koşullar altında, 30 °C'de, 100 mg/L TNT içeren besiyerinde, bu suşlarla yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT'nin parçalanma oranı SÇ1 K1, SÇ1 K4 ve SÇ1 K5 izolatları için sırasıyla % 90, % 95, % 84, SU K2, SU K3 ve SU K4 izolatları için sırasıyla % 70, % 96, % 93 olarak belirlenmiştir. SÇ1 K1, SÇ1 K4 ve SU K3



izolatları 7. inkübasyon gününün sonunda başlangıçtaki TNT'nin neredeyse tamamını metabolize etmiştir. Toprak ve su örneklerinden izole edilen bütün bakteri suşlarının 1., 3. ve 7. inkübasyon gününün sonunda kültür ortamında kalan TNT miktarı Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** İzole edilen bakterilerin 1, 3 ve 7. günün sonunda besiyerinden alınan örneklerin TNT miktarı

İzolatlar	TNT Miktarı (mg/L)		
	1. Gün	3. Gün	7. Gün
<b>SÇ1 K1</b>	<b>10,4</b>	<b>4,1</b>	<b>0,1</b>
SÇ1 K2	78,0	49,4	31,9
SÇ1 K3	42,2	33,9	28,1
<b>SÇ1 K4</b>	<b>5,4</b>	<b>4,0</b>	<b>0,1</b>
<b>SÇ1 K5</b>	<b>15,7</b>	<b>11,5</b>	<b>10,5</b>
SÇ2 K1	59,2	52,0	39,1
SÇ2 K2	36,1	19,6	19,6
SÇ2 K3	57,2	31,6	27,6
SÇ2 K4	41,5	20,0	17,5
SÇ2 K5	32,8	27,6	23,2
SYT K1	65,0	56,1	45,3
SYT K2	58,5	39,1	26,1
SYT K3	57,2	34,1	29,2
SYT K4	62,0	52,0	40,9
KT K1	74,0	64,0	49,2
KT K2	68,9	47,2	43,9
KT K3	81,6	78,8	60,5
KT K4	62,8	61,1	52,0
KT K5	74,5	61,1	52,0
SU K1	41,4	26,1	23,5
<b>SU K2</b>	<b>30,0</b>	<b>17,5</b>	<b>16,3</b>
<b>SU K3</b>	<b>4,1</b>	<b>2,7</b>	<b>0,1</b>
<b>SU K4</b>	<b>6,6</b>	<b>6,1</b>	<b>4,0</b>
SU K5	61,1	52,4	51,1

### 3.4. TNT Yıkım Kapasitesi En İyi Olan İzolatların Tür Tayinleri

İzolatların tanımlanması önce Gram boyama ile yapılmıştır. Gram boyama sonucunda bütün izolatların gram (-) ve çubuk şekilli oldukları belirlenmiştir. Sonrasında izolatlar çeşitli seçici ve diferansiyel besiyerlerine (Cetrimide agar, EMB agar gibi) ekilerek izolatların değişik özellikleri belirlenmiştir. Cetrimide agar besiyerinde sadece SÇ1 K5 izolatu gelişim gösterirken, EMB agar üzerinde bütün izolatlar gelişim göstermiştir. EMB agar üzerinde laktozu fermente edebilen mikroorganizmalar (SÇ1 K1, SÇ1 K4, SU K3 ve SU K4) koyu siyah merkezli mukoid koloniler oluştururken, SÇ1 K5 ve SU K2 izolatlarının açık pembe renkli koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir.

İzolatların cins/tür tayinleri ise 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık 1550 baz çiftinden oluşmakta ve üzerinde iyi korunmuş ve heterojen bölgeler içermektedir. Bu genin çoğaltılmasında kullanılan primerler genin başlangıcındaki korunmuş bölgelere veya 540 baz çiftlik bir bölgesine ya da genin tamamına göre tasarlanmaktadır (Clarridge, 2004). Bütün bakterilerin 16S rRNA genlerinin çoğaltılmasını sağlayan primerler (üniversal primerler) kullanılarak, bu bölgenin çoğaltılması ve dizilenmesi bakteriyel tanımlamada veya cins ve tür düzeyinde yakın ilişkilerin tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle elde edilen izolatların bakteriyel tanımlamaları için, NB'de büyütülen bakterilerin genomik DNA'ları izole edilmiş, her bir izolatu 16S rRNA geninin tümü PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünlerinin DNA dizi analizleri yapılmıştır. İzolatlardan elde edilen dizilerin NCBI Gen Bankası sonuçları ile eşleştirilerek her bir bakterinin 16S rRNA gen dizisine göre Gen Bankasında bulunan bakteri türlerine % benzerliği bulunmuştur. Örneklerden elde edilen dizilerin gen bankası sonuçları ile blastlanması sonrası % benzerlikleri Çizelge 3.3'te belirtildiği gibidir.

**Çizelge 3.3.** İzolatların UNI27F/1492R primeri ile elde edilen 16S rRNA dizilerinin NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

İzolatlar	İdentifikasyon Sonuçları	Gen Bank No	% Homoloji
SÇ1 K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KM096433.1	% 99
SÇ1 K4	<i>Raoultella planticola</i>	AF129444.1	% 99
SÇ1 K5	<i>Pseudomonas putida</i>	KP192772.1	% 99
SU K2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KJ584896.1	% 98
SU K3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KM096433.1	% 99
SU K4	<i>Raoultella planticola</i>	JX294892.1	% 99

16S rRNA dizi analizine göre, SÇ1 K1 ve SU K3 izolatları *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar *K. pneumoniae* ile % 99 oranında homoloji göstermiştir. Literatürde, *Klebsiella* sp. ile TNT'nin parçalanması birkaç çalışmada da rapor edilmiştir. Ancak *K. pneumoniae* SÇ1 K1 ve *K. pneumoniae* SU K3 izolatlarıyla yapılan parçalama çalışmalarında elde edilen TNT parçalanma oranları literatürde *Klebsiella* sp. ile yapılan önceki TNT parçalanma çalışmalarına göre daha yüksektir (Litake vd., 2005, Shin ve Song, 2009). Litake vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada mühimmat fabrikasının çevresinden toplanan atık su ve toprak örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* bakterisi suyu ile minimal besiyerinde 30 saat içerisinde 20 ppm TNT'nin % 70'i uzaklaştırılmıştır.

16 S rRNA dizi analizine göre, SÇ1 K4 ve SU K4 izolatları *Raoultella planticola* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar *R. planticola* ile % 99 oranında homoloji göstermiştir. Literatürde, *R. planticola* ile TNT'nin parçalanması ile ilgili çalışma yoktur, ancak *R. terrigena* ile TNT'nin parçalanması birkaç çalışmada rapor edilmiştir. Claus vd. (2007) Almanya'da iki eski mühimmat üretim tesisinden alınan toprak ve su örneklerinden izole ettikleri, 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile tanımladıkları *R. terrigena* izolatı ile TNT'nin parçalanmasını araştırmışlardır. Bu izolatın 7. inkübasyon gününün sonunda başlangıçtaki 100 mg/L TNT'nin tamamını yıktığı belirlenmiştir.

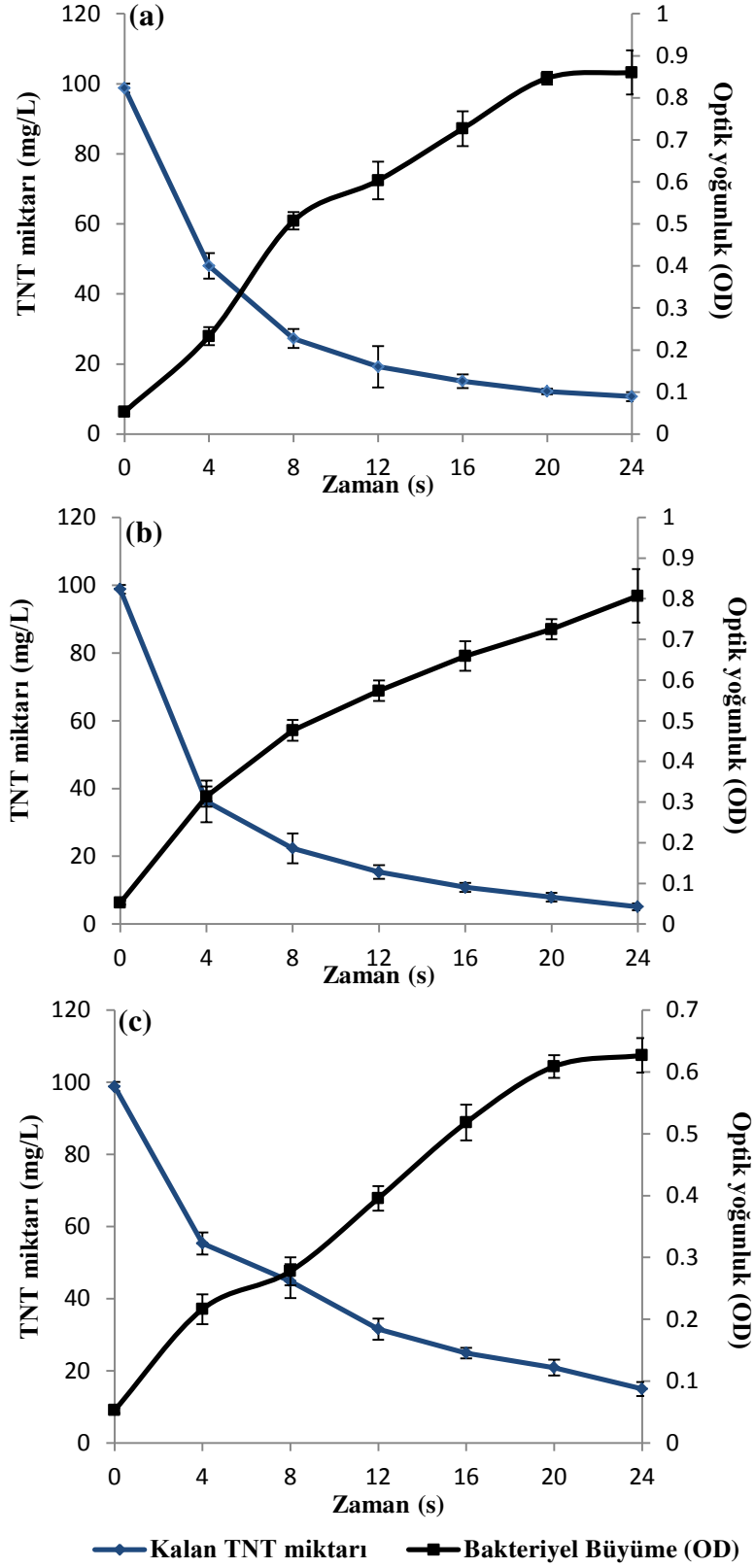
16S rRNA dizi analizine göre, SÇ1 K5 izolatu *Pseudomonas putida* ve SU K2 izolatu ise *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanımlanmıştır. Literatürde, *Pseudomonas* sp. ile TNT'nin parçalanması ile ilgili birçok çalışma rapor edilmiştir (Esteve-Nuñez vd., 2001; Claus, 2014). Park vd. (2002) Kore'de TNT ile kirlenmiş alandan aldıkları toprak örneklerinden yüzlerce bakteri izole etmiş ve en yüksek TNT yıkım kapasitesine sahip bakteri suşunu *P. putida* KP-T201 olarak tanımlamışlardır. Bu suşla yapılan TNT parçalama çalışmalarında, sırasıyla 20, 50 ve 100 ppm TNT derişimine sahip kültür ortamına inoküle edilen bakteri hücreleri sırasıyla 6, 16 ve 36 saatte başlangıçtaki TNT'nin tamamını yıkmıştır. *S. maltophilia* ile de TNT'nin parçalanması başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Oh ve Kim (1998) atrazin uygulamalarında kullanılan bir bölgeden, M91-3 olarak isimlendirdikleri, Gram boyama ve Trypticase Soy Agar (TSA) üzerinde büyüyen bakterilerin yağ asit analizleri ile *S. maltophilia* olarak tanımladıkları bakteriyi izole etmişler ve bu izolat ile TNT'nin parçalanmasını çalışmışlardır. Bu izolatla yapılan TNT parçalama çalışmalarında 100 ppm TNT içeren besiyeri içerisinde 28 gün inkübasyon süresinin sonunda başlangıçtaki TNT'nin tamamı uzaklaştırılmıştır.

### **3.5. TNT'nin Mikrobiyal Parçalanması**

Bu çalışmada, TNT kirliliğine maruz kalmış toprak ve su örneklerinden elde edilen bakteriler ile TNT başarılı ve etkili bir şekilde parçalanmıştır. TNT'yi en iyi metabolize eden suşların seçiminden sonra, TNT'yi en iyi yıkan bakteri suşları ile TNT'li besiyerinde, TNT'nin mikrobiyal parçalanması 24 saat içinde besiyerinden belirli aralıklarla alınan örneklerle takip edilmiştir. 100 mg/L TNT'li besiyerine ekimi yapılan bakteriler 24 saat 30°C'de 120 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Her dört saatte bir 600 nm'de bulanıklık ölçümü yapılarak bakteri büyümesi takip edilmiştir. Her dört saatte bir bakterilerin inkübe edildiği besiyerinden örnek alınarak TNT miktarı analiz edilerek her bir bakteri suşunun 24 saat boyunca TNT'yi parçalama oranı belirlenmiştir.

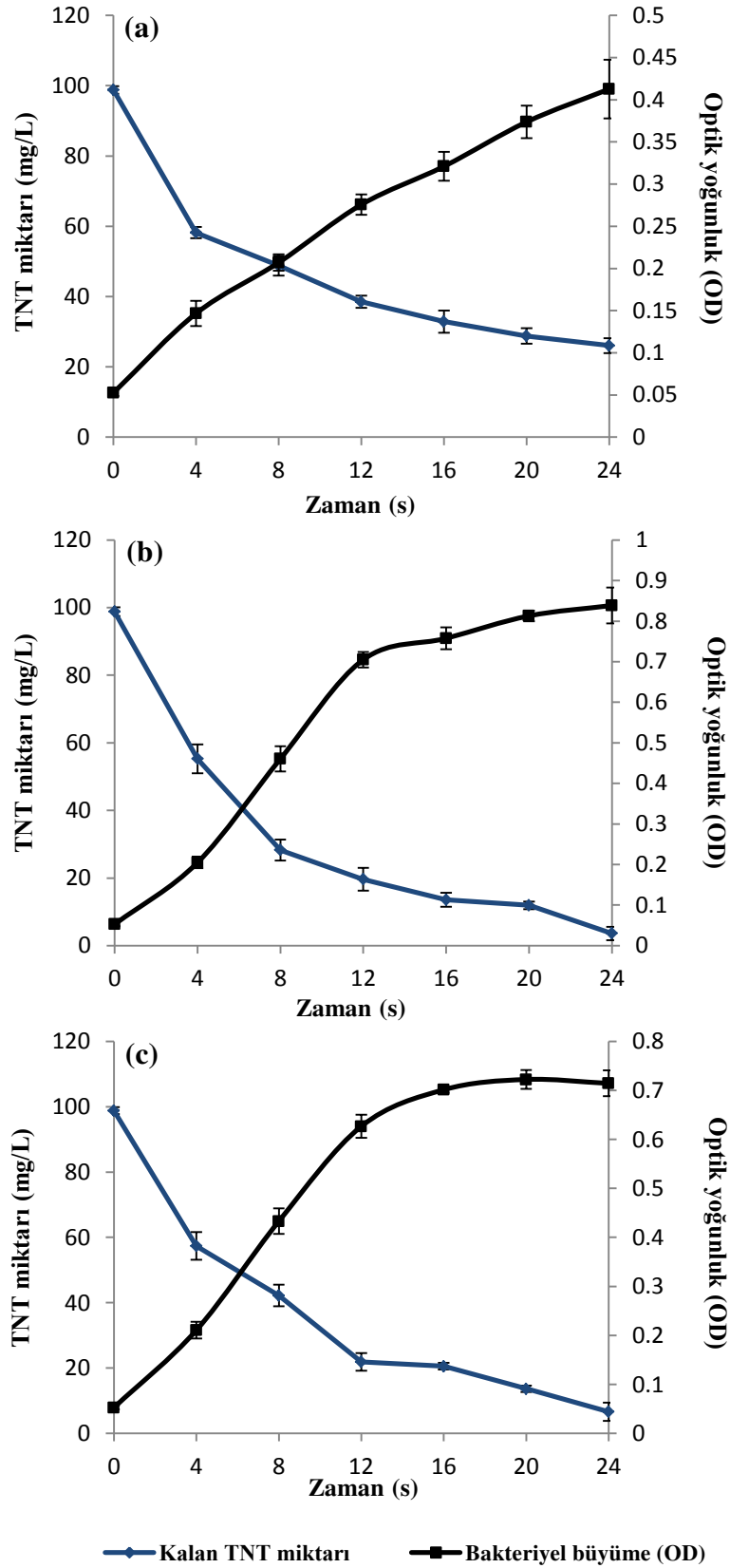
Bu analizlere göre toprak örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 suşlarının, TNT'li besiyerinde 24 saatlik

inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'yi % 84-95 oranında metabolize ettikleri belirlenmiştir. Bu izolatlar için, Şekil 3.1'de, bakteriyel büyümeye karşı (optik yoğunluk) besiyerinde kalan TNT miktarı verilmiştir. Şekil 3.1.a'da gösterildiği gibi, *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatı ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'nin neredeyse yarısını tamamen parçalamış ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'yi % 90 oranında metabolize etmiştir. İzolatın ilk dört saatlik inkübasyon süresinden sonra, TNT parçalama oranı azalmıştır. *R. planticola* SÇ1 K4 izolatı da *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatı gibi ilk dört saat içerisinde besiyerinde bulunan TNT'nin yarısından fazlasını metabolize etmiş ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçta besiyerinde bulunan TNT'nin % 95'ini parçalamıştır (Şekil 3.1.b). *P. putida* SÇ1 K5 izolatı da ilk dört saat içerisinde TNT'yi parçalamaya başlamış ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 84 oranında başlangıçtaki TNT'yi metabolize etmiştir (Şekil 3.1.c). Bütün izolatların kültür ortamlarında bulunan TNT miktarı azalırken bakteriyel büyümelerinden dolayı kültür ortamının optik yoğunluğunun arttığı görülmüştür.



Şekil 3.1. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) izolatlarına ait kültürlerdeki TNT miktarının zamana bağlı değişimine karşı optik yoğunlukları (30 °C’de)

*S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 izolatlarına ait kültürlerdeki TNT'nin zamana bağlı değişimine karşı optik yoğunlukları Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekil 3.2'de gösterildiği gibi su izolatlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'yi % 70-96 oranında parçalama kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir. *S. maltophilia* SU K2 izolatının çalışmada kullanılan izolatlar arasında TNT'yi parçalama kapasitesi en düşük ve TNT'li besiyerinde büyüme kabiliyeti en az olan suş olduğu belirlenmiştir. *S. maltophilia* SU K2 izolatının, 100 mg/L TNT içeren ortamda 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT'yi parçalama oranının % 70 olduğu belirlenmiştir. *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 izolatlarının, sudan izole edilen izolatlar arasında TNT üzerinde parçalama etkinliği en yüksek bakteri suşları oldukları belirlenmiştir. Bu iki izolat 100 mg/L TNT içeren besiyerine inkübe edildiğinde, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda izolatların başlangıçtaki TNT'nin % 93 ve % 96'sını parçaladıkları belirlenmiştir.



**Şekil 3.2.** *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) izolatlarına ait kültürlerdeki TNT miktarının zamana bağlı değişimine karşı optik yoğunlukları (30 °C’de)



Bütün izolatlar için, kültür ortamında zamanla TNT miktarı azalırken, bakteriyel büyümenin arttığı belirlenmiş ve bu sonucun daha önceki çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmüştür (Park vd., 2003; Claus vd., 2007; Rahal ve Moussa, 2011; Gümüştü ve Tekinay, 2013; Mercimek vd., 2013; Mercimek vd., 2015). Bakteri inokülasyonu yapılmayan steril edilmiş TNT parçalanma ortamı kontrol grubu olarak kullanılmış ve kontrol gruplarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT azalışı saptanmamıştır. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında tüm bakteriyel kültürlerde belirgin bir TNT parçalanmasının gerçekleştiği belirlenmiştir. Kumagi vd. (2000) ve Gümüştü ve Tekinay (2013) tarafından daha önce belirtildiği gibi izolatlar TNT'li besi ortamına inoküle edildikten sonra TNT'yi azot kaynağı olarak kullanmaya hemen başlamış ve ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda, bütün izolatlar değişen oranlarda kültür ortamında bulunan TNT'yi metabolize etmeye başlamıştır.

Bu çalışmada, izolatlar TNT'li ortamda büyüme kabiliyetlerine ve TNT'yi parçalama kapasitelerine göre seçildiği için elde edilen bakteri izolatları 100 mg L<sup>-1</sup> TNT varlığında hücre biyokütlelerini artırmış ve 24 saat içinde başlangıçtaki TNT'yi % 70 ile % 96 arasında değişen oranlarda parçalamıştır. Literatürde yapılan önceki TNT parçalama çalışmaları ile karşılaştırıldığında bu parçalanma oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Oh ve Kim, 1998; Rahal ve Moussa, 2011; Mercimek vd., 2013; Mercimek vd., 2015). Oh ve Kim (1998) bir herbisit uygulama alanından izole ettikleri *S. maltophilia* bakteri suşu ile 100 mg L<sup>-1</sup> TNT'yi 28 gün içerisinde parçaladıklarını rapor etmişlerdir. Rahal ve Moussa (2011) Mısır'da TNT ile kirlenmiş toprak örneklerin izole ettikleri *Clavibacter agropyi* (R.L1) ve *Sphingomonas sanguinis* (R.L2) bakteri suşlarının 100 mg L<sup>-1</sup> TNT'yi 7 gün içerisinde tamamen uzaklaştırdıklarını belirtmişlerdir. Mercimek vd. (2013) İzmir NATO bölgesinden alınan TNT kirliliğine maruz kalmış topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* bakteri suşunu 50 ve 75 mg L<sup>-1</sup> TNT içeren besiyerine inoküle etmiş ve bu izolatının 96 saat içerisinde başlangıçtaki TNT'nin sırasıyla % 68'ini ve % 77'sini parçaladığını tespit etmişlerdir.

### 3.6. Parçalanma Ürünlerinin Analizi

Bakteriyel kültürlerden 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda alınan örneklerin HPLC ile analizleri yapılarak TNT'nin mikrobiyal parçalanması sonucu oluşan ürünler tanımlanmıştır. HPLC analizlerinin sonuçlarına göre, bütün izolatların bakteriyel kültürlerinde 4-ADNT ve 2-ADNT birikimleri tespit edilmiştir. TNT'nin mikrobiyal parçalanması ile ilgili birçok çalışmada, bakteriyel transformasyondan dolayı bu ara ürünlerin oluştuğu rapor edilmiş ve bu sonuçlar daha önceki çalışmaların bulgularıyla uyum içindedir (Duque vd., 1993; Boopathy ve Kulpa, 1994; Maeda vd., 2006; Rahal ve Moussa, 2011). TNT'nin 4-ADNT ve 2-ADNT bileşiklerine dönüştürülmesi TNT'nin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için istenilen bir şeydir, çünkü 4-ADNT ve 2-ADNT nitroaromatik bileşiklerinin toksik etkileri TNT'ye göre daha azdır (Maeda vd., 2006), bu bileşiklerin sudaki çözünürlükleri TNT'ye göre daha düşüktür ve patlayıcı özellikleri yoktur.

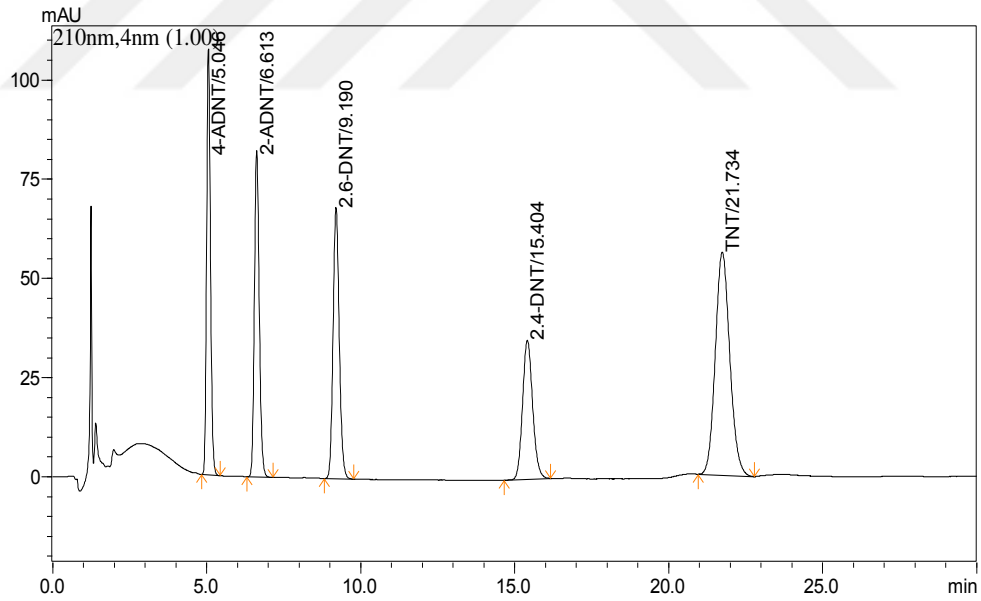
HPLC analizlerinin sonuçlarına göre, izolatların TNT'li besiyerine inokülasyonlarından önce (0. saat) ve inokülasyonlarından 24 saat sonra kültür ortamlarında bulunan TNT, 2-ADNT ve 4-ADNT miktarları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** İnkübasyondan önce (0. saat) ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerindeki TNT, 2-ADNT ve 4-ADNT miktarları (mg/L)

İzolatlar	0. saat			24. saat		
	TNT	2-ADNT	4-ADNT	TNT	2-ADNT	4-ADNT
<b>SÇ1 K1</b>	100,1	0	0	1,67	2,6	12,6
<b>SÇ1 K4</b>	101,4	0	0	5,4	2,25	13,1
<b>SÇ1 K5</b>	102,4	0	0	15,7	5,1	10,2
<b>SU K2</b>	101,1	0	0	18,2	2,6	12,6
<b>SU K3</b>	101,0	0	0	4,13	2,3	11,2
<b>SU K4</b>	102,7	0	0	6,73	2,62	12,1

Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi izolatların inokülasyondan önce (0. saat) kültür ortamlarında sadece TNT varken, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bütün izolatların kültür ortamlarında 4-ADNT ve 2-ADNT birikimleri tespit edilmiştir. Her izolat için besi ortamında biriken 4-ADNT miktarı 2-ADNT miktarına göre fazladır, çünkü para konumundaki nitro gruplar orto konumundaki nitro gruplara göre daha kolay indirgenebilmektedirler (Barrow vd., 1996).

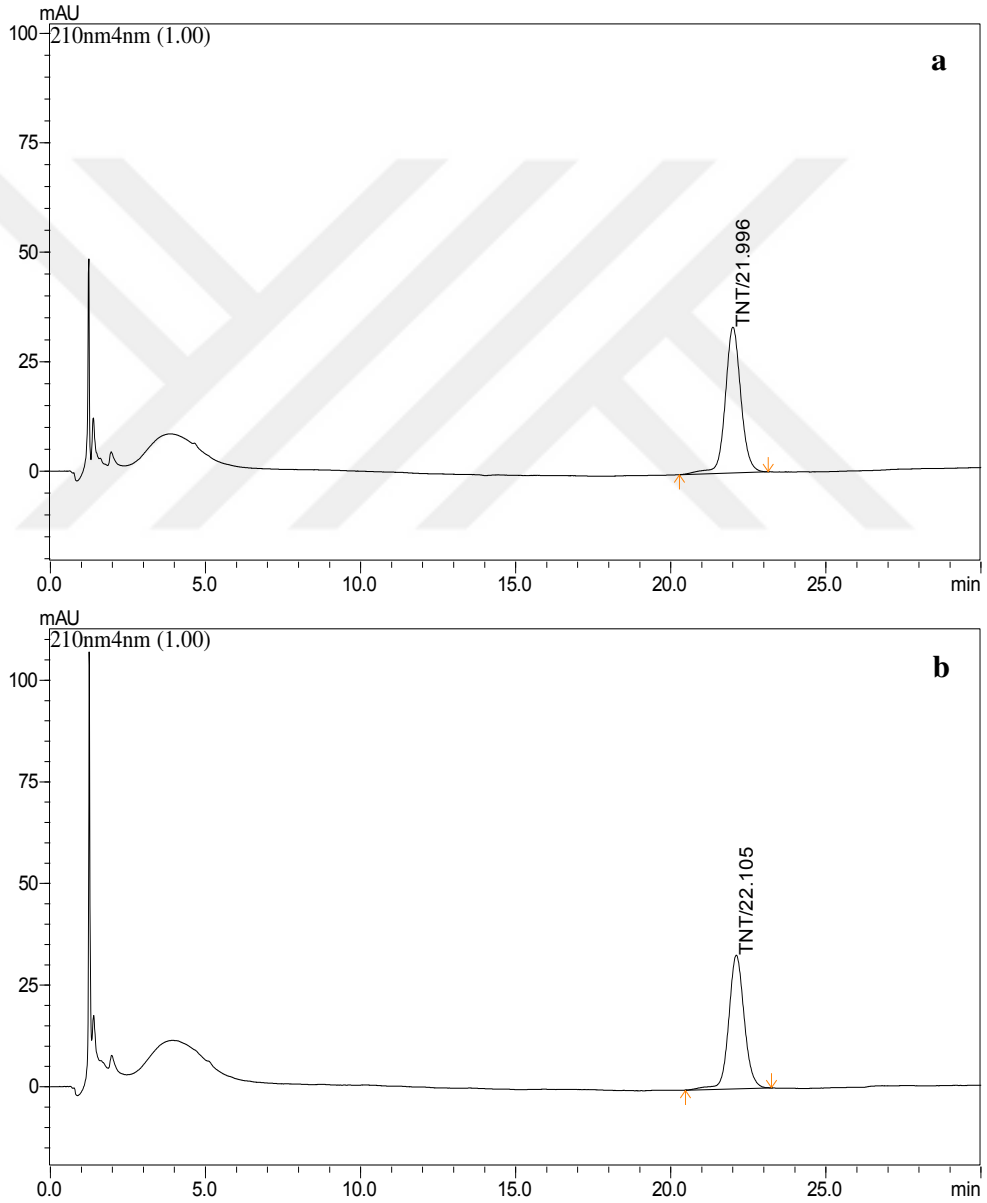
HPLC analizleri için standart olarak TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-ADNT ve 4-ADNT bileşikleri kullanılmıştır. Standart maddelerin karışımının HPLC kromatogramı Şekil 3.3'te verilmiştir. Şekil 3.3'te gösterildiği gibi kolondan ilk gelen pik 5,08 alıkonma zamanı ile 4-ADNT olmuştur ve 4-ADNT pikini ardı ardına 6,613 alıkonma zamanı ile 2-ADNT, 9,190 alıkonma zamanı ile 2,6-DNT ve 15,404 alıkonma zamanı ile 2,4-DNT pikleri takip etmiştir. Kolondan en son gelen pik 21,734 alıkonma zamanı ile TNT piki olmuştur.



**Şekil 3.3.** Standart maddelerin karışımının kromatogramı

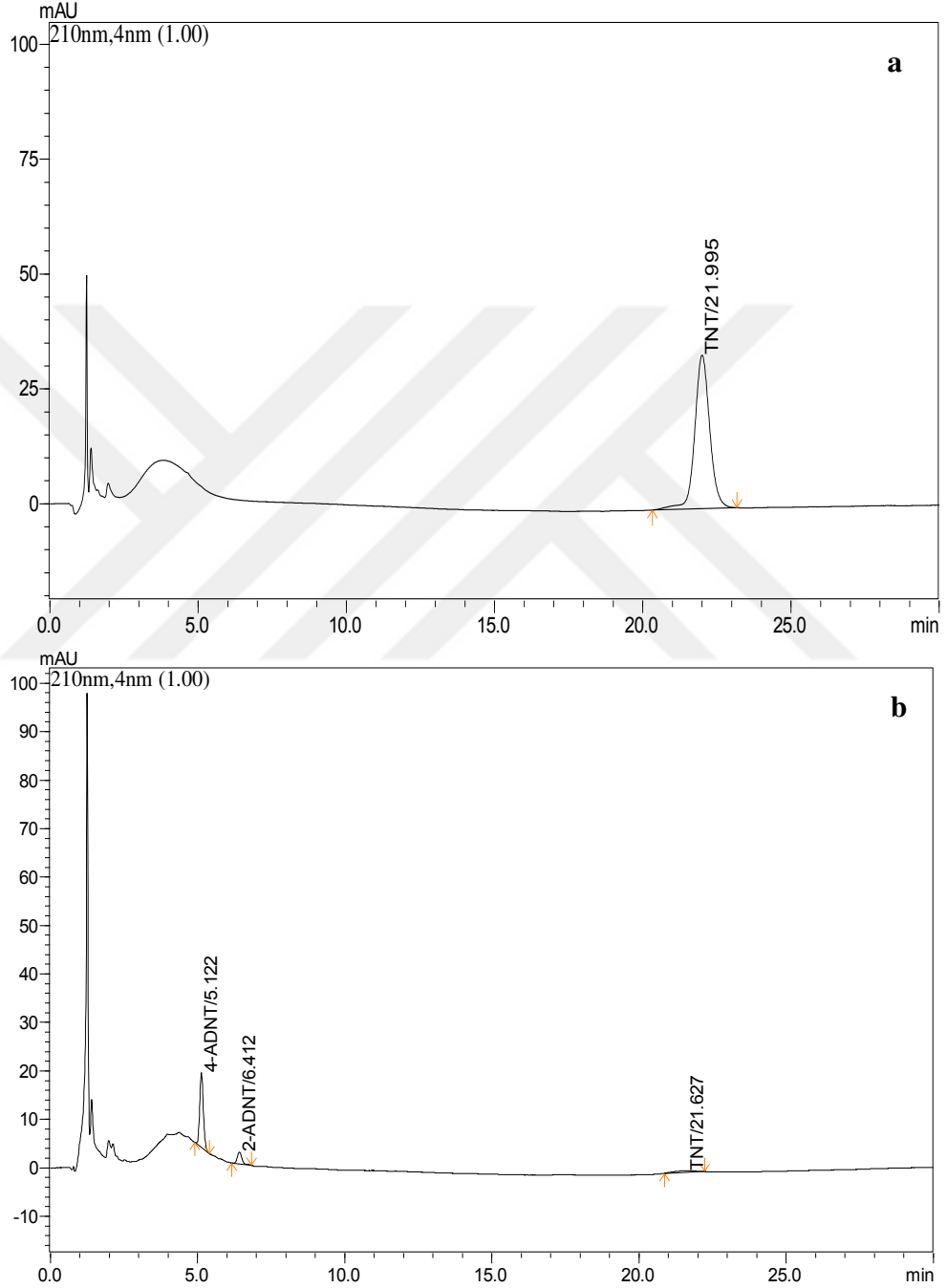
Şekil 3.4'te kontrol (bakteri inokülasyonu yapılmayan steril besiyeri) örneğinin 0. saatte ve 24. saatteki HPLC kromatogramları verilmiştir. Şekil 3.4'te gösterildiği gibi

kontrol örneğinin 0. saatteki kromatogramında 21,996 alıkonma zamanı ile sadece TNT piki vardır ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol örneğinin 24. saatteki kromatogramında 22,105 alıkonma zamanı ile başlangıçtaki TNT piki ile aynı alana sahip TNT piki vardır. Bu sonuç bakteri inokülasyonunun yapılmadığı kontrol örneklerinde TNT'nin parçalanmaya uğramadan kültür ortamında kaldığını göstermektedir (Rahal ve Moussa, 2011).

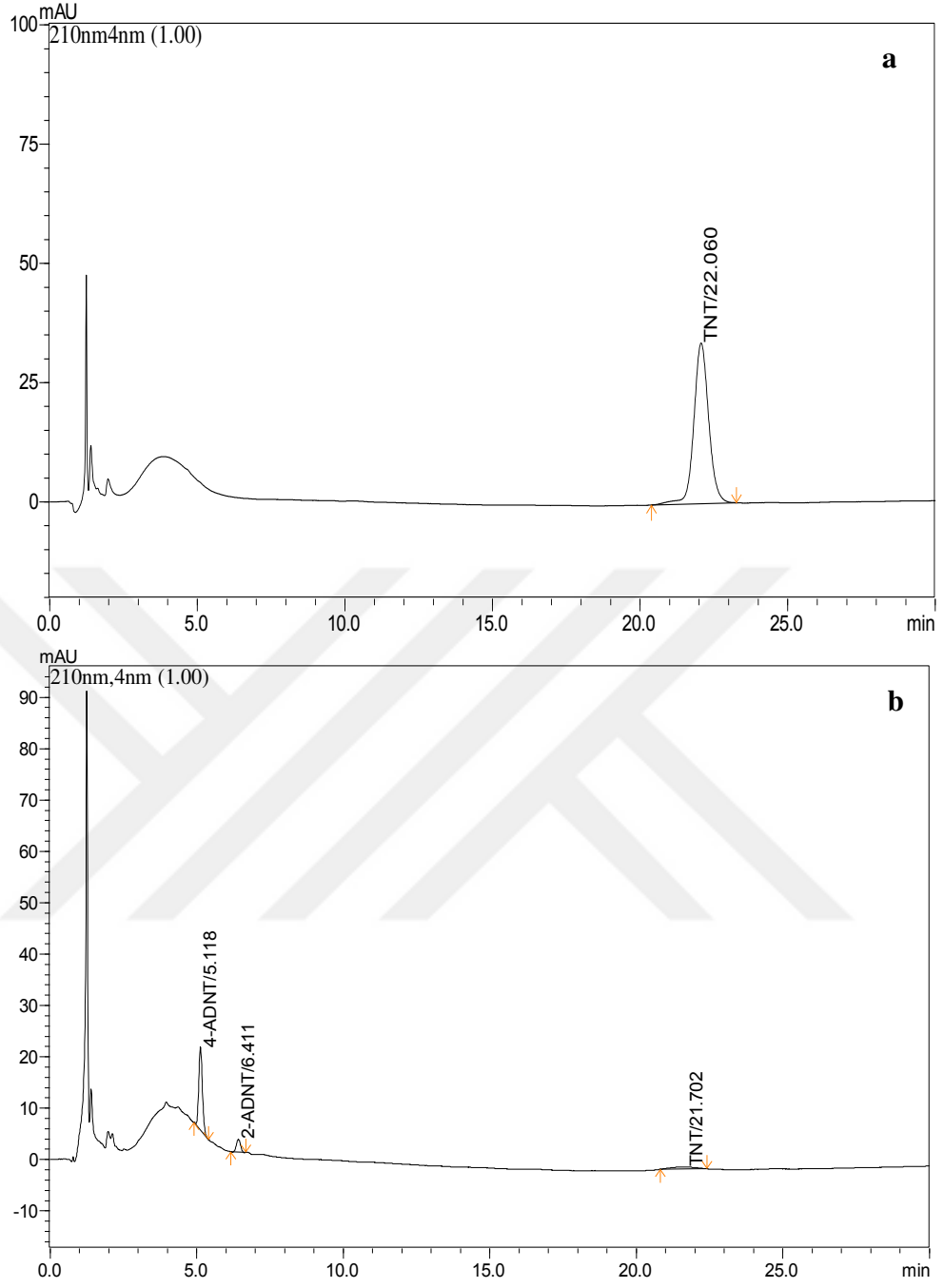


**Şekil 3.4.** Kontrolün 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları

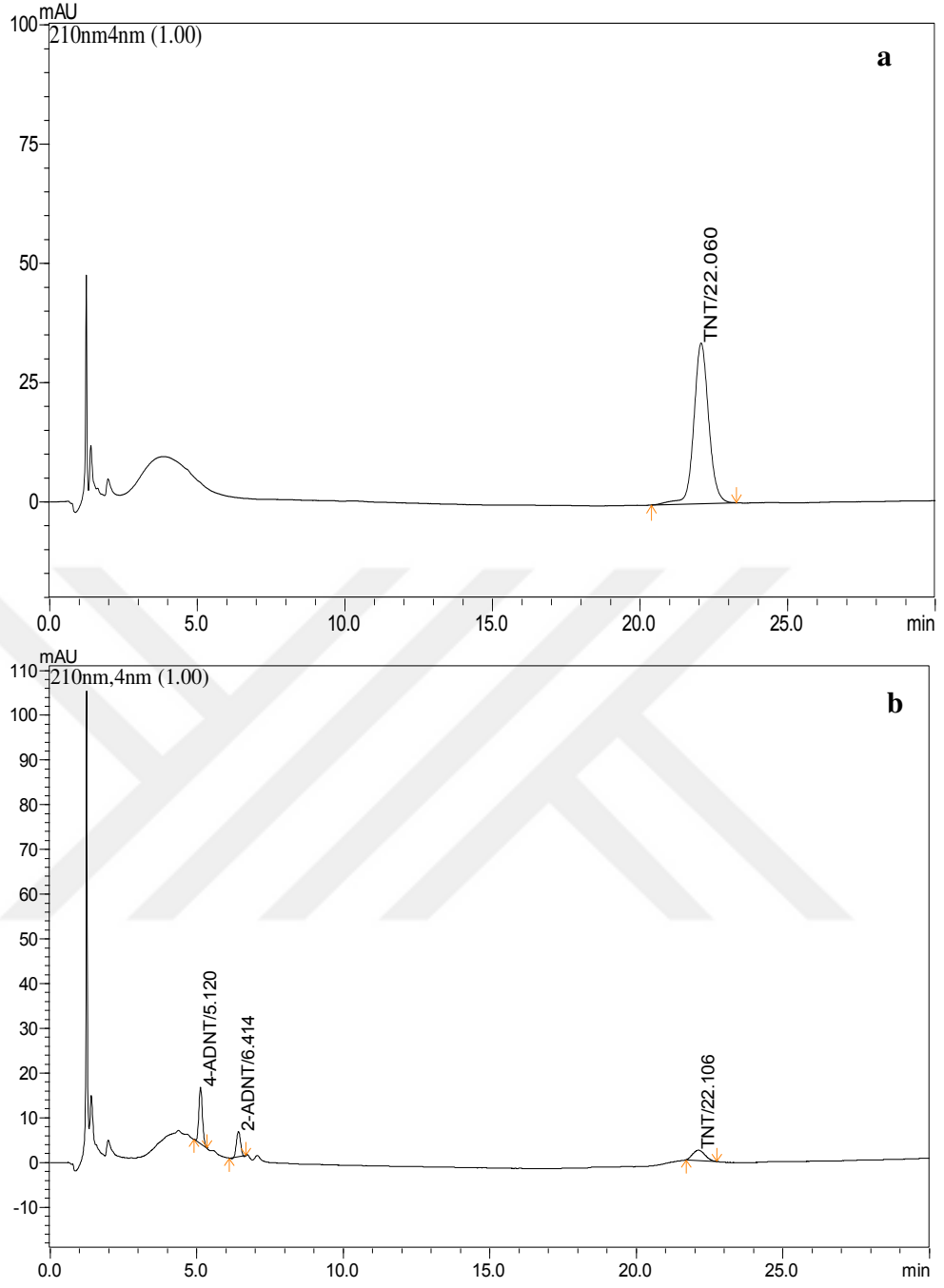
HPLC analizlerine ait kromatogramlar *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4, *P. putida* SÇ1 K5, *S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 izolatları için sırası ile Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir.



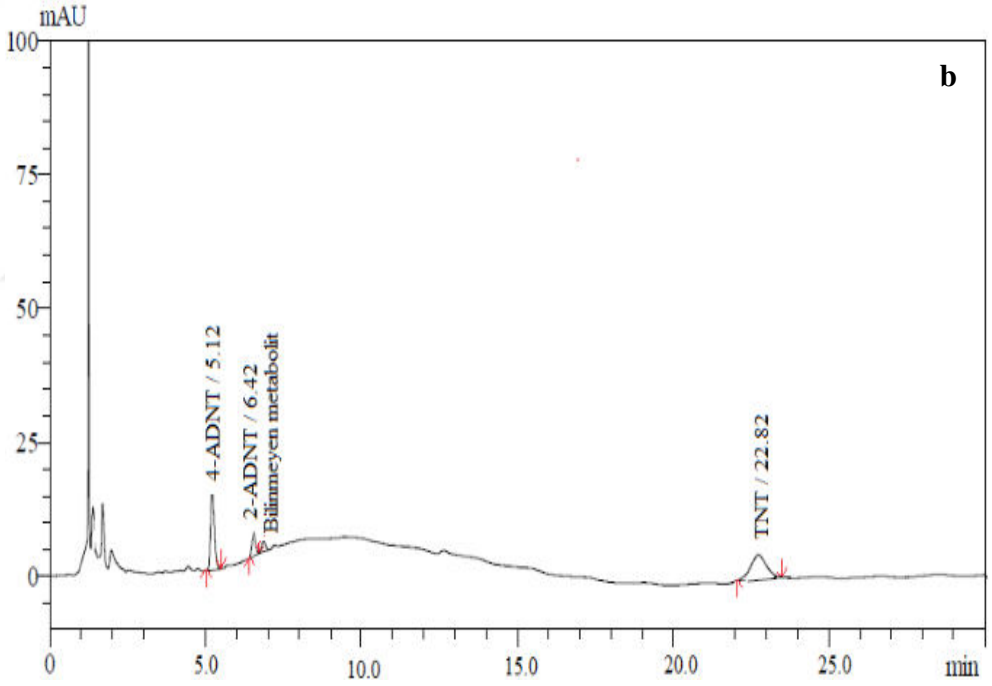
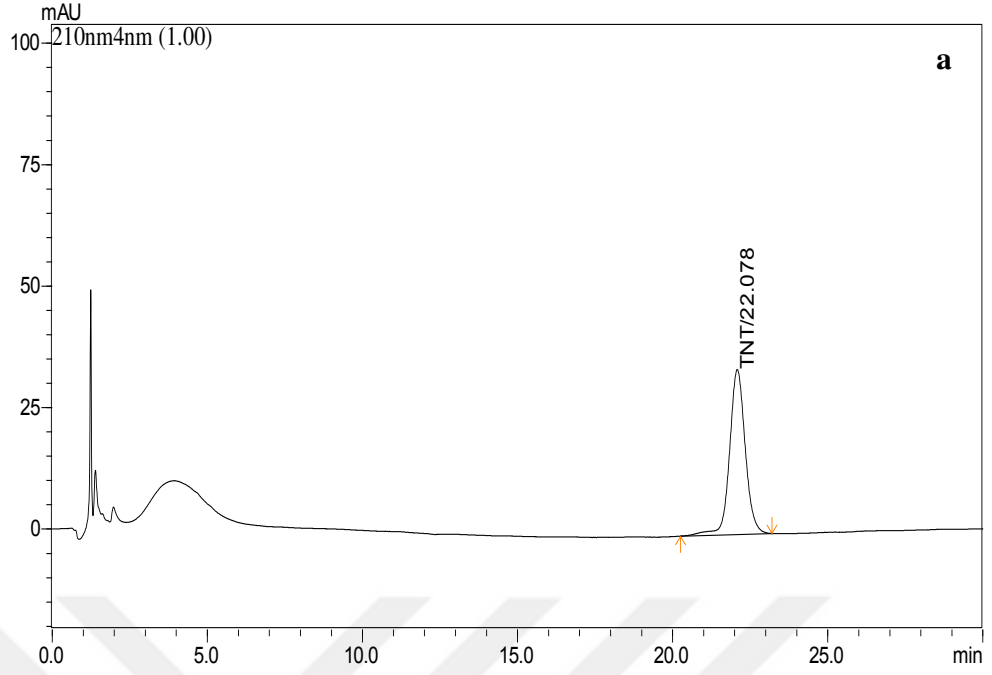
Şekil 3.5. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatının (35 °C'de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları



**Şekil 3.6.** *R. planticola* SÇ1 K4 izolatının (30 °C’de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları

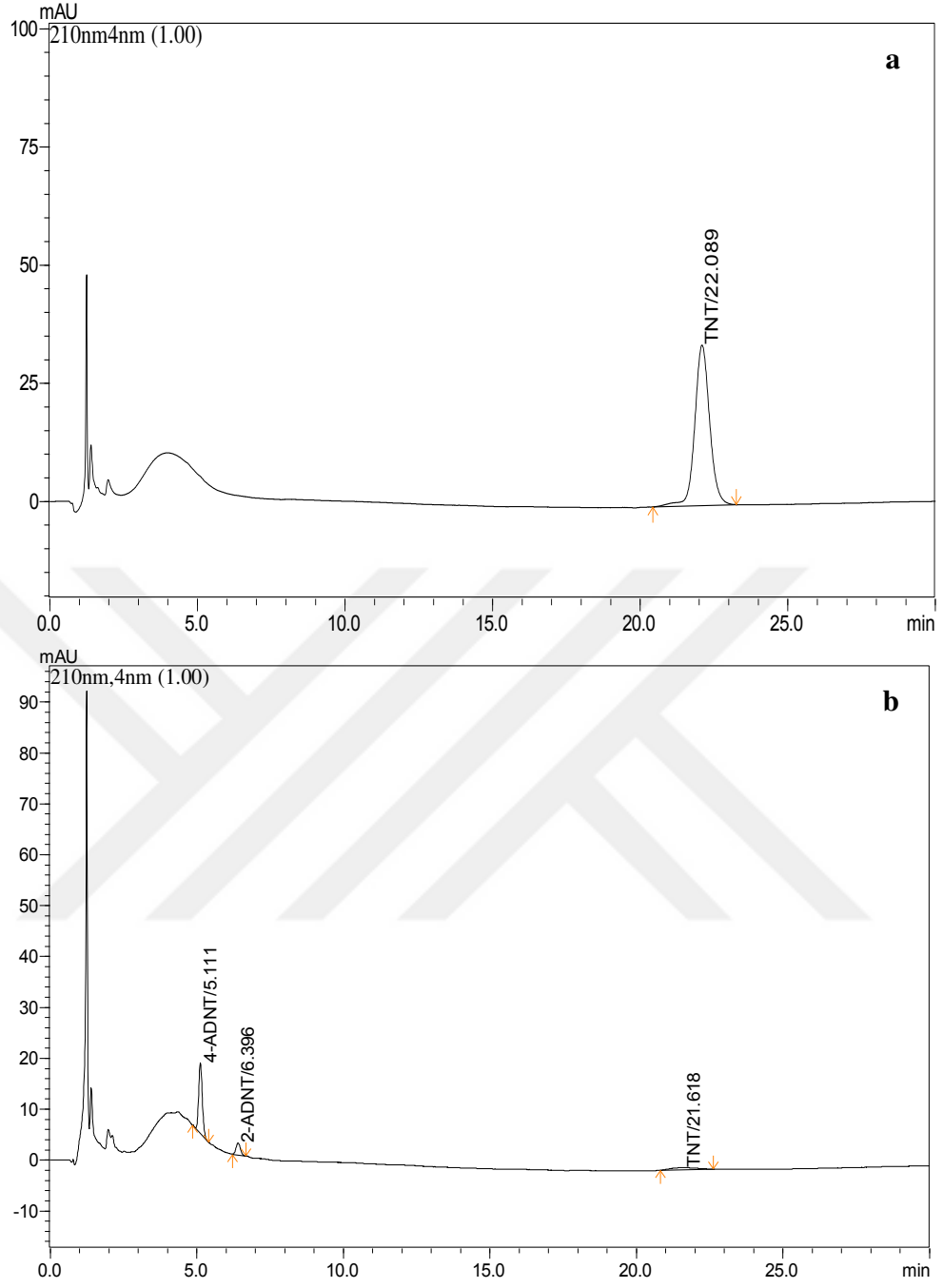


**Şekil 3.7.** *P. putida* SÇ1 K5 izolatının (30 °C’de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları

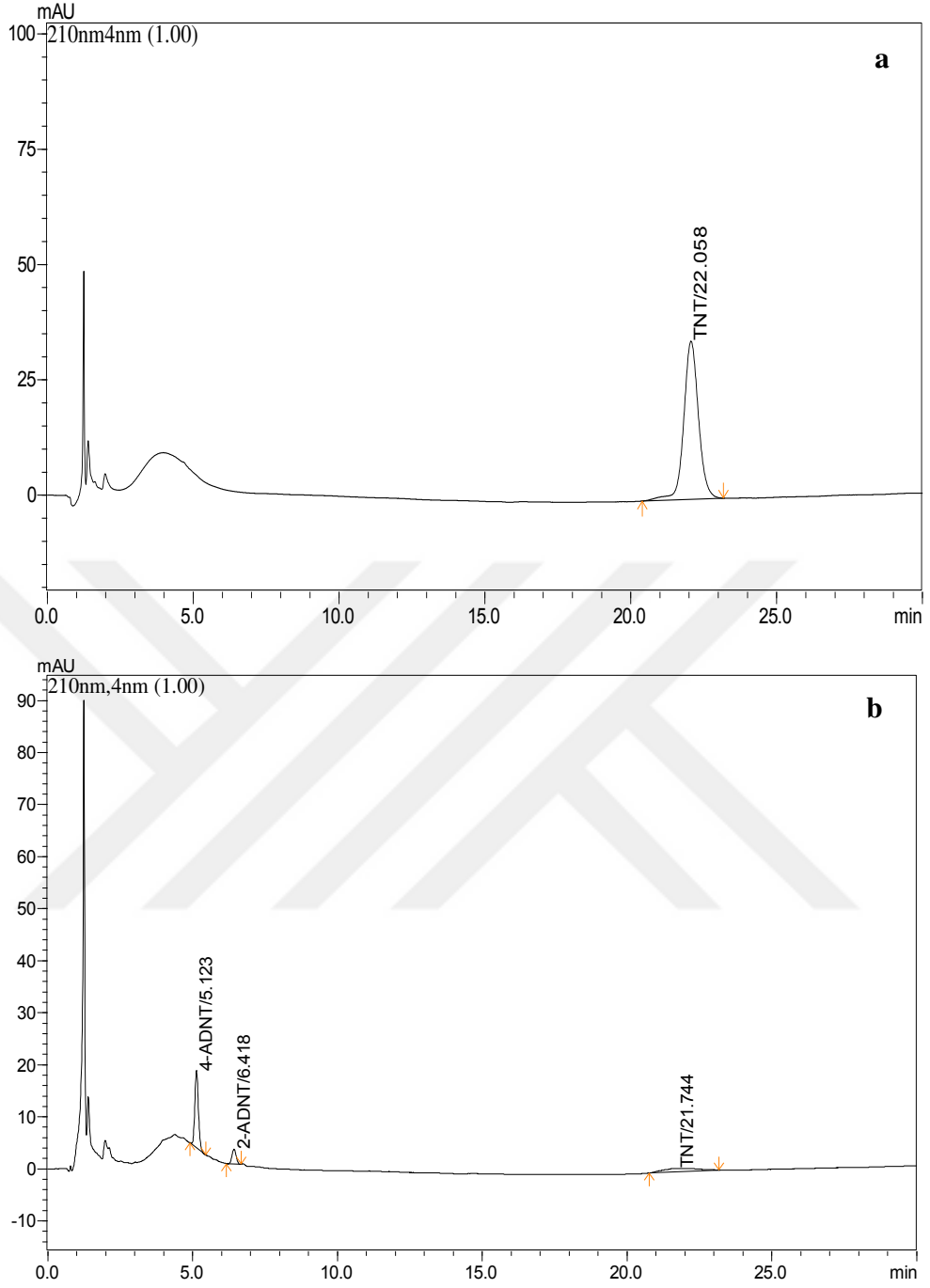


**Şekil 3.8.** *S. maltophilia* SU K2 izolatının (35 °C’de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları





**Şekil 3.9.** *K. pneumoniae* SU K3 izolatının (30 °C’de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki (b) HPLC kromatogramları



**Şekil 3.10.** *R. planticola* SU K4 izolatının (30 °C’de) 0. saatteki (a) ve 24. saatteki HPLC kromatogramları

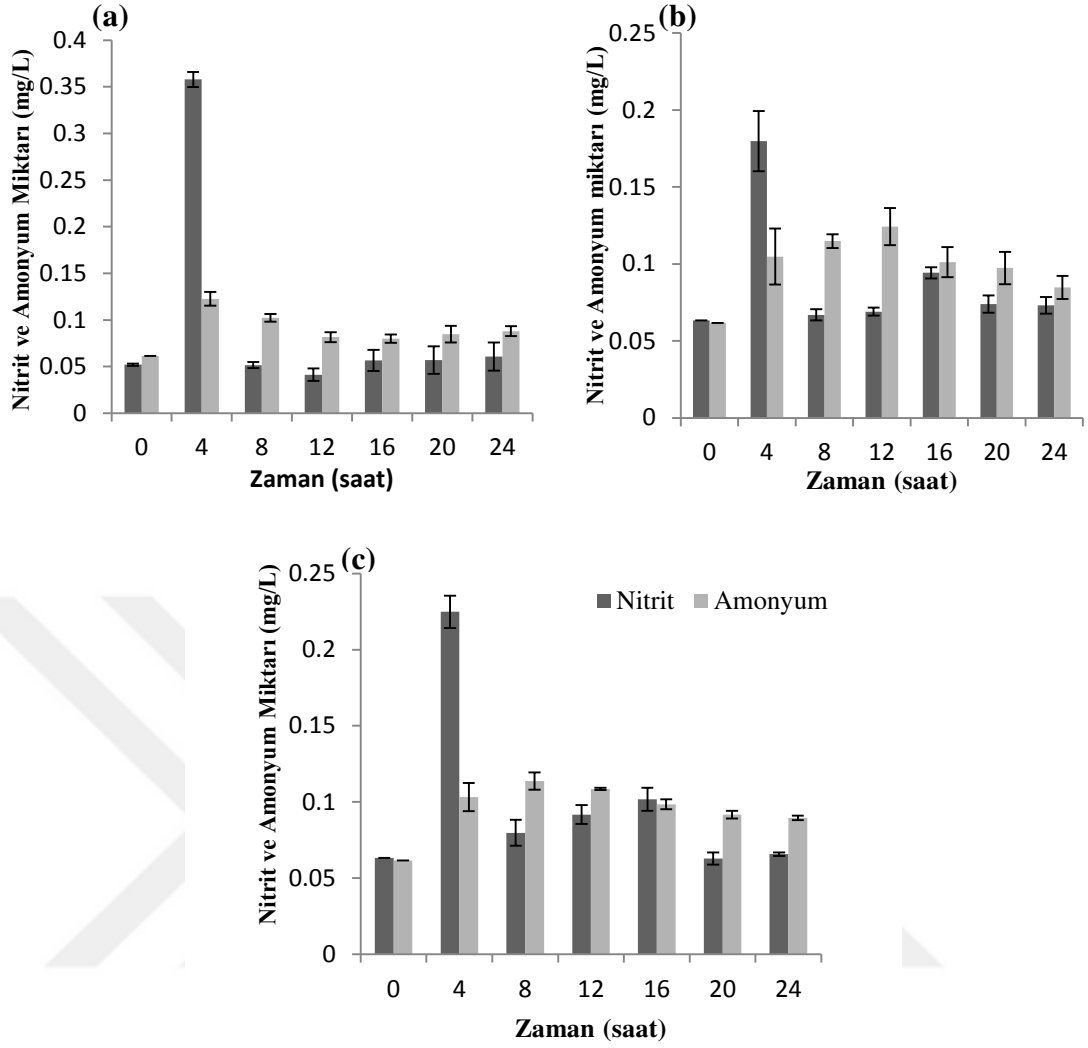
Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da gösterildiği gibi izolatların HPLC kromatogramlarında inokulasyondan hemen önceki kültür

ortamlarında sadece TNT piki varken, 24 saat inkübasyon süresi sonunda izolatların kromatogramlarında ardı ardına 4-ADNT ve 2-ADNT pikleri ve değişen şiddetlerde TNT pikleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, izolatların TNT'yi azot kaynağı olarak kullanıp TNT'li ortamda gelişirken TNT'nin bir kısmını 4-ADNT ve 2-ADNT nitroaromatik bileşiklerine dönüştürdüğünü göstermektedir. Ayrıca *S. maltophilia* SU K2 izolatının kültür ortamında 2-ADNT pikinin hemen arkasından hangi bileşiğe ait olduğu bilinmeyen küçük bir pik gözlemlenmiştir. Mikroorganizmalarla TNT'nin parçalanması sırasında tanımlanamayan ara ürün oluşumu literatürde de rapor edilmiştir (McFarlan ve Yao, 2011; Gümüüşçü ve Tekinay, 2013).

HPLC analizleri için standart olarak 2,4-DNT ve 2,6-DNT bileşikleri de kullanılmıştır, ancak hiçbir izolatın kültüründe bu bileşiklerin birikimine rastlanmamıştır. HPLC analizleri ile bütün izolatların kültür ortamlarında TNT'nin parçalanması sonucu 2-ADNT ve 4-ADNT birikimi tespit edilmiştir, çünkü bu bileşikler suda çözündükleri için kültür ortamında birikmişlerdir. Muhtemelen, parçalanma ara ürünlerinin geri kalanı (azoksi bileşikleri) daha önce Claus vd. (2007) rapor ettiği gibi çözünmeyen materyal olarak hücre pelletlerinde birikmiştir.

### **3.7. TNT'nin Parçalanması Sırasında Oluşan Nitrit ve Amonyum Miktarlarının Belirlenmesi**

TNT'den nitrit iyonunun ve HADNT ara ürününden amonyum iyonun açığa çıkması, TNT'nin mikrobiyal parçalanmasının göstergesidir (Stenuit ve Agathos, 2009). Bu nedenle, toprak ve su örneklerinden izole edilen bakteriler TNT'li besiyerinde inkübe edilmiş, izolatlar tarafından TNT'nin mineralizasyonunu göstermek için TNT'nin parçalanması sırasında bakteriyel kültürde biriken  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  miktar tayinleri yapılmıştır. Toprak izolatları *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 kültürlerinde TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında biriken nitrit ve amonyum miktarları Şekil 3.11'de verilmiştir.



**Şekil 3.11.** *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) kültürlerinde TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında biriken  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  miktarları

Şekil 3.11'de gösterildiği gibi toprak izolatlarının kültür ortamında, nitrit seviyesi 0-4 saatler arasında keskin bir artış gösterirken, daha sonra hemen hemen neredeyse sabit kalmıştır. *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatu için ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit ve amonyum miktarlarının sırasıyla 0,35 mg/L ve 0,123 mg/L seviyelerine ulaştığı saptanmıştır. 4. saatten sonra *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatının kültür ortamında nitrit seviyesinin 0,05-0,06 mg/L seviyelerinde, amonyum seviyesinin ise 0,09-0,102 mg/L seviyelerinde kaldığı görülmüştür (Şekil 3.11.a). *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatının kültür ortamında TNT'nin parçalanması sırasında,

inokülasyondan önceki ortam (0. saat) ile karşılaştırıldığında, biyolojik parçalanmadan dolayı bir nitrit oluşumu tespit edilmiştir.

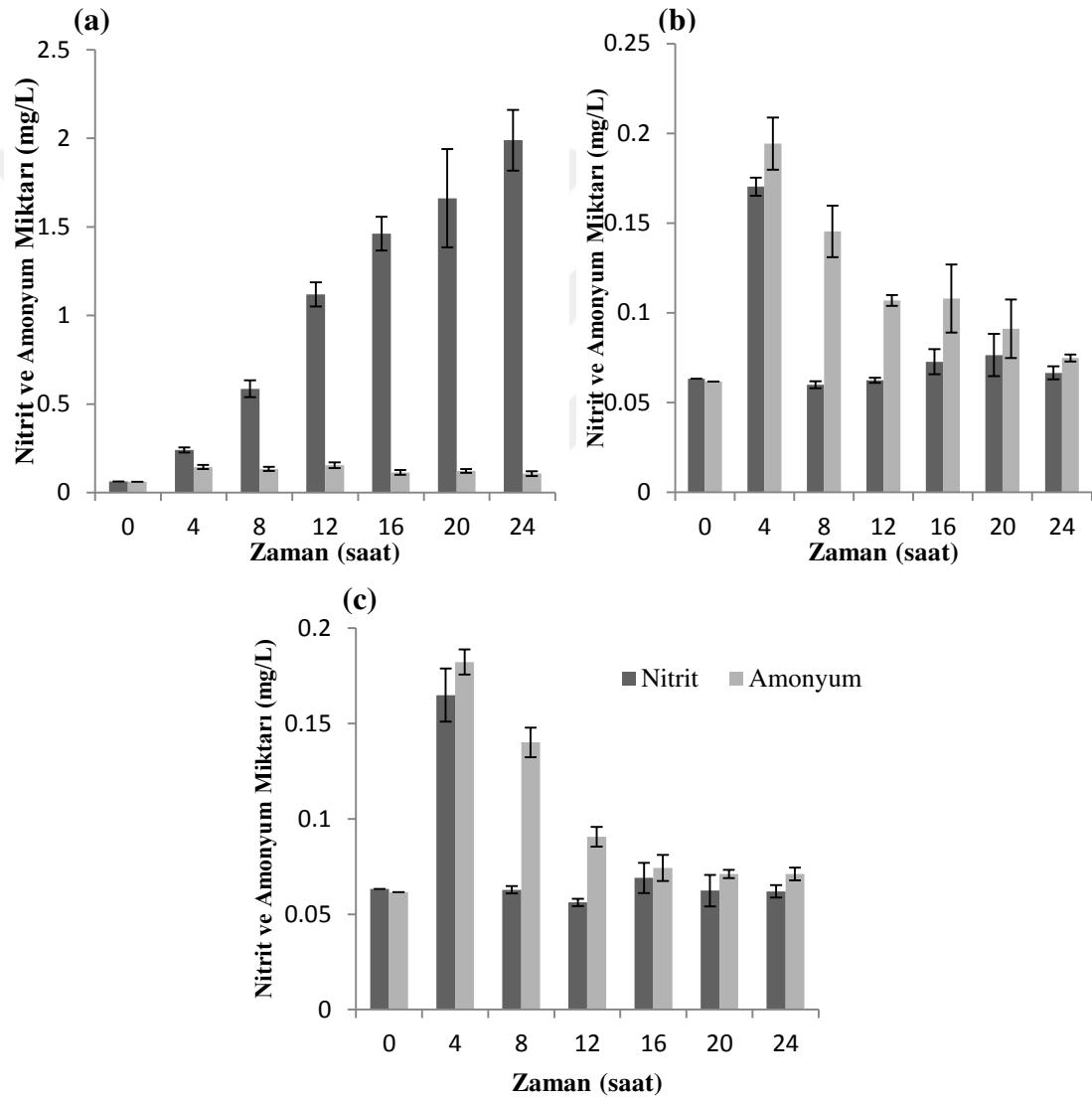
*R. planticola* SÇ1 K4 izolatu için ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit miktarı maksimum seviyesine ulaşmış ve 0,18 mg/L olarak saptanmıştır. Amonyum miktarının ise ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,105 mg/L seviyesine ulaştığı ve 12. saatin sonunda maksimum 0,124 mg/L seviyesine ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 3.11.b).

*P. putida* SÇ1 K5 izolatu için ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit ve amonyum miktarlarının 0,23 mg/L ve 0,103 mg/L seviyelerine ulaştığı saptanmıştır. 4. saatten sonra *P. putida* SÇ1 K5 izolatının kültür ortamında biriken nitrit seviyesi 0,108-0,09 mg/L seviyelerine düşerken, amonyum miktarının 8. saatin sonunda maksimum 0,114 mg/L seviyesine ulaştığı, bu saatten sonra 0,1-0,09 mg/L seviyelerinde sabit kaldığı saptanmıştır (Şekil 3.11.c). *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 izolatlarının kültür ortamlarında da *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatında olduğu gibi TNT'nin parçalanması sırasında inokülasyondan önceki ortam (0. saat) ile karşılaştırıldığında, biyolojik parçalanmadan dolayı bir nitrit oluşumu tespit edilmiştir.

TNT'li besiyerinde, bakteriler inoküle edildikten sonra nitrit miktarının inokülasyondan önceki ortamın nitrit miktarına göre değişmesi ve 4 saat sonra maksimum seviyesine ulaşması, TNT'nin bakteriyel parçalanmaya uğradığını göstermektedir (Rahal ve Moussa, 2011). Bütün toprak izolatlarında ilk dört saatlik inkübasyon süresinde başlangıçtaki TNT'nin neredeyse % 50'sinden fazlası parçalanmıştır. Bundan dolayı ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit miktarı maksimum seviyesine ulaşmış ve sonrasında bakteri hücreleri tarafından azot kaynağı olarak kullanıldığı için besiyerinde biriken nitrit miktarında azalmalar olmuştur. Daha önce Claus vd. (2007) rapor ettikleri gibi, toprak izolatlarının kültürlerinde ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit iyonu birikiminin saptanmasına karşın, HPLC analizlerinde 2,6-DNT veya 2,4-DNT birikimlerine rastlanmamıştır. Nitrit iyonu oluşumuna karşın, denitrasyona uğramış ara ürünlerin tespit edilememesi, TNT'nin denitrasyonu sonucu oluşan 2,6-DNT ve 2,4-DNT ara

ürünlerinin bu izolatlar tarafından muhtemelen metabolize edilmesinden kaynaklanmaktadır (Gümüüşü ve Tekinay, 2013).

Su izolatları *S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 kültürlerinde TNT'nin biyolojik parçalanması sırasında biriken nitrit ve amonyum miktarları Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) kültürlerinde TNT'nin parçalanması sırasında kültür ortamında biriken  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  miktarları

*S. maltophilia* SU K2 izolatu için ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit ve amonyum miktarlarının sırasıyla 0,242 mg/L ve 0,144 mg/L seviyelerine ulaştığı saptanmıştır (Şekil 3.12). Şekil 3.12.a'da gösterildiği gibi, *S. maltophilia* SU K2 izolatu ile gerçekleştirilen TNT parçalama çalışmalarında 0 ile 24. saatleri arasında nitrit miktarının hızla yükseldiği 24. saatin sonunda 2 mg/L seviyelerine ulaştığı belirlenmiştir. Amonyum miktarının ise 0 ile 20. saatler arasında hemen hemen sabit kaldığı, fakat 24. saatin sonunda 0,107 mg/L seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. *S. maltophilia* SU K2 izolatının toprak ve su örneklerinden elde edilen izolatlar arasında en düşük TNT parçalama kapasitesine sahip olmasına karşın, en yüksek miktarda nitrit birikimi bu izolatının kültürlerinde tespit edilmiştir. Bu durum *S. maltophilia* SU K2 izolatının farklı bir TNT parçalama mekanizmasına sahip olduğu ile ya da TNT'nin bakteriyel parçalanması sonucu açığa çıkan nitrit iyonlarını metabolik faaliyetleri için diğer izolatlar kadar etkili kullanamamasıyla açıklanabilir. TNT'nin mikroorganizmalar tarafından indirgenmesi ile oluşan Meisenheimer kompleksi, bakteriyel kültürlerde kırmızı-kahverengimsi renk oluşumuna ve nitrit iyonunun açığa çıkmasına sebep olmaktadır (Mercimek, 2011). TNT parçalama çalışmalarında, *S. maltophilia* SU K2 izolatının kültürlerinde bu renk oluşumu gözlemlenmesine karşın diğer izolatların kültürlerinde ve kontrol grubunda bu renk oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu renk değişimi ve nitrit iyonunun açığa çıkması, bu izolatının TNT'yi Meisenheimer kompleksi oluşturarak parçaladığını göstermektedir (Mercimek vd., 2013).

Şekil 3.12.b'de gösterildiği gibi, *K. pneumoniae* SU K3 izolatu ile gerçekleştirilen TNT parçalama çalışmalarında ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit miktarı maksimum seviyesine ulaşmış ve 0,17 mg/L olarak saptanmıştır. 4. saatten sonra nitrit iyon miktarının 0,06-0,07 mg/L seviyelerinde sabit kaldığı belirlenmiştir. Amonyum miktarı ise ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum seviyesine ulaşmış ve 0,194 mg/L olarak saptanmıştır. 4. saatten sonra kültür ortamında biriken amonyum iyon miktarı yavaşça azalarak 24. saatin sonunda 0,075 mg/L olarak saptanmıştır.

*R. planticola* SU K4 izolatu için ilk dört saatlik inkübasyon süresi sonunda nitrit ve amonyum miktarlarının maksimum seviyelerine ulaştığı ve açığa çıkan nitrit ve

amonyum miktarlarının sırasıyla 0,165 mg/L ve 0,182 mg/L olduğu saptanmıştır. 4. saatten sonra bu izolatının kültür ortamında biriken nitrit seviyesinin 0,06-0,07 mg/L seviyelerine düştüğü ve 4. saatten sonra kültür ortamında biriken amonyum iyon miktarının yavaşça azalarak 24. saatin sonunda 0,071 mg/L olduğu saptanmıştır (Şekil 3.12.c).

*S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 izolatlarının kültür ortamlarında toprak izolatlarında olduğu gibi TNT'nin bakteriyel parçalanması sırasında inokülasyondan önceki ortam (0. saat) ile karşılaştırıldığında, biyolojik parçalanmadan dolayı bir nitrit oluşumu tespit edilmiştir. Toprak izolatlarında olduğu gibi su izolatlarının kültürlerinde de nitrit birikimine rastlanırken, HPLC analizlerinde denitrasyona uğramış ara ürünler tespit edilmemiştir. Bu durumda bu izolatların TNT'nin parçalanması sonucu oluşan denitrasyonlu bileşikleri de metabolize etmesiyle açıklanabilir (Gümüşçü ve Tekinay, 2013).

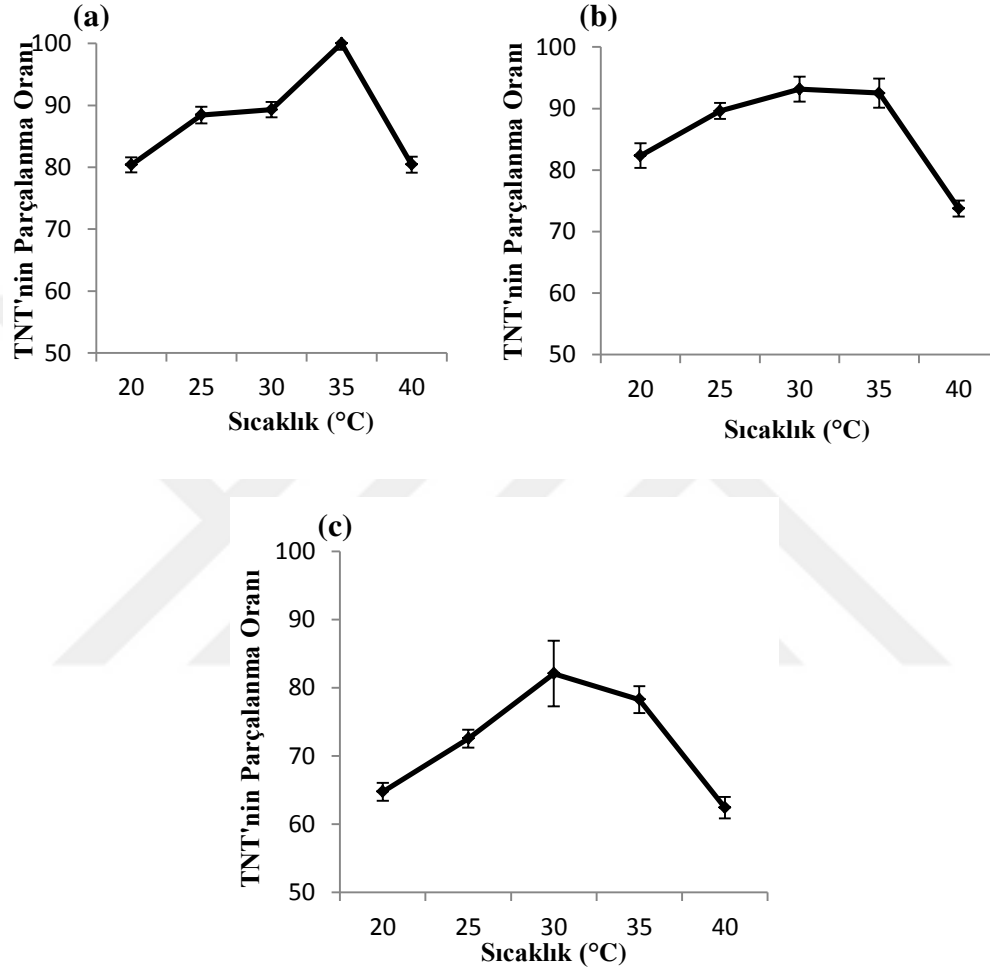
İzolatlarla yapılan TNT parçalama çalışmalarında 0 ile 24. saatleri arasında bütün bakteriyel kültürlerde nitrit ve amonyum birikimleri tespit edilmiştir. İzolatların kültür edildiği besi ortamında TNT dışında azot içeren herhangi bir bileşik olmadığından dolayı , kültür ortamında nitrit ve amonyum birikimi, toprak ve su izolatlarının TNT'yi parçalayabilme kapasitesine sahip olduklarının göstergesidir (Rahal ve Moussa, 2011; Gümüşçü ve Tekinay, 2013; Mercimek vd., 2013). Literatürde, TNT'nin farklı mikroorganizmalarla parçalanması sırasında, nitrit ve amonyum birikimine yönelik sonuçlarımızı destekler nitelikte birçok çalışma rapor edilmiştir (Duque vd., 1993; Kim vd., 2002; Rahal ve Moussa, 2011; Gümüşçü ve Tekinay, 2013; Mercimek vd, 2013; Mercimek vd., 2015).

### **3.8. Sıcaklığın TNT'nin Biyolojik Parçalanmasına Etkisi**

Organik kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından parçalanması önemli ölçüde sıcaklık, besiyeri bileşenleri ve pH gibi çevresel koşullara bağlıdır (Küce vd., 2015). Bundan dolayı, izolatların TNT'nin biyolojik parçalanmasını daha verimli hale getirmek için, izolatlarla TNT'nin parçalanma çalışmaları farklı sıcaklık değerlerinde



gerçekleştirilmiştir. *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 toprak izolatlarının farklı sıcaklıklarda değişen TNT parçalama oranları Şekil 3.13'te verilmiştir.



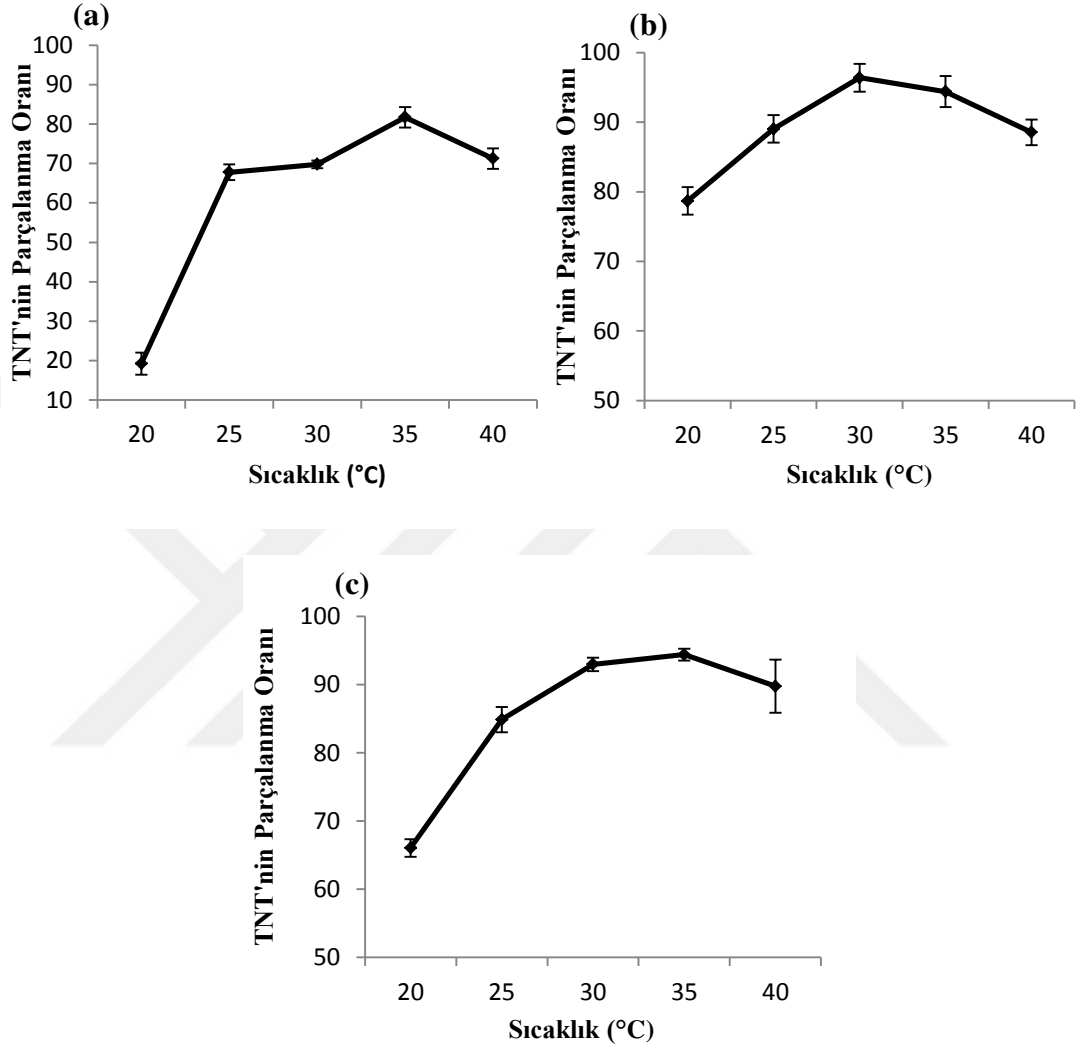
**Şekil 3.13.** *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) izolatlarının TNT'yi parçalama oranlarının 24. saatin sonunda farklı sıcaklık değerlerine bağlı değişimi (pH 7'de)

*K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatı ile yapılan önceki TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT azalışı *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatı için 100 ppm TNT içeren besiyerinde 30 °C'de % 90 olarak belirlenmiştir. Bu izolat ile

yapılan sıcaklık çalışmalarında, 35 °C’de izolatin 100 ppm TNT içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT’nin % 98’ini metabolize ettiği tespit edilmiştir. Inkübasyon sıcaklığın 20 °C’lere indirilmesi ile ya da 40 °C’lere çıkarılmasıyla *K. pneumoniae* SÇ1 K1 izolatinin TNT’yi parçalama oranının % 80’lere indiği belirlenmiştir (Şekil 1.13.a). *R. planticola* SÇ1 K4 izolatu ile yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda izolatin TNT parçalama oranının 30 °C’de ve 35 °C’de değişmediği ve 100 ppm TNT içeren besiyerinde % 95 olduğu tespit edilmiştir. *R. planticola* SÇ1 K4 izolatinin TNT parçalama oranının, 20 °C’de % 80’lere, 40 °C’de % 70’lere indiği tespit edilmiştir (Şekil 3.13.b). *P. putida* SÇ1 K5 izolatu ile farklı sıcaklıklarda yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bu izolatinin TNT’yi parçalama kapasitesinin 30 °C’de maksimum olduğu ve sıcaklığın artırılmasıyla ve azaltılmasıyla TNT parçalama kapasitesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 3.13.c).

Su izolatları için farklı sıcaklıklarda değişen TNT parçalanma oranları Şekil 3.14’te verilmiştir. *S. maltophilia* SU K2 izolatu ile yapılan önceki TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda TNT azalışı bu izolat için 100 ppm TNT içeren besiyerinde 30 °C’de % 70 olarak belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda yapılan TNT parçalama çalışmalarında, bu izolatin maksimum TNT parçalama kapasitesinin 35 °C’de ve bu sıcaklıkta TNT parçalama oranının % 82 olduğu tespit edilmiştir. *S. maltophilia* SU K2 izolatinin farklı sıcaklıklarda inkübe edildiğinde TNT’yi parçalama kapasitesinde çok fazla değişme olduğu görülmüştür. 20 °C’de TNT’yi parçalama kapasitesinin % 20’lerin altına düştüğü görülmüştür (Şekil 3.14.a). *K. pneumoniae* SU K3 izolatu ile yapılan TNT parçalama çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, izolatin TNT’yi parçalama oranının 30 °C’de maksimum olduğu, sıcaklığın artması veya azalmasıyla bu oranın % 96’dan % 80-90’lara düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.14.b). *R. planticola* SU K4 izolatu ile yapılan TNT’nin biyolojik parçalanması çalışmalarında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda izolatin TNT’yi parçalama oranının 30 °C ve 35 °C’de değişmediği ve maksimum olduğu, 20 °C’de % 66’ya, 25 °C’de % 85’e ve 40 °C’de % 90’a düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.14.c). Yapılan sıcaklık çalışmalarında, *K. pneumoniae* SÇ1 K1 ve *S. maltophilia* SU K2 izolatlarının 35 °C’de maksimum TNT parçalama oranlarına

sahip oldukları belirlenmiş ve bu izolatlarla yapılan TNT parçalama çalışmaları 35 °C’de gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.14.** *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) izolatlarının TNT’yi parçalama oranlarının 24. saatin sonunda farklı sıcaklık değerlerine bağlı değişimi (pH 7’de)

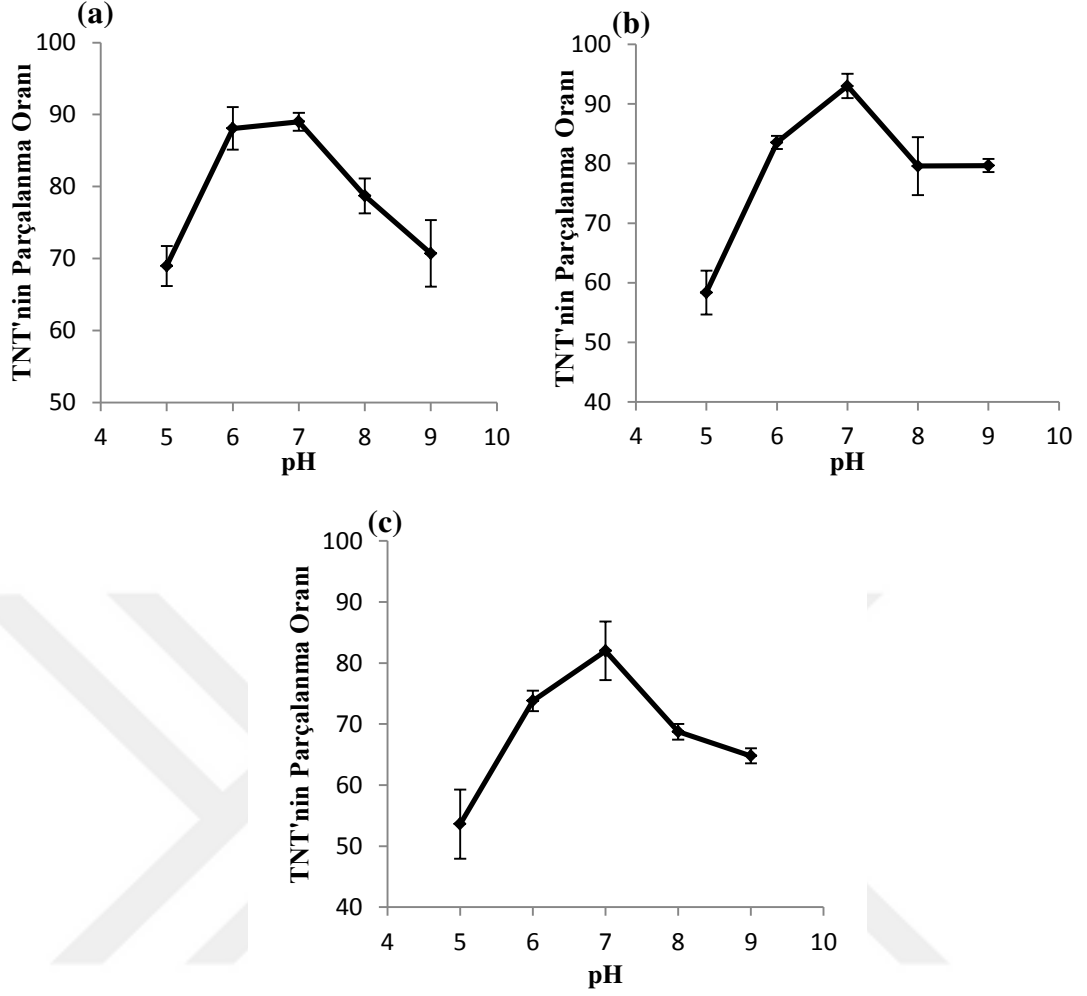
Sıcaklığın TNT’nin parçalanmasına etkisinin nedeni bakterilerin nispeten dar bir sıcaklık aralığı içinde hızlı bir şekilde büyümesi ve sıcaklığın yüksek ya da düşük olmasıyla hücresel enzimlerin aktivitesinin engellenmesidir (Lopez Zavala vd., 2004; Lin vd., 2013). Sıcaklığın TNT’nin parçalanmasına etkisiyle ilgili çalışmamızın

sonuçlarını destekler nitelikte literatürde benzer çalışmalar da rapor edilmiştir (Estve-Nunez ve Ramos, 1998; Park vd., 2003; Gümüşçü ve Tekinay, 2013; Lin vd., 2013). Örneğin, Lin vd. (2013) bir bakteri konsorsiyumundan izole ettikleri *Bacillus mycooides* bakteri türü ile TNT'nin parçalanması için en uygun pH ve sıcaklık gibi çevre koşullarını araştırmışlardır. Farklı sıcaklık ve pH değerlerinde izolatan TNT'yi parçalama kapasitesinin değiştiğini ve maksimum TNT parçalama kapasitesinin pH 7 ve 30 °C'de olduğunu bildirmişlerdir. Park vd. (2003) patlayıcılarla kirlenmiş alandan elde ettikleri izolat tarafından TNT'nin biyolojik parçalanmasını daha verimli yapmak için TNT'nin parçalanmasına etki eden pH ve sıcaklık gibi faktörleri araştırmışlar ve elde edilen izolat için optimum sıcaklığın 30 °C ve optimum pH'ın 7 olduğu belirlenmiştir.

### **3.9. pH'ın TNT'nin Biyolojik Parçalanmasına Etkisi**

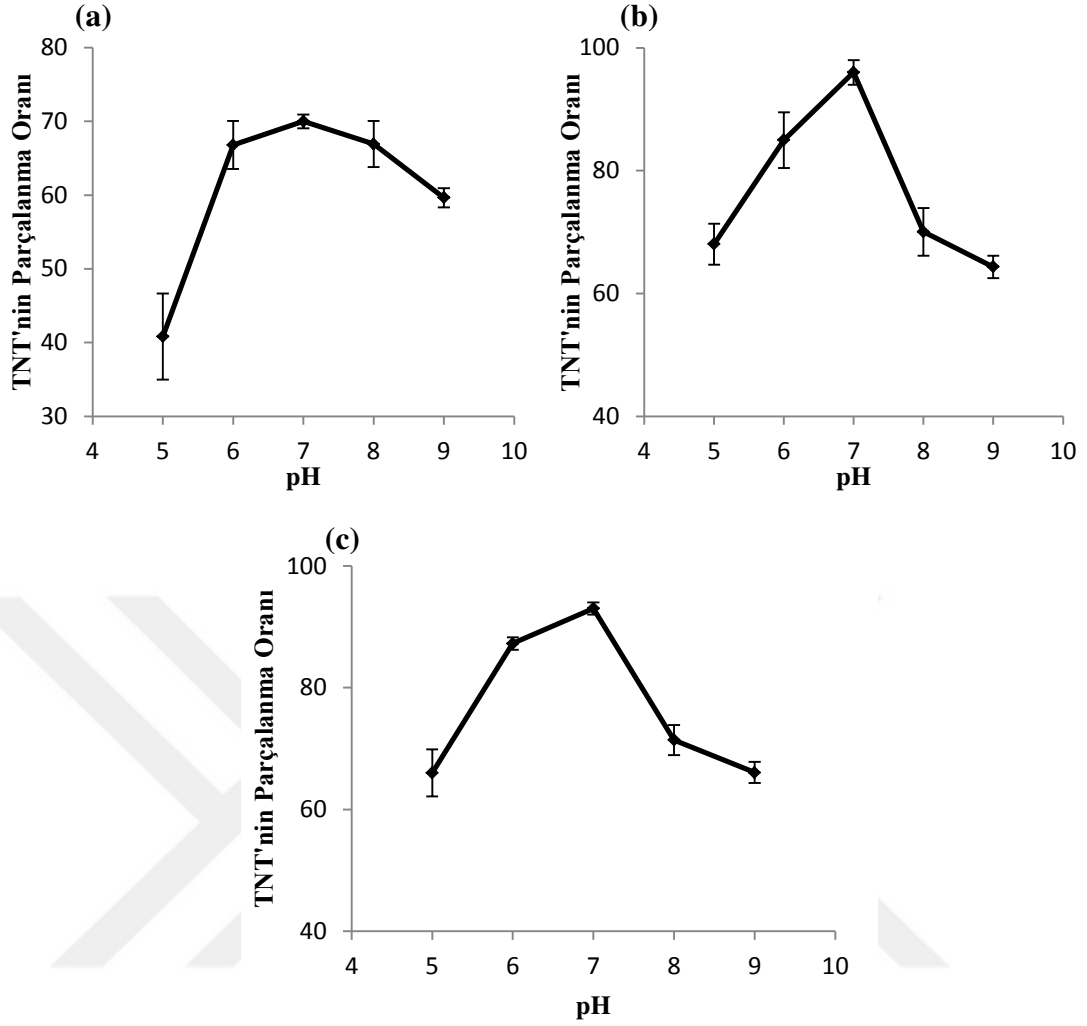
Kültür ortamının pH'ı bakteriyel büyümeyi önemli ölçüde etkilemektedir (Xu vd., 2005; Lin vd., 2013), bundan dolayı kültür ortamındaki hidrojen iyon derişiminin TNT'nin parçalanmasına etkisini araştırmak için izolatlarla TNT'nin parçalanma çalışmaları farklı pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir.

Toprak izolatları *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 bakteri suşlarının farklı pH değerlerinde değişen TNT parçalama oranları Şekil 3.15'te verilmiştir.



**Şekil 3.15.** *K. pneumoniae* SÇ1 K1 (a), *R. planticola* SÇ1 K4 (b) ve *P. putida* SÇ1 K5 (c) bakteri suşlarının TNT'yi parçalama oranlarına pH'nın etkisi (30 °C'de)

Su izolatları *S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 suşlarının farklı pH değerlerinde değişen TNT parçalama oranları Şekil 3.16'da verilmiştir.



**Şekil 3.16.** *S. maltophilia* SU K2 (a), *K. pneumoniae* SU K3 (b) ve *R. planticola* SU K4 (c) bakteri suşlarının TNT'yi parçalama oranlarına pH'ın etkisi (30 °C'de)

Şekil 3.15 ve 3.16'da gösterildiği gibi, bütün izolatların TNT'yi parçalama kapasitesi farklı pH değerlerinde değişmiştir. Bütün izolatların pH 7'de maksimum TNT parçalama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş ve daha alkali ya da asidik koşullarda izolatların TNT parçalama kapasitelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (Estve-Nunez ve Ramos, 1998; Park vd., 2003; Gümüşçü ve Tekinay, 2013; Lin vd., 2013).

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Birinci ve ikinci dünya savaşı sırasında, TNT ana patlayıcı madde olarak kullanılmış ve bu patlayıcı maddenin kitlesel kullanılmasından dolayı toprak ve yeraltı sularının TNT ile kirlenmesi günümüze kadar devam eden bir çevresel probleme sebep olmuştur. Bundan dolayı, TNT üretilmesinde, işlenmesinde ve imhasında kullanılan birçok askeri bölge ciddi bir şekilde TNT kirliliğine maruz kalmıştır. TNT kirliliğini ortadan kaldırmak için kullanılan yakma ve termal oksidasyon gibi geleneksel yöntemler son derece pahalı ve yıkıcı işlemlerdir ve CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> gibi istenmeyen sera gazların açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Son yıllarda, TNT'nin mikrobiyal parçalanması ve biyoremediasyonu uygun maliyetli ve çevre dostu bir yaklaşım olarak birçok araştırmacı tarafından ilgi görmektedir. Çoğunlukla, patlayıcıların biyoremediasyonu, biyoreaktör içine ya da doğrudan kontamine olmuş bölgelere (bioaugmentation) inoküle edilebilir yüksek patlayıcı yıkım kapasitesine sahip mikroorganizmaların keşfi amacıyla çalışılmaktadır. Bundan dolayı birçok araştırmacı TNT ve ilgili bileşiklerle kontamine olmuş bölgelerden TNT'nin biyoremediasyonunda kullanılma kapasitesine sahip TNT'yi metabolize edebilen mikroorganizmaları izole etmiş ve tanımlamıştır.

Bu çalışmada, yıllardır TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen Kırıkkale'den alınan TNT ile kirlenmiş toprak ve su örneklerinden, TNT'nin biyoremediasyonunda kullanılma kapasitesine sahip bakteri suşları mikrobiyolojik yöntemlerle izole edilmiştir. Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. TNT'yi parçalayabilen bakteri suşlarının izolasyonu için toprak ve su örnekleri yaklaşık on yıldır TNT kirliliğine maruz kaldığı bilinen araziden alınmıştır. Örneklerin alındığı bu bölgede uzun yıllardır kullanılmayan askeri mühimmatların imhası yapılmaktadır, ancak bu bölgedeki TNT kirlilik seviyesi konusunda resmi ya da bilimsel herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bu bölgeden alınan toprak ve su örneklerindeki TNT kirlilik seviyesi yapılan spektrofotometrik analizlerle belirlenmiş ve TNT kirlilik seviyesinin 49-346 mg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir.

2. TNT kontaminasyonuna maruz kalmış toprak örneklerinden azot kaynağı olarak sadece 100 mg/L TNT bulunan ortamda büyüeyebilen 19, su örneğinden 5 toplamda 24 bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolatlar arasından, azot kaynağı olarak 100 mg/L TNT bulunduran besi ortamında en yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip 6 bakteri suşu ileri çalışmalar için seçilmiştir.
3. Seçilen izolatlar Gram boyama ve 16S rRNA gen dizi analizi yöntemi ile tanımlanmıştır. 16S rRNA gen dizi analizlerine göre, SÇ1 K1 ve SU K3 izolatları *K. pneumoniae*, SÇ1 K4 ve SU K4 izolatları *R. planticola*, SÇ1 K5 izolatu *P. putida* ve SU K2 izolatu *S. maltophilia* olarak tanımlanmıştır.
4. Aerobik şartlar altında, 30 °C’de ve 120 rpm çalkalama hızında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, toprak izolatları *K. pneumoniae* SÇ1 K1, *R. planticola* SÇ1 K4 ve *P. putida* SÇ1 K5 izolatlarının sırasıyla besiyerinde bulunan başlangıçtaki TNT’nin % 90, % 95 ve % 84’ünü parçaladıkları bulunmuştur. SÇ1 K1 izolatının 35 °C’de inkübe edildiğinde, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT’nin neredeyse tamamını parçaladığı tespit edilmiştir.
5. Aerobik şartlar altında, 30 °C’de ve 120 rpm çalkalama hızında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, su izolatları *S. maltophilia* SU K2, *K. pneumoniae* SU K3 ve *R. planticola* SU K4 izolatlarının sırasıyla besiyerinde bulunan başlangıçtaki TNT’nin % 70, % 96 ve % 93’ünü parçaladıkları bulunmuştur. SU K2 izolatının 35 °C’de inkübe edildiğinde, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda başlangıçtaki TNT’nin % 82’sini parçaladığı bulunmuştur
6. Her bir izolatın TNT’nin biyolojik olarak parçalanması sırasında oluşan ara ürünleri HPLC ile analiz edilmiş ve bütün izolatların bakteriyel kültürlerinde 4-ADNT ve 2-ADNT birikimleri tespit edilmiştir. TNT’nin bu bileşiklere dönüşümü istenilen bir arıtım sürecidir çünkü oluşan bu ara ürünlerin TNT gibi patlayıcı özelliği yoktur, TNT ile karşılaştırıldığında toksik etkileri daha azdır ve sudaki çözünürlükleri TNT’ye göre daha az olduğu için yer altı sularına karışıp su kaynaklarını kirletme ihtimalleri TNT’ye göre daha düşüktür.



7. Her bir izolatin TNT'nin biyolojik olarak parçalanması sırasında kültür ortamında biriken nitrit ve amonyum miktarı belirlenmiş ve bütün izolatların kültür ortamında inokülasyondan önceki ile karşılaştırıldığında TNT'nin biyolojik parçalanmasından dolayı nitrit ve amonyum miktarlarının arttığı görülmüştür.
8. İzolatlar tarafından TNT'nin parçalanmasına sıcaklığın etkisi araştırılmış ve *K. pneumoniae* SÇ1 K1 ve *S. maltophilia* SU K2 izolatları için uygun inkübasyon sıcaklığı 35 °C, diğer izolatlar için 30 °C olarak bulunmuştur.
9. İzolatlar tarafından TNT'nin parçalanmasına pH'nin etkisi araştırılmış ve bütün izolatların pH 7'de maksimum TNT parçalama ve büyüme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada yüksek TNT parçalama kapasitesine sahip bakteri suşları TNT kirliliğine maruz kalmış bölgeden izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar, biyoreaktörlerde ya da doğrudan kontamine olmuş bölgelerde, bireysel olarak veya çeşitli bakteri konsorsiyumları ile TNT ile kirlenmiş bölgelerin arıtılmasında güvenli ve etkili bir şekilde kullanılabilir. Buna ek olarak izolatlar belirli bir sıcaklık ve pH aralığında yüksek TNT yıkım kapasitelerini korumuşturlar. Bundan dolayı, bu izolatlarla yapılan büyük ölçekli biyoremediasyon çalışmalarında sıcaklık veya pH kontrolü gerekmeyecek olması, arıtım işlemini daha kolay uygulanabilir hale getirecektir. Yüksek TNT metabolizasyonuna sahip bu izolatların büyük ölçekli biyoremediasyon süreçlerinde kullanılmasının, çevre dostu ve daha az maliyetli bir yöntemin geliştirilmesine katkı sağlayacağı da öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Alvarez, M.A., Kitts, C.L., Botsford, J.L., Unkefer, P.J., *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 984-991, 1995.
- Anonim, Trinitrotoluene, University of Torino, [http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2008\\_Esplosivi/TNT.html](http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2008_Esplosivi/TNT.html) (Erişim Tarihi: 12.10.2015).
- ATSDR, U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 2,4,6-trinitrotoluene. 1-208. Georgia, 1995.
- Ayoub, K., Hullebusch, E.D., Cassir, M., Bermond, A., Application of advanced oxidation processes for TNT removal: A review. *Journal of Hazardous Materials* 178, 10-28, 2010.
- Bae, B., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Aerobic biotransformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. In *Bioremediation of recalcitrant organics*. 231-238. Ed: R.E. Hinchee, R.E. Hoeppel, and D.B. Anderson. Battelle Press, Columbus, Ohio, 1995.
- Barrow, S.E., Cramer, C.J., Truhlar, D.G., Elovits, M.S., Weber, E.J., Factors controlling regioselectivity in the reduction of polynitroaromatics in aqueous solution. *Environmental Science and Technology*, 30, 3028-3038, 1996.
- Boopathy, R., Kulpa, C.F., Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus* sp. (strain B) isolated from a lake sediment. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 273-278, 1994.
- Boopathy, R., Kulpa, C.F., Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Current Microbiology* 25, 235-241, 1992.

- Breitung, J., Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Kaminski, L., Gemsa, D., von Low, E., Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 795-800, 1996.
- Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Steinbach, K., Schmidt, C., von Löw, E., Gorontzy, T., Blotevogel, K.H., Gemsa, D., Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environmental Science & Technology* 32, 1676-1679, 1998.
- Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Gemsa, D., von Löw, E., Composting (humification) of nitroaromatic compounds. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. 357-393. Ed: by J. Spain, J.B. Hughes, and H.-J. Knackmuss. Publishers, Boca Raton, Fla, 2000.
- Bryant, D., McCalla, D., Leeksa, M., Laneville, P., Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 81-86, 1981.
- Chaundry, G.R., *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1994.
- Chien, C-C., Kao, C-M., Chen, D-Y., Chen, S.C., Chen, C-C., Biotransformation of Trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas* spp. Isolated from a TNT-contaminated Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (5), 1059-1063, 2014.
- Clark, B., Boopathy, R., Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials* 143, 643-648, 2007.
- Clarridge, J.E., Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (4), 840-862, 2001.
- Claus, D., A standardized Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 451-452, 1992.

- Claus, H., Bausinger, T., Lehmler, I., Perret, N., Fels, G., Dehner, U., Preuß, J., König, H., Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation* 18, 27-35, 2007.
- Claus, H., Microbial Degradation of 2,4,6- Trinitrotoluene In Vitro and in Natural Environments. In the Biological remediation of explosive residues. 15-38. Ed: S.N. Singh. *Environmental Science and Engineering*, Springer International Publishing Switzerland, 2014.
- Cole, S., The emergence of treatment wetlands: as constructed wetlands for wastewater treatment grow in popularity; regulators and researchers strive to better understand this treatment option. *Environmental Science & Technology* 9(1), 218-223, 1997.
- Dindar, E., Topaç Şağban, F.O., Başkaya, H., Kirlenmiş Toprakların Biyoremediasyon İle Islahı. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi* 15(2), 123-137, 2010.
- Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel, K.H., Gemsa, D., Mass balance studies with <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species. *Current Microbiology* 37, 380-386, 1998.
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F., Ramos, J.L., Construction of a *Pseudomonas* Hybrid Strain That Mineralizes 2,4,6-Trinitrotoluene, *Journal of Bacteriology*, 175 (8), 2278-2283, 1993.
- H. Dursun, Determination of the Postexplosion Residues of Nitro Group Containing Explosives in Soil with Gas Chromotography-Mass Spectrometry and Gas Chromotography-Thermal Energy Analyser. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2007.
- Ederer, M.M., Lewis, T.A., Crawford, R.L., 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridia* isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18, 82-88, 1997.

- Environmental Protection Agency, Health Advisory for TNT, Criteria and Standard Division, Office of Drinking Water, Washington, 1989.
- Environmental Protection Agency. J.R. Simplot Ex-Situ Anaerobic Bioremediation Technology: TNT. EPA Superfund Innovative Technology Evaluation (SITE) Capsule. EPA 540/R-95/529a. September 1995.
- Esteve-Nuñez, A., Caballero, A., Ramos, J.L., Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 335-352, 2001.
- Esteve-Nuñez, A., Lucchesi, G., Philipp, B., Schink, B., Ramos, J.L., Respiration of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11. *Journal of Bacteriology* 182, 1352-1355, 2000.
- Esteve-Nuñez, A., Ramos, J.L., Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *Environmental Science & Technology* 32, 3802-3808, 1998.
- Fant, F., De Sloovere, A., Matthijsen, K., Marle, C., el Fantroussi, S., Verstraete, W., The use of amino compounds for binding 2,4,6-trinitrotoluene in water. *Environmental Pollution* 11, 503-507, 2001.
- Fiorella, P.D., Spain, J.C., Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2007-2015, 1997.
- Fischer R.H., Taylor, J.M., Munitions and explosive wastes. In the Land treatment of hazardous wastes, 297-303. Ed: Parr, J.F., Marsh, P.B., Kla, J.M. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corporation, 1983.
- Frank, J.A, Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S, Wilson, B.A., Olsen, G.J., Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), 2461-2470, 2008.

- French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C., Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2864-2868, 1998.
- Fuller, M.E., Manning, J.F., Microbiological changes during bioremediation of explosives contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresource Technology* 91(2), 123-133, 2004.
- Fuller, M.E., Manning, J.F.Jr., Aerobic Gram-positive and Gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Current Microbiology* 35, 77-83, 1997.
- Funk, S.B., Roberts, D.J., Crawford, D.L., Crawford, R.L., Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2171-2177, 1993.
- E.M. Gallagher, Anaerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): molecular analysis of active degraders and metabolic pathways, PhD Thesis, The State University of New Jersey, New Jersey, 2010.
- B. Gümüşçü, Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene by Novel Strains of Aerobic Bacteria. Yüksek Lisans Tezi, Bilkent Üniversitesi, Ankara, 2012.
- Gümüşçü, B., Tekinay T., Effective biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene using a novel bacterial strain isolated from TNT-contaminated soil. *International Biodeterioration&Biodegradation* 85, 35-41, 2013.
- Hamby, D.M., Site remediation techniques supporting environmental restoration activities-a review. *Science of The Total Environment* 19, 203-224, 1996.
- Hannah, E.S., Panneer, S.A., Characterization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-metabolizing Strain *Pseudomonas aeruginosa* sp Tuhp1 isolated from TNT-polluted soils in Thevellore District, Tamilnadu, India, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (7), 267-271, 2014.
- Haselhorst, L., Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) at munitions sites. *Restoration And Reclamation Review* 4 (7), 1-9, 1999.

- Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 605-618, 2000.
- Hintze, J.L., Wagner, P.J., TNT Wastewater Feasibility Study: Phase 1 Laboratory Study. Gencorp Aerojet Propulsion division US Army Missile Command/production base modernization activity, contract number DAAH01-91-C-0738, 1-730, 1992.
- Ho, P.C., Photo oxidation of 2,4-DNT in aqueous solution in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Environmental Science & Technology* 20 (1), 260-265, 1986.
- Hofstetter, T.B., Heijman, C.G., Haderlein, S.B., Holliger, C., Schwarzenbach, R.P., Complete reduction of TNT and other (poly)-nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions. *Environmental Science & Technology* 33, 1479-1487, 1999.
- Hughes, J.B., Wang, C., Yesland, K., Bhadra, R., Richardson, A., Bennet, G., Rudolph, F., Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 343-348, 1998.
- Jones, A.M., Greer, C.W., Ampleman, G., Thiboutot, S., Lavigne, J., Hawari, J., Biodegradability of selected highly energetic pollutants under aerobic conditions. In the *Bioremediation of recalcitrant organics*. 251-257. Ed: by E. Hincsee, R.E. Hoepfel, and D.B. Anderson. Battelle Press, Columbus, Ohio, 1995.
- Ju, K.S., Parales, R.E., Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (2), 250-272, 2010.
- Kalafut, T., Wales, M.E, Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K., Wild, J.R., Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Current Microbiology* 36, 45-54, 1998.

- Kalderis, D., Hawthorne, S.B., Clifford, A.A., Interaction of soil, water and TNT during degradation of TNT on contaminated soil using subcritical water. *Journal of Hazardous Material* 15, 329-334, 2008.
- Kalderis, D., Juhasz, A.L., Boopathy, R., Comfort, S., Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of the-art remediation processes (IUPAC Technical Report)\*. *Pure and Applied Chemistry* 83 (7), 1407-1484, 2011.
- Khachatryan, G.E., Mkrtychyan, N.I., Simonyan, N.V, Khachatryan, T.V., Tatikyan, S.Sh., Two unidentified aerobic bacterial strains that transform 2,4,6-trinitrotoluene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 393-395, 2000.
- Khan, M.I., Lee, J., Park, J., A Toxicological Review on Potential Microbial Degradation Intermediates of 2,4,6-Trinitrotoluene, and Its Implications in Bioremediation. *KSCE Journal of Civil Engineering* 17 (6), 1223-1231, 2013.
- Kim, H.Y., Bennett, G., Song, H.G., Degradation of 2,4,6- trinitrotoluene by *Klebsiella* sp. isolated from activated sludge. *Biotechnology Letter* 24, 2023-2028, 2002.
- Koubek, E., Photochemical induced oxidation of refractory organics with hydrogen peroxide. *Industrial&Engineering Chemistry Process Design and Development* 14, 348, 1975.
- Kumagai, Y., Wakayama, T., Li, S., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Sun, G., Shimojo, N., z-Crystallin catalyzes the reductive activation of 2,4,6- trinitrotoluene to generate reactive oxygen species: a proposed mechanism for the induction of cataracts. *FEBS Letters* 478, 295-298, 2000.
- Küce, P., Coral, G., Kantar, Ç., Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene (DNT) by *Arthrobacter* sp. K1 isolated from a crude oil contaminated soil. *Annals of Microbiology* 65, 467-476, 2015.



- Levsen, K., Musmann, E., Berger-Preiss, E., Preiss, A., Volmer, D., Wunsch, G., Analysis of nitroaromatics and nitramines in ammunition waste water and in aqueous samples form from ammunition plants and other military sites. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 21, 153-156, 1993.
- Lewis, T.A., Ederer, M.M., Crawford, R.L., Crawford, D.L., Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18, 89-96, 1997.
- Lewis, T.A., Newcombe, D.A., Crawford, R.L., Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* 70, 291-307, 2004.
- Lin, H., Yu, C., Chen, Z., Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoide*. *Ecological Engineering* 52, 270-277, 2013.
- Litake, G.M., Joshi, S.G., Ghole, V.S., TNT biotransformation potential of the clinical isolate of *Salmonella typhimurium*-potential ecological implications, *Indian Journal of Occupational & Environmental Medicine* 9, 29-34, 2005.
- Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T., Temperature effect on aerobic biodegradation of feces using sawdust as a matrix. *Water Research* 38, 2406-2416, 2004.
- Maeda, T., Kadokami, K., Ogawa, H.I., 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 (1), 33-39, 2006.
- N. Maleki, Treatment and Biodegradation of High Explosives A Literature Review. Doctor of Philosophy Thesis in University of California, Los Angeles, 1994.
- Martin, J.L., Comfort, S.D., Shea, P.J., Kokjohn, T. A., Drijber, R.A., Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 447-455, 1997.

- McCormick, N.G., Feeherry, F.E., Levinson, H.S., Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 949-958, 1976.
- McFarlan, S., Yao, G., Anaerobic trinitrotoluene pathway map, University of Minnesota. 2011. [http://umbbd.msi.umn.edu/tnt2/tnt2\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/tnt2/tnt2_map.html) (Erişim Tarihi: 25.10.2015).
- H.A. Mercimek, 2,4,6-trinitrotoluen'in Mikrobiyal Biyodegradasyonu. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2011.
- Mercimek, H.A., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., Matyar, F., Aerobic biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* isolated from contaminated soil. *Microbial Ecology* 66, 512-521, 2013.
- Mercimek, H.A., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., Matyar, F., Arkut, A., Kayis, F., Sumengen Ozdefne, M., Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 104-111, 2015.
- Mohan, S.V., Shailaja, S., Krishna, M.R., Reddy, K.B., Sarma, P.N., Bioslurry phase degradation of diethylphthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process Biochemistry* 41(3), 644-652, 2006.
- Montpas, S., Samson, J., Langlois, E., Lei, J., Piche, Y., Chevenert, R., Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. *Biotechnology Letters* 19, 291-294, 1997.
- Muter, O., Potapova, K., Limane, B., Spröge, K., Jakobson, I., Cepurnieks, G., Bartkevics, V., The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. *Journal of Environmental Management* 98, 51-55, 2012.
- Naumova, R.P., Selivanovskaya, S.L.U., Mingatina, F.A., Possibilities for the deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. *Mikrobiologia* 57, 218-222, 1988.

- Nyanhongo, G.S., Aichernig, N., Ortner, M., Steiner, W., Guebitz, G.M., Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials* 165, 285-290, 2009.
- Oh, B., Shea, P.J., Drijber, R.A., Vasilyeva, G.K., Sarath, G., TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *USDA Agricultural Research Service* 14, 309-319, 2003.
- Oh, B.T., Sarah, G., Shea, P.J., Drijber, R.A., Comfort, S.D., Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a *Pseudomonas* enzyme assay. *Journal of Microbiological Methods* 42, 149-158, 2000.
- Oh, K.H., Kim, Y.J., 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, 1998.
- Oliveira, I.M., Bonatto, D., Pegas Henriques, J.A., Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. In the Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 1008-1019. Ed: by A. Méndez-Vilas. FORMATEX, Press, Badajoz, Spain, 2010.
- Oxley, J. C., The chemistry of explosives. In the Explosive effects and applications. 137-172. Ed: by J.A. Zukasand and W. Walters. Springer, Berlin, Germany, 2002.
- Özcan, G., Türkdoğan, F.İ., Askeri Alanlardaki Kirliliklerin Gideriminde Biyoremediasyon Teknikleri. *KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 31-36, 2014.
- Pak, J.W., Knoke, K.L., Noguera, D.R., Fox, B.G., Chambliss, G.H., Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4742-4750, 2000.

- Panz, K., Miksch, K., Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. *Journal of Environmental Management* 113, 85-92, 2012.
- Park, C., Kim, T.H., Kim, S., Optimization of biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Biengineering* 95, 567-571, 2003.
- Park, C., Kim, T-H., Kim, S., Lee, J., Kim, S-W., Biokinetic Parameter Estimation for Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) with *Pseudomonas putida* KP-T201. *Journal of Bioscience and Biengineering* 94 (1), 57-61, 2002.
- Preuss, A., Fimpel, J., Dickert, G., Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Archives of Microbiology* 159, 345-353, 1993.
- Qasim, M.M., Moore, B., Taylor, L., Honea, P., Gorb, L., Leszczynski, J., Structural Characteristics and Reactivity Relationships of Nitroaromatic and Nitramine Explosives-A Review of Our Computational Chemistry and Spectroscopic Research, *International Journal of Molecular Sciences* 8, 1234-1264, 2007.
- Rahal, A.Gh., Moussa, L.A., Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(2), 8-17, 2011.
- Rodgers, J.D., Bunce, N.J., Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Research* 35, 2101-11, 2001.
- Rodgers, J.D., Jedral, W., Bunce N.J., Electrochemical treatment of wastewater: a study of the reduction of DNT and oxidation of chlorinated phenols. *AWMA 92nd Annual Meeting, Proceedings (CD-ROM)*, St. Louis, Missouri, Session, Abs. No. 875, 1999.
- Rylott, E.L., Lorenz, A., Bruce, N.C., Biodegradation and biotransformation of explosive. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 434-440, 2011.
- Sangwan, P, Mary Celin, S., Hooda, L., Response Surface Methodological Approach for Optimizing Process Variables for Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene

- using *Acinetobacter noscomialis*. European Journal of Advances in Engineering and Technology 2 (4), 51-56, 2015.
- Schackmann, A., Müller, R., Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 34, 809-813, 1991.
- H.M. Seth-Smith, Microbial Degredation of RDX. Doctor of Philosophy Thesis, University of Cambridge, England, 1-139, 2002.
- Shim, C.Y., Crawford, D.L., Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by a strain of *Clostridium bifermentans*. In Bioaugmentation for site remediation. 57-69. Ed: by R.E. Hinchee, J. Fredrickson and B.C. Alleman. Battelle Press, Columbus, Ohio, 1995.
- Shin, J.H., Song, H.G., Nitroreductase II involved in 2,4,6-trinitrotoluene degradation: purification and characterization from *Klebsiella* sp. C1. The Journal of Microbiology 47, 536-541, 2009.
- Singh, S.N., Biological Remediation of Explosive Residues. Environmental Science and Engineering, 15, 15-38, 2014.
- Spain, J., Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annual Review of Microbiology 49, 523-555, 1995.
- Stenuit, B.A., Agathos, S.N., Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa?. Applied Microbiology and Biotechnology 88, 1043-1064, 2010.
- Stenuit, B.A., Agathos, S.N., Rapid and unbiased colorimetric quantification of nitrite and ammonium ions released from 2,4,6-trinitrotoluene during biodegradation studies: Eliminating interferences. International Biodeterioration & Biodegradation 63, 116-122, 2009.
- Traxler, R.W., Wood, E., Delaney, J.M., Bacterial degradation of alpha-TNT. Developments in Industrial Microbiology 1, 71-76, 1974.

- A. Üzer, Bazı Nitrofenollerin Temel ve Türev Spektrofotometrik Analizi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2004.
- Üzer, A., Erçağ, E., Apak, R., Selective colorimetric determination of TNT partitioned between an alkaline solution and a strongly basic Dowex 1-X8 anion exchanger. *Forensic Science International* 174, 239-243, 2008.
- Vanderberg, L.A., Perry, J.J., Unkefer, P.J., Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 937-945, 1995.
- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Knackmuss, H.J., Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *Journal of Bacteriology* 176, 932-934, 1994.
- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J.C., Knackmuss, H.J., Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 246-252, 1998.
- Widrig, D.L., Boopathy, R., Manning, J.F., Bioremediation of TNT contaminated soil: A laboratory study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1141-1148, 1997.
- Williams, R.E., Rathbone, D.A., Scrutton, N.S., Bruce, N.C., Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (6), 3566-3574, 2004.
- Williams, R.T., Ziegenfuss, P.S., Sisk, W.E., Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 9, 137-144, 1992.
- Wittich, R.M., Ramos, J.L., van Dillewijn, P., Microorganisms and explosives: mechanisms of nitrogen release from TNT for use as an N-source for growth. *Environmental Science & Technology* 43, 2773-2776, 2009.

Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D., Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55, 9-15, 2005.

Yinon, J., *Toxicity and Metabolism of Explosives*. CRC Press, Florida, 1990.

Zhu, B., Peng, R.H., Fu, X.Y., Jin, X.F., Zhao, W., Xu, J., Han, H.J., Gao, J.J., Xu, Z.S., Bian, L., Yao, Q.H. Enhanced transformation of TNT by *Arabidopsis* plants expressing an old yellow enzyme. *Plos One* 7, e39861, 2012.

