

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANYONİK DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN SULARDA DETERJAN DEGRADE
EDEN BAKTERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

LALE GÖKSU

MAYIS 2015

Biyoloji Anabilim Dalında Lale GÖKSU tarafından hazırlanan ANYONİK DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN SULARDA DETERJAN DEGRADE EDEN BAKTERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 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

ANYONİK DETERJAN KİRLİLİĞİ OLAN SULARDA DETERJAN DEGRADE EDEN BAKTERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GÖKSU, Lale

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2015, 125 sayfa

Bu çalışma kapsamında Kırıkkale-Kızılırmak'ta belirlenen oniki istasyondan 2014 yılı boyunca mevsimsel periyotlarla alınan su örnekleri ile anyonik deterjan kirliliği gösteren bölgeler belirlenmiştir. Deterjan kirliliği tespit edilen Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii, Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii ve Irmak Mevkii-Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı istasyonlarından anyonik deterjanlardan sodyum dodesil sülfatı (SDS) degrade eden bakteriler zenginleştirme yöntemi kullanarak izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler 16S rDNA sekans analizi kullanılarak *Pseudomonas migulae* SDS10, *Pseudomonas koreensis* SDS10-1, *Pseudomonas kilonensis* SDS11 ve *Pseudomonas baetica* SDS12 olarak sırasıyla % 96, 94, 99 ve 99 homolojiler ile tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise tanımlanan bu suşlardaki SDS degradasyonundan sorumlu olan *sdsA* gen varlığı ve bu gen tarafından kodlanan alkil sülfataz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Saf kültür ve deterjan sanayi atık suyu ortamlarında yapılan çalışmalar sonucu *Pseudomonas koreensis* SDS10-1 adlı bakterinin SDS degradasyon yeteneğinin % 83 ile 89 arasında olduğu, alkil sülfataz enzim aktivitesinin ise 2.9 U/mg olduğu ve deterjanlarla kirletilmiş suların remediasyonunda potansiyel oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SDS degradasyonu, alkil sülfataz, yüzey suları, *sdsA*, deterjan kirliliği

ABSTRACT

ASSESSMENT OF DETERGENT DEGRADING BACTERIA IN WATERS POLLUTED WITH ANIONIC DETERGENT

GÖKSU, Lale

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, 125 pages

Within the scope of this study, seasonal water samples were taken over 2014 to determine anionic detergent polluted areas in Kırıkkale-Kızılırmak. Out of twelve polluted stations revealed, only three of them, namely Kum Ocağı Mevkii, Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii and Irmak Mevkii, were used for sampling to isolate sodium dodecyl sulfate (SDS) degrading isolates through enrichment process which was followed with 16S rDNA sequence analysis for identification. The selected four isolates were identified as *Pseudomonas migulae* SDS10, *Pseudomonas koreensis* SDS10-1, *Pseudomonas kilonensis* SDS11 ve *Pseudomonas baetica* SDS12 with 96, 94, 99 and 99 % homologies, respectively. The identified isolates were further characterized in terms of *sdsA* gene and activity of the enzyme alkyl sulfatase coded by this gene. Due to its SDS degradation ability in both pure culture and detergent industry waste waters, *Pseudomonas koreensis* SDS10-1 was found to be potential SDS biodegrader with 83-89 % SDS degradation ability and 2.9 U/mg enzyme activity.

Key Words: SDS biodegradation, alkylsulfatase, surface waters, *sdsA*, detergent pollution

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.

Çalışmam boyunca her türlü desteğini esirgemeyen Dr. Fadime YILMAZ, Hüseyin ULUSOY, Gamze SERİM, Semih CERİT, Özgün ŞAHİN, Elnaz SEYEDMONİR, Volkan KANTER, ODTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü İcgen Team çalışanlarına ve üniversite hayatım boyunca çalışmalarında yanımda olan ve yardımlarını eksik etmeyen Salih Batuhan SALIK'a teşekkür ederim.

Bugüne kadar manevi desteğini hissettiğim babam Ahmet GÖKSU, her aşamada destekçim olan annem Muazzez GÖKSU ve abim Murat GÖKSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özetleri	2
1.1.1. Çevre Kirliliği	2
1.1.2. Su Kirliliği	3
1.1.3. Deterjanlar	4
1.1.3.1. Deterjanların Sınıflandırılması	5
1.1.3.1.1. Yüzey Aktif Maddeler (Süpfektanlar)	5
1.1.3.1.1.1. Yüzey Aktif Maddelerin Özellikleri	9
1.1.3.1.1.2. Yüzey Aktif Maddelerin Kullanım Alanları	11
1.1.3.1.1.3. Yüzey Aktif Maddelerin Sınıflandırılması	11
1.1.3.1.2. Yapısal Maddeler	17
1.1.3.1.2.1. Alkaliler	17
1.1.3.1.2.2. Kompleks Yapıcılar	18
1.1.3.1.2.3. İyon Değiştiriciler	18
1.1.3.1.3. Ağartıcılar (Beyazlatıcılar)	19
1.1.3.1.4. Diğer Yardımcı Maddeler	19
1.1.3.1.4.1. Enzimler	19
1.1.3.1.5. Optik Beyazlatıcılar	20
1.1.3.1.5.1. Köpük Stabilizatör ve Regülatörleri	20
1.1.4. Deterjanların Çevre ve Canlılar Üzerine Etkisi	20
1.1.4.1. Deterjanların İçme Sularına Etkileri	22
1.1.4.2. Deterjanların İnsan Sağlığına Etkileri	23
1.1.4.3. Deterjan Kaynaklı Fosfatın Etkisi	24

1.1.5. Atık Sulardaki Deterjan Kirliliğinin Giderilmesinde	
Kullanılan Yöntemler	27
1.1.5.1. Fiziksel Arıtım.....	27
1.1.5.2. Kimyasal Arıtım	28
1.1.5.3. Biyolojik Arıtım	29
1.1.6. Deterjanların Biyodegradasyonu.....	30
1.1.7. Deterjan Degradasyonu Yapan Bakterilerin Moleküler	
Yöntemlerle Tanımlanması.....	34
1.1.7.1. PZR.....	35
1.1.7.2. PZR Primerlerinin Tasarımı	37
1.1.7.3. 16S rDNA Dizi Analizi.....	40
1.1.7.4. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturma	41
1.1.7.4.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler.....	42
1.1.7.4.1.1. Nükleotid Dizisi Kullanan Metotlar (Sequence-Based).....	42
1.1.7.4.1.2. Uzaklık (Distance) Metotları	44
1.2. Çalışmanın Amacı	45
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	46
2.1. Materyal.....	46
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	46
1.1.1.1. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyerinin Hazırlanışı	46
2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı	46
2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı.....	47
2.1.1.4. Deterjan Sanayi Atık Su Örneklerinin Toplanması.....	47
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	48
2.1.2.1. Deterjan Stok Çözeltisinin Hazırlanışı	48
2.1.2.1.1. SDS Çözeltisinin Hazırlanışı	48
2.1.2.1.2. Deterjan Standart Çözeltisinin Hazırlanışı	48
2.1.2.2. NaCl Çözeltisi (5M, 100 mL).....	48
2.1.2.3. Metilen Mavisi Stok Çözeltisinin Hazırlanışı (5 mL)	48
2.1.2.4. % 70'lik Etanol (100 mL)	48
2.1.2.5. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL).....	49
2.1.2.6. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlanışı.....	49
2.1.3. DNA İzolasyon Kitinde Kullanılan Kimyasallar	49

2.1.4. Şusların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler	49
2.1.5. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	50
2.1.5.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , 1000 mL)	50
2.1.5.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL).....	50
2.1.6. Native - PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı	50
2.1.7. Native - PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	51
2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12).....	52
2.1.9. Dengeleyici Jelin Bileşimi (% 4)	52
2.1.10. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması	52
2.2. Yöntem.....	53
2.2.1. Çalışma Alanı ve Su Örneklerinin Toplanması	53
2.2.2. Su Öneklerinde MBAS Yöntemiyle Deterjan Analizi	55
2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu.....	55
2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen SDS Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	56
2.2.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	56
2.2.6. Bakterilerin Deterjan Sanayi Atık Suyundaki Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	56
2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı (CFU)	57
2.2.8. SDS Degradasyon Oranlarının Belirlenmesi	57
2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini.....	57
2.2.10. PZR ve Optimizasyonu.....	58
2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması.....	58
2.2.12. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizlerin Yapılması.....	59
2.2.13. Primer Tasarımları ve <i>sdsA</i> Gen Analizlerinin Yapılması.....	59
2.2.13.1. <i>sdsA</i> Geni Primer Tasarımlarının Yapılması	59
2.2.13.2. <i>sdsA</i> Gen Analizlerinin Yapılması	60
2.2.14. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektroforezi	60
2.2.15. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonu	60
2.2.16. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	61
2.2.17. Alkil Sülfataz Enzimi Protein Native - PAGE Analizi	61
2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması.....	61

2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması.....	62
2.2.17.3. Native - PAGE Jellerinin Boyanması	62
2.2.17.4. Zimografi Analizlerinin Yapılması.....	62
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
3.1. Kırıkkale-Kızılırmak Suyu Deterjan Analizi	63
3.2. Deterjan Kirliliği Gösteren Sulardan SDS Degrade Eden Bakterilerin İzole Edilmesi	64
3.3. Bakterilerin Laboratuvar Besi Ortamında ve Deterjan Sanayisi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	64
3.3.1. Deterjan Sanayi Atık Suyunda Kendiliğinden Olan SDS Degradasyonu	64
3.3.2. SDS10 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	65
3.3.2.1. SDS10 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	65
3.3.2.2. SDS10 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	66
3.3.3. SDS10-1 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	67
3.3.3.1. SDS10-1 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	67
3.3.3.2. SDS10-1 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	67
3.3.4. SDS11 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	68
3.3.4.1. SDS11 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	68
3.3.4.2. SDS11 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	69
3.3.5. SDS12 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	70
3.3.5.1. SDS12 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	70
3.3.5.2. SDS12 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi	71
3.4. SDS10 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	72
3.4.1. SDS10 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	73

3.5. SDS10-1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	75
3.5.1. SDS10-1 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması	77
3.6. SDS11 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	79
3.6.1. SDS11 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	80
3.7. SDS12 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	82
3.7.1. SDS12 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	84
3.8. <i>sdsA</i> Gen Analizlerinin Yapılması.....	86
3.8.1. <i>sdsA</i> Geni için Primer Tasarımı.....	86
3.8.2. <i>sdsA</i> Gen Analizleri	94
3.8.2.1. <i>P. migulae</i> SDS10 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	94
3.8.2.2. <i>P. koreensis</i> SDS10-1 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	95
3.8.2.3. <i>P. kilonensis</i> SDS11 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	97
3.8.2.4. <i>P. baetica</i> SDS12 Suşu <i>sdsA</i> Gen Analizi.....	98
3.9. SDS Degrade Eden Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri.....	100
3.9.1. Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin İncelenmesi.....	100
3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografi Analizlerinin Yapılması.....	101
3.10. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	102
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	106
KAYNAKLAR	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Deterjan oluşumu	5
1.2. Yüzey aktif madde molekülünün yapısı	6
1.3. Sulu çözeltilerde sürfektanların davranışı	7
1.4. Sabun oluşumu	8
1.5. Sabun miseli	8
1.6. Farklı şekillerdeki misel yapıları	10
1.7. Yüzey aktif maddelerin kullanım alanları	11
1.8. Sürfektanların sınıflandırılması	12
1.9. Lineer alkil benzen sülfonik asit	13
1.10. SDS'in kimyasal yapısı	14
1.11. Katyonik sürfektan molekül yapısı	15
1.12. İyonik olmayan sürfektan molekül yapısı	15
1.13. Zwitteriyonik sürfektan molekül yapısı	16
1.14. Deterjan kirliliğinin sembolize edilmesi	22
1.15. Ötrofikasyonun sembolize edilmesi	25
1.16. Endüstriyel flotasyon işlemi	28
1.17. Endüstriyel koagülasyon işlemi	29
1.18. Alkil sülfataz proteininin üç boyutlu yapısı	32
1.19. SDS degradasyon mekanizması	33
1.20. PZR aşamaları	36
1.21. Forward 5'- 3' ve reverse 5'- 3' primerleri	38
1.22. 16S rDNA sekans analiz yöntemi	40
1.23. Filogenetik ağaç tipleri	41
2.1. Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık su örnekleri.....	47
2.2. Kızılırmak	53
2.3. Su örneği alınan istasyonların Google Earth görüntüsü	54
3.1. Kırıkkale-Kızılırmak suyu deterjan analizi	63
3.2. Deterjan sanayisi atık suyunda kendiliğinden olan SDS degradasyonu	65

3.3. SDS10 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	65
3.4. SDS10 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	66
3.5. SDS10-1 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	67
3.6. SDS10-1 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	68
3.7. SDS11 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	69
3.8. SDS11 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	70
3.9. SDS12 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi.....	71
3.10. SDS12 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı	72
3.11. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10 kodlu suşa ait PZR ürünleri....	72
3.12. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS10 suşuna ait PZR ürünleri.	73
3.13. SDS10 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	75
3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-1 kodlu suşa ait PZR ürünleri.	76
3.15. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS10-1 suşuna ait PZR ürünleri.....	76
3.16. SDS10-1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	77
3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS11 kodlu suşa ait PZR ürünleri ...	79
3.18. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS11 suşuna ait PZR ürünleri	80
3.19. SDS11 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram...	82
3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS12 kodlu suşa ait PZR ürünleri....	83

3.21. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında SDS12 suşuna ait PZR ürünleri	83
3.22. SDS12 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	84
3.23. Farklı iki primer (1977 ve 672 bp) kullanılarak yapılan <i>sdsA</i> gen analizleri; 1977 bp ve 672 bp	86
3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması	87
3.25. Primer tasarımında kullanılan aşamaların ekran görüntüsü	92
3.26. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. migulae</i> SDS10 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	94
3.27. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. migulae</i> SDS10 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	95
3.28. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. koreensis</i> SDS10-1 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	96
3.29. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. koreensis</i> SDS10-1 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	96
3.30. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. kilonensis</i> SDS11 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	97
3.31. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. kilonensis</i> SDS11 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	98
3.32. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. baetica</i> SDS12 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	99
3.33. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında <i>P. baetica</i> SDS12 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri	99
3.34. SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz enzimi protein lokasyonunun belirlenmesi	100
3.35. Alkil sülfataz enzim proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	101
3.36. SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimlerinin aktif ve inaktif formları	102
3.37. SDS degrade eden suşların değişen pH ve sıcaklıklardaki enzim aktivitesi ...	103
3.38. Ekstrakt haldeki alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri.....	49
2.2. Native - PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı	50
2.3. Native - PAGE solüsyonlarının hazırlanışı	51
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması	52
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	52
2.6. Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları.....	54
3.1. SDS degrade edebilen suşlar için belirlenen MTK değerleri	64
3.2. SDS10 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	74
3.3. SDS10-1 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	78
3.4. SDS11 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	81
3.5. SDS12 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	85
3.6. Kullanılan primerler ve özellikleri	93
3.7. Çalışmada elde edilen SDS degrade eden bakteriler ve özellikleri	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$	Sodyum dodesil sülfat
Ca	Kalsiyum
Na	Sodyum
Mg	Magnezyum
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Sodyum bifosfat
$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	Sodyum trifosfat
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
LABSA	Lineer Alkil Benzen Sülfonik Asit
STPP	Sodyum Tripolifosfat
DDT	Diklorodifenil Trikloroethan
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MSM	Mineral Salt Medium
NB	Nutrient Broth

1. GİRİŞ

Teknolojinin hızla gelişmesi, nüfus yoğunluğunun artması, düzensiz yapılaşma sonucu su kaynaklarının bilinçsizce kullanılması, endüstriyel ve evsel atıkların deşarjı ile denizler ile iç su kaynakları, atmosfer ve karasal ortamlardan daha çok kirliliğin etkisi altında kalmaktadır. Çünkü her geçen gün giderek artan oranda çeşitli kaynaklardan gelen atık maddeler akarsulara, dolayısıyla göl ve denizlere ulaşmakta ve ekolojik dengenin de bozulmasına neden olmaktadır. Kirliliğin boyutları sucul sistemdeki canlı yaşamını etkilediği gibi, kirleticilerin ortamda belirli bir düzeyin üstüne çıkmasıyla doğal denge bozulmakta ve besin zincirini oluşturan organizmalar aracılığıyla insan sağlığı da tehdit edilmektedir. Çeşitli kirletici etmenlerin katılması ile birlikte suda doğal olmayan bir şekilde fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Doğal yapıdaki su kaynağına karışan atık maddeler mikroorganizmaların yardımı ile transformasyon ve mineralizasyona uğramaktadır. Böylece sular veya su kaynakları biyolojik olarak kendi kendilerini temizleme özelliği gösterir. Su kaynaklarına katılan çoğu toksik yapıdaki yabancı maddelerin konsantrasyonları, bu tamponlama gücünün üzerine çıktığı zaman, sulardaki organik maddelerin parçalanması ve suda çözülmüş oksijen yetmezliği nedeniyle sistemi çöktürmektedir [1].

Yurdumuz akarsuyu bol olan ülkeler arasında sayılmaktadır. Ancak hızla kalkınmakta ve gelişmekte olan ülkemizde akarsularımız, göl ve denizlerimizle diğer tüm su kaynaklarımızda görülen kirlenmenin önemi büyüyen şehirlerin içme suyu ve gelişen endüstrinin su talebini karşılamak durumunda kalacağı düşünüldüğünde bir kat daha artmaktadır. Dolayısıyla Türkiye'nin gelecek nesillerine sağlıklı ve yeterli su bırakabilmesi için kaynaklarını çok iyi koruyup akılcı kullanması gerekmektedir. Son yıllarda evsel ve endüstri atıklarından kaynaklanan kirlilik olayları çok önem taşımakta ve evsel ve endüstriyel atıklardan sucul ortama gelen kirleticiler arasında deterjanlar önemli bir yer tutmaktadır. Deterjanlar, genellikle evlerde temizleme işlerinde, deri, kağıt, tekstil, kozmetik ve lastik endüstrilerinde, fotoğrafçılıkta, çamaşırhanelerde, süt ve meşrubat fabrikalarında şişe yıkama işlerinde kullanılır [2]. Deterjan kirliliği sulardaki biyolojik aktiviteyi etkilemesi açısından önemlidir.

Özellikle deniz suyundaki deterjan miktarının 0.1 gr/m^3 'ten fazla olması hallerinde organizmalara toksik etkiler yapacağı belirtilmiştir. Bu toksik etkinin organizmalardaki oksijen taşınımını etkilediği birçok tür için değişik lethal doz değerleri ile belirtilmiştir [3].

Kırıkkale, Orta Anadolu Bölgesi'nde Kızılırmak'ın yakınında kurulmuş, hızla sanayi merkezi haline gelmekte olan bir ilimizdir. Kırıkkale-Kızılırmak çevresindeki sanayi kuruluşlarının ürettiği atıklardan ve şehrin yerel atıklarından etkilenmektedir [4]. Bu nedenle bu çalışma kapsamında, ilk olarak Kırıkkale-Kızılırmak'ın deterjan kirliliği açısından değerlendirilmesi yapılmış, daha sonraki aşamada ise kirlilik gösteren bölgelerden anyonik deterjanlardan olan ve yaygın kullanıma sahip olan SDS'i degrade eden suşlar izole edilmiş ve moleküler karakterizasyonları yapılarak SDS remediasyon çalışmalarında kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

1.1. Literatür Özetleri

1.1.1. Çevre Kirliliği

Son yıllarda hızlı sanayileşme, nüfustaki hızlı artış ve kentleşme, yetersiz altyapı ve sanayi kuruluşlarının pek çoğunda arıtım tesisinin bulunmaması çevre kirliliğini oluşturmaktadır [5]. Bu bahsedilen sorunların çözümlenmesinde önemli rol oynayan teknolojik gelişmeler, insanlığın yararına birçok yeni ve alternatif ürünler sunarken küçümsenmeyecek oranda ve nitel- nicel yönden oldukça farklı atıklar oluşmaktadır. Bu tür katı ve sıvı atıkların arıtmaları mevcut konvansiyonel arıtım süreçleri ile yeterli düzeyde yapılamamaktadır. Bunun yanı sıra etkili bir arıtım ise, ilgili endüstri kuruluşlarına oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle, günümüzde birçok endüstri kuruluşlarının önemli sorunu olan bu tür atıkların arıtımında; ekonomik yönden ucuz, pratik uygulamalarda kolaylık sağlayacak arıtım süreçlerine yönelik geniş bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde evsel ve endüstriyel atıkların yeterince arıtılmadan nehir göl ve deniz gibi alıcı ortamlara verilmesi ekolojik sistem için ciddi problemler oluşturmaktadır [6]. Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında rol alan kirleticiler arasında deterjanlarda

yer almaktadır. Deterjanların rastgele üretilmesi ve çevreye boşaltılmaları sonucunda çevre kirlenmesine neden olmaları deterjanlar konusunda bir dizi önlem alma zorunluluğu getirmiştir [7].

1.1.2. Su Kirliliği

Dünyada nüfusun artması ve endüstrinin gelişmesi ile suyun yerküre üzerindeki doğal yapısı istenilmeyen yönde bozulmaktadır [8]. Su kirliliği su kaynağının kimyasal, fiziksel, biyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde gözlenen ve doğrudan veya dolaylı yoldan biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, su ürünlerinde, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılmasını ifade etmektedir. Bu çerçevede Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sulara kirletici etki yapabilecek unsurlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmışlardır [9]:

- Bakteriler, virüsler ve diğer hastalık yapıcı canlılar: Suların hijyenik açıdan kirlenmesine neden olan bu organizmalar genellikle hastalıklı ya da portör (hastalık taşıyıcı) olan insan ve hayvanların dışkı ve idrarlarından kaynaklanır.
- Organik maddelerden kaynaklanan kirlenme: Ölmüş hayvan ve bitki artıkları ile tarımsal artıkların yüzeysel sulara karışması sonucunda ortaya çıkan kirlenmedir.
- Endüstri atıkları: Çeşitli endüstri faaliyetleri sonucu oluşan fenol, arsenik, siyanür, krom, civa vb. toksik maddeleri içerirler.
- Yağlar ve benzeri maddeler: Tanker kazaları ve petrol boru hatlarından kaynaklanır.
- Sentetik deterjanlar: Temizlik maddeleri.

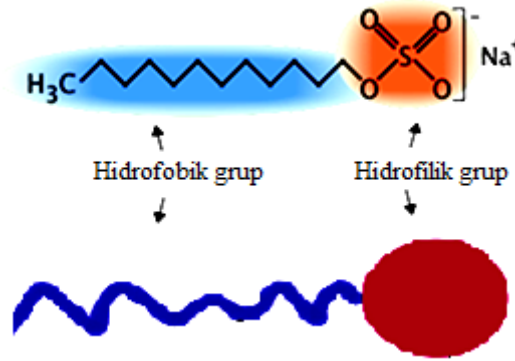
- Radyoaktivite: Nükleer enerji santralleri, hastaneler, bazı endüstri kuruluşları, araştırma kuruluşlarından kaynaklanan atıklar ile nükleer silah denemeleri sonucunda oluşabilmektedir.
- Pestisitler: Tarımsal savaşta kullanılan yapay organik maddelerdir.
- Yapay organik kimyasal maddeler: Bu maddeler farmasotik, petrokimya ve zirai kimya endüstrilerince üretilmektedir.
- Anorganik tuzlar: Bu maddeler toksik olmayıp ancak yüksek dozlarda kirletici olarak kabul edilirler.
- Yapay ve doğal tarımsal gübreler: Azot ve fosfordan kaynaklanan ikincil kirlenme.
- Atık ısı: Tek geçişli soğutma suyu sistemlerine sahip termik santraller yüzeysel sulara büyük miktarda atık ısı verir. Suyun sıcaklığının artması biryandan doğal arıtma sürecini hızlandırırken öte yandan sudaki oksijenin doygunluk derişimini azaltarak anaerobik kokuşmaya neden olurlar.

Evsel ve endüstriyel atıklar içinde çevre kirliliği açısından kanalizasyona verilen en tehlikeli atıklar deterjanlar ve temizlikte kullanılan çamaşır suyu gibi kimyasallardır. Bunlar biyolojik atık su arıtma sistemlerinin çalışmasını da etkilediği için önemli ölçüde kirlenmelere neden olmaktadırlar. Son yıllarda biyolojik olarak parçalanan temizlik hammaddelerinin kullanımı ile bu sorun kısmen de olsa giderilmiştir [9].

1.1.3. Deterjanlar

Petrokimya ürünlerinden elde edilen, temizleme ve arıtma gibi işlemlerde kullanılan toz, sıvı ya da jel şeklinde olabilen kimyasal maddelere "deterjan" denilmektedir [10]. Pek çok kişi deterjanı temizleme özelliğine sahip kimyasal madde olarak tanımlamakta ise de akla en uygun gelen tanımı Larson'un [11] suda çözünen, yüzey

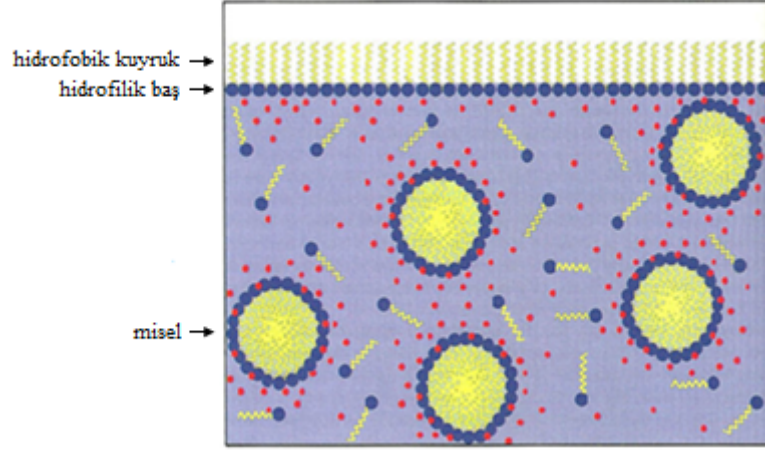
(apolar) olan iki grubun varlığı ile karakterize edilir (Şekil 1.2). Hidrofilik kısım baş grup ve hidrofobik kısım da kuyruk grup olarak isimlendirilir [14]. Molekülün su sever kısmı küresel formlar, yağ-sever kısmı ise çubuk formlar oluşturur. Molekülün su-sever kısmı, aynı zamanda yük taşıyan kısımdır. Sürfektanlar, düşük konsantrasyonlarda monomer halinde bulunurlar. Her monomer elektriksel yüke sahiptir [15].



Şekil 1.2. Yüzey aktif madde molekülünün yapısı [16-17]

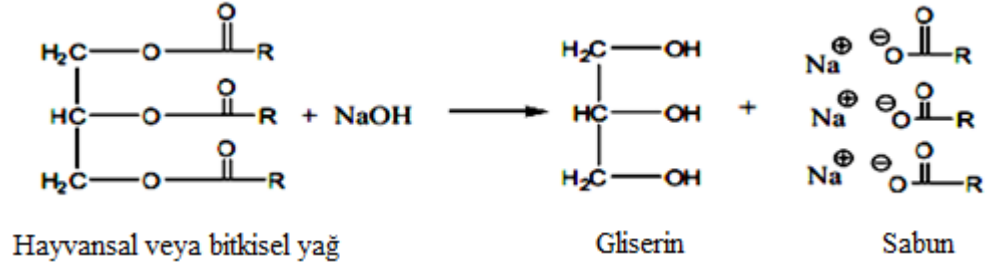
Sulu çözeltide sürfektanların davranışı, hidrofobik kısmının çözeltiden ayrılma ve hidrofilik kısmının çözeltiye doğru yönelme eğilimi ile tayin edilir. Bu çift yönlü eğilim, arayüzeylerde sürfektanların adsorpsiyonu ve miseller gibi agregatların oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 1.3). Sürfektan moleküllerinin, hidrofobik grupları sudan uzakta su/hava arayüzeylerinde ve hidrofilik grupları da çözelti içinde adsorplanır. Bunun bir sonucu olarak, arayüzeydeki su moleküllerinin bazıları hidrokarbon veya polar olmayan gruplar ile yer değiştirir. Arayüzeyde sürfektan moleküllerinin adsorpsiyonu sonucu su molekülleri arasındaki etkileşim kuvveti azalır ve çözeltilin yüzey geriliminde bir düşme meydana gelir. Su ve sulu çözeltide çözüdüğü zaman yüzey gerilimini azaltıp, kirlerin buldukları yüzeyden daha çabuk koparılmasını sağlayan maddelerdir. Yüzey aktif madde hammaddesi için kullanılan kaynaklar, petrokimyasal veya doğal kökenlidir. Petrokimyasal hammaddeler, etilen, normal parafin ve benzen olup bu kaynaklardan üretilen aktif madde hammaddeleri lineer alkoller, lineer alkil benzenler, lineer alfa olefinler ve

dallanmış zincir yapıları alkil benzenlerdir. Doğal kaynaklar ise, yağ alkolleri veya yağ asitleridir [11].



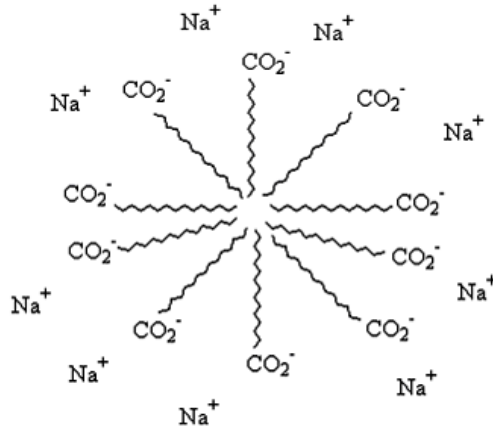
Şekil 1.3. Sulu çözeltide sürfektanların davranışı [18]

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 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 gelmiştir. Sabun, genelde yüzyıllar öncesinden beri kullanılmakta olan eritilmiş iç yağı ya da diğer yağların sodyum hidroksit ile ısıtılması yöntemiyle elde edilmektedir (Şekil 1.4). Reaksiyon sonunda sabun olarak adlandırılan gliserin ve yağ asitlerinin sodyum tuzu oluşur [19].



Şekil 1.4. Sabun oluşumu [20]

Sabunlar uzun zincirli yağ asitlerinin sodyum veya potasyum tuzlarıdır. Sabunların hem uzun, apolar hidrokarbon kuyruğu hem de polar karboksilat uçları vardır. Sabunlar bu özellikleriyle suyun içinde miseller oluşturup suda çözünmeyen maddelerin etrafını sarak, kirlerin suyla temizlenmesini sağlarlar (Şekil 1.5). Buna rağmen sabunlar sert sularda çok iyi performans göstermezler. Çünkü sert suyun içindeki Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarıyla çökelek oluştururlar. Sabunların sert sularda köpürmemesinin sebebi de budur. Bu problemi halletmek için 1940'lı yıllarda deterjanlar üreilmeye başlanmıştır. Aynen sabunlar gibi suda miseller oluştururlar ama onlar gibi sert sudaki iyonlarla çökelek oluşturmazlar [20].



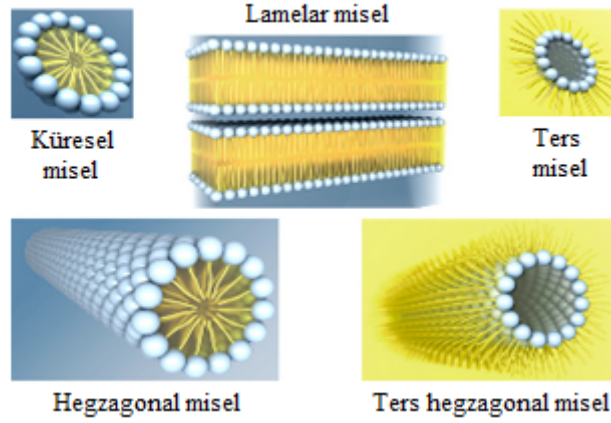
Şekil 1.5. Sabun miseli [21]

1.1.3.1.1.1. Yüzey Aktif Maddelerin Özellikleri

Yüzey aktif maddelerin özellikleri aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

- Misel Oluşturma: Miseller belirli bir konsantrasyondan ve sıcaklıktan sonra oluşmaya başlar. Misellerin oluştuğu bu konsantrasyon kritik misel konsantrasyonu (KMK) ve sıcaklık da Krafft sıcaklığı olarak adlandırılır. Misel oluşumu çok sayıda molekülün çözücünün özelliğine göre hidrofobik ya da hidrofilik gruplarının bir araya gelerek farklı şekilde düzenlenmesiyle gerçekleşir. Sulu çözeltide, hidrofilik gruplar sulu fazla temas halinde iken hidrofobik hidrokarbon zincirleri miselin içine doğru yönelerek yüzey aktif madde iyonlarının misel ya da agregatları oluşur. Çözücü ortamının apolar olduğu durumlarda ise ters (reverse) miseller oluşur. Bu durumda hidrofobik zincirler miselin dışında hidrofilik polar gruplar misel çekirdeğini oluşturmak üzere misel çekirdeğinde yerleşirler [22].

Sulu ortamda büyük-dağınık hidrofilik grup ve uzun-ince hidrofobik grup içeren yüzey aktif maddeler küresel, büyük hidrofobik grup ve küçük hidrofilik grup içeren yüzey aktif maddeler ise lamelar ve silindirik misel oluşturma eğilimindedir. Yine konsantrasyon artışı ile de küresel olarak başlayan miseller değişik şekiller almaktadır (Şekil 1.6). Misellerin bulundurduğu yüzey aktif madde molekül sayısı o maddenin agregasyon sayısı olarak adlandırılır. İyonik olmayan yüzey aktif maddelerin agregasyon sayısı 1000 ve üzeri olabilirken iyonik yüzey aktif maddelerde yüklü baş gruplar arasındaki elektrostatik itmelerden dolayı daha az sayıda monomer bir araya gelebilmekte ve iyonik yüzey aktif maddeler için agregasyon sayısı en fazla 100 olmaktadır [22].

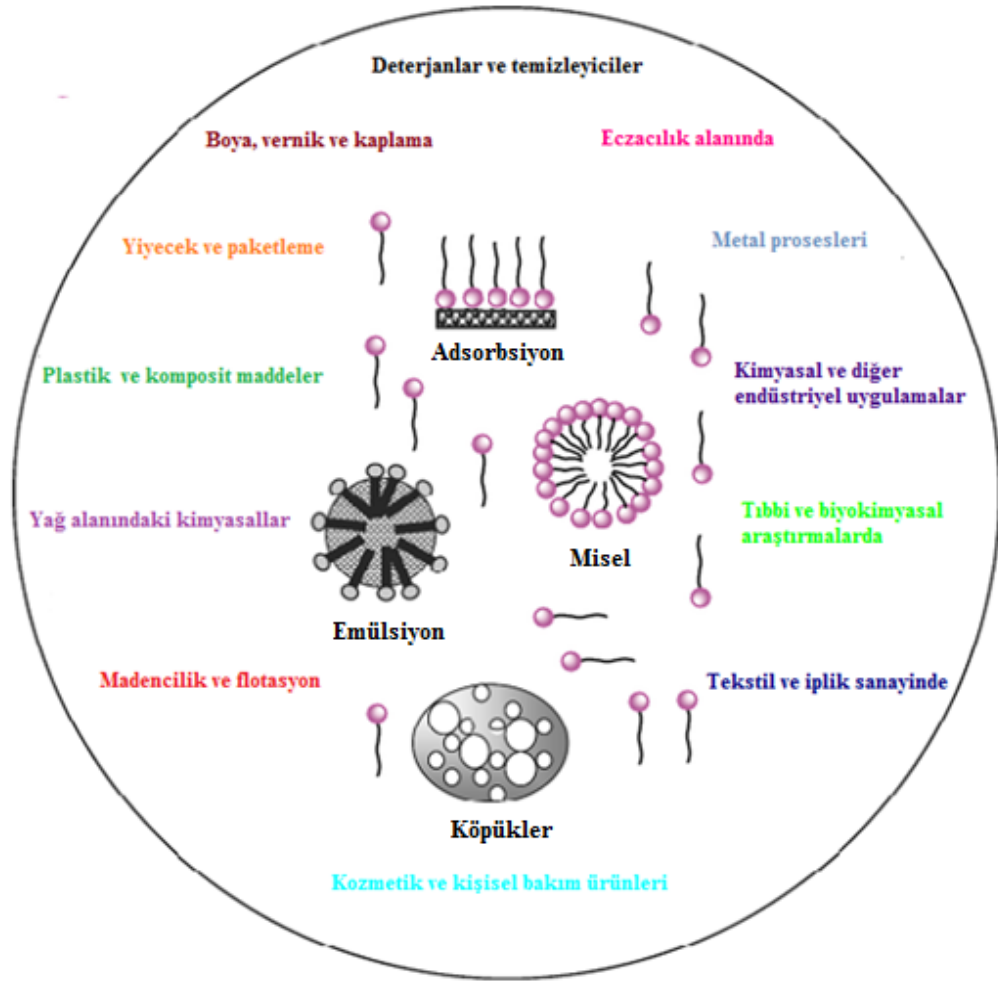


Şekil 1.6. Farklı şekillerdeki misel yapıları [23]

- Çözünürlük: Bir maddenin yüzey aktif madde olabilmesi için, likid bir sistemin en az bir fazında çözünmesi gerekir.
- Amphipatik yapı: Yüzey aktif madde molekülleri, çözünürlük eğilimine karşı koyan gruplardan oluşur. Suyun yüzey gerilimini düşüren, ıslatma ve deterjan özelliği gösteren yapı olarak tanımlanabilir.
- Fazlar arasında adsorbsiyon: Yüzey aktif maddeler yüzey gerilimini çok fazla düşürürler.
- Fonksiyonel özellikleri: Yüzey aktif madde solüsyonları, temizleme, köpürme, ıslatma, emülsifiye etme, dağıtma gibi fonksiyonel özellikler göstermektedirler [24].

1.1.3.1.1.2. Yüzey Aktif Maddelerin Kullanım Alanları

Yüzey aktif maddelerin gıda, eczacılık, deterjan, kozmetik ve tekstil gibi bazı önemli uygulama alanları vardır (Şekil 1.7).

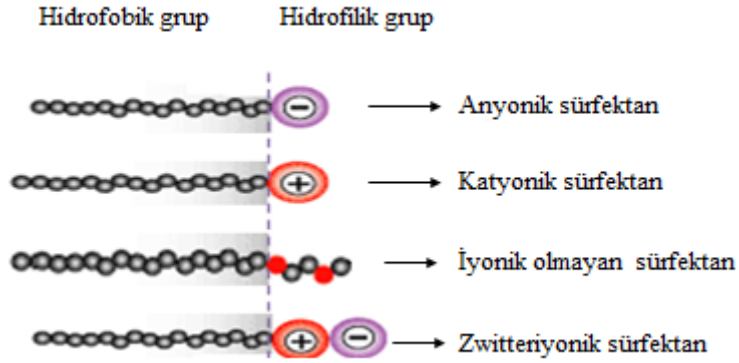


Şekil 1.7. Yüzey aktif maddelerin kullanım alanları [22]

1.1.3.1.1.3. Yüzey Aktif Maddelerin Sınıflandırılması

Sümfektanlar, polar baş grupların yapısına bağlı olarak sınıflandırılır (Şekil 1.8) [25]. Eğer baş grup negatif olarak yüklenmiş ise sümfektan anyonik bir sümfektandır. Buna karşın katyonik sümfektanlar pozitif yüklenmiş bir baş grup içerir. Yüksüz

sürfektanlar genellikle iyonik olmayan olarak adlandırılır. Hem negatif hem de pozitif olarak yüklenmiş grup içeren sürfektanlar ise zwitteriyonik sürfektanlardır [14].



Şekil 1.8. Sürfektanların sınıflandırılması [25]

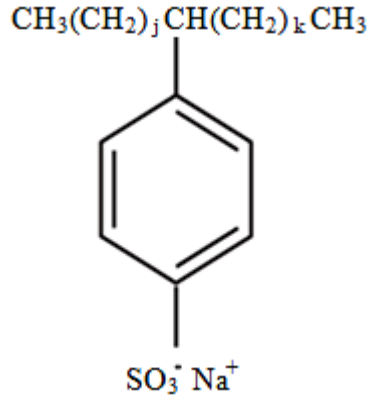
- **Anyonik Sürfektanlar**

Suda çözüdüğüleri hidrofil uçları anyon, yani negatif yüklü bir iyon oluşturur. Anyonik sürfektanlarda polar baş grup olarak, karboksilat, sülfat, sülfonat ve fosfat bulunmaktadır. Anyonik sürfektanlar, sürfektanların büyük bir kısmını meydana getirir ve diğer sürfektan sınıflarına göre daha büyük miktarda kullanılmaktadırlar. Bunların daha çok kullanılmasının nedeni imalatının daha kolay ve ucuz olmasıdır. Karşıt iyon olarak çoğunlukla sodyum, potasyum, amonyum, kalsiyum ve değişik protonlanmış alkil aminler kullanılmaktadır. Sodyum ve potasyum suda çözünürlüğü artırırken, kalsiyum ve magnezyum yağdaki çözünürlüğünü artırır. Amin/alkanol amin tuzları hem yağ hem de suda çözünen ürünler verir. Etkileri ve sudaki çözünürlükleri sıcaklıkla artmaktadır. Bir diğer özellikleri de çok köpürmeleri ve su sertliklerinden olumsuz etkilenmeleridir. Bu sürfektan maddeler iyi temizleme özelliklerinden dolayı daha çok çamaşır ve bulaşık deterjanlarında ve şampuanlarda kullanılmaktadır [15]. Anyonik sürfektanlar, deterjanların en büyük sınıfıdır ve 60 farklı grubu vardır. Bu maddeler; sabunlar, alkil benzen sülfonatlar, ikincil alkan

sülfonatlar, yağ alkolü sülfatları veya alkil sülfatlar, alfa sülfonik asit metil esterleri, alkil eter sülfatlar ve yağ esterleridir.

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 alkilsülfonat) ve LAB (lineer alkil benzen) şeklindedir. LAB köpürme özelliği yüksek ve çözünürlüğü fazla olan bir yüzey aktif maddedir. Fakat suyun sertliğinden etkilenmektedir. LAB deterjan içinde LAB olarak kullanılmayıp LABSA (Lineer Alkil Benzen Sülfonik Asit) formuna dönüştürülerek kullanılmaktadır. Yani lineer alkil benzen sülfonik aside dönüştürülmektedir (Şekil 1.9). LAB Türkiye’de üretilmemektedir. İthal edilip fabrikalardaki sülfonasyon ünitelerinde LABSA şekline dönüştürülmektedir [26].

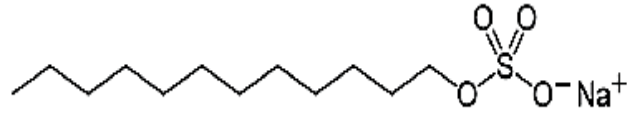


Şekil 1.9. Lineer alkil benzen sülfonik asit [26]

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Sodyum dodesil sülfat, sodyum lauril sülfat olarak da adlandırılan $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ şeklinde formüle edilen organik bir bileşiktir (Şekil 1.10). Organik sülfat grubu 12 karbonlu kuyruğa eklenerek deterjana amfibilik özellik verir.

SDS mükemmel temizleme özelliğinden dolayı en çok tercih edilen anyonik deterjanlardan biridir. Özellikle şampuan ve diş macunu için köpük maddesinin önemli bir bileşenidir. Başta temizlik madde formülasyonlarında, emülgatör, farmasötik, tekstil ve elyaf üretiminin yanı sıra plastik, boya, deri, fotoğrafçılık ve metal sanayi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [27]. SDS'in dünyada yaygın bir şekilde kullanımı sonucunda, gerek evsel gerekse endüstriyel atık sularla alıcı su ortamlarına önemli miktarda karışmaktadır. Genelde parçalanabilir yüzey aktif maddeler arıtma tesislerinde uzaklaştırılabilmelerine rağmen, indirgenmiş konsantrasyonlarda atık sularla nehir ve çaylara verilmektedir. Böylece sulama suyu olarak tarım alanlarında kullanılan sularla, yüzey aktif maddelerin toprağı da kirlettiğı gösterilmiştir [28-29].

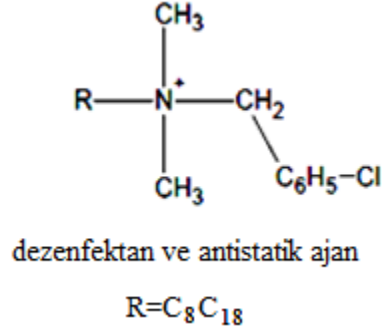


Şekil 1.10. SDS'in kimyasal yapısı [30]

- **Katyonik Sürfektanlar**

Sudaki çözeltileri katyon yani pozitif yüklü bir iyon oluştururlar. Temizlik gücü zayıf olduğundan yıkama maddelerinde kullanılmazlar. Hiçbir zaman anyon aktif maddelerle birlikte kullanılmaması gerekir. Kullanıldıklarında birbirlerini nötralize ederek çökerler ve özelliklerini kaybederler [10]. Katyonik sürfektanlar birçok yüzeyde güçlü olarak adsorplandığından dolayı yüzey modifikasyonlarında kullanılmaktadırlar. Katyonik sürfektanların büyük bir çoğunluğu, katyonik yük taşıyan azot atomuna dayanmaktadır (Şekil 1.11). Hem amin hem de kuaterner amonyuma dayalı ürünler oldukça fazladır. Aminler, yalnızca protonlanmış durumda sürfektan olarak fonksiyon gösterirler, bu nedenle yüksek pH değerlerinde kullanılamazlar. Kuaterner amonyum bileşiklerinin pH'a karşı duyarlılığı yoktur.

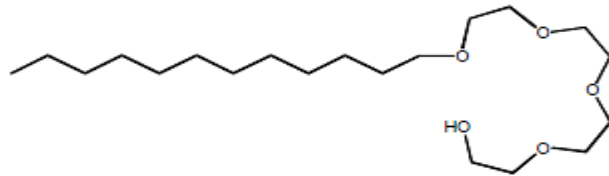
Kuaterner olmayanlar da çok değerlikli anyonlara karşı oldukça yüksek hassasiyete sahiptir. Dezenfektanların ve çamaşır yumuşatıcıların üretiminde kullanılır [15].



Şekil 1.11. Katyonik sürfektan molekül yapısı [26]

- **İyonik Olmayan Sürfektanlar**

İyonik olmayan sürfektanlar, diğer bütün sürfektan türleri ile uyumludur. R grubu, yağ alkolleri, alkil fenoller ve oxo alkolleri olmak üzere genel formülleri R-O-(CH₂-CH₂-O)_nH'dır (Şekil 1.12). Sert sulara karşı hassasiyetleri yoktur. İyonik sürfektanların tersine fizikokimyasal özellikleri, elektrolitler tarafından belirgin bir şekilde etkilenmez. Bunlar yüksek sıcaklıklarda suda daha az çözünür ve daha hidrofobik hale gelirler [15].

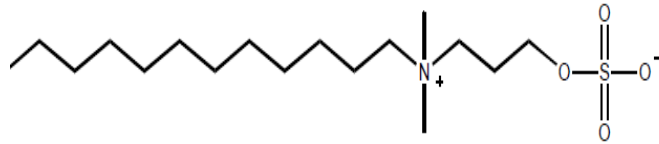


Şekil 1.12. İyonik olmayan sürfektan molekül yapısı [22]

İyonik olmayan sürfektanlar, polar grup olarak ya bir polietere ya da polihidroksil birimlerine sahiptir. İyonik olmayanların büyük bir kısmında polar grup, oksietilen birimlerinden oluşan bir polieterdir. İyonik olmayan deterjanların anyonik deterjanlar için kimyasal ara ürünler, emülsiyon oluşturucular, köpük arttırıcılar ve çok sayıda ilaç uygulamaları da vardır. İyonik olmayan deterjanlar renk açma özelliklerinden dolayı tekstil sanayinde kullanılırlar [11].

- **Zwitteriyonik Sürfektanlar**

Zwitteriyonik sürfektanlar en küçük sürfektan sınıfıdır. Bunlar genellikle asit ve bazlarda kararlıdır. Göz ve deride çok düşük tahribat gösterdiklerinden dolayı birçok türünün şampuan ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılması uygundur. Zwitteriyonik sürfektanlar, farklı işaretle iki yüklü grup içerirler (Şekil 1.13). Pozitif yük, genellikle amonyumken, negatif yük kaynağı en yaygın olarak karboksilatlar olmasına rağmen değişebilir. Zwitteriyonikler, amfoterikler olarak da adlandırılır. Bu gruptaki yüzey aktif maddeler çok etkili, fakat çok pahalıdır. Yapıları ve üretimleri oldukça karışıktır. Bu tip maddeler deterjan hammaddesi olarak çok yaygın bir şekilde kullanılmakla birlikte, asidik ortamda katyonik, bazik ortamda anyonik olarak hareket ederler. Aynı molekülde hem anyonik hem de katyonik kısım vardır. Anyonik ve katyonik kısımlar molekülde denge halinde olduğu takdirde deriyi tahriş edici ve göz yakıcı özellikleri yoktur. Bu nedenle özel şampuan ve deriyi koruyucu preparatlarda kullanılırlar [13].



Şekil 1.13. Zwitteriyonik sürfektan molekül yapısı [22]

1.1.3.1.2. Yapısal Maddeler

Yapısal maddeler birçok fonksiyonu birden yerine getirerek yıkamanın tamamlanmasına yardımcı olurlar. Yıkama suyundan, tekstilden ve diğer kirli ortamlardan kalsiyum ve magnezyum gibi metal elementlerini uzaklaştırırlar [33]. Deterjan endüstrisi tarafından en iyi olarak nitelendirilen yapısal madde STPP (sodyum tripolifosfattır). Deterjan formülasyonlarında iyon değiştirici yapısal maddelerin başında ise zeolitler (sodyum alumina silikatlar) gelmektedir [11]. Sodyum tripolifosfat:

- Su sertliğine neden olan iyonlarla (Ca^{+2} , Mg^{+2}) kompleks yaparak uzaklaştırma özelliği dışında aktif maddelere sinerjistik etkisinin olması,
- Suyun pH'sını 9-10 arasında tutarak temizleme işlemini kolaylaştırmak,
- Kirin su içinde kalmasını sağlama, çamaşır makinelerinin yıpranmasını önlemek, ekonomik olmak,
- Toksik özelliğinin olmaması,
- Cilde alerjik etkisinin bulunmaması nedenleriyle önemli fonksiyonlara sahip yapısal maddedir [2].

Çevresel problemler oluşturduğu için sodyum tripolifosfat yerine zeolitin kullanıldığı, ama son yıllardaki araştırmalara göre zeolitin de çevresel sorunlar meydana getirdiği belirtilmektedir [11]. Üç tip yapıcı madde grubu vardır. Bunlar:

1.1.3.1.2.1. Alkaliler

En çok kullanılan sodyum karbonat ve sodyum silikattır. Suyun sertliğini artıran metal iyonlarını çöktürürler, deterjan çözeltisinin pH'sını alkali ortamda tutarak kirlerin ve tekstil elyafının negatif zeta potansiyelini arttırıp bazı kirlerin tekrar elyaf

üzerine çökelmesini önleyici rol oynarlar. Fakat toprak alkali karbonat ve silikatlarının elyaf ve çamaşır makinesi parçaları üzerinde toplanmasına neden oldukları için bir deterjanın yapısında yalnız başlarına kullanılmamalıdır [7].

1.1.3.1.2.2. Kompleks Yapıcılar

Bu grupta en çok tanınan kompleks yapıcı madde sodyum tripolifosfattır. Alkalilere göre çok büyük avantajlara sahiptir. Su sertliğine neden olan metal iyonlarını kompleks halinde bağlayarak zararsız hale getirir ve bir çökeltiye neden olmaz. Ayrıca, ağır metal iyonlarını da kompleks halinde bağlar. Bu özelliğine ek olarak STPP tampon etkisi nedeni ile yıkama çözeltisinde alkaliliğin devamlılığını sağlar. Sodyum tripolifosfatın yıkamaya yardım eden temizleyici özelliği de bulunmaktadır. Ancak, deterjanlardan kaynaklanan ve atık sulara geçen fosfatlar göl sularında ötrofikasyona neden olmakta ve bu yüzden, deterjanlara fosfatların katılması bazı ülkelerde yasaklanmış bulunmaktadır. Sodyum tripolifosfattan başka en çok tanınan başlıca yapıcı maddeleri; tetrasodyum pirofosfat, trisodyum fosfat, bazı fosforik asit türevleri, EDTA, nitriol asetik asit, sitrik asit ve bazı polikarboksilik asitler şeklinde sıralamak mümkündür [10].

1.1.3.1.2.3. İyon Değiştiriciler

Bunlar kalsiyum ve magnezyum metallerini sodyum iyonuyla değiştirerek zararsız hale getirirler. En tanınmış olanları zeolit-A olup bu madde poliakrilik asit türevleri ile birlikte kullanıldığında STPP performansına yaklaşmaktadır. Kalsiyum ve magnezyum kationlarını uzaklaştırma konusunda yapılan pek çok araştırma sonucunda düzgün kristal forma sahip sodyum alüminyum silikatların bu işleme uygun olduğu bulunmuştur. En ekonomik ve kullanılabilir olan iyon değiştirici zeolit 4A adı verilen üründür. Kalsiyum ve magnezyum haricinde Pb, Cu, Ag, Cd, Zn ve Hg iyonlarını da tutma özelliğine sahiptir [7].

1.1.3.1.3. Ağartıcılar (Beyazlatıcılar)

Ağartıcı terimi, en geniş anlamı ile bir objenin rengindeki açılmayı sağlayan madde olarak ifade edilebilir. Genel olarak ağartma etkisi mekanik, fiziksel veya kimyasal olarak gerçekleşebilir. Yıkama işlemi sırasında bu proseslerin hepsi paralel fakat değişik oranlarda gerçekleşebilir. Ağartıcıların etkisi, tipi dâhil olmak üzere konsantrasyonuna, zamana, sıcaklığa, kirin tipine ve tekstil ürününün cinsine bağlıdır. Beyazlatma genellikle yüksek sıcaklık (90-95°C) istediği için son zamanlarda düşük sıcaklıklarda da yıkama ve beyazlatma özelliğini sağlamak amacıyla bazı oksijen aktive edici maddeler kullanılmaya başlanmıştır. En çok kullanılan peroksit aktive edici tetra asetilen daimindir [3]. Ağartıcılar temizleyici değildirler. Yalnızca % 2-3 oranında kir uzaklaştırma etkileri vardır. Bir yıkama formülünde ağartıcının fonksiyonu, çamaşır elyafını boyamış olan pigmentleri okside ederek renksiz hale getirmek ve parçalayarak çözümlü hale getirmek suretiyle uzaklaştırmaktır [11].

1.1.3.1.4. Diğer Yardımcı Maddeler

1.1.3.1.4.1. Enzimler

Enzimler bilhassa protein bazlı kirlerin parçalanıp temizlenmesini sağlayan çok önemli bileşenlerdir. Deterjanda kullanılacak enzim, yıkama süresi bir saatten az olduğu halde yüksek etkinlik göstermeli, heterojen kirlerle karşılaştığında düşük spesifiklik göstermemeli, yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğu gibi alkaliteye karşı da stabil olmalıdır. Ayrıca deterjan içindeki kompleks yapıcılara, perborata, yüzey aktif maddelere karşı da stabil olmalı ve uzun müddet depolanmada herhangi bir bozunma göstermemelidir. Bu özelliklerin birçoğuna sahip olan serin proteinleri deterjan piyasasında en fazla kullanılan enzim türüdür. Enzimler gerek üretim, gerekse deterjanlara katılmaları sırasında insan ve çevre sağlığına hiçbir olumsuz etkilerinin olmaması için gerekli bütün önlemler alınır [7].

1.1.3.1.5. Optik Beyazlatıcılar

Kumaş üzerine düşen gözle görünmeyen ultraviyole 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, klora ve ısıya dayanıklı olmalıdır [11].

1.1.3.1.5.1. Köpük Stabilizatör ve Regülatörleri

Yıkamada deterjanın köpüğünü arttırıcı maddelerdir. En bilinenleri; polikarboksilik asitler, yağ asidi amidleri, yağ asitleri alkanol amidleri, betainler, sulfobetainler, aminoksitlerdir [10]. Bir maddenin köpük ayarlayıcı olabilmesi için düşük çözünürlüğe ve yüksek yüzey gerilimine sahip olması gerekmektedir. Piyasadaki LAS/yağ alkolü poliglitol, eter özellikli deterjanların köpüğü uzun karbon zincirine sahip sabunlarla kontrol edilmektedir [11].

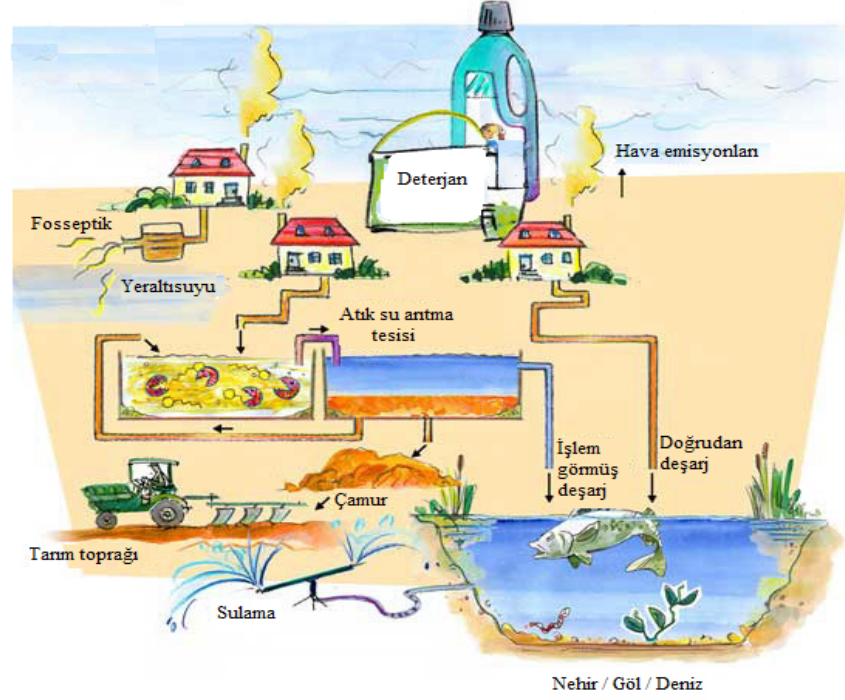
1.1.4. Deterjanların Çevre ve Canlılar Üzerine Etkisi

Organik kirleticilerden olan deterjan kirliliği denizlere, göllere ve nehirlere evsel ve endüstriyel atıklarla gelmektedirler (Şekil 1.14). Deterjanların boşaltıldıkları alıcı sulara başlıca etkileri, köpük oluşturma, biyolojik ayrışma sonucu oksijen tüketimi, su yaşamına toksik etki olarak özetlenebilir. 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 ayrışır ve bu ayrışma sırasında ortamdaki çözünmüş oksijeni kullanırlar, bu da ani oksijen eksikliğine neden olabilir. Deterjanlar, sulardaki biyolojik yaşam üzerinde birçok olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Özellikle deniz suyundaki deterjan miktarının belli değerdan fazla olması durumunda organizmalara toksik etkiler yapacağı belirtilmektedir [2]. Sucul hayvan türlerinde patolojik,

embriyolojik, üreme, fizyolojik, biyokimyasal ve diğer etkilere sebep olurken, sucul bitki türlerinde sararma, klorofil-protein kompleksinin parçalanması, membrana zarar vererek hücre ölümü, metabolizma ve büyümenin geciktirilmesi, patomorfolojik başkalaşım, biyokütle artışında, protein ve DNA sentezinde azalmalar gibi deterjana bağlı etkiler deneylerle gösterilmiştir [31]. Marmara Denizi'nde gözlenen, aşırı plankton üremesinden kaynaklanan kırmızı su (red tide) olaylarına neden olan kimyasal atıkların önemli bir kısmını da deterjanlar oluşturmaktadır [32].

Deterjanlar çok kuvvetli balık zehirleridir. Balıkların solunum yolları ile tuz dengesini bozarlar. Solungaç hücrelerinde incelmeye, büyüme ve kanama meydana gelir. Balıkların kronik olarak az dozlarda maruz kalmaları bile onların ölümüne neden olur. Suda devamlı fakat az miktardaki deterjan balıkta metabolizmayı bozup kuluçka süresinin gerilemesine neden olur. Gıda zinciri ile insana geçerek zararlı olur. Balıklar üzerinde deterjanların toksik etkileri araştırılmış, balıkların omurgasızlara oranla daha hassas oldukları saptanmıştır. ABS'nın 0.01 ppm'lik, LAS'ın 1 ppm'lik konsantrasyonunun *Crassostrea virginica* ve *Merceneria merceneria* veliger larvalarında büyümeyi durdurduğu gözlenmiştir. Crustaselerden *Elminius modestus* ve poliketlerden *Sabellaria spinulosa* yumurta ve larvalarına benzer toksik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Deterjan içeren suda, diğer kirleticilerin de etkileri artabilir. Örneğin milyonda bir oranında deterjan içeren suda dikloro difenil trikloroethan (DDT) gibi böcek öldürücü pestisidlerin balıklardaki toksisitesi artmaktadır. Diğer yandan sudaki miktarına göre deterjanın canlıda yüksek oranda biriktiği çalışmalarla saptanmıştır. Yapılan bir araştırmada bir balık türünün etinde 18 mg/kg'a kadar deterjan birikebildiği saptanmıştır. Yani deterjan, denizden aldığımız besin zinciri yoluyla bizlere kadar ulaşabilmektedir [2]. Deterjan ve şampuanların bulunduğu nehir suyu örneklerinde doğal mikrobiyal komünite gibi hücre sayısındaki artışın, metabolik işlemler için tek karbon ve enerji kaynağı olarak yüzey aktif maddelerin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir. Deterjan ve şampuanlardaki STPP gibi maddeler mikrobiyal gelişme için besin kaynağı olarak da kullanılabilirler [33]. Yapılan bir çalışmada, satılan bazı deterjanların biyolojik parçalanmaya dirençli bileşenler içerdiği belirlenmiştir. Bu kimyasal ürünlerin, kanalizasyon gibi sucul ortama karışıklarında, dirençli olmaya devam ettikleri bildirilmiştir. Son yıllarda deterjanlarda, biyolojik olarak

parçalanamayan bileşiklerin yerine biyolojik olarak parçalanabilen bileşiklerin kullanılması nedeniyle sucul ortamlarda daha düşük deterjan miktarlarının bulunduğu bildirilmiştir [31].



Şekil 1.14. Deterjan kirliliğinin sembolize edilmesi [34]

1.1.4.1. Deterjanların İçme Sularına Etkileri

İçme suyu amaçlı kullanılan kuyu sularında parçalanmaz özellikte dallanmış zincire sahip ABS moleküllerine rastlamak mümkündür. Dolayısıyla oluşan köpük problemini çözmek için ABD ve Avrupa'da 1964-1965 yıllarında tümüyle LAS kullanılmaya başlanmıştır. Değişik tuzluluk derecesine sahip alıcı ortam analizlerinde LAS'ın % 80-90 oranında parçalandığı, bir atık su örneğinde ise, LAS'ın 0.5 mg/L konsantrasyonun altına iki aylık bir periyot içinde ulaştığı, ABS taşıyan aynı miktardaki atık su örneğinde ise, ABS'nin 5.5 yıllık bir periyotta 0.5 mg/L'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Aerobik arıtma tesislerinde de LAS'ın kolaylıkla

parçalandığı, parçalanmayan kısmın yarattığı toksisitenin önemli miktarda olmadığı bildirilmiştir. Bu açıdan ülkemizde son yıllarda deterjan yapımında aktif madde olarak biyolojik parçalanması oldukça kolay olan LAS kullanılmaktadır [1]. İçme sularında zararsız fosfor konsantrasyonu 7 mg/L P₂O₅ üst sınırdır. Deterjanlar konusunda Dünya Sağlık Teşkilatı'nın önerdiği limitlere göre içme suyunda bulunabilecek anyonik deterjanlar 0.2 mg/L'yi geçmemelidir. Yine aynı kuruluşun 1984 yılında yayınladığı "İçme Suyu Kalitesi için Ana Hatlar" adlı yayında deterjanlar için sınır değer verilmemekte, ancak içme suyunda köpük, tat ve koku meydana getirmeyecek seviyede olması gerektiği belirtilmektedir. Deterjanlar insanlara içme suyu ile ayrıca deterjanla kirlenmiş su ile yıkanan meyve ve bitkiler ve çalkalanmadan kullanılan kaplarla geçebilir. Evlerde yıkanan kaplar sonradan çalkalandığı zaman suya 0.2-1 ppm yüzey aktif madde verir [1].

1.1.4.2. Deterjanların İnsan Sağlığına Etkileri

Bütün yüzey aktif madde gruplarının bazı yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Deterjanlar insan vücuduna deri, sindirim sistemi, solunum yoluyla girmektedir. Deriye temas ettiğinde derinin yağın alarak kurumasına, çatlamasına ve hassas kişilerde dermatitlerin oluşmasına neden olmaktadır. Deterjanların içeriğinde çok miktarda fosfat ve klor vardır. Bunların yutulması ve solunması zararlıdır. Bu yüzden deterjanlarla yıkanan bulaşıklar iyice durulanmalıdır. Bulaşık yıkarken buharlaşan klorun etkisiyle gözlerde yanma, solumada zorluk, baş ağrısı gibi etkiler ortaya çıkar. Bu deterjan maddeleri kanalizasyona karışıp trihalometani oluşturuyor, ayrıca kanalizasyonlardaki yararlı bakterilerin ölmesine sebep oluyor. Deterjan içerisinde bulunan yüzey aktif madde dışında önemli oranda (% 70-90) bulunan temizleyici, beyazlatıcı, yumuşatıcı, köpürtücü, parlaklık verici ya da antiseptik özellik veren katlı maddelerinin çoğu da yüzey aktif madde gibi insan organizmasına gıdalarda ve diğer yollardan girdiklerinde dokularda irritasyon sonucu olumsuz etkilere neden olabilmektedirler. Her ne kadar bu maddelerin kanserojen etkili olduklarına ilişkin bilgi olmasa da birçok kanser türünün dokuların sürekli irritasyonu sonucu oluşabildiği literatürlerde vardır. Kokulu deterjanlar (tuz ruhu, kezzap, çamaşır suyu) akciğer hastalıklarına ve bağırsak kanserine yol açmaktadır. Koku giderici spreyle

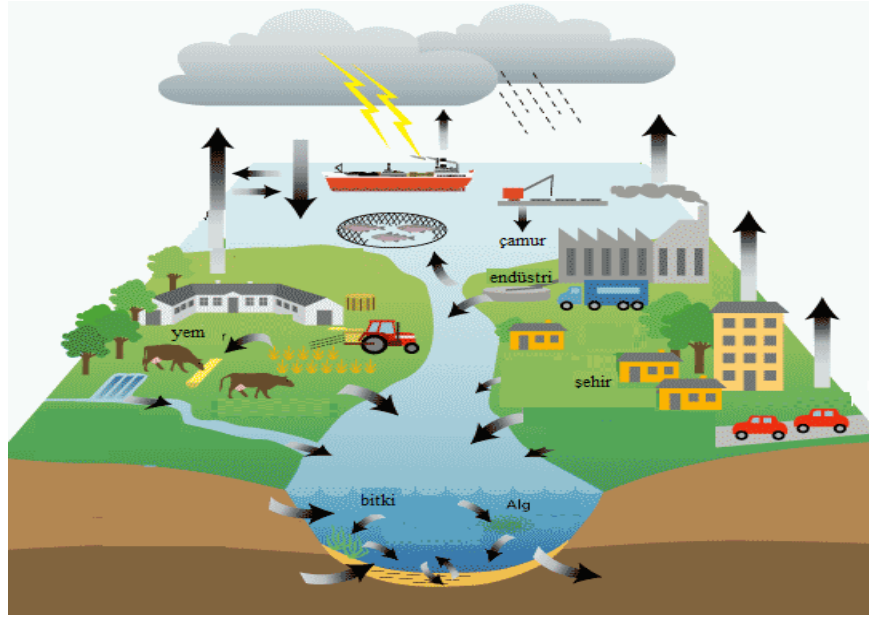
havadaki kokuları yok etmezler. Bir kısmı kötü kokuları hoş kokularla örter; bir kısmı da burun yollarını yağlı bir tabakayla kaplayıp koku alınmasını engeller. Bunlar etanol, naftalin formaldehit içerir. Cam temizleyicilerin çoğunda sadece su, amonyak ve mavi boya vardır. Bunlardan amonyak içerenlerin tahriş edici etkisi olduğundan solunması ve göze teması zararlıdır [35].

1.1.4.3. Deterjan Kaynaklı Fosfatın Etkisi

Sulu sistemlerde fosfor, bu sistemlerde mevcut olan çok yönlü ve karmaşık kimyasal dengelerin anahtar elemanlarından biridir. Sularda fosfat, çözülmüş fosfat, çözülmüş organik fosfat ve partiküle fosfor bileşikleri halinde bulunur. Çözülmüş fosfat çoğunlukla orto fosfat iyonları ($H_2PO_4^-$, HPO_4^-) halindedir. Suda fosfat bileşiklerinin dağılımı pH'nin fonksiyonu ile değişir. Evsel atık sularda fosforun yaklaşık % 50'si evsel ve endüstriyel orijinli atıklardan, kullanılan deterjanların yapısındaki fosfattan gelir. Bu madde $Na_4P_2O_7$ (sodyum bifosfat) ve $Na_5P_3O_{10}$ (sodyum trifosfat) şeklinde bulunur. Evsel kökenli pis sulardaki toplam fosforun 1.6 gr P/N gün deterjanlardan, 1.7 gr P/N gün insan dışkılarından ve 57 mg P/N gün ise yiyecek maddelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Evsel atık sulardaki fosforun ana kaynağı, 1925'te $Na_4P_2O_7$ ve 1934'te $Na_5P_3O_{10}$ olarak değiştirilip kullanılan çamaşır temizleme tozlarıdır. Bugün dünyada 3.000.000 ton fosfat çamaşır tozu için kullanılmaktadır. Tarımsal üretim alanlarından yıkanarak suya karışan fosfor miktarı 0.2-1 kg P/ha yıl olarak verilmekte olup alıcı ortam suya fosforun % 91'i evsel ve endüstriyel atıklardan gelirken, % 9'u da tarımsal alanlardan gelmektedir [26].

Atık sularla, erozyonla, tarımsal topraklardan drenajla ve yağmur sularıyla gelen azot, fosfor gibi besleyici elementlerin, göl, nehir, durgun su ve körfezlerde maksimum düzeye ulaşması sonucu aşırı alg çoğalmasının ardından ötrofikasyon sorunu ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.15). Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) ötrofikasyonu "suların besleyici elementlerce zenginleşmeleri sonucu artan alg ve makrofit üremesi, balık avlama alanlarının, su kalitesinin nitelikçe bozulmasına kadar varan bir dizi semptomatik değişim ve su kullanımı ile uyuşmayan diğer başka etkilerinin ortaya çıkması" olarak tanımlamaktadır.

Ötrofikasyon, alglerin hızlı çoğalması, alglerin neden olduğu koku ve tat, bazı alglerin salgıladığı toksik maddeler, su yüzeyinde alg kütlelerinin yüzmesiyle oluşan estetik problemler, göl tabanında organik maddelerin birikmesi, oksijen tükenmesi ve balık ölümleri, birçok yabancı bitkilerin yetişmesi, suda organik maddelerin neden olduğu renklenme, suyun filtrasyonunda zorluklar ortaya çıkması, denize girilen sahillere ve denizciliğe olumsuz etkileri gibi birçok probleme neden olur. Ötrofikasyon daha da arttığında flora ve fauna için olumsuz etki yapan hiperötrofikasyon sorunu ortaya çıkmakta ve bu olay yüzeysel suların yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır [36]. Dünyada çeşitli alıcı sularda yapılan çalışmalar alg gelişimini sınırlayıcı parametrenin fosfor, klorofil konsantrasyonları ve ışık geçirgenliği ile birlikte ifade edilen fosfor düzeyi olduğunu ortaya çıkarmıştır [2].



Şekil 1.15. Ötrofikasyonun sembolize edilmesi [37]

Ötrofikasyonun önlenmesi için, kanalizasyon sularına fosfor deşarjının azaltılması, özellikle fosfatsız deterjanların kullanılması, göllerde, iç sularda birikmiş olan fosfatların kimyasal çöktürme ile elimine edilmesi, organik maddelerin parçalanmadan önce mekanik toplayıcılarla ortamdan çıkarılması, suya herbivor balık ilavesi, ortamı oksijenlendirme, ekosisteme temiz su ilavesiyle kirlenmiş suyun

yerini değiştirme, özellikle göl çevresindeki tarım arazilerinde kimyasal gübrelerin bilinçli kullanılması ve göl ortamına ulaşmasının engellenmesi amacıyla teraslama uygulaması yapılmalıdır [36].

Deterjanlarda STPP kullanımının engellenmesiyle, evsel atık suların fosfat yükünün % 20-25 oranında azalabileceği saptanmıştır. Evsel atık sular için kimyasal çöktürme veya biyolojik arıtım yöntemleriyle % 90 verimle fosfat uzaklaştırılması mümkündür. Bunlardan en çok uygulanan yöntem alüminyum tuzları, demir tuzları veya kireç ilavesiyle uygulanan kimyasal çöktürmedir. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucu STPP dolgu maddesi yerine, zeolitler, nitrilotriasetat ve alkalilerin kullanılabileceği saptanmıştır. Zeolitler, sodyum alüminyum silikatlar olup, iyon değiştirme yoluyla suyu yumuşatırlar. Nitrilotriasetat, nitrilotriasetik asitin sodyum tuzu olup, suda sertliğe yol açan iyonları çok iyi bağlar. Fakat maliyeti STPP'ye göre çok yüksektir, ayrıca çevrede yaratabileceği toksik etki ve ağır metalleri alıcı sulara tasıma özelliğinden dolayı birçok ülkede kullanımı yasaklanmıştır. Alkalilerin temizleme güçleri STPP seviyesine ulaşmamaktadır. Toprak alkali karbonat ve silikatlar suda sertliğe neden olan iyonlarla çözünmez bileşikler oluştururlar. Yurdumuzda başlangıçtan beri dolgu maddesi olarak STPP kullanılmaktadır [2].

Avrupa'da, atık çamurunun kullanımının tarımda yaygınlaşması, kullanılan pahalı gübreler yerine topraktaki fosfatın yeniden tutulması gibi yöntemlerle atıklarda bulunan fosfatın yarısından fazlası 1990'lardan bu yana geri dönüştürölmektedir. Uygulanan Avrupa evsel atık su arıtım yönergesinde, evsel atıklardaki fosfatın deterjan içeren farklı kaynaklardan, yiyecek atıklarından, insan idrarı ve dışkılarından kaynaklandığı ve artık etkileyici çevresel konulardan biri olduğu gösterilmektedir. Bu yönergede genişleyen kentlerdeki tüm atık çalışmalarında, fosfatın ortadan kaldırılmasının potansiyel olarak ötrofikasyona yatkın veya yüzey sularına deşarjdan sonra arıtıma yatkın sularda gerekli olduğu önemle belirtilmiştir. Atıktan potansiyel olarak kullanılır fosfatın geri dönüşümüyle elde edilen miktarlar oldukça artmıştır ve atıktan fosfat eldesi önemli bir gelişme olarak kaydedilmiştir. Endüstriyel proseslerde fosfatın ayrıştırılması için çeşitli yollar hala tartışılmaktadır [38].

1.1.5. Atık Sulardaki Deterjan Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılan Yöntemler

Atık su arıtımı, çeşitli kullanımlar sonucu oluşan atık suların deşarj edildikleri alıcı ortamın fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerini değiştirmeyecek hale getirmek için uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtım yöntemlerini kapsamaktadır. Atık sularda deterjan ve fosfat kirliliğinin önlenmesi için biyolojik parçalanabilirliği fazla olan yüzey aktif maddeler kullanılmalıdır. Deterjan ve dolayısıyla fosfatın mikroorganizmalar tarafından parçalanması şeklinde uygulanabilir. Birçok mikroorganizma türünün deterjanları karbon kaynağı olarak kullanabildikleri dikkate alınır, deterjan miktarları azaltılabilecektir. Böylece hem deterjan miktarlarının kaynağında kontrol edilerek alıcı sularda canlılar için toksik etkileri azalacak, hem de deterjan kaynaklı fosfatlar da biyolojik arıtım tesislerinde önemli ölçüde tutulabilecektir. Biyolojik olarak ayrışabilirliği yüksek SDS, LAS tipi deterjanlar biyolojik arıtma sistemlerinde diğerkentsel atık sularla birlikte arıtılabilmektedir. Ancak ABS tipi deterjanların biyolojik ayrışabilirliği düşük olduğundan bu tip deterjanlar çok parçalanabildiğinden bunların arıtımı için kimyasal oksidasyon ve aktif karbon adsorpsiyon yöntemleri tercih edilmelidir [39].

1.1.5.1. Fiziksel Arıtım

Fiziksel arıtma atık su içerisinde bulunan yüzer maddeler ile kendiliğinden çökebilendir katı maddelerin giderilmesi amacıyla yapılır. Bu amaçla kullanılan ekipmanlar: ızgara ve elekler, kum ve yağ tutuculardır. Deterjan gideriminde fiziksel arıtım yöntemlerinden en yaygın kullanılanı flotasyon yöntemidir. Bu yöntem endüstriyel atık suların içinde bulunan yağ zerreciklerinin atık suya katılan koagülant maddeler tarafından adsorplanması ve bunların hava kabarcıklarıyla su yüzeyine taşınması ilkesine dayanır (Şekil 1.16). Flotasyon işleminin başlangıcında atık su, karıştırıcıya alınır. Burada dolanım suyu koagülantla ($Al_2(SO_4)_3$ çözeltisi) karıştırılır. Karışımın pH değerine bakılır. Endüstriyel atık sular, karıştırıcıdan sonra basınç düşürücülerden geçirilir ve flotasyon tanklarına gönderilir. Burada atık su içinde hava kabarcıkları ve köpük oluşur. Yağ zerrecikleri köpük içinde tutulur ve hava kabarcıklarıyla birlikte

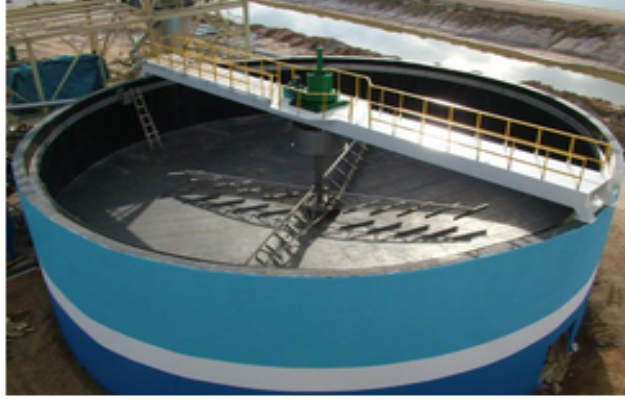
su yüzüne yükselerek yüzeyde birikir. Bu birikinti, köpük sıyrıcılarıyla sıyrılarak ortamdaki uzaklaştırılır. Tank tabanında biriken yağlı çökelti ise, pompa istasyonuna gider. Doyurulan çamur, pompalarla kurutma yataklarına gönderilir [40].



Şekil 1.16. Endüstriyel flotasyon işlemi [41]

1.1.5.2. Kimyasal Arıtım

Kimyasal arıtma sistemleri suda çözülmüş veya askıda halde bulunan maddelerin fiziksel durumunu değiştirerek çökelmelerini sağlamak üzere uygulanan arıtma tekniğidir. Kimyasal arıtma işleminde, uygun pH değerinde atık suya kimyasal maddeler ilave edilmesi sonucu, çöktürülmek istenen maddeler çökelti olarak çamur halinde sudan ayrılır. Bu yöntemde deterjan gideriminde etkili sistemler flokülasyon ve koagülasyondur. Flokülasyon atık suyun uygun hızda karıştırılması sonucunda koagülasyon işlemi ile oluşturulmuş küçük taneciklerin, birbiriyle birleşmesi ve kolay çökebilecek taneciklerin oluşturulması işlemidir (Şekil 1.17). Koagülasyon ise koagülant maddelerin uygun pH da atık suya ilave edilmesi ile atık suyun bünyesindeki kolloidal ve askıda katı maddelerle birleşerek flokül oluşturmaya hazır hale gelmesi işlemidir [40].



Şekil 1.17. Endüstriyel koagülasyon işlemi [42]

1.1.5.3. Biyolojik Arıtım

Biyolojik arıtma sistemlerinde ortamın anaerobik ve aerobik olması durumlarında sıvı fazdaki fosfat konsantrasyonu değişmektedir. Anaerobik şartlarda sıvı fazda fosfat konsantrasyonu yükselmekte ve organizmalar ortama fosfat vermektedirler. Aerobik şartlarda sıvı fazdaki fosfat organizmalar tarafından tutularak fosfat konsantrasyonu azalmaktadır. Biyolojik işlemin esas amacı suda çözülmüş olan organik maddeleri bakteri etkisiyle karbondioksit hâline getirerek sudan uzaklaştırmaktır. Bu işlemden sonra atık su, kirleticilerin büyük bir kısmından kurtarılmıştır. Klorlama veya başka bir madde ile dezenfeksiyondan sonra çevre sularına verilebilir. Eğer daha fazla bir arıtma isteniyorsa üçüncül adı verilen fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal yöntemlerden oluşan ileri bir arıtma yöntemi uygulanmalıdır. Biyolojik arıtma yönteminin uygulanmasında, atık suların gerekli organik maddeyi bulundurması ve suda ağır metaller gibi biyolojik arıtmaya zararlı madde bulunmaması istenir. Biyolojik arıtma, kullanılmış sudaki organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından besin ve enerji kaynağı olarak kullanılması esasına dayanır. Bu kullanım anında organik maddelerin bir kısmı enerjiye dönüştürülürken diğer kısmı hücre için gerekli maddelerin sentezinde kullanılır. Kullanılmış suda gelişen ve arıtmada önemli olan başlıca organizmalar: bakteriler, mantarlar, algler, protozoalar, rotiferler, kabuklular ve virüslerdir. Organizmalar, oksijenin kullanımına göre iki ana gruba ayrılır: Birinci grup moleküler oksijenden yararlanan ve oksijen

bulunan yerlerde yaşayabilen aerobik organizmalar, diğeri oksijenin bulunmadığı yerlerde yaşayan anaerobik organizmalardır. Buna bağılı olarak arıtma da aerobik ve anaerobik sistemlerde yapılır [43].

Kimyasal ve biyolojik arıtım birlikte kullanıldığında fosfor giderme yönteminde kimyasal çökeltme işlemi, ön çökeltme, biyolojik arıtım sırasında ve son çökeltme şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Ön çökeltmeden sonra, organik maddeleri giderebilen bir biyolojik arıtma basamağı bulunmaktadır [44]. *Acinetobacter* aktif çamur prosesleri içerisinde fosfat gideren mikroorganizma olarak bilinmektedir [45]. Biyolojik arıttımdan sonraki kimyasal arıttımda, aktif çamur sistemindeki havalandırma tankı flokülasyon ve kimyasal çökeltme tankı olarak kullanılmaktadır. Burada havalandırma sistemi suyun karışmasını da sağlamaktadır. Ancak, bu sistemde havalandırmanın çok hızlı olması sebebiyle kimyasal flokların parçalanarak, aktif çamur çıkış suyunda bulunması ve ardından gelen çöktürme ünitesinde sudan ayrılması mümkün olmayan, dağılmış yumakların suda kalması gibi bir problem ortaya çıkacaktır. Ön çökeltme ve son çökeltmede koagülasyon-flokülasyon ve çöktürme birimleri ayrı bir sistem olarak oluşturulması ile daha verimli fosfat giderimi gerçekleştirilebilecektir. Kimyasal arıtım ikincil biyolojik arıttımı takip eden üçüncül arıtım olarak da kullanılabilir [46].

1.1.6. Deterjanların Biyodegradasyonu

Kendi içinde bir dengeye ulaşmış olan çevre, tabiatına uymayan etkiler karşısında etkilenmekte, tekrar dengeye ulaşmak için yeni davranışlarla (bakteri, enzim üreterek) kirlilik faktörlerine cevap vermektedir. Mikroorganizmalar bozulan çevre şartlarına uyum sağlamada çok hızlı davranabilmektedir. Gelişmiş organizmalarda bozulan çevre şartlarına uyum daha uzun zamanda sağlanabilmektedir. Temizlik ve yıkama maddesi olarak kullanılan deterjanlar için de aynı durum geçerlidir. Biyodegradasyon, mikroorganizmaların farklı kirleticileri karbon kaynağı olarak kullandığı kimyasal olaylardır. Deterjanlar bazı mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Sudaki mikroorganizmaların bazıları deterjanlara adapte olmuş, bazıları ise olamamıştır. Ancak uygun sıcaklık koşullarında

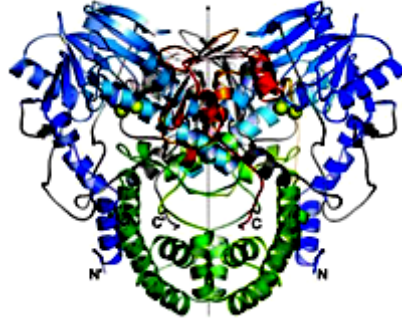
degradasyonun tamamlanabilmesi için uygun bir zamana gereksinim vardır. Eskiden kullanılan tetrapropilen benzen sülfonat % 30 oranında degradasyona uğrarken, günümüzde kullanılan deterjanlar % 90 oranında degradasyona uğramaktadır [2].

Biyodegradasyondan sorumlu faktörler;

- deterjan aktif madde sayısı,
- mevcut mikroorganizmaların adaptasyon dereceleri ve tabiatları,
- deterjan konsantrasyonu,
- pH,
- sıcaklık,
- etkilenme süresi,
- ortamın havalandırılması,

Organik madde konsantrasyonunun önemli olmasının nedeni biyodegradasyonu kolaylaştırmasıdır. Bu ortamda mikroorganizmalar hızlı bir şekilde çoğalırlar ve biyokütle artar. Bununla birlikte ortamdaki isteklerine göre besinleri kullanırlar. Birçok mikroorganizma türünün anyonik deterjanları kuvvetlice absorbladığı dikkate alınır, anyonik deterjanların bulunan değerlerine hem biyodegradasyon hem de deterjan-protein etkileşmesi sonucunda absorpsiyonun etkili olması beklenmelidir [2]. Anyonik deterjanları degrade eden birçok bakteri vardır, fakat bu bakterilerden gram negatif bakterilerin, gram pozitif bakterilere kıyasla anyonik deterjana karşı daha toleranslı oldukları gözlemlenmiştir. Bunun nedeni gram negatif bakterilerin sahip olduğu lipopolisakkarid adı verilen dış zarları gram pozitif bakterilere göre toksik maddelere karşı dirençli olmasıdır [47].

Yüzey aktif maddelere dirençli olan bakterilere yaşamlarını sürdürebilme yeteneğini veren *sdsA* genidir [48]. Özellikle *Pseudomonas* cinsi bakterilerin biyodegradasyon yeteneğini sağlayan gen bölgesi *sdsA*'dır. *sdsA* geni *Pseudomonas* türü bakterilerinde alkilsülfataz veya alkilsülfathidrolaz enzimini kodlar. *Pseudomonas* türü bakterileri *sdsA* geni aracılığıyla deterjanların hammaddelerinden biri olan SDS'in güçlü sülfat esterlerini denatüre ederek ortamdaki karbonu en aza indirgenmesini sağlar. *sdsA* geninin kodladığı alkil sülfataz, metallo- β -laktamaz ailesindeki sülfatazların üçüncü sınıfına ait bir enzimdir (Şekil 1.18).

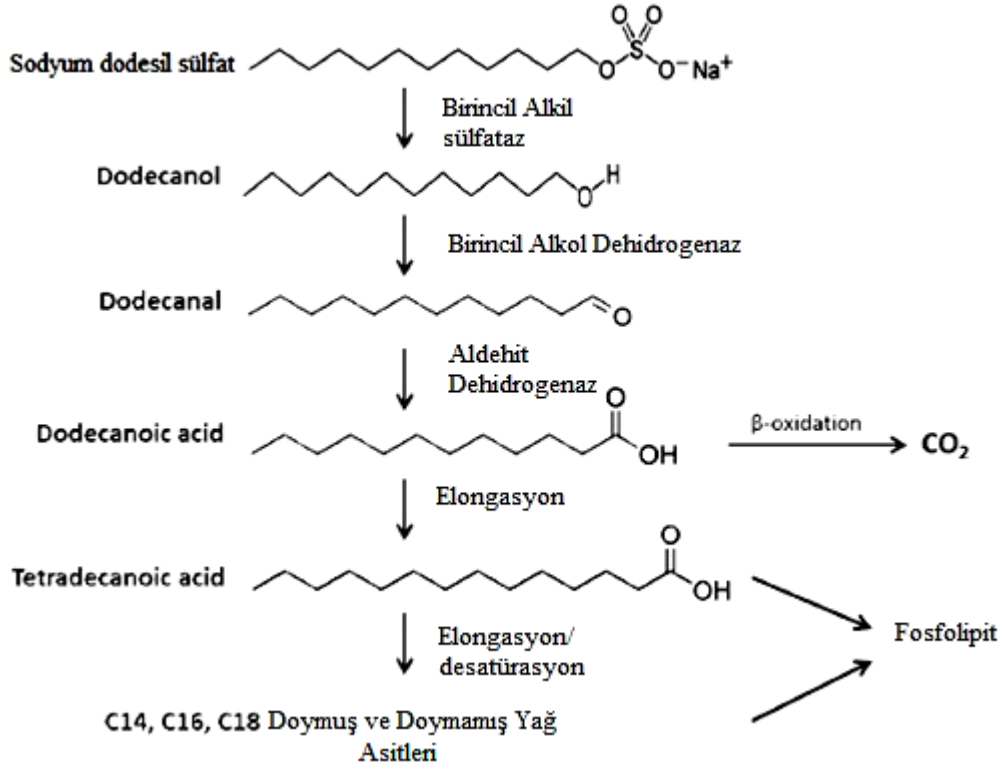


Şekil 1.18. Alkil sülfataz proteininin üç boyutlu yapısı [49]

Jovicic ve arkadaşlarının [48] yaptıkları çalışmada, alkil sülfataz enzimi ve alkil sülfataz regülatör genleri kodlayan *LysR* ailesi (*sdsB*) bu suştan klonlanmış ve gen dizisi belirlenmiştir. *sdsA* gen homologları *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. putida* KT2440 suşlarında tespit edilmiştir. SDS'in parçalanmasına bağlı olarak alkil sülfataz aktivitesi, *P. mendocina* PM2 suşunda yüksek, *P. alcaligenes* JN2 suşunda düşük gözlenmiştir. Bu izolatlarda bulunan alkil sülfataz enzimi ilk kez tespit edilmiştir. Alkil sülfat ester metabolizmasına sahip bakteriler genellikle alkil sülfatazları çoklu üreme yeteneğine sahiptir. *Pseudomonas* C12B suşunun beş, *P. putida* FLA suşunun altı ve *Pseudomonas* DESI suşunun ise dört enzim üretebildiği belirtilmiştir [50-52].

Alkil sülfataz enzimleri, alkil sülfat esterlerin degradasyonunu başlatır ve ester bağının hidrolizini katalizleyip inorganik sülfatın serbest kalmasını sağlar. Endüstriyel bileşiklerin biyolojik olarak parçalanmasında *Pseudomonas* cinsine ait türler çok iyi olarak bilinmektedir. Ayrıca, bu izolatlar alkil sülfataz enzim aktivitesi ile SDS'i enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Yüzey aktif maddelerin degradasyonunda en çok çalışılan bakteri *Pseudomonas* türüdür [53]. Thomas ve White yaptıkları [54] çalışmada *Pseudomonas* türü C12B bakterisinde SDS biyodegradasyonu üzerine detaylı bir çalışma yapmışlardır (Şekil 1.19). 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. Radyoaktif ışınlar sonucunda, bakteri tarafından SDS biyodegradasyonu 1-dodecanol ile başlayıp birincil alkil sülfatazı aktifleştirdiğinde, birincil alkol dehidrogenazın ortaya çıkmasıyla 1-dodecanoic asit olduğu belirlenmiştir. Oluşan ürünler bakteri metabolizmasına β -oksidasyon yolu ile katıldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 1.19. SDS degradasyon mekanizması [54]

Pseudomonas türü ATCC19151 suşunun, tek karbon kaynağı olarak SDS'i kullanarak büyüme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. SDS'in biyodegradasyonu üzerine moleküler çalışmalar ilk kez Davison ve arkadaşları [55] tarafından yapılmıştır.

Scott ve Jones [56] yaptıkları çalışmada, yüzey aktif maddelerin çevrede yarattığı kontaminasyonları gözden geçirmişlerdir. Bugün kullanılan iki ana surfaktan LAS ve alkil fenol etoksilat (APE)'nin 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.

Çin Dong Hu gölündeki LAS'ın degradasyonunda mikrobiyal popülasyonun büyüklüğünün etkileri araştırılmıştır [57]. Çalışmada LAS oranları arasında korelasyonu bulmak, göl suyunda başlangıçtaki bakteriyal popülasyonun büyüklüğünü bulmak amaçlanmıştır. Sonuç olarak test ortamında mikrobiyal popülasyonun büyüklüğünün, LAS degradasyon oranını etkilediği saptanmıştır. LAS ve SDS'i degrade eden bazı bakteri cinsleri: *Spongia*, *Phanerochaete*, *Parvibaculum*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pantoea* ve *Stenotrophomonas* olarak bulunmuştur [58].

1.1.7. Deterjan Degradasyonu Yapan Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Farklı habitatlardan izole edilen deterjan degrade eden bakterilerle ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır ve Kızılırmak'ta deterjan degradasyonu yapan bakteri popülasyonu hakkında mevcut bilgi bulunmamaktadır. Geleneksel mikrobiyolojik metodlar, tam olarak mikrobiyal çeşitliliği çalışmak için uygun değildir. Bakterilerin identifikasyonu ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması birçok avantaj sağlar. Tekrarlanabilir ve duyarlılığının yanısıra hızlı sonuç verir. Diğer taraftan, moleküler teknikler araştırmacının mikroorganizmaları kültüre almadan mikrobiyal komünitenin işlev ve yapısını daha doğru bir şekilde incelemesine imkan verir [59].

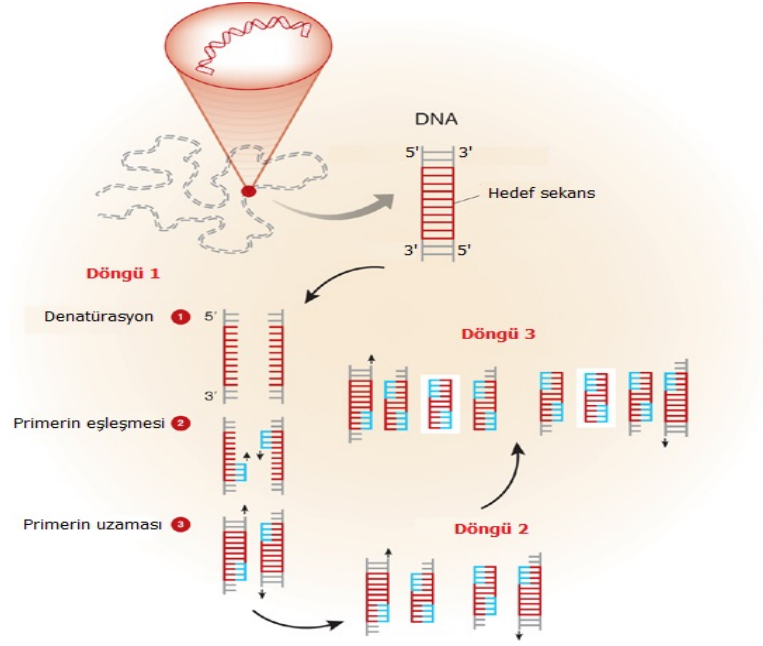
Farklı çevrelerde mikrobiyal çeşitliliğin identifikasyonunda kullanılan moleküler tekniklerin hızlı ve etkili olduğu görülmektedir. Genetik çeşitlilik, organizmaların

biyolojik çeşitliliğinde kesin bilgi sağlayan DNA veya RNA'larının bazı benzersiz kısımları ile organizmalar tanımlanabilmektedir [60]. Diğer taraftan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve 16S rDNA analizi gibi nükleik asit teknolojisindeki son gelişmeler, bakterilerin genotip analizleri için yeni metodların kullanılmasına yol açmıştır. 16S rDNA karşılaştırmalı analizleri, son derece korunmuş dizilerin değişken dizi bölgeleri ile iç içe olduğunu göstermektedir. Değişken bölgelerin analizleri, değişken filogenetik ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesine izin vermektedir [61]. Mikroorganizmaların tanımlanmasında korunmuş ya da değişken olan bölgeler PZR ile DNA amplifikasyonuna yönelik primer için hedef olarak kullanılabilir. Geleneksel mikrobiyolojik metodlar, tam olarak mikrobiyal çeşitliliği çalışmak için uygun değildir. Bakterilerin identifikasyonu ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması birçok avantaj sağlar [59].

1.1.7.1. PZR

PZR tekniği bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile amplifikasyonunu sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir (Şekil 1.20). PZR ile hücre içerisinde meydana gelen doğal DNA replikasyonu bir tüp içerisinde taklit edilerek gerçekleştirilmektedir. Hücre içerisinde DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için bir kısmı enzim özelliği taşıyan birçok proteinin görev yaptığı bilinmektedir. PZR tekniğinde, replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması, ortam sıcaklığını 94°C'ye kadar yükseltilmesi ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile sağlanabilmektedir. Canlı bir hücrede DNA zincirlerinin ayrılma işlemi ise, bu hücrenin optimum gelişme sıcaklığında ve bu amaçla görev yapan yardımcı proteinlerin sayesinde gerçekleşmektedir. Hücre içi replikasyonun başlamasında bir başka önemli olay primaz adı verilen enzim tarafından genellikle 12 nükleotit uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede, bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirmektedir. PZR'de ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgün olarak bağlanan primerler, reaksiyon karışımının içerisine önceden eklenmekte ve DNA sentezi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde

edilen sıcaklığa dirençli Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. PZR tekniğinde temel üç basamak bir döngüyü oluşturur. Bu döngü genelde 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Başlangıçta DNA molekül sayısı, PZR işleminin kaç döngü sonunda bitirileceğini belirler [62].



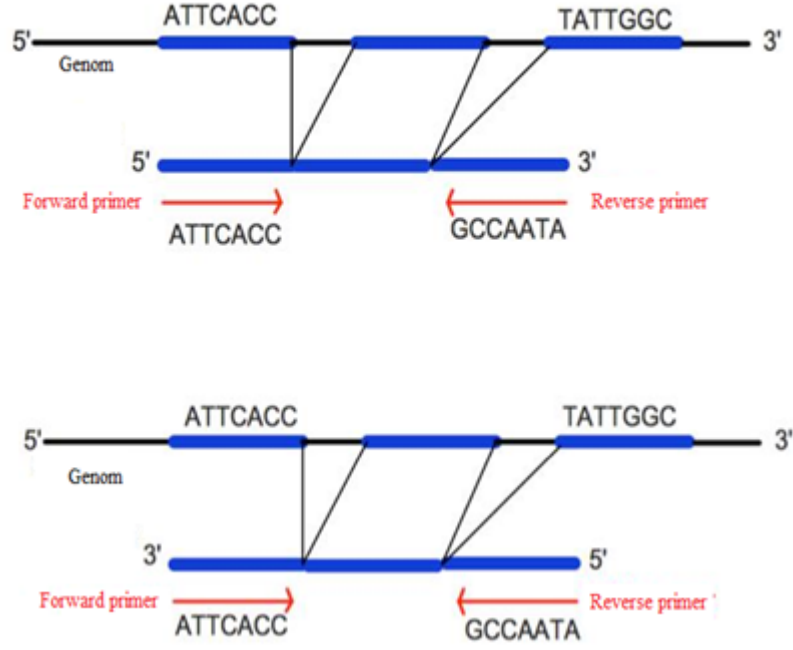
Şekil 1.20. PZR aşamaları [63]

Bir PZR uygulamasında n sayıda döngü varsa, ortamda maksimum 2 sayıda çoğaltılmış DNA beklenir. Bu döngüler sonunda elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktör olarak gösterilmektedir [62].

1.1.7.2. PZR Primerlerinin Tasarımı

Başarılı bir PZR için en kritik parametre primerlerin tasarımıdır. Gen çoğaltılması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır (Şekil 1.21). Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır [64]. Primerler tasarlanırken çeşitli parametrelere dikkat edilmelidir. En kritikleri;

- Konum: Primerlerin kalıp DNA üzerindeki konumları, yapılacak uygulamaya göre seçilmelidir. Ancak her durumda çoğaltılmak istenen yerleri ve ters primerlerin arasında olmalıdır [64].
- Amplikon büyüklüğü: Amplikonlar genel olarak 100 ile 1000 baz çifti uzunluğunda olsa da, amplikon büyüklüğü bu rakamlarla sınırlı değildir. 1000 baz çiftinden büyük amplikonlarda bir takım zorluklar karşılaşılabiliyorsa da, çok daha uzun bölgelerin PZR'ını yapmak mümkündür. 100 baz çiftinden küçük amplikonlar oluşturmakta mümkündür, gerçekte küçük amplikonun getirdiği bir dezavantaj olmadığı için sadece primerlerden oluşan amplikonlar oluşturmak ta mümkündür. Primerlerin konumu amplikonun büyüklüğünü belirleyeceği için, amplikonların büyüklüğü de yapılacak uygulamaya göre belirlenmelidir denilebilir [64].
- 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 GC içerik taşıyan ve yaklaşık 20 bp uzunluğunda nükleotidlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı erime sıcaklığı T_m 'yi 56-62°C'lik aralıkta tutar [62].



Şekil 1.21. Forward 5'- 3' ve reverse 5'- 3' primerleri [65]

- 3'-uç sekansı: 3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı kontrol için çok önemlidir. 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 yavaşlamasının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon verimini artırır [64].
- Erime sıcaklığı: Bir DNA dizisinin erime sıcaklığı, dizinin yarısının çift zincir yarısının tek zincir olduğu sıcaklık olarak tanımlanabilir. PZR'da kullanılacak primerlerin erime sıcaklığı için kesin bir rakam verilememek ile birlikte, dikkat edilmesi gereken durumlar ise primerlerin DNA'ya bağlanabildiği sıcaklıkta DNA polimerazın aktif olması ve iki primerinde erime sıcaklıklarının aynı veya çok yakın olmasıdır [62].

- 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 oluşturması görülebilir. Primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamaları gerekmektedir, çünkü bu yapıdaki primerin, kalıp DNA üzerine melezenerek (hybridization) polimerizasyonu başlatma verimliliği düşüktür. Aynı zamanda şayet saç tokası yapısında 3’ucu eşlenik bölge içindeyse ve 5’ uç fazlalığı varsa, polimerizasyon saç tokası üzerinde gerçekleşeceği için primerin dizisi bozulacak ve hiç verim alınamayacaktır [64].
- Primer-dimer’leri: İki primer içinde birbirini eşlenik bölgelerin olmasından dolayı, primerlerin birbirleri üzerine melezenerek bağlanmaları ile oluşan yapılardır. Primerlerin dimer oluşturmamaları gerekmektedir, çünkü bu yapıdaki primerlerin, kalıp DNA üzerine melezenerek polimerizasyonu başlatma verimliliği düşüktür. Aynı zamanda şayet primer dimer yapısında 3’ ucu eşlenik bölge içindeyse ve 5’uç fazlalığı varsa, polimerizasyon primer dimer üzerinde gerçekleşeceği için primerin dizisi bozulacak ve hiç verim alınamayacaktır [62].
- Primer 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 [64].

1.1.7.3. 16S rDNA Dizi Analizi

Bakterilerin tanımlanması için 1980 yılından itibaren yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Woese ve arkadaşları bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için genetik kodun değişmeyen bölgelerini kıyaslamışlardır. Bakterilerdeki bu gen bölgeleri 16S rDNA geni (ribozomun küçük alt birimine özgü DNA) ve 23S ve 5S rDNA (büyük alt birimler) genleri ve bu genler arasında yer alan bölgelerdir [66-67]. 5S rDNA molekülünün 16S rDNA'ya göre (120 baz çifti) oldukça küçük olması ve sınırlı bilgi taşıma kapasitesinden dolayı tercih edilmemektedir. 23S rDNA molekülü, 16S rDNA molekülüne göre daha fazla filogenetik açıdan bilgi içermesine karşın (3300 baz çifti), 23S rDNA'ya yönelik çalışmalara literatürde daha az rastlanılmaktadır. Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rDNA'dır. 16S rDNA gen bölgesi yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır ve hem değişebilen hem de korunmuş bölgelerden oluşur [68]. 16S rDNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir moleküler araçtır [67-68]. Bu dizilerin BLAST programında karşılaştırılarak homolojileri belirlenmektedir [69]. Ayrıca 16S rDNA dizileri kültürü yapılamayan prokaryot tür çeşitliliğinin ortaya konulması ve kültür bağımlı olmayan mikrobiyal komünitelerin belirlenmesi için rDNA hedefli problemlerin tasarımında son derece avantajlıdır. Bu amaçla binlerce organizmanın rDNA dizileri belirlenmiştir ve bu bilgiler RDP-II ve BLAST gibi özel veri tabanlarında saklanmaktadır (Şekil 1.22).

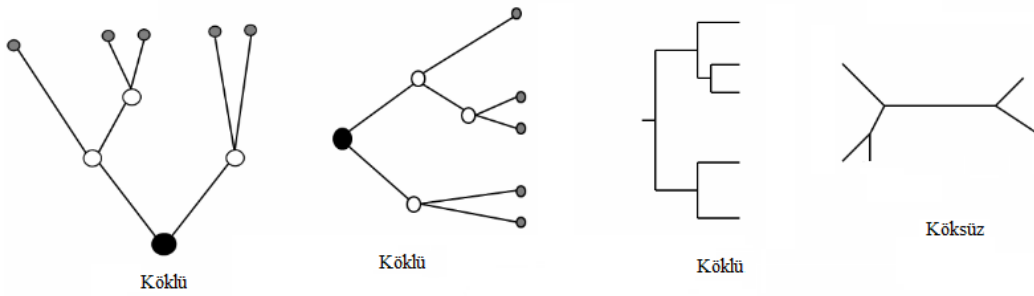


Şekil 1.22. 16S rDNA sekans analiz yöntemi [70]

1.1.7.4. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturma

Filogeni kısaca; evrimsel akrabalık ilişkisi olarak tanımlanabilir. Filogenetik analiz ise; mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasıyla soy ağaçlarının oluşturulmasıdır [71]. Filogenetik ağaç bir grubun evrimsel tarihinin grafiksel özetidir.

Filogenetik ağaç; dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar, türleşme sırasını kaydeder, hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir. Filogenetik bir ağaçta; dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler; bir popülasyonun (taksonun) iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktalara denir. Dal uçları ise; soyu tükenmiş veya bugün yaşayan türleri ifade eder. Filogenetik ağaçlar köklü veya köksüz olabilir (Şekil 1.23). Köklü Ağaçlar; inceleme altındaki soy hattını nereden köklendiğini tanımladığı için ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarlar [72]. Köksüz ağaçlar ise; köklü ağaçların tersine, türler arasındaki ilişkiyi ortaya koyar. Fakat, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce veya sonra açığa çıktığına işaret etmez [73]. Ağaçlardaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin (basamakların) sayısını belirler [74].



Şekil 1.23. Filogenetik ağaç tipleri [75]

1.1.7.4.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak iki ana başlık altında incelenir:

Nükleotid dizisi kullanan metotlar (sequence-based)

- Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi (Maximum Parsimony)
- En Yüksek İhtimal Metodu (Maximum Likelihood)
- Bayes Metodu

Uzaklık kullanan metotlar (distance-based)

- Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu
- Komşu Birleştirme Metodu (Neighbour Joining)

1.1.7.4.1.1. Nükleotid Dizisi Kullanan Metotlar (Sequence-Based)

Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter hangi taksonun hangisiyle yakın akraba olduğu konusunda bize yardım eder. Bu karakterler; DNA dizisi gibi özellikler olabilir [73].

Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi (Maximum Parsimony)

Parsimoni metodu, olası birçok filogenetik ağaçlar arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yol göstericidir. Parsimoniye göre olması en muhtemel ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [73]. Yani en az farklı olan birimler, birbirine çok yakın ve en çok benzeyen birimlerdir. Bu nedenle; Parsimoni (MP), Minimum Evrimsel Metod (parsimoni, tutumluluk) olarak tanımlanabilir.

Maksimum parsimoni yönteminin dezavantajları;

- Yüksek seviye homoplasilerde yanılabılırler.
- İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir.
- MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır.

En Yüksek İhtimal Metodu (Maximum Likelihood)

En yüksek ihtimal metodunda, tüm ağaç topolojileri değerlendirilir. Neticede, yarışan ağaç topolojilerinden en yüksek gerçekleşme olasılığı olan ağaç seçilir.

Maximum likelihood yönteminin avantajları;

- Mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olanıdır.
- Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilirler.
- Sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilir.
- Nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer data tiplerine uygulanabilir.

Bütün bu avantajlarının yanında Maximum Likelihood metodu, basit ve sezgisel olmayışı, parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılabılması ve parsimoni metoduna göre daha yavaş olması gibi dezavantajlara sahiptir [73].

Bayes Metodu

Bayes metodu, temelde maximum likelihood metoduna benzemektedir, ancak sonraki (posterior) olasılık kullanımı nedeniyle bu yöntemden ayrılır. Mevcut gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir durum hakkında sonuç çıkarma prensibine dayanır. Bu methoda baz alınan “önceki olasılık” kavramı analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılığı ifade eder. Bu metod günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır [73].

1.1.7.4.1.2. Uzaklık (Distance) Metotları

Mesafe temelli yöntemler; dizi hizlanması sonucu elde edilen evrimsel mesafelerle bir veri matrisi oluşturularak daha sonra matristeki mesafe skorlarına göre tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturma esasına dayanmaktadır [73]. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir [74]. Tercih edilen ağaçlar, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçlardır [76]. Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümelene temelli veya en iyi durum (optimum durum) temelli algoritmalar olarak ikiye ayrılırlar. Mesafe temelli yöntemlerden bazıları; aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu ve neighbour-joining yöntemleridir [72].

Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu

Bir takson için uzaklık matrisi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matrisi baz alınır. Hızlı bir yöntemdir ve geniş data setlerini çabukça analiz edebilir fakat karakter analizinde kullanılamazlar. Bir atanın iki yavrusunun aynı miktarda değişime uğradığını (dalların eşit uzunlukta olduğunu) savunması gerçekçi değildir [73].

Komşu Birleştirme Metodu (Neighbour Joining)

Bu metod içerik olarak “cluster” analizle alakalıdır. Ancak, dallar boyunca moleküler değişikliklerin eşit olmayan oranları için metod izin verir. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklılıktır. Bu yöntemde birtane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez [73].

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı Kırıkkale-Kızılırmak'ın deterjan kirliliği açısından durumunun belirlenmesi, deterjan kirliliği gösteren bölgelerden alınan su örneklerinden SDS degrade eden bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, SDS degrade edebilme potansiyellerinin belirlenmesi ve deterjan kirliliği gösteren yüzey sularında remediasyon amaçlı olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

1. MATERYAL VE YÖNTEM

1.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

1.1.1.1. Mineral Salt Medium (MSM) Besiyerinin Hazırlanışı

Mikroorganizma üretimi için ve izole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
K ₂ HPO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄	3.5 g
NH ₄ Cl	0.5 g
NaCl	0.5 g
Na ₂ SO ₄	0.14 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.15 g
Agar	10.0 g

2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi, protein izolasyonu ve DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5.0 g/L
Et özütü	3.0 g/L

2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Kob sayımı için alınan örneklerin inkübasyonunda kullanılmıştır. Gerekli miktarda besiyeri 121 °C’de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	5.0 g/L
Maya özütü	2.5 g/L
Glukoz	1.0 g/L
Agar	12.0 g/L

2.1.1.4. Deterjan Sanayi Atık Su Örneklerinin Toplanması

Deterjan sanayisine ait olan atık su örneği Ankara İvedik organize sanayi bölgesindeki deterjan üretim yapan sanayi kuruluşundan temin edilmiştir (Şekil 2.1). Alınan atık suyun sterilasyonu için 0.2 µm’luk filtre (Milipor, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık su 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'luk 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 (5M, 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 5 mL 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. Şusların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler

İzolatların 16S rDNA gen dizisini PZR yöntemi ile çoğaltarak dizi analizini yapmak amacı ile kullanılan primerler ve özellikleri belirtilmiştir (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	[77]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	[78]

F, forward; R, reverse

2.1.5. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.5.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , 1000 mL)

6.8 g KH_2PO_4 ve 8.7 g K_2HPO_4 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).

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 çözülmüştür.
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-merkaptotanol, % 1 Bromfenol mavisi 1 mL; 2.9 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.

2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12)

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

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

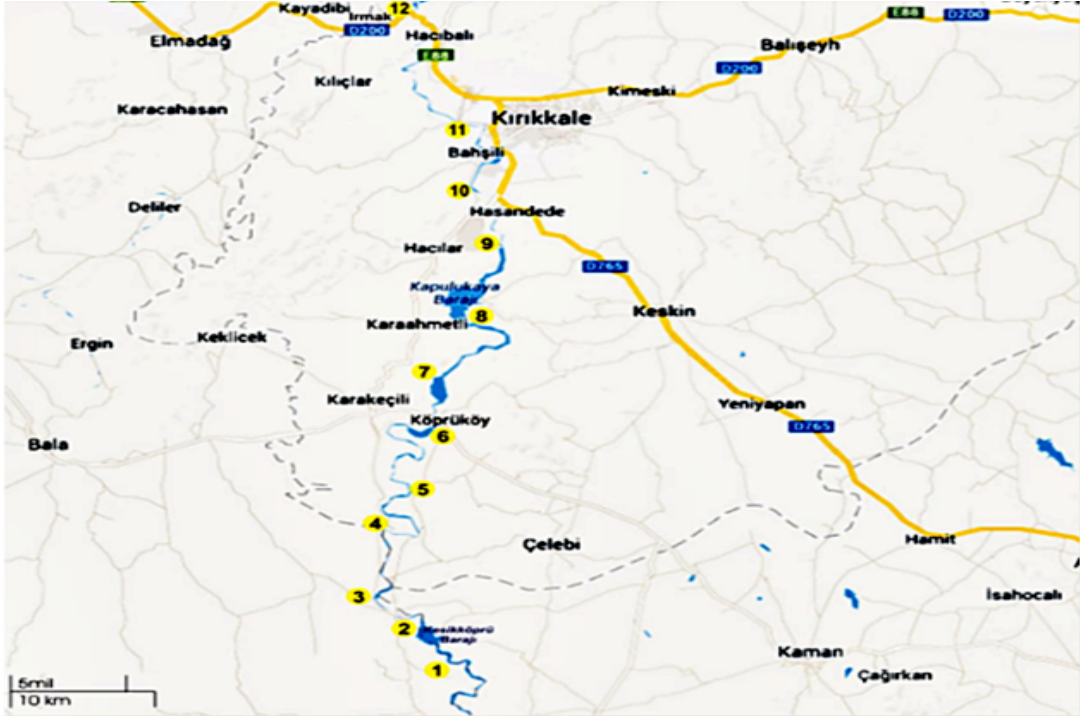
Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [79]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi $184 \text{ m}^3/\text{sn}$ olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az $18.4 \text{ m}^3/\text{sn}$ ve en çok $1.673 \text{ m}^3/\text{sn}$ 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, Altınkaya ve Derbent'dir [80].



Şekil 2.2. Kızılırmak [81]

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 - Kıyıbağı 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 [81]

2.2.2. Su Örneklerinde 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 [82]. 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. Ayrıca toplanan su örneklerinde pH ve sıcaklık değerlerine bakılmıştır.

2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu

SDS degrade eden bakterilerin seçimi için karbon kaynağı olarak 1.5 mM SDS 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 MSM ortamlarına ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyerler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiştir. Seçici ortamdaki izole edilen farklı koloniler saflaştırma için aynı

ortamda tekrar kültüre edilmiştir [83]. Katı besiyerinde büyütülen saf suşların koloni morfolojisi ve gram özellikleri incelenmiştir.

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

SDS degrade eden suşların MTK değerleri, petrielerde 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 (100 mL) 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 [80].

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 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 1 dk 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 eklenip 3 dk 15 g'de santrifüj edilmiştir. Son olarak 200 µL Elution Solution eklenmiş 5 dk bekletilip 15 g'de 1dk santrifüj edilmiştir ve -20°C'de saklanmıştır [56].

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'[77] ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'[78] kullanılmıştır. Primerlerin T_m 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 cycles 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 yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır [84].

2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması

PZR ürünleri Thermo Scientific GeneJET PZR Purification Kit (Thermo Scientific, ABD) ile saflaştırılmıştır. Eppendorf tüplerinin içinde bulunan PZR ürünlerinin üzerine 1:1'lik bir hacimde Binding Buffer eklenmiştir. İyi karıştırılıp çözümü 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 filtrelili 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. 1 dk 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 [85]. Komşu-bağlantı metodu ile soy ağaçları çizilmiştir ve oluşturulan soy ağaçları ile izolatların birbirleriyle yakınlık dereceleri ortaya konulmuştur.

2.2.13. Primer Tasarımları ve *sdsA* Gen Analizlerinin Yapılması

2.2.13.1. *sdsA* Geni 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* Gen Analizlerinin Yapılması

Suşlarda *sdsA* geni analizi yapmak için Shahbazi ve arkadaşları [83], Chatuverdi ve Kumar [86] arkadaşlarının belirlediği primer dizileri kullanılmıştır. Ayrıca NCBI' da belirlenen dizilerin ortak bölgesi Vector NTI primer tasarım programı aracılığıyla primer elde edilmiştir. Bu primerler primer tasarım kuralları göz önünde bulundurularak en uygun primer seçimi yapılmıştır. Chatuverdi ve Kumar [86] '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 Elektroforezi

% 1'lik agaroz jel 50 mL 1x TBE tamponu ile çözüldükten sonra jele 5 µL Olerup SSP GelRed Dropper Bottle boya eklenerek hazırlanmıştır. Her bir örnekten 6 µL alınarak 2 µL 6X Orange Loading Dye ile boyanmıştır. DNA örnekleri mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. 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 40 mA amper uygulanarak yaklaşık 45 dkda yürütme işlemi tamamlanmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, ABD) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır [79].

2.2.15. Alkil Sülfataz Enzimi Protein İzolasyonu

İzole edilen SDS degrade eden bakterilerin total protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları [87] 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 0.14 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 0.14 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 [83].

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 [81].

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 iyici 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 [81].

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 [88], fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

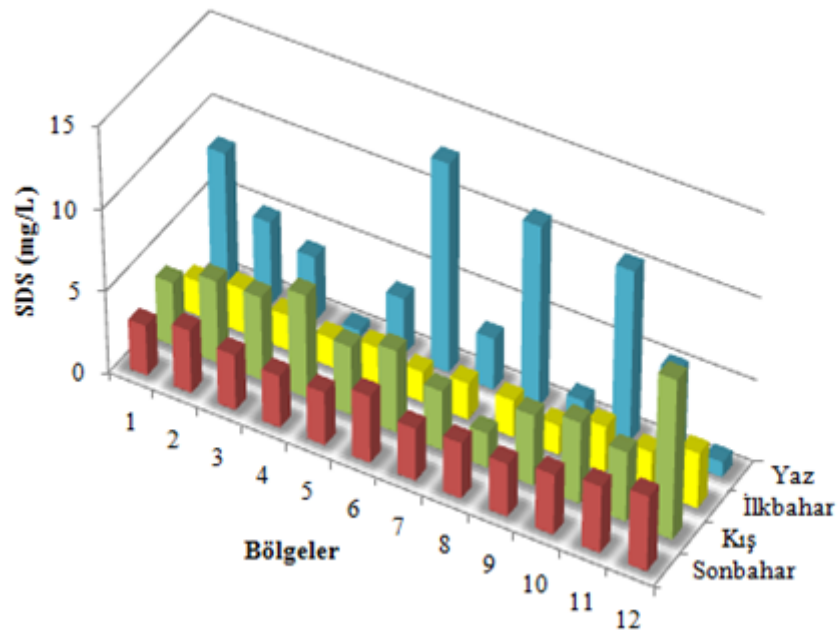
2.2.17.4. Zimografi Analizlerinin Yapılması

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 damlatılarak bantların belirginleşmesi gözlemlenmiştir [86].

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 ve nehrin ortalama deterjan miktarının ise 4.07 mg/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii, Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii ve Irmak Mevkii istasyonları 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 Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii, Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii ve Irmak Mevkii istasyonlarından SDS degrade eden 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlar SDS10 SDS10-1, SDS11 ve SDS12 olarak kodlanmıştır ve MTK değerleri sırasıyla 65, 20, 15 ve 55 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. SDS degrade edebilen suşlar 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
10 / SDS10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10 / SDS10-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 / SDS11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 / SDS12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

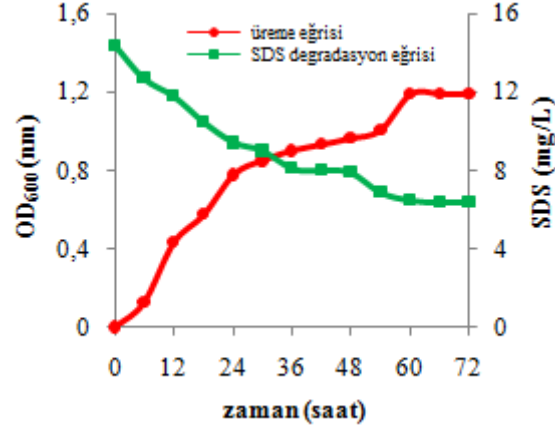
(+), üreme var; (-), üreme yok

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 sanayi 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).

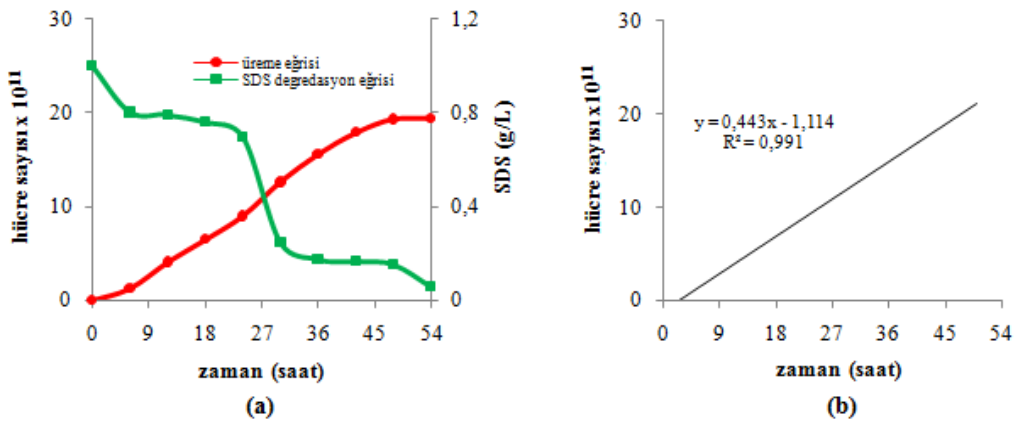


Şekil 3.2. Deterjan sanayisi atık suyunda kendiliğinden olan SDS degradasyonu

3.3.2. SDS10 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.2.1. SDS10 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS10 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 54 saat sonunda 19.5×10^{11} bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L'den 0.06 g/L'ye kadar düşürerek % 93.95 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).

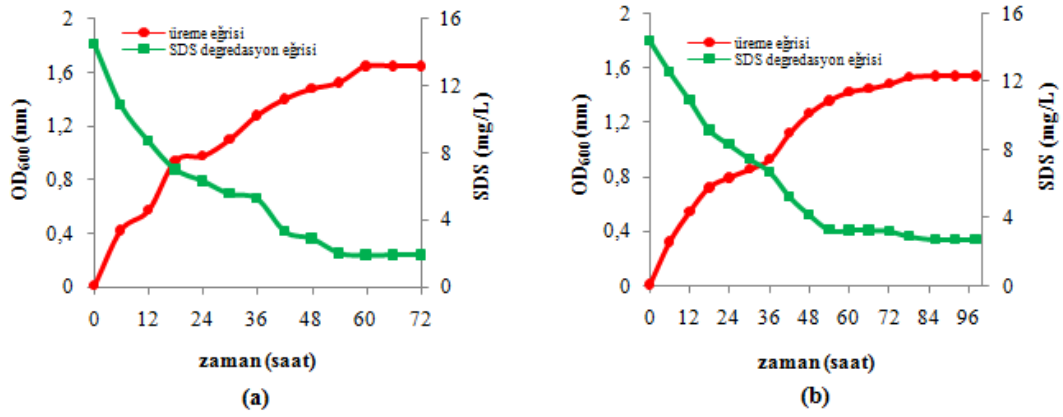


Şekil 3.3. SDS10 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.2.2. SDS10 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS10 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 60 saat sonunda ortamdaki SDS'i, 14.5 mg/L'den 1.9 mg/L'ye kadar düşürerek % 87 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.4).

SDS10 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 86 saat sonunda ortamdaki SDS'i, 14.4 mg/L'den 2.7 mg/L'ye kadar düşürerek % 81 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.4).

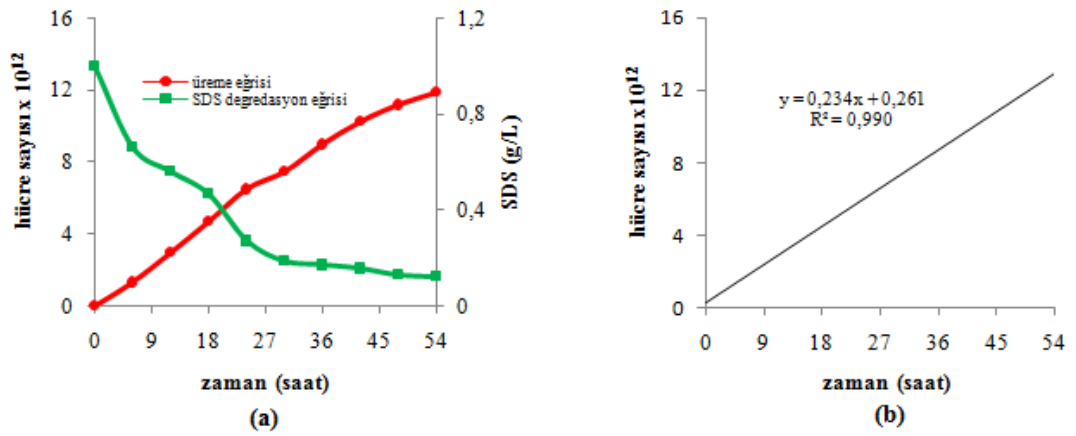


Şekil 3.4. SDS10 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.3. SDS10-1 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.3.1. SDS10-1 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS10-1 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 54 saat sonunda 11.3×10^{12} bakteri, ortamdaki SDS'yi 1 g/L'den 0.1 g/L'ye kadar düşürerek % 87.8 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).

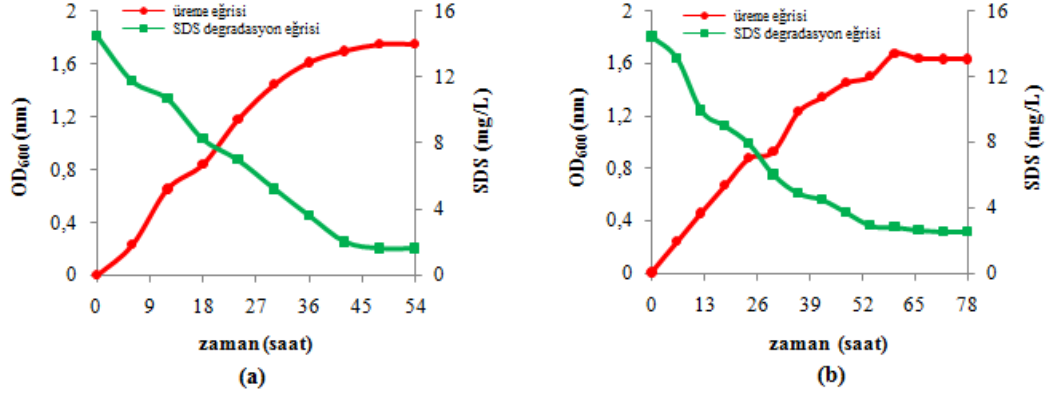


Şekil 3.5. SDS10-1 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.3.2. SDS10-1 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS10-1 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 48 saat sonunda ortamdaki SDS'yi 14.5 mg/L'den 1.6 mg/L'ye kadar düşürerek % 89 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.6).

SDS10-1 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 72 saat sonunda ortamdaki SDS'yi 14.4 mg/L'den 2.5 mg/L'ye kadar düşürerek % 83 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).

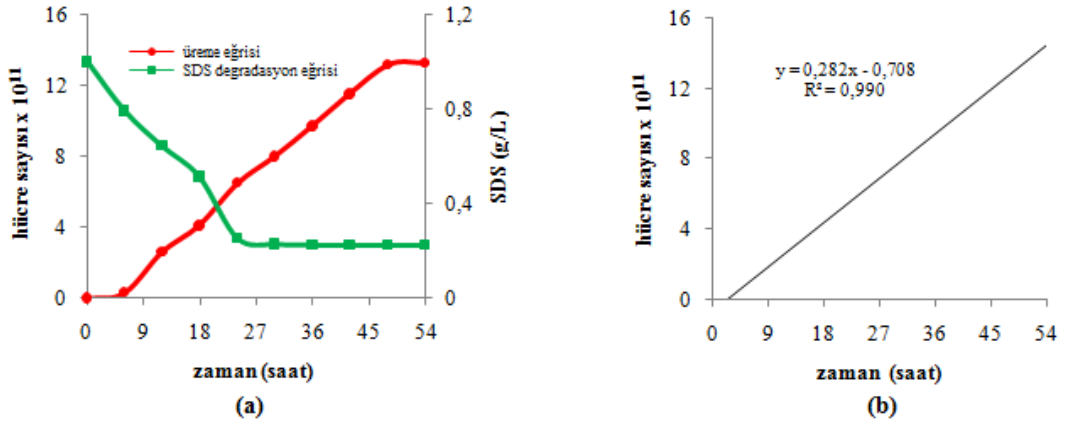


Şekil 3.6. SDS10-1 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.4. SDS11 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.4.1. SDS11 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS11 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 54 saat sonunda 13.2×10^{11} bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L'den 0.2 g/L'ye kadar düşürerek % 77.44 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.7).

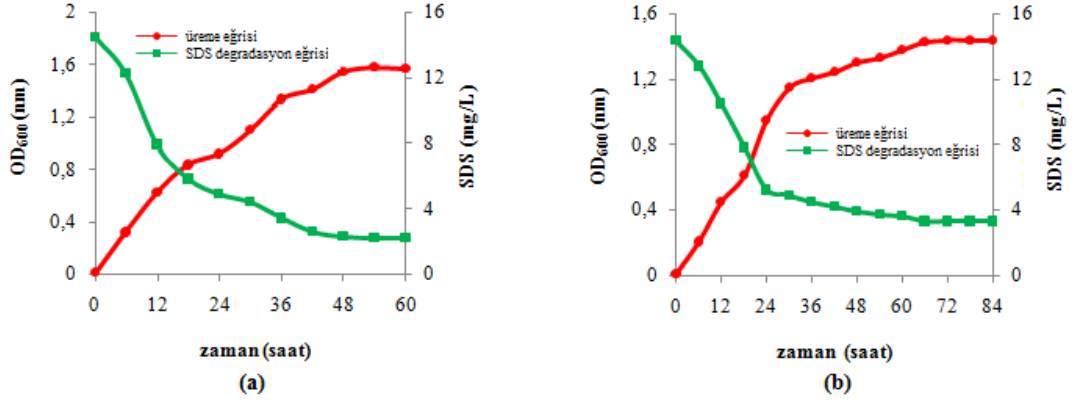


Şekil 3.7. SDS11 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.4.2. SDS11 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS11 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 54 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.5 mg/L'den 2.2 mg/L'ye kadar düşürerek % 85 oranında degrade ettiği belirlenmiştir(Şekil 3.8).

SDS11 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 66 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 3.3 mg/L'ye kadar düştüğü % 77 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).

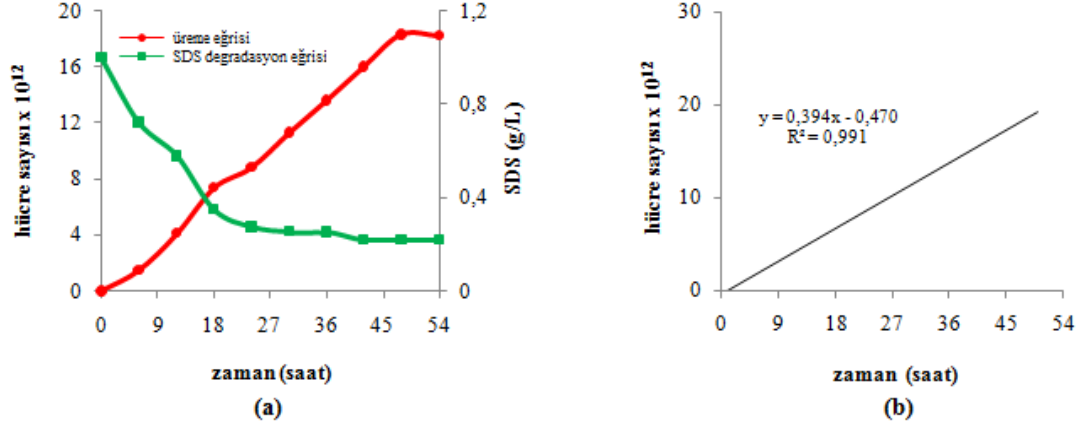


Şekil 3.8. SDS11 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

3.3.5. SDS12 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

3.3.5.1. SDS12 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS12 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 54 saat sonunda 18.3×10^{12} bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L'den 0.2 g/L'ye kadar düşürerek % 77.92 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.9).

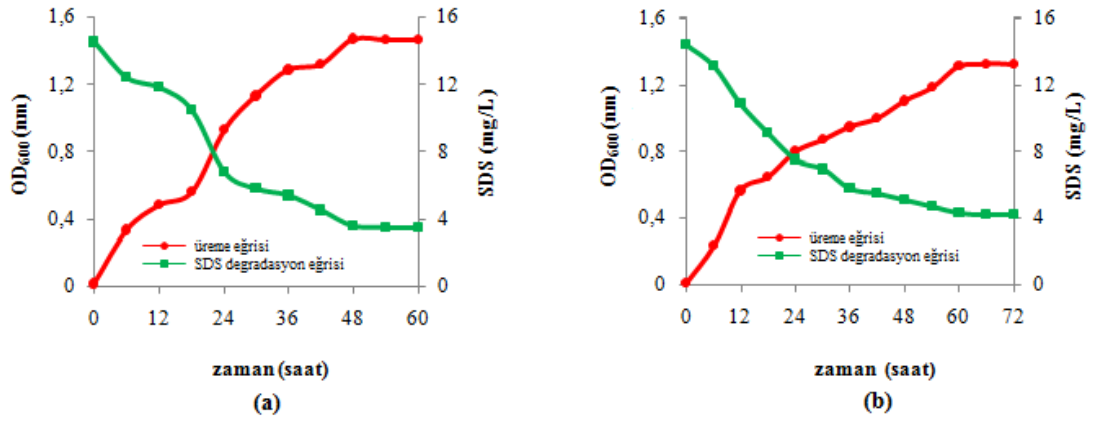


Şekil 3.9. SDS12 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

3.3.5.2. SDS12 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS12 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 54 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.5 mg/L'den 3.5 mg/L'ye kadar düşürerek % 76 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.10).

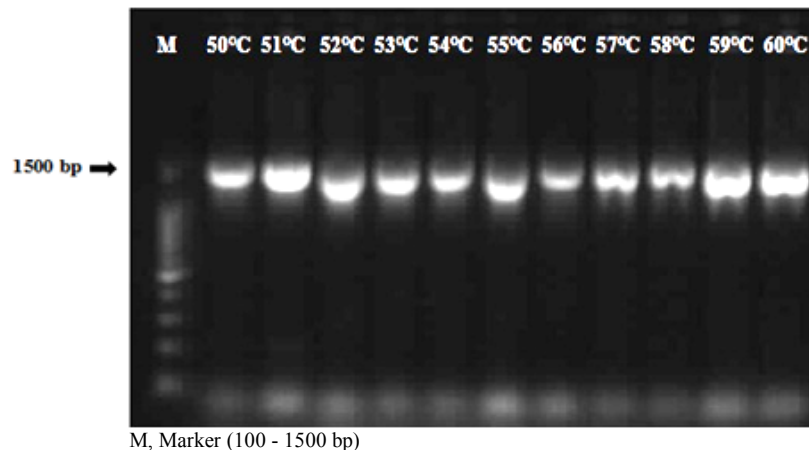
SDS12 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 66 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 4.2 mg/L'ye kadar düşürerek % 71 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. SDS12 kodlu suşun; steril olmayan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

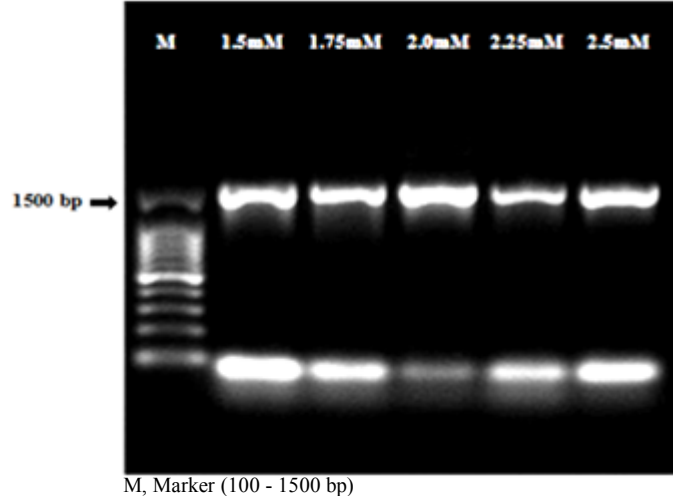
3.4. SDS10 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

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). SDS10 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 59°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. SDS10 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 SDS10 suşuna ait PZR ürünleri

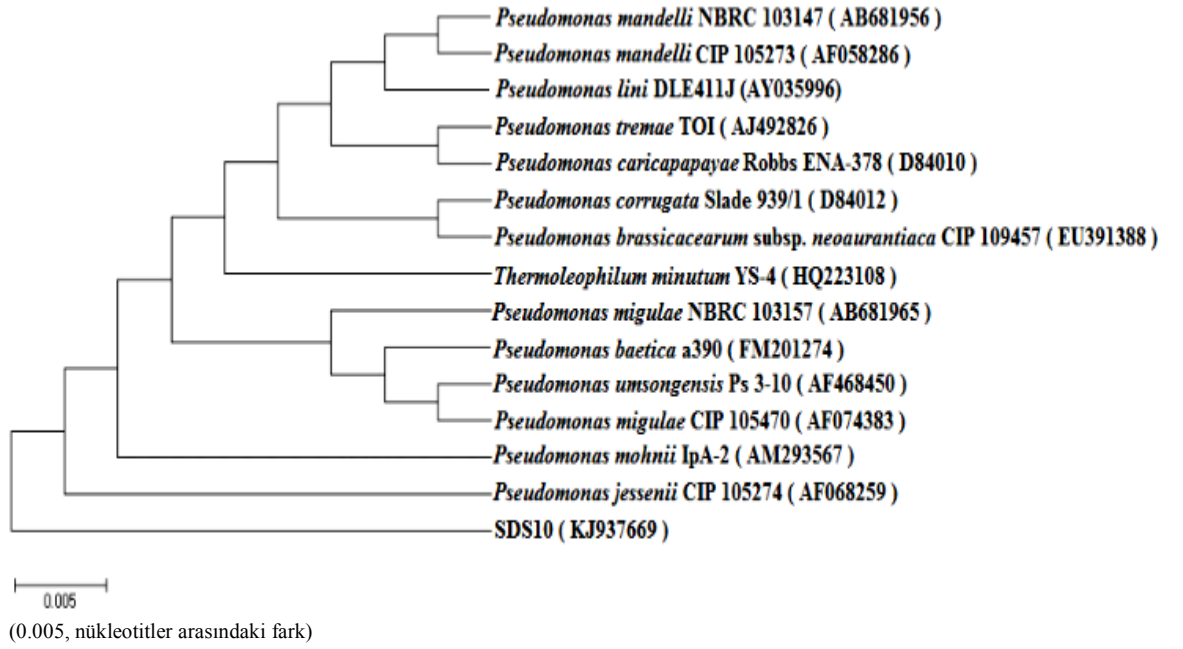
3.4.1. SDS10 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS10 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir (Çizelge 3.2.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS10 kodlu suş % 96 oranında *Pseudomonas migulae* (accession number KJ937673) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır

Çizelge 3.2. SDS10 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. <i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	0,036														
3. <i>Pseudomonas baetica</i> a390	0,036	0,000													
4. <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	0,036	0,000	0,000												
5. <i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470	0,036	0,000	0,000	0,000											
6. <i>Pseudomonas mandelii</i> NBRC 103147	0,040	0,006	0,006	0,006	0,006										
7. <i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273	0,040	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000									
8. <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	0,036	0,003	0,003	0,003	0,003	0,009	0,009								
9. <i>Pseudomonas lurida</i> P 513/18	0,052	0,018	0,018	0,018	0,018	0,013	0,013	0,018							
10. <i>Pseudomonas trivialis</i> P 513/19	0,052	0,018	0,018	0,018	0,018	0,014	0,014	0,021	0,004						
11. <i>Pseudomonas lini</i> DLE411J	0,043	0,009	0,009	0,009	0,009	0,003	0,003	0,012	0,014	0,016					
12. <i>Thermoleophilum minutum</i> YS-4	0,041	0,005	0,005	0,005	0,005	0,012	0,012	0,008	0,017	0,017	0,009				
13. <i>Pseudomonas tremae</i> TO1	0,044	0,010	0,010	0,010	0,010	0,007	0,007	0,013	0,017	0,013	0,009	0,016			
14. <i>Pseudomonas brassicacearum</i> 109457	0,044	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,013	0,020	0,018	0,008	0,010	0,010		
15. <i>Pseudomonas caricapapayae</i> Robbs -378	0,045	0,012	0,012	0,012	0,012	0,008	0,008	0,014	0,018	0,017	0,010	0,017	0,004	0,013	-

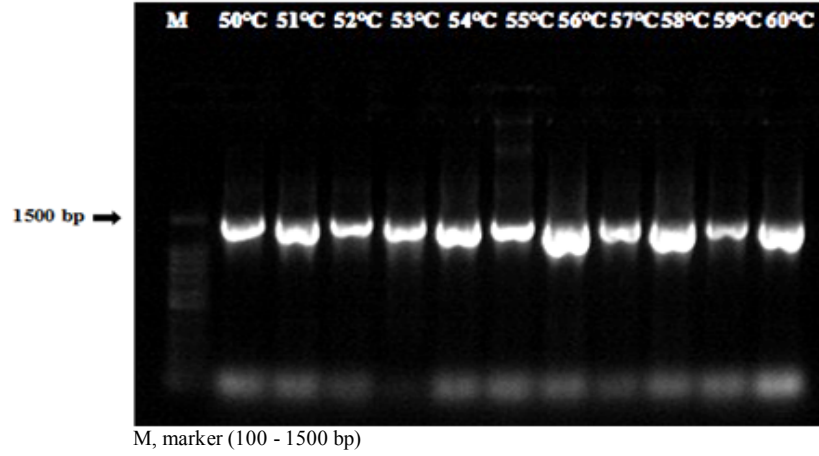
16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.13). Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS10 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas migulae* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



Şekil 3.13. SDS10 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

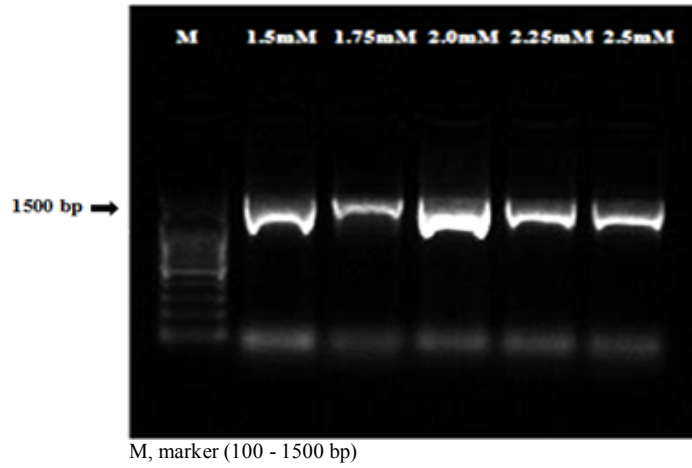
3.5. SDS10-1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

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 3.14). SD10-1 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 53°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS10-1 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. SDS10-1 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir. (Şekil 3.15).

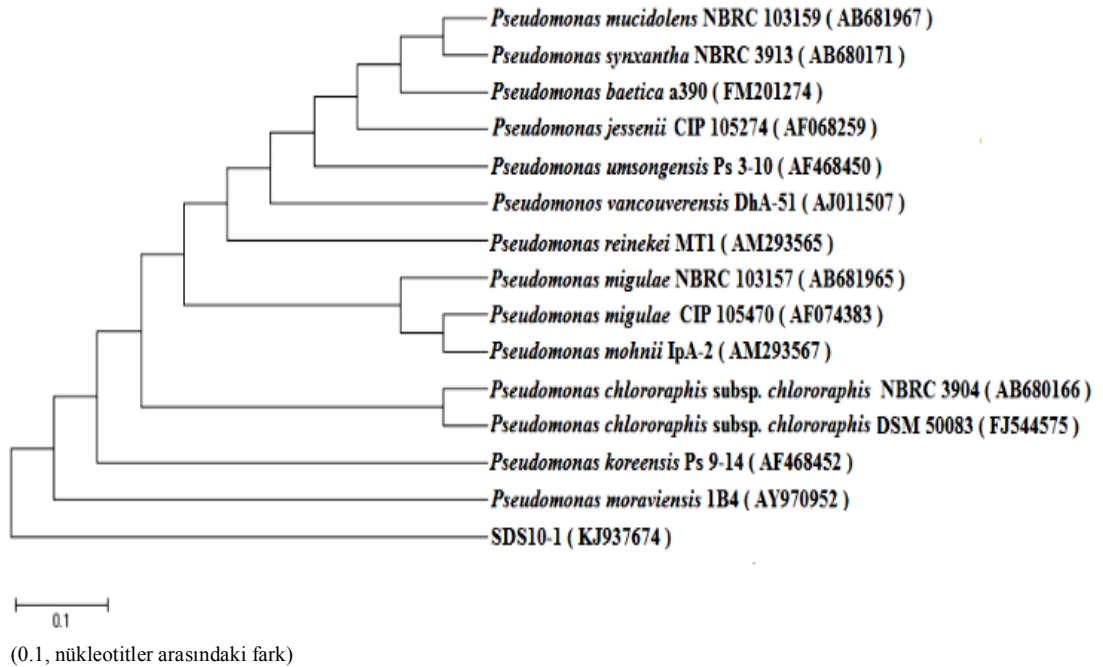


Şekil 3.15. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS10-1 suşuna ait PZR ürünleri

3.5.1. SDS10-1 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 SDS10-1 kodlu suşlara en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir.(Çizelge 3.3.). SDS10-1 kodlu suş % 94 oranında *Pseudomonas koreensis* (accession number KJ937674) 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 SDS10-1 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas koreensis* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



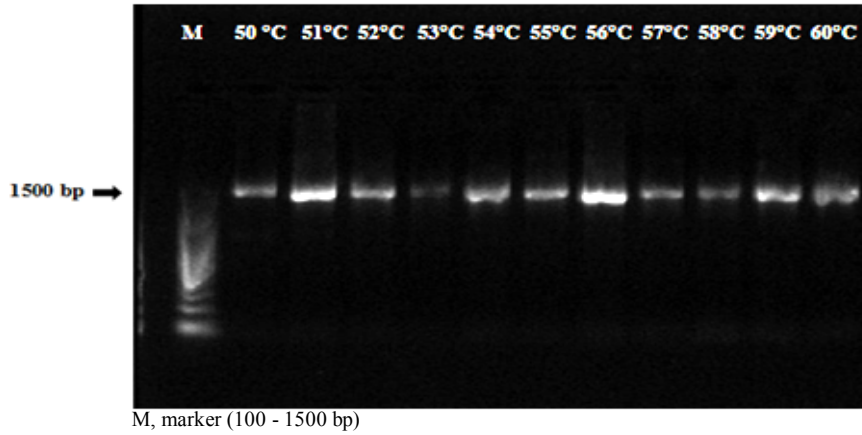
Şekil 3.16. SDS10-1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram

Çizelge 3.3. SDS10-1 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. SDS10-1															
2. <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	1,013														
3. <i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	1,020	0,004													
4. <i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4	1,005	0,003	0,004												
5. <i>Pseudomonas vancoverensis</i> DhA-51	1,020	0,004	0,000	0,004											
6. <i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	1,027	0,003	0,001	0,006	0,001										
7. <i>Pseudomonas baetica</i> a390	1,020	0,006	0,001	0,003	0,001	0,003									
8. <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	1,020	0,004	0,000	0,004	0,000	0,001	0,001								
9. <i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470	1,027	0,003	0,001	0,006	0,001	0,000	0,003	0,001							
10. <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	1,020	0,004	0,000	0,004	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001						
11. <i>Pseudomonas mucidolens</i> NBRC 103159	1,056	0,014	0,009	0,010	0,009	0,010	0,007	0,009	0,010	0,009					
12. <i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC 3913	1,061	0,012	0,009	0,014	0,009	0,009	0,010	0,009	0,009	0,009	0,003				
13. <i>Pseudomonas mohnii</i> IpA-2	1,027	0,003	0,001	0,006	0,001	0,000	0,003	0,001	0,000	0,001	0,010	0,009			
14. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	1,020	0,001	0,006	0,004	0,006	0,004	0,007	0,006	0,004	0,006	0,014	0,012	0,004		
15. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	1,020	0,001	0,006	0,004	0,006	0,004	0,007	0,006	0,004	0,006	0,014	0,012	0,004	0,000	-

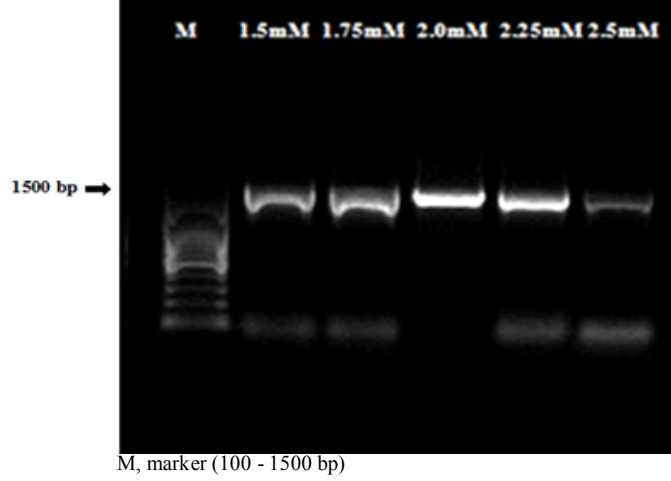
3.6. SDS11 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

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 3.17). SDS11 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 56°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS11 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. SDS11 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS11 suşuna ait PZR ürünleri

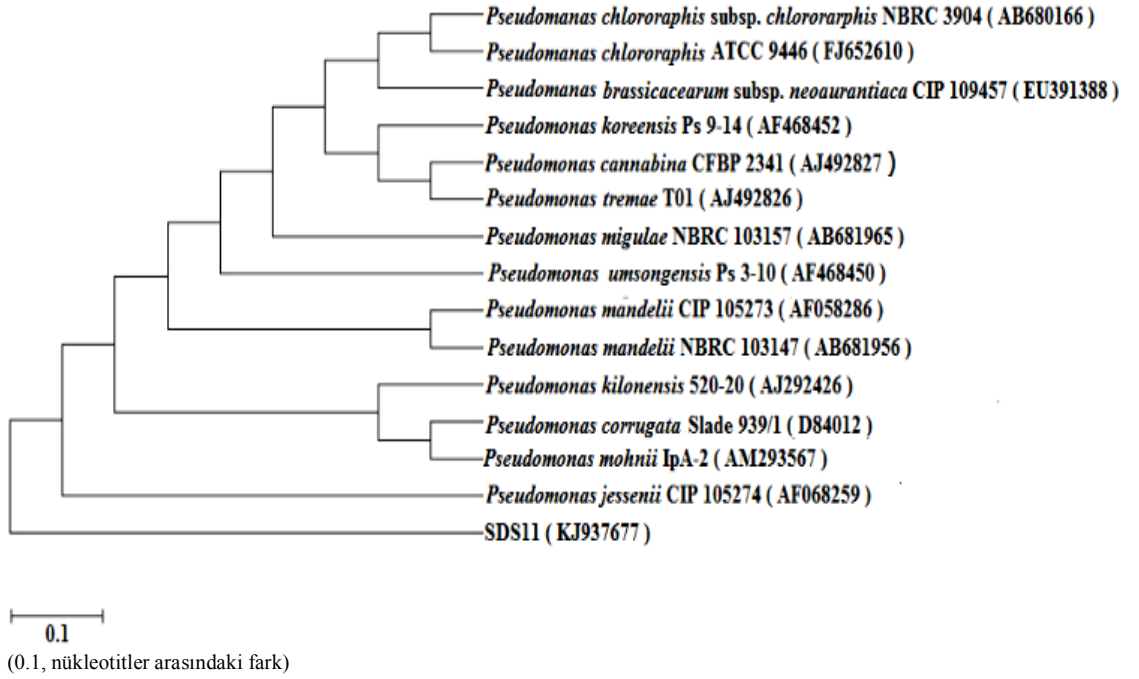
3.6.1. SDS11 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS11 kodlu suşlara en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.4). SDS11 kodlu suş % 99 *Pseudomonas kilonensis* (accession number KJ937677) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.4. SDS11 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. SDS11															
2. <i>Pseudomonas kilonensis</i> 520-20	1,030														
3. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp.	1,054	0,006													
4. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 9446	1,054	0,006	0,000												
5. <i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273	1,030	0,003	0,006	0,006											
6. <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	1,041	0,004	0,003	0,003	0,004										
7. <i>Pseudomonas corrugata</i> Slade 939/1	1,030	0,000	0,006	0,006	0,003	0,004									
8. <i>Pseudomonas mandelii</i> NBRC 103147	1,030	0,003	0,006	0,006	0,000	0,004	0,003								
9. <i>Pseudomonas mohnii</i> IpA-2	1,030	0,000	0,006	0,006	0,003	0,004	0,000	0,003							
10. <i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	1,035	0,001	0,005	0,005	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001						
11. <i>Pseudomonas cannabina</i> CFBP 2341	1,040	0,008	0,006	0,006	0,008	0,004	0,008	0,008	0,008	0,006					
12. <i>Pseudomonas tremae</i> TO1	1,041	0,005	0,004	0,004	0,005	0,001	0,005	0,005	0,005	0,004	0,003				
13. <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp.	1,049	0,005	0,003	0,003	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,009	0,006			
14. <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	1,030	0,001	0,008	0,008	0,003	0,005	0,001	0,003	0,001	0,003	0,009	0,006	0,006		
15. <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	1,035	0,003	0,006	0,006	0,001	0,004	0,003	0,001	0,003	0,001	0,008	0,005	0,005	0,001	-

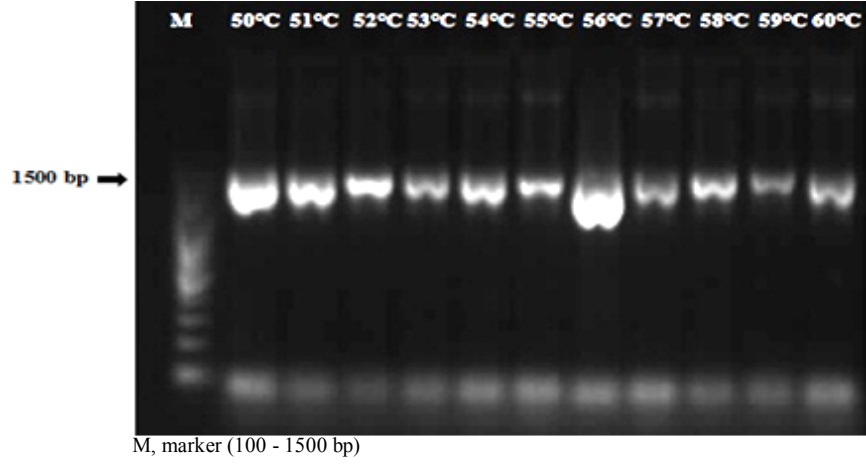
16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.19). Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS11 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas kilonensis* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



Şekil 3.19. SDS11 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram

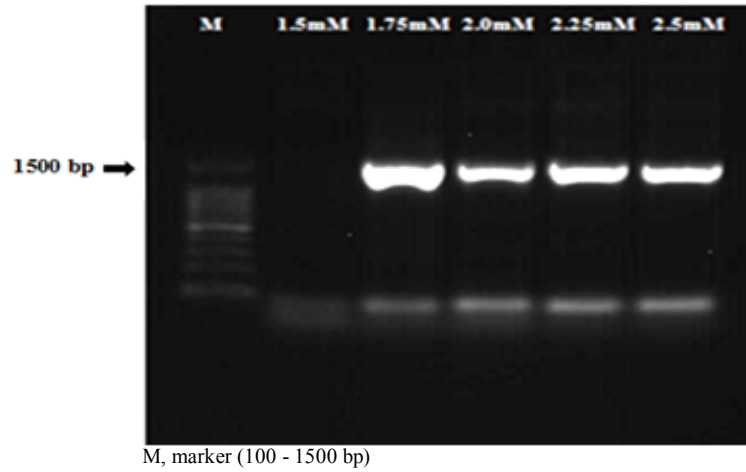
3.7. SDS12 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

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 3.20). SDS12 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 56°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS12 kodlu suşu ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. SDS12 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 1.75 mM belirtilmiştir (Şekil 3.21).

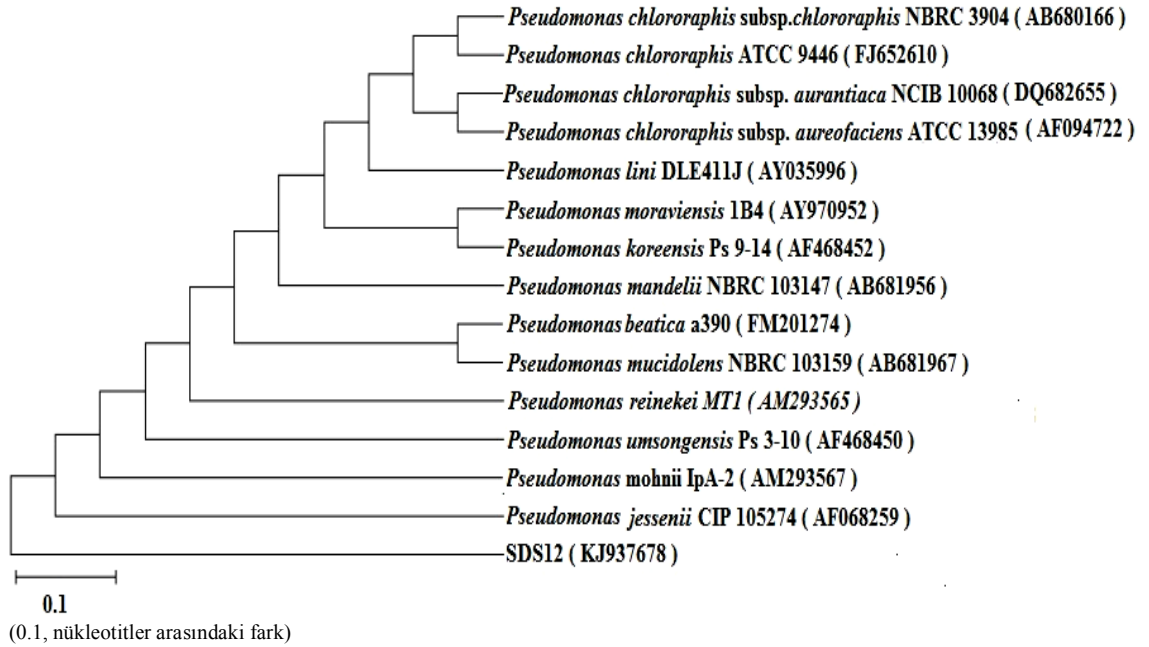


Şekil 3.21. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında SDS12 suşuna ait PZR ürünleri

3.7.1. SDS12 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 SDS12 kodlu suşlara en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.5). SDS12 kodlu suş % 99 *Pseudomonas baetica* (accession number KJ937678) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree 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 SDS12 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas baetica* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



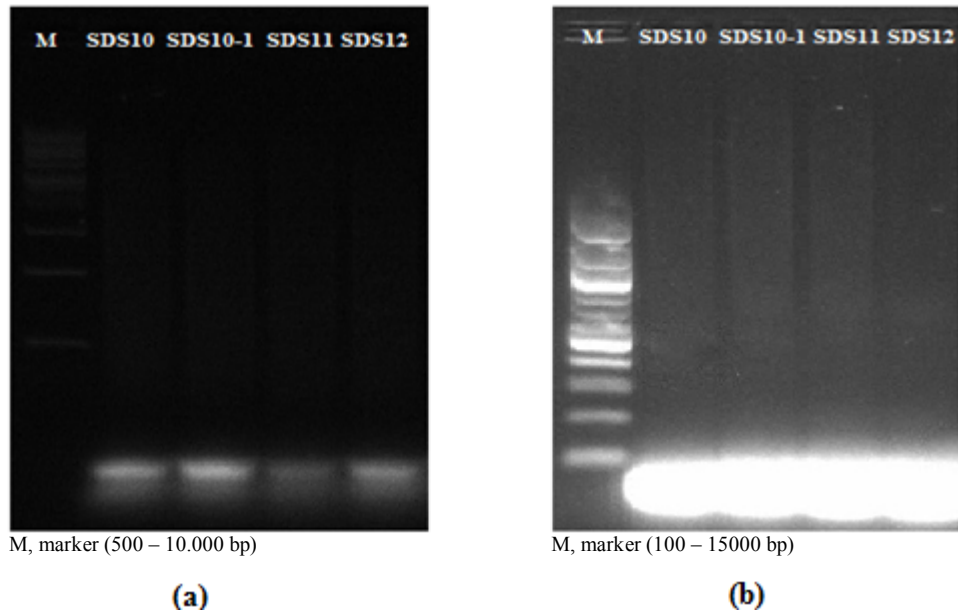
Şekil 3.22. SDS12 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram

Çizelge 3.5. SDS12 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. SDS12															
2. <i>Pseudomonas baetica</i> a 390	0,987														
3. <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	0,976	0,003													
4. <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	0,981	0,001	0,001												
5. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	0,993	0,008	0,008	0,006											
6. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 9446	0,993	0,008	0,008	0,006	0,000										
7. <i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	0,981	0,001	0,001	0,000	0,006	0,006									
8. <i>Pseudomona chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	0,987	0,006	0,006	0,005	0,001	0,001	0,005								
9. <i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4	0,987	0,003	0,005	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004							
10. <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	0,987	0,005	0,005	0,004	0,003	0,003	0,004	0,004	0,003						
11. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurefaciens</i>	0,987	0,006	0,006	0,005	0,001	0,001	0,005	0,000	0,004	0,004					
12. <i>Pseudomonas mucidolens</i> NBRC 103159	0,988	0,006	0,009	0,008	0,013	0,013	0,008	0,012	0,009	0,012	0,012				
13. <i>Pseudomonas mandelii</i> NBRC 103147	0,985	0,003	0,003	0,001	0,006	0,006	0,001	0,006	0,005	0,004	0,006	0,009			
14. <i>Pseudomonas mohnii</i> IpA-2	0,982	0,004	0,001	0,003	0,006	0,006	0,003	0,008	0,006	0,004	0,008	0,010	0,003		
15. <i>Pseudomonas lini</i> DLE211J	0,991	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,008	0,006	0,004	0,010	0,003	0,005	-

3.8. *sdsA* Gen Analizlerinin Yapılması

Shahbazi ve arkadaşları [78], Chatuverdi ve Kumar [81] *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) [64], 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) [78] (Şekil 3.23). Primer çiftleri kullanılmış olup, primerlerin çalışmadığı belirlenmiştir.



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 2.24). Elde edilen ortak alkil sülfataz gen bölgesinden Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) primer tasarım yazılımı ile basamak basamak primer tasarlanmıştır (Şekil 2.25).

<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	CTCCAGTCAAATTATGGAAATTGACACTTCGTTTCTG-CTTGCC-GCAT	94
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTCT-----CTTATTGCTTCA-----TCGATTAGTT	61
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	CCGCCGA--AACACCAGC-----GCC-----CAAACCGCCC	78
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	CCCTCGCCAGCCGCTGCTGGCTGCAGAGAGCCTGGACAGCAAACCGGCC	111
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	CC--CG---AGGGGCTG-----	23
<i>P.stutzeri</i>	CCTGCGCCAGTCAACAGC-----GCC-----GCCACGC	94
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CCATCAT--AGTATCTGGT-----CAAAGCTGGGCTGCAGAACAGCT	135
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTGCTGCAGATAAATTAG-----GCGGATTTAAAGAGCCGACT	99
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGTGCCTTCA---CCGTCG--AGGCCAGCGGGTCTGAAGCG---G	118
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	AGCGCCATCA---CCGCCGAAAAGAACGCCGAAGTGTGAAG-----A	151
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----ATCA---TCGTCG-----ACACCGCGAGTCGGTG-----G	51
<i>P.stutzeri</i>	CACGCACGCAA--GCTGCC-----AGGCCAGGTGGCGCAGAGCTATG	136
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AA-GCCTGCAACGGATGCGACAAAGCCGCTAACGATGCTTTGCTCAAAG	184
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	GA-ACTGACA---CAGCAAAAAATGCGGCAATGGCCCAATC-----	137
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AATTGCCCTTCGCGCACCAGCGCGACTTCGAGCGCGCCAGCCGCGCCTG	168
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	ACCTGCCCTTCGCGCACCAGCGAGGAGTTCGAGGCCGCAACCGGGGCTG	201
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	ACCGATCGCGCAAGGTCCTCGCCGAGTTC-----CGCAA---G	86
<i>P.stutzeri</i>	ACCTGAGCCATGTCGA--GGGCTAGCCAGGCACGC---CGCGCCCTA	180
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	AGCTGCCATTTGACGACAAGACCTCCTTCGACTTAGCGCACAAGGCTTT	234
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	- ACTTCCCTTTGCTGCTCAACAAGATTTGCTGACGCAACAAGGGGATTT	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-AGGGC---CAGGTGCGCGATGC---CGAAGGCGAAG	223
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ATTGCTCCCTGCCTGCAGA-ACCGATCAAAGGCGA---AAAGGGCAATA	280
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATAGCGACCAATGAAGGACA-AGTGATTAATAAAGCAAGCAAGATCGGG	235
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TCGCCTGGCAGCTCGGTGGCTACGACTTCTCCTCGACGGCAA-GCCTCG	263
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TGGTGTGGACATGGGCGCGTACCAGTTCCTCAACGACAAGGACGCCGC-	293
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----ACAAGCCATC-----AAGGCC---	110
<i>P.stutzeri</i>	TGATCTGGGACTTCGATAGCTTTGCGTTTATCC---AAGGTGAGGCCCC-	269
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	TGATCTGGGACCCAAGCAAAATATGGCTTTATTAAAGAGGTGAAGCCGCG	330
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TGATATGGGATCTCAATTCTTATCAATTAAAGGCGA-AAAGCCTCC	284
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	C--GACAGCA-TCAATCCCAGCCTGCAACGCCAGGCCCTGCTCAATCTCA	310
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	C--GACACGG-TCAACCCAGCCTGTGGCACCAGGCCAGCTGAACAACA	340
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	-----ATCG-TCTACACCCACTT-----CCA--CCCGG---ACCACA	141
<i>P.stutzeri</i>	C--ACTACCG-TCAACCCAGCCTGTGGCGGCAAGCGCTGCTGAATAACC	316
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	CCGACACGA-CCAACCAAGCTGTGGCGCCAATCTCAACTAATCAATA	379
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	T--GCATCAATTAATCCAGCTTATGGCGTCAAGCAAGACTTAATATGA	331
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGTACGGCTTGTTCGAGGT--TGCCGAGGTATCTACCAGGTGCGCGGCT	358
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TCGCCGGCCTGTTTCGAGGTATGCCGAAGCT--CTACCAGGTGCGCGGCC	388
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TCAACGGCGTG---AAGGC-----CT	159
<i>P.stutzeri</i>	AGGTTGGGCTGTTCAAAGT--CAGCGACAAAATCTATCAGTACGCGGCT	364
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	TTTCTGGCCTGTTTGAAGT--CACCGACGGCATTACCAAGTCCGCAACT	427
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	ATAATGGCCTGTACAAGGT--CACTGATAGGATTTATCAAAATTCGTGGTT	379
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	TCGACCTGGCCAACATCACCTTCATCCGCGCGGAC-AGCGGCTGGATCGT	407
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6611	TCGATCCGGCGAACATGACCATCATCGAAGGGGAC-AGCGGCTGTTGCTG	437
<i>Pseudomonas</i> sp.alkylsulfatase	TCG--TCAGCGAAGAGCA-----GGTGAAGAGCGCGAGGTGCG	196
<i>P.stutzeri</i>	TCGACTAGCCAACATGACGCTGATCGAAGGGGAC-AGCGGCTGGATGTT	413
<i>Pseudomonas</i> sp. S9 PSdsA	ATGACTTGTCAACATGACCATCGTCAAGGCAAA-GATGGCATCACCAT	476
<i>Legionellafallonii</i> Alkyl	TTGATTTATCAAAATATGGATATTATCGAAGGTAAT-ACAGGTTAATTAT	428

Şekil 3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması

(*); Ortak sekanslar

P.aeruginosa PAO1 GGTTCGACACCCTGACCACCCCGGCCACCGCCAGGGCGGGCTACGAACTGG 457
Pseudomonas sp. DSM 6611 CATCGATACCCTGACCACCCGCGGAACCCGCGCGCCCTCGACCTGT 487
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CATCTACGCCCCAGGAAACC-----CTGCTGG-----ACAACGTCG 231
P.stutzeri CATCGACCCTAACCCAGCCGGGAAACCAGCCGCTTCGGCTATGGACTTCG 463
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ATTCGACCCTGATTTCAAGAAGACGCGAAGGCAGCGCTCGACCTGT 526
Legionellafallonii Alkyl TGTAGATCCATTAATAGTGCAGAACTGCCAAGCAGGTTTGGATTAT 478
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TCAGCCCGGAGCTGGGCGA-GAGGCCGATCCGTACGGTGATCTACAGCCA 506
Pseudomonas sp. DSM 6611 ATTTTCCA-GCACCACCGAAGAACCGATCGTCGCGGTGGTCTACAGCCA 536
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TCACCCA-AGGCTCGCTGGTGGGGCCGATCCTCACCATGCGCTCGGGCTA 280
P.stutzeri TTGCACAACATCTGGGCTC-ACGCCGGTGAGCGCGATGATCTTCAGCCA 512
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AC-TACAAACATCGGCCGAAAAAACCTGTGGTTGCAGTCATCTACACACA 575
Legionellafallonii Alkyl AC-TTTAAACACCACCTAAAAAGTCGGTTGTTGCAGTGATTATACGCA 572
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGCCCACGCCGATCACTTTGGAGGCGTGCGCGGTC TGGTAGAGCCACAGC 556
Pseudomonas sp. DSM 6611 CAGCCATATCGACCCTTCGGCGGC GCGCGCGCATCATCGA--CGAGGC 584
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CA-----GCTTCGGCGTTGCGC-----TCTCCGA--CGAGGA 310
P.stutzeri CAGCCATGTCGATCACTTTGGCGGTGCTCTCGCGGTGATCAG--CGCCGA 560
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CAGCCACGTTGACCCTACGGCGCGGTGCGCGGTGTTGTCGA--TGAGGC 623
Legionellafallonii Alkyl CAGTCATGTGGATCACTATGGCGGGTTAAAGGTATAGTCAA--TGAAGA 575
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 AGGT-CGCCAG---CGGCGCGGTGCAGATCATCGCTCCGGCCGGCTTCA 601
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGA--CGTCAAGGC-CGGCAAGGTGAAGTCTTCGCGCCGTCGCGGTTCA 631
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CAAG-CG-----CGACA---TGAACGCCG--GCCTCGGCCCGCT--- 343
P.stutzeri AGA--CGCCAAGGTGCGTCA-GCTACCGGTGATGCCCCGGCTGGGTTTA 607
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AGA--TGTAAAGGC-CGGCAAGGTAAAGATCTACGCACCGTTAGGTTTCC 670
Legionellafallonii Alkyl TGATGTGACGAAG---GGTAAAGTAAAAATTTATGCGCCGAAGGGATTC 622
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TGGAGCGCGCATCAAGGAGAACGTCTTGGCCGGCAACGCCATGATGCGC 651
Pseudomonas sp. DSM 6611 TGGAGCATGCCGTCAGCGAGAACATCCTCGCCGGCACCCGCATGGCCCGT 681
Pseudomonas sp.alkylsulfatase -----GGCCACGAGGGCGCCTCCACCTTCATCGC-----CCAC 379
P.stutzeri TGGAAAGAGGCCACCAGCGAAAACCTGATGATGGGCATCGCCATGGCCCGC 657
Pseudomonas sp. S9 PSdsA TTGAGCACGCCGTGGCCGAGAACGTTATGGCAGGTACTGCCATGAGCCGC 720
Legionellafallonii Alkyl TAGAAGAGGCCGTAAGTGAGAACGTTTATGCGGGTAAATGCGATGATCGT 672
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGCGCCACCTACCAGTACGGCACGCAACTGCCCAAGGGGCGCGAGGGGCA 701
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGCGGCCAGTACCAGAGTGGCGTCATGGTGCCCGCGGAGCCGAGCCGCA 731
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CG--ACACCTTCC---GCGACA-----GCC-----399
P.stutzeri CGTGCCACCTTCATGTACGGCAAGCGCCTACCGCGCAGCGCCGAGGGCCT 707
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CGGGCCAGCTATATGTACGGTAACCTGTGCGCCAGAGCCAAAGGGCA 770
Legionellafallonii Alkyl CGTTCGTTTTATATGTATGGCACTTTTCTACCCCGGAGAAAGAGGCCA 722
* * * * *

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

P.aeruginosa PAO1 CTGCTGGCGCCGACCCGCCTGATCGAAGGCGAGGGCGAGGACCTGGTGCT 797
Pseudomonas sp. DSM 6611 CTGGTCGCACCGAAGCTGTGATCGAGAAGCCCTACGAGCGCCACACCGT 830
Pseudomonas sp.alkylsulfatase -----CGCCGGGC-----TTAAG-----425
P.stutzeri CTGC---CGCCACCAACTGATCGACGGCCGCAACAGACGCTGGACGT 803
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CTGATTCACCAACCGACATCATCAAAGAAACCGGTGAAACCCACGTAAT 866
Legionellafallonii Alkyl CTTATTCGCCAACAGATGAAATCAAGCAAACCTGGAGAATAAAAAATAT 818
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GGACGGCGTGCCTTACCTTCCAGAACCGCGGGCACCGAGTCGCCGG 847
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGACGGCTCGAGCTGGAGTTCAGCTCACCCCTGGGCAGCGAAGCGCCAT 880
Pseudomonas sp.alkylsulfatase -----GTGCAGTTC---CTCCA---CGTGCC---CAGCGAGGCGCCG 459
P.stutzeri GGATGGAGTGCCTTTCGCTTCTACAAACGTAACCGAGAGTGAAGCCCGG 853
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CGACGGTCTCACTTACGAGTTCATGTATGCGCCTGGCAGTGAAGCCCGG 916
Legionellafallonii Alkyl TGATGGAATCGATATAGTATTTCAAATGGCACCTCATACTGAGGCGCCAG 868
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGGAGATGAACATCTGGCTGCCCGGCGAGAAGGCCCTGCTGATGGCCGAG 897
Pseudomonas sp. DSM 6611 CGGACATGAACATCTACCTGCCCGAGTTCAAGGTCCTGAACACCCGCGAT 930
Pseudomonas sp.alkylsulfatase ACGAAATCGTCTCTACCTGCCCGGACAACCCGCTGCTCATCAGCCCGGAG 509
P.stutzeri CGGAAATGACCTTTCAGCTTCCCGGAGCTGAAACGCTTTGGCGGCGCCGAG 903
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CGGAGATGCTTACTACATCAAGGAGAAGAAAGCCCTTAACGCTGCAGAA 966
Legionellafallonii Alkyl CAGAAATGTTAATGTATTTCCCGCAATCAAAGCATTTATGTGCGGCGGAA 918
* * * * *

Şekil 3.24. (Devam)

P.aeruginosa PAO1 A--ACGTG--GTCGGTACCTGCACAACCTGTACACCCCTGCGCGGCGCCG 943
Pseudomonas sp. DSM 6611 A--ACGCGCCGCGCG--ATGCACAACCTGCTCACCOCGCGCGCGCG 976
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GTGACCCAGGCGCCG--ACCCTGCCAACGTCCACACCCCTGCGCGGCACCA 558
P.stutzeri CT-ACTCT---CGAAACCTGCACAACCTGTACACCCCTACGCGGCGCCA 949
Pseudomonas sp. S9 PSdsA G--ACTCC--ACGCATACGCTGCACAATACCTACTCGCTTCGTGGCGCCA 1012
Legionellafallonii Alkyl G--ATGCA--ACGCATACCTTACATAATCTTTACTTTGCGCGGTGCC 964
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 AGGTACGTGATGCGCTGGGCTGGAGCAAGTACATCAAC--CAGGCGTGCA 992
Pseudomonas sp. DSM 6611 AAGTGCAGCGACGCCAAGGCTGGGCGCGCTACATCGACGCCAGC--CTGGA 1025
Pseudomonas sp.alkylsulfatase AGTTCCCGGACCCGGTGGTGTGGGTGGCGAGCCTGGAC--AAGC--TGCG 604
P.stutzeri AGGTACGCGATGCCTTGCAGTGGGCCAATACATCGACGCCAGC--CGCG 997
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AGATCCGTGACCCACTCGCTTGGTCGAAGTACCTCAACG--AAGCACTGAA 1061
Legionellafallonii Alkyl AAGTAAGGATGCTGCTTCTTGG--TGAAACCGTTAAATGAACCATAGA 1013
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TCGTTTCGGCAGCGAGGCCGAGGTGATGTTTCGCGGTGCACAACCTGGCCCG 1042
Pseudomonas sp. DSM 6611 AAAATACGGCGACCGCACCGAGTGTGATCCAGCAGCACAACCTGGCCCG 1075
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GGCCCTC-----CAGGCCGACGTGATGGTGGCCGCTGCACGGCCAGCCGG 648
P.stutzeri CGCAAGCCGCTGGC--GCCGAGGTGCTGTTCAACCAGCACCCTGGCCCG 1045
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ACTCTGGGGTGTGACGTTCAAGTGTATGATGCCATGCACCAGTGGCCGG 1111
Legionellafallonii Alkyl ATTATTTGGTGATAAGACCGAGTTGATTTGCGCAACATCATTTGCCCA 1063
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GCTG--GGCAACGCGGAGAT--CGTCGAGGTGC--TGG--AGAAGCAGCGCGA 1088
Pseudomonas sp. DSM 6611 TCTG--GGCGCGGACAAGGTGCGT--ACCTACCTCG--CCGACCCAGCGCGA 1121
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TGAGCGGGCGG--GAGAAGGT--GGAGGAGGTGCTGCGCATGACC--CGCA 694
P.stutzeri TGTGGGGGCG--GACAACATCCA--GACCTTCTCA--CCACCAGCGTGA 1091
Pseudomonas sp. S9 PSdsA TGTG--GGCAACAAGAAGTGCAGGAGCAGTTATCG--CTA--CAACCGCA 1157
Legionellafallonii Alkyl TGTG--GGATAACAAGCGCGT--TGTGGAGTTTC--TCG--AGAGTCAGCGTGA 1109
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CCTGTACGGCTACCTGCACGACCGACCCCTGCACCTGGCCAACCGAGGGG 1138
Pseudomonas sp. DSM 6611 CATGTACGCCTTCCTCAACAACCGCGCGCTGAACCTGATGAACAAGGGCC 1171
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CGCCATCGCTTACATCCACGACCGACCGTGGCTGGATGAACAAGGGCC 744
P.stutzeri TGCCCTACCGCTACCTGCACGATCAAACTGTTGCGCTGATGAATGCCGGCC 1141
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CATGTACCGCTACATCAATGATGAACCCCTTCGCTTAGCGAACAAGGGTT 1207
Legionellafallonii Alkyl TTTATATAAGTTTATCCATGATCAAGCATACGTATGCTCAACCAAGGAT 1159
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TGACCATCGGCCAGGTGCACAACCGCC--TGCGCCTGCCGCCAGC---CT 1184
Pseudomonas sp. DSM 6611 TGACCCTCCACGAGAT--CGCGGAGAAAGTGAGCAAGCTGCCTGGCGAGCT 1220
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TGACCCCGGACGAGCT---GGTGGAGAAGTCAAGTGC--GCCACCC 789
P.stutzeri TCACCCGCGCGGAGAT--CGCCGAGCAACTGCACCTGCCGCCAGC---CT 1187
Pseudomonas sp. S9 PSdsA ACACCATGACCGAAAT---CGCGGAGCAGGTGAAACTGCCAAGAAAAAT 1253
Legionellafallonii Alkyl TTGTGATGACTGAGAT---TGGCAACATGATGCAATTACCACCGGAGCT 1205
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CGACCAG---GAATGGTACGACCGCGGCTACCACGGCTCG--GTACGCC 1228
Pseudomonas sp. DSM 6611 GGACCGG---AAGTGGTACCTGCGCAGCTACTACGGCGCGCTGTCGACC 1266
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TGGCCGGTACACGCCCTACCTGCGCGAGTACTACGGCACC--GTGAAGC 837
P.stutzeri CGACCGCC---ATCTGAACGTGCACGACTACTACGGAACCC--TCAAGC 1231
Pseudomonas sp. S9 PSdsA TG--CTACA---AAATCTCCAACCGCGGTTACTACGGCTCAC--TGAATC 1297
Legionellafallonii Alkyl TG--CCAAT---AAGTGGTATAACCGTGATTATTTATGGTTCC--GTAAAGC 1249
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 A--TAACGC--ACGG--GCCGTGCTGAACCGCTACCTGGGCTACTACGAC 1272
Pseudomonas sp. DSM 66114 AACTTGCGC--GCGG--TC--TACC--AGCGCTACCTGGGCTTCTACGAC 1308
Pseudomonas sp.alkylsulfatase A--CAGCGT--GCGGCAGATCTACC--AGGGCTACCTGGGCTGGTTCCAG 881
P.stutzeri A--CAACGT--GCGCGGCATCTATC--AGTTCTACCTAGGCTGGTTCCAG 1275
Pseudomonas sp. S9 PSdsA A--CAACGTCAAAGCCACTTATGTT---CTGTATCTTGGCTGGTTCAAT 1341
Legionellafallonii Alkyl A--TGATGCTAAGGC--GGTGTATC--AACGTTATTTGGGTTGGTATGAT 1293
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GGCAACCCGCGACCCCTCGACCCGCTCAGCCCGGAGGAC--TCGGCGGGCC 1321
Pseudomonas sp. DSM 66114 GGCAATCCGGCCAACCTCGACCCGTTCCCGCGGGTCGAGGCCGGCAAGC- 1357
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GGGCACCCGGTGGACCTCGACCCATCCCGCCGGGAGAGAAGGCCAGGC- 930
P.stutzeri GCCAACCCGGCCAACCTCGACCCACTGCGCGGGTGGCCGCCGCC--GCCA 1324
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GGCAACCCCGCCACATTTGGGAGCTGCCACCTGCAGACAAGGCTAAGC- 1390
Legionellafallonii Alkyl TCTAACCCAGCGCATCTTGACCCGATTATGCCCGTAGAATCGAGCAAAA- 1342
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GCTACGTGGAATACATGGCGCGCGGAGCGCC--TGTTGG--AGCAAGCGC 1369
Pseudomonas sp. DSM 66114 GCTACGTGAGGCCATGGCGCGCGCCGA--CGCCGTGCTCA--AGCAGATGC 1405
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GCCTGATCGCCCTCATGGCGGGTCGCGA--CAAGGTGCTGATGGCGGCCG- 978
P.stutzeri AGTACGTGGCCCTGGCGCGCGCGGTGAGCCGC--TGTTGGCAGCCGCGCA 1373
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GTTACGTGAAATGATGGGTGGTGTGTA--CGCTGTGCTGAAAAAGCCAA 1439
Legionellafallonii Alkyl AATATGTTGAGTACATGGGGGAGTGA--TGCAGTCTTAAAAAGCCAC 1391
* * * * *

Şekil 3.24. (Devam)

P.aeruginosa PAO1 GGGC-GTCGTACGCCAGGGGCGAATACCGTTGGGTGGTTCGAGGTGGTCAA 1418
Pseudomonas sp. DSM 66114 GCGCCGCCAT-CGACAAGGGCGACTACCGCTGGGCGGTGCAACTGGGCAA 1454
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GCGATGCC-TACCTGAAGGGCGACTGGCAATGGGCGGCCAACTGTCCGG 1027
P.stutzeri GCAA-GCC-TATGCCGAGGGCGATTACCGCTGGGCGCGGAGCTGGGCAA 1421
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GGA--GTATTACGACAAAGGTGATTCCGCTGGGTAGCCGAGGTAGTCAA 1487
Legionellafallonii Alkyl AGAA-GCA-TACAACAAAGGGAGTATCGGTGGTGTCTGAGGTGATGAA 1439
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CAGGCTGGTCTTCGCCGAGCCGGATAATCGGGCCGCGCGAGCTGCAGG 1468
Pseudomonas sp. DSM 66114 CCACCTGGTCTTCGCCGACCCGGCCAAACAAAGGACGCCCGCGCCCTGCAGG 1504
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CTACGCCATCCGCGTCCGACACGACGACAAACTCGCCCGGACATCAAGG 1077
P.stutzeri ACATCTGCTCTATGCCGATCCGGACAACCAGGGCCCGCGATCTGCAGG 1471
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CCATGTGGTCTTTGCTGAACCGAACAATCAAGCGGCAAAAAATATGCAAG 1537
Legionellafallonii Alkyl TCATGTGGTATTCCGCCGATCCTAATAATAAAAAAGCACGCGATTGGAGG 1489
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CCGACGCCCTGGAGCAACTCGGCTAC--CAGGCGGAG--AACGCCGGCTG 1514
Pseudomonas sp. DSM 66114 CCGACGCCATGGACAGCTCGGTTAC--CAGACCGAG--AACGCCCTCTG 1550
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CCCGCAGCTTCGCCCGCTGGGCTACGCCAG--CATG--AACATCAACTG 1123
P.stutzeri CACGCGCTTCGAGCAACTGGGCTAT--CAGCCGAGTCCGGGCC--CTG 1517
Pseudomonas sp. S9 PSdsA CCGACGCCCTGGAGCAGCTGGGTTAT--CAAGCTGAG--AGCGGCCATG 1583
Legionellafallonii Alkyl CTGATGCTTTTGAGCAGTTAGGTTAT--CAAACCTGAA--AATCCAACATG 1535
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GCGCAACAGCTACCTCAGCGCCGCTACGAACTGCGCCACGGCGTAC--C 1562
Pseudomonas sp. DSM 66114 GCGCAACATGTACATGACCGGGGCAATGGAACCTGCGCCACGGTGTGC--C 1598
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GCGCAACTGGTACCTGATGAGTGCATGGAGCTGG--AAGGCAAGC--T 1168
P.stutzeri GCGCAACTTCTACCTGAGTGGCACCTATGAGCTGCGCCACGGCTGC--C 1565
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GCGCAACTTCTACCTCAGCTCAGGTCGCGAGGAACCTCGCAATGGCGTGCAC 1633
Legionellafallonii Alkyl GCGTAATGAATATTTAATGGGGGATTTGAATGAGAATGGGGTGC--- 1582
*** ** * * * * *

P.aeruginosa PAO1 G--CGCGACCAGCGCAGATG-AAGGCGGCGAGCGCCGATGCC--TGCC 1607
Pseudomonas sp. DSM 66114 GACATATGACT--CCCGCGC--AAGTCCGA-----GATGGGC-CGC- 1635
Pseudomonas sp.alkylsulfatase GGAGGGCGAGCTGGCGCTGGAA-ATGTCCCGC---CGGGTGGCGCGCCG 1213
P.stutzeri GGAAGAGGGTTTCACTCCGGTA-ATGATGCTC-----GATATGCTCAAA 1608
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AACTTCCGACAC-CCGATACCGCAAGTCT-----GACACCGTCAA- 1673
Legionellafallonii Alkyl ---CTAAGATTCTCAGTTCATTTAGTTCCTTCTTCTTCCGATACTATTCCG- 1628
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GCGGATGGACACCGGCTGCTGTTTCGACTATCTCGGCG---TGCGCCTG 1653
Pseudomonas sp. DSM 66114 -GCGCTGACTCCCGATATGTTCTTCGACC-TGCTGGCGA---TCCGCGCTG 1680
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TCTCTCTCCCGGACATGCTGAAGAACC-TGCCGGCGGCATCTCCTG 1262
P.stutzeri CACACCGCTCCCGAGCGC-TTCCTGGACG-TGATGGCCA---CCAAGCTC 1653
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GCGGATGGACTTGGATTGTTCTTCGACT-TCCTGGCCA---TGCGTTTG 1719
Legionellafallonii Alkyl CGTATGCCTATGGAAATGTATCTCGATTATTTAGGAA----TGCGTTTG 1674
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GA-CGCC--GGCGCTGCG-GAGGGCAAGGCGCTGAGCATCAACCTGCGCC 1699
Pseudomonas sp. DSM 66114 GA-CACC--GATAAGGCC-GTCGGCCACGACATGACCCTCAAC-TGGGTG 1725
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CA-GAACTGGGTGACGCGCATCGACCCGGAGAAGAGCGGCGACGTCGAAC 1311
P.stutzeri AA-TGGCACGGCG--GCA-GCCGACAGCGCGCTGCGTATCAACCTCAACT 1699
Pseudomonas sp. S9 PSdsA AAAGGGCTGATGTTGC---CGACAAGCACATCACTCTCAACCTTGACT 1765
Legionellafallonii Alkyl GA-TGGCCAAAAAGCGCA---AGGTAAGAAAATGAGTATCAATTTAAGCC 1720
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 TGCCG-GACATCGGTGAGAACTACCTGCTG-GAACTGAAGAA---CTCGCA 1745
Pseudomonas sp. DSM 66114 TTCGAAGACCTCAAGCAGGACATCGCCCTG-ACCCTGCGCAA--CG-GCG 1771
Pseudomonas sp.alkylsulfatase T----GGCCTGGGCTTCGCCTTCC-CCG-ACATCGACGAAGCCTGGAC 1354
P.stutzeri T-CACCGACAGCGCGCGCTATCACTTGTGGATCGAGAAGCCCGTG-- 1746
Pseudomonas sp. S9 PSdsA T-TACCGATCTCAAACAGAAGTACACGCTCGAGATGGTAAACGGTGTG-- 1812
Legionellafallonii Alkyl T-CACGGATAAAAAACAATAACGCGATT-AAATGCAAAA--TTCAGT 1766
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 CCTGAACAACCTGCGC-GGCGTG---CAG---AGCGAGGACGCCGGGCA 1787
Pseudomonas sp. DSM 66114 TGCTGAC--CCAGCGC-GTCG-G---CAGCCTCAACCCGAAGGCCGACGT 1814
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CCTGGAGGTGCGCCCGC-GGCGTGGCCAGCTCAAGTCCGG-CATTGACCC 1402
P.stutzeri -CTGCAT---CACCGC-CGTATG---AATGAAGCGAAGTCCGCGAGGC 1787
Pseudomonas sp. S9 PSdsA -CTCAAC-CACACCGAAGGCATG---CAA---GCTAAGAACGCCGACGC 1853
Legionellafallonii Alkyl ACTG-ATTTATACCCGGAATAAAA---AAATTGGAT---AATGCGGATGT 1808
* * * * *

P.aeruginosa PAO1 GACCGTGAGCATCGACCGGCC-GATC-TCAACCGGCT---GCTGCTCAA 1832
Pseudomonas sp. DSM 66114 CACCGTGAA-GCTGACCAAGCC-CACCCTCGACCAAGATC--GCCGCGGC 1860
Pseudomonas sp.alkylsulfatase CGCCGTG----CCCCTGCGCCTGACCCTCGACAAGC----GCTACCTGG 1443
P.stutzeri CGACG-----CCA-GCCTCAACCTGAGTAAGGACT-TCTTGTTCG 1825
Pseudomonas sp. S9 PSdsA GACCGTCAC--CTTAACGCGTGAACCCCTTAATAACGT--GATGCTAAA 1898
Legionellafallonii Alkyl TAGTGTTC--TTTACC CGAAATGTATTAGATGCCATTAATCTGCGTGA 1856
* * * * *

Şekil 3.24. (Devam)

```

P.aeruginosa PAO1          AGAGG-----TATCG-GCG-GTA-----CGCC-TGGTCTTCGAGGGCA- 1867
Pseudomonas sp. DSM 66114 AAGC-----TCG-ACCTGCC-----CACCGCATCAAGCAGGGCAC 1895
Pseudomonas sp.alkylsulfatase ACACCGTCATCAGCG-GCGAGAA-----CAGCCTGCTCAA-GGGAGCGC 1485
P.stutzeri                 AGATA-----ATCA-GTGGGCAAGCCGGCGCCGAGCCCTGCTCAGCTC 1868
Pseudomonas sp. S9 PSdsA   ACAG-----ACCACGCTAAAA-----GATGCGAAAGCTCAGGCGA 1934
Legionellafallonii Alkyl  G-----ACTACTCTGGAT-----GATGAGTTAAAGAAAGGTAC 1889
                               *

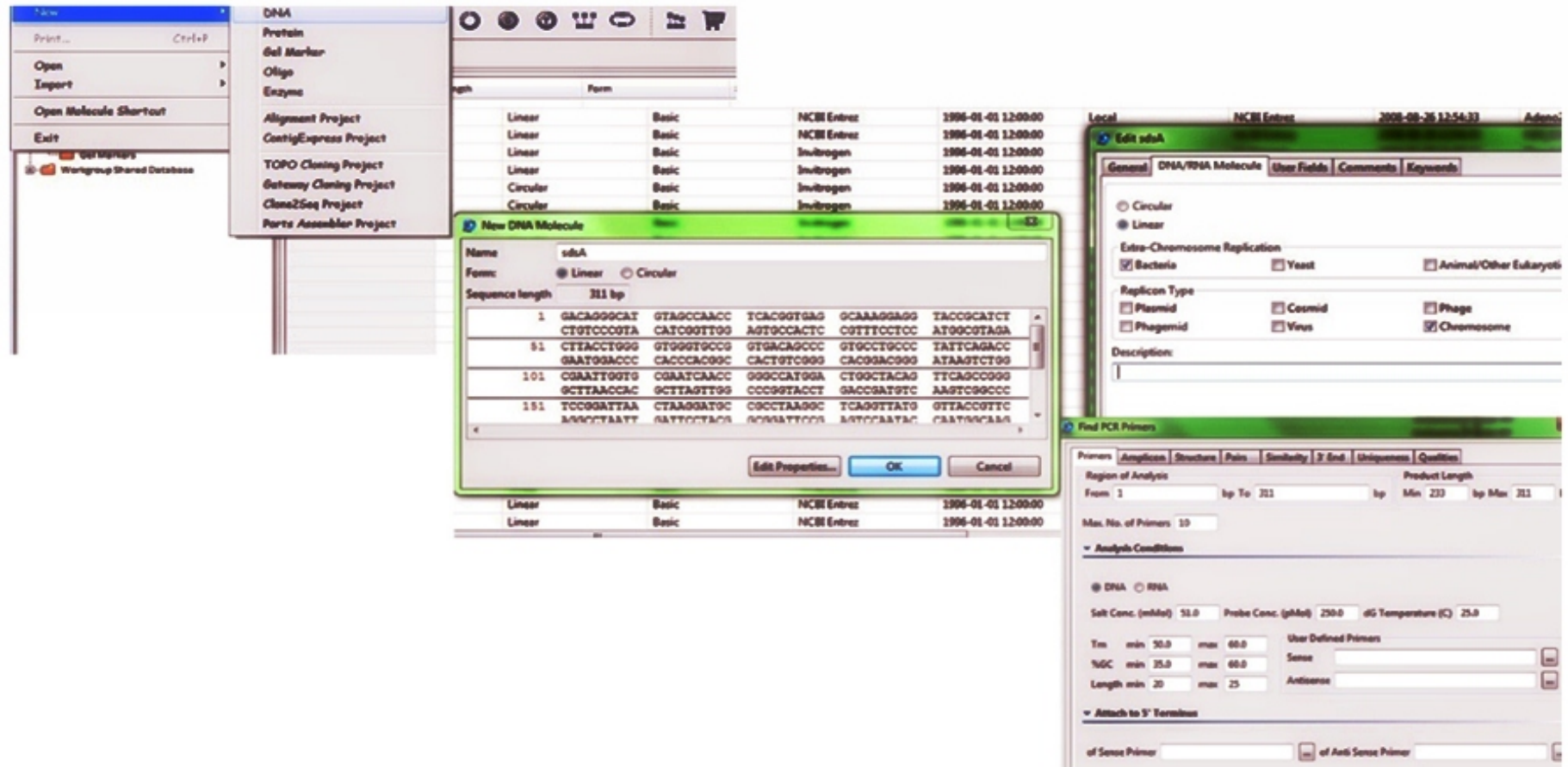
P.aeruginosa PAO1          ----AGC----TGAAGAG--TTCCGGCAATCCGCTGTTGCTGGGGC--- 1903
Pseudomonas sp. DSM 66114 GGTCAAGC----TGGACGG--CGACGGCAA-----GAAGCTCGGCG--- 1930
Pseudomonas sp.alkylsulfatase TGCTGGGGGACGTGAAGGT--CGATGGCAAC-----CTGCTGGACATCA 1527
P.stutzeri                 CGATCAGG---TGTCGAT--CGACGGCAAC-----CCCCTGGCCCTTG 1906
Pseudomonas sp. S9 PSdsA   CATCAAAAT---CGAAGGTGACAAAGGCAA-----GCTCGAAG--- 1969
Legionellafallonii Alkyl  AGTGAAAT---TGATGGG---GATAGAAAT-----AAACTAAGCG--- 1924
                               *      *  **      **

P.aeruginosa PAO1          AACTGTTCGGCATGCTCGGC-GACT---TCGACTTCTGGTTCGAT--ATC 1947
Pseudomonas sp. DSM 66114 AGTTCTTCGGCTGCTCGAC-AGCT---TCAGCCCGAAGTTCAT--ATC 1974
Pseudomonas sp.alkylsulfatase AGACCTTC-----CTCGGC-TGCT---TCGACTTCGAGGACGCC--CCC 1565
P.stutzeri                 GCGCTTC-----TTCAGCCTACTGGATCAGCCAGACGGAGCCTTCCCC 1950
Pseudomonas sp. S9 PSdsA   AGCTAATGAGC-TACATGGATAACT---TCGACTTCTGGTTCAC----- 2010
Legionellafallonii Alkyl  AGTTACTCGATATGCTGGTTGTATT---TCAACC-GACATTTAAT--ATT 1968
                               *      *  **  *

P.aeruginosa PAO1          GTCACGCCGGCGCGGAAGTCCGAAGGCTGA 1977[86]
Pseudomonas sp. DSM 66114 GTC-----GAACCCCTCGAG-TGA 1992[89]
Pseudomonas sp.alkylsulfatase ATCGCCCT-----CACCGTGCCTTGA 1586[90]
P.stutzeri                 ATTG-----TCACGCGGTAG 1965[91]
Pseudomonas sp. S9 PSdsA   ATTG-----TGACGCCATAA 2025[92]
Legionellafallonii Alkyl  ATCACGCC-----GAATGAGCAATGA 1989[93]
                               *      *

```

Şekil 3.24. (Devam)



Şekil 3.25. Primer tasarımında 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 2.25). 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	63.62 58.78
2.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCGTTCCAATGCGCGTACCA	289	24 20	63.62 59.67
3.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CCCTCGTTCCAATGCGCGTA	292	24 20	63.62 60.53
4.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-ACCCTCGTTCCAATGCGCGT	293	24 20	63.62 61.29
5.	F-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCCCGACCCTCGTTCCAATG	298	24 20	63.62 59.33
6.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CCAATGCGCGTACCATCTCG	282	22 20	59.87 58.78
7.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TCCAATGCGCGTACCATCTC	283	22 20	59.87 55.97
8.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-TTCCAATGCGCGTACCATCT	284	22 20	59.87 55.97
9.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-GTTCCAATGCGCGTACCATC	285	22 20	59.87 55.57
10.	F-GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R-CGTTCCAATGCGCGTACCAT	286	22 20	59.87 58.2

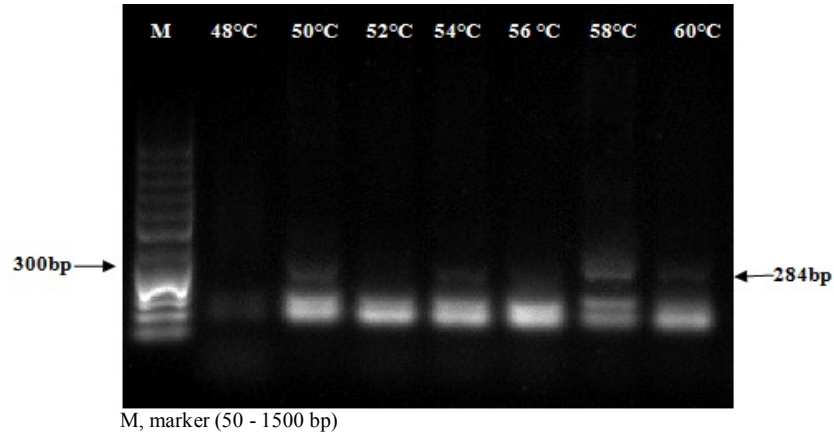
F, forward; R, reverse

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. migulae* SDS10 Suşu *sdsA* Gen Analizi

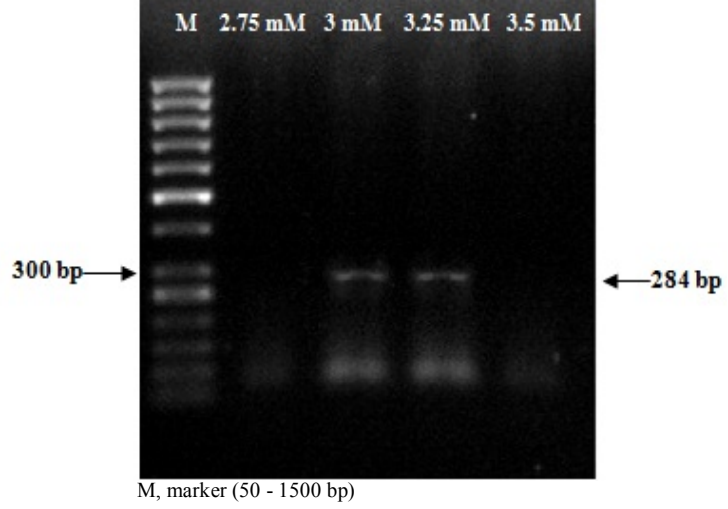
Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir (Şekil 3.26). *P. migulae* SDS10 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.26. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. migulae* SDS10 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR

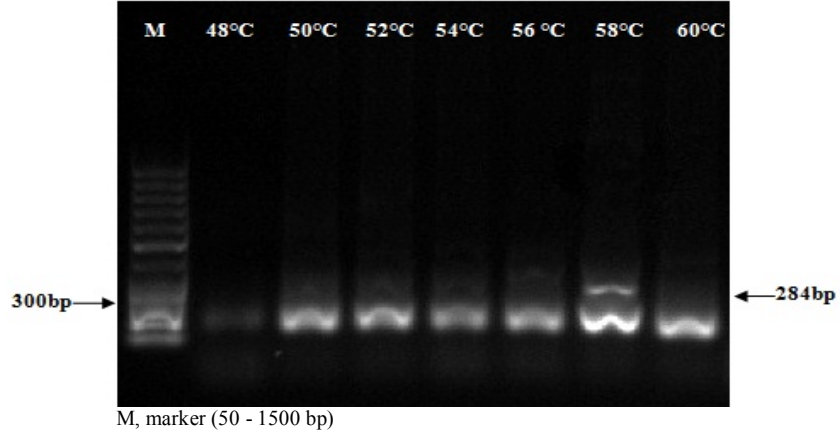
şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.27). *P. migulae* SDS10 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 3 mM seçilmiştir.



Şekil 3.27. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında *P. migulae* SDS10 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

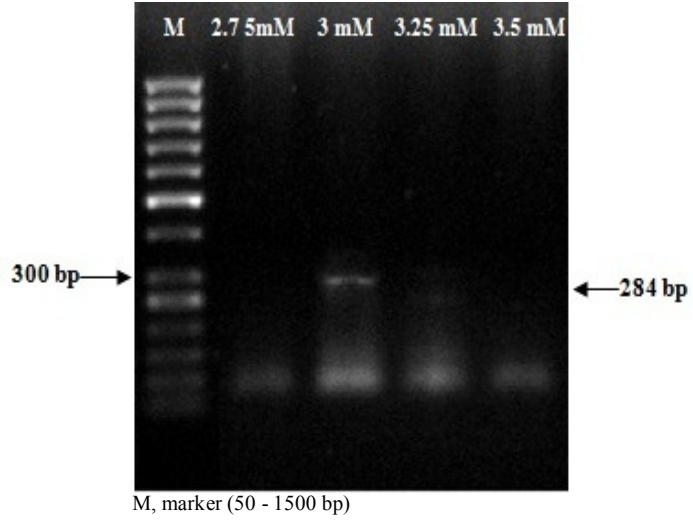
3.8.2.2. *P. koreensis* SDS10-1 Suşu *sdsA* Gen Analizi

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 3.28). *P. koreensis* SDS10-1 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.28. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P.koreensis* SDS10-1 kodlu suşu ait *sdsA* PZR ürünleri

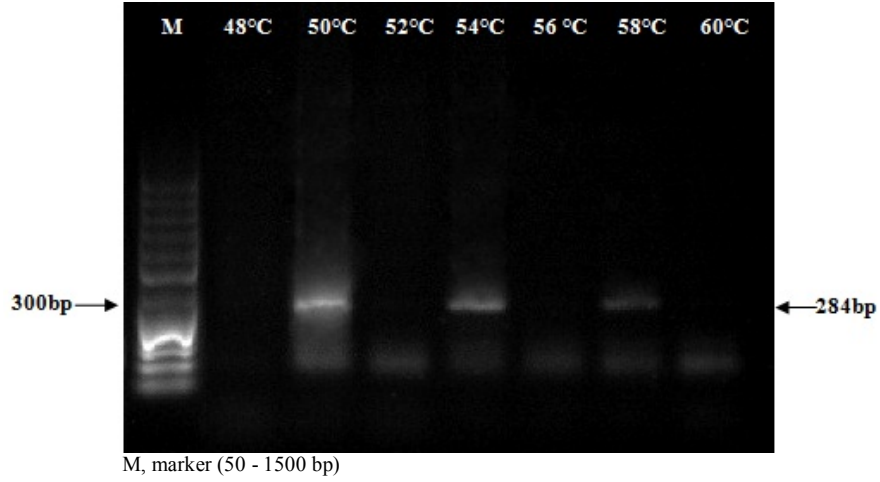
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.29). *P. koreensis* SDS10-1 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 3 mM seçilmiştir.



Şekil 3.29. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. koreensis* SDS10-1 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

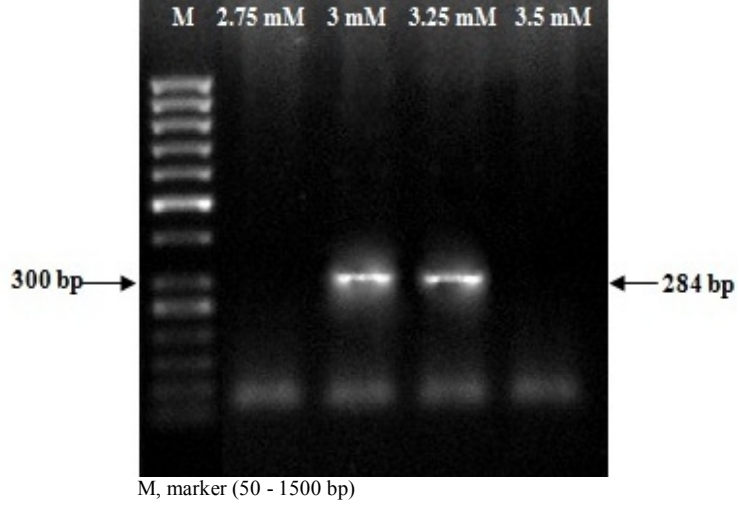
3.8.2.3. *P. kilonensis* SDS11 Suşu *sdsA* Gen Analizi

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. kilonensis* SDS11 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.30. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. kilonensis* SDS11 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

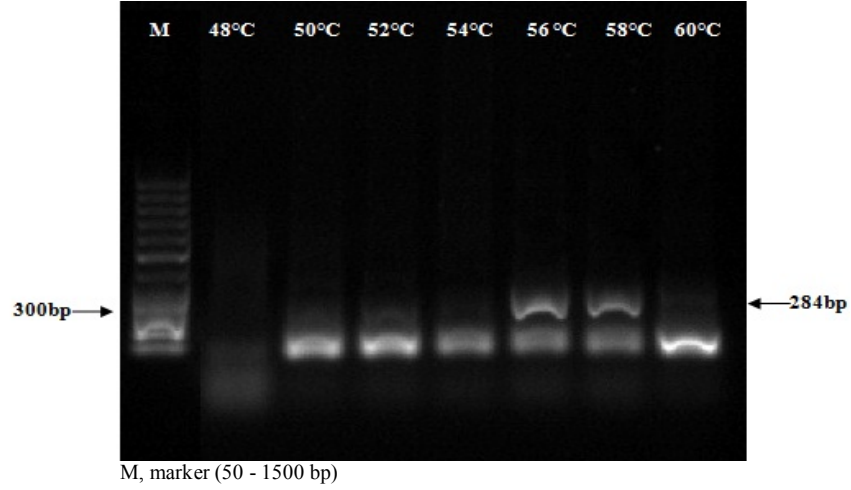
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.31). *P. kilonensis* SDS11 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 3 mM seçilmiştir.



Şekil 3.31. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. kilonensis* SDS11 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

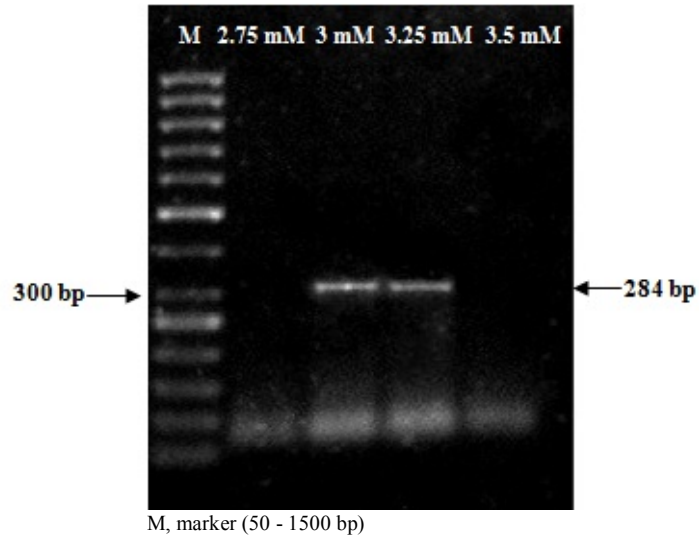
3.8.2.4. *P. baetica* SDS12 Suşu *sdsA* Gen Analizi

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. baetica* SDS12 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın $56^{\circ}C$ olduğu görülmektedir.



Şekil 3.32. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. baetica* SDS12 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur (Şekil 3.33). *P. baetica* SDS12 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 3 mM seçilmiştir.

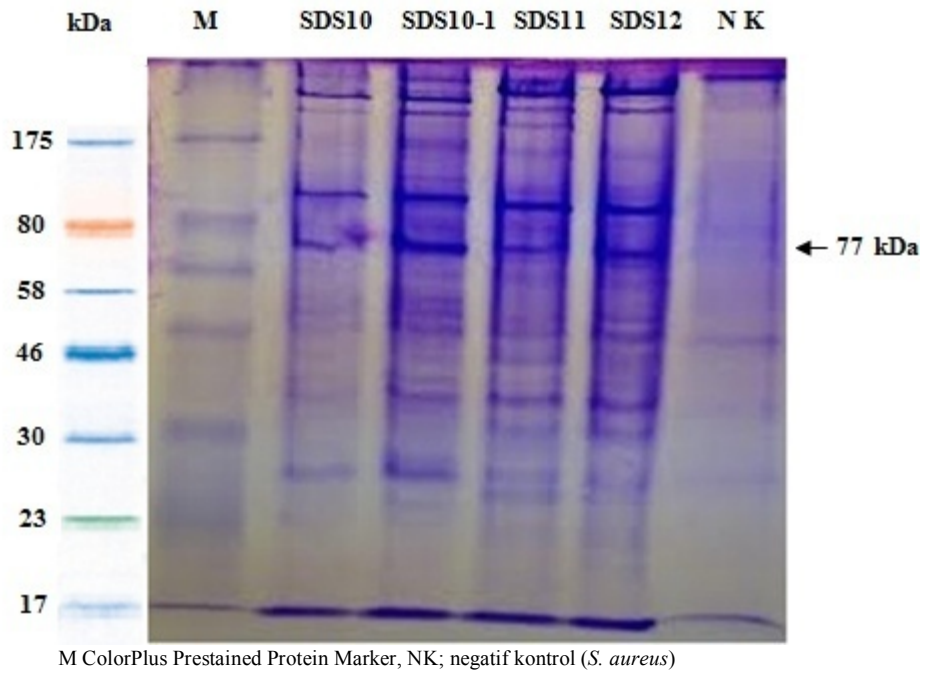


Şekil 3.33. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında *P. baetica* SDS12 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

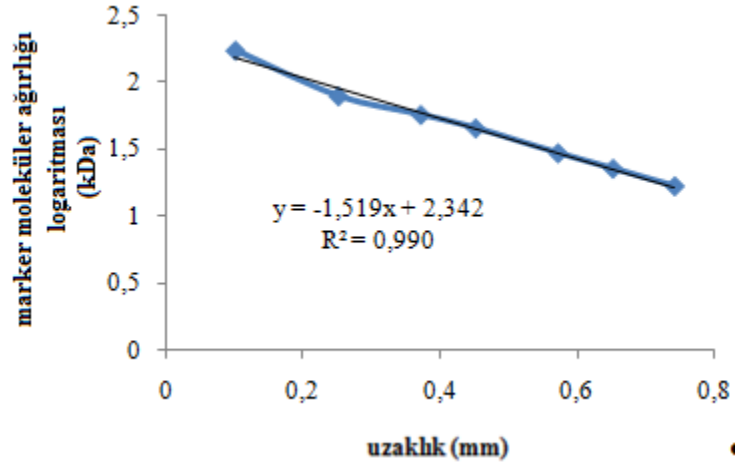
3.9. SDS Degrade Eden Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri

3.9.1. Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin İncelenmesi

P. migulae SDS10, *P. koreensis* SDS10-1, *P. kilonensis* SDS11 ve *P. baetica* SDS12 suşlarının SDS içeren ortamda alkil sülfataz enzimi protein profilleri incelenmiştir (Şekil 3.34). 77 kDa ağırlığında olan alkil sülfataz proteininin lokasyonunu belirlemek için jelin protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.35).



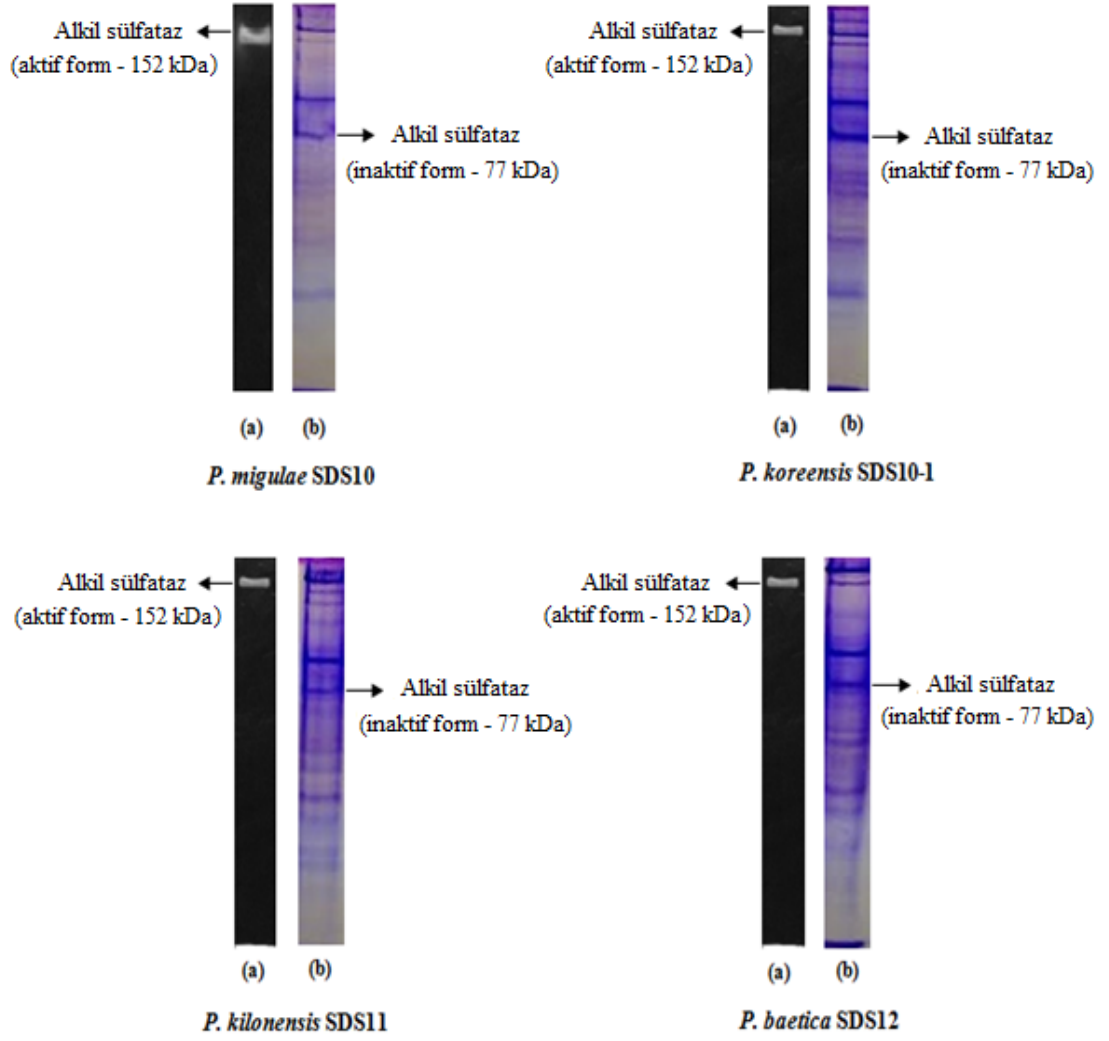
Şekil 3.34. SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz enzimi protein lokasyonunun belirlenmesi



Şekil 3.35. Alkil sülfataz proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografi Analizlerinin Yapılması

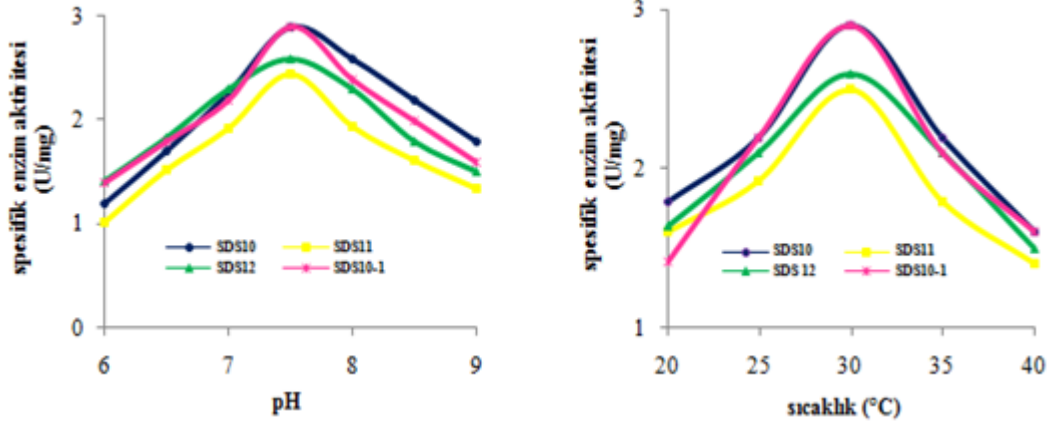
SDS degrade eden suşların, molekül ağırlığı bilinmeyen zimografik protein bantlarının, molekül ağırlıkları alkil sülfataz enzimi protein profilinde çizilen standart eğri ile belirlenmiş 152 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Bu durum 152 kDa ağırlığındaki protein bantlarının aktif formda, 77 kDa 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 suşların alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ilk olarak farklı pH ve sıcaklık aralıklarına ve alkil sülfataz spesifik enzim aktivitelere (U/mg) bakılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda suşların optimum pH 7.5 ve optimum 30°C sıcaklığında ve spesifik enzim aktivitelere ise *P. migulae* SDS10 2.9 (U/mg), *P. koreensis* SDS10-1 2.9 (U/mg), *P. kilonensis* SDS11 2.5 (U/mg), *P. baetica* SDS12 2.6 (U/mg) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.37).



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

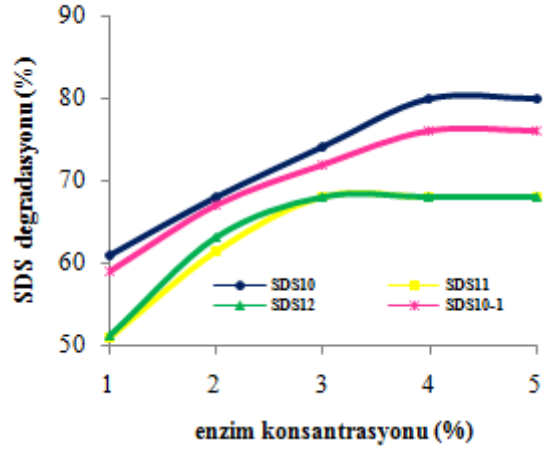
Alkil sülfataz enzim aktivitesi için belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşullarında, ekstrakt haldeki alkil sülfataz enziminin % SDS degradasyon oranı belirlenmiştir. Buna göre % 1, 2, 3, 4 ve 5 enzim konsantrasyonlarında sırasıyla 0.72, 1.44, 2.16, 2.88 ve 3.6 mg/mL enzim kullanılmıştır (Şekil 3.38).

P. migulae SDS10 kodlu suşun 2 88 mg/mL (% 4) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 3.93 mg/mL'ye düşürerek % 80 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

P. koreensis SDS10-1 kodlu suşun 2 88 mg/mL (% 4) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 4.83 mg/mL'ye düşürerek % 76 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

P. kilonensis SDS11 kodlu suşun 2.16 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 6.4 mg/mL'ye düşürerek % 68 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

P. baetica SDS12 kodlu suşun 2.16 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'ı 6.5 mg/mL'ye düşürerek % 68 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

105

Suş kodu	İzole edilen bölge koordinatı	16S rDNA sekansı (% Homoloji)	EMBL Giriş Numarası	Maksimum SDS tolerasyonu (g/L)	SDS Degradasyonu			sdsA geni PZR analizi	Alkil sülfataz Native-PAGE analizi	Alkil sülfataz enzim aktivitesi (U/mg)
					Saf kültür ortamında (% / saat)	Deterjan sanayi atık suyundaki				
						Steril olmayan (% / saat)	Steril olan (% / saat)			
SDS10	39°48'38.97''N, 33°29'14.57''E, 684 m	<i>Pseudomonas migulae</i> (% 96)	KJ937673	65	94 / 36	87 / 72	81 / 96	+	+	2.9
SDS10-1	39°48'38.97''N, 33°29'14.57''E, 684 m	<i>Pseudomonas koreensis</i> (% 94)	KJ937674	20	88 / 30	89 / 54	83 / 78	+	+	2.9
SDS11	39°50'28.41''N, 33°28'02.13''E, 686 m	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (% 99)	KJ937677	15	78 / 24	85 / 60	77 / 84	+	+	2.5
SDS12	39°57'22.98''K, 33°25'04,35''D, 679 m	<i>Pseudomonas baetica</i> (% 99)	KJ937678	55	78 / 24	76 / 60	71 / 72	+	+	2.6

EMBL, European Molecular Biology Laboratory; +, var; -, yok

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye ve dünyadaki araştırmalar, akarsu ve durgun sulardaki deterjan kirliliğinin önemli değerlere ulaştığını göstermektedir. Su kirliliğinin kontrolü ve önlenmesi konusunun önem kazanması nedeniyle ev ve endüstri kaynaklı deterjanların mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmesi ve biyoremediasyon çalışmaları tüm dünyanın üzerinde önemle durduğu bir konudur. Bu nedenle bu tez çalışması ile yüzey sularında bulunan deterjanların biyolojik parçalanabilirliğinde etkili olabilecek lokal suşların kolayca belirlenmesi ve tanımlanması, deterjan uzaklaştırma çalışmalarında kullanılabilirlikleri gibi konularda önemli kazanımlar elde edileceği düşünülmektedir. Bu açıdan da benzer konulardaki çalışmalara ve literatüre özgün katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Deterjanlar konusunda Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerdiği limitlere göre içme suyunda bulunabilecek anyonik deterjanlar 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 edilmiştir. 4 Eylül 1988 tarih ve 19919 sayılı Resmî Gazetede belirtilen yüzeysel sulardaki anyonik yüzey aktif madde konsantrasyonlarına göre 1.sınıf (yüksek kalite) 0.5 mg/L, 2.sınıf (az kirletilmiş) 1 mg/L, 3.sınıf (kirletilmiş) 1.5 mg/L ve 4.sınıf (çok kirletilmiş) > 1.5 mg/L olduğu belirlenmiştir [94].

Kırıkkale-Kızılırmak'tan 2014 yılında alınan su örneklerinin deterjan analizleri, ortalama pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Deterjan analiz sonuçlarına göre deterjan konsantrasyonunun tüm istasyonlar için 1.5 mg/L'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre nehrin çok kirletilmiş yüzey suları kategorisinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre deterjan kirliliğine Kızılırmak nehri etrafındaki sanayi kuruluşlarının ve şehrin yerel atıklarının neden olduğu düşünülmektedir.

Minareci ve arkadaşları [39] yaptıkları çalışmada Gediz Nehir sisteminde anyonik yüzey aktif madde kirliliğinin incelendiği bir araştırmada, deterjan konsantrasyonlarının bazı istasyonlarda su kalite kriterlerinin üstünde (0.023-4.48 mg/L) 4. sınıf yani çok kirlenmiş su sınıfında olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyonların su bitkileri ve balıklar için toksik etki sınırlarına ulaştığı belirtilmiştir. Yuvarlak Çay'da [95] deterjan konsantrasyonu 0.12 mg/L, Küçük Menderes Nehri'nde 0-0.93 mg/L [96], Bakırçay'da 0.01-0.29 mg/L olarak belirlenmiştir [97]. İzmir Körfezi ve yöredeki yüzeysel sularda yapılan bir çalışmada, özellikle Melez Çayı ve Arap Deresinde deterjan miktarının 1.5 mg/L'yi aştığını, yani 4.sınıf çok kirletilmiş su olduğu belirtilmiştir. Yüzeysel suları deterjan yönünden en çok etkileyen kaynakların ise evsel ve endüstriyel atık sular olduğunu ortaya koymuştur [98]. Minareci ve arkadaşları [99] yaptıkları çalışmada Büyükçekmece Gölü'nden alınan su örneklerinde analiz sonuçlarına göre, anyonik deterjan konsantrasyonları 0.054-0.134 mg/L arasında değişen değerlerde bulunmuştur. Elde edilen ortalama değerler, "Çevre Mevzuatı, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Kıta İçi Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleriyle karşılaştırılmıştır. Büyükçekmece Gölü'nün anyonik deterjan yönünden 1. sınıf (yüksek kaliteli su) olduğu belirlenmiştir.

Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii, Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii, Irmak Mevkii-Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı bölgelerinden SDS degrade edebilen 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlar sırasıyla SDS10, SDS10-1, SDS11 ve SDS12 olarak kodlanmıştır.

Yapılan 16S rDNA sekans analizleri sonucu SDS10 kodlu suş % 96 homoloji ile *Pseudomonas migulae*, SDS10-1 kodlu suş % 94 homoloji ile *Pseudomonas koreensis*, SDS11 kodlu suş % 99 homoloji ile *Pseudomonas kilonensis*, SDS12 kodlu suş % 99 homoloji ile *Pseudomonas baetica* olarak tanımlanmıştır.

SDS'i karbon kaynağı olarak kullanıp degrade eden *Pseudomonas* türü, *Acinetobacter* türü, *Pantoea* türü, *Citrobacter* türü ve *Bacillus* türü gibi birçok bakteri 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır [100]. SDS degradasyonu yapan *Bacillus cereus* [101], *Acinetobacter calcoaceticus* [102], *Pseudomonas beteli*, *Acinetobacter johnsoni*, [103], *Klebsiella oxytoca* [104], *P. alcaligenes*, *P.*

mendocina [53], *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. putida*, *P. otitidis* [105], *P. aeruginosa* MTCC 10311 [106] gibi bakteriler 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır.

Moleküler yöntemlerle tanımlanan bu suşların laboratuvar besi ortamında ve deterjan sanayi atık suyunda SDS degradasyon oranları belirlenmiştir. Buna göre *P. migulae* SDS10 % 81 - 94, *P. koreensis* SDS10-1 % 83 - 89, *P. kilonensis* SDS11 % 77 - 85 ve *P. baetica* SDS12 % 71 - 77 oranında SDS degradasyonu yaptığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalar göz önüne alındığında izole edilen suşların laboratuvar besi ortamında ve deterjan sanayi atığında gösterdikleri SDS degradasyon oranları ile doğal koşullarda SDS ve diğer deterjanları içeren atık suların remediasyonunda etkin oldukları belirlenmiştir.

SDS degradasyonu ile yapılan çalışmalara bakıldığında Payne ve Faysal [104] SDS'in *Pseudomonas* türü ile biyodegradasyonu üzerine ilk detaylı çalışmayı yapmışlardır. Hosseini ve arkadaşları [103] aktif çamurdan iki bakteri izole edip, SDS'i karbon kaynağı olarak kullanabildiklerini belirlemişlerdir. Biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi sonucu *Acinetobacter johnsoni* ve *Pseudomonas beteli* olarak tanımlanan bu suşların on günlük süre sonunda sırasıyla % 96.4 ve % 97.2 oranında SDS'i degrade edebildikleri tespit edilmiştir. SDS'in moleküler yapısı, bir hidrokarbon zinciri (C11-C14), bu zincire bağlı bir benzen halkası ve bir sülfat grubundan oluşmaktadır [100]. Singh ve arkadaşları [101] gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus cereus* tarafından SDS'in karbon kaynağı olarak kullanıldığını ve diğer deterjanların da degradasyonunda bu bakterinin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Pantoea agglomerans*'ın da SDS'i degrade edebildikleri bildirilmiştir. Chaturvedi ve Kumar [105] Hindistan'ın Veranasi şehrinde bulunan deterjan ile kontamine olmuş göletlerden SDS degrade eden *P. aeruginosa* SDS1 ve SDS3, *P. stutzeri* K2, *P. alcaligenes* JN2 ve *P. putida* SP3 suşlarını izole etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak sadece SDS içeren minimal ortamda zenginleştirme tekniği kullanarak seçilen bu izolatlardan sadece *P. alcaligenes* ve *P. mendocina* izolatlarının SDS'i verimli olarak degrade edebildikleri saptanmıştır. *Pseudomonas* türü ATCC19151 suşunun, tek karbon

kaynağı olarak SDS'i kullanarak büyüme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. SDS'in biyodegradasyonu üzerine moleküler çalışmalar ilk kez Davison ve arkadaşları [90] tarafından yapılmıştır.

Orhan ve Büyükgüngör [106] yaptıkları bir çalışmada, dodesil benzen sülfonat ve lineer alkil benzen sülfonat gibi kullanımı yaygın yüzey aktif maddelerin *P. putida* DSM 50026 tarafından biyolojik parçalanmasını 30 gün süreyle 26°C'de çalkalamalı ortamda incelemiş ve DBS ile LAS parçalanma oranlarını sırasıyla % 70 ve % 80 olarak bildirmişlerdir. Çakır ve Kıvanç [31] yaptıkları bir çalışmada, SLES (Sodyum Lauril Eter Sülfat) ve NI (Non İyonik: Dehydol LS 7) yüzey aktif maddelerinin *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. Shukor ve arkadaşları [104]. Malezya'da SDS ile kontamine olmuş su örneklerinden *Klebsiella oxytoca* suşunu izole etmişlerdir. Bu izolatın 4 günlük inkübasyonundan sonra 2.0 g/L SDS'i yaklaşık olarak % 80 oranında, 10 günlük inkübasyonda ise % 100 oranında degrade edebildiği belirlenmiştir. Abboud ve arkadaşları [102] atık sulardan fakültatif anaerob olan *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Pantoea agglomerans* suşlarını izole etmişler ve bu izolatların bir arada 120 saatlik inkübasyonları sonunda 4000 ppm SDS'i degrade edebildiklerini tespit etmişlerdir.

SDS biyodegradasyonundan sorumlu olan alkil sülfataz enzimini kodlayan *sdsA* genidir. Chaturvedi ve Kumar [86], Shahbazi ve arkadaşlarının [83] yapmış oldukları çalışmada belirlenen primerler kullanılmıştır. SDS degrade eden *P. aeruginosa* türü için kullanılan bu primerler, Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen suşların *sdsA* geni analizi için denenmiş herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Chaturvedi ve Kumar [86], Shahbazi ve arkadaşlarının [83] kullandıkları primerlerin sadece *P. aeruginosa* türüne yönelik olduğu için başarılı sonuç alınmadığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda belirlenen altı alkil sülfataz dizisinin ortak bölgeleri dikkate alınarak Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) programı ile *sdsA* genine yönelik primer tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan primer 284 bp uzunluğunda olup SDS degrade eden suşlar için *sdsA* gen bölgesi çoğaltılmıştır. Yapılan çalışmalar

sonucunda tasarlanan primerin suşlar için *sdsA* geni belirlemede etkin olduğu fakat yüksek oranda özgün olmayan bağlanmalar oluştuğu tespit edilmiştir.

SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzim 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 formununun 152 kDa, inaktif formununun ise 77 kDa ağırlığında protein bantları oluşturduğu tespit edilmiştir.

Suşlara SDS'i degrade edebilme yeteneği veren alkil sülfataz enzim proteininin aktivitesi incelenmiştir. Buna göre suşların optimum pH ve sıcaklıkta spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir. *P. migulae* SDS10, *P. koreensis* SDS10-1, *P. kilonensis* SDS11, *P. baetica* SDS12 suşlarının optimum pH koşulları 7.5 ve optimum sıcaklık durumları 30°C olarak belirlenmiştir. Yapılan enzim aktivitesi çalışmaları sonucu alkil sülfataz enzim aktivitesi *P. migulae* SDS10 ve *P. koreensis* SDS10-1 için 2.9, *P. kilonensis* SDS11 için 2.5 ve *P. baetica* SDS12 için 2.6 U/mg olduğu belirlenmiştir.

Alkil sülfataz enzim ekstraktının optimum pH ve sıcaklık değerlerindeki aktivitesi incelenmiştir. Buna göre *P. migulae* SDS10 ve *P. koreensis* SDS10-1 suşlarından elde edilen % 4 enzim konsantrasyonundaki ekstraktının % 80 ile 76 oranında aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu bakterilerin laboratuvar besi ortamındaki SDS degradasyon oranları ise % 93.95 ile 87.8 olarak belirlenmiştir.

Ambily ve arkadaşları [107] alkil sülfataz enzim aktivitesini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada izole ettikleri SDS degrade eden *P. aeruginosa* MTCC 10311 suşunun optimum pH, sıcaklık aralığını belirleyerek bu koşullarda ekstrakt haldeki spesifik enzim konsantrasyonunu ve SDS degradasyonunu belirtmişlerdir. Belirlenen optimum pH 7.5 ve sıcaklık 30°C'de % 4 enzim konsantrasyonunda durağan faza geçmiştir ve spesifik enzim aktivitesi ise 3.04 U/mg olduğu tespit edilmiş olup, ekstrakt haldeki enzimin SDS degradasyonu % 75 olduğu belirlenmiştir. Besi ortamında SDS degradasyon oranının % 96 olduğu görülmüştür.

Shahbazi ve arkadaşlarının [83] araba yıkama atık suyundan izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* suşunun spesifik enzim aktivitesinin 24.3 U/mg olduğu belirlenmiş olup SDS degradasyonu için uygun bir izolat olduğu görüşüne varmışlardır.

Yapılan çalışmalar sonucunda *P. koreensis* SDS10-1 olarak tanımlanan suşun saf kültür ve deterjan sanayi atık sularında % 83 ile 89 oranlarında SDS degradasyonu yaptığı, bu bakterinin taşıdığı *sdsA* geni tarafından kodlanan alkil sülfataz enzim aktivitesinin ise 2.9 U/mg olduğu belirlenerek, bu suşun SDS uzaklaştırma çalışmaları için potansiyel oluşturduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Anonim, Çevre Yönetimi, Su Kirliliği, Manisa İl Çevre ve Orman Müdürlüğü, Manisa, 2007.
- [2] Egemen, Ö., Çevre ve Su Kirliliği. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi. 42 (3): 106 - 116, 2000.
- [3] Minareci, O., Öztürk, M., Egemen, Ö., Minareci, E., Manisa Organize Sanayi Arıtım Tesisinin, Gediz Nehrinde Deterjan Kirliliğine Olan Etkilerinin Belirlenmesi. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 4 (1): 65 - 72, 2008
- [4] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır, A.Ş., Kırındı, T., *Mytilus* sp. (midye), *Gammarus* sp. (nehir tırnağı) ve *Cladophora* sp. (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak Nehri'ndeki ağır metal kirliliğinin araştırılması. BAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi, 9: 52 - 60, 2007.
- [5] Kayar, N.V., Çelik, A., Gediz Nehri Kimi Kirlilik Parametrelerinin Tayini ve Su Kalitesinin Belirlenmesi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Manisa, 2003.
- [6] Anonim, Çevre Kirliliği.
<http://www.efendizade.com/cevrekirliligi.html> (Erişim tarihi: 06.02.2015)
- [7] Deterjanlar. <http://www.cevremuhendisleri.net/> (Erişim tarihi: 03.01.2015)
- [8] Tan, A., Atık Sularda Bazı Kirlilik Parametrelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Edirne, 2006.
- [9] Halkman, A.K., Tarım Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1214.A.Ü.Ziraat Fakültesi Baskı Ofset Ünitesi, Ankara, 82s, 1991.

- [10] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Kimya Teknolojisi Deterjan Analizleri. Ankara, 2012.
- [11] Salar, A., Kızmaz, A., Arda, A., Deterjanlar, Deterjan Analizleri, Deterjanların Çevreye ve İnsan Sağlığına Etkileri. Bitirme Tezi. Celal Bayar Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Muradiye - Manisa, 2004.
- [12] A., Mustafa., Hayatımızdaki kimyasallar.
<https://mustafaatalay.files.wordpress.com/2012/02/temizlikmaddeleri.pdf>
(Erişim tarihi: 12.02.2015)
- [13] Gökalp, A., Tanrıkulu, E., Deterjanlar. Bitirme Tezi. Celal Bayar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Muradiye - Manisa, 2003.
- [14] Hamme, J.D.V., Singh, A. and Ward, O.P., Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24: 604 - 620, 2006.
- [15] Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. and Lindman, B., Surfactants and polymers in aqueous solution, 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, 259, İngiltere, 2003.
- [16] Yüzey Aktif Maddeler.
http://chemwiki.ucdavis.edu/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Lower's_Chem1/07%3A_Solids_and_Liquids/7.11%3A_Colloids_and_their_Uses (Erişim tarihi: 13.03.2015)
- [17] Sürfektanlar.
<http://blog.sorbetcosmetics.com/2014/11/14/your-questions-what-causes-lather-and-is-it-necessary/> (Erişim tarihi: 15.03.2015)

- [18] Sürfektan Davranışı. <https://universe-review.ca/F12-molecule13.htm> (Erişim tarihi: 18.03.2015)
- [19] Çeltikli, D.O., Anyonik ve Katyonik Yüzey Aktif Maddelerin Toprak Ortamında Parçalanabilirliklerinin Tarla Koşullarında Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 2013.
- [20] Brady, James E., Russell, Joel, W. and Holum, John, R., Chemistry: Matter and Its Changes, 3rd edition. New York: Wiley, 2000.
- [21] Ece, M., Yüzey Aktif Maddelerin Kimyasal Oksidasyon Sürecinde Giderimi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Çevre Mühendisliği, Ana Bilim Dalı, Isparta, 2005.
- [22] Batıgöç, Ç., Yüzey Aktif Maddelerin Etkileşimlerinin ve Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2010.
- [23] Misel. <http://ajprenal.physiology.org/content/295/6/F1601> (Erişim tarihi: 20.02.2015)
- [24] Özüyamanbas, A., Yüzey Aktif Maddeler ve Saç Preparatlarında Kullanımı. Bitirme Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir, 1994.
- [25] Sürfektan yapısı. <http://www.ukessays.com/essays/biology/examining-the-structure-and-properties-of-surfactants-biology-essay.php> (Erişim tarihi: 28.02.2015)
- [26] Minareci, O., Gediz Nehrinin Deterjan Kirliliğinin Araştırılması. Doktora Tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 2007.

- [27] Falbe, J., Surfactants in consumer products. Theory, Technology and Application, Springer, 1987.
- [28] De Henau, H., Hopping, W.D., Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in sewage sludges, soils and sediments: analytical determination and environmental safety considerations. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 26: 279 - 293, 1986.
- [29] Vural, N., Duydu, Y., Ankara Çayının anyonik ve noniyonik yüzey aktif madde kirliliğinin araştırılması. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 21: 1 - 2, 1992.
- [30] Barnes. G.T. Gentle I.R., Interfacial Science. Oxford University Press, Oxford, 2005.
- [31] 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.
- [32] P.K., Modern Technology of Soaps, Detergents and Toiletries: With Formulas and Project Profiles, National Institute of Industrial Research 201, 2012. Öz,H.<http://www.aktuelkimya.com/2012/07/deterjankimyas.html>, Chattopadhyay, (Erişim tarihi: 12.05.2015)
- [33] Okpokwasili, G.C., Olisa, A.O., River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. Water Research, 25: 1425 - 1429, 1991.
- [34] Deterjan Kirliliği.
<http://www.scienceinthebox.com/environmental-fate-biodegradation> (Erişim tarihi: 14.03.2015)

- [35] Ceylan, H., Tezcan, M., Çıvrıllı, P., Korkut, A.M., Kimyasal Maddeler (Deterjanlar , İlaçlar, Boyalar). Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği, (Erişim Tarihi: 29.03.2015)
- [36] Egemen, Ö., Su Kalitesi. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi. 14 (5): 150, 2005.
- [37] Ötrofikasyon.
http://www2.dmu.dk/1_viden/2_miljoen/tilstand/3_vand/4_eutrophication/causes.asp (Erişim tarihi: 13.04.2015)
- [38] Lijmbach, D., Thornton, C., The first recyclable detergent component:phosphates. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2 (9): 54 - 57, 2003.
- [39] Minareci, O., Minareci, E., Öztürk, M., Karaçay'da (Manisa) Deterjan, Fosfat ve Bor Kirliliğinin Araştırılması. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 26 (3): 171 - 177, 2009.
- [40] Halistürk, İ., Topcu, B., Yoldaş, S., Atıkların Arıtılmasında Mikroorganizmaların Kullanılması Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği (Erişim tarihi: 24.03.2015)
- [41] Arıtım. <http://www.komline.com/images/DAFcoverm.jpg> (Erişim tarihi: 25.03.2015)
- [42] Atık su arıtım.
<http://www.i-chemsolution.com/images/waste-water-4.jpg> (Erişim tarihi: 26.03.2015)
- [43] Milli Eğitim Bakanlığı Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Kimya Teknolojisi, Su Arıtma, Ankara, 2008.

- [44] Erenler, E., Göl ve Deniz Sularının Fosfor Eliminasyonu ile Korunması. Uluslararası Çevre Sorunları Sempozyumu Tebliğleri, İstanbul, 115 - 125, 1991.
- [45] Hao, O.J., Member, ASCE and Chang, C.H., Metal toxicity on phosphate removal in pure culture and in activated sludge systems. *Journal of Environmental Engineering*, 114 (1): 38 - 53, 1988.
- [46] Henze, M, Harremoes, P., Jansen, J.C., Arvin, E., Wastewater treatment biological and chemical processes. Chapter 8-10, Springer, 1996.
- [47] Cleveland Biotech S-Series. Retrieved from:
<http://www.clevebio.com/sseries.asp> (Erişim tarihi:16.04.2015)
- [48] Jovicic, 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.
- [49] Hagelueken, G., Thorsten, M.A., Lutz, W., Ute, W. Harald, K., Burkhard, T., Dirk, W.H. and Wolf-Dieter, S., The crystal structure of *sds A1*, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. Harvard University, Cambridge, 2006.
- [50] Dodgson, K.S., White, G.F., Fitzgerald, J.W., Sulfatases of Microbial Origin. CRC Press, Boca Raton, 1982.
- [51] Lillis, V., Dodgson, K.S., White, G.F., Initiation of activation of a pre-mergent herbicide by a novel alkyl sulfatase of *Pseudomonas putida* FLA. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 988 - 994, 1983.
- [52] Hales, SG., Microbial degradation of linear ethoxylate sulfates. Ph.D. Thesis, University of Wales, 1981.

- [53] Chaturvedi, V., Kumar, A., Bacterial Utilization of Sodium Dodecyl Sulfate. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 1 (3): 976-4550, 2010.
- [54] Thomas, O.R.T., White, G.F., Metabolic pathway for the biodegradation of sodium dodecyl-sulfate by *Pseudomonas* SP-C12B. Biotechnology and Applied Biochemistry, 11: 318 - 327, 1989.
- [55] Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, P., Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. Gene, 114: 19 - 24, 1992.
- [56] Scott, M.J., Jones, M.N., The biodegradation of surfactants in the environment. Biochimica et Biophysica Acta, 1508: 235 - 251, 2000.
- [57] 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.
- [58] Rebello, S., Asok, K.A., Mundayoor, S. and Jisha M.S., Chemistry, Toxicity and Remediation. School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala 685 560, India, (Erişim Tarihi: 28.03.2015)
- [59] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M. and Sohrab, A.D., Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. Biotech, 9: 1 - 8, 2010.
- [60] Elsayed, E.H., and Elbestawy, E., Molecular characterization of soil microorganisms: Effect of industrial pollution on distribution and biodiversity. World Journalist Microbiology Biotechnology, 2: 215 - 224, 2008.

- [61] Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. and Naidu, R., The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environmental. International*, 34: 265 - 276, 2008.
- [62] Watson, J.D., Gilman, M., Witkovski, J., Zoller, M., *Recombinant DNA*. Scientific American Books, USA, 1992.
- [63] Polimerize Zincir Reaksiyonu.
http://www.nature.com/jid/journal/v133/n3/fig_tab/jid20131f1.html (Erişim tarihi: 28.04.2015)
- [64] 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)
- [65] Primer tasarımı.
http://www.scientistsolutions.com/t24468qpcr+primer+design+_+rna+template.html (Erişim tarihi:11.03.2015)
- [66] Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.C. and Liu, H.W., PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4502 - 4510, 2003.
- [67] Öztürk, F., Ankara'daki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara, 2007.
- [68] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane D.J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 91: 697 - 703, 1991.
- [69] Çetinkaya, E., Ayhan, K., Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2 (1): 53 - 62, 2012.

- [70] Cole, J.R., Chai, B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31: 442 - 443, 2003.
- [71] Saitou, N. and İmanishi, T., Relative efficiens of the fitch-margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution*, 6 (5): 514, 1989.
- [72] Freeman, S. and Herron, J.C., Çıplak, B., Basıbüyük. H.H., Karaytuğ, S. and Gündüz İ., *Evrimsel Analiz*. Palme Yayıncılık, 28-29, 438 - 449, 1999.
- [73] Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D.L.J., *Phylogenetic Systematics*. Önder Matbaa, Sivas, 2000.
- [74] Mount, D., *Bioinformatics*, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, *Phylogenetic prediction*, 7: 281, 2001.
- [75] Soyağacı.
<http://cemet-english.weebly.com/16s-rrna-gene-analysis.html> (Erişim tarihi: 11.03.2015)
- [76] Felsenstein, J., Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Journal of Molecular Evolution*, 26 (1-2): 123 - 131, 1987.
- [77] 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.

- [78] 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.
- [79] Koçak, R., Alüminyum, Baryum ve Kurşun Tolere Eden Yüzey Suyu İzolatlarının Biyosorpsiyon Yetenekleri. Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2014.
- [80] 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.
- [81] Yılmaz, F., 16S rRNA Probları Kullanılarak Etkin Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Nehir İzolatlarının Takip Edilmesi. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2013.
- [82] Ojo, O.A., Oso, B.A., Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1090 - 1109, 2009.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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 of Evolution*, 28: 2731 - 2739, 2011.

- [86] 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.
- [87] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates. *Microbiology*, 86: 143 - 156, 1996.
- [88] 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.
- [89] 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
- [90] Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, P., Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene*, 114: 19 - 24, 2002.
- [91] Gomez V., Laura to the Insd. Institut Pasteur, *Biology of Intracellular Bacteria*, 28, Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, 2014.
- [92] 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.

- [93] 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.
- [94] Resmi Gazete, 2004. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği. Tarih 31.12.2004. Sayı: 25687.
- [95] Balık S., M.R., Ustaoglu, Ö. Egemen, S. Cirik, R. Eltem, H.M. Sarı, A.G. Elbek, Y. Güner, G. Özdemir, D. Özdemir Mis, Y. Köksal, M. Özbek, C. Aygen, A. Taşdemir, S. Yıldız, A. İlhan, E.T. Topkara, H. Sömek, A. Kaymakçı, The formulation of a action plan sustainable usage for Yuvarlak Stream. T.C. Çevre Bakanlığı, Özel Çevre Koruma Kurumu Başkanlığı, Ankara. 182s, 2002.
- [96] Balık, S., M.R., Ustaoglu, Ö., Egemen, M., Önen, H., Hakarerler, H.M., Sarı, T., Tanrikul, M., Özbek, A., İlhan, A.K., Basaran, Water quality of Küçük Menderes River and investigation of interaction with ecosystem. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. No: 2003/BİL/010, 65 s, 2005.
- [97] Başaran, A.K., Pollution Parameters in Bakırçay Delta and Relation Çandarlı Bay. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2004.
- [98] İzgoren S.F., Detergent Pollution in Melez Stream and Corelation with Nutrients. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1992.
- [99] 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.

- [100] Schleheck, D., Lechner, M., Schonenberger, R., Desulfonation of the disulfodiphenylethercarboxylates from alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants, *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 938 - 944, 2003.
- [101] Singh, K.L., Kumar, A., Kumar, A., *Bacillus cereus* capable of degrading SDS shows growth with a variety of detergents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 777 - 779, 1998.
- [102] Abboud, M.M., Mufeed, K.K., Khaled, B., Tarawneh, A., Al-Mustafa, A., Al-Madadhah, M., Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 432 - 439, 2007.
- [103] 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.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] Orhan, Y., Büyükgüngör. H., Yüzey aktif maddelerin *Pseudomonas putida* kullanılarak biyodegradasyonunun incelenmesi. II. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu Bildiri ve Poster Özetleri Kitabı, 1994.

- [107] 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.