

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜT FABRİKASI ATIKSULARINDAN MİKROORGANİZMA İZOLASYONU

VE BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİMİ

FADİME YILMAZ

ARALIK 2008

ÖZET

SÜT FABRİKASI ATIKSULARINDAN MİKROORGANİZMA İZOLASYONU VE BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİMİ

YILMAZ, Fadime

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Aysun Ergene

Aralık 2008, 120 sayfa

Bu tez çalışmasında süt endüstrisi atık sularından izole edilen farklı mikroorganizmalar ile biyosüर्फektan eldesi ve peyniraltı sularının biyolojik kullanılabilirliği çalışılmıştır. Bu amaçla Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikasından alınan atık su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. İzolatların biyosüर्फektan üretme yeteneklerini belirlemek için drop-collapse” yöntemi uygulanmıştır ve üç izolatın, *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia*’nın biyosüर्फektan üretebildikleri tespit edilmiştir. *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* tarafından sentezlenen biyosüर्फektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır. İzolatların MSM kültür ortamında ürettikleri biyosüर्फektan miktarlarını belirlemek için fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır ve BS-I, BS-II ve BS-III için bulunan değerler sırasıyla 728, 827 ve 656 mg/L olarak bulunmuştur. Biyosüर्फektan

madde üretimi üzerine optimum koşulları belirlemek için pH etkisi, azot kaynağı, karbon kaynağı, EDTA konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Belirlenen optimum koşullar ile modifiye edilen peyniraltı suyu, biyosüpfektan madde üretiminde temel besiyeri olarak kullanılmıştır. BS-I, BS-II ve BS-III'ün yapıları FTIR analiziyle ve özellikleri yüzey gerilimi, emülsiyon testi, antimikrobiyal etki, hemoliz aktivitesi ve ağır metal giderme testleri ile belirlenmiştir. Biyosüpfektan eldesi ve karakterizasyon çalışmaları bittikten sonra izolatlar, biyosüpfektan üretimi için peyniraltı suyu ile 10 gün 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında BS-I, BS-II ve BS-III miktarları sırasıyla 946 mg/L, 992 mg/L ve 1115 mg/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada peyniraltı atık sularının biyodegradasyonu (laktoz, protein ve yağ biyodegradasyonu) da çalışılmıştır. *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* tarafından degrade edilen protein oranları sırasıyla % 76.6, % 50 ve % 66.6 olarak bulunmuştur. Degrade edilen karbonhidrat oranları ise sırasıyla % 8.41, % 37.8 ve % 35.3 olarak saptanmıştır. Son olarak degrade edilen yağ oranları sırasıyla % 22.9, % 51.7 ve % 31.3 bulunmuştur.

Bu çalışma, süt endüstrisi atıklarından biri olan peyniraltı sularının, biyosüpfektan üretimi için ucuz ve uygun mikrobiyal büyüme sağladığını ve ticari ölçekte biyosüpfektan üretiminde peyniraltı sularının sentetik ortamlara göre daha iyi substratlar olduğunu göstermiştir. Böylelikle çevre için önemli bir tehdit unsuru olan peyniraltı sularının değerlendirilmesiyle hem biyosüpfektan ekonomik olarak üretilmiş hem de biyolojik olarak parçalanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosüpfektan, peyniraltı atık suyu, biyodegradasyon

ABSTRACT

MICROORGANISMS ISOLATION FROM MILK FACTORY WASTEWATERS AND BIOSURFACTANT PRODUCTION

YILMAZ, Fadime

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Aysun Ergene

December 2008, 120 pages

In this study, biosurfactant production and bioavailability of whey wastewater were studied with isolated different microorganisms from Atatürk Forest Farm Milk Factory wastewaters. For this purpose, five different strains were isolated and identified. In order to determine the biosurfactant production, the “drop-collapse” method was applied and it was determined that only three strains *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* and *Burkholderia cepacia* were able to produce biosurfactant. Biosurfactants produced by *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* and *Burkholderia cepacia* were coded as BS-I, BS-II and BS-III, respectively. In MSM culture medium, amount of biosurfactants produced by isolates were measured by phenol-sulfuric acid method and production capacity of BS-I, BS-II and BS-III were determined as 728, 827 ve 656 mg/L, respectively. The effects of pH, nitrogen

source, carbon source and concentration of EDTA were studied to determine optimum conditions on biosurfactant production. For biosurfactant production, whey wastewaters were modified with determined optimum conditions and used as basal medium. Structures of biosurfactants were searched with FTIR analysis and the properties were analyzed with surface tension, emulsion, antimicrobial effects, hemolytic activity and removal of heavy metals tests. After biosurfactant production and characterization studies were completed, isolates were incubated with whey wastewaters were at 35°C for 10 days for biosurfactant production. At the end of the incubation period, amount of BS-I, BS-II and BS-III were measured as 946 mg/L, 992 mg/L and 1115 mg/L, respectively. Further in this study biodegradation of whey wastewaters (lactose, protein and lipid degradation) was studied. Rate of protein degradation by *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* and *Burkholderia cepacia* were determined as 76.6%, 50% and 66.6%, respectively. Rate of carbohydrate degradation by the isolates were determined as 8.41%, 37.8% and 35.3%, respectively. Finally rate of lipid degradation were found respectively 22.9 %, 51.7 % and 31.3 %, respectively.

This study showed that using whey wastewater is an effluent of milk factory waste became an appropriate medium for microbial growth and cheaper proses on biosurfactant production and also on commercial production of biosurfactants, whey wastewaters are the better substrates than artificial mediums. So, with using this effluent being an important threat factor for enviroment, not only biosurfactant was produced economically but also whey wastewater was degraded biologically by the isolates.

Key words: Biosurfactant, whey wastewater, biodegradation

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aysun ERGENE'ye teőekkürlerimi sunarım.

Kıymetli bilgi ve desteklerinden faydalandığım deney ve yazım aşamalarında yardım gördüğüm Dr. Emine YALÇIN'a, analitik çalışmaların gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kültigin ÇAVUŐOĞLU'na ve yine deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arő. Gör. Zeynep ELİBOL'a, Arzu KAYA'ya teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda beni destekleyen, sonsuz sevgi ve ilgisini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Kaynak özetleri.....	2
1.1.1. Endüstriyel kirlenme.....	4
1.1.2. Süt ve süt endüstrisi atıkları	5
1.1.3. Süt endüstrisi atıklarının Dünyadaki ve Türkiye’deki durumu	6
1.1.4. Peyniraltı suyu ve içeriği.....	8
1.1.5. Peyniraltı suyunun önemi.....	12
1.1.5.1. Peyniraltı suyunun değerlendirilmesi.....	13
1.1.6. Süt atıklarının yarattığı çevre kirliliği.....	14
1.1.6.1. Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ DEĞERİ).....	17
1.1.6.2. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ).....	18
1.1.7. Süt fabrikalarında atık suların arıtılması.....	19
1.1.7.1. Mekaniksel işlemler.....	19
1.1.7.2. Kimyasal işlemler.....	19

1.1.7.3. Biyolojik işlemler (Biyodegradasyon).....	20
1.1.8. Peyniraltı sularının biyodegradasyonu.....	21
1.1.9. Sürfektanlar.....	22
1.1.10. Biosürfektanlar.....	24
1.1.11. Biosürfektanların yapısı ve fonksiyonu.....	25
1.1.12. Biosürfektanların sınıflandırılması ve mikrobiyal orjinleri.....	26
1.1.12.1. Glikolipidler.....	27
1.1.12.1.1. Ramnolipidler.....	27
1.1.12.1.2. Trehalolipidler.....	28
1.1.12.1.3. Sophorolipidler.....	29
1.1.12.2. Lipopeptidler ve lipoproteinler.....	30
1.1.12.3. Yağ asitleri, fosfolipidler ve nötral lipidler.....	31
1.1.12.4. Polimerik biosürfektanlar.....	32
1.1.12.5. Partiküllü biosürfektanlar.....	32
1.1.13. Biosürfektanların kullanım alanları.....	35
1.1.14. Endüstriyel ve çevresel uygulamalar.....	38
1.1.14.1. Peyniraltı sularının biyoremediasyonu.....	37
1.1.14.2. Petrol kazanımı ve atık giderim yöntemi.....	39
1.1.14.3. Ağır metal gideriminde biosürfektanlar.....	40
1.1.14.4. Terapötik ve biyomedikal alanlarda biosürfektanlar.....	41
1.1.14.5. Gıda endüstrisinde biosürfektanlar.....	44
1.1.14.6. Kozmetik alanında biosürfektanlar.....	45
1.1.14.7. Tarım alanında biosürfektanlar.....	45
1.1.14.8. Biosürfektanların diğer kullanım alanları.....	46
1.1.15. Biosürfektanların sentetik sürfektanlara göre avantajları.....	46

1.1.16. Biosüpfektanların ticari üretimi.....	47
1.1.17. Ucuz substratlar kullanılarak biosüpfektan üretimi.....	48
1.2. Çalışmanın Amacı.....	50
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	51
2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izolasyonu.....	51
2.2. Mikroorganizmaların üretilmesi.....	51
2.3. Ekim ve kültürasyon.....	52
2.4. Kültürlerde biosüpfektan varlığının saptanması.....	53
2.5. Kültürlerde biosüpfektan miktarının ölçülmesi.....	53
2.5.1. Biosüpfektan üretimi üzerine pH etkisi.....	54
2.5.2. Biosüpfektan üretimi üzerine karbon kaynağının etkisi.....	54
2.5.3. Farklı azot kaynaklarının biosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	55
2.5.4. NaNO ₃ konsantrasyonunun biosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	55
2.5.5. EDTA ajanının biosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	55
2.6. Peyniraltı sularından biosüpfektan eldesi.....	56
2.7. Biosüpfektan karakterizasyonu.....	56
2.7.1. FTIR analizi.....	56
2.7.2. Yüzey gerilimi.....	57
2.7.3. Emülsiyon testi.....	57
2.7.4. Antimikrobiyal aktivite.....	57
2.7.5. Hemoliz aktivitesi.....	59
2.7.6. Ağır metal giderimi.....	59
2.8. Peyniraltı atık sularının biyodegradasyonu.....	60
3. BULGULAR.....	62
3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların identifikasyonu.....	62

3.1.1. <i>Burkholderia cepacia</i>	63
3.1.2. <i>Micrococcus luteus</i>	64
3.1.3. <i>Yarrowia lipolytica</i>	65
3.2. Kültürlerde biyosülfektan varlığının saptanması.....	67
3.3. Kültürlerde biyosülfektan miktarının ölçülmesi.....	69
3.4. Biyosülfektan üretimi üzerine pH etkisi.....	69
3.5. Biyosülfektan üretimi üzerine karbon kaynağının etkisi.....	70
3.6. Farklı azot kaynaklarının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi.....	71
3.7. NaNO ₃ konsantrasyonunun biyosülfektan üretimi üzerine etkisi.....	72
3.8. EDTA ajanının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi.....	73
3.9. Peyniraltı sularından biyosülfektan eldesi.....	74
3.10. Biyosülfektan karakterizasyonu	75
3.10.1. FTIR analizi	75
3.10.2. Yüzey gerilimi.....	78
3.10.3. Emülsiyon testi.....	78
3.10.4. Antimikrobiyal aktivite.....	79
3.10.5. Hemoliz aktivitesi.....	87
3.10.6. Ağır metal tutma kapasitesi.....	88
3.11. Peyniraltı atık sularının biyodegradasyonu.....	89
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	93
5. KAYNAKLAR.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

1.1. Türkiye’de yılda elde edilen süt atıklarındaki besin değeri miktarı (ton).....	7
1.2. 100 mL peyniraltı suyunun kimyasal bileşimi.....	10
1.3. Pıhtılaşma şeklinin peyniraltı suyu bileşimi üzerine etkisi.....	11
1.4- Süt ve bazı süt atıklarının biyolojik oksijen ihtiyaçları.....	18
1.5. Biosürefektanlar ve mikrobiyal tür orjinleri.....	34
2.1. MSM besiyeri içeriği (g/L).....	52
2.2. PAH ve türevlerinin analizinde kullanılan GC koşulları.....	61
3.1. İzole edilen bakteriler ve biyokimyasal özellikleri.....	62
3.2. BS-I, BS-II ve BS-III biosürefektanların yüzey gerilimleri (mN/m).....	78
3.3. BS-I, BS-II ve BS-III biosürefektanların emülsifikasyon aktivitesi (%).....	79
3.4. BS-I, BS-II ve BS-III biosürefektanların, patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm).....	81
3.5. BS-I, BS-II ve BS-III biosürefektanların, antifungal patojen <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> maya türlerine ve <i>A. flavus</i> küf türüne karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları(mm).....	82
3.6. BS-I, BS-II ve BS-III Biosürefektanların varlığında bitki patojeni fungusların misel gelişimleri (%).....	83
3.7. Biosürefektanların hemoliz aktiviteleri.....	88
3.8. Biosürefektanların ağır metal giderim oranları (%).....	88
3.9. İzolatlar tarafından degrade edilen protein, karbonhidrat ve yağ oranları (%)...	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Süt fabrikası atık suları.....	6
1.2. Peyniraltı suyu.....	9
1.3. Farklı yüzeyleri bir araya getirme özelliğindeki yüzey aktif maddeler.....	23
1.4. Mikroemülsiyonlar oluşturan sürfektanlar.....	23
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 400044 ‘ten elde edilen ramnolipitin yapısı.....	28
1.6. <i>Arthrobacter</i> sp. SI 1 tarafından üretilen trehaloz tetraester (a) ve trehaloz diester (b).....	29
1.7. <i>Torulopsis bombicola</i> tarafından üretilen sophorolipid laktonun yapısı.....	30
1.8. <i>Bacillus subtilis</i> tarafından üretilen siklik lipopeptid surfaktinin yapısı.....	31
1.9. <i>Bacillus licheniformis</i> tarafından üretilen, bir lakton bağı aracılığıyla hidrofilik peptid halkasına bağlanmış 4 farklı zincirli lipofilik yağ asidi kısmından oluşan biyosürfektanın yapısı.....	31
1.10. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ’un ürettiği polimerik biyosürfektan emülsanın kimyasal yapısı.....	32
1.11. <i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589 (<i>Candida lipolytica</i>) tarafından hegzadekanı kullanarak 48 saatlik inkübasyon sonrası ürettiği partiküllü biyosürfektanın kimyasal yapısı.....	33
1.12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2 ‘den üretilen kristal formdaki biyosürfektanın mikroskopik görüntüsü.....	39
3.1. <i>Y. lipolytica</i> , <i>M. luteus</i> ve <i>B. cepacia</i> ’nın SEM mikrografları.....	67
3.2. Kontrol sıvıları ve sürfektan içeren sıvıların microwell plate kuyucuklarında dağılımı.....	68

3.3. Biyosüpfektan üretimi üzerine pH etkisi.....	70
3.4. Farklı karbon kaynaklarının biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	71
3.5. Farklı azot kaynaklarının biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	72
3.6. Azot kaynağı olarak kullanılan NaNO ₃ konsantrasyonunun biyosüpfektan üretimi üzerine etkisi.....	73
3.7. Biyosüpfektan üretimi üzerine EDTA etkisi.....	74
3.8. Peyniraltı suyundan biyosüpfektan üretimi.....	75
3.9. <i>Y. lipolytica</i> tarafından üretilen BS-I'in FTIR spektrumu.....	76
3.10. <i>M. luteus</i> tarafından üretilen BS-II'nin FTIR spektrumu.....	77
3.11. <i>B. cepacia</i> tarafından üretilen BS-III'ün FTIR spektrumu.....	77
3.12. İzolatlara ait biyosüpfektanların patojen bakterilere karşı antibakteriyal etkileri.....	80
3.13. İzolatlara ait biyosüpfektanların patojen funguslara karşı antifungal etkileri...	82
3.14. İzolatlara ait biyosüpfektanların <i>Fusarium heterosporium</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	84
3.15. İzolatlara ait biyosüpfektanların <i>Fusarium inflexum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	85
3.16. İzolatlara ait biyosüpfektanların <i>Fusarium gramineum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	86
3.17. İzolatlara ait biyosüpfektanların <i>Fusarium avenaceum</i> 'un misel gelişimi üzerine etkileri.....	87
3.18.a. Yağ degradasyonuna ait GC kromatogramları, Degredasyon öncesi (A) ve <i>Y. lipolytica</i> ile degradasyon sonrası (B) elde edilen GC kromatogramları.....	91
Şekil 3.18 b. <i>M. luteus</i> (C) ve <i>B. cepacia</i> (D) ile degradasyon sonrası elde edilen GC kromatogramları	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A.P.I	Analitik Profil İndeks
BOİ	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
BS	Biyosürefektan
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetikasit
E ₂₄	Emülsiyon indeksi
FTIR	Fourier Transform Infrared
HSV	Herpes Simplex Virus
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
MSM	Mineral Salt Medium
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

1. GİRİŞ

Hem doğal hem de sentetik sürfektanlar uzun yıllardan beri ticari amaçla çok çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle makine sanayi ve motor yağları endüstrisinde, çevre biyoteknolojisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik sanayinde her gün artan ham madde talebini karşılamak amacıyla sürfektan elde etme proseslerini geliştirme yönündeki projeler hızlanmıştır. Ülkemizde ise üretim prosesleri yerine ham madde ithali önemli döviz kaybına yol açmaktadır. Sonuç olarak çok değişik endüstrilerde önemli bir ham madde olan biyosürfektanın, bakteriyal kaynaklardan eldesi gündeme gelmiştir⁽¹⁾. Bu çalışmada çevre kirliliği unsuru olan peyniraltı suları kullanılarak biyosürfektan eldesi amaçlanmıştır. Bu yolla hem çevre kirliliğinin etmenleri azaltılmış hem de üretimi zor ve maliyetli olan biyosürfektan madde eldesi sağlanmış olacaktır. Patel ve Desai⁽²⁾ biyosürfektan üretiminde karbon kaynağı olarak melası kullandıklarını rapor etmişlerdir. Deshpande ve Daniels⁽³⁾ ise, *C. bombicola* ile sophorolipid üretiminde hayvansal yağ kullanıldığını rapor etmişlerdir. Bu tür karbon kaynakları besleyici özelliğe sahiptir. Şeker pancarı fabrikasyonunun yan ürünü olan melas yem sanayi, alkol, maya, kimya, kozmetik, gibi birçok üretim kollunda girdi olarak kullanılmaktadır. Çevre açısından kirlilik yaratmayan melas, ayrıca toz kömüründe yapıştırıcı olarak da kullanılmaktadır. Bu tür kaynaklar yerine karbon kaynağı olarak süt endüstrisi atığı olan peyniraltı sularının kullanılması hem ekonomik açıdan hem de çevresel kirliliğin giderilmesi açısından önemli bir avantajdır. Tez kapsamında, süt endüstrisi atıkları ile kontamine olmuş kirli suların biyolojik olarak giderimi ve mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürfektanların izolasyonu

amaçlanmaktadır. Bu yolla çeşitli endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılan sürfektanların üretimi ile yurt dışına bağımlılığımız azalacak ve sonuçların ticarileştirilme potansiyeli artacaktır.

Suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin (sütteki yağ asitleri gibi) mikrobiyal biyodegradasyonu kısıtlanmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilerek ekstrasellüler olarak ortama salınan sürfektan maddeler, hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek, hidrokarbonları emülsifiye etmektedir. Ayrıca sürfektanlar tarafından suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik grupların yüzey alanının ve biyolojik uygunluklarının artırılması ile bu tür bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması kolaylaşmaktadır. Bütün bu veriler ile çalışma kapsamında, süt endüstrisi atıklarının biyolojik olarak iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikasından alınan atık su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmıştır. İzolatların identifikasyonu yapıldıktan sonra, atık su ile etkileştirilerek laktoz, protein ve yağ asiti degradasyonu araştırılmıştır.

1.1. Kaynak Özetleri

Çağdaş yaşamın bir sonucu olarak ortaya çıkan kirlilik, günümüzde üzerinde en çok durulan ancak, en az çözüm getirilebilen konulardan birisidir. Çevre kirliliği 16. Yüzyıldan sonra başlamıştır. Bu tarihe kadar tarımsal üretim potansiyelinin düşük olması, kıtlıklar ve salgınlar nedeni ile dünya nüfusunda kayda değer bir artış olmamıştır. Bu tarihten sonra tıpta, endüstride ve tarımda görülen gelişmeler doğrudan dünya nüfusunun artmasına yol açmış, artan nüfusun ve kentleşmenin gereksinmelerini karşılayabilmek için tarımda ve endüstride "daha çok üretim"

zorunluluğu ortaya çıkmış, bu kez daha çok üretim daha çok artık ve atık oluşmasına neden olmuş ve bunun sonucu olarak çevre kirlenmesi görölmeye başlamıştır. Özellikle 1970'li yıllarla başlayan dönemde teknolojiadaki gelişmelere bağlı olarak üretimde ve tüketimde görölen baş döndürücü artışlar ekolojik dengede ciddi bozulmalara yol açmıştır.

Sanayileşmenin oluşturduğu çevre sorunlarının öncelikli anlamı son zamanlarda büyük ölçüde değişmiştir. 1970'li yılların başında çevre kirlenmesi sadece hava, su ve toprağın kirlenmesi olarak tanımlanırken ve çevrenin her türlü atığı kabul eden serbest bir mal olduğu düşünölürken, bu gün bu değer yargıları tümüyle değişmiş, çevrenin de bir kaynak olduğu, zamanla kirlenerek tükenebileceği ve bu kaynağın da kullanımının bir maliyeti olduğu anlaşılmıştır.

Çevre kirliliğini oluşturan temel unsurlar evsel ve endüstriyel atıklardır. Atıkların çevre kirliliği oluşturmayacak şekilde başka yerlerde değerlendirilmesi ya da parçalanarak doğaya verilmesi ile çevre kirlenmesi en aza iner ve bu denli küçük bir kirliliği doğal süreçler zaten temizleyebilir. Ekolojik dengenin bozulmasında atıklar en önemli payı almakla beraber, aşırı ve bilinçsiz avlanma, toprağı sömürürcesine yapılan tarım da ekolojik dengeyi bozmakta, dolaylı olarak doğal temizleme süreçlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Çevre kirlenmesinin tümüyle ortadan kaldırılması bugünkü teknolojik, ekonomik olanaklar ve çevre bilinci açısından olası değildir. Tüm modern yaşamdan vazgeçilmesi halinde elde edilecek olan sadece daha çok kirlenmenin durdurulması olacak, ancak bugüne kadar olan kirliliğin birikintisi uzun yıllar devam edecektir. Bu durumda yapılması gereken şey bir yandan daha çok kirlenmenin olabildiğince önlenmesi, öte yandan mevcut kirliliğin temizlenmesidir⁽⁴⁾.

1.1.1. Endüstriyel Kirlenme

Sanayi ve ticaretin gelişmesi ucuz üretim girdilerinin sağlanmasına bağlıdır. Sanayileşmenin çevre kirliliği üzerindeki asıl olumsuzluğu doğrudan kirliliktir. Türkiye gibi sanayileşme sürecini devam ettiren ülkelerde yine ucuz üretim amacı ile ucuz yakıt kullanılmakta, üretim gereği olarak ortaya çıkan artıklar doğrudan alıcı kaynaklara verilmekte, sonuçta hava, su ve toprak kirlenmektedir⁽⁴⁾.

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de endüstriyel alandaki yatırımlar giderek artmakta; gelişen endüstriyel etkinliklere ve evlerden oluşan atıklara bağlı olarak doğanın dengesi bozulmakta ve böylece önemli çevresel sorunlar oluşarak insan yaşamını olumsuz etkilemektedir. Ekolojik dengenin bu şekilde bozulması çevre kirlenmesi olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel kirlenme, gerek karşılaşılan kirlenme sorunlarının çok ve çeşitli olması gerekse doğanın korunması ve bu amaçla alınacak önlemlerin dengesi yüzünden en karmaşık kirlenme şeklini oluşturmaktadır. Endüstriyel atık suların hiçbir işlem uygulanmadan alıcı su ortamlarına atılması bugün gelişen dünyanın en tehlikeli ve önemli sorunlarından birisidir.

Ülkemizde ise 20. yüzyılın ortalarında başlayan ve giderek hızlanan endüstrileşme sürecinde, özellikle gıda, tekstil, kimya gibi sektörler öne çıkmaktadır. Gıda sektörünün önemli bir yan kolu olan süt ve süt ürünlerinin üretimi ve işlenmesi, hem üretim kapasitesi hem de çevreye verdiği kirlilik yükü bakımından ülkemizde önemli bir yer tutmaktadır⁽⁵⁾.

1.1.2. Süt ve Süt Endüstrisi Atıkları

Yurdumuzda hayvancılığın gelişmesi, yeni ırkların ıslahı ile başlamış, iklim şartlarının yeni kültür ırklarının gelişmesine daha müsait olması sonucu, Trakya ve Ege Bölgelerinde hayvancılık daha fazla gelişmiştir. Günümüzde 1980'li yıllarla birlikte entegre süt ve süt ürünleri tesisleri artmıştır. Bu gelişime bağlı olarak süt ve süt endüstrisi de önemli aşamalar kat etmiştir. Süt, doğrudan tüketime sunulduğu gibi, kısa sürede özelliklerini yitirdiğinden dolayı çeşitli ürünlere de işlenmektedir. Bu ürünlerin yanında artıklar da elde edilmekte ve sütteki besin maddelerinin önemli bir kısmı bu atıklara geçmektedir. Son yıllarda süt ve süt ürünleri endüstrisi geliştikçe bu endüstrilerin oluşturduğu kirlilik de gittikçe artmaktadır⁽⁶⁾.

Süt ve süt ürünleri işletmelerinde oluşan atık su kaynakları; ısıtma ve soğutma sistemlerinden gelen sular, tesis ve makinelerin yıkanmasından gelen atık sular ve peyniraltı sularıdır. Atık su miktar ve özellikleri, üretim şekli ve ürün çeşidine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Peyniraltı suyu dışında oluşan atık sular, süt endüstrisinde atık su miktarının büyük, kirlilik yükü bakımından ise küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Süt endüstrisinde toplam kirlilik yükünün büyük kısmını peyniraltı suları oluşturmaktadır⁽⁵⁾. Hayvansal protein, yağ, şeker, madensel maddeler içeren bu atıklar pek çok ülke tarafından değişik şekillerde değerlendirilmektedir. Peynir ve kazein teknolojisinden arta kalan peyniraltı suyu, süt endüstrisinin en fazla ürettiği yan ürünlerindedir. Kuru maddesinin düşük oluşu, süt gibi kolayca bozulabilir oluşu ve taşınmasının ekonomik olmayışı gibi nedenlerden dolayı değerlendirilmesi en problemlidir ve ülkemizde de birkaç modern işletmede değerlendirilmektedir. Kimi zaman hayvanlara verilmekte ya da tarlalara dökülmekte, kimi zaman da kanal ve akarsulara atılmaktadır⁽⁶⁾.



Şekil 1.1. Süt fabrikası atık suları⁽⁷⁾

1.1.3. Süt Endüstrisi Atıklarının Dünyadaki ve Türkiyedeki Durumu

Dünya süt endüstrisinde en önemli süt atığı peyniraltı suyudur. Bu nedenle yapılan sayısız araştırmaların ve teknolojik çalışmaların peyniraltı suyu ile ilgili olduğu görülmektedir. Günde tonlarca peynir üreten dev tesisler için, peyniraltı suyu çok büyük bir sorun oluşturmaktadır. Dünyada 72 milyon ton peyniraltı suyu elde edildiği tahmin edilmektedir. Avrupa Ekonomik Topluluğuna üye ülkelerde toplam peyniraltı suyu miktarının ise yaklaşık 24 milyon ton olduğu araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir. Dolayısıyla yapılan her 10 araştırmadan 9'u peyniraltı suyu ile ilgili bulunmaktadır⁽⁸⁾.

Ülkemizde yıllık süt üretiminin % 4 kadarı tereyağında, % 2 kadarı da peynir üretiminde kullanılmaktadır. Ancak ülkemiz sütçülüğü hala küçük aile işletmeleri veya mandıralar görünümündedir. Türkiye'de üretilen sütün ancak % 10–15 kadarının modern teknolojinin gerektirdiği şartlarda, süt fabrikalarında işlendiği

kabul edilmektedir. Süt gibi değerli bir besin maddesinin çoğunlukla küçük kapasiteli işletmelerde ve yetersiz bilgi ile işlenmesi sonucu süt atıklarının değerlendirilmesi de güçleşmektedir. Türkiye’de toplam süt üretiminin % 60’ını bulan önemli bir kısmı tereyağı ve peynir gibi mamullere işlenmektedir. Yani toplam üretilen süt miktarı 6 milyon ton olarak alınacak olursa, Türkiye’de her yıl 3–6 milyon ton süt önemli miktarlarda süt atıkları veren süt ürünlerine işlenmektedir. Bu durumun ekonomik önemi, süt atıklarında çoğu kez değerlendirilmeden atılan ve kaybolan yağ, protein, laktoz ve mineral maddeleri miktarına bakılarak ortaya çıkar. Çizelge 1.1’de görüleceği gibi sadece yayık altı ve peyniraltı suyu gibi iki önemli süt atığından modern teknolojinin uygulanması halinde elde edilebileceği hesaplanan toplam protein miktarı 103104 ton olup Türkiye nüfusunun hayvansal protein gereksinimini belli bir süre için karşılamada yardımcı bir kaynak olabilir⁽⁸⁾.

Çizelge 1.1. Türkiye’de yılda elde edilen süt atıklarındaki besin miktarı (ton)

	Yayık altı	Peyniraltı suyu	Toplam
Yağ	13524	9942	23446
Protein	93984	9120	103104
Laktoz	109737	48245	157982
Mineral maddeler	18931	6182	15113

1.1.4. Peyniraltı Suyu ve İçeriği

Peyniraltı suyu, süt bileşenlerinden laktoalbumin ve laktoglobulin gibi serum proteinleri ile değişen düzeylerde laktoz, yağ, mineral madde, proteinler içeren ve peynir yapımı sırasında süzme sonucunda oluşan önemli bir yan üründür⁽⁹⁾. Peyniraltı suyunun bileşimi peynire işlenen sütün bileşim ve kalitesine, peynir yapım tekniğine, pıhtılaşmada kullanılan maya veya asit miktarı ile kalitesine, pıhtılaştırma süresi ve sıcaklık gibi birçok parametreye bağlıdır. Süt kuru maddesinin yaklaşık % 45–50'si peyniraltı suyuna geçer⁽¹⁰⁾. Değerlendirilemeyen peyniraltı suyu, kanalizasyonlara verilerek büyük bir çevre problemi oluşturmaktadır. Özellikle küçük ölçekli süt işleme tesislerinde peyniraltı suyunu işleyebilecek alt yapı imkanları olmadığı için bu yan ürün değerlendirilememekte ve kanalizasyonlara verildiği için çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Ülkemizde 2002 yılında istatistiklere girmiş olan süt üretim miktarı 8.408.566 tondur⁽¹¹⁾. Bunun yaklaşık % 20'sinin peynire işlendiği kabul edilirse işlenen süt miktarı yaklaşık olarak 1.681.732 tondur⁽⁸⁾. Peynir yapımında kullanılan sütün yaklaşık olarak % 70-90'lık kısmı peyniraltı suyu olarak elde kalır. Bu da 1.17-1.51 milyon ton peyniraltı suyu olduğu anlamına gelir. Bu miktarın ne kadarının işlendiği tam olarak bilinmemekte fakat işletmelerin çoğunda peyniraltı suyu işleme tesislerinin olmadığı ortadadır⁽⁹⁾.

Ülkemizde genel olarak peynir işleme tekniğinin yetersizliği, yerli peynirlerde randımanı düşürürken, peyniraltı suyunun miktar ve bileşimini zenginleştirmektedir. Özellikle yağ ve proteinin önemli bir kısmı peyniraltı suyuna geçmektedir. Peyniraltı suyunun bileşiminde yaklaşık olarak % 6.96 oranında süt kuru maddesi bulunmaktadır. Bunda % 0.36 yağ, % 0.84 protein, % 5.76 laktoz ve tuzlar, % 0.2 kadar laktik asit yer almaktadır. Bu değerler çeşitli etkenlere bağlı

olarak değişmektedir. Sütün bileşimi ve kullanılan peynir işleme yöntemlerine göre içerik değişmektedir. Peyniraltı suyunda vitaminler de yer almaktadır. Vitamin A çoğunlukla yağla birlikte peynire geçmekte çok az bir kısmı peyniraltı suyunda kalmaktadır. Vitamin B1, B2 ve C suda çözündüklerinden peyniraltı suyunda kalmaktadır. Vitamin D çok az bulunmaktadır. Bunlardan başka peyniraltı suyunda potasyum oksit % 0.188, sodyum oksit % 0.075, kalsiyum oksit % 0.071, magnezyum oksit % 0.018, demir oksit % 0.001, fosforpentoksit % 0.11, klor % 0.107 ve kükürttrioksit % 0.029 kadar bulunmaktadır⁽⁵⁾. Peynir yapımından kalan yaklaşık % 4–5 oranında laktoz içeren peyniraltı suyu mikrobiyolojik işlemler için iyi birer ham madde kaynağıdır. Peyniraltı suyunda bulunan kalsiyum, fosfor ve laktoz besin değerini yükseltmektedir. Peyniraltı suyu proteinleri yüksek nitelikli olup hayvanların beslenmesinde önemli bir kaynaktır. Peyniraltı suyu bileşimi, üretilen peynir çeşidine göre değişmekle beraber, ortalama bileşim değerleri Çizelge 1.2'deki gibidir.



Şekil 1.2. Peyniraltı suyu⁽⁸⁾

Çizelge 1.2. 100 mL peyniraltı suyunun kimyasal bileşimi⁽⁵⁾

Bileşen	Miktar	Ölçü Birimi
Kuru madde	6.3-7.0	g
Yağ	0.05-0.4	g
Ham protein	0.85-1.15	g
Karbonhidrat	4.6-5.2	g
Kül	0.5-0.6	g
Laktoz	4.6-5.2	g
Laktik asit	0.05-0.2	g
Sitrik asit	0.14-0.17	g
Kazein	0.04-0.05	g
α -laktoglobulin	0.12	g
β -laktoglobulin	0.32	g
Serum albümün	0.40	g
Immüoglobulinler	0.70	g
Na	36-51	mg
K	140-160	mg
Ca	40-50	mg
Mg	8-10	mg
Fe	0.10	mg
Cl	70-120	mg
P	40-55	mg
S	15-18	mg
Tiamin	0.03-0.05	mg
Riboflavin (B2)	0.1-0.16	mg
Piridoksin	0.04-0.07	mg
Vitamin C	0.9-1.5	mg
Vitamin A	0.002-0.004	mg

Peynircilikte iyi bir teknik uygulandığında peyniraltı sularındaki yağ miktarları % 0.3-0.5 oranlarında iken, bizde genellikle peyniraltı sularının % 1.0-1.5 oranlarında yağ içeriği görülmektedir. Peyniraltı sularındaki protein içinde geçerli olan bu hususlar nedeniyle yabancı ülkelerde yapılan peynirlerin suyunda % 1 civarında olan azotlu madde miktarı bizde % 1.5'i aşmaktadır. Peyniraltı suyu iki şekilde elde edilmektedir. Birincisi asitliğin arttırılmasıyla oluşan ürünlerin arttığı olan “asit peyniraltı suyu”, ikincisi ise peynir teknolojisinde kullanıldığı gibi maya enzimi ile oluşan “maya peyniraltı suyu” dur. Sütü pıhtılaştırmada kullanılan maddenin maya veya asit oluşuna göre, elde edilen peyniraltı suyunun bileşimi farklı olur. Genel olarak asitle pıhtılaştırılmış peyniraltı suyunun maya peyniraltı suyundan besin değeri açısından daha zengin olduğu görülür.

Çizelge 1.3. Pıhtılaşma Şeklinin Peyniraltı Suyu Bileşimi Üzerine Etkisi⁽⁸⁾

Bileşimi (%)	Maya	Asit
Su	93.00	93.00
Kuru madde	7.00	7.00
Yağ	0.30	0.10
Protein	0.90	1.00
Laktoz	4.90	5.10
Mineral madde	0.60	0.70

Peynir yapımında sütün kazeini kullanıldığı için peyniraltı suyunda kalan protein, serum proteinleri dediğimiz laktoalbumin ve laktoglobulinden ibarettir. Sütün başlıca proteini ise bilindiği gibi kazeindir. Sütün içinde bulunan laktozun peynir yapımında hemen hemen tamamı peyniraltı suyuna geçmektedir⁽⁸⁾.

1.1.5. Peyniraltı Suyunun Önemi

İçerdiği besin öğeleri ve özellikle peynir üretiminde de fazla miktarda elde edilmesi peyniraltı suyunun değerlendirilmesinin önemini artırır. Besin öğeleri kadar önemli bir konu da, peyniraltı suyunun çevreye verdiği zararlarıdır. ABD’ de açığa çıkan peyniraltı suyunun 115 milyon ton, Fransa’da 6.7 milyon ton, Almanya’da da 4.5 milyon ton seviyelerine ulaştığı, ülkemizde ise bu değer 1.4 milyon ton düzeyinde bulunduğu bildirilmiştir⁽¹²⁾. Peyniraltı suyunun besin maddeleri içeriğinin az olmasına karşın çeşitli oluşu ve bir yılda üretilen miktar dikkate alındığında bu atığın, atıklıktan çıkıp önemli bir gelir kaynağı haline gelmesi gayet doğaldır. Ülkemizde yılda 200.000 ton dolayında peynir üretildiği ve bu peynirden elde edilen peyniraltı suyunun ortalama 800.000 ton olduğu tahmin edilmektedir. Yurdumuzda yılda üretilen 6.000.000 ton sütün yaklaşık % 60 kadarı yani 3.600.000 tonu tereyağı ve peynire işlenir. Bunlardan elde edilen atıkların çok az kısmı basit şekilde değerlendirilmektedir. Bu atıkların önemli bir bölümü ise işletmelerin dağınık olması, olanaksızlık ve bilgisizlik gibi nedenlerden dolayı değerlendirilememektedir. Bu nedenle peyniraltı suyunun dökülmesiyle ülkemizde 9942 ton yağ, 9120 ton protein, 48245 ton laktoz, 6182 ton mineral madde kaybı olabileceği hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi son yıllara kadar atık gözüyle bakılan süt atıkları ülkemizin hayvansal protein gereksinimine büyük ölçüde katkıda bulunacak durumdadır⁽⁸⁾.

1.1.5.1. Peyniraltı Suyunun Değerlendirilmesi

Son yıllarda süt şekeri, serum proteinleri, vitaminler ve mineral maddeler içeren, bir ham madde olarak çeşitli ürün teknolojilerinde kullanılan peyniraltı suyunun değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Dünya genelinde üretilen peyniraltı suyunun yaklaşık % 50 kadarı işlenmekte ve çeşitli besin ürünlerine dönüştürülmektedir. Bu miktarın yaklaşık % 45'i doğrudan sıvı formda, % 30'u tozlaştırılmış peyniraltı suyu formunda, % 15'i laktoz ve laktoz yan ürünleri şeklinde, geri kalanı ise peyniraltı suyu proteini konsantresi olarak kullanılmaktadır. Peyniraltı suyunun BOİ değerinin % 75'inden fazlası biyogaz, etanol, tek hücre proteini ve diğer pazarlanabilir ürünlere dönüştürülerek ya da doğrudan biyolojik arıtım yöntemleri ile giderilmektedir. Bununla beraber dünya peyniraltı suyu üretiminin % 50'ye yakın kısmı halen atık olarak akarsulara, göllere ve denizlere boşaltılmaktadır. Yine de her geçen yıl dünyada oluşan yıllık peyniraltı suyu miktarı artmakta, beraberinde bunun kullanımı için gereken yeni arıtım ve işleme süreçleri geliştirilmektedir⁽⁵⁾. Bu durumda hem önemli ölçüde besin israfına hem de arıtılmadan alıcı ortamlara verilebilen bu tür atık sular çevre kirliliğine neden olmaktadır. Sütçülükle uğraşan işletmelerin genellikle çok düşük kapasiteli olması pek çok yan ürünün üretilmesini engellemektedir. Peyniraltı suyundaki yüksek süt şekeri içeriği dolayısıyla bazı tesislerde bu şekerin bir kısmını kristalize laktoz olarak elde edilmekte, daha sonra temizlenerek ilaç ve şekerleme endüstrisinde kullanılmaktadır. Büyük kapasiteli işletmelerde peyniraltı suyunun değerlendirilmesi yoluna gidilmektedir. Ancak, peynir üretimimizin büyük bir çoğunluğunun yapıldığı mandıralarda böyle bir değerlendirme yapılamamaktadır. Avrupa ülkelerinden Hollanda başta olmak üzere İtalya, Fransa gibi ülkelerde peynir altı suyu kurutularak değerlendirilmektedir⁽⁷⁾.

Ülkemizde de peyniraltı suyunun değerlendirilmesi için gereken yatırımlar desteklenmelidir. Birçok küçük işletme peyniraltı suyunu değerlendirmek amacıyla, bu suyu kaynatarak lor elde ediyorsa da, bunun ekonomik değeri nispeten sınırlı kalmaktadır. Peyniraltı suyundaki % 1.5 oranındaki katı madde lor olarak alınmaktadır. Ancak, peyniraltı suyunda % 5.5-6.6 oranında katı madde bulunmaktadır. Toz haline getirildiğinde bunun tamamı alınmaktadır. Küçük işletmeler tarafından yapılan bu lor alma işleminden sonra yine atık su oluşmakta, dolayısıyla kirletici etkisi giderilememektedir. Toz haline getirme işlemindeyse, su tamamen uçurulduğu için herhangi bir atık su oluşmamakta ve durum çevre kirliliğinin önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Peyniraltı suyunun asit ve yağ oranı yüksek bir materyal olması nedeniyle arıtılması da pahalı olmaktadır. Bugün ülkemizde süt işletmeciliği yapan tesislerin çoğunun ilkel şartlarda çalışan küçük kapasiteli işletmeler olması arıtma için gerekli olan altyapının yapılmasını ekonomik açıdan güçleştirmekte, bu nedenle çoğu işletme arıtma tesisi yapmaktansa bu suları doğrudan alıcı ortama vermeyi tercih etmektedirler⁽⁷⁾.

1.1.6. Süt Atıklarının Yarattığı Çevre Kirliliği

Süt atıkları çevreye olduğu gibi atıldığı zaman, bu atıklarda bulunan organik maddelerin atıldıkları yerlerde özellikle akarsularda, göllerde ve hatta denizlerde neden oldukları kirlenmenin ekolojik ve ekonomik önemi, sayısız yerli ve yabancı araştırmalarda ve yayınlarda vurgulanmıştır. Süt fabrikaları atıklarının içerisinde mikroorganizmaların çoğalması için gerekli olan besin maddeleri bulunmaktadır. Bununla beraber bu atıklar sinekler, böcekler, kemiriciler için de önemli bir besin

kaynağıdır. Mikroorganizmalar için iyi bir ortam oluşturması ve içerisindeki organik ve inorganik maddeler nedeniyle toksik maddelerin meydana gelmesi, hatta patojen organizmaların bulunması nedeniyle, süt fabrikası atıkları halk sağlığı açısından olduğu kadar, diğer canlılar açısından da potansiyel bir kontaminasyon kaynağıdır. Sütün üretilmesi, taşınması, depolanması ve satışı sırasında meydana gelen atıklar gaz, sıvı ve katı halde bulunurlar. Özellikle atıkların, herhangi bir işlem yapılmadan atılmaları halinde uygun hava koşulları altında meydana gelecek biyolojik parçalar, birçok kötü kokulu gazın çevreye yayılmasına, toksik maddelerin oluşmasına ve çevrede yaşayan tüm canlıların zarara uğramasına neden olurlar⁽¹³⁾.

Süt endüstrilerinden gelen atıklar ağır yağlar içermektedir. Bu tip atıklar kanalizasyon sistemlerinin taşıma kapasitesi üzerine ters etkiler yapar. Bu nedenle yağlı maddelerin alıcı sulara ve kanalizasyon sistemlerine verilmesinde bazı kurallar ve kısıtlamalar konulmuştur. Yağ, arıtma tesislerinde çeşitli problemlere yol açmaktadır. Yüksek yağ içerikli atıklardan en önemlilerinden olan et, bitkisel yağ, margarin ve süt endüstrilerinden gelen atıklarda köpük problemi oldukça önemli olup, evsel kanalizasyon sistemlerine bu tip atıkların doğrudan verilmesi sakıncalıdır. Su yataklarında kirlenmeye neden olan yağlar su yüzeyini kaplayarak su kuşları için çok cazip hale gelmekte, yağ üzerine konan kuşların tüyleri yağa bulanmaktadır. Neticede kuşların uçuş kabiliyeti azalmakta, ısınlama yoluyla vücut ısısı kaybolmakta ve hayvanlar ölmektedir. Bu şekilde yağa bulanmış kuşların kurtarılması son derece zordur. Sulardaki yağlı maddelerin su çevresindeki hayata etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- i. Serbest yağ ve emülsiyonlar alglerin ve fitoplanktonların üzerine sıvanarak onları tahrip ederler,
- ii. Yağların bir tabaka halinde suyun yüzeyini kaplaması su ortamına havadan oksijen girmesini önler.
- iii. Yağların bir kısmı doğrudan zehirleyici özelliğe sahiptir (fenoller gibi) ve organizmaları zehirleyerek tahrip eder,
- iv. Yağlı sularda balıkların solungaçları ve vücutları yağa bulanarak soluk almaları güçleşir ve neticede ölüme kadar gidebilir,

Böyle sularda yaşayan balık ve midyeler ölmeseler bile yağın kokusunu ve tadını absorbe ettikleri için etlerinin kalitesi bozulur ve uzun süre yenmeleri mümkün olmaz⁽¹⁴⁾. Kısaca peyniraltı sularının, herhangi bir işlem yapılmadan atılması halinde meydana gelecek biyolojik parçalar ekosistem içersisindeki tüm organizmaları etkilemektedir. Bu tür bileşikler atmosfer ve sucul ortam arasındaki gaz alışverişini engelleyerek sudaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu tür bileşikler ışık geçirgenliğini azaltarak deniz ortamındaki yaşam için çok önemli olan fotosentez olayını engellemektedir. Çevre kirlenmesinin tümüyle ortadan kaldırılması bugünkü teknolojik, ekonomik olanaklar ve çevre bilinci açısından olası değildir. Tüm modern yaşamdan vazgeçilmesi ile sadece daha çok kirlenmenin durdurulması sağlanabilir, ancak bugüne kadar olan kirliliğin birikintisi uzun yıllar devam edecektir. Bu durumda yapılması gereken şey bir yandan daha çok kirlenmenin olabildiğince önlenmesi, öte yandan mevcut kirliliğin temizlenmesidir⁽¹³⁾.

Bugün teknolojisi ileri ülkelerde tesis temizlemede kullanılan sular dahil süt fabrikalarında elde edilen atıklar hiçbir işleme tabi tutulmadan olduğu gibi çevreye, akarsulara atılamazlar. Bunun için bu ülkelerde yasal önlemler alınmıştır. Zira işletmeden çevreye atılacak peyniraltı suyu ve yayık altı, atıldıkları ortamda bulunan oksijeni tüketmekte ve hayatı yok etmektedir. Süt endüstrisi, yüksek oranda organik madde içeren, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) konsantrasyonları yüksek, kuvvetli karakterde atık sular üretmektedir. Çizelge 1.4. bu konuda fikir vermektedir⁽⁸⁾.

1.1.6.1. Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ DEĞERİ)

Çevre kirlenmesinde ölçü olarak BOİ₅ değeri olarak ifade edilen bu değer, kirli sulardaki organik maddeleri parçalamak için mikroorganizmaların kullandığı oksijen miktarını belirtir. Bir litre peyniraltı suyu için bu değer 40 g/L olarak saptanmıştır. Oysa bir insanın günlük artıklarının parçalanması için BOİ₅ değeri 60 g/L'dir⁽⁸⁾. Bu yüzden peyniraltı suyunu değerlendiremeyen süt işletmeleri arıtma tesisi kurmak zorunda kalıp ekonomik kayba uğrarlar. Atık sudaki yüksek organik yüke neden olan maddeler ise süttten kaynaklanan karbonhidratlar, proteinler ve yağlardır. Süt endüstrisi atık suları genelde üretim esnasında cihazların ve hatların temizlenmesi, taşıyıcı konteynerlerin temizlenmesi, süt silolarının yıkanması ve cihaz veya operasyon hataları sonucu oluşmaktadır⁽¹⁵⁾.

Belirtilen bu nedenlerden dolayı peyniraltı suyunun değerlendirilmesi sadece ekonomik yönden değil, çevre kirlenmesini önlemek açısından da gereklidir.

Çizelge 1.4. Süt ve Bazı Süt Atıklarının Biyolojik Oksijen İhtiyaçları⁽⁸⁾

Biyolojik Oksijen İhtiyaçları (mg/L)	
Süt	120.000
Yağsız süt	72.000
Yayık altı	70.000
Peyniraltı suyu	44.000

1.1.6.2. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)

Bir ön işlem uygulanmamış fakat sedimentasyona veya filtrasyona tabi tutulmuş 1 L atık suda bulunan organik maddelerin, gümüş nitrat ve potasyum dikromat katalizörünün eşliğinde kimyasal oksidasyonun tamamlanması için gerekli oksijen miktarının mg (mg/L) veya ppm cinsinden ifadesidir. Bu yöntem, biyolojik oksijen gereksinimi tayin yönteminden daha çabuk sonuç verir. KOİ ile BOİ₅ birbirine eş değer değildir. KOİ yöntemiyle elde edilen değer, çözünmüş organik katı maddeler hakkında fikir verir. Atık sular içerisinde protein ve karbonhidrat oranı yüksek olduğunda, KOİ/BOİ₅ 1'den büyük olur. Süt atıklarında karbonhidrat miktarı yüksek olup, azot ve fosfor içeriği de fazladır. Her 1000 L süt işlendiğinde spesifik çevre kirlenmesi 1-2.4 kg/L BOİ₅ değeri arasındadır. Peyniraltı suyu, yayık altı ve şişe yıkama makinesinden akan atık suyun BOİ₅ değeri daha yüksektir. 1 kg laktozun parçalanması için BOİ₅ değeri 0.8 kg (0.8 kg oksijen/kg) değerine sahiptir. Süt işletmelerinde bu değer ortalama olarak 0.2-0.5 BOİ₅/1000 kg'a düşürülmesi hedef olarak saptanmıştır⁽⁸⁾.

1.1.7. Süt Fabrikalarında Atık Suların Arıtılması

Çevre kirliliğine bir bütün olarak bakıldığında kirliliğin ortadan kaldırılması yerine kirlenmenin önlenmesi en akılcı çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Yeryüzündeki tüm sosyo-ekonomik ve sosyokültürel yapı dikkate alındığında kirlenmenin tümüyle önüne geçilmesi bugün için olanaksızdır. Bunun yerine özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde bir yandan kirlenmenin olanaklar ölçüsünde azaltılması, mevcut kirliliğin temizlenmesi, atıkların yeniden kazanılması gibi çevre koruma yöntemleri beraberce uygulanmalıdır. Süt fabrikalarında çıkan atık suyun arıtılması için, atık suyun miktarına ve bileşimine bağlı olarak değişik yöntemler uygulanabilir. Atık sular genellikle mekaniksel, kimyasal ve biyolojik olarak veya bu yöntemlerin kombinasyonları şeklinde uygulanarak temizlenir⁽⁸⁾.

1.1.7.1. Mekaniksel yöntemler

Filtrasyon, çöktürme, yüzdürme gibi yöntemlerdir. Yüzdürmede ve çöktürmede, katı parçacıkların hareketlenmesi için ortama gaz verilir. Süt fabrikalarındaki atık suların çökeltme havuzlarında en az 2–3 saat bekletilmesi gerekir. Bu yöntemle BOİ₅ giderme verimi % 25–30 arasında değişir.

1.1.7.2. Kimyasal işlemler

Uygun demir sülfat, demir klorür, alüminyum sülfat, kireç vb. çöktürücü maddeler kullanılarak, pıhtılaşma ve yumaklaştırma yoluyla asılı olan maddeler çökeltilir ya da atık suda çözülmüş olarak bulunan kirletici unsurların kimyasal

reaksiyonlar ile çözünlüğü düşük bileşiklere dönüştürülür. Kimyasal yolla temizleme süt atıklarının temizlenmesinde yeterli değildir. Çünkü bu yöntemle laktoz gibi çözülmüş maddeler uzaklaştırılmaz. BOİ₅ giderme oranı % 50–85 dir. Tarıma dayalı diğer sanayi dallarında kimyasal arıtma sistemleri kullanılmaktadır. Tüm arıtma sistemleri pahalı ve çalıştırılması zor olan temizleme birimleridir. Atık suyun miktarı, kirlilik konsantrasyonu, kirlilik öğeleri, günlük deşarj edilen miktar, bileşim ve konsantrasyon dağılımı gibi faktörler tarafından etkilenir⁽⁸⁾.

1.1.7.3. Biyolojik işlemler (Biyodegradasyon)

Fiziksel-kimyasal işlemlerde kullanılan kimyasal madde maliyetlerinin yüksekliği ve çözülmüş KOİ gideriminin az olması, biyolojik proseslerin tercihine yol açmaktadır. Gıda endüstrisi gibi organik madde yükü fazla olan atıklar biyolojik arıtma ile temizlenebilir, süt atıklarının temizlenmesinde de en uygun yöntemdir. Bu kademe 2 yolla (aerobik ve anaerobik) yapılabilir. Son zamanlarda aerobik prosesler ile süt endüstrisi atık suyun arıtımı çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Aerobik prosesler, özellikle de aktif çamur tesisleri, süt endüstrisi atık sularının arıtımında sıkça kullanılmaktadır, fakat yüksek enerji sarfıyatı bu prosesin önemli bir dezavantajıdır. Havasız (anaerobik) prosesler ise, havalandırma için enerji tüketimine ihtiyaç olmaması, az miktarda fazla çamur oluşumu ve tesis kurulumu için az miktarda alana ihtiyaç duyulması gibi önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca süt endüstrisi atık sularından biyogaz üretimi de bu prosesi, aerobik arıtma proseslerine nazaran, çok daha cazip kılmaktadır⁽¹⁵⁾.

Aerobik biyolojik arıtmada prensip, biyolojik parçalanma sonucu sucul ortamda oluşan kirliliğin giderilmesidir. Süt endüstrisi atıkları mikroorganizmalar tarafından organik karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmakta ve sucul ortamdan etkili bir şekilde uzaklaştırılmaktadır. Bu şekilde oluşan biyolojik kütle atık sudan ayrılmaktadır. Anaerobik biyolojik arıtma ise organik maddeleri mikroorganizmalar ile daha küçük moleküllere dönüştürmektir. Bu dönüşüm sonunda metan gazı da elde edilir. Kalan küçük moleküllü organik maddeler aerobik arıtım ile kolaylıkla arıtılabilecek forma dönüşür. Bir diğer deyiş ile anaerobik arıtma tesisleri aerobik arıtma öncesi kullanılır. Biyolojik arıtmada basit olarak 40.000 BOİ altında kirli sulara aerobik, 40.000 BOİ' den daha kirli sulara anaerobik prosesler uygulanır. Süt endüstrisi atıkları aerobik yöntemle kolayca arıtılabilirler. Bu sistemde oksijen ve bakteri kültürünün sağlanması ile biyokimyasal oksitlenme hızlanır ve böylece çözülmüş organik maddeler giderilir. Çözülmüş ve kolloidal halinde asılı olan organik maddeler, aerobik bakterilerin meydana getirdiği oksidasyon sonucu parçalanarak, karbondioksit ve suya indirgenirler. Gerektiğinde pis su içerisine hava vermek veya çok geniş alanlara yaymak suretiyle gerekli oksijeni sağlamak mümkündür. Bu yöntemde pH büyük önem taşır. İyi bir sonuç alınabilmesi pH'nın 6.5-8.5 arasında olmasına bağlıdır. Aksi takdirde mikroorganizmaların faaliyeti duracağından arıtma işlemi gerçekleşemez⁽⁸⁾.

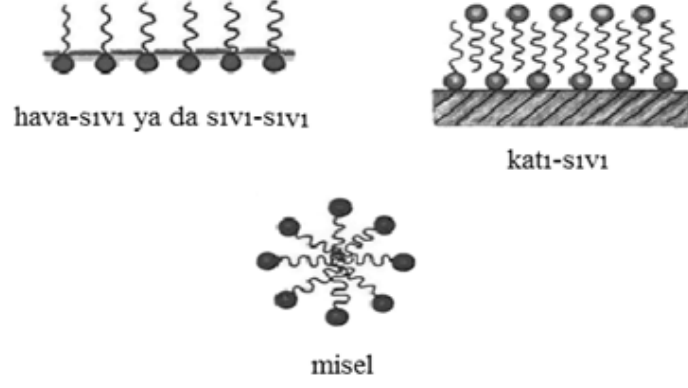
1.1.8. Peyniraltı Sularının Biyodegradasyonu

Biyosürefektan üreten mikroorganizmalar, biyodegradasyonda önemli bir role sahiptir⁽¹⁶⁾. Sucul ortamda oluşan kirliliğinin giderilmesinde mikrobiyal degradasyon en basit tekniklerden biridir. Suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin

mikrobiyal biyodegradasyonu kısıtlanmaktadır. Süt endüstrisi atıkları, mikroorganizmalar tarafından organik karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmakta ve sucul ortamdan etkili bir şekilde uzaklaştırılmaktadır. Bu sayede mikroorganizmalar tarafından üretilerek ortama salınan biosümfektanlar, hidrokarbon ve su arasındaki yüzey gerilimini indirgeyerek, hidrokarbonları emülsifiye etmektedir. Suda çözünmeyen maddelerin kolaylıkla karışmasını, disperse olmasını sağlamaktadır⁽¹⁷⁾.

1.1.9. Sümfektanlar

Sümfektan; kelime olarak "yüzeyi saran" anlamına gelmektedir. Sümfektan maddeler, suyun yüzey gerilimini düşüren amfipatik bileşiklerdir. Bu nedenle "yüzey aktif" maddeler olarak anılırlar. Farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik gösterirler. Örnek olarak; su-petrol yüzeyi, hava-su yüzeyi, sıvı-katı yüzeyi gibi⁽¹⁸⁾. Hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplar içeren sümfektanlar, çok fazlı sistemlerde polar ve polar olmayan fazlar arasındaki yüzeyde ya da yüzeyler arasında etkin olurlar. Hidrofobik grupların varlığı nedeniyle her iki fazın yüzey özelliklerini değiştirirler. Bu etkinlikleri yoluyla buldukları ortamın yüzey gerilimini ya da yüzeyler arası gerilimi düşürürler⁽¹⁹⁾. Fazlar arasındaki ara yüzey geriliminin azalması ve misel oluşumu ile hidrofobik bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından çözünürlüğü artarak bu bileşiklerin, mikroorganizmalar tarafından alımı kolaylaşmaktadır⁽²⁰⁾.



Şekil 1.3. Farklı yüzeyleri bir araya getirme özelliğindeki yüzey aktif maddeler⁽²¹⁾



Şekil 1.4. Mikroemülsiyonlar oluşturan sürfektanlar⁽²¹⁾

Sürfektanlar, mikroemülsiyonlar oluşturma sırasında Şekil 1.4’de görüldüğü gibi küresel miseller oluştururlar. Hidrokarbon molekülleri böylece sarılmış olur ve daha da küçük moleküllere bölünebilirler. Sürfektanlar, farklı yüzeyler arasında birleştirici olarak çalışma özelliğine sahiptir. Miseller, mikroorganizmaların organik kirliliğe yani hidrokarbon moleküllerine daha hızlı ulaşmalarını sağlar⁽²¹⁾.

Sülfektanların varlığında hidrokarbonların çözünürlüğünün artmasıyla biyolojik ayrışma hızlanmaktadır. Sülfektan molekülleri misellerde toplandıktan sonra ayrışma kritik misel konsantrasyonunun üzerinde meydana gelmektedir. Ayrışmış hidrofobik bileşikler miseller içinde tutulmaktadır. Böylelikle miseller organik kirliliğin parçalanma oranını arttırmış olur. Bu durum çözeltideki sülfektanın, bileşiklerin ayrışmasını artırdığını göstermektedir. Sudaki hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğünün artması sülfektanın dozuna ve türüne bağlı olarak değişmektedir. Sülfektanlar kimyasal olarak ya da mikrobiyolojik olarak üretilirler. Mikroorganizmalar özellikle suda karışmayan substratlarda gelişmeleri boyunca bu bileşikleri çoğunlukla oksijenli ortam koşullarında sentezler⁽²⁰⁾. Birden fazla kimyasal dönüşüm prosesleriyle üretilen sülfektanlar, sentetik sülfektanlardır. Petrol türevlerinden ya da bitkisel, hayvansal yağlar, yağ asitleri, alkollerden üretilirler⁽²²⁾.

1.1.10. Biyosülfektanlar

Biyosülfektanlar, karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir⁽²⁰⁾. Kimyasal olarak hazırlanan sülfektanlara alternatiftir. Yapısal farklılıkları (glikolipidler, lipopeptidler, yağ asitleri gibi), düşük toksisiteleri, biyolojik olarak parçalanabilmelerinden dolayı bu moleküller yaygın bir şekilde kozmetikte, ilaç, gıda sanayinde emülsifier, ıslatıcı-nemlendirici, koruyucu madde ve deterjan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ekolojik olarak güvenlidirler. Biyoremediasyonda ve atık işleme proseslerinde kullanılabilirler. Biyosülfektanlar ekonomik olarak çeşitli substratlardan başta bitkisel yağlar, içki ve

süt sanayi atıkları gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilebilirler⁽²³⁾. Özellikle fermentasyon teknolojisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyosümfektanlar, metallerle kompleks oluşturma eğilimindedirler. Bu özellik, biyosümfektanların ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve suların arıtılmasında kullanılmalarını da akla getirmektedir. Mikroorganizmalar kullanılarak ağır metallerin biyolojik olarak iyileştirilmesi (biyoremediasyon) sadece bilimsel gelişme açısından değil endüstriyel uygulanabilirlik açısından da son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Biyosümfektanlar; yapısal farklılıkları, biyolojik olarak ayrışabilirlikleri, ekstrem sıcaklık, pH ve tuzluluktaki etkinliklerinden dolayı özel uygulamalar için sentetik sümfektanlara göre avantajlara sahiptirler⁽²⁴⁾. Bu tür biyolojik temelli sümfektanların avantajları biyolojik olarak doğaya uyumluluk ve toksisitelerinin düşük olmasıdır. Belirli hidrokarbon kirleticilerinin mikrobiyal ayrışmasının biyosümfektanların eş zamanlı üretimi ile kolaylaştığı gösterilmektedir. Buna karşılık, sentetik sümfektanlar yüksek konsantrasyonlarda ortama eklendiğinde mikrobiyal aktiviteyi inhibe ettikleri görülmektedir⁽²⁰⁾.

1.1.11. Biyosümfektanların Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosümfektanlar yüzey gerilimini azaltma, düşük kritik misel konsantrasyonu (CMC), emülsiyonları stabil etme, köpürmeyi düzenleme özelliklerine sahiptir. Genellikle toksik değildirler ve biyolojik olarak parçalanabilirler. Mikrobiyal sümfektanlar çeşitli olma, çevreye dost, büyük ölçekli ürün imkanı, seçicilik, ekstrem şartlar altında çalışma ve çevre korumada potansiyel kullanımları gibi özelliklerinden dolayı son yıllarda sürekli ilgi çeken moleküllerdir⁽²⁵⁾.

Hidrokarbon kirliliğinin giderilmesi işlemlerinde kimyasalların kullanılması sonucu ortaya çıkan yan ürünler ile çevre kontamine olabilmektedir. Halbuki biyolojik işlemde biosürfektan kendi kendine biyolojik olarak parçalanabilirken, çevreyi kirleten maddelere de zarar verir. Biosürfektanlar; hidrokarbon kontaminantları çözebilme potansiyeline sahiptir, emülsifikasyon ve mikrobiyal degradasyon için hidrokarbonların kullanılabilirliklerini artırır. Bu nedenle biosürfektan üreten mikroorganizmalar, hidrokarbonlarla kontamine olmuş yerlerin hızlandırılmış biyoremediasyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar⁽²⁶⁾. Hatta bu bileşikler hızlandırılmış petrol-yağ gideriminde kullanılabilirler⁽²⁷⁾. Diğer uygulamalar, herbisid ve pestisid formülasyonu, deterjan, sağlık hizmetleri, kozmetik, selüloz - kağıt, kömür, tekstil, seramik, gıda sanayisi, maden işletmeciliği gibi alanları kapsamaktadır^(25,28). Yüzey aktif bileşiklerini sentezleyen birçok bakteri ve maya bilinmektedir⁽²⁹⁾. Bu mikroorganizmalar karbon kaynağı olarak hidrokarbonları kullandıklarında, yüzey aktivite özelliğine sahip glikolipid, fosfolipid, lipopeptid gibi çeşitli kimyasallar sentezlemektedirler. Bu kimyasallar görünürde hidrokarbonları emülsifiye etmek ve bu maddelerin hücre içine transportunu kolaylaştırmak için sentezlenmektedir⁽¹⁸⁾.

1.1.12. Biosürfektanların Sınıflandırılması ve Mikrobiyal Orjinleri

Kimyasal olarak sentezlenen sürfektanlardan farklı olan ve polar grupların çeşidine göre sınıflandırılan biosürfektanlar başta kimyasal kompozisyonları ve mikrobiyal orjinleri ile kategorize edilmektedir. Mikrobiyal orjinlerine göre bakteri, maya ve fungal sürfektanlar olarak sınıflandırılırlar (Çizelge 1.5). Genelde yapıları amino asitler, peptid anyonları veya katyonları; mono-, di- veya polisakkaritlerden

oluşan hidrofilik kısım ve doymuş ya da doymamış yağ asitlerinden oluşan hidrofobik kısım içermektedir. Kimyasal yapılarına göre de glikolipidler, lipopeptidler, lipoproteinler, yağ asitleri, fosfolipidler, nötral lipidler, polimerik ve partiküllü biyosümfektanlar olarak sınıflandırılırlar⁽³⁰⁾.

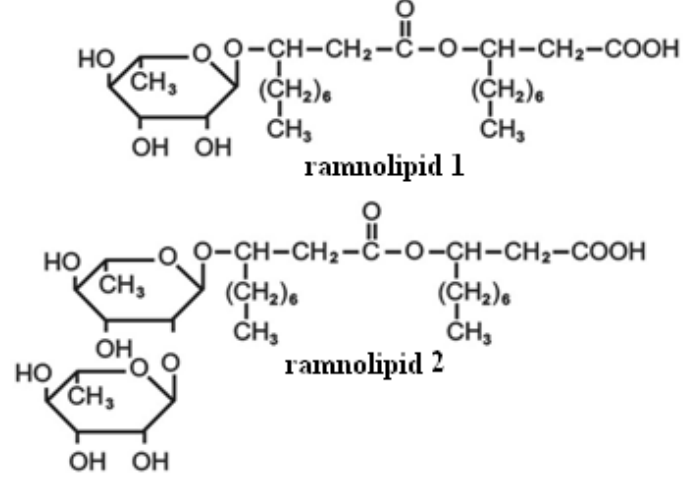
1.1.12.1. Glikolipidler

En çok bilinen biyosümfektanlardır. Uzun zincirli alifatik asitler veya hidroksi alifatik asit yapısındaki karbonhidratlardır. Mono-, di-, tri ve tetrasakkarid bileşenleri glukoz, mannoz galaktoz, glukuronik asit, ramnoz ve galaktoz fosfat içerir. Yağ asidi bileşeni genellikle aynı mikroorganizmaların fosfolipidleriyle benzer bir kompozisyona sahiptir. Glikolipidler arasında en iyi bilinenleri ramnolipidler, trehalolipidler ve sophorolipidlerdir⁽¹⁸⁾.

1.1.12.1.1. Ramnolipidler

Birçok mikroorganizma farklı kültür ortamlarında farklı yapılar da biyosümfektanlar sentezlemektedir. Biyosümfektanlar; katı, sıvı ve gazlar arasındaki yüzey ve iç yüzey gerilimi azaltabilen amfifilik bileşiklerdir. Ramnoz şekeri ve yağ asitleri içeren glikolipid yapısındaki biyosümfektanlara ramnolipidler denilmektedir. Ramnolipidler, yapısında bir veya iki tane ramnoz şekeri ve bunlara bağlı çeşitli uzunlukta β -hidroksi dekanolik yağ asitleri bulunduran biyosümfektanlardır. Ramnolipid yapısında bulunan ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliklerini artırmaktadır. Bu özellikleri ramnolipidlerin kararlılığını ve hidrofobik bileşikleri

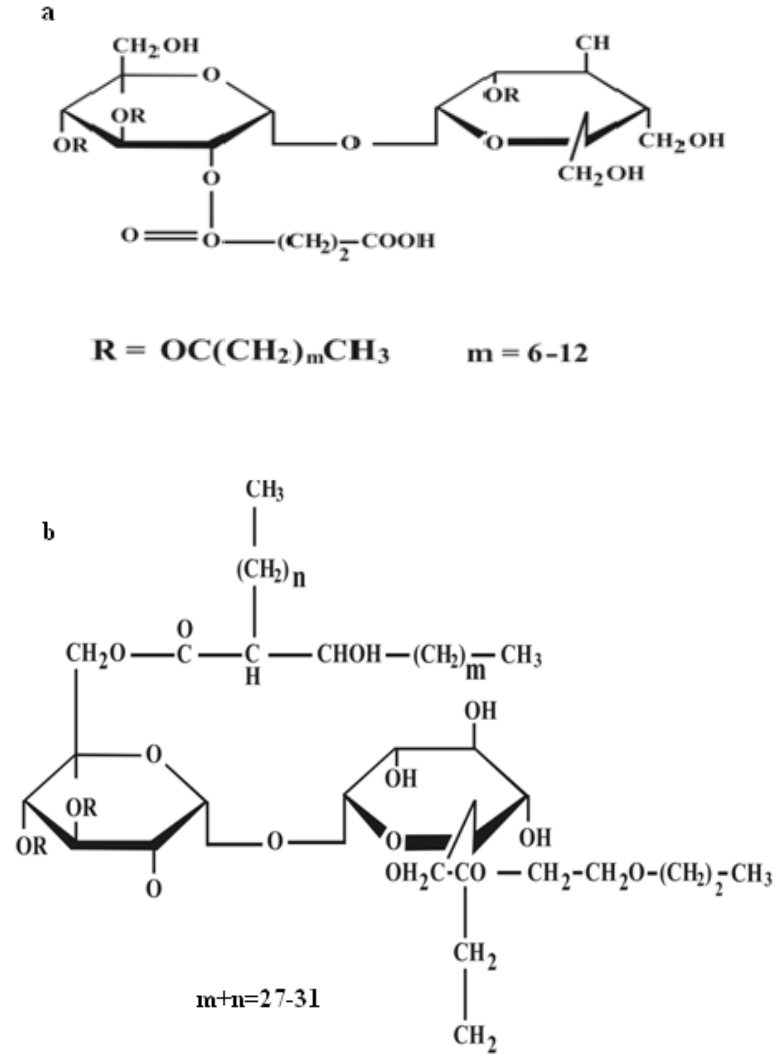
çözebilme kapasitesini etkilemektedir⁽³¹⁾. 1 ya da 2 molekül ramnozun ve 1 ya da 2 molekül β -hidroksidekanoik asitle bağlı olan glikolipidlerdir.



Şekil 1.5. *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 400044'ten elde edilen ramnolipitin yapısı⁽³²⁾.

1.1.12.1.2. Trehalolipidler

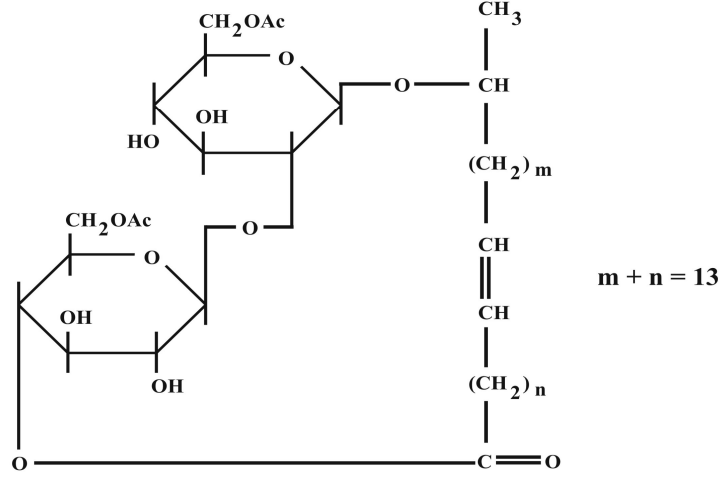
Birkaç farklı yapıda mikrobiyal trehalolipid rapor edilmiştir. Dissakkarit trehaloz C-6 ve C-6'da *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium*'un birçok türüyle ilişkili mikolik asitlere bağlıdır. Mikolik asitler uzun zincirli α -dallı- β -hidroksi yağ asitleridir. Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen Trehalolipidlerin mikolik asit yapısı ve büyüklüğü ile C atomlarının sayısı ve doymamışlık derecesi ayırdır⁽³³⁾.



Şekil 1.6. *Arthrobacter* sp. SI 1 tarafından üretilen trehaloz tetraester (a) ve trehaloz diester (b)⁽³⁴⁾.

1.1.12.1.3. Sophorolipidler

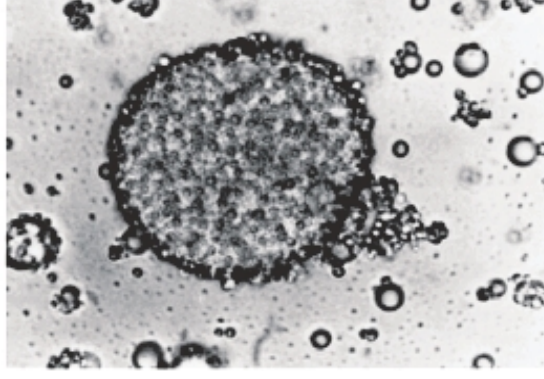
Başta *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* ve *T. apicola* gibi mayalar tarafından üretilen sophorolipidler, uzun zincirli hidroksi yağ asidine bağlanmış dimerik karbonhidrat olan sophorozdan oluşurlar.



Şekil 1.7. Sophorolipid laktonun yapısı⁽³⁾

1.1.12.2. Lipopeptidler ve Lipoproteinler

Lipopeptidler antibiyotik, antiviral-antitümör ajanları, immünomodulator, spesifik toksin ya da enzim inhibitörü olarak rol oynayabilmektedir⁽²⁴⁾. Dekapeptid antibiyotikleri (gramisidinler) ve lipopeptid antibiyotikleri (polimiksinler) içeren çok sayıda siklik lipopeptidler çoğunlukla *Bacillus* türleri tarafından üretilir. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen siklik lipopeptid surfaktin en etkili biyosümfektanlardandır⁽³⁵⁾. *Bacillus brevis* siklosimetrik dekapeptid antibiyotik gramisidin S yi üretir. Lipopeptid antibiyotiklerin bir grubu olan polimiksinler *Bacillus polymyxa* tarafından üretilir⁽²⁸⁾.



Şekil 1.11. *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 (*Candida lipolytica*) tarafından hegzadekanı kullanarak 48 saatlik inkübasyon sonrası ürettiği partiküllü biyosümfektan⁽³⁸⁾

Biyosümfektanlar bazı durumlarda düşük moleküler ağırlıklı ve büyük moleküler ağırlıklı polimerler olarak iki kısma ayrılabilir⁽²⁸⁾. Düşük moleküler ağırlıklı biyosümfektanlar genellikle glikolipidler ve lipopeptidlerdir. Büyük moleküler ağırlıklı biyosümfektanlar amfipatik polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ya da bu biyopolimerlerin karışımı olan moleküllerdir⁽²⁶⁾.

Çizelge 1.5. Biyosümfektanlar ve mikrobiyal tür orjinleri^(18,39)

	Biyosümfektan	Kaynağı
Glikolipidler	Trehalolipidler	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i>
	Ram nolipidler	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
	Sophorolipidler	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
	Sellobiyolipidler	<i>Ustilago zae</i> <i>Ustilago maydis</i>
	Lipopeptidler/ Lipoproteinler	Peptid-lipid Serravettin Viskosin Surfaktin Subtilisin Gramisidinler Polimiksinler Emülsan
Polimerik sümfektanlar	Biyodispersan Mannan-lipid-protein Liposan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida lipolytica</i>
	Karbonhidrat-protein-lipid	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Partiküllü sümfektanlar	Vezikül/fimbria <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>

1.1.13. Biosurfektanların Kullanım Alanları

Biosurfektanların doğal rolleri düşünüldüğünde, çok farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlendiklerini, çok farklı kimyasal yapı ve yüzey özelliklerine sahip olduklarını vurgulamak gerekir. Bu nedenle, mikrobiyal fizyolojide bu moleküllerin doğal rolleri hakkında genelleme yapmak güçtür. İlk olarak konuyla ilgili deneyler birkaç emülsifier üreten mikroorganizma ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tanımlanan mikrobiyal emülsifierlerin sayısında artış olmuştur. Birçok mikroorganizma tarafından sentezlendikleri, çok farklı kimyasal yapı ve yüzey özelliklerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu yüzden biyoemülsifierlerin farklı rollerinin olduğu, bazılarının sentezlendikleri mikroorganizmaların ekolojisi ve fizyolojisinde benzersiz oldukları düşünülmektedir. Bu durumda birkaç biosurfektanın işlevini tanımlayıp bütün mikrobiyal surfektanlar üzerinde genellemeler yapmak imkansızdır⁽²⁸⁾.

Biosurfektanlar, emülsiyonlaştırıcı, seyreltici, nemlendirme, köpürtme, solubilizasyon, dispersiyon, paslanmayı önleme, akışkanlığı azaltma, deterjan ve işlevsel gıda maddeleri olabilme özelliklerinden dolayı petrol, petrokimya, çevre yönetimi, ilaç, kozmetik, kişisel bakım ürünleri, gıda-içecek sanayi, tarım uygulamaları, madencilik, seramik, inşaat sektörü, boya sanayi, metal endüstrisi ve deri işletmesi gibi birçok alanda kullanılabilirler. Tıp alanındaki uygulamalar için, terapötik ve biyomedikal özellikleri de vardır. Antibakteriyal, antifungal, antiviral özellikte olup immun sistemi düzenleyen yararlı moleküller olduğu belirtilmektedir. Biosurfektanların hidrofobik kirleticilerin biyodegradasyonu ve biyolojik kullanılabilirliği üzerine etkisi değişkendir. Doğada, biosurfektanlar hidrofobik moleküllerin biyolojik kullanılabilirliğini arttırmada, mikroorganizmaların bir araya

gelme hareketini sağlamada ve selüler fizyolojik proseslere katılmada fizyolojik bir rol oynar. Hatta biyofilm oluşturma proseslerine de katılırlar. Hayvan, bitki ve insan mikrobiyal patojenlerine karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirler⁽²²⁾. Ayrıca fibrin oluşumu ve çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı anti-adhesiv aktivite sergilemektedirler⁽⁴⁰⁾.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), çevreyi kirleten toksik, mutajenik ve karsinojenik olan bileşiklerdir. Kömür işleme yan ürünü ve yağ-petrol dökülmelerinin bir sonucu olarak çevreye yayılırlar. Büyük moleküler ağırlıklı hidrofobik bileşiklerin sucul ortamlarda uzun süre kalmalarının nedeni sudaki çözünürlüklerinin düşük olmasıdır. PAH'ların sudaki düşük çözünürlükleri mikroorganizmalarca kullanılabilirliklerini sınırlandırır. Bu da bileşiklerce kontamine olmuş bölgelerin biyoremediasyonu için potansiyel bir sorun oluşturur. Mikrobiyal olarak sentezlenen sürfektanlar hidrofobik bileşiklerin biyoremediasyon için biyolojik olarak kullanılabilirliklerini hızlandırır. Bu yüzden, biyosüfektanlar PAH'ların çözünürlüğünü artırarak biyoremediasyonda potansiyel olarak kullanılabilirler⁽⁴¹⁾. Bu durum hidrofobik bileşiklerin yüzeyler tarafından emilimlerini artırır ve biyodegradasyon yapan mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliklerini sınırlar. Organik bileşikler, yüzeylere geri dönüşümsüz bağlanırlarsa biyodegradasyon inhibe olur. Biyosüfektanlar yüzeyine bağlandıkları substratların, sudaki çözünürlüklerini artırarak yüzeyden uzaklaştırabilir ve mikrobiyal büyümeyi hızlandırabilmektedirler. Yüzeyler arası gerilimi düşüren süfektanlar yüzeye bağlanmış hidrofobik molekülleri düzenli olarak harekete geçirmede ve biyodegradasyonu gerçekleştirmede etkilidirler. Düşük misel konsantrasyonuna (CMC) sahip olan küçük moleküler ağırlıklı biyosüfektanlar hidrokarbonları, misellerin hidrofobik boşluklarına çekerek çözünürlüklerini

arttırırlar. Bu durum *P. aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipitin, poliaromatik hidrokarbonların degradasyonuna katılmasıyla görülmüştür. Polimerik biyosümfektanların, hidrofobik bileşiklerin çözünürlüklerini nasıl arttırdığı çok fazla bilinmemektedir. Son zamanlarda alasanın (*Acinetobacter radioresistens* tarafından üretilen bir emülsifier) PAH'ların çözünürlüklerini 5-20 kat arttırdığı ve buna bağlı olarak biyodegradasyon oranında da önemli bir artış olduğu gösterilmiştir⁽²⁸⁾. Hidrokarbon kontaminantları, mikrobiyal populasyonlar tarafından birincil mekanizma olarak çevreden uzaklaştırılır. Sümfektanlar, topraktaki organik maddeler tarafından absorbe edilmiş hidrokarbonların serbest kalması için solibilizasyon ve emülsifikasyon ile degradasyona yardım ederler. Sucul ortamda ise hidrokarbon bileşiklerinin konsantrasyonlarını arttırırlar⁽²⁵⁾. Biyosümfektanlar, karışmayan sıvıların ara yüzeyinde birikerek yüzey gerilimini azaltırlar, çözünemeyen bileşiklerin yüzey alanlarını arttırarak biyokullanımlarına ve daha sonra hidrokarbonun biyodegradasyonuna neden olurlar⁽⁴²⁾.

Pseudomonas tarafından üretilen ramnolipid, oktadekan dispersiyonunu ve biyodegradasyonunu hızlandırmıştır. 1L ramnolipid çözeltisinde bulunan oktadekanın % 20'sinin 84 saat içinde mineralize olduğu görülmüştür⁽⁴³⁾. Bakterilerin poliaromatik hidrokarbon kullanma kapasitelerini araştırmada biyosümfektan üretmeleri için naftalen ve penetran kullanılmıştır. Daziel ve arkadaşları⁽⁴⁴⁾, naftalenin sudaki çözünürlüğünün artışından biyosümfektan üretiminin sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum, glikolipid konsantrasyonu, kritik misel konsantrasyonunu aştığında yüzey geriliminde azalma ile gözlemlenmiştir. Biyosümfektanların bu tür bileşiklerin çözünürlüğünün artmasında potansiyel rollerinin olduğu görülmektedir.

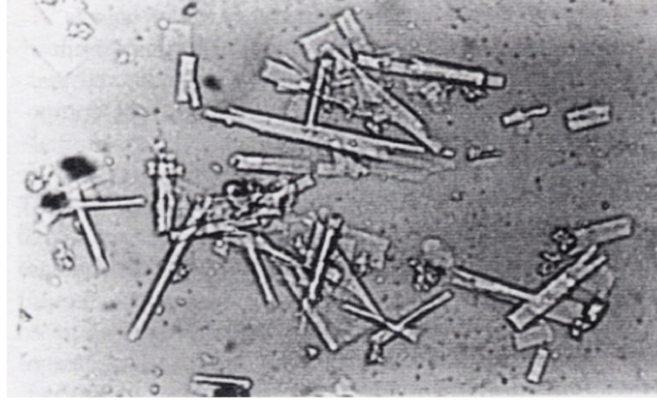
1.1.14. Endüstriyel ve Çevresel Uygulamalar

1.1.14.1. Peyniraltı Sularının Biyoremediasyonu

Biyoremediasyon, tipik olarak nutrientlerle bazen mikroorganizmalarla kontamine olan toprak ya da diğer ortamlardan kirleticilerin biyolojik yolla parçalanarak uzaklaştırılması için geliştirilen bir prosestir. Toprakta kontaminantın biyodegradasyon oranı, mikroorganizma biyokullanımına yani mikroorganizmaların kontaminantı metabolize etmesini etkileyen desorpsiyon, difüzyon ve çözünme gibi faktörlere bağlıdır. Birçok kontaminant suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Bu yüzden kontaminantların biyokullanımları, emülsiyonlaştırıcıların eklenmesiyle gerçekleşebilmektedir. Sıvılar, katılar ve gazlar arasındaki yüzey ve yüzeyler arası gerilim azaltılarak, kontaminantların emülsiyonlar olarak kolayca disperse olmalarına neden olan sentetik ve mikrobiyal sürfektanlar biyodegradasyonda değişik etkilere sahip olabilmektedirler⁽²⁵⁾.

Süt endüstrisi atıklarından olan peyniraltı suları, biyosüfektan üretiminde ucuz ve uygun bir substrat olarak görülmektedir. Süt fabrikası atık suları biyosüfektan üretimi için iyi bir mikrobiyal büyüme sağlamaktadır. Bu çalışmalar biyosüfektan üretiminde ticari ölçekte peyniraltı sularının sentetik ortamlara göre nispeten daha iyi substratlar olduğunu göstermiştir. Ayrıca süt fabrikası atık sularının kullanılması biyosüfektanın ekonomik üretilmesini sağlar ve atık suların değerlendirilmesinde etkilidir⁽⁴⁵⁾. Günümüzde peyniraltı sularının kullanımı, işlenmesi halen önemli bir çevresel sorundur. *Ganoderma lucidum*, *Acetobacter xylinus* ve *Kluyveromyces fragilis* gibi mikroorganizmaların büyümelerinde substrat olarak peyniraltı sularını kullanmaları, bu atık suların kimyasal işlenmesine bir alternatiftir⁽⁴⁶⁾. Dubey ve Juwarkar⁽⁴⁷⁾ *Pseudomonas aeruginosa* BS2 suşunu

biyosüpfektan üretimi için peyniraltı suyu kullanarak geliştirmiştir. 48 saatlik inkübasyonda 0.92 g/ biyosüpfektan gözlenmiştir. BS2 suşu ikincil metabolitler olarak kristal formda biyosüpfektan üretmiştir. İzole edilen biyosüpfektan suyun yüzey gerilimini 72 mN/m ‘den 27 mN/m‘ye düşürmüştür.



şekil 1.12. *Pseudomonas aeruginosa* BS2’den üretilen kristal formdaki biyosüpfektanın mikroskopik görüntüsü ⁽⁴⁷⁾

1.1.14.2. Petrol Kazanımı ve Atık Giderim Yöntemi

Doğal ya da enjekte edilerek yararlı fermantasyon ürünleri sentezleyen mikroorganizmalar petrol kazanımı ve atıkların giderimi için MEOR (Mikrobiyal Hızlandırılmış Petrol Kazanımı) proseslerinde kullanılmaktadır. MEOR proseslerine katılan mikroorganizmalar, biyosüpfektanlar, polisakkaritler, CO₂, metan ve hidrojen gibi çeşitli ürünler üretirler. Mikroorganizmalar biyosüpfektanları ham petrolden, saf hidrokarbonlardan ve hidrokarbon olmayan basit karbonhidrat, asit, alkol gibi substratlardan sentezleme yeteneğindedir. Herhangi bir biyolojik metodun tuzluluk, pH, sıcaklık ve basınç bakımından rezervin çevresel koşullarını dikkate alması

gerekir. Mikroorganizmalar arasında sadece bakteriler MEOR için umut verici adaylar olarak düşünölmektedir. Küfler, mayalar, algler ve protozoalar ne morfolojik özelliklerinden ne de rezervde büyüme şartlarından dolayı uygun değildirler. Biyosürefektan uygulamaları için üç strateji bilinmektedir.

- i. MEOR'yi ticari bir yöntem olarak kullanarak yığında sürekli kültürde üretme ve rezervuara ekleme
- ii. Rezervuar içinde yağ-hücre ara yüzeyine mikroorganizmalar enjekte edilerek biyosürefektan üretimi
- iii. Doğal biyosürefektan üreten bakterilerin büyümesini stimüle etmek için rezervuara seçilmiş nutrientlerin enjeksiyonu⁽²²⁾.

Biyosürefektanlar petrol-yağ giderimini hızlandırmak için kullanılmaktadır. Kimyasal olanlarıyla kıyaslandığında çok selektiftirler, küçük miktarlarda gereklidir ve geniş petrol alanlarında etkilidir. Banat'ın yaptığı bir çalışmada; biyosürefektanların petrol depolayan tankları temizleyebildiği ve emülsifiye ettiği çamurdan hidrokarbonların geri kazanıldığı görölmüştür. İki ton biyosürefektan içeren hücre kültürü 850 m³ petrol tankını temizlemek için kullanılmıştır. Yaklaşık olarak % 91 yani tankın 744 m³'lük alanındaki petrol yeniden satılabilir halde geri kazanılmıştır⁽⁴⁸⁾.

1.1.14.3. Ağır Metal Gideriminde Biyosürefektanlar

Biyosürefektanlardan biri olan ramnolipitin topraktan kadmiyum, kurşun ve çinko metallerini uzaklaştırabildiği gösterilmiştir⁽⁴⁹⁾. Ayrıca ramnolipid 10 kat fazla konsantrasyonda eklendiğinde, kadmiyumun toksisitesini gidermiştir, eşit

konsantrasyonlarda eklendiğinde ise kadmiyumun toksisitesini azaltmıştır. Metal toksisitesini azaltan ramnolipid mekanizması, kadmiyum ramnolipid kompleksi içerebilmelidir. Ramnolipid, kadmiyumun hücre yapısına alınımını değiştirmek için hücre yüzeyiyle etkileşime girer. Surfaktinin glutamat kısımları Mg, Mn, Ca, Ba, Li, Rb gibi metalleri bağlayabilmektedir. % 0.25 oranında surfaktin ile yıkanmış topraktan % 70 oranında Cu ve % 22 oranında Zn uzaklaştırılmıştır⁽²²⁾.

1.1.14.4. Terapötik ve Biyomedikal Alanlarda Biosurfektanlar

Bazı biosurfektanlar sentetik ilaçlara ve antimikrobiyal ajanlara göre güvenli ve etkili terapötik ajanlar olarak uygun alternatifler olabilmektedir. Bu da biosurfektanların insanlar, hayvan hücreleri ve mikroorganizmalar üzerine olan etkisine, ilgiyi arttırmaktadır. Antibakteriyal, antifungal, antiviral ajanlar olmalarının yanısıra major immunomodulator moleküller, anti-adhesiv ajanlar olarak aşı ve gen terapilerinde kullanılma potansiyeline sahiptirler. Biosurfektanlar gen transfeksiyonunda, immunoglobulinlere bağlanmak için ligandlar olarak, bazı aşılarda bağışıklık cevabını artırmak amacıyla adjuvanlar olarak hatta fibrin pıhtı formasyonunda inhibitör ve fibrin pıhtı parçalanmasında aktivatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu moleküller vücut içine takılan tıbbi cihazların üzerinde anti-adhesiv biyolojik tabakalar oluşturmaktadırlar. Böylece hastane enfeksiyonları ve ilaç kullanımı da azalmış olmaktadır⁽²⁴⁾.

Anti-adhesiv ajan olarak biosurfektanlar, biyofilm oluştururlar. Biyofilm, bir yüzeyde koloni oluşturmuş bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır. Sadece bakterileri içermekle kalmaz hatta yüzeyde üretilmiş ekstraselüler maddeleri ve sonuçta oluşan matrikse alınan maddeleri de tanımlar⁽⁵⁰⁾. Biyofilm oluşumu, serbest

mikroorganizmaların bir yüzeye bağlanması ile başlar. İlk koloniler başlangıçta yüzeye zayıf Van der Waals bağlarıyla bağlanırlar. İlk koloniler farklı adhezyon bölgeleri sağlayarak diğer mikroorganizmaların gelmesini kolaylaştırmaktadır ve matriks oluşumunu başlatırlar. Mikroorganizmalar salgılanan ekstraselüler polimerik bileşikler ya da ekzopolisakkaritlerin oluşturduğu matrikse tutunurlar ve korunurlar. Matriks, olumsuz çevre koşullarına karşı hücreleri korur ve aralarında biyokimyasal sinyallerle iletişimi kolaylaştırır⁽⁵¹⁾.

Bazı türler yüzeylere kendileri bağlanamaz. Fakat kendilerini matrikse ya da doğrudan ilk bağlanan kolonilere bağlarlar. Kolonileşme süresince, hücreler kuarum sensing (mikroorganizmaların birbirleriyle iletişim kurması) aracılığıyla iletişim kurabilmektedirler. Kolonileşme başladığında hücre bölünmeleri ile biyofilm büyür. Biyofilm oluşumunda son safha gelişme olarak bilinir. Sadece şeklinde ve büyüklüğünde değişimler olabilmektedir. Biyofilmdeki bu gelişme hücreleri, antibiyotiklere karşı daha dirençli yapmaktadır. Bazı durumlarda antibiyotik direnci 1000 kat artabilmektedir⁽⁵²⁾.

Birçok lipopeptid yapıdaki sürfektan, etkili antibiyotiklerdir. Bunlar; *B. subtilis*'in sentezlediği siklik lipopeptid (surfaktin veya subtilisin), *B. brevis*'in sentezlediği siklosimetrik dekaeptid olan gramisidin S antibiyotiği ve *B. polymyxa*'nın sentezlediği polimiksindir. Bir ya da daha fazla peptid antibiyotiğin sporilasyonun erken safhalarında sentezlendiğine ve bunun *Bacillus* cinsi birçok bakteriye mahsus olduğuna dikkat edilmelidir. *B. subtilis*'ten elde edilen surfaktin, antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin yanısıra Ehrlich Assit Karsinoma hücrelerine karşı antitümör, HIV-1 ve HS1 virüslerine karşı antiviral aktivite göstermektedir⁽²⁴⁾.

Pseudomonas aeruginosa AT10'dan elde edilen ramnolipid; *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Alcaligenes faecalis* (32 mg/mL), *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* (16 mg/mL) ve *Staphylococcus epidermidis* (8 mg/ mL) bakterilerine; mükemmel antifungal özelliği ile *Aspergillus niger* (16 mg/mL), *Chaetium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans* (32 mg/mL) funguslarına ayrıca *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani* (18 mg/mL) bitki patojenlerine karşı inhibitör aktivite göstermiştir. Sophorolipidler ve ramnolipidlerin bitki ve tohum patojeni funguslara karşı etkili antifungal ajanlar olduğu ifade edilmiştir. 200 mg/L ramnolipid ve 500 mg/L sophorolipid *Phytophthora* sp. ve *Pythium* sp.'nin miselyum gelişimini % 80 oranında inhibe etmişlerdir. *Candida antarctica*'dan elde edilen glikolipid sürfektan mannosylerythritol lipid (MEL), gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermiştir⁽⁵³⁾. MEL'in insanlarda promiyelositik lökemiya HL60 hücre dizisinde hücre farklılaşmasını azalttığı görülmüştür. *Lactobacillus* cinsine ait türlerin ürettiği surlaktin ise enterik bakterilerin dahil olduğu birçok patojene karşı anti-adhesiv etki göstermektedir⁽²⁴⁾.

Surfaktin, PVC levhalarında ve plastik üretral tüplerde *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis*'in biyofilm oluşumunu azaltır. Antibiyotikler, genellikle planktonik hücrelerle kıyaslandığında biyofilmlere karşı daha az etkili olurlar. Biyofilm oluşumunu bozan, adhezyonu azaltan biosürfektanlarla antibiyotiklerin birlikte kullanımı yeni bir antimikrobiyal stratejiyi ifade eder⁽⁵⁴⁾. Biosürfektanların bu kadar özelliği olmasına rağmen yüksek üretim-ekstraksiyon maliyeti ve insan vücudunda toksik etkisi olup olmadığı hakkında yeterince bilgiye sahip olunmadığından terapötik ve medikal alanda kullanımları halen sınırlıdır. Ayrıca biosürfektanların kullanımı için insanlar ve

doğal mikrobiyota üzerinde yapılan araştırmaların birçok biyomedikal ve sağlıkla ilgili kurumlar tarafından onaylanması gerekmektedir⁽²⁴⁾.

1.1.14.5. Gıda Endüstrisinde Biosürefektanlar

Bu mikrobiyal bileşikler gıda endüstrisinde özellikle emülsiyonlaştırıcı, köpürtme, ıslatma ve çözücü, anti-adhesiv ve antimikrobiyel ajanlar olarak yararlı özellikler sergilemektedirler. Biosürefektanlar, gıda endüstrisinde gıda katkı maddesi olarak birçok uygulamalara sahiptir. Lesitin ve türevleri, gliserol, sorbitol içeren yağ asidi esterleri veya son zamanlarda sentezle birleştirilen oligopeptid içeren monogliseritlerin etilen glikol ve etil oksitlenmiş türevleri dünya genelinde emülsifier olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunlar kıvam ve yoğunluk ayarlamalarında veya değişik fazların dağıtımında çoğunlukla tercih edilmektedir. Fırıncılık ve et ürünlerinde kısmen parçalanmış yağların emülsifikasyonunda kullanılırlar⁽⁵⁵⁾. Bakteriyal biyofilmler, gıda endüstrisinde gıda bozunmasına ve hastalık bulaşmasına yol açan potansiyel kontaminasyon kaynağı yüzeyler olarak ortaya çıkmaktadırlar. Bu yüzden gıda işletmecileri *Salmonella* ve hatta (birçok ülkede) *Listeria monocytogenes* gibi patojenler için sıfır tolerans göstermektedirler. Bağlanmış bir hücre, biyofilm gelişiminde önemli olabilmektedir. Böylece gıda yüzeylerine bağlanmalarını kontrol etme, tüketiciye kaliteli ve güvenli ürünler sağlamada gerekli bir basamaktır⁽⁵⁰⁾. *Streptococcus thermophilus*'un ürettiği biosürefektan, pastörizasyon cihazlarının ısı değişim levhalarında bozunma kontrolü için kullanılmakla birlikte, bozunmadan sorumlu diğer *Streptococcus* cinsine ait türlerin koloni oluşturmasını da geciktirmektedir. Yağ damlalarının bir araya toplanmasının kontrolü, havalandırılmış sistemleri stabilize etme, sıvıların kıvamını

ayarlama, nişasta içeren ürünlerin raf ömrünü uzatma, yağlı ürünlerin kıvamını ve yoğunluğunu düzenleme gibi işlevleri vardır. Ramnolipid ilavesiyle hamur stabilitesinde, kıvamında, hacminde ve unlu mamullerin korunmasında bir gelişme elde edilmiştir. Fırıncılıkta ve dondurma yapımında biyosürefektanlar kıvamı ayarlama, bayatlamayı geciktirmede ve tat vermek için katılan yağların çözünürlüğünde etkilidirler. Hatta yağ stabilizatörü ve yağların yemek pişirirken sıçramalarını engelleyici ajan olarak kullanılmaktadırlar⁽⁵⁴⁾.

1.1.14.6. Kozmetik Alanında Biyosürefektanlar

Biyosürefektanlar kozmetik sanayinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yüzey aktif maddeleri cilt bakım ürünlerinde ve şampuanlarda bulunmaktadırlar⁽⁵⁵⁾. Biyosürefektanlar nemlendirici ve cilde uygunluk gibi özelliklerinden dolayı kişisel bakım ürünlerinde yerini almaktadır⁽¹⁸⁾.

1.1.14.7. Tarım Alanında Biyosürefektanlar

Biyosürefektanlar tarımsal alanlarda gübre ve pestisidlerin eşit dağılımında, hidrokarbon yapıdaki organik kimyasalların çözünmesinde ve topraktaki ağır metallerin hidrofilyzasyonunda kullanılmaktadır. Bu uygulamalar yanında biyosürefektanlar endüstriyel kirliliğin, pestisidlerin giderilmesinde⁽²⁵⁾ ve ayrıca biyofungusid olarak kullanılmaktadırlar. Mısır ve diğer bitki patojenlerinin kontrolünde⁽²⁵⁾ ramnolipid, zoosporik bitki patojenlerine karşı (*Pythium*, *Phytophthora*, *Plasmopara*) litik aktivite sergileyerek membran bütünlüğünü bozmaktadır⁽⁵⁶⁾.

1.1.14.8. Biyosüpfektanların Diğer Kullanım Alanları

Farklı moleküler yapıları ve yüzey özellikleri sayesinde biyosüpfektanlar çok farklı alanlarda ve farklı şekillerde kullanılmaktadır. Madencilik alanında inorganik minerallerin dispersiyonunda, kömürün işlenmesinde, kireçtaşı flokülasyonunda; kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, inşaat sektörü, tekstil, boya, deri ve metal endüstrilerinde de biyosüpfektan kullanımına rastlanmaktadır⁽⁵⁷⁾.

1.1.15. Biyosüpfektanların Sentetik Süpfektanlara Göre Avantajları

Mikrobiyal süpfektanlar suda karışabilir ya da yağlı substratları kullanarak gelişen mikroorganizmalar tarafından sentezlenen yüzey aktif metabolitleri olup ya mikrobiyal hücre yüzeylerine yapışıp kalırlar ya da kültür ortamına salınırlar. Biyosüpfektanlar yüksek spesifiteleri gibi avantajlarından dolayı bazı uygulamalarda sentetik süpfektanlar kadar etkili olabilirler. Birçok sentetik ve mikrobiyal süpfektan, biyoremidasyon prosesinde biyolojik olarak parçalanabilme amaçlı kullanılmaktadır. Kimyasal süpfektanlarla aynı mekanizmaları kullanarak yüzey ve yüzeyler arası gerilimi azaltan karakteristik özelliklere sahiptirler. Biyosüpfektanların eşsiz özellikleri kimyasal olarak sentezlenen süpfektanların yerine birçok endüstriyel alanda kullanılmasına imkan vermektedir. Biyosüpfektanlar sentetik süpfektanlarla kıyaslandığında birçok avantaja sahiptir. Bunlardan bazıları;

- i. Biyolojik olarak parçalanabilme
- ii. Genellikle düşük toksisiteye sahip olma
- iii. Canlı dokulara zararsız ve sindirilebilir olmaları kozmetik, ilaç ve gıda sanayinde katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verir.

iv. Ham maddelerden elde edilebilme; biyosürefektanlar kullanılabilir ucuz ham maddelerden büyük miktarlarda üretilebilirler. Karbon kaynağı olarak hidrokarbonlar, karbonhidratlar ve lipidler ayrı ya da birlikte kullanılabilir.

v. Makul ürün ekonomisi; uygulamalara bağlı olarak biyosürefektan hatta endüstri atıklarından ve yan ürünlerden de üretilebilmektedir.

vi. Çevresel kontrolde kullanımı; biyosürefektanlar endüstriyel emülsiyonları işlemede, yağ-petrol atıklarının kontrolünde, endüstri atıklarının biyodegradasyon ve detoksifikasyonda ve kontamine olmuş toprakların biyoremediasyonunda etkili bir şekilde kullanılabilir.

vii. Özgünlük; biyosürefektanlar spesifik işlevsel gruplarıyla kompleks organik moleküllerdir ve işlevlerinde özgündürler. Bu sayede spesifik kirleticilerin detoksifikasyonu, endüstriyel emülsiyonların de-emülsifikasyonu, kozmetik, ilaç ve gıda uygulamalarında özel bir alan olacaktırdır.

Dezavantajlarıyla ilgili olarak problemlerden birisi, biyosürefektanların büyük miktarda ve ucuz üretimidir. Özellikle petrol ve çevresel uygulamalarda büyük miktarlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu problemin üstesinden gelebilmek için atık maddelerin kullanımı ve aynı zamanda bunların kirletici etkisiyle mücadele eden, maliyeti dengeleyen prosesler birleştirilmelidir⁽⁵⁸⁾.

1.1.16. Biyosürefektanların Ticari Üretimi

Son yıllarda biyosürefektan üretimi yoğun olarak çalışılmaktadır. Üretimi, özellikleri ve türleri ile ilgili birçok veri bulunmaktadır. Ticari olarak ilgi çekici birçok özelliğe ve kimyasal benzeri olan sentetiklerle kıyaslandığında belirgin avantajlara sahip olmalarına rağmen; düşük verim, yüksek üretim maliyetinden

dolayı bu bileşikler ekonomik olarak kimyasal sürfektanlarla rekabet edemezler. Büyük ölçekte üretmek ve geri kazanmak amaçlanmaktadır. Her mikrobiyal metabolitin üretim ekonomisi üç temel faktörle yönetilir.

- i) başlangıçtaki ham madde maliyeti,
- ii) uygun kullanım ve iyileştirme prosedürü, ekonomik ürün ve
- iii) sentezleyen mikroorganizmaların üretme verimi.

Böylece biyosürfektan üretimi ile ilgili ekonomik kısıtlamalar ışığında, üç temel stratejinin üretim maliyetini daha ucuz hale getirdiği kabul edilmiştir. Atık substratları kullanarak maliyeti düşürmek, maksimum ürün ve etkili iyileştirme yapabilmesi için uygun kültür koşullarını içeren biyoprosesleri geliştirmek, verimi arttırmak için mutant ve rekombinant bakterileri fazlaca üretmek biyosürfektan verimini arttıran faktörlerdir⁽⁴⁵⁾. Üretim maliyetini azaltmak için ürün verimini ve üretim hızını arttırmak, ekonomik yöntemler geliştirmek, mikroorganizmaların gelişmesi ve biyosürfektan üretimi için ucuz, yenilenebilir kaynaklar kullanmak gibi farklı yollar araştırılmaktadır. Ucuz ham madde seçeneği kapsamlı ekonomik proses için önemlidir. Çünkü kullanılan ucuz ham madde % 50 üretim maliyetinden sorumludur ve atık işleme ile maliyeti azaltmaktadır⁽¹⁹⁾.

1.1.17. Ucuz Substratlar Kullanılarak Biyosürfektan Üretimi

Pek çok biyoteknolojik proseslerle biyosürfektan eldesinde üretim maliyeti büyük bir engel oluşturmaktadır. Ham madde miktarı ve cinsi üretim maliyetini büyük ölçüde etkiler. Ham maddelerin biyoteknolojik proseslerde % 10 ile 30 oranında toplam üretim maliyetinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle maliyeti azaltmak için düşük maliyette ham maddelerin kullanılması

istenilir. Bitkisel yağlar, yağ fabrikası atıkları, melas, hayvansal yağlar, petrol atıkları, kızartma yağlar, zirai atıklar, petrol atıkları, süt endüstrisi atık suları, peyniraltı suları ve içki fabrikası atıkları çeşitli ucuz ham maddeler olup mikroorganizmaların gelişmesi ve biyosüpfektan üretiminde büyük bir potansiyele sahiptir⁽⁴⁵⁾. Eğer organik kirleticiler içeren endüstriyel veya kentsel atıklar biyosüpfektan üretimi için substrat olarak kullanılırsa iki kat kazanç elde edilebilir. Kirletilmiş sular işlenerek, değerli bir ürün olan biyosüpfektan üretilmiş olur. Bu yaklaşım atık suların işleme maliyetini azaltır ve biyosüpfektan satışı sayesinde olası bir kazanç oluşturur⁽⁵⁸⁾. Şimdiye kadar deneysel boyutta mikroorganizmaların kùltivasyonu ve süpfektan üretimi için çeşitli kaynaklardan (özellikle endüstriyel atıklar) yenilenebilir substratlar yoğun olarak çalışılmaktadır⁽⁴⁶⁾.

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında süt endüstrisi atık sularından izole edilecek farklı mikroorganizmalar ile peyniraltı sularının biyolojik kullanılabilirliği, biyosüpfektan eldesi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikasından alınan atık su örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmıştır. İzolatlar hem süt endüstrisi atık sularının iyileştirilmesinde hem de biyosüpfektan madde üretiminde kullanılmıştır. Tez kapsamında biyosüpfektan madde üretiminde optimum koşullar (pH etkisi, NaNO_3 konsantrasyonu, karbon kaynağı etkisi) kesikli sistemde belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar ile modifiye edilen peyniraltı suları biyosüpfektan madde üretiminde temel besiyeri olarak kullanılmıştır. Her bir izolattan elde edilen biyosüpfektanların karakterizasyonu ve biyokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Ayrıca izole edilen mikroorganizmalar ile peyniraltı sularının biyodegradasyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Bu tez çalışması ile çevre için önemli bir tehdit unsuru olan peyniraltı suları biyolojik olarak giderilmiştir. Sonuç olarak sadece yurt dışından temin edilebilen biyosüpfektan maddelerin Türkiye’de üretilebilecek olması bu çalışmanın ticari uygulanabilirliğini de arttırmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalar, Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan alınan su örneklerinden (steril şişe içerisine) izole edilmiştir. 0.1 ml örnek, L bagetle Nutrient agar besiyerine aktarılmış ve 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerin saflaşana dek çizgi ekimleri yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların koloni ve mikroskopik özellikleri incelenerek, biyokimyasal testler (IMViC, hemoliz, okdidaz, gram boyama vb.) ile identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon için gerekli biyokimyasal testler A.P.I ile Setti'e⁽⁵⁹⁾ göre gerçekleştirilmiştir. Stok bakteri kültürlerinin hazırlanması amacı ile mikroorganizmalar yatık Nutrient Agar besiyerine ekilerek 48 saat süreyle üretilip bu süre sonunda daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Tüm ekim ve pasajlama işlemleri steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

2.2. Mikroorganizmaların Üretilmesi

Mikroorganizma üretimi için Zhang ve arkadaşları⁽⁶⁰⁾ tarafından önerilen temel besiyeri Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri kullanılmıştır. Mineral Salt Medium bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir. MSM besiyerinin pH'ı 6.8 olarak ayarlanmıştır ve 121°C'de 1 atm basınç altında 30 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çizelge 2.1. MSM besiyeri içeriği (g/L)

NaNO ₃	4.0
NaCl	1.0
KCl	1.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
KH ₂ PO ₄	3.0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.0
MgSO ₄	0.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.008
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.75
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.08
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.075
MnSO ₄ .H ₂ O	0.75
H ₃ BO ₃	0.15
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.05

2.3. Ekim ve Kültürasyon

Daha önce hazırlanan stok kültürleri kullanılarak mikroorganizmalar steril MSM kültürlerine aktarılmıştır. Bu amaçla tüm izolatlardan Mc Farland 2 (%1'lik H₂SO₄ çözeltisinden 9.8 ml + %1'lik BaCl₂ çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklıkta steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ilave edilerek homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan MSM besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon, 35°C'de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (Heidolph Ins., Unimax 1010) gerçekleştirilmiştir.

2.4. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Varlığının Saptanması

Mikroorganizma kùltùrlerinde biyosùrfektan üretiminin belirlenmesi için Bodour ve arkadaşlarının rapor ettiği “drop-collapse” yöntemi kullanılmıştır⁽⁶¹⁾. Bu yöntem için 96 kuyucuğa (microwell plate) sahip bir platform kullanılmıştır. Kuyucuklar ilk olarak 7 µl mineral yağ ile kaplanmıştır. Kontrol sıvısı olarak da steril su ve ekim yapılmamış besiyeri kullanılmıştır. Kùltürler 10000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında süpernant Millipore Filtrasyon sistemi ile steril edilmiştir. Elde edilen son filtrat, biyosùrfektan varlığı için “drop collapse” yöntemi ile test edilmiştir. Su ve filtratlardan alınan 25µl’lik örnekler 45°C’lik açılı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma yada stabil kalma durumları gözlenerek biyosùrfektan varlığı belirlenmiştir.

2.5. Kùltùrlerde Biyosùrfektan Miktarının Ölçülmesi

Kùltùrlerde biyosùrfektan miktarı, Saha ve Brewer’in önerdiği fenol sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁶²⁾. İlk olarak kùltürler 10000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernant Millipor seti ile filtre edilmiştir ve filtrat biyosùrfektan miktarının tayininde kullanılmıştır. Bu amaçla 1.0 ml örnek, 1.0 ml fenol (% 5) ve 3.0 ml H₂SO₄ (% 98) vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Oluşan renkli (sarı-turuncu) bileşik spektrofotometrik olarak 480 nm’de ölçülmüştür. Standart L-Ramnoz çözeltileri (0.1-1.0g/L) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi, biyosùrfektan madde miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında maksimum biyosülfektan üretimi elde edebilmek için çeşitli sistem parametrelerinin biyosülfektan üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH'nın, NaNO₃ konsantrasyonunun ve karbon kaynağının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi belirlenmiştir. Peyniraltı suyu, elde edilen veriler doğrultusunda optimum koşullar ile modifiye edilmiştir.

2.5.1. pH Etkisi

Biyosülfektan üretimi üzerine pH etkisini belirlemek için MSM besiyeri pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 8.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir besiyeri sterilize edildikten sonra mikroorganizma ekimi yapılmıştır ve 35 °C'de 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda biyosülfektan miktarı belirlenmiştir.

2.5.2. Farklı Karbon Kaynaklarının Biyosülfektan Üretimi Üzerine Etkisi

Mikroorganizmalar tarafından kullanılan karbon kaynağının biyosülfektan üretimi üzerine etkisini belirlemek amacı ile besiyeri bileşiminde farklı karbon kaynakları (glukoz, laktoz, pepton ve mineral yağ) %1 oranında kullanılmıştır. Karbon kaynaklarının biyosülfektan üretimi üzerine etkisi, farklı karbon kaynağı içeren kültürlerde biyosülfektan miktarının ölçümü ile belirlenmiştir.

2.5.3. Farklı Azot Kaynaklarının Biyosüpfektan Üretimi Üzerine Etkisi

Mikroorganizmalar tarafından kullanılan azot kaynağının biyosüpfektan üretimi üzerine etkisini belirlemek amacı ile besiyeri bileşiminde farklı azot kaynakları NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NaNO_3 ve KNO_3 (3.0g/L) kullanılmıştır ve biyosüpfektan üretimi için uygun azot kaynağı saptanmıştır.

2.5.4. NaNO_3 Konsantrasyonunun Biyosüpfektan Üretimi Üzerine Etkisi

Biyosüpfektan üretimi üzerine en uygun azot kaynağının NaNO_3 olduğu belirlenmiştir. NaNO_3 konsantrasyonunun etkisini belirlemek için MSM besiyerine farklı konsantrasyonlarda 1.0, 3.0 ve 6.0 g/L olacak şekilde NaNO_3 ilave edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamından alınan örneklerde biyosüpfektan miktarı tayin edilmiştir.

2.5.5. Etilen Diamin Tetraasetikasit (EDTA) Ajanının Biyosüpfektan Üretimi Üzerine Etkisi

Hücre büyümesiyle bağlantılı olarak hücre duvarı geçirgenliğini etkilediği düşünülen EDTA, besiyerine ekim yapılmadan önce (0.2 g/L, 1.0 g/L ve 2.0 g/L) farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde eklenmiş ve ekim yapılmıştır.

2.6. Peyniraltı Sularından Biosürefektan Eldesi

Biosürefektan üretiminin optimum olduğu sistem parametreleri (pH, karbon kaynağı, NaNO₃ ve edta konsantrasyonu gibi) belirlendikten sonra, optimum koşullar uygulanarak mikroorganizmalar ile atık sulardan maksimum biosürefektan üretimi sağlanmıştır. Peyniraltı sularından biosürefektan eldesi için, atık su örnekleri besiyeri olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmalar, 35 °C'de 10 gün süre ile atık suyu içeren besiyerinde inkübe edilerek, kültürlerdeki biosürefektan miktarı fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Kültür ortamından biosürefektanın ayrıştırılması için, kültürler 5000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Biosürefektan presipitasyonu için santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant, 6 N H₂SO₄ ile çözelti pH'ı 2.0 noktasına ulaşana dek asidifiye edilmiştir. Çökelti kloroform/metanol (1:1, v/v) karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Evaporatör ile çözücünün ortamdan uzaklaştırılması sağlanarak, elde edilen ekstrakt toplanmıştır ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.7. Biosürefektan Karakterizasyonu

2.7.1. Fourier Transform Infrared Analysis (FTIR)

Biosürefektan yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi için FTIR spektrumları alınmıştır. Kuru biosürefektan örnekleri (1.0 mg) KBr (0.1 g) ile karıştırılarak pellet hale getirilmiş ve FTIR spektrumları alınmıştır.

2.7.2. Yüzey Gerilimi

Biyosürefektanın yüzey gerilimi üzerine etkisini belirlemek üzere kültürlerden elde edilen süpernatant sıvılarının yüzey gerilimi K6 tansiyometre (Krüss GmbH, Hamburg, Almanya) kullanılarak halka metodu ile belirlenmiştir. Farklı karbon kaynağı içeren her bir besiyerinden iki adet örnek incelenmiştir. Kontrol sıvısı olarak ekimi yapılmamış besiyeri kullanılmıştır. Her uygulamanın üç paraleli de aynı şekilde sürdürülmüş ve ortalama değerler alınmıştır.

2.7.3. Emülsiyon Testi

Emülsifiyer ajan olarak kabul edilen biyosürefektanın emülsiyon indeksinin (E_{24}) belirlenmesi için 2.0 ml süpernatant ve 3.0 ml ksilen, kerosen, toluen ve mineral yağ bir vorteks yardımıyla 2 dakika süre ile karıştırılmıştır. 24 saat bekletilen çözeltinin toplam yüksekliği ve emülsiyon tabakasının yüksekliği belirlenerek Eşitlik 1'den biyosürefektanın emülsiyon indeksi hesaplanmıştır⁽⁶³⁾.

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{Emülsiyon tabakasının yüksekliği}}{\text{Çözeltinin toplam yüksekliği}} \times 100 \quad (1)$$

2.7.4. Antimikrobiyal Aktivite

Biyosürefektanlar, bakteriyel membran bütünlüğünü bozarak antibakteriyel aktivite sergilemektedirler. Biyosürefektanların antibakteriyel aktivitelerini belirlemek için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Escherichia coli* DM, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus*

aureus COWAN 1, *Klebsiella pneumonia* FMC 5, *Proteus vulgaris* FMC 1 mikroorganizma suşları ile disk difüzyon metodu⁽⁶⁴⁾ kullanılmıştır. Kloroformda çözünen biyosürefektan örnekleri mikropipet ile 6 mm çapındaki boş steril antibiyotik disklerle 20 mg/mL emdirilmiştir. Bakteri (10^7 - 10^8 adet/ ml) suşları, Müller Hinton Agara ekilmiştir. Ekimi yapılan bakteri kültürleri üzerine biyosürefektan emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C’ de 1 saat bekletildikten sonra bakteri aşılama plaklar $37\pm 0.1^\circ\text{C}$ de $18-24\pm 2$ saat süre ile inkübe edilmiştir⁽⁶⁴⁾. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir.

Biyosürefektanların antifungal etkilerini belirlemek için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen patojen maya türleri olan *Candida albicans* FMC 17, *Candida krusei* ATCC 6258 ve bir küf türü olan *Aspergillus flavus* ATCC 9807 için de biyosürefektanların antifungal etkisine bakılmıştır. Yine antibakteriyal etki de olduğu gibi disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Maya ($0.5-2.5\times 10^6$ adet/ml) suşları Sabouraud Dextrose Agara homojen bir şekilde aşılamaştır. Maya kültürleri üzerine biyosürefektan emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Maya aşılama plaklar ise $25\pm 0.1^\circ\text{C}$ ’de $24-37$ saat süre ile inkübe edilmiştir⁽⁶⁴⁾. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz biyosürefektanların, bitki patojeni funguslara karşı antifungal aktivitelerini belirlemek için Ankara Tarım İl Müdürlüğü’nden temin edilen *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 ve *Fusarium heterosporium* ATCC 15625 kullanılmıştır. Antifungal çalışma kapsamında biyosürefektanların, Potato Dekstroz

Agar ortamında geliştirilen bitki patojeni fungusların misel gelişimlerine karşı etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla kloroform içerisinde çözünen BS-I, BS-II ve BS-III örnekleri Potato Dekstroz Agar ortamına (%5) ilave edilmiştir. Kontrol grupları ise biyosürefektan ilave edilmemiş besiyerlerinde test edilmiştir. 7 günlük *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium inflexum* ve *Fusarium heterosporium* kültürlerinden 5 mm genişliğinde kesilen diskler, her petri kutusuna ayrı ayrı ters çevrilerek yerleştirilmiş ve 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Koloni çapı ölçülerek ve misel inhibisyonu yüzde olarak hesaplanmıştır⁽⁶⁵⁾. Her uygulamanın üç paraleli de aynı şekilde sürdürülmüş ve ortalama değerler alınmıştır.

2.7.5. Hemoliz Aktivitesi

Hemolitik aktivite testi için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından temin edilen kan örnekleri 10 (mL) her bir izolata ait biyosürefektan (25 µg/mL) ile 37°C'de 12 saat süre ile etkileştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında insan kanı 1000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantta, hemoglobin analizi Heco cihazı ile belirlenmiştir.

2.7.6. Ağır Metal Giderimi

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürefektan maddeler, ağır metal kontaminasyonunun giderilmesinde de önemli bir role sahiptir. Biyosürefektanların, ağır metallere bağlanıp bağlanmadığına bakılmıştır. Bunun için 1 g/L olarak tartılan biyosürefektanlar, 60 mg/L olarak hazırlanan Pb, Cu, Fe, Zn, Hg ve Cd ağır metal çözeltileri ile etkileştirilmiştir. Her bir süspansiyon orbital karıştırıcıda (Nuve SL

350) 200 rpm'de karıştırılmış ve süre sonunda örnekler 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant 0,45 µm filtre kağıdından filtre edilmiştir. Filtrat biyosürefektan tarafından tutuklanan metal miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Her bir ağır metal ile 20-60 mg/L derişimlerinde çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Etkileşim öncesi ve sonrasında çözeltideki Pb, Cu, Fe, Zn, Hg ve Cd metal derişimleri Atomik Adsorpsiyon Spektrofotometre (ATI Unicam 929 AAS) kullanılarak belirlenmiştir. Bu yolla çalışmamızda saflaştırılan biyosürefektanların ağır metal kirliliğinin giderilmesindeki performansları test edilmiştir.

2.8. Peyniraltı Atık Sularının Biyodegradasyonu

Optimum koşullarla modifiye edilmiş rafineri atık suyu ve her bir izolata ait hücre kültürünün 10 gün 35 °C'de etkileştirilmesi ile degradasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Peyniraltı atık sularının biyodegradasyon yolu ile arıtılması sürekli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmalar ile peyniraltı sularının biyodegradasyonu kesikli sistemde 12 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Peristaltik pompa yardımı ile reaktör içerisine sabit akış hızında (0.5 mL/dakika) peyniraltı suyunun girdisi sağlanmıştır. Sistemden çıkan atık su örnekleri bir rezervuar içerisinde toplanarak belirli zaman aralıklarında (bir saat ara ile) rezervuar içerisinden alınan örnek karbonhidrat, protein ve yağ tayini için değerlendirilmiştir. Peyniraltı suyunun degradasyon öncesi ve sonrasında içerdiği protein miktarı biüret, karbonhidrat miktarı 3-5 Dinitrosalisilik asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir⁽⁶⁶⁾. Yağ miktarını tayin etmek için de gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. Kromatografi öncesi peyniraltı suyu 2:1, v/v kloroform-metanol ile ekstrakte

edilmiştir. Protein, karbohidrat ve amino şekerler gibi lipit olmayan safsızlıklar % 0.88'lik KCI ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Total lipidi içeren kloroform fazı, döner buharlaştırıcıda 40°C'de 20 ml hacme getirilmiştir. Gaz kromatografisi koşulları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PAH ve türevlerinin analizinde kullanılan GC koşulları

Kolon	DB-1 CA kapiler kolon
Dedektör	Alev İyonizasyon Detektör
Taşıyıcı Gaz	Azot, 1 mL/dak
Analiz Süresi	70 dak.
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Fırın Sıcaklığı	40° C (1 dak.) 4°C/dak.-200°C(10 dak.)

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Ankara Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan alınan su örneklerinden beş farklı koloni tipi ayırt edilmiştir. Kolonilerden alınan örneklerden, saflaşana dek çizgi ekimler yapılmış ve elde edilen izolatların biyokimyasal morfolojik özellikleri incelenmiştir. İzolatların biyosürefektan üretebilme yetenekleri test edilmiştir. Biyosürefektan üreten üç izolatın identifikasyonları, BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System kitleri ve Analitik Profil İndeks (API) kitleri ile VITEK 2 cihazı (Biomerieux) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İdentifikasyon sonrasında izolatlar *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır. İki bakteriye ait biyokimyasal özellikler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Tüm izolatların stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. İzole edilen bakteriler ve biyokimyasal özellikleri (B: Beyaz, S: sarı)

	<i>M. luteus</i>	<i>B. cepacia</i>
Hücre morfolojisi	Kok	Çubuk
Koloni tipi	S	S
Gram Reaksiyon	+	-
Oksidaz	+	+
42°C’de üreme	+	+/-
H ₂ S	-	-
Pigment	S	B
Laktoz	-	+/-
İndol	-	-

3.1. 1. *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepecia*)

Burkholderia cepacia, Walter Burkholder tarafından 1949'da soğan köklerinde çürümeye neden olan bitki patojeni olarak keşfedilmiştir. 1950'lerde ise insan patojeni olarak tanımlanmıştır. 1980'lerde ise kistik fibrozisli hastalarda ilk kez tanımlanmıştır⁽⁶⁷⁾. *B. cepacia* gram negatif bir bakteridir. Koloni uzunluğu 1.6-3.2 µm'dir. Zorunlu aerobtur ve optimum sıcaklık aralığında (30-35°C'de) kemoorganotroftur. Toprakta, suda, bitkiler üzerinde bulunmaktadır ve nemli yerlerde daha fazla yaşayabilmektedir. İnsan ve bitki patojenidir. Aynı zamanda biyokontrol ve biyoremediasyon ajanı olarak da kullanılan çok yönlü bir mikroorganizmadır. Çünkü bitki patojeni olan funguslara karşı birçok antibiyotik üretir. Toksik bir fungusid değildir. Bu yüzden suyu ve toprağı kirletmez. *B. cepacia* herbisid ve pestisidlerin yapısında bulunan hidrokarbonları metabolize etme yeteneğine sahiptir. Bu toksinlerle kontamine olan alanlara bu mikroorganizmanın eklenmesiyle çevrenin temizlenmesi mümkündür. *B. cepacia* kimyasalları parçalamada en etkili mikroorganizmalardan biridir.

Ne yazık ki, bu bakterinin yaygın kullanımı dezavantajlı olabilmektedir. Birincisi birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanabilir. Penisilinli ortamda gelişebildikleri görülmüştür. Kolayca mutasyona uğrayabilir ve genomu sayesinde yeni ortamlara adapte olabilir. 1970'lerin başında insan patojeni olarak idrar yollarında ve solunum yollarında enfeksiyonlara neden olduğu bulunmuştur. 1980'lerde kistik fibrozisli hastalarda hayatı tehdit eden pulmoner enfeksiyonlarına neden olduğu görülmüştür. *B. cepacia*'nın neden olduğu komplikasyonlarda ölüm oranı % 80'dir⁽⁶⁸⁾.

3.1.2. *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*)

Micrococcus luteus gram pozitif bir bakteridir. Koloni çapı 0.5-3 mikrometre olup kok şeklindedir. Flagellasız (hareketsiz olduğu için), katalaz pozitif, zorunlu aerobtur. Spor formları yok, tek, ikili veya kümeler halinde bulunurlar. Koagülaz negatiftir. Basitrasine duyarlıdır. *M. luteus* parlak sarı renkte pigment oluşturur. Toprakta, suda, havada, memelilerin derilerinde normal florada bulunurlar. *M. luteus* insan, hayvan derilerinden, su ve topraktan izole edilebilirler. Süt ürünlerinde bozulmaya neden olmaktadır. Bu bakteri az suda ve yüksek tuzlulukta gelişebilir^(69,70). *Micrococcus*'ların birçok suşu 100°C'de gelişebilir. Bu mikroorganizmalar tuza dayanıklı oldukları için tuzlu besinlerde de bulunurlar. Ayrıca üst solunum yollarında, orta farinkste, ağız ve mukozada koloni oluşturur. *M. luteus* patojenik olmamasına rağmen genellikle kontaminant olarak düşünülmektedir. İmmün sistemi zayıf olanlarda örneğin AIDS'li bireylerde septik şok ya da penömoniye neden olabilmektedir⁽⁶⁹⁾. *M. luteus* inorganik H₂S, sülfür, thiyosülfat, H₂ ya da diğer organik bileşikleri suksinat, malat ve bütirat gibi bileşikleri enerji kaynağı olarak kullanır. *M. luteus* ototrofiktir ve karbon kaynağı olarak CO₂'yi kullanır. *Micrococcus*, piridin, herbisid, klorlu bifeniller ve yağ gibi farklı substratları kullanabilme yeteneğine sahiptir. Birçok çevresel kontaminantı biyolojik olarak degrade etmek ve toksisitesini gidermek için kullanılmaktadır^(71,72).

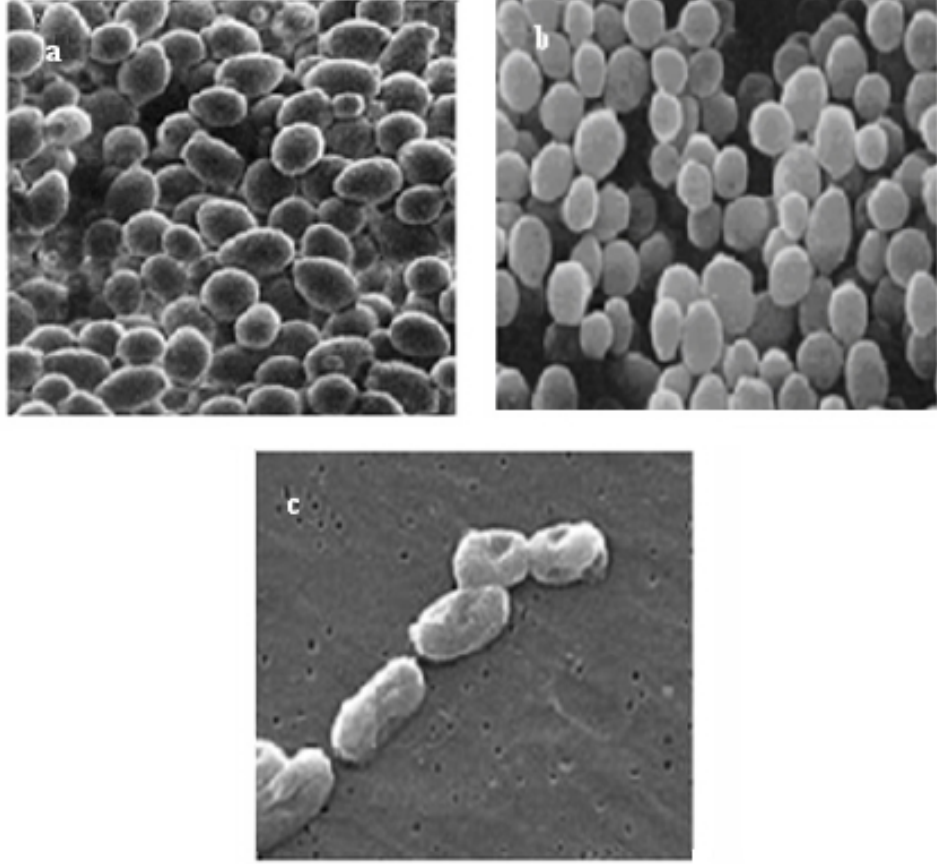
M. luteus biyoremediasyon ve biyoteknolojide önemli bir role sahiptir. Toksik atıklarla ilgili olarak toksik organik kirleticileri degrade edebilmekte ve metallere karşı tolerans gösterebilmektedir. Kontamine olmuş toprakta, yağ petrol atıklarında, tortullaşmış yağ birikintilerinde sık sık bulunur, hidrokarbonları ve olefinik bileşikleri degrade edebilmektedir, bifenilleri karbon kaynağı olarak

kullanabilmekte ve phthalik asid esterleri olan phthalatları parçalayabilmektedir. Metallerle ilgili fonksiyonunun olduğuda rapor edilmiştir. Stronsiyumun (uzun tesirli ve zehirli bir radyoaktif madde) biyosorpsiyonunu gerçekleştirmektedir. Kurşunu, nikeli ve çinkoyu daha az derecede tutmaktadır. *M. luteus*, spor oluşturmada stres altında yani düşük sıcaklık ve besin kıtlığı gibi olumsuz ortam koşullarında dörtlü formlar oluşturarak uzun yıllar yaşayabilmektedir⁽⁷³⁾.

3.1.3. *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*)

Y. lipolytica, üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmış geleneksel olmayan ve *Yarrowia* genusuna ait tek türdür. Türün gelişmiş formu ilk olarak Diddens ve Lodder tarafından 1942 yılında *Candida lipolytica* şeklinde tanımlanmıştır. Gelişmiş formu, *Endomycopsis lipolytica*, daha sonra *Saccharomyces lipolytica* ve nihayet Wickerham ve arkadaşları tarafından 1980'de *Y. lipolytica* olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Literatürde *Y. lipolytica* suşlarının, hücre dışı lipolitik ve proteolitik aktivitelerinin güçlü olması nedeniyle daha çok yağ, protein ve şeker içeren ortamlardan izole edildiği bildirilmektedir. Bu sebeple en çok; peynir gibi süt ürünlerinde bunun yanında soya sosu ve et içeren salatalarda da görülmektedirler. *Y. lipolytica*'nın süt ürünlerinde en sık rastlanan maya türleri arasında yer alması peynir teknolojisinde iyi bir olgunlaşma ajanı olmasını desteklemektedir. *Y. lipolytica*'nın 5–10 °C'lerde geliştiği gözlenmiş, optimum ve maksimum gelişme sıcaklıkları sırasıyla 25–30 °C ve 33–37 °C olarak bildirilmiştir. Maya, laktik ve sitrik asidi kullanabilmekte, sitrik veya laktik asit konsantrasyonun % 1 olduğu ortamlarda gelişebilmektedir. *Y. lipolytica* suşlarına ait lipolitik aktivite düşük sıcaklıklarda ve

yüksek tuz konsantrasyonlarında azalma gösterse de yapılan çalışmalar lipolitik aktivitenin devam ettiğini ve bu nedenle peynirin olgunlaşmasında bu mayanın kullanılabilceğini göstermiştir. Ekstrasellüler proteolitik aktivite gösteren çoğu *Y. lipolytica* suşlarının ise proteinaz üretebilecekleri minimum sıcaklık 0–3°C olarak bildirilmiştir. *Y. lipolytica*'nın biyokimyasal aktiviteleri, aromatik bileşikler ve/veya metil ketonlar, alkoller, laktonlar ve esterler gibi aroma maddeleri oluşumuna öncü bileşikler üretebilmesi nedeniyle, peynirin duysal özellikleri yönünden önemli role sahiptir⁽⁷⁴⁾. 25 °C'de Sabouraud Dekstroz Agar besiyerinde beyaz, mat, kuru, serebriform veya krem şeklinde koloniler oluşturur. Üreaz reaksiyonu pozitifdir⁽⁷⁵⁾. *Y. lipolytica* (ökaryot) basit bir maya türü değildir. Bu organizma genetik çalışmalarda sık sık kullanılmaktadır. Potansiyel olarak ürettiği moleküllerle biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanına sahiptir⁽⁷⁶⁾. *Y. lipolytica* lipidlerden metan üretebilmektedir. Aerobik şartlarda alkanlardan, bitkisel yağlardan ya da glikozdan sitrik asit üretir. Genomlarının bilinmesi, ökaryotik genom gelişimini açıklamak için fırsat verir⁽⁷⁷⁾.

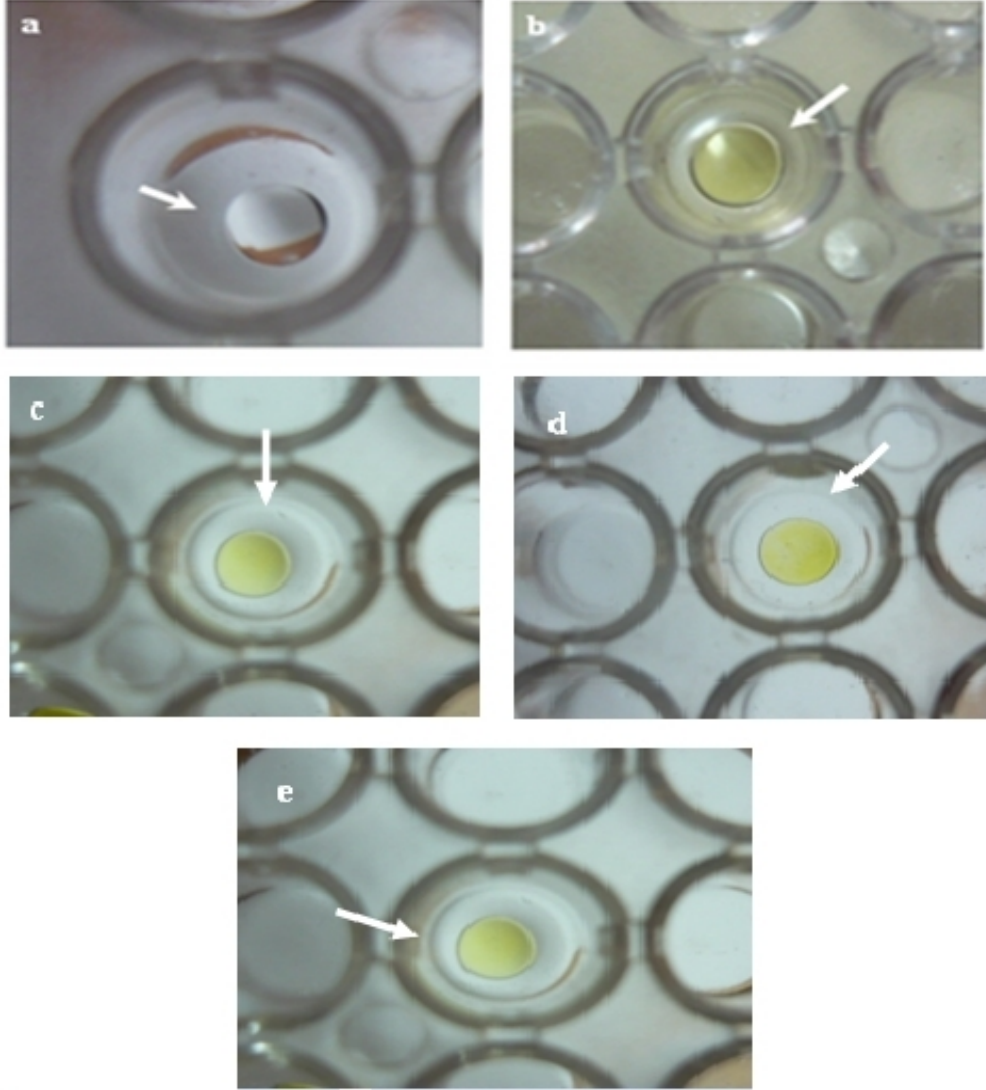


Şekil 3.1. *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia*'nın SEM Mikrografları^(77,78,79)

3.2. Kültürlerde Biosümfektan Varlığının Saptanması

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biosümfektan varlığının saptanması için MSM besiyerinde üretilmiş *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* kültürleri 20 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatantlar, su ve ekim yapılmamış besiyeri örnekleri, mineral yağ ile kaplanmış microwell plate içerisindeki kuyucuklara enjekte edilmiştir. Su ve ekim yapılmamış besiyeri örneklerinin boncuk şeklini aldığı, izolatlara ait kültür örneklerinde ise kuyucuklardaki damlaların yayıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.2.)

İzolatlar tarafından biyosurfektan üretiminin saptanması sonrasında *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen biyosurfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır.



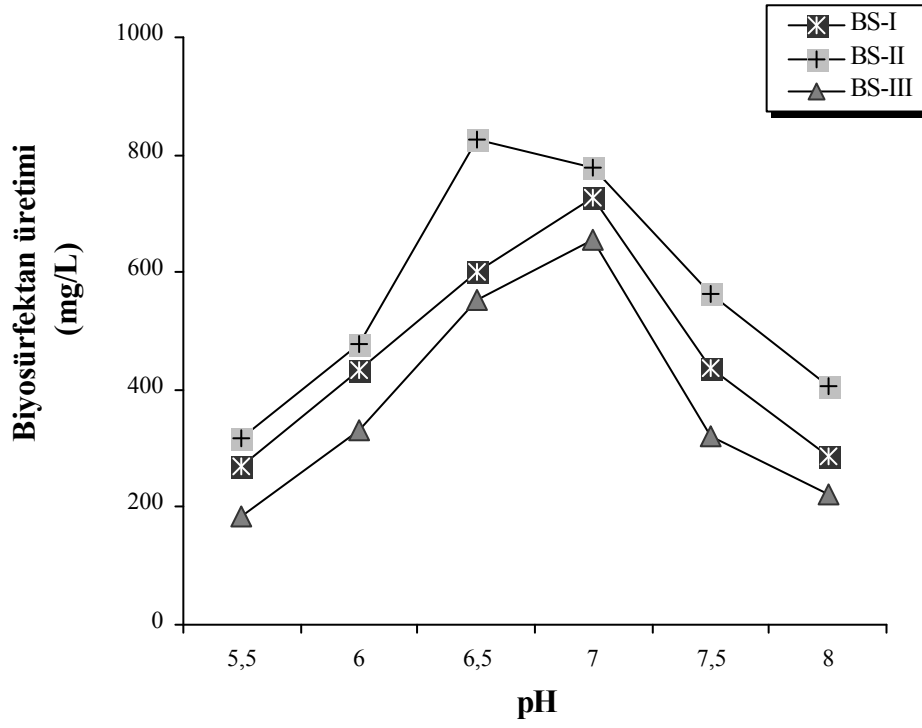
Şekil 3.2. Kontrol sıvıları ve biyosurfektan içeren sıvıların microwell plate kuyucuklarında dağılımı a) Su, b) Ekim yapılmamış kültür, c) *Y. lipolytica*, d) *B. cepacia*, e) *M. luteus*

3.3.Kültürlerde Biyosülfektan Miktarının Ölçülmesi

Y. lipolytica, *M. luteus* ve *B. cepacia* mikroorganizmaları tarafından biyosülfektan üretiminin belirlenmesi sonrasında kültürlerdeki biyosülfektan miktarı belirlenmiştir. Temel MSM besiyerinde *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* mikroorganizmaları tarafından üretilen biyosülfektan miktarları sırası ile 728, 827 ve 656 mg/L bulunmuştur.

3.4. Biyosülfektan Üretimi Üzerine pH Etkisi

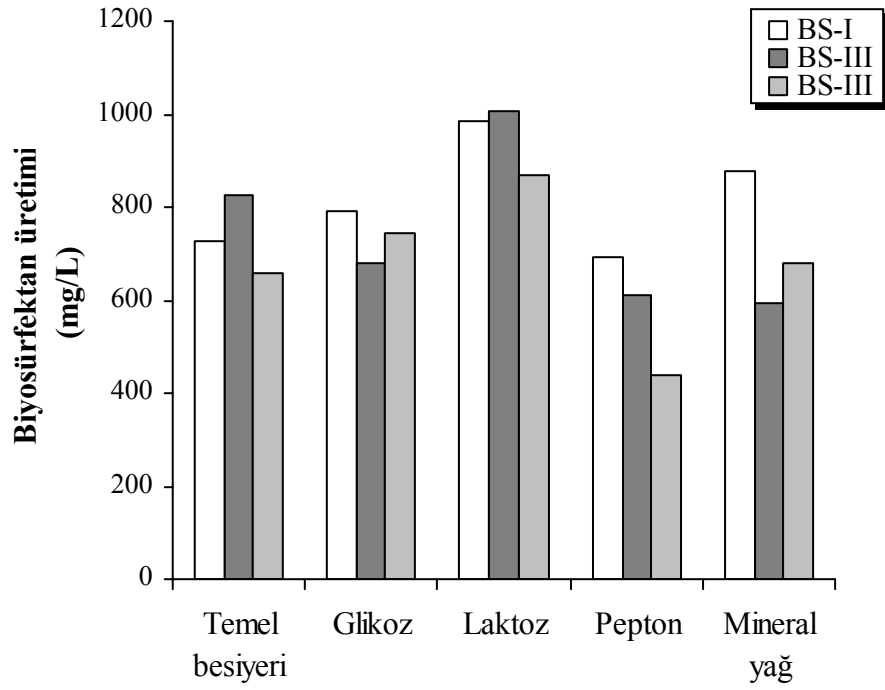
Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları için besin ortamının pH'ı önemli bir parametredir. Her mikroorganizma belirli bir pH aralığında optimum gelişme ve ürün sentezi göstermektedir. Tüm izolatlar için biyosülfektan üretimi üzerine pH etkisi 5.5-8.0 aralığında incelenmiştir ve bütün izolatların 5.5.-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük biyosülfektan üretimi gösterdiği, pH 6.5-7.0 aralığında ise yüksek biyosülfektan üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *B. cepacia* ve *Y. lipolytica* için en yüksek biyosülfektan üretimi pH 7.0'da sırası ile 675 ve 763 mg/L olarak gözlenmiştir. *M. luteus* için maksimum biyosülfektan miktarının, pH 6.5'de 856 mg/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Biosüurfektan üretimi üzerine pH etkisi

3.5. Karbon Kaynağının Biosüurfektan Üretimi Üzerine Etkisi

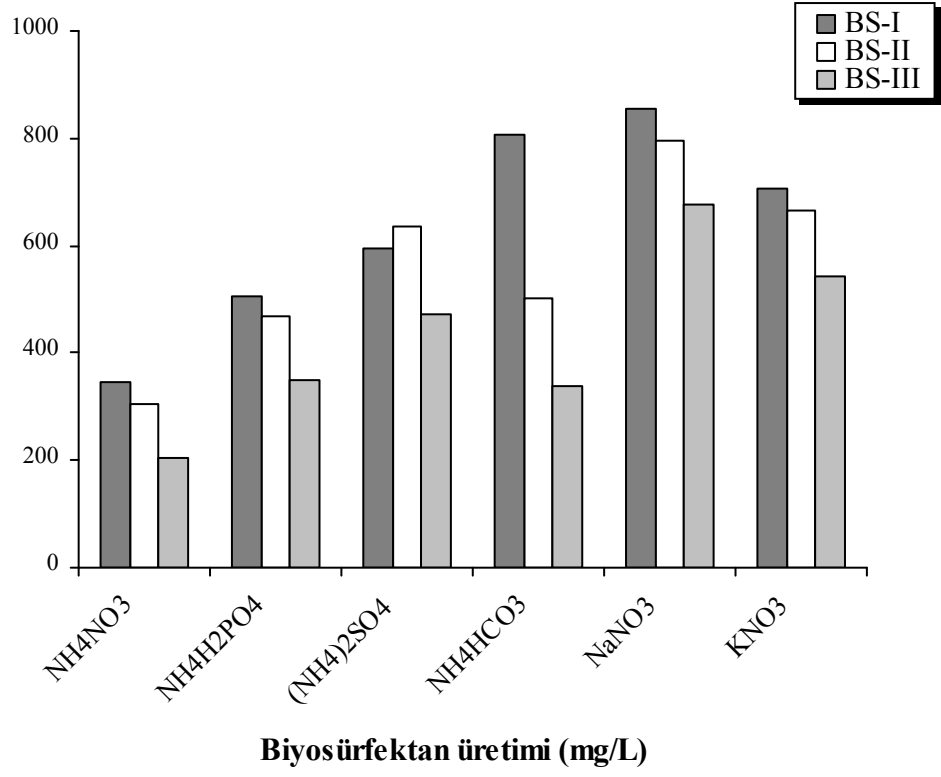
Biosüurfektan üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi glukoz, pepton, laktoz ve mineral yağ kaynakları içeren ortamlarda test edilmiştir. Kültürlerde en yüksek ve en düşük biosüurfektan miktarına bakılmıştır. *B. cepacia*, laktoz içeren ortamda maksimum biosüurfektan üretimi gösterirken (867 mg/L), en düşük üretim kapasitesini pepton içeren ortamda (440 mg/L) göstermiştir. *M. luteus* en fazla üretim kapasitesine laktoz içeren ortamda ulaşırken (1005 mg/L), mineral yağ bulunan ortamda 595 mg/L'lik kapasite ile düşük biosüurfektan üretimi sergilemiştir. *Y. lipolytica* ise *B. cepacia* ile benzer şekilde en fazla laktozlu besiyerinde 986 mg/L, en az peptonlu ortamda (691 mg/L) biosüurfektan üretimi göstermiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı karbon kaynaklarının biyosümfektan üretimi üzerine etkisi

3.6. Farklı Azot Kaynaklarının Biyosümfektan Üretimi Üzerine Etkisi

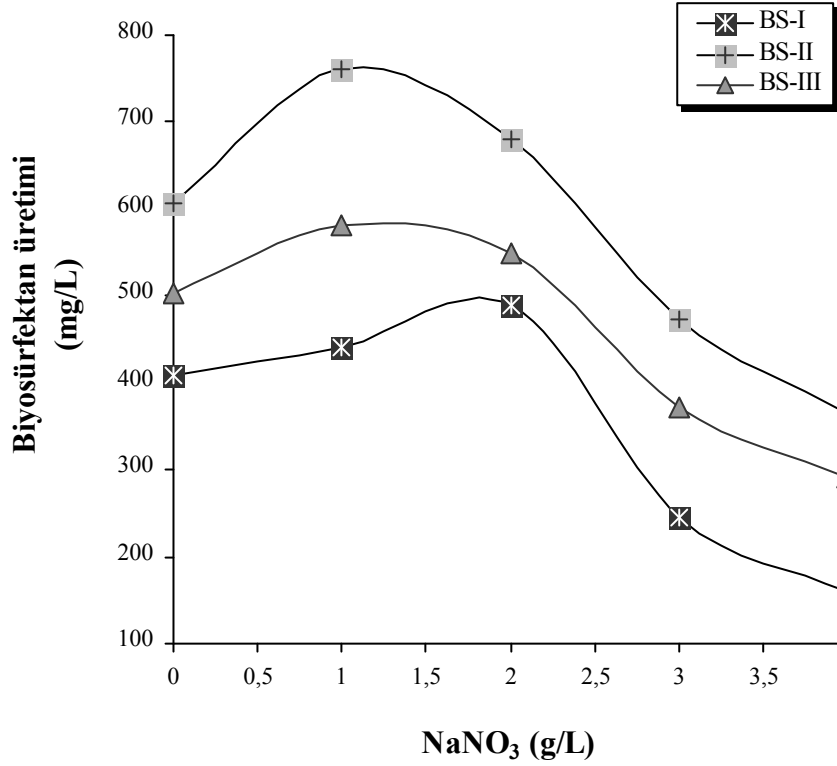
Azot kaynağının biyosümfektan üretimi üzerine etkisini belirlemek için temel besiyeri bileşimine NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NaNO_3 ve KNO_3 azot kaynakları ilave edilmiştir. *B. cepacia*, *M. luteus* ve *Y. lipolytica* izolatları için diğer azot kaynaklarına kıyasla NaNO_3 içeren besiyerinde biyosümfektan üretimi açısından daha yüksek verim elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Farklı azot kaynaklarının biyosümfektan üretimi üzerine etkisi

3.7. NaNO₃ Konsantrasyonunun Biyosümfektan Üretimi Üzerine Etkisi

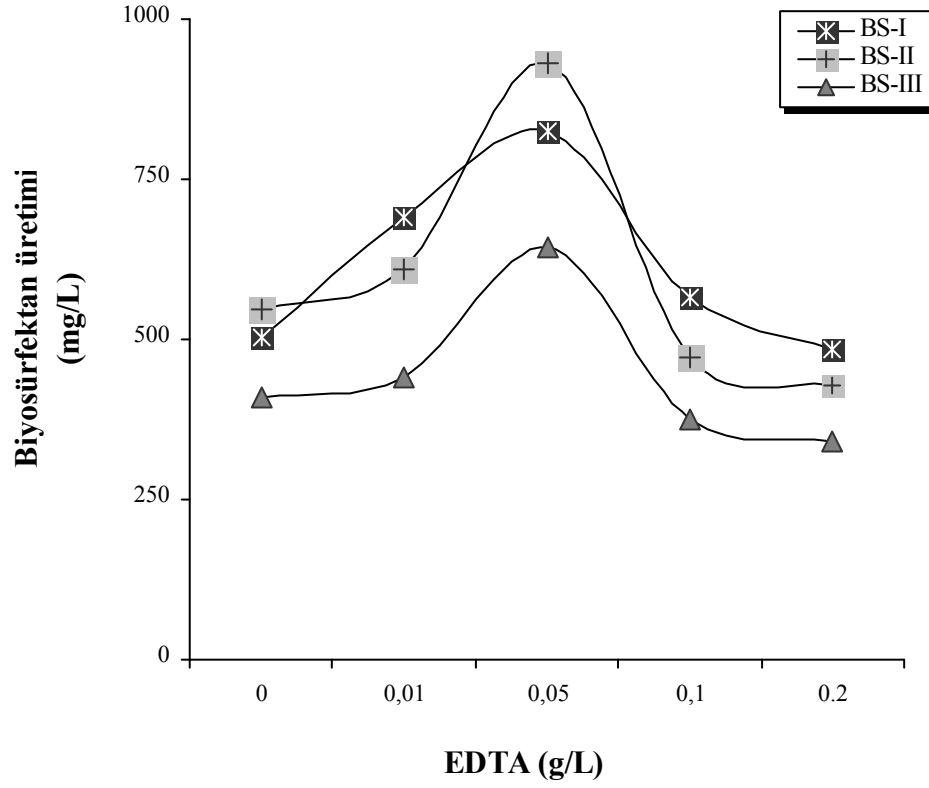
Optimum azot kaynağı konsantrasyonunu tespit etmek için farklı oranlarda NaNO₃, besiyeri ortamına ilave edilmiş ve en iyi sonuç Şekil 3.6.'da görüldüğü gibi 1g/L'lik derişimde bulunmuştur.



Şekil 3.6. Azot kaynağı olarak kullanılan NaNO₃ konsantrasyonunun biyosümfektan üretimi üzerine etkisi

3.8. EDTA Ajanının Biyosümfektan Üretimi Üzerine Etkisi

Hücre duvarı geçirgenliğini arttırdığı düşünülen EDTA'nın biyosümfektan üretimine etkisi Şekil 3.6'da verilmiştir. 0.01-0.05 g/L aralığındaki düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığının biyosümfektan üretimini artırdığı 0,1 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarında ise bakteri gelişiminin ve buna bağlı olarak biyosümfektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Sonuçta en yüksek biyosümfektan üretimi 0.05 g/L EDTA konsantrasyonunda gözlenmiştir ve *Y. lipolytica*, *M. luteus*, *B. cepacia* için sırasıyla 825, 932 ve 645 mg/L olarak bulunmuştur.



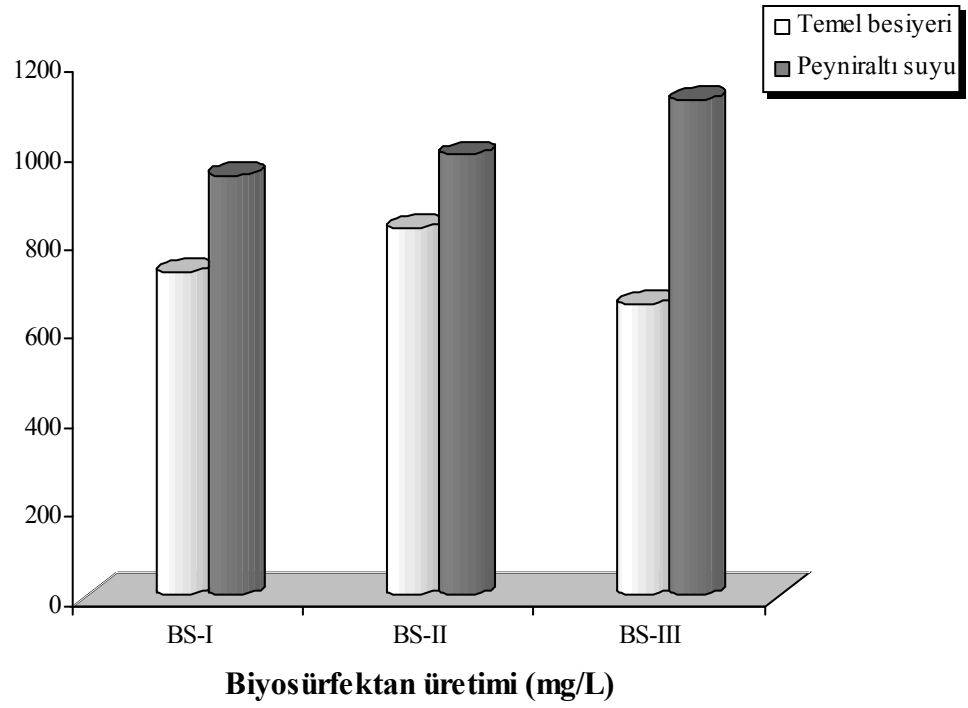
Şekil 3.7. Biosürfektan üretimi üzerine EDTA etkisi

3.9. Peyniraltı Sularından Biosürfektan Eldesi

Biosürfektan üretiminin optimum olduğu sistem parametreleri (pH, Karbon kaynağı, NaNO_3 ve EDTA konsantrasyonu) belirlendikten sonra, optimum koşullar mikroorganizmalar ile peyniraltı atık su örneğine uygulanmıştır. Mikroorganizmalar, besiyeri olarak kullanılan peyniraltı suyunda $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10 gün süre ile muamele edilmiş ve kloroform/metanol ekstraksiyonu sonrasında biosürfektan katı halde elde edilmiştir. Sonuç olarak maksimum biosürfektan üretimi sağlanmıştır.

Şekil 3.8'de görüldüğü gibi *Y. lipolytica*, temel MSM besiyerinde 728 mg/L biosürfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 946 mg/L biosürfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biosürfektan miktarının 1.3 kat arttığı gözlenmiştir.

M. luteus, temel MSM besiyerinde 827 mg/L biyosülfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 992 mg/L biyosülfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosülfektan miktarının 1.2 kat arttığı gözlenmiştir. *B. cepacia*, temel MSM besiyerinde 656 mg/L biyosülfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 1115 mg/L biyosülfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosülfektan miktarının 1.7 kat arttığı gözlenmiştir.



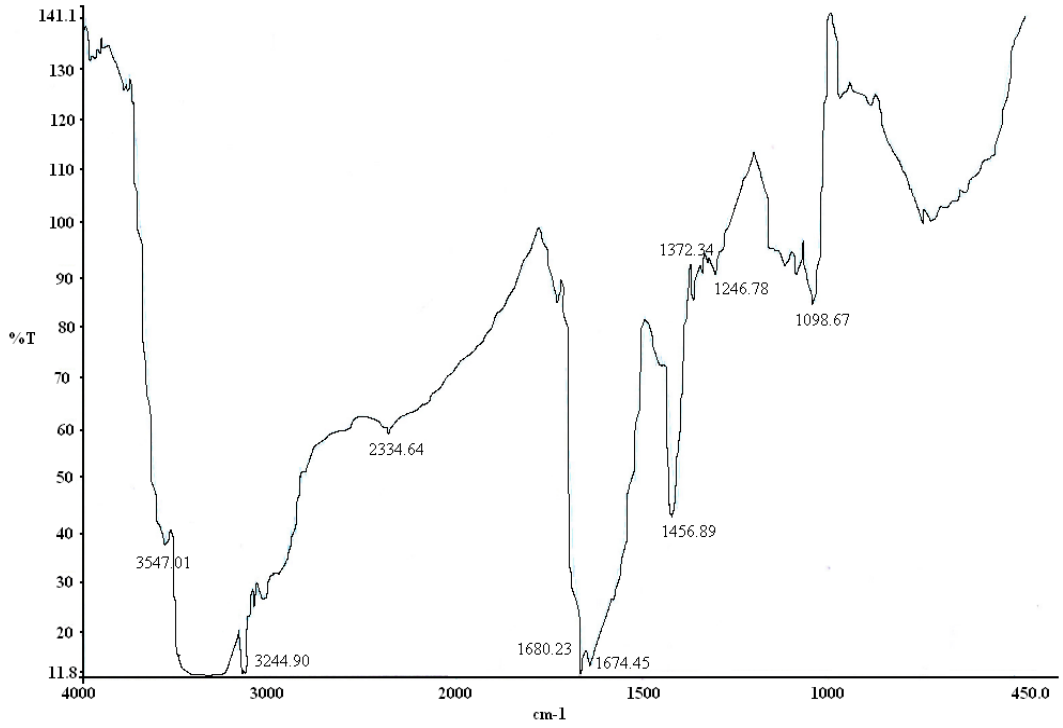
Şekil 3.8. Peyniraltı suyundan biyosülfektan üretimi

3.10. Biyosülfektan Karakterizasyonu

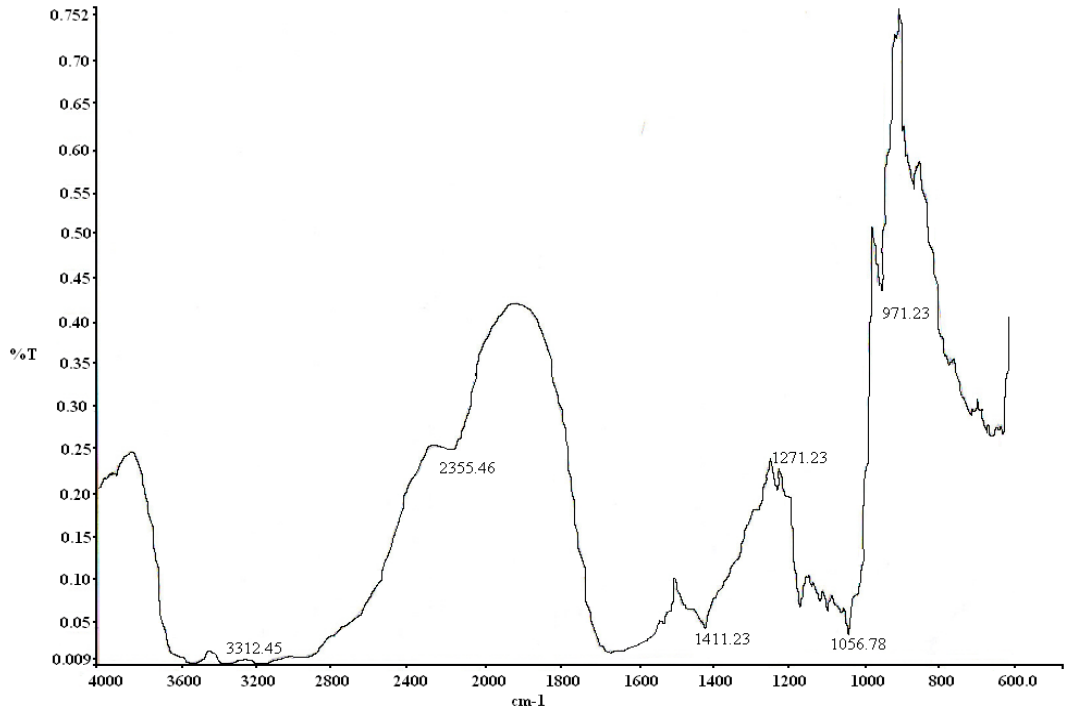
3.10.1. FTIR Analizi

FTIR analizi moleküllerdeki fonksiyonel grupları tanımlamada kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen

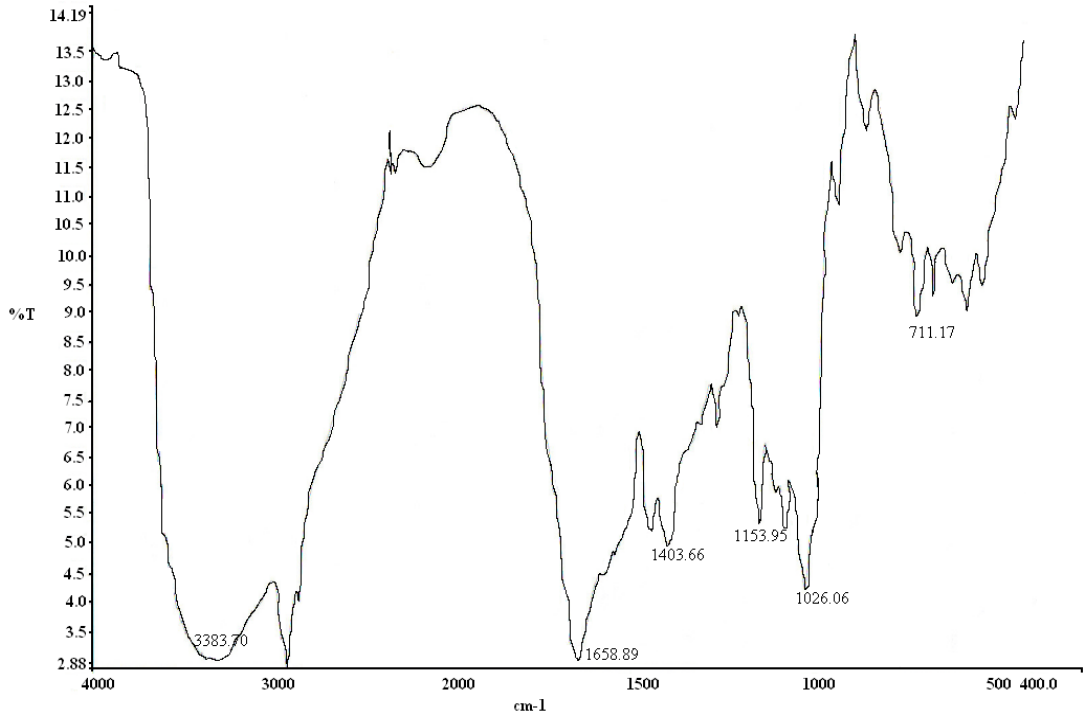
BS-I, BS-II ve BS-III'ün FTIR spektrumları ve fonksiyonel grupların yerleri incelenerek moleküler yapıları hakkında bilgi verilmiştir. BS-I 3312, 2355, 1411, 1271, 1056 ve 971 cm^{-1} noktalarında titreşim bantları vermiştir (Şekil 3.9). BS-II 3547, 3244, 2334, 1680, 1456, 1372, 1246 ve 1098 cm^{-1} noktalarında titreşim bantları oluşturmuştur (Şekil 3.10). BS-III 3383, 1658, 1403, 1153, 1026 ve 711 cm^{-1} noktalarında titreşim bantları vermiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.9. BS-I biyosürefektanına ait FTIR spektrumu



Şekil 3.10. BS-II biosürfektanına ait FTIR spektrumu



Şekil 3.11. BS-III biosürfektanına ait FTIR spektrumu

3.10.2. Yüzey Gerilimi

İzolatlara ait kültürlerde yüzey gerilimindeki değişimler incelenmiş ve test edilen tüm kültürlerde yüzey geriliminin azaldığı Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. Yüzey geriliminde en belirgin azalma *Y. lipolytica* kültüründe gözlenmiştir. Yüzey geriliminde en az azaltıcı etki ise *B. cepacia* kültüründe gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. BS-I, BS-II ve BS-III biyosüpfektanların yüzey gerilimleri (mN/m)

Test sıvısı	Yüzey gerilimi (mN/m)	Yüzey gerilimini azaltıcı etki (%)
Ekim yapılmamış besiortamı	70.1	-
<i>Y. lipolytica</i> kültürü	45.7	35
<i>M. luteus</i> kültürü	59.2	16
<i>B. cepacia</i> kültürü	61.6	12

3.10.3. Emülsiyon Testi

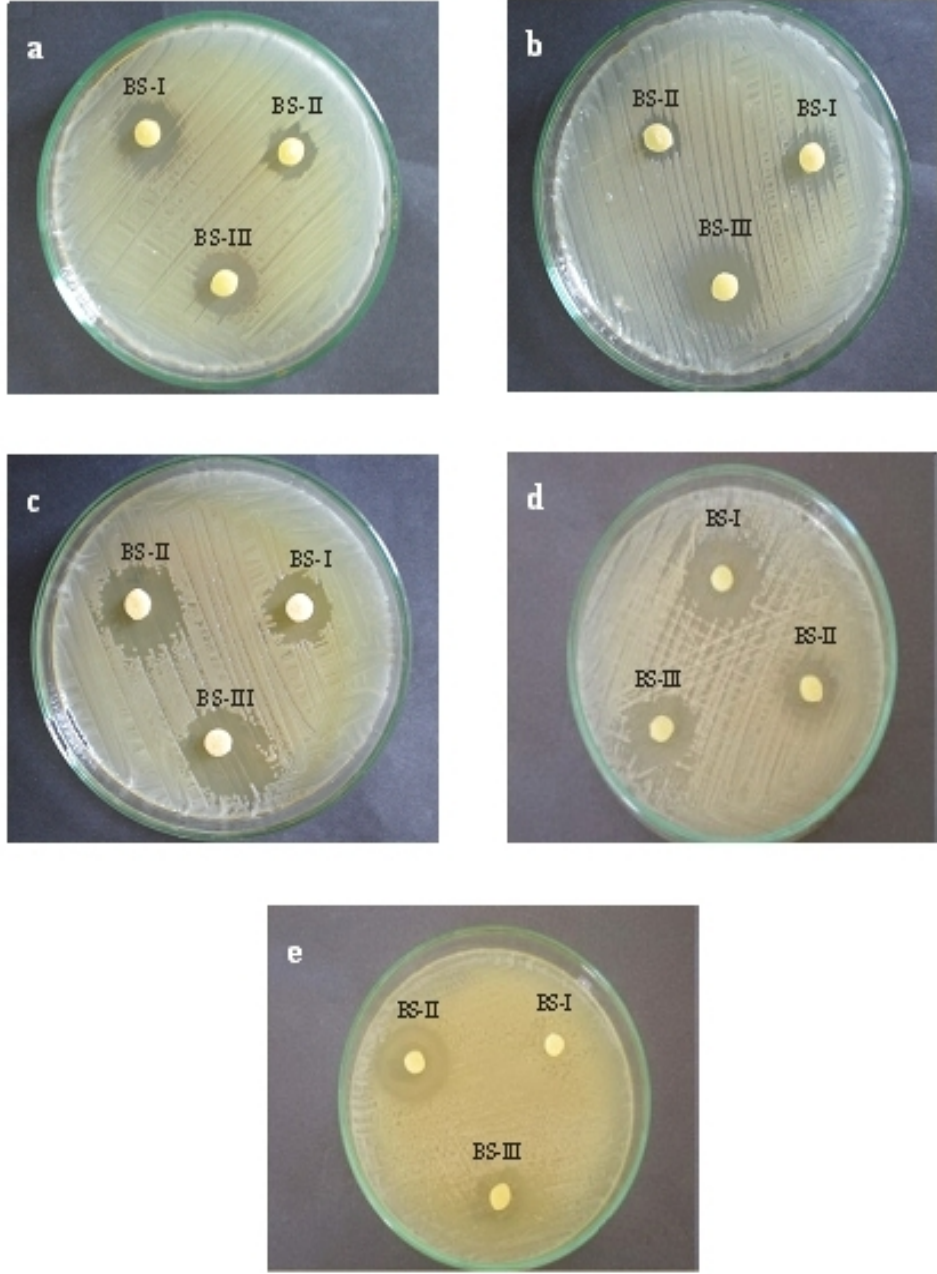
Y. lipolytica, *M. luteus* ve *B. cepacia* izolatları tarafından üretilen biyosüpfektanların emülsifikasyon özelliği kerosen, toluen, ksilen ve mineral yağ hidrokarbonları kullanılarak test edilmiştir (Çizelge 3.3). BS-I, en fazla kerosenli ortamda % 59 oranında, en az toluenli ortamda % 45 oranında emülsiyon özellik göstermiştir. BS-II, en fazla % 65 oranında kerosende ve en az ksilenli ortamda % 44 oranında emülsiyon aktivitesi sergilemiştir. BS-III ise en fazla mineral yağda % 59 oranında ve en az ksilende % 37 oranında emülsiyon aktivitesi göstermiştir.

Çizelge 3.3. BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanların emülsifikasyon aktivitesi (%)

	Kerosen	Toluen	Ksilen	Mineral oil
<i>Y. lipolytica</i>	59	45	51	53
<i>M. luteus</i>	65	51	44	49
<i>B. cepacia</i>	47	39	37	59

3.10.4. Antimikrobiyal Aktivite

Elde edilen biyosürefektanların patojen bakterilere karşı gösterdiği antibakteriyal etki Şekil 3.12’de görülmektedir. Çizelge 3.4’te ise oluşturdukları inhibisyon zonları belirtilmiştir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, en fazla 25 mm’lik inhibisyon zonu ile *K. pneumonia*’da etki gösterirken, *S. aureus*’ta en az 25 mm’lik inhibisyon zonu oluşturmuştur. Fakat *P. vulgaris*’e karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II, yine en fazla 22 mm’lik inhibisyon zonu ile *K. pneumonia*’da etkili olmuştur. En az etkiyi, 11 mm’lik inhibisyon zonu oluşturarak *S. aureus*’ta göstermiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III, en fazla *K. pneumonia*’da 32 mm’lik inhibisyon zonu oluşturken, en az etkiyi, 15 mm’lik inhibisyon zonu ile *P. vulgaris*’e karşı göstermiştir.

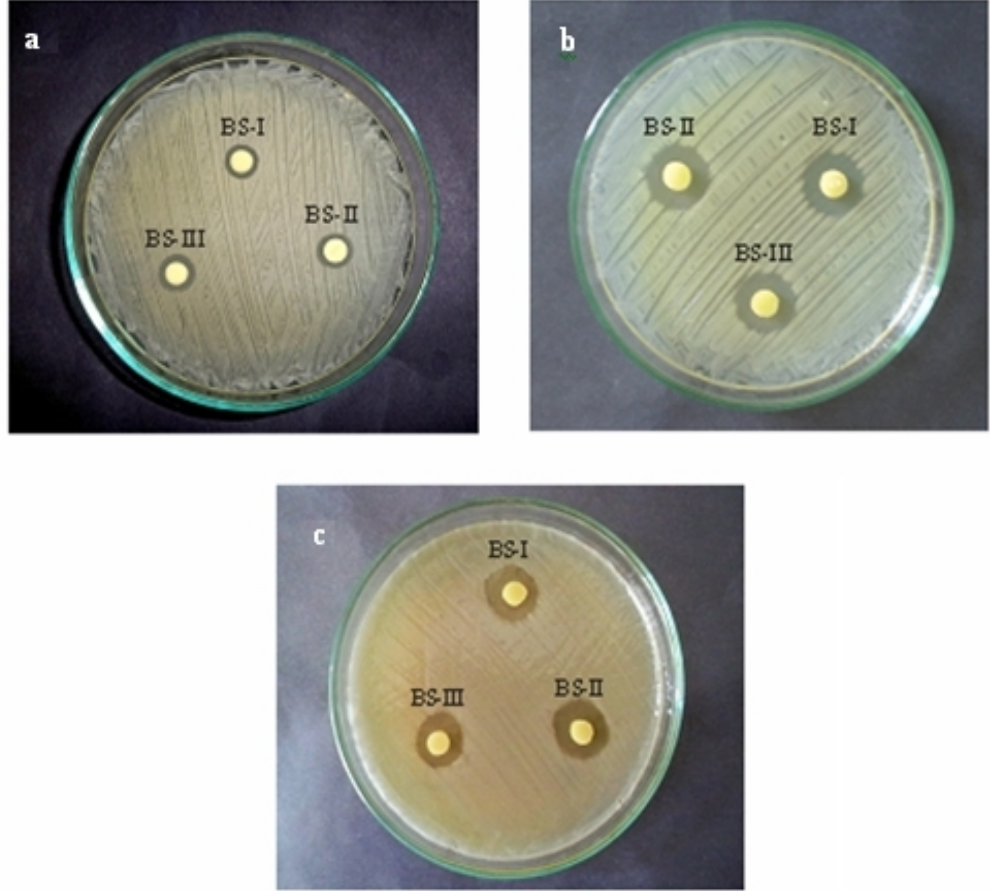


Şekil 3.12. İzolatlara ait biyosümfektanların patojen bakterilere karşı antibakteriyal etkileri a. *P. aeruginosa* b. *S. aureus* c. *K. pneumoniae* d. *E. coli* ve e. *P. vulgaris*

Çizelge 3.4. BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanların, patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
BS-I	20	15	25	22	-
BS-II	16	11	22	15	26
BS-III	19	25	32	20	15

İzolatlara ait biyosümfektanların patojen funguslara karşı gösterdiği antifungal etki Şekil 3.13'te görölmektedir. Çizelge 3.5'te göröldüğü gibi *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, en fazla antifungal etkiyi *C. albicans*'a karşı oluşturduğu 21 mm inhibisyon zonu ile en az etkiyi *C. krusei*'ye karşı oluşturduğu 13 mm'lik inhibisyon zonu ile göstermiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II, en fazla antifungal etkiyi *C. albicans*'a karşı 20 mm inhibisyon zonu oluşturarak göstermiştir. *C. krusei*'ye karşı oluşturduğu 14 mm'lik inhibisyon zonu ile en az etkiyi göstermiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III, en fazla antifungal etkiyi 22 mm inhibisyon zonu oluşturarak *C. albicans*'a karşı göstermiştir. En az etkiyi *A. flavus*'ta 16 mm inhibisyon zonu oluşturarak göstermiştir.



Şekil 3.13. İzolatlara ait biyosüpfektanların patojen funguslara karşı antifungal etkileri a. *C. krusei*, b. *C. albicans* ve c. *A. flavus*

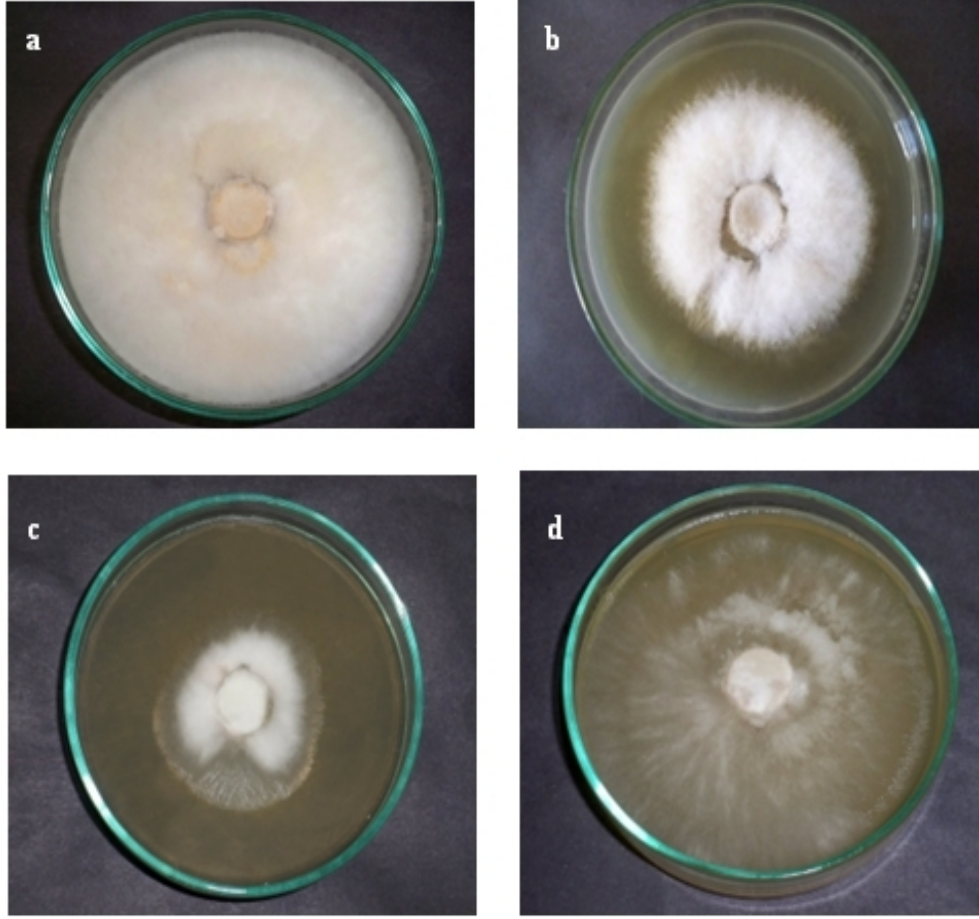
Çizelge. 3.5. BS-I, BS-II ve BS-III biyosüpfektanlarının, *C. albicans*, *C. krusei* maya türlerine ve *A. flavus* küf türüne karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)

	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>
BS-I	13	21	20
BS-II	14	20	18
BS-III	15	22	16

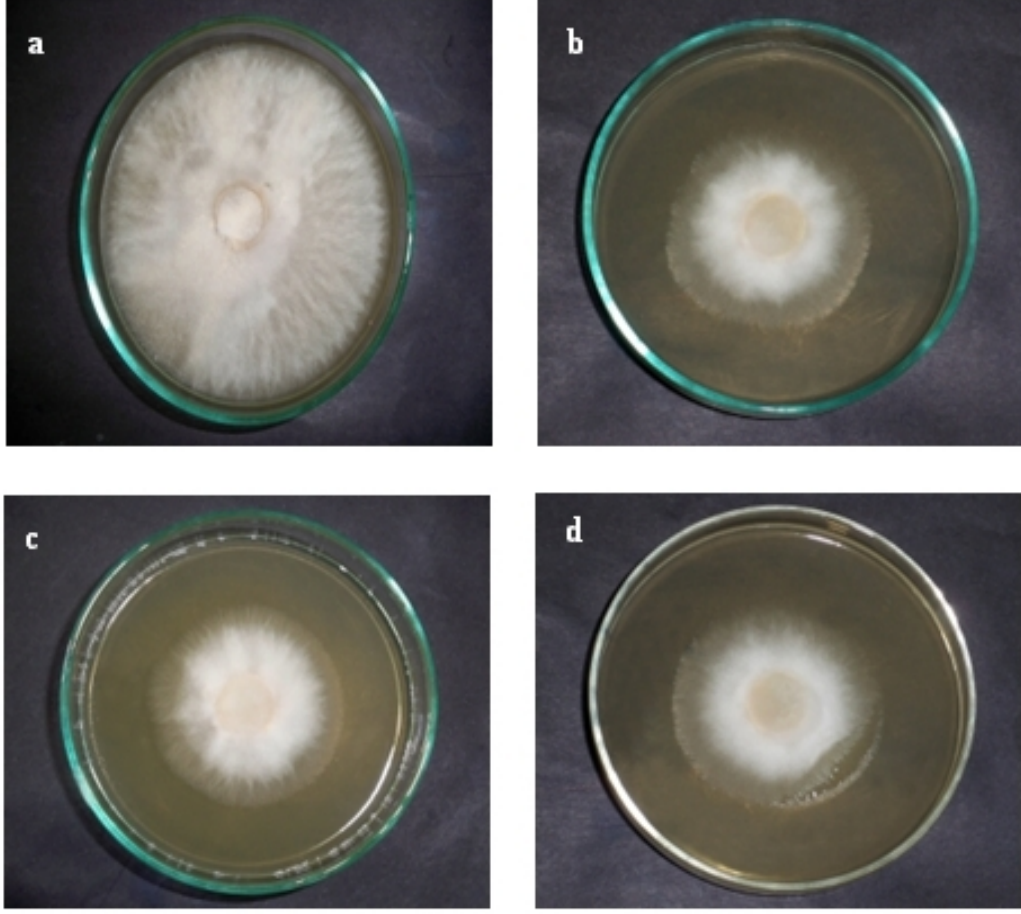
Elde edilen biyosürefektanlar varlığında bitki patojeni fungusların misel gelişim yüzdeleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I varlığında, en fazla misel gelişimi % 67 oranında *F. heterosporium*'da, en az misel gelişimi % 42 oranında *F. avenaceum*'da belirlenmiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II'nin varlığında, en fazla misel gelişimi *F. inflexum*'da % 50 oranında, en az misel gelişimi ise *F. avenaceum*'da % 40 oranında hesaplanmıştır. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III varlığında ise en fazla misel gelişimi % 97 *F. heterosporium*'da, en az misel gelişimi de *F. graminearum*'da % 29 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanları varlığında bitki patojeni fungusların misel gelişimleri (%)

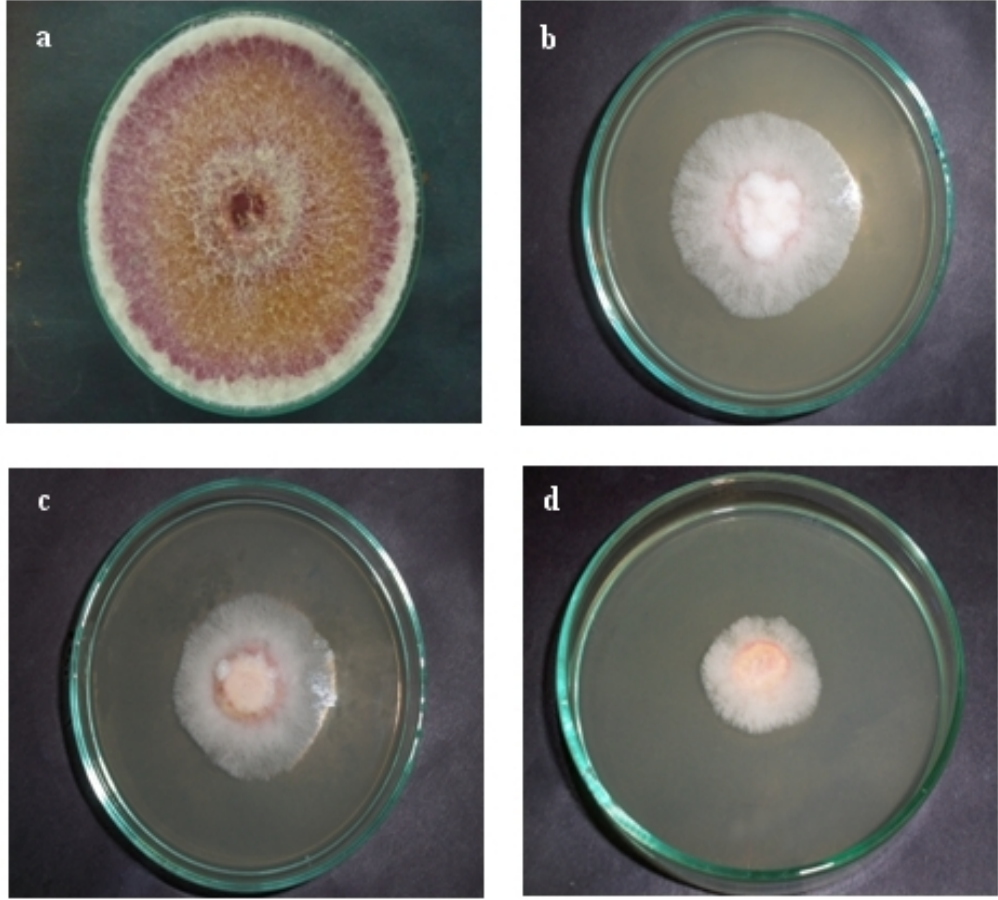
	<i>F. heterosporium</i>	<i>F. inflexum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
BS-I	67	47	42	50
BS-II	44	50	40	42
BS-III	97	51	46	29



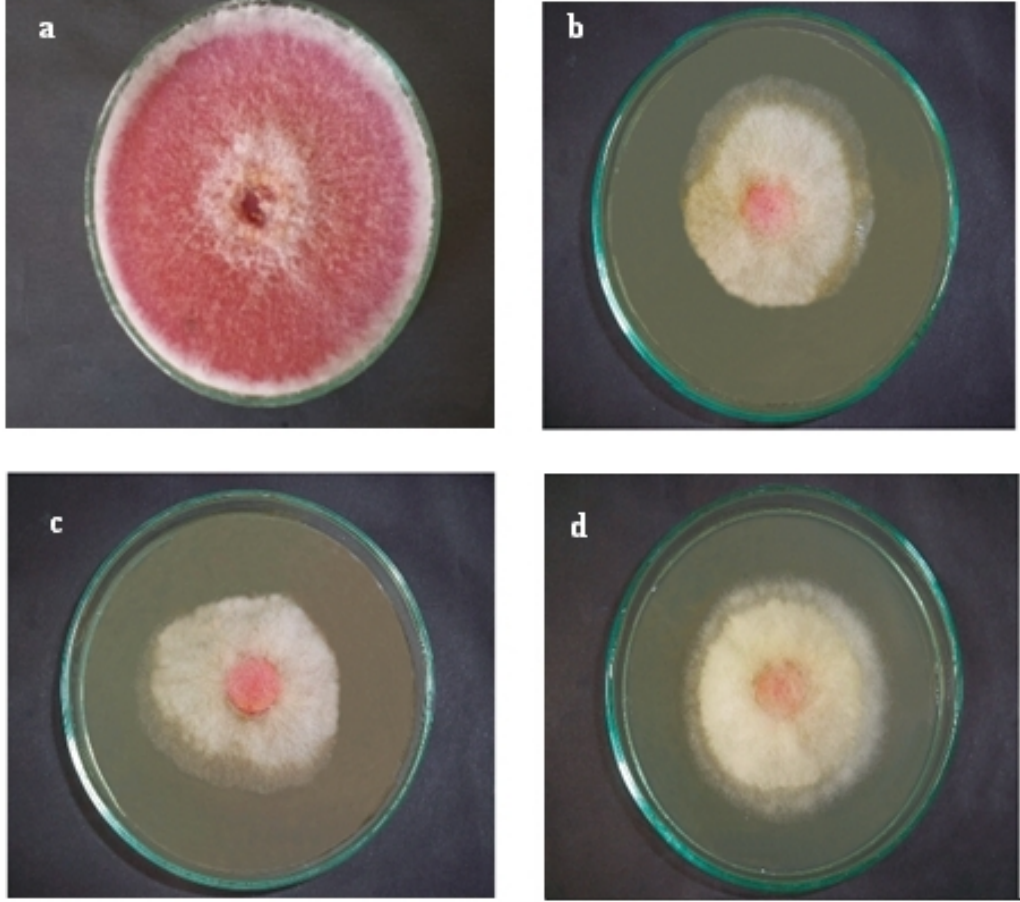
Şekil 3.14. İzolatlara ait biyosümfektanların *Fusarium heterosporium*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 3.15. İzolatlara ait biyosümfektanların *Fusarium inflexum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 3.16. İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium graminearum* 'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 3.17. İzolatlara ait biyosürefektanların *Fusarium avenaceum* 'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III

3.10.5. Hemoliz Aktivitesi

Çizelge 3.7.'de izolatlara ait biyosürefektanların yüksek derecede hemolitik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Biyosürefektan içermeyen kan kültüründe, kültürasyon süresince çok düşük miktarda hemoglobinin (0.1g/dL) seruma geçtiği belirlenmiştir. Biyosürefektan içeren kan kültürlerinde ise hemoliz sonucu fazla miktarda hemoglobin moleküllerinin seruma geçtiği gözlenmiştir. Sonuç olarak en fazla hemolitik aktivite *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III biyosürefektanında gözlenmiştir. En düşük hemolizi ise *Y. lipolytica*'dan üretilen BS-I göstermiştir.

Çizelge 3.7. Biyosürefektanların hemolitik aktiviteleri

Uygulama	Hemoglobin(g/dL)
Kontrol	0.1±0.11
BS-I	4.3±0.36
BS-II	4.8±0.23
BS-III	5.0±0.25

3.10.6. Ağır Metal Tutma Kapasitesi

Bu çalışmada mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürefektan maddeler ile civa, kurşun, bakır, kadmiyum, çinko ve demir ağır metallerinin giderimi incelenmiştir. Çizelge 3.8'deki verilere göre BS-I, en fazla % 59.2 oranında Cu(II) uzaklaştırırken, en az % 22.6 oranında Hg(II) uzaklaştırabilmiştir. BS-II en fazla % 61.0 oranında Pb(II) uzaklaştırırken, en az % 30.9 oranında Fe(III) uzaklaştırabilmiştir. BS-III ise en fazla % 64.9 oranında Cu(II), en az % 21.9 oranında Fe(III) uzaklaştırabilmiştir.

Çizelge 3.8. Biyosürefektanların ağır metal giderim oranları (%)

	Hg(II)	Pb(II)	Cu(II)	Cd(II)	Zn(II)	Fe(III)
<i>Y. lipolytica</i>	22.6	44.5	59.2	26.3	39.2	27.6
<i>M. luteus</i>	31.3	61.0	59.2	45.6	32.3	30.9
<i>B. cepacia</i>	30.1	55.2	64.9	51.0	38.3	21.9

3.11. Peyniraltı Atık Sularının Biyodegradasyonu

Peyniraltı atık sularının biyodegradasyon yolu ile arıtılması işleminde izolatların her biri ayrı ayrı peyniraltı suyu ile 12 saat süreyle etkileştirilmiştir. Peyniraltı suyu bileşiminde başlangıç ve etkileşim sonrasındaki protein miktarı Biüret yöntemi ile tayin edilmiştir. Peyniraltı suyunun başlangıçtaki protein miktarı 2.304 mg/mL olarak belirlenirken *Y. lipolytica* ile etkileşim sonrasında ortamdaki protein miktarı 1.421 mg/mL olarak belirlenmiştir. *M. luteus* ve *B. cepacia* ile etkileşim sonrasında peyniraltı suyu içerisindeki protein miktarı sırası ile 1.728 mg/mL ve 1.536 mg/mL olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.9.'da görüldüğü gibi *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından protein degradasyon oranları sırası ile % 76.6, % 50 ve % 66.6 olarak hesaplanmıştır.

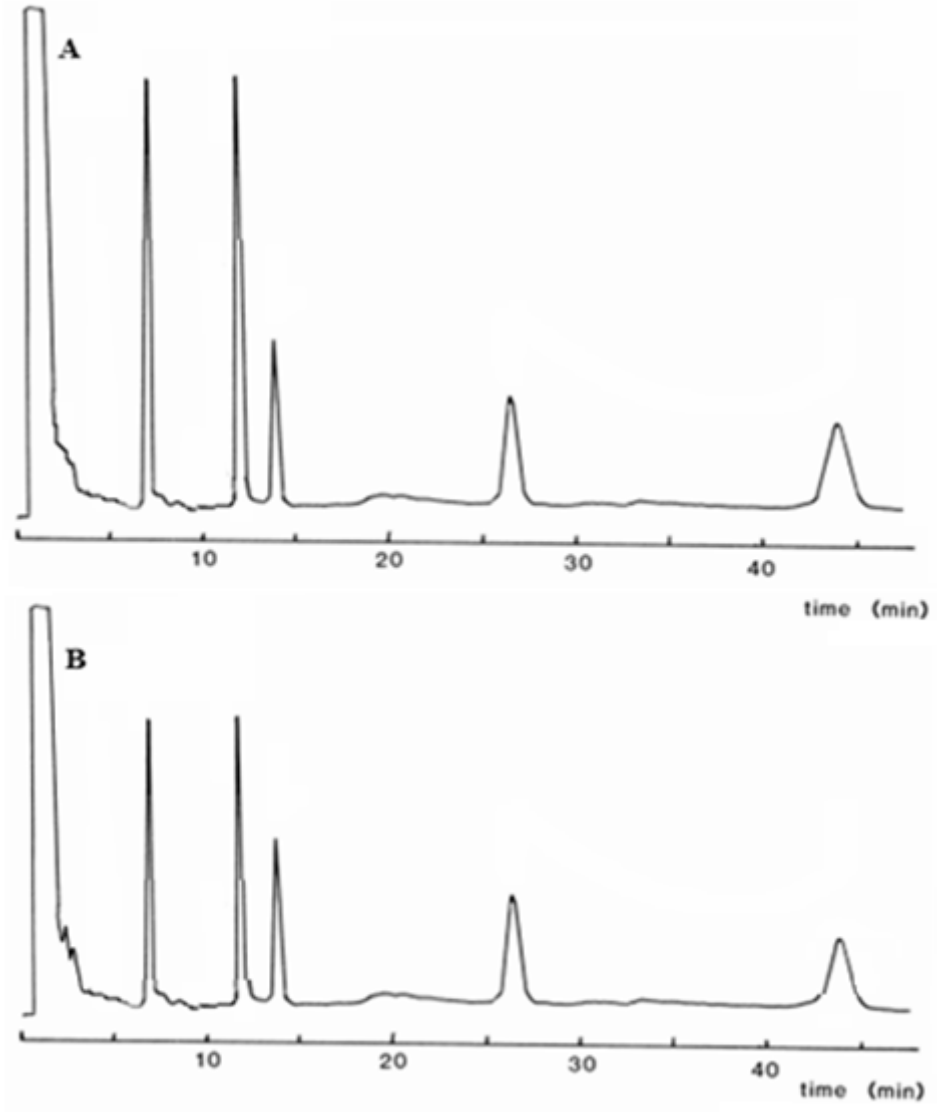
Peyniraltı suyunun başlangıç ve etkileşim sonrasındaki karbonhidrat miktarı 3-5 Dinitrosalisilik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Peyniraltı suyunda başlangıç karbonhidrat miktarı 24.5 mg/mL olarak hesaplanmıştır. *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* ile etkileşim sonrasında peyniraltı suyu içerisindeki karbonhidrat miktarı sırası ile 23.47, 19.86 ve 20.17 mg/mL olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.9'da görüldüğü gibi *Y. lipolytica*'nın degrade ettiği karbonhidrat oranı % 8.41, *M. luteus* tarafından degrade edilen karbonhidrat oranı ise % 37.8 ve *B. cepacia*'nın degrade ettiği karbonhidrat oranı da % 35.3 olarak belirlenmiştir.

İzolatlar tarafından peyniraltı suyundaki yağ degradasyonu GC analizleri ile belirlenmiştir. Peyniraltı suyu içeriğindeki başlangıç total yağ ve izolatların peyniraltı suyu ile etkileştirilmesi sonucunda ortamda kalan yağ miktarı tayin edilerek her bir izolata ait degradasyon oranları tespit edilmiştir. Etkileşim öncesinde peyniraltı suyu içerisindeki total yağ düzeyi % 16.8 olarak bulunmuştur ve *Y.*

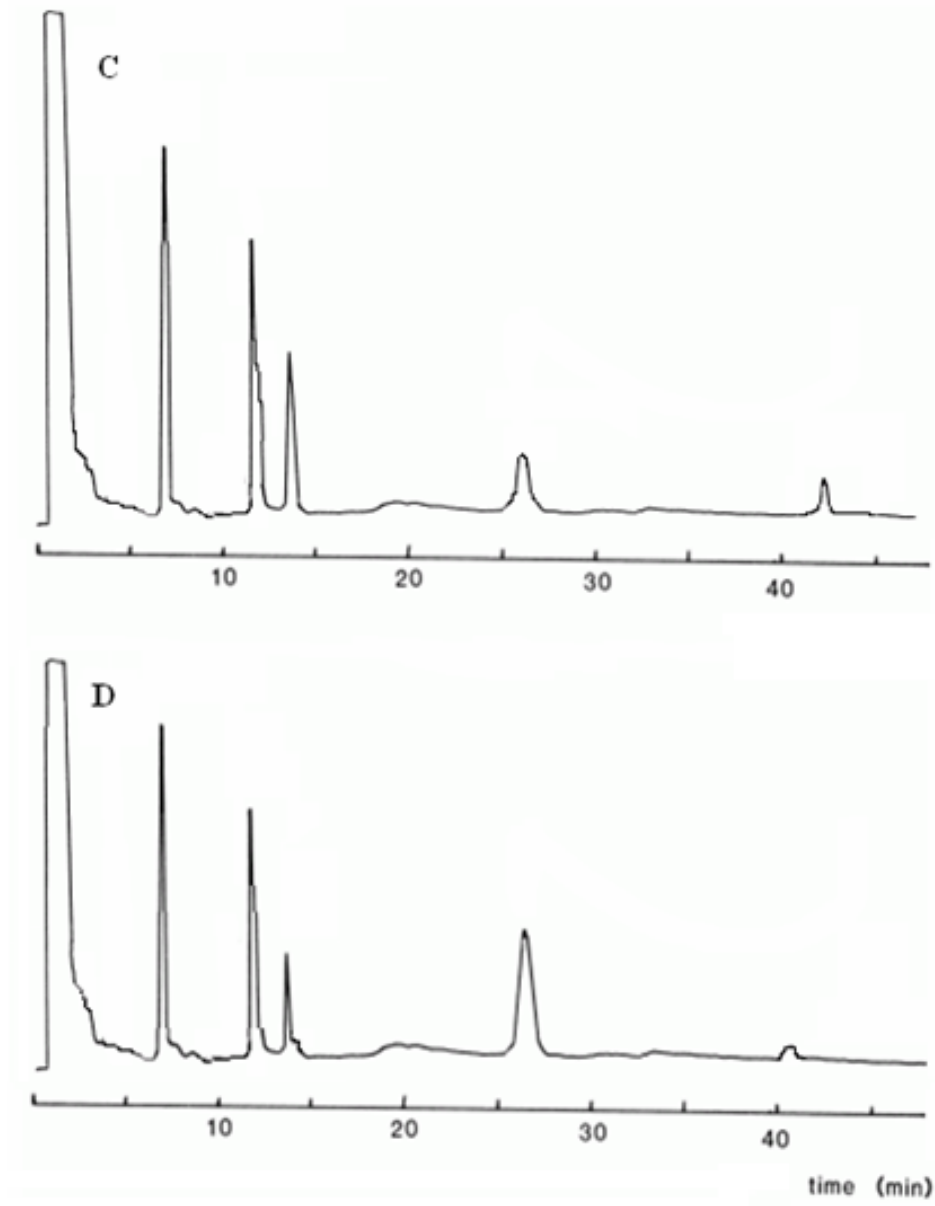
lipolytica, *M. luteus* ve *B. cepacia* ile etkileşim sonrasında peyniraltı suyu içerisindeki yağ miktarının sırası ile 23.47, 19.86 ve 20.17 mg/mL seviyelerine düştüğü belirlenmiştir. Yine Çizelge 3.9'da görüldüğü gibi kültürasyon süresinin sonunda *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia*'nın yağ degradasyon oranları sırası ile % 22.9, % 51.7 ve % 31.3 bulunmuştur.

Çizelge 3.9. İzolatlar tarafından degrade edilen protein, karbonhidrat ve yağ oranları (%)

	Protein	Karbonhidrat	Yağ
<i>Y. lipolytica</i>	76.6	8.41	22.9
<i>M. luteus</i>	50.3	37.8	51.7
<i>B. cepacia</i>	66.6	35.3	31.3



Şekil 3.18 a. Yağ degradasyonuna ait GC kromatogramı, Degredasyon öncesi (A) ve *Y. lipolytica* ile degradasyon sonrası (B) elde edilen GC kromatogramları



Şekil 3.18 b. Şekil 3.18 b. *M. luteus* (C) ve *B. cepacia* (D) ile degradasyon sonrası elde edilen GC kromatogramları

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt fabrikalarının atık suları içerisinde bulunan yüksek konsantrasyonda çözülmüş organik maddeler, özellikle proteinler, laktoz ve yağ, mikroorganizmaların gelişmesi için iyi bir ortam oluşturmaktadır. Süt fabrikası atık sularından mikroorganizma izolasyonu ve biyosürefektan üretimini amaçlayan bu tez çalışmasında Ankara Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan alınan su örneklerinden 5 farklı koloni tipi ayırt edilmiştir. Biyokimyasal ve mikroskopik özelliklerinin incelenmesi sonucunda izolatlar *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır. Bu üç izolatın da biyosürefektan üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatürde de süt fabrikası atık suları ile ilgili çok çeşitli çalışmalara rastlanmaktadır. Süt atıkları florasını araştıran bir çalışmada, McGarvey ve arkadaşları⁽⁸⁰⁾, süt fabrikası atıklarından patojen mikroorganizmaları *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* spp. ve *Mycobacterium avium*'u izole etmişlerdir. Yine Thanomsub ve arkadaşları⁽⁸¹⁾, süt fabrikası atıklarından *Pseudomonas aeruginosa* B189'u izole etmiş ve bu suşun ürettiği ramnolipitin, biyolojik aktivitesini ve kimyasal yapısını incelemişlerdir. Rajeshkumar ve Jayachandran⁽⁸²⁾ tarafından yapılan fizyokimyasal ve biyolojik analizler sonucunda, süt fabrikası atık sularının KOİ değerinin yüksek ve pH değerininin de 6.4 olduğunu belirtmişler ve bu sulardan *Sporolactobacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. ve *Proteus* sp. gibi çeşitli bakteri suşlarını izole edip tanımlamışlardır.

Kujumdzieva ve Nedeva⁽⁸³⁾ laktoz tüketen termotolerant iki yeni maya türünü süt atıklarından izole edip *Kluyveromyces marxianus var. lactis* T1 ve *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* T3 olarak tanımlamışlardır. Ramesh Babu ve arkadaşlarının⁽⁸⁴⁾ yaptığı bir diğer çalışmada yine süt fabrikası atıklarından *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Neisseria* sp. ve *Lactobacillus* sp. mikroorganizmalarını izole edip tanımlamışlardır.

Biyosümfektan madde varlığını belirlemek için drop-collapse metodu kullanılmıştır. Bu yöntem, kolay, ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntemdir ve hem sümfektan üreten mikroorganizmaların ayırt edilmesi için kullanılan kalitatif hem de mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektan konsantrasyonunu belirlemede kullanılan kantitatif bir analizdir. 96 kuyucuktan oluşan bir platformun yağ ile kaplanması ve içerisinde sümfektan madde olan çözeltilerin bu kuyucuklara damlatılıp yayılması esasına dayanır. Ekim yapılmamış besiyeri ve su örnekleri bu kuyucuklara damlatıldığında, damlacıkların boncuk şeklinde kaldığı saptanmıştır^(61,85). İzolatlarla ait kültürlerde ise damlacıkların yayıldığı ve boncuk şeklinden uzaklaştığı belirlenmiştir.

İzolatların biyosümfektan ürettiği belirlendikten sonra temel MSM besiyerinde *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* mikroorganizmaları tarafından üretilen biyosümfektan miktarları fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodladığımız biyosümfektanların miktarları sırasıyla 728, 827 ve 656 mg/L olarak bulunmuştur. Bu verilerden en fazla biyosümfektanı, *M. luteus*'un ürettiği belirlenmiştir. Kahyaoğlu ve Konar'ın⁽³¹⁾ yaptığı çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 suşu ile besiyerini olarak şeker fabrikası atık maddesi olan % 5'lik melas kullanılmıştır. 72 saatlik inkübasyon

sonrasında 0,78 g/L ramnolipid elde edildiği gözlenmiştir. Patel ve Desai'nin⁽²⁾, karbon kaynağı olarak melas ve mısır likörünü kullandıkları çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* GS3 kültürlerinde 0,25 g/L ramnolipid elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz biyosülfektanlar miktar bakımından literatürde yer alan çalışmalarla kıyasalanabilir durumdadır.

Karbon kaynağı mikrobiyal büyümeyi ve biyosülfektan üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Biyosülfektan üretiminde genellikle kullanılan karbon kaynakları karbonhidrat, hidrokarbon ve bitkisel yağlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Üretim maliyetini düşürmek için atık maddeler tercih edilmektedir⁽⁴⁶⁾. Bu nedenle süt fabrikası atık sularından izole ettiğimiz *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* izolatlarının biyosülfektan üretimi üzerine laktoz, glikoz, pepton ve mineral yağ karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Kültürlerde en yüksek ve en düşük biyosülfektan miktarına bakılmıştır. *Y. lipolytica* laktoz varlığında 986, mineral yağ varlığında 879, glikoz varlığında 791 ve peptonlu ortamda 691 mg/L biyosülfektan üretmiştir. *M. luteus* laktozlu ortamda 1005, glikoz varlığında 678, pepton varlığında 610 ve mineral yağ varlığında 595 mg/L biyosülfektan üretmiştir. *B. cepacia* ise yine en fazla laktozlu ortamda 867 mg/L biyosülfektan üretmiştir. Glikoz, mineral yağ ve pepton varlığında sırasıyla 745, 678 ve 440 mg/L biyosülfektan üretmiştir. Bu sonuçlara göre üç mikroorganizmanın, laktozlu ortamda daha fazla biyosülfektan ürettiği belirlenmiştir. Glikoz ve galaktozdan meydana gelmiş bir disakkarit olan laktoz ile bir hidrokarbon olan mineral yağın, glikoz ve peptona göre suda çözünürlüğü azdır. Suda çözünürlüğü düşük olan substratların çözünürlüğünün arttırılabilmesi, mikroorganizmalar tarafından salınan biyosülfektan miktarının arttırılması ile açıklanmıştır⁽²⁰⁾. Suda çözünebilen glikoz ve pepton varlığında ise izolatlarımızın biyosülfektan üretimini azalttığı gözlenmiştir. Mikroorganizmanın

substratı kullanabilirliği yüksek olduğu durumlarda biyosürefektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar glikoz, pepton gibi primer metabolitlerin varlığında biyosürefektan sentezinin katabolik represyona uğradığını rapor etmişlerdir. *Arthrobacter paraffineus*, karbon kaynağı olarak hekzadekanı kullandığında biyosürefektan üretirken, glukozlu ortamda biyosürefektan üretememiştir. *Torulopsis petrophilum* suda çözünen karbon kaynağı içeren ortamda hiç glikolipid üretememiştir⁽³⁹⁾.

Yakimov ve arkadaşları⁽⁸⁶⁾ % 2'lik sükroz ve glikozun *Bacillus licheniformis* BAS 50 suşunun biyosürefektan üretiminde en iyi karbon kaynakları olduğunu ve 160 mg/L ürün elde edildiğini bildirmiştir. Sıdal ve arkadaşları⁽¹⁾ zeytinyağı fabrikası atığı ile kontamine olmuş toprak ve su örneklerinden izole ettiği ve biyosürefektan sentezleme yeteneğinde olan *Pseudomonas* sp. A01 suşu ile zeytin yağ fabrikası atıklarını kullanarak 0.875 g/L biyosürefektan üretildiğini gözlemlemişlerdir. *Candida bombicola*'nın glikoz ve oleik asit, palmitik asit, bitkisel yağlar, peyniraltı suyu gibi substratlar varlığında sophorolipid ürettiği belirtilmiştir. Sophorolipid biyosentezi üzerine lipit karbon kaynağının etkisi ve ürünün yayılması konusu kısmen anlaşılabilmiştir. Örneğin, sophorolipid üretiminde, karbon kaynağı olarak hem laktonik kısım hem de doymuş yağ asitleri ile 16 C'lu ve 18 C'lu doymamış yağ asidi kısımlarına sahip soya yağı ile lipofilik bir substrat olan hekzadekan kullanılmıştır. Hekzadekan C₁₆H₃₄ yapısında laktonik kısımlar ile palmitat yağ asidi kısmından oluşan bir hidrokarbondur. İki durumda sophorolipid üretimini kıyasladıklarında hekzadekanlı ortamda daha fazla ürün olduğunu saptamışlardır⁽⁸⁷⁾. *Candida ingens* karbon kaynağı olarak % 2'lik mısır yağı içeren minimal besiyeri ortamında 10 gün inkübe edilerek büyümenin durduğu 7. günde, maksimum 48.4 mg/L biyosürefektan üretmiştir. Biyosürefektan üretim aşaması sekonder mikrobiyal metabolik proses

olarak öne sürülmüştür⁽⁸⁸⁾. Rashedi ve arkadaşları⁽⁸⁹⁾ İran'ın güney bölgesinde bir petrol kuyusundan *P. aeruginosa* izole etmişlerdir. Bu suş benzin, parafin, gliserol ve peyniraltı suyunu kullanarak ramnolipid üretebilmiştir. % 5'lik gliserol varlığında 2.8 g/L maksimum ramnolipid üretirken, kültür ortamının yüzey gerilimini de 73 mN/m'den 32 mN/m'ye düşüğü gözlenmiştir.

Kültür ortamının pH değeri, mikrobiyal büyüme, aktivite ve biyosürefektan üretimini etkileyen çevresel bir faktördür. Tez kapsamında izolatlarımızın biyosürefektan üretimi için optimum koşulları belirlenmiştir. pH çalışmasında; tüm izolatlar ile pH 6.5 -7.0 aralığında maksimum verim elde edildiği, izolatların 5.5-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük biyosürefektan üretimi gösterdikleri belirlenmiştir. *Y. lipolytica* ve *B. cepacia* için en yüksek biyosürefektan üretimi pH 7.0'da sırası ile 675 ve 763 mg/L olarak gözlenmiştir. *M. luteus* için maksimum biyosürefektan üretiminin pH 6.5'de 856 mg/L olduğu belirlenmiştir. Literatür çalışmalarına baktığımızda genellikle pH 6.5 -7.0 aralıklarında biyosürefektan üretiminin arttığına dair veriler bulunmaktadır. Guerra Santos ve arkadaşları⁽³³⁾ *Pseudomonas* sp.'nin ramnolipid üretiminin pH 6.0-6.5 aralığında maksimum olduğunu, pH 7.0'da ise ramnolipid üretiminin azaldığını saptamışlardır. Cooper ve Goldenberg'in⁽³⁰⁾ yaptığı bir çalışmada ise *Bacillus* sp.'nin pH 6.5-7.0 aralığında biyosürefektan sentezini arttırdığı görülmüştür. pH 5.5'e düşüğünde hem bakteriyal büyüme hem de biyosürefektan madde sentezi azalmıştır. *Rhodococcus*'un pH 6.5-7.2 aralığında maksimum biyosürefektan üretilip yüzey gerilimini düşürdüğü bildirilmiştir⁽⁹⁰⁾. Bu çalışmalar bizim yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir.

Azot kaynağı da biyosürefektan sentezini etkileyen önemli bir diğer faktördür. Literatürde yer alan çalışmalar azot kaynağının mikroorganizmaların biyosürefektan

sentezinde kesin rolü olduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmada kültür ortamına NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NaNO_3 ve KNO_3 azot kaynakları ilave edilmiştir. *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* izolatları için diğer azot kaynaklarına kıyasla NaNO_3 içeren besiyerinde biyosüpfektan üretimi açısından daha yüksek verim elde edildiği tespit edilmiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalardan bazılarına bakacak olursak; Desai ve Banat⁽¹⁸⁾ *Pseudomonas* 44T1 ve *Rhodococcus* ST-5 ile biyosüpfektan üretiminde en uygun azot kaynağının nitrat olduğunu belirtmişlerdir. Petrol atıklarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* PA1'in rhamnolipid üretiminde en uygun nitrojen kaynakları olarak NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ kullanılmış ve sonuçta maksimum ürünün (3.16 g/L) sodyum nitratlı ortamda elde edildiği görülmüştür⁽⁹¹⁾. Uygun azot kaynağı belirlendikten sonra kullanılacak miktarının da önemli olduğu literatürde yerini almıştır. Guerra-Santos'a göre⁽⁸⁹⁾ glutamin-glutamat metabolizması tarafından nitrat, amonyuma göre daha yavaş ve daha iyi metabolize olmaktadır. Bu yüzden nitrojen, sınırlı bir şekilde ortama verildiğinde biyosüpfektan miktarının arttığını saptamışlardır. Sınırlı miktarda ortama azot verildiğinde *P. aeruginosa* ve *C. tropicalis* ITP-4'ün biyosüpfektan üretimini arttırdığı gözlenmiştir⁽¹⁸⁾. Abouseouda ve arkadaşları⁽⁹²⁾, *Pseudomonas fluorescens*'in biyosüpfektan üretimi üzerine optimum azot kaynağı etkisini araştırmak için 1 g/L NH_4Cl , NaNO_3 ve NH_4NO_3 kullanmışlar ve sonuçta NaNO_3 ile NH_4NO_3 'ün en iyi azot kaynakları olduğunu belirlemişlerdir. NH_4Cl , içerisindeki amonyum tuzu biyosüpfektan üretiminde değil, bakteriyal büyümede kullanılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada optimum azot kaynağı konsantrasyonunu tespit etmek için farklı oranlarda NaNO_3 besiyeri ortamına ilave edilmiş ve en iyi sonuç 1g/L'lik derişimde bulunmuştur.

Ayrıca çalışma kapsamında kültür ortamına mikroorganizmaların hücre duvarı geçirgenliğini etkileyebilecek kimyasal bir ajan olan EDTA'nın eklenmesi ile biyosülfektan üretiminin arttırılması amaçlanmıştır. 0.01-0.05 g/L aralığındaki düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığının biyosülfektan üretimini arttırdığı, 0.1 ve 0.2 g/L konsantrasyonlarında ise bakteri gelişiminin ve buna bağlı olarak biyosülfektan üretiminin azaldığı belirlenmiştir. En yüksek biyosülfektan üretimi 0.05g/L EDTA konsantrasyonunda gözlenmiştir ve *M. luteus*, *Y. lipolytica*, *B. cepacia* için sırası ile 932, 825 ve 645 mg/L olarak bulunmuştur. Literatürde EDTA konsantrasyonuna, mikroorganizma ve kültür ortamına bağlı olarak biyosülfektan üretiminin arttırılabildiği ya da baskılanabildiği ile ilgili veriler yer almaktadır. Düşük konsantrasyonlarda EDTA varlığı ile biyosülfektan üretiminin artması hücre geçirgenliğinin artması, besinlerin hücre içerisine daha kolay alınması ve daha çok metabolit üretilmesi ile açıklanabilir. *Pseudomonas* hücrelerine ait dış membranlar Mg (II) iyonları ve lipopolisakkaritlerin kovalent olmayan çapraz bağlarla etkileşimi ile stabil hale gelmektedir. Düşük miktarlarda EDTA Mg (II) iyonları ile etkileşime girerek dış membran akıcılığında ve bütünlüğünde değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişimler dış membranın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Besi ortamında EDTA miktarının arttırılması ile biyosülfektan üretiminin azalması, MSM besiyeri bileşiminde bulunan ve mikroorganizmaların üremesi için gerekli Mn(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II) ve Co(III) metallerinin EDTA ile kompleks oluşturması ile açıklanabilir. EDTA, yapısında dört karboksilat ve iki amin grubu içermektedir ve bu gruplar EDTA'nın metallerle kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. EDTA özellikle Mn(II), Cu(II), Fe(III), Pb (II) ve Co(III) metal iyonları ile güçlü kompleksler oluşturmaktadır. EDTA-metal kompleksinin oluşması ile mikroorganizmaların bu metallere erişimi kısıtlanmakta, mikroorganizma

metabolizmasında ve metabolit üretiminde aksamalar meydana gelmektedir. Mikroorganizmalar tarafından ihtiyaç duyulan bu metaller biyokimyasal reaksiyonların katalizasyonunda, bazı enzimlerin ve kofaktörlerin yapısında yer almaktadırlar. Ortamda çok az bulunan ve hücreler tarafından da çok az miktarda ihtiyaç duyulan böyle elementler, iz elementler olarak tanımlanmaktadır. Bu elementlerin noksanlığı veya azlığı bakterilerin üremelerini ve gelişmelerini olumsuz yönde etkilemektedir. İz elementlerden, demir, elektron transport mekanizması ve sitokrom sentezi için önemlidir. Nitratların redüksiyonunda ve melanin sentezinde bakır önemli bir role sahiptir. Manganez nitrat redüksiyonları için, çinko ise alkol dehidrogenaz aktivitesi ve sitokrom-c'nin sentezi için gereklidir. Mikrobiyal metabolizmada farklı yollarda işlev gören bu elementlerin EDTA ile uzaklaştırılması ya da maskelenmesi, ilgili yollarda aksamalara neden olacaktır ve bu yolla metabolit üretiminde azalacaktır⁽⁹³⁾. *Rhodococcus erythropolis*'in biyosülfektan üretiminde EDTA'nın etkisinin olduğu ve biyosülfektan üretimini arttırdığı belirlenmiştir. *Pseudomonas* sp. 2874 suşunda ortama verilen EDTA'nın, ramnolipid üretimini engellediği saptanmıştır⁽⁹⁴⁾. Literatürde yer alan bilgiler elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

Biyosülfektan üretiminin optimum olduğu sistem parametreleri (pH, karbon kaynağı, NaNO₃ ve EDTA konsantrasyonu gibi) belirlendikten sonra, optimum koşullar peyniraltı atık su örneklerine uygulanmıştır. Mikroorganizmalar besiyeri olarak kullandıkları peyniraltı suyunda 35 °C'de 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. *Y. lipolytica* temel MSM besiyerinde 728 mg/L biyosülfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 946 mg/L biyosülfektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosülfektan miktarının 1.3 kat arttığı gözlenmiştir. *M. luteus* temel MSM besiyerinde 827 mg/L biyosülfektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 992

mg/L biyosürefektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosürefektan miktarının 1.2 kat arttığı gözlenmiştir. *B. cepacia*, temel MSM besiyerinde 656 mg/L biyosürefektan üretirken, peyniraltı suyu içeren besiyerinde 1115 mg/L biyosürefektan üretmiştir. Peyniraltı suyunda biyosürefektan miktarının 1.7 kat arttığı gözlenmiştir. Üç izolatan biyosürefektan madde üretimini arttırmasının nedeni daha önce de belirtildiği gibi peyniraltı atık sularının hayvansal protein, yağ, şeker ve mineral maddeler bakımından zengin oluşudur⁽¹⁰⁾. Böylece izolatlarımız için iyi bir mikrobiyal büyüme ortamı sağlanarak, biyosürefektan üretiminde daha fazla verim elde edilmiştir.

Rodrigues ve arkadaşları⁽⁹⁵⁾ *Lactobacillus pentosus* ile peyniraltı suyunu kullanarak 72 saatlik inkübasyon sonrasında 1.4 g/L maksimum biyosürefektan elde etmişlerdir. Dubey ve Juwarkar⁽⁴⁷⁾ biyosürefektan üretmek için *Pseudomonas aeruginosa* BS2 suşu ile peyniraltı suyunu kullanmıştır. 48 saatlik inkübasyonda 0.92 g/L biyosürefektan gözlenmiştir. Peyniraltı suyunda üç izolatımızın da biyosürefektan madde miktarını attırdıkları görülmüştür. Literatürdeki bilgilere dayanarak peyniraltı suyunu kullanarak elde ettiğimiz biyosürefektanlar miktar açısından yüksek olup literatürle kıyaslanabilir durumdadır.

Tez kapsamında ayrıca elde ettiğimiz biyosürefektanların FTIR analizi ile moleküler yapısı, yüzey gerilimi, emülsiyon aktivitesi, antibakteriyal, antifungal aktiviteleri, hemolitik aktivite, ağır metal tutma kapasitesi gibi bazı özellikleri de belirlenmiştir.

FTIR analizi ile *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia*'dan elde ettiğimiz BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. BS-I'e ait spektrumda 3312 cm⁻¹'de N-H bağından, 1271 cm⁻¹'de C-O ester gruplarından, 1411 cm⁻¹'de C-CH₃-CH₂ alkil guplarından kaynaklanan pikler tespit edilmiştir.

Spektrumda amin gruplarının ve alkil gruplarının varlığı yağ asidi zincirleri ve protein varlığına işaret etmektedir. Bu sonuç ile BS-I biyosüpfektanının lipoprotein yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. BS-II ile elde edilen spektrumda gözlenen 3244 cm^{-1} 'deki titreşimler -OH gruplarının, 1680 cm^{-1} 'deki bandlar lakton karbonil gruplarının, 1456 cm^{-1} 'deki ve 1372 cm^{-1} 'de gözlenen titreşimler ise $\text{C-CH}_3\text{-CH}_2$ alkil gruplarının varlığına işaret etmektedir. Spektrumda gözlenen lakton karbonil grupları, hidroksil ve alkil grupları BS-II biyosüpfektanının glikolipid yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir. BS-III spektrumunda 3383 cm^{-1} 'de -OH gruplarından, 1658 cm^{-1} 'de CO-N bağından, 1403 cm^{-1} 'de $\text{C-CH}_3\text{-CH}_2$ alkil gruplarından, 1153 ve 1026 cm^{-1} 'de C-O ester karbonil gruplarından kaynaklanan titreşimler gözlenmiştir. Bu titreşimler lipoprotein yapıya işaret etmektedir. 711 cm^{-1} 'de gözlenen C=C bağı titreşim bantları biyosüpfektan yapısındaki yağ asidi zincirlerinin doymamış olduğunu işaret etmektedir. Joshi ve arkadaşları⁽⁹⁶⁾ *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 ve *Bacillus* HS3 suşları ile peyniraltı suyu ve melası kullanarak elde ettikleri biyosüpfektanların FTIR spektrumlarını inceleyerek biyosüpfektanların lipopeptid yapıda olduklarını rapor etmişlerdir.

İzolatlara ait kültürlerde yüzey gerilimindeki değişimler incelendiğinde tüm kültürlerde yüzey geriliminin azaldığı belirlenmiştir. Yüzey geriliminde en belirgin azalma *Y. lipolytica* kültüründe gözlenmiştir. *Y. lipolytica*'nın ürettiği BS-I, ekim yapılmamış besiortamının yüzey gerilimini 70.1 mN/m 'den 45.7 mN/m 'ye düşürmüştür. Yüzey gerilimini azaltıcı etkisi % 35 olarak ölçülmüştür. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II yüzey gerilimini 59.2 mN/m 'ye düşürerek, % 16 oranında yüzey gerilimini azaltıcı etki göstermiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III, yüzey gerilimini 61.6 mN/m 'ye düşürerek, % 12 oranında yüzey gerilimini azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır.

Biyosümfektanlar hem hidrofobik hem de hidrofilik gruplar içerdiklerinden yüzey ve yüzeyler arası gerilimi etkili bir şekilde azaltma yeteneğine sahiptirler⁽¹⁹⁾. Saf bir sıvının içerisinde bir madde çözünüyorsa, çözünen maddenin ve çözücünün karakterine bağılı olarak yüzey geriliminin değıştiğı gözlenir. Çözünen tanecikler, içteki çözücü moleküllerinin, yüzeydeki çözücü moleküllerini içe doğru çekmesini belli ölçüde engellediğinden, çözeltilerin yüzey gerilimi saf çözücüye göre genellikle düşüktür⁽⁹⁷⁾. *B. subtilis*'in sentezlediğı surfaktinin suyun yüzey gerilimini 72 mN/m'den 25 mN/m'ye, *P. aeruginosa*'dan elde edilen ramnolipidlerin suyun yüzey gerilimini 26 mN/m'ye, *T. bombicola*'nın ürettiğı sophorolipidlerin de suyun yüzey gerilimini 33 mN/m'ye düşürebildiğı rapor edilmiştir⁽³⁹⁾. Dubey ve Juwarkar⁽⁴⁷⁾, *Pseudomonas aeruginosa* BS2 suşunun ürettiğı ramnolipitin, suyun yüzey gerilimini 72mN/m'den 27 mN/m'ye düşüren etkili yüzey aktif bileşiğı olduğunu rapor etmişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada ise *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* izolatları tarafından üretilen biyosümfektanların emülsifikasyon özelliğı 9-14 C'lu kerosen, 7 C'lu toluen, 8C'lu ksilen ve 15–40 C'lu mineral yağ hidrokarbonları kullanılarak test edilmiştir. *Y. lipolytica*'dan elde edilen BS-I'in sırasıyla en yüksek ve en düşük E₂₄ değerleri; kerosende 59 ve toluende 45 olarak hesaplanmıştır. *M. luteus*'dan elde edilen BS-II'in en yüksek E₂₄ değeri kerosende 65, en düşük ise ksilende 44 olarak ölçülmüştür. *B. cepacia*'dan elde edilen BS-III'ün en yüksek E₂₄ değeri mineral yağda 59, en düşük ksilende 37 olarak ölçülmüştür. BS-I, BS-II ve BS-III biyosümfektanların kısa zincirli hidrokarbonlara kıyasla uzun zincirli hidrokarbonlara karşı yüksek emülsifikasyon özelliğı sergilediğini söyleyebiliriz.

Biyosürefektanlar emülsiyon aktiviteleri ile kerosen, n-hekzadekan, toluen gibi hidrokarbonlardan süspansiyon oluştururlar. Bu sayede hidrokarbonların degradasyonu hızlanabilmektedir⁽⁴⁶⁾. Biyosürefektanlar karışmayan sıvıların ara yüzeyinde birikerek yüzey gerilimini azaltırlar, çözünemeyen bileşiklere bağlanarak yüzey alanlarını arttırlar. Biyokullanımlarına ve daha sonra hidrokarbonun biyodegradasyonuna neden olurlar^(28,42). Literatürde yer alan çalışmalara baktığımızda; *Pseudomas aeruginosa* LBI'den üretilen ramnolipitin, su ile karışım halinde olan farklı hidrokarbon kaynaklarına karşı emülsifikasyon indeksi ölçülmüştür. E_{24} (%) ; benzen 60, kerosen 50, mineral yağ 42, hint yağı 67, badem yağı 83 ve ham petrol için 75 olarak belirlenmiştir⁽⁹⁸⁾. *Aeromonas* spp.'nin petrolü kullanarak ürettiği biyosürefektanın, dizel ve hekzana karşı gösterdiği emülsiyon aktivitesi ölçülmüştür. Dizel için $E_{24} = 65$ ve hekzan için $E_{24} = 22$ olarak saptanmıştır⁽⁹⁹⁾.

Farklı hidrokarbonlara karşı yapılan emülsiyon analizi sonucunda elde ettiğimiz BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının emülsiyon aktivitelerinin yüksek olması toprak ve su biyoremediasyonunun yanısıra diğer endüstriyel alanlarda kullanılabilmelerinin mümkün olduğunu göstermektedir.

Biyosürefektanlar hayvan, bitki ve insan patojenlerine karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirler⁽⁴⁰⁾. Tez kapsamında elde ettiğimiz biyosürefektanların antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri test edilmiştir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, sırasıyla *K. pneumonia*'da 25, *E. coli*'de 22, *P. aeruginosa*'da 20 ve *S. aureus*'ta 15 mm inhisyon zonları oluşturarak antibakteriyal etki göstermiştir. Ancak BS-I'in *P. vulgaris*'te antimikrobiyal etki gösteremediği belirlenmiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II, sırasıyla *P. vulgaris*'te 26, *K.*

pneumonia'da 22, *P. aeruginosa*'da 16, *E. coli*'de 15 ve *S. aureus*'ta 11 mm inhibisyon zonları oluşturarak antibakteriyal etki sergilemiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III'ün antibakteriyal etkisi, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*'te sırasıyla oluşturdukları 32, 25, 20, 19 ve 15 mm'lik inhibisyon zonları ile belirlenmiştir. 20 mg/mL konsantrasyonunda uygulanan BS-I, BS-II ve BS-III'ün bu patojen bakterilerin büyümelerini inhibe edici, etkili birer antibakteriyal ajanlar olduğu görülmüştür.

Elde ettiğimiz biyosüperfektanların *C. albicans*, *C. krusei* mayalarında gelişme ve yalancı misel oluşumuna ve *A. flavus* küf türünde ise spor oluşumu ile misellerin uzamasına karşı gösterdiği antifungal etki belirlenmiştir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, *C. albicans*, *C. krusei* ve *A. flavus* için sırasıyla 21, 13 ve 20 mm inhibisyon zonları oluşturmuştur. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II'nin ise bu patojen mikroorganizmalarda sırasıyla 20, 14 ve 18 mm'lik inhibisyon zonları oluşturduğu belirlenmiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III'de, *C. albicans*, *C. krusei* ve *A. flavus*'ta sırasıyla 22, 15 ve 16 mm inhibisyon zonları oluşturmuştur. Bu test sonucunda 20 mg/mL konsantrasyonunda uygulanan BS-I, BS-II ve BS-III'ün en fazla antifungal etkisinin *C. albicans*'ta, en az *C. krusei*'de olduğu gözlenmiştir.

Ayrıca BS-I, BS-II ve BS-III'ün bitki patojeni mantarlara karşı antifungal etkileri de test edilmiştir. *Fusarium* cinsine ait türler, toprakta ve bitkide bulunan filamentöz funguslardır. Normal mikroflorası pirinç, fasulye ve diğer ekinlerdir. Genel kontaminant ve bitki patojeni olarak bilinmekle beraber, *Fusarium* spp. insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Birçok bitki hastalığı, çok yaygın bir tür olan *Fusarium* küfünün çeşitlerinden kaynaklanır. *Fusarium*, 20'nin üzerinde tür içermektedir⁽¹⁰⁰⁾.

% 5 oranında *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, *F. heterosporium*'da % 33, *F. inflexum*'da % 53, *F. avenaceum*'da % 58 ve *F. graminearum*'da % 50 oranlarında misel gelişimini inhibe etmiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II bu patojenlerde misel gelişimini *F. heterosporium*'da % 56, *F. inflexum*'da % 50, *F. avenaceum*'da % 60 ve *F. graminearum*'da % 58 oranında engellemiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III'ünde misel gelişimini inhibe edici etkisi *F. heterosporium*'da % 3, *F. inflexum*'da % 49, *F. avenaceum*'da % 54 ve *F. graminearum*'da % 71 olarak ölçülmüştür. Ancak BS-III'ün varlığında *F. heterosporium*'un % 97 oranında miseller gelişirken, misel yoğunluğunun azaldığı görülmüştür.

Das ve arkadaşları⁽¹⁰¹⁾, denizden izole ettikleri *B. circulans*'ın ürettiği lipopeptid yapıdaki biyosürefektanın antimikrobiyal aktivitesini belirlemişlerdir. Metanolde ekstrakte edilen biyosürefektanın HPLC'de çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş haldeki biyosürefektan, gram negatif bakterilerden *Proteus vulgaris* ve *Alcaligenes faecalis*, gram pozitif *Staphylococcus aureus*'a karşı 10 µg/mL gibi düşük konsantrasyonda uygulanarak antibakteriyel etki göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada *Bacillus subtilis* R14 tarafından üretilen lipopeptid yapıdaki biyosürefektanın gram pozitif koklara karşı, gram negatif basillerden daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. *Enterococcus faecalis*'te oluşan zon çapı, 14.6 mm, *Escherichia coli*'de 13.8 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 9.8-12.1 mm arasında ve *Staphylococcus aureus*'ta ise 14.2 mm olarak ölçülmüştür. Patojen mikroorganizmalar, doğal olarak bazı antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Bu sonuçlar, kullanılan biyosürefektanların gösterdikleri antimikrobiyal etkiyi çok daha önemli kılmaktadır⁽¹⁰²⁾. Benincasa ve arkadaşları⁽¹⁰³⁾ tarafından, petrolle kontamine olmuş topraktan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* LBI'in ürettiği ramnolipid,

Bacillus subtilis, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus vulgaris* için 8 mg/L, *Streptococcus faecalis* için 4 mg/L ve *Pseudomonas aeruginosa* için 32 mg/L, bitki patojeni fungal türler *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocadium virens* ve *Chaetonium globosum* için 32 mg/L konsantrasyonlarında uygulanmış ve iyi bir antimikrobiyal aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Bakteriyal hücre içerisine giren biyosümfektanlar, proteinler, enzimler, mineraller ve iz elementler gibi sitoplazmik moleküllerle etkileşerek çeşitli metabolik faaliyetlerde aksamalara neden olmaktadır. Literatürde biyosümfektanların antibakteriyal ve antifungal etki mekanizmalarına dair bilgiler de bulunmaktadır. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen utirinin maya hücrelerinin membran yapısını ve morfolojilerini etkileyerek antifungal aktivite sergilediği belirtilmiştir. Utirinin hücre duvarını geçip, membran içindeki partikülleri toplayarak oluşturduğu küçük kesecikler ile plazma membranı bozar ve hatta utirin nüklear membran ve stoplamik organellerle etkileşime geçer. Sürfektinin membran geçirgenlik mekanizması, lipopeptidlerin hemolitik ve antibiyotik etkisi ile hücre membranında por oluşumuna neden olması ile açıklanmıştır. Bu durumda süfektinin fosfolipidler ile etkileşim halinde olduğu bölgelerde membran bariyer özelliklerinin hasara uğradığı öne sürülmüştür. Yapılan incelemeler biyosümfektanların genellikle konakçı ya da bakteriyal hücreler ile etkileşime geçen, enfeksiyon inhibisyonlarına neden olan sinyal faktörleri içerdiklerini göstermiştir. Ayrıca mikrobiyal adhezyonu engelleme özelliğine de sahip oldukları öne sürülmektedir⁽²⁴⁾. Biyosümfektanların, deterjanlar gibi hücre membran geçirgenliği üzerinde toksik etki gösterdiği kabul edilmektedir⁽⁸¹⁾. Elde ettiğimiz biyosümfektanların, antibakteriyal ve antifungal etkileri dikkate alınacak olursa terapötik, biyokontrol ve biyomedikal alanlarda kullanılabilmelerinin mümkün olacağı kanısındayız.

Elde ettiğimiz biyosümfektanların hemolitik aktivitesine de bakılmıştır. Sonuç olarak, biyosümfektan içermeyen kan örneğinde çok düşük miktarda hemoglobinin (0.1g/dL), seruma geçtiği gözlenirken, biyosümfektanlarla muamele edilen kan örneklerinde, biyosümfektan içermeyen kan örneğine göre yüksek derecede hemolitik aktivite olduğu belirlenmiştir. En fazla hemolitik aktivite *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III biyosümfektanında gözlenmiştir. En düşük hemolitik aktiviteyi ise *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I göstermiştir. Literatürde sıvı ortamda biyosümfektan üretme kapasitesinin hemolitik aktivite ile ilgili olduğu ifade edilmiştir. Hemoliz aktivitesinin bu yüzden biyosümfektan üreten suşları ayırmada iyi bir kriter olduğu bildirilmiştir. Ancak biyosümfektanların tamamının hemolitik aktiviteye sahip olmadığı, bunun yanısıra kanlı agarı lizis eden virülens faktörler ve yeterince dağılıp kan hücrelerini lizis edemeyen biyosümfektanlar olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden kanlı agarı lizis edip etmemek, biyosümfektan üretimini ayırt etmek için kullanılan kesin bir test değildir⁽¹⁰⁴⁾. Kanlı agar metodu biyosümfektan üreten *Lactobacillus* suşlarını ayırt etmek için kullanılmıştır. Biyosümfektanların hemolitik aktiviteleri ilk kez Bernheimer ve Avigad (1970) tarafından keşfedilmiştir. Kanlı agarı lizis etme surfaktin ve ramnolipid miktarını belirlemede, biyosümfektan üreten yeni izolatları ayırt etmede kullanılmıştır. Kanlı agarı lizis edebilme özelliği biyosümfektan aktivitesini ayırt etmek için primer metod olarak önermiştir⁽⁹⁵⁾. Çift tabakalı misellerin oluşumu ile eritrosit membran geçirgenliğinin artması sonrasında, hücrenin ozmotik lizise uğratarak biyosümfektanların hemolitik aktivite sergiledikleri düşünülmektedir⁽¹⁰⁵⁾.

Endüstriyel atıksular, içerdikleri ağır metal iyonları ile günümüzde en önemli çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Ağır metallerin parçalanabilir özellikte olmaması, bu tür kirliliklerin giderilmesini de zorlaştırmaktadır. Yüksek

konsantrasyonda ağır metal içeren endüstriyel atık suların arıtımında ve topraktan metal gideriminde nötralizasyon, kimyasal çökeltim, adsorpsiyon, sorpsiyon, iyon değiştirme, ters ozmoz, buharlaştırma ve membran yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu nedenle ağır metallere kontamine olmuş toprak ve suların arıtılmasında immobilizasyon ve uzaklaştırma yöntemleri kullanılmaktadır⁽¹⁰⁶⁾. Mikroorganizmaların ve mikrobiyal ürünlerin kullanımı ağır metal giderim yöntemi olarak uygun bir alternetiftir. Bu çalışmada mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektan maddeler ile endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve atık sularla alıcı ortamlara aktarılan ağır metallere giderimi incelenmiştir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I'nin ağır metal giderim oranları; % 59.2 Cu(II), % 44.5 Pb(II), % 39.2 Zn(II), % 27.6 Fe(III), % 26.3 Cd(II) ve % 22.6 Hg(II) olarak hesaplanmıştır. *M. luteus*'tan elde edilen BS-II'nin ağır metal giderim oranları; % 61.0 Pb(II), % 59.2 Cu(II), % 45.6 Cd(II), % 32.3 Zn(II), % 31.3 Hg(II) ve % 30.9 Fe(III) olarak ölçülmüştür. *B. cepacia*'dan elde edilen BS-III'ün ağır metal giderim oranları ise; % 64.9 Cu(II), % 55.2 Pb(II), % 51.0 Cd(II), % 38.3 Zn(II), % 30.1 Hg(II) ve % 21.9 Fe(III) olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre BS-I en fazla % 59.2 oranında Cu(II) uzaklaştırırken, en az % 22.6 oranında Hg(II) uzaklaştırabilmiştir. BS-II en fazla % 61.0 oranında Pb(II) uzaklaştırırken, en az % 30.9 oranında Fe(III) uzaklaştırabilmiştir. BS-III ise en fazla % 64.9 oranında Cu(II), en az % 21.9 oranında Fe(III) uzaklaştırabilmiştir.

Biyosümfektanlarla ağır metal giderimi konusunda literatürde yapılmış çok fazla çalışma yer almamaktadır. Mulligan ve arkadaşları⁽¹⁰⁷⁾, ağır metallere kontamine olmuş sedimentlerden (110 mg/kg bakır and 3300 mg/kg çinko) ağır metal uzaklaştırmak için *Bacillus subtilis*'ten surfaktin, *Pseudomonas aeruginosa*'dan ramnolipid ve *Torulopsis bombicola*'dan sophorolipid elde

etmişlerdir. Bu biyosürefektanlardan, % 0.5 oranında ramnolipitin, % 65 oranında bakır ve % 18 oranında çinko uzaklaştırdığını, % 4 sophorolipitin % 25 oranında bakır ve % 60 oranında çinko uzaklaştırdığını, surfaktinin ise daha az etkili olduğunu % 15 oranında bakır ile % 6 oranında çinko uzaklaştırabildiğini belirlemişlerdir. Biyosürefektanların metal uzaklaştırma mekanizması, ultrafiltrasyon sonucunda belirlenmiştir. Toprak yüzeyinde biyosürefektan miselleri, ağır metalleri soğurarak metal-biyosürefektan kompleksi oluşur ve ağır metal topraktan uzaklaştırılır. Ağır metalin kontamine olmuş ortamdan uzaklaştırılması kontaminasyon düzeyine, biyosürefektanın tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Yapılan bir başka çalışmada, kurşunla kontamine olmuş suyun ağır metal giderimi incelenmiş ve FTIR analizi yapılarak biyosürefektanların karboksil, hidroksil gruplar taşınması ve ağır metallerin katyonik yapıda olması nedeniyle aralarında elektrostatik bir etkileşim meydana gelmektedir. Böylelikle biyosürefektanların, ağır metal uzaklaştırmada etkili oldukları belirtilmiştir⁽¹⁰⁸⁾.

Elde ettiğimiz verileri, literatürde yer alan verilerle kıyasladığımızda BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının ağır metal giderim oranlarının yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Bu özelliklerinden dolayı BS-I, BS-II ve BS-III biyosürefektanlarının, ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve suların biyoremediasyonda kullanılabilmesinin mümkün olduğu görülmektedir.

Peyniraltı atık sularının biyodegradasyon yolu ile arıtılması işleminde peyniraltı suyunun protein, karbonhidrat ve yağ konsantrasyonları tayin edilmiştir. Ekim yapılmamış peyniraltı suyunun başlangıçtaki ve etkileşim sonrasındaki protein miktarının belirlenmesiyle *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından degrade edilen protein oranlarının sırasıyla %76.6, % 50 ve % 66.6 olduğu belirlenmiştir.

Ekim yapılmamış peyniraltı suyunun başlangıçtaki ve etkileşim sonrasındaki karbonhidrat miktarı belirlenmiştir. *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia*'nın degrade ettiği karbonhidrat oranları sırasıyla % 8.41, % 37.8 ve % 35.3 olarak hesaplanmıştır.

GC analizleri sonrasında elde edilen kromatogramda pik yoğunluğundaki değişimler yağ degradasyonunu doğrulamaktadır. *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia*'nın degrade ettiği yağ oranları sırasıyla % 22.9, % 51.7 ve % 31.3 olarak hesaplanmıştır. Kromatogramda gözlenen pik yoğunluğunun *M. luteus* ile etkileşim sonrasında önemli derecede azaldığı görülmektedir. Biyodegradasyon hidrofobik yapıdaki kontaminantların, kimyasal bileşiklerin enerjiye, hücre kütesine ve metabolitlere dönüşümünü sağlamaktadır. İzolatlar, peyniraltı suyundaki karbonhidrat, laktoz, yağ ve proteini karbon ve azot kaynağı olarak metabolize ederek biyosürefektan sentezlemişlerdir.

Bu tez çalışması sonucunda her bir izolattan elde edilen biyosürefektanların karakterizasyonu ve biyokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ile peyniraltı sularının biyodegradasyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Ayrıca çevre için önemli bir tehdit unsuru olan bu sular biyolojik olarak arıtılmıştır. Böylelikle sadece yurt dışından temin edilebilen biyosürefektan maddelerin Türkiye'de üretilebilecek olması bu çalışmanın ticari uygulanabilirliğini de arttırmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. U. Sidal, N. Kolonkaya, Kurtonur C., Turkish Journal of Biology, **24**: 611–625 (2000).
2. R.M. Patel and A.J. Desai, Lett. Appl. Microbiol., **25**: 91-94 (1997).
3. M. Deshpande and L Daniels, Bioresource Technol., **54**: 143-150 (1995).
4. A. K. Halkman, M. Atamer, A.H. Ertaş, Endüstri ve çevre ilişkileri. TMMOB ZMO Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, **2**;1029–1047 (2000).
5. N. Yiğit, Peyniraltı suyundan sürekli sistemde biyogaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara (2007).
6. www.styd-cevreorman.gov.tr/IMAGES/sut_endustrisi.doc (erişim tarihi 01/12/2007).
7. <http://www.ultraspin.com.au/images/Dairy-s2-skimmer.jpg> (27/05/2007)
8. <http://foodwaste-milk.tripod.com/whey/index.html> (erişim tarihi 27/05/2007)
9. S. Sözer ve O. Yıldız, Sığır gübresi ve peyniraltı suyu karışımlarından biyogaz üretimi üzerine bir araştırma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, **19**; 179–183 (2006).
10. C. Karagözlü, M. Bayarer, Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., **41**; 197-207 (2004).

11. DİE, 2004. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer) T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları (2002).
12. C. Karagözlü ve G. Kavas, Alkollü fermente süt içecekleri: Kefir ve kımızın özellikleri ve insan beslenmesindeki önemi. Dünya Gıda, **6**; 86-93 (2000).
13. M. Metin ve F. Öztürk. Süt işletmelerinde sanitasyon. Ege Üniv. Meslek Yüksek Okulu Yayınları, **17**; 79-110 (1995).
14. R. İleri ve N. Güner, Süt endüstrisi atıksularında yeni bir yağ-sıvı ayırımı teknolojisinin araştırılması, **9**; 3-8 (2000).
15. B. Demirel, O. Yenigün ve T. T. Onay, İTÜ Dergisi su kirlenmesi kontrolü, **15**; 3-16 (2005).
16. E. Z. Ron and E. Rosenberg, Current Opinion Biotechnol., **13**;249-252 (2002).
17. http://www.eng.deu.edu.tr/cev_bitirme_2007.pdf (erişim tarihi:19/04/2008)
18. J. D. Desai and I. M. Banat, Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**; 47-64 (1997).
19. M. Nitschke, C. Ferraz and M. Pastore, Brazilian Journal Of Microbiology, **35**; 81-85 (2004).
20. A.Uysal ve A.Türkman, Klorofenollü bileşiklerin ayrışabilirliğinin biosüpfektan kullanımı ile hızlandırılması, **14**; 23-30 (2004).
21. <http://www.mnh-tr.com/p21.html> (erişim tarihi:19/06/2008)
22. A. Singh, J. D. Van Hamme and O. P. Ward, Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects (2006).

23. RS. Makkar and S.S Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**; 428–434 (2002).
24. L.R. Rodrigues, J.A Teixeira, R. Oliveira, *Biochemical Engineering Journal*, **32**; 135–142(2006).
25. I. M Banat, R. S. Makkar, and S. S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**; 495–508 (2000).
26. Rosenberg, E. and Ron, E.Z.. High- and low molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**; 154-162 (1999).
27. A.Shulga, E. Karpenko, R.Vildanova-Martshishin, A.Turovsky and M. Soltys, *Adsorpt. Sci. Technol.*, **18**; 171–176 (1999).
28. E.Z. Ron, and E. Rosenberg, *Environ. Microbiol.*, **3**; 229–236 (2001).
29. IM. Banat, *Biores Technol.*, **51**;1-12 (1995).
30. D. Cooper and B. Goldenberg, *Appl Environ Microbiol.*, **53**; 224–229 (1987).
31. M. Kahyaoğlu ve V. Konar, *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. J of Fırat Univ*, **18**; 493-498 (2006).
32. S. Lang and D. Wullbrandt, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **51**; 22–32 (1999).
33. K.K. Gautam and V.K Tyagi, A Review. *J. Oleo Sci.*, **55**; 155–166 (2005).
34. D. Schulz, A. Passeri, M. Schmidt, S. Lang, F. Wagner, V. Wray and W. Gunkel, *Z. Naturforsch*, **46**;197–203 (1991).
35. F. Peypoux, J.M. Bonmatin and J. Wallach, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**; 553–563 (1999).

36. K. Jenny, O. Kappeli and A. Fietcher, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **36**; 5–13 (1991).
37. M. Nitschke e G. M. Pastore, *Nova*, **25**; 772-776 (2002).
38. S. S Zinjarde and A. Pant, *J. Basic Microbiol.*, **42**; 67-73 (2002).
39. N. G. K. Karanth, P. G. Deo and N. K. Veenanadig, *Current Science*, **77**; 116-126 (1999).
40. S.S. Cameotra and R.S. Makkar, *Curr Opin Microbiol.*, **7**; 262–266 (2004).
41. S.S. Cameotra and J. M. Bollag, *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, **33**; 111-126 (2003).
42. S. Barathi and N. Vasudevan, *Environ. Int.*, **26**; 413-416 (2001).
43. Y. Zang and R. M. Miller, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**; 3276–3282 (1992).
44. E. Daziel, G. Paquette, R. Vellemur, F. Lepins and J. G. Bisailnon, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**; 1908–1912 (1996).
45. S. Mukherjee, P. Das and R. Sen, *Trends Biotechnol.*, **24**; 509–515 (2006).
46. S. Maneerat, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **27**; 675–683 (2005).
47. K. Dubey and A. Juwarkar, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**; 61–69 (2001).
48. I.M. Banat, N. Samarah, M. Murad, R. Horne and S. Banerjee, **7**; 80–8 (1991).

49. D.C. Herman et al., *Environmental Science & Technology*, **29**; 2280-2285 (1995).
50. S. K. Hood and E. A. Zottola, *Food Control*, **6**; 9-18 (1995).
51. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm> (erişim tarihi:30/06/2008)
52. P. S. Stewart and J. W. Costerton, *Lancet* **358**; 135–138 (2001).
53. K. Muthusamy, S. Gopalakrishnan, T. K. Ravi and P. Sivachidambaram, *Current Science Assoc / Indian Academy of Sciences*, **94**; 736–747 (2008).
54. M. Nitschke, and S. G. Coast, *Trends Food Sci. Technol.*, **18**; 252–259 (2007).
55. A. Fietcher, *Tibtech.*, **10**; 208-217 (1992).
56. M.E. Stanghellini and R.M. Miller, *Plant Disease*, **81**; 4–12 (1997).
57. N. Kosaric, *Food Technol. Biotechnol.*, **39**; 295–304 (2001).
58. N. Kosaric, *PureAppl Chem.*, **64**;1731–1737. (1992).
59. L. Setti, S. Mazzieri, P. G. Pifferi, *Bioresource Tech.*, **67**,191 (1999).
60. Zhang G. L., Wu T-T., Qian X-P, Meng Q, *J. Zhejiang Un. Sci.* 6B (8):725 (2005).
61. A. Bodour and R.M Miller-Maier, *Journal of Microbiological Methods*, **32**; 273-280 (1998).
62. S.K. Saha, and C.F. Brewer, *Carbohydrate Research*, **254**; 157-167 (1994).

63. Y.H. Wei, H.C. Lai, S.Y. Chen, M.S. Yeh, J.S. Chang, *Biotechnol. Lett.*, **26**; 799–802 (2004).
64. E. K. Dağcı ve M. Dığrak, Bazı meyve ekstraktlarının antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, **8**; 2-7 (2005).
65. M. Özcan, D. A. Ceylan, A. Ünver, R. Yetişir, Türkiye'nin Çesitli Bölgelerinden Sağlanan Polen ve Propolis Ekstraktlarının Antifungal Etkisi, *Uludağ Arıcılık Dergisi* (2003).
66. <http://faculty.mansfield.edu/bganong/biochemistry/reagents.htm>
(erişim tarihi; 25/08/2008).
67. http://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia_cepacia,
(erişim tarihi:19/05/2008).
68. http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2000/Burkholderia_cepacia.html
(erişim tarihi:19/05/2008).
69. http://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus (erişim tarihi:19/05/2008).
70. HP. Doddamani, and H. Z. Ninnekar, *Curr Microbiol.*, **43**; 69-73 (2001).
71. <http://www.britannica.com/eb/article-9052499> (erişim tarihi:19/05/2008)
72. <http://www.sinauer.com/perry/MicrobialLife05.pdf>
(erişim tarihi:19/05/2008)
73. http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/miclu/miclu.home.html
(erişim tarihi;18/05/2008).
74. H. Kesenkaş ve N. Akbulut, Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, **43**; 165-174 (2006).

75. http://www.doctorfungus.org/thefungi/Candida_lipolytica.html
(erişim tarihi:18/05/2008).
76. http://www.genomenetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p4.shtml (erişim tarihi:18/05/2008).
77. http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/eukaryotes/Yarrowia_lipolytica.html
(erişim tarihi 17/08/2008).
78. <http://www.kosmix.com/health/micrococcus> (erişim tarihi 17/08/2008)
79. <http://www.wpi.edu/Academics/Depts/CHE/Research/BA/imagingbacteria.html>
ml (erişim tarihi 17/08/2008).
80. J. A. McGarvey, W.G. Miller, S. Sanchez and L. Stanker, *Applied And Environmental Microbiology*, **70**; 4267-75 (2004).
81. B. Thanomsub, W. Pumeechockchai, A. Limtrakul, P. Arunrattiyakorn, W. Petchleelaha, T. Nitoda, H. Kanzaki, *Bioresource Technology*, **98**, 1149–1153 (2007).
82. K Rajeshkumar and K Jayachandran, *Appl Biochem Biotechnol.*; **118**; 65-72 (2004).
83. A. Kujumdzieva, T. Nedeva, M. Morfova and V. Savov, *Journal Of Culture Collections*, **2**; 44–50 (1998).
84. B. Ramesh Babu, S. Maruthamuthu, A. Rajasekar, N. Muthukumar and N. Palaniswamy, *In.t . J. Environ.. Sci. Te.ch.*, **3**; 159-166 (2006).
85. D.K. Jain, D.L. Collins-Thompson, H. Lee and J.T. Trevors, *J. Microbiol. Methods*, **13**; 271-279 (1991).

86. M.M. Yakimov, K.N. Timmis, V. Wray and H.L. Fredrickson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**; 3276–3282 (1995).
87. P. A. Felse, V. Shah, J. Chan, K. J. Rao, R. A. Gross, *Enzyme and Microbial Technology*, **40** (2), 316–323 (2007).
88. C. Amezcua-Vega, H.M. Poggi-Varaldo, F. Esparza-García, E. Ríos-Leal, R. Rodríguez-Vázquez, *Bioresource Technology*, **98**; 237–240 (2007).
89. H. Rashedi, E. Jamshidi, M. Mazaheri Assadi and B. Bonakdarpour, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **2**; 121-127 (2005).
90. A.Tabatabaee, M. Mazaheri Assadi, A. A. Noohi and V. A. Sajadian, *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, **2**; 6-12 (2005).
91. L.M. Santa Anna, G.V. Sebastian, E.P.Menezes, T. L. M. Alves, A.S. Santos, N. Pereira Jr. and D.M.G. Freire, *Environments Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **19**; 159–166 (2002).
92. M. Abouseouda, R. Maachib, A. Amranec, S. Bouderguaa and A. Nabia, *Desalination*, **223**; 143–151 (2008).
93. E. Yalçın, *Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosülfektan Eldesi ve Hidrokarbon Degredasyonunun Araştırılması*, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2008.
94. N Kosaric, WL Cairns, NCC Gray - 1987 - books.google.com.
95. L.R. Rodrigues, A. Moldes, J.A. Teixeira, R. Oliveira, *Biochem. Eng. J.*, **28**; 109-116 (2006).
96. S. Joshi, C. Bharucha, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai, *Bioresource Technology*, **99**; 195–199 (2008).

97. http://en.wikipedia.org/wiki/Surface_tension (erişim tarihi: 25/08/2008)
98. I. O. Moraes, M. Benincasa and R. M. Alegre, *Braz. J. Food Technol.*, **5**;145-149 (2002).
99. M.O. Ilori, C.J. Amobi and A.C. Odocha, *Chemosphere*, **61**; 985–992 (2005).
100. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium> (erişim tarihi 25/08/2008).
101. P. Das, S. Mukherjee and R. Sen, *Journal of Applied Microbiology*, **104**; 1675–1684 (2008).
102. P. A. Vicente Fernandes et al., *Brazilian Journal Of Microbiology*, **38**; 704–709 (2007).
103. M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira and A. Manresa, , *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**; 1–8 (2004).
104. S. Maneerat and K. Phetrong, *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, **29**; 781-791 (2007).
105. G. Dehghan-Noudeh, M. Housaindokht, B. S. Fazzly Bazzaz, *Microbiol society of Korea.*, **43**; 272-276 (2005).
106. A. Türkman, Ş. Aslan, İ. Ege, Doğal Zeolitlerle Atıksulardan Kurşun Giderimi, *Deü Mühendislik Fakültesi Fen Ve Mühendislik Dergisi*, **3**; 13–19 (2001).
107. C. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs, *Journal of Hazardous Materials*, **85**; 111–125 (2001).
108. J. Kim and C. Vipulanandan, *J. Envir. Engrg.*, **132**; 777-786 (2006).