



**T. C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pseudomonas putida* NRRL B-13 SUŞU TARAFINDAN TOLUENİN
BİYOLOJİK YIKIMININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Sümeyya TATLI
(201392041040)**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Musa SARİ**

**SIVAS
2019**

Sümeyya TATLI'nın hazırladığı ve "*Pseudomonas putida* NRRL B-13 Suşu Tarafından Toluenin Biyolojik Yıkımının Belirlenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı **Doç. Dr. Musa SARİ**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Şeker DAĞ**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof. Dr. Süleyman AYDIN**
Fırat Üniversitesi



Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özlem Pelin CAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisans Üstü Tez Yazılım Kılavuzu (Yönerge) ' da belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.





Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

Sümeyya TATLI , 2019

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge) 'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada ;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel , işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı ; beyan ederim .

11.09.2019

Sümeyya TATLI

ÖZET

***PSEUDOMONAS PUTIDA* NRRL B-13 SUŞU TARAFINDAN TOLUEN'İN BİYOLOJİK YIKIMININ BELİRLENMESİ**

Sümeyya TATLI

Yüksek Lisans Tezi

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Musa SARİ

2019; xv + 34 sayfa

Çağdaş yaşamın bir sonucu olarak ortaya çıkan kirlilik , günümüzde üzerinde en çok durulan ancak , en az çözüm getirilebilen konulardan biridir .

Geçtiğimiz yüzyılın son yarısından itibaren gelişen teknolojiyi arkasına alarak büyüyen sanayi ve endüstriyel atımlar , daha fazla enerji talebini beraberinde getirince petrol gibi doğal enerji kaynaklarının tüketimi katlanılarak artmıştır.

Kirletici özelliklerinden dolayı biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen , petrol hidrokarbonlarından çevrenin temizlenmesi , çevre ve uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemlidir.

Toluen gibi organik kirleticiler çevrede uzun süre kalarak çevre güvenliğini ve çevre sağlığını tehdit ediyor. Toluen ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması sırasında ortaya çıkar. Su ve karasal ekosistemlerde risk oluşturan organik kirleticilerin mikroorganizmalar yoluyla biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları , son yıllarda önem kazanmış bir işlemdir. *Pseudomonas* bakteri türlerinin toluen ve ksilen gibi toksik hidrokarbon gruplarına karşı toleransa sahip olduğu görülmüştür .

Bu alışma , önemli evre kirleticisi olarak bilinen , aromatik hidrokarbonlardan biri olan toluenin , *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu tarafından biyolojik yıkımının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

Bu alışma kapsamında , *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu önce glukoz içerikli sıvı besiyerinde üretildi ve spektrofotometrede ölçümler yapılarak büyüme eğrisi oluşturuldu. Üretilen bakteriler toluen içerikli besiyerine ekildi ve zamana bağlı toluen miktarında azalma ve buna bağlı olarak bakteri miktarında ki artış ölçüldü. Daha sonra bakterilerin optimum sıcaklık değeri azaltılarak remelerinin değişmediği ölçüldü. Daha sonra MgCl₂ içeren ve MgCl₂ içermeyen sıvı besiyerine bakteri ekimi yapılarak, MgCl₂ içeren besiyerinde toluenin parçalanma hızının artması sonucu Magnezyumun tepkime de kofaktör olarak görev alarak yıkımı arttırdığı görüldü. CaCl₂ içeren ve CaCl₂ içermeyen sıvı besiyerlerinde *Pseudomonas putida*'nın toluenin biyolojik parçalamasına etki etmediği belirlenmiş oldu.

Anahtar Kelimeler :*Pseudomonas* sp.,toluen.

ABSTRACT

DETERMINATION OF TOLUENE BIODEGRADATION BY *PSEUDOMONAS PUTIDA* NRRL B-13 STRAIN

Sümeyya TATLI

Master of Science Thesis

Cumhuriyet University Graduate School of Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Doc. Dr. Musa SARI

2019; xv + 34 pages

Pollution, which occurs as a result of contemporary life, is one of the most focused but least solvable issues today.

Since the last half of the century, the growing industry and industrial breakthroughs behind the developing technology have increased using the consumption of natural energy sources such as petroleum as they bring with them more energy demand.

Cleaning the environment from petroleum hydrocarbons, which significantly affects the biological balance due to its pollutant properties, is very important in terms of environment and applied microbiology.

Organic pollutants such as toluene remain in the environment for a long time, threatening environmental safety and environmental health. Toluene occurs during the decomposition of gasoline and from other fuels oil. Biodegradation and bioremediation studies of organic pollutants that pose risks in aquatic and terrestrial ecosystems through microorganisms have gained importance in recent years. Pseudomonas bacterial species have been found to have a tolerance to toxic hydrocarbon groups such as toluene and xylene.

This study was planned to determine the degradation of toluene, one of the aromatic hydrocarbons known as an important environmental pollutant, by the *Pseudomonas putida* NRRL B-13 strain.

Within the scope of this study, *Pseudomonas putida* NRRL B-13 strain was first produced in liquid media with glucose content and growth curve was created by measuring spectrophotometrically.

The bacteria produced were cultured in toluene-containing media and the decrease in the amount of toluene due to time and the increase in the amount of bacteria were measured. Then it was seen that the bacteria did not change their reproduction by decreasing the optimum temperature value. By then the cultivation of bacteria liquid medium with and without magnesium chloride were performed. It was seen that toluene degradation rate was increased in magnesium chloride containing medium. Magnesium acts as a cofactor in the reaction that increasing the degradation of toluene. It was determined that calcium chloride did not affect the biological breakdown of toluene in liquid media.

Key Words: *Pseudomonas* sp., toluene

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Musa SARİ' ye ,

Laboratuvar çalışmalarında benden bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ergün KASAKA ' ya

Tez yazım süresi boyunca , benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen daima yanımda olan babam Ali TATLI ve annem Ayşe TATLI 'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Sümeyya TATLI

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2.MATERYAL VE METOD	12
2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar	12
2.2. Glukoz İçeren Besiyerinin Hazırlanması.....	13
2.3. Bakteri Ekimi (1. Nesil)	13
2.4. Bakteri Ekimi (2. Nesil)	14
2.5. Toluen içerikli Besiyerinin Hazırlanması.....	14
2.6. Toluen İçerikli Besiyerine Bakteri Ekimi ve Absorbans Ölçümü.....	14
2.7. Toluen İçeren Stok Besiyeri Hazırlama	15
2.7.1. Standart Eğri	15
2.8. Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ‘de ölçümü.....	15
2.9. Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 30°C ‘ de 600 nm’ de ölçümü.....	15
2.10. MgCl ₂ İçeren ve MgCl ₂ İçermeyen Toluen İçeren besiyerinin 260 nm’ de Absorbans Ölçümü.....	15
2.11. CaCl ₂ İçeren ve CaCl ₂ İçermeyen Toluen İçeren Besiyerinin 600 nm’ de Absorbans ölçümü	16
3. BULGULAR	17
TARTIŞMA VE SONUÇ	29
KAYNAKÇA	32
ÖZGEÇMİŞ	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Toluenin Molekül Yapısı.....	6
Şekil 2. Toluenin Biyolojik Yıkımının Metabolik Yolu.....	8
Şekil 3. Toluenin Yıkımında Toluen Dioksijenaz ve Metilkatekol 2,3-Dioksijenaz Aktivitesi (Madıgan ve Martinko ,2010)	8
Şekil 4. Toluenin Biyolojik Yıkımı	10
Şekil 5. Toluenin Biyolojik Yıkımının Metabolik Yolu (Morimoto et al , 1954)...	11
Şekil 6. Standart Eğri.....	18
Şekil 7. 4 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm ‘deki Absorbans Değerleri ile Zamana Bağlı Değişim Değerleri	20
Şekil 8. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm’ deki Absorbans.....	22
Şekil 9. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm 30 °C ‘deki.....	24
Şekil 10. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ‘ deki 2 M MgCl ₂ İçeren ve MgCl ₂ İçermeyen Absorbans Değerleri ile Değişim Değerleri.....	26
Şekil 11. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ‘ deki 2 M CaCl ₂ İçeren ve CaCl ₂ İçermeyen Absorbans Değerleri ile Değişim Değerleri.....	28

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1 Litrelık glukoz içeren besiyeri ortamı için kullanılan kimyasal maddeler	13
Tablo 2.1 Litrelık glukoz içeren besiyeri ortamı için kullanılan kimyasal maddeler	14
Tablo 3. 260 nm'de 7 mM Toluen 60 ml'lik Stok lümleri	17
Tablo 4. 4mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm 'deki Absorbans Değerleri (Sıcaklık: 35 C)	19
Tablo 5. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm'deki Absorbans Değerleri (Sıcaklık: 35 C)	21
Tablo 6. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm 30 oC 'deki Absorbans Değerleri	23
Tablo 7. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ' deki 2 M MgCl ₂ İçeren ve MgCl ₂ İçermeyen Absorbans Değerleri	25
Tablo 8. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ' deki 2 M CaCl ₂ İçeren ve CaCl ₂ İçermeyen Absorbans Değerleri	27

SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrat
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
g	: Gram
ppm	: Milyonda bir (Parts Per Million)
K₂HPO₄	: Potasyum fosfat (dibazik)
(NH₄)₂HPO₄	: Amonyum fosfat (dibazik)
Mg(NO₃)₂.6H₂O	: Magnezyum nitrat hegzahidrat
MnSO₄.H₂O	: Mangan (II) sülfat monohidrat
FeCl₃.6H₂O	: Ferik klorid hegzahidrat
CaSO₄.2H₂O	: Kalsiyum sülfat dihidrat
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
MgCl₂	: Magnezyum klorür

KISALTMALAR DİZİNİ

PPÜ	: Petrol ve Petrol Ürünleri
vs	: Vesaire
UV	: Ultraviolet
TNT	: Trinitrotoluen
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit



1.GİRİŞ

Kirlenen dünyamızda çevre sorunları büyük öneme sahiptir. Çevre problemleri, doğal kaynakların aşırı, yanlış ve sağlıksız kullanılarak tahribi sonucu meydana gelmektedir. Çevredeki fiziksel kirlenme ve bozulma hava, su ve toprak kirlenmesi olarak sınıflandırılabilirse de bunlar çok çabuk birbirine dönüşebilirler. Çünkü ekolojik dengenin bir parçasındaki bozulma bütün sistemin yapısını olumsuz yönde etkilemektedir. (Anonim, 1997).Çevre kirliliğine yol açan faktörler arasında, sanayi sektöründe kullanılan arsenik, civa, kadmiyum, kurşun ve çinko gibi metallerin, organik çözücülerin (toluen, ksilen, benzen, kloroform, aseton v.b.), yağ, mum, sülfidler, klorürler, merkaptanlar, fenolik bileşikler ve krezilat gibi bileşiklerin bilinçsizce çevreye atıldığını belirtmektedir (Akman ve ark. 2000).20. yüzyılın başından itibaren modern tarıma geçilmesi ve sanayileşmenin hızlanması ile birlikte hızla artan dünya nüfusunun oluşturduğu etkiyle doğal kaynaklar, ekosistemler büyük ölçüde tahrip edilmiş, kirletilmiş ve bunların sonucunda toprak kirliliği de bir çevre sorunu olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır.Daha önceki asırlarda kullanılan güç ve enerji kaynaklarının yetersiz olması, nüfusun ve endüstrileşmenin henüz gelişmemesi sebebiyle diğer çevre faktörlerinde olduğu gibi topraklarda da herhangi bir kirlenme söz konusu değildi. Bu etkenlerin hızla gelişmesine paralel olarak toprak kirliliği de artmaya başlamıştır. Toprak kirliliği: Toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısının insan aktiviteleri sonucu bozulması olarak tanımlanabilir.

Teknolojinin gelişmesiyle hızla büyüyen sanayi ve endüstri çalışmaları daha fazla enerji gereksinimini doğurmuştur. Bu artan enerji talebi petrol ve petrol ürünlerinin kullanımını arttırarak, petrolün çıkarılmasını, işlenmesini ve nakliyesini gündeme getirmiştir. Bu faaliyetler sırasında ortaya çıkan kazalar, sızıntılar, dikkatsizlikler büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir. Sızıntılar toprağa oradan da yeraltı suyuna karışarak kirlilik ve tehlike oluşturuyor. Aynı tehlike deniz ve okyanus yaşamı için de söz konusu. Genel olarak; petrol ve petrol ürünlerinin (PPÜ) içerdiği yıkıcı zor, kompleks bileşikler ve ağır metaller, meydana gelen tanker kazalarının ve boru sızıntılarının gerçekleştiği alanlarda toprak kaynağının arzu edilen amaca (tarımsal, endüstriyel ve rekreasyonel) hizmet edemeyecek şekilde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler açısından bozulmasına neden olmaktadır (Rhykerd vd. 1998).

Petrol ve petrol ürünlerinin canlılar üzerindeki etkisi; petrol deniz kuşlarının kanatlarına yapışarak uçamamasına, balıkların solungaçlarına yapışarak solunumu engellemesine ve canlıların bünyesine girmesiyle onları zehirleyici etkilere neden olur, hatta bu canlıları avladığımızda petrol ve türevleri bize kadar ulaşabilir.

Toprak mikroorganizmaları kıtasal ekosistemlerin birçok anahtar role sahip önemli bir bileşenidir. En önemli görevlerini bitkisel ve hayvansal artıkların ayrıştırılarak toprak organik maddesinin desteklenmesi, toprak profili boyunca strüktürel yapının oluşumu, atmosferikazot fiksasyonu ve bitkilerle simbiyotik ilişkilerin oluşumu şeklinde sıralayabileceğimiz toprak mikroorganizmaları, sahip oldukları bu özelliklerle besin döngüsünün ve toprak verimliliğinin sürekliliği açısından gerekli olan koşulları sağlarlar. Ayrıca toprağın biyolojik özellikleri antropojenik aktivitelerin (tarımsal, endüstriyel vs.), topraktaki etkilerinin izlenmesinde uzun zamanda değişimler gösteren fiziksel ve kimyasal özelliklere kıyasla daha hızlı ve net tepkiler verirler.

Toprakta PPÜ (petrol ve petrol ürünleri) kirliliğinin toprağın fiziksel ve kimyasal tabiatına aykırı olmayan biyolojik yöntemler ile giderilmesi (biyoremediasyon) son zamanlarda toprak ekolojik çalışmalarında giderek ilgi toplayan bir çalışma disiplini.

Biyoremediasyonun temel prensibi kısaca “bir çevredeki kirlenici unsuru, karbondioksit ve su gibi zararsız parçalanma ürünlerine dönüştürme yeteneğindeki mikroorganizmaları teşvik ederek ortadan kaldırmak” şeklinde ifade edilebilir. Biyoremediasyon, katabolik fonksiyonlara sahip mikroorganizmaların hücre kütesine kodlanarak, geliştirilen katabolik mikroorganizmaların toprağa aşılması ve kimyasal bileşiklerin özellikle bu mikroorganizmalar tarafından zararsız biyolojik artıklara dönüştürülmesi şeklinde tanımlanabilir (Atlas, 1978). Biyolojik iyileştirme çevre kirliliğini gidermede doğadaki doğal süreçlerin sürdürülebilirliğini sağlar. Aromatik hidrokarbonlu bileşikler, mikroorganizmalar tarafından enerji ve besin kaynağı olarak kullanılarak kolayca parçalanır ve karbondioksit ve suya dönüştürülür.

Biyodegradasyonda biyolojik olarak parçalanabilen bileşikler, mikroorganizmanın hücre dışı enzimlerine bağlanıp hücre membranından geçerek, hücre içerisine taşınmaktadır. Hücre içerisinde bir seri dönüşüm reaksiyonları ile daha küçük ara ürünlere parçalanma gerçekleşir. Bu reaksiyonlar esnasında enerji açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan enerji hücrelerin çoğalmasında, onarılmasında, bileşiklerin hücreye taşınmasında ve hareket etmesinde kullanılmaktadır.

Biyolojik iyileştirme yöntemlerinin diğer yöntemlere göre birçok avantajı vardır. Masrafsız olması yani maliyetin düşük olması, kullanım kolaylığı, organik kirleticilerin tamamen parçalanması, çevre dostu bir yöntem oluşu ve yan etkilerinin olmayışı en önemlileri arasında sayılabilir.

Bir çevre kirleticisini ortamdan uzaklaştırmak için bakteri, fungus (mantar), alg ve bitki gibi organizmaların kullanılmasına biyolojik iyileştirme, bu organizmaların çeşitli zararlı kimyasal bileşikleri parçalayıp mineralize etmesine ise biyolojik yıkım diyoruz.

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan yüzey aktif maddeleri ve enzimler bu işlemin gerçekleşmesine yardımcı oluyor.Parçalanmayı gerçekleştiren mikroorganizmalar genelde oksijen, ışık ve suya ihtiyaç duyar, ancak birçok mikroorganizma bu işlemi oksijen olmadan da yapmayı başarır. Doğal bir işlem olduğu için zamana ihtiyaç vardır. Bu işlemi yapan mikroorganizmalar, doğal yaşam alanlarında her durumda hazır bulunur.

Su ve karasal ekosistemler de risk oluşturan organik kirleticilerin mikroorganizmalar yoluyla biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları son yıllarda önem kazanmış bir işlemdir.Bu alanda kullanılan mikroorganizmalar özellikle *Pseudomonas spp.*'lerin yardımı ile hem çevrede sorun oluşturan kirletici ajanlar ortadan kaldırılarak çevre kirliliği azaltılması hem de biyoteknolojik açıdan önemli olan ve çok değişik endüstrilerde insanlara hizmet eden metabolitlerin eldesinin biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getirileceği düşünülmektedir. (Jamir ,Y.). *Pseudomonas* cinsi üyeleri, üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynakları kullanarak ikincil metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid) sentezlemektedirler.Toprakta yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin, özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörleri önemli oranda degradasyon kabiliyeti göstererek toprağın doğal yolla temizlenmesinde rol oynaması sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir.*Pseudomonas*lar ilk kez Gessard tarafından 1882'de tanımlanmıştır. En yüksek organik çözügen toleransını *Pseudomonas* türleri gösterir. Araştırmalar *Pseudomonas putida*'nın her çeşit aromatik ve alifatik hidrokarbonları parçalayabildiğini göstermiştir.Toprak kökenli *Pseudomonas* türü bazı bakteriler (*P. putida*) ham petrolün bazı fraksiyonlarını parçalama yeteneğindedir (Kapley vd., 1999; Ojumu vd., 2005; Peressuttia vd., 2003; Rahman vd.,

2002a; Ökmen ve Algur, 2000; Johnson vd., 1996; Komukai-Nakamura vd., 1996; Kiyohara vd., 1992; Jack vd., 1985; Fall vd., 1979).

1900'lü yılların ortalarına doğru keşfedilmiştir.1995 yılında, Almanya'daki Genomik Araştırmalar Enstitüsündeki bilim adamları, *Pseudomonas putida*'nın ilk tam genom dizisini çözdü. Genom analizi yoluyla, *Pseudomonas putida*'nın yaklaşık 6.2 milyon DNA baz çiftine sahip olduğu keşfedildi. Dahası, genlerin çoğunluğu çevredeki kimyasal sinyalleri saptamak için olup, toksinlere hızlı bir şekilde tepki verebilir.Bu bakteri ayrıca, kirleticilerin bozunmasında önemli bir rol oynayan sıralı TOL ve OCT plasmid gibi birçok önemli plazmite sahiptir. *Pseudomonas putida*, karmaşık metabolizması ve kirliliği kontrol etme kabiliyeti nedeniyle çevre için önemlidir.

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait olup, gram negatif , düz ya da kıvrık çomak şeklinde , boyları 1,5-5,0 µm arasında değişen, genişlikleri 0,5-1,0 µm arasındadır ve bir ya da çok sayıda polar flagellası olan bakterilerden oluşur.Fotosentetik pigmentleri yoktur, katalaz ve oksidaz pozitif, indol ve metilred negatiftir.Non-fermentatif özelliktedirler ve bazıları karbonhidratları (glukoz, riboz,glukonat gibi) oksidatif metabolizmada kullanırlar.Bu organizmalar zorunlu aerob olarak tanımlansa da bazı durumlarda nitratı alternatif elektron alıcısı olarak kullanarak aerob gelişim gösterirler ve düşük moleküler ağırlıktaki organik bileşikleri yıkmaları nedeniyle diğer aerobik bakterilerden ayrılırlar.*Pseudomonas*'lar minimal nutrientlere ihtiyaç duyar.

Birçok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilirler. Sadece birkaç tür organik gelişim faktörlerine ihtiyaç duyar. Kemoorganotroftirler, fakat bazı türleri ototrofik şartlar altında da gelişebilir. Hiç bir türü fermentatif ve fotosentetik değildir. Birçok organik bileşik*Pseudomonas* türleri tarafından mineralize edilebilir. Bu bakteriler, bu bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Buna bağlı olarak *Pseudomonas* türleri, biyoremediasyonunda (mikroorganizmaların, fungi ya da yeşil bitkilerin ya da onların enzimlerinin çevredeki kontaminantlardan arındırılması, orijinal haline geri getirilmesi) kullanım potansiyeline sahiptir.Bazı türleri 4°C'de gelişebilir, ancak çoğu 30-37 °C arası optimal gelişim sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Nötral ph ' da gelişirler.Bazı türleri H₂ ve CO₂'i elektron verici olarak kullanarak kemolitotrofik özellikler gösterir.(Murray ve ark ., 1994).

Pseudomonas cinsi bakterileri genetik çalışmalarda özel bir ilgiye sahiptir. Bunun nedenleri, geniş bir yayılım alanına, medikal öneme, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğe sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında geliştirilebilmeleri için gerekli şartların basit olmasıdır.*Pseudomonas*'lar toprak, su ve çürümekte olan organik maddelerde olan mikroorganizmalardır. Bu ortamlar dışında sulak alanlarda yetiştirilen tarım ürünlerinde, lağım çukurlarında, tuvaletlerde, hastane ortamı ve hastanelerde kullanılan temizlik maddelerinde, solunum ve diyaliz cihazlarında ve hatta dezenfeksiyon solüsyonlarında bile bulunurlar.(Carson ve ark., 1973).

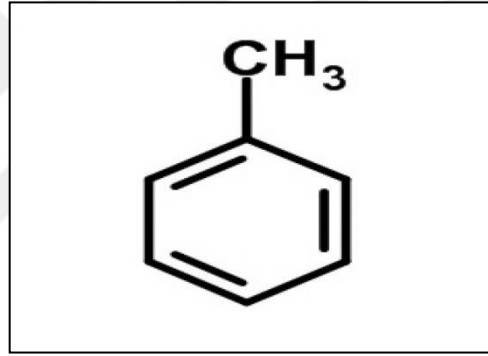
Pseudomonas türlerinin en önemli özellikleri çok çeşitli organik bileşiği karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmesidir.(Michael Madigan .,2010).*Pseudomonas putida* ile yapılan bazı çalışmalar, benzen, tolüen ve ksilen gibi benzin bileşenlerine has metabolik yolları belirledi.*Pseudomonas putida* toluen ve ksilen gibi toksik karbon gruplarına karşı toleransa sahiptir.(Ramons ve ark. ,2002) Tolueni metabolize ederek (parçalayarak) , zararsız ürünlere (CO₂, su, enerji) dönüştürme kabiliyetindedir.(UK and Taus Biotech Ltd, s.285,2003).*P. putida*, aynı degradasyon özelliğini gösteren *P. aeruginosa* gibi patojen bazı diğer *Pseudomonas* türlerinden daha güvenli olduğundan tercih edilir.

Pseudomonas türlerinin piyoverdin (fluoressein), piyosiyenin, piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler oluşturdukları ve bu pigmentlerin onlara seçici bir özellik kazandırdığı bildirilmiştir.Fluoresens pigmentler, fluoresens özellik taşıyan *Pseudomonas' ların* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir.

Bu pigmentler siderofordır. Sideroforlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen metabolitlerdir. Bu bileşikler demiri bağlar ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler. Böylece ortamda bulunmayan demir problemini azaltır.

Flouressein, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir fluoresens pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulur.Piyoverdin, fluoresens grupta yer alan *P. aeruginosa*, *P. flourescens* ve *P. putida* tarafından sentezlenen, suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresens veren, sarı-yeşil renkte bir pigment grubunu ifade eder.

Aerobik parçalanma çeşitli mikroorganizmalarla (bakteri ve fungi) oksijen varlığında gerçekleştirilir. Aerobik parçalanma esnasında oksidasyon-indirgenme reaksiyonları meydana gelir ve bu reaksiyonlarda moleküler oksijen terminal elektron alıcısı olarak, kirletici organik bileşik ise elektron vericisi olarak kullanılır. Aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda oksijen, hidroksilasyon ve aromatik halkanın kırılmasında anahtar bir role sahiptir. Halkanın enzimatik olarak kırılması için aromatik çekirdek üzerinde iki hidroksil grubu olmak zorundadır. Metabolik yol organizmaya ve halkanın kırıldığı yere göre değişir . Dioksijenaz ve oksijenaz organik bileşiklerin dönüşümü ve mineralizasyonu süresince aerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılan iki temel enzimdir. İki enzim arasındaki fonksiyonel farklılık süstrata katılan moleküler oksijenin atom sayısıdır. Aerobik bozunma anaerobik parçalanmaya göre daha verimli ve hızlı gerçekleşmektedir.



Şekil 1. Toluenin Molekül Yapısı

(<https://tr.wikipedia.org/wiki/Toluen#/media/File:Toluol.svg>)

Toluen , (Toluol, Fenil Metan veya Metil Benzen) renksiz, hoş kokulu bir sıvıdır. Sudaki çözünürlüğü doğal olarak azdır (100 ml suda 0.05 gr). Petrokimasalmaddelerin üretim proseslerinde hammadde olarak kullanılır. Birçok organik madde için çok iyi bir çözücüdür. Kullanım alanları: Bazı ilaç ve parfümlerinsentez yoluyla eldesinde, patlayıcı madde (TNT) üretiminde, boya ve petrokimya sanayisinde, benzin, akrilik boyalar, cilalar, lake, boya inceltici, yapıştırıcılar, tutkallar, kauçuk çimento, uçak tutkalı ve ayakkabı cilasında olmak üzere birçok kullanım alanı vardır.

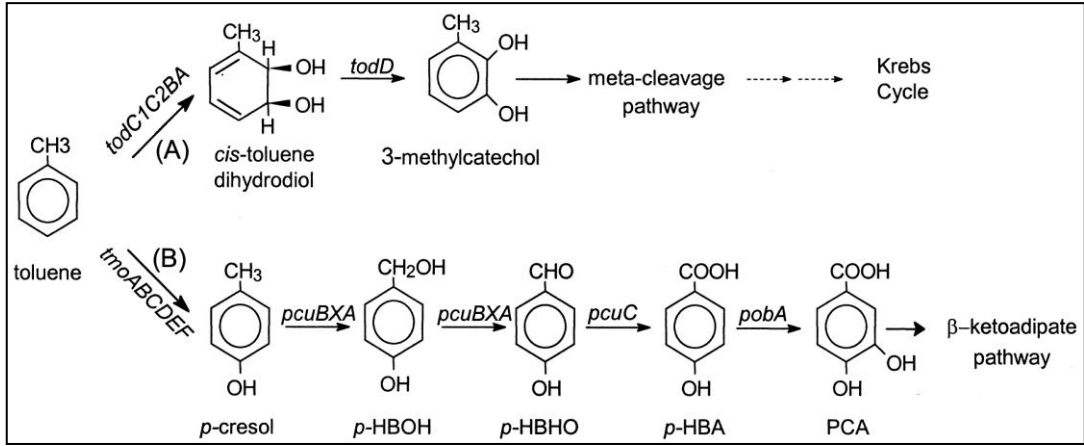
Toluenin insan sağlığı üzerindeki etkisi; Havada 10 ppm'in üzerinde bulunması insan sağlığı açısından sakıncalıdır. Toluen solunum yoluyla alınan ve akciğerlerden hızla

emilerek sistemik dolaşıma geçen aromatik bir hidrokarbondur. Zehirlenme hali genellikle benzen buharlarının solunması ile ortaya çıkar. Deri yoluyla da organizmaya girerek zehirlenmeye neden olabilir. Yüksek konsantrasyonda (3000 ppm veya üzeri) benzen buharına maruz kalındığında ani zehirlenme belirtileri ortaya çıkar. Bu belirtiler baş ağrısı, baş dönmesi, düzgün konuşamama, depresyon, derinin kızarması, solunum güçlüğü, mide bulantısı, kusma şeklinde görülür. Ortam değiştirilmediği takdirde koma veya ölüm hali meydana gelebilir.

Denizler üzerinde ki etkisi; Su yüzeyini kaplayarak estetik açıdan olumsuz bir görüntü yarattıkları gibi, bunların yüzeyde oluşturdukları tabaka atmosfer ile su arasındaki oksijen alış-verişini olumsuz yönde engeller. Oksijenin suyun alt katmanlara inememesi sonucu deniz bitkileri fotosentez yapamazlar ve bu durum ötrofikasyona neden olur. Birçok balık, kabuklu ve eklembacaklı ilk evrelerini yüzeyde yüzerek geçirirler ve bu durumda petrolden fazlasıyla etkilenirler. Işığın ve havanın suyun alt katmanlarına geçişini engeller. Oksijenin azlığında oksijenli solunum yapan canlılar yaşayamazlar. Özellikle sahile yakın bölgelerde toplu ölümlere neden olur. Balıkların solungaçlarına yapışarak solunumlarını olumsuz yönde etkiler. Deniz kuşlarının kanatlarına yapışarak kuşların uçuşmasını engeller.

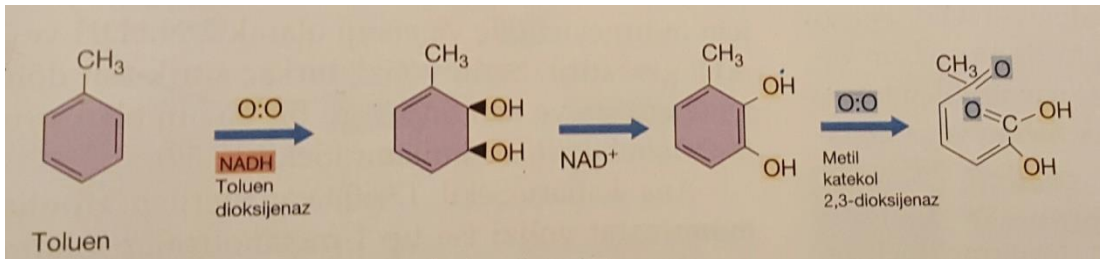
Toprak canlıları üzerindeki etkisi; Toprağın biyolojik özellikleri toprak yüzeyinin sadece birkaç mm altında yaşam süren toprak mikroorganizmalarının varlıkları ve aktiviteleri ile ilgilidir. Toprak mikroorganizmaları kıtasal ekosistemlerin birçok anahtar role sahip önemli bir bileşenidir. En önemli görevlerini bitkisel ve hayvansal artıkların ayrıştırılarak toprak organik maddesinin desteklenmesi, toprak profili boyunca strüktürel yapının oluşumu, atmosferik azot fiksasyonu ve bitkilerle simbiyotik ilişkilerin oluşumu şeklinde sıralayabileceğimiz toprak mikroorganizmaları, sahip oldukları bu özelliklerle besin döngüsünün ve toprak verimliliğinin sürekliliği açısından gerekli olan koşulları sağlarlar.

Morgan ve Watkinson (1989) petrol türevlerinin, toprağa bulaştığında toprak biyolojik aktivitesinde ve fiziksel koşullarında olumsuz etkilere neden olduğu ve buna bağlı olarak kirlenmiş toprakların iyileştirilmesi için uygun metotların gelişimi ve seçiminin gerekli olduğunu bildirmişlerdir *Pseudomonas putida* organik çözücü olarak kullanılan tolueni metabolize ederek, toluen ile kirlenmiş bir araziye hiç bir yan etki yaratmadan bir yıl içinde % 75 oranında temizlediği bildiriliyor.



Şekil 2. Toluenin Biyolojik Yıkımının Metabolik Yolu

Toluenin parçalanmasında toluen dioksijenaz ve metilkatekol 2,3-dioksijenaz aktivitesi ile olur. Katekol ve protokatekauate , aerobik aromatik katabolizmada yaygın ara ürünlerdir.proto-katekuate , katekolün OH gruplarının birinden iki karbon atomunun uzaklaşması ile oluşur ve bir karboksil grubu bulundurur.(Michael T.Madigan.2010).



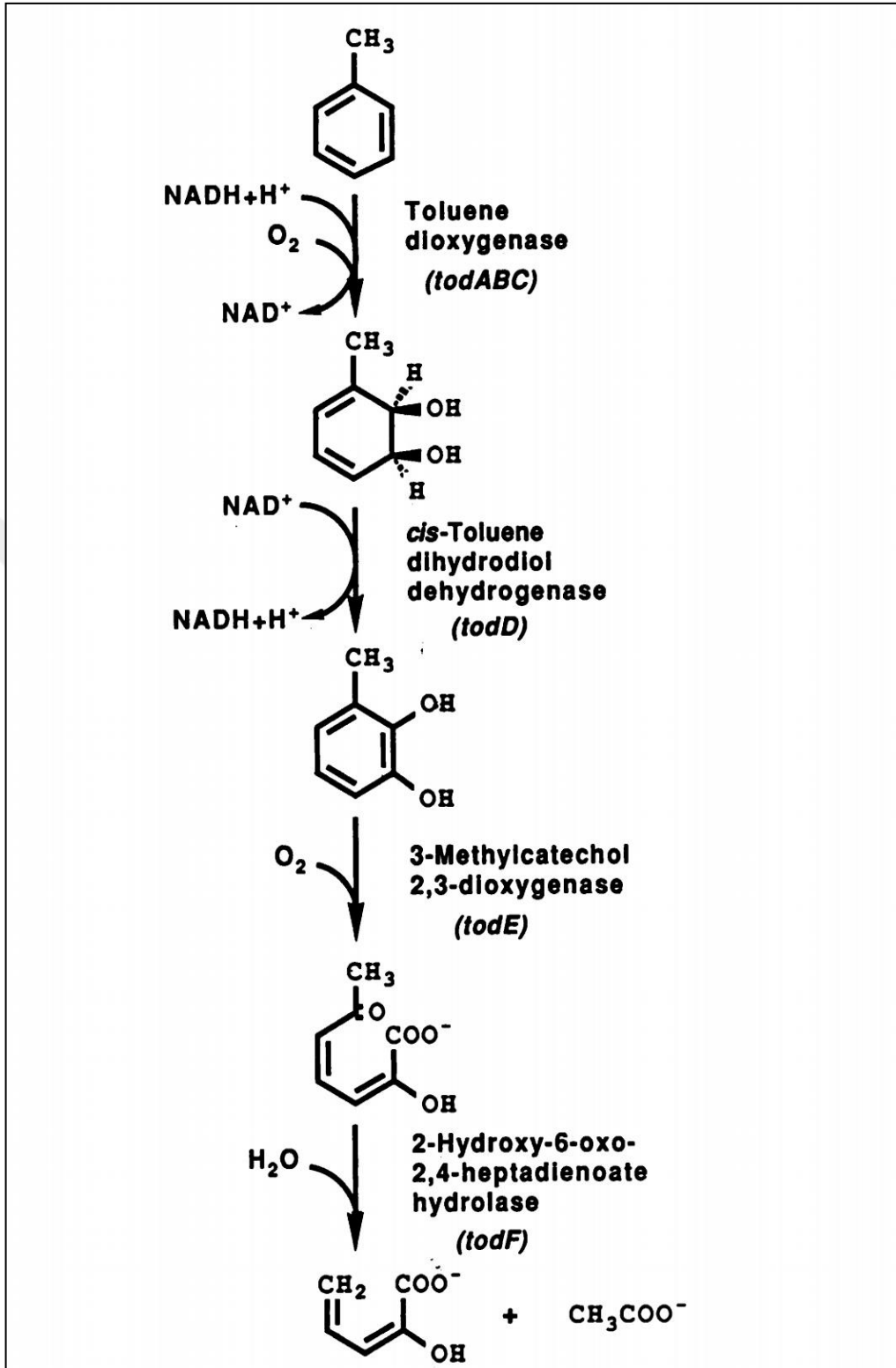
Şekil 3. Toluenin Yıkımında Toluen Dioksijenaz ve Metilkatekol 2,3-Dioksijenaz Aktivitesi (Madıgan ve Martinko ,2010)

Hidrokarbonların bakteriler tarafından aerobik biyodegradasyonunda ilk aşama oxygenase enziminin kullanılmasıyla moleküle oksijen eklenmesidir. Bu basamak enerji yatırımı gerektirir. Bu basamakta enerji NADH olarak kullanılır ve oksijen gerekir.Oxigenation reaksiyonunda moleküle bir veya iki OH grubu eklenir.Her bir OH ilavesi için iki elektron kullanılır. Fakat organizma enerjiyi NADH formunda geri kazanmaz.Mikroorganizma enerji kazanmasa da, oksijenin eklenmesiyle organik madde

mikroorganizmalar için daha available hale gelir ve çözünürlükleri artar. İlk basamakta elde edilen ürün dehydrogenation ve hydroxylation reaksiyonlarına girerek NADH üretir ve daha çok suda çözünen bir form alır.

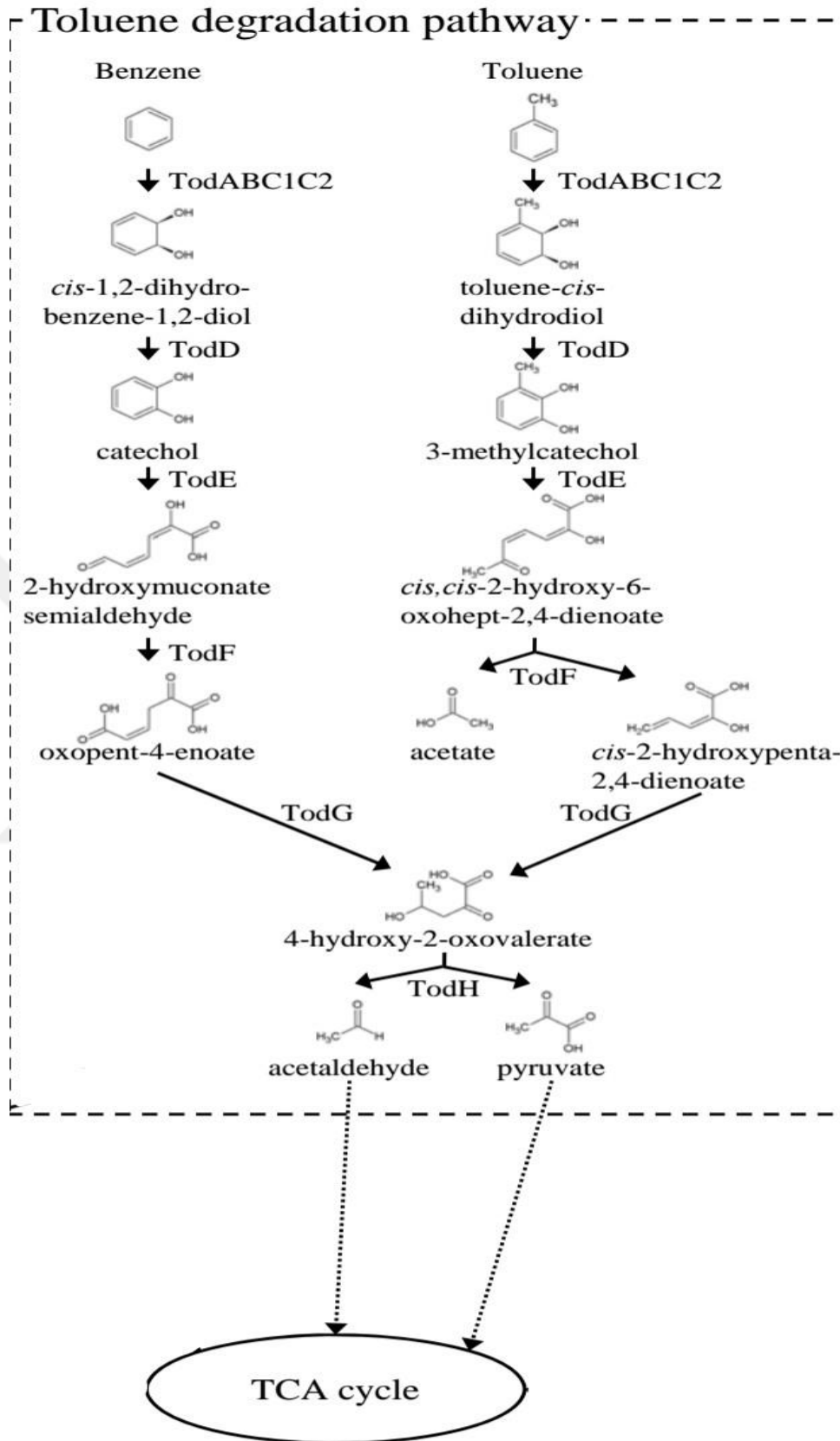
Yakın geçmişte hidrokarbonların anaerobik olarak oksitlenemeyeceği düşünülmekteydi. Çünkü anaerobik koşullarda hidrokarbona oksijen ilavesi için gereken moleküler oksijen bulunmamaktadır. Fakat daha sonraları farkedildi ki anaerobik koşullarda bakteriler sudaki oksijeni kullanarak ilk oksidasyon basamağını gerçekleştirebilirler. Her ne kadar hidrokarbonların anaerobik parçalanması yavaş olsa da, hidrokarbonların doğadaki akıbetleri belirlemek için oldukça önemlidir.

Dolayısıyla mikroorganizmaların yaşam kapasiteleri genellikle bizim düşündüğümüzden daha fazladır.



Şekil4.Toluenin Biyolojik Yıkımı

(<http://2012.igem.org/Team:Leicester/Modeling>)



Şekil 5. Toluenin Biyolojik Yıkımının Metabolik Yolu (Morimoto et al , 1954)

2.MATERYAL VE METOD

2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

- 1) Spektrofotometre (Cecil 5000 Series)
- 2) Plastik küvetler
- 3) Kuvars küvetler
- 4) Otoklav
- 5) Etüv (Termal Laboraturvar Aletleri)
- 6) 1000 ve 200µl'lik mikropipet
- 7) Mikropipet uçları (Mavi, sarı, Biosphere Filtler Tips)
- 8) 1000 ml , 500 ml ve 250 ml erlenler
- 9) Toluen
- 10) Dipotasyum fosfat (dibazik)
- 11) Diamonyum fosfat
- 12) Magnezyum nitrat Hekzahidrat
- 13) Demir (III) Klorür Hekzahidrat
- 14) Kalsiyum sülfat dihidrat
- 15) Magnezyum klorür
- 16) Kalsiyum klorür
- 17) Glukoz

2.2. Glukoz İçeren Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada ilk önce +4 C ‘de inaktif şekildedutulan *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun aktifliğini kazanabilmesi için glukoz içeren besiyeri hazırlandı. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldı.

1 Litrelik glukoz içeren besiyeri ortamı Tablo 1’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 1. 1 Litrelik glukoz içeren besiyeri ortamı için kullanılan kimyasal maddeler

Besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler	Miktar (1000 ml için)
Glukoz	10 g
K ₂ HPO ₄	1.39 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.5 g
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.097 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.025 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.005 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0.001 g

Kimyasal malzemeler 1 Litrelik erlen içerisinde üzerine 400 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda yarım saat karıştırılarak znmesi beklendi. Daha sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ilave edilerek karışımın tamamen homojen olması için yarım saat daha karıştırıldı.

Homojen bir besiyeri elde edildikten sonra başka 1 Litrelik erlen alınarak karışım 500 ml olacak şekilde ikiye ayrıldı ve 105 C ‘de 15 dakika otoklav edildi.

2.3. Bakteri Ekimi (1. Nesil)

Pseudomonas putida NRRL B-13 stok bakteri kültüründen 3 ml alınarak sterilizasyonu sağlanan glukoz içeren besiyerine ekim yapıldı. Besiyerinin kontaminasyonunu engellemek için eker ocak altında bek alevi yanında çalışma yapıldı.

Ekim yapılan iki besiyeri de çalkalanıp +35 C’ de etüve kaldırıldı.4 gün süreyle etüvde bekletilerek bakterilerin üremeleri sağlandı. (1. Nesil)

2.4. Bakteri Ekimi (2. Nesil)

Tablo 1 de verilen kimyasallar ile aynı şekilde 1 Litrelik glukozlu besiyeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra 1.nesil bakteri stoğundan 5 ml alınarak çeker ocak altında bek alevi yanında ekim işlemi yapıldı.

Ekim yapılan glikoz içerikli besiyeri +35°C ' de etüve kaldırıldı. (2. Nesil)

2.5. Toluen içerikli Besiyerinin Hazırlanması

1 Litrelik Toluen içerikli Besiyeri Ortamı Tablo 2’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 2. 1 Litrelik glukoz içeren besiyeri ortamı için kullanılan kimyasal maddeler

Besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler	Miktar (1000 ml için)
Toluen	4 mM
K ₂ HPO ₄	1.39 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.5 g
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.097 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.025 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.005 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0.001 g

Toluen hariç diğer kimyasalların hepsi 1 Litrelik erlen içerisine kondu son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklendi ve manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.

Homojen karışım 250 ml içeriğe sahip olacak şekilde 4 tane 500 ml’lik erlenler içerisine eşit şekilde ayrılır. Her erlen içerisine 4 mM Toluen eklendi. 120 °C’de 15 dakika otoklav edildi.

2.6. Toluen İçerikli Besiyerine Bakteri Ekimi ve Absorbans Ölçümü

Otoklavlanan 250 ml’lik toluen içeren besiyerine bek alevi yanında 2.nesil bakteri kültüründen 4 ml alınarak ekim yapıldı.

Ekim yapılır yapılmaz deneye başlanılan ilk andan (0.zaman) ‘da dahil olmak üzere, plastik küvetlere 2 ml örnek konularak 600 nm’de her 4 saatte bir bakteri sayısındaki artışı görmek için spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Her ölçümde içerisinde distile su

bulunan plastik küvet kör olarak kullanıldı ve spektrofotometre de ikinci bölmeye kondu. Kör ile 600 nm’ de absorbands değerini sıfırlayarak bölmeden çıkarılıp aynı bölmeye içinde örnek bulunan plastik küvet konuldu ve 600 nm’de değeri ölçüldü.

2.7. Toluen İçeren Stok Besiyeri Hazırlama

44 µl toluen alındı 60 ml distile su ile tamamlandı.

2.7.1. Standart Eğri

1 mM ‘dan 7 mM’a 0,5 mM arttırılarak 13 değer için stoktan $M_1.V_1 = M_2.V_2$ formülü ile stoktan ve distile sudan alınacak miktarlar için hesaplama yapıldı.

Kuvars küvetlerde 260 nm’ de ölçüm yapıldı. Her ölçüm kör ile sıfırlanıp değerler alındı.

2.8. Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ‘de ölçümü

Toluen uçucu madde olduğu için 4 mM miktarı 8 mM ‘ a çıkarıldı.

Kuvars küvet içerisinde kör olarak kullanılan distile su ile spektrofotometrede absorbands değeri sıfırlandı. Önceden otoklavlanan 250 ml ‘ lik 8 mM toluen içeren besiyeri ekim yapılmadan kuvars küvete konularak 260 nm’ de absorbandsı ölçüldü.

Daha sonra Toluen içeren bakteri kültüründen 4 ml örnek alınarak bek alevi yanında ekim yapıldı. 35 °C ‘ de etüve kaldırıldı. 4 saatte bir spektrofotometre de kör ile ilk önce sıfırlanan absorbandslar alındı.

2.9. Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 30°C ‘ de 600 nm’ de ölçümü

250 ml ‘lik otoklavlanan besiyerine 4 ml toluenli bakteri kültüründen kontaminasyonu engellemek için bek alevi yanında ekim yapıldı. Yapılan ekim 30 °C ‘ de etüve kaldırıldı. 4 saatte bir spektrofotometre de kör ile ilk önce sıfırlanan absorbandslar alındı.

2.10. MgCl₂ İçeren ve MgCl₂ İçermeyen Toluen İçeren besiyerinin 260 nm’ de Absorbans Ölçümü

500 ml’lik 2 M MgCl₂ çözeltisi hazırlandı. Buna göre 95,3 gram MgCl₂ hassas terazide tartıldı , 300 ml distile su eklenerek mıknatıslı karıştırıcı da karıştırıldı. Son hacim 500 ml olacak şekilde distile su eklendi ve homojen karışım meydana gelecek şekilde karıştırılmaya devam edildi. 500 ml MgCl₂ çözeltisi 500 ml ‘lik 2 erlene 250 ml olacak şekilde ikiye ayrıldı. 110 °C’de 15 dakika otoklav edildi.

8 mM toluenli besiyeri hazırlandı. 2 tane 500 ml'lik erlen içerisinde 250 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Her iki erlene de 214µl toluen eklendi ve 120°C'de 15 dakika otoklav edildi. Otoklavlanan erlenlerden birinin içerisine önceden otoklavlanmış 2 M'lık 5 ml MgCl₂ eklendi. Diğer erlene eklenmedi. Daha sonra her iki erlene de toluenli kültürden örnek alıp bek alevi yanında 4 ml ekim yapıldı. 35°C'de etüve kaldırıldı.

260 nm ' de kör ile sıfırlanan absorbans MgCl₂ içeren kültürden örnek alıp ölçüm yapıldı. Aynı şekilde MgCl₂ içermeyen kültürden de örnek alınıp ölçüm yapıldı.

2.11. CaCl₂ İçeren ve CaCl₂ İçermeyen Toluene İçeren Besiyerinin 600 nm' de Absorbans ölçümü

250 ml'lik 2 M CaCl₂ çözeltisi hazırlandı. Buna göre 55,49 gram CaCl₂ hassas terazide tartıldı. Son hacim 250 ml olacak şekilde distile su eklendi ve homojen karışım meydana gelecek şekilde karıştırılmaya devam edildi. 110 °C'de 15 dakika otoklav edildi.

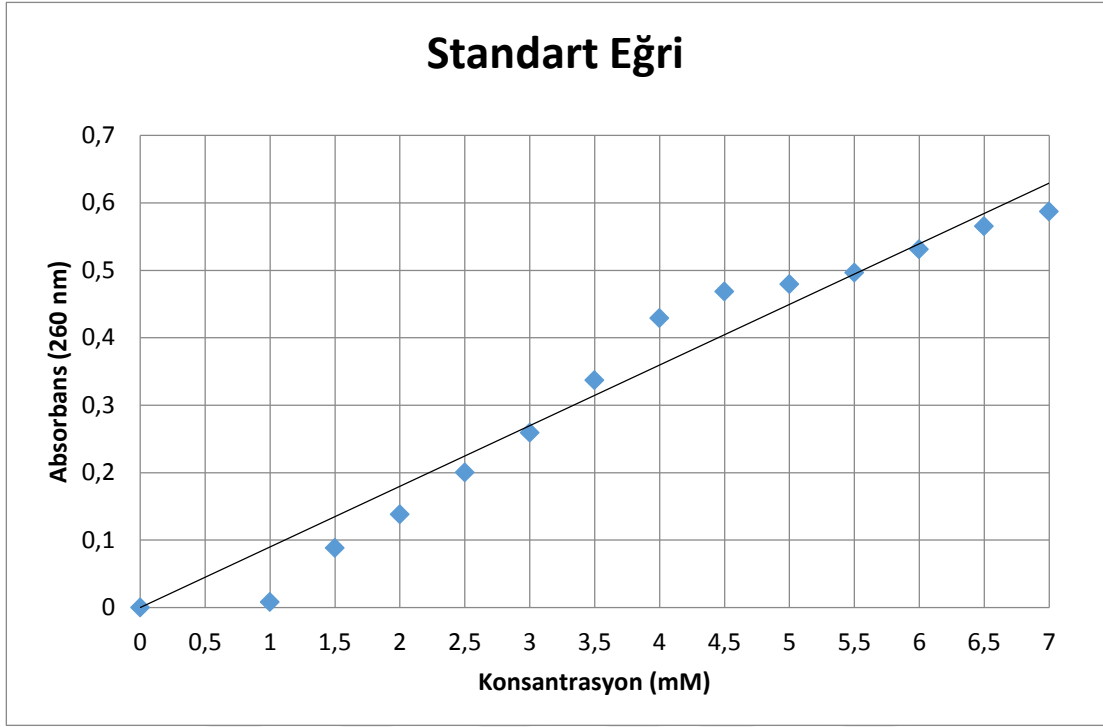
8 mM toluen içeren besiyeri hazırlandı. 2 tane 500 ml'lik erlen içerisinde 250 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Her iki erlene de 214 mik.l toluen eklendi ve 120°C'de 15 dakika otoklav edildi. Otoklavlanan erlenlerden birinin içerisine önceden otoklavlanmış 2 M 5 ml CaCl₂ eklendi. Diğer erlene eklenmedi. Daha sonra her iki erlene de toluenli kültürden örnek alıp bek alevi yanında 4 ml ekim yapıldı. 35°C'de etüve kaldırıldı.

260 nm ' de kör ile sıfırlanan absorbans CaCl₂ içeren kültürden örnek alıp ölçüm yapıldı. Aynı şekilde CaCl₂ içermeyen kültürden de örnek alınıp ölçüm yapıldı

3. BULGULAR

Tablo 3. 260 nm'de 7 mM Toluen 60 ml'lik Stok Ölçümleri

Konsantrasyon (mM)	Absorbans (260 nm)
1	0,008
1,5	0,088
2	0,138
2,5	0,2
3	0,259
3,5	0,337
4	0,429
4,5	0,468
5	0,479
5,5	0,496
6	0,531
6,5	0,565
7	0,587

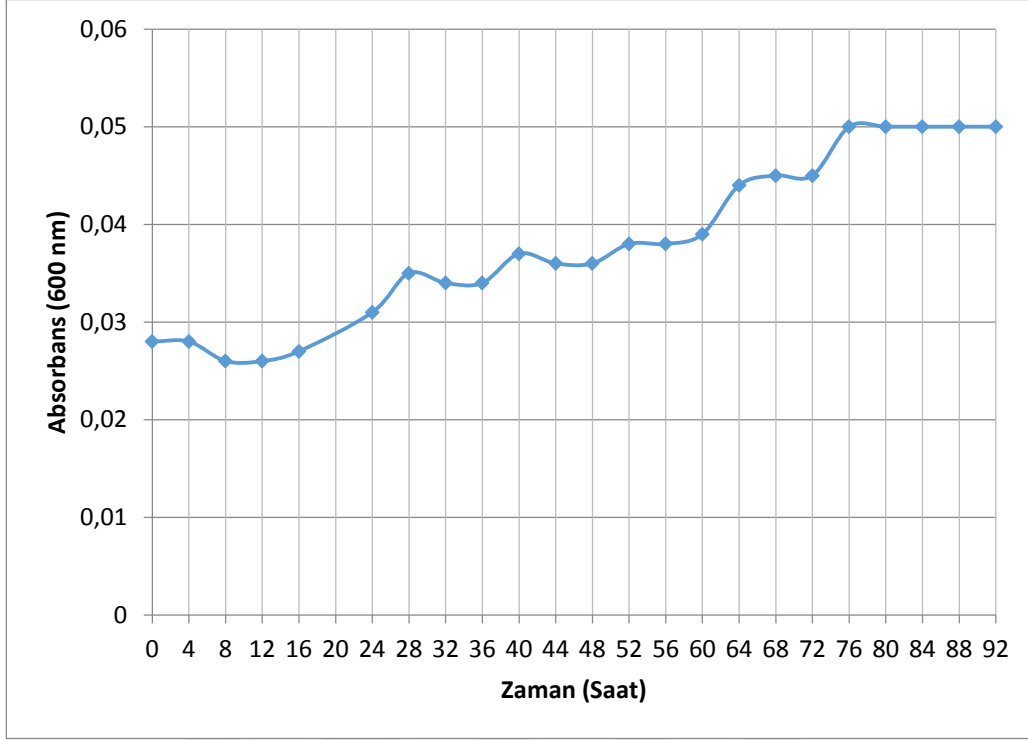


Şekil 6. Standart Eğri

Farklı konsantrasyonlardaki toluenin standart eğrisi

Tablo 4.4mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm ‘deki Absorbans Değerleri
(Sıcaklık: 35  C)

Zaman (saat)	Absorbans (600 nm)
0	0,028
4	0,028
8	0,026
12	0,026
16	0,027
24	0,031
28	0,035
32	0,034
36	0,034
40	0,037
44	0,036
48	0,036
52	0,038
56	0,038
60	0,039
64	0,044
68	0,045
72	0,045
76	0,050
80	0,050
84	0,050
88	0,050
92	0,050

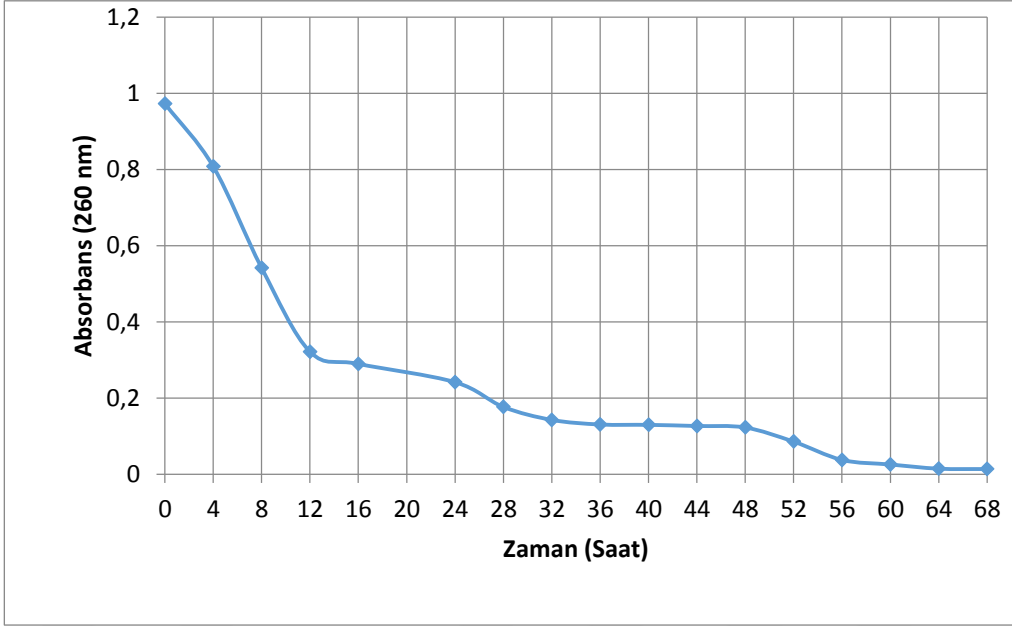


Şekil 7.4 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm ‘deki Absorbans Değerleri ile Zamana Bağlı Değişim Değerleri

Sıfırıncı zamanda y eksenindeki absorbans değeri 0,03 ‘ e (0,028) yakındır. 4 -24 saat aralıklarında lag fazı gözlemlendi. 28-80 saat aralıklarında log fazı gözlemlendi. 84-96 saat aralıklarında durağan faz gözlemlendi.

Tablo 5. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm'deki Absorbans Değerleri
(Sıcaklık: 35 oC)

Zaman (Saat)	Absorbans (260 nm)
0	0,973
4	0,808
8	0,542
12	0,322
16	0,29
24	0,242
28	0,177
32	0,143
36	0,131
40	0,13
44	0,127
48	0,123
52	0,086
56	0,038
60	0,026
64	0,015
68	0,014

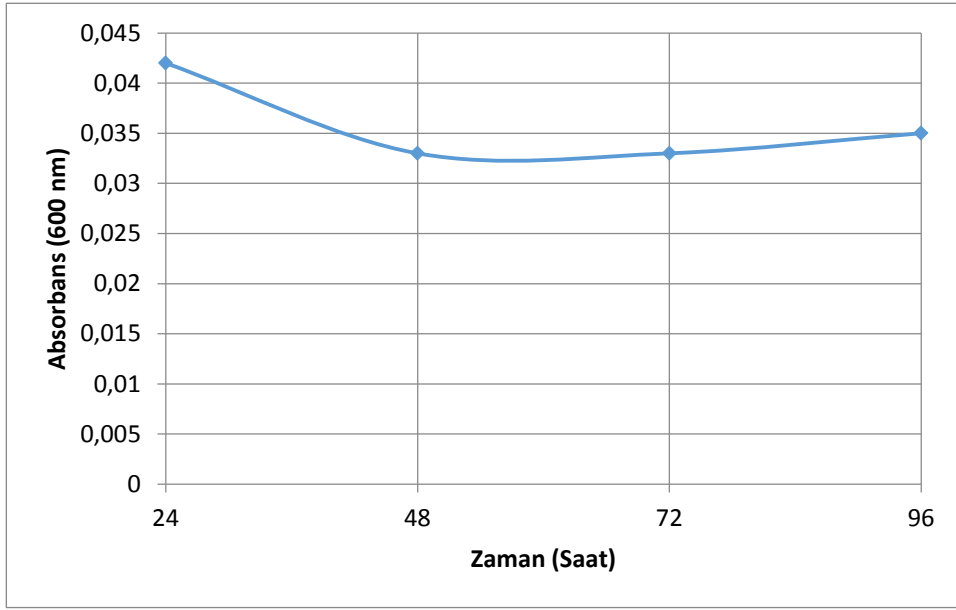


Şekil 8. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm' deki Absorbans Değerleri ile Zamana Bağlı Değişim Değerleri

Sıfırncı zamanda y ekseninde ölçülen absorbans değeri 1 ' e (0,973) yakındır. Ortamdaki toluenin azalmasıyla absorbans değeri 4 saatte bir azalma gösterdi

Tablo 6. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm 30 oC ‘deki Absorbans Değerleri

Zaman (Saat)	Absorbans (600 nm)
24	0,042
48	0,033
72	0,033
96	0,035

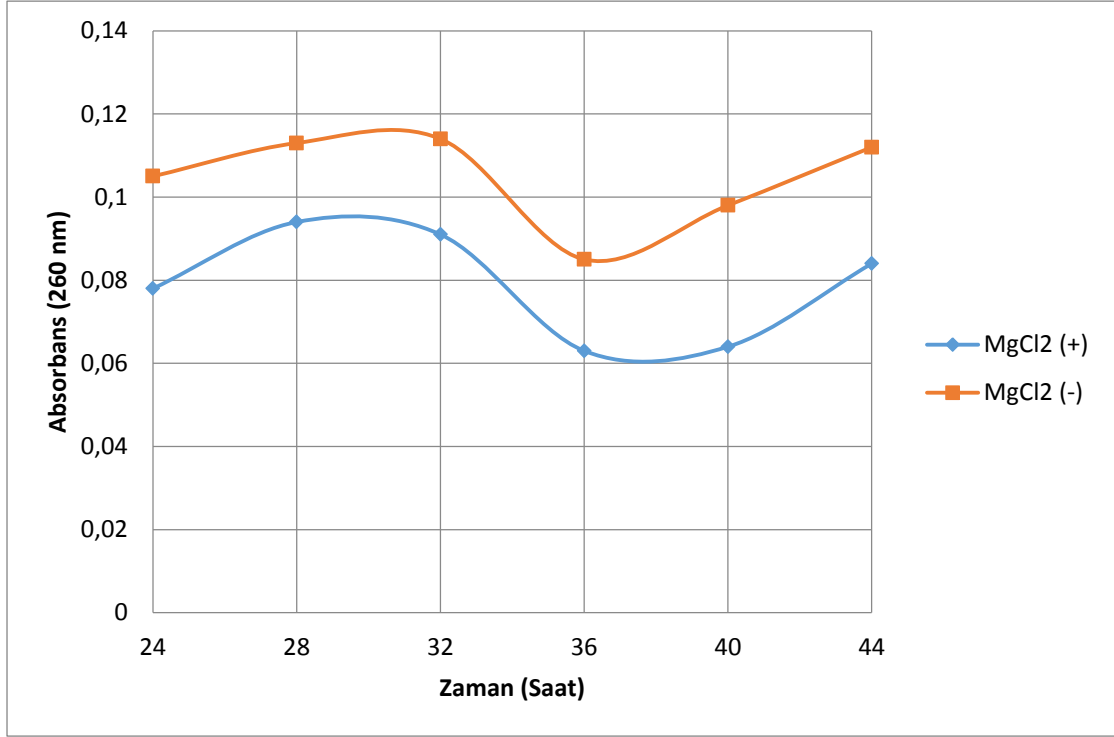


Şekil 9. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 600 nm 30 °C ‘deki Absorbans Değerleri ile Zaman Bağlı Değişim Değerleri

24 saat sonra y ekseninde ilk ölçüm değeri 0,045-0,04 (0,042) arasındadır. *Pseudomonas putida*’nın optimum üremesi 35°C ‘ de olduğu için 30 °C ‘ de y ekseninde absorbans değerlerinde azalma olup standart izlemiştir.

Tablo 7.8 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ' deki 2 M MgCl₂ İçeren ve MgCl₂ İçermeyen Absorbans Değerleri

Zaman (Saat)	Absorbans (260 nm)	
	MgCl ₂ (+)	MgCl ₂ (-)
24	0,078	0,105
28	0,094	0,113
32	0,091	0,114
36	0,063	0,085
40	0,064	0,098
44	0,084	0,112

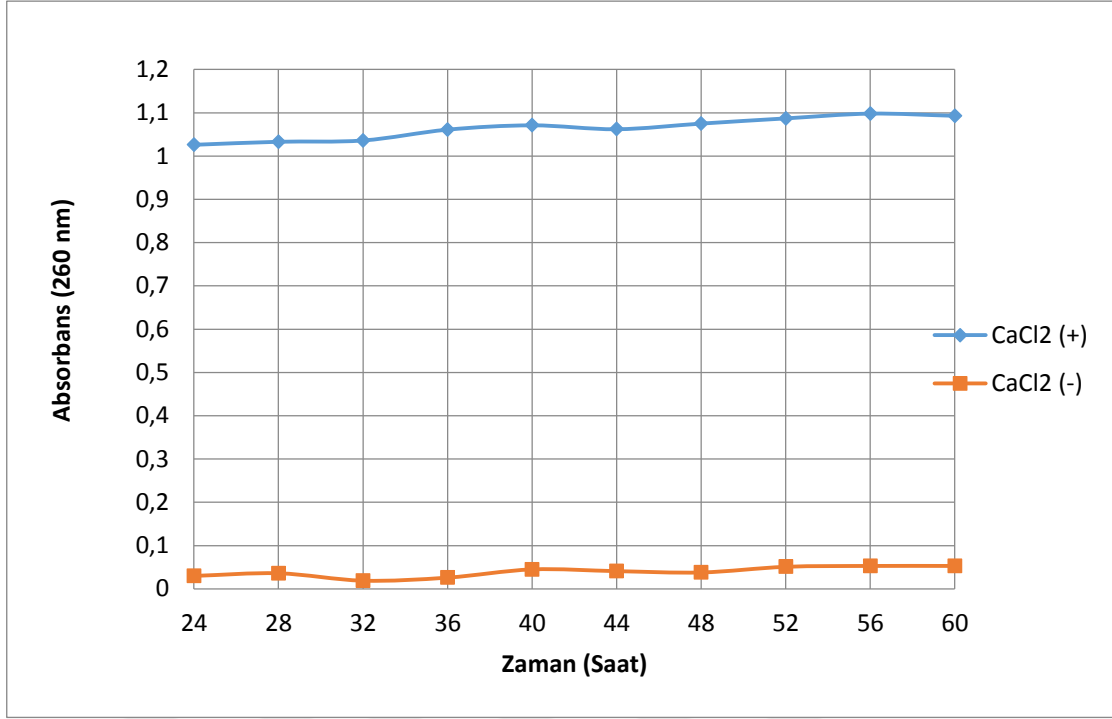


Şekil 10. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ' deki 2 M MgCl₂ İçeren ve MgCl₂ İçermeyen Absorbans Değerleri ile Değişim Değerleri

MgCl₂ İçeren kültürün absorbans değeri MgCl₂ İçermeyene oranla gittikçe artmıştır. Mg tepkimede kofaktör olarak görev alarak toluen parçalanmasını arttırdığı için absorbans değeri MgCl₂ İçerenin fazladır.

Tablo 8. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ' deki 2 M CaCl₂ İçeren ve CaCl₂ İçermeyen Absorbans Değerleri

Zaman (Saat)	Absorbans (260 nm)	
	CaCl ₂ (+)	CaCl ₂ (-)
24	1,026	0,03
28	1,033	0,036
32	1,036	0,019
36	1,061	0,026
40	1,071	0,045
44	1,062	0,041
48	1,075	0,038
52	1,087	0,051
56	1,098	0,053
60	1,093	0,053



Şekil 11. 8 mM Toluen İçerikli Bakteri Kültürünün 260 nm ‘ deki 2 M CaCl₂ İçeren ve CaCl₂ İçermeyen Absorbans Değerleri ile Değişim Değerleri

CaCl₂ İçeren ve CaCl₂ İçermeyenkültürlerin ikisinde de absorbans değerleri standart izlemiştir.CaCl₂ İçeren kültürün 24 saat sonucu y eksenini üzerinde ilk ölçümü 1’den (1,026) büyüktür.CaCl₂ İçermeyenkültürün y eksenini üzerinde ilk ölçümü 0,03 tür.Ca⁺² un toluen parçalanmasına etkisi yoktur.1,026’lık absorbans değeri CaCl₂ içeriğinden dolayı fazla çıktı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Petrol ve petrol türevleri olan aromatik Hidrokarbonlar, petrol dökülmesi ve fosil yakıtlarının tamamen yanmaması sonucu çevreye atılan, yaygın organik kirleticilerdir. Aromatik Hidrokarbonlar'ın çoğu çevrede uzun süre kalmaları ve birikimleri sonucu, çevre kirlenmesine sebep olurlar ve biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilerler. (Leahy, J.G. ve Covell). Aromatik Hidrokarbonlar(toluen, benzen, naftalin gibi.) taş kömürünün damıtılmasıyla elde edilen katrandan ya da çizgisel hidrokarbonlardan sanayide üretilirler. (Akman ve ark. 2000).

Toluen genellikle organik bir çözücü gibi kullanılır ve her yerde mevcut, havayı ve suyu kirleten kimyasal bir maddedir. Toluen, hücre membranlarında dağılımlarından dolayı ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için toksiktir. Toluenin toksik etkileri ile denizel ve karasal canlılar olumsuz etkilenmektedir. Uçucu olduğu için havada 10 ppm 'den yüksek değerlerde bulunması insan sağlığını etkiler. Denizlerin ve göllerin üst katmanlarını kaplayarak oksijen geçişine engel olur. Sucul organizmaların fotosentez yapmasına engel olarak ötrofikasyona neden olur. Bu nedenlerden dolayı bazı çevre koruma kuruluşları tolueni öncelikli kirletici olarak ilan etmiştir. (Huertas ve ark.2000). *Pseudomonas putida* organik çözücü olarak kullanılan tolueni metabolize ederek, toluen ile kirlenmiş bir araziye hiç bir yan etki yaratmadan temizlemektedir.

Bir çevre kirleticisini ortamdaki uzaklaştırmak için bakteri, fungus (mantar), alg ve bitki gibi organizmaların kullanılmasına biyolojik iyileştirme, bu organizmaların çeşitli zararlı kimyasal bileşikleri parçalayıp mineralize etmesine ise biyolojik yıkım diyoruz. Çevre kirliliğinin azaltılmasında mikroorganizmaların kullanılma nedenleri ; maliyetsiz yani masrafının az olması , parçalanma esnasında çevreye toksik madde verilmemesi , kullanımının kolay olması nedenleri sayılabilir.

Pseudomonas türlerinin en önemli özellikleri çok çeşitli organik bileşiği karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmesidir. (Michael Madigan ., 2010).

Pseudomonas putida toluen ve ksilen gibi toksik hidrokarbon gruplarına karşı toleransa sahiptir. (Ramons ve ark., 2002). Tolueni metabolize ederek (parçalayarak), zararsız ürünlere (CO₂, su, enerji) dönüştürme kabiliyetindedir. (UK and Taus Biotech Ltd, s. 285, 2003). *P. putida*, aynı degradasyon özelliğini gösteren *P. aeruginosa* gibi patojen bazı diğer *Pseudomonas* türlerinden daha güvenli olduğundan tercih edilir.

Bu çalışmada *Pseudomonas putida*'yı kullanmamızın en önemli nedeni bu bakterinin toksik özellikteki kimyasalların biyolojik yıkımını gerçekleştirebilmesi ve solventlere karşı en dirençli bakteriler arasında olmasıdır.

Toluen'in parçalanmasında Toluen dioksijenaz ve metilkatekol 2,3-dioksijenaz aktivitesi ile olur. Katekol ve proto-katekuate , aerobik aromatik katabolizmada yaygın ara ürünlerdir. Proto-katekuate, katekolün OH gruplarının birbirinden iki karbon atomunun uzaklaşması ile oluşur ve bir karboksil grubu bulundurur.(Michael T.Madigan .2010). Toluenin parçalanması sonucu oluşan asetaldehit ve pürivat krebs döngüsüne katılır . Böylece *Pseudomonas putida* çevreye ve insan sağlığı üzerine toksik etkisi bulunan tolueni kendine özgü enzimleri ile parçalar ve çevreye geri kazandırır.

Bu çalışmanın temel amacı petrol ürünlerinde bulunan organik kirleticiler, örneğin aromatik hidrokarbonlu bir bileşik olan Toluen ' in mikroorganizmalar tarafından enerji ve besin kaynağı olarak kullanılarak kolayca parçalanıp karbondioksit ve suya dönüştürülerek Biyolojik İyileştirme ile çevre temizliğinin sağlanmasıdır. Elde edilen bulgularda da görüldüğü gibi ortama karbon kaynağı olarak besi yerine sadece toluen verilince *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu tolueni parçalarken ortamda üremeleri için enerji alacağı başka madde olmadığından ilk önce bakteri üremesi olmadı durağan faz seyir etti (Lag Fazı). Bu fazda hücreler yeni besi ortamına veya diğer koşullara adapte olurlar ve üremeleri için gerekli yeni bileşenler , enzimler sentezlenir. Toluen yavaş yavaş parçalanmaya başladıktan sonra bakteriler enerji alıp üremeye başladıkları için bakteri sayısı logaritmik olarak artmaya başladı (Log Fazı). Besiyerinde ki toluen sürekli parçalanarak zamanla miktarı azalmaya başladı ve bakterilerin toksik maddeleri ile besi ortamının PH'ı değişmeye başladığı için bakterilerde üreme durumu yavaşladı duraklama fazına geçildi (Durağan Faz). Karbon kaynağı olarak kullanılan toluen *Pseuodomonasputida* tarafından parçalandıkça ortamda miktarı zamanla azaldı. Tolueni karbon kaynağı olarak kullanan bakteriler ne kadar çok tolueni parçarlarsa o kadar çok enerji elde ederler ve o oranda üreyerek sayılarının artması gözlemlenir. Bakteri sayısının artması ile absorbansları da o oranda artma gösterdi (Şekil 7).

Toluen *Pseudomonas putida* NRRL-B 13 suşu tarafından karbon kaynağı olarak parçalanıp kullanıldıkça ortamdaki miktarı azaldı.Besi ortamında ki miktarı azaldıkça toluenin absorbansı da zamanla o oranda azalma gösterdi (Şekil 8).

Optimal sıcaklık, hücre içinde enzimlerin aktivitesi için de genellikle, uygun kabul edilir. Sıcaklık arttıkça veya azaldıkça, enzim aktivitesinde de değişiklik oluşacağından, metabolizma üzerine olumsuz yönde etkiler. *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun en iyi gelişme gösterdiği sıcaklık değeri 35°C 'dir. Bu nedenle 30 °C ' de yapılan deneyde üremelerinde artma göstermemiştir. Ortamdaki karbon kaynağı toluendir. Toluene parçalanmadan enerji elde edilemez ve üreme sağlanamaz. *Pseudomonas putida* 'daki tolueni yıkan enzimler optimal sıcaklık değerinin biraz altında fazla aktif duruma geçemedikleri için toluene parçalanması ve enerji eldesi az olmuştur. Dolayısıyla ortamdaki bakteri sayısında da artış gözlemlenmedi (Şekil 9).

Bazı enzimlerin aktif hale gelmeleri için protein yapısında bulunmayan metal iyonlarından oluşan ve kofaktör adı verilen yan gruplara ihtiyaç duyulur. Kalsiyum, magnezyum, potasyum, çinko gibi mineraller kofaktör olarak bazı enzimlerin aktiviteleri için şarttır. Bu çalışmada toluenin parçalanmasının artırılmasının gözlemlenmesinde kofaktör olarak MgCl₂ ve CaCl₂ kullanıldı. MgCl₂ içeren besi ortamında absorbansda azalma görüldüğü için MgCl₂ 'ün toluenin parçalanmasını arttırdığı gözlemlendi. Madde miktarı ne kadar az olursa absorbans da o oranda azalacağı için toluene parçalanmasını arttırdığını söyleyebiliriz. MgCl₂ içermeyen besi ortamındaki absorbans değerleri ile MgCl₂ içeren besi ortamındaki absorbans değerlerine göre fazladır. Absorbans fazla olduğu için toluene miktarı da MgCl₂ içermeyen besi ortamında fazladır. Yani MgCl₂ kofaktör olarak toluene parçalanmasını arttırmıştır (Şekil 10). CaCl₂ içeren besi ortamında absorbans yüksek ama sabitlik gösterdi. Sabitlik göstermesi durumu toluenin parçalanma miktarında artma veya azalma olmamasından kaynaklandı. Bu nedenle CaCl₂ ' nin toluene parçalanmasına bir etkisi yoktur. CaCl₂ içermeyen besi ortamında absorbans az ve sabitlik gösterdi. Sabitlik göstermesinin nedeni toluenin parçalanma miktarında artma veya azalma olmamasından kaynaklandı. Bu nedenle CaCl₂ ' nin toluene parçalanmasına bir etkisi yoktur. CaCl₂ içeren besi ortamındaki absorbansın CaCl₂ içermeyen besi ortamındaki absorbansa göre yüksek çıkmasının nedeni kalsiyumun derişim miktarının fazla olmasından kaynaklanmaktadır. MgCl₂ ve CaCl₂ ' de klorlar ortaktır. Buna göre magnezyum toluene parçalanmasını arttırdığı için kofaktör olarak görev yapmıştır. Kalsiyumun toluene parçalanmasına bir etkisi yoktur.

KAYNAKÇA

- Atlas R. M.** (1978): “Microorganisms and Petroleum Pollutants”, *BioScience*,28, s.387- 391.
- Carson, L.A.,Favero, M.S., Bond, W.W. and Petersen, N.J.** (1973). Morphological,Biochemical and Growth Charecteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. *Appl. Microbiol.*, 25(3):476-483.
- Civan, M., Elbir, T., Seyfiođlu, R., Sofuođlu, S., Bayram, A., Műezziñođlu, A., Odabaşı, M., Kuntasal, Ö., Bozlaker, A., Pekey, H., Andiç, Ö., Yurdakul S., Tuncel, G.**, (2008). Aliađa bölgesindeki inorganik ve uçucu organik bileşiklerin pasif örnekleme meto- duyla belirlenmesi. *HavaKirliliđi ve Kontrolü Ulusal Sempoz- yumu—2008 Bildiriler Kitabı*, 22—25 Ekim 2008 Hatay 178— 193.
- Erman Dolmacı, Özlem Özden, Tuncay Döđerođlu, Eftade O. Gaga** (2013). Eskişehir’de Bir Petrol İstasyonu Çevresindeki Dış Ortam Uçucu Organik Bileşik (UOB) Derişimlerinin Belirlenmesi . *Anadolu Üniversitesi, Műhendislik Fakűltesi, Çevre Műhendisliđi Bölümü, İki Eylül Kampüsü, 26555 Eskişehir.*
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S. , Tang, X., Dickman, M. B, Collmer, A.and Alfano, J. R.**,(2004) “Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast”. *Plant J.* , 37:554-565
- Kapley vd.**, (1999); Ojumu vd., 2005; Peressuttia vd., 2003; Rahman vd., 2002 ; Ökmen ve Algur, 2000; Johnson vd., 1996; Komukai-Nakamura vd., 1996; Kiyohara vd., 1992; Jack vd., 1985; Fall vd., 1979

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. and Clark, D.P.(2010). Brock
Biology of Microorganisms, 13th edition, Pearson Benjamin- Cummings,
San Francisco.

Morimoto, H. ;Yoshida, M.,(1954). On the nutritive value of starches. I. Bull. Nat.
Inst. Agric. Sci., Set. G., 8:43-51

Rhykerd, R.L., Crews, B., McInnes, K.J., and Weaver, R.W.(1998). Impact of
bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-
contaminated soil. Bioresource Technology 67; 279-285

(<https://tr.wikipedia.org/wiki/Toluen#/media/File:Toluol.svg>) 07.07.2019

(<http://2012.igem.org/Team:Leicester/Modeling>) 07.07.2019

(<http://www.kocaelisistemlab.com/meslek-hastalıkları-tourent.asp>) 07.07.2019

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Sümeyya TATLI
Doğum Yeri ve Tarihi Sivas, 06.10.1991
Medeni Hali Bekar
E-posta Adresi s.tatli58@hotmail.com

Eğitim ve Akademik durumu

Lise Sivas Lisesi
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi
Yüksek Lisans Cumhuriyet Üniversitesi

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce

Uzmanlık Alanları

Moleküler Biyoloji

Başarılar / Ödüller

2012-2013 Onur Belgesi

İlgi alanları , Hobiler

Müzik dinlemek