

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN NEHİR SULARINDA SDS DEGRADE EDEN
SUŞLARIN BELİRLENMESİ VE TANIMLANMASI

SALİH BATUHAN SALIK

MAYIS 2015

Biyoloji Anabilim Dalında Salih Batuhan SALIK tarafından hazırlanan DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN NEHİR SULARINDA SDS DEGRADE EDEN SUŞLARIN BELİRLENMESİ VE TANIMLANMASI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sema ÇETİN

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye (Eş danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Üye : Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ümit YIRTICI

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

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

(Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN NEHİR SULARINDA SDS DEGRADE EDEN SUŞLARIN BELİRLENMESİ VE TANIMLANMASI

SALIK, Salih Batuhan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2015, 113 sayfa

Çevre kirliliğinde önemli rol oynayan sentetik deterjanlardan biyolojik olarak parçalanmaya maruz kalmayanlavevsel ve endüstriyel atık sular aracılığı ile sulu ortamlara karışarak birikmektedir. Böylece suların doğal dengesini bozup suda yaşayan canlılarınve onlarla beslenen insanların sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle, özellikle endüstriyel olarak yaygın kullanıma sahip olan sentetik anyonik deterjanlardan sodyum dodesil sülfatın (SDS) biyodegradasyonuna yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan bu çalışmada ilk olarak Kırıkkale-Kızılırmak anyonik deterjan kirliliği açısından incelenmiş ve kirlilik gösteren oniki bölge belirlenmiştir. İkinci olarak, bu oniki bölge içerisinde seçilen üç bölge olan Akkoşan Merkez, Sulubük Kıyıbağı ve Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii'nden su örnekleri alınarak SDS degrade eden bakteriler izole edilmiş, 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar ile suşlarda SDS degradasyonundan sorumlu olan *sdsA* gen analizi ve bu geninin ürünü olan alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen dört suş arasında *Pseudomonas koreensis* SDS4 olarak tanımlanan lokal suşun saf kültür ortamında ve deterjan sanayi atık suyunda % 82 - 91 oranlarında SDS degradasyonu yaptığı, alkil sülfataz

enzimi aktivitesinin ise 2.52 U/mg olduğu ve SDS uzaklaştırma çalışmaları için yüksek potansiyel oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SDS biyodegradasyonu, *sdsA*, alkil sülfataz, deterjan kirliliği, nehir suları

ABSTRACT

DETECTION AND IDENTIFICATION OF SDS DEGRADING STRAINS IN DETERGENT-CONTAMINATED RIVER WATER

SALIK, Salih Batuhan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent İÇGEN

May 2015, 113 pages

Synthetic detergents escaping from biological degradation accumulate in domestic and industrial wastewaters and threat aquatic environment and human health. Therefore, studies on the biodegradation of sodium dodecyl sulfate (SDS) which is one of the widely used anionic detergents, are of great importance. Thus, this study aimed at the assessment of Kırıkkale-Kızılırmak river interms of anionic detergent pollution and isolation of potential SDS-degrading isolates from the detergent-polluted locations. Out of twelve polluted locations revealed, only three of them, Akkoşan, Sulubük and Aşağıyazı locations, were chosen for sampling to isolate SDS-degrading isolates. The selected isolates were identified by using 16S rDNA sequencing and further characterized in terms of catabolic *sdsA* gene, alkylsulfatase enzyme activity and SDS degradation abilities. Out of four isolates one isolate, namely *Pseudomonas koreensis* SDS4, was found to degrade SDS in between 82-91% in both pure culture and detergent industry wastewater environments with an enzyme activity of 2.52 U/mg. The results pointed *Pseudomonas koreensis* SDS4 out as a potential isolate for the removal of SDS from the contaminated surface waters.

Key words: SDS biodegradation, *sdsA*, alkylsulfatase, detergent pollution, riverwaters

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi çalışmalarında bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez danışmanım Prof. Dr. Aysun ERGENE ve tez eş danışmanım Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren çalışmalarım boyunca hep beraber olduğumuz, tüm maneviyatı ile yanımda olan Dr. Fadime YILMAZ, Hüseyin ULUSOY, ODTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü İçgen Team çalışanlarına ve üniversite hayatım boyunca çalışmalarında yanımda olan ve yardımlarını eksik etmeyen Lale GÖKSU'ya teşekkür ederim.

Bugüne kadar beni maddi manevi destekleyen babam Yavuz SALIK, annem Ayten SALIK 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özetleri.....	2
1.1.2. Deterjanın Tanımı.....	2
1.1.2.1. Yüzey Aktif Maddeler	3
1.1.2.1.1. Anyonik Deterjanlar.....	6
1.1.2.1.1.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	7
1.1.2.1.1.2. Alkil Benzen Sülfonatlar	7
1.1.2.1.1.3. Alkil Eter Sülfat (Yağ Alkolü Eter Sülfatı).....	8
1.1.2.1.1.4. Alkil Sülfat (Yağ Alkolü Sülfatı).....	8
1.1.2.1.2. Katyonik Deterjanlar.....	8
1.1.2.1.3. Noniyonik Deterjanlar.....	9
1.1.2.1.4. Amfoterik Deterjanlar	10
1.1.2.2. Yapısal Maddeler.....	11
1.1.2.2.1. Alkaliler.....	11
1.1.2.2.2. Kompleks Yapıcılar	11
1.1.2.2.3. İyon Değişiriciler	12
1.1.2.3. Ağartıcılar (Beyazlatıcılar).....	12
1.1.2.4. Diğer Yardımcı Maddeler	12
1.1.2.4.1. Enzimler	12
1.1.2.4.2. Antiredepozitan Maddeler	13
1.1.2.4.3. Köpük Stabilizatörleri ve Regülatörleri	13

1.1.2.4.4. Optik Beyazlatıcılar	13
1.1.2.4.5. Korozyon İnhibitörleri.....	13
1.1.2.4.6. Parfümler	13
1.1.2.4.7. Boyalar	14
1.1.2.4.8. Dolgu Maddeleri	14
1.1.3. Deterjan Kirliliği	14
1.1.3.1. Deterjanların Boşaltıldıkları Alıcı Sulara Başlıca Etkileri.....	15
1.1.3.2. Deterjanlardan Kaynaklı Fosfatın Etkisi.....	16
1.1.4. Atık Sulara Deterjan Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılan Yöntemler	17
1.1.4.1. Fiziksel Arıtım.....	17
1.1.4.2. Kimyasal Arıtma.....	18
1.1.4.3. Biyolojik Arıtım	20
1.1.4.3.1. Deterjanların Biyodegradasyonu	20
1.1.5. Deterjan Degrade Eden Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler	24
1.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Temel Prensipleri.....	25
1.1.5.1.1. PZR Primerlerinin Tasarımı	28
1.1.5.2. 16S rDNA Dizi Analizi.....	31
1.1.5.3. Filogenetik Ağacın Oluşturulması ve Filogenetik Analiz.....	33
1.2. Çalışmanın Amacı	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM	37
2.1. Materyal.....	37
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	37
2.1.1.1. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyerinin Hazırlanışı	37
2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı	37
2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı.....	37
2.1.1.4. Deterjan Sanayi Atık Su Örneklerinin Toplanması.....	38
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	38
2.1.2.1. Deterjan Stok Çözeltisinin Hazırlanışı.....	38
2.1.2.1.1. SDS Çözeltisinin Hazırlanışı	38
2.1.2.1.2. Deterjan Standart Çözeltisinin Hazırlanışı	38
2.1.2.2. NaCl Çözeltisi (5 M, 100 mL).....	39

2.1.2.3. Metilen Mavisi Stok Çözeltisinin Hazırlanışı (5 mL)	39
2.1.2.4. % 70'lik Etanol (100 mL)	39
2.1.2.5. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL)	39
2.1.2.6. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlanışı.....	39
2.1.3. DNA İzolasyon Kitinde Kullanılan Kimyasallar	39
2.1.4. Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler	40
2.1.5. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	40
2.1.5.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , 1000 mL)	40
2.1.5.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL).....	40
2.1.6. Native - PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	41
2.1.7. Native - PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	41
2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12)	42
2.1.9. Dengeleyici Jelin Bileşimi (% 4).....	43
2.1.10. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	43
2.2. Yöntem	43
2.2.1. Çalışma Alanı ve Su Örneklerinin Toplanması.....	43
2.2.2. Su Öneklerinde Deterjan Analizi	45
2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu.....	46
2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen SDS Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	46
2.2.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	46
2.2.6. Bakterilerin Deterjan Sanayi Atık Suyundaki Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	47
2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı (CFU)	47
2.2.8. SDS Degradasyon Oranlarının Belirlenmesi	47
2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini	48
2.2.10. PZR ve Optimizasyonu	48
2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması	49
2.2.12. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizlerin Yapılması.....	49
2.2.13. Primer Tasarımları ve <i>sdsA</i> Geni Analizlerinin Yapılması	50
2.2.13.1. <i>sdsA</i> Geni için Primer Tasarımlarının Yapılması.....	50
2.2.13.2. <i>sdsA</i> Geni Analizlerinin Yapılması	50

2.2.14. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektroforezi.....	50
2.2.15. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonu.....	51
2.2.16. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	51
2.2.17. Alkil Sülfataz Enzimi Protein Native - PAGE Analizi.....	52
2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması.....	52
2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması.....	52
2.2.17.3. Native - PAGE Jellerinin Boyanması	52
2.2.17.4. Zimografi Analizlerinin Yapılması.....	53
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
3.1. Kırıkkale-Kızılırmak Suyu Deterjan Analizi.....	54
3.2. Deterjan Kirliliği Gösteren Sulardan SDS degrade Eden Bakterilerin İzole Edilmesi	55
3.3. Bakterilerin Laboratuvar Besi Ortamında ve Deterjan Sanayisi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi	55
3.3.1. Deterjan Sanayi Atık Suyunda Kendiliğinden Olan SDS Degradasyonu.....	55
3.3.2. SDS4 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	56
3.3.2.1. SDS4 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	56
3.3.2.2. SDS4 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	57
3.3.3. SDS7 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	57
3.3.3.1. SDS7 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	57
3.3.3.2. SDS7 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	58
3.3.4. SDS10-2 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	59
3.3.4.1. SDS10-2 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	59
3.3.4.2. SDS10-2 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	60
3.3.5. SDS10-3 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	61

3.3.5.1. SDS10-3 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	61
3.3.5.2. SDS10-3 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	62
3.4. SDS4 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması	63
3.4.1. SDS4 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	64
3.5. SDS7 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi	66
3.5.1. SDS7 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	68
3.6. SDS10-2 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi.....	70
3.6.1. SDS10-2 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	71
3.7. SDS10-3 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi.....	73
3.7.1. SDS10-3 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	75
3.8. <i>sdsA</i> Geni Analizlerinin Yapılması.....	77
3.8.1. <i>sdsA</i> Geni için Primer Tasarımı	78
3.8.2. <i>sdsA</i> Gen Analizleri.....	85
3.8.2.1. <i>P. koreensis</i> SDS4 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	85
3.8.2.2. <i>A. veronii</i> SDS7 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi	86
3.8.2.3. <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi	88
3.8.2.4. <i>P. corrugata</i> SDS10-3 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	89
3.9. SDS Degrade Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri.....	91
3.9.1. Alkil Sülfataz Enzim Protein Profillerinin Belirlenmesi	91
3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografi Analizlerinin Yapılması.....	92
3.10. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	94
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	99
KAYNAKLAR.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Farklı yüzeyleri bir araya getirme özelliğindeki yüzey aktif maddeler .	4
1.2. Mikroemülsiyonlar oluşturan sürfektanlar	4
1.3. Sabun miseli	5
1.4. Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması	6
1.5. SDS	7
1.6. Lineer alkil benzen sülfonik asit	8
1.7. Trimetil heksadesilamonyum klorür	9
1.8. Pentaeritritil palmitat	10
1.9. Endonezya Citarum Irmağı deterjan kirliliği	15
1.10. Fosfatın çevreye etkisi	17
1.11. Flotasyon işlemi	18
1.12. Koagülasyon işlemi	19
1.13. Flokulasyon işlemi	20
1.14. Alkil sülfataz proteini üç boyutlu yapısı .	22
1.15. SDS degradasyon mekanizması	23
1.16. PZR amplifikasyon basamakları	27
1.17. Forward 5'- 3' ve Reverse 5'- 3' primerleri	31
1.18. 16S rDNA sekans analiz yöntemi	33
2.1. Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık suyu örnekleri	38
2.2. Kızılırmak	44
2.3. Su örneği alınan istasyonların Google Earth görüntüsü	45
3.1. Kırıkkale-Kızılırmak suyu deterjan analizi	54
3.2. Deterjan sanayisi atık suyunda kendiliğinden olan SDS degradasyonu	56
3.3. SDS4 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi	56
3.4. SDS4 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	57

3.5. SDS7 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	58
3.6. SDS7 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	59
3.7. SDS10-2 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	60
3.8. SDS10-2 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı,	61
3.9. SDS10-3 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi	62
3.10. SDS10-2 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı,	63
3.11. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS4 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	63
3.12. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS4 suşuna ait PZR ürünleri.....	64
3.13. SDS4 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	66
3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS7 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	67
3.15. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS7 suşuna ait PZR ürünleri.....	67
3.16. SDS7 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	68
3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-2 kodlu suşa ait PZR ürünleri	70
3.18. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS10-2 suşuna ait PZR ürünleri; M	71
3.19. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	73
3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-3 kodlu suşa ait PZR ürünleri	74
3.21. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS10-3 suşuna ait PZR ürünleri	74
3.22. SDS10-3 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	75
3.23. Farklı iki primer (1977 ve 672 bp) kullanılarak yapılan <i>sdsA</i> gen analizleri; 1977 bp ve 672 bp.....	77
3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması	82

3.25. Primer tasarımında kullanılan aşamaların ekran görüntüsü	83
3.26. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. koreensis</i> SDS4 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	85
3.27. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. koreensis</i> SDS4 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	86
3.28. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>A. veronii</i> SDS7 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	87
3.29. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>A. veronii</i> SDS7 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	87
3.30. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	88
3.31. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	89
3.32. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. corrugata</i> SDS10-3 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	90
3.33. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. corrugata</i> SDS10-3 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	90
3.34. SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz enzimi protein lokasyonunun belirlenmesi.....	91
3.35. Alkil sülfataz enzim proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	92
3.36. SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimlerinin aktif ve inaktif formları	93
3.37. SDS degrade eden suşların değişen pH ve sıcaklıklardaki enzim aktivitesi	94
3.38. Ekstrakt haldeki alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri.....	40
2.2. Native - PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı	41
2.3. Native - PAGE solüsyonlarının hazırlanışı	42
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması	42
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	43
2.6. Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları.....	44
3.1. SDS degrade eden bakteriler için belirlenen MTK değerleri	55
3.2. SDS4 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	65
3.3. SDS7 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerler	69
3.4. SDS10-2 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	72
3.5. SDS10-3 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	76
3.6. Kullanılan primerler ve özellikleri.....	84
3.7. Çalışmada elde edilen SDS degrade eden bakteriler ve özellikleri	96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}^+$	Sodyum dodesil sülfat
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3\text{Na}^+$	Sodyum p-dodesilbensülfonat
Ca	Kalsiyum
Na	Sodyum
Mg	Magnezyum
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	Alüminyum (III) sülfat
AlCl_3	Alüminyumklorür
$\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_3$	Demir (III) sülfat
FeCl_3	Demirklorür
CaO	Kalsiyumoksit
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Kalsiyumhidroksit
MgCl_2	Magnezyumklorür
KH_2PO_4	Monopotasyumfosfat
K_2HPO_4	Dipotasyumfosfat
NH_4Cl	Amonyumklorür
NaCl	Sodyumklorür
Na_2SO_4	Sodyumsülfat
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezyumklorürheksahidrat

KISALTMALAR DİZİNİ

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DDB	Dodesil Benzen
ABS	Alkil Benzen Sülfonat
LAS	Lineer Alkil Sülfonat
LAB	Lineer Alkil Benzen
CMC	Karboksi Metil Selüloz
TPBS	Tetrapropilen Benzen Sülfanat
PZR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
MSM	Mineral Salt Medium
NB	Nutrient Broth

1. GİRİŞ

Günümüzde nüfus artışı ve ilerleyen teknolojik gelişmelere paralel olarak çevre kirliliği de ciddi boyutlara varmıştır. Ekosistemimize ve doğal kaynaklarımıza yabancı karakterde olan yüzlerce kimyasal madde insanoğlu tarafından üretilmekte, kullanılmakta ve böylece doğal denge bozularak çevre yıkımına neden olmaktadır. Biyosferde hava, su ve toprak karşılıklı olarak etkileşim halinde olduklarından bunlardan birinde meydana gelen kirlenme diğere de iletilmektedir. Dünyada ve ülkemizde kullanılan kimyasalların başında yüzey aktif maddeler gelmekte, bu maddeler temizlik alanında oldukça başarılı sonuç vermesinin yanı sıra kullanım ürünlerinin çeşitli yollarla alıcı ortamlara karışması sonucu kirlenmeye neden oldukları bilinmektedir. Bu alıcı ortamlardan özellikle su kirliliği toplum sağlığı açısından oldukça fazla önem arz etmektedir [1].

Su kirliliği oluşturan kirleticiler arasında deterjanlar da yer almaktadır. Deterjanların boşaltıldıkları alıcı sulara etkileri, köpük oluşturma, biyolojik ayrışma sonucu oksijen tüketimi, sudaki canlılar üzerine olumsuz etkileri, ötrofikasyon ve içme sularına etkileri şeklinde özetlenebilir. Deterjan kirliliği, sulardaki biyolojik aktiviteyi etkilemesi açısından önemlidir. Deterjan aktif maddeleri alıcı sularda su özelliklerine bağlı olarak 0.5 mg/L'den yüksek derişimlerde köpük oluştururlar. Oluşan köpükler su yüzeyini kaplayarak havalandırmaya ve oksijen alışverişine engel olabilir. Deterjan aktif maddesi boşaltıldıkları alıcı sularda biyokimyasal reaksiyonlarla ayrışırlar ve bu ayrışma sırasında ortamdaki çözünmüş oksijeni kullanırlar, bu da ani oksijen eksikliğine neden olabilir. Organik ve/veya endüstriyel kirlenmeden kaynaklanan fosfatın alıcı sulara başlıca etkisi ötrofikasyona neden olmalarıdır. Böyle bir ortamda oksijenin azalması, renk değışimi, bulanıklılık, dipte aşırı birikimler, canlı türü sayısında azalma, bozunma ve kokuşma gözlenmekte ve ortam giderek kullanılamaz hale gelmektedir [2].

Deterjan aktif maddesi ile kirlenmiş su sistemlerinin arıtılmasında kullanılan kimyasal ve biyolojik metotlar mevcuttur. Biyolojik metotlar kimyasal metotlara göre daha çevreye uyumlu özelliklere sahiptir. Biyolojik arıtım metotları arasında

özel bakteri suşlarının kimyasal atıkların yıkımı amacıyla kullanımı endüstriyel ve evsel atık sularının arıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak birçok bakteri türü zorlu çevresel koşullara karşı dayanıklı olamamakta ve istenilen atığa yönelik bir arıtım sağlayamamaktadır. Zorlu çevre koşullarına daha dayanıklı ve biyodegradasyon amacıyla kullanılabilir daha iyi ve daha güçlü bakterilerin bulunması ve izole edilmesi olası bir stratejidir. Uygun çevresel ve fiziksel koşullar sağlandığında bu yöntem atık suların arıtımında başarı sağlayabilmektedir [3].

Kırıkkale, Orta Anadolu Bölgesi'nde Kızılırmak'ın yakınında yeni kurulmuş hızla sanayi ve yerleşim yeri merkezi haline gelmekte olan bir ilimizdir. Kızılırmak, çevresindeki sanayi kuruluşlarının ve şehrin yerel atıklarındaki deterjanlardan etkilenmektedir [4]. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında Kırıkkale-Kızılırmak nehri deterjan kirliliği açısından incelenmiş, deterjan kirliliği gösteren bölgelerden alınan su örneklerinden deterjan degrade eden suşlar izole edilmiş ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

1.1. Literatür Özetleri

1.1.2. Deterjanın Tanımı

Deterjan terimi, “temizlemek” veya “tasfiye etmek” anlamına gelen “deterge” kelimesinden türemiştir [5]. Deterjan, genel temizleme işlerinde kullanılan ve içersinde esas temizleyici olarak kullanılan alkil sülfat veya alkil aril sülfonat tipindeki anyonik yüzey aktif maddeler ve temizleme işlemine yardımcı diğer maddeler bulunan toz, granül, yumuşak kıvamlı veya sıvı haldeki karışımlara denir [6].

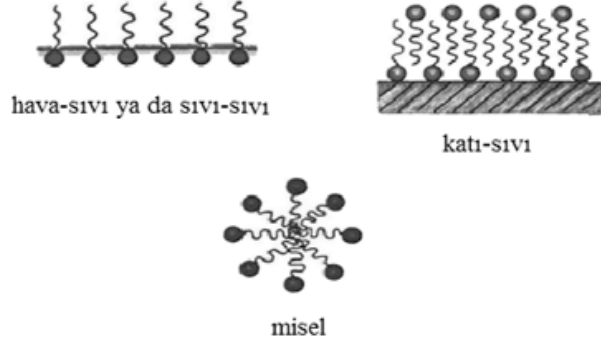
Larson, deterjanı, “suda çözünen, yüzey gerilimini azaltarak sulu çözeltilerin kapiler içine girmesini sağlayan (ıslatma etkisi), agglomera (yığın) teşkil eden partikülleri suya başka maddelerden daha iyi bağlayan (emülsiyon etkisi) bir maddedir” şeklinde tanımlamıştır [5]. Deterjan kompozisyonunu oluşturan maddeler, yüzey aktif maddeler, yapısal maddeler, ağartıcılar (beyazlatıcılar) ve diğer yardımcı maddeler olarak dört bölümde incelenir [7].

Deterjanların üç önemli fonksiyonu vardır:

- Suyun yüzey gerilimini düşürerek, ıslanma sağlama özelliği,
- Kiri yüzeyden koparma (emülsiyete etme) özelliği,
- Kirin su içinde dağılmasını sağlama (disperse etme) özelliği [8].

1.1.2.1. Yüzey Aktif Maddeler

Yüzey aktif maddeler belli bir yüzey aktivitesine sahip olduklarından suda çözüldüklerinde düşük konsantrasyonlarda bile olsalar içerisinde çözüldükleri çözücülerin yüzey enerjisini ani olarak ve büyük ölçüde değiştirirler (çoğunlukla düşürürler). Çözücü sıvının yüzey veya ara yüzey özelliğini belirgin bir şekilde değiştirirler. Yüzey aktif maddelerinin yüzey aktiviteleri, çeşitli yüzey özelliklerinin (yüzey gerilimi vb.) ölçülmesiyle belirgin hale getirilebilir [9]. Yüzey aktif maddelerle diğer çözünmüş maddeler arasındaki fark, yüzey aktif maddelerin farklı bir koloidal çözelti tipi oluşturmasıdır. Seyreltik çözeltileri normal elektrolitler gibi davranırken, belli konsantrasyon değerinin üzerinde fiziksel özelliklerinde (osmotik basınç, bulanıklık, yüzey gerilimi) ani değişim ve sapmalar gösterirler. Bu farklı davranışlar yüzey aktif madde moleküllerinin ve iyonlarının çözeltide yumaklaşma veya misel oluşmasıyla açıklanabilir [9] (Şekil 1.1). Yüzey aktif maddelerin çözücü içindeki konsantrasyonları belirli bir miktar aştığında, molekül veya iyon gruplarından veya agregatlarından oluşan miselleri oluştururlar. Misellerin şekli, misel içindeki moleküllerin dağılımı ve bir veya daha fazla misel tipinin olup olmadığı bir sonuca bağlanamamıştır. Misellerin moleküllerden oluşmasının tersinir bir reaksiyon olduğu kabul edilmiştir. Çözeltinin koloidal özellikler taşıması misellerin büyüklüğü ile ilgilidir. Yüzey aktif maddenin iyonize olduğu durumda misel özel bir yüke sahiptir ve çözelti iyi bir iletkenidir. İyonize olan yüzey aktif maddeler koloidal elektrolit olarak kullanılabilir [9] (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Farklı yüzeyleri bir araya getirme özelliğindeki yüzey aktif maddeler [10]

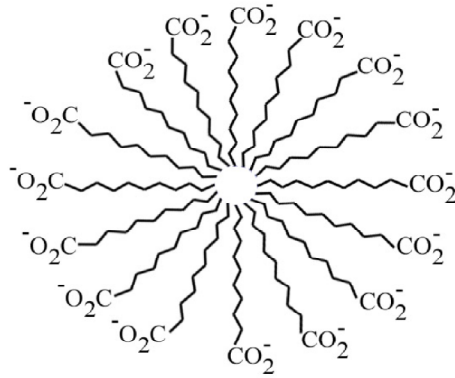
Suda ve diğer polar çözücülerde, yüzey aktif maddeler çözeltinin serbest enerjisini düşürmek için birleşirler. Bu süreç sulu fazla yüzey aktif maddenin hidrofobik fazını ayıran bir ara yüzey oluşumunu içerir. Bu hidrofobik kısımlar sulu çözücüden hidrofilik gruplarla ayrılan bir yağ nano damlası oluştururlar [9].



Şekil 1.2. Mikroemülsiyonlar oluşturan sürfektanlar [10]

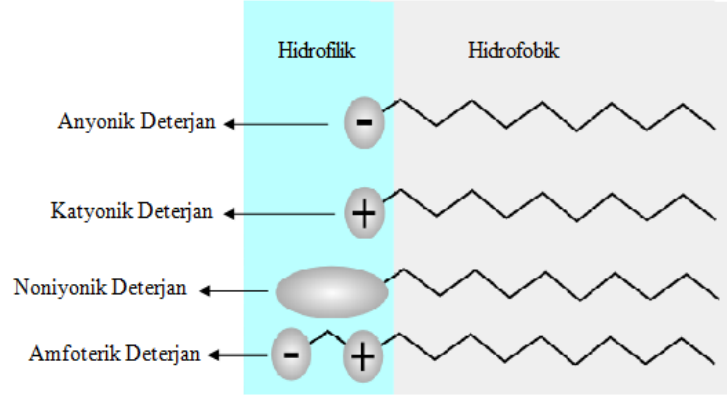
Yüzey aktif madde moleküllerinin başlıca fiziksel özellikleri yüzey gerilimi, yüzey viskozitesi ve fazlar arasındaki elektriksel potansiyel farklarında ölçülebilen değişikliklerdir. Endüstriyel açıdan da önem taşıyan diğer özellikleri ise ıslatma, deterjan etkisi, yayılma ve dağılma, hidrotropi (çözündürme), emülsiyon oluşturma (sıvı-sıvı karışımı) ve köpüklenme olarak sıralanabilir [11].

Sabunlar bilinen en eski yüzey aktif maddelerdir ve yağ asitlerinin alkali metal (özellikle sodyum) tuzlarıdır. Yüzey aktif maddeler bünyelerinde daha çok 16 ve 18 karbonlu (C16 ve C18) tuzları ve az miktarda da daha küçük molekül ağırlıklı karboksilatları barındırırlar. Sabunun birkaç bin yıl önce Eski Mısırlı'lar tarafından bulunduğu sanılmaktadır. Sabun 18. yüzyıla kadar tüm dünyada her alanda yaygın olarak kullanıla gelmiştir. Sabun, genelde yüzyıllar öncesinden beri kullanılmakta olan eritilmiş iç yağı yada diğer yağların sodyum hidroksit ile ısıtılması yöntemiyle elde edilmektedir [11]. Bir sabun molekülü, uzun bir hidrokarbon kuyruk (zincir) ve iyonik bir kutuba sahiptir. Molekülün hidrokarbon kısmı hidrofobik (suyu sevmeyen) olup, apolar maddelerde çözünür. İyonik uç ise hidrofiliktir (suyu seven) ve suda çözünür. Sabun molekülü barındırdığı hidrokarbon zinciri nedeniyle suda tam olarak çözünmez. Ancak suda miseller oluşturarak kolayca süspanse hale geçer. Misel, 5 ile 150 sabun molekülünün hidrokarbon kısmının bir araya geldiği ve iyonik ucun suya yöneldiği kümelerdir [11] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Sabun miseli [11]

İkinci dünya savaşından sonra ise sentetik deterjanlar geliştirilmiştir. Deterjanlar uzun zincirli sülfonat veya sülfatların sodyum tuzlarıdır. ($\text{RSO}_3^- \text{Na}^+$ veya $\text{ROSO}_3^- \text{Na}^+$). Bunlara örnek olarak Sodyum dodesilsülfat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$) ve Sodyum p-dodesilbensensülfonat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_3^- \text{Na}^+$) verilebilir [11].



Şekil 1.4. Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması [12]

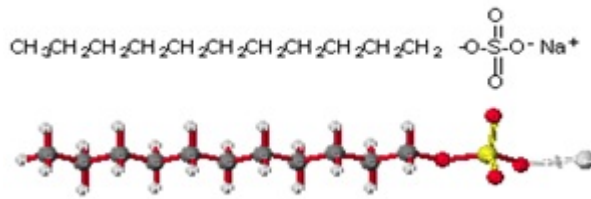
1.1.2.1.1. Anyonik Deterjanlar

En çok kullanılan ve evlerde tüketilen deterjanlar bu gruba aittir. Sulu çözeltilerde negatif yüklü bir grup veya anyon verirler (R-OSO-3 gibi). R hidrofobik hidrokarbon zinciridir. Pozitif yüklü iyon veya katyon genellikle sodyumdur [7]. Yağın hidrofobik zincirine negatif yüklü hidrofilik kısım bağlanmıştır. Deterjanların en büyük sınıfıdır ve 60 farklı grubu vardır. Bu maddeler;

- Sabunlar,
- Alkil benzen sülfonatlar
- İkincil alkan sülfonatlar
- Yağ alkolü sülfatları veya alkil sülfatlar
- Alfa sulfo yağ asidi metil esterleri
- Alkil eter sülfatlar
- Yağ esterleridir

1.1.2.1.1.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

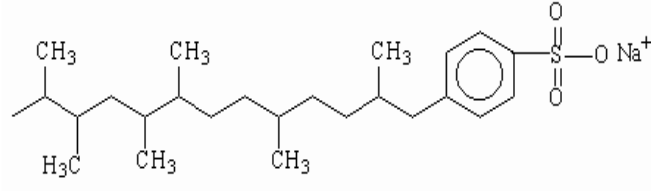
Sodyum dodesil sülfat (SDS), organik bir bileşik olup kimyasal olarak $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}$ formülü ile ifade edilir (Şekil 1.5). Anyonik deterjan çeşitlerinden bir tanesidir. Bu organik tuz organik sülfat ürünüdür. Sülfat grubuna bağlı 12C'lu kuyruğa sahiptir. Bu kuyruk deterjana gerekli amfibilik özellikleri verir. Son yıllarda deterjan sanayisinde temizlik ürünleri için kullanılan ortak ham maddedir [13].



Şekil.1.5. SDS [14]

1.1.2.1.1.2. Alkil Benzen Sülfonatlar

En yaygın şekilde kullanılmaktadır. Alkil benzen ve bunların sülfonatları ile ilgili olarak yapılan kısaltmalar DDB (dodesil benzen), ABS (alkil benzen sülfonat), LAS (lineer alkil sülfonat) ve LAB (lineer alkil benzen) şeklindedir (Şekil 1.6) LAB köpürme özelliği yüksek ve çözünürlüğü fazla olan bir yüzey aktif maddedir. Fakat suyun sertliğinden etkilenmektedir [7]. Yapıcı ile birlikte kullanıldığında çok iyi sonuçlar verir. LAB deterjan içinde LAB olarak kullanılmayıp LABSA (Lineer Alkil Benzen Sülfonik Asit) formuna dönüştürülerek kullanılmaktadır. Yani lineer alkil benzen sülfonik aside dönüştürülmektedir. LAB Türkiye'de üretilmemektedir. İthal edilip fabrikalardaki sülfonasyon ünitelerinde LABSA sekline dönüştürülmektedir [9].



Şekil 1.6. Lineer alkil benzen sülfonik asit [15]

1.1.2.1.1.3. Alkil Eter Sülfat (Yağ Alkolü Eter Sülfatı)

$R-CH_2-CH_2-O-(CH_2-CH_2-O)_n-SO_3Na^+$ Formülündeki alkil eter sülfatın R grubunda 10-12 arası C bulunmaktadır. n sayısı ise 1 ile 4 arasında değişmektedir. Su sertliğinden etkilenmez, yüksek çözünürlük gösterir. Sıvı formülasyonlarında düşük sıcaklıkta depolama kolaylığı vardır. Yün deterjanlarında, banyo köpüklerinde, şampuanlarda, bulaşık makinesi deterjanlarında kullanılır [9].

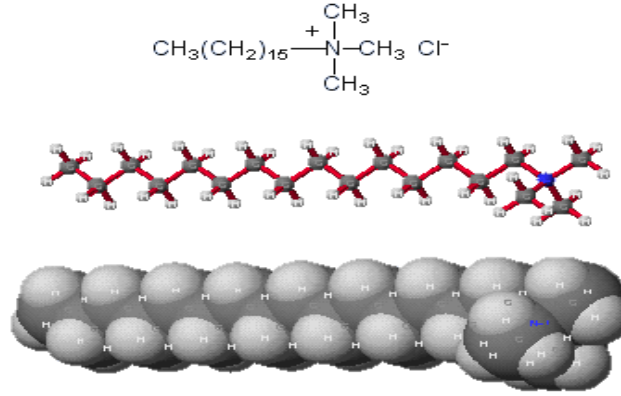
1.1.2.1.1.4. Alkil Sülfat (Yağ Alkolü Sülfatı)

$R-CH_2-CH_2-O-SO_3Na^+$ Formülündeki alkil sülfatın R grubunda 11-17 arası C bulunmaktadır. Hassas olmayan kumaşlarda kullanılır. Ağır iş deterjanı üretmek amacıyla kullanılır [7]. Anyonik yüzey aktif maddelerin fonksiyonel grubu genelde sülfat veya sülfonatları içerir ve hidrokarbon zinciri düz olduğunda tümüyle biyolojik olarak parçalanırlar [16].

1.1.2.1.2. Katyonik Deterjanlar

Organik bazların tuzlarıdır. İyonize oldukları zaman pozitif yüklü hidrofob amonyum veya piridinyuma ve negatif yüklü hidrofil gruba ayrılırlar. Bu tip deterjanların bakteri öldürücü özelliği vardır. Bu deterjanlar, yiyecek fabrikaları, restoranlar ve otellerdeki eşyaları, mutfak kaplarını yıkamada, ayrıca eczacılıkta kullanılmaktadır [7]. Yağın hidrofobik zincirine pozitif yüklü hidrofilik grup bağlanmıştır. Katyonik

yüzey aktiflerin en çok bilinenleri yumuşatıcı olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşikleri (Trimetil heksadesilamonyum klorür) ile dezenfektan ve antistatik ajan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşikleridir [9] (Şekil 1.7).



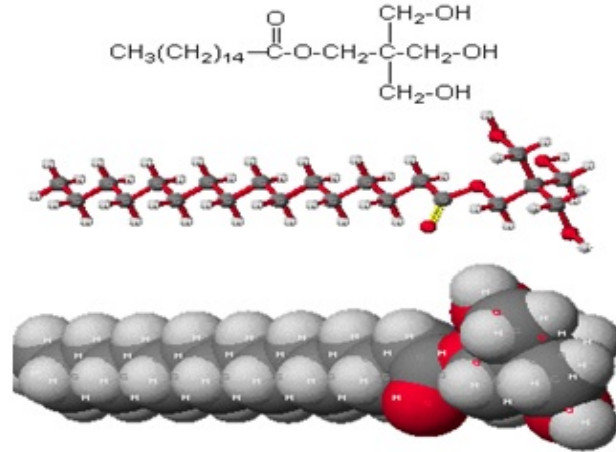
Şekil 1.7. Trimetil heksadesilamonyum klorür [14]

Katyonik deterjan bileşikleri sınıfı, en azından pozitif yüklü azot atomuna direkt veya indirekt bağlanmış bir hidrofobik grup (R) içerir. Hidrofobik grup ya uzun zincirli yağ asitlerinden ya da petrokimyasallardan elde edilen uzun zincirli alkollerden üretilir [5].

1.1.2.1.3. Noniyonik Deterjanlar

Hidrofobik zincire yüksüz bir hidrofilik zincir ya da grup bağlanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda bile çok iyi etki gösterirler. Sentetik liflerde kirin tekrar çökmesini önleyici özellikleri vardır. R grubu, yağ alkolleri, alkil fenoller ve oxo alkoller olmak üzere genel formülleri $\text{R-O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$ 'dır [7]. Noniyonik deterjanların kolloidal elektrolitler ve sulu çözeltilerinde iyonizasyonu oluşmaz. Kısmen hidrofobik ve kısmen hidrofilik kısımları diğer deterjanlara benzer. Hidrofilik kısımlar için hammaddeler başlıca hidroksi etil oksijeni veya eter oksijeni

bakımından zengindir [9]. Noniyonik deterjanların sulu çözeltilerinin derecesi, bu maddelerin tüm çözünürlüğünün bu hidrofilik zincirin hidrasyonunun genişlemesine bağlı olmasından dolayı etkilidir. Su molekülleri hidrojen bağı ile eter oksijenini bağlar [5]. Etilen oksit, propilen oksit, polialkilen glikoller, pentaeritritil palmitat dietanolamin, gliserol, sorbitol ve sükröz hidrofilik kısım için kullanılan hammaddelerdir. Başlıca yağlardan elde edilen hidrofobik kaynaklar uzun zincirli asitler, alkoller, amitler ve aminlerdir (Şekil 1.8). Noniyonik deterjanların, anyonik deterjanlar için kimyasal ara ürünler, emülsiyon oluşturucular, köpük arttırıcılar ve çok sayıda ilaç uygulamaları da vardır [9]. Özellikle modern sentetik kumaşlar ve düşük sıcaklıktaki etkisinden dolayı ağır amaçlı çamaşır makinelerinde iyonik deterjanların kullanımı daha önemlidir. Noniyonik deterjanlar sahip olduğu düşük kritik misel konsantrasyonlarında da epeyce düşük konsantrasyon kullanılmasına izin verir ve renk açma özelliklerinden dolayı tekstil sanayinde kullanılır [5].



Şekil 1.8. Pentaeritritil palmitat [14]

1.1.2.1.4. Amfoterik Deterjanlar

Hidrofobik yağ zincirine hem pozitif hem de negatif yüklü grup içeren hidrofilik grup bağlanmıştır. Örnek olarak alkil betain ve alkil sülfobetain verilebilir. Bu gruptaki yüzey aktif maddeler çok etkili, fakat çok pahalıdır [9]. Yapıları ve

üretimleri oldukça karışıktır. Bu tip maddeler deterjan hammaddesi olarak çok yaygın bir şekilde kullanılmakla birlikte, hem anyonik deterjanların hem de katyonik elyaf yumuşatıcıların özelliklerine sahip oldukları için ilginçtirler, asidik ortamda katyonik, bazik ortamda anyonik olarak hareket ederler [7]. Aynı molekülde hem anyonik hem de katyonik kısım vardır. Anyonik ve katyonik kısımlar molekülde denge halinde olduğu takdirde deriyi tahris edici ve göz yakıcı özellikleri yoktur. Bu nedenle özel şampuan ve deriyi koruyucu preparatlarda kullanılırlar [8].

1.1.2.2. Yapısal Maddeler

Deterjanların yapısında yüzey aktif maddelerden başka temizleme özelliğini arttırıcı: alkalihidroksitlerpolifosfatlar, silikatlar; Çözünürlüğü arttırmak amacıyla: Alkoller-Glikoller ve glikoetherler; Ağır metalleri ayırmada kullanılan: Etilen diamin tetraasetik asit; Beyazlık ve parlaklık vermek amacıyla: optik beyazlatıcılar çeşitli boyalar ve parfüm bulunur [17].

1.1.2.2.1. Alkaliler

En çok kullanılan sodyum karbonat ve sodyum silikattır. Suyun sertliğinin arttıran metal iyonlarını çöktürürler. Deterjan çözeltisinin pH'ını alkali ortamda tutarak kirlerin tekrar çökmesini önleyici rol oynar. Alkalite suyun sertliğini önler. Alkalite ne kadar yüksek olursa maddenin temizleme gücü de o kadar fazla olur [5].

1.1.2.2.2. Kompleks Yapıcılar

Bunlar suda çözünen organik veya anorganik tuzlardır. Su sertliğine neden olan metal iyonlarının kompleks iyonlarını bağlayarak zararsız hale getirir ve bir çökeltiyeye neden olmaz. Aktif maddenin yıkama gücünü arttırırlar [5].

1.1.2.2.3. İyon Değiştiriciler

Bunlar Ca ve Mg iyonlarını Na iyonu ile değiştirerek zararsız hale getirirler. En tanınmış olanları zeolit A (sasil), poliakrilik asit ve türevleri ile polikarboksilik asit ve türevleridir [7].

1.1.2.3. Ağartıcılar (Beyazlatıcılar)

Yıkama sonunda geride kalan serbest klor ve bu klorun kokusu, bu tür beyazlatıcıların en yaygın örneği olan hipokloritler alternatifler aranmasına neden olmuştur. Son yıllarda kullanımı giderek artan sodyum perborat en tipik örnektir. Beyazlatıcı etkiyi düşük sıcaklıklarda gösterebilmesi için sodyum perborat yanında genellikle bir de aktivatör kullanılmaktadır. Ağartıcılar temizleyici değildirler. Yalnızca % 2 -3 oranında kir uzaklaştırma etkileri vardır [7].

1.1.2.4. Diğer Yardımcı Maddeler

Enzimler, antiredepozitan maddeler, köpük stabilizatörleri ve regülatörleri, optik beyazlatıcılar, korozyon inhibitörleri, parfümler, boyalar ve dolgu maddeleridir [7].

1.1.2.4.1. Enzimler

Enzimler, karbonhidrat ve proteinler gibi büyük kompleks yapıda olan kirleri parçalayan katalizlerdir. Yani kendileri değişime uğramazlar ancak reaksiyona girdikleri molekülleri parçalarlar [5].

1.1.2.4.2. Antiredepozitan Maddeler

Yıkama suyuna geçen kirin, temizlenen yüzey üzerine birikimini önleyici özellikte maddelerdir. Örnek olarak CMC (karboksi metil selüloz) verilebilir [7].

1.1.2.4.3. Köpük Stabilizatörleri ve Regülatörleri

Yıkamada deterjanın köpüğünü arttırıcı maddelerdir. En bilinenleri; polikarboksilik asitler, yağ asidi amidleri, yağ asitleri alkanol amidleri, betainler, sulfobetainler, aminoksitlerdir [7].

1.1.2.4.4. Optik Beyazlatıcılar

Kumaş üzerine düşen gözle görünmeyen ultraviole ışığı, görünür ışık dalga boyuna çevirerek kumaş üzerinden yansıtırlar. Böylece göz, kumaş üzerine düşen ışıktan fazla ışık alır. Kumaş olduğundan daha beyaz ve parlak görünür. Bu bir optik aldanmadır. Bir optik beyazlatıcı elyafa iyice bağlanmalı, oksijene, kloro ve ısıya dayanıklı olmalıdır [5].

1.1.2.4.5. Korozyon İnhibitörleri

Çamaşır makinesinin, bulaşık makinesinin ve makinede yıkanan çatal, bıçak gibi metal eşyaların paslanmasını önler [7].

1.1.2.4.6. Parfümler

Ürünün güzel kokmasını sağlayan maddelerdir [7].

1.1.2.4.7. Boyalar

Deterjana özgü bir renk sağlamak amacıyla kullanılır [7].

1.1.2.4.8. Dolgu Maddeleri

Deterjana dolgu olarak kullanılan, silikatlar ve sodyum sülfat gibi maddelerdir [7].

1.1.3. Deterjan Kirliliği

İnsanlar yaşamlarını sürdürebilmeleri için, besin, su, hava ve ısı gibi temel kaynakları kullanmaktadırlar. Ancak günümüzde artan nüfus ve gelişen teknoloji ile bu kaynakların kirlenmesi giderek artmaktadır. Evsel ve endüstriyel atıkların hiçbir önlem alınmadan gelişi güzel çevreye boşaltılmaları halinde çevre kirlenmesi sorunu ortaya çıkmaktadır. Sulara atıklarla karışan inorganik ve organik maddeler doğanın ekolojik dengesini kısa ve uzun vadede bozabilmektedir. Kirlilik uzun vadede sudaki canlıların yaşamında ve dağılımında değişikliğe yol açar; bazı balıkların sayısı azalırken, kirleticilere dirençli başka canlılar sayıca artış gösterir. Sanayi atıklarının, tarım ilaçlarının, deterjanların ve fenollü maddeler gibi organik atıkların sudaki çözülmüş oksijeni tüketmesi, balıkların kitle halinde ölmelerine neden olmaktadır [18].

Deterjanın üretimine kadar dünyamızda temizleme maddesi olarak sadece sabun kullanılmaktaydı. Yeni temizleme maddelerinin bulunması için yapılan çalışmalardan sonra ham petrolden sentetik yolla elde edilen hammadde ile deterjan üretilmesine başlandı. Temizlik işlerinde ve bulaşıcı hastalıkların yayılmasının önlenmesiyle büyük yararlar sağlanması nedeniyle dünyada deterjan kullanımı hızlı bir şekilde artmıştır fakat bunların rastgele üretilmesi ve çevreye boşaltılmaları sonucunda doğa kirlenmesine neden olmaları, bazı ülkelerin deterjanlar hakkındaki bir dizi önlem alma zorunluluğu getirmiştir [18] (Şekil 1.9.). Deterjanları oluşturan kimyasal maddelerin büyük bir bölümünü yüzey aktif maddeler oluşturmaktadır. Bu

maddeler hidrofil (su seven) ve hidrofob (su sevmeyen) grupları içeren bir molekül yapısına sahiptirler. Nüfusun artması ve deterjan kullanımı nedeniyle yüzey aktif maddelerin de alıcı su ortamındaki konsantrasyonları giderek artmaktadır. Biyolojik ayrışabilirliği çok fazla olan yüzey aktif maddelerin kullanımı zorunlu olmuştur [18].



Şekil 1.9. Endonezya Citarum Irmağı deterjan kirliliği [19]

1.1.3.1. Deterjanların Boşaltıldıkları Alıcı Sulara Başlıca Etkileri

Deterjanların zararlı etkilerinden ilki yaygın olarak kullanılan deterjan atıklarının kanalizasyon yolu ile göl ve nehirleri kirlenmesi ile başlamış ve sularındaki konsantrasyonun artmasıyla oluşan köpükler büyük kentlerin önemli bir sorunu haline gelmiştir. Zira yüzey aktif maddelerin biyolojik parçalanmaya dayanıklı bulunması veya parçalanma hızının çok yavaş olması bir taraftan yüzeysel sulardaki köpük miktarının çoğalmasına diğer taraftan çeşitli yollardan içme ve kullanma sularına sızan deterjan atıklarının artmasına neden olmuştur [17].

1.1.3.2. Deterjanlardan Kaynaklı Fosfatın Etkisi

Fosfat, ırmakları, gölleri ve fazla akıntı olmayan körfezleri istila eden zehirli mavi-yeşil alglerin (yosunların) ana nedenidir. Deniz, akarsu ve göllerde en belirgin kirlenme çeşitlerinden biri, aşırı üretim anlamına gelen ötrofikasyondur [12]. Suyun yeşil ve bulanık bir renge dönüşmesine, kıyılarda fosfatla beslenen yosunların (alglerin) birikmesine yol açar. Aşırı fosfat ile birlikte insan tarafından sulak alanlar ve denizlere yüklen diğer bitki besin maddeleri, bu yosunların çok büyük miktarda üremesine, hızlı büyümesine sebep olur.(Şekil 1.10) Bu yosunların dibe çöküp ayrışması sonucu dip suların oksijeni tükenir ve hidrosülfid gazı (çürük yumurta kokusu) ortaya çıkar. Bu, suda yaşayan canlı hayatın sonunu hazırlar [20]. 1960 ve 1970'lerde deterjanların bileşimleri, çevreyi koruma düşüncesiyle hızlı değişimler uğramışlardır. Deterjanlardan kaynaklanan (sularda sürüklenen) fosfatlar, göl sularında ötrifikasyona neden olmakta ve bu nedenle deterjanlara fosfatların katılması bazı ülkelerde yasaklanmış bulunmaktadır [20]. Bu konuda atılan en önemli adım, tetrapropilen benzensülfonatın (TPBS) diğerlerinin yerini almasıdır. Bu deterjan malzemesi, deterjan endüstrisinin ham maddesidir. Bulaşık ve çamaşır yıkama deterjanlarında kullanılan yüzey aktif maddeler pazarında, ağırlıklı olarak % 70'lik paya sahiptir [12]. Yılda yaklaşık 250 milyon kg civarında bir tüketim gücüne erişmiştir. TPBS; Benzenin önce bir propilen tetramer ile alkile edilmesi ve sonra benzen halkasının sülfonasyonu ile üretilir. Propilen tetramer, dallanmış izomerlerin bir karışımından ibarettir ve maddenin bulunabilmesi konusunda yapılan çalışma, alkil benzen oluşturmak için düz zincirli bir hidrokarbon geliştirilmiştir. Düz zincirli maddeler, daha kolay parçalanabilen deterjanlar verir ve deterjan formülasyonunda kolaylıkla uyar [12].



Şekil 1.10. Fosfatın çevreye etkisi [21]

1.1.4. Atık Sularda Deterjan Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılan Yöntemler

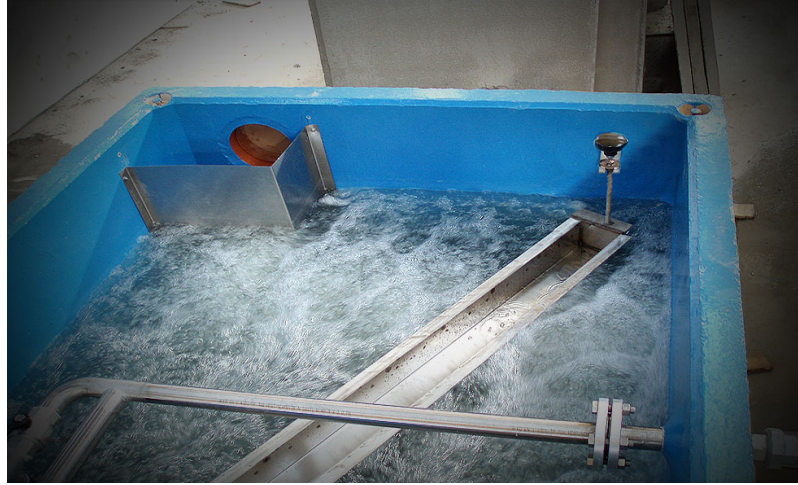
Atıksu bünyesinde kirliliğe neden olan yabancı maddeler, tane boyutlarına göre çökebilir, askıda, koloidal ve çözülmüş halde bulunabilirler. Her madde grubu değişik metodlarla atıksudan uzaklaştırılabilir. Atıksu arıtımında uygulanan metodları fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç ana grupta toplamak mümkündür [22]. Bunlardan fiziksel arıtmada çökeltim ve flotasyon işlemleriyle çökebilir veya yüzebilen tanecikler ayrılmakta; kimyasal arıtmada çözülmüş ya da koloidal boyuttaki tanecikler pıhtılaştırılıp yumaklaştırılarak çökebilir hale getirilmekte; biyolojik arıtmada ise çözülmüş maddeler kısmen biyolojik kütlelerin bir araya gelerek oluşturduğu kolay çökebilir yumaklara, kısmen de mikroorganizmaların enerji ihtiyaçları için yaptıkları solunum sırasında çıkan gazlara ve diğer stabilize olmuş son ürünlere dönüşür. Biyolojik ve kimyasal arıtma ünitelerinin yükünü azaltmak için, öncelikle fiziksel ön işlemler uygulanır [23].

1.1.4.1. Fiziksel Arıtım

Atık sularda deterjan giderimini fiziksel arıtma metodlarından flotasyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Flotasyon, atıksularda bulunan gerek sıvı gerekse katı maddelerin yüzdürülerek su yüzeyinde toplanması ve sıyrılmasını sağlayan bir

işlemedir. Flotasyon işlemi sıvı ortama verilen gaz (genellikle hava) kabarcıklarının, yüzdürülecek tanelere tutunarak bunları yukarıya doğru birlikte hareket ettirmeleri şeklinde olur [23] (Şekil 1.11). Flotasyonu kolaylaştırmak üzere katı durumlarda suya uygun kimyasal maddelerinde eklenmesi mümkündür. Yüzeyde toplanan köpük halindeki yüzdürülmüş maddeler bir yüzey sıyırma tertibatı ile toplanarak uzaklaştırılır. Taneleri yüzdürmek için kullanılan hava kabarcıkları şu üç yoldan biri ile elde edilebilir [22]:

- a) Atmosferik basınç altındaki sıvıya basınçlı havanın kabarcıklar halinde verilmesiyle (disperse hava flotasyonu),
- b) Basınç altında sıvıda havanın çözünmesi ve daha sonra basıncın kaldırılmasıyla (çözünmüş hava flotasyonu),
- c) Sıvının atmosferik basınç altında havaya doygun hale getirilmesini takiben vakum uygulanmasıyla (vakum flotasyonu)



Şekil 1.11. Flotasyon işlemi [24]

1.1.4.2. Kimyasal Arıtma

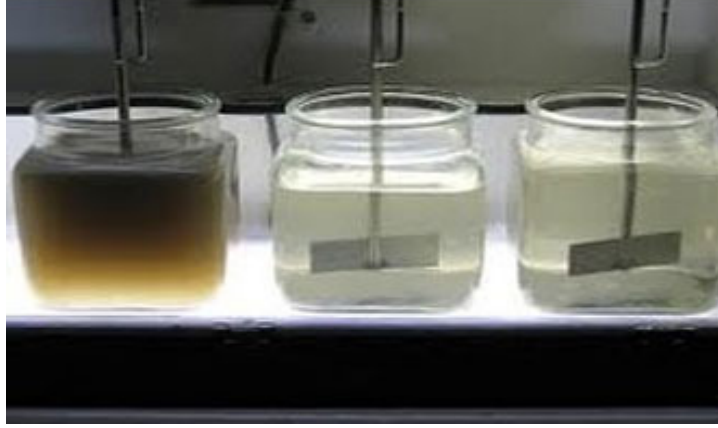
Kimyasal arıtma, atık sularda kirliliğe neden olan çözünmüş, kolloidal ve askıdaki maddelerin uzaklaştırılmasını temin veya hızlandırmak amacıyla, çeşitli kimyasal reaksiyonlardan yararlanılması esasına dayanan genel metotlardır [22]. Kimyasal

arıtma suda çözülmüş halde bulunan kirleticilerin, kimyasal reaksiyonlarla çözünürlüğü düşük bileşiklere dönüştürülmesi veya kolloidal ve askıdaki taneciklerin pıhtı ve yumaklar oluşturarak çökeltilmesinin sağlanmasını amaçlar [23]. Yüzey aktif maddelerden deterjanların giderilmesinde kullanılan kimyasal yöntemlerden genellikle koagülasyon (pıhtılaştırıcı) ve flokulasyon (yumaklaştırıcı) yöntemleri kullanılır [22]. Koagülasyon (pıhtılaşma) işlemi genellikle hızlı karıştırma ünitelerinde yapılır (Şekil 1.12). Atıksuyun bu ünitelerde kalış süreleri 0.5-5 dk arasında değişmektedir. Pıhtılaştırma işlemi sonucunda, suda bulunan kolloidler ve kimyasal reaksiyon sonucu oluşan tanecikler çok küçük yumaklar halinde birleşirler (Şekil 1.13). Bu aşamadan sonra suyun yavaş bir şekilde karıştırılması, pıhtılaştırma ile oluşmuş bu parçacıkların birleşerek daha kolay çökebilen büyük yumaklar oluşturmasını sağlar. Yumaklaştırma ünitelerinde suyun kalış süresi 15-60 dk arasında değişim gösterir [23].

Flokulasyon (yumaklaştırma) işlemi hızlandırmak, kullanılan yumaklaştırıcıların miktarlarını azaltmak veya arıtma verimini artırmak için kil, kalsit, polielektrolit, aktif silika, çeşitli alkali ve asitler gibi yumaklaştırmaya yardımcı maddeler (koagülant yardımcısı) kullanılır. Yumaklaştırıcı olarak en çok kullanılan kimyasal maddeler $Al_2(SO_4)_3$, $AlCl_3$, $Fe_3(SO_4)_3$, $FeCl_3$, CaO , $Ca(OH)_2$ olup, yumaklaştırma yardımcısı maddesi olarak en fazla polielektrolitler kullanılmaktadır [22].



Şekil 1.12. Koagülasyon işlemi [25]



Şekil 1.13. Flokulasyon işlemi [26]

1.1.4.3. Biyolojik Arıtım

Atıksu bünyesinde bulunan organik ve kısmen de anorganik kirletici maddelerin, mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak suretiyle atıksudan uzaklaştırılmaları esasına dayanan metodlardır [22]. Organik maddelerin bir kısmı mikroorganizma hücrelerine, bir kısmı da enerjiye dönüşür [23]. Biyolojik arıtmada kullanılan en yaygın yöntem biyodegradasyon yöntemidir. Biyodegradasyonun farklı kullanım alanları vardır. Biyolojik arıtma sistemleri, aşılana uygun bir bakteri suşunun organik atıkları sudan gidermesi ile çalışır. Suyu doğru miktarda havalandırma, yani suya oksijen verme önemlidir. Böyle bir arıtma tesisinde ev ve sanayi atığından bahçe sulanacak kalitede su almak mümkündür [23].

1.1.4.3.1. Deterjanların Biyodegradasyonu

Yüzey sularında ve klasik atık su arıtma tesislerinde deterjan konsantrasyonunu azaltmada kimyasal maddeler yetersiz kalmaktadır. Tamamlayıcı ve değiştirici olan bu kimyasal yöntemlerin yetersizliği biyoteknolojideki son gelişmelere yol açmıştır. Yüzey aktif maddelerin degradasyonu için bakteri üreten ticari konsorsiyumlar aşağıda gösterilen ürünleri geliştirmiştir [3].

- Amnite F250 (BioPond): Suyu temiz tutmak için bakteriler içerir ve toksinleri serbesttir.
- Amnite L250 (Biosolv): Bu bakteriyel formülasyon yağ, petrol ve gres gibi atıkların degradasyonunda etkindir.
- Amnite S250 (Biogest): Bu bakteriyel formülasyon etkili organik katı atıkların degradasyonunda etkindir.

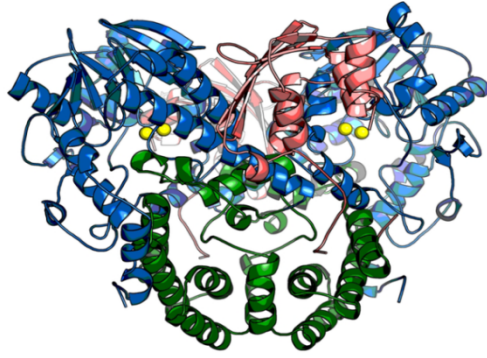
Ayrıca bu bakteriyel karışımlar uzun sürelerce muhafaza edilerek tekrar aynı sorunla karşılaşıldığında geri ürün alınımına ihtiyaç duyulmadan degradasyon çalışmaları için tekrar tekrar kullanılabilir. Kimyasal yöntemlere göre ekonomik açıdan oldukça avantajlıdır. Bu durum sektör tarafından biyolojik giderimin kullanılmasını daha çok yaygınlaştırmıştır [3].

Deterjan degrade eden birçok bakteri vardır, fakat bu bakterilerden biyodegradasyon sürecinin işleyişi ve çevre koşullarının değişmesiyle gram negatif bakterilerin, gram pozitif bakterilere kıyasla deterjana karşı daha dirençli olduğu gözlemlenmiştir [27]. Bunun nedeni ise gram negatif bakterilerin sahip olduğu lipopolisakkarid adı verilen dış zarları gram pozitif bakterilere göre toksik maddelere karşı dirençli olabilme yeteneğini geliştirmiştir.

sdsA gen bölgesi, özellikle yüzey aktif maddeleri degrade eden bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme yeteneğini veren gen bölgesi olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerden *Pseudomonas* cinsi bakterilerin biyodegradasyon yeteneğini sağlayan gen bölgesi *sdsA*'dır. *sdsA* geni *Pseudomonas* cinsi bakterilerinde alkil sülfataz veya alkilsülfat hidrolaz enzimini kodlar. *Pseudomonas* cinsi bakterileri *sdsA* geni aracılığıyla deterjanların ham maddelerinden biri olan sodyum dodesil sülfatın güçlü sülfat esterlerini denatüre ederek ortamdaki karbonu en aza indirgenmesini sağlar. *sdsA* genin kodladığı alkil sülfataz metallo- β -laktamaz ailesindeki sülfatazların üçüncü sınıfına ait bir enzimdir [28] (Şekil1.14).

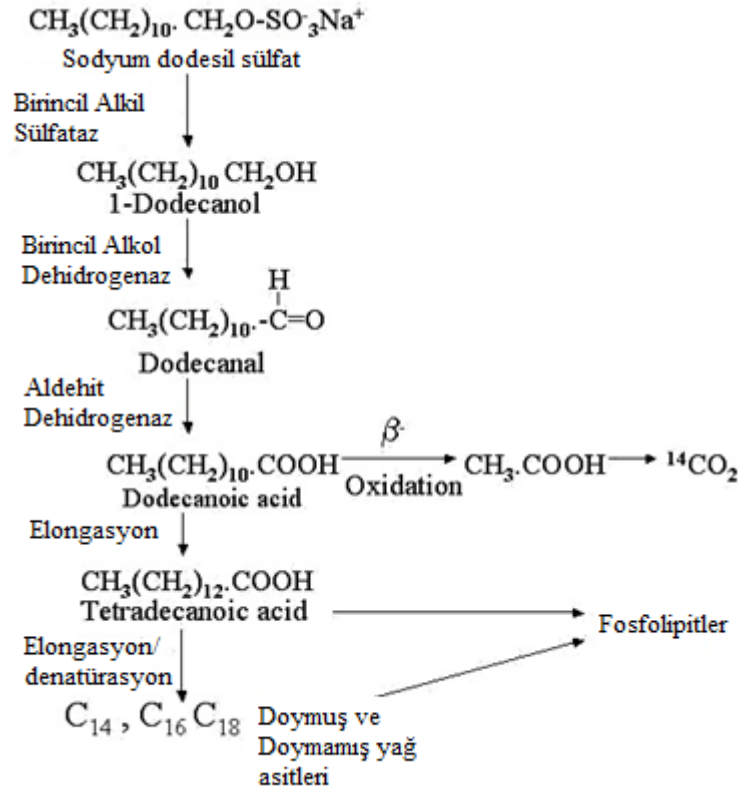
Yüzey aktif maddelerin degradasyonunda en çok çalışılan bakteri türü *Pseudomonas* cinsi'dir. Bu çalışmaların sonucunda deterjan degradasyonundan sorumlu enzimin, P1 (Primary alkil sülfataz) ve P2 (Primary alkil hidrolaz) oldukları keşfedilmiştir. İlk yapılan çalışmalarda P1 ve P2 enzimlerinin degradasyona başlayamadıkları tespit

edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda belirli miktarlarda deterjan konsantrasyonu artırılmış ve bakteriler için bu konsantrasyonlar toksik etki yarattığından enzimlerin çalışmadığı görülmüştür. Bu durum belirli deterjan konsantrasyon aralıklarında bakterilerin degradasyon yeteneğine sahip olduğunu ispatlamıştır [29, 30].



Şekil 1.14. Alkil sülfataz proteini üç boyutlu yapısı [31].

Thomas and white tarafından *Pseudomonas* sp. C12B bakterisinde SDS biyodegradasyonu üzerine detaylı bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada amaç SDS'deki C atomlarını radyoaktif ışına yapan 14 C atomu ile işaretleyip radyoaktif ışına tekniği kullanarak SDS biyodegradasyonunun yol haritasını çıkarmak amaçlanmıştır [32]. Radyoaktif ışınalarda gözlenen sonuçlar; 1-dodecanol ve 1-dodecanoic asitin kullanılması sonucunda SDS tespit edilmiştir. Bu gözlem birincil alkil sülfatazın varlığını göstermiş olup, bakteri tarafından SDS biyodegradasyonu 1-dodecanol ile başlayıp birincil alkil sülfatazı aktivelediğinde, birincil alkol dehidrogenazın ortaya çıkmasıyla 1-dodecanol asit oluştuğu belirlenmiştir. Oluşan ürünler bakteri metabolizmasına β -oksidasyon yolu ile katılmıştır [32] (Şekil 1.12).



Şekil 1.15. SDS degradasyon mekanizması [32].

Gram negatif bakteriler deterjan degradasyonunda oldukça yaygındır. Önceden çalışılmış bazı bakteri cins ve türleri: *Klebsiella liquefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* türü., *Klebsiella oxytoca*, *Brevibacterium*, *Vibrio*, *Klebsiella pneumonia*, *Flavobacterium*, *Shigella* and *Citrobacter*. Yapılan çalışmalardan gram pozitif bakterilerden sadece *Staphylococcus albus* ve *Brevibacterium* deterjan degradasyonunda etkin mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir [33].

Scott ve Jones [7] yaptıkları çalışmada, yüzey aktif maddelerin çevrede yarattığı kontaminasyonları gözden geçirmişlerdir. Bugün kullanılan iki ana surfaktan LAS ve APE'nin (alkil fenol etoksilat) atık su arıtma tesislerinde kısmen aerobik degradasyona uğradığını, kısmen de atık sulu çamur adsorbe edildikten sonra araziye uygulandığını, toprağa sulu çamurun uygulanmasıyla birlikte surfaktan düzeyinin 0-

3 mg kg⁻¹ aralığında olabileceğini, APE'nin ürünlerin bozulmasında az da olsa toksisite gösterdiğini, ayrıca erkeklerde sperm sayısının azalmasıyla ve kanserojen etkilerle de bağlantı olabileceğini, sonuç olarak anyonik yüzey aktif maddelerin yaygın olarak kullanımı ciddi oranda risk oluşturmazken, katyonik yüzey aktiflerin çok daha toksik olduğunu ve katyonik deterjanların degradasyonu ile ilgili bilgi eksikliği olduğunu belirtmişlerdir

Dong Hu gölündeki (Çin) LAS'ın degradasyonunda mikrobiyal populasyonun büyüklüğünün etkileri araştırılmıştır. Çalışmada LAS oranları arasında korelasyon ve göldeki başlangıç bakteriyal populasyonun büyüklüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak test ortamında mikrobiyal populasyonun büyüklüğünün, LAS degradasyon oranını etkilediği saptanmıştır [34].

1.1.5. Deterjan Degrade Eden Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Deterjan degrade eden bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel atık suların temizlenmesi ve bilimsel açıdan gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu haline gelmiştir [35]. Deterjan degrade eden bakterilerin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bunların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile antibiyotik duyarlılıkları ve faj tiplerinin belirlenmesinin ve serolojik olarak tiplendirilmelerini içeren klasik yöntemlerin yanı sıra, son yıllarda güncellik kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulsed Field Jel Elektrofrezisi (PFGE), Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamide Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE), Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve DNA dizilim analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılabilmektedir [30]. Bu yöntemlerin her biri bakteri izolatlarını cins, tür, alt tür ve suş düzeyinde sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize etmeye çalışmaktadır. Bu yöntemlerin her biri bakteri izolatlarını cins, tür, alt tür ve suş düzeyinde sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize etmeye çalışmaktadır. Her yöntemin uygulama, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri

açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak, genellikle son yıllarda kullanılmaya başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan tanımlama ve sınıflandırma yöntemleri olarak değerlendirilmektedir [35,37]. Biyokimyasal prosedürlerin ve fenotipik metotların sınıflandırmada yetersiz kalması araştırmacıları yeni yöntemler bulmaya yöneltmiştir. Bu yöntemler DNA üzerine kurulu moleküler metotlar olarak tanımlanmıştır [38]. Bu yöntemlerin başında; plazmid profil analizi, DNA/DNA hibridizasyonu, restriksiyon endonükleaz analizi, ribotiplendirme, pulsed-field jel elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu ve nükleotid sekans analizleri gelmektedir.

Bu metotların temel avantajları:

- Kuvvetli bir ayırım gücüne sahiptirler. Çok yakın türlerin ayrımı bile gerçekleşebilir,
- Bakteriden DNA izolasyonu tanımlanmıştır ve kolay bir yöntem olduğu için materyal kolaylıkla elde edilebilir,
- Farklı kaynaklardan DNA izolasyonu ile aynı yöntem kullanılarak sistematige gidilebilir,
- DNA stabil bir molekül olduğu için kültür içeriğinden ve hazırlanan aşamalardan etkilenmemektedir. Böylece daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir,
- Sonuçlar istatistiksel analizler ve diyagramlar ile desteklenebilir,
- Yeni izole edilen suşların da varlığı bu şekilde kanıtlanabilir.

1.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Temel Prensipleri

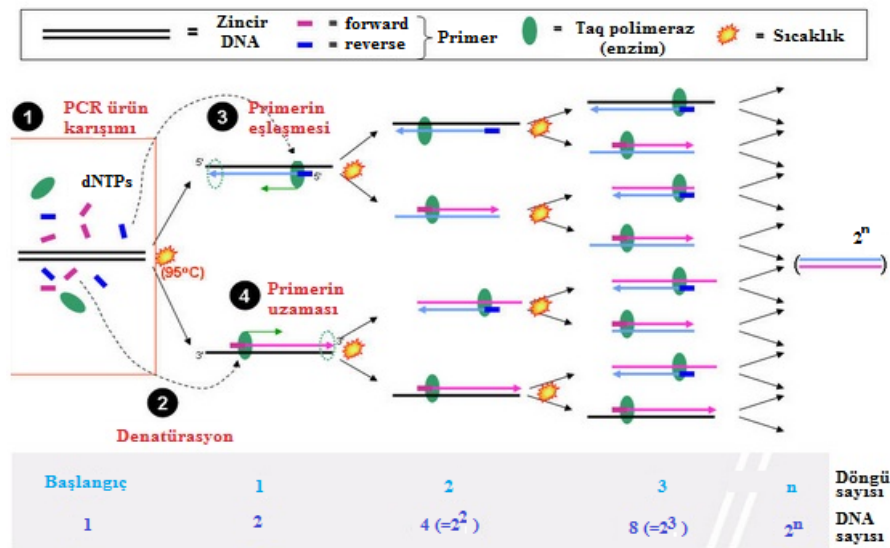
PZR, bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak *in vitro* olarak amplifikasyonunu sağlayan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir [39]. Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır [40]. PZR'nin temel

bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂'dir [41]. Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşur [40]. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar. Sentezlenen DNA ürününün saptanması, kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleşmektedir [42].

PZR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PZR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PZR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuvarında yeniden ayarlanması gerekmektedir [43]. Eğer PZR şartları yeni PZR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir [44,45]. Bu problemler;

- PZR'den beklenen ürün ya az alınır ya da hiç alınmaz.
- Primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
- Primerler yanlış şekilde uzayabilir.
- Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatır.
- Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.
- PZR'in avantajları;
- Tekniğin çok hızlı aynı zamanda da oldukça spesifik oluşu en önemli özelliklerindedir.

- Kan, serum, doku, hücre gibi materyallerin yanı sıra oldukça eski zamanlara ait olan kurutulmuş örneklerden (antropolojik çalışma) de nükleik asitler ekstrakte edilebildiğinden ve hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonlarının bile bu iş için yeterli olabilmesi nedeniyle oldukça pratik bir yöntem olarak kabul edilir.
- Toksin oluşturan etkenlerin ve saptanması güç olan toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar koşullarında üretilmeleri oldukça güç olan virusların teşhis edilebilmesini sağlamaktadır.
- Dirençliliğe neden olan genin belirlenmesi ile antibakteriyel ilaçlara dirençli olan bakterilerin saptanmasında kullanılır. Örneğin, *Staphylococcus aureus*'da metisilin direnç geni PZR ile tespit edilmiştir.
- Adli tıpta başta babalık tayini olmak üzere pek çok alanda, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygınlaşarak kullanılmaktadır [43, 46].



Şekil 1.16. PZR amplifikasyon basamakları [47]

1.1.5.1.1. PZR Primerlerinin Tasarımı

Başarılı bir PZR için en kritik parametre primerlerin tasarımıdır. Tüm koşulların uygun olduğu bir durumda, sadece zayıf tasarlanmış bir primer PZR reaksiyonun çalışmamasına neden olabilir. Primer sekansı ürünün gen üzerindeki pozisyonu ve uzunluğu, erime sıcaklığı, ve nihayetinde PZR verimi dahil pek çok parametreyi etkiler [48] (Şekil 1.17). Zayıf tasarlanmış bir primer, ürün oluşumunu bastıracak biçimde rakip olabilen primer-dimer oluşumu ve/veya özel olmayan amplifikasyon sonucu çok az veya hiç ürün üretilmemesine neden olabilir. PZR için primer tasarlanırken dikkat edilmesi gereken kuralları şunlardır [49]:

Primer Seçimi: PZR primerleri tasarlanırken çeşitli parametrelere dikkat edilmelidir. En kritikleri; primer uzunluğu, erime sıcaklığı (T_m), hassasiyet (specificity), tamamlayıcı primer sekansları, G/C miktarı ve polipirimidin (T, C) ve polipurin (A, G) uzamaları ve 3' uç sekansıdır [49].

Primer uzunluğu: PZR hassasiyeti, bağlanma sıcaklığı ve bağlanma süresi primer uzunluğuna bağlı olduğundan bu parametre başarılı bir PZR için çok önemlidir. Genel olarak, bağlanma sıcaklığı uygun olduğunda 18 ile 24 bazlık oligonükleotidler belli bir sekansa özel olarak bağlanırlar. Primer uzunluğu aynı zamanda bağlanma verimi ile de doğru orantılıdır. Genel olarak primer uzadıkça, bağlanma verimi azalır. Her basamakta daha az ana molekül primerle bağlandığından çoğaltılan üründe önemli derecede azalmaya neden olur. Uygulama özellikle gerektirmedikçe, primerler çok kısa olmamalıdır. Aşağıda bahsedildiği gibi hedef en az 50°C'lik bağlanma sıcaklığına sahip bir primer tasarlamaktır. Bağlanma sıcaklığı ile erime sıcaklığı arasındaki bağlantı PZR'nin kara kutularından biridir. Genel kural bağlanma sıcaklığını erime sıcaklığından 5°C daha düşük olarak kullanmaktır. Genellikle sadece bu şekilde hesaplanan bağlanma sıcaklığı, en uygun sıcaklık olmayıp belirlemek için ampirik deneyler yapılmak zorunda kalınabilir. Bu optimizasyon kademeli termal döngü kullanılarak kolaylıkla yapılabilir [50].

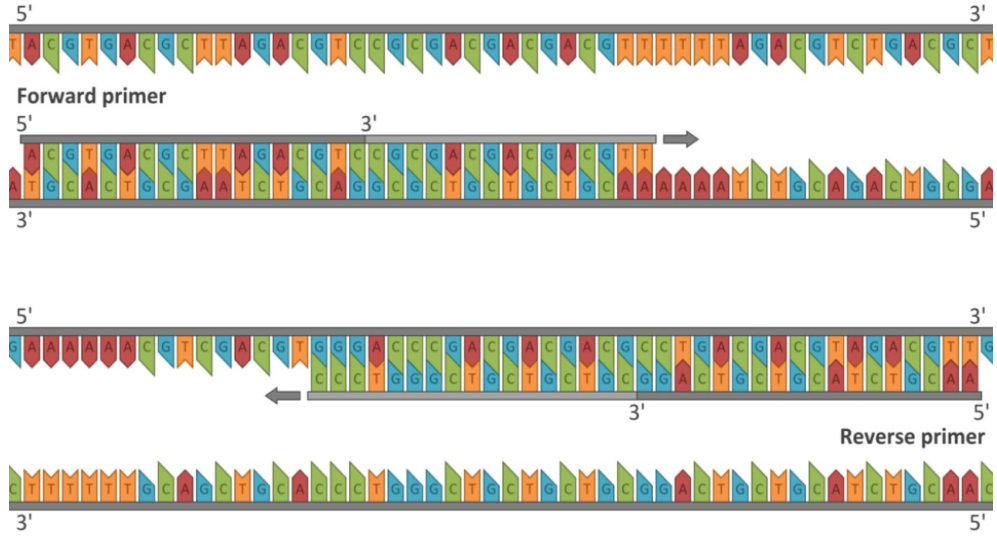
Erime sıcaklığı (T_m): Hedef/bölge yönlü PZR reaksiyonu için iki primer kullanıldığı unutulmamalıdır. Her iki oligonükleotid primer de benzer erime sıcaklıklarına sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Eğer primerler T_m nedeni ile yanlış bağlanırsa, amplifikasyon daha az verimli olacaktır. Düşük sıcaklıkta T_m'ye sahip primer yüksek sıcaklıkta, yüksek sıcaklıkta T_m'ye sahip primer düşük sıcaklıkta çalışmayacaktır. Oligoların erime sıcaklığı en yakın komşu termodinamik hesaplamaları kullanılarak kesin olarak hesaplanabilir [50].

Primer hassasiyeti: Yukarıda bahsedildiği gibi, primerin hassasiyeti, primer uzunluğuna bağlıdır. 24 bazlık özgün oligo sekansları 15 bazlık oligo sekanslarından daha hassastır. Primerler kısmi olarak çoğaltılacak hedef DNA içinde özgün bir sekans taşıyacak biçimde tasarlanmalıdır. Tekrarlanan sekanslar içeren primer ile genomik DNA çoğaltılması bulanıklık ile sonuçlanacaktır (birden fazla ürün türü). Ancak aynı primer, genomik kütüphaneden tek bir klon çoğaltıldığında net, tek bir bant verebilir. Taq polimeraz geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğu için primer uzaması düşük bağlanma sıcaklıklarında meydana gelebilir. Sıcaklık çok düşük olduğunda primer ile özgün olmayan bağlanma gerçekleşebilir. Eğer 3' ucunda kısa da olsa homoloji varsa polimeraz bu noktadan çalışmaya devam eder. Genel olarak 55-72°C arasındaki erime sıcaklığı en iyi sonucu verir [50].

Tamamlayıcı primer sekansları: Primerler 3 bazdan daha fazla iç primer homolojisine sahip olmayacak şekilde dizayn edilmelidir. Primerler kendi içinde homolojiye sahip olursa, "snap back" veya "hairpin" (saç tokası) tabir edilen, primerin homolog sekansları sebebiyle kendi üzerine katlanarak çift zincir oluşması görülebilir. Bu da primerin hedef DNA'ya bağlanmasını etkileyecektir. Diğer bir tehlike primerler arası homolojidir. İki primerin orta bölümündeki kısmi homoloji hibridizasyonu engelleyebilir. Eğer homoloji primerlerden birinin 3' ucuna karşılık geliyorsa primer-dimerleri (birbirine bağlanmış iki primer molekülü) oluşur. Bu da elde etmek istenen ürünle yarışacağı için istenilen ürünün oluşmasını engelleyecektir [49].

G/C miktarı ve poliprimidin (T, C) ve polipurin (A, G) uzamaları: Primerlerin baz kompozisyonu % 45 ile % 55 arası GC taşıyacak şekilde olmalıdır. Primer sekansı özel olmayan bağlantıları arttıracak poli G ve poli C uzamaları olmayacak şekilde seçilmelidir. Primer-hedef kompleksinde gevşemeye yol açacak Poli A ve poli T uzantılarından da kaçınılmalıdır. Bu amplifikasyonun verimini düşürebilir. Polipirimidin (T, C) ve polipurin (A, G) uzantılarından da kaçınılmalıdır. İdeal olarak bir primer % 50 G C içerik taşıyan ve yaklaşık 20 bp uzunluğunda nükleotidlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı erime sıcaklığı T_m'yi 56-62°C'lik aralıkta tutar [49].

3'- uc sekansı (zinciri); 3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı kontrol için çok önemlidir. Bu bölgede yer alan primer homolojilerinin yaratacağı sorunlardan bahsedilmişti. Diğer bir değişken primerlerin 3' ucuna G ve C bazlarının eklenmesidir. Bu GC kıskacı G/C nükleotidlerinin daha kuvvetli hidrojen bağlarla bağlanması nedeni ile 3' ucun sonuna doğru bağlanmayı garanti eder. Bu aynı zamanda primer-hedef kompleksinde gevşemelere bağlı olarak reaksiyon hızının yavaşlamsının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon verimini artırır [50]. Primer tasarım için yeterli istatiki bilgilerin araştırılması ve kesin sonuçlara ulaşılması biyoenformasyoncular için yeni yazılım programları geliştirmelerine neden olmuştur. Bu yazılım programların bazıları; Vector NTI Express (Life Technologies, ABD), Oligo primer designer (ABD), NCBI (National Center of Biotechnology Information Primer designer tool)



Şekil 1.17. Forward 5' - 3' ve Reverse 5' - 3' primerleri [51]

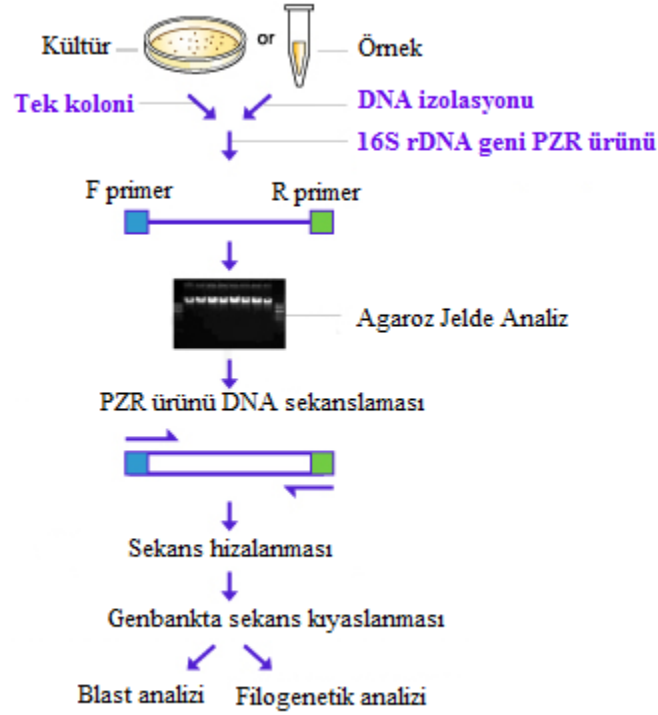
1.1.5.2. 16S rDNA Dizi Analizi

16S rDNA gen bölgesi filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve bakteriyal tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. 16S rDNA gen bölgesi RNA'nın bir alt birimi olup toplam uzunluğu yaklaşık 1540 nükleotittir. Yüksek oranda korunmuş bölgeleri içeren 16S rDNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalıdır ve bu bölgeler tür için spesifiktir [52]. Korunmuş bölgeler yavaş evrimleştikleri için taksonomik karşılaştırmaları sağlayacak verileri içermektedir. 16S rDNA sekans verileri genbanklarda deposit edilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda bu veriler gen bankalarından kolaylıkla elde edilebilmektedir [52-54].

16S rDNA dizisinde, diğer tüm organizmalardan % 3'den fazla farklılık gösteren bir prokaryotun yeni bir tür olduğu düşünülebilir. Bunu destekleyen en önemli veri, 16S rDNA dizisinde % 97'den az benzerlik gösteren iki prokaryotun genomik DNA'larının genelde % 70'den az hibridize olduğudur. Yapılan çalışmalar 16S baz dizilemenin bazı durumlarda genomik DNA hibridizasyonuna göre organizmaları tür seviyesinde ayırma gücünün yetersizliğini göstermektedir. 16S baz dizisi çok benzer ve hatta birebir olan bazı organizmaların oldukça farklı bir genoma sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden % 97'den fazla dizi benzerliği görülen durumlarda genomik

hibridizasyon yeni türlerin tanımlanması için önemli bir taksonomik tekniktir [55-57]. DNA eşleşme çalışmalarının sonuçları ile ribozomal RNA dizi analizleri ve numerik taksonomi gibi diğer teknik uygulamalarından elde edilen veriler arasında uyum olması gerekmektedir. 16S rDNA dizisi, cinsler ve doğru kararlaştırılmış türler arasında ilişki kurmak ve onları birbirlerinden ayırt etmek için kullanılmaktadır, fakat, son dönemde yapılan çalışmalar sadece 16S rDNA gen bölgesinin yeni bir türü belirlemek için yeterli olmadığını göstermiştir [57] (Şekil 1.18).

16S rDNA gen sekansları, fizyolojik testler ve DNA-DNA hibridizasyon analizleri, cins içerisindeki türlerin filogenetik olarak sınıflandırılmasında kullanılan başlıca metodlardır. 16S rDNA gen analizleri ve DNA-DNA hibridizasyonu, modern bakteriyal taksonominin 'altın standardı' olmalarına rağmen dezavantajlara da sahiptir. 16S rDNA molekülünün yüksek oranda korunmuş doğası bakteriyal izolatların cins seviyesinde ve cins içindeki türlerin % 98,7 sekans benzerliğinin üzerindeki değerlerle ayırımında oldukça faydalı olmasına rağmen, 16S rDNA gen sekans karşılaştırmaları çok yakın ilişkili türler arasında ayırt edicilik sağlamayabilir. Ayrıca, % 99 büyük sekans benzerlik seviyesinde, sekans hatalarının olma ihtimali suşların uzaklık ilişkilerini belirlemede yeterli duyarlılık göstermeyebilir. DDH çalışmaları yakın ilişkili türler arasındaki akrabalığı belirlemeye izin verirken, uzak akraba türler arasındaki ilişkiyi belirlemede kullanılmaktadır. Bunun için yapısal (housekeeping) gen sekanslarının kullanımı, 16S rDNA gen sekans analizlerinin tamamlayıcısı olarak tür seviyesinde belirlemeyi sağlamak için önerilmektedir [58-60].



Şekil 1.18. 16S rDNA sekans analiz yöntemi [61]

1.1.5.3. Filogenetik Ağacın Oluşturulması ve Filogenetik Analiz

Türlerin filogenetik tarihini inceleyen bilim dalı filogeni olarak adlandırılır ve bir filogenetik ağaç bu tarihin grafik bir özetidir. Filogenetik analiz, yaygın bir ata soyundan gelen türlerin soyları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi süreci anlamındadır. Daha pratik bir anlamda ise, bu analiz mevcut organizmaların yakın ilişkilerini belirlemek ve organizmaları filogenetik soylar kapsamında sistematik konumları için kullanılır. Moleküler filogenetik analiz ise hızlı DNA dizilenmesinin oluşumu ile daha yaygın hale gelmiştir. Analizler sonucu oluşturulan filogenetik ağaçlar hangi organizmaların daha yakın ilişkili, hangilerinin ise uzak olduklarını belgelemektedir [62].

Nükleotit dizileri ya da aminoasit dizileri, filogenetik analizleri için en çok kullanılan moleküllerdir. Filogenetikte, nükleik asitlerin kullanımı, nükleik asit dizilenmesinin hızlı, ucuz ve güçlü olması avantajına sahiptir. Bunun yanında, Ribozomal

Veritabanı Projesi gibi büyük veritabanlarının mevcut olması, filogenetik analizini kolaylaştırmaktadır [62-63].

Bir nükleik asit ya da aminoasit dizisi elde edildikten sonra, bir filogenin ortaya çıkarılmasından sonraki aşama, analiz için görece bir sistem sağlayan benzer dizilerin tanımlanmasıdır. Örneğin Ribozomal Veritabanı Projesi gibi bazı veritabanları verisetlerinin oluşturulması ve başlangıç filogenetik analizin yapılması için web tabanlı destek sağlayabilir. Bunun yanı sıra Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) gibi otomatik araştırma ve karşılaştırma aracı da bulunmaktadır. Bu araçtan yararlanılarak çalışmada kullanılan dizi ile en yakın ilişkili diziler belirlenir [62].

Filogenetik ağacı oluşturmak için birçok algoritma kullanılmaktadır. Tindall ve arkadaşlarının 2010'da gerçekleştirdikleri çalışmada da önerildiği gibi organizmalar arasındaki genetik mesafeyi hesaplamak için bakteri sistematiklerinde en sık kullanılan ve kullanımı tavsiye edilen parametre, 1969 yılında Jukes ve Cantor tarafından önerilen ve kendi isimleriyle anılan parametredir. Jukes-Cantor modelinde tüm nükleotit pozisyonlarında bağımsız değişimin olduğu ve bu sebeple diğer üç bazın birbirine dönüşümünde eşit olasılık olduğu kabul edilmektedir. Yani, değişim oranlarının tüm konumlar boyunca eşit olduğunu, değişimlerin rastgele ve nükleotit sıklığının 0.25 olduğunu, dizi içinde ekleme ya da çıkarma meydana gelmediğini, her bir değişimin başlangıç nükleotitinden bağımsız olduğunu varsaymaktadır [62-63].

Bir uzaklık matrisinin oluşturulmasını takiben ikinci aşama, bu filogenetik uzaklıkların ilişkilerini anlamlı bir gösterime dönüştürülmesidir. Kümeleme analizine benzer, ultrametrik olmayan, toplumsal ağaç oluşturmak için farklı bir algoritma kümesi olan Neighbor-joining (NJ) algoritması en popüler olanıdır. Kümeleme analizinde olduğu gibi bu algoritma bir uzaklık matrisi ile başlar fakat ikinci oran düzeltilmiş matrisin oluşturulması ile farklılık gösterir [62]. NJ yöntemi genetik mesafe (distance) matrisinden faydalanarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntemdir. Filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul eder [64].

Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA); Aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıklandırılmamış eş karşılaştırma yöntemi gibi kümeleme analizleri filogenlerin yeniden oluşturulması için en temel yaklaşımlardan biridir.. Yöntem filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının sabit olduğunu kabul eder ve dalların köklerini esas alarak kümeleme gerçekleştirir [63]. Uzaklık yöntemlerinde en çok kullanılan Maksimum-parsimoni (tutumluluk) ve Maksimum Likelihood (en çok olabilirlik) metodlarıdır. Maksimum-parsimoni ‘en basit çözüm en doğru olandır’ prensibine dayanır. Bu prensip, moleküler veri cinsinden gözlenen dizi verisini açıklamak için kullanılır. Maksimum-parsimoni (tutumluluk) metodu muhtemel ağaç topolojileri içinde en parsimonik ağacı bulmak için kullanılır. Tüm değişim sayısının en az olduğu ağaç en parsimonik olandır ve filogenetik olarak en yakın çıkarsama tutumluluğu oluşturmaktadır [64]. Maksimum Likelihood metodunda maksimum-parsimoni metodunda olduğu gibi belirli sayıdaki alternatif ağaçları değerlendirmek için en çok olabilirlik ölçütünü kullanır. Maksimum Likelihood algoritması, her bir düğümdeki her bir özelliğin ortaya çıkma olasılığının çarpımının hesaplamasını kullanır ve bu hesaplamalardan elde edilen sonuçlarla ağaç topolojisindeki dizi verilerinin uyum sağlama olabilirliğini arttırmaktadır [62, 63].

Ağaçların güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılan yaklaşımlardan biri seç-bağla (bootstrapping) olarak adlandırılan yöntemdir. Seç bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Çalışmada kullanılan dizinin baz çifti kadar yeni bir dizi oluşturmak için bu pozisyonlardan birini rastgele seçer, bunu yeni dizinin ilk ögesi yapar ve seç bağla testine başlar. Daha sonra rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur ve bu ekleme orijinal verinin boyutu elde edilene kadar devam eder. Daha sonra yeni veri seti filogeni hesaplamak için kullanılır. Yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belirli bir dalın ortaya çıkma yüzdesi hesaplanır. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, o dalın gerçekte var olduğuna dair güven artmaktadır. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir [64, 65].

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı Kırıkkale-Kızılırmak'ın deterjan kirliliği açısından durumunun belirlenmesi, deterjan kirliliği gösteren bölgelerden deterjan degrade eden bakterilerin izole edilmesi, izole edilen bakterilerin tanımlanması ve degradasyon yeteneklerinin belirlenerek potansiyel oluşturan suşların moleküler karakterizasyonlarının yapılmasıdır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması ve büyüme eğrilerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. MSM agar besiyeri; KH_2PO_4 (3.5 g), K_2HPO_4 (1.5 g), NH_4Cl (0.5 g), NaCl (0.5 g), Na_2SO_4 (0.14 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.15 g), agardan (10 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121°C 'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin DNA izolasyonu ve protein izolasyonu deneylerinde kullanılmıştır. Nutrient broth besiyeri; pepton (5 g), et özütünden (3 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121°C 'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Koloni oluşturan birim sayımında kullanılmıştır. Plate count agar besiyeri; tripton (5 g), maya özütü (2.5 g), glukoz (1 g) ve agardan (12 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C 'de 1 atm basınçta steril edilmiştir.

2.1.1.4. Deterjan Sanayi Atık Su Örneklerinin Toplanması

Deterjan sanayisine ait olan atık su örneği Ankara İvedik organize sanayi bölgesindeki deterjan üretimi yapan sanayi kuruluşundan temin edilmiştir (Şekil 2.1.). Alınan atık suyun sterilizasyonu için 0.2 µm'lık filtre (Milipore, Almanya) ile steril kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık suyu örnekleri

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.2.1. Deterjan Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

2.1.2.1.1. SDS Çözeltisinin Hazırlanışı

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür. 0.2 µm'lık filtre (Milipore, Almanya) ile steril edilmiştir.

2.1.2.1.2. Deterjan Standart Çözeltisinin Hazırlanışı

Alınan su örneklerinde deterjan miktarının tayini için; sırasıyla 2, 4, 8 ve 10 mg SDS tartılarak 1000 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2. NaCl Çözeltisi (5 M, 100 mL)

29.2 g NaCl tartılarak, 100 mL distile su ile çözülmüştür.

2.1.2.3. Metilen Mavisi Stok Çözeltisinin Hazırlanışı (5 mL)

0.025 g metilen mavisi tartılarak 5mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.4. % 70'lik Etanol (100 mL)

30 mL distile su ile 70 mL % 100'luk etanol ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.5. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL)

8.47 g Tris-HCl tartılarak 50 mL distile suda çözülmüştür ve pH 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.6. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlanışı

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tampon tamamlanmıştır.

2.1.3. DNA İzolasyon Kitinde Kullanılan Kimyasallar

İzolasyonda Bacterial Genomic Miniprep DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

2.1.4. Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler

İzolatların 16S rDNA gen dizisini PZR yöntemi ile çoğaltarak dizi analizini yapmak amacı ile kullanılan primerler ve özellikleri verilmiştir.(Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	T _m (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyal, düz	48	[74]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	[75]

F, forward; R, reverse

2.1.5. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.5.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH₂PO₄, K₂HPO₄, 1000 mL)

6.8 g KH₂PO₄ ve 8.7 g K₂HPO₄ tartılarak 1000'er mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 7.0'ye ayarlanmıştır.

2.1.5.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülerek pH 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.6. Native-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Native-PAGE jel elektroforezinde kullanılan stok solüsyonlarının hazırlanışı belirtilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Native-PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı

Stok solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24.2 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 8.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Tris-HCl, 1 M	12.1 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 6.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Gliserol (% 50)	50 mL %100'lük gliserol alınıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Bromfenol mavisi (% 1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılarak, 10 mL saf su içinde çözülmüştür.

2.1.7. Native-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

Native-PAGE jel elektroforezi için kullanılan çalışma solüsyonları belirtilmiştir (Çizelge 2.3). Native - PAGE için kullanılan bütün stok solüsyonlar ve çözeltiler +4°C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.3. Native-PAGE solüsyonlarının hazırlanışı

Çalışma solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A % 30 akrilamid % 0,8, bisakrilamid (100 mL)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözümüştür.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH=8.8) 75 mL, 25 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 50 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
Amonyum persülfat % 10'luk (5 mL)	0.5 g amonyum persülfat tartılıp saf su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır.
Elektroforez tamponu (1L)	3 g Tris (25µM), 14.4 g glisin (192 mM) tartılarak saf su ile 1 L tamamlanmıştır.
Örnek tamponu (5x) 10 mL	0.6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 mL % 50 gliserol; 0.5 mL 2-merkaptolanol, % 1 Bromfenol mavisi 1 mL; 2.9 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.

2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12)

Ayırıcı jelin hazırlanması için kullanılan solüsyonlar belirtilmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

Ayırıcı jel solüsyonları	Miktarları
Solüsyon A (Stok)	7.8 mL
Solüsyon B (Stok)	6 mL
Saf su	10.08 mL
Amonyum persülfat	79.2 µL
TEMED	15.6 µL

2.1.9. Dengeleyici Jelin Bileşimi (% 4)

Dengeleyici jelin hazırlanması için kullanılan solüsyonlar belirtilmiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması

Dengeleyici jel solüsyonları	Miktarları
Solüsyon A (Stok)	1.13 mL
Solüsyon C (Stok)	2 mL
Saf su	4.67 mL
Amonyum persülfat	27 µL
TEMED	7.5 µL

2.1.10. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

% 0.1 Commassie Brilliant Blue boya tartılarak, % 12'lik glasiyal asetik asit ve % 50'lik metanol ile karıştırılarak çözülmüştür.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı ve Su Örneklerinin Toplanması

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [68]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m³/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18.4 m³/sn ve en çok 1.673 m³/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.2.). Nehir üzerinde 12 önemli baraj vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı,

Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altinkaya ve Derbent'dir [69].



Şekil 2.2. Kızılırmak [69]

Çizelge 2.6. Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları

Bölge No	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı	39° 23' 53,41''K, 33° 25' 18,44''D, 775 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98''K, 33° 24' 56,99''D, 819,5 m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60''K, 33° 23' 25,53''D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39 ''K, 33° 24' 00,99''D, 801 m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39° 32' 26,97''K, 33° 23' 59,54''D, 760 m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02''K, 33° 24' 38,51''D, 750,5 m
7	Sulubük - Kıybağı Mevkii	39° 37' 04,85''K, 33° 26' 11,19''D, 771 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39' 42,39''K, 33° 27' 13,46''D, 766,5 m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62''K, 33° 28' 59,95''D, 741 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08''K, 33° 27' 42,27''D, 718,5 m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92''K, 33° 28' 07,85''D, 706,5 m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25''K, 33° 25' 04,24''D, 699,5 m



Şekil 2.3. Su örneği alınan istasyonların Google Earth görüntüsü.

2.2.2. Su Öneklerinde MBAS Yöntemiyle Deterjan Analizi

Bu tez kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2014 yılı boyunca üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinde SDS konsantrasyonları araştırılmıştır. Alınan su örneklerindeki SDS miktarının belirlenmesi amacıyla Metilen Mavisi Aktif Maddeleri (MBAS) anyonik deterjan tayin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem metilen mavisinin anyonik yüzey aktif maddelerle reaksiyonu sonucu oluşan mavi renkli tuzun kloroformda çözülmesiyle spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır [34]. Metilen mavisini % 0.5 oranında distile suda çözülerek bir stok boya çözeltisi hazırlanacak ve fotokimyasal bozulmayı en aza indirmek için kahverengi bir şişede muhafaza edilmiştir. Metilen mavisini stok boya çözeltisi, 0.7 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.2.) ile 100 kat seyreltilmiştir. Temiz cam tüplere 0.5 mL seyreltilmiş boya çözeltisi, 1 mL örnek ve 3 mL kloroform eklenerek 7 sn vortekslenmiştir. Ardından tüpler 3 dk boyunca 2 g'de oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan iki fazın karışmaması için 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1 mL kloroform fazından kuartz ya da cam küvete alarak 652 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Su örneklerindeki SDS konsantrasyonu standart SDS ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden

yararlanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar mg/L olarak verilmiştir. Alınan su örneklerinde bölgelere göre ortalama sıcaklık ve pH ölçümleri alınmıştır.

2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu

SDS degrade eden bakterilerin seçimi için karbon kaynağı olarak 1.5 mM SDS sülfat ve KH_2PO_4 3.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, Na_2SO_4 0.14 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L içeren MSM sıvı besiyeri (pH 7.1.) kullanılmıştır. 12 farklı bölgeden alınan su örnekleri % 5 oranında besiyerine inoküle edilip ve ekim sonrası erlenler 30°C 0.15 g'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra sıvı kültürden 1.5 mM SDS içeren ve % 2 agar ile hazırlanmış olan basal salt medium ortamlarına ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiştir. Seçici ortamdan izole edilen farklı koloniler saflaştırma için aynı ortamda tekrar kültüre edilmiştir [70]. Katı besiyerinde büyütülen saf suşların koloni morfolojisi ve gram özellikleri belirlenmiştir.

2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen SDS Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi

SDS degrade eden suşların MTK değerleri, petrilerde koloni görülmeyene kadar MSM agar plağında her gün 1 g/L artan konsantrasyonda SDS eklenerek saptanmıştır. Başlangıç konsantrasyonu, literatür bilgilerine göre belirlenmiştir. Son konsantrasyonda büyüyen kültür, çizgi metoduyla petriye ekilerek daha yüksek konsantrasyona aktarılarak MTK değerleri bulunmuştur.

2.2.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

İzole edilen suşların iki gecelik taze kültür örnekleri 1 g/L SDS içeren 100 mL'lik MSM sıvı besiyerleri çalkalamalı etüvde 30°C'de inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede dalga boyu 600 nm'ye ayarlanarak her 6 saatte bir ölçümleri

alınmıştır. Elde edilen optik density (OD) değerleri ile üreme eğrileri oluşturulmuştur.

2.2.6. Bakterilerin Deterjan Sanayi Atık Suyundaki Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

İzole edilen her bir suş için deterjan sanayi atık su örnekleri (100mL) steril edilerek ve steril edilmeden üç tekrarlı olacak şekilde ekim yapılarak 30°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. 6 saat aralıklarla alınan örnekler spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri ile üreme eğrileri çıkarılmıştır.

2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı (CFU)

Her bir suş için gecelik kültürlerden 100 µL alınarak 1 g/L SDS içeren MSM sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 6 saatte bir 1 mL örnek alınıp seyreltme yapılarak plate count agarlara ekilmiştir. 2 günlük inkübasyon sonrası koloni oluşumu gözlemlenmiş ve sayılmıştır [69].

2.2.8. SDS Degradasyon Oranlarının Belirlenmesi

Her bir suş için gecelik kültürlerden 100 µL alınarak SDS içeren MSM sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 6 saatte bir 1 mL örnek alınıp Metilen Mavisi Aktif Maddeleri (MBAS) anyonik deterjan tayin yöntemi kullanılarak SDS degradasyon miktarı belirlenmiştir.

2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen SDS degrade eden bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Bacterial Genomic Miniprep DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak yapılmıştır. 15 mL'lik kültür 1.35 g'de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 180 µL Lyse T eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 20 µL RNAaz A eklenerek 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekledikten sonra 20 µL proteinaz K eklenerek 30 dk 55°C'de bekletilmiştir. Örnekler alınıp 200 µL Lizis Solusyon C koyup karıştırılmıştır, % 95 lik etanol ekleyip vortekslenmiştir. Yeni tüplere alınarak 1dk 7 g'de santrifüj edilmiştir. Örnek üzerine 500 µL yıkama solusyonu 1 eklenmiş ve karıştırılıp 1 dk 7 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar yeni tüpe alınıp 500 µL yıkama solusyonu eklenir 3 dk 15 g santrifüj edilmiştir. Son olarak 200 µL Elution Solution eklenmiş 5 dk bekletilip 15.g 1dk santrifüj edilmiştir ve -20°C'de saklanmıştır [71].

2.2.10. PZR ve Optimizasyonu

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'[66] ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'[67] kullanılmıştır. Primerlerin Tm özellikleri ve literatür verileri baz alınarak bir PZR programı belirlenmiş ve bu program kullanılarak PZR reaksiyonun genomik DNA, MgCl₂ miktarı ve farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimizasyon yapılmıştır. Optimum PZR reaksiyon içeriği ve programları aşağıdaki gibidir. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S forward primer (20 pmol), 5 µL 16S reverse primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl₂, 10 µL 10x Taq Buffer, 61.5 µL saf su, 0.5 µL (2.5 U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp pipetaj yapılmıştır. Tüplerin thermal cyclus da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekildedir; 5 dk 95°C de ön ısıtma, 95°C'de 30 sn 30 döngü denatürasyon, 30 sn 55°C'de primerlerin bağlanması, 2 dk 72°C'de uzama ve 10 dk 72°C'de zincir sentezinin

gerçekleştirilmesi şeklindedir. Suşların 16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 100 bp Plus DNA Ladder marker olarak kullanılmıştır. PZR ürünleri jelde görüntüledikten sonra sekans analizi yapılabileceği kadar -20°C'de saklanmıştır [72].

2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması

PZR ürünleri GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, ABD) ile saflaştırılmıştır. Eppendorf tüplerin içinde bulunan PZR ürünlerinin üzerine 1:1' lik bir hacimde Binding Buffer eklenmiştir. İyice karıştırılıp çözümün rengini kontrol edilmiştir. Sarı renk DNA bağlayıcı için optimum pH'ı göstermektedir. Çözeltinin rengi turuncu ya da mor olursa, 10 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2) çözeltisi ilave edilmelidir. Karışımın rengi tekrar sarıya dönecektir. Karışım filtreli tüpe alınıp 1 dk 1.25 g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtrelerin tam ortasına 700 µL Wash Buffer konulmuştur. Tekrardan 1 dk 1.25 g' de santrifüj edilmiştir. PZR ürünleri filtre üzerinde tutulmuştur. Altta toplanan sıvı dökülüp tekrardan 1.25 g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolon filtresinin alt kısmına steril eppendorf yerleştirilmiş ve üzerine 50 µL Elution Buffer ilave edilmiştir. 1dk 1.25 g'de santrifüj edilmiştir. Kolon filtresi atılmış ve saflaştırılan PZR ürünleri eppendorfta toplanmıştır.

2.2.12. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizlerin Yapılması

İzole edilen bakterilerin PZR ürünlerinin sekans analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center of Biotechnology Information'ın internet sayfasındaki BLAST programı kullanılarak NCBI GenBank veritabanında yayımlanan sekanslarla karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz için PZR, 16S rDNA sekansları gen bankasından seçilen ilk 15 tür ile oluşturulmuştur. Bakterilerin filogenetik ağaçların oluşturulmasında 16S rDNA sekansları, Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) istatistik analiz programında Clustal W seçeneği kullanılarak türlere ait baz

dizileri hizalanmıştır [73]. NJ metodu ile soy ağaçları çizilmiştir ve oluşturulan soy ağaçları ile izolatların birbirleriyle yakınlık dereceleri ortaya konulmuştur.

2.2.13. Primer Tasarımları ve *sdsA* Geni Analizlerinin Yapılması

2.2.13.1. *sdsA* Geni için Primer Tasarımlarının Yapılması

sdsA geninin kodladığı alkil sülfataz proteinleri National Center of Biotechnology Information (NCBI)' da tespit edilmiştir. Farklı *Pseudomonas* türlerine ait 6 alkil sülfataz dizisi seçilip Clustal W aracılığıyla hizalanarak dizilerin ortak bölgeleri belirlenmiştir ve Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) programı ile primer tasarımı yapılmıştır.

2.2.13.2. *sdsA* Geni Analizlerinin Yapılması

Suşlarda *sdsA* geni analizi yapmak için Shahbazi ve arkadaşları [70], Chatuverdi ve Kumar [74] arkadaşlarının belirlediği primer dizileri kullanılmıştır. Ayrıca NCBI' da belirlenen dizilerin ortak bölgesi Vector NTI Express programı aracılığıyla primerler elde edilmiştir. Bu primerler arasından primer tasarım kuralları göz önünde bulundurularak en uygun primer seçimi yapılmıştır. Chatuverdi ve Kumar [74] 'ın yaptığı PZR koşulları uygulanarak *sdsA* gen bölgesi çoğaltılmıştır. PZR sonucunda elde edilen DNA'ların boyutları 50 ve 100 bp'lik marker ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.14. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektrofrezisi

% 1'lik agaroz jel 50 mL 1x TBE tamponu ile çözüldükten sonra 5 µL Olerup SSP GelRed Dropper Bottle boya eklenerek hazırlanmıştır. Her bir örnekten 6 µL alınarak 2 µL 6X Orange Loading Dye ile boyanmıştır. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA O'RangeRuler™ 100

bp DNA Ladder yüklenmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu eklenmiştir. 80 V/cm² voltaj ve 40mA amper uygulanarak yaklaşık 45 dk'da yürütme işlemi tamamlanmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, ABD) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır [68].

2.2.15. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonu

İzole edilen SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz enzimi protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları [75] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Bakteriler 50 mL NB besiyerinde 24 saat 30°C' de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası besiyeri, santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 5 mL distile su eklenerek 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır, üst kısım atılmıştır. Pellet üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dk 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2 g' de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım temiz tüplere alınmıştır. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tampon ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dk bekletilip -20°C'de saklanmıştır.

2.2.16. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Alkil sülfataz enzim aktivitesi için kullanılacak hücre ekstraktlarının protein konsantrasyonu Qubit Fluorometre cihazı (Invitrogen, ABD) ile ölçülmüştür. Alkil sülfataz enzim aktivitesinde ilk olarak optimum pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir. Yaklaşık 0.72 mg/mL protein ihtiva eden 50 µL hücre ekstraktı üzerine 450 µL 50 mM Tris-HCl ve 500 µL 100 mM SDS ilave edilip belli pH ve sıcaklık aralıklarında 48 saat inkübe edilerek, MBAS deneyi ile enzim aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık aralığı belirlenmiştir. Daha sonra alkil sülfataz enzimi için belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşulları doğrultusunda alkil sülfataz enzimi için optimum enzim konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre yaklaşık 0.72 mg/mL protein ihtiva eden 50 µL hücre ekstraktı üzerine belli konsantrasyonlar da SDS ve

450 µL 50 mM Tris-HCl ilave edilip 48 saat inkübe edilmiştir. Ortamda kalan SDS konsantrasyonu MBAS deneyi ile ölçülmüştür [74].

2.2.17. Alkil Sülfataz Enzimi Protein Native-PAGE Analizi

2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması

16.7 mL % 30'luk akrilamid/bis akrilamid, 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 µL %10'luk amonyum persülfat (APS), birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin) ilave edilerek, 1 mm aralığına sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı bütanol ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir [4].

2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması

3.4 mL % 30'luk akrilamid/bis akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 µL %10'luk APS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 µL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki bütanol distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve 80 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 1 saat yürütülmüştür [4].

2.2.17.3. Native-PAGE Jellerinin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller tespitleme çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisinde ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk aralıklarla yıkanarak [76], fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

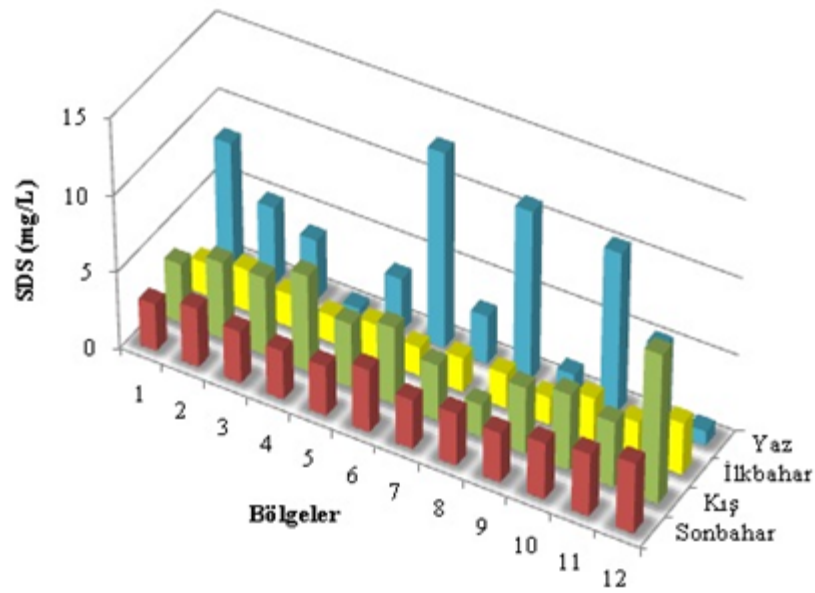
2.2.17.4. Zimografi Analizlerinin Yapılması

Protein izolasyonu sonucu elde edilen hücre ekstratlarının aktif ve inaktif form lokasyonunu belirlemek için Native-PAGE jel elektroforezinde yürütülmüştür. Hazırlanan 20 mM SDS üzerine 1 M Tris-HCl ilave edildikten sonra oluşan solüsyon elektroforez işlemi tamamlanan jeller üzerine ilave edilip, 30°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda jel üzerine 1 damla alkol damalatılarak bantların belirginleşmesi gözlemlenmiştir [74].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Kırıkkale-Kızılırmak Suyu Deterjan Analizi

Kırıkkale-Kızılırmak'tan 2014 yılında mevsimsel periyotlarla alınan su örneklerinin deterjan kirliliği analiz sonuçlarına göre nehrin çevresindeki yerleşim bölgeleri dikkate alınarak deterjan konsantrasyonunun tüm istasyonlar için Dünya Sağlık Örgütü teşkilatı tarafından belirlenen 1.5 mg/L'nin üzerinde olduğu ve nehrin ortalama deterjan miktarı ise 4.07 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu istasyonların Akkoşan Merkez, Sulubük Kıybağı ve Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii bölgeleri bu tez kapsamında ele alınmıştır. Bu bölgelerin yaz ve bahar ayında ortalama sıcaklık değeri 25°C, ortalama pH 7.5 olup sonbahar ve kış aylarında ise ortalama sıcaklık değeri 7°C, ortalama pH 7.6 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Kırıkkale-Kızılırmak suyu deterjan analizi

3.2. Deterjan Kirliliği Gösteren Sulardan SDS Degrade Eden Bakterilerin İzole Edilmesi

Alınan su örneklerinden belirli konsantrasyonda SDS içeren MSM katı besiyerine ekimler yapılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Akkoşan Merkez, Sulubük Kıyıbağı ve Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii bölgelerinden SDS degrade eden 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlar SDS4 SDS7, SDS10-2 ve SDS10-3 olarak kodlanmıştır ve MTK değerleri sırasıyla 65, 20, 15 ve 55 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. SDS degrade eden bakteriler için belirlenen MTK değerleri

Bölge / Suş	SDS (g/L)																
	0.5	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7/7-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10/10-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10/10-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

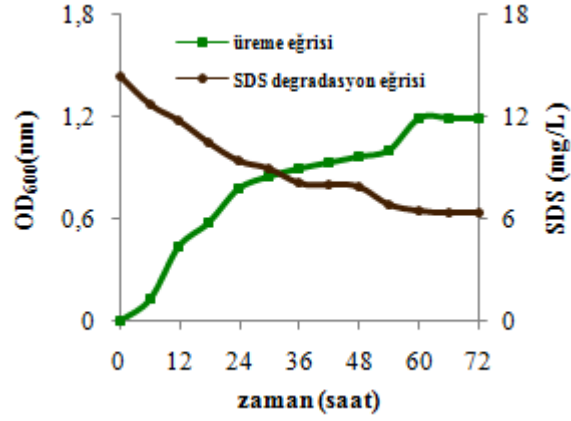
(+), üreme var; (-), üreme yok

3.3. Bakterilerin Laboratuvar Besi Ortamında ve Deterjan Sanayisi Atık Sularında SDS Degrasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzole edilmiş olan suşların laboratuvar besi ortamında ve deterjan sanayisi atık suyunda SDS degradasyon oranları belirlenmiştir.

3.3.1. Deterjan Sanayi Atık Suyunda Kendiliğinden Olan SDS Degrasyonu

Deterjan sanayisi atık suyu degradasyonunda. atık suda bulunan mikroorganizmalar 66 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 6.4 mg/L'ye düşürerek % 56 oranında degradasyon gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.2).

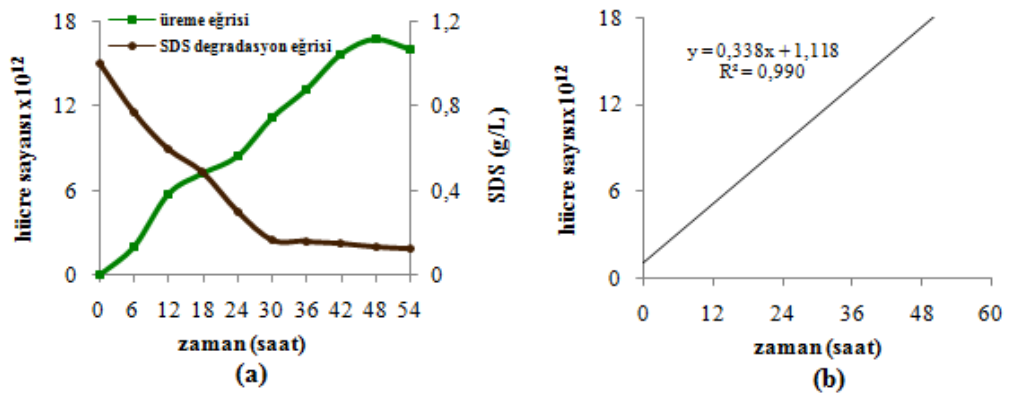


Şekil 3.2. Deterjan sanayisi atık suyunda kendiliğinden olan SDS degradasyonu

3.3.2. SDS4 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.2.1. SDS4 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS4 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda 17×10^{12} bakteri, ortamdaki SDS'yi 1 g/L den 0.13 g/L 'ye düşürerek % 86 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).

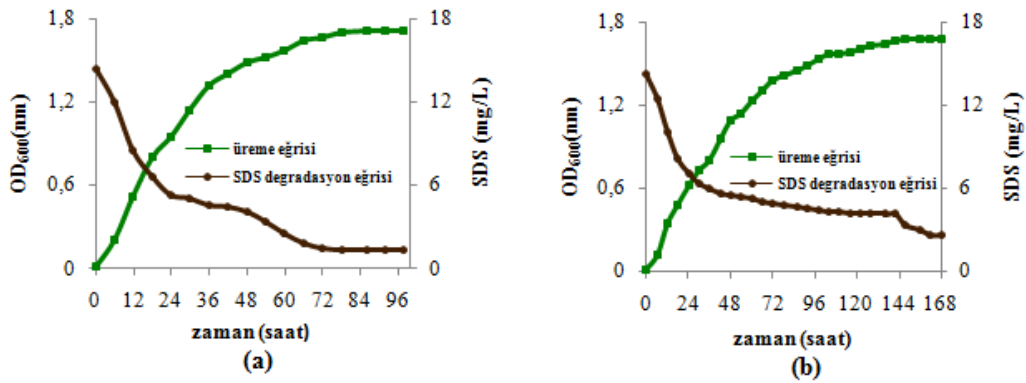


Şekil 3.3. SDS4 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.2.2. SDS4 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS4 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 78 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 1.3 mg/L'ye düşürerek % 91 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.4).

SDS4 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 162 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.3 mg/L'den 2.6 mg/L'ye düşürerek % 82 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.4).

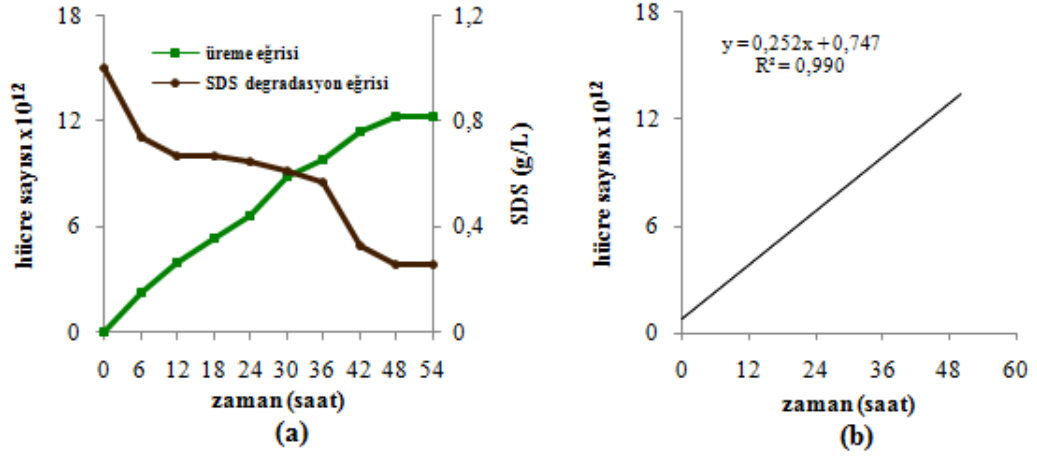


Şekil 3.4. SDS4 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.3. SDS7 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.3.1. SDS7 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS7 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda 12×10^{12} bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L den 0.25 g/L 'e kadar düşürerek % 75 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).

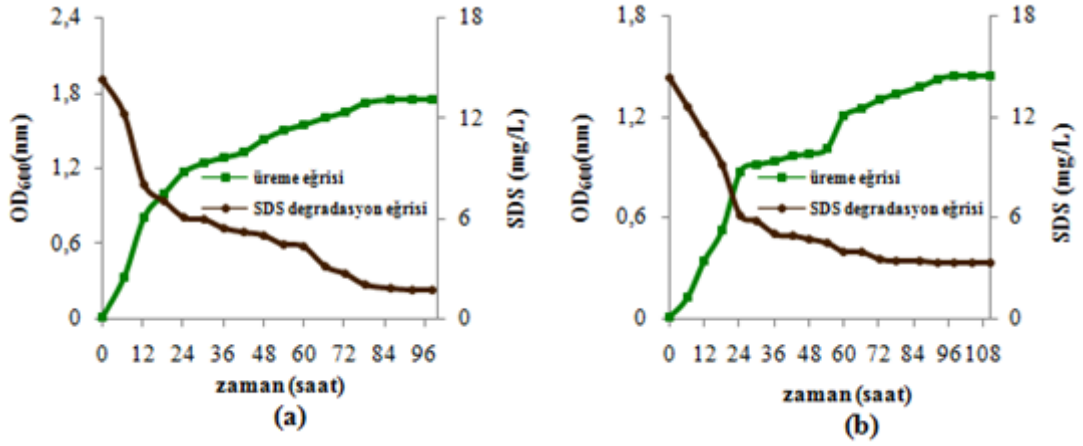


Şekil 3.5. SDS7 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.3.2. SDS7 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS7 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 92 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14,4 mg/L'den 1,7 mg/L'ye düşürerek % 88 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.6).

SDS7 suşunun steril deterjan sanayi atık su ortamında 92 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14,3 mg/L'den 3,3 mg/L'ye düşürerek % 77 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).

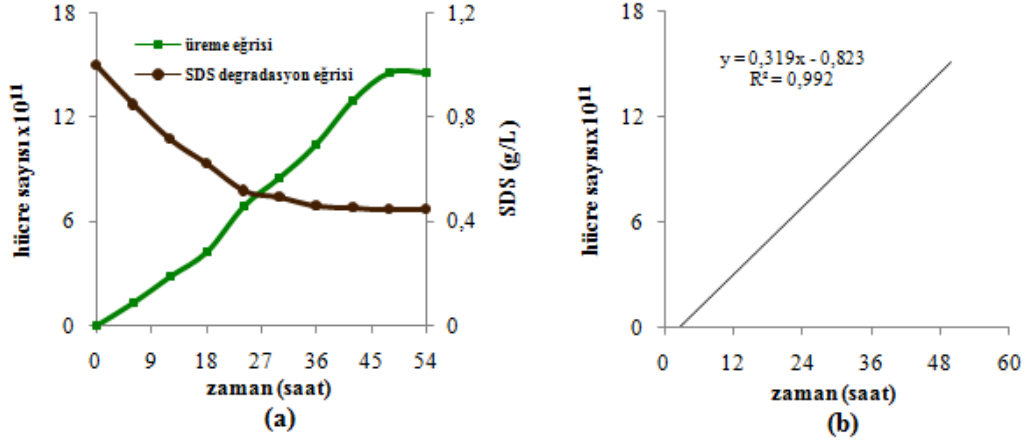


Şekil 3.6. SDS7 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.4. SDS10-2 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.4.1. SDS10-2 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS10-2 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda 15×10^{11} bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L'den 0,45 g/L'ye düşürerek, % 55 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).

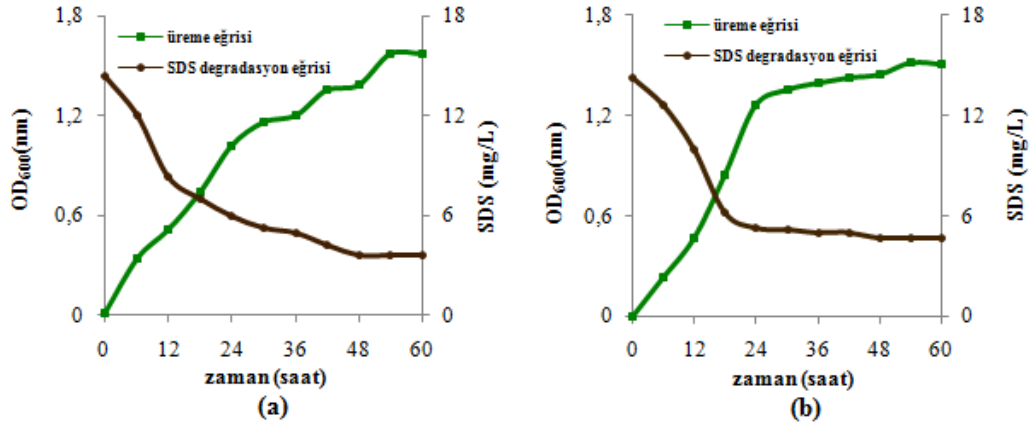


Şekil 3.7. SDS10-2 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.4.2. SDS10-2 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS10-2 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 48 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 3.6 mg/L'ye düşürerek, % 75 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.8).

SDS10-2 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 48 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.3 mg/L'den 4.7 mg/L'ye düşürerek, % 67 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).

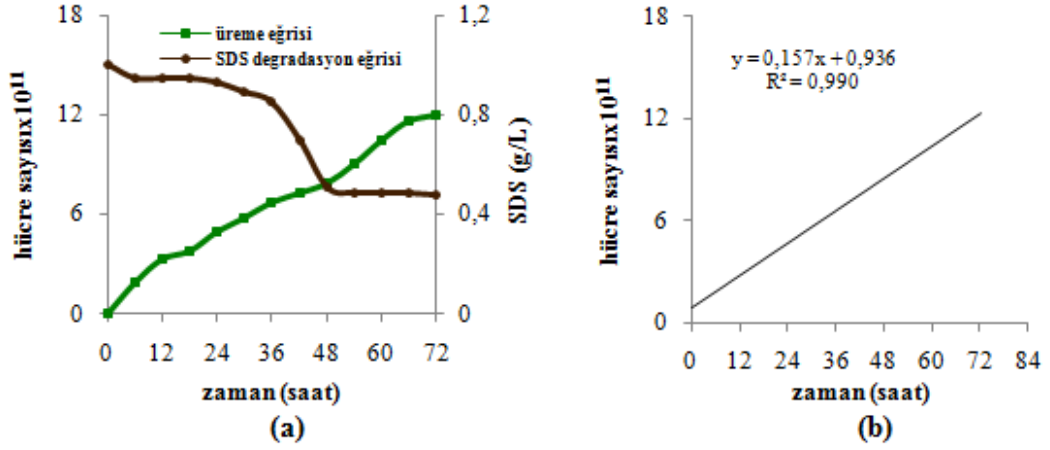


Şekil 3.8. SDS10-2 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.5. SDS10-3 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.5.1. SDS10-3 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS10-3 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 66 saat sonunda 15×10^{11} bakteri, ortamdaki SDS'i % 52'nı gidererek 1 g/L den 0,48 g/L 'ye düşürerek, % 52 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.9).

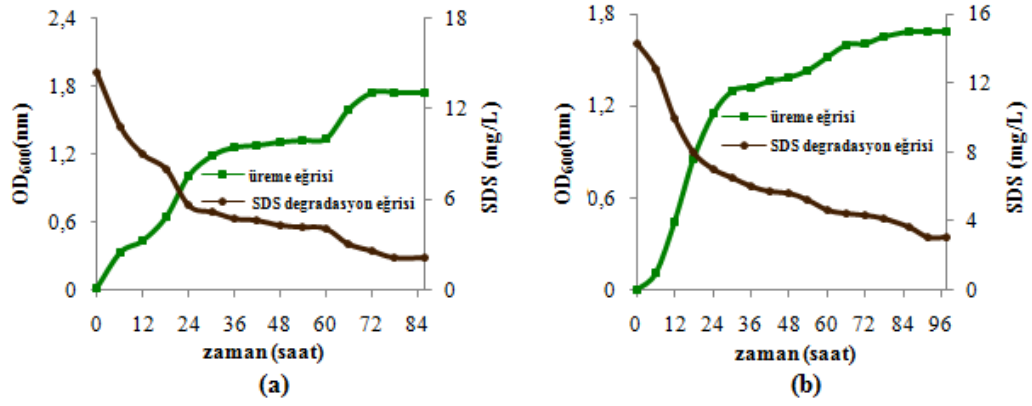


Şekil 3.9. SDS10-3 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.5.2. SDS10-3 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS10-3 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 78 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14,4 mg/L'den 2,1 mg/L'ye düşürerek, % 85 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.10).

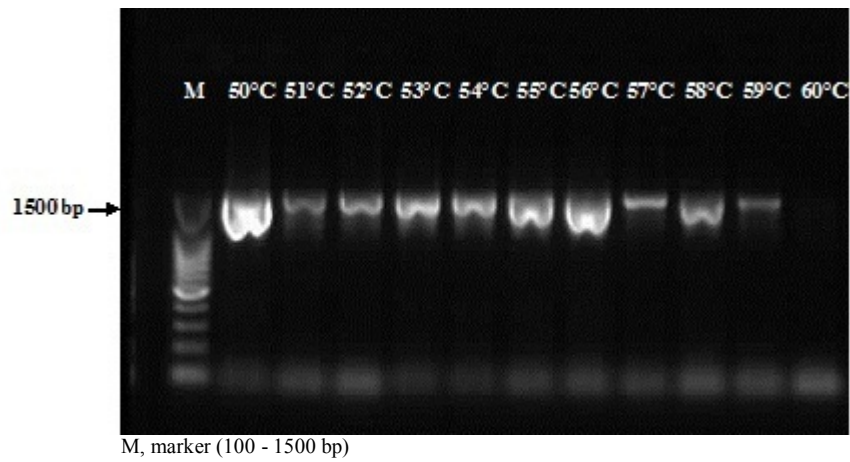
SDS10-3 suşunun steril deterjan sanayi atık su ortamında 92 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14,3 mg/L'den 3,1 mg/L'ye düşürerek, % 78 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. SDS10-3 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

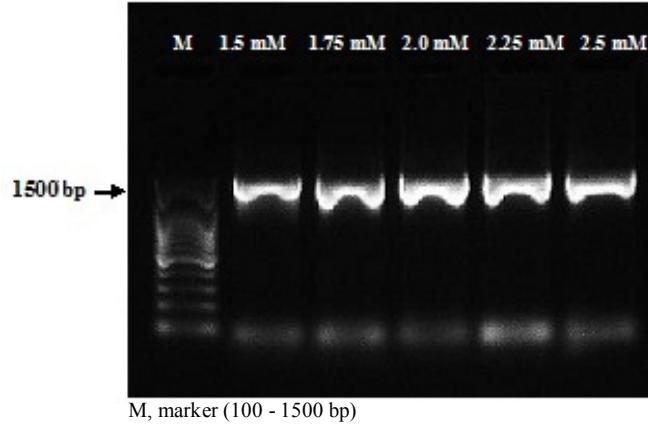
3.4. SDS4 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

16S rDNA bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.11). SDS4 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 55°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS4 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. SDS4 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS4 suşuna ait PZR ürünleri

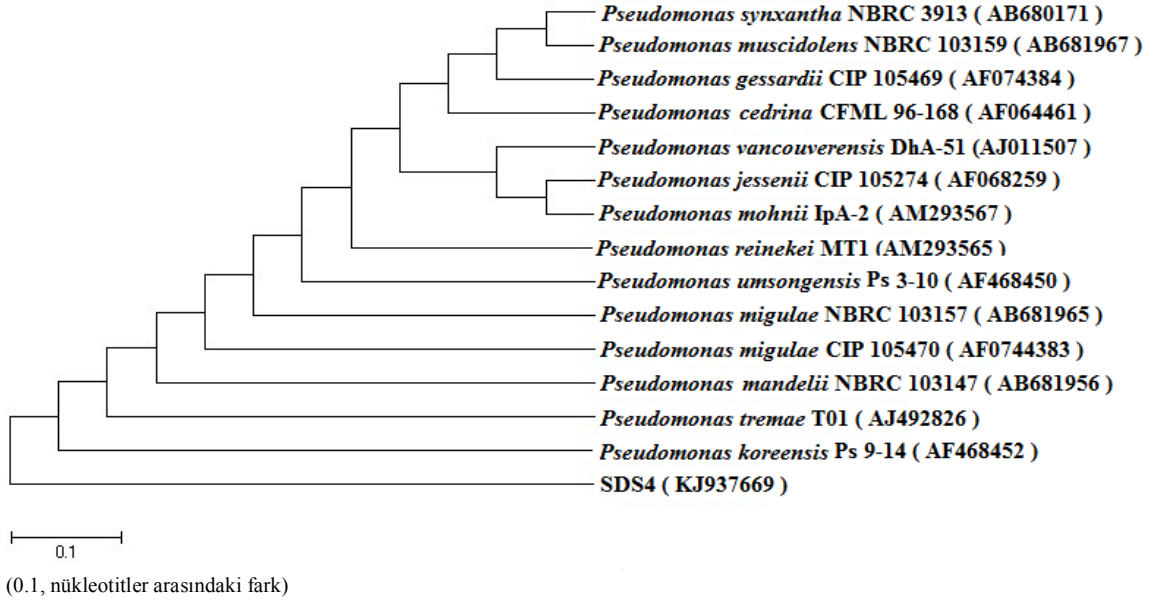
3.4.1. SDS4 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS4 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.2.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS4 kodlu suş % 97 oranında *Pseudomonas koreensis* (accession number KJ937669) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.2. SDS4 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. SDS4															
2. <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	1,036														
3. <i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	1,049	0,003													
4. <i>Pseudomonas vancoverensis</i> DhA-51	1,054	0,004	0,001												
5. <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	1,054	0,004	0,001	0,000											
6. <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	1,049	0,003	0,000	0,001	0,001										
7. <i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	1,049	0,003	0,000	0,001	0,001	0,000									
8. <i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC 3913	1,080	0,009	0,006	0,008	0,008	0,006	0,006								
9. <i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470	1,049	0,003	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,006							
10. <i>Pseudomonas mucidolens</i> NBRC	1,080	0,010	0,008	0,009	0,009	0,008	0,008	0,001	0,008						
11. <i>Pseudomonas mohnii</i> IpA-2	1,054	0,004	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,008	0,001	0,009					
12. <i>Pseudomonas tremae</i> TO1	1,046	0,006	0,009	0,010	0,010	0,009	0,009	0,015	0,009	0,017	0,010				
13. <i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198	1,094	0,011	0,009	0,010	0,010	0,009	0,009	0,008	0,009	0,009	0,010	0,018			
14. <i>Pseudomonas gessardii</i> CIP 105469	1,070	0,010	0,008	0,009	0,009	0,008	0,008	0,001	0,008	0,003	0,009	0,017	0,009		
15. <i>Pseudomonas mandelii</i> NBRC 103147	1,060	0,008	0,005	0,006	0,006	0,005	0,005	0,011	0,005	0,013	0,006	0,006	0,014	0,013	-

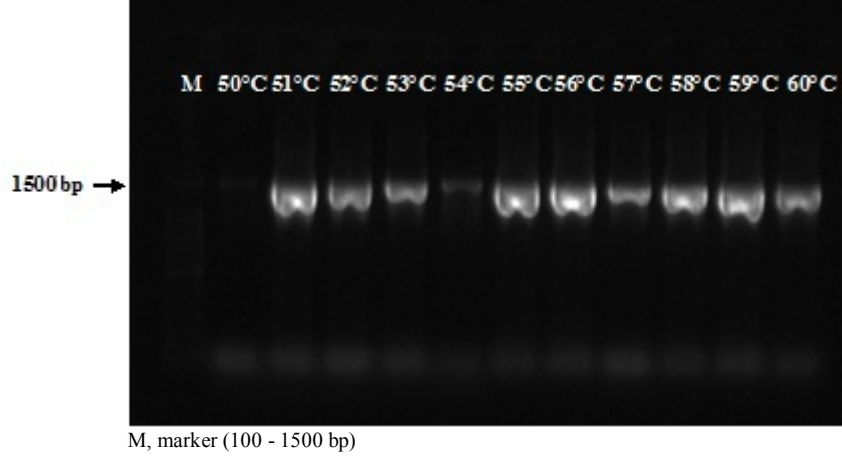
16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.13). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS4 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas koreensis* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



Şekil 3.13. SDS4 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

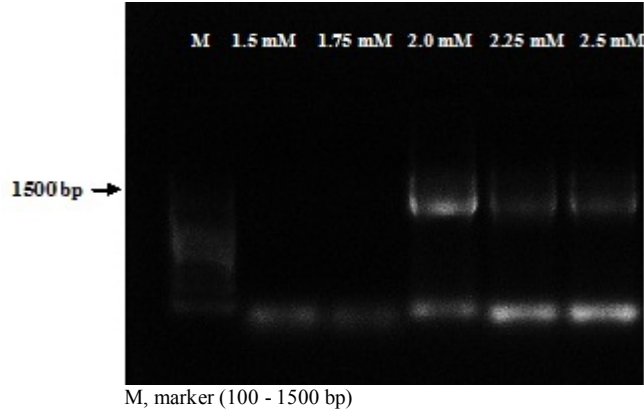
3.5. SDS7 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi

16S rDNA bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.14). SDS7 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir



Şekil 3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS7 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir (Şekil 3.15). SDS7 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir.

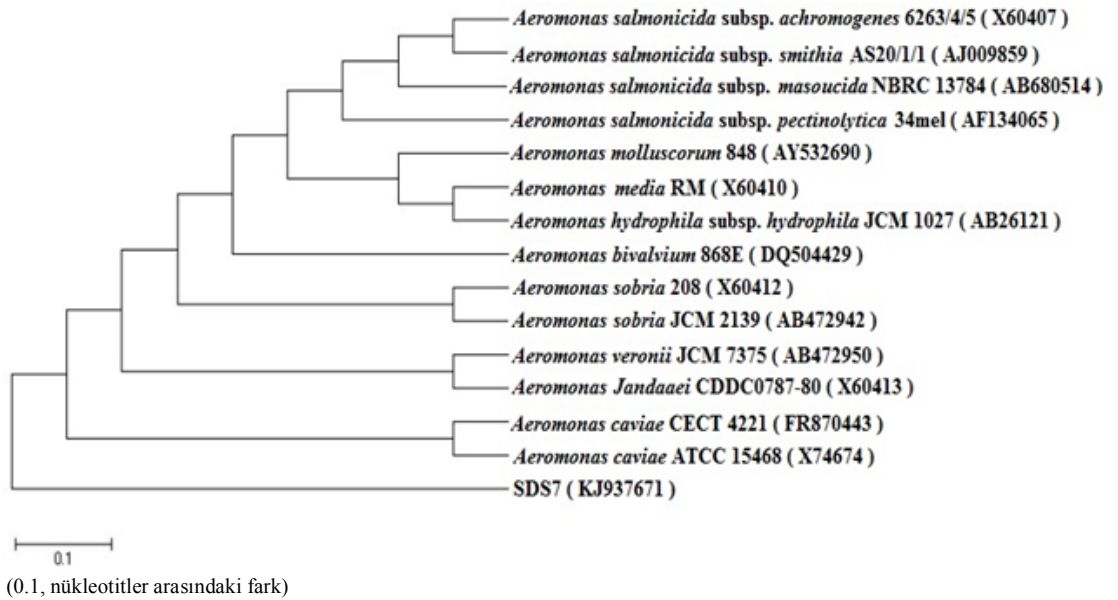


Şekil 3.15. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS7 suşuna ait PZR ürünleri

3.5.1. SDS7 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS7 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir (Çizelge 3.3.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS7 kodlu suş % 97 oranında *Aeromonas veronii* (accession number KJ937671) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.16). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS7 kodlu suş evrimsel açıdan *Aeromonas veronii* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



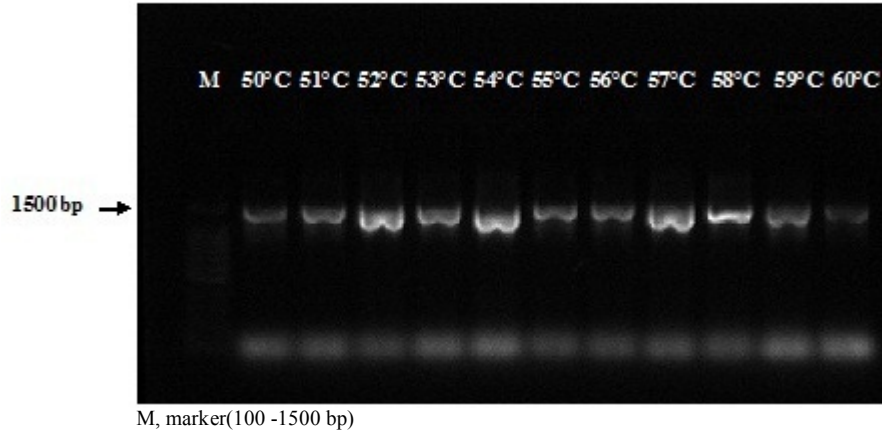
Şekil 3.16. SDS7 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

Çizelge 3.3. SDS7 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. SDS7															
2. <i>Aeromonas veronii</i> JCM 7375	1,038														
3. <i>Aeromonas Jandaei</i> CDC0787-80	1,026	0,004													
4. <i>Aeromonas sobria</i> 208	1,025	0,010	0,012												
5. <i>Aeromonas media</i> RM	1,038	0,019	0,022	0,015											
6. <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	1,035	0,018	0,021	0,014	0,003										
7. <i>Aeromonas sobria</i> JCM 2139	1,025	0,010	0,012	0,000	0,015	0,014									
8. <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoa</i> NBRC	1,021	0,012	0,016	0,005	0,011	0,009	0,005								
9. <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	1,021	0,012	0,016	0,005	0,011	0,009	0,005	0,000							
10. <i>Aeromonas caviae</i> CECT 4221	1,022	0,017	0,012	0,014	0,013	0,012	0,014	0,018	0,018						
11. <i>Aeromonas bivalvium</i> 868E	1,034	0,013	0,016	0,008	0,013	0,013	0,008	0,009	0,009	0,018					
12. <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	1,033	0,015	0,019	0,008	0,014	0,011	0,008	0,003	0,003	0,020	0,011				
13. <i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468	1,022	0,017	0,012	0,014	0,013	0,012	0,014	0,018	0,018	0,000	0,018	0,020			
14. <i>Aeromonas molluscorum</i> 848	1,025	0,013	0,017	0,008	0,009	0,006	0,008	0,003	0,003	0,019	0,007	0,005	0,019		
15. <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinoltica</i>	1,021	0,013	0,017	0,006	0,012	0,010	0,006	0,001	0,001	0,019	0,010	0,004	0,019	0,004	-

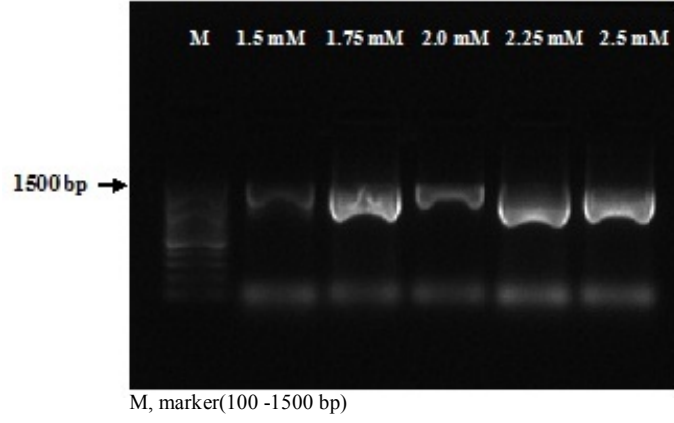
3.6. SDS10-2 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.17). SDS10-2 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-2 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir (Şekil 3.18). SDS10-2 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir



Şekil 3.18. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında SDS10-2 suşuna ait PZR ürünleri

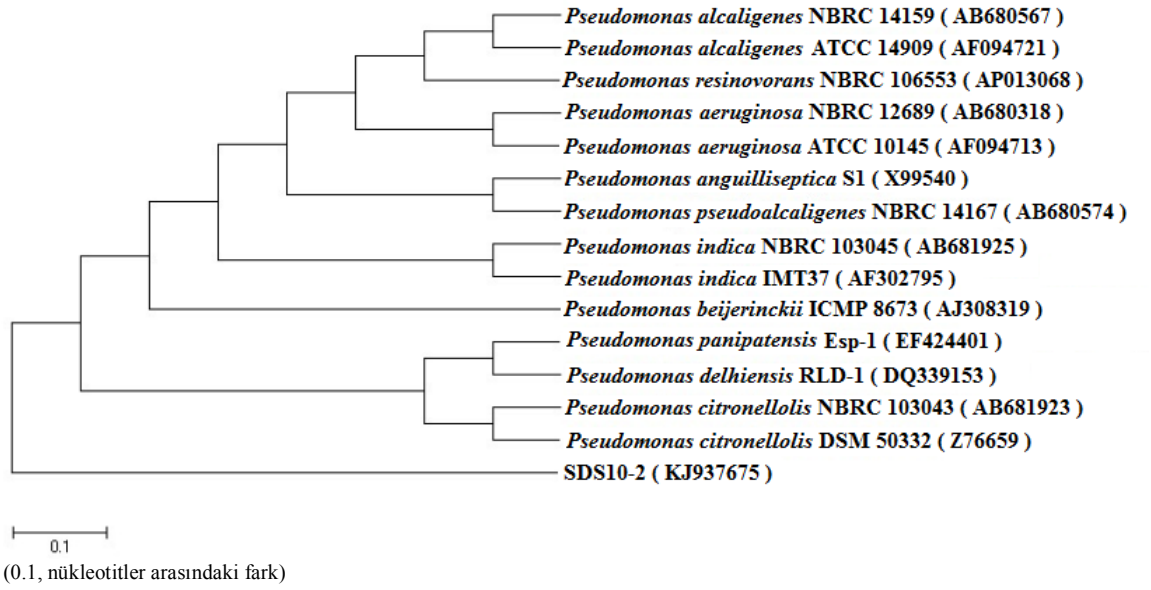
3.6.1. SDS10-2 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS10-2 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir (Çizelge 3.4.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS10-2 kodlu suş % 93 oranında *Pseudomonas resinovorans* (accession number KJ937675) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.4. SDS10-2 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. SDS10-2															
2. <i>Pseudomonas resinovorans</i> NBRC 106553	1,147														
3. <i>Pseudomonas alcaligenes</i> ATCC 14909	1,150	0,000													
2. <i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC 14159	1,150	0,003	0,003												
5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	1,177	0,013	0,013	0,010											
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	1,177	0,013	0,013	0,010	0,000										
7. <i>Pseudomonas indica</i> NBRC 10345	1,167	0,030	0,030	0,033	0,022	0,022									
8. <i>Pseudomonas panipatensis</i> Esp-1	1,150	0,052	0,052	0,049	0,047	0,047	0,053								
9. <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> S1	1,160	0,019	0,019	0,022	0,024	0,024	0,035	0,057							
10. <i>Pseudomonas citronellolis</i> NBRC 10343	1,167	0,050	0,050	0,047	0,046	0,046	0,055	0,001	0,055						
11. <i>Pseudomonas indica</i> IMT37	1,184	0,035	0,035	0,038	0,027	0,027	0,004	0,058	0,039	0,060					
12. <i>Pseudomonas delhiensis</i> RLD-1	1,154	0,055	0,055	0,052	0,050	0,050	0,057	0,003	0,060	0,004	0,061				
13. <i>Azotobacter beijerinckii</i> ICMP 8673	1,157	0,039	0,039	0,042	0,038	0,038	0,035	0,039	0,041	0,038	0,039	0,042			
14. <i>Pseudomonas citronellolis</i> DSM 50332	1,167	0,050	0,050	0,047	0,046	0,046	0,055	0,001	0,055	0,000	0,060	0,004	0,038		
15. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> NBRC	1,170	0,021	0,021	0,024	0,021	0,021	0,038	0,049	0,019	0,047	0,042	0,052	0,033	0,047	-

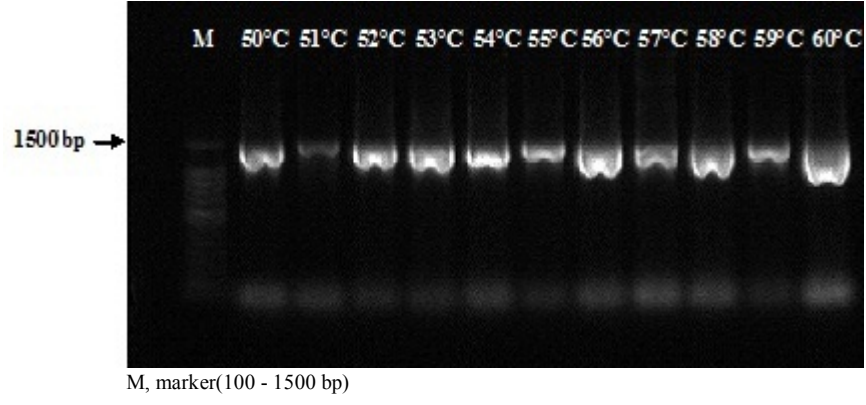
16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.19). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS10-2 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas resinovorans* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



Şekil 3.19. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram

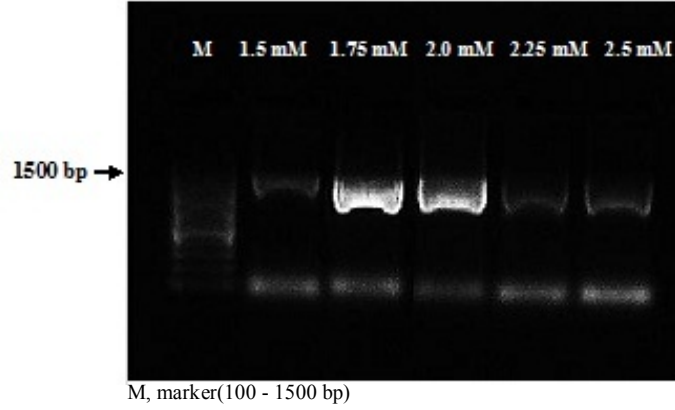
3.7. SDS10-3 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.20). SDS10-3 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 55°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-3 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir (Şekil 3.21). SDS10-3 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir.

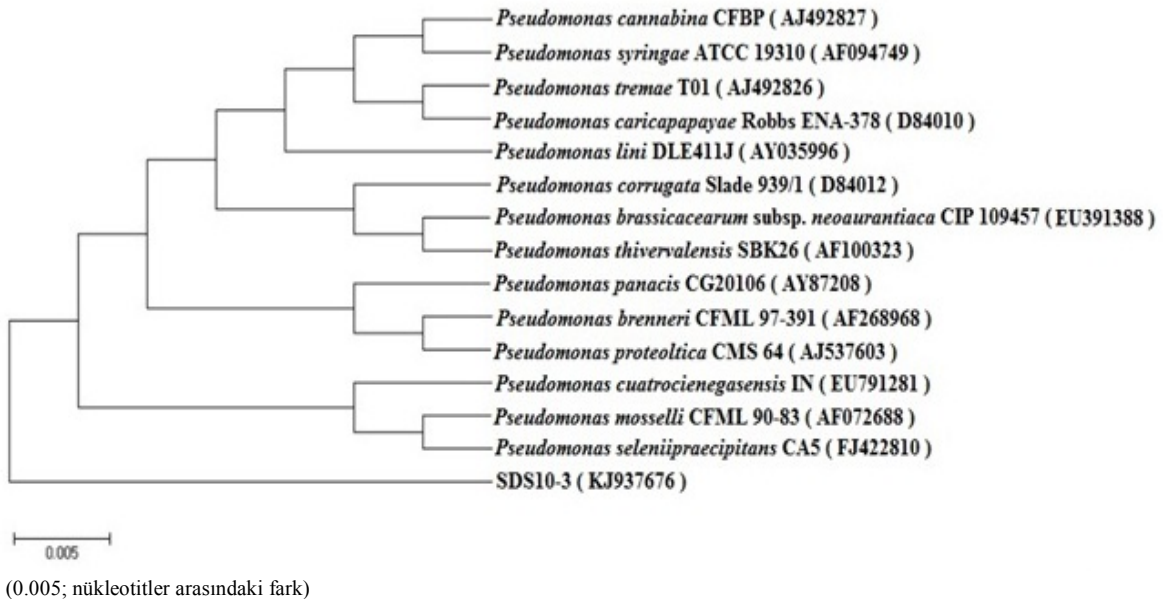


Şekil 3.21. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS10-3 suşuna ait PZR ürünleri

3.7.1. SDS10-3 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS10-3 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.5.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS10-3 kodlu suş 93% oranında *Pseudomonas corrugata* (accession number KJ937676) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joiningtree oluşturulmuştur (Şekil 3.22). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS10-3 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas corrugata* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



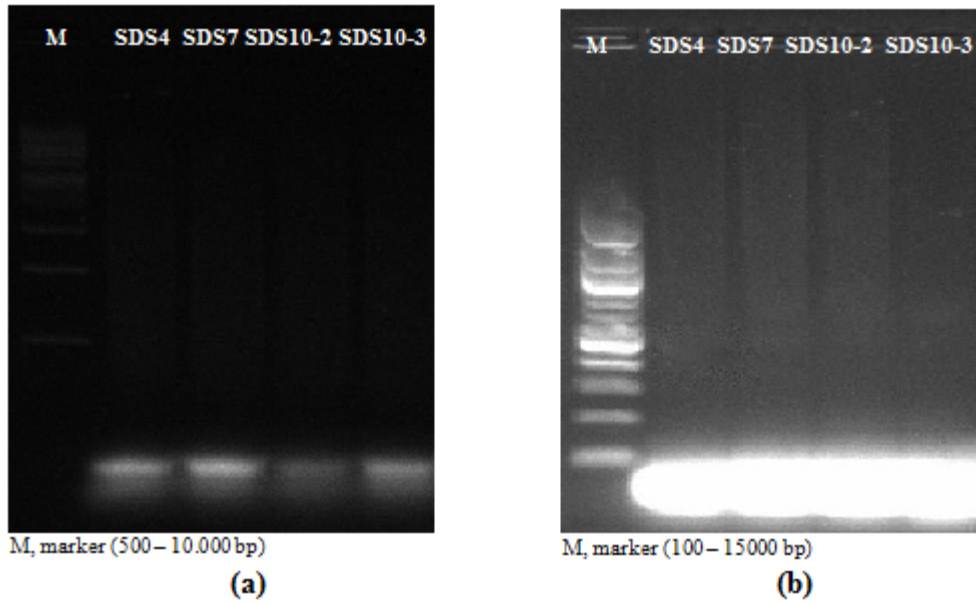
Şekil 3.22. SDS10-3 kodlu suşa ait neighbourjoining metoduyla oluşturulan dendrogram

Çizelge 3.5. SDS10-3 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. SDS10-3															
2. <i>Pseudomonas corrugata</i> Slade 939/1	0,039														
3. <i>Pseudomonas cuatrocienegasensis</i> 1N	0,045	0,020													
4. <i>Pseudomonas lini</i> DLE411J	0,045	0,015	0,026												
5. <i>Pseudomonas brenneri</i> CFML 97-391	0,045	0,020	0,026	0,018											
6. <i>Pseudomonas proteolytica</i> CMS 64	0,045	0,020	0,026	0,018	0,000										
7. <i>Pseudomonas cannibina</i> CFBP 234	0,047	0,017	0,020	0,009	0,024	0,024									
8. <i>Pseudomonas tremae</i> TO1	0,047	0,013	0,020	0,013	0,024	0,024	0,007								
9. <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	0,047	0,007	0,026	0,011	0,020	0,020	0,018	0,015							
10. <i>Pseudomonas panacis</i> CG20106	0,047	0,022	0,028	0,022	0,005	0,005	0,026	0,026	0,024						
11. <i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19310	0,047	0,017	0,020	0,011	0,024	0,024	0,002	0,005	0,018	0,026					
12. <i>Pseudomonas caricapapayae</i> Robbs ENA-378	0,047	0,015	0,020	0,013	0,024	0,024	0,007	0,004	0,017	0,026	0,005				
13. <i>Pseudomonas mosseli</i> CFML 90-83	0,051	0,026	0,024	0,024	0,024	0,024	0,026	0,026	0,024	0,028	0,026	0,026			
14. <i>Pseudomonas thivervalensis</i> SBK26	0,045	0,09	0,024	0,015	0,022	0,022	0,022	0,020	0,005	0,026	0,022	0,022	0,022		
15. <i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i> CA5	0,51	0,026	0,020	0,032	0,024	0,024	0,026	0,026	0,032	0,026	0,026	0,026	0,019	0,030	

3.8. *sdsA* Geni Analizlerinin Yapılması

Shahbazi ve arkadaşları [70], Chatuverdi ve Kumar [74] *sdsA* geni için kullandıkları primerler SDS degrade eden suşlar için tespit edilememiştir. SDS degrade eden 4 suş için; F 5'-GAC GGC CAT ATG AGC CGT CTG CTT GCA CTC CTG-3' R 5' – GCG CAG ATC TGC CTT CGG ACT TCG CCG CCG GCG T-3' (1977 bp) [74], F 5' – GTC TAC ACC CAC TTC CAC CCG G- 3' R 5'-GTG GCG GCA GCT TGA CCT TGA CCT TCT C- 3' (672 bp) [70] (Şekil 3.23) Primer çiftleri kullanılmış olup, primerlerin çalışmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.23. Farklı iki primer (1977 ve 672 bp) kullanılarak yapılan *sdsA* gen analizleri; 1977 bp (a) ve 672 bp (b).

3.8.1. *sdsA* Geni için Primer Tasarımı

NCBI’ da belirlenen *sdsA* geninin kodladığı alkil sülfatazların hizalanması sonucunda 311 bp uzunluğunda ortak alkil sülfataz gen bölgesi elde edilmiştir (Şekil 3.24). Elde edilen ortak alkil sülfataz gen bölgesinden Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) primer tasarım programı ile basamak basamak pirimer tasarlanmıştır (Şekil 3.25).

<i>P.aeruginosa</i> PAO1	ATGAG-----CCGTCT-G---CTTGC-----ACTC-CTGG	25
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	ATGTC-----CCGTTCA---TTCGC-----GCCAGCCAG	27
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----	
<i>P. stutzeri</i>	ATGAA-----CCTGCCCT---ATCGCT-----GGATGCTAACCCAG	32
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ATGAAATTGAATGCCCTATCG---ACCGCAACGCATGGGAGCCGGTCAT	46
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATGACA---AATCCATATCAGCGCATCGC-----GTTATATTC	35
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CGC-----TCGCCCGCTG-----CTCGCC-GGCG	49
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CGCCGCACAC-----TGCTCGCCACCCTG-----ATCGCC-GCCA	61
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----TG-----ATCGA--GGCG	11
<i>P. stutzeri</i>	CACC-----TTGTTGCTACTCAGTGCATGCAGCGAC-GGC	66
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CTCCAGTCAAATTATGGAAATTCAGCACTTCGTTCTG-CTTGCC-GCAT	94
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTCT-----CTTATTGCTTCA-----TCGATTAGTT	61
	*	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CCGCCGA--AACCACCGC-----GCC-----CAAACCGCCC	78
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CCCTCGCCAGCCGCTGCTGGCTGCAGAGAGCCTGGACAGCAAACCGGCC	111
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CC--CG--AGGGGCTG-----	23
<i>P. stutzeri</i>	CCTGCGCCAGTCAACGC-----GCC-----GCCACGC	94
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CCATCAT--AGTATCTGGT-----CAAAGCTGGGCTGCAGAACAGCT	135
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTGCTGCAGATAATTTAG-----GCGGATTTAAAGAGCCGACT	99
	*	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGTGCCTTCA---CCGTGC--AGGCCAGCGGGGTCGAAGCG---G	118
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	AGCGCCATCA---CCGCCGAAAGAACGCCGAAGTGCTGAAG-----A	151
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----ATCA---TCGTGC-----ACACCGCCGAGTCGGTG-----G	51
<i>P. stutzeri</i>	CACGCACGCAA--GCTGCC-----AGGCCAGGTGGCGCAGAGCTATG	136
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AA-GCCTGCAACGGATGCGACCAAAGCCGCTAACGATGCTTTGCTCAAAG	184
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	GA-ACTGACA---CAGCAAAAAATGCGGCAATGGCCCAATC-----	137
	** * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AATTGCCCTTCGCGCACCAGCGGACTTCGAGCGCGCCGACCGCGCCTG	168
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	ACCTGCCGTTTCGCGCACCAGGAGTTCGAGGCCCAAACCGGGGCTG	201
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ACCAGTCCGCGAAGGTCCTCGCCGAGTTC-----CGCAA--G	86
<i>P. stutzeri</i>	ACCTGAGCCATGTCGA--GGGCCTAGCCAGGCACGC---CGCGCCTA	180
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AGCTGCCATTTGACGACAAGACCTCCTTCGACTTAGCGCACAAGGCTTT	234
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	- ACTTCTTTTCTGCTCAACAAGATTTGCTGACGCAACAAGGGGATTT	186
	* *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	ATC-CGCGCCCGGAGCGGTTACTCATCCGCAACCC---CGACGGCAGCG	214
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	ATCGCGCCGTTTC--AGCGG--GCAGATCAAGAACGC---CGAGGGCCAGG	244
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ATC-----AGCG-----	93
<i>P. stutzeri</i>	ATTGCCACGCCTC-AGGCG---CAGGTGCGCGATGC---CGAAGGCGAAG	223
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ATTGCTCCCTGCTGCAGA-ACCGATCAAAGGCGA---AAAGGGCAATA	280
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATAGCGACCAATGAAGGACA-AGTGATTAATAAAGCAAGCAAGATCGGG	235
	** *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TCGCCTGGCAGCTCGGTGGCTACGACTTCTCCTCGACGGCAA-GCCTCG	263
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TGGTGTGGGACATGGGCGCGTACCAGTTCCTCAACGACAAGGACCGCCG-	293
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----ACAAGCCATC-----AAGGCC---	110
<i>P. stutzeri</i>	TGATCTGGGACTTCGATAGCTTTGCGTTTATCC---AAGGTGAGGCCCC-	269
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	TGATCTGGGACCAAGCAAATATGGCTTTATTAAGAAGGTGAAGCCGCG	330
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TGATATGGGATCTCAATTCTTATCAATTATTAAGGCGA-AAAGCTCC	284
	* * **	

Şekil 3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması.

(*); Ortak sekanslar

P.aeruginosa PAO1 C--GACAGCA-TCAATCCCAGCCTGCAACGCCAGGCCCTGCTCAATCTCA 310
Pseudomonas sp. DSM 6611 C--GACACGG-TCAACCCCAGCCTGTGGCACCAGGCCAGCTGAACAACA 340
Pseudomonas sp.alkylsulfatase -----ATCG-TCTACACCCACTT-----CCA--CCGG---ACCACA 141
P. stutzeri C--ACTACCG-TCAACCCCAGCCTGTGGCGGCAAGCGCTGCTGAATAACC 316
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CCGGACACGA-CCAACCCAAGCTTGTGGCGCAATCTCAACTAATCAATA 379
Legionellafallonii Alkyl T--GCATCAATTAATCCCAGCTTATGGCGTCAAGCAAGACTTAATATGA 331
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 AGTACGGCTTGTTCGAGGT--TGCCGAGGGTATCTACCAGGTGCGCGGCT 358
Pseudomonas sp. DSM 6611 TCGCCGGCCTGTTCGAGGTTCATGCCGAAGCT--CTACCAGGTGCGCGGCT 388
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TCAACGGCGTG---AAGGC-----CT 159
P. stutzeri AGGTTGGGCTGTTCAAAGT--CAGCGACAAAATCTATCAGTACGCGGGCT 364
Pseudomonas sp. S9 PSdsA TTTCTGGCCTGTTTGAAGT--CACCGACGGCATTTACCAAGTCCGCAACT 427
Legionellafallonii Alkyl ATAATGGCCTGTACAAGGT--CACTGATAGGATTTATCAAATTCGTGGT 379
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TCGACTTGGCCAAACATCACCTTCATCCGCGGGGAC-AGCGGTGATCGT 407
Pseudomonas sp. DSM 6611 TCGATCCGGCAACATGACCATCATCGAAGGCGAC-AGCGGTCTGGTGTCT 437
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TCG--TCAGCGAAGAGCA-----GGTGAAGAGCGCGGAGGTGCG 196
P. stutzeri TCGACTTGGCCAAACATGACGCTGATCGAAGGCGAC-AGCGGTGATGTT 413
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ATGACTTGTGCAACATGACCATCGTCAAGGCAAA-GATGGCATCACCAT 476
Legionellafallonii Alkyl TTGATTTATCAAATATGGATATTATCGAAGGTAAT-ACAGGTTAATAT 428
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GGTTCGACACCTTGACCACCCCGCCACCGCCAGGGCGGCTACGAACTGG 457
Pseudomonas sp. DSM 6611 CATCGATACCTTGACCACCGCGAAACCGCCCGCGCCCTCGACTGT 487
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CATCTACGCCAGGAAACC-----CTGCTGG-----ACAACGTCG 231
P. stutzeri CATCGACCCGCTAACCCAGCCGGGAAACCGCCCGCTTCGCTATGGACTTCG 463
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ATTTCGACCCACTGATTTACAAGAAACAGCGAAGGCGCGCTCGACTGT 526
Legionellafallonii Alkyl TGTAGATCCATTAATTAGTGCAGAAACTGCCAAAGCAGGTTTGGATTTAT 478
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TCAGCCGCGAGCTGGGCGA-GAGGCCGATCCGTACGGTATCTACAGCCA 506
Pseudomonas sp. DSM 6611 ATTTCCA-GCACCGACCGAAGAGCCGATCGTCGCGGTGGTCTACAGCCA 536
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TCACCCA-AGGCTCGCTGGTGGGGCCGATCCCTACCATGCGCTCGGGCTA 280
P. stutzeri TTGCACAACATCTGGGCTC-ACGCCCGTGAAGCGGATGATCTTCAGCCA 512
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AC-TACAACATCGGCCGAAAAAACCTGTGGTTGCAGTCACTACACACA 575
Legionellafallonii Alkyl AC-TTTAAACACCGACCTAAAAAGTCCGGTGTTCGAGTATTATACGCA 527
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGCCCACGCCGATCACTTGGAGGCGTGCAGGCTCGGTAGAGCCACAGC 556
Pseudomonas sp. DSM 6611 CAGCCATATCGACCACTTCGGCGGCGCGCGGCATCATCGA--CGAGGC 584
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CA-----GCTTCGGCGTTGCGC-----TCTCCGA--CGAGGA 310
P. stutzeri CAGCCATGTCGATCACTTGGCGGCTGCTTCGGCGTGCATCAG--CGCCCA 560
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CAGCCAGTTCAGCACTACGGCGGCGTGCAGGCTGTTGTCGA--TGAGGC 623
Legionellafallonii Alkyl CAGTCATGTGGATCACTATGGCGGGTTAAAGGTATAGTCAA--TGAAGA 575
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 AGGT-CGCCAG----CGGCGGCTGCAGATCATCGCTCCGGCCGGCTTCA 601
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGA--CGTCAAGGC-CGGCAAGGTGAAGGTCTTCGCGCCGTCGGCTTCA 631
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CAAG-CG-----CGACA--TGAACGCCG--GCCTCGGCCGCT--- 343
P. stutzeri AGA--CGCCAAGGTGCGTCA-GCTACCGGTGATTGCCCCGGCTGGGTTTA 607
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AGA--TGTTAAGGC-CGGCAAGGTTAAGATCTACGCACCGTTAGGTTTCC 670
Legionellafallonii Alkyl TGATGTGACGAAG--GGTAAAGTAAAAATTTATGCGCCGAAGGGATTT 622
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TGGAGGCGGCGATCAAGGAGAACGTCTTGGCCGGCAACGCCATGATGCGC 651
Pseudomonas sp. DSM 6611 TGGAGCATGCCGTCAGCGAGAACATCCTCGCCGGCACCGCCATGGCCCGT 681
Pseudomonas sp.alkylsulfatase -----GGCCACGAGGGCGCTCCACCTTCATCGCC----CCCAC 379
P. stutzeri TGGAAAGAGGCCACAGCGAAAACCTGATGATGGGCATCGCCATGGCCCGC 657
Pseudomonas sp. S9 PSdsA TTGAGCACGCCGTGGCCGAGAACGTTATGGCAGGTACTGCCATGAGCCGC 720
Legionellafallonii Alkyl TAGAAGAGGCCGTAAGTGAAGAAGCTTATGCGGGTAATGCGATGAGTCGT 672
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGCGCCACCTACCAGTACGGCAGCCAACTGCCCAAGGGGCGCAGGGGCA 701
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGCGCCAGTACCAGAGTGGCGTCATGGTGGCCGCGGAGCGCAGGCGCA 731
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CG--ACACCTTCC---GCGACA-----GCC----- 399
P. stutzeri CGTGCCACCTTCATGTACGGCAAGCGCCTACCGCGCAGCGCCGAGGGCCT 707
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CGGGCCAGCTATATGTACGGTAACCTGCTGCGCCAGACGCAAGGGGCA 770
Legionellafallonii Alkyl CGTTCTGTTTATATGTATGGCACTTTTCTACCCCGGAGAAAGAGGCCA 722
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GGTTCGACA-TGGCCATCGGCAAGGGATTGGCGCGCGG-ACCGCTGA-GC- 747
Pseudomonas sp. DSM 6611 GGTTCGACAGCGGCC-TGTTCAAGACCACGGCGCAATGCCACCAATACG 780
Pseudomonas sp.alkylsulfatase --TCGACA-----CCACCAT--- 412
P. stutzeri GGTAGACAACGGCC-TGGGCAAGGCGGTTGCCTTCGGGCACATGGGCATT 756
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ATTAGGCGCTGGTC-TGGTACCACACATCGGCAGG---TACAGTAACG 816
Legionellafallonii Alkyl AGTCGATGCCGGAT-TAGGTAAGACTACTTCAACGGG---TACAGTCACT 768
* *

Sekil 3.24. (Devam)

<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CTGCTGGCGCCGACCCGCTGATCGAAGGCGAGGGCGAGGACCTGGTGCT	797
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CTGGTCGCACCCGAACGTGCTGATCGAGAAGCCCTACGAGCGCCACACCGT	830
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----CGCCGGGC-----TTAAG-----	425
<i>P.stutzeri</i>	CTGC---CGCCACCCAACTGATCGACGGCCGCAACAGACGCTGGACGT	803
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CTGATTCACCAACCAGCATCATCAAAGAAACCGGTGAAACCCACGTAAT	866
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	CTTATTCGCCAACAGATGAAATCAAGCAAACCTGGAGAATAAAAAATAT	818
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GGACGGCGTGCCGTTACCTTCCAGAACACGCGGGCACCGAGTCGCCGG	847
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CGACGGCTCGAGCTGGAGTTCAGCTCACCTGGGCAGCGAAGCGCCAT	880
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----GTGCAGTTC---CTCCA---CGTGCC---CAGCGAGGCGCCGG	459
<i>P.stutzeri</i>	GGATGGAGTGCCTTCGTTCTTACACGTACCCGAGAGTGAAGCCCGG	853
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CGACGGTCTCACTTACGAGTTCATGTATGCGCTGGCAGTGAAGCCCGG	916
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TGATGGAATCGATATAGTATTTCAAATGGCACCTCATACTGAGGCGCCAG	868
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CGGAGATGAACATCTGGCTGCCGCGGCAGAAAGCCCTGCTGATGGCCGAG	897
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CGGACATGAACATCTACCTGCCGCGAGTTCAGGTCCTGAACACCGCCGAT	930
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ACGAAATCGTCTCTACCTGCCGCGCAACCCGCTGCTCATCAGCGCCGAG	509
<i>P.stutzeri</i>	CGGAAATGACCTTACGCTGCCGCGAGCTGAAACGCTTTGGCGCGCCGAG	903
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CGGAGATGCTTACTACATCAAGGAGAAGAAAGCCCTTAAACGCTGAGAA	966
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	CAGAAATGTTAATGTATTTCCCGCAATTCAAAGCATTATGTGCGCGCGAA	918
	** * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	A--ACGTG--GTCGGTACCCTGCACAACCTGTACACCCTGCGCGGCGCCG	943
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	A--ACGCGCGCCGCGCG--ATGCACAACCTGCTCACCCCGCGCGGCGCG	976
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GTGACCCAGGGGCGCG--ACCTGCCAACCTCCACACCTGCGCGGACCA	558
<i>P.stutzeri</i>	CT-ACTCT---CGAAACCTGCACAACCTGTACACCCTACGCGGCGCCA	949
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	G--ACTCC--ACGCATACGCTGCACAATACCTACTCGCTTCGTTGGCGCA	1012
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	G--ATGCA--ACGCATACCTTACATATCTTTTACTTTGCGCGGTGCC	964
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGGTACGTGATGCGCTGGGCTGGAGCAAGTACATCAAC--CAGGCGTGCA	992
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	AAGTGCGCGACGCCAAGGCTGGGCGGCTACATCGACGCCAGC--CTGGA	1025
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	AGTTCCCGGACCCGGTGTGGTGGGCGGAGCTTGAC--AAGC--TGCG	604
<i>P.stutzeri</i>	AGGTACCGGATGCTTGCAGTGGGCGCAACTACATCGACGCCAGC--CGCG	997
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AGATCCGTGACCCACTCGCTTGGTGAAGTACCTCAACG--AAGCACTGAA	1061
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	AAGTAAGGATGCTGCTTCTTGG--TGGAACCGTTAAATGAAACATAGA	1013
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TCGTTTCGGCAGGCGAGCCGAGGTGATGTTGCGGGTGCACAACCTGGCCG	1042
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	AAAATACGGCGACCCGACCGAGCTGCTGATCCAGCAGCACAACCTGGCCG	1075
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GGCCTC-----CAGGCGAGCTGATGGTGGCGTGCACGGCCAGCCGG	648
<i>P.stutzeri</i>	CGCAAGCCGCTGGC--GCCGAGGTGCTGTTCAACCAGCACCCTGGCCAG	1045
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ACTCTGGGCTGATGACGTTCAAGTATGATGATGCCATGCACCACTGGCCG	1111
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATTATTTGGTGATAAGACCGAGGTTGTATTTGCGCAACATCTGGCCCA	1063
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GCTG--GGCAACGCGGAGAT--CGTCGAGGTGC--TGG--AGAAGCAGCGCA	1088
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TCTG--GGCGCGGACAAGTGCCT--ACCTACCTCG--CCGACCAGCGCGA	1121
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TGAGCGGGCGG--GAGAAGT--GGAGGAGTGTGCTGCGCATGACC--CGCGA	694
<i>P.stutzeri</i>	TGTGGGGCGAG--GACAACATCCA--GACCTTCTCA--CCACCCAGCGTGA	1091
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	TGTG--GGCAACAAAGAAGTGCAGGAGCAGTTATCG--CTA--CAACGCGA	1157
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TGTG--GGATAACAAGCGCT--TGTGGAGTTTC--TCG--AGAGTCAGCGTGA	1109
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CCTGTACGGCTACCTGCACGACAGACCCTGCACCTGGCCAACCGAGGGCG	1138
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CATGTACGCTTCTCAACAACCGCGCTGAACCTGATGAACAAGGGCC	1171
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CGCCATCGCTACATCCACGACAGACCCTGCGCTGGATGAACAAGGGCC	744
<i>P.stutzeri</i>	TGCCTACCGCTACCTGCACGATCAAACCTGTTGCGCTGATGAATGCCGGCC	1141
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CATGTACCGCTACATCAATGATGAAACCTTGCCTTAGCGAACAAGGGTT	1207
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTTATATAAGTTTATCCATGATCAAGCATTACGTATGCTCAACCAAGGAT	1159
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TGACCATCGCCAGGTGCACAACCGCC--TGCCTGCGCCCGCAGC--CT	1184
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TGACCCTCCACGAGAT--CGCGGAGAAAGTGAAGCTGCCTGGCGAGCT	1220
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TGACCCCGGACGAGCT---GGTGGAGAAGGTCAAGCTGCC--GCCACCC	789
<i>P.stutzeri</i>	TCACCGCGCGGAGAT--CGCCGAGCAACTGCACCTGCCGCCAGC--CT	1187
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ACACCATGACCGAAAT---CGCGGAGCAGGTGAAACTGCCAAAGAAAAT	1253
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTGTGATGACTGAGAT---TGGCAACATGATGCAATTACCACCGGAGT	1205
	* * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CGACCAG---GAATGGTACGACCGCGCTACCACGGCTCG--GTCAGCC	1228
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	GGACCGG---AAGTGGTACCTGCGCAGCTACTACGGCGCGCTGTCGACC	1266
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TGGCCGGCTACACGCCCTACCTGCGCAGTACTACGGCACC--GTGAAGC	837
<i>P.stutzeri</i>	CGACCGC---ATCTGAACGTGACGACTACTACGGAACCC--TCAAGC	1231
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	TG--CTACA---AAATCTCAACCGCGTTACTACGGCTCAC--TGAATC	1297
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TG--CCAAT---AAGTGGTATAACCGTGATTATTATGGTTCC--GTAAGCC	1249
	* * * * * * * * * * *	

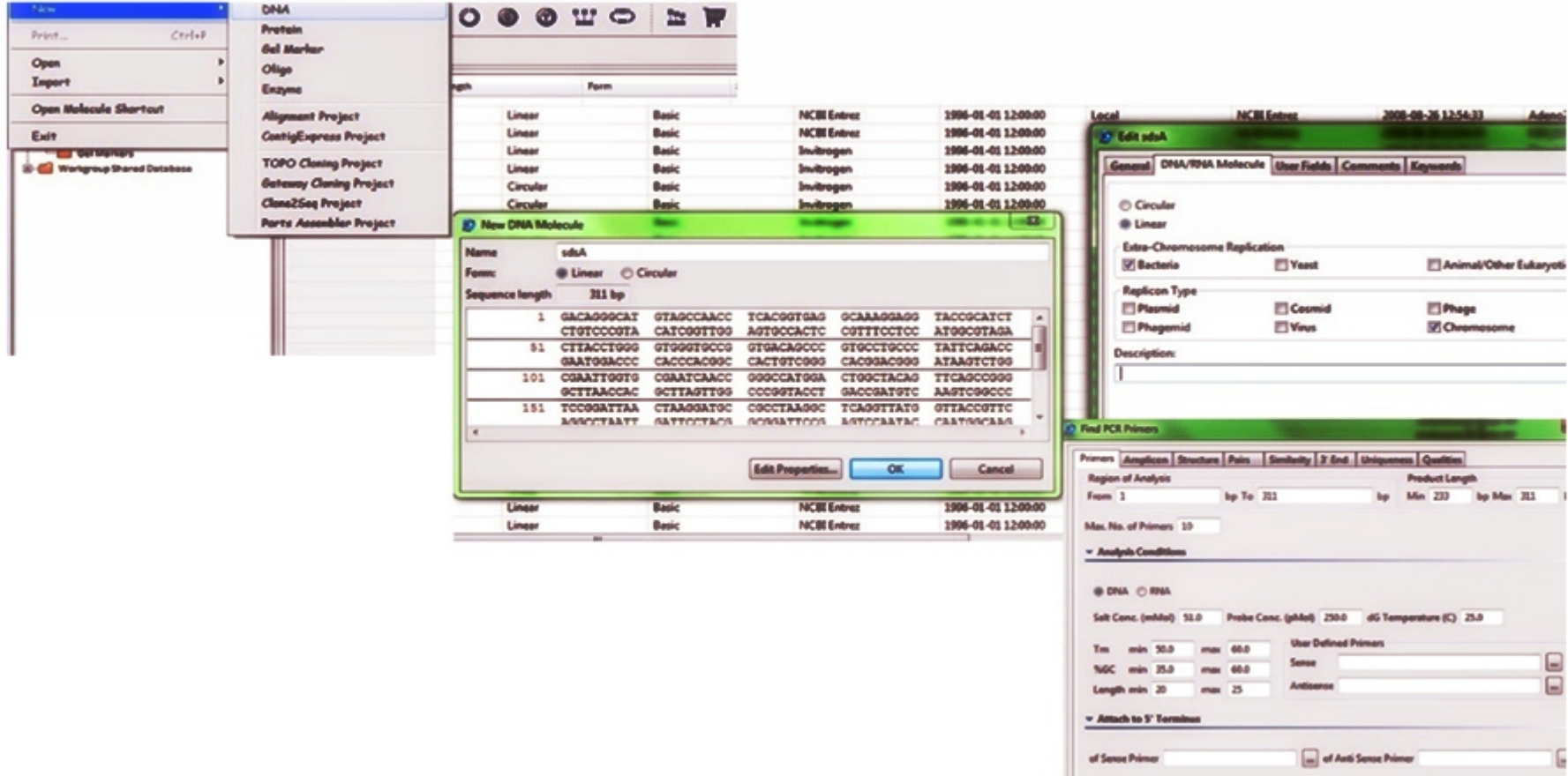
Şekil 3.24. (Devam)

<i>P.aeruginosa</i> PAO1	A--TAACGC--ACGG--GCCGTGCTGAACCGCTACCTGGGCTACTACGAC	1272
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	AACTTGCGC--GCGG--TC--TACC--AGCGCTACCTGGGCTTCTACGAC	1308
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	A--CAGCGT--GCGGCAGATCTACC--AGGGCTACCTGGGCTGGTTCAG	881
<i>P. stutzeri</i>	A--CAACGT--GCGCGCATCTATC--AGTCTACCTAGGCTGGTTCAG	1275
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	A--CAACGTCAAAGCCACTTATGTT---CTGTATCTTGGCTGGTTCATT	1341
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	A--TGATGCTAAGGC--GGTGTATC--AACGTTATTTGGGTTGGTATGAT	1293
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GGCAACCCGGCGACCCCTCGACCCGCTCAGCCCGGAGGAC-TCGGCGGGCC	1321
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GGCAATCCGGCCAACTCGACCCGTTCCCGCCGGTCGAGGCCGGCAAGC-	1357
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GGCGACCCGGTGGACCTCGACCCCATCCCGCCGGCGGAGAAGGCCAGGC-	930
<i>P. stutzeri</i>	GCCAACCCGGCCAACTCGACCCACTGCCCGCCGGTGGCCCGCCGCC-GCCA	1324
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GGCAACCCCGCCACATTTGGGAGCTGCCACCTGCAGACAAGGTAAGC-	1390
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TCTAACCCAGCGCATCTTGACCCGATTATGCCCGTAGAATCGAGCAAAA-	1342
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GCTACGTGGAATACATGGGCGGCGGAGCGCC-TGTTGG-AGCAAGCGC	1369
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GCTACGTGCGAGGCCATGGGCGGCGCCA-CGCGGTGCTCA-AGCAGATGC	1405
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GCTGTGATCGCCCTCATGGGCGGTGCGCA-CAAGGTGCTGATGGCGGCG-	978
<i>P. stutzeri</i>	AGTACGTGGCCCTGGCCGGCGCCGTGAGCCGC-TGCTGGCAGCCGCGCA	1373
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GTTACGTTGAAATGATGGGTGGTGTCTGA-CGCTGTGCTGAAAAAAGCCAA	1439
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	AATATGTTGAGTACATGGGGGAGCTGA-TGCAGTCATTGAAAAAGCCAC	1391
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GGGC-GTCGTACGCCAGGGCGAATACCGTTGGGTGGTCGAGGTGGTCAA	1418
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GCGCCGCCAT-CGACAAGGGCGACTACCGCTGGGCGGTGCAACTGGGCAA	1454
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GCGATGCC-TACCTGAAGGGCGACTGGCAATGGGCGGCCAAGTGTCCGG	1027
<i>P. stutzeri</i>	GCAA-GCC-TATGCCGAGGGCGATTACCGCTGGGCGCGGAGCTGGGCAA	1421
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GGA--GTATTACGACAAAGGTGATTTCCGCTGGGTAGCCGAGGTAGTCAA	1487
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	AGAA-GCA-TACAACAAAGGGGAGTATCGGTGGTTGCTGAGGTGATGAA	1439
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CAGGCTGGTCTTCGCCGAGCCGGATAATCGGGCCGCGCGAGCTGCAGG	1468
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	CCACTGGTCTTCGCCGACCCGGCCAAACAAGGACGCCCGCCCTGCAGG	1504
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CTACGCCATCCGCGTCCGACCCAGCAGCAAACTCGCCCGGACATCAAGG	1077
<i>P. stutzeri</i>	ACATCTGCTCTATGCCGATCCGGACAACCAGGGCGCCCGCATCTGCAGG	1471
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CCATGTGCTCTTGTGTAACCGAACATCAAGCGGCAAAAAATATGCAAG	1537
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TCATGTGTTATCGCCGATCCTAATAATAAAAAAGCACGCGATTGAGG	1489
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CCGACGCCCTGGACAACTCGGCTAC--CAGGCGGAG--AACGCCGGCTG	1514
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	CCGACGCCATGGAAACAGCTCGGTTAC--CAGACCGAG--AACGCCCTG	1550
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CCCGCAGCTTCCGCCGCTGGGCTACGCCAG--CATG--AACATCAACTG	1123
<i>P. stutzeri</i>	CACGCAGCTTCGACAACTGGGCTAT--CAGGCCGAGTCGGGGCC--CTG	1517
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CCGACGCCCTGGAAACAGCTCGGTTAT--CAAGCTGAG--AGCGGCCATG	1583
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	CTGATGCTTTTGAGCAGTTAGGTTAT--CAAACCTGAA--AATCCAACATG	1535
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GCGCAACAGCTACCTCAGCGCCGCTACGAACTGCGCCACGGCGTAC--C	1562
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GCGCAACATGTACATGACCGGGGCAATGGAATGCGCCACGGTGTGC--C	1598
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GCGCAACTGGTACTGATGAGTGCCATGGAGCTGG--AAGGCAAGC--T	1168
<i>P. stutzeri</i>	GCGCAACTTCTACCTGAGTGGCACCTATGAGCTGCGCCACGGCCATG--C	1565
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GCGCAACTTCTACCTACAGGTGCGCAGGAACCTCGCAATGGCGTGCAC	1633
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	GCGTAATGAATATTTAATGGGGCATTGAAATGAGAAATGGGGTGC---	1582
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	G--CGCGACCAGCCGACGATG-AAGGCCGGCAGCGCCGATGCC-TGGC	1607
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GACATATGACT--CCCGCGC--AAGTCCGA-----GATGGGC-CGC-	1635
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	GGAGGGCGACGTGGCGCTGGAA-ATGTCCCGC----CGGGTGGCGCGGC	1213
<i>P. stutzeri</i>	GGAAGAGGGTTTCACTCCGTA-ATGATGCTC-----GATATGCTCAA	1608
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AACTTCCGACAC-CCGATACCGCAAGTCT-----GACACCGTCAA-	1673
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	---CTAAGATCTCAGTTCATTTAGTTCTTCTTCTTCGGATACTATTGC-	1628
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GGCGATGGACACCGGCTGCTGTTGCGACTATCTCGGCG---TGCGCCCTG	1653
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	-GCGTGACTCCCGATATGTTCTTCGACC-TGCTGGCGA---TCCCGCTG	1680
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CTTCTCTCCCGGACATGCTGAAGAACC-TGCCGGCGGCATCTTCTCTG	1262
<i>P. stutzeri</i>	CACACCGCTCCCGAGCGC-TTCTGGACG-TGATGGCCA---CCAAGCTC	1653
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GGCGATGGACTTGGATTGTTCTTCGACT-TCCTGGCCA---TGCCTTTG	1719
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	CGCTATGCTATGGAATGTATCTCGATTATTTAGGAA----TGCCTTTG	1674
	* * * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GA-CGCC--GGCGCTGCG-GAGGGCAAGCGCTGAGCATCAACCTGCGCC	1699
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GA-CACC--GATAAGGCC-GTCGGCCACGACATGACCTCAAC-TGGGTC	1725
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CA-GAACTGGGTGACGCGCATCGACCCGGAGAAGAGCGGCGACGTCGAAC	1311
<i>P. stutzeri</i>	AA-TGGCAGCGCG--GCA-GCCGACAGCGCGCTGCGTATCAACCTCAACT	1699
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AAAGGGCCTGATGTTGC---CGACAAGCAGCATCACTCTCAACCTTGA	1765
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	GA-TGGCCAAAAAGCGCA--AGGTAAGAAAATGAGTATCAATTTAAGCC	1720
	* * * * *	

Sekil 3.24. (Devam)

<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TGCCG-GACATCGGTGAGAACTACCTGCTG-GAACTGAAGAA--CTCGCA	1745
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	TTCGAAGACCTCAAGCAGGACATCGCCCTG-ACCCTGCGCAA--CG-GCG	1771
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	T-----GGCCCTGGGCTTCGCCTTCC-CCG-ACATCGACGAAGCCTGGAC	1354
<i>P.stutzeri</i>	T-CACCGACAGCGGCGCGCTATCACCCTGTGGATCGAGAACGCCGTG--	1746
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	T-TACCGATCTCAAACAGAAGTACACGCTCGAGATGGTAAACGGTGTG--	1812
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	T-CACGGATAAAAAATCAACAATACCGATT-AAATTGCAAAA--TTCAGT	1766
	* * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CCTGAACAACCTGCGC-GGCGTG--CAG---AGCGAGGACGCCGGGCA	1787
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	TGCTGAC--CCAGCGC-GTCG-G---CAGCCTCAACCCGAAGGCCGACGT	1814
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CCTGGAGGTGCGCCGC-GGCGTGGCCAGCTCAAGTCCGG-CATTGACCC	1402
<i>P.stutzeri</i>	-CTGCAT---CACCGC-CGTATG---AATGAAGCGGAAGTCGCCGAGGC	1787
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	-CTCAAC-CACACCGAAGGCATG---CAA---GCTAAGAACGCCGACGC	1853
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ACTG-ATTTATACCGCGAATAAA---AAATTGGAT---AATGCGGATG	1808
	* ** * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GACCGTGAGCATCGACCGGCC-GATC-TCAACCGGCT---GCTGCTCAA	1832
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	CACCGTGAA-GCTGACCAAGCC-CACCCCTCGACCAGATC--GCCGCGCGC	1860
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CGCCGTG-----CCCCTGCGCCTGACCCTCGACAAGC---GCTACCTGG	1443
<i>P.stutzeri</i>	CGAGC-----CCCA-GCCTCAACCTGAGTAAGGACT-TCTTCTTGC	1825
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	GACCGTCAC--CTTAACGCGTGAAACCCTTAATAACGT---GATGCTAAA	1898
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TAGTGTTC--TTTACC CGAAATGTATTAGATGCCATTAATCTGCGTGA	1856
	* * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGAGG-----TATCG-GCG-GTA-----CGCC-TGGTCTTCGAGGGCA-	1867
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	AAGC-----TCG-ACCTGCC-----CACCGCATCAAGCAGGGCAC	1895
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ACACCGTCATCAGCG-GCGAGAA-----CAGCCTGCTCAA-GGAGGCGC	1485
<i>P.stutzeri</i>	AGATA-----ATCA-GTGGGCAAGCCGCGCGCAGCCCTGCTCAGCTC	1868
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ACAG-----ACCACGCTAAAA-----GATGCGGAAAGCTCAGGCGA	1934
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	G-----ACTACTCTGGAT-----GATGAGTTAAAGAAAGGTAC	1889
	* * * *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	-----AGC---TGAAGAG--TTCCGGCAATCCGCTGTTGCTGGGGC---	1903
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GGTCAAGC---TGGACGG--CGACGGCAA-----GAAGCTCGGCG---	1930
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TGCTGGGGGACGTGAAGT--CGATGGCAAC-----CTGCTGGACATCA	1527
<i>P.stutzeri</i>	CGATCAGG---TGTCGAT--CGACGGCAAC-----CCCCTGGCCCTTG	1906
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CATCAAAAT---CGAAGGTGACAAAGGCAA-----GCTCGAAG---	1969
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	AGTGAAAAT---TGATGGG---GATAGAAAT-----AAACTAAGCG---	1924
	* * ** **	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AACTGTTGCGGATGCTCGGC-GACT---TCGACTTCTGGTTCGAT--ATC	1947
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	AGTTCTTCGGCCTGCTCGAC-AGCT---TCAGCCCGAAGTTCAAT--ATC	1974
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	AGACCTTC-----CTCGGC-TGCT---TCGACTTCGAGGACGCC--CCC	1565
<i>P.stutzeri</i>	GGCGCTTC-----TTCAGCCTACTGGATCAGCCAGACGGACGCTTCCCC	1950
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AGCTAATGAGC-TACATGGATAACT---TCGACTTCTGGTTC AAC-----	2010
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	AGTTACTCGATGCTGGTGTATT---TCAACC-GACATTTAAT--ATT	1968
	* * ** *	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GTCACGCCGGCGGCAAGTCCGAAGGCTGA	1977[74]
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 66114	GTC-----GAACCCCTCGAG-TGA	1992[77]
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ATCGCCCT-----CACCGTGCCTGA	1586[78]
<i>P.stutzeri</i>	ATTG-----TCACGCGGTAG	1965[79]
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ATTG-----TGACGCCATAA	2025[80]
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATCACGCC-----GAATGAGCAATGA	1989[81]
	* *	

Şekil 3.24. (Devam)



Şekil 3.25. Primer tasarımı kullanılan aşamaların ekran görüntüsü

Programın araçlar çubuğundan DNA seçeneği seçilmiştir. Tasarlanacak genin ismi ve 311 bp uzunluğundaki ortak alkil sülfataz gen bölgesi yazılmıştır. Canlı türüne göre DNA'nın halkasal ya da doğrusal formuna dikkat ederek seçim yapılmıştır. 'Primer design/Find/PCR primers Inside Selection' seçeneği seçilerek PZR ürünü uzunluğunun 233-311 bp arasında, GC oranının %35-60 arasında, forward ve reverse uzunluğunun ise 20-25 baz dizisi uzunluğu arasında olması istenmiştir. Eğer tasarlanacak primer oldukça spesifik bir gen ise yapılması muhtemel bütün hassas ayarlar bu basamakta gerçekleşmiştir (Şekil 3.25). Ortak alkil sülfataz gen bölgesinden, istenilen PZR ürünü doğrultusunda forward ve reverse'lerin lokalizasyonları belirlenerek 10 tane primer tasarlanmıştır. (Çizelge 3.6)

Çizelge 3.6. Kullanılan primerler ve özellikleri

	Primer (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)	Uzunluk (bp)	Tm (°C)
1.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CCAATGCGCGTACCATCTCG	284	24 20	63.6 58.7
2.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCGTTCCAATGCGCGTACCA	289	24 20	63.6 59.6
3.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CCCTCGTTCCAATGCGCGTA	292	24 20	63.6 60.5
4.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-ACCCTCGTTCCAATGCGCGT	293	24 20	63.6 61.2
5.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCCCGACCCTCGTTCCAATG	298	24 20	63.6 59.3
6.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CCAATGCGCGTACCATCTCG	282	22 20	59.8 58.7
7.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCCAATGCGCGTACCATCTC	283	22 20	59.8 55.9
8.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TTCCAATGCGCGTACCATCT	284	22 20	59.8 55.9
9.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-GTTCCAATGCGCGTACCATC	285	22 20	59.8 55.5
10.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CGTTCCAATGCGCGTACCAT	286	22 20	59.8 58.2

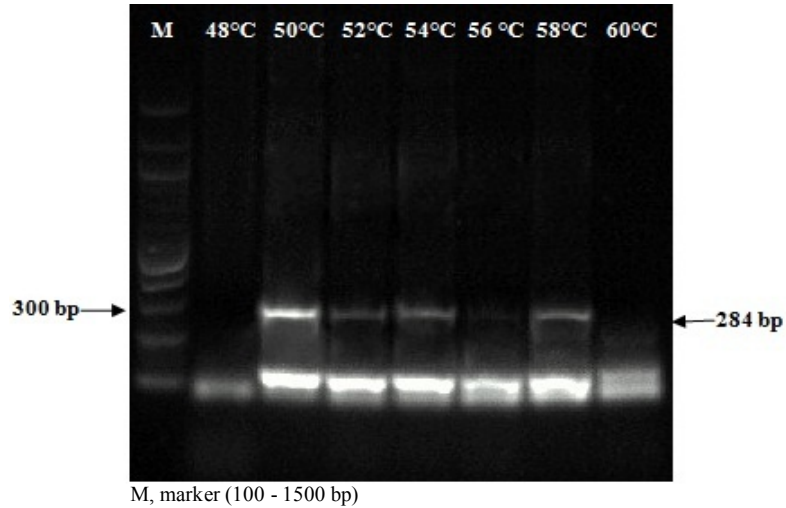
F, forward; R, reverse

Belirlenen primerler arasından primer seçimi için T_m değeri, % GC oranı ve baz dizisi uzunluğu gibi tasarım kriterleri dikkate alınarak forward primer 5'-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT-3' reverse primer 5'-CCAATGCGCGTACCATCTCG-3' 284 bp uzunluğundaki primer çifti seçilerek *sdsA* gen analizi için kullanılmıştır.

3.8.2. *sdsA* Gen Analizleri

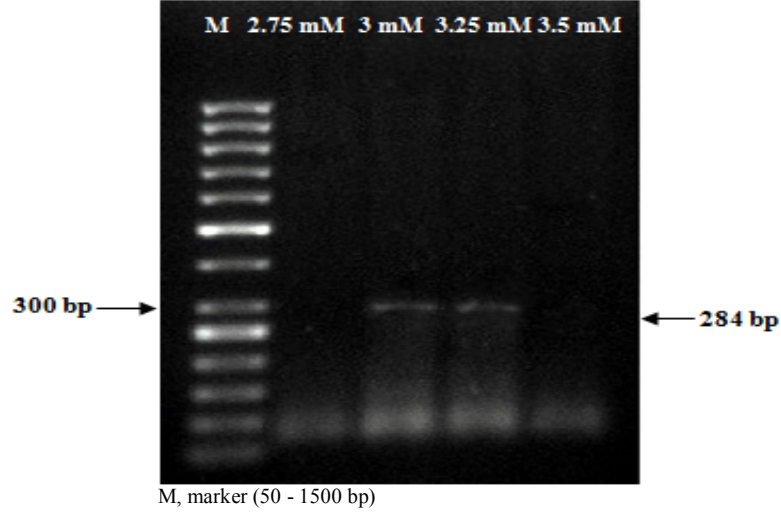
3.8.2.1. *P. koreensis* SDS4 Suşu *sdsA* Gen Analizi

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.26). *P. koreensis* SDS4 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.26. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. koreensis* SDS4 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

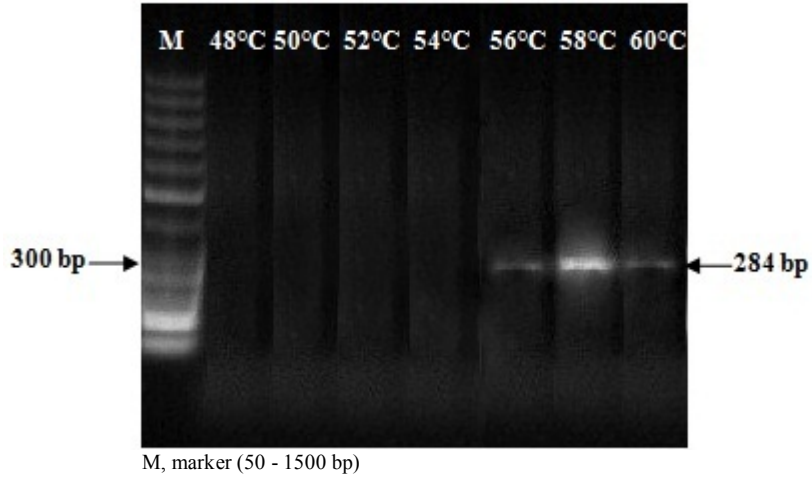
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. (Şekil 3.27) *P. koreensis* SDS4 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu 3 mM olarak belirtilmiştir.



Şekil 3.27. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. koreensis* SDS4 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

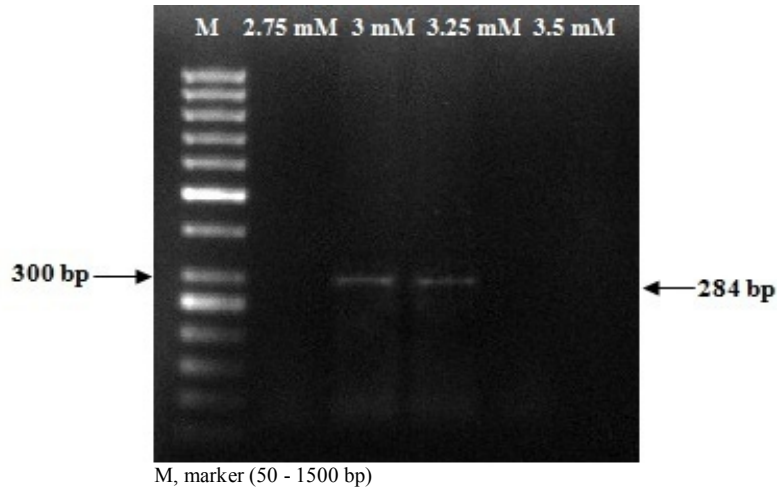
3.8.2.2. *A. veronii* SDS7 Suşu *sdsA* Geni Analizi

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.28). *A. veronii* SDS7 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın $58^{\circ}C$ olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.28. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *A. veronii* SDS7 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

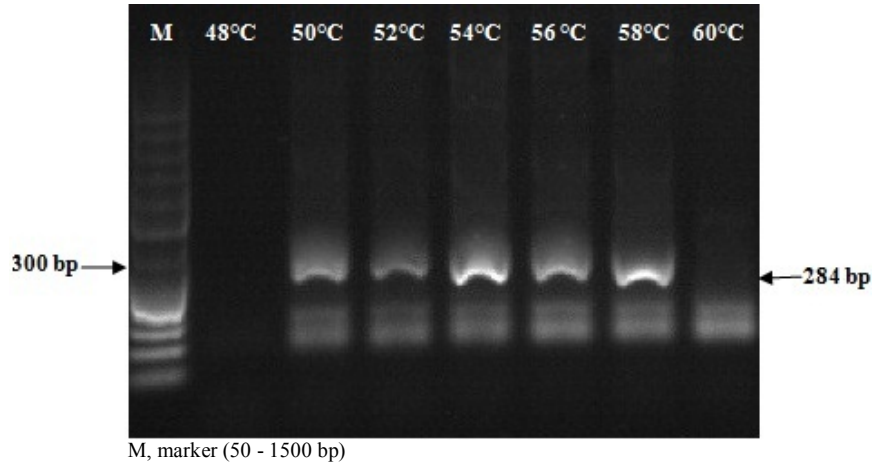
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.29). *A. veronii* SDS7 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.



Şekil 3.29. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *A. veronii* SDS7 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

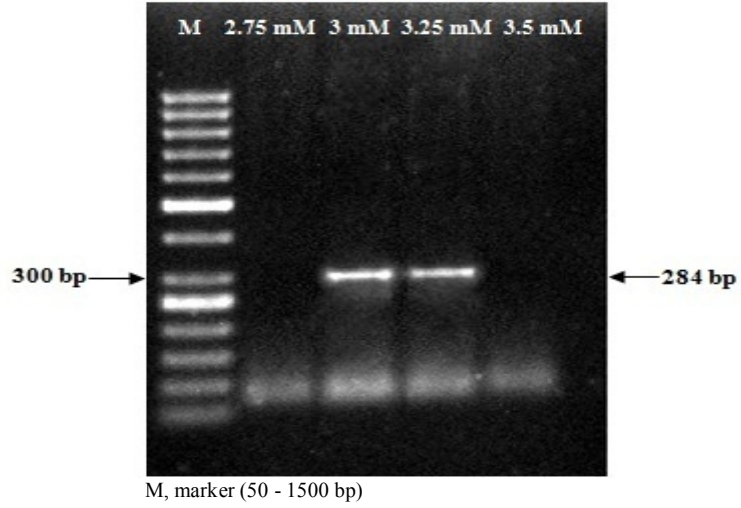
3.8.2.3. *P. resinovorans* SDS10-2 Suşu *sdsA* Gen Analizi

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.30). *P. resinovorans* SDS10-2 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.30. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. resinovorans* SDS10-2 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

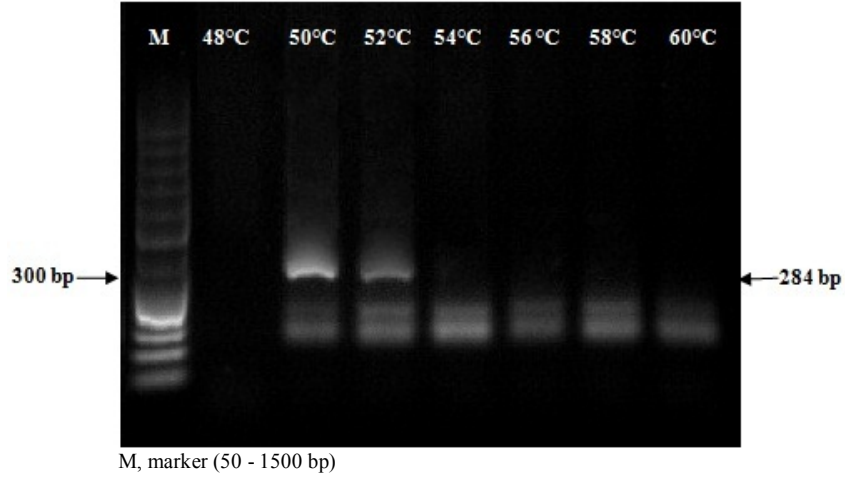
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.31). *P. resinovorans* SDS10-2 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.



Şekil 3.31. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. resinovorans* SDS10-2 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

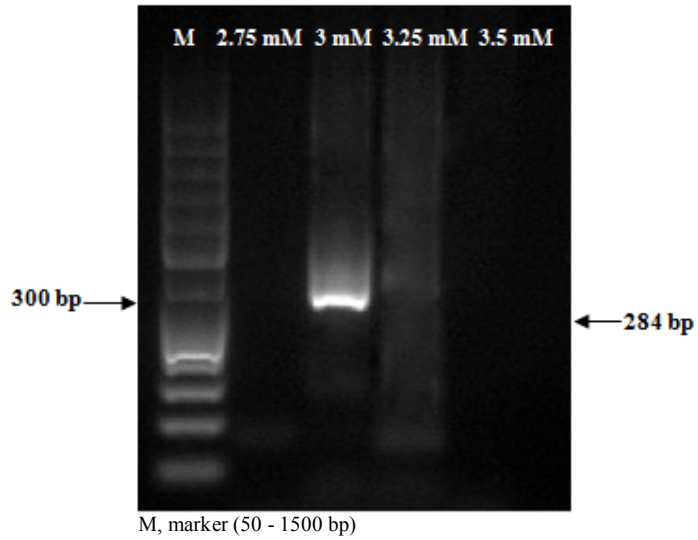
3.8.2.4. *P. corrugata* SDS10-3 Suşu *sdsA* Gen Analizi

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR' da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.32). *P. corrugata* SDS10-3 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu belirtilmiştir.



Şekil 3.32. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. corrugata* SDS10-3 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.33). *P. corrugata* SDS10-3 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.

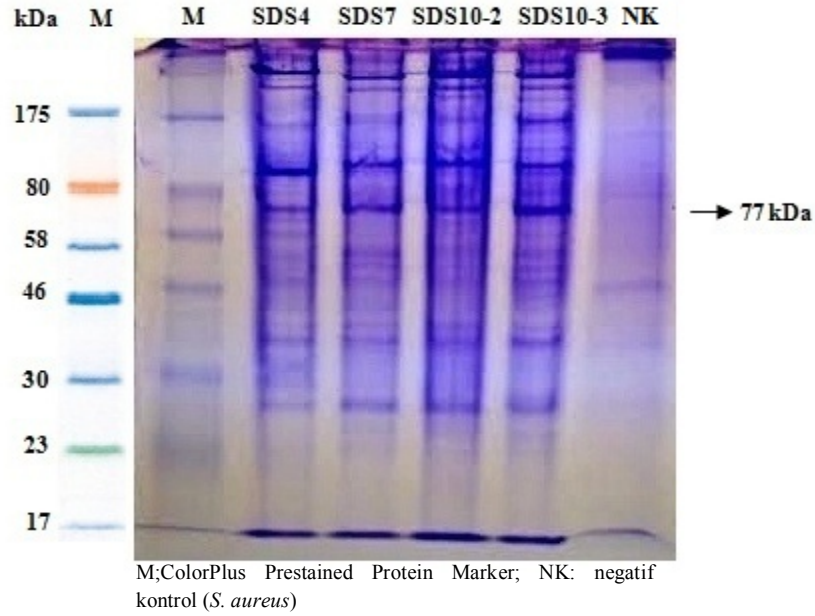


Şekil 3.33. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. corrugata* SDS10-3 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

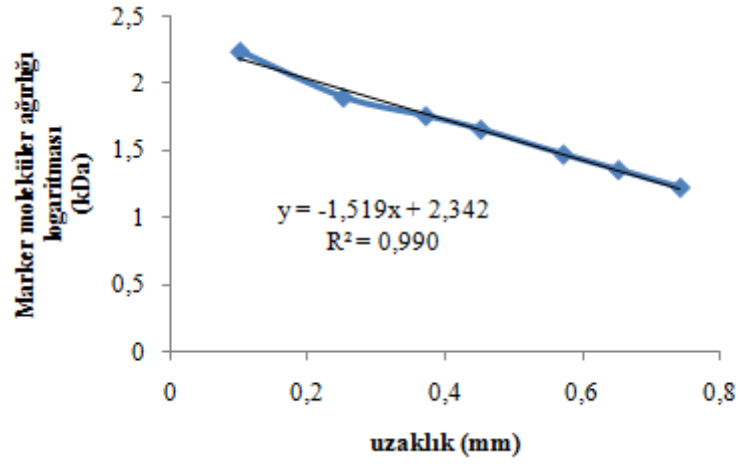
3.9. SDS Degrade Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri

3.9.1. Alkil Sülfataz Enzim Protein Profillerinin Belirlenmesi

P. koreensis SDS4, *A. veronii* SDS7, *P. resinovorans* SDS10-2 ve *P. corrugata* SDS10-3 suşlarının SDS içeren ortamda alkil sülfataz enzimi protein profilleri incelenmiştir (Şekil 3.34). 77 kDa ağırlığında olan alkil sülfataz proteinin lokasyonunu belirlemek için jelin protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.35).



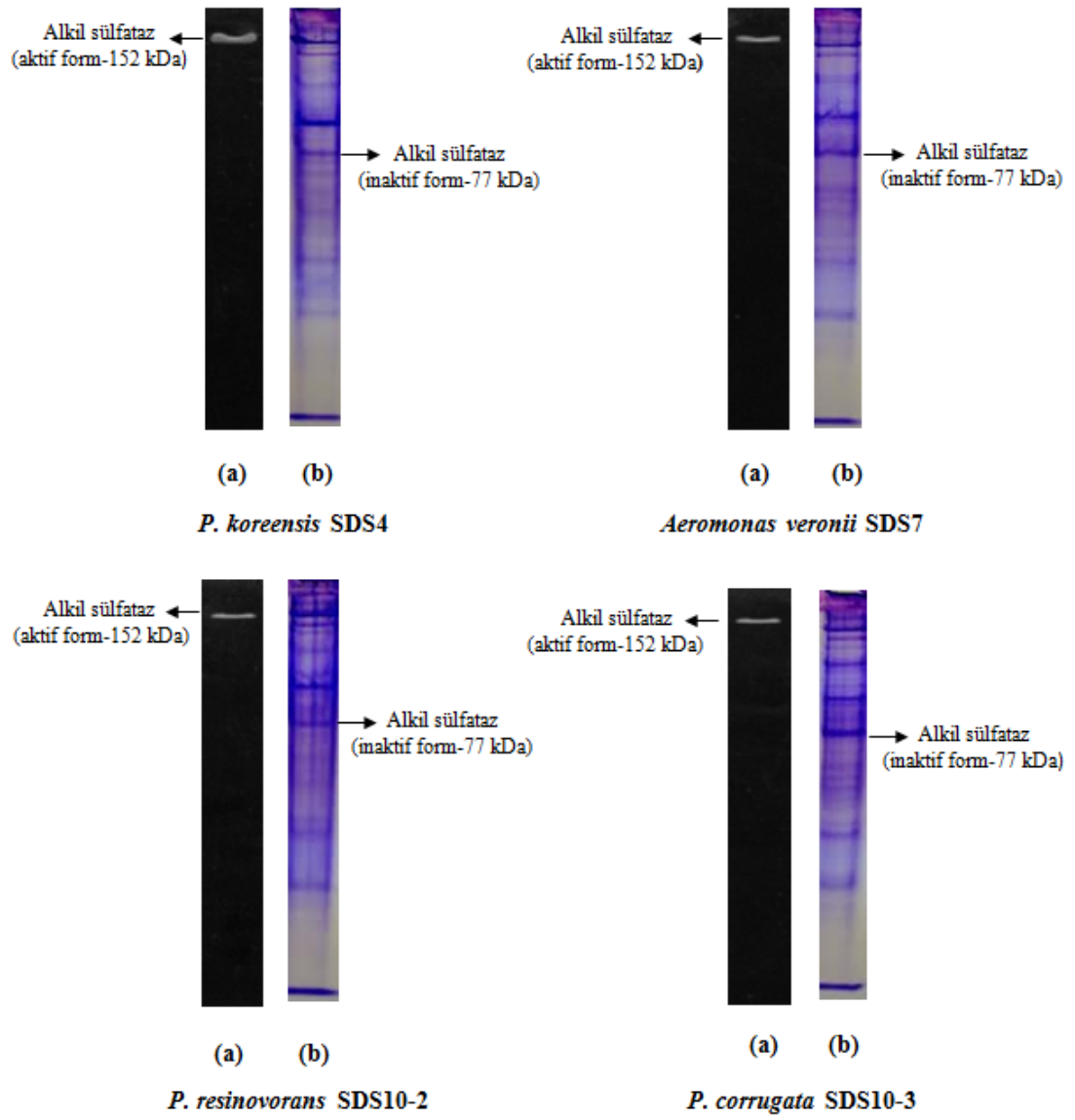
Şekil 3.34. SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz enzimi protein lokasyonunun belirlenmesi



Şekil 3.35. Alkil sülfataz proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografî Analizlerinin Yapılması

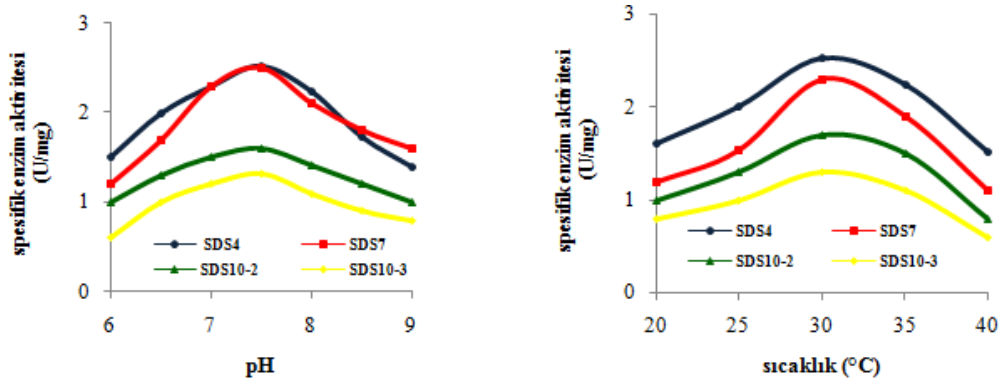
SDS degrade eden suşların, molekül ağırlığı bilinmeyen zimografik protein bantlarının molekül ağırlıkları alkil sülfataz enzimi protein profilinde çizilen standart eğri ile belirlenmiş 152 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Bu durum 152 kDa'ki protein bantlarının aktif formda, 77 kDa ağırlığındaki protein bantlarının ise inaktif formda olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimlerinin aktif (a) ve inaktif formları (b)

3.10. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SDS degrade eden suşlarının alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ilk olarak farklı pH ve sıcaklık aralıklarına ve spesifik enzim aktivitelere (U/mg) bakılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda suşların optimum pH 7.5 ve optimum sıcaklık 30°C sıcaklığında ve spesifik enzim aktivitelerinin ise *P. koreensis* SDS4 suşu için 2.52 U/mg, *A. veronii* SDS7 suşu için 2.5 U/mg, *P. resinovorans* SDS10-2 suşu için 1.60 U/mg, *P. corrugata* SDS10-3 suşu için 1.32 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. SDS degrade eden suşların değişen pH ve sıcaklıklardaki enzim aktivitesi

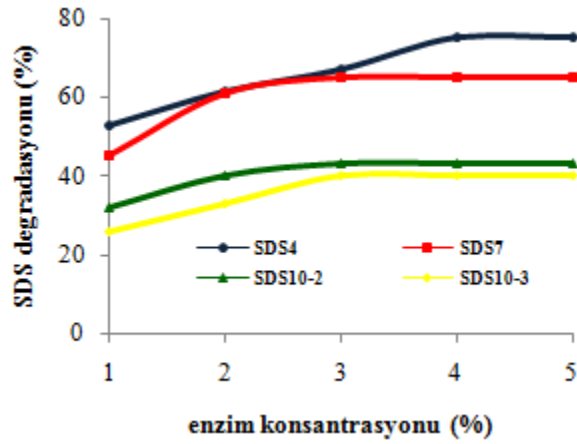
Alkil sülfataz enzim aktivitesi için belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşullarında, ekstrakt haldeki alkil sülfataz enziminin % SDS degradasyon oranı belirlenmiştir. Buna göre % 1, 2, 3, 4 ve 5 enzim konsantrasyonlarında sırasıyla 0.72, 1.44, 2.16, 2.88 ve 3.6 mg/mL enzim kullanılmıştır. (Şekil 3.38).

P. koreensis SDS4 kodlu suşun 2 88 mg/mL (% 4) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'i 5 mg/mL'ye düşürerek % 75 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

A. veronii SDS7 kodlu suşun 2.16 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 7.1 mg/mL'ye düşürerek % 65 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

P.resinovorans SDS10-2 kodlu suşun 2.16 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 11.5 mg/mL'ye düşürerek % 43 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

P.corrugata SDS10-3 kodlu suşun 2.16 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 12mg/mL'ye düşürerek % 40 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. Ekstrakt haldeki alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çizelge 3.7. Çalışmada elde edilen SDS degrade eden bakteriler ve özellikleri

Suş kodu	İzole edilen bölge koordinatı	16S rRNA sekansı (Homoloji %)	EMBL Giriş Numarası	Maksimum SDS tolarasyonu (g/L)	SDS degradasyonu		<i>sdsA</i> geni analizi	Alkil sülfataz Native-PAGE analizi	Alkil sülfataz enzim aktivitesi (U/mg)	
					Deterjan sanayi atık suyundaki					
					Saf kültür ortamında (%/saat)	Saf kültür ortamında (%/saat)				
SDS4	39°28'39.46''K, 33°24'26.73''D, 740 m	<i>Pseudomonas koreensis</i> 97%	KJ937669	55	87 / 30	91 / 78	82 / 162	+	+	2.52
SDS7	39°37'02.34''K, 33°26'38.26''D, 773 m	<i>Aeromonas veronii</i> 97%	KJ937671	65	74 / 48	88 / 92	77 / 78	+	+	2.50
SDS10-2	39°48'38.97''K, 33°29'14.57''D, 684 m	<i>Pseudomonas resinovorans</i> 93%	KJ937675	15	55 / 36s	75 / 48	67 / 48	+	+	1.60
SDS10-3	39°48'38.97''K, 33°29'14.57''D, 684 m	<i>Pseudomonas corrugata</i> 93%	KJ937676	75	52 / 54	85 / 78	78 / 92	+	+	1.32

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akarsu ve durgun sulardaki deterjan kirliliğinin son zamanlarda yüksek değerlere ulaştığı gözlenmektedir. Su kirliliğinin kontrolü ve önlenmesi önem kazanması nedeniyle ev ve endüstri kaynaklı deterjanların mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmesi ve biyodegradasyon çalışmaları gelişmiş ülkelerin üzerinde durduğu bir konudur. Bu tez çalışması ile alıcı sularda bulunan deterjanların biyolojik parçalanabilirliğinde etkin olabilecek lokal suşların belirlenmesi ve tanımlanması, deterjan giderimi çalışmalarında kullanılabilen potansiyel suşlar olabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan da benzer konulardaki çalışmalara ve literatüre özgün katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Dünya Sağlık Teskilatı'nın(WHO) içme suyundaki anyonik deterjan miktarları hakkında belirlediği deterjan miktarı 0.2 mg/L'yi geçmemelidir. Avrupa Birliğinde uygulanan su kalitesi kriterlerinde, metilen mavisi aktif maddelerin tavsiye edilen değeri 0.3 mg/L olarak kabul edilmistir. 4 Eylül 1988 tarih ve 19919 sayılı Resmi Gazetede belirtilen yüzeysel sulardaki anyonik yüzey aktif madde konsantrasyonlarına göre 1.sınıf (yüksek kalite) 0.5 mg/L, 2.sınıf (az kirlenmiş) 1 mg/L, 3.sınıf (kirlenmiş) 1.5 mg/L ve 4.sınıf (çok kirlenmiş) >1.5 mg/L olarak sınıflandırılmıştır [82].

Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinin yapılan deterjan analizleri, ortalama sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre nehirde belirlenen deterjan miktarı tüm istasyonlar için 1.5 mg/L'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre nehrin çok kirlenmiş yüzey suları kategorisinde olduğu tespit edilmiştir. Bu kirliliğin sebebi olarak da nehir çevresinde kurulan sanayi kuruluşları ve bu kuruluşlara bağlı olarak artan nüfus sayısı nedeniyle evsel atıkların fazlalaşması bu durumun sonuçları olarak düşünülmektedir.

Chatuverdi ve Kumar [83] Hindistan' ın Varanisi şehrinde evsel atıklarla kirlenmeye sebebiyet verildiği düşünölen 7 ayrı gölün deterjan analizleriyle ilgili yaptıkları çalışmada, Assi gölü 9.5 mg/L, Naipura 5.5 mg/L, Kandwa 8.9 mg/L, Pisachmochan 7.4 mg/L, Niralanagar 9.2 mg/L, Sundarpur 8.2 mg/L, Jawaharnagar ise 7 mg/L olduğu sonucuna varılmıştır.

Minareci ve arkadaşları' nın [2] Büyükçekmece Gölünde deterjan miktarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, anyonik deterjan miktarı 0.054–0.134 mg/L arasında değişen sonuçlar tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, “Çevre Mevzuatı, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Kıta İçi Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleri ile kıyaslanmıştır. Büyükçekmece Gölü'nün anyonik deterjan yönünden 1.dereceden (yüksek kaliteli su) olduğu belirlenmiştir.

Minareci ve arkadaşları [84] Gediz Nehir sistemindeki anyonik yüzey aktif madde kirliliğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada, deterjan miktarlarının belirli bölgelerde içme suyu kriterlerinin üzerinde bir deterjan miktarı (0.023–4.48 mg/L) olduğu tespit edilmiştir. Gediz Nehir sisteminde tespit edilen deterjan miktarı 4.dereceden yani çok kirlenmiş su sınıfında olduğu rakamsal verilerle belirlenmiştir. Başaran' nın [85] yapmış olduğu tez çalışmasında Yuvarlak Çay'da deterjan miktarı 0.12 mg/L, Küçük Menderes Nehri'nde 0-0.93 mg/L, Bakırçay'da 0.01 - 0.29 mg/L olarak belirlenmiştir.

Akkoşan Merkez Mevkii, Sulubük - Kıyıbağı Mevkii ve Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii bölgelerinden SDS degrade eden 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlara sırasıyla SDS4, SDS7, SDS10-2 ve SDS10-3 olarak adlandırılmıştır.

Bakterilerde 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması ve sekans analizi sonucu tanımlama işlemleri moleküler çalışmalarda standart bir yöntem olarak yerini almıştır. 16S rRNA bölgesinin tüm bakterilerde bulunması, evrim süresince korunmuş olması, uygun büyüklükte olması ve zengin veri tabanının olması tür düzeyinde tanımlama için sekanslamada en uygun bölge olmasını sağlamaktadır [86].

Yapılan 16S rDNA sekans analizleri sonucu SDS4 kodlu suş % 97 homoloji ile *Pseudomonas koreensis*, SDS7 kodlu suş % 97 homoloji ile *Aeromonas veronii*, SDS10-2 kodlu suş % 93 homoloji ile *Pseudomonas resinovorans*, SDS10-3 kodlu suş % 93 homoloji ile *Pseudomonas corrugata* olarak tanımlanmıştır.

16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılarak SDS'i degrade eden *Pseudomonas* sp., *Acenitobacter* sp., *Pantoea* sp., *Citrobacter* sp. ve *Bacillus* sp. gibi birçok bakteri tanımlanmıştır [87]. Yüzey aktif maddelerle kirletilmiş yüzey sularındaki mikroorganizmaların artışının, tek karbon ve enerji kaynağı olarak yüzey aktif maddelerin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği tespit edilmiştir. [87, 88]. Buna göre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus majodoratus*, *Klebsiella liquefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus albus*, *Proteus* sp., *Klebsiella oxytoca* ve *Brevibacterium* sp. gibi SDS degrade edebilen bakteriler 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır.

Tanımlanan bu suşların deterjan sanayi atık suyu ve laboratuvar besi ortamı koşullarında en yüksek SDS degradasyonu % 82- 91 oranıyla *P. koreensis* SDS4 kodlu suşa ait olduğu belirlenmiştir. İzole edilen dört suş içinden *Pseudomonas* türü bakterileri dışında *A.veronii* SDS7 kodlu suşun SDS degradasyonu % 75 - 88 oranıyla biyodegradasyon çalışmalarında kullanılabilir potansiyel suşlar oldukları belirlenmiştir.

Chaturvedi ve Kumar [83] yaptıkları çalışmada anyonik yüzey aktif maddelerle kirletilmiş Kandwa gölünden SDS degrade eden K1, K2, K3 ve K4 kodlu dört suş izole edilmiştir. Tanımlanan bu dört suşunda *P. stutzeri* olduğu belirlenmiştir. K1 kodlu *P. stutzeri* % 50, K2 kodlu *P. stutzeri* % 54, K3 kodlu *P. stutzeri* % 49 ve K4 kodlu *P. stutzeri* % 38.2 oranında SDS degrade etme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Shukor ve arkadaşları [89] yaptıkları çalışmada deterjan içeren yüzey sularında SDS kontaminasyonuna maruz kalmış bir bölgeden izole ettikleri altı bakteriden sadece *Klebsiella oxytoca* suşunun % 90 oranında SDS'i degrade ettiğini belirlemişlerdir. Hosseini ve arkadaşları [90] yaptıkları çalışmada Tehran belediyesine ait aktif çamur sisteminde iki bakteri izole etmişlerdir. Tanımlanması

yapılan iki bakteri sırasıyla *Acinetobacter johnsoni* and *Pseudomonas beteli* olduğu sonucuna varılmıştır. Degradasyon yetenekleri ise *Acinetobacter johnsoni*'nin % 96.4 , *Pseudomonas beteli*'nin ise % 97.2 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca bakıldığında SDS'i tek karbon kaynağı olarak kullandığını ve hızlı, etkin bir şekilde SDS'i degrades edebilme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. J. Usharani ve arkadaşları [91] deterjanla yoğun olarak kirletilmiş topraktan 40 suş izole etmişlerdir. Fakat aralarında SDS degradasyonu yeteneğini en yüksek verimde kullanabilen HS18 olarak kodlanmış suşun gerçekleştirebildiğini tespit etmişlerdir. İzolatı tanımlamak için uygulanan biyokimyasal yöntemler sonucunda *Pseudomonas sp.* bakterisi olduğu ve SDS degradasyon oranı ise % 80 olduğu gözlemlenmiştir. Çakır ve Kıvanç [87] yaptıkları bir çalışmada, SLES (Sodyum Lauril Eter Sülfat) ve NI (Non İyonik: Dehydol LS 7) yüzey aktif maddeinin *P. putida* (NRRL-B 13) tarafından biyolojik parçalanmasını, 33 gün süreyle 28°C' de çalkalamalı ortamda incelemiş ve SLES ve NI parçalanma oranlarını sırasıyla % 61 ve % 53; durgun ortamda ise % 51 ve % 44 olarak belirlemişlerdir.

SDS biyodegradasyonundan sorumlu olan alkil sülfataz enzimini kodlayan *sdsA* genidir. Chaturvedi ve Kumar [74], Shahbazi ve arkadaşlarının [70] *sdsA* gen analizi için kullandıkları primerler SDS degrade eden suşlarda belirtilen gen bölgesini çoğaltmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *sdsA* genine yönelik primerlerin sadece *Pseudomonas aeruginosa* türüne ait gen dizisi olduğu düşünülmektedir. Bu neden de dolayı altı farklı *Pseudomonas* türüne ait alkil sülfatazların ortak bölgeleri esas alınarak Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) programı aracılığıyla primer tasarımı yapılmıştır.

Tasarlanan primer 284 bp uzunluğunda olup SDS degrade eden suşlar için *sdsA* gen analizi yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda tasarlanan primerin *sdsA* genini belirlemede etkin bir primer dizisi olmadığı ve farklı bölgelere yönelik bantların olduğu gözlemlenmiştir.

SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimi protein profilleri incelenmiştir. Bu suşlar Native - PAGE jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, oluşan jel SDS içeren solüsyonda bekletilerek alkil sülfataz enziminin SDS'i substrat olarak kullanmasıyla oluşan bantların aktif formu 152kDa ağırlığındaki protein bantları, inaktif formda 77 kDa ağırlığındaki protein bantlarını oluşturduğu belirlenmiştir.

SDS degrade edebilme yeteneği veren alkil sülfataz proteininin enzim aktivitesi incelenmiştir. SDS degrade eden suşlar için optimum pH ve sıcaklıkta spesifik enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu değerler belirlenmiştir. *P. koreensis* SDS4, *A. veronii* SDS7, *P. resinovorans* SDS10-2 ve *P. corrugata* SDS10-3 suşlarının uygun optimum pH 7.5 ve optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Bu dört suş içerisinde en yüksek alkil sülfataz enzim aktivitesi 2.52 (U/mg) değeriyle *P. koreensis* SDS4 kodlu suşun olduğu, izole edilen dört suş arasında farklı türe ait *A. veronii* SDS7 kodlu suş ise 2.50 (U/mg) spesifik enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

SDS degradasyonundan sorumlu Alkil sülfataz enziminin uygun sıcaklık ve pH' da, belirli enzim konsantrasyonlarında reaksiyon hızı ve ekstrakt haldeki enzimin SDS degradasyonu incelenmiştir.

Yapılan enzim konsantrasyonu çalışmasında *P. koreensis* SDS4 suşunun % 4 enzim konsantrasyonu nda ekstrakt haldeki enzimin en yüksek SDS degradasyonu oranı % 75 ve bu suşun laboratuvar besi ortamındaki SDS degradasyonu % 86 olarak belirlenmiştir. Ayrıca SDS degrade eden *Pseudomonas* türleri dışında *A. veronii* SDS7 kodlu suş % 3 enzim konsantrasyonunda enzim SDS degradasyonu % 65 ve bu suşun laboratuvar besi ortamındaki SDS degradasyonu % 75 olarak tespit edilmiştir. Chaturvedi ve Kumar'ın [83] Assi gölünden SDS degrade eden üç suş izole etmişlerdir. SDS1, SDS2, SDS3 olarak kodlanan suşlar % 99 homoloji ile *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan üç suşun spesifik enzim aktiviteleri araştırıldığında SDS1 *P. aeruginosa* 0.142 U/mg, SDS2 *P. aeruginosa* 0.144 U/mg, SDS3 *P. aeruginosa* 0.168 U/mg olarak belirlenmiştir

Shahbazi ve arkadaşlarının [70] otomobil yıkama ve bakım iş yerine ait atık suyundan izole ettikleri *P. aeruginosa* suşu için spesifik enzim aktivitesinin 24.3 U/mg olduğu belirlenmiş olup SDS degradasyonu için uygun bir izolat olduğu görüşüne varmışlardır.

Ambily ve arkadaşları [92] SDS degradasyonundan sorumlu olan alkil sülfataz proteini için yapılan enzim aktivitesi çalışmasında izole ettikleri SDS degrade eden *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10311 suşunun uygun sıcaklık ve pH değerini tespit ederek, ekstrakt haldeki proteinin spesifik enzim aktivitesini, enzim konsantrasyonunu ve SDS degradasyonunu gözlemlemişlerdir. Belirlenen uygun sıcaklık 30°C ve pH 7.5' da % 4 enzim konsantrasyonunda durağan faza geçmiştir, spesifik enzim aktivitesi 3.04 U/mg olduğu belirlenmiştir. Ekstrakt haldeki alkil sülfataz proteininin SDS degradasyonu % 75 olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10311 suşunun genel besiyeri ortamında SDS degradasyonunun ise % 96 olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalar göz önünde bulunudurduğunda *P. koreensis* SDS4 kodlu suşun % 82- 91 SDS degradasyonu ve alkil sülfataz enzim aktivitesinin 2.52 (U/mg) olduğu, % 4 enzim konsantrasyonunda % 75 enzim SDS degradasyonu belirlenmiştir. SDS degrade eden dört suş arasında farklı tür olan *A.veronii* SDS7 kodlu suş ise % 75 - 88 SDS degradasyonu ve alkil sülfataz enzim aktivitesinin 2.50 (U/mg) olduğu, % 3 enzim konsantrasyonunda % 65 enzim SDS degradasyonu tespit edilmiştir. Gözlemlenen bu sonuçlar *P. koreensis* ve *A.veronii* suşlarının SDS degradasyonu çalışmalarında potansiyel suşlar olduğu sonucuna varılmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Carlsen, L., Metzson, M., Kjelsmark, J., Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in the terrestrial. *Journal of Environmental Sciences*, 280: 225-230, 2001.
- [2] Minareci, O., Bilgin, N., Çakır, M., İstanbul büyükçekmece gölü'nde anyonik deterjan, fosfat ve bor kirliliğinin araştırılması. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (2): 52-60, 2013.
- [3] Sarioğlu, Ö.F., Remediation of anionic surfactants and ammonium by biological materials. Master's Thesis. Bilkent University, Ankara, 2012.
- [4] Yılmaz, F., 16S rRNA Probları Kullanılarak Etkin Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Nehir İzolatlarının Takip Edilmesi. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2013.
- [5] Salar, A., Kızmaz, A., Arda, A., Deterjanlar, deterjan analizleri, deterjanların çevreye ve insan sağlığına etkileri. Bitirme tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Muradiye-Manisa, 2004.
- [6] Egemen, Ö., Çevre ve su kirliliği. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, Ege Üniversitesi basımevi, Bornova-İzmir, 42 (3): 106-116, 2000.
- [7] Minareci, O., Gediz Nehrinin Deterjan Kirliliğinin Araştırılması. Doktora Tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, 2007.
- [8] Gökalp, A., Tanrıkulu, E., Deterjanlar. Bitirme tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Muradiye-Manisa, 2003.
- [9] Çeltikli, D.O., Anyonik ve Katyonik Yüzey Aktif Maddelerin Toprak Ortamında Parçalanabilirliklerinin Tarla Koşullarında Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, 2013.

- [10] Yılmaz, F., Süt Fabrikası Atıksularından Mikroorganizma İzolasyonu ve Biyosülfektan Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2008.
- [11] Ece, M., Yüzey Aktif Maddelerin Kimyasal Oksidasyon Sürecinde Giderimi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
- [12] Yüzey aktif maddeler.
http://www.kimyaegitimi.org/sites/default/files/mufredat/yuzey_aktif_maddeler.pdf (Erişim tarihi: 03.03.2015)
- [13] Sodyum dodesil sülfat http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate (Erişim tarihi: 06.03.2015)
- [14] Trimetil heksadesilamoniyum klorür <http://www.donkeylane.co.uk> (Erişim tarihi: 05.05.2015)
- [15] Lineer alkil benzen sülfonik asit
http://www2.nau.edu/~doetqpp/courses/env440/env440_2/lectures/lec22/lec22.html (Erişim tarihi: 06.05.2015)
- [16] Anonim, Çevre yönetimi-su kirliliği. Manisa il çevre ve orman müdürlüğü, Manisa, 2007.
- [17] Deterjanlar. <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok8.pdf> (Erişim tarihi: 24.03.2015)
- [18] Deterjan kirliliği.
<http://www.cevremuhendisleri.net/> (Erişim tarihi: 03.01.2015)
- [19] Endonezya Citarum ırmağı deterjan kirliliği.
<https://oecotextiles.wordpress.com/tag/edward-burtynsky/> (Erişim tarihi: 05.03.2015)

- [20] Yüksel, E., Elektrofenton Yöntemiyle Yüzey Aktif Madde İçeren Atıksuların Arıtılması. Doktora Tezi. Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2009.
- [21] Fosfatın çevreye etkisi. <http://yesilanneyim.blogspot.com.tr/2014/06/fosfatn-zararlar-nelerdir.html> (Erişim tarihi: 24.03.2015)
- [22] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı MEGEP (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi). Kimya Teknolojisi, Su Arıtma, Ankara, 2008.
- [23] Azman, H., E., Evsel Atıksuların Arıtılmasında Arıtma Verimi – Enerji İlişkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2005.
- [24] Flotasyon işlemi. <http://www.gazebo.it/en/car-wash-wastewaters-treatment-plants.html> (Erişim tarihi: 10.05.2015)
- [25] Koagülasyon işlemi. <http://www.eflo.com/Electrocoagulation.html> (Erişim tarihi: 10.05.2015)
- [26] Flokulasyon işlemi. <http://www.rasayan.in/miscellaneous.html> (Erişim tarihi: 10.05.2015)
- [27] Cleveland Biotech S-Series. Retrieved from: <http://www.clevebio.com/sseries.asp> (Erişim tarihi: 16.04.2015)
- [28] Jovcic, B., Venturi, V., Davison, J., Topisirovic, L. and Kojic, M., Regulation of the *sdsA* alkyl sulfatase of *Pseudomonas* sp. ATCC19151 and its involvement in degradation of anionic surfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (3): 1076-1083, 2010.
- [29] Fitzgerald, J.W., Specificity of P2 primary alkylsulphohydrolase induction in the detergent degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. *Biochemical Journal*, 185 (1): 13-21, 1980.

- [30] Bateman, T.J., Dodgson, K.S., White, G.F., Primary alkylsulphatase activities of the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. *Biochemical Journal*, 185 (1): 23-31, 1986.
- [31] Alkil sülfataz proteini üç boyutlu yapısı .
<http://de.wikipedia.org/wiki/Alkylsulfatase> (Erişim tarihi:06.03.2015)
- [32] Chaturvedi, V., Kumar, A., Bacterial utilization of sodium dodecyl sulfate. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1 (3): 1126-1130, 2010.
- [33] Ojo, O.A., Oso, B.A., Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 8 (6): 1090-1109, 2009.
- [34] Yediler, A., Zhang, Y., Cai, J.P., Korte, F., Effect of the microbial population size on the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in lake water (Dong Hu East Lake, Wuhan, Hubei, P.R.China). *Chemosphere*, 18 (7-8): 1589-1597, 2003.
- [35] Rademaker, J.L. W. and De Bruijn, F.J., Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 655-657, 2000.
- [36] Busch, U. and Nitschko, H., Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B*, 722 (1-2): 263-78, 1999.
- [37] Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Vilani, F., Deianna, P. and Coppola, S., Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied. Microbiology*, 85: 25-36, 1998.

- [38] Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J., Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 74 (8): 2414-2423, 2004.
- [39] Persing, H. D., Polymerase chain reaction: Trends to benches. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1281-1285, 1991.
- [40] Prichard, R., Tait, A., The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 98: 169-194, 2001.
- [41] Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 101-107. Ed: by G. Temizkan, N. Arda, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2004.
- [42] Mc Pherson, M.J., Moller, S.G., *The Basics*. Cromwell Press, New York, 1-45, 2000.
- [43] Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J., Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643-1650, 1991.
- [44] Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition, New York, 114: 79-98, 1992.
- [45] Hadidi, A., Levy, L., Podleskis, E.V., *Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology*. *Molecular Methods in Plant Pathology*. 167-187. Ed: by R. P. Singh, U. S. Singh. CRS Press, Boca, Raton, 1995.
- [46] Schochetman, G., Jones, K.W., Polymerase chain reaction. *Infectious Diseases*, 158: 1154-1157, 1988
- [47] PZR amplifikasyon basamakları. <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab8-Biol210.htm> (Erişim tarihi:24.03.2015)

- [48] Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs. . 5-11. Ed: by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. London, CRC Press,1994.
- [49] Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. J. and Dveksler, G.S., General Concepts for PCR Primer Design. 33-155. Ed: by Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. *PCR Primer: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1995.
- [50] Somma, M., Querci, M., Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Bölüm 6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> (Erişim tarihi:05.03.2015)
- [51] Forward 5'- 3' ve Reverse 5'- 3' primerleri.
<http://calculatedimages.blogspot.com.tr/2013/06/need-to-teach-pcr.html>
(Erişim tarihi 10.05.2015)
- [52] Brown-Elliot, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J., Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 259-282, 2006.
- [53] Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E., An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 589-608, 2009.
- [54] Tindall, J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W., Kämpfer, P., Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 249-266, 2010.

- [55] Stackebrandt, E., Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. 98-108. Ed: by Stackebrandt, E. Springer, Berlin, 2006.
- [56] Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., Towards a prokaryotic genomic taxonomy. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews, 29: 147-167, 2005.
- [57] Goodfellow, M., Fiedler, H.P.A., Guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. Antonie van Leeuwenhoek, 98: 119-142, 2010.
- [58] Kirby, B.M., Everest, G.J., Meyers, P.R., Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. Antonie van Leeuwenhoek, 97: 131-142, 2010.
- [59] Stackebrandt, E., Ebers, J., Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology Today, 33: 152-155, 2006.
- [60] Everest, G.J., Meyers, P.R., The use of *gyrB* sequence analysis in the phylogeny of the genus *Amycolatopsis*. Antonie van Leeuwenhoek, 95: 1-11, 2009.
- [61] 16S rDNA sekans analiz yöntemi.
http://www.acgtinc.com/specialty_dna_sequencing.htm (Erişim tarihi: 10.05.2015)
- [62] Lepp, P.W., Relman D.A., Molecular Phylogenetic Analysis. In Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. 13: 161-180. Ed: by Persing, D.H, Tenover, F.C., Versalovic J., Tang Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., White., T.J. ASM Pres, Washington D.C., 2004.

- [63] Stackebrandt, E., Schumann, P., Introduction to the taxonomy of actinobacteria. *The Prokaryotes*. A Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd edn, 3: 297-321. Ed: by M., Dworkin, S., Falkow, E., Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. Springer-Verlag. New York, 2006.
- [64] Koçak, F.Ö., Bazı Nocardioform İzolatların 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Gen Dizi Analizleri ile Moleküler Sistematiği. Doktora Tezi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2011.
- [65] Freeman, S., Herron, J.C. Evolutionary analysis, 4th edition. Pearson Education, 2007.
- [66] Britschgi, T.B., Giovannoni, S.J., Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 1707-1713, 1991.
- [67] Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Tekse, A., Gomez, A.V., Sogin, M.L., Benthic eukaryotik diversity in the guaymas basin hydrothermal vent environment. *Frontiers in Microbiology*, 11: 7658-7662, 2002.
- [68] Koçak, R., Alüminyum, Baryum ve Kurşun Tolere Eden Yüzey Suyu İzolatlarının Biyosorpsiyon Yetenekleri. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2014.
- [69] Bahadır, M., Kızılırmak nehri akım değişimlerinin istatistiksel analizi. *International periodical for the languages. Literature and History of Turkish or Turkic*, 6 (3): 1339-1356, 2011.
- [70] Shahbazi, R., Kasra-Kermanshahi, R., Gharavi, S., Moosavi-Nejad, Z., Borzooee, F., Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkyl sulfatase enzyme activity. *Iran Journal of Microbiology*, 5: 153-158, 2013.

- [71] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M., Sohrab, A.D., Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. *Biotechnology*, 9 (1): 1-8, 2010.
- [72] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T.A., Henze, G., and Beyermann, B., Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex and time-release PCR. *BioTechniques*, 24 (1): 154-158, 1998.
- [73] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739, 2011.
- [74] Chaturvedi, V., Kumar, A., Presence of SDS-degrading enzyme, alkyl sulfatase (*sdsA1*) is specific to different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 48: 688-693, 2013.
- [75] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L. R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates. *International Microbiology*, 86: 143-156, 1996.
- [76] Demiralp, H., Celik, S., Koksel, H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. *European Food Research and Technology*, 211: 322-325, 2000.
- [77] Schober, M., Gadler, P., Knaus, T., Kayser, H., Birner-Grünberger, R., Gully, C., Macheroux, P., Wagner, U. and Faber K. A., Stereoselective Inverting sec-Alkylsulfatase for the Deracemization of sec-Alcohols. *American Chemical Society*, 13 (16): 4296-4299, 2011.

- [78] Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, P., Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene*, 114 (1): 19-24, 2002.
- [79] Gomez V., Laura, Rusniok, C., Rolando, M., Neou, M., Dervins-R., D., Demirtas, j., Rouy, Z., J Moore, R., Chen, H., K Petty, N., Jarraud, S., Etienne, J., Steinert, M., Heuner, K., Gribaldo, S., Médigue, C., Glöckner, G., L Hartland E. and Buchrieser, C., Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biology*, 15: 505, 2014.
- [80] Chwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterhelt D., Kunte H. J. A., blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Environmental Microbiology*, 13 (8): 1973-1994, 2010.
- [81] Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M., Jin, Q., Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (21): 7564-7569, 2008.
- [82] Minareci, O., Öztürk, M., Egemen, Ö., Minareci, E., Manisa organize sanayi arıtım tesisinin, gediz nehrinde deterjan kirliliğine olan etkilerinin belirlenmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (1): 65-72, 2008.
- [83] Chaturvedi, V., Kumar, A., Diversity of culturable sodium dodecyl sulfate (SDS) degrading bacteria isolated from detergent contaminated ponds situated in Varanasi city, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 961-971, 2011.

- [84] Minareci, O., Minareci, E., Öztürk, M., Karaçay'da (Manisa) deterjan, fosfat ve bor kirliliğinin araştırılması. *Journal of Fisheries & Aquatic*, 26, (3): 171-177, 2009.
- [85] Başaran, A.K. Pollution Parameters in Bakırçay Delta and Relation Çandarlı Bay (in Turkish). Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 2004.
- [86] Demirel S., Molecular Techniques For Determining Microbial Diversity In Treatment Systems. *Sigma*, 30: 179-192, 2012.
- [87] Çakır, E., Kıvanç, M., Porsuk Çayı'ndan izole edilmiş bakteriler tarafından deterjan aktif maddelerinin biyolojik parçalanabilirliği. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1: 129-135, 2000.
- [88] Okpokwasili, G.C., Olisa, A.O., River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. *Water Research*, 25: 1425-1429, 1991.
- [89] Shukor, M.Y., Husin, W.S.W., Rahman, M.F.A., Shamaan, N.A. and Syed, M.A., Isolation and characterization of an SDS-degrading *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Environmental Biology*, 30 (1): 129-134, 2009.
- [90] Hosseini, F., Malekzadeh, F., Amirmozafari, N., Ghaemi, N., Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4 (1): 127-132, 2007.
- [91] Usharani, J., Rajasekar, T. and Deivasigamani, B., Isolation and characterization of SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) degrading organisms from SDS contaminated areas. *Scientific Reports*, 1: 148, 2012.
- [92] Ambily, P.S. and Jisha, M.S., Characterization of Alkyl sulphatase required for the biodegradation of sodium dodecyl sulphate (SDS). *European Journal of Experimental Biology*, 1 (4): 41-49, 2011.