

**2,4-DİNİTROTOLUEN'İN BİR *ARTHROBACTER*
CHOLOROPHENOLICUS SUŞU İLE
BİYODEGRADASYONU VE İLGİLİ KATABOLİK
GENLERİN FISH TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

PINAR KÜCE

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
HAZİRAN - 2010**

**2,4-DİNİTRO TOLUEN'İN BİR *ARTHROBACTER*
CHOLOROPHENOLICUS SUŞU İLE
BİYODEGRADASYONU VE İLGİLİ KATABOLİK
GENLERİN FISH TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

PINAR KÜCE

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Gökhan CORAL**

**MERSİN
HAZİRAN - 2010**

Pınar KÜCE tarafından Prof. Dr. **Gökhan CORAL** danışmanlığında hazırlanan “2,4-Dinitrotoluen’in bir *Arthrobacter cholorophenilus* suşu ile biyodegradasyonu ve ilgili katabolik genlerin FISH tekniği ile belirlenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gökhan CORAL

Doç. Dr. Münir TUNCER

Doç.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

İmza



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02.../09.../2016 tarih ve 2010.19.../374..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

2,4-DİNİTROTOLUEN'İN BİR *ARTHROBACTER CHLOPHENOLİCUS* SUŞU İLE BİYODEGRADASYONU VE İLGİLİ KATABOLİK GENLERİN FISH TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Pınar KÜCE

ÖZ

Bu çalışmada, petrol rafinerisinden alınan ham petrolle kontamine olmuş toprak örneklerinden zenginleştirme kültür metoduyla karbon ve azot kaynağı olarak 2,4-Dinitrotoluen (2,4-DNT) içeren MM9 besiyerinde 15 bakteri suşu izole edilmiştir. 30 °C sıcaklıkta 10 günlük inkübasyon sonrasında en iyi üreyen bakteri suşu identifikasyonu yapılmak üzere seçilmiştir. İdetifikasyon için 16S rRNA/DGGE metodu kullanılmış ve bakteri suşu *Arthrobacter chlorophenolicus* olarak teşhis edilmiştir. Bakteri suşunun farklı sıcaklık ve pH değerlerinde optimum degradasyon koşulları test edilmiştir. 2,4-DNT'nin optimum degradasyonunun 30 °C sıcaklıkta ve pH 7-8 aralığında gerçekleştiği tespit edilmiştir. 2,4-DNT'nin degradasyon kinetiğı HPLC analizleriyle hesaplanmıştır.

Plazmid eliminasyonu deneyleri sonucunda 2,4-DNT degradasyon yeteneğinin plazmid kaynaklı olduğu bulunmuştur. Bu plazmidin büyüklüğünün ise yaklaşık 8,125 kb olduğu tespit edilmiştir.

Ham petrolle kirlenmiş toprak ve saf bakteri kültürü örnekleri ile gerçekleştirilen Floresan Yerde Hibritleme (FISH) deneylerinde, 2,4-DNT degradasyon metabolik yolundaki *dntAa* ve *dntD* genlerine ait hibridizasyon sinyalleri gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyodegradasyon, 2,4-DNT, *Arthrobacter*, Plazmid, FISH.

Danışman: Prof. Dr. Gökhan CORAL, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

BIODEGRADATION OF 2,4-DINITROTOLUEN BY *ARTHROBACTER CHOLOPHENOLICUS* STRAIN AND DETERMINATION OF RELEVANT CATABOLIC GENES WITH FISH TECHNIQUE

Pınar KÜCE

ABSTRACT

In this study, soil samples which were contaminated by crude oil were used. 15 Bacterial strains were isolated with enriched culture method from this samples and 2,4-DNT used as a source of nitrogen and carbon in MM9 medium. The best growing strain was selected for identification after the incubation at 30 °C for 10 days. This bacterial strain was identified as *Arthrobacter chlorophenicus* by using 16S rRNA/DGGE method. The optimum degradation conditions of this strain was tested at different temperatures and pH intervals. Optimum 2,4-DNT degradation was found at 30 °C and pH 7-8. Moreover, the degradation kinetics of 2,4-DNT were determined by HPLC.

2,4-DNT degradation ability of the bacterial strain was found to be plasmid-mediated through curing experiments. The size of this plasmid was estimated as about 8,125 kb.

In fluorecent *in situ* hybridization (FISH) experiments, hybridization signals of 2,4-DNT degradation pathway genes, *dntAa* and *dntD*, were observed in crude oil contaminated soil and pure bacterial culture samples.

Key words: Biodegradation, 2,4-DNT, *Arthrobacter*, Plasmid, FISH.

Advisor: Prof. Dr. Gökhan CORAL, Mersin University, Department of Biology

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren danışmanım Prof.Dr. Gökhan CORAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Desteğinden dolayı Doç.Dr. Münir TUNCER'e, Yrd.Doç.Dr. Gülay BÖREKÇİ'ye teşekkür ederim. Çalışmam sırasında laboratuvarımı kullanımına açan Doç.Dr. Murat GİZİR ve çalışmalarım sırasında yardımcı olan Muhammet DEMİREL'e, Yrd.Doç.Dr. Berkant KAYAN'a, çalışmalarımı istatistiksel değerlendirilmesinde yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Bahar TAŞDELEN'e, Arş.Gör. M. Ali SUNGUR'a, analizlerimin değerlendirilmesinde yardımcı olan Doç.Dr. Çetin KANTAR'a teşekkür ederim. Yüksek lisansım süresince her zaman yanımda olan çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Sertan ÇEVİK'e ve Dr. Filiz KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca desteğini her zaman hissettiğim bölüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca benden desteğini ve güzel dileklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme, özellikle **Anneme** tüm emekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN KİMYASAL YAPISI.....	5
2.2. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN TOKSİSİTESİ, KARARLILIĞI, DÜZENLEYİCİ GEREKSİNİMİ.....	7
2.2.1. Ekotoksitesi, Dirençliliği, Canlılara Etkileri.....	8
2.2.2. Kontaminasyon Kaynakları, Yok Etme Mekanizmaları.....	9
2.3. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK OLARAK PARÇALANMASI.....	10
2.3.1. NAC'ların Biyodegradasyonunda Kullanılan Bazı Terimler.....	11
2.3.2. 2,4-DNT'nin Biyodegradasyon Mekanizması.....	12
2.3.2.1. Meisenheimer kompleksi.....	14
2.3.3. DNT Biyodegradasyonunda Rol Alan Enzimler.....	14
2.3.3.1. DNT dioksigenaz.....	15
2.3.3.2. MNC monooksigenaz.....	16
2.3.3.3. THT oksigenaz.....	16
2.3.4. Biyodegradasyona Etki Eden Faktörler.....	16
2.3.4.1. Sıcaklık.....	16
2.3.4.2. Oksijen.....	17

2.3.4.3. Nutrient varlığı.....	17
2.3.4.4. Tuzluluk.....	18
2.3.4.5. Basınç.....	18
2.3.4.6. Su aktivitesi.....	19
2.3.4.7. Ph.....	19
2.3.4.8. Ortamdaki bitki varlığının etkisi.....	19
2.4. DNT'İ DEGRADE EDEBİLEN BAKTERİ VE FUNGUSLAR.....	20
2.5. <i>Arthrobacter</i> GENUSUNUN ÖZELLİKLERİ.....	20
2.5.1. <i>Arthrobacter</i> Genusunun Degrad Edebildiği Bileşikler.....	22
2.6. BİYODEGRADASYONDA KULLANILAN MOLEKÜLER TEKNİKLER.....	23
2.7. ÇALIŞMANIN AMACI.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Ksenobiyotikleri degrade eden katabolik genlerin tanımlanması ve çeşitliliğinin teşhisi için kullanılan moleküler yaklaşımlar.....	24
Çizelge 3.1. Kullanılan primerler.....	36
Çizelge 3.2. Hibridizasyon solüsyonu.....	37
Çizelge 3.3. Yıkama tampon solüsyonu.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Yaygın nitroaromatik bileşiklerin kimyasal formülleri.....	6
Şekil 2.2. Nitroaromatik bileşiklerde nitro gruplarının redüksiyon mekanizması.....	12
Şekil 2.3. Nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyon mekanizması. 5. metabolik yol sadece anaerobik sistemler için tanımlanmıştır.....	13
Şekil 2.4. TNT-meisenheimer kompleks formasyonu.....	14
Şekil 2.5. <i>Burkholderia</i> sp. tarafından dinitrotoluenin biyodegradasyon metabolik yolu.....	15
Şekil 2.6. Dioksigenaz gen ailesi.....	16
Şekil 2.7. <i>In situ</i> hibridizasyon prosesi.formaldehit ile fiksasyon yapılarak hücre içeriğinin elde edilmesi(A).spesifik prop ile hibridizasyon(B) marker ile işaretleme(C).florasan mikroskopuyla gözlemlenmesi.....	26
Şekil 4.1. İzole edilen bakteri suşunun 2,4-DNT içeren MM9 Agardaki üreme davranışı.....	39
Şekil 4.2. 10 günlük inkübasyon süresince iyi üreme gösteren 3 suşun zaman bağlı üreme grafiği.....	40
Şekil 4.3. Gram boyama yöntemi ile boyanan <i>Arthrobacter</i> genusunun 100X mikroskop görüntüsü.....	40
Şekil 4.4. NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution tree" yöntemi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.5. Absorbans ölçümleri için regresyon grafiği.....	42
Şekil 4.6. Besiyeri pH'sının bakteri suşunun üremesi üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.7. 2,4-DNT miktarının belirlenmesi için oluşturulan regresyon grafiği...	44
Şekil 4.8. Besiyeri pH'sının bakteri suşunun 2,4-DNT degradasyonu üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.9. Farklı sıcaklık ortamında degradasyon ve biyokütlerdeki değişim.....	46

Şekil 4.10. Sabit pH ve sıcaklıkta 2,4-DNT konsantrasyonu / Biyokütle ilişkisi.....	47
Şekil 4.11. Zamana bağlı substrat tüketim kinetiğini gösteren grafik.....	48
Şekil 4.12. Substrat tüketim hızının pH'ya bağlı değişimi.....	48
Şekil 4.13. EtBr ile muamele edilen bakterilerin Nturient agar(A) ve 2,4-DNT'li MM9 agar (B)'daki görünümü.....	49
Şekil 4.14. Agaroz jel'de ayrıştırılan kromozomal ve plazmid DNA görüntüleri. Hat1: 1kb'lık DNA markırı, Hat 2: plazmid DNA, Hat 3: Kromozomal DNA.....	50
Şekil 4.15. FITC ile işaretli dntAa genini taşıyan bakterilere ait hibridizasyon sinyalleri ve DAPI görüntüleri.....	51
Şekil 4.16 cy3 ile işaretli dntD genini taşıyan bakterilere ait hibridizasyon ve DAPI görüntüleri.....	52
Şekil 4.17. cy3 ile işaretli EUB338 probunun kullanıldığı pozitif kontrol grubu ve bu bakterilerin DAPI görüntüleri.....	53
Şekil 4.18. cy3 ile işaretli nonEUB338 probunun kullanıldığı negatif kontrol grubu ve bu bakterilerin DAPI görüntüleri.....	54

KISALTMALAR

- CY3 : Siyanin 3
- DABCO: 1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktan
- DAPI : 4',6-diamidin-2-fenilindol
- DIG : Dioksijenin
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- DNT : Dinitrotoluen
- EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit
- FISH : Floresan yerinde hibritleme (flouresence in stu hybridization)
- FITC : Floresan isotiosiyanat
- HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Preformance Liquid Chromotography)
- MM9 : Modifiye Mineral besiyeri
- MNC : Metilnitrokateşol
- NAC : Nitroaromatik bileşik
- NDO : Naftalin dioksijenaz
- PBS : Fosfat tamponu
- PFA : Paraformaldehit
- rRNA : Ribozomal ribonükleik asit
- SDS : Sodyum dodesil sülfat
- TE : Tris-EDTA
- THT : Trihidroksitoluen
- TNT : 2,4,6-Trinitrotoluen
- TRITC : Tetrametilrhodamin-5- (and 6)-isotiyosiyanat
- 4M5NC : 4-Metil-5-Nitrokateşol

1. GİRİŞ

Çevre sorunu dünyanın pek çok yerinde, özellikle son 20 yılda güncel hayata girmiş, acilen çözüm bekleyen bir problemdir. Ormanların tahribi ve erozyon, düzensiz şehirleşme ve yeşil alanların azalması, kıyıların bozulması, sanayide kullanılan kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, nükleer enerjili termik santraller ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ların ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat sadece Türkiye'de değil, dünyada da çözüm yolları aranan sorunlar haline gelmiştir [1].

Nitrobenzen, nitrofenoller, aminofenoller ve aromatik aminler gibi nitroaromatik bileşikler, biyosferde çoğunlukla antropojenik kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı bileşikler fosil yakıtların tamamlanmamış kompostlamasından kaynaklandığı gibi, bazıları da sentetik ara bileşiklerden, boyalardan, pestisit ve patlayıcı yapımından kaynaklanmaktadır. Nitrobenzen bileşiğinin yıllık üretim miktarı 225.000 tondur ve bu bileşiğin yaklaşık 9000 ton kadarı doğadaki su kaynaklarına deşarj edilmektedir [2].

Toluen diisosiyanatın öncüsü olan 2,4-DNT bileşiği, poliüretan köpük yapımında kullanılan önemli bir endüstriyel ara üründür. Bununla beraber dinitrotoluenler, özellikle 2,4-DNT, 2,4,6-TNT patlayıcısının öncüsüdür. Bir süre öncesine kadar bu endüstriyel prosesler sonunda açığa çıkan atık suların çevreye bırakıldığı bilinmektedir. 2,4-DNT, karsinojenik ve toksik özellikleri nedeniyle Birleşik Devletler Çevre Kroma Ajansı'nın (U.S. EPA) birincil kirletici listesine alınmıştır. Bu nedenle, uzaklaştırılması önemli bir çevresel durumdur [3].

Doğada bu aromatik bileşiklerin varlığı çevresel ve sağlık açısından ciddi problemler doğurmaktadır. Bu bileşiklerden bazıları karsinojenik ya da mutajenik aktiviteye sahiptir ve besin zincirinde biyolojik yığılmaya neden olabilmektedirler. Bunun yanında birçok nitroaromatik bileşiğin mikroorganizmalar için de toksik ya da mutajenik olduğu bilinmektedir [2].

In situ biyoremediasyon doğadaki zararlı kimyasalları parçalamak için biyolojik prosesleri kullanması açısından avantajlıdır. Biyoremediasyon süresince kontaminantlar, mikrobiyal proseslerle karbondioksit ve su gibi zararsız formlara parçalanırlar ya da daha az zararlı formlara dönüştürülürler. Mikroorganizmaların üremesi ve hayatlarını sürdürebilmesi için besin kaynağına, karbon kaynağına ve uygun çevresel koşullara ihtiyaçları vardır [4,5].

Zararlı maddeleri daha az toksik ya da zararsız hale dönüştürmek veya degrade etmek için biyolojik sistemlerin kullanıldığı biyoremediasyon gibi alternatif teknikler, dünya çapında nitroaromatik kirleticilerin dekontaminasyonu alanında oldukça ilgi çekmektedir. Bu teknik ekolojik olduğu kadar sürdürülebilir bir yöntemdir. Biyoremediasyon yöntemi temel olarak; biyoremediasyon, biyostimülasyon ve biyoaugmentasyon olmak üzere 3 uygulamadan meydana gelir. Nitroaromatik bileşiklerle kontamine alanları temizleme uygulamalarında mikroorganizmalar, yaşama, üreme, metabolize etme ve kolonize olma yönünden sahip oldukları üstün yetenekleriyle çok önemli bir yer tutmaktadırlar [6].

DNT izomerleri yaygın nitroaromatik kirleticilerdendir ve DNT'lerin remidasyonu özellikle son 20 yıldır oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Karışık ve saf kültürle NAC'lerin biyodegradasyonu ile ilgili birçok önemli bilgi elde edilmiştir. O₂ ve diğer nutrientlerin olmadığı durumlarda NAC'lerin hareketini ve kararlılığını tanımlamak mümkün olmuştur. DNT'lerin aerobik ve anaerobik şartlar altındaki metabolizmasıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Anaerobik şartlar altında DNT'lerin transformasyonu ya da yarı metabolizmasının, tamamlanmamış yıkım ürünleriyle sonlandığı ve kontrolünün zor olduğu tespit edilmiştir. Aerobik şartlar altında O₂ kullanımıyla DNT'nin parçalanması, proton ve nitrit çıkışı, CO₂ üretimi ve biyokütle gelişimi ile sonuçlanmaktadır [7]. Nitroaromatik bileşiklerin aerobik bakterilerle degradasyonu temel olarak mono- ve di- nitro aromatik bileşiklerin karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmak üzere tamamen mineralizasyonu ile gerçekleşir [6].

Arthrobacter genusu çok çeşitli karasal habitatta bulunur. Bu aerobik, kemoheterotrofik karakterdeki bakteri genusu, herbisit, klorofenol ve alkanlar,

kompleks aromatik bileşikler gibi çok çeşitli organik bileşiği metabolize etmektedir. *Arthrobacter*'lerin kurumaya ve besin yetersizliğine karşı dirençli olması, çöleşmeye yakın toprakların biyoremediasyonunda kullanılmasında avantaj sağlamaktadır [8].

Çevresel DNA'da her yıl yaklaşık bir milyondan fazla yeni gen keşfedilmesine rağmen; ne yazık ki 1970'lerden günümüze kadar hiçbir yeni biyokimyasal reaksiyon bulunmamıştır. Toksik kimyasallar ve zarar verme potansiyeli olan endüstriyel atıklarla kirletilmiş alanlar ise biyoteknolojik açıdan altın madeni gibi değerli hale gelmiştir. Çünkü bu alanlar ksenobiyotikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaya yarayan gerekli enzimleri taşıyan mikroroganizma nişlerini barındırmaktadırlar. Mikroplar diğer domainlerde yaygın olmayan metabolik reaksiyonları gerçekleştirerek, çok çeşitli substrat varlığında yaşayabilme avantajına sahiptir. Diğer bir deyişle; parçalanmaya dirençli kimyasallar için geliştirilmiş mikrobiyal biyodegradatif yollar, sadece çevre kirliliğinin giderilmesi açısından değil, aynı zamanda yeşil kimya ve beyaz biyoteknoloji alanlarına özgün katalitik aktiviteler kazandırmış olması açısından da oldukça önemlidir. Bundan dolayı, biyodegradasyon ve biyotransformasyon prosesi mikrobiyal biyokimyada sınırsız güç konumundadır [9].

Saf kültür izolasyonunu temel alan geleneksel mikrobiyal teknikler, morfolojik, metabolik, biyokimyasal ve genetik alanındaki çalışmalarla doğal ya da oluşturulmuş sistemlerdeki mikrobiyal kominite hakkında ayrıntılı bilgi vermektedir. Bunun yanında, geleneksel teknikler, doğal çevredeki çoğu mikroorganizmanın, laboratuvar koşullarında üretilen saf kültürlerinde anlaşılacak fizyolojik ihtiyaçları, sinotropik ve simbiyotik ilişkileri hakkında yeterli bilgi veremez. Ek olarak, çoğu kültür besiyerleri mikroorganizmaların belirli gruplarının gelişmesi için yeterli ise de; bazıları özgün örneklerin üremesini sağlamaz. Bu yüzden, günümüzde kabul edilen prokaryot türleri, mikroorganizmaların çeşitliliği açısından çok sınırlı bir karşılaştırmayla belirlenmiştir. Bu durum geleneksel metodların, ekosistemdeki mikroorganizma çeşitliliğini yansıtamadığını göstermektedir.

Günümüzde 7000 bakteriyal tür tanımlanmıştır, fakat moleküler ve ekolojik tahminlere göre gerçek rakam birkaç katı fazla olmalıdır. Bu probleme uygun çözüm

moleküler biyolojik yaklaşımları kullanmaktır. Bu teknikler, moleküler saat ya da evrimsel kronometre olarak nitelenebilecek olan ribozomun küçük alt birimini oluşturan RNA'yı ya da ona karşılık gelen genleri temel alır [10].

Denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE), denatüre olmuş aynı boyutta fakat farklı nükleik asit dizisi içeren DNA fragmentlerinin jeldeki hareket farklılığını temel alan ve böylece örneklerdeki biyolojik çeşitliliği ortaya koyan, oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Karşılıklı gelen bantların sayısı dominant türlerin sayısı ile orantılıdır. Bantların sekans ve filogenetik analizi ile çalışıldığında DGGE, bir mikrobiyal komünitenin kompozisyonu hakkında bilgi sağlayan bir metottur [10]. rRNA'yı hedefleyen oligonükleotid propların kullanıldığı Floresan Yerde Hibritleme (FISH) tekniği, kendi doğal ortamlarında mikrobiyal hücrelerin tek tek özgül tanımlanmasının hızlı bir şekilde yapılmasını sağlayan bir tekniktir. Son on yılda FISH tekniğinde geliştirilen metodolojik gelişmeler sayesinde mikrobiyal ekoloji ve biyoteknoloji alanında kullanımı yaygınlaşmıştır [11].

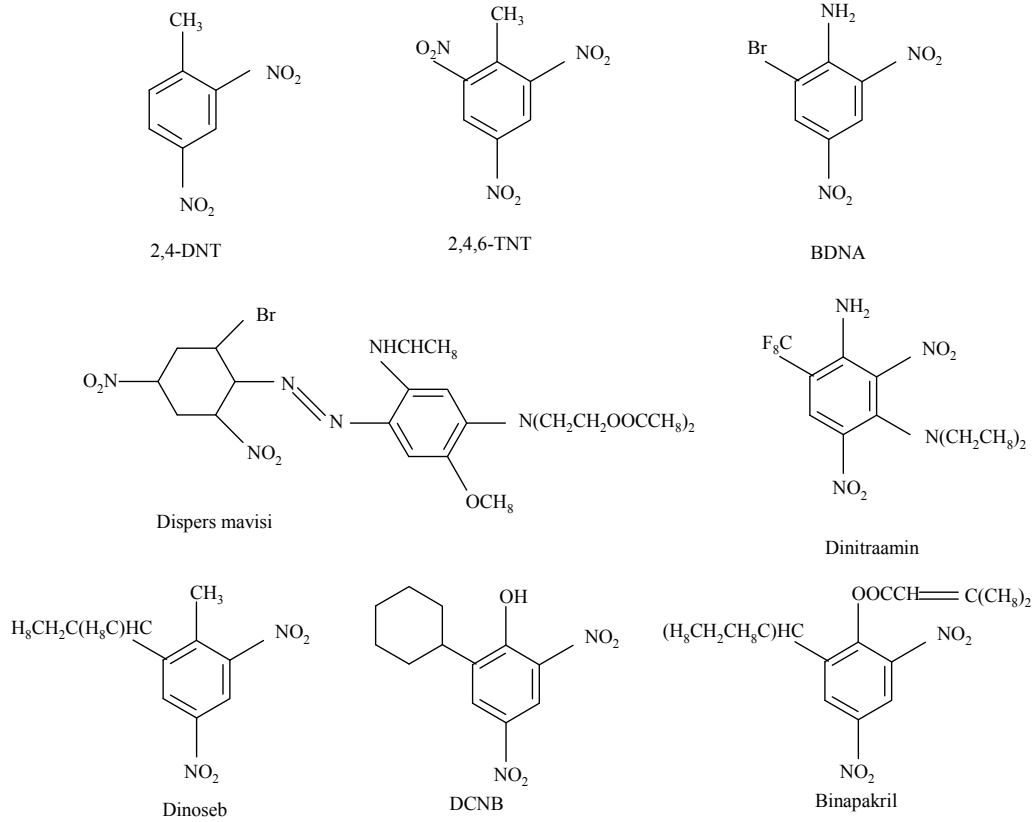
Son yüz yıldır kimya endüstrisindeki hızlı gelişme özellikle ksenobiyotikler olmak üzere birçok kirleticinin doğada birikimine neden olmuştur. Nitroaromatik bileşikler, patlayıcı, boya ve pestisit üretimi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. NAC'ların doğada birikimi, birçok çevresel ve sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu zararlı bileşiklerin doğadan temizlenmesi için en ekonomik yol mikroroganizmaların kullanılmasıdır. Bu çalışmada, ham petrol ile kontamine olmuş topraklardan 2,4-DNT degrade edebilen bakteri suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu ile izole edilen bakteri türünün, FISH yöntemi ile degradasyonda görev alan *dntAa* ve *dntD* genlerinin varlığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN KİMYASAL YAPISI

2,4-DNT, atmosfer sıcaklığında açık sarı ya da daha koyu sarı, kristal yapıda, acı, toksik, nem çekmeyen ve yanıcı özellik gösteren bir bileşiktir. Sudaki çözünürlüğü az olmasına karşın; eter, aseton, benzen ve toluen gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünür. Ham materyali, toluen diisosiyanat sentezinde kullanılır. DNT'nin erime ve kaynama noktası, sırasıyla 71 ve 300 °C'dir. Kristal yoğunluğu 1,3208 g/cm³'dür [12].

Nitroaromatik bileşiklerin fiziko-kimyasal özellikleri (Şekil 2.1) ve aromatik nitro grubunun kimyası, nitroaromatik bileşiklerin alt ürünlere dönüşümünde anahtar rol oynamaktadır. Nitro grubunun polarize etkisinden ve suyla beraber H bağı oluşturabilmesinden dolayı, NAC'lar suya yüksek ilgi gösterirler ve polar ortamda diğer klasik organik kirleticilerin (halojenik ya da alkali aromatik bileşikler gibi) aksine bir durum sergilerler [13].



Şekil 2.1. Yaygın nitroaromatik bileşiklerin kimyasal formülleri [14].

Nitro gruplarıyla aromatik halka arasındaki güçlü etkileşim, nitroaromatik bileşiklerin reaktifliğini belirler. Nitro gruplarının azot-karbon bağları üzerinde kuvvetli negatif indükleyici etkisi vardır. Çoğu diğer elektron yakalayıcı yapılara karşın, nitro grupları aromatik sistemle etkileştiğinde oldukça güçlü π akseptörü haline gelirler. İndükleyici ve yer değiştirici etkisinin sonucunda nitro grubunun oksijen atomunda negatif yük birikimi meydana gelir. Aromatik halkanın elektronunun yetersiz olmasının sonucunda, nitroaromatik bileşikler oldukça iyi π akseptördür ve uygun elektron vericilerle eş düzlemler oluşturabilirler. Bu ortaklık yük transferi ya da elektron alıcı-verici (EDA) kompleksini meydana getirir ve $\pi - \pi$ ve $n - \pi$ etkileşimlerini içerirler.

Doğal toprak bileşenleri ve akifer ile NAC'ların arasındaki EDA kompleks formasyonu, diğer üstün kontaminantlardan farklı bir biçimde nitroaromatik bileşiklerin hareket yeteneği, biyolojik yararlılığı ve reaktivitesini etkilemektedir.

NAC'ların aromatik sistemlerinin elektron eksiklikleri, halka karbonlarına elektrofilik saldırıları engeller ve bundan dolayı kimyasal ya da mikrobiyal halka oksidasyonuna uğramaya düşük eğilim gösterirler. Buna zıt olarak, aromatik nitro grubu, mikroorganizmalar tarafından ya da abiyotik reaksiyonlarla gerçekleşen redüktif transformasyonlara karşı oldukça duyarlıdır. Nitroaromatik bileşiklerin yer değiştiren yapılarının sterik ve elektronik etkisi nitroaril radikallerinin kararlı yapılarını önemli ölçüde etkiler ve bu yüzden nitroaromatik bileşikler redüktif transformasyonlara duyarlıdır. Nitro grubunun amino grubuna redüksiyonu esnasında, ilk elektronun geri dönüşümlü transferi genellikle yüksek enerji içerir ve bu yüzden, bu basamak reaksiyonun kontrol basamağıdır [13].

TNT'nin aromatik halkasından elektronegatif nitro grupları tarafından π elektronları uzaklaştırılır. Nitro grubu N ve O olmak üzere 2 element içerir ve bunların ikisi de yüksek elektronegatifdir. O atomu, N atomundan daha elektronegatifdir. Bu yüzden, N-O bağı polar yapıdadır. Azot atomunun kısmi + yüklü olması ve N-O kombinasyonunun yüksek elektronegatif olması, nitro grubunu kolay redüklenebilir hale getirir. Aromatik halkadaki nitro gruplarının redüksiyonu ise yaygın olarak yaşayan organizmalarca gerçekleştirilir [15].

2.2. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN TOKSİSİTESİ, KARARLILIĞI, DÜZENLEYİCİ GEREKSİNİMİ

Nitroaromatik bileşiklerin kararlı yapısı, kolay bozunamaz oluşu, bu bileşikleri endüstriyel alanda değerli kılsa da, çevrede bulunduğunda tehlikelidir. Aromatik bileşiklerde nitro grubu arttıkça, bu grupların uzaklaştırılması da zorlaşmaktadır. Benzer elektron alma özelliği, aerobik ve anaerobik ortamda bu grupların kolay redüklenmesini sağlar.

Walia vd., *Pseudomonas putida* OU83 suşunun nitrotoluenleri degradasyon ile ilgili çalışmalarında, nitro grubunun benzen halkasındaki konumunun degradasyonda etkili olduğunu göstermişlerdir [16].

2.2.1. NAC'lerin Ekotoksosite, Dirençlilik ve Canlılara Etkileri

Nitroaromatik bileşiklerin indirgenmesi oldukça reaktiftir ve memeli sistemlerinde potansiyel karsinojenik ve mutajenik türevleri oluştururlar. Hem bağırsaktaki mikroflora hem de memeli organ sistemleri, özgül olmayan nitroredüktaz enzimine sahiptirler ve bu enzim, nitro grubunun daha zarar verici formları olan nitroso ve hidroksilamino gruplara dönüşümünü katalizlemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, amino ve nitroaromatik bileşiklerin ikisinin de güçlü karsinojen olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, nitrobenzenler, dinitrotoluenler, mono- ve di-nitrofenoleri kapsayan çok sayıdaki nitroaromatik bileşikler öncelikli kirleticilerdendir [13].

Yapılan çalışmalarda nitroaromatik bileşiklerin;

- Yüksek ekotoksik,
- Mutajenik,
- Kanserojenik,
- İmmünotoksik,
- Üreme açısından toksik olduğu ve,
- Üreme sistemi tümörlerine neden olduğu saptanmıştır.

Bazı nitroaromatik bileşiklerin karsinojen maddelerin dönüşümünü aktive ettiği bilinmektedir [10]. 2,4-DNT ve 2,6-DNT'nin canlılarca tüketilmesi ve sonrasında hepatik enzimlerce ve intestinal mikroflora tarafından metabolize edilmesi , bu bileşiklerin karsinojenik formasyonuna neden olmaktadır [17]. Toksik etkisi solunumla, beslenme yoluyla, ya da deriden absorpsiyonla gerçekleşir. Bu maddeler ayrıca yakıcı, patlayıcı ve uçucu özellikleri taşır.

Dodard vd. yaptıkları çalışmada, 2,4-DNT, 2,6-DNT ve bu nitroaromatik bileşiklerin metabolitlerinin toksik etkilerini, TNT ile, 15 dakikalık Mikrotoks (*Vibrio fischeri*) ve 96 saatlik tatlı su yeşil alg (*Selenastrum capricornutum*) üreme inhibisyon testi uygulayarak kıyaslamış ve sonuç olarak test edilen dinitrotoluenler ve onların metbolitlerinin TNT'den daha az toksik olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca toksisite çalışmalarında kullanılan model organizmanın, kıyaslama açısından etkili olduğu sonucuna varılmıştır [17].

Yapılan birçok çalışmada nitro grubunun amin grubuna indirgenmesinin tamamlanmasının bileşiğin mutajenik etkisinin azalmasını sağladığı tespit edilmiştir [16].

2.2.2. NAC'lerin Kontaminasyon Kaynakları ve Yok Etme Mekanizmaları

Nitroaromatik bileşikler nadir olarak biyolojik prosesler sonucu üretilirler. Nitroaromatiklerin kirlilik yaratacak düzeyde birikimi, endüstriyel aktiviteler nedeniyle olmuştur. NAC'ler, aromatik halkaya nitro gruplarının eklenmesiyle birlikte, aromatik bileşiklerin sentezinde başlangıç materyalidir. Nitrobenzen ve mono- di- nitrotoluen gibi nitroarenler boya, pigment, patlayıcı, pestisit, herbisit ve polimer yapımında solvent ya da hammadde olarak kullanılırlar ve büyük çaplarda üretilirler. Yapılan çalışmalarda istatistiklere göre, 1980 yılında toplam yıllık nitrobenzen üretimi 453.592 tonun üzerindedir. Bu atıkların büyük bir bölümü yeraltı sularına karışmaktadır. Bunun yanında önemli bir kısmı da su yüzeyi ve havaya karışmaktadır.

TNT hükümetlerin faaliyetleriyle üretilmektedir ve kontamine olmuş alanda yapılan çalışmalar alana dinitrotoluen (DNT) izomerlerinin yayıldığını göstermiştir. TNT'nin kitlesel üretimi 1. ve 2. Dünya Savaşlarında gerçekleştirilmiş olup, toprak ve suyun DNT ve TNT ile büyük çapta kontaminasyonuna neden olmuştur [14]. Askeri patlayıcıların üretimi ve eski mühimmatların kullanımı uzun yıllar boyunca oldukça geniş bir alanda devam etmiştir. 1945 yılında, Birleşik Devletlerde TNT üretim kapasitesi, günlük üretimde 65 tondan daha fazla gerçekleşmiştir. Aynı dönemde Almanyada ayda $2,36 \times 10^4$ ton üretim yapılmıştır. Bu geniş çaplı üretim patlayıcı maddelerin ve nitratlı bileşiklerin çevrede birikimine yol açmıştır. Birleşik Devletlerde, sadece askeri bölgelerde bile tahminen 1,2 milyon ton toprak, patlayıcı maddelerle kontamine olmuş durumdadır [18].

TNT'nin çevresel yayılımının bir nedeni de kasıtlı olarak herbisit ve pestisit kullanımı ve kazara dökülmesidir. Sonuç olarak, nitrobenzen, 2,4- ve 2,6-dinitrotoluen Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından birincil kirlilik etmeni oluşturan maddeler olarak tanınmıştır [13].

2,4-DNT, TNT üretiminde ara ürün, toluen diisosyanatın ise ham maddesidir [18]. DNT'ler dünya çapında askeri alanda patlayıcı yapımında kullanılmaktadır. 2,4-DNT ve 2,6-DNT izomerleri 4:1 oranında üretilmektedir [13]. Toluene ve nitrik asit, sülfürik asit varlığında etkileşime sokularak dinitrotoluenlerin yapımı gerçekleştirilmekte ve sonuç olarak %80 2,4-DNT, %20 oranında da 2,6-DNT oluşmaktadır [19].

Kirliliği temizlemenin maliyeti geleneksel yöntem kullanıldığında oldukça fazladır. Yakma işlemi ile tahmin edilen fiyat, m³ toprak başına 400 ya da 600 \$, gömme işlemiyle m³ toprak başına 404-467 \$'dır. TNT ile kontamine olmuş toprakların yardımcı biyoçamur uygulaması ile temizlenmesi ise 290 ile 350 \$ arasında değişmektedir [13]. Kontamine topraklar, kazı çalışmaları ve yakma işlemleriyle temizlenmeye çalışılmaktadır. Yeni arındırma teknikleri arasında UV radyasyonu, yıkama/kazıma, yardımcı solvent kullanımı ve kimyasal oksidasyon kullanılmaktadır. Enzimatik redüksiyon, katyonik sürfaktanlarla reaksiyon ve aktif karbon içeren biyorektörler de remidasyon teknikleri arasındadır [19]. Sürdürülebilir stratejiler geliştirilebilirse, nitroaromatik bileşiklerin mineralizasyonu gerçekleştirilebilir. Buna bağlı olarak maliyet de düşürebilir. Çevrede nitroaromatik bileşiklerin yarattığı seleksiyon baskısının bir sonucu olarak, bu bileşikleri degrade etme yeteneği olan bakterilerin evrimi gelişmiştir [13].

2.3. NİTROAROMATİK BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK OLARAK PARÇALANMASI

Mikroorganizmalar doğadaki karbon döngüsünün temel bileşenini oluşturmaktadırlar. Bununla beraber, substrat olarak birçok ksenobiyotik kimyasal da, kometabolik basamaklarla, kısmi degradasyonla ya da molekülü mineralize ederek degrade etmektedirler. Aromatik, kloroaromatik, alifatik ve kloroalifatik bileşikler gibi birçok bileşiğin degradasyonu mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir [20].

2.3.1. NAC'ların Biyodegradasyonunda Kullanılan Bazı Terimler

Biyolojik remediasyon, tehlikeli atıkların uzaklaştırılması için genellikle mikroorganizmaların ve bitkilerin kullanıldığı, geleneksel yöntemlere göre daha ucuz ve güvenli bir metottur [21]. Biyoremediasyon teknikleri, yakma gibi geleneksel yöntemlere göre maliyeti yaklaşık %65-85 oranında düşürmektedir. Biyoremediasyonu sınırlayan etmenler arasında, her türlü materyale uygulanamaması, uygulama alanlarının şartları sağlayamaması ya da uyarlamak için ön uygulamalar gerektirmesi ve uygulamanın çok uzun zaman alabilmesi sayılabilir [22]. Toprak biyoremediasyon proseslerinde mikroorganizmalar katalitik olarak birincil role sahiptirler. Bitkilerin bazı ksenobiyotikleri bünyesine alıp detoksifiye etme yeteneği vardır. Fitoremediasyon, rizosferik mikroorganizmalarla ortak olarak yürütüldüğünde biyoremediasyon açısından önemli bir araçtır. Birçok kimyasal grup için çeşitli biyoremediasyon şekilleri geliştirilmiştir [21].

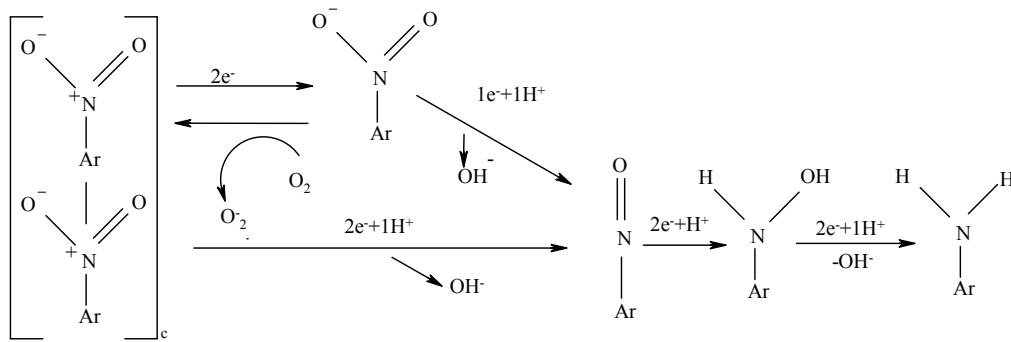
Doğal giderimin(NA) temelini, kontamine alanlarda var olan katabolik mikroflora tarafından gerçekleştirilen degradasyon oluşturmaktadır. Yapılan tek müdahale biyodegradasyon sürecinin izlenmesidir. Varolan mikroorganizmalarca degradasyonun süresi, bu yaklaşımda önemlidir. Çünkü degradasyon süresinin alandaki canlıları olumsuz etkilemeyecek şekilde olması gerekir. Biyositümülasyon ise, doğal degradatif mikrofloranın besin maddesi veya sınırlayıcı diğer faktörler açısından desteklenmesine dayanan bir biyoremediasyon tekniğidir. Bu alanlardaki fiziksel ve kimyasal kritik faktörler belirlenir ve mikroorganizmaların degradasyonu artırılır.

Kirlenmiş alanlarda varolan mikroorganizmalar kirleticileri degrade edecek yeterlilikte değilse, degradatif yeteneği bilinen bakteri suşlarının toprağa inokülasyonu ile gerçekleştirilen biyoremediasyon prosesi ise biyoaugmentasyon olarak nitelendirilmektedir. Kontamine alanda varolan bakterinin degradatif yeteneğini artırmak için de biyoaugmentasyon uygulanabilir ve biyoremediasyon prosesi bu yolla stimüle edilebilir [22].

2.3.2. 2,4-DNT'nin Biyodegradasyon Mekanizması

Birçok mikroorganizma ve yüksek ökaryotlardan hazırlanan hücre özüt preparatı ile yapılan *in vitro* deneyler göstermektedir ki, nitro grubunun redüksiyonu 2 elektron transferiyle meydana gelmektedir. Sonuç olarak nitroso, hidroksilamino ve amino türevleri oluşur (Şekil 2.2.). Bu redüksiyon oksijenden bağımsız olarak gerçekleşir ve radikal oluşmaz. Nitroredüktaz enzimleri bu reaksiyonu piridin nükleotidlerinin indirgenmesiyle oluşan elektron çiftini kullanarak gerçekleştirir. Nitroaromatik bileşikleri indirgeyen diğer enzimler; aldehit oksidaz, dihidrofilik amid dehidrojenaz, sitokrom B5 redüktaz, diaforaz, hidrogenazlar, ksantin oksidaz ve CO dehidrojenazdır.

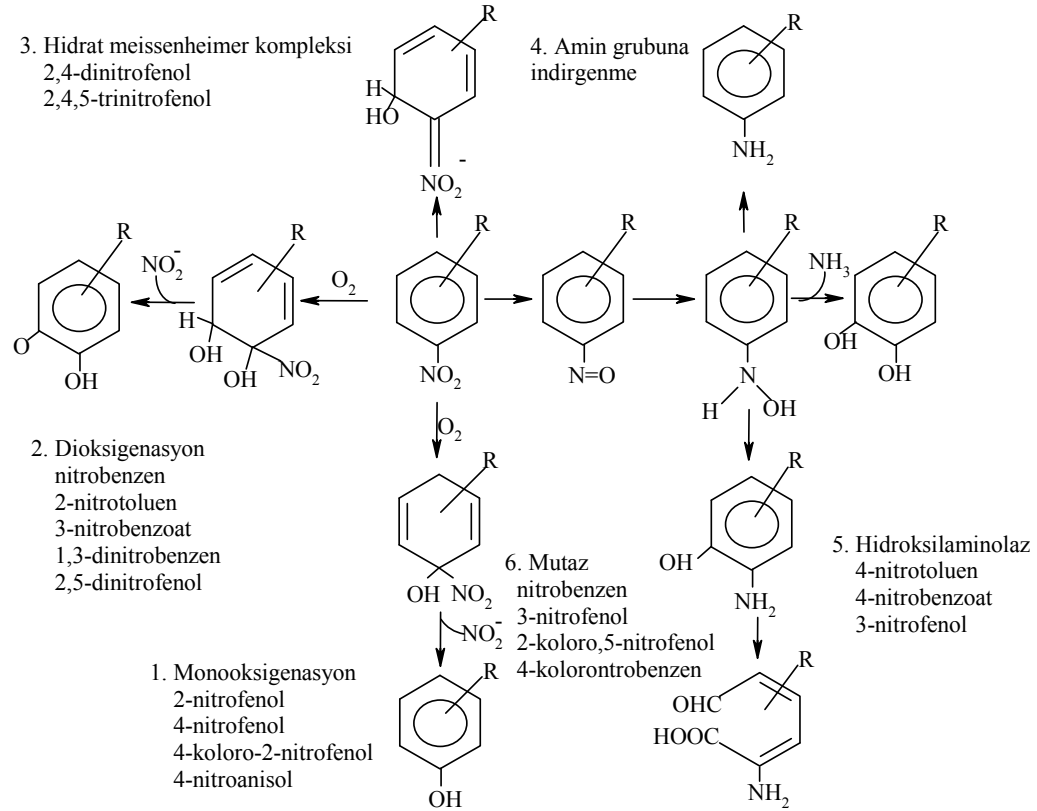
Nitro grubu tek elektron transferiyle'de indirgenebilir ve sonuçta nitro anyonik radikali oluşur (Şekil 2.2.). Bu radikalın nitro grubunun nitroso grubu haline gelirken gerçekleşen indirgenme sırasında oluşu düşünülmektedir. Bu radikal oksijenle tepkime verebilir ve süperoksit anyon oluşturabilir. Bu şekilde orijinal nitro grubunda değişiklik olur. Bu reaksiyonu katalizleyen enzimler oksijene duyarlı olduğu bilinen nitroredüktaz tip II dir ve *Clostridium* sp. ve *Escherichia coli*' de bulunur [15].



Şekil 2.2. Nitroaromatik bileşiklerde nitro gruplarının redüksiyon mekanizması. İlk basamakta (kesiksiz çizgi) nitro grubunun redüksiyonu tek elektron transferiyle, ikinci basamakta ise iki elektron transferi ile gerçekleşmektedir [9].

Bakteriler, NAC'i merkezi metabolitlere dönüştürken nitro gruplarını uzaklaştırmak için çok çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Aromatik halkanın dioksijenasyonunu takiben nitro grubu nitrit olarak ayrılır ve aromatik halka dihidroksi ara ürününe dönüşür ya da mono oksijenazla epoksid oluşur. Bunların dışında hibrid-meisenheimer kompleksinde oluşturulabilir. Hidroksilaminobenzenin kısmi olarak indirgenmesiyle metabolik yoldan amonyum çıkar. Hidroksilaminobenzenler mutaza bağlı yeni düzenlemeler geçirerek bazı yapılar da orto-aminofenol oluşturabilir. Alternatif olarak, hidroksilamin bileşikleri amonyumun eliminasyonu kateşole dönüştürülebilir [3].

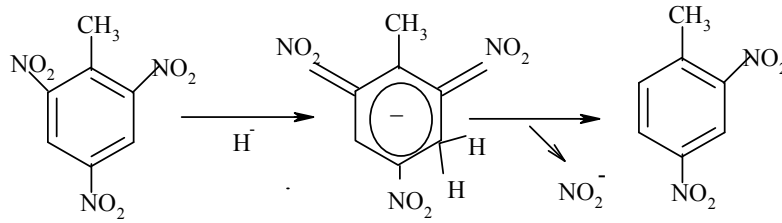
Mononitrofenol bileşiklerin (2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 4-kloro-2-nitrofenol) tüm nitro grupları hidroksillenmiştir ve nitrit koparıldığında orto ya da para hidroksibenzen oluşur. Paration ve metilparation gibi bazı bileşikler ilk olarak 4-nitrofenole hidrolize olurlar [13].



Şekil 2.3. Nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyon mekanizması. 5. Metabolik yol sadece anaerobik sistemler için tanımlanmıştır [13].

2.3.2.1. Meisenheimer kompleksi

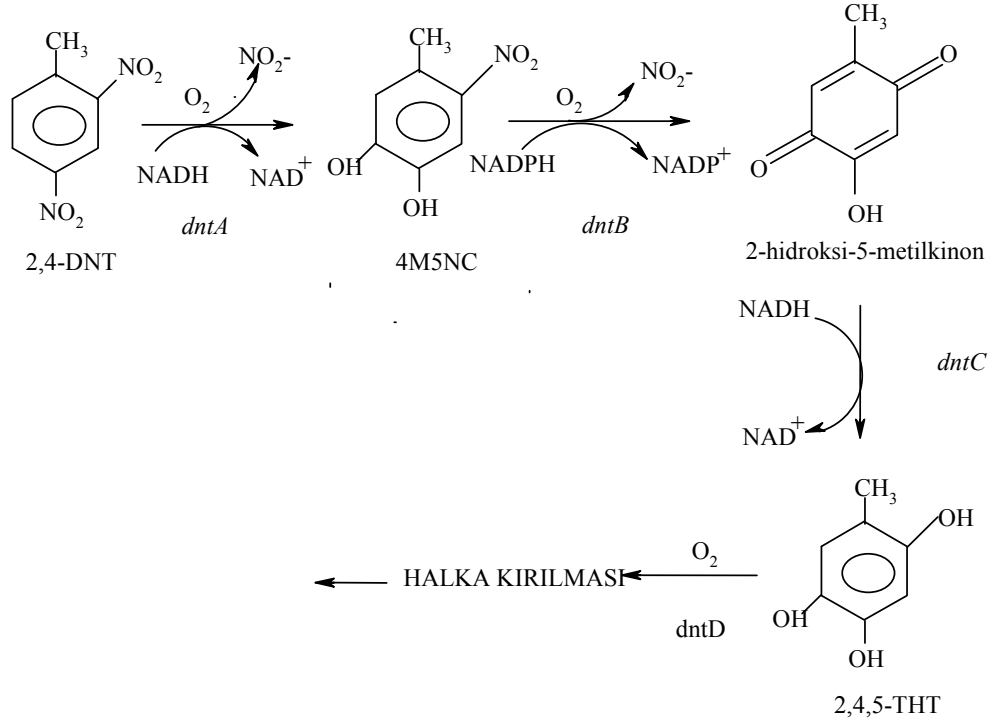
Aromatik çekirdeğin elektron eksikliğinden dolayı, aromatik halkaya nükleofilik saldırılar mümkün hale gelir ve bunun sonucu olarak da aromatik olmayan bir yapı olan Meisenheimer kompleksi şekillenebilir [23]. Bu bileşikler kırmızı-turuncudur ve negatif yüke sahiplerdir. Bu gibi kompleks bileşikler *in vivo* ortamda piridin nükleotidinin indirgenmesiyle oluşan hidrid saldırılarıyla şekillenebilmektedir. Meisenheimer kompleksi, nitritin ayrılmasıyla tekrar aromatik hale gelebilir. Bu tarz reaksiyonlar için oksijen (O₂) gerekli değildir [15].



Şekil 2.4. TNT-Meisenheimer kompleks formasyonu. Hidrojen iyonu NAD(P)H tarafından yakalanarak bu formasyon oluşabilmektedir [23].

2.3.3. DNT Biyodegradasyonunda Rol Alan Enzimler

Nitroaromatik bileşikler, özellikle nitrotoluenler, cephane, boya ve poliüretan köpük yapımı gibi birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [15]. Genel olarak bakteriler 2,4-DNT'yi iki oksijenaz reaksiyonu içeren ve nitro gruplarının uzaklaştırılmasıyla sonuçlanan metabolik yolla degrade ederler [24]. Spain vd. tarafından 2,4-DNT degradasyon yolağındaki enzimleri kodlayan genler; DNT diokgenaz (*dntA*), 4-metil-5-nitrokateşol monooksijenaz (*dntB*), trihidrotoluen oksijenaz (*dntC*) ve trihidroksitoluen oksijenaz (*dntD*) olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.5) [24].

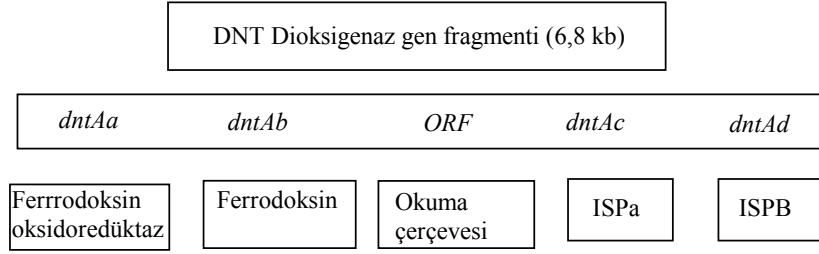


Şekil 2.5. *Burkholderia* sp. tarafından dinitrotoluenin biyodegradasyon metabolik yolu [25,26,27].

Spain vd., *Burkholderia cepacia* R34 suşunda DNT degradasyon yolunda görevli enzimleri kodlayan genleri, suşa ait olan 216 kb'lık plazmidin 50 kb'lık bölgesinde teşhis etmişlerdir.

2.3.3.1. DNT dioksijenaz

DNT degradasyon yolağının ilk enzimini kodlayan *dntA* geninin alt klonlama çalışmaları yapılmış ve multikompotent enzim olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2.6. Dioksimenaz gen ailesi

2.3.3.2. 4-metil-5-nitro kateşol (4M5NC) monooksijenaz enzimi

2,4-DNT'nin metabolik yolundaki ikinci basamak oksijenolitik denitrasyon reaksiyonu içerir ve metilnitrokateşol 2-hidroksi-5-metilkinon'a dönüşür. *dnt* genlerine ait haritalama sonuçları, MNC monooksijenaz enzimini kodlayan genin (*dntB*) *dntA* gen ailesinin altında, 1683 bp'lik bölgesinde yerleştiğini göstermektedir [24].

2.3.3.3. Trihidroksitoluen (THT) oksijenaz

2,4,5-THT oksijenaz meta-halka füzyon enzim ailesiyle benzer dizileri içermektedirler. 2,4-DNT metabolik yolunda halka kıran enzim olarak görev yapmaktadır [24].

2.3.4. Biyodegradasyona Etki Eden Faktörler

2.3.4.1. Sıcaklık

Biyodegradasyonda sıcaklık, maddenin kimyasal kompozisyonunda ve fiziksel doğasında, mikroorganizmaların metabolizmasında ya da mikrobiyal topluluğun kompozisyonunda etki gösterebilir [28].

Park vd., *Pseudomonas sp.* suşu tarafından TNT'nin degradasyonunun optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, sıcaklığın 30 °C'ye kadar artmasının biyokütle ve degradasyon hızını önemli ölçüde artırdığını, fakat sıcaklığın

30 °C'den fazla olması durumunda ise biyokütle ve degradasyon hızında ani düşüşe neden olduğunu gözlemlemişlerdir [29].

2.3.4.2. Oksijen

Bakteriler ve funguslar tarafından yapılan alifatik, aromatik ve siklik hidrokarbonların katabolizmasında oksijenaz enzimlerinin substratı okside etmeleri için oksijen gereklidir. Toprakta oksijen miktarı, mikrobiyal oksijen tüketimine, toprak tipine, suyla olan doygunluğuna ve oksijenin tükenmesine neden olabilecek substratların varlığına bağlıdır [30].

Hughes vd., *Clostridium acetobutylicum* tarafından 2,4-DNT ve 2,6-DNT'nin anaerobik şartlardaki degradasyonunda, 2 izomerin de hidroksilaminonitrotoluenlere dönüştüğünü gözlemlemişlerdir [31].

Boopaty vd., patlayıcı maddelerin anaerobik degradasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, TNT'nin indirgenebilmesi için özgül elektron alıcılarına gereksinim olduğunu göstermişlerdir [32].

2.3.4.3. Nutrient varlığı

Atlas tarafından, düşük derişimde inorganik nutrient içeren sulu çevrelerde hidrokarbonların yayılmasının, aşırı yüksek karbon/azot ya da karbon/fosfor ya da her ikisinin birden artışına neden olduğu ve bu durumun mikroorganizmaların gelişimi için elverişsiz olduğu belirtilmiştir [28].

Gupta vd., 2,4-DNT'nin biyodegradasyonunda besiyerine ek nutrient kaynağı olarak kümes saman suyu eklemiş ve sonuç olarak degradasyon hızının arttığını saptamışlardır [31]. Yapılan benzer bir çalışmada kümes samanının 2,4-DNT ve 2,6-

DNT'nin degradasyon hızını artırdığı ve degradasyon süresince diğer ara ürünlerin oluşmadığı saptanmıştır [33]. Zheng vd., *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99 suşunun akrilonitril degradasyonunda besiyerinde Hg^{+2} , Ag^{+2} , Cu^{+2} metal iyonlarının varlığının enzim aktivitesini inhibe ettiğini belirlemiştir [34].

Park vd., 2,4,6-TNT'nin *Pseudomonas putida* tarafından degradasyonun optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, ortamda ek karbon kaynağı olarak mısır maserasyon sıvısının ve şeker kamışı melasının degradasyon hızını artırdığını belirtmişlerdir [29]. Yapılan birçok çalışmada besiyerine maya özütü ilavesi ile destek besin sağlandığı belirtilmiştir [26,35,36].

2.3.4.4. Tuzluluk

Shiaris'in koy sedimentinde yaptığı çalışmasında, tuzluluğun PAH degradasyonuna olan etkisinin alan ve substrata göre değiştiğini tespit etmiştir. Fenantren ve naftalinin mineralizasyonu ile tuzluluk arasında pozitif korelasyon saptanırken; Benzo[a]pyrene degradasyonu ile negatif korelasyon olduğu saptanmıştır. Tuzluluğun substratın çözünürlüğüne etki ettiği belirtilmiştir [37].

2.3.4.5. Basınç

Basıncın hidrokarbon biyodegradasyonuna etkisi en fazla derin deniz ortamında önemlidir. Schwarz vd., yaptıkları çalışmada tetradekan, hegzadekan ve karışık hidrokarbon substratlarının derin deniz sedimentindeki karışık mikroorganizma topluluğundaki degradasyonunu incelemiştir. +4 C°de, yüksek basınç altında hegzadekanın %94'ü 40 hafta sonra gerçekleşirken, 1 atm basınçta 8 haftada gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak derin deniz ortamındaki mikrobiyal popülasyonlar tarafından petrolün degradasyonu çok yavaş olmakta ve bu hidrokarbonlar yıllar süresince birikim yapmaktadırlar [28].

2.3.4.6. Su aktivitesi

Topraktaki su aktivitesi ya da su potansiyeli 0,0 ile 0,99 oranları arasında değişebilmektedir. Buna karşın sulu ortamlarda su aktivitesi yaklaşık 0,98 değerinde ve karardır. Hidrokarbon degradasyonunun karasal ekosistemde sınırlı olmasının nedeni mikroorganizmaların gelişme ve metabolizmaları için kullanılabilir su miktarının bu seviyelerde olması olabilir [28].

2.3.4.7. pH

Çoğu sulu çevreye zıt olarak, toprağın pH değeri oldukça çeşitlilik göstermektedir (pH 2.5-11). Heteretrofik bakterilerin çoğu ve funguslar nötre yakın pH'ı tercih ederler. Bununla beraber fungusların asidik ortama toleransı fazladır. Ekstrem pH'ların mikroorganizmaların hidrokarbon biyodegradasyonuna olumsuz etkisi olduğu saptanmıştır [30].

2.3.4.8. Ortamdaki bitki varlığının etkisi

Steven D. Silicano vd., yaptıkları bir çalışmada; poliaromatik bileşiklerle kirlenmiş alanın biyodegradasyonu sırasında toprağa uygun bitkilerin ekiminin degradasyon aktivitesinin 2 katına çıkardığını tespit etmişlerdir [38]. Biyodegradasyonun fitoremediasyon uygulamasıyla desteklediğinde alanın temizlenme süresinin yarıya düştüğü görülmüştür. Bu etkinin bitkiden salınan kök salgılarının mikroorganizmaların kompozisyonunda değişiklik yapmasıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir [38].

Nepovim vd., *Phragmites australis*, *Juncus glaucus*, *Carex gracillis* ve *Typha latifolia* bitkilerinin in vitro koşulda 2,4,6-TNT degradasyonunu gözlemlemişler ve

10 gün içinde yaklaşık %90 oranında degradasyon saptamışlardır. Burada bitkiler ve mikroorganizmaların sinerjistik etkisinin varlığı belirtilmiştir [39].

2.4. DNT DEGRADE EDEBİLEN BAKTERİ VE FUNGUSLAR

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, deniz ve toprak örneklerinde nitroaromatik bileşikleri degrade eden önemli aerobik bakteriler *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* olarak tanımlanmıştır.

Bakterilerin dışında funguslarla yapılan çalışmalarda da birçok fungusun nitroaromatik bileşikleri degrade edebildiği tespit edilmiştir. Jackson vd., ligninsiz koşullarda *Phanerochaete chrysosporium* fungusunun 2,4-DNT ve 2,4,6-TNT'yi degrade ettiğini gözlemlemiştir [40]. Parrish, TNT ve 2,4-DNT'nin fungal degradasyonunu çalışmış ve 190 fungustan 98'inin TNT'yi parçaladığını; buna karşın 5 tanesinin de 2,4-DNT'yi parçalayabildiğini tespit etmiştir [41].

Shin vd., anaerobik bakterilerden *Lactococcus lactis* ile yaptıkları çalışmada DNT izomerlerinin anaerobik biyotransformasyonunu gerçekleştirdiğini teşhis etmişlerdir [42]. Patlayıcı maddelerin sülfat redükleyici metanojenik bakteriler tarafından anaerobik biyodegradasyonu ise Boopathy vd. tarafından çalışılmıştır [32].

2.5. *ARTHROBACTER* GENUSUNUN ÖZELLİKLERİ

Durgun faz kültürleri (2-7 gün) genellikle 0,6-1,0 µm çapında kokoid hücrelerden oluşur. Kokoid hücreler taze besiyerine ekildiğinde oldukça fazla ürerler ve böylece düzensiz çubuk karakteristiği gösteren ekponansiyel faz kültürleri elde

edilir. Bazı hücreler V şeklinde kıvrımlar gösterirken bazıları daha kompleks köşeli formlar oluşturabilmektedir.

Hücrelerin boyutları çeşitlilik göstermekle beraber, genelde 0,6-1,2 µm çapındadır. Durgun fazda gelişme sürecinde çubuklar zamanla kokoid karakter göstermeye başlamaktadır. Çubuk ve kokoid formların ikisi de Gram pozitifdir ve dekolorize olabilirler. Endospor oluşturmazlar. Hücre duvarında peptidoglikan yapısı diaminoasit olarak lizin içermektedir. Zorunlu aerobiktirler. Yaşamlarını sürdürdükleri optimum sıcaklık 25-30 °C'dir. Maya özütü ve pepton besiyerinde ve nötral pH'da başarılı bir şekilde ürerler [43]

Arthrobacter genusu korniform bakterilerden oluşmaktadır. Bunlar morfolojik olarak Gram özellikleri bakımından çok çeşitli bulunabilmektedirler. Belirgin biçimde iki basamaktan oluşan kompleks bir yaşam döngüsüne sahiptirler. Kültür çok gençken; hücreler cansız, Gram negatif çubuk şeklindedir. 1-2 gün sonrasında çubuk şeklinde gözlemlenebilirler. 30 saat sonrasında ise hücreler küçülür, Gram pozitif kok, çubuk şekline dönüşürler. *Arthrobacter*'ler spor oluşturmazlar ve Gram pozitif bakterilerin oluşturduğu *Actinobacteria* kolunun üyeleridirler. Birçok *Arthrobacter* ihmal edilecek düzeyde sınırlı bir hareketlilik gösterirler [44].

Solunum metabolizmasına sahiptirler, asla fermentasyon yapmazlar. Pepton medyumda glukoz ya da diğer şekerlerden asit ya hiç üretmezler ya da çok az üretirler. Selülozu hidroliz edemezler. Katalaz pozitifdirler, DNaz üretirler, Jelatini hidrolize ederler. Türlerinin çoğu tek organik büyüme faktörü olarak biyotine ihtiyaç duymaktadır [44].

Arthrobacter'ler kanlı agarda ufak koloniler oluştururlar. Renkleri sarı-beyaz arasında çeşitlilik göstermektedir ve koloni çapları 2 mm civarındadır. Toprakta yaygın bir şekilde bulunmaktadırlar ve çok çeşitli maddeyi metabolize

edebilmelerinin yanında çok tehlikeli toksik materyalleri de degrade edebilmektedirler [43].

2.5.1. *Arthrobacter* genusunun degrade ettiği bileşikler

Arthrobacter genusu üyeleri toprakta yaygın olarak bulunurlar ve çok çeşitli aromatik ve alifatik bileşikleri degrade etme yeteneğine sahiptirler [45,46,47]. Fenilüre, fenil karbamat gibi herbisit ve pestisitlerin degradasyonunda önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [48,49,50,51]. Jain vd., *Arthrobacter* sp. suşunun *p*-nitrofenol bileşiğini 1,2,4-benzenetriol yoluyla degradasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, nitro grubunun monooksijenaz yoluyla ayrıldığı tespit etmişlerdir [36]. Yapılan çalışmalarda *Arthrobacter* suşlarının endüstriyel atıksulardaki yüksek nitrat derişimine toleranslı oldukları, 1 M nitrat içeren ortamda yaşayabildikleri ve nitratı azot kaynağı olarak kullandıkları belirtilmiştir [52,53]. Ayrıca *Arthrobacter* suşlarının ağır metallerden nikelin yüksek konsantrasyonuna toleranslı olduğu Margesin vd. tarafından bildirilmiştir [54]. *Arthrobacter* suşlarının kağıt hamuru ve kağıt üretimine ait aktif çamurdan izolasyonu Blondeau vd. tarafından belirtilmiştir. Aktif çamurda selülitik, amilolitik ya da proteolitik bir aktivisinin olmadığı, sadece flok oluşumunda önemli olduğu vurgulanmıştır [55]. Aktif çamur prosesinde *Arthrobacter*'lerin karbonhidratı parçalayıcı özelliği ise Horan vd. tarafından belirtilmiştir [56]. Tope vd., TNT' nin *Arthrobacter* sp. suşunun tuutklanmış ve durgun faz kültürü ile transformasyonunu çalışmış ve suşun TNT'yi aerobik koşullarda di ve mononitrotoluenlere dönüştürdüğünü bulmuşlardır. İmmobilize edilmiş hücrelerin durgun faz hücrelerine göre daha başarılı oldukları tespit edilmiştir [57]. Westerberg vd. yaptıkları çalışmada, *Arthrobacter chlorophenilus* suşunun yüksek derişimde 4, klorofenölü degrade ettiğini tespit etmişlerdir. [58]

Arthrobacter genusunun bazı üyelerinin tarımsal pestisitleri *Streptomyces* türleriyle sinerjistik olarak etkileşerek degrade ettiği tespit edilmiştir. Birlikte

bulduklarında organofosfat diazinonu tamamıyla degrade ettikleri, yalnız bulduklarında ise iki genustan hiçbirinin bu bileşiğin varlığında gelişemediği tespit edilmiştir [43]

2.6. BİYODEGRADASYONDA KULLANILAN MOLEKÜLER TEKNİKLER

Biyosferdeki mikroorganizmaların çoğu, ksenobiyotikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Ksenobiyotiklerin degradasyonu için oldukça benzer ve metabolik yollar ve enzim sistemleri, ayrı coğrafik alanlardan izole edilen akraba olmayan bakterilerce paylaşılmaktadır. Genellikle aynı evrimsel orjinden köken almış çeşitli plazmid ve bakterilerdeki katabolik genler benzerdir. Birçok katabolik gen grupları, bakterilerin yeni katabolik aktiviteye adaptasyonunu sağlayan delesyon, duplikasyon, insersiyon gibi yeni düzenlemelere maruz kalmıştır [59]

Mikrobiyal biyokatalitik reaksiyonların veritabanının büyük bir kısmı tamamlanmış olup, yaklaşık 140 metabolik yol, 930 reaksiyon, 880 bileşik ve araürün, 590 enzim, 340 mikroorganizma, 250 biyotransformasyon ve 50 organik fonksiyonel grup içermektedir. Bu verilerin çoğu saf kültür çalışmalarıyla oluşturulmuştur. Günümüzde geliştirilen molekül teknikler, araştırmacının direk kontamine alanda çalışabilmesini sağlamıştır [9].

Ksenobiyotiklerin degradasyonunda rol alan katabolik genlerin incelenmesinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Ters Transkriptaz-PCR (RT-PCR), Denatüre Gradient Jel Elektrofrezisi (DGGE), Mikroarray, Floresan Yerde Hibritleme (FISH) gibi diziye bağımlı yöntemlerle beraber, Diferansiyel Görüntüleme (DD) Stabil İzotop Proplama (SIP) gibi diziden bağımsız çalışılan metotlar da uygulanabilmektedir (Çizelge 2.1.) [9,60].

Çizelge 2.1. Ksenobiyotikleri degrade eden katabolik genlerin tanımlanması ve çeşitliliğinin teşhisi için kullanılan moleküler yaklaşımlar.

<u>Hedef gen</u>	<u>Moleküler yaklaşım</u>	<u>Kaynak</u>	<u>Referans</u>
<i>nahAc</i>	Dejenere primer ile RT-PCR	Yeraltı suyu (kültürden bağımsız)	Wilson vd. 1999
<i>phnAc</i> , <i>nahAc</i> ve <i>glutasyon-S transferaz</i>	Birçok primer ile PCR	Toprak örnekleri (kültürden bağımsız)	Lloyd-Jones vd. 1999
Fenol hidroksilaz (<i>LmPH</i>)	Dejenere primerler ile PCR-DGGE	Aktif çamur (kültürden bağımsız)	Watanabe vd. 1998
<i>RHD</i>	Dejenere primerlerle PCR	Prestine ve aromatik hidrakabon ile kontamine olmuş toprak(kültürden bağımsız)	Yeates vd. 1998
<i>PAH dioksigenaz</i>	Birçok primer ile PCR	PAH toprak bakterileri (kültüre bağımlı)	Lloyd-Jones vd. 1999
<i>nahAc</i>	Dejenere primerlerle PCR	Deniz sediment bakterileri (kültüre bağımlı)	Allison vd. 1998
<i>nahAc</i>	Dejenere primerlerle PCR	Deniz sediment bakterileri (kültüre bağımlı)	Hedlund vd. 1999
<i>Nah</i>	Dejenere primerlerle PCR	Toprak baterileri (kültüre bağımlı)	Hamann vd. 1999

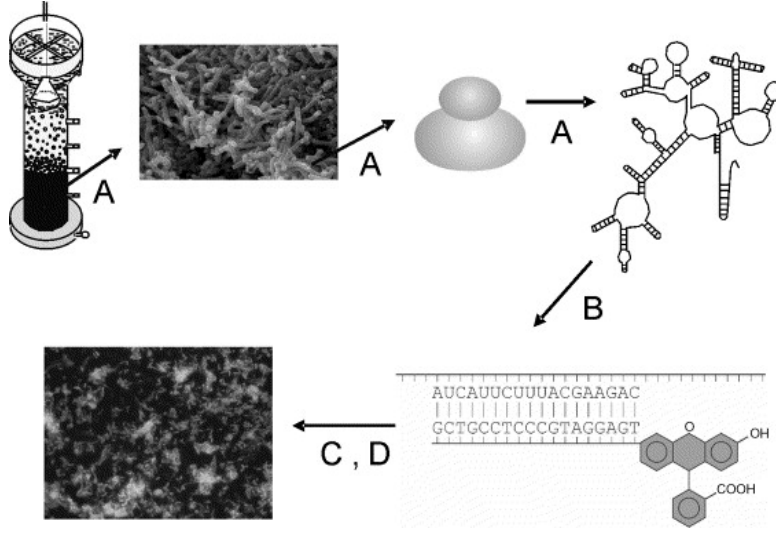
Çizelge 2.1. (devamı)

<i>tfdC</i>	Dejenere primerlerle PCR	Toprak bakterileri (kültüre bağımlı)	Cavalca vd. 1999
<i>PAH dioksijenaz</i> ve <i>catekol dioksijenaz</i>	Dejenere primerlerle PCR	Atık su ve yoprak bakterileri (kültüre bağımlı)	Meyer vd. 1999
<i>phnAc</i> , <i>nahAc</i> ve <i>PAH dioksijenaz</i>	Birçok primer ile PCR	Nehir suyu, sediment ve toprak bakterileri (kültüre bağımlı)	Widada vd. 2002
RHD	Dejenere primer ile PCR-DGGE	<i>Rhodococcus</i> sp. Strain RHA1 (Kültüre bağımlı)	Kitagawa et al. 2001

16S rRNA kodlayan genin sekanslanması ve klonlanmasına dayanan moleküler yaklaşımlar mikrobiyal ekolojide oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metod, nükleik asit ekstraksiyonu, 16S rRNA geninin sekanslanması, tanımlanması ve filogeni programlarında kıyaslanarak belirlenmesini kapsamaktadır [60].

Floresan Yerde Hibritleme (FISH), floresan işaretli RNA propları fikse edilmiş hücrelerle hibridize edilip, sentezlenen transkriptlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bununla beraber floresan işaretli 16S rRNA propları kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalarla mikroorganizma tanımlanması yapılmaktadır [9].

DNA hibridizasyon tekniğinde, çevresel örneklerdeki özgül mikroorganizma kimliklerinin belirlenmesi için, önceden kullanılmış özgül bir prop olan etiketlenmiş DNA kullanılır (Şekil 2.7). Bu tekniklerin bazı sınırlamaları olmasına rağmen, hala doğadaki özgül bir genomun gözlenmesinde yararlıdır. Koloni hibridizasyonu sadece kültüre edilebilir hücrelerin tespiti için kullanılabilir.



Şekil 2.7. *In situ* hibridizasyon prosesi. Formaldehit ile fiksasyon yapılarak hücre içeriğinin elde edilmesi (A). Spesifik prop ile hibridizasyon (B). Marker ile işaretleme (C). Florasan mikroskopuyla gözlemlenmesi (D) [50].

Ksenobiyotik degrade edicilerin gözlenmesi için direk hibridizasyon tekniğiyle yapılan ilk çalışma, toprak mikroorganizmalarından TOL (toluen degradasyonu için) ve NAH (naftalin degradasyonu için) plazmidleriyle yapılmıştır. Proplar olarak kullanılan plazmidlerle kolonilerin hibridizasyonu yapılmış ve bu katabolik plazmid genlerini içeren hücrelerin miktarı belirlenmiştir. Plazmid yoğunluğu ile mineralizasyon arasında pozitif korelasyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Aromatik substratlara maruz kalmanın plazmid seviyesinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir [61]. Benzer teknikler krezot degradasyonu yapan mikroorganizmaların içerdiği *xylE* ve *ndoB* genlerinin incelenmesinde de kullanılmıştır [62].

Biyodegradasyon genlerine ait mRNA için tasarlanmış prop ile mikroorganizmaların degradatif yeteneklerinin direk olarak gözlenmesi de FISH tekniğiyle mümkündür. Pernthaler vd., mRNA FISH tekniğinde, mRNA'nın bütünlüğünün, hücre fiksasyon ve geçirgenliği, prop tipi ve miktarının, hibrit formasyonunun stabilitesinin önemli parametrelerin olduğunu belirtmişlerdir [63].

2.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmanın üç temel amacı vardır. Bunlardan ilki ham petrole kirlenmiş topraklardan 2,4-DNT'yi degrade edebilen bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu; ikincisi, Bakterilerin degradasyon sırasında gereksinim duydukları optimum koşulların belirlenmesi; Üçüncüsü ise, degradasyonda rol alan dinitrotoluen oksijenaz ve trihidroksitoluen monooksijenaz enzimlerini kodlayan dntAa ve dntD genlerinin varlığının FISH tekniğı ile belirlenmesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma, Merck, Fluka, Fermentas ve Takara firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Bakteri Suşları

Bu çalışmada kullanılan bakteri suşları petrol rafinerisi'nden alınan ham petrol ile kontamine olmuş toprak örneğinden izole edilmiştir.

3.1.3. Cam Malzemeler

Besiyeri içeren erlenlerin sterilizasyonu 121 °C'de 1,3 atm basınçta, 15 dakika bekletilerek yapılmıştır. Petri kapları Pasteur fırınında 200 °C'de, 2 saat süre bekletilerek steril edilmiştir.

3.1.4. İnkübatörler

Bakteri suşlarının kültürü hazırlanırken, katı kültür ortamlarının inkübasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) inkübatör ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının izolasyonu ve 2,4-DNT degradasyonu için kullanılan sıvı kültür ortamlarının inkübasyonu ise Edmund Bühler TH 15 orbital çalkalamalı inkübatör ile yapılmıştır.

3.1.5. Santrifüj

İzole edilen bakteri suşunun genomik DNA ve plazmid DNA izolasyonunda ve degradasyon testlerinde Nutrient Broth, Luria-Bertani veya C besiyerinde üretilmiş suşların çöktürülmesi aşamasında Sigma 1-14 typ model santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre

İzole edilen suşların degradasyon testleri sırasında, kültürlerin biyokütle artışlarını belirlemek amacıyla Perkin Elmer marka Lambda EZ 210 serisi UV/Visible spektrofotometre (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, A.B.D.) kullanılmıştır.

3.1.7. UV/White Transilüminatör

Agaroz jel elektroforezi sonuçları UVP White/ Ultraviolet Transilüminatör (UVP CA 91786, U.S.A) cihazı ile görüntülenmiştir.

3.1.8. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bakteri suşunun degradasyon yeteneğini ölçmek için 10 günlük inkübasyon süresince yapılan ölçümler için HPLC Perkin Elmer Series 200 Cihazı kullanılmıştır. Kolon olarak ODS-2-C-18 kolon, dedektör olarak da UV dedektör kullanılmıştır.

3.1.9. Epiflorasan Mikroskop

Floresan Yerde Hibritleme (FISH) metodu ile bakteri suşundaki degradatif genlerin varlığı gözlenmiştir. WU, WG ve WB filtre küplerini içeren Olympus BX51 model floresan mikroskop kullanılarak gözlenmiştir. Çekilen fotoğraflar Olympus DP-BSW analiz program ile görüntülenmiştir.

3.1.10. Besiyerleri

3.1.10.1. MM9 (Modifiye Mineral) besiyeri

İzolasyon ve degradasyon deneylerinde kullanılmıştır [64].

NaH ₂ PO ₄ (7H ₂ O)	60 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NH ₄ Cl	10 g
NaCl	5 g

MgSO ₄	0,52 g
2,4-DNT	0,1 g
*Agar	15 g
Distile su	1 L
Mineral Tuz Çözeltisi	2,5 mL

*Sadece katı ortam hazırlanırken ilave edilmiştir.

3.1.10.2. Mineral tuz çözeltisi

ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂	30 mg
CoCl ₂	200 mg
NiCl ₂	20 mg
Na-molibdat	10 mg
CuCl ₂	10 mg
Distile su	1 L

3.1.10.3. GSP Agar

Bakteri izolasyonunda kullanılmıştır [65].

Na-L-Glutamat	10 g
Çözünür nişasta	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,5 g
Fenol kırmızısı	0,36 g
Agar	13 g
Distile su	1 L

3.1.10.4. Luria- Bertani (LB) Bulyon

Tripton	10 g
Maya özütü	5 g
NaCl	5 g
Distile su	1 L

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bakteri Suşlarının Kültürü ve Muhafazası

Bakteri suşları, 100 0,1 g/L 2,4-DNT içeren MM9 minimal agarlı katı besi yerlerine ekilerek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Bakteri İzolasyonu

Petrol rafinerisinden alınan ham petrolle kirlenmiş toprak örneklerinden bakteri izolasyonu yapmak için zenginleştirilmiş kültür yöntemi kullanılmıştır. Bunun için;

1. 1 g toprak örneği alınarak 10 mL steril distile su içinde süspanse edilmiş, hazırlanan bu süspanسیون 2000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek toprak partikülleri çöktürülmüştür.

2. 2,4-DNT'yi degrade eden bakterilerin izolasyonu için, üst kısımda kalan sıvıdan 500 µL örnek alınarak 100 mL'lik 100 g/L 2,4-DNT içeren Modifiye M9 (MM9)besiyerine inoküle edilmiştir [26].

3. Kültürler 30 °C'de 150 devir/dakika çalkalanmak suretiyle, 10 gün inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında kültürlerden 1 mL alınarak tekrar MM9 besiyerine inoküle edilmiştir. Bu pasajlama işlemleri 3 kez tekrar edilmiştir.

4. MM9 kültürlerinden seri dilüsyon yöntemiyle GSP agara ve Nutrient agara yayma ekim yapılmıştır. Burada üreyen koloniler 100 g/L 2,4- DNT içeren MM9 Agar eğik katı besi yerine ekilerek buzdolabında saklanmıştır.

5. Nutrient Agarda çizgi ekimi yapılan 15 suş, 100 mL'lik 100 g/L 2,4-DNT içeren sıvıbesiyerine ekilmiştir ve 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. Kültürler arasında en çok üreme görülen suşlar seçilmiştir.

3.2.3. 2,4-DNT'nin Biyodegradasyonu

1. Seçilen suşlar 100 mL'lik MM9 sıvı besiyerine alınmış ve 30 °C'de 150 devir/dakika'da, her gün 2 mL örnek alınmak üzere, 10 gün süreyle inkübe edilmiştir.
2. Alınan örneklerden 1 mL'si, bakteri yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans(A_{600}) değerleri tespit edilmiştir.
3. Diğer 1 mL'lik örnek, eppendorf tüplerine alınmış ve HPLC analizi için buzlukta saklanmıştır.
4. Veriler grafik haline getirilmiş ve aralarında üremenin en iyi gözlemlendiği bakteri suşu tespit edilmiştir.

3.2.4. Bakterilerin Optimum Üreme ve Degradasyon pH'sının Belirlenmesi

Seçilen bakteri suşunun pH 4-9 aralığındaki üreme ve degradasyon yeteneği test edilmiştir. 10 Günlük inkübasyon süresince hergün 2 mL örnek alınmış ve 1 mL'si spektrofotometrede bakteri yoğunluğunu ölçmek için, 1 mL'si de HPLC analizi için kullanılmıştır.

3.2.5. Bakterilerin Optimum Üreme ve Degradasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Seçilen bakteri suşunun 25-45 °C aralığındaki üreme potansiyeli ve degradasyon yeteneği analiz edilmiştir. Bunun için 100 mL MM9 besiyerine ekilen bakteri suşunun 5 günlük inkübasyonu yapılmış ve 5. günün sonunda, 2 mL örnek toplanmıştır. 1 mL'si spektrofotometrede A_{600} değerleri için kullanılmıştır. Kalan 1 mL'si ise HPLC analizi için saklanmıştır.

3.2.6. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Seçilen bakteri suşunun 2,4-DNT'yi parçalama düzeylerini belirlemek amacıyla, 10 günlük inkübasyon süresince günlük alınan örnek çözeltilerin kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde ODS C-18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak metanol:su (50:50)

kullanılmıştır. Analizde UV dedektörde okunacak dalga boyu 254 nm, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL olarak seçilmiştir [3]. Standart grafiğinin elde edilmesi için 0,1, 0,08, 0,06, 0,04 ve 0,02 g/L DNT içeren standart çözeltiler hazırlanıp HPLC de analiz edilmiştir. HPLC'de analiz edilen standart çözeltilerin derişimlerine karşı, pik alanlarının grafiği elde edilmiş, buradan bulunan doğru denklemde örneğin pik alanı yerine konulmuş ve derişimi bulunmuştur.

HPLC de analiz edilmeden önce; kültür ortamından alınan örnekten 700 µL alınıp, 700 µL asetonitril ile karıştırılmıştır. Karışım önce vortekslenip, sonra 3000 devir/dk'da 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatlice alınıp 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

3.2.7. Substrat Tüketim Kinetiğinin Hesaplanması

Substrat tüketim kinetiğinde Monod denklemi kullanılmıştır [66]. Substrata bağlı mikrobiyal çoğalma tespit edilmiş ve buna göre substrat tüketim hızları bulunmuştur. Birinci dereceden redüksiyon modeline göre hesap yapılmıştır.

$$\ln \frac{S_0}{S} = k t$$

S : substrat miktarı

S₀: ilk andaki subs. miktarı

k : özgül substrat kullanım hızı

t : zaman⁽⁻¹⁾

3.2.8. Plazmid Eliminasyonu

2,4-DNT degradasyon yeteneğinin serbest plazmid DNA'lardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla test edilen bakteri suşunda plazmid eliminasyon testi yapılmıştır. Plazmid eliminasyon testinde ise aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

1. Bakteriler, içerisinde 500 µg/mL ethidium bromid bulunan Nutrient Broth besiyerine ekilerek 24 saat, 30 °C'de inkübe edilmiştir.

2. İnkübasyon sonunda, 100 g/L DNT içeren MM9 agar besiyerine ve kontrol olarak da Nutrient Agar besiyerine ekilmiştir.

3. Yapılan paralel ekimlerde, her iki besiyerinde üreyen koloni sayıları karşılaştırılarak eliminasyon düzeyi saptanmıştır.

3.2.9. Bakteri Suşunun İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizi

Test edilen bakteri suşunun 16S rRNA sekansının DGGE analizi yapılmış ve çıkan sonuç FinchTV programında işlenip BLAST analizi yapılarak teşhis edilmiştir.

1. Nutrient broth'da üretilen bakteri suşunun genomik DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kiti ile yapılmıştır.

2. İzole edilen DNA Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır.

Tüp başına toplam konstrasyon değerleri

0,2 X Taq buffer (Applied Biosystems)

1,5 mM MgCl

0,25 mM dNTP (Fermantas)

0,03 U AmpliTaq Polimeraz (Applied Biosystems)

0,4 pmol her bir primer (16S genini tümünü çoğaltan)

300 ng Bakteriyal Genomik DNA

3. PCR ürünlerini özütlemek için Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II kiti kullanılmıştır.

4. PCR ürünü DNA'nın dizi analizi, Bigdye Cycle Sequencing kit v.3.1 ile yapılmıştır. DNA dizi analizi için ABI 3130XL Genetic Analyzer cihazı kullanılmıştır.

5. NaOAC-EtOH saflaştırma yöntemi ile DNA dizi analizi saflaştırması yapılmıştır.

6. Dizi analizinden çıkan sonuçlar NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilmiş ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır.

3.2.10. Genomik DNA İzolasyonu

Fermentas Genomik DNA izolasyon kiti (Genomic DNA purification Kit # K0512) ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır:

1. Genomik DNA izolasyonu yapılacak bakteri suşu Nutrient Broth besiyerinde 30 °C' de bir gece inkübe edilmiştir.
2. Bakteri kültüründen 10 mL alınıp, 7500 devir/ dk'da 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Üst faz uzaklaştırılıp çökelti üzerine 200 µL TE tamponu (pH:8) eklenmiştir.
4. Örnek üzerine 400 µL liziz solüsyonu eklenip karıştırılmış ve 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 600 µL Kloroform eklenip, birkaç kez ters-düz edilmiş ve 10000 devir/dk'da 2 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası DNA içeren üst faz yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve presipitasyon solüsyonu eklenmiş ve 10000 devir/dk'da 2 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Üst faz uzaklaştırılıp çökelti üzerine 1,2 M NaCl solüsyonundan 100 µL eklenip karıştırılmıştır.
8. 300 µL soğuk etanol eklenip, -20 °C'de, 10 dakika bekletilmiştir.
9. Sonrasında 10.000 devir/dk'da, 3 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra 100 µL steril distile su eklenip, -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.11. Agaroz Jel Elektroforezi

1. İzole edilen genomik DNA örneği %0,7'lik agaroz jelde, 60 Volt'luk akım uygulanarak, 180 dakika süreyle ayrıştırılmıştır.
2. Elektroforez bitiminde jel EtBr içeren solüsyonda boyanmış ve UV transilüminatör üzerine konularak görüntülenmiştir.
3. Kromozomal ve plazmid DNA'ların büyüklüğü, DNA Size (Version 1) adlı bilgisayar program kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.12. Floresan Yerde Hibritleme (FISH)

Floresan işaretli primerler, Metabion (Metabion International AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried/Almanya) ve Microsynth (Schützenstrasse 15, Postfach 63 CH-9436 Balgach, İsviçre) firmalarına sentezletilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kullanılan primerler [3].

PROB	GEN DİZİSİ	Flourokrom boya
Eub	5'- Cy3- GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	Cy3
Noneub	5'- Cy3- ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'	Cy3
646 F (<i>dntAa</i> geninin ileri dizisi)	5'- FITC- AAC TGG TAG TAG AAC CCC TC-3'	FITC
1687 R (<i>dntAa</i> geninin geri dizisi)	5'-FITC- GGG GTT CAC TCA TGG CTT GG- 3'	FITC
81 F (<i>dntD</i> geninin ileri dizisi)	5'- Cy3- CCA TGT CCG TTG CAG ACA TT-3'	Cy3
1040 R (<i>dntD</i> geninin geri dizisi)	5'- Cy3-GCT ACT GGG TTC AGT TGT GC -3'	Cy3

Çizelge 3.2. Hibridizasyon solüsyonu

Kimyasal	Derişim	Hacim
NaCl	5 M	360 µL
Tris-HCl(pH 7.2)	1 M	40 µL
SDS	%10	2 µL
Formamid	%30	600 µL
Bidistile H ₂ O		1000 µL

Çizelge 3.3. Yıkama tampon solüsyonu

Kimyasal	Konsantrasyon	Hacim
NaCl	5 M	1000 µL
Tris-HCl (pH 7.2)	1 M	1000 µL
SDS	%10	50 µL
NaH ₂ PO ₄ (pH 7)	250 mM	1000 µL
Bidistile su ile tamamlanacak hacim		50 mL

1XPBS (fosfat tamponu):

10 mM sodium fosfat (10 mM Na₂HPO₄ ile 10 mM NaH₂PO₄'ün 1000 mL distile suda çözdürülmesiyle hazırlanmıştır) ile 130mM NaCl, 1000 mL distile suda çözdürülmüş, pH'sı 7.2'ye ayarlanarak hazırlanmıştır.

1. Kontamine topraktan alınan 5 g numune havanda ezilip, %50 etanol-numune olacak şekilde alınıp vorteksle karıştırılmıştır.

2. Karışımdan alınan 1 mL örnek, 13.000 devir/dk.'da, 3 dk santrifüj edilmiştir.

3. Üst faz uzaklaştırılıp çökelti üzerine 0,5 mL 3 X PBS eklenip, 25 kez şırıngalanmıştır. Bu işlem üç kez tekrar edilmiştir.

4. Sonrasında 0,75 mL %4'lük paraformaldehit (PFA) eklenerek, 3 saat +4 °C'de bekletilmiştir.

5. 3XPBS ile yıkama aşamasından sonra 0,5 mL etanol + 0,5 mL 1 X PBS eklenerek, 50 kez şırıngalanmış ve -20 °C' de saklanmıştır.
6. Fikse edilmiş örneklerden, 250 µL alınıp, 13000 devir/dk.'da, 3 dk santrifüj edilmiştir.
7. Çökelti üzerine 0,5 mL 3 X PBS eklenip, 25 kez şırıngalanmış ve 13.000 devir/dk.'da, 3 dk santrifüj edilmiştir.
8. Çökelti üzerine 0,5 mL distile su eklenip 25 kez şırıngalanmıştır.
9. Teflon kaplamalı kuyucuklu lam üzerine, kuyucuk hacmine göre örnek konulup 46 °C' de kurutulmuştur.
10. Kuyucuklara 10 µL 1 X PBS ve 2 µL Lizozim eklenip, 37 °C'de, 5 dk inkübe edilmiştir.
11. Sonrasında sırasıyla %50-80-96'lık etanol serisinde 3'er dakika bekletilmiştir.
12. Örnek içeren lamalar kurutulduktan sonra, 17 µL hibridizasyon çözeltisi (çizelge 3.2) ve 3 µL prop eklenip zemininde ıslatılmış havlu kağıt olan hibridizasyon tüpünde 46 °C'de, 3 saat bekletilmiştir.
13. Kuyucuklara 10 µL DAPI boyası eklenerek, 15 dakika inkübe edilmiştir
14. Yıkama tamponunda (Çizelge 3.3) iki kez 7'şer dakika bekletilmiş ve sonrasında +4 °C distile su ile yıkanmıştır.
15. 46 °C'de kurutulan slaytlara 5 µL DABCO antisoldurucu eklenip lamel ile kapatılmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir [67,68].

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. İzole Edilen Bakteri Suşunun Karakterizasyonu

Petrol Rafinerisi'nden alınan ham petrolle kirlenmiş toprak örneğinden, karbon ve azot kaynağı olarak 2,4-DNT içeren MM9 sıvı besiyerinde zenginleştirilmiş kültür yöntemi ile üretilen kültürler, Nutrient agar, GSP agar ve 0,1 g/L oranında 2,4-DNT içeren MM9 agara yayma ekim yöntemiyle yayılmış ve koloni morfolojisi teşhis edilmiştir (Şekil 4.1). 2,4-DNT içeren MM9 besiyerinde ve GSP agarda küçük, şeffaf koloniler halinde, Nutrient agarda ise beyaz koloniler halinde gözlemlenmiştir.

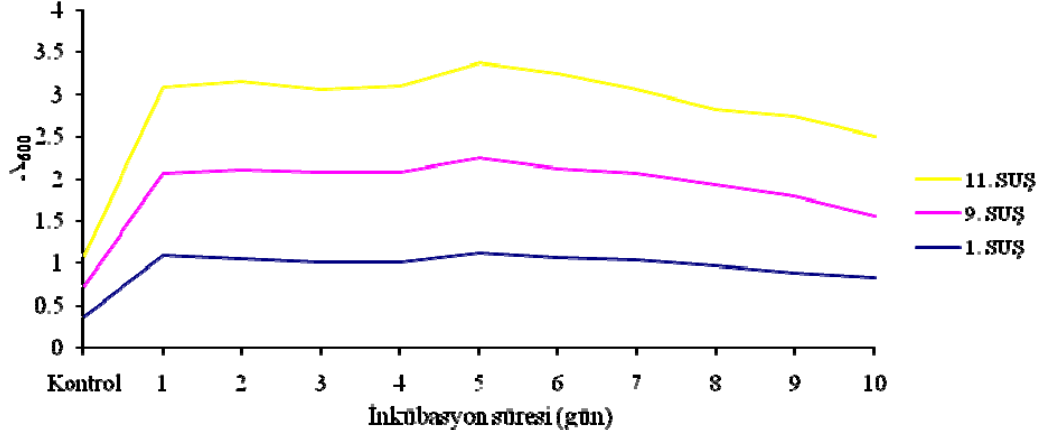


Şekil 4.1. İzole edilen bakteri suşunun 2,4-DNT içeren MM9 Agardaki üreme davranışı.

4.1.2. 2,4-DNT İçeren Besiyerinde Üreme Davranışına Ait Bulgular

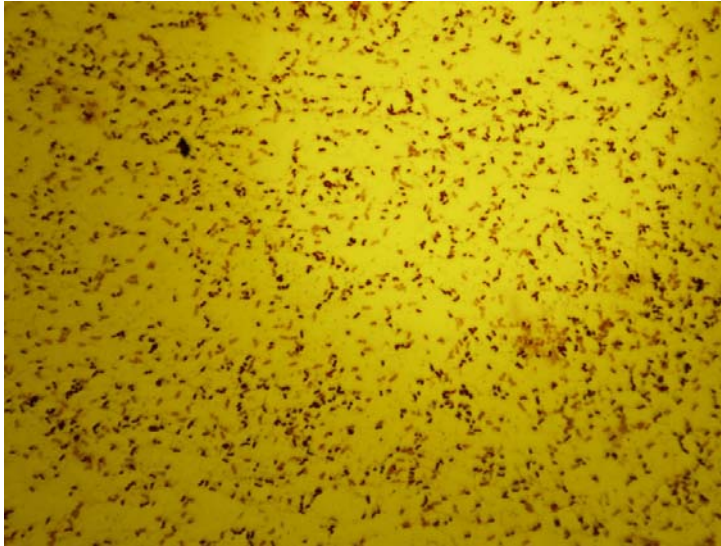
İzole edilen küçük kolonilere ait 15 adet suş, 2,4-DNT içeren MM9 sıvı besiyerinde, 30 °C'de, pH 7'de, 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. İçlerinden en iyi üreme gösteren 3 suşun A_{600} değerleri ölçülmüş ve 11. Suşun 2,4-DNT'li ortamda en

iyi ürediği görülmüştür (Şekil 4.2). İnkübasyon süresince maksimum üreme miktarı 5. gün olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. 10 günlük inkübasyon süresince iyi üreme gösteren 3 suşun zamana bağlı üreme grafiği

Gram boyama ile boyanan saf kültürün Gram pozitif özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Gram boyama yöntemi ile boyanan *Arthrobacter* genusunun 100X mikroskop görünümü.

4.1.3. Bakteri Suşunun Tanımlanması ve Filogenetik Analizine Ait Bulgular

Nutrient broth'da üretilen bakteri suşunun genomik DNA izolasyonu yapılmış, 16S rRNA genini kodlayan bölge PCR'da çoğaltılmış ve çoğaltılan bölgenin DNA dizi analizi yapılmıştır. NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır (Şekil 4.4)

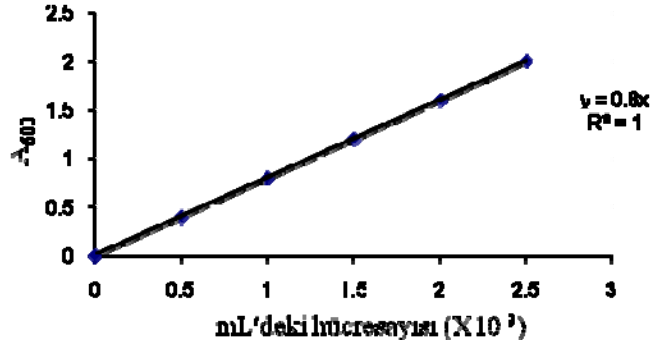
Sekanslanan gen dizileri FinchTV adlı bilgisayar programında BLAST analizi yapılarak 11. suşun, %95 güvenilirlikle *Arthrobacter chlorophenolicus* türüne ait olduğu tespit edilmiştir.



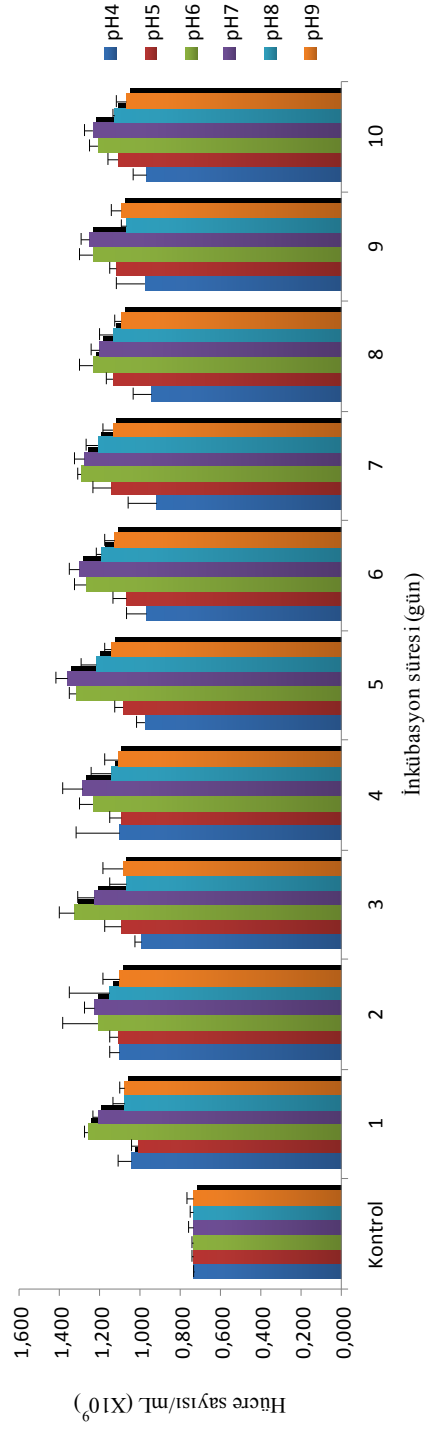
Şekil 4.4. NCBI gen bankasındaki referans genomlarla eşleştirilerek ve Fast "Minimum Evolution Tree" yöntemi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.

4.1.4. 2,4-DNT Degradasyonunda Farklı pH'larda Biyokütlerdeki Değişimin Gözlemlenmesi

Arthrobacter chlorophenolicus suşunun pH 4-9 aralığındaki pH'larda 10 günlük inkübasyon süresince biyokütle ölçümleri yapılmış ve üreme yoğunluğu (A_{600} nm)'na göre regresyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Biyokütle ölçümlerine göre en iyi üreme pH 7.0'de tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Absorbans ölçümleri için regresyon grafiği.

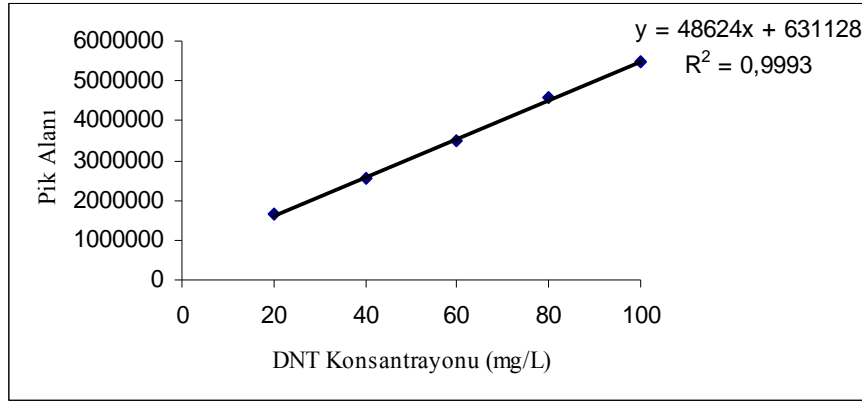


Şekil 4.6. Besiyeri pH'sının bakteri süşunun üremesi üzerine etkisi

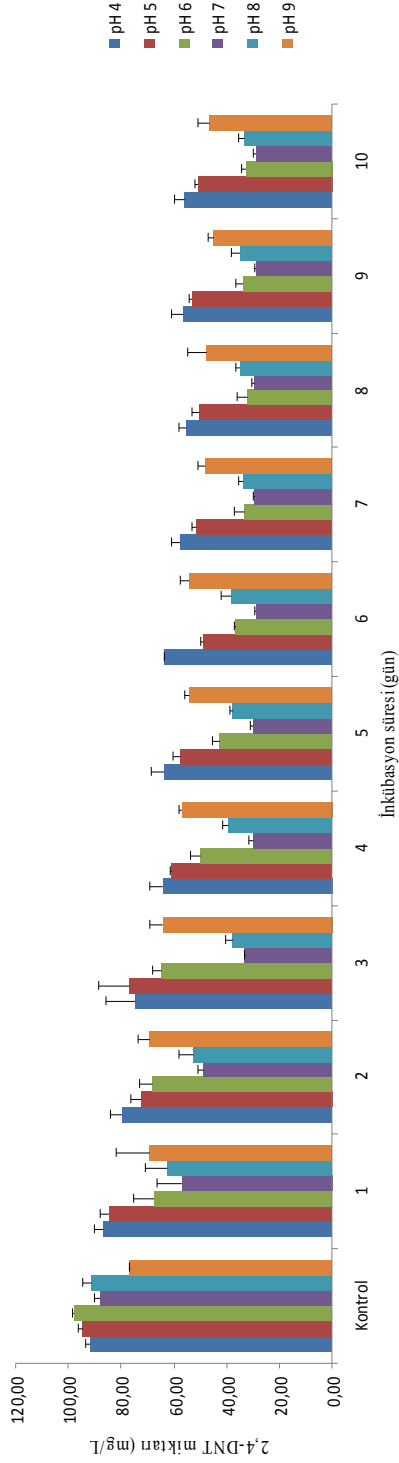
Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile istatistiksel olarak; A_{600} değerleri bakımından pH değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir).

4.1.5. 2,4-DNT'nin Degradasyonu İçin Optimum pH Aralığının Saptanması

HPLC analizi ile pH 4-9 aralığındaki besiyerlerinde, 10 günlük inkübasyon süresince hergün için tüketilen 2,4-DNT miktarı ölçülmüştür. Analiz için 0,02, 0,04, 0,06,0,08,0,1 mg/L derişimlerde standart solüsyonlar hazırlanmış ve regresyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.7). En iyi degradasyon pH'sı 7 olan besiyerinde görülmüştür (Şekil 4.8). Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi yapılmıştır ve degradasyon açısından pH değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.7. 2,4-DNT miktarının belirlenmesi için oluşturulan regresyon grafiği.



Şekil 4.8. Besiyeri pH'sının bakteri suşunun 2,4-DNT degradasyonu üzerine etkisi

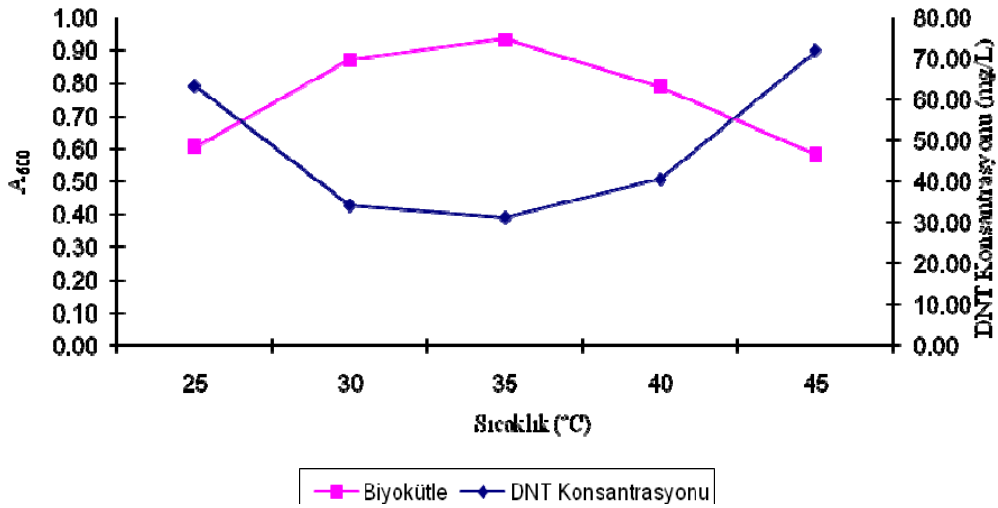
4.1.6. 2,4- Farklı Sıcaklık Değerlerinde Biyokütle Değişimi

25, 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda biyokütle değeri hergün için, spektrofotometrede A_{600} değerleri ölçülerek yapılmıştır. Sonuç olarak, en iyi üremenin görüldüğü sıcaklık aralığı 30-35 °C olarak bulunmuştur. Sıcaklığa bağlı biyokütlerdeki değişim grafiği, degradasyon grafiğiyle birlikte verilmiştir (Şekil 4.9)

Sıcaklığa bağlı biyoküte artışı verilerinin ANOVA analizi ile istatistiksel değerlendirmesi yapılmış ve 25 ile 45 °C sıcaklıklar arasındaki fark anlamlı değilken, diğer sıcaklık değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)

4.1.7. 2,4-DNT'nin Degradasyonu İçin Optimum Sıcaklığın Saptanması

25, 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda, 5 gün boyunca inkübe edilen suşun 5. gün sonunda alınan örnekleri HPLC'de analiz edilmiştir.

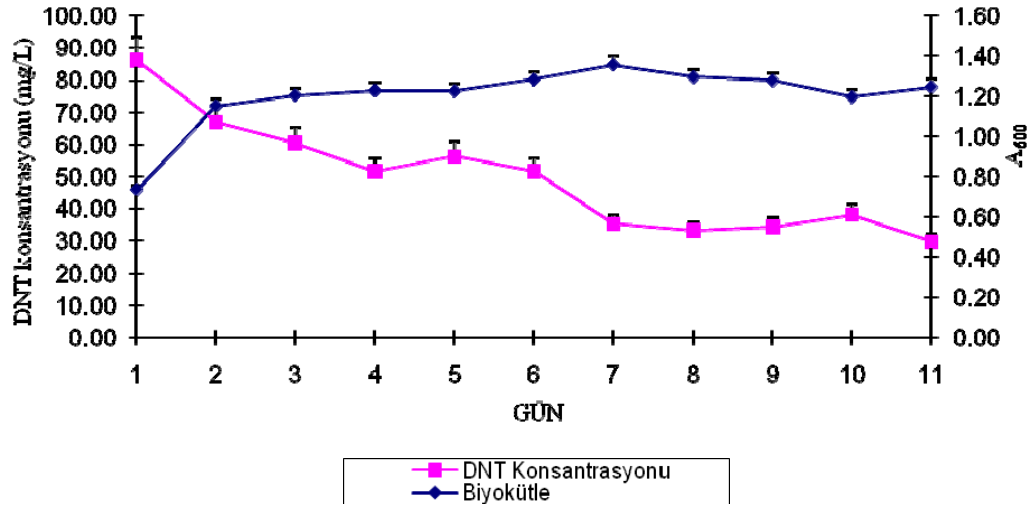


Şekil 4.9. Farklı sıcaklık değerlerinde degradasyon ve biyokütlerdeki değişim

Sonuç olarak optimum biyokütle artışının 30-35°C'de gerçekleştiği, buna bağlı olarak 2,4-DNT degradasyonunun gerçekleştiği optimum sıcaklığın da 30-35°C aralığında olduğu bulunmuştur. 5. gün sonrasında büyümeye bağlı olarak DNT miktarındaki azalmanın da orantılı bir şekilde gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 4.9) Kruskal-Wallis analizi sonucunda sadece 35 ve 45 °C arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p= 0,02 anlamlı kabul edilmiştir.)

4.1.8. Sabit pH ve Sıcaklıkta 2,4-DNT'nin Degradasyonuna Ait Bulgular

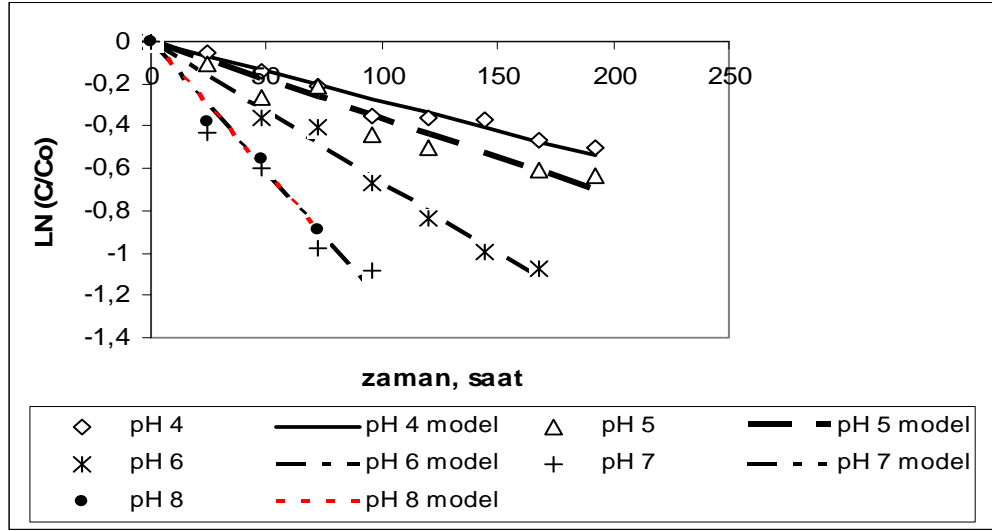
30 °C sıcaklıkta, pH 7'de 10 günlük inkübasyon yapılmış günlük biyokütle ve degradasyon miktarı ölçülmüştür. Sonuç olarak,10 günlük inkübasyon sonunda, %58,4'lük büyümeye karşılık 2,4-DNT'nin %34 oranında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



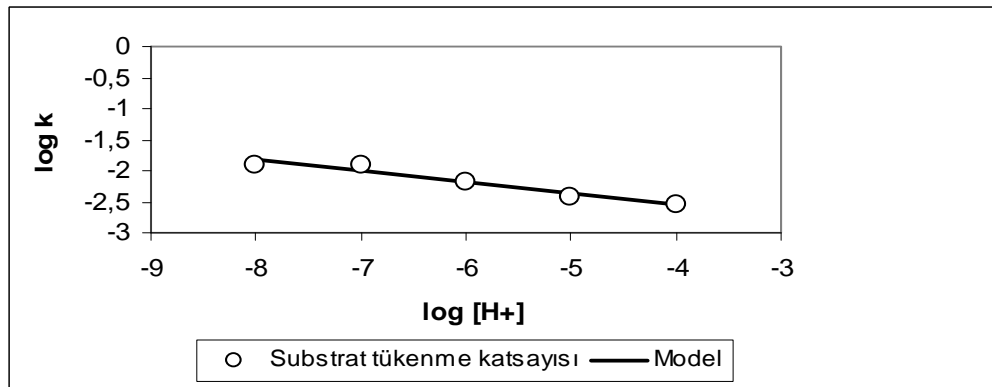
Şekil 4.10. Sabit pH ve sıcaklıkta 2,4-DNT konsantrasyonu / Biyokütle ilişkisi

4.1.9. Substrat Tüketim Kinetiğine Ait Bulgular

Monod denklemi ile, zamana bağlı mikrobiyal çoğalma hızı kullanılarak substrat tüketim hızı tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Özgül substrat kullanım hızı ile pH arasındaki ilişki Şekil 4.12'de verilmiştir.



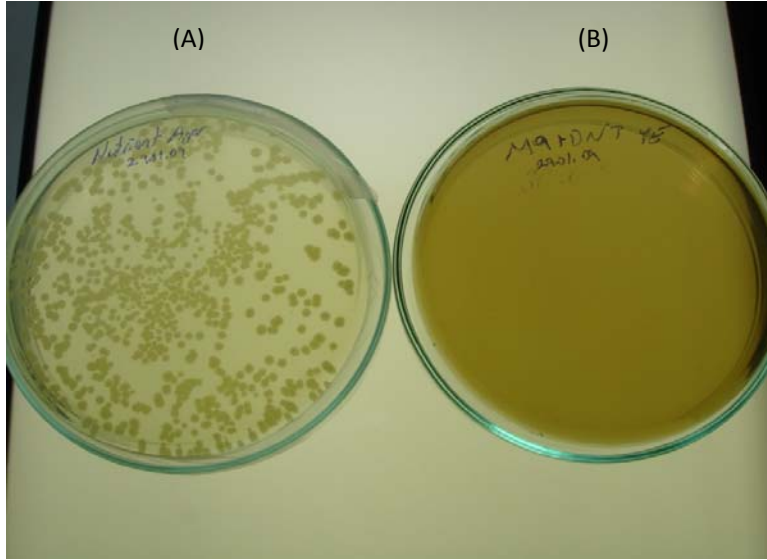
Şekil 4.11. Zamana bağlı substrat tüketim kinetiği



Şekil 4.12. Substrat tüketim hızının pH'ya bağlı değişimi

4.1.10. Plazmid Eliminasyonuna Ait Bulgular

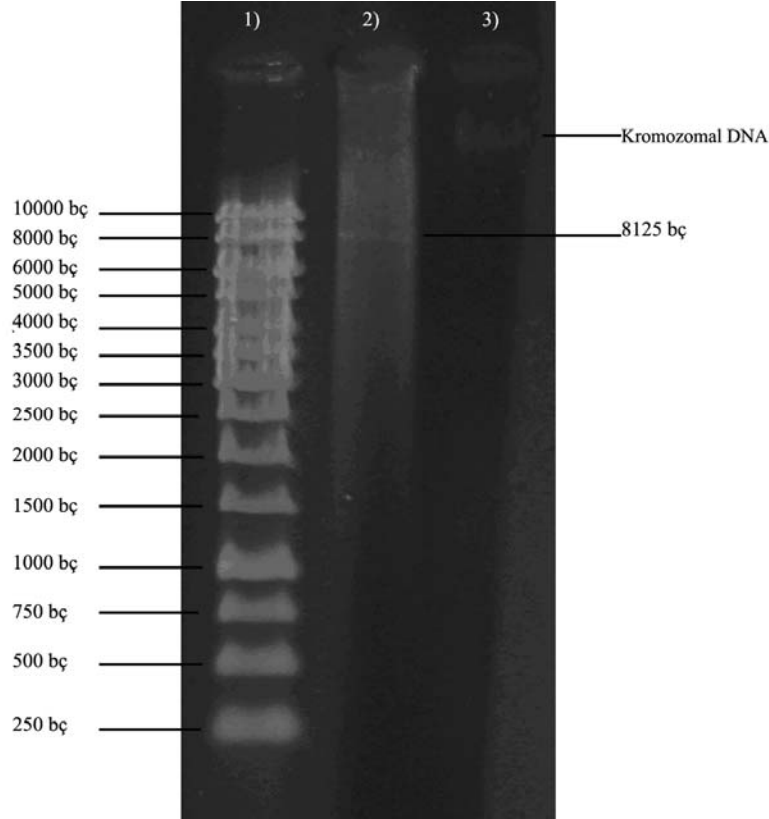
2,4-DNT degradasyonu yapan *Arthrobacter chlorophenolicus* suşu için yapılan plazmid eliminasyonu testi sonucunda, 2,4-DNT içeren MM9Agarda hiçbir kolonininin gözlenmemesi, plazmid eliminasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil4.13).



Şekil 4.13. EtBr ile muamele edilen bakterilerin Nutrient Agar (A) ve 2,4-DNT'li MM9 agar (B)'deki görünümü

4.1.11. Agaroz Jel Elektrofrezine Ait Bulgular

Genomik DNA izolasyon kiti (Fermentas) ile total DNA izolasyonu ve plazmid izolasyon kiti (Fermentas) ile plazmid izolasyonu yapılan *Arthrobacter chlorofenolicus* bakterisi DNA'sı % 0,7'lik agaroz jelde 50V uygulanarak 180 dakika boyunca separe edilmiş; *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 bakterisinin 8,125 kb büyüklüğünde plazmid bulundurduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).

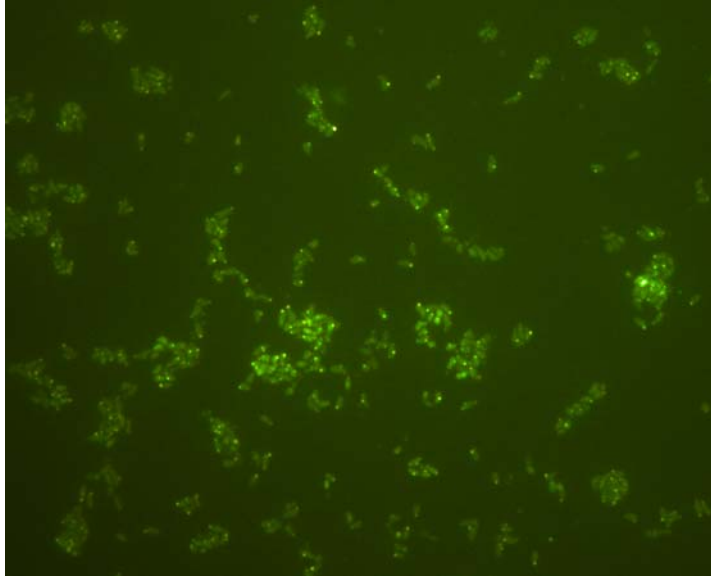


Şekil 4.14. Agaroz jel’de ayrıştırılan kromozomal ve plazmid DNA görüntüleri. Hat 1: 1 kb’lık DNA büyüklük markırı. Hat 2: Plazmid DNA. Hat 3: Kromozomal DNA.

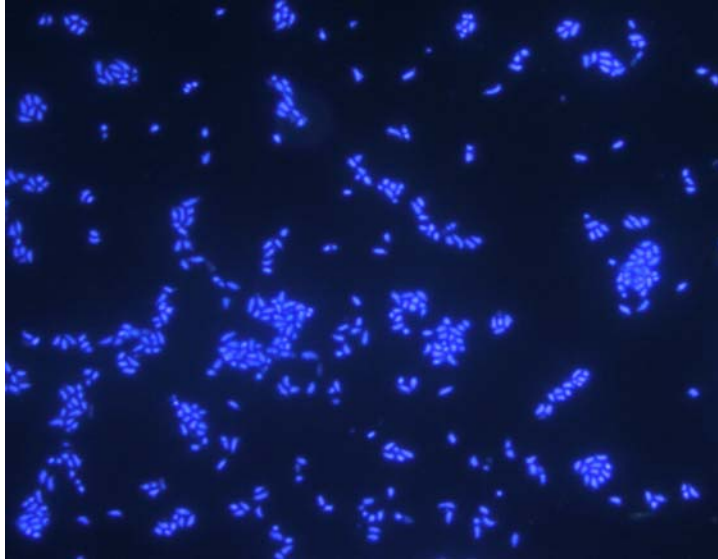
4.1.7. Floresan Yerde Hibritleme (FISH) Bulguları

Direkt toprak örneği ve saf kültür ile gerçekleştirilen FISH çalışmasında bakteri varlığı DAPI boyası ile tespit edilmiştir. EUB338 ve NONEUB propları ile pozitif ve negatif kontrolleri yapılmıştır. *dntAa* genini kodlayan gen bölgesine özgü primer (FITC ile işaretli) ile yapılan hibridizasyonun sonucu pozitif olarak görülmüştür (Şekil 4.15). *dntD* genini kodlayan gen bölgesine özgü primer (Cy3 ile işaretli) ile yapılan hibridizasyonda da pozitif sinyaller görülmüştür (Şekil 4.16). EUB338 probu ile yapılan pozitif kontrol grubuna ait hibridizasyon görüntüleri şekil 4. 17’de, NONEUB probu ile yapılan negatif kontrol gurbuna ait hibridizasyon görüntüleri şekil 4.18’da verilmiştir.

a)

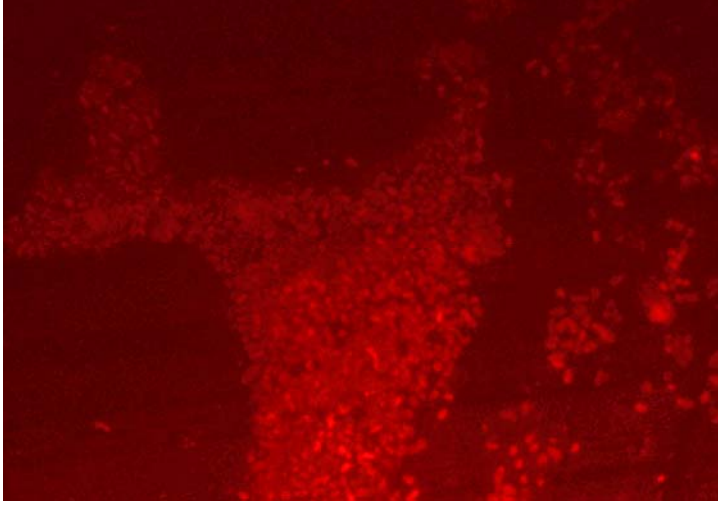


b)

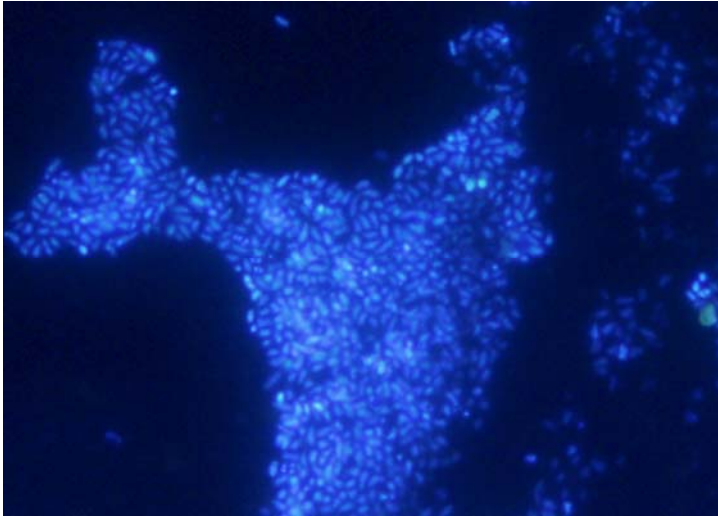


Şekil 4.15. FITC ile işaretli *dntAa* genini taşıyan bakterilere ait hibridizasyon sinyalleri (a) ve DAPI görüntüleri (b).

a)

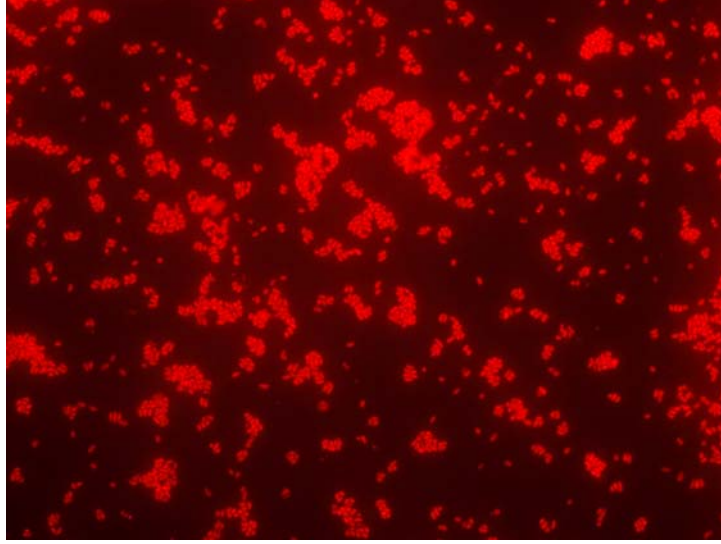


b)

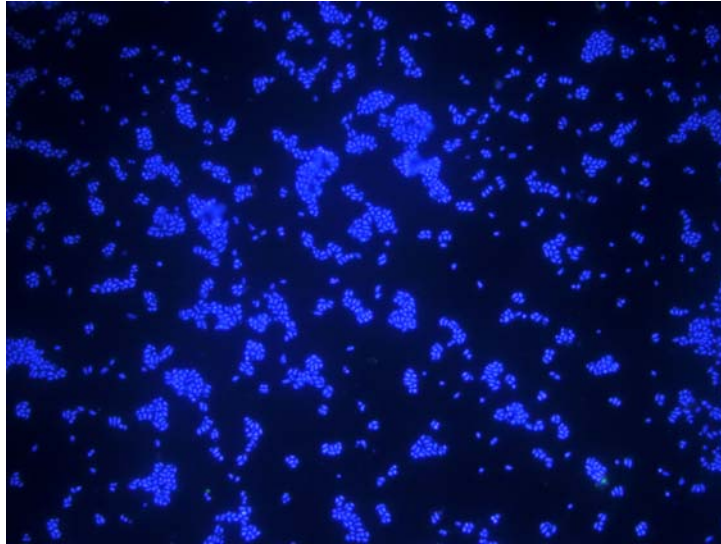


Şekil 4.16. Cy3 ile işaretli *dntD* genini taşıyan bakterilere ait hibridizasyon sinyalleri (a) ve DAPI görüntüleri (b)

a)

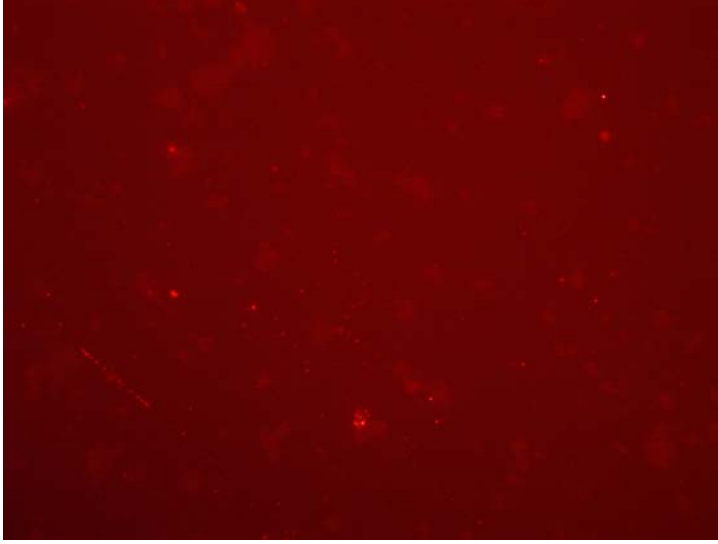


b)

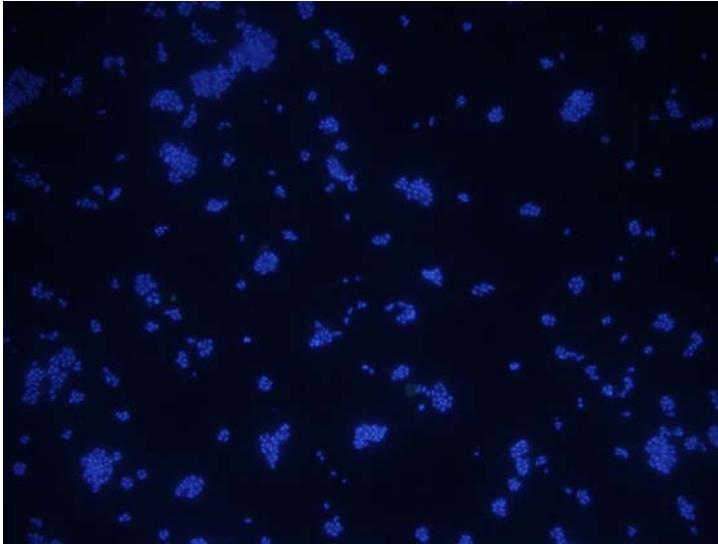


Şekil 4.17. Cy3 ile işaretli EUB338 probunun kullanıldığı pozitif kontrol grubuna iat sinyaller (a) ve bu bakterilerin DAPI görüntüleri (b).

a)



b)



Şekil 4.18. cy3 ile işaretli nonEUB338 probunun kullanıldığı negatif kontrol grubuna ait sinyaller (a) ve bu bakterilerin DAPI görüntüleri (b).

4.2. TARTIŞMA

Nitroaromatik bileşikler, aerobik ve anaerobik şartlar altında birçok mikroorganizma tarafından parçalanabilmektedir. Nitro grubunun elektron yakalama özelliği DNT'lerin anaerobik ve aerobik redüksiyonunu mümkün kılmaktadır. DNT'lerin mikrobiyal degradasyonunun oksidatif ya da redüktif metabolik reaksiyonlarla gerçekleştiği rapor edilmiştir [42]. Oksidatif reaksiyonda reaktant olarak O₂ gereklidir ve oksijenaz veya peroksidaz enzimleriyle reaksiyonlar gerçekleştirilir. Degradasyon için etkili bir diğer yol ise aerobik ve anaerobik şartlarda gerçekleşebilen aril aminlere redüksiyonudur [25].

Ham petrole kirlenmiş alanlarda yapılan biyodegradasyon çalışmalarında birçok saf ve karışık bakteri kültürü kullanılmıştır. Bu bakterilerden en çok *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Basillus* sp., *Acinetobacter* sp. öne çıkmaktadır [69,70,71]. Petrol degradasyonunda önemli bir faktör bakteri tarafından üretilen ekstraselüler emülsifiyer veya biyosüpfaktanlardır [69]. Rosenberg vd., petrol degrade edebilen *Arthrobacter* sp. RAG-1 suşunun, hegzadekan, etanol veya asetat bulunan ortamda emülsifiyer özellikte ekstraselüler ürün oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Bu özellikte emülsifiyer üretmeyen bakterilerin petrole kirlenmiş alanda gelişimlerinin zayıf olduğu; bakteri kültürünün eksponansiyel fazında emülsifiyer üretimi ile mikrobiyal gelişim arasında paralellik bulunduğu belirtilmiştir [72].

Ham petrole kirlenmiş alanlarda yapılan çalışmalarda *Arthrobacter* genusu önemli bir yer tutmaktadır. DNT içeren minimal besi ortamından izole ettiğimiz bakteri suşlarının filogenetik analizleri sonucunda bu bakterilerin *Arthrobacter cholorophenolicus* suşu olduğu ortaya çıkmıştır. 2,4-DNT içeren katı besiyeri ortamında sarı-kahverengi renginde, ufak, düzgün koloniler halinde gözlenmiştir. Bu sonuç Zheng vd.'nin *Arthrobacter nitroguajacolicus* ile yaptıkları çalışma ve Reisfeld vd.'nin yaptıkları çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir [34,71]. Gram boyama yöntemi ile boyandığında bakteriler Gram pozitif özellik göstermiştir.

Evrimsel açıdan önemli birçok gen veya protein moleküler kronometre olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında rRNA'yı kodlayan genler, translasyonel sistemdeki temel bileşenler, ATPaz proteinleri, ATP sentezleyen ya da hidrolizini yapan enzim sistemleri, genetik rekombinasyona yardımcı olan *RecA* enzimi, belirli translasyonel proteinler mikroorganizmalar hakkında önemli filogenetik bilgiler sunmaktadır [73]. Waasbergen vd., derin deniz sediment yüzeyinden izole edilen *Arthrobacter* türlerinin genetik çeşitliliğini 16S rRNA ve *RecA* enzimini kodlayan geni baz alarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak farklı sedimentlerdeki mikroorganizmaların benzer genleri paylaştığını ve buna bağlı olarak ortak bir orjinlerinin olduğu belirtilmiştir. *recA* geni ile oluşturulan filogenetik ağaçta birbirleriyle ilişkili gruplar arasında fazla çeşitlilik gözlemlendiği, bu yüzden daha korunmuş olan 16S rRNA sekansına dayalı filogenetik analizin daha doğru sonuç vereceği belirtilmiştir [74]. Koch vd., *Arthrobacter* genusuna ait 11 tür ve *Micrococcus* genusuna ait 4 türün 16S rRNA analizini yapmışlar ve bu iki genusa ait türlerle *Renibacterium salmoninarum* türünün filogenetik ağaçta bu genusların hattında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Birbirleriyle yakın ilişkili *Arthrobacter* ve *Micrococcus* türlerinin aynı kümede dallanma gösterdiği ve bu organizmaların yakın ilişkili organizmalar olarak nitelendirilebileceği belirtilmiştir [75]. Koch vd., *Micrococcus agilis* türünün filogenetik ağaçtaki yerini yeniden teşhis etmişlerdir. 16S rRNA analizi ve bununla beraber yapılan biyokimyasal testler, hücre duvar yapısı özellikleri göz önüne alınarak türün *Arthrobacter* Grup I 'e ait dalda yer aldığı tespit edilmiştir [76]. Tang vd., *Micrococcus luteus* ATCC 9341 suşunun fizyolojik karakter, sitokimyasal özellikleri ve moleküler verilerine dayalı yaptıkları çalışmalarında filogenetik olarak *Kocuria* genusuna ait olduklarını teşhis etmişlerdir ve *Kocuria rhizophila* olarak yeniden isimlendirilmiştir [77]. *Kocuria* genusunun ise, *Micrococcus* genusunun filogenetik ve kemotaksonomik ayrımıyla oluşturulduğu Stackebrandt vd. tarafından belirtilmiştir. Bu çalışmada filogenetik olarak çok yakın olmalarına rağmen, kemotaksonomik açıdan farklılıklar gözlemlendiği ve ona göre ayrı bir genus oluşturulduğu belirtilmiştir [78].

Bu çalışmada ise, ham petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen suşun 16S rRNA analizi sonucunda Minimum Evolution Tree yöntem ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan filogenetik ağaçta ,bu çalışmada kullanılan suşun *Renibacterium salmenarium* ATCC 33209, *Arthrobacter* sp.,*A. aurescens* TC1 ve *A. chlorophenolicus* A6 türünü içeren grupta yer aldığı tespit edilmiştir. Elde edilen filogenetik ağaç, şimdiye kadar oluşturulan filogenetik ağaçlarla benzer kümelenme şekli göstermiştir. Bununla beraber çalışılan bakteri suşu, filogenetik ağaçta *Kocuria rhizophila* DC2201 türü ile komşu hatta bulunmaktadır (bkz. Şekil 4.4). Önceden *Micrococcus luteus* olarak bilinen [77] bu bakteri suşu ile yakın olması, çalışılan suşun *Micrococcus* generusu ile filogenetik olarak yakın olduğunu göstermektedir. Tanımlanan filogenetik ağaçta *Micrococcus* generusu üyelerinin olmaması kemotaksonomik açıdan farklılıkların olduğu sonucunu desteklemektedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda deniz ve toprak örneklerinde nitroaromatik bileşikler degrade eden önemli aerobik bakteriler *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Clostridium* sp., *Mycobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Variovorax* sp. olarak tanımlanmıştır [3,79,80,81]. Bununla beraber, Boopatya vd., ve birçok araştırmacı, anaerobik bakterilerden TNT'yi toluene dönüştüren *Desulfovibrio* sp. suşunun çeşitli NAC'ı da degrade ettiğini gözlemlemişlerdir [32]. Shin vd., DNT izomerlerini degrade eden *Lactococcus lactis* subsp. 27 suşunu izole etmişlerdir [42]. 2,4-DNT'i degrade eden ilk bakteri olan *Burkholderia* sp. DNT suşu, Spanggord vd. tarafından tanımlanmıştır [3]. Parrish, TNT ve 2,4-DNT'nin fungal degradasyonunu çalışmış ve 190 fungustan 98'inin TNT'yi parçaladığını; buna karşın 5 tanesinin de 2,4-DNT'yi parçalayabildiğini tespit etmiştir [41]. Yine beyaz çürükçül funguslarla yapılan çalışmada 2,4-DNT ve TNT gibi bileşiklerin transformasyonunun gözlemlendiği belirtilmektedir [7].

Arthrobacter generusu üyeleri toprakta yaygın olarak bulunurlar ve çok çeşitli aromatik ve alifatik bileşikler degrade etme yeteneğine sahiptirler [45,46,47]. Jain vd., *Arthrobacter* sp. suşunun *p*-nitrofenol bileşimini 1,2,4-benzenetriol yoluyla degradasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, nitro grubunun monooksijenaz yoluyla

ayrıldığını tespit etmişlerdir [36]. Yapılan çalışmalarda *Arthrobacter* suşlarının endüstriyel atıksulardaki yüksek nitrat derişimine toleranslı oldukları, 1 M nitrat içeren ortamda yaşayabildikleri ve nitratı azot kaynağı olarak kullandıkları belirtilmiştir [52,53]. Tope vd., TNT' nin *Arthrobacter* sp. suşunun tutuklanmış ve durgun faz kültürü ile transformasyonunu çalışmış ve bu suşun TNT'yi aerobik koşullarda di- ve mono-nitrotoluenlere dönüştürdüğünü bulmuşlardır. Tutuklanmış hücrelerin ise durgun faz hücrelerine göre daha başarılı oldukları tespit edilmiştir [57]. Westerberg vd. yaptıkları çalışmada, *Arthrobacter chlorophenilus* A6 suşunun yüksek konsantrasyonda 4-klorofenol'ü degrade ettiğini tespit etmişlerdir [58] Çalışmamızda izole edilen *Arthrobacter chlorophenilus* olarak teşhis edilen suşun 2,4-DNT'yi degrade ettiği tespit edilmiştir. 2,4-DNT içeren besiyerinde bakterinin üremesinin yavaş olduğu gözlenmiştir. Hasan vd., yaptıkları çalışmada, *Arthrobacter* sp. suşunun 0,05 g/L derişimdeki 2,4-DNT'yi %47.82 oranında degrade ettiğini belirtmişlerdir [82]. Gupta vd, ek besin elementi ile desteklenen besiyerinde 0,001-0,1 g/L derişimlerde DNT eklemiş ve 0,05 g/L oranına kadar eklenen derişimlerde 2 günlük inkübasyonda degradasyonun tamamlandığı gözlenirken; 0,1 g/L DNT içeren besiyerinde degradasyonun ancak %45 civarında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ortamdaki ek besin elementi miktarının 2 katına çıkarılmasıyla %92'lik degradasyon oranına ulaşıldığı belirtilmiştir [33].

Bu çalışmada MM9 besiyerine 0,1 g/L oranında 2,4-DNT ilave edilmiştir. Sabit sıcaklık ve pH'da 10 günlük inkübasyon süresince %34 oranında degradasyon gözlenmiştir. TNT'nin aromatik halkasında hidroksil grubunun olmamasından dolayı, halka kırılmasına karşı dirençlilik gösterebileceği vurgulanmıştır [57]. DNT için de aynı durumun söz konusu olabileceği; ortamdaki DNT derişiminin artmasının üreme oranının azalmasıyla beraber degradasyon oranında da azalmaya neden olacağı düşünülebilir. Degradasyon oranının artması için ek besin maddesinin miktarının artırılmasının olumlu sonuç vereceği söylenebilir. Snellix vd., 2,4-DNT'yi degrade eden mikrobiyal birlikler üzerine çalışmış ve *Pseudomonas mariginalis* suşunun kominite içerisinde temel rol oynadığı ve etkili bir degradasyon için birlikte bulunması gerektiği tespit edilmiştir [3]. Hasan vd., yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* suşunun *Arthrobacter* sp. suşuna oranla degradatif yönden daha

başarılı olduğu belirtilmiştir [82]. İyi bir remedasyon süreci için bu gibi bakteri kominitelerinin kullanılmasının avantajlı olacağı yapılan çalışmalarla desteklenmektedir.

2,4-DNT'yi degrade eden mikroorganizmaların optimum pH, sıcaklık, nutrient ihtiyacının bilinmesi, uygulanabilir bir remediasyon çalışması için önem taşımaktadır. Kim vd., *Pseudomonas putida* ile TNT'nin degradasyonunda optimum şartların, pH 7.0'de 30 °C'de gerçekleştiğini saptamışlardır. Bununla beraber besiyerine eklenen çeşitli karbon kaynağı olarak mısır maserasyon sıvısı (CSL) ve şeker kamışı melasının üremeyi tetiklediğini tespit etmişlerdir [29]. Zheng vd., *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99 suşunun akrilonitril degradasyonunda optimum enzim aktivitesinin pH 5.8-6.5 arasında, sıcaklığın ise 40 °C olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca besiyerinde Hg⁺², Ag⁺², Cu⁺² metal iyonlarının varlığının enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir [34]. Gupta vd., 2,4-DNT'nin degradasyonunda besiyerine eklenecek besin elementlerinin degradasyon prosesini stimüle ettiklerini göstermiştir. Ek besin elementi olarak kümes saman suyu (NO₃, P₂O₅, K₂O içermektedir) kullanılmış ve degradasyonun 1 gün içerisinde tamamlandığını belirtmişlerdir [19].

Çalışmamızda biyokütle ve degradasyon için sıcaklık ve pH optimizasyonu yapılmıştır. Optimum pH'nın 7.0 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Arthrobacter* genusuna ait suşlar için optimum pH değerinin ortalama 6.0-8.0 aralığında olduğu belirtilmiştir [34,55]. pH 7.0'de maksimum üremenin görüldüğü sürenin 5. gün sonu olduğu saptanmıştır. Üremenin maksimum olduğu sürede degradasyon oranının da fazla olduğu bulunmuştur. Sıcaklık açısından *Arthrobacter chlorophenolicus* değerlendirilmiş ve en iyi üreme ve degradasyon oranının 30-35 °C sıcaklık aralığında gerçekleştiği bulunmuştur. Bu sonuç yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir [29,34,53]. Çalışmamızda bakterinin üremesi ve 2,4-DNT degradasyonu gerçekleştirmesi için besiyerine ek karbon kaynağı olarak maya özütü ilavesi yapılmıştır [26]. Ek karbon kaynağının degradasyonu stimüle ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [19,29].

Bu çalışmada degradasyon kinetik modeli, birinci dereceden kinetik modeline uygunluk göstermektedir. Bu eşitliğe göre reaksiyon hızı eğim değerlerinden hesaplanmıştır. Kim vd., 2,4,6-TNT'nin *Pseudomonas putida* tarafından degradasyonunun optimizasyonu ile ilgili çalışmalarında farklı pH değerinde substrat tüketim kinetiğini hesaplamış ve optimum pH 7.0'de 30 saatlik inkübasyon sonucunda ulaşılan $A_{600} = 1,5$ biyokütle değerine karşılık reaksiyon hızının $0,068 \text{ h}^{-1}$ olduğu göstermişlerdir [29]. Çalışmamızda 10 günlük ikübasyonda $A_{600} = 1,2$ değerine karşılık reaksiyon hızının $0,0123 \text{ h}^{-1} (\pm 0,00074)$ olduğu görülmüştür. Kim vd., ortama eklenen ilave karbon kaynağının *Pseudomonas putida* suşunda degradasyon oranını $A_{600} = 1,8$ değerine karşılık $0,079 \text{ h}^{-1}$ olarak artırdığını belirtilmişlerdir [29]. Gupta vd. *Pseudomonas* sp. ve *Pseudomonas putida* ile kümes samanı ile zenginleştirilmiş besiyerinde 2,4-DNT ve 2,6-DNT'nin degradasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada 30 saatlik inkübasyonda 2,4-DNT ve 2,6-DNT'nin reaksiyon oranlarının sırasıyla $0,15 \text{ h}^{-1}$ ve $0,05 \text{ h}^{-1}$ olduğunu göstermişlerdir [19]. Hasan vd., *Pseudomonas* sp. ve *Arthrobacter* sp. bakterisinin 2,4-DNT redüksiyon oranlarının $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve pH 7.5 de ($0,05 \text{ g/L DNT}$) sırasıyla %63,21 ve %47,82 olduğunu, pH 7.0'deki redüksiyon oranının sırasıyla % 67,24 ve % 36,01 olduğunu tespit etmişlerdir. Tween 80 varlığındaki redüksiyon oranlarının *Pseudomonas* sp. ve *Arthrobacter* sp. suşlarında, sırasıyla %75,5 ve %69,25 olduğu, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'deki redüksiyon oranlarının ise de sırasıyla %64,27 ve %42,17 olduğu tespit edilmiştir [82].

Bu çalışmada plazmid eliminasyonu testi sonucu DNT degradasyon yolundaki genlerin plazmid kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen *Arthrobacter cholophenilicus* suşunun $8,125 \text{ kb}$ 'lık plazmid içerdiği tespit edilmiştir. Spain vd.'nin *Pseudomonas* sp. DNT suşu ile yaptıkları çalışmada degradasyonda görevli enzimleri kodlayan genlerin 180 kb 'lık pJS1 plazmidinde olduğunu tespit etmişlerdir [27]. Spain vd., *Burkholderia cepacia* R34 suşunda 2,4-DNT degradasyon yolundaki genlerin 216 kb 'lık plazmidin 50 kb 'lık bölgesinde bulunduğu tespit etmişlerdir. *Arthrobacter* genusuna ait suşlarda plazmid kaynaklı çok çeşitli ksenobiyotik maddeyi parçalama yeteneği olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [49,51].

Jain vd., *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 suşunun nitroaromatik bileşiklerden nitrobenzoat degradasyonunda 65 kb'lık plazmidin rol aldığını göstermişlerdir [83]. Jerke vd., 5 ayrı *Arthrobacter* suşundan toplam 8 plazmidi kıyaslamışlar ve baz uzunluklarını 99.213, 96.488, 115.507, 159.538, 49.633, 165.137, 408.000 ve 300.725 bp olarak tespit etmişlerdir. Teshis edilen 8 plazmidin de replikasyon, segregasyon ve konjugasyon ile ilgili genleri ortak olarak içerdiklerini, diğer taksonlara kıyasla plazmid genlerinin yüksek oranda aminoasit benzerliği gösterdiğini tespit etmişlerdir [84]. Hayatsu vd. tarafından, Karbarili karbon kaynağı olarak kullanan *Arthrobacter* suşunda 110, 120 ve 130 kb büyüklüğünde 3 plazmid izole edilmiştir. Plazmidlerden ikisinin karbaril degradasyonunu gerçekleştirebildiği, plazmidler tek haldeyken degradasyonun tamamlanamadığı belirtilmiştir [51]. Çalışmamızda teşhis edilen *Arthrobacter cholorophenilus* suşundaki plazmid boyutu diğer çalışmalarda belirtilen plazmid boyutlarına göre oldukça küçüktür.

2,4-DNT'nin bakteriyal degradasyonunda ilk aşama, 2,4-DNT'nin dioksijenasyonudur ve sonucunda nitrit grubunun uzaklaşmasıyla 4-metil-5-nitrokateşol (4M5NC) oluşmaktadır. Sonraki basamakta 4M5NC'nin monooksijenasyonu ile 2-hidroksi-5-metilkinon ara ürünü oluşur ve indirgenerek 2,4,5-trihidroksitolueni (THT) oluşturur. Bu ürün ise halka füzyon reaksiyonu için başlangıç materyalini oluşturmaktadır [85]. Spain vd., *Pseudomonas* sp. DNT suşunun 2,4-DNT degradasyon yolunu karakterize etmişler ve klonlama deneyleri sonucu *dntA* (DNT dioksijenaz) geninin 6,8 kb'lık NsiI-NsiI fragmenti içinde olduğu, *dntB* geninin (MNC monooksijenaz) 1,6-1,8 kb uzunluğunda olduğu, *dntD* geninin (THT oksijenaz) ise 1,2 kb'lık ECOR1-XhoI fragmentinde olduğu belirtilmiştir [27]. Spain vd., *Burkholderia* sp. DNT suşundan 2,4-DNT dioksijenazı kodlayan genler ile *Pseudomonas putida* G7 suşundan naftalin dioksijenaz (NDO) enzimini kodlayan genler arasındaki benzerlik üzerine yaptıkları çalışmada, tanımlanan 5 açık okuma çerçevesinin 4 tanesinde yüksek oranda benzerlik tespit etmişlerdir [86]. Spain vd., 2,4-DNT'nin metabolik yolu ile ilgili yaptıkları çalışmada *Burkholderia cepacia* R34 suşundan klonlanan 27 kb'lık bölgede DNT metabolik yolunu kodlayan genleri teşhis etmişlerdir.

Çalışmada, DNT dioksijenaz genlerinin (*DntAaAbAcAd*) 5,8 kb'lık bir bölgede bulunduğu ve bu genlerin 3 bileşenli Rieske non-heme demir oksijenazlarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşenler oksidoredüktazlar (*dntAa*), demir sülfür ferrodoksin proteini (*dntAb*) ve α ve β alt üniteleri (*dntAc* ve *dntAd*) olarak belirtilmiştir. MNC monooksijenaz geninin *DntA* gen ailesinin altında 1,683 bp'lik bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca THT oksijenazın meta ring füzyon enzim ailesiyle benzerlik gösterdiği vurgulanmıştır [24].

Çalışmamızda 2,4-DNT'yi degrade eden *A. chlorophenilicus* suşunda metabolik yoldaki enzimleri kodlayan *dntAa* ve *dntD* genlerinin varlığı Floresan Yerde Hibritleme tekniği ile gösterilmiştir. Bunun için DNT dioksijenaz enzimini oksidoredüktaz bileşeni olan *dntAa* geni ile halka kırımını sağlayan *dntD* geni prop olarak kullanılmıştır. Snellix vd., 2,4-DNT'nin türler arası metabolizmasını incelerken aynı genlerle Southern Hibridizasyon yapmış ve *dntAa* ve *dntD* genleriyle hibridize olan bakterileri teşhis etmişlerdir [3]. Bu çalışmada, floresan işaretli proplarla gerçekleştirilen hibridizasyon sinyalleri floresan mikroskopta incelenmiş ve *dntAa* ve *dntD* geni için sinyaller alınmıştır. Lechardeur vd., plazmidlerin hücre içindeki kararsızlığıyla ve hücreler arası transferini etkileyen faktörlerle ilgili yaptıkları çalışmada plazmidin hücredeki varlığını FISH ile tespit etmişlerdir. DIG-dUTP, biyotin ve FITC ile işaretli proplarla plazmidin hibridizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bütünlüğü korunmuş hücrelerde, hücre içine enjekte edilmiş TRICT-Dekstran yoğun bir şekilde hücre içinde gözlenirken hibridizasyon sinyallerinin plazmid eliminasyonundan 1 saat sonra azaldığı belirtilmiştir. Geçirgenliği artan hücrelerde ise TRICT-Dekstranın hücrelerden ayrıldığı, buna karşın hibridizasyon sinyalleri daha güçlü gözlenmekle beraber bir kısım plazmidin kaybolduğu belirtilmektedir [87]. Benzer şekilde, çalışmamızın FISH prosedürü sırasında hücrelere lizozim uygulaması yaparak geçirgenlik artırılmıştır. Böylelikle hibridizasyon sinyallerinin güçlendiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber geçirgenliğin artırılmasının, hücrelerin resüpsansiyonu ve fiksasyonu sırasında bazı hücrelerde plazmid kaybına neden olduğunu, görüntülerde hücre dışı zayıf sinyallerin serbest kalmış plazmidlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Wilschut vd., bakteri içerisinde polipleks türevli plazmid DNA'yı FISH metoduyla tespit

etmişlerdir [88]. Çalışmamızda ise görüntüleme için plazmidler katyonik polimerlerle türevlendirilmemiştir. Türevlendirme olmadan hücre içinde plazmide ait hibridizasyon sinyalleri görüntülenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genellikle antropojenik kaynaklı olarak çevreye bulaşan nitroaromatik bileşikler canlılar üzerinde karsinojenik, mutajenik ve toksik etkiye neden olmaktadır. Özellikle patlayıcı yapımında yaygın olarak kullanılan 2,4-DNT'nin çevreden temizlenmesi için en önemli ve sürdürülebilir yol, mikroorganizmaların kullanımınıdır. Degradasyon açısından başarılı olduğu tespit edilen bakteri suşlarının kontamine toprağa inoküle edilmesi, toprağın kirleticilerden arındırılması için en ekonomik yoldur. Etkin bir biyodegradasyon uygulaması için bakteri suşunun, yaşamsal gereksinimlerinin ve kirletici bileşiği parçalayabilme yeteneğinin iyi bilinmesi gerekir.

2,4-DNT gibi nitroaromatik bileşikleri degrade edebilen mikroorganizmaların izolasyonu ve anahtar rolü olan genlerin belirlenmesi, kontamine olmuş ekosistemlerdeki mikrobiyal adaptasyon mekanizmaları hakkında çok değerli bilgiler vermektedir. Ayrıca çeşitli ksenobiyotiklerin biyoremediasyonu için etkin bakteri suş koleksiyonlarının oluşturulmasının bu konudaki dışa bağımlılığımızı azaltacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- [1] “Oil in the sea-inputs; fates, and effects” National Academy of Sciences, National ,Academy Pres., Washington, DC. (1985).
- [2] Isayev, O., Rasulev, B., Gorlb, L., Leszczynskil. “Structure-toxicity relationships of nitroaromatic compounds”, *Moleculer Diversity*, 10: 233-245. (2006).
- [3] Snellinx, Z., Taghavi, S., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. “Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterization” *Biodegradation*, 14: 19-29, (2003).
- [4] Nishino, S. F., and Jim C. “Bioremediation of Dinitrotoluene (DNT)” *Technology Status Review*, (2001).
- [5] Rittmann, B. E., and P.L. McCarty. “In Environmental Biotechnology: Principles and Applications”, McGraw-Hill: New York, (2001).
- [6] Kulkarni, M., Chaudhari, A., “Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview”, *Journal of Environmental Management*, 85:496-512, (2007).
- [7] Han, S., “In situ bioremediation and natural attenuation od dinitrotoluenes and trinitrotoluenes”, Georgia Institute of Technology, Doctora Thesis, 263 s., (2008).
- [8] C.E. Deutch and G.S. Perera, “Myceloid cell formation in Arthrobacter globiformis during osmotic stress”, *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 493-499, (1992).
- [9] Galvao, T.C., Mohn, W.W., and Lorenzo V., “Exploring the microbial biodegradation and bitransformation gene pool”, *TRENDS in Biotechnology*, 23(10), (2005).

- [10] Sanz, J.L., Köchling, T., “Molecular Biology techniques used in wastewater treatment: An overview”, *Process Biochemistry*, 42: 119-133, (2007).
- [11] Amann, R., Fuchs, B.M. and Behrens, S., “The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization”, *Current Opinion in Biotechnology*, 12:231–236,(2001).
- [12] Reyes, C.M.R., “Theoretical studies of 2,4-DNT molecular structure and its interaction with the siloxane surface of clays”, University of Puerto Rico, Science of Chemistry, Master thesis, 123 s.,(2005).
- [13] Spain J. C., Hughes J. B., Knackmuss Hans- Joachim, “Biodegradation of nitroaromatic compounds”, Lewis Pub., New York Washington, 434s., (2000).
- [14] pollux.chem.umn.edu/nitroposter/nitrointro.GIF
- [15] Ramos, L. J., Cabarrello, A., Esteve- Nunez A., “Biological degradation of 2,4,6- Trinitrotoluen”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:335–352, (2001).
- [16] Walia, S. K., Sadat, S. A., Brar, R. , and Chaudhry, G.R., “Identification and mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* OU83”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73:131–139, (2002).
- [17] Dodard, S.G., Renoux, A.Y., Havari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Snahara, G.I., “Ecotoxicity characterization od dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites”, *Chemosphere*, 38(9):2071-2079, (1999).
- [18] Lewisa, T.A., Newcombeb, D.A. and Crawfordb, R.L., “Bioremediation of soils contaminated with explosives”, *Journal of Environmental Management*, 70:291–307,(2004)
- [19] Gupta, G., Bhaskaran, H., “Use of poultry litter for biodegradation of soil contaminated with 2,4- and 2,6-dinitrotoluene”, *Journal of Hazardous Materials*, B116 : 167–171, (2004).

- [20] Reineke, W., “Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials of Microorganisms”, Biodegradation and Persistence, Berlin, Heidelberg, 1-161, (2001).
- [21] Singh, A., Kuhad, R.C., Word, O.P. “Soil Biology: Advances in Applied Bioremediation”, Springer Dordiecht Heidelberg, London, N.Y., Vol. 17, 365s., (2009).
- [22] Nordin, K., “4-chlorophenol biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6”, Department of Biochemistry and Biophysics Stockholm University , Doctoral Thesis, 72 s., (2004).
- [23] Kaplan, L.A., ve Sieddle, A.R., “Studies in boron hydrides., IV.stable hydride meisenheimer adducts”, J. Org. Chem., 36:937-939, (1971).
- [24] Johnson, G.R., Jain, R. K., and Spain, J. C., “Origins of the 2,4-Dinitrotoluene pathway”, Journal of Bacteriol., 184 (15):4219-4232, (2002).
- [25] Haigler, B. E., Nishino, S. F., and Spain, J. C., “Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas sp.* strain DNT”, J. Bacteriol., 176:3433–3437, (1994).
- [26] Spangord, R. J., Spain, J. C., Nishino, S. F. and Mortelmans, K. E. , “Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas sp.*”, Appl. Environ. Microbiol., 57:3200–3205, (1991).
- [27] Suen, W.C., and Spain, J. C., “Cloning and characterization of *Pseudomonas sp.* strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation”, J. Bacteriol., 175:1831–1837,(1993).
- [28] Atlas, R.M., “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective”, Microbial. Rev., 45:180-209, (1981).
- [29] Park, C., Kim, T.H., Kim, S., Kim, S.W., Lee, J., Kim, S.H., “Optimization for biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene(TNT) by *Pseudomonas putida*”, Journal of Bioscience and Bioeng., 95:567-571, (2003).

- [30] Leahy, J.G., ve Colwell R.R., “Microbial degradation of hydrocarbons in environment”, *Microbiol. Rev.*, 54(3):305–315, (1990).
- [31] Hughes, J., Wang, C.Y., and Zhang, C., “Anaerobic Biotransformation of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: A Pathway through Dihydroxylamino Intermediates”, *Environ. Sci. Technol.*, 33:1065-1070,(1999).
- [32] Boopathy, R., Kulpa C.F. and Manning J., “Anaerobic biodegradation of explosives and related compounds by sulfate-reducing and methanogenic bacteria: a review”, *Bioresource Technology*, 63:81-89, (1998).
- [33] Gupta, G., Bhaskaran, H., Kananen, G., Okoh, J., “Biodegradation 2,4-dinitrotoluene using poultry litter leachate”, *Journal of Hazard. Materials*, B113:137-140, (2004).
- [34] Shen, M., Zheng, Y.G., Shen, Y.C., “Isolation and characterization of a novel *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99, capable of converting acrylonitrile to acrylic acid”, *Process Biochemistry*, 44:781-785, (2009).
- [35] Haigler, B.E., Nishino, S.F., Spain, J.C., “Biodegradation of 4- Methyl-5-Nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. Strain DNT”, *Jour. of Bacteriol.*, 176 (11):3433-3437, (1994).
- [36] Jain, R.K., Dreisbach J.H., Spain, J.C., “Biodegradation of p-Nitrophenol via 1,2,4-Benzenetriol by an *Arthrobacter* sp.”, *Appl. And Environ. Microbiol.*, 60(8):3030-3032- (1994).
- [37] Shiaris, M.P., “Seasonal biotransformation of Naphthalene, Phenanthrene, and Benzo[a]pyrene in surficial estuarine sediments”, *Apply. Environ. Microbiol.*, 55:1391-1399, (1989).
- [38] Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K., Greer, C.W., “Changes in microbial community composition and function during polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:483–489, (2003).

- [39] Nepovim, A., Hebner, A., Soudek, P., Gerth, A., Thomas, H., Smrcek, S. and Vanek, T., “Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by selected helophytes”, *Chemosphere*, 60:1454-1461, (2005).
- [40] Jackson, M.M., Hou, L.H., Banerjee, H. N, Sridhar, R., Dutta, S. K., “Disappearance of 2,4-Dinitrotoluene and 2-Amino,4,6-Dinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* Under Non-Ligninolytic Conditions”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62:390-396, (1999).
- [41] Parrish F.W., “Fungal Transformation of 2,4-Dinitrotoluene and 2,4,6-Trinitrotoluene” , *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(2):232-233, (1977).
- [42] Shin K.H., Lim Y., Ahn J.H., Khil J., Cha C.J. and Hur H. G., “Anaerobic biotransformation of dinitrotoluene isomers by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain 27 isolated from earth worm intestine”, *Chemosphere*, 61:30–39,(2005).
- [43] <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrobacter>
- [44] Krieg, N.R., Holt, J.G., “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Lippincot Williams and Wilkins, Vol.2, New York, U.S.A., (1983).
- [45] Vaishampayan P.A., Kanekar P.P. and Dhakephalkar P.K., “Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436,an atrazine-degrading bacterium,from rhizospheric soil”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60:273–278, (2007).
- [46] Widehem P., Aït-Aïssa S., Tixier C., Sancelme M.,Veschambre H.and Truffaut N., “Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2”, *Chemosphere*, 46:527– 534,(2002).
- [47] Seo J.S., Keum Y.S., Hu Y., Lee S.E. and Li Q.X., “Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10- dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2 dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids”, *Chemosphere* , 65:2388–2394, (2006).

- [48] Tixier C., Sancelme M., Aït-Aïssa S., Widehem P., Bonnemoy F., Cuer A., Truffaut N. and Veschambre H., “Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi”, *Chemosphere*, 46:519–526,(2002).
- [49] Turnbull G.A., Ousley M., Walker A., Shaw E. and Morgan J.A.W., “Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* Strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, *puhA*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5):2270–2275, (2001).
- [50] Pohlenz H.D., Boidol W., Schütte I. And Streber W.R., “Purification and Properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 Carbamate Hydrolase Specific for the Herbicide Phenmedipham and Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene”, *J. Bacteriol.*, 174 (20):6600-6607,(1992).
- [51] Hayatsu, M., Hirano M. and Nagata T., “Involvement of Two Plasmids in the Degradation of Carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3):1015–1019, (2001).
- [52] Piñar G. and Ramos J.L. “A strain of *Arthrobacter* that tolerates high concentrations of nitrate”, *Biodegradation*, 8:393–399, (1998).
- [53] Piñar G., Oliva J.M., Barbero L.S., Calvo V. and Ramos J.L., “Removal of Nitrate from Industrial Wastewaters in a Pilot Plant by Nitrate-Tolerant *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 and *Arthrobacter Globiformis* CECT 4500”, *Biotechnol Bioeng.*, 58(5):510-4,(1998).
- [54] Margesin R. and Hinner F., “Bacterial heavy metal-tolerance-extreme resistance to nickel in *Arthrobacter* spp. Strains”, *J. Basic Microbiol.*, 36 (4):269-282, (1996).
- [55] Paris D. and Blondeau R., “Isolation and Characterization of *Arthrobacter* sp. From Activated Sludge Of A Pulp and Paper Mill”, 33(4):947-950, (1999).

- [56] Jianlong, W, Yi, Q., Horan, N., and Stentiford, E., “Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass”, *Bioresource Technology*, 75:157-161,(2000).
- [57] Tope A.M., Jamil K. and Baggi T.R., “Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Immobilized and Resting Cells Of *Arthrobacter* Sp.”, *Journal of Hazardous Substance Research*, 2:1-9, (1999).
- [58] Westerberg, K., Elvang, A.M., Stackebrandt, E. and Jansson, J.K., “*Arthrobacter chlorophenicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:2083–2092, (2000).
- [59] Suda, M., Tan, H.M., Nishi, A., and Furukawa, K., “Mobile Catabolic Genes in Bacteria”, *J. Biosci. Bioeng.*, 87(4):401-410, (1999).
- [60] Sanz, J.L., Köchling, T., “Molecular Biology techniques used in wastewater treatment: An overview”, *Process Biochemistry*, 42:119-133, (2007).
- [61] Sayler, G.S., Shields, M.S., Tedford, E.T., Breen, A., Hooper, S.W., “Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1295–1303, (1985).
- [62] Hosein, S.G., Millette, D., Butler, B.J., Greer, C.W., “Catabolic gene probe analysis of an aquifer microbial community degrading creosote-related polycyclic aromatic and heterocyclic compounds”, *Microbiol. Ecology*, 34:81–89. (1997).
- [63] Pernthaler, A. and Amann, R., “Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5426-5433, (2004).

- [64] Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K.N., and Ramos, J., "Regulator and enzyme specificities of TOL plasmid- encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway", J. Bacteriol., 171(12):6782- 6790, (1989).
- [65] Çetin, E.T., "Pratik Mikrobiyoloji", Menteş Matbaası, Ankara, (1968).
- [66] Spear, J.R., Figueroa, L.A., and Honeyman, B.D., "Modeling Reduction of Uranium U(VI) under Variable Sulfate Concentrations by Sulfate-Reducing Bacteria", Appl. Environ. Microbiol., 66 (9):3711-3721, (2000).
- [67] Schuppler, M., Wagner, M., Schan, G., and Gabel, U.B., "In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes", Microbiol., 144:249-259, (1998).
- [68] Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., and Amann, R., "Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA- targeted oligonucleotide probes", Methods in Microbiology: Marine Microbiology,(ed. Paul J.), methods in microbiol., Academic Press Ltd, London, vol:30, (2001).
- [69] Huy N.Q., Jin S., Amada K., Harukl M., Huu N.B., Hang D.T., Ha D.T.C., Imanaka T., Morikawa M.and Kanaya S., "Characterization of Petroleum-Degrading Bacteria from Oil-Contaminated Sites in Vietnam", J.Biosci. Bioeng., 88(1):100-102, (1999).
- [70] Giedraitytė G., Kalėdienė L. And Bubinas A., "Correlation between biosurfactant synthesis and microbial degradation of crude oil hydrocarbons", Ekologija, 3:38-41, (2001).
- [71] Reisfeld A., Rosenberg E.and Gutnick D.," Microbial Degradation of Crude Oil: Factors Affecting the Dispersion in Sea Water by Mixed and Pure Cultures", Appl. Microbiol., 24(3):363-368, (1972).
- [72] Rosenberg, E., Zuckerberg A., Rubinovitz C. and Gutnick D.L., "Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1:Isolation and Emulsifying Properties", Appl. Environ. Microbiol., 37(3):402-408, (1979).

- [73] Madigan, M.T., Martinko, J.M., “Broock biology of microbiology”, eleventh ed.,(Editör: Çökmüş, C.), Palme yayıncılık, Türkiye, sy 309, (2010).
- [74] Waasbergen, L.G.V., Balkwill D.L., Crocker F.H., Bjornstad B.N. and Miller R.V., “Genetic Diversity among *Arthrobacter* Species Collected across a Heterogeneous Series of Terrestrial Deep-Subsurface Sediments as Determined on the Basis of 16S rRNA and *recA* Gene Sequences”, Appl. Environ. Microbiol., 66(8):3454–3463, (2000).
- [75] Koch, C., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E., “16S rDNA studies on members of *Arthrobacter* and *Micrococcus*: An aid for their future taxonomic restricting”, FEMS Microbiology Letters, 123(1-2):167-171, (2006).
- [76] Koch C., Schumann P. and Stackebrandt E., “Reclassification of *Micrococcus agilis* (Mi-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and Emendation of the Genus *Arthrobacter*”, Int. J. Syst. Bacteriol, 45(4):837-839, (1995).
- [77] Tang J.S. and Gillevet P.M., “Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:995–997, (2003).
- [78] Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O. and Schumann P., “Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend.”, Int. J. Syst. Bacteriol, 45(4):682-692, (1995).
- [79] Haigler B.E., Johnson G.R., Suen W.C. and Spain J.C. “Biochemical and Genetic Evidence for *meta*-Ring Cleavage of 2,4,5-Trihydroxytoluene in *Burkholderia* sp. Strain DNT” , J. Bacteriol., 181(3):965–972, (1999).
- [80] French, C. E., Nicklin, S., and Bruce, N.C., “Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase”, Apply. Environ. Microbiol., 64 (8):2864–2868, (1998).

- [81] Huang, S., Lindalh, S. H., Wang, C., Bennett, G.N., Rudolph, F. B., and Hughes, J.B., “ 2,4,6-Trinitrotoluene reduction by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*”, *Apply. Environ. Microbiol.*, 66(4) :1474-1478, (2000).
- [82] Hasan F., Makhdoom A., Shah A.A. and Hameed A., “Biodegradation of 2, 4-dinitrotoluene by bacteria isolated from TNT containing effluent”, *IET BioSysBio*, UK, Poster session 1, (2009).
- [83] Jain, R.K., and Chauhan, A., “Degradation of o-nitrobenzoate via anthranilic acid (o-Aminobenzoate) by *Arthrobacter protophormiae*: A plasmid-encoded new pathway”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267:236–244, (2000).
- [84] Jerke, K., Nakatsu, C: H., Beasley, F., and Konopka, A., “Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids”, *Plasmid* 59:73–85, (2008).
- [85] Nishino, S.F., Paoli, G.C., and Spain, J.C., “Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene”, 66(5):2139–2147. (2000).
- [86] Suen, W.C., Haigler, B.E., and Spain, J.C., “2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: Similarity to naphthalene dioxygenase”, *J. Bacteriol.*, 178(16):4926–4934,(1996).
- [87] Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., Brodovich, H.O., and Lukacs, G.L., “Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer”, *Gene Therapy* ,6: 482–497, (1999).
- [88] Wilschut, K.J., Aa, M.A.E.M. van der, Oosting, R.S., Hennink, W.E., Koning, G.A, Crommelin, D.J.A., Mastrobattista, E., “Fluorescence in situ hybridization to monitor the intracellular location and accessibility of plasmid DNA delivered by cationic polymer-based gene carriers”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72: 391–396,(2009).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Pınar KÜCE

Doğum Tarihi: 02/05/1983

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen/ Matematik	Keçiören/Kalaba Lisesi	1997-2000
Lisans	Fen/Edb. Fak./Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2002-2007
Yüksek Lisans	Fen Bil. Enst./Biyoloji	Mersin Üniveritesi	2007-devam

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniveritesi Fen/Edb. Fak. Biyoloji Bölümü	2008-devam etmekte.