

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PETROKİMYA TESİSİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI
MİKROORGANİZMALARIN TEREFİTALİK ASİT
VE 1,2 DİKLOROETAN BİYOPARÇALANMA
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Didem EROĞLU BAYRAK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güven Özdemir

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.04.00

Sunuş Tarihi 14 Şubat 2013

Bornova-İZMİR

2013

Didem Eroğlu Bayrak tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan "**Petrokimya Tesisinden İzole Edilen Bazı Mikroorganizmaların Terefitalik Asit ve 1,2 Dikloroetan Biyoparçalanma Etkinliğinin İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14 Şubat 2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Güven Özdemir
Raportör Üye	: Prof. Dr. İsmail Karaboz
Üye	: Prof Dr. Nurdan Pazarlıoğlu

ÖZET**PETROKİMYA TESİSİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI
MİKROORGANİZMALARIN TEREFİTALİK ASİT VE 1,2
DİKLOROETAN BİYOPARÇALANMA ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

EROĞLU BAYRAK, Didem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Şubat 2013, 74 sayfa

Bu tez çalışmasında Petkim Petrokimya Holding A.Ş atık su arıtma ünitesinden alınan örneklerden terefitalik asit ve 1,2 dikloroetan biyoparçalama yeteneğindeki mikroorganizmaların izolasyonu ve tanılanması yapılmış ve parçalama etkinliklerinin belirlenmiştir. Terefitalik asit için izole edilen 4 organizmanın *Pseudomonas* sp, *Chryseobacterium* sp. *Arthrobacter nicotianae* ve *Burkholderia* sp, olduğu belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen mikroorganizmaların terefitalik asiti %100 biyoparçalama etkinliği gösterdiği saptanmıştır. 1,2 dikloroetan kimyasalı için elde edilen organizmaların biyoparçalama etkinliğinin belirlenmesi için ise GC analizi yapılmıştır. Etkinliği belirlenen 2 organizma sırasıyla *Arthrobacter* sp. ve *Microbacterium* sp. olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoparçalama, terefitalik asit, 1,2 dikloroetan, Petrokimya endüstrisi, HPLC, GC.

ABSTRACT**ANALYSING THE BIODEGRADATION OF TEREPHTHALIC ACID AND 1,2 DICHLOROETHANE VIA SOME MICROORGANISM WHICH WAS ISOLATED FROM PETROCHEMICAL SYSTEM**

EROĞLU BAYRAK , Didem

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

February 2013, 74 pages

In this thesis, It was carried out that the isolation, identification and investigation of biodegradation efficiencies of the microorganisms that have abilities to degrade terephthalic acid and 1,2 dichloroethane from the samples taken from the waste water treatment unit of Petkim Petrochemical Holding A.Ş. The biodegradation efficiencies of the isolates which has identified as *Pseudomonas* sp, *Chrysobacterium* sp. *Burkholderia* sp. and *Arthrobacter nicotinae* investigated by HPLC analysis. It was reported that the degradation ratios of terephthalic acid has been calculated %100. 1,2 dichloroethane biodegradation efficiencies of the isolates which has identified as *Arthrobacter* sp. and *Microbacterium* sp. investigated by GC analysis.

Keywords: Biodegradation, Terephthalic acid, 1,2 dichloroethane, Petrochemical industry, HPLC, GC.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması SANTEZ 0639-STZ 2010-2 ve 060 nolu Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiş olup maddi desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güven Özdemir başta olmak üzere, sayın hocam Prof. Dr. İsmail Karaboz 'a ve Prof. Dr. Nurdan Pazarlıoğlu'na çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan arkadaşlarım Burçin Saygılı, Caner Vural ve Ezgi Tunç'a emeği geçen tüm Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ailesine teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen annem Ayşegül EROĞLU, babam Süleyman EROĞLU, kardeşim Dinçer EROĞLU'ya her zaman yanımda olan, beni destekleyen, fikirlerini benimle paylaşan eşim Engin BAYRAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
RESİMLER DİZİNİ	xix
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Çevre Kirliliği ve Biyoparçalanma	3
2.1.1 Biyoparçalanmaya etki eden faktörler	7
2.1.2 Biyoparçalanmada iş gören mikroorganizmalar	8
2.1.3 Kirleticilerin toksisiteleri	9
2.2 Tereftalik asit	13
2.2.1 Tereftalik asit biyoparçalanmasında iş gören mikroorganizmalar	13
2.2.2 Tereftalik asit parçalanma yol izi	14
2.3 Klor İçeren Hidrokarbonların Çevreye Etkisi.....	15

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1 1,2 dikloroetan	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Biyoparçalanmada kullanılacak mikroorganizmalar.....	20
3.1.2 İzolasyonda kullanılan besiyeri ve içerikleri.....	20
3.1.3 İzolatların yıkanmasında kullanılan çözeltiler.....	22
3.1.4 İzolatların mikroskopik tanılanmasında kullanılan kimyasallar.....	22
3.1.5 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.....	23
3.1.6 Kimyasalların çözünmesinde ve diğer analizlerde kullanılan çözgenler.....	23
3.1.7 DNA'ların görüntülenmesinde kullanılan kimyasallar.....	24
3.1.8 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	24
3.2 Yöntem.....	26
3.2.1 Tereftalik asit ve 1,2 dikloroetanı parçalama yeteneği bulunan mikroorganizmaların seçilmesi.....	26
3.2.2 İzole edilen mikroorganizmaların biyoparçalanma etkinliklerinin belirlenmesi.....	27
3.2.3 Seçilen mikroorganizmaların ön tanılanmaları.....	30

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4 Seçilen mikroorganizmaların moleküler tanılanması.....	31
4. BULGULAR.....	36
4.1 İzolatların Mikroskobik, Kültürel ve Biyokimyasal Tanılamaları.....	38
4.1.1 Terefitalik asit sonuçları.....	38
4.1.2 1,2 dikloroetan sonuçları.....	41
4.2 İzolatların Biyoparçalanma Etkinliğinin Belirlenmesi.....	45
4.2.1 Terefitalik asit sonuçları.....	45
4.3 İzolatların Moleküler Tanılamaları.....	56
4.3.1 DNA izolasyonu ve saflık kontrolü.....	56
4.3.2 PZR ürünleri saflık kontrolü.....	56
4.3.3 PZR ürünlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi.....	56
4.3.4 Filogenetik ağaç oluşturulması.....	61
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	62
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Fitalik asit izomerleri ve esterleri.....	11
2.2 Fitalat izomerleri.....	13
2.3 Paraksilenin oksidayonunda oluşan bileşikler.....	13
2.4 Terefitalik asitin biyoparçalanma yol izi.....	15
2.5 1,2 dikloroetanın kimyasal yapısı.....	16
2.6 <i>Pseudomonas</i> sp. DCA1 , <i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10 ve <i>Ancylobacter aquiticus</i> AD25 'e ait EDC'nin farklı parçalanma yol izleri.....	19
4.1 Pasajlama esnasındaki terefitalik asit içeren Bushnell Haas Broth ortamı ve ortamdaki biyoparçalamaya yeteneğindeki mikroorganizmalar.....	36
4.2 Bushnell Haas Agar ortamında büyüyen mikroorganizmalar.....	37
4.3 Pasajlama sonrası terefitalik asit içeren PCA ortamına aktarılan mikroorganizmaların büyümesi.....	37
4.4 İzolat T1'in Gram boyama görüntüsü (100x).....	39
4.5 İzolat T4'ün Gram boyama görüntüsü (100x).....	39
4.6 İzolat T5'in Gram boyama görüntüsü (100x).....	40
4.7 İzolat TK'nın Gram boyama görüntüsü(100x).....	40
4.8 T1,T4,T5,TK kodlu izolatların PCA ortamındaki görüntüsü.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 Kör erleni ve E4b izolatının Bushnell Haas Broth ortamındaki görüntüsü....	42
4.10 E2b ve E4b kodlu izolatların mikroskopik görüntüsü.....	43
4.11 E2b, E4b ve E6b kodlu izolatların petri görüntüsü.....	44
4.12 Universal primerlerle çoğaltılmış PZR ürünlerinin %1 agaroz jelde yürütülerek bantların belirteç DNA dizileri ile karşılaştırılması.....	56
4.13 İzolatların filogenetik ağacı.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Biyoremediyasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan kimyasallar.....	6
2.2 Biyoparçalanmayı etkileyen faktörler.....	8
2.3 Zararlı kimyasalları parçalayan başlıca mikroorganizma grupları.....	8
2.4 1,2 dikloroetanın etki yolu ve sağlığa zararları.....	10
2.5 Fitalat ve fitalat esterlerini parçalayan mikroorganizmalar.....	12
2.6 Terefitalik asit biyoparçalanmasında iş gören bazı mikroorganizmalar ve parçalama konsantrasyonu.....	14
2.7 1,2 dikloroetanın özellikleri.....	16
3.1 Bushnell Haas Broth.....	20
3.2 Bushnell Haas Agar.....	20
3.3 Plate Count Agar.....	21
3.4 Phosphate Buffer Saline.....	22
3.5 Kristal Viyole Solüsyonu.....	22
3.6 Gram İyodür Solüsyonu.....	23
3.7 Safranin Solüsyonu.....	23
3.8 Çözgenler listesi.....	23
3.9 PZR bileşenleri ve miktarları.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.10 Konvensiyonel PZR'da kullanılan primer setleri.....	34
3.11 PZR koşulları.....	34
4.1 Elde edilen izolatlar.....	38
4.2 Terefitalik asit çalışmasında kullanılan izolatların özellikleri.....	39
4.3 1,2 dikloroetan çalışmasında kullanılan izolatların özellikleri.....	42
4.4 JX480627 aksesyon numarası ile Genbank' a kayıt ettirilen izolat T1: <i>Pseudomonas putida</i> 16S rDNA dizisi.....	57
4.5 JX480628 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat T4: <i>Chrysobacterium</i> sp. 16S rDNA dizisi.....	57
4.6 JX480629 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat T5: <i>Burkholderia cepacia</i> 'nın 16S rDNA dizisi.....	57
4.7 JX480630 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat TK: <i>Arthrobacter nicotinae</i> 'nın 16S rDNA dizisi.....	58
4.8 KC480441 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat E2b kodlu <i>Arthrobacter</i> sp'nin 16S rDNA dizisi.....	58
4.9 KC480442 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat E4b kodlu <i>Microbacterium</i> sp 16S rDNA dizisi.....	59
4.10 İzolat E6b: <i>Pseudomonas fluorescens</i> 16S rDNA dizisi.....	59
4.13 İzolatların NCBI'daki benzerlik oranları.....	60

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Exxon Valdez patlaması sonucunda oluşan görüntüler	4
2.2 Meksika Körfezine açılan Mississippi Deltası ve açıklarındaki, petrol sızıntısının fotoğrafı.....	4

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Terefitalik asit standart grafiği.....	45
4.2 T1 izolatının HPLC sonuçları.....	46
4.3 T4 izolatının HPLC sonuçları.....	47
4.4 T5 izolatının HPLC sonuçları.....	48
4.5 TK izolatının HPLC sonuçları.....	49
4.6 Terefitalik asit denemesinde kullanılan kör erleninin HPLC sonuçları.....	51
4.7 1,2 dikloroetanın GC analizinde saptanması.....	52
4.8 1,2 dikloroetan içeren kör erleni denemesindeki değişimler.....	53
4.9. E2b, E4b, E6b kodlu izolatların GC analizi ile biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi.....	54

1.GİRİŞ

Endüstri ve insan aktiviteleri nedeniyle giderek artan çevresel sorunlar dünyanın pek çok yerinde acilen çözüm bekleyen bir problemdir. Çeşitli uluslararası kuruluşlar tarafından '20. yüzyılın kanseri' olarak tanımlanan ve 21.yüzyılda da dünyadaki sorunların ilk sırasında yer alan çevre ve çevre sağlığı, kalkınma ve yaşam standartlarını geliştirme gayreti içinde olan insanlığın yarattığı ve sonucunda da yine kendisinin etkilendiği bir sorundur (Yalaki, 2005).

Günümüzün önemli çevre kirlilik kaynaklarından biride petrokimya endüstrisi atık sularıdır. Çevreyi ve dolayısıyla insan sağlığını da olumsuz etkileyen petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan tehlikeli kimyasallar; toprağa, suya ve atmosfere karışmaktadır. Atık sularda bulunan bu kimyasallar insan sağlığını da ciddi oranda tehlikeye sokmaktadır. Bu kimyasallardan en önemlileri arasında yer alan tereftalik asit ve 1,2 dikloroetan; plastik, polivinil klorür (PVC), boya, yapıştırıcı gibi günlük hayatımızda sıklıkla kullandığımız ürünlerin hammaddeleri arasında yer almaktadır.

Mikroorganizmaların zararlı kimyasalları parçalamasıyla ilgili çalışmalar 1895 yılında Miyoshi tarafından ilk kez yayınlanmıştır. Sonraki çalışmalarda ise bakteriler, mayalar gibi birçok farklı mikrobiyal türün çeşitli hidrokarbonları parçalama kapasitesinde olduğu belirlenmiştir. Hidrokarbonları parçalayabilme yeteneği en iyi olan mikrobiyal grup ise bakteriler olarak belirlenmiştir (Kaczorek et al., 2007). Günümüzde de petrokimya endüstrisi atık sularının doğal yollarla arıtılmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır.

Biyolojik arıtım ile zararlı kimyasalların kullanılmasında karşımıza birçok kavram çıkmaktadır. Bunlardan sıklıkla kullanılanlardan biride biyoremediyasyondur. Biyoremediyasyon mikroorganizmaların zararlı kimyasalı karbon veya enerji kaynağı olarak kullanarak en azından daha az zararlı bir kimyasala dönüşmesini kapsamaktadır. Biyodegradasyon (biyoparçalama – biyoyıkım) tanımı ise kimyasalın karbondioksit ve suya kadar parçalanmasını ifade etmektedir.

Tez çalışmasında; Petkim Petrokimya Holding A.Ş atık su arıtma ünitesinden alınan örneklerden tereftalik asit ve 1,2 dikloroetan kimyasallarını parçalama yeteneğinde olan mikroorganizmaların kültürel tekniklerle seçilmesinin ardından Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) ve Gaz Kromatografisi (GC) ile parçalama etkinliklerinin belirlenmesi, daha sonrasında ise etkinliği belirlenen izolatların morfolojik, biyokimyasal ve DNA tabanlı moleküler tanılamaları hedeflenmiştir.

Yapılan çalışma toksijenik ve özellikle kanserojenik olan bu iki önemli kirleticinin çevreye ve dolayısıyla insanlara verdiği zararı mikroorganizmalar aracılığıyla yok etmeyi veya azaltmayı hedeflemiştir. Biyoparçalama etkinliği saptanan mikroorganizmaların belirlenmesi, tanılanması ve üretilebilmesi durumunda, bu kimyasallarla kontamine olmuş alanlarda denenerek hem ülkemizdeki hem de dünyadaki çevresel kirliliğin önlenmesinde önemli katkıları olması beklenmektedir. Ayrıca bu çalışma Petkim Petrokimya Holding A.Ş tarafından kullanılacak mikroorganizmaların temin edilmesi için gereken maliyetin düşürülmesi açısından özel bir öneme sahiptir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Çevre Kirliliği ve Biyoparçalanma

Toplumun ekonomik büyümesi, dünya nüfusundaki artış ve buna paralel olarak endüstrileşme sürecindeki hızlı değişim ile birlikte çevreye yayılan kirleticilerin miktarı ve çeşidi her geçen gün artmaktadır. Canlı ve yaşadığı çevre üzerinde yapısal zararlar meydana getiren, organik ve inorganik yapıdaki kirleticilerin hava, su ve toprağa karışması olayına "çevre kirliliği" adı verilmektedir (Kösesakal, 2011).

İnsan aktivitelerinin sonucu olarak çevreye bırakılan organik ve inorganik bileşiklerin büyük kısmı ciddi çevresel problemlere sebep olmaktadır. Toksik, mutajen, karsinojen ve/veya kalıcı özellikteki kirleticiler, insan sağlığını, tarımsal verimliliği ve çevreyi tehdit etmektedir. Bu kirleticiler toplam petrol hidrokarbonları (TPH), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), halojenli hidrokarbonlar, pestisitler, solventler ve metallerdir (Greenberg et al., 2007). Çevresel problemlerin en önemlilerinden biri; petrokimya endüstrisi aktivitelerinin sonucu oluşan tehlikeli kimyasallardır. Bunların başında gelen hidrokarbonlar ve diğer kimyasallar çevresel kaynaklara kontamine olmaktadır. Özellikle petrokimya fabrikalarının olduğu bölgelerde toprak yüzeylerine ve su sistemlerine yüksek oranda karışmaktadır (Shokrollahzadeh et al., 2008).

Son zamanlarda havada ve karada yarattığı olumsuz etkilerin yanısıra deniz ortamında da neden olduğu kalıcı etkiler nedeni ile tanker kazalarından kaynaklanan petrol kirliliği ve petrol dökülmelerinin hassasiyetle üstünde durulmaktadır. 1989 yılında Alaska'da Exxon Valdez isimli bir tankerin patlaması sonucu 10,8 milyon galon petrol çevreye saçılmıştır (Resim 2.1). Bu olaydan sonra biyoremediyasyon alanında kullanılan teknikler hızla gelişmiştir. Exxon şirketi tarafından desteklenen biyoremediyasyon çalışmalarına 10 milyon dolardan fazla yatırım yapılmış ve bu alanda birçok patent alınmıştır (Juhasz et al., 2000; Van Hamme et al., 2003).



Resim 2.1. Exxon Valdez patlaması sonucunda oluşan görüntüler.

<http://crisispictures.blogspot.com/2011/11/exxon-valdez-oil-spill.html>

Deepwater Horizon petrol platformunun 20 Nisan 2010'da patlaması sonucunda oluşan petrol sızıntısı, eşi benzeri görülmemiş bir çevre felaketine yol açmıştır. Petrol sızıntısı balıkçılığa ciddi zarar verirken, körfezin büyük bir bölümünde balıkçılık faaliyetleri yasaklanmıştır. Deniz hayvanlarının zarar gördüğü bu kaza sonucu biyolojik çeşitliliğin olumsuz etkilenmesinden korkulmaktadır. Araştırmacılar bu kazanın etkilerinin Exxon Valdez faciasından daha büyük boyutlarda olacağını açıklamıştır. Sızıntı ile yüzeye çıkan petrolün akıntılar ile yayıldığı NASA tarafından fotoğraflanmış ve tehlikenin boyutları gözler önüne serilmiştir (Resim 2.2) (Hagerty, 2010).



Resim 2.2: Meksika Körfezine açılan Mississippi Deltası ve açıklarındaki, petrol sızıntısının fotoğrafı .http://www.nasa.gov/topics/earth/features/oilspill/20100517_spill.html

Yaşanan tüm bu olumsuz olaylar çevre kirliliğinin çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu çevre teknolojileri; canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanılmasını kapsamaktadır. Geleneksel yöntemlerden çok daha verimli olan çevre biyoteknolojisi yöntemleri sayesinde, yüksek sıcaklıklarda yakma ve atık sahaları oluşturma gibi yöntemlere alternatifler oluşturulabilmektedir. Çevre konusundaki hassasiyetlerin artmasıyla çevre biyoteknolojisi uygulamaları artacaktır. Bugün, dünyadaki birçok kent atık sularını temizlemek için mikroorganizmaları kullanmakta ve bu kentlerin sayısının hızla artması beklenmektedir. Temizlenmesi yasal olarak zorunlu bölgelerin (maden alanların endüstriyel bölgeler, su kaynakları vb.) geleneksel yöntemlerle temizlenmesinin maliyeti oldukça fazladır. Çevre biyoteknolojisi yöntemleriyle kirli bölgelerin, bu tutarın çok daha altında temizlenebileceği hesaplanmaktadır (Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Biyoparçalanma; organik bileşiklerin, karbondioksit ve suya kadar parçalanmasını ifade etmektedir (Das and Chandran, 2011). Biyoparçalanma işlemi, genellikle ortamda doğal olarak bulunan birçok organizmanın ortak metabolik etkileşimleri ile verimli bir şekilde gerçekleşir. Bu nedenle, biyoparçalanma yeteneğindeki mikroorganizmaların kullandıkları metabolik yol izlerinin belirlenmesi biyoremediyasyon uygulamalarının etkinliğinin arttırılabilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Biyoremediyasyon ise mikroorganizmalar kullanılarak zararlı maddeleri toksik olmayan bileşiklere dönüştüren bir proses olup tehlikeli atıkların arıtılması için kullanılan ümit verici tekniklerden biridir (Alexander, 1999). Biyoremediyasyon mikroorganizmaların kirleticileri bünyelerine alma kapasitesine sahip olmaları ve bu kirleticileri büyüme ve metabolik faaliyetleri için kullanmaları esasına dayanmaktadır. Biyoremediasyon tasarımının asıl amacı, mikrobiyal büyüme ve aktivite için en uygun şartların sağlanmasıdır. Biyoremediyasyon için en uygun kimyasal maddeler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Çizelge 2.1. Biyoremediyasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan kimyasallar (Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Kimyasallar	Örnekler
Dehalojenize aromatik bileşikler	Benzen, Toluen, Ksilen (BTEX)
Polinükleer aromatik hidrokarbonlar	Piren, Floren
Poliklorlanmış bifeniller	Triklorobifenil
Klorofenoller	Penteklorfenoller
N içeren heterosiklikler	Piridin
Klor içeren solventler	Kloroform, trikloroetilen, Vinil klorid
Klor içermeyen fenolikler	2-metil fenol
Herbisit ve pestisitler	

Biyoremediyasyon doğal yollarla gerçekleşen ve maliyet açısından diğer yöntemlere göre daha ekonomik bir proses olması sebebiyle oldukça avantajlıdır. Ancak arıtım süresinin uzun olması ve yüksek kirletici konsantrasyonlarında verimli sonuçlar elde edilememesi yöntemin kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır.

Biyoaugmentasyon işlemi ise bir biyoremediyasyon uygulaması olup, biyoparçalama yeteneğine sahip mikroorganizmaların kirli alanlara aktarılma işlemidir. Kirli alanlarda bulunan yerli flora üyesi mikroorganizmaların ortamda bulunan kimyasalları parçalama yeteneği zayıf veya hiç olmayabilmektedir.

2.1.1 Biyoparçalanmaya etki eden faktörler

Petrokimyasal atıksularda bulunan organik bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılmasında aktif çamur sistemleri kullanılmaktadır. Aktif çamurun mikrobiyal kompozisyonu ve aktivitesi; besine, çözünmüş oksijen miktarına, çalkalanma derecesine sıcaklık ve pH gibi faktörlere bağlıdır (Shokrollahzadeh et al., 2008).

Abiyotik faktörlerden pH, besin kullanılabilirliği veya oksijen seviyesi biyoparçalanmayı etkilese de, mikrobiyal işlemlerin parçalanmada öncül sorumlu olduğu bilinmektedir (Doyle et al., 2008).

Sıcaklık artışı ortamdaki kullanılabilir oksijenin ve buna bağlı olarak aerobik biyoparçalanmanın azalmasına sebep olabilmektedir. Biyolojik parçalanma oranları genellikle sıcaklığın düşmesiyle azalır. Oksijen, aerobik biyoparçalanmada monooksijenaz ve dioksijenaz enzimleri için gereklidir (Hwang et al., 2007). Bu nedenle aerobik biyoparçalanmanın gerçekleştirileceği ortamların oksijenle zengin olması gerekmektedir.

Mikroorganizmaların maksimum biyoparçalanma aktivitesi gösterebilmeleri için ortamda bulunan organik ve inorganik maddeler arasında bir denge olmalıdır. Biyoparçalanmayı sınırlayan en önemli elementler azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) dir. Organizmaların pH istekleri, buldukları ortamda en uygun metabolik aktiviteyi gösterebilmeleri için önem taşımaktadır (Leahy et al., 1990).

Yapılan çalışmalar ışığında hidrokarbonların parçalanmasında temel olarak bakteri ve fungusların iş gördüğü bilinmektedir. Bunun dışında siyanobakteri, arkea, alg ve maya gruplarından da parçalayan birçok organizmanın mevcut olduğu bilinmektedir. En uygun sıcaklık, pH ve oksijen gibi parametreler temizlenmek istenen alanın bulunduğu çevre koşullarına ve parçalanmada iş gören mikroorganizmaların metabolizma tiplerine göre belirlenmektedir (Hwang et al., 2007). Çizelge 2.2’de biyoparçalanmanın verimliliğini etkileyen diğer şartlar da kısaca özetlenmiştir (Balba et al., 1998).

Çizelge 2.2. Biyoparçalanmayı etkileyen faktörler (Balba et al., 1998).

Uygun kimyasal ve biyolojik faktörler	Uygun olmayan kimyasal ve biyolojik faktörler
Mikroorganizmaların çeşitliliği	Düşük mikrobiyal populasyon
Az sayıda organik kirlilik	Organik ve inorganik kirleticilerin çokluğu
Aşırı toksik olmayan kirleticiler	Toksik kirleticiler
Uygun pH aralığı	Uygun olmayan pH aralığı

2.1.2. Biyoparçalanmada iş gören mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar; oksijen, sıcaklık, pH gibi etmenlerin azlığı/ çokluğu yada ortamda zararlı kimyasalların olması gibi bir çok farklı duruma adapte olabilir ve tüm çevresel koşullardan izole edilebilirler. Zararlı kimyasalları parçalamaya adapte olan başlıca mikroorganizma grupları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (Vidali, 2001).

Çizelge 2.3. Zararlı kimyasalları parçalayan başlıca mikroorganizma grupları (Vidali, 2001).

Aerobik	Oksijen varlığında kontamine olan hidrokarbonları, poliaromatik hidrokarbonları, pestisitleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar.
Anaerobik	Oksijen yokluğunda trikloroetilen, kloroform gibi kimyasalların parçalanmasında kullanılmaktadır.
Ligninolitik Funguslar	Özellikle beyaz çürükçül fungus olan <i>Phanaerochaete chrysosporium</i> , toksik çevresel kirleticilerin parçalanmasında iş görmektedir.
Metilototroflar	Metan kullana aerobik bakterilerdir. Trikloroetilen ve 1,2 dikloroetan biyoparçalanmasında iş görmektedir.

Organik kirleticilerle kontamine olan alanlardaki mikrobiyal parçalama çalışmalarına bakıldığında çoğunlukla kemoorganotrofik türlerle olmaktadır. Kemoorganotroflar çok sayıdaki doğal veya ksenobiyotik bileşenleri karbon kaynağı ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Organik kirleticileri aerobik şartlarda parçalayan mikroorganizmaların başlıcaları şunlardır; *Pseudomonas sp*, *Acinetobactersp.*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.* (Fritsche, 2005).

2.1.3 Kirleticilerin toksisiteleri

Petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan kimyasallar arasında yer alan 1,2 dikloroetan ve tereftalik asitin toksisiteleri ve çevreye verdiği zararlar günümüze kadar yapılan birçok çalışmada belirtilmektedir. Bu bileşiklerin pek çoğu toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinden dolayı US EPA (Amerika Çevre Koruma Kuruluşu) ve Avrupa Birliği tarafından önemli kirleticiler olarak sınıflandırılmıştır (ATSDR, 2005).

Klorlu hidrokarbonlar arasında yer alan 1,2 dikloroetanın canlılar üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak bilinmemekle beraber böcekleri, balıkları, kuşları ve insan dahil diğer canlıları da etkilemekte ve bünyeye alındığı takdirde zehir etkisi yapmaktadır. 1,2 dikloroetan; uçucu olmasından dolayı, en sık maruz kalma yolu teneffüsdür. Yine de cilde ve gözlere temasıyla da zarar verebilir. Solunum yoluyla alındığında toksik etkileri daha fazla olmaktadır. Yüksek dozlarda/konsantrasyonlarda, sinir ve sindirim sistemlerine zarar verir, baş dönmesi, mide bulantısı ve kusmaya neden olduğu bilinmektedir. Karaciğer, böbrek ve böbrek üstü bezleri de zarar görebilmektedir. Bu kimyasal koku ile anlaşılamayacak kadar düşük konsantrasyonlarda bile toksik olabilir (Snedecor, 1993). Çizelge 2.4' de EDC'nin etki yolu ve sağlığa zararı gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. 1,2 dikloroetanın etki yolu ve sağlığa zararları (Snedecor, 1993).

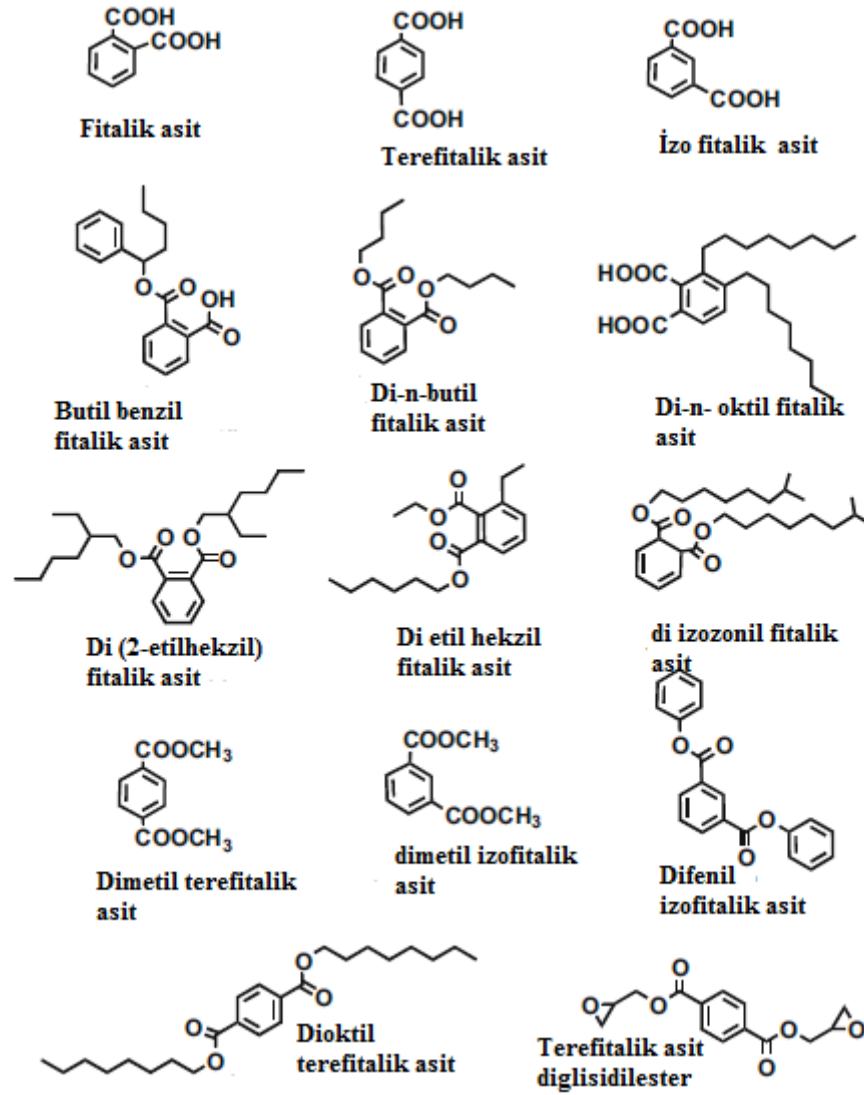
Endüstride kullanım yeri	Etki yolu ve aksimum sınır	Sağlığa zararı
Çözücü, parazit öldürücü, plastik hammaddesi olarak kullanılır	Solunum , deri ve ağızdan etki edebilmektedir. Maksimum sınır; 50 ppm.'dir.	Özellikle karaciğer, böbrek, akciğer kanserine, ödem oluşumuna neden olmaktadır.

Petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan zararlı kimyasal gruplarından bir diğeri ise fitalatlardır. Şekil 2.1'de çeşitli fitalik asit izomer ve esterleri gösterilmiştir (Krishna and Phale, 2007).

Fitalatlar ve fitalik asit esterleri, plastik ham maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Çoğunlukla plastik baskı işlemlerinde, PVC kaplamacılığında, PVC esaslı giysi ve ayakkabı aksesuarlarında kullanılmaktadır. Ayrıca fikse arttırıcı, deterjan, yağlayıcı ve çözücü olarak ta kullanılmaktadır. Plastik malzemelerde yumuşatıcı-esneklik kazandırıcı olarak kullanılan bu malzemeler çocuk oyuncaklarında da kullanılmaktadır.

Plastiklerin aşırı kullanımı ve dolayısıyla fitalatların üretimi sonucu fabrika atık sularına karışmakta böylelikle de doğaya yayılmaktadır. Bu durum da insan sağlığı açısından önemli bir sorundur. Çünkü doğada bulunan fitalatlar; hepatotoksik, teratojenik ve karsinojeniktir (Matsumata et al.,2008).

Plastik üretiminde kullanılan fitalat izomerleri veya esterlerine maruz kalan insanların; özellikle karaciğer ve üreme sistemlerine etki ettiği bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde National Toxicology Programın çalışmaları sonucu fitalat izomerleri ve esterlerinin farelerde karaciğer tümörüne neden olduğunun bulunması üzerine bu madde üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Fitalik asit esterlerinin karsinojenik etkileri hakkındaki son değerlendirmede Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Kanser Araştırma Merkezi (IARC) bu maddenin farelerde karsinojenik etkileri ile ilgili yeterli delil olduğunu bildirmektedir (IARC, 1982).



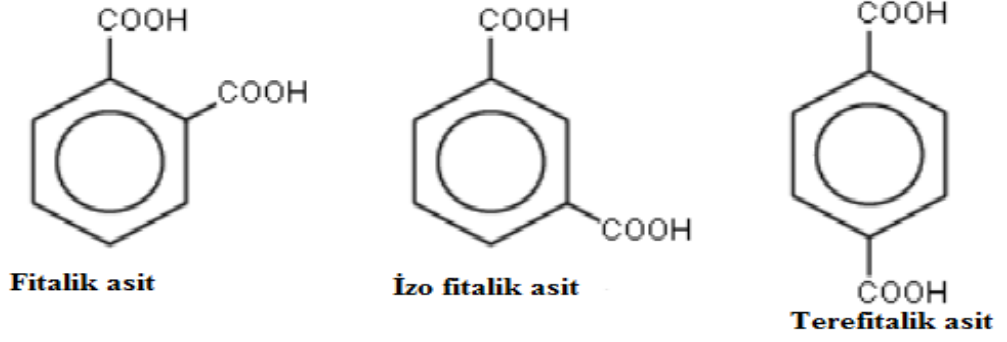
Şekil 2.1:Fitalik asit izomerleri ve esterleri (Krishna and Phale, 2007)

Fitalatların üretimine baktığımızda 1980'den 2000'li yıllara kadar 2 milyon tondan 5,5 milyon tona ulaştığı görülmektedir. Bu kadar çok kullanılıyor olmasının sonucu olarak ta bu zararlı kimyasalların doğaya ve insanlara zararı giderek artmaktadır. Son yıllarda bakteri ve funguslar aracılığıyla farklı koşullarda fitalat ve fitalat esterlerini parçalayan çok fazla çalışma mevcuttur (Liang et al.,2008). Fitalik asit ve esterleriyle ilgili yapılan çalışmalar Çizelge 2.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5:Fitalat ve fitalat esterlerini parçalayan mikroorganizmalar (Liang et al.,2008).

Mikroorganizmalar	Fitalat ve fitalat esterleri
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fitalat ve
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Dimetil fitalat
<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B	Fitalat ve
<i>Gordonia</i> sp. DK17	Terefitalat
<i>Sphingomonas</i> sp.DK4	Dietil fitalat ve
<i>Corynebacterium</i> sp. O18	Dipropil fitalat
<i>Variovorax paradoxus</i> T4	Dimetil terefitalat
<i>Delftia</i> sp. TBKNP-05	Di-n butil fitalat

Tez çalışmasında kullanılan terefitalik asit, fitalik asit izomeridir. Fitalik asit (PA), izo fitalik asit (IA) ve terefitalik asit (TA) olmak üzere fitalat izomerleri 3'e ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Bu tez çalışmasında; doğada diğerlerine göre daha bol bulunan ve daha zararlı olan terefitalik asit kullanılmıştır. Terefitalik asit; poliester kumaş yapımında, tekstil ürünlerinde , fotoğraf filmlerinde, plastik pet şişelerde ve polietilen terefitalat olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

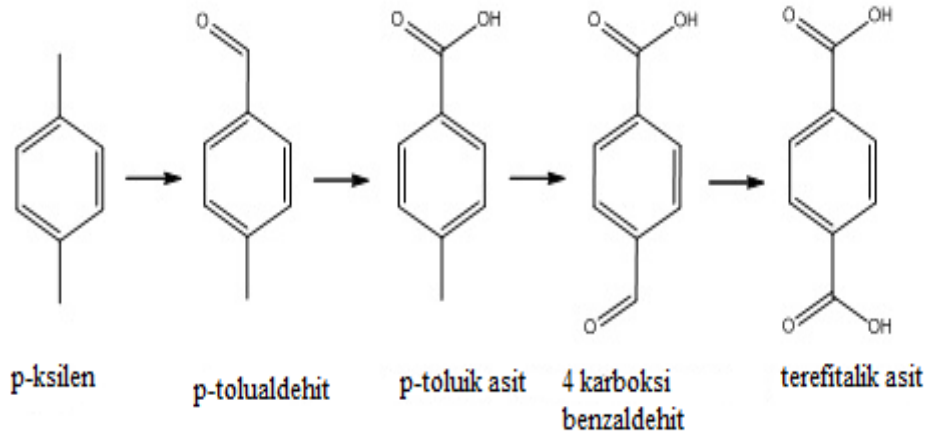


Şekil 2.2 Fitalat izomerleri

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phthalic_acid_isomers.PNG)

2.2.1. Terefitalik asit (TFA)

Paraksilenin (1,4 - dimetilbenzen) hava ile oksidasyonu neticesi oluşan terefitalik asit, hidrojen ile safsızlıkları giderildikten sonra saf terefitalik asit'e (PTA) dönüşmekte ve özellikle plastik sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır. Şekil 2.3'de p-ksilenin oksidasyonu sonucunda oluşan terefitalik asit ve ara metabolitler verilmiştir.



Şekil 2.3. Paraksilenin oksidasyonunda oluşan bileşikler

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Intermediate2.svg>)

2.2.1.1 Terefitalik asit biyoparçalanmasında iş gören mikroorganizmalar

Terefitalik asit sanayi ürünü oluşumu esnasında ve sonrasında doğaya, özellikle atık suya karışmasından dolayı oldukça sorun oluşturan bir kimyasaldır. Günümüze dek terefitalik asit ile ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur. Çizelge 2.6'da bu kimyasalı farklı konsantrasyonlarda parçalama yeteneğine sahip farklı mikroorganizmalar gösterilmiştir (Liang et al., 2008; Krishna and Phale, 2007).

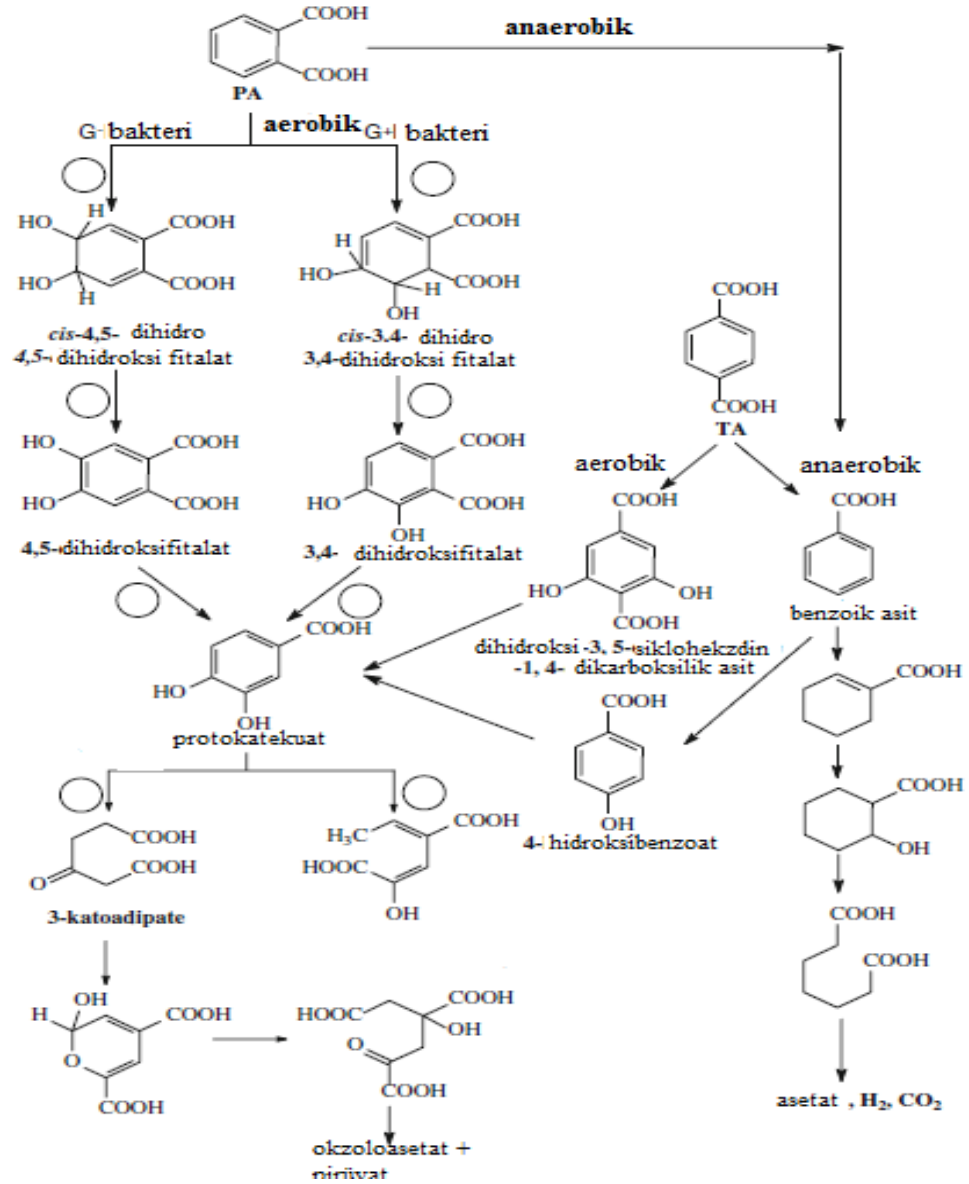
Çizelge 2.6.Terefitalik asit biyoparçalanmasında iş gören bazı mikroorganizmalar ve parçalama konsantrasyonu (Liang et al., 2008; Krishna and Phale, 2007).

Mikroorganizmalar	Konsantrasyon (mg/L)
<i>Pseudomonas sp.</i>	1000
<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	830
<i>Burkholderia cepacia</i>	-
<i>Pelotomaculum terephthalicum, Pelotomaculum isophthalicum</i>	100
<i>Comamonas testosteroni YZW-D</i>	-
<i>Micrococcus sp.</i>	-

2.2.1.2 Terefitalik asit parçalanma yol izi

Terefitalik asit biyoparçalanma çalışmaları arasında hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda yapılan çalışmalar mevcuttur. Aerobik bakteriler tarafından terefitalik asit karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Aerobik organizmalar tarafından terefitalik asiti, terefitalat 1,2 dioksijenazlar ile dihidroksi- 3,5 sikloheksidin- 1,4 dikarboksilik asite dönüşür ve sonrasında protokatekuata dönüşüp yol izine devam eder.

Terefitalik asitin anaerobik organizmalar tarafından parçalanma yol izinde ise kimyasal benzoik asite dönüşür ve 4 hidroksibenzoata dönüşüp yine protokatekuata dönüşmektedir. Terefitalik asitin biyoparçalanma yol izi Şekil 2.4 de gösterilmiştir (Liang et al., 2008).



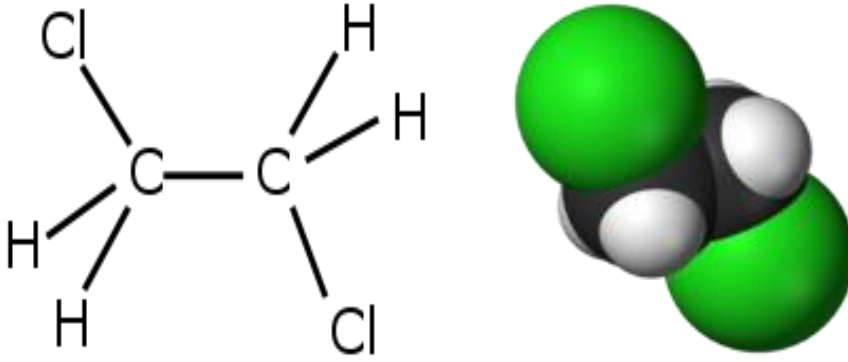
Şekil 2.4 Tereftalik asitin biyoparçalanma yol izi (Liang et al., 2008)

2.3 Klor İçeren Hidrokarbonların Çevreye Etkisi

Klor içeren alifatik hidrokarbonlar, su yüzeylerinde, yer altı sularında, yiyeceklerde ve atmosferde bulunur (Hileman, 1993). Çözücülerde, yapıştırıcılarda, plastiklerde, pestisitlerde ve birçok endüstriyel kullanım alanına sahiptir. Özellikle tetrakloroetan, 1,2 dikloroetan ve vinil klorür gibi klor içeren hidrokarbonlar endüstride sıklıkla kullanılmaktadır. Klor içeren alifatik hidrokarbonlar arasında yıldaki üretim payı en fazla olan 1,2 dikloroetan (EDC) 'dir.

2.3.1 1,2 dikloroetan

1,2 dikloroetan (EDC) veya etilendiklorit olarak bilinen bu kimyasal atık sularında bulunan rekalsitranant yani zor parçalanan kimyasallar arasında yer almaktadır. 1,1 trikloroetan ve florokarbon gibi kimyasalların sentezinde ara bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Bhatt et al, 2007). Özellikle böbrek, akciğer ve sinir sistemine zararlı olan EDC oldukça kanserojendir. Bu nedenle sulara, toprağa karışma olasılığı durumunda insanlar üzerinde ciddi tehlikeleri mevcuttur (Hughes et al., 1994). Şekil 2.5’de 1,2 dikloroetanın kimyasal ve üç boyutlu yapısı ve Çizelge 2.7’de kimyasal özellikleri verilmektedir.



Şekil 2.5. 1,2 dikloroetanın kimyasal yapısı (<http://sl.wikipedia.org/wiki/1,2-dikloroetan>)

Çizelge 2.7. 1,2 dikloroetanın özellikleri

Sinonimleri	EDC, etilendiklorür, DCE
Yoğunluk	1,253 gL ⁻¹
Kimyasal yapısı	C ₂ H ₄ Cl ₂
Sudaki çözünürlüğü	8.69 gL ⁻¹
Moleküler ağırlığı	98.96 g mol ⁻¹

EDC, buharlaşan bir kimyasal olduğundan endüstriyel atık gazlarda sıklıkla görülmektedir. Bu kimyasalın kanserojenik mutajenik ve toksik etkileri olmasından dolayı sağlığımız açısından EDC ‘nin zararlı olmayan yada daha az zararlı olan kimyasallara dönüştürülmesi gerekmektedir (Nouchi, 1984).

2.3.1.1 1,2 dikloroetan biyoparçalanmasında iş gören mikroorganizmalar

1,2 dikloroetanın parçalanmasıyla ilgili biyolojik yöntemler; fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre hem daha ucuz hem de çevre dostu yöntemler olması nedeniyle tercih edilmektedir (Wildeman and Verstraete, 2003). Ayrıca suda az miktarda bulunduğu için fizikokimyasal arıtımı çok zordur. Bu nedenle biyolojik olarak arıtım en uygun yöntemdir. 1,2 dikloroetan hem aerobik koşullarda hem de anaerobik koşullarda mikroorganizmalar aracılığıyla parçalanabilmektedir. EDC'nin aerobik biyoparçalanmasıyla ilgili ilk çalışma 1983 yılında yapılmıştır (Stucki et al., 1983). Yapılan çalışmada *Pseudomonas* sp. DE2 izolatının 5mM EDC'yi karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı saptanmıştır. EDC biyoparçalanmasıyla ilgili yapılan aerobik çalışmalarda *Pseudomonas* sp. izolatına ilave olarak çoğunlukla *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ve *Ancylobacter aquaticus* AD25 izolatlarına sıklıkla rastlanmıştır (Hage and Hartmans, 1999).

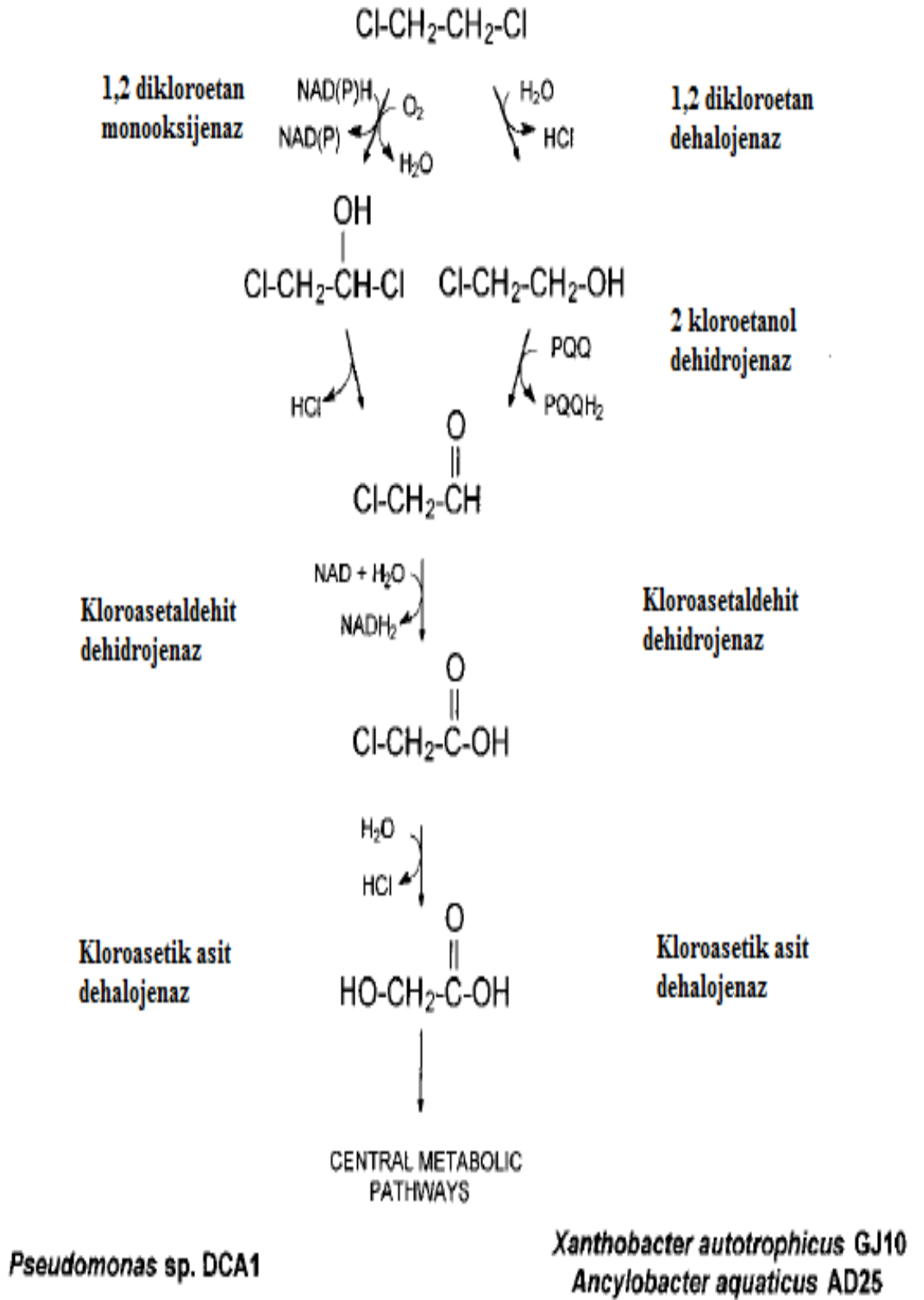
1,2 dikloroetan aerobik parçalanmasında kullanılan bu organizmalar kimyasalı elektron vericisi olarak kullanmakta ya hidroliz dehalojenaz enzimi ile yada oksijenazlarla 2- kloroetanol, monokloroasetat ve son olarak da karbondioksit kadar parçalanmaktadır.

Anaerobik parçalanmada ise kimyasalı elektron alıcısı olarak kullanıp redüktif deklorinaz enzimi ile parçalarlar. Genellikle *Dehalococcoides ethenogens* ve bazı metanojen bakteriler anaerobik parçalamada iş görmektedirler. *Methanobacterium thermoautotrophicum* ve *Methosarcina barkeri* ve *Methylosinus trichosporium* kometabolizmayla 1,2 dikloroetanı etana kadar dönüştürmektedir. (Oldenhuis et al., 1989)

2.3.1.2 1,2 dikloroetanın parçalanma yol izi

Xanthobacter autotrophicus GJ10, 1,2 dikloroetanın biyoparçalanma çalışmalarında en sık kullanılan organizmalardan biridir. Bu organizmaya ait parçalanma yol izinin ilk adımında hidrolitik dehalojenaz enzimi iş görmektedir. 1,2 dikloroetanı bu enzimle 2- kloroetanole, alkol dehidrojenaz enzimiyle kloroasetaldehite ve sonra sırasıyla kloroasetik asit ve glikolik asit oluşup merkezi metabolik yol izine kadar farklı ürünlere dönüşmektedir (Janssen et al., 1985)

Pseudomonas sp. DCA1 izolatı da 1,2 dikloroetan çalışmalarında sıklıkla kullanılmış olup parçalanma yol izi açıklanmıştır. Fakat bu organizmada hidrolitik dehalojenazlar iş görmemektedir. Buna alternatif olarak ilk adımda monoksijenaz enzimleri aracılığıyla oksidasyon olmaktadır. Bu sebeple NADH veya NADHP indirgeyici güç kaynağı olarak mutlaka gereklidir. Bu iki organizmanın farklı biyoparçalanma yol izleri Şekil 2.6' da gösterilmiştir (Hage, 1999).



Şekil 2.6: *Pseudomonas* sp. DCA1 , *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ve *Ancylobacter aquaticus* AD25 'e ait EDC'nin farklı parçalanma yol izleri (Hage, 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Biyoparçalanmada kullanılacak mikroorganizmalar

Tez çalışmasında biyoparçalanma etkinliği saptanan izolatların tamamı Petkim Petrokimya Holding A.Ş. atık su arıtma ünitesinden alınan aktif çamur ve yağlı atık çamur örneklerinden izole edilmiştir.

3.1.2 İzolasyonda kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Bushnell Haas Broth (*Sigma-Aldrich-B5051*) (Çizelge 3.1) ve Bushnell Haas Agar (Çizelge 3.2) ortamları terefitalik asit ve 1,2 dikloroetani parçalayan mikroorganizmaların seçilmesini sağlamıştır.

Çizelge 3.1: Bushnell Haas Broth

<u>Bileşen</u>	<u>Miktarı g/L</u>
Magnezyum Sülfat	0,20
Kalsiyum Klorür	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00
Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorür	0,05

Çizelge 3.2: Bushnell Haas Agar

<u>Bileşen</u>	<u>Miktarı g/L</u>
Magnezyum Sülfat	0,20
Kalsiyum Klorür	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00
Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorür	0,05
Agar	15,0

Ticari olarak temin edilen Bushnell Haas Broth hazır besiyerinden 0,16 gr tartılarak 250 ml'lik erlenlerde 50 ml distile su içinde çözünerek, 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Bushnell Haas Agar ortamı için; Bushnell Haas Broth ortamından 0,64 gr tartılarak 250 ml'lik şişelerde 200 ml distile su içinde çözülmüştür. Daha sonra ise 200 ml 'lik şişelere % 1.5 gr olacak şekilde agar eklenerek Bushnell Haas Agar ortamı hazırlanmıştır. 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Ayrıca organizmaların morfolojik farklılıklarını ve çeşitliliklerini belirlemek amacıyla genel bir besiyerleri olan Plate Count Agar (PCA) (*Merck 1.05463*) ve Nutrient Agar (NA) (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3: Plate Count Agar ve Nutrient Agar Bileşenleri

<u>Bileşen</u>	<u>Miktarı (g/L)</u>
PCA	
Kazeinden Elde Edilen Pepton	5,0
Yeast Extract	2,5
D(+) Glukoz	1,0
Agar-agar	14,0
Nutrient Agar	
Etten Elde Edilen Pepton	5,0
Meat Extract	3,0
Agar-agar	14,0

Ticari olarak hazırlanmış Merck “Plate Count Agar” ın 4.5 gramı 200 ml distile suda karıştırarak tamamen çözülmeye kadar kaynatılmıştır. Otoklavda 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildikten sonra, 50°C'ye soğutulup sonra petri kaplarına dökülmüştür. Aynı işlem Nutrient Agar içinde yapılmıştır.

3.1.3 İzolatların yıkanmasında kullanılan çözeltiler

Pasajlama sonrasında kimyasalı kullandığımız düşündüğümüz organizmalar besiyeri ortamında seçilmiş ve izole edilen organizmalar biyoparçalama etkinliklerinin ölçülmesi için besiyerlerine inoküle edilmeden önce ortamdaki gelebilecek karbon kaynağını uzaklaştırmak için PBS çözeltisinde (Çizelge 3.4) yıkanmıştır.

Çizelge 3.4: Phosphate Buffer Saline (PBS) Çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon
NaCl	0,12 M
Na₂HPO₄	0,01 M
KH₂PO₄	5 mM
Distile su	1000ml
pH	7,5

3.1.4 İzolatların mikroskopik tanılmasında kullanılan kimyasallar

Biyoparçalama yaptığı gözlenen mikroorganizmaların morfolojik tanılmasının yapılması için gram boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu sayede mikroorganizmaların gram özelliklerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Gram boyamada kullanılan kimyasalların bileşeni Çizelge 3.5, 3.6 ve 3.7'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.5: Kristal Viyole Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Kristal Viyolelet (%90 boya içeren)	2.0 g
Etanol (%95 v/v)	20 ml
Amonyum okzalat	0,8 g
Distile Su	80 ml

Hazırlanan solüsyon iyice karıştırıldıktan sonra filtre kağıdından geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

Çizelge 3.6. Gram İyodür Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı (g/300 ml)
Potasyum iyodür	2.0
İyot	1.0

Gram iyodür solüsyonu potasyum iyodür ve iyotun bir kapta iyice ezilerek yavaş yavaş su eklenmesiyle hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7: Safranin Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin O	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Deiyonize Su	100 ml

Toz haldeki safranin boyası etanolde çözülmüş ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre kağıdından geçirilerek kullanıma hazırlanmıştır.

3.1.5 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Tereftalik asit (*Sigma Aldrich-18,536-1*) ve 1,2 dikloroetan (*Sigma Aldrich-284505*) kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.6 Kimyasalların çözünmesinde ve diğer analizlerde kullanılan çözenler

Çizelge 3.8 : Çözenler

DMSO	Tereftalik asit çözeni
Metanol	HPLC analizi

3.1.7 DNA'ların görüntülenmesinde kullanılan kimyasallar

İzole edilen DNA'lar agaroz jel sisteminde ticari olarak temin edilen 1X Tris Asetik Asit (AppliChem 10X TAE) tamponu kullanılarak görüntülenmiştir. DNA'ların jelde görünebilmeleri için GelRed (Biotium) floresanlı nükleik asit boyası kullanılmıştır.

3.1.8 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

- ❖ **Hassas Terazî** (Denver Instrument) : Tüm ortam bileşenleri ve kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
- ❖ **Otoklav** (Hirayama Hiclave-HV 50L) : Hazırlanan taze ortamların ve kullanılmış organizmalı ortamların sterilizasyonunda kullanılmıştır.
- ❖ **Steril kabin** : Yapılan tüm ekim işlemlerinde kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır.
- ❖ **İnkübatör** (Memmert) : Katı besiyerlerindeki organizmaların 25°C 'de büyütülmesinde kullanılmıştır.
- ❖ **İnkübatör** (New Brunswick Scientific Innova 4340) : Sıvı ortamdaki mikroorganizmaların 25°C' ve 150 rpm'de büyütülmesinde kullanılmıştır.
- ❖ **İnkübatör** (Biosan İnkübatör ES-20): 1,2 dikloroetan kimyasalı inkübasyonu için kullanılmıştır.
- ❖ **Spektrofotometre** (Carry 300 Bio): Aşı olarak kullanılacak mikroorganizmaların ve büyüme esnasındaki mikrobiyal yükün belirlenmesinde kullanılmıştır.
- ❖ **HPLC** (Agilent 1100 Series) : Tereftalik asit biyoparçalama yeteneğindeki organizmaların parçalama etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
- ❖ **PZR** (Techne-TC Plus) : İzole edilen mikroorganizma DNA'larının moleküler tanılması için çoğaltılmasında kullanılmıştır.
- ❖ **Mikroskop** (Olympus) : Organizmaların morfolojik olarak tanılmasında kullanılmıştır.
- ❖ **pH metre** (WTW) : Kullanılacak besiyerlerinin uygun pH'ya getirilmesinde kullanılmıştır.

- ❖ **Vortex** (VWR) : Ekstraksiyon basamağında ve diğer tüm karıştırma işlemlerinde kullanılmıştır.
- ❖ **Mikropipetler** (Eppendorf) : 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l pipetler tüm düşük hacimdeki aktarım işlemlerinde kullanılmıştır.
- ❖ **Santrifüj** (Hettich) : Tereftalik asitin HPLC analizinde kullanılmıştır.
- ❖ **Jel Görüntüleme Cihazı** (UVP Biospectrum) : İzole edilen DNA'ları ve PZR ürünlerinin görüntülenmesinde kullanılmıştır.
- ❖ **Elektroforez** (Thermo Scientific) : İzole edilen DNA'ların saflık ve bütünlük kontrollerinde kullanılmıştır.
- ❖ **GC** (Agilent 6890) : 1,2 dikloroetan biyoparçalama yeteneğindeki organizmaların parçalama etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Terefitalik asit ve 1,2 dikloroetanı parçalama yeteneği bulunan mikroorganizmaların seçilmesi

Petkim Petrokimya Holding A.Ş petrol rafineri tesislerinden, mikroorganizma yoğunluğu açısından en uygun olan dönemlerde aktif çamur ve yağlı çamur örnekleri alınmıştır. İstenilen hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların seçilmesi için modifiye edilmiş bir tarama metodu kullanılmıştır (Liu et al., 2010).

Petkim Petrokimya Holding A.Ş atık giderme tesislerinden alınan aktif çamur (2,5ml) ve yağlı atık çamur örnekleri (1gr) karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen haldeki örnekler tek karbon kaynağı olarak referans kimyasalları ayrı ayrı içeren Bushnell Haas Broth ortamlarına eklenmiş ve 25°C 'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 7 gün boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (Madsen et al.,1999). Terefitalik asit denemesi, 250ml'lik erlenlerde 50ml Bushnell Haas Broth içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. 1,2 dikloroetan ise buharlaşan bir kimyasal olması nedeniyle 50 ml'lik kapalı (şilifli) erlenlerde inkübasyonu sağlanmıştır. Sterilizasyonu sağlanan besiyerlerine, son konsantrasyon 25mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L terefitalik asit ve 1mM, 5mM ve 20mM olacak şekilde 1,2 dikloroetan eklenmiştir. Tüm çalışmalarda denemenin paraleli yapılmış olup kontrolleri sağlanmıştır.

Terefitalik asit suda çok az miktarda çözünmektedir. Bu nedenle çözgen olarak organizmalara kritik miktarı aşılmadığında zararı olmamasından dolayı DMSO (dimetilsülfoksit) kullanılmıştır. Sıvı halde bulunan 1,2 dikloroetan ise çözgen kullanmadan ortama direk eklenmiştir. Ortama eklendikten bir süre sonra su içerisinde dağıldığı gözlemlenmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda erlenlerden, aynı konsantrasyonlarda kimyasal içeren 50ml steril Bushnell-Haas Broth besiyerlerine 2,5 ml aktarım yapılarak inkübasyon işlemi tekrarlanmıştır. Her pasajlama işlemi sırasında, mikrobiyal yükün ve çeşitliliğin belirlenebilmesi için erlenlerden örnekler alınarak PCA ortamlarına seyreltme plaka yöntemiyle ekim yapılmış olup bir önceki pasajlamada elde edilen petrilerle karşılaştırılarak mikrobiyal çeşitlilikteki artmalar ya da azalmalar belirlenmiştir.

Beş kez yapılan pasajlamanın ardından, ortamda üreyebilen mikroorganizmaların seçilmesi için; 100mg/L kimyasal içeren Bushnell Haas Agar besiyerine dökme plaka yöntemi ile ekim yapılarak 25°C 'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Bushnell Haas Agar besiyerlerinde belirgin bir şekilde büyüyen koloniler seçilmiştir. Seçilen mikroorganizmaların en iyi büyüme gösterdiği ve en fazla mikrobiyal çeşitliliğin bulunduğu 100 mg/L terefitalik asit ve 20 mM 1,2 dikloroetan içeren besiyeri ortamına ekilmiştir.

Bushnell Haas Agar ortamında büyüyen mikroorganizmalar, karbon kaynağı olarak sadece kimyasalı kullandığı için morfolojik farklılıklarını görmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle seçilen organizmaların PCA genel besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilerek, renk, koku ve şekil gibi morfolojik farklılıkların gözlemlenmesi sağlanmıştır. PCA ortamları 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda PCA'da üreyen mikroorganizmalar koloni farklılıklarına göre belirlenmiş ve farklılık gösteren koloniler besiyeri ortamından alınarak saflaştırma amaçlı çizgi ekim yöntemi ile yeniden PCA ortamlarına ekilmiştir. Saf olduğunu düşündüğümüz mikroorganizmaların gram boyamaları yapılarak mikroskop görüntüleriyle kontrolleri yapılmıştır. Saflaştırma sonunda elde ettiğimiz organizmalar yatık Nutrient Agar ortamına çekilerek daha sonraki analizler için saklanmıştır.

3.2.2 İzole edilen mikroorganizmaların biyoparçalanma etkinliklerinin belirlenmesi

Besiyeri setleri hazırlanmadan önce kullanılacak erlenler H₂SO₄ çözeltisinden (%40) geçirelerek cam yüzeyinde bulunabilecek organik maddelerden arındırılmıştır.

Terefitalik asit denemesinde; 250 ml'lik erlenlerde hazırlanan ve tek karbon kaynağı olarak 100 mg/L terefitalik asit içeren, 1,2 dikloroetan için ise 20mM olacak şekilde şilifli erlenlerde Bushnell Haas Broth ortamları kullanılmıştır.

Yatık nutrient agarda saklanan izolatlar biyoparçalanma etkinliklerinin ölçüleceği denemeden önce aktivasyonlarının sağlanması için; her iki kimyasal

için uygun olarak seçilen izolatlar 50 ml nutrient broth ortamına ekilerek 25°C de 24 saat boyunca 150 rpm de çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda erlenlerden steril mikrosantrifüj tüplerine 1ml alınarak 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. İnokülasyon sırasında Nutrient Broth ortamından gelebilecek organik maddelerin uzaklaştırılması için; santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan mikroorganizma pelletleri üzerine 1ml steril PBS solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve yeniden santrifüjlenmiştir.

Yıkama işlemi üç kez tekrarlanmış ve son olarak yeniden 1ml steril su ile süspansiyon hale getirilmiştir. Kullanılacak tüm hücre süspansiyonları 540-600 nm 'de optik yoğunlukları 0,3-0,5 olacak şekilde optimize edilmiştir.

Biyoparçalanma analizinde kullanılacak mikroorganizma süspansiyonlarının optik yoğunluklarının karşılık geldiği mikrobiyal yükün belirlenmesi için; 0,3-0,5 olarak ayarlanan süspansiyonlar 10^{-9} 'a kadar seyreltilmiş ve PCA ortamlarına ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 0,3-0,5 optik yoğunluğun yaklaşık olarak 10^6 - 10^7 kob/ml olduğu belirlenmiştir.

Biyoparçalanma etkinliğinin ölçüleceği her izolat için paralel iki deney seti hazırlanmıştır. Ayrıca izolatların etkinlik ölçüm analizleri için örnek alınması esnasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskine karşılık, deneme süresince açılmadan bekletilecek kontrol erlenleri hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm erlenler hidrokarbonlar eklenmeden önce otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış steril Bushnell Haas Broth ortamlarına %5 oranında hidrokarbon ve %5 oranında (2.5 ml) bakteri süspansiyonları eklenerek 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 25°C 'de inkübe edilmiştir. Erlenlerin tamamı karanlık ortamda inkübe edilerek fotooksidasyon ihtimali de engellenmiştir.

3.2.2.1 Biyoparçalanma etkinliğinin belirlenmesi için yapılan kültürel analizler

Mikroorganizmaların çevresel koşullara olan adaptasyon süreçleri; buldukları ortamın bileşenleri, sıcaklık, oksijen içeriği vb. gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Etkinlik ölçümleri için kullanılan ortamların yeterliliği, çözümlerin toksik etkilerinin olup olmadığı ve oksijen miktarının mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin belirlenmesi için mikroorganizmaların

canlılık faaliyetlerinde ki artış/azalışı sayısal olarak belirleyen kültürel ekim yöntemi kullanılmıştır.

Bu amaçla, deneme süresince 2 gün aralıklarla her deneme erleninden alınan örnekler seyreltme plaka yöntemi ile PCA ortamına ekilmiştir. Böylece mikrobiyal yükteki artma veya azalma miktarları ile organizmaların kontrolü sağlanmıştır.

Aynı zamanda kör olarak kullanılan erlenlerden de ekimler yapılarak erlenlerde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.2.2 Biyoparçalama etkinliğinin belirlenmesi için yapılan analitik analizler

Yapılan kültürel analizlere ek olarak, mikroorganizmaların biyoparçalama yeteneklerinin sayısal verileri; karbon kaynağı olarak kullanıldığı düşünülen terefitalik asitin zamana bağlı azalmasını belirleyen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) ile ölçülmüştür.

HPLC analizlerinde ; Metanol - Su sistemi (%80 - %20), 1µl enjeksiyon ve 0.4 ml akış hızı ve 25°C kolon sıcaklığı kullanılmıştır. Analiz kolonu olarak Agilent Zorbax Eclipse PAH Column kullanılmıştır.

Analiz için örnekler sisteme verilmeden önce steril mikrosantrifüj tüplerine 1ml örnek alınmıştır.

Terefitalik asit dimetilsülfoksit (dmsö) çözüeni ile ortama eklendiğinde homojen bir şekilde besiyerinde bulunduğu için organizma pelletlerinden arındırmak için 3000rpm'de 2 dakika santrifüjlenmektedir.

Yapılan çalışmada mikroorganizmaların biyoparçalama verimliliğinin kıyaslanması amaçlı standart eğriler oluşturulmuştur (Grafik 4.1).

Yapılan tüm kültürel ve analitik analizler, biyoparçalama etkinliğinin doğrulanması için 2'şer paralelli olarak yapılmıştır.

3.2.3 Seçilen mikroorganizmaların ön tanılamaları

Yapılan kültürel ve analitik analizler sonucunda, biyoparçalanma yeteneğinde olan izolatların ön tanılamaları yapılmıştır.

Bunun için kültürel ve biyokimyasal özelliklerine ek olarak ileri tanılamalarında moleküler teknikler kullanılarak 16S rDNA dizi analizi ile izolatlar tanımlanmıştır.

3.2.3.1 Kültürel özellikler

İzolatlar PCA'ya ekilerek 25°C'de 24 saatlik inkübasyonlarından sonra oluşan koloniler morfoloji, renk, koku ve pigmentasyon bakımından incelenmişlerdir.

3.2.3.2 Mikroskobik özellikler

İnkübasyondan sonra PCA 'daki kültürlerin hem Gram boyama ve hem de KOH testi ile Gram reaksiyonlarına bakılmış, bakteri morfolojileri ve boyutları 100x'lik büyütmede mikrometrik lam ve mikrometrik oküler kullanılarak mikroskopta incelenmişlerdir.

3.2.3.3 Biyokimyasal özellikler

KOH Testi

Gram boyama testini desteklemek amacıyla yapılan bu denemede, temiz bir lamın üzerine 1 damla %3'lük KOH çözeltisi damlatılarak üzerine 30°C'de 24 saat PCA'da büyütülmüş izolatlardan bir öze dolusu konulmuş ve bir cam çubukla karıştırılmıştır. Süspansiyondan cam çubuğu çekince bir uzama söz konusu ise, izolatın Gram (-) olduğu kabul edilmiştir (DSM, 1991).

Oksidaz Testi

Bir parça filtre kağıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün (Sigma Chemical co.) %1'lik solüsyonunun birkaç damlası ile ıslatılmış ve bu solüsyon kullanılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır. 24 saatlik PCA kültüründen bir öze dolusu organizma, platin bir öze ile alınmış (sıradan telden yapılmış özeler yanlış sonuçlara neden olabilir) ve filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu test için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt et al., 1981; Tamer ve ark., 1989).

Katalaz Testi

Yatık Nutrient Agar' da 30°C'de 24 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3'lük 1ml H₂O₂ çözeltisi damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt et al., 1981; Tamer ve ark. 1989; Temiz, 1994).

3.2.4 Seçilen mikroorganizmaların moleküler tanılaması

3.2.4.1 DNA izolasyonu

Kültürel ve analitik analizler sonucunda tereftalik asit ve 1,2 dikloroetani parçalama yeteneğinde olan organizmaların moleküler tanılaması için öncelikle DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonu ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

- 1-50-100 mg fungal/bakteriyel hücre içeren 200 µl PBS içinde yeniden süspansiyon edilerek BashingBead™ Lysis tüpüne aktarılır ve üzerine 750µl Lysis Solution eklenmiştir.
- 2- Bashing Bead liziz tüpü maksimum hızda vorteks ile 5dk boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.
- 3-Daha sonra 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.
- 4-Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400µl, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo-Spin IV spin filtre'ye aktarılmış, ardından hemen 7.000xg'de 1dk. santrifüjlenmiştir.
- 5- Toplama tüpündeki biriken filtrat üzerine 1200µl Fungal/bakteriyal bağlama tamponu ilave edilmiştir.
- 6- Bu aşamadan elde edilen karışımdan 800 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.
- 7- Sonra "6" nolu basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır.
- 8- 200µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.
- 9- 500µl Fungal/bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

10- Zymo-Spin IIC kolonu 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 100µl DNA elüsyon tamponu doğrudan kolon içerisinde orta kısımdaki matrise ilave edilmiştir. Daha sonra 10.000xg'de 30sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası mikrosantrifüj içerisinde DNA elde edilmiştir.

3.2.4.2 DNA saflık kontrolü

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Thermo Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi, 2,5 µl GelRed'li %1 agaroz (Sigma) içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1xTAE tamponu kullanılmıştır. 2 µl DNA solüsyonu, 1µl yükleme boya solüsyonu ve 3µl su ile karışımı hazırlanarak 80V'da 45 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde, DNA belirteç dizisi olarak Nanohelix DNA Ladder (1,0kb'lık) kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Ausubel et al., 1997).

PZR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Temiz bir erlen içerisinde 100ml 1xTAE konulmuş ve 1g agaroz tartılarak 1xTAE içerisine eklenmiştir.
2. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşmıncaya kadar ısıtılarak, agarozun erimesi ve homojenizasyonu sağlanmıştır.
3. Agaroz jel, 45-50°C'ye kadar soğutulurken içerisine belirtilen miktarda GelRed ilave edilmiştir.
4. Elektroforez küvetine taraklar uygun şekilde yerleştirilmiş ve jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde, yaklaşık 1mm kalınlıkta dökülmüştür.
7. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45dk bekletilerek donması sağlanmıştır.
8. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jelin yüzeyini 1-2mm kaplayacak biçimde 1xTAE ilave edilmiş ve ardından taraklar çıkarılmıştır.

9. PZR ürünleri ve belirteç DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılmıştır.

10. 1,5 saat sonra elektroforez sonlandırılmış ve jel dikkatlice küvetten alınmıştır.

11. Jel UVP Biospectrum cihazı kullanılarak görüntülenmiş ve bantlar belirteç DNA dizisi ile karşılaştırılmıştır.

PZR ürünleri daha sonra sekans analizi için kullanılmıştır.

DNA miktarı ve saflık kontrolü için nanodrop ile ölçümler yapılmıştır. Bu amaçla 1,5µl DNA örneğinin A_{260}/A_{280} oranı belirlenmiştir. PZR için uygun kalitede DNA'lara ait A_{260}/A_{280} değeri 1,80 civarında olmalıdır (Dale, J. W., and Schantz M. V., 2002; Gonzalez et al., 2006).

3.2.4.3 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

16S rDNA dizi analizi için gönderilecek DNA örneklerinin çoğaltılması, Taq DNA Polimeraz Kiti (HelixAmp™) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisindeki bileşiklerin yanısıra 16S rDNA'ya özgü universal primerler ve kalıp DNA ilave edilmiştir.

Amplifikasyon tüpüne eklenecek bileşenler ve reaksiyon basamakları kit içeriğine göre düzenlenmiş olup Çizelge 3.9'da belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.9. PZR bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktarı
Kalıp DNA	5µl
10X Taq Buffer	5µl
dNTP	1µl
Primer – F	1µl
Primer – R	1µl
5X Tune Up Buffer	10µl
Taq Polimeraz	1,25unit
Su	50µl'ye tamamlanır

İstenilen bölgenin çoğaltılması için bakterilerin 16s rDNA'ya özgü bölgeye spesifik universal primer setleri kullanılmıştır (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10: Konvensiyonel PZR'da kullanılan primer setleri

Primerler	Nükleotid Sırası
27-F (Forward)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
1492-R (Reverse)	5'- AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3'

İstenilen bölgenin çoğaltılması için, kit prosedürüne uygun olarak, reaksiyon basamakları Çizelge 3.11'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.11. Çoğaltmanın sağlandığı PZR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk denütarasyon	1	2dk	95°C
Denütarasyon (Ayrılma)		20sn	95°C
Annealing (Bağlanma)	30	40sn	56°C
Elongasyon (Uzama)		1,5dk	72°C
Son Uzama	1	5dk	72°C
Soğutma	-	Sınırsız	4°C

3.2.4.4 PZR ürünlerinin Elektrofrez

PZR ürünleri, 2,5µl GelRed içeren %1'lik agaroz jelde, 1xTAE tampon olarak kullanılarak 60V'da 45dakika boyunca yürütülmüştür. 2µl PZR ürünü ve 1µl jel yükleme boyası ve 3µl su ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş ve her elektrofrez işleminde örneklerle beraber belirteç DNA dizisi (Nanohelix DNA ladder 1,0kb) jelde yürütülmüştür.

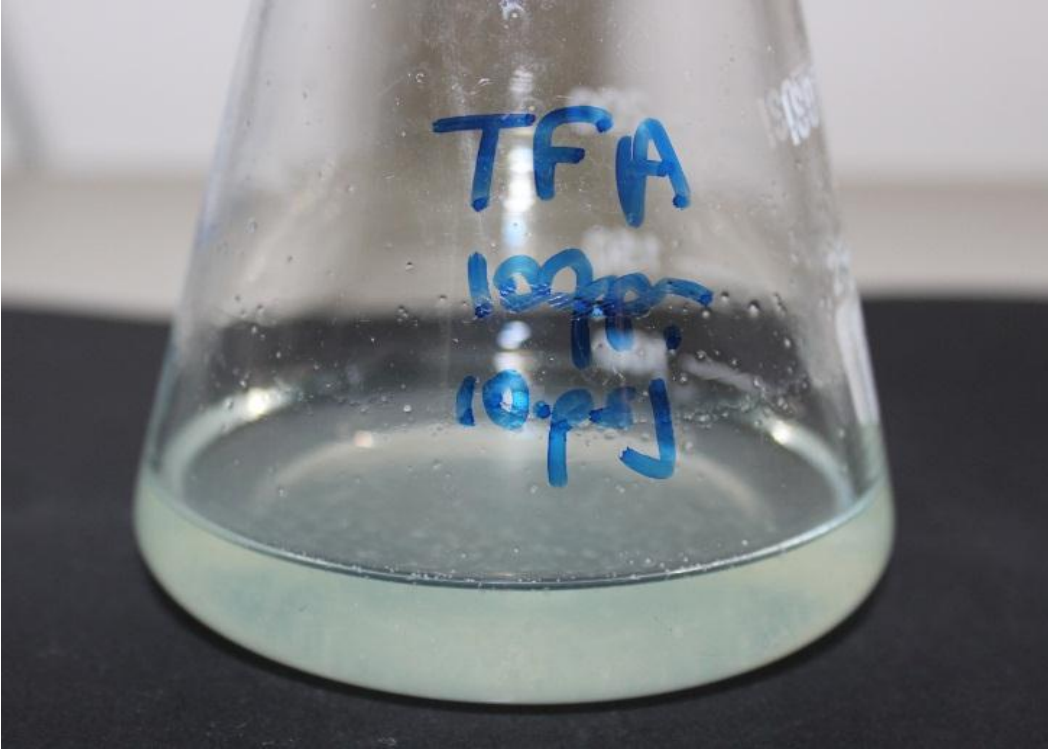
Elektroforez sonuçlarında çıkan DNA bantlarının boyutları, yüklenen belirteç DNA dizisi ile ölçülmüştür. Universal primerlerin uzunluğu yaklaşık olarak 1500bp olduğu için, jel üzerinde bu bölgeye denk gelen DNA bantları dikkate alınmıştır.

3.2.4.5 PZR ürünlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi

Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (MOBAM) tarafından her bir izolat için belirlenen 16S rRNA nükleotid dizileri, BioEdit, DNA Baser 3,5 ve Serial Cloner 1.2 programları kullanılarak değerlendirilip, uygun forma getirildikten sonra Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve blast sonucu % benzerlik oranlarına göre organizmalar tanımlanmıştır. Referans diziler ClustalW programıyla indirilmiş (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) ve tanımlanan diziler ile karşılaştırılmıştır. MEGA 5.3 programı kullanılarak, "Neighbor-joining" metoduyla türlerin filogenetik ağacı yapılandırılmıştır. Aynı zamanda belirlenen sekanslar Genbank'a eklenerek ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere aksesyon numaraları alınmıştır.

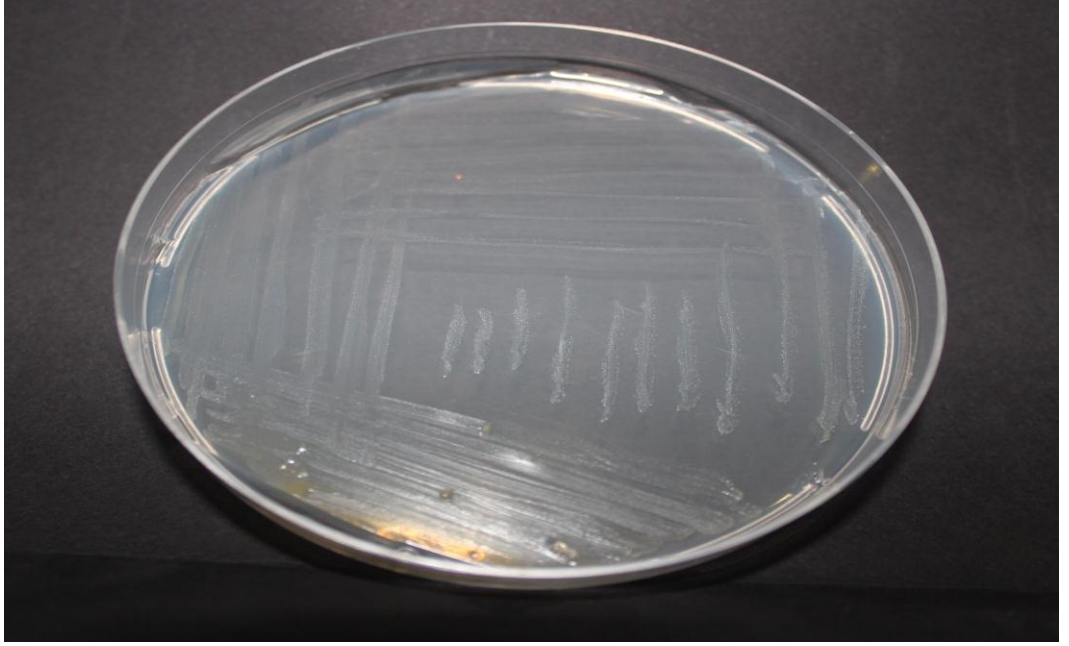
4. BULGULAR

Tez çalışmasında Petkim Petrokimya A.Ş atık su arıtım tesislerinden alınan aktif çamur ve yağlı atık çamur örnekleri Bushnell Haas Broth ortamına eklenerek pasajlamalar yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan erlen şekil 4.1’de gösterilmiştir. Çalışmalarda 1,2 dikloroetanın uçucu olmasından dolayı şilifli erlen, terefitalik asit için ise normal erlen kullanılmıştır. Pasajlamalar sonucunda terefitalik asit için 100 ppm , 1,2 dikloroetan için ise 20mM konsantrasyonlarında en iyi sonuçlar alınmış ve biyoparçalama etkinliği denemelerine bu konsantrasyonlarda devam edilmiştir.



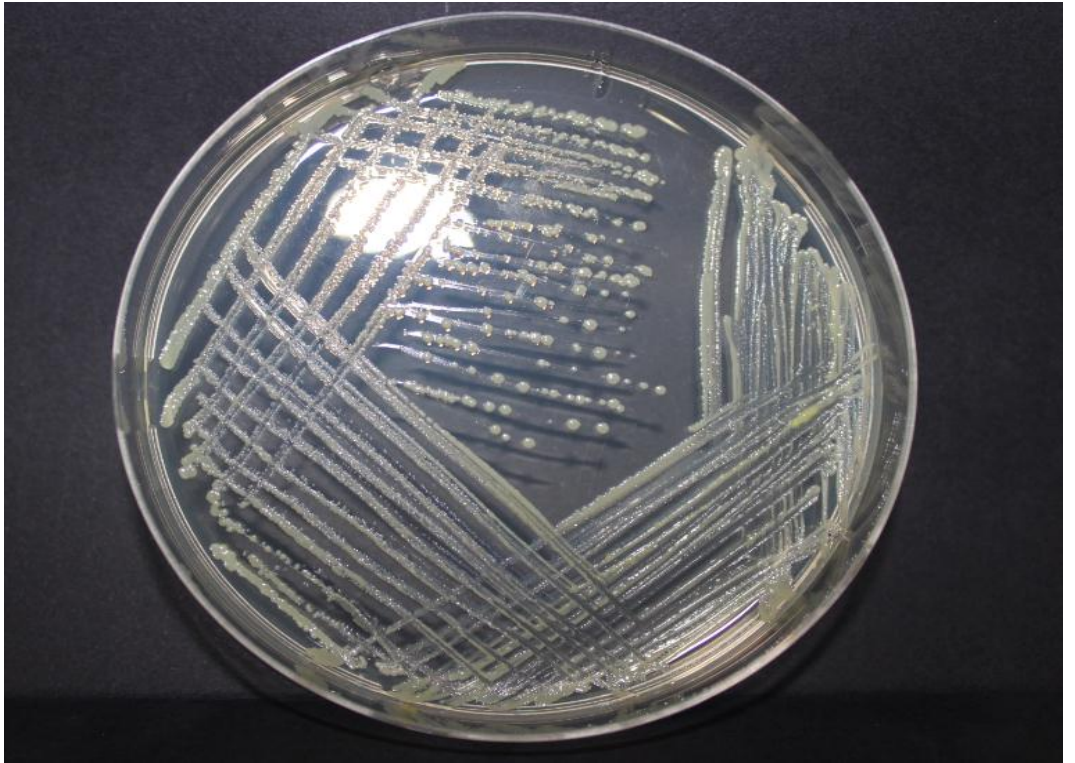
Şekil 4.1: Pasajlama esnasındaki terefitalik asit içeren Bushnell Haas Broth ortamı ve ortamdaki biyoparçalama yeteneğindeki mikroorganizmalar

Erlen ortamından alınan mikroorganizmalar aynı konsantrasyonda ilgili kimyasalı içeren Bushnell Haas Agar ortamına çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2:Bushnell Haas Agar ortamında büyüyen mikroorganizmalar

Bushnell Haas agarda büyüyen mikroorganizmaları morfolojik farklılıklarına göre ayırt etmek mümkün olmamıştır. Bunun için büyüyen mikroorganizmalar steril pipet uçlarıyla alınarak Nutrient Broth ortamında çoğaltılmış ve yeniden PCA ortamında saflaştırılarak morfolojik tanılamaları yapılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Pasajlama sonrası tereftalik asit içeren PCA ortamına akatarılan mikroorganizmaların büyümesi.

Pasajlama ve sonrasında yapılan analizler sonucunda; terefitalik asit ve 1,2 dikloroetan için petrilere en iyi ve hızlı büyüme gösteren mikroorganizmalar seçilerek çalışmalara bu izolatlarla devam edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Elde edilen izolatlar

Kimyasal	Elde edilen izolat kodları
Terefitalik asit	T1,T4,T5,TK
1,2 Dikloroetan	E2b,E4b,E6b

Terefitalik asit için elde edilen bu dört izolatin HPLC analizleri ile biyoparçalanma etkinliği saptanmıştır. Fakat 1,2 dikloroetanın biyoparçalanma etkinliğini inceleyeceğimiz uygun bir HPLC kolonu bulunmadığı için GC analizi ile etkinlik belirlenmiştir.

4.1 İzolatların Mikroskobik, Kültürel ve Biyokimyasal Tanılamaları

Uzun bir pasajlama işleminden sonra karbon kaynağı olarak ortama eklenen kimyasalı kullandığımız düşündüğümüz organizmaların ön tanılamaları için koloni morfolojisi, renk, koku, pigment, hücre büyüklükleri, gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH testleri yapılmıştır. Bu testlerin sonucu izolatlar hakkında genel bilgi edinilmiş olup parçalanma etkinlikleri belirlendikten sonra ileri tanılamaları sekans analizleri ile yapılmıştır.

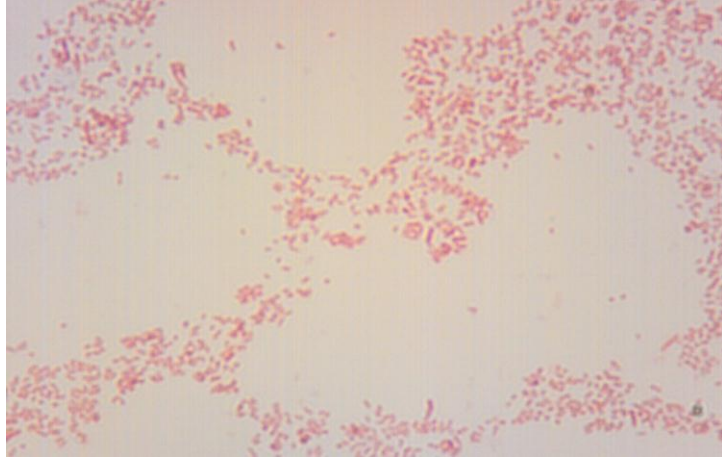
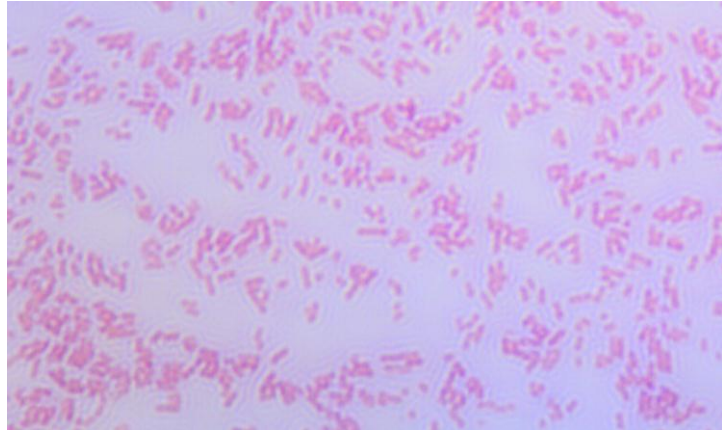
4.1.1 Terefitalik Asit Sonuçları

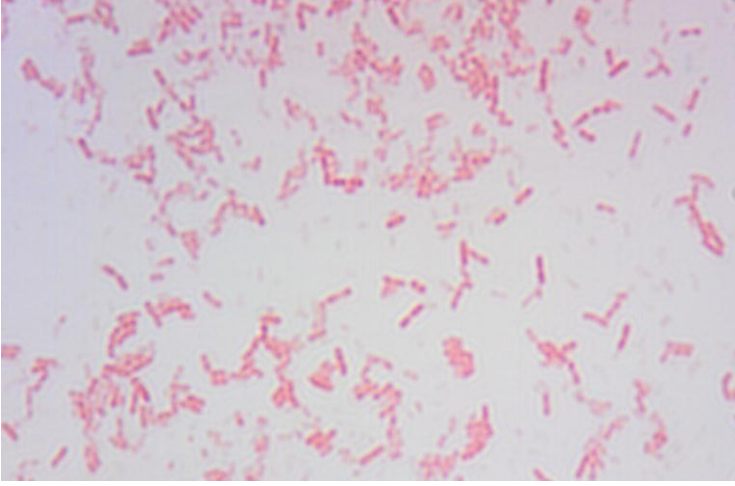
100 mg/L terefitalik asit içeren Bushnell Haas Broth ortamında 5 haftalık pasajlamalar sonrasında mikroskobik ve kültürel tanılamaları sonucunda farklı olduğunu düşündüğümüz 6 mikroorganizma bulunmuştur. Bu 6 mikroorganizma 100 mg/L terefitalik asit içeren Bushnell Haas Agar ortamına ekildiğinde ise sadece 4 mikroorganizmanın ürediği görülmüştür. Bu nedenle terefitalik asit için 4 mikroorganizma(T1,T4,T5,TK) seçilmiş ve HPLC ile parçalanma etkinlikleri belirlenmeden önce mikroskobik, kültürel ve biyokimyasal tanılamaları yapılmış olup çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Tereftalik asit çalışmasında kullanılan izolatların özellikleri

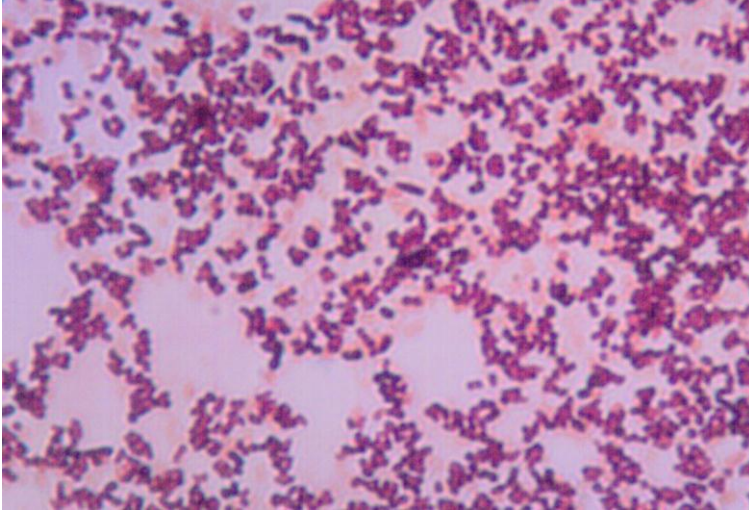
Özellikler	T1	T4	T5	TK
Gram boyama	Gr-	Gr-	Gr-	Gr+
KOH	+	+	+	-
Katalaz	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+
Koloni rengi	açık gri	turuncu	sarı	mat beyaz

İzolatların mikroskopik özelliklerine bakmak için gram boyama yapılmış olup mikroskop görüntüleri şekil 4.4,4.5,4.6ve 4.7’de gösterilmiştir.

**Şekil 4.4:** İzolat T1'in Gram boyama görüntüsü (100x)**Resim 4.5:** İzolat T4'ün Gram boyama görüntüsü (100x)

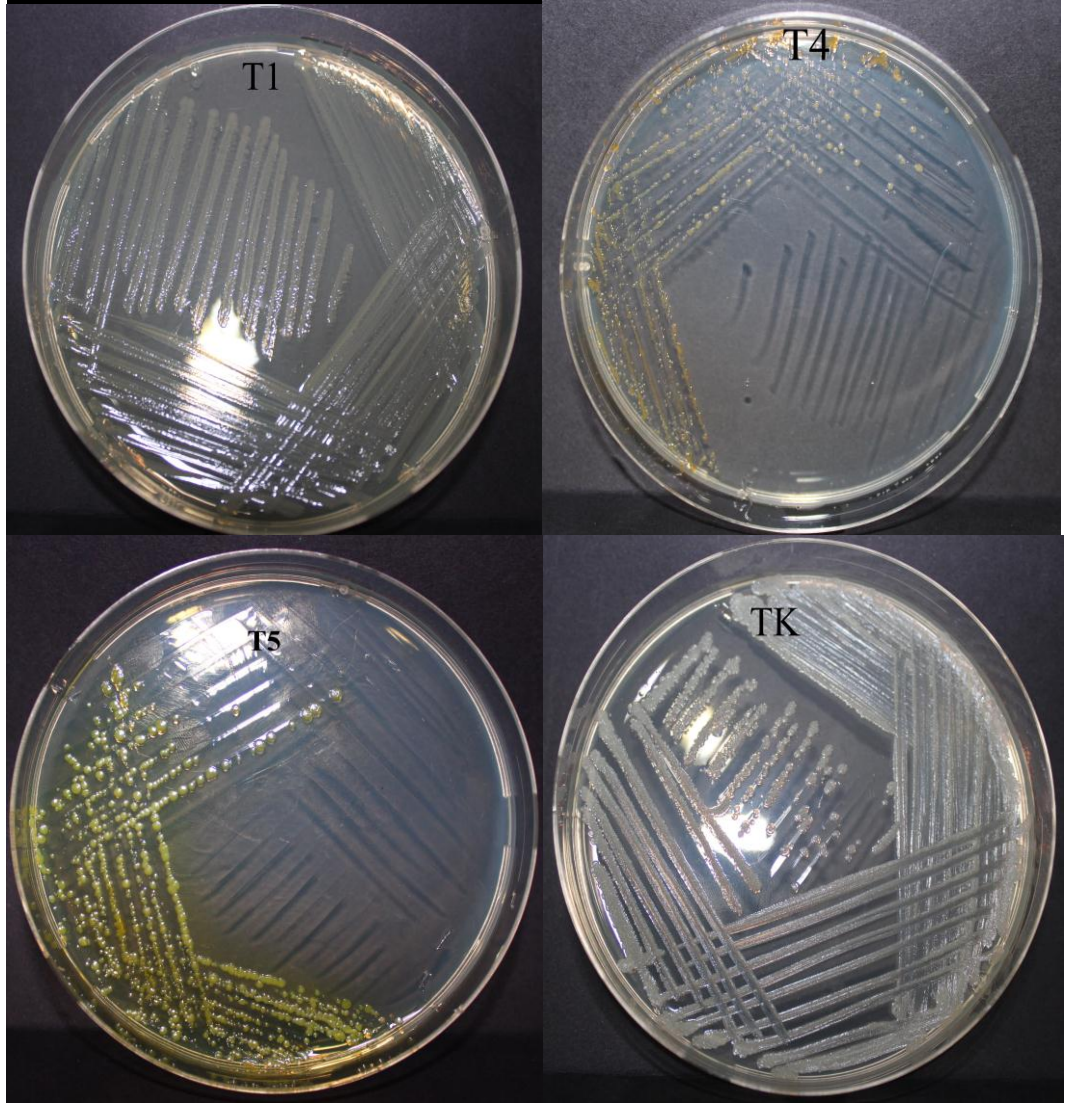


Şekil4.6: İzolat T5'in Gram boyama görüntüsü (100x)



Şekil 4.7: İzolat TK'nın gram boyama görüntüsü(100x)

Yapılan çalışmada elde edilen 4 izolatın mikroskopik özellikleri dışında PCA ortamındaki kültürel karakteristikliğinde bakılmıştır.Kültürel ortamdaki üremeleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8: T1,T4,T5ve TK kodlu izolatların PCA ortamındaki görüntüsü

4.1.2 1,2 dikloroetan sonuçları

1,2 dikloroetan kimyasalı için şilifli erlenler kullanılarak kimyasalın buharlaşması önlenmiştir. Kimyasalın buharlaşma özelliğinde dolayı pasajlama esnasında erlenler sadece haftada bir kez açılmasına özen gösterilmiş olup daha sonraki analizler içinde bu durum dikkate alınmıştır. Şekil 4.9’da kör erlenine göre bulanıklık meydana getiren izolatları ve şilifli erlenler gösterilmiştir.

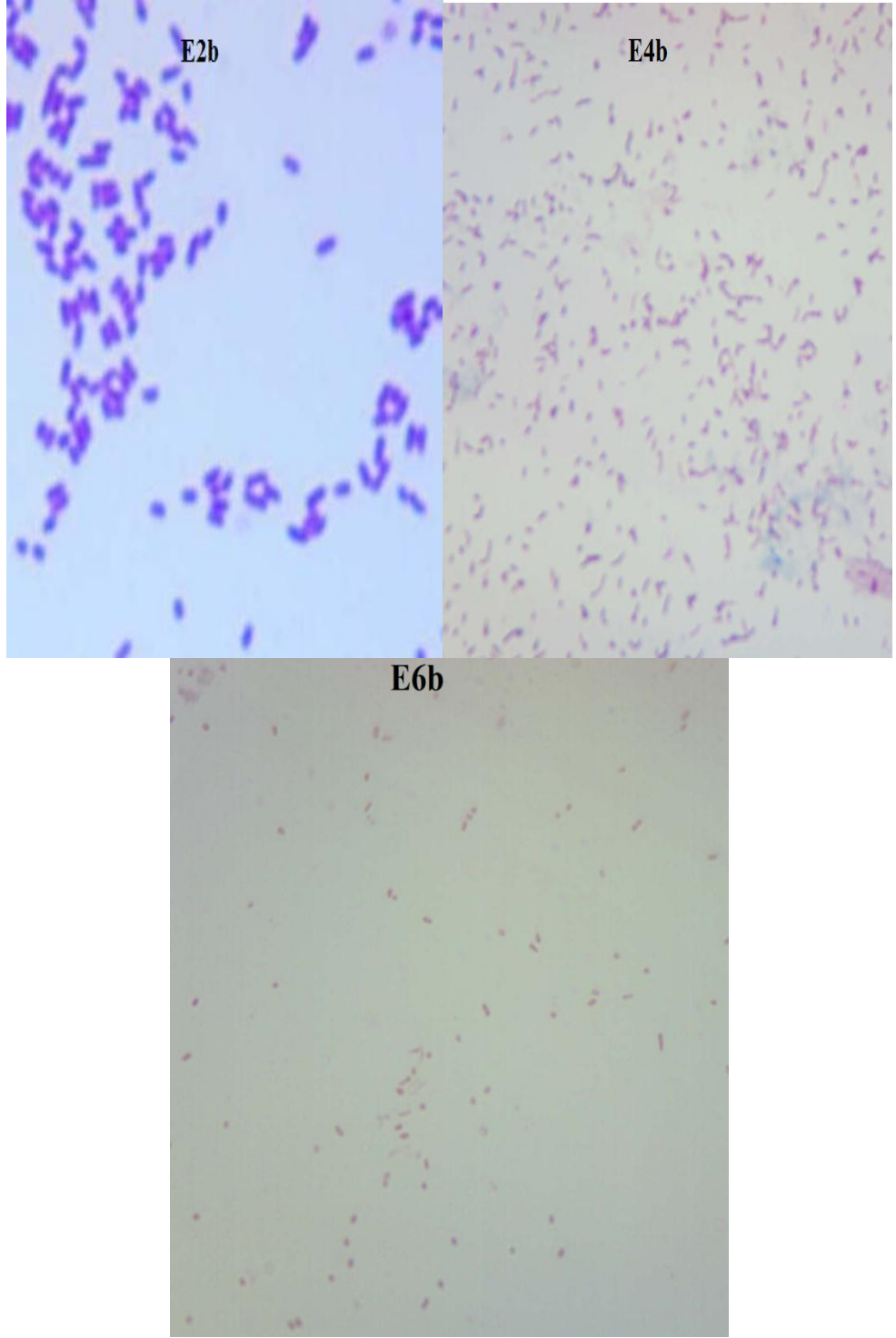


Şekil 4.9 Kör erleni ve 4b izolatının Bushnell Haas Broth ortamındaki görüntüsü

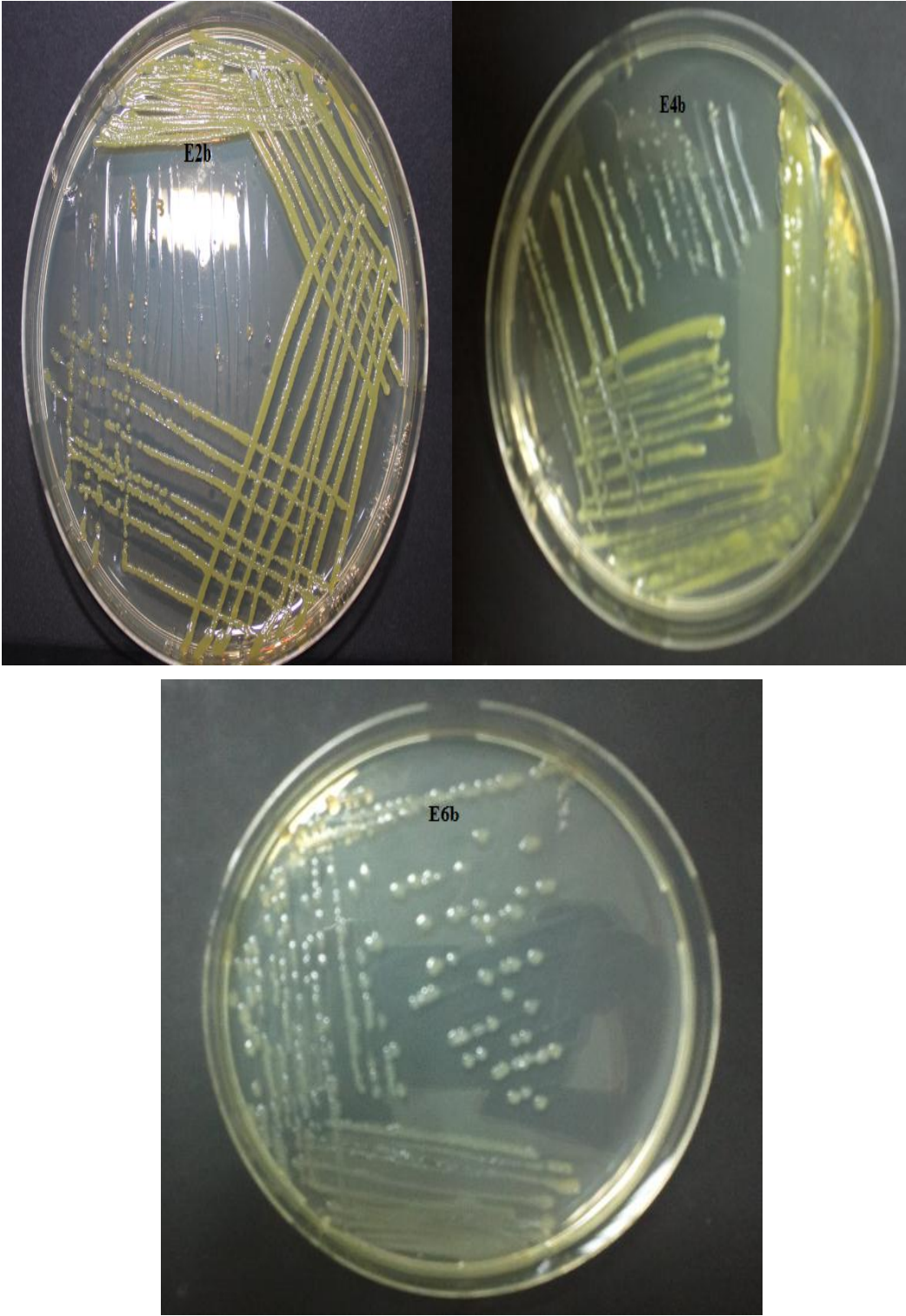
Tez çalışmasında 1,2 dikloroetan kimyasalı erlen ortamında biyoparçalama etkinliği belirlenecek olan 5 farklı mikroorganizma bulunmuştur. Fakat Bushnell Haas Agar ortamında 3 mikroorganizmanın üremiştir. E2, E4b ve E6 kodlu izolatların mikroskopik görüntüsü resim 4.10 ; petri görüntüleri ise Şekil 4.11’da verilmiştir.

Çizelge 4.3: 1,2 dikloroetan çalışmasında kullanılan izolatların özellikleri

Özellikler	E2b	E4b	E6b
Gram boyama	Gr+	Gr+	Gr-
KOH	-	-	+
Katalaz	+	+	+
Oksidaz	+	+	+
Koloni rengi	sarı	sarı	beyaz



Şekil 4.10: E2b, E4b ve E6b kodlu izolatların mikroskobik görüntüsü



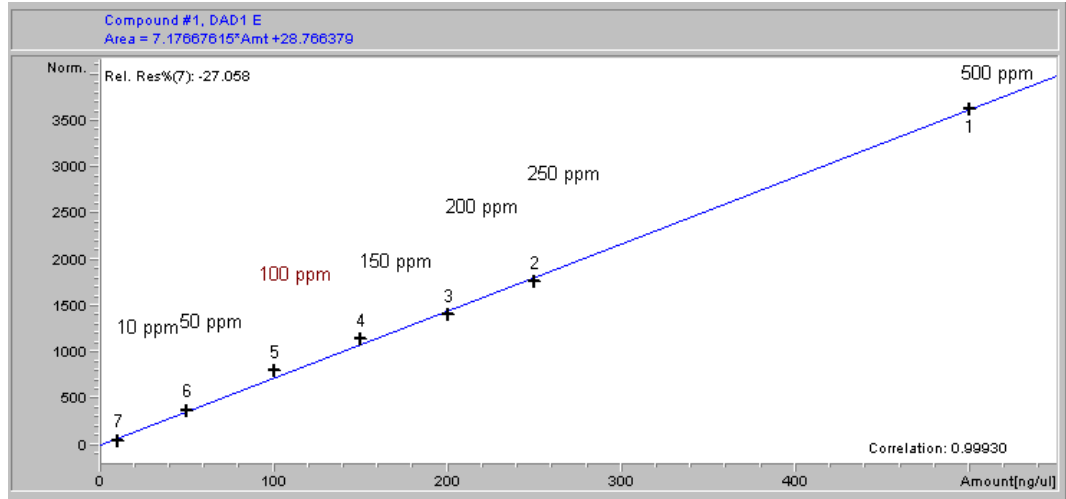
Şekil 4.11 E2b, E4b ve E6b kodlu izolatların petri görüntüsü

4.2 İzolatların Biyoparçalanma Etkinliğinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında Bushnell Haas ortamlarında denenen ve biyoparçalanma etkinliği olduğunu düşündüğümüz izolatlar; terefitalik asit için HPLC,1,2 dikloroetan için ise GC analizi yapılarak biyoparçalanma etkinlikleri belirlenmiştir.

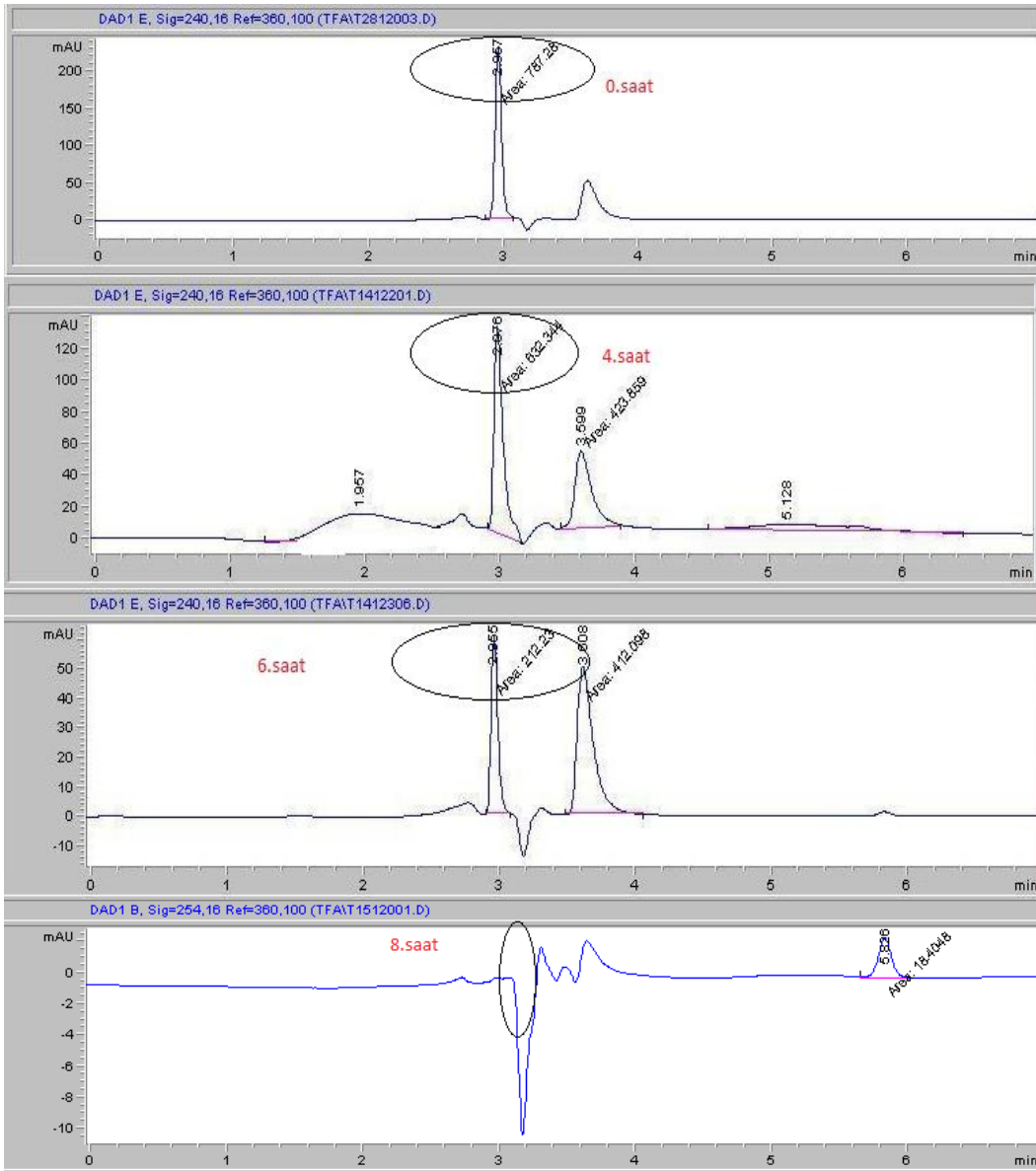
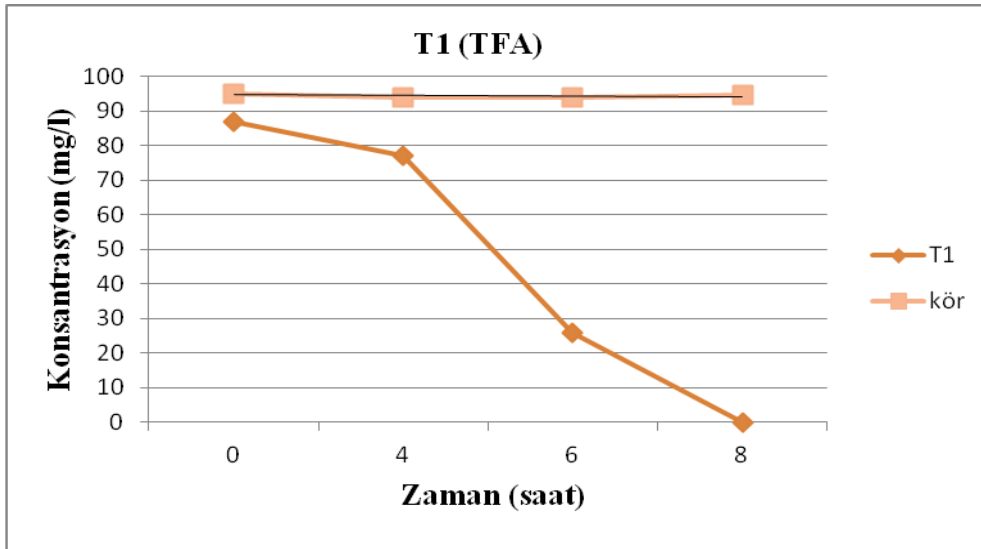
4.2.1 Terefitalik Asit Sonuçları

Terefitalik asit için HPLC'de oluşturulan standart grafik 4.1'de verilmiştir. Bu standarta bağlı olarak HPLC'de oluşan alan ile kimyasalın konsantrasyonu hakkında sonuca varılmıştır.



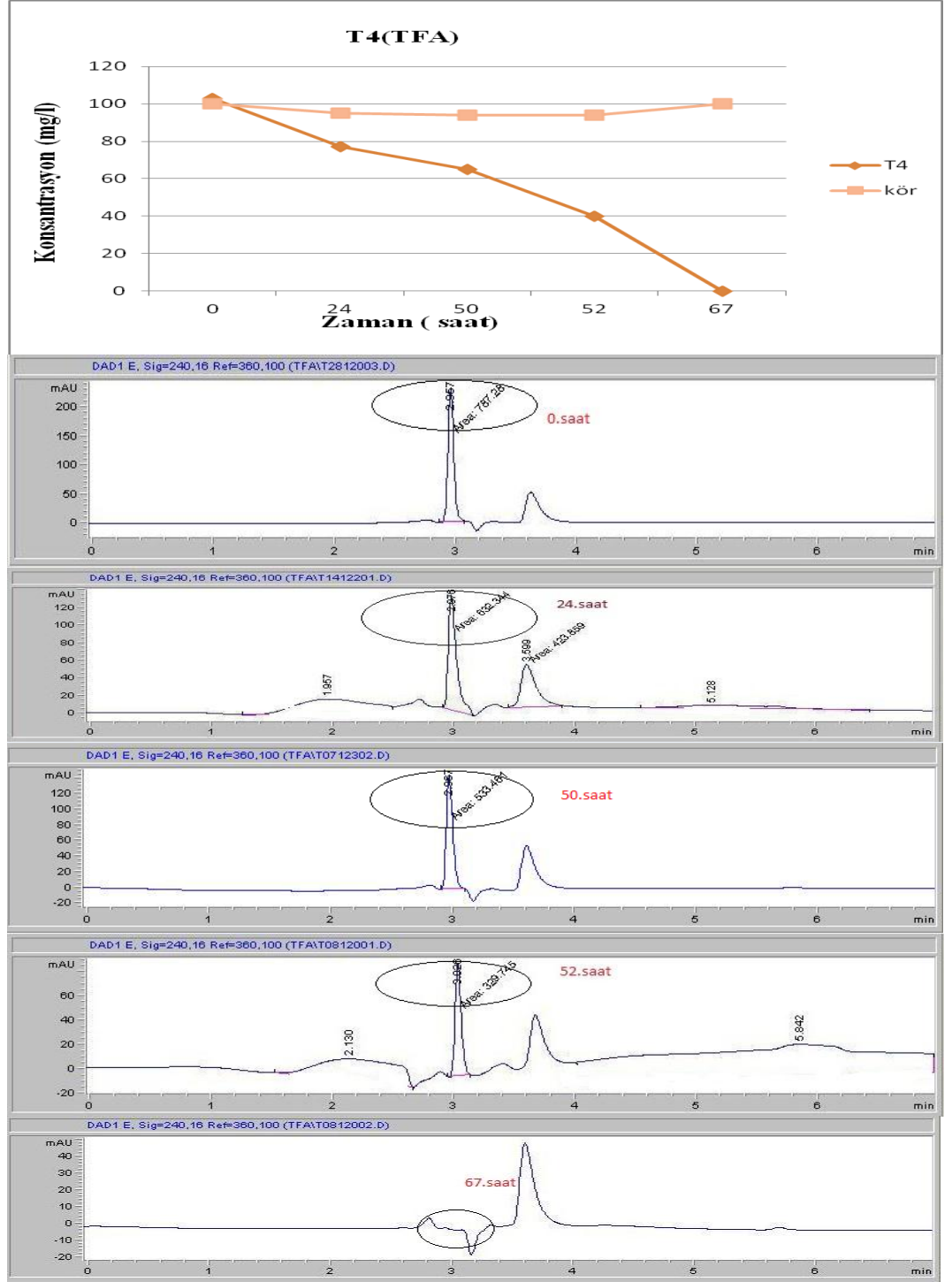
Grafik 4.1: Terefitalik asit standart eğri grafiği

Terefitalik asit HPLC denemesinde kullanılan tüm izolatlar için 100 mg/L kimyasal kullanılmıştır. HPLC denemesi boyunca tüm izolatlar için tamamen parçalanma olurken kör erleni denemesinde hiçbir değişiklik olmamıştır. İzolatlar arasındaki tek fark ise parçalanma zamanlarıdır. Terefitalik asit denemesinden elde edilen 4 izolatın HPLC piklerindeki değişimler grafik 4.2, 4.3, 4.4, 4.5'de verilmiştir. Analizlerde kör erlenleride kullanılarak biyoparçalanma etkinliği ve oranı hakkında karar vermeye neden olmuştur ve kör erleninde yapılan HPLC denemesi grafik 4.6'da verilmiştir



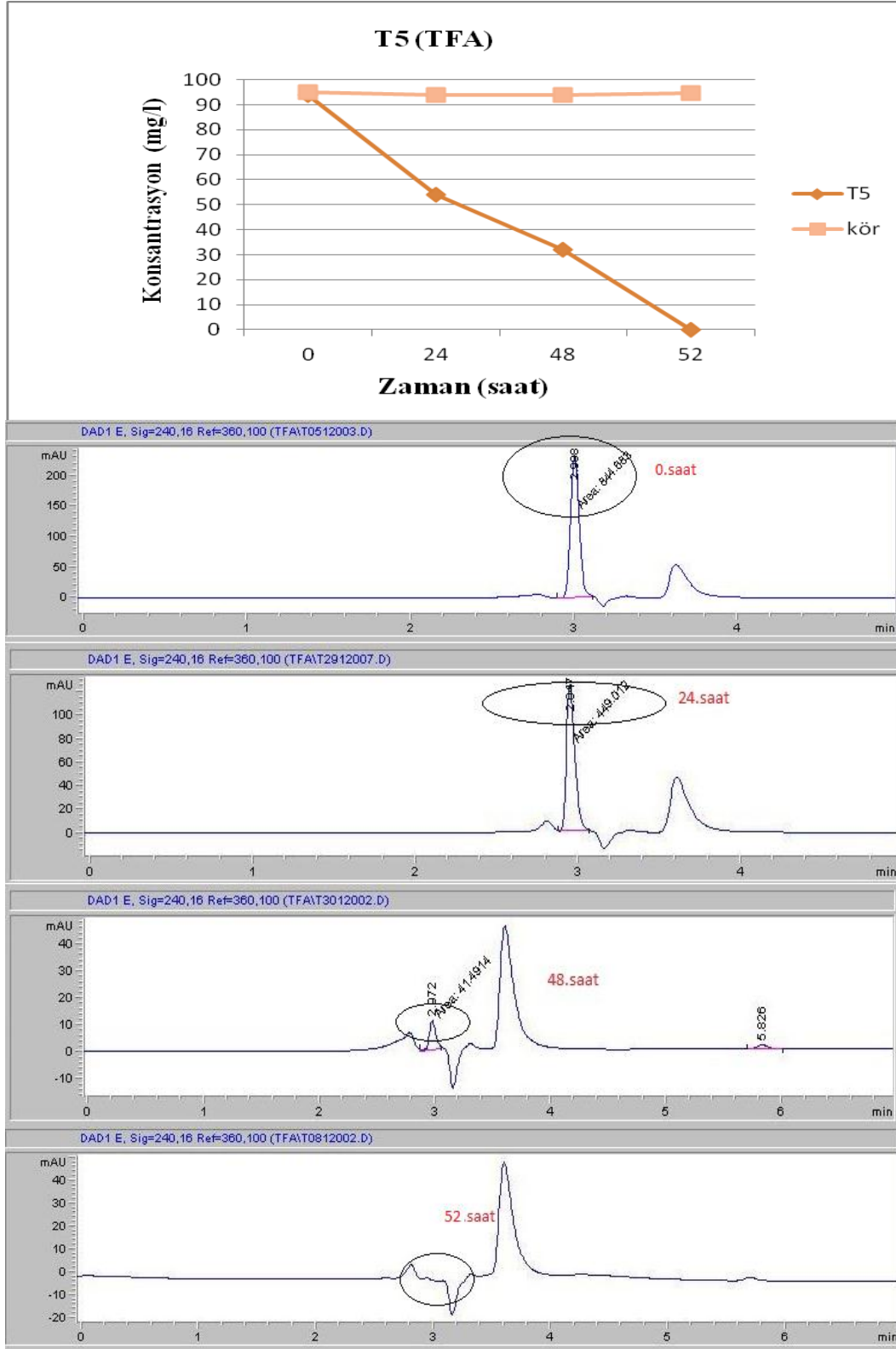
Grafik 4.2: T1 izolatının HPLC sonuçları

T1 izolatu için HPLC grafiklerine bakıldığında tereftalik asiti 8 saat sonunda %100 oranında parçaladığı görülmüştür. Alıkonma zamanı yaklaşık 3.5 dk. olarak görülen pikin tereftalik asit çözgeni olan DMSO'ya ait olduğu belirlenerek ilave pik oluşumu gözlenmemiştir. Dört farklı saatte paralelli örnekler alınarak orantılı bir biçimde özellikle 4.saatten sonra kimyasalın parçalandığı görülmüştür.



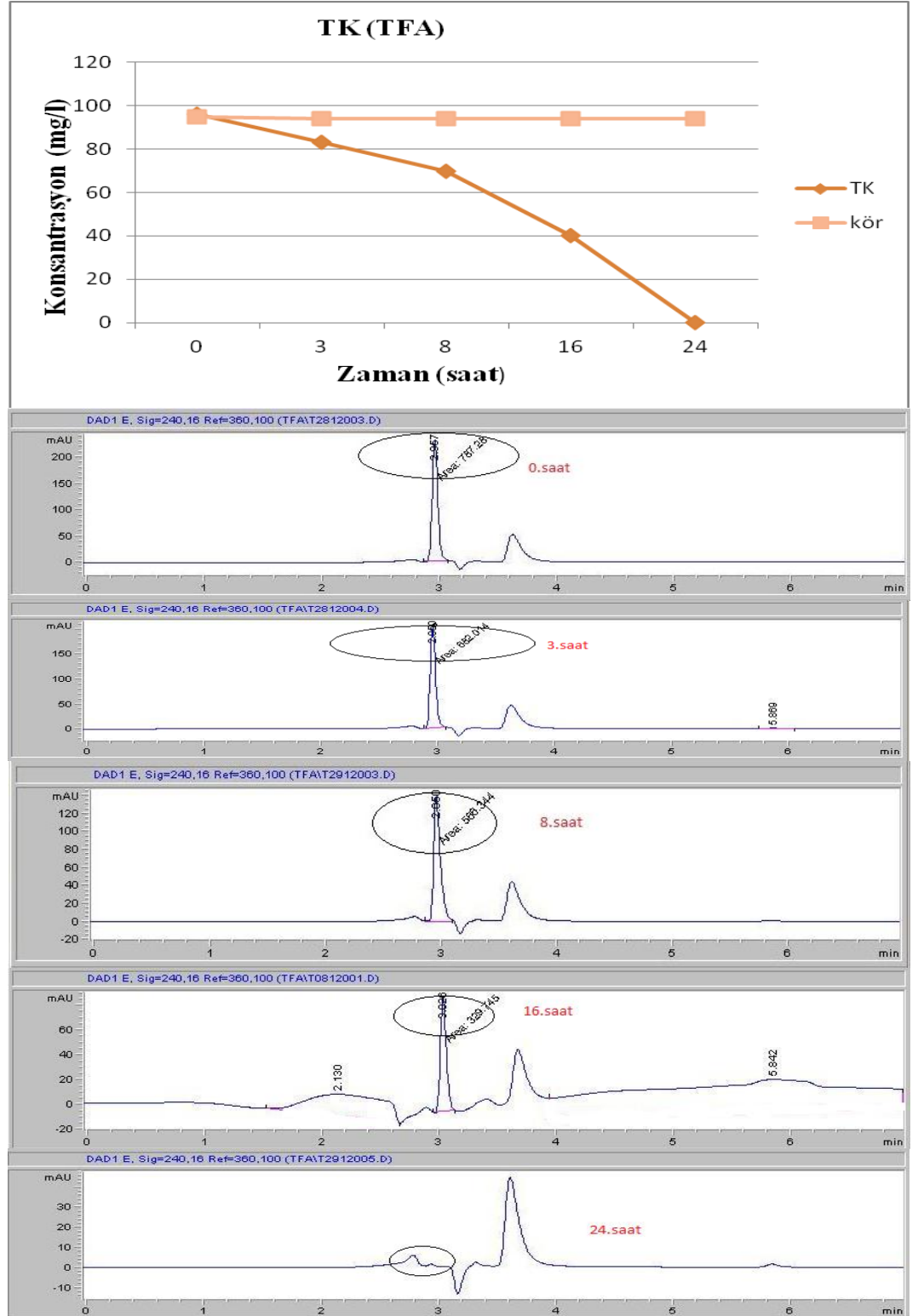
Grafik 4.3: T4 izolatu için HPLC sonuçları

HPLC analizleri sonucu izolat T4' ün 67. saat sonunda tereftalik asiti %100 oranında parçalandığı görülmektedir. Beş farklı zamanda alınan örnekler sonucunda tereftalik asitin orantılı olarak azaldığı görülmüştür.



Grafik 4.4: T5 izolatının HPLC sonuçları

HPLC analizleri sonucu izolat T5' in 52. saat sonunda tereftalik asiti %100 oranında parçaladığı görülmektedir. Dört farklı zamanda alınan örnekler sonucunda tereftalik asitin orantılı olarak azaldığı görülmüştür.

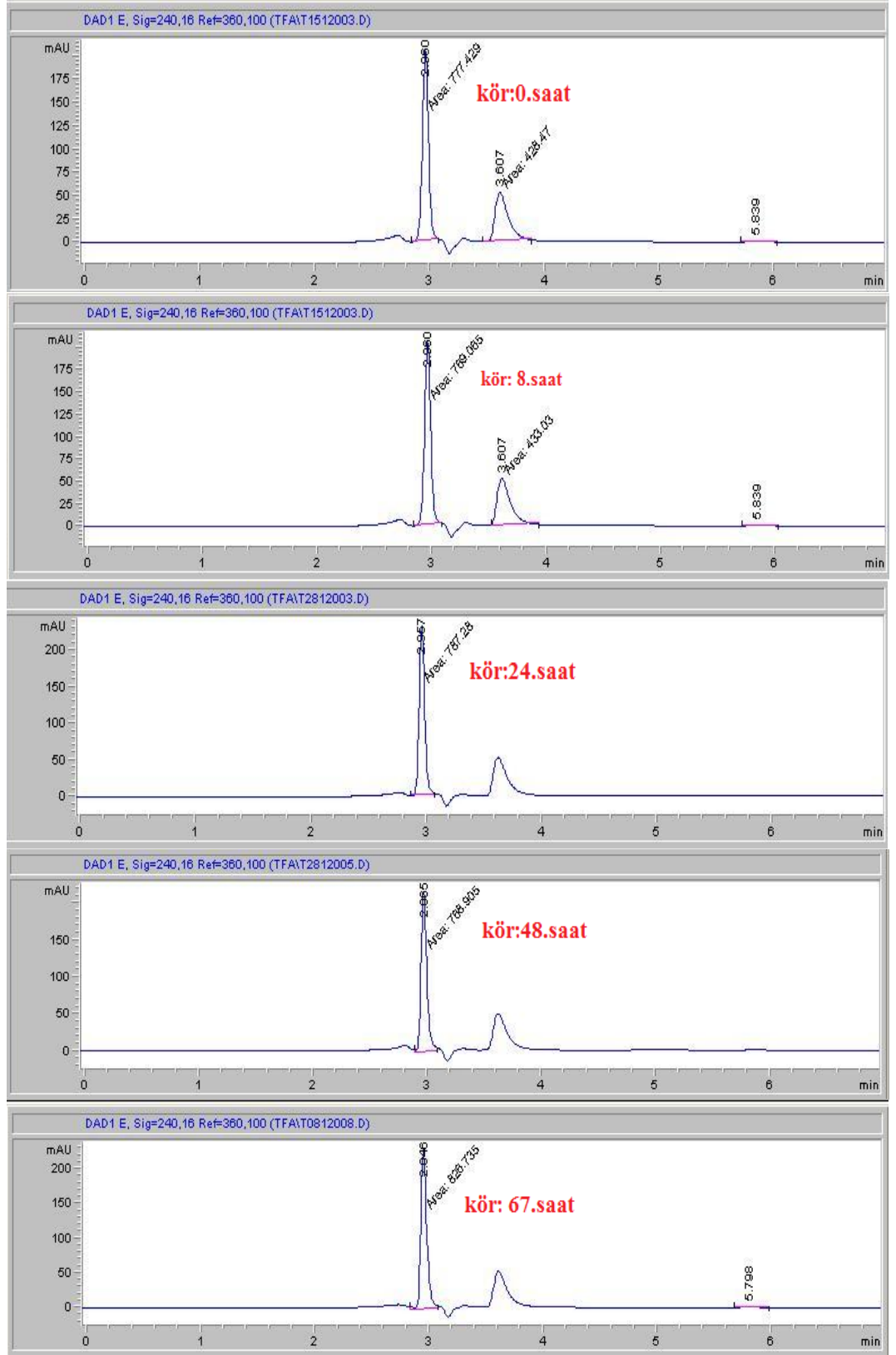


Grafik 4.5:TK izolatının HPLC sonuçları

HPLC analizleri sonucu izolat TK' nın 24. saat sonunda terefitalik asiti %100 oranında parçaladığı görülmektedir. Beş farklı zamanda alınan örnekler sonucunda özellikle 16-24. saat aralığında biyoparçalanmanın arttığı görülmüştür.

Tez çalışmasında kullanılan dört izolattan T ve TK izolatları diğer izolatlara göre daha kısa sürede parçalama özelliğine sahiptir.

Elde edilen izolatların HPLC analizi ile etkinlikleri belirlenirken aynı zamanda kör erleni denemeside yapılmıştır. Aynı konsantrasyonda kimyasal içeren kör erleni denemeleri, kimyasalların mikroorganizmalara bağlı olmayan değişimlerini belirlemek amacıyla ölçülmüştür. Tüm denemelerde kullanılan kör erleni sonuçlarında terefitalik asit konsantrasyonunda bir azalma olmamıştır. Kör erleni denemesinin HPLC sonuçları Grafik 4.6'da gösterilmiştir.

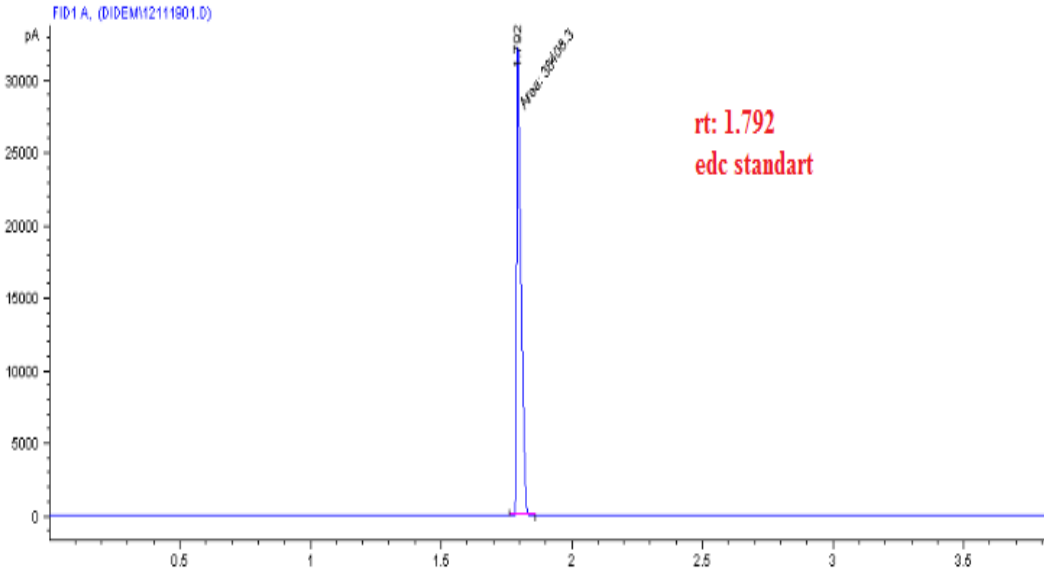


Grafik 4.6: Tereftalik asit denemesinde kullanılan kör erleni HPLC sonuçları

4.2.2. 1,2 dikloroetan sonuçları

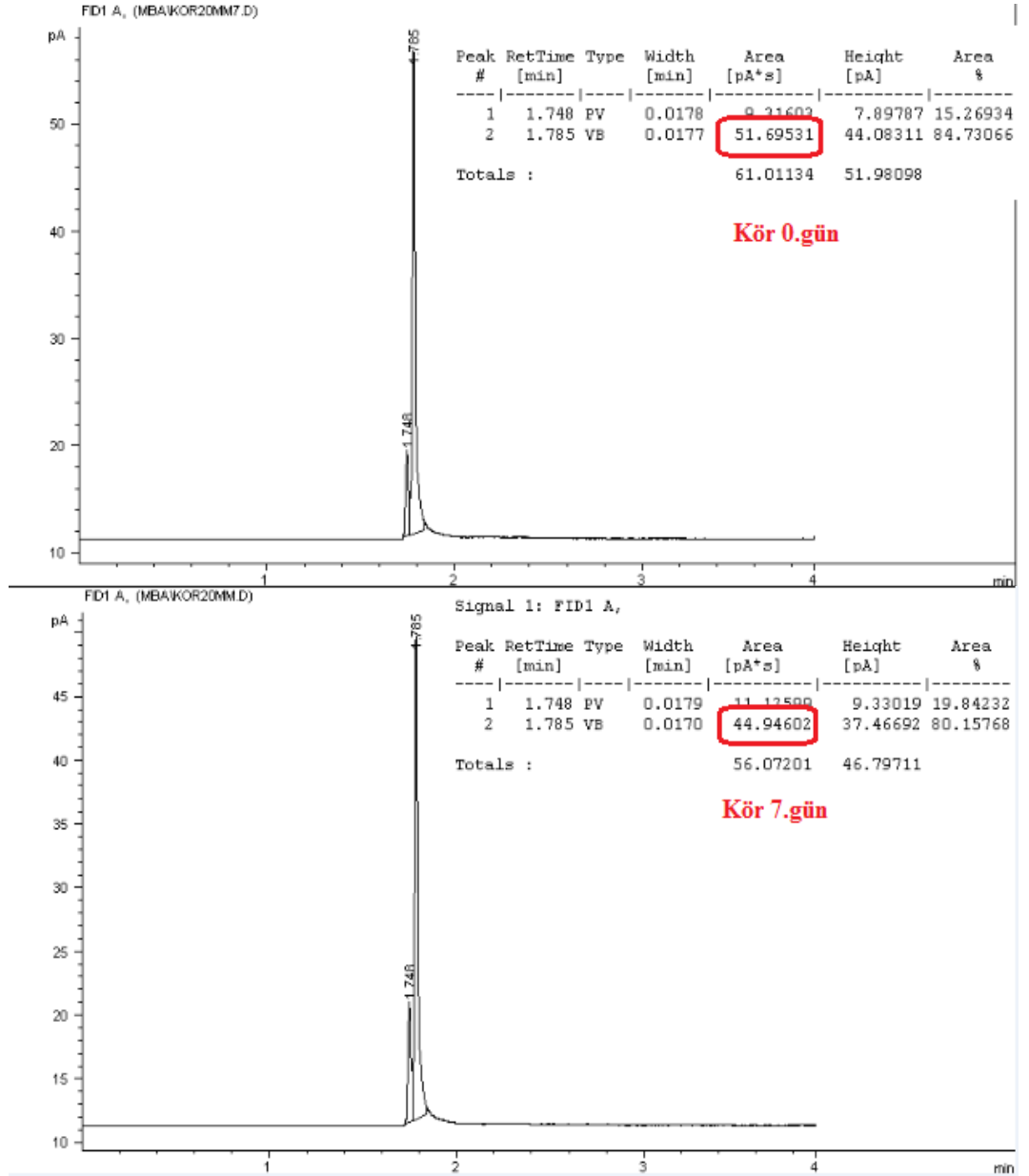
EDC (1,2 dikloroetan) ise HPLC analizi ile belirlenememiş olup Petkim Petrokimya A.Ş laboratuvarlarına GC-MS analizleri için gönderilmiştir. Ancak aletlerde oluşan arızalar nedeniyle GC analizleri tam randımanlı bir şekilde yapılamamıştır. Kimyasalı kullanan organizmaların saptanabilmesi için bu analizler Biyomühendislik Bölümü Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarında Agilent GC 6890N cihazı ile yapılmıştır.

1,2 dikloroetan; GC (6890N Agilent Technologies Network GC System) cihazı ile FID (flame ionization detector) ve HP-FFAP 30mx0.25mmx0.25 mikrometre kapiller kolon (J&W Scientific) kullanılarak analiz edilmiştir. Numuneler 0.2 mikronluk filtreden geçirilerek sisteme verilmiştir. Grafik 4.7’de görüldüğü gibi 1,2 dikloroetan 1.792 alıkonma süresinde pik vermiş olup bundan sonraki ölçümlere referans kabul edilmiştir.



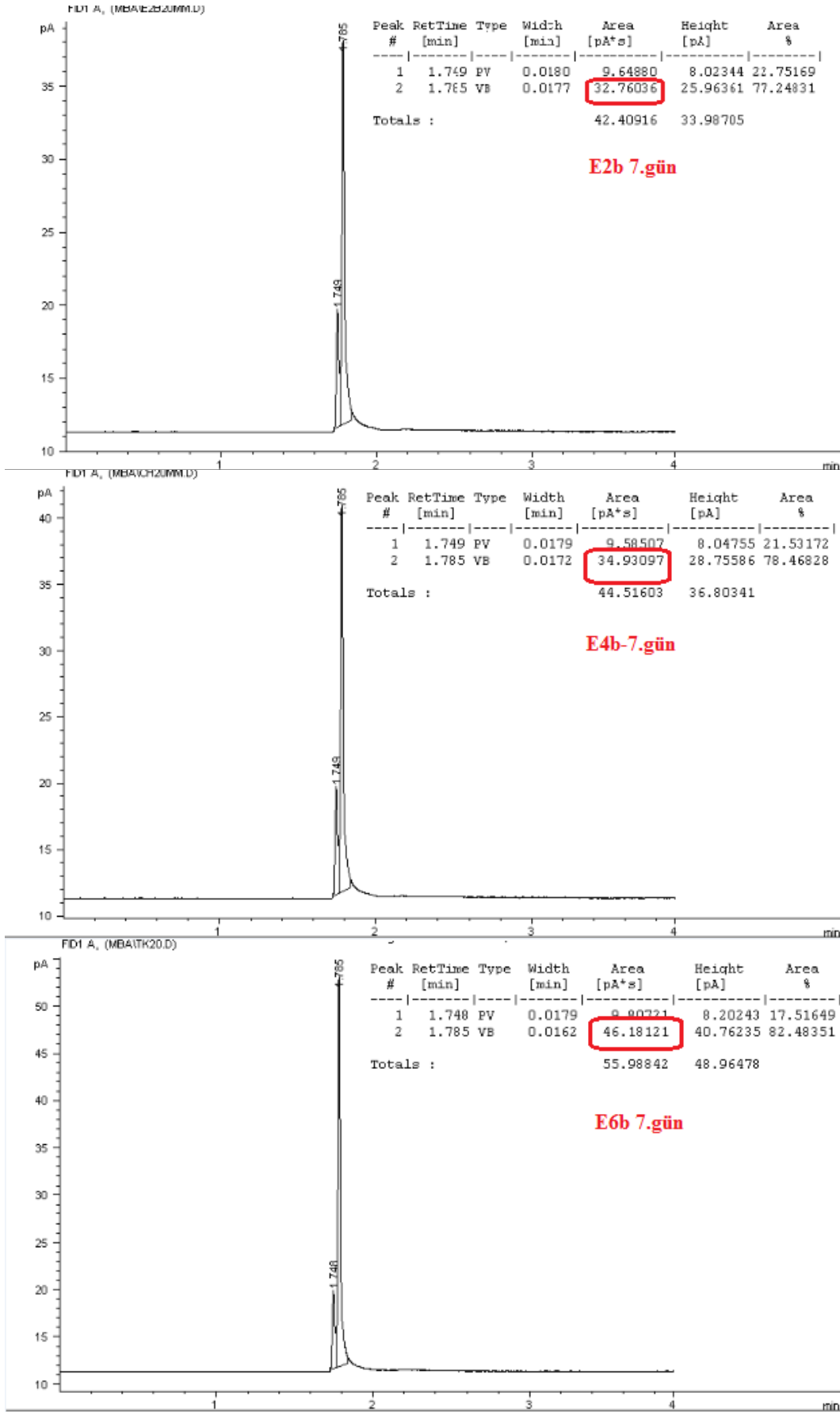
Grafik 4.7. 1,2 dikloroetanın GC analizinde saptanması

1,2 dikloroetanın buharlaşması nedeniyle tüm örnekler 1 haftalık inkübasyona bırakılmış ve şilifli erlenler sadece analiz esnasında açılarak ölçümleri yapılmıştır. Yapılan 7 günlük çalışmanın kör erleni 0. ve 7. gün arasındaki değişimler grafik 4.8’ de gösterilmiştir.



Grafik 4.8. 1,2 dikloroetan içeren kör erleni denemesindeki değişimler

Görüldüğü gibi %12'lik bir azalma meydana gelmiştir. Bu azalmalara bakarak izolatlardaki düşmeler kimyasalın biyoparçalama etkinliğini belirlememize yardımcı olmuştur. Grafik 4.9' da izolat E2b, E4b, E6b'nin 7.gün sonundaki EDC piklerinin alanını göstermektedir.



Grafik 4.9. E2b, E4b, E6b kodlu izolatların GC analizi ile biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi

Yapılan çalışmada E2b ve E4b kodlu izolatların %25-30 oranında 1,2 dikloroetanı parçaladığı saptanmıştır. Ancak E6b kodlu izolatin kör ile aynı pik alanına sahip olmasından dolayı biyoparçalanma etkinliği gözlemlenmemiştir.

Petkim Petrokimya Holding A.Ş'de yapılması planlan EDC analizi rutin olarak yapıldığı için güvenilir bir sonuç oluşturacak olup bizim çalışmamıza yön vermesi planlanmaktaydı. Fakat cihazda bulunan teknik arızalar nedeniyle EDC analizinin Petkim tarafından yapılamaması bizim hem zaman kaybımıza yol açmış olup aynı zamandada tam olarak GC şartları standardize edilememiştir.

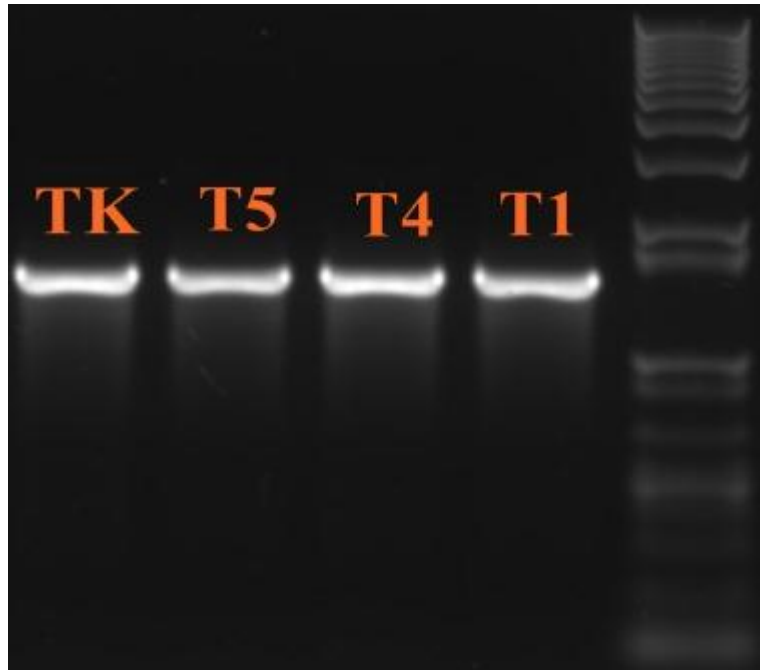
4.3. İzolatların Moleküler Tanılamaları

4.3.1. DNA izolasyonu ve saflık kontrolü

Tereftalik asit ve 1,2 dikloroetan için elde edilen izolatlar, ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA 'ların kontrolleri %1'lik agaroz jelde yapılmıştır

4.3.2. PZR ürünleri saflık kontrolü

Elde edilen ve saf olduğu belirlenen DNA' ların üniversal primerler kullanılarak çoğaltımları gerçekleştirilerek %1'lik agaroz jelde doğrulamaları yapılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Üniversal primerlerle çoğaltılmış PZR ürünlerinin %1 agaroz jelde yürütülerek bantların belirteç DNA dizileri ile karşılaştırılması

4.3.3 PZR ürünlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi

Çalışmamızda üniversal primerler ile çoğaltılmış olan 16S rRNA'nın baz dizisi tayini Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (MOBAM) 'da yaptırılmıştır. Elde edilen veriler Bioedit programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tür tayini Gen Bankası'nın web sayfasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır. Her bir izolata ait DNA dizileri ve Gen Bankası'ndan elde edilen sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

MOBAM ' a gönderilen PZR ürünleri yaklaşık 1500bp uzunluktadır. Bu uzunlukta ürünün 1 primer seti (forward veya reverse) kullanılarak okunması durumunda yöntem kaynaklı olarak arada okunmamış bölgeler oluşabilmektedir. Her bir primerin yaklaşık 600 bazlık kısmı doğru olarak okunmayı sağladığı düşünülmelidir. Reverse primerle elde edilen sekansın bir kısmının forward primer ile okunan sekansla eşleştirilmesi çalışmanın güvenilirliği açısından çok önemlidir (Dale and Schantz, 2002).

Bu nedenle 1500bp'lik PZR ürününün mümkün olan en uzun sekans dizisinin elde edilmesi amacı ile, dizi analizleri iki farklı primer (27F ve 1492R) kullanılarak yaptırılmıştır.

MOBAM laboratuvarından herhangi bir işleme uğramamış DNA dizi sonuçları gönderilmiştir. Her izolat için 2 primer tarafından belirlenen iki sonuç gönderilmiştir. Bioedit programında bu 2 farklı sonuç birleştirilerek her izolat için tek bir sekans dizisi oluşturulmuştur. Uygun forma getirilen DNA dizileri Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve BLAST sonucu tereftalik asit çalışmasında; izolat T1: *Pseudomonas* sp.izolat T4: *Chryseobacterium* sp. izolat T5: *Burkholderia* sp.ve izolat TK: *Arthrobacter nicotinae* olarak belirlenmiştir.

1,2 dikloroetan çalışmasında ise sekansa gönderilen organizmalar izolat E2b: *Arthrobacter* sp. izolat E4b: *Microbacterium* sp. ve izolat E6b: *Pseudomonas* sp. olarak belirlenmiştir.

Bu işlem yapılırken aynı zamanda primerlerin ortak belirlediği sekanslar da eşleştirilerek kontrolü sağlanmıştır. Aşağıda verilen tüm sekans sonuçları 5'→3' doğrultusundadır. DNA dizi sonuçlarının başında verilen kod numaraları Gen bankasına kayıt ettirilmiş dizilerin accession (kayıt) numaralarıdır. E6b kodlu izolat hariç diğer tüm örnekler için accession numaraları alınmış olup, E6b kodlu izolatın sonucu henüz gelmemiştir.

İzolatlara ait 16S rDNA'nın kısmi dizileri Çizelge:4.4, 4.5, 4.6,4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. JX480627 aksesyon numarası ile Genbank' a kayıt ettirilmiş izolat T1: *Pseudomonas* sp. 16S rDNA dizisi.

GCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAG
TTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGC
TAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACG
CATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA

Çizelge 4.5. JX480628 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat T4: *Chrysobacterium* sp. 16S rDNA dizisi.

TATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTTAG
GCGGATCTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCACAGCTTAACTGTGAAACT
GCCATTGATACTGCAGGTCTTGAGTAAGGTAGAAGTAGCTGGAATAAG
TAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGA
AGGCAGGTTACTATGTCTTAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGCTA
ACTCGTTTTTGGGTTTTTCGGATTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGT
TAGCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAATTCGATGATAC
GCGAGGAACCTTACCA

Çizelge 4.6. JX480629 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat T5: *Burkholderia* sp. 'nın 16S rDNA dizisi

TGCAGTCGACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCG
GCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGG
GACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
AGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA

GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTG
 TCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGTACC
 GGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCA
 GGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
 TGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
 CCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
 CGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGA
 TGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCCTTAGTAACGTAGCTAACGCG
 TGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCG
 ATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGC
 TGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCAT
 GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGAC
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCAT
 GGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTTCGGAACAGAG
 GGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAG
 TCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
 CACCGCCCCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTC
 TAACCGCAAGGAGGACGTCA

Çizelge 4.7. JX480630 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat TK: *Arthrobacter nicotinae* 'nin 16S rDNA dizisi

TAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGC
 TCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGAGGCTCAACCTC
 GGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTG
 GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC
 GATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAGCGAA
 AGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
 AACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTA
 GCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGG
 ATTAATTTCGATGC

Çizelge 4.8. KC480441 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat E2b: *Arthrobacter* sp' nin 16S rDNA dizisi

GAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTATCGTGAAAGTCCGAGGCTCAA
 CCTCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAG
 ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
 CACCGATGGCGAAAGGCAGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAG
 CGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC
 CGTAAACGTTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCG
 CCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 CTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT
 GCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATG

TTCCAGATCGCCTCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCTGGTTCACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCG
 GGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAT
 GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACA
 ATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCTA
 AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAG
 TCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACAC
 CCGAAGCCGATGGCCTAACCACCT

Çizelge 4.9. KC480442 aksesyon numarası ile Genbank'a kayıt ettirilmiş izolat E4b: *Microbacterium* sp'nin 16S rDNA dizisi.

TGCTGTGAAATCCGGAGGCTAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGC
 AGACTAGAGTGCAGGAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
 AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTG
 GGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCT
 TAGATAACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGG
 GTCCATTTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGG
 GACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGT
 CAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
 CGTGTGTCGTCAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGT
 TCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTGCCGGG
 GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA
 TGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAA
 TACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTG
 AGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
 TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCAGGTCTTGTACACACCGCCC
 GTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCT

Çizelge 4.10. İzolat E6b: *Pseudomonas fluorescens*' in 16S rDNA dizisi.

GCTACCGTTCTGGCTCAGGCAATCGTCAACGAAGGCTACAAAGCCGTC
 GCTGCCGGCATGAACCCGATGGACCTCAAGCGCGGCATCGACAAAGC
 GACCATCGCTGTTGTTGCCGAGCTGAAAAACCTGTCCAAGCCATGCGC
 TGACACCAAGGCTATCGCTCAGGTAGGCACCATCTCCGCCAACTCCGA
 CAGCTCCATCGGCGACATCATTGCCGAAGCCATGGAAAAAGTCGGTAA
 AGAAGGCGTGATCACCGTTGAAGAAGGCACTGGCCTGGAAAACGAAC
 GTCGGTTGTAGAAGGCATGCAGTTCGACCGTGGCTACCTGTCCCCGTA
 CTTCGTCAACAAGCCAGAAACCATGGTTGCCGAGCTGGACAGCCCGCT
 GATCCTGCTGGTCGACAAAAAGATCTCCAACATCCGCGAAATGCTGCC
 AGTACTGGAAGCCGTTGCCAAAGCCGGCCGTCCGCTGCTGATCGTTTC
 CGAAGACGTTGAAGGCGAAGCCCTGGCGACGCTGGTTGTGAACAACA
 TGCGTGGCATCGTTAAAGTCGCAGCCGTC

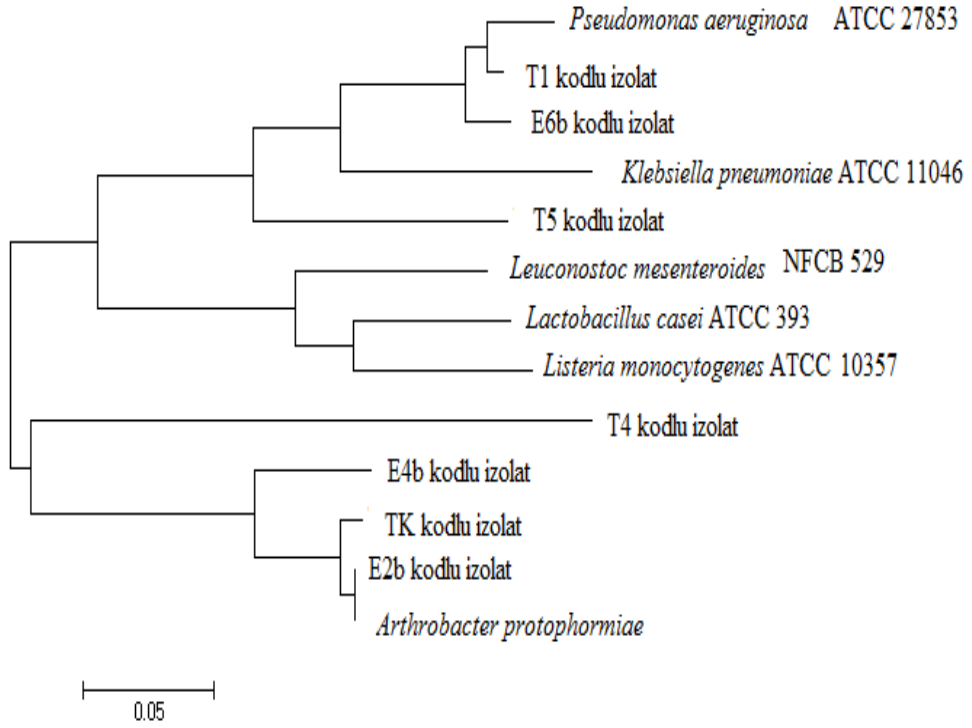
Çizelge 4.11’de ise izolatlara ait dizilerin NCBI’deki referans organizmalara benzerlik oranları ve erişim adresleri verilmiştir.

Çizelge 4.11. İzolatların NCBI’deki benzerlik oranları

İzolat kodları	Referans Organizma Erişim Numarası	Ref. Organizma	Benzerlik Oranları
T1	HF674459.1	<i>Pseudomonas</i> sp	%100
T4	JX480628.1	<i>Chryseobacterium</i> sp	%100
T5	JX480629.1	<i>Burkholderia</i> sp.	%100
TK	KC178593.1	<i>Arthrobacter nicotinae</i>	%100
E2b	JX477802.1	<i>Arthrobacter</i> sp.	%99
E4b	KC119117.1	<i>Microbacterium</i> sp.	%100
E6b	AY123661.1	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	%99

4.3.4 Filogenetik Ağaç Oluşturulması

İzolatlara ait 16S rDNA dizileri Mega 5.3 programı kullanılarak hizalanmış ve gerekli baz dizileri temizlenmiştir. Daha sonra ClustalW ile “Neighbor-joining” metoduyla türlerin filogenetik ağacı yapılandırılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: İzolatların Filogenetik Ağacı

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Günümüzde gelişmiş ülkeler, gelişmişlik düzeylerini oluşturma süreci içerisinde kentleşme ve sanayileşme politikaları güderken çevre sorunlarının baş göstermesi ve ekolojik dengenin bozulması sebebiyle ileride karşılaşmaları muhtemel çevresel tabloyu görmüşler, ulusal ve uluslararası boyutta ortaya çıkan sorunların açılması ve çevrenin korunması konusunda çalışmalara başlamışlardır.

Son zamanlarda bu çalışmalar arasında özellikle petrokimya endüstrisi atık sularının arıtımı üzerinde hassasiyetle durulmaktadır. Günümüzde geleneksel aktif çamur sistemleri hala yaygın olarak atıksu arıtım tesislerinde kullanılmaktadır fakat bu sistemler genellikle atıksuyun kolay parçalanabilir bileşikleri için iş gören sistemlerdir. Rekalsitran bileşiklerin bu sistemlere aniden girişi veya giriş suyunda onların oranının artması sistemi başarısızlığa uğratar. Bu sistem düşüklüğü başlıca bu rekalsitran bileşikleri parçalama kabiliyetindeki bakteri popülasyonundaki azalmadan dolayıdır. Birçok endüstriyel atık, mikroorganizmalara yabancı olan ve mikroorganizmalarca parçalanmaya dirençli olan insan yapımı kimyasalları içerebilir. Böyle atıkların biyolojik arıtımında büyük zorluklar görülebilir. Böyle durumlarda, yerli popülasyon bioaugmentasyon olarak bilinen bir prosesle spesifik kirleticilerin parçalanmasını gerçekleştirmek için seçilmiş özel bakterilerle iyileştirilebilir.

Yapılan tez çalışmasında doğal yollarla elde edilen mikroorganizmaların çevresel kirlilik etmeni olan tereftalik asit ve 1,2 dikloroetanın biyoparçalanmasındaki etkinliklerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla bu kimyasalları içeren atık su arıtma suyundan alınan aktif çamur ve yağlı çamur örneklerinden tereftalik asit biyoparçalama yeteneğinde olan toplam 4 tür 1,2 dikloroetan için ise 2 türün izolasyonları yapılarak tanılanmış ve biyoparçalama etkinlikleri ölçülmüştür.

Tereftalik asit kimyasalı ile ilgili yapılan çalışmaya baktığımızda; 6 farklı izolat elde edilmiştir. Fakat yapılan HPLC analizleri sonucunda 4 farklı izolataın biyoparçalama etkinliği belirlenmiş olup, tamamen biyoparçalanma gözlenmiştir. HPLC verilerinde oluşan yeni bir pik gözlenmemiş olup tereftalik asit yerine

oluşan bileşiğin ya karbondioksit ve suya kadar parçalandığı ya da kullanılan HPLC kolonunun yeni kimyasalı belirleyememesinden kaynaklanabilmektedir.

Terefitalik asiti karbon kaynağı olarak kullanabilen *Pseudomonas sp.* izolatıyla ilgili benzer bir çalışmaya bakıldığında, kimyasalın biyoparçalanma etkinliğini arttırmaya yönelik farklı parametreler denemiştir. Ortamdaki üre miktarını arttırarak 1400 mg/L terefitalik asitin parçalandığı gözlemlenmiştir. Yaklaşık 50 saat içerisinde ortamdaki kimyasal tamamen tükenmiştir (Wang, 2011).

Boya fabrikası atıksularındaki terefitalik asit biyoparçalama çalışmasında aerobik, anaerobik ve anoksik şartlarda biyoparçalanma oranları çalışılmıştır. En iyi parçalamanın aerobik şartlarda olduğu gösterilmiştir. 1000 mg/L ve 2000 mg/L terefitalik asitin, anaerobik koşullarda %56, anoksik koşullarda %10 ve aerobik koşullarda ise %96 oranında parçalanma meydana gelmiştir. Bu çalışma sonucunda aerobik parçalamanın diğer koşullardan çok daha önemli olduğu gösterilmiştir. Aerobik koşullarda ilk sekiz saat içerisinde kimyasalın büyük miktarı parçalanmış olup 24 saat sonunda ortamdaki terefitalik asit tükenmiştir (Guan et al., 2003).

Diğer bir çalışmada ise fitalik asit izomerleri anaerobik biyoparçalanması çalışılmıştır. 500 mg/L terefitalik asit 60 gün sonunda parçalanmıştır. Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer olarak anaerobik parçalanmanın aerobik parçalanmaya göre daha zor olduğunu göstermiştir (Kleerebezem, 1999).

Terefitalik asitin yer aldığı fitalik asit izomerleriyle ilgili yapılan bir çalışmada yüksek konsantrasyonlarda bulunan kimyasalın mikrobiyal konsorsiyum oluşturularak başarıyla parçalandığı gösterilmiştir. *Pseudomonas* ve *Bacillus* 'un kullanıldığı çalışmada tek bir organizmayla kısmen parçalanırken ikisi beraber bulunduğunda 8000mg/L terefitalatın parçalandığı gösterilmiştir (Kimura and Ito, 2001). Benzer bir çalışmada ise *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium* bakterileri kullanılarak karışım halinde arıtım sistemine verilmiş ve fitalik asitin üç izomerinide parçaladığı çalışılmıştır. Tek bir izolatin bu üç izomerin bulunduğu ortamda yaşayamamasına rağmen üçü birlikte bulunduğu

zaman kimyasalı parçalamaları konsoriyum çalışmalarının özellikle yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermiştir (Gibson and Subramanian, 1984).

Son yıllarda tereftalik asit biyoparçalanmasıyla ilişkili olan *cis*-dihidrodiol dehidrojenaz enzimleri ile ilişkili moleküler çalışmalarda mevcuttur (Bains et al, 2012). Diğer benzer çalışmalara bakıldığında kansorejen etkisi olduğu bilinen tereftalik asitin mikroorganizmalarca biyoparçalanmasının çevresel kirliliğe olan olumlu etkileri açıkça ortaya konmuştur.

Tereftalik asit arıtımına baktığımızda bizim kullandığımız 100 mg/L konsantrasyonun yeterli olduğunu görmekteyiz. Fakat olası bir durumda atık su sistemine gelen daha yüksek miktardaki tereftalik asiti parçalayan mikroorganizmaların olması çalışmanın ileriki hedefleri arasındadır. Bu durumda biyoparçalama için mikrobiyal konsorsiyum oluşturulması uygun olacaktır.

Atık sularda bulunan rekalsitrant kimyasallar arasında yer alan 1,2 dikloroetan (EDC); hem insan sağlığı hemde çevre kirliliği açısından parçalanması gereken bir bileşik olup biyolojik arıtım en alternatif yöntemdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda aerobik ve anaerobik biyoparçalanma çalışmaları yapılmıştır. EDC biyoparçalanmasıyla ilgili yapılan aerobik çalışmalarda *Pseudomonas* sp. izolatına ilave olarak çoğunlukla *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ve *Ancylobacter aquaticus* AD25 organizmalarına sıklıkla rastlanmıştır (Hage and Hartmans, 1999).

1,2 dikloroetan biyoparçalanmasıyla ilgili yapılan tez çalışmasında, 2 izolatın yaklaşık %25-30 oranında 7 gün içerisinde kimyasalı saptadığı gözlemlenmiştir. Çalışmalar hava almayacak şekilde şilifli erlenlerde gerçekleştirilmiş ve örnekler 1 haftalık inkübasyon sonucu ölçümleri yapılmıştır.

Petkim Petrokimya Holding A.Ş’de yapılması planlan EDC analizi rutin olarak yapıldığı için güvenilir bir sonuç oluşturacak ve bizim çalışmamıza yön vermesi planlanmaktaydı. Fakat cihazda bulunan teknik arızalar nedeniyle EDC analizinin Petkim tarafından yapılamaması bizim hem zaman kaybımıza yol açmış olup hemde tam olarak standardize edilememiştir. Laboratuvar koşullarımızda GC cihazımız olmadığı için eş zamanlı örnek analizi mümkün olmamış olup ancak 1 haftalık inkübasyona bırakılıp organizmalardaki değişimler incelenmiştir. Buda çalışmanın gidişatıyla ilgili karar verilmesine teşkil olmuştur. Bundan sonraki hedeflerimiz arasında özellikle EDC için ekstraksiyon metotları geliştirmek yada

mümkünse anaerobik yada anoksik şartlarda çalışarak örneklerin güvenilir biçimde belirlenmesi düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada yapılmış olan 7 günlük inkübasyon süresi uzatılarak kimyasalın parçalanma etkinliğinin daha uzun sürede incelenmesi ileriki hedeflerin arasındadır.

Benzer çalışmalara baktığımızda *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, 5mM EDC konsantrasyonunda kapalı serum şişelerinde çalışılmıştır. Haloalkane dehidrojenaz ve halokarboksilik asit dehalojenaz enzimi iş görmektedir. Biyoparçalanma etkinliğine GC cihazı ile bakılmış olup örneklerin ekstraksiyonu dietileter içeren dodekan ile yapılmıştır. 200 dakika gibi kısa bir sürede kimyasal parçalanmıştır. Ayrıca çalışmada enzimlerin farklı sıcaklık ve pH'daki aktivitelerinde bakılmıştır (Janssen et al., 1984).

Mycobacterium spp. TA5 ve TA7 suşlarıyla ilgili klorlu bileşiklerin biyoparçalanması ile ilgili çalışmaya bakıldığında kapalı serum şişeleri kullanılmıştır. Bu suşlar etan kullanan bakterilerdir ve ortama belli oranlarda etan eklenerek biyoparçalanma oranlarına GC cihazı ile bakılmıştır. EDC için TA7 suşu etkili olmuştur. 3 gün içerisinde %3 etan içeren TA7 suşu 1 mg/L kimyasalın %95'inden fazlası parçalanmıştır. %12 etan içeren ortamda ise 14 günde 50 mg/L kimyasalın %50' den fazlası parçalanmıştır (Hashimoto et al., 2000).

1,2 dikloroetan ile ilgili son yıllarda yapılan bir çalışmada ağır metallerin kimyasalın biyoparçalanmasına etkisi incelenmiştir. Arsenik, cıva, kurşun gibi ağır metallerin , 1,2 dikloroetanın biyoparçalanmasını yavaşlattığı saptanmıştır (Olaniran et al., 2011)

Tez çalışmasında kullanılan organizmalar aktif ve yağlı çamur örneklerinden screening ile elde edilmiştir. Bu çalışmayı diğer benzer biyoparçalanma çalışmalarından ayırmaktadır. Genellikle bilinen mikroorganizmalarla farklı koşullar denenerek biyoparçalanmayı artırıcı çalışmalar yapılmaktadır. 1,2 dikloroetan kimyasalı için bilinen bir mikroorganizma çalışmanın gidişatını kolaylaştırmakla beraber biyoparçalanma süresini kısaltmaya yönelik çalışmaların yapılmasına olanak vermektedir.

Tez çalışmasında kimyasalları parçalayacak mikroorganizmaların belirlenmesinde farklı seçici ortamlar ve izolasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Her ne kadar geniş bir enzimatik kapasiteye sahip olsalar da; parçalama

etkinliğindeki bu mikroorganizmalardan verim elde edilebilmesi için bu kompleks kimyasalların ortamda tek enerji kaynağı olarak bulunması gerekmektedir (Ghazali et al. 2004). Yapılan tez çalışmasında birçok literatür kaynağının taranması sonucunda Bushnell Haas Petroleum Broth zenginleştirme ortamı olarak tercih edilmiştir (Singh et al., 2008; Dzulkapli et al., 2009; Hamza et al., 2012).

Tez çalışmasının sonunda elde edilen izolatların ileriki çalışmalarda çok daha yüksek miktarda kimyasalı tamamen parçalayacağı öngörülmektedir. Mikroorganizmanın verimini arttıracak farklı azot kaynakları sıcaklık, pH gibi parametreler biyoparçalanma oranındaki değişimleri izlenecektir. Aynı zamanda izolatların karışık kültür halinde biyoparçalama etkinliklerinin ölçülmesi planlanmaktadır.

Buna ek olarak, izolasyonu yapılan ve tanılanan bu organizmaların çalışmada kullanılan referans kimyasalları parçalayan enzim ya da enzimleri kodlayan gen bölgelerinin saptanarak klonlanmasıyla biyoparçalamaya odaklı plazmidlerin oluşturulması ve bu sayede çok daha etkin ve kısa süreli biyoparçalama aktivitelerinin elde edilebileceği düşünülmektedir.

Özellikle ABD başta olmak üzere biyoremediasyon piyasası endüstrileşmiş ülkelerde giderek artmaktadır. ABD’de gelişmesinin sebepleri arasında biyoremediasyonun büyük bir kısmı ARGE’lerde geliştirilmiş olması ve Amerikan Çevre Koruma Kanunu’nun faaliyet alanı çok geniş ve yaptırımlarının diğer ülkelere göre çok daha ağır olmasıdır. 1990’lı yıllarda Amerikan biyoremediasyon piyasası 60 milyon \$ olarak hesaplanırken 1995’de 300 milyon \$’a yükselmiştir. Türkiye’de ise; bulunan biyoremediasyon şirketlerinin çoğu ABD şirketlerinin Türkiye’deki temsilcileridir ve ürün satıcısıdır. Bununla beraber, ülkemizde henüz bir arıtım tesisi kurmak tam anlamıyla destek görmemektedir. Konu ile ilgili yaptırımlar çok yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle ARGE’lerin geliştirilmesi gerekmektedir (Ceyhan ve Esmeray, 2012)

Biyoremediasyon diğer yöntemlere kıyasla kontamine su ve toprak alanlarının temizlenmesinde daha ucuz ve gelecek vaat eden bir yöntemdir. Uzun dönem kamu sağlığının korunması, küçük bir alanda ve az sayıda ekipmanla dahi prosesin uygulanabilirliği, tehlikeli materyallerin taşınmasına gerek olmaması bu teknolojinin tercih nedenlerindedir.

Yapılan tez çalışması ile özellikle zor parçalanan ve zararlı olan tereftalik asit ve 1,2 dikloroetani parçalayan bakterilerin biyolojik arıtım sistemlerinde kullanılmasıyla beraber ülkemizde çeşitli arıtım tesislerinde kullanılacak ve yurt dışından sürekli bakteri satın alınması yerine kendi üretimimiz olan bakteriler ülke içindeki arıtım sistemlerinde kullanılabilir hale gelecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alexander, M.**, 1999, Biodegradation and bioremediation second edition, Academic Press New York.
- ATSDR**, 2005, Agency for Toxic Substances and Disease Registry., CERCL Priority list of hazardous substances. *US Department of Health and Human Service*, Atlanta, GA, USA.
- Ausubel, F. M., Brent, R. and Kingston, R. E.**, 1997, Short Protocols in Molecular Biology ,*New york: John Wily & Sons*.
- Bains, J., Wulff, J.E. and Boulanger, J.M.**, 2012, Investigation terephthalate biodegradation: Structural characterization of a putative decarboxylating cis dihydrodiol dehydrogenase, *Elsevier*, 284-293p.
- Balba, M., Awadhi, N. and Daher, R.**, 1998, Bioremediation of oil contaminated soil: Microbiological Methods to feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 155-164p.
- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S. and Chakrabarti, T.**, 2007, Biodegradation of chlorinated compounds a rewiev.*Critical reviews in environmental Science and Technology*, 165-198p.
- Ceyhan, N. ve Esmeray, E.**, 2012, Petrol Kirliliği ve Biyoremediyasyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 5 (1):95101
- Dale, J. W. and Schantz, M.**, 2002, From genes to genomes concepts and applications of DNA technology. *Chichester: John Wiley & Sons*.
- Das, N. and Chandran, P.**, 2011, Microbial Degradtion of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *SAGE- Hindawi Access to Research Biotechnology International*.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M. and Clipson, N.**, 2008, Microbial PAH degradation. *Advances in Applied Microbiology* , 65(10): 27-66p.
- DSM.**, 1991, Scientific Services of Culture Collection, *The DSM-Experience, Campinas, Sao Paulo, Brasil*.
- Dzulkapli, N. F., Talib, S. A., Ramasamy, K. and Chun-Yang, Y.**, 2009, Identification of Bacterial Strains Capable of Degrading Malaysian Petroleum Sludge. *Conferenceon Scientific & Social Researchs (CSSR 08' 09)*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fritsche, W. and Hofrichter, M.**, 2005, Aerobic Degradation of Recalcitrant organic compounds by microorganisms. *Environmental Biotechnology, Concepts and Applications*. Wiley 203–227p.
- Gerhardt, P.**, 1981, Manual of Methods for General Bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 791p.
- Ghazali, M.F., Zaliha, N.R., Abdul, R.N., Salleh, A.B. and Basri, M.**, 2004, Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 61-67p.
- Gibson, D.T. and Subramanian, V.**, 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, Markel Dekker, New York 181-252p.
- Greenberg, B.M., Huang, X.-D., Gerhardt, K., Glick, B.R., Gurska, J., Wang, W., Lampi, M., Khalid, A., Isherwood, D., Chang, P., Wang, H., Wu, S.S., YU, X.-M., Dixon, D.G. and Gerwing, P.**, 2007, Field and laboratory tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils, In: Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium.
- Guan, B., Wu, Z., Wu, Z., XU, G. and Tan, T.**, 2003, Biodegradability of terephthalic acid in terylene artificial silk printing and dyeing wastewater, *Journal of Environmental Sciences*, 296-301p.
- Hage, J. C. and Hartmans, S.**, 1999, Monooxygenase Mediated 1,2 Dichloroethane Degradation by Pseudomonas sp. Strain DCA1, *Applied and Environmental Microbiology*, 2466-2470p.
- Hagerty, L.C. and Ramseur, J. L.**, 2010, Deepwater Horizon Oil Spill, Selected Issues for Congress. Congressional selected research.
- Hanza, U. D., Mohammed, I. A. and Sale, A.**, 2012, Potentials of Bacterial Isolates in Bioremediation of Petroleum Refinery Wastewater. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*, 1 (3): 131-138p.
- Hashimoto, A., Iwasaki, K., Nakasugi, N., Nakajima, M. and Yagi, O.**, 2000, Degradation of trichloroethylene and related compounds by Mycobacterium spp. Isolated from soil. *Clean Products and Process*, Springer 167-173p.
- Hileman, B.**, 1993, Concerns broaden over chlorine and chlorinated hydrocarbons. *Chem. Eng. News* 71: 11-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hughes, K., Meek, M.E. and Caldwell, I.**, 1994, 1,2 dichloroethane- evaluation of risks to helath from environmental exposure in Canada, *Journal of Environmental Science and Health* 293-303p.
- Hwang, H., Hu, X. and Zhao, H.**, 2007, Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Environmentally Friendly Techniques. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 25 : 313–352p.
- IARC**, 1982.Di (2-Ethylhexyl) phhthalate. I n : I A R C Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 29.
- Janssen, D. B., A. Scheper, L. Dijkhuizen, and B. Witholt**, 1985, Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol*, 673–677p.
- Juhasz, A. L. and Naidu Ravendra**, 2000, Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45 : 57-88p.
- Kaczerek, E., Chryzanowski, L., Pijanowska, A. and Olszanowski, A.**, 2007 Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins.*Elsevier*,4285-4291p .
- Khrishma, C.V. and Phale. P. S.**, 2007, Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters.*Indian J.Microbiology*,48:19-34p.
- Kimura, T. And Ito, Y.**, 2001, Two bacterial mixed culture systems suitable for degrading terephthalate in wastewater, *Journal Biosci Bioeng* 91:416-418.
- Kleerebezem, R., Hulshoff, L.W. and Lettinga, G.**, 1999, Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds, *Kluwer Academic Publisher*,Biodegradation 10: 63-73p.
- Kösesakal, T.**, 2011, Tatlı su eğreltisi *Azolla filiculoides* kullanılarak petrol hidrokarbonlarının fitoremediasyonu. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Leahy, J. G. and Colwell R. R.**, 1990, Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54 : 3, 305-315p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liang, D. W., Zhang, T., Fang, H. H. P. and He, J.,** 2008, Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80:183-198p.
- Liu, H., Yang, C., Tian, Y., Lin, G. and Zheng, T.,** 2010, Screening of PAH-degrading Bacteria in mangrove swamp using PCR-RFLP. *Marine Pollution Bulletin*. 60(11): 2056-2061p.
- Madsen, P. L., J. B. Thyme, K. Henriksen, P. Møldrup, and P. Roslev.,**1999, Kinetics of di(ethylhexyl)phthalate (DEHP) mineralization in sludge-amended. *Environmental Science & Technology*
- Nouchi, T. H. Miura, M. Kanayama, O. Mizuguchi, and T. Takano,** 1984, Fatal intoxication by 1,2-dichloroethane a case report. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 54: 111-113p.
- Olaniran, A.O., Balgobing, A. and Pillay, B.,** 2011, Quantitative assesment of the toxic effects of heavy metals on 1,2 dichloroethane biodegradation in co- contaminated soil under aerobic condition. *Chemosphere* 839-847p.
- Oldenhuis, R., Vink, R.L., Janssen, D.B. and Witholt, B.,** 1989, Degradation of chlorinatedaliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressingsoluble methane monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (11) 2819-2826p.
- Shokrollahzadeh, S., Azizmohseni, F., Golmohammad, F., Shokouhi, H. and Khademhaghighat, F.,** 2008, Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran.*Elsevier*,6127-6133p.
- Singh, C. and Lin, J.,** 2008, Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*. 7 (12): 1927-1932p.
- Snedecor, G.,**1993 Other chloroethanes. *IN: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 6: 11-36p.
- Stucki, G., U. Krebsler, and T. Leisinger.** 1983, Bacterial growth on 1,2-dichloroethane. *Experientia* 39:1271–1273p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R.,** 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. baskı, *Ege Üniv. Fen Fak. Teksirler Serisi*, İzmir, 260s.
- Temiz, A.,** 1994, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, *Hacettepe Üniv., Ankara*, 266s.
- Van Hamme, J. D., Singh A. and Ward, O. P.,** 2003, Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Mol. Biology Rewievs*, 503–549p.
- Vidali, M.,** 2001, Bioremediation. An Overview. *Pure Applied Chem.* 1163–1172p.
- Wang, J. Z., Teng, L., Zhang, J., Huang, X. and Zhang, J. F.,** 2011, Study on optimal biodegradation of terephthalic acid by an isolated *Pseudomonas* sp. *African Journal of biotechnology*, 3143-3148p.
- Wildeman, S. and Verstraete, W.,** 2003, The quest for microbial reductive dechlorination of C-2 to C-4 chloroalkanes is warranted, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61 (2), 94-102p.
- Yalaki, S.,** 2005, Adana merkez ve kırsal alanlarda trafiksel kaynaklı organik hava kirleticileri ve atmosferik poliaromatik hidrokarbonlar. *Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enst. Yüksel Lisans Tezi*.

ÖZGEÇMİŞ

Didem Eroğlu Bayrak, 20 Ekim 1987 İzmir doğumludur. İlk ve orta öğrenimini İzmir'de tamamlamıştır. 2004 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans öğrenimine başlamıştır. 2009 yılında Biyoloji Bölümü/ Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalından mezun olarak aynı yıl aynı anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.