

**BENZOİK ASİDİN *Pseudomonas aeruginosa*
TARAFINDAN BİYOLOJİK YIKIMININ
OPTİMİZASYONU**

**YASEMİN MÜŞTERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2008**

T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ

**BENZOİK ASİDİN *Pseudomonas aeruginosa*
TARAFINDAN BİYOLOJİK YIKIMININ
OPTİMİZASYONU**

**Yasemin MÜŞTERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30. 12. 1993 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
GRAFİKLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Aromatik Hidrokarbonlar	1
1.2. Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Yıkımı	5
1.2.1. Aromatik Hidrokarbonların Enerji Eldesi İçin Yıkımı	6
1.2.2. Kometabolizma (Yan metabolizma)	9
1.3. Benzoik asit	9
1.4. Benzoik Asidin Endüstride Kullanımı	11
1.5. Benzoik Asidin Hayvanlar Üzerindeki Etkileri	11
1.6. Benzoik Asidin Biyolojik Yıkımı	13
1.7. <i>Pseudomonas</i>	14
1.7.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1. Molar Absorbsiyon Katsayısının (ϵ) Hesaplanması	17
2.2. Minimal Kültür Ortamı	20
2.3. Bakteri Ekimi	22
2.4. Absorbans Ölçümü	22
3. BULGULAR	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
5. KAYNAKLAR	66
6. ÖZGEÇMİŞ	74

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tezin Adı: Benzoik Asidin *Pseudomonas aeruginosa* Tarafından Biyolojik Yıkımının Optimizasyonu

Yasemin Müşteri
Cumhuriyet Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa Sarı

Pek çok endüstriyel ürünün yapısında bulunan benzoik asit bitkisel ve hayvansal dokularda doğal olarak bulunan aromatik bir hidrokarbondur. Benzoik asit kararlı bir yapıda olduğundan biyolojik yıkımı oldukça zordur. Bu nedenle benzoik asidin çeşitli çevrelerde birikimi toksik etki yaparak canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Diğer taraftan *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı mikroorganizmalar benzoik asidi etkili olarak parçalayabilir.

Bu çalışmada, 0.002 M benzoik asit ve belirli nutrientleri içeren stok çözeltiden iki sıvı besiyeri (100 ml) hazırlanmıştır. Bunlardan biri deney grubu, diğeri ise kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Her iki besiyerine de stok bakteri solusyonundan 3 ml eklenerek inokülasyon yapılmıştır ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her deneyde deney grubuna çeşitli kofaktörler eklenerek eklenen kofaktörlerin benzoik asidin biyolojik yıkımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* tarafından benzoik asidin yıkımının optimum koşullarını belirlemek için 5 farklı pH'da (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9) ve 2 farklı sıcaklıkta (30 °C, 37 °C) çalışılmıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre kültür ortamına NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺ birlikte eklendiği zaman deney grubunda pH 7'de ve 37 °C'de benzoik asidin yıkımının en yüksek oranda arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları değerlendirilerek benzoik asit tarafından kirletilmiş çevrelerden benzoik asit etkili olarak elemine edilebilir.

Anahtar kelimeler: Benzoik asit, *Pseudomonas aeruginosa*, Çevre kirleticileri, Biyo-iyileştirme, Aromatik hidrokarbonlar.

SUMMARY

MSc Thesis

Name of Thesis: Optimization of Biological Degradation of Benzoic Acid by *Pseudomonas aeruginosa*

Yasemin Müşteri

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Musa Sarı

Benzoic acid which is an aromatic hydrocarbon found in structure of many industrial products as well as exists in plant and animal tissues naturally. Benzoic acid comprise a chemically stable structure therefore makes its biological degradation very hard. That is why, accumulation of benzoic acid in the various environments threats living organisms by toxicating them. On the other hand, some microorganisms like *Pseudomonas aeruginosa* capable to degrade benzoic acid efficiently.

In this study, two liquid media (100 ml) were prepared by using stock solution including 0.002 M benzoic acid and certain nutrients. One of the media was defined as experimental group and the other defined as a control group. Both media were inoculated by adding 3 ml of bacterial stock solution and incubated throughout 72 hours. In each experiment, various cofactors were added to experimental group and their effects on biological degradation of benzoic acid were investigated. In further studies experiments were performed at 5 different pH's (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9) and 2 different temperatures (30 °C, 37 °C) to determine optimum conditions for degradation of benzoic acid by *Pseudomonas aeruginosa*.

According to results of this study when NADH, Fe⁺⁺⁺ and Mg⁺⁺ were added together in cultured media, it is observed that degradation of benzoic acid increased at greatest rate at pH 7 and 37°C in experimental group. By evaluating results of this study, benzoic acid can be efficiently eliminated from the environments that were polluted by benzoic acid.

Keywords: Benzoic acid, *Pseudomonas aeruginosa*, Environmental pollutants, Bioremediation, Aromatic hydrocarbons.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Yrd.
Doç. Dr. Musa SARI'ya;

Her zaman yanımda olan ve bana destek veren aileme;

Arkadaşlarım Binnur Köksal'a, Canan Karakoç'a ve Elif Başer'e;

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa No**

- Şekil 1.** Biyosürefektan üretiminin lipofilik substratların hücre içine alımındaki rolü 4
- Şekil 2.** Aromatik hidrokarbonların biyolojik yıkımı sonucu oluşan iki ara ürün; katekol ve protokatekuat 7
- Şekil 3.** a) Katekolün orto-kırılması, b) Katekolün meta-kırılması 8
- Şekil 4.** Benzoik asidin 1,2-dihidro-1,2-dihidroksi benzoik asit yoluyla katekole dönüşümü 13
- Şekil 5.** *Pseudomonas putida*'da β -ketoasit yolu 15

TABLolar DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1. Benzoik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri	9
Tablo 2. Molar absorpsiyon katsayısını belirlemek için kullanılan 5 farklı konsantrasyondaki benzoik asit çözeltisinin 270 nm'deki absorbans değerleri	18
Tablo 3. Molar absorpsiyon katsayısını belirlemek için kullanılan 5 farklı konsantrasyondaki benzoik asit çözeltisinin 270 nm'deki absorbans değerleri	19
Tablo 4. Minimal kültür ortamı için kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 5. NADH ve Mg^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	23
Tablo 6. NADH'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	24
Tablo 7. ATP'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	25
Tablo 8. Fe^{+++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	25
Tablo 9. Mg^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	26
Tablo 10. Mn^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	26
Tablo 11. Cu^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	27
Tablo 12. Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	27
Tablo 13. NADH, Fe^{+++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	28
Tablo 14. NADH, Mg^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	28
Tablo 15. NADH, Mn^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	29
Tablo 16. Ca^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi	29
Tablo 17. NADH, Ca^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	30
Tablo 18. NADH, Cu^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	30
Tablo 19. NADH, Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	31
Tablo 20. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	31
Tablo 21. NADH, Cu^{++} , Mn^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	32
Tablo 22. NADH, Ca^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	32
Tablo 23. Fe^{+++} , Mg^{++} , Cu^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	33
Tablo 24. Fe^{+++} , Mg^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	33

Tablo 25. Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	34
Tablo 26. Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	34
Tablo 27. Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	35
Tablo 28. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	35
Tablo 29. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	36
Tablo 30. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	36
Tablo 31. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	37
Tablo 32. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	37
Tablo 33. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	38
Tablo 34. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	38
Tablo 35. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	39
Tablo 36. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	39
Tablo 37. NADH, Fe ⁺⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri	40

GRAFİKLER DİZİNİ	<u>SayfaNo</u>
Grafik 1. Benzoik asidin standart eğrisi	41
Grafik 2. Benzoik asidin standart eğrisi	41
Grafik 3. NADH'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	42
Grafik 4. ATP'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	42
Grafik 5. Fe ⁺⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	43
Grafik 6. Mg ⁺⁺ 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	43
Grafik 7. Mn ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	44
Grafik 8. Cu ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	44
Grafik 9. Zn ⁺⁺ 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	45
Grafik 10. NADH, Fe ⁺⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	45
Grafik 11. NADH, Mg ⁺⁺ 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	46
Grafik 12. NADH, Mn ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	46
Grafik 13. Ca ⁺⁺ 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	47
Grafik 14. NADH, Ca ⁺⁺ 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	47
Grafik 15. NADH, Cu ⁺⁺ 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi	48

Grafik 16. NADH, Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	48
Grafik 17. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	49
Grafik 18. NADH, Cu^{++} , Mn^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	49
Grafik 19. NADH, Ca^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	50
Grafik 20. Fe^{+++} , Mg^{++} , Cu^{++} 'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	50
Grafik 21. Fe^{+++} , Mg^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	51
Grafik 22. Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} 'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	51
Grafik 23. Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	52
Grafik 24. Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} 'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	52
Grafik 25. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} 'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	53
Grafik 26. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	53
Grafik 27. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	54
Grafik 28. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	54
Grafik 29. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	55
Grafik 30. NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbands ilişkisi	55

- Grafik 31.** NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi 56
- Grafik 32.** NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi 56
- Grafik 33.** NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi 57
- Grafik 34.** NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi 57

1.GİRİŞ

Benzoik asit aromatik bir hidrokarbondur ve kararlı bir yapıya sahip olduğu için çevredeki eliminasyonu oldukça zordur. Bu nedenle çevrede birikerek canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Benzoik asit ile kirlenmiş olan hava, toprak ve su gibi çevrelere uygulanan fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon metotları tam ve etkili bir çözüm getirmekten uzak gözükmemektedir (Kahraman ve Ark., 2005).

Bazı mikroorganizmalar (mantarlar ve bakteriler) benzoik asidi tam ve etkili bir şekilde parçalayabilmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* da bunlardan biridir ve benzoik asidi karbon kaynağı olarak kullanarak büyük ölçüde çoğalabilmektedir. (Reiner, 1971 ; Wang ve Ark., 2006). Buradan yola çıkılarak bu çalışmada benzoik asidin neden olduğu kirliliğin *Pseudomonas aeruginosa* tarafından maximum derecede giderilebileceği koşulların belirlenmesi ve belirlenen bu koşullar kullanılarak benzoik asitle kirlenmiş olan çevrelerin etkili bir şekilde biyo-iyileştirilmesi amaçlanmaktadır.

1. 1. AROMATİK HİDROKARBONLAR

Aromatik hidrokarbonlar petrol ve petrolün rafine edilmiş ürünlerinin önemli bileşenleridir. Aromatik bileşikler genellikle benzen olarak tanımlanır ve diğer aromatik hidrokarbonlarda benzene benzer kimyasal özellikler gösterir. En önemli aromatik hidrokarbonlar ; benzen, toluen (metilbenzen), etilbenzen, ksilen (dimetilbenzen) ve çok halkalı aromatik hidrokarbonlardır.

Tüm aromatik hidrokarbonlar benzen türevidir olduğundan dolayı benzenin özellikleri oldukça önemlidir. Benzenin genel formülü C_6H_6 'dır ve 3 tane $C=C$ çift bağ içerir. Halkasal ve doymamış olduğu için yapısal olarak halkasal alkenlere benzer, ancak alkenlere göre daha kararlı ve alkenlerin karakteristik reaksiyonlarına katılmaz. Benzen ve türevlerinin oldukça kararlı yapıda olması ve girdiği tepkimeler aromatik hidrokarbonları, doymamış alifatik hidrokarbonlardan ayırır.

Aromatik ve alifatik hidrokarbonlar arasındaki farklar bu bileşikleri belirlemede kullanılır. Biyolojik yıkımda ise benzerlikler görülür. Örneğin alifatik hidrokarbonlarda olduğu gibi aromatik hidrokarbonların aerobik yıkımında da direkt reaktant ve uç elektron alıcısı olarak moleküler oksijene ihtiyaç duyulur. Düz zincirli ve dallanmış alkanlara göre aromatik hidrokarbonlar yıkıma daha dirençli olmasına rağmen, bazı durumlarda alifatik hidrokarbonlardan daha kolay yıkılabilirler (Leahy ve Ark., 1990).

Klor, brom, flor gibi halojen yan gruplar içeren aromatik hidrokarbonlara halojenlenmiş aromatik hidrokarbonlar denir. PCB'ler (poliklorürlenmişbifeniller), dioksinler, DDT (1,1,1- trikloro-2,2-bikloro-feniletan), CFC'ler (kloroflorokarbonlar) gibi halojenlenmiş aromatik hidrokarbonlar çevrede kalıcı kirleticiler olarak bulunurlar. Çünkü içerdikleri yan gruplar nedeniyle daha az reaktiftirler ve biyolojik yıkıma dirençlidirler (Fetzner ve Ark., 1994; Janssen ve Ark., 2001; Nilsson, 2001).

Birden fazla halkasal yapı içeren polisiklik aromatik hidrokarbonlarda (PAH) önemli çevresel kirleticilerdir (Johnsen ve Ark., 2005). İki yada üç aromatik halkalı ve düşük molekül ağırlığına sahip olan naftalin, floren, fenantren gibi PAH'ların mikrobiyal yıkımının, dört yada daha fazla aromatik halkalı florantren, piren, benzoantresan gibi PAH'lara göre daha kolay olduğu çalışmalar sonucu ispatlanmıştır (Šepič ve Ark., 1997).

Aromatik hidrokarbonlar insan ve hayvanlar üzerinde kuvvetli karsinojenik potansiyele sahiptir. Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji teknikleri aromatiklerin karsinojenik mekanizmalarının anlaşılmasında büyük rol oynamıştır ve aromatiklerin tümör başlatıcı ve geliştirici özellikte potansiyel karsinojenler olduğu ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar sonucunda bu maddelerin immün sistemi baskılayıcı özellikte oldukları da görülmüştür. Karsinojenik potansiyellerinin yüksek oluşu da bu immüno toksik etkilerine bağlanmaktadır. Sonuç olarak aromatikler hem hücrel hem hümoral immüneyi inhibe etmektedir (Nilsson, 2001).

Aromatik hidrokarbonlar aşağıda sıralanan çeşitli kimyasal özellikleri gösterir.

a) Apolar olmaları nedeniyle suda az znrler ve biyolojik yıkımları biyosrfektanları gerektirir (Hofrichter ve Ark., 2000). Biyosrfektanlar, katı, sıvı ve gazlar arasındaki yüzey ve i yüzey gerilimini azaltabilen, hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşan amfilik bileşiklerdir (Salager, 2002; Kosaric, 2001). Biyosrfektanların görevi hidrofilik yüzey alanını arttırarak suda znmeyen substratların znrlğn arttırmak ve hücre duvarından geçişini kolaylaştırmaktır (Pieper ve Ark, 2000). Ramnoz şekeri ve yağ asitleri içeren glikolipit yapısındaki biyosrfektanlara ramnolipitler denir ve ramnolipitlerin yapısında bir veya iki tane ramnoz şekeri ve bunlara bağlı çeşitli uzunlukta β -hidroksi dekanolik yağ asitleri bulunur. Ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliğini arttırmaktadır (Ramana ve Ark., 1989; Guerra-Santos ve Ark.,1984). İşte bu özellikler ramnolipitlerin kararlılığını ve hidrofobik bileşikleri zebilme kapasitelerini etkilemektedir (şekil 1). Bu nedenle ramnolipitler kara ve denizlere dökülmüş petrol atıklarının temizlenmesinde, petrol taşıyan borularda viskoziteyi arttırmada, makine sanayi, motor yağları, petrol endüstrisi, tarım, tıp ve evre biyoteknolojisi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Kahyaoglu ve Ark., 2006; Sıdal ve Ark., 2000).

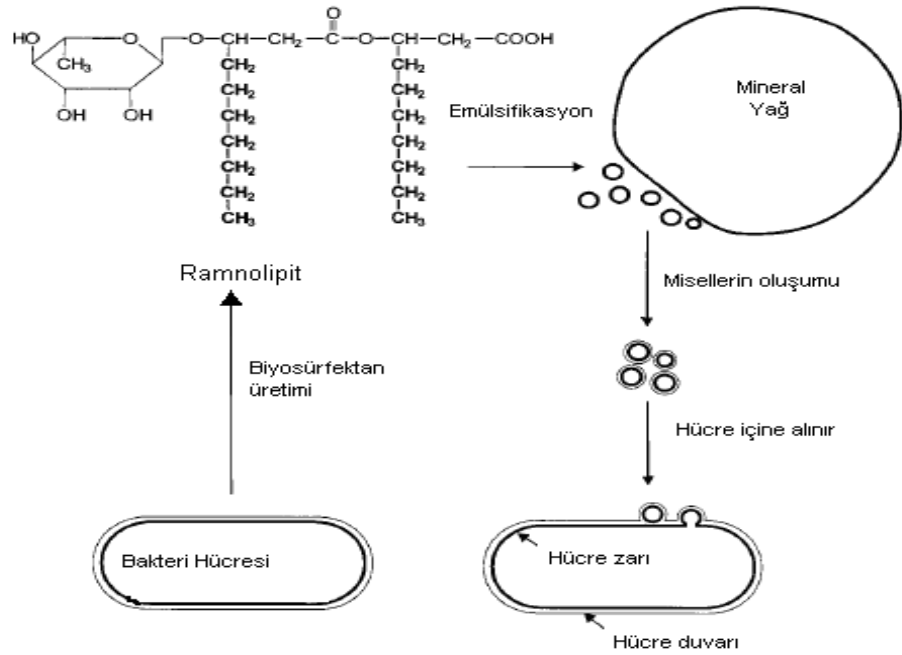
b) Aromatik hidrokarbonlar yüksek termodinamik stabiliteye sahiptir. Alkenler ve alkinler kolayca elektrofilik katılma reaksiyonu vermelerine karşın aromatik bileşikler elektrofilik yer değiştirme reaksiyonu verirler.

c) Aromatik hidrokarbonlar yarı uçucu özellik göstermekte ve uçuculukları sıcaklığa bağlıdır. Örneğin tropik bölgelerde yarı uçucu olan bu maddeler çok hızlı buharlaşır ve rüzgar tarafından uzak mesafelere taşınırlar. Düşük sıcaklıklarda ise bu maddeler yoğunlaşır ve soğuk iklimlerde zenginleşirler.

d) Yüksek lipofilik özellik gösterirler yani yağ dokusunda znrler. Bu zellik kimyasal yapıya bir ya da daha fazla halojen yan grup eklenmesi sonucu artar. Örneğin dioksinler ve PCB'ler canlı dokularda ve sedimentteki organik

materyalde yüzey suyundan daha yüksek düzeyde birikir. Bu durum biyolojik birikime yol açar (Bedding ve Ark., 1983).

e) Toksik özelliktedirler. Bu nedenle bu tür kimyasal maddelere uzun süre maruz kalma sonucu kanser, üreme sistemi bozuklukları, nörotoksik etkiler ve immün sistem bozuklukları meydana gelebilir (Nilsson, 2001).



Şekil 1. Biosürfektan üretiminin lipofilik substratların hücre içine alımındaki rolü (Hofrichter ve Ark., 2000)

f) Aromatik hidrokarbonlar biyomagnifikasyon özelliği gösterirler. Biyomagnifikasyon, biyolojik yıkıma dirençli olan bileşiklerin besin zincirinin üst basamaklarına çıkıldıkça birikiminin artması olarak bilinmektedir. Besin zincirinin alt basamaklarında hiçbir toksik etkiye sahip olmayan maddeler üst basamaktaki avcılar için çok toksik olabilir. Çünkü bu canlılarda birikerek toksik etkilerin meydana gelmesine neden olan kritik düzeye ulaşabilir. Örneğin DDT ve PCB gibi maddelerin etkisi ilk olarak avcı kuşlar ve balıkla beslenen memelilerde görülmüştür (Nilsson, 2001).

1.2. AROMATİK HİDROKARBONLARIN BİYOLOJİK YIKIMI

Aromatik hidrokarbonlar çeşitli yıkıcı güçlere maruz kalırlar ve bunlar arasında biyotik yıkım ya da metabolik süreçler hayati rol oynamaktadır. Bu metabolik süreçler mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda oldukça farklılık gösterir ve sadece aromatiklerin orijinal formunun yok olmasını sağlamakla kalmaz ayrıca fiziksel ve kimyasal yapılarını da değiştirir.

Yüksek yapılı hayvanlarda aromatiklere karşı uygulanan reaksiyonlardaki amaç aromatikleri daha polar ve vücuttan daha kolay atılabilen bir forma dönüştürmektir. Bu reaksiyonlar karaciğer gibi daha az özelleşmiş organlarda gerçekleşir ve biyolojik yıkım oksidatif bir detoksifikasyon sisteminin aktivitesi tarafından belirlenir.

Mikroorganizmalar ise aromatik hidrokarbonların biyolojik yıkımında ve mineralizasyonunda büyük rol oynamaktadır (Alexander, 1981). Çünkü birçok mikroorganizma aromatik hidrokarbonları enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Ayrıca mikroorganizmalarda gerçekleşen fermantasyon, anaerobik metabolizma, kemolitotrofik metabolizma ve ekzoenzimlerle sağlanan metabolizma gibi çeşitli metabolik aktiviteler diğer organizmalarda görülmez (Bourdeau, 1989). Mikroorganizmaların bir diğer özelliği de değişen çevre koşullarında toksik özellikteki kimyasal maddelere karşı mutasyonlarla sağlanan adaptasyon yeteneğidir (Pries ve Ark., 1994).

Bakteri ve mantarların çoğu aromatik hidrokarbonları yıkabilme özelliğine sahip ve aromatikleri parçalama özelliği gösteren bakteriler toksik maddelere karşı çeşitli özel mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bunlar; membran yağ asitlerinin ve fosfolipit baş gruplarının kompozisyonundaki adaptasyonlar, hızlı membran tamiri ve düşük hücre membran geçirgenliği, arttırılmış membran sağlamlığı, azaltılmış yüzey hidrofobikliği, toksik maddelere karşı özel inaktive edici enzimler ve pompa (efflux pump) gibi çeşitli adaptasyonlardır (Sikkema ve Ark.,1995; Pieper ve Ark., 2000; Sardesai ve Ark.,2002).

1. 2. 1. Aromatik Hidrokarbonların Enerji Eldesi İçin Yıkımı

a) Aromatik Hidrokarbonların Karbon Kaynağı Olarak Yıkımı;

Aromatik hidrokarbonların karbon kaynağı olarak yıkımı aerobik koşullarda gerçekleşir ve yıkıcı özellikteki organizmalar iki metabolik yolda oksijene ihtiyaç duyar. Birincisi substrata ilk atakta, ikincisi solunum zincirinin sonundadır.

Aerobik yıkımın anahtar enzimatik reaksiyonu oksijenaz ve peroksidazların katalizlediği oksidasyon tepkimeleridir. Mikroorganizmalar aromatik halkayı kırmak için monooksijenaz ve dioksijenaz olmak üzere iki tip oksijenaz enzimi kullanır. Monooksijenazlar aromatik halkaya bir oksijen atomu, dioksijenazlar ise iki oksijen atomu ekler (Diaz ve Ark., 2001). Oksijenazlar geniş bir substrat aralığında, yüksek derecede spesifik ve stereoselektif reaksiyonları katalizler (Cirino ve Ark., 2002).

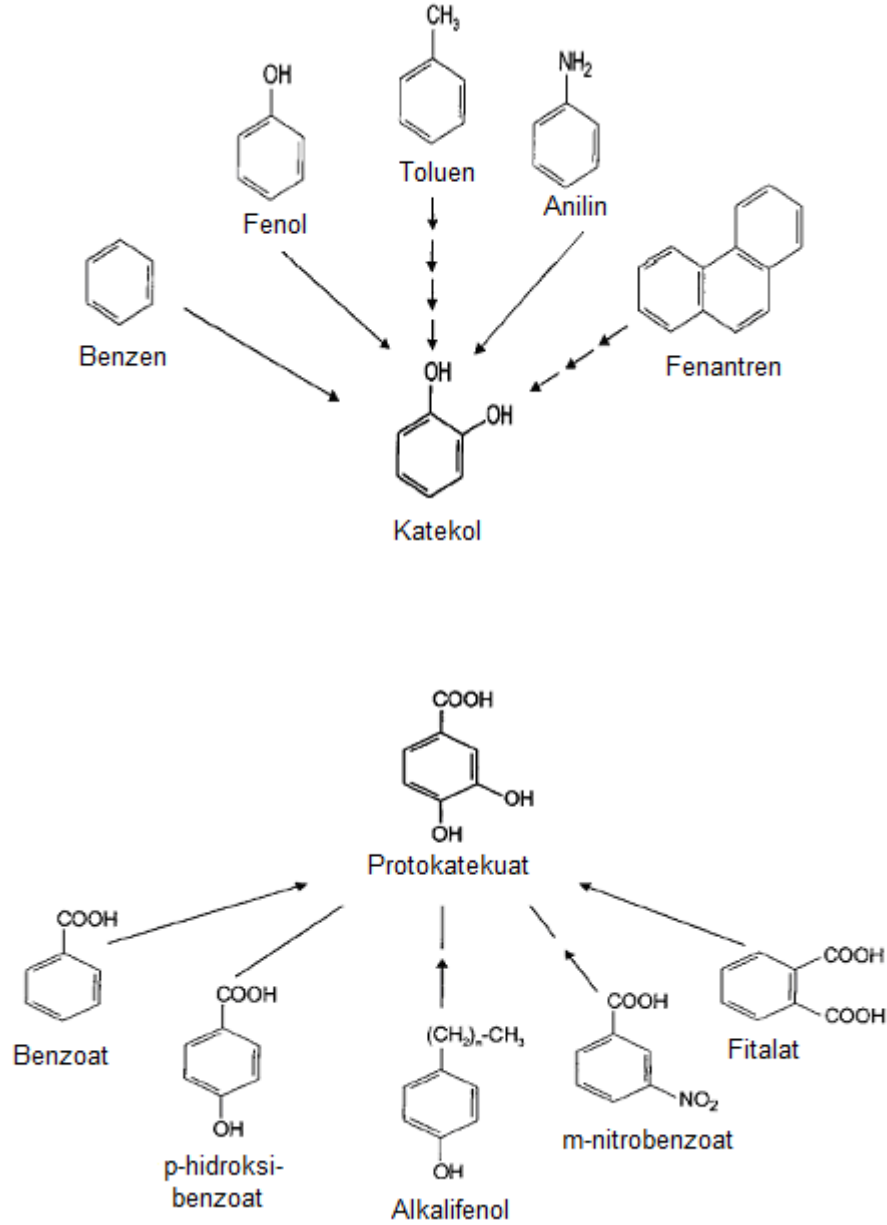
Monooksijenazlar hidroksilasyon ve epoksidasyon reaksiyonlarını katalizler ve substratlarına moleküler oksijenden bir oksijen atomu eklerler. Diğer oksijen atomu ise bir elektron verici (genellikle NADH veya NADPH) yardımıyla suya indirgenir (Tonge ve Ark., 1977).

Dioksijenazlar ya hem-kompleksinde ya da ilişkide buldukları çevrede sıkı şekilde bağlı bir demir atomu içerirler ve substratlarına eş zamanlı olarak iki oksijen atomu eklerler. Halka hidroksilasyon dioksijenazları NADH ve O₂ varlığında aromatik hidrokarbonları dihidrodiollere dönüştürür (Bagneris ve Ark., 2005).

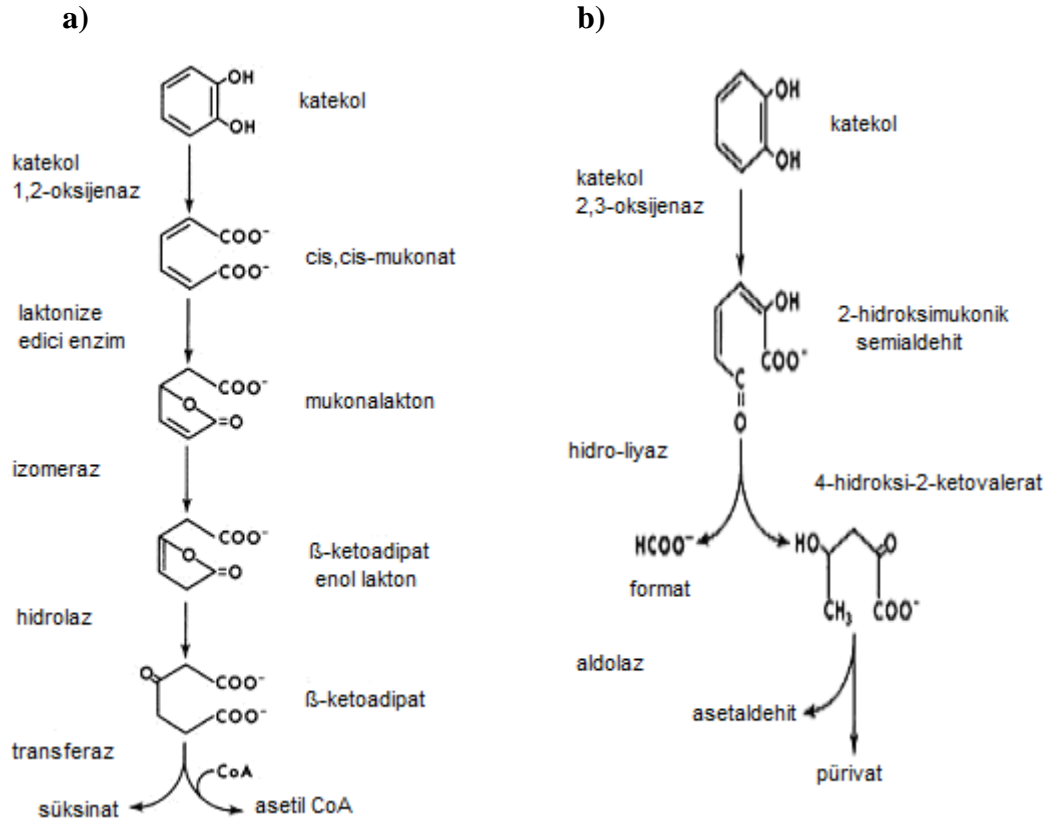
Bütün aromatik hidrokarbonların yıkımı iki merkezi ara ürün üzerinden yapılmaktadır. Bunlar; katekol ve protokatekuattır (Şekil 2).

Katekol, aromatik halkanın kırılmasıyla yıkıma uğrar. Halka kırılması orto, meta ve para-kırılma yollarıyla meydana gelir (Meer ve Ark., 1992).. Orto-kırılmada aromatik halka hidroksillenmiş iki karbon atomu arasından, meta-kırılmada ise aromatik halka hidroksillenmiş karbon atomu ve komşu karbon atomları arasından kırılır (Şekil 3). Bu reaksiyonlar dioksijenaz enzimleri tarafından katalizlenir. Bunu izleyen metabolik yollar ise tamamen farklıdır, fakat

bu reaksiyonların sonunda TCA (trikarboksilik asit) döngüsünün ara ürünleri olan asetat ve süksinat yada TCA döngüsünün ara ürünlerine kolayca dönüştürülebilen pürivat ve asetaldehit oluşur (Goulding ve Ark., 1988; Mars ve Ark., 1997).



Şekil 2. Aromatik hidrokarbonların biyolojik yıkımı sonucu oluşan iki ara ürün; katekol ve protokatekuat (Hofrichter ve Ark., 2000)



Şekil 3. a) Katekolün orto-kırılması, b) Katekolün meta-kırılması (Feist ve Ark., 1969)

b) Aromatik Hidrokarbonların Elektron Alıcısı Olarak Yıkımı;

Aromatik hidrokarbonların elektron alıcısı olarak yıkımı anaerobik koşullarda gerçekleşir. Halojenlenmiş bileşiklerin *Desulfitobacterium dehalogens* gibi bazı bakteriler tarafından elektronca zengin olan başka bir bileşiğin oksidasyonu sırasında terminal elektron alıcısı olarak kullanılması halorespirasyon olarak bilinir (Janssen ve Ark., 2001; Field, 2001). Halojenize bileşiklerin indirgenmesi yani dehalojenasyon, halojenize bileşiklerin yıkımında anahtar reaksiyondur ve redüktif dehalojenaz enzimleriyle katalizlenir. Halojen uzaklaştırılması bileşiğin toksik karakterinden sorumlu halojen yan grubun

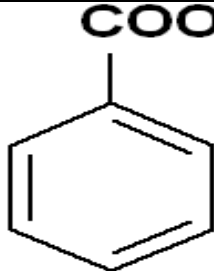
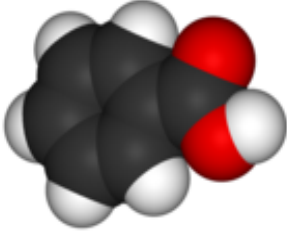
hidrojen ya da hidroksil grupla yer değiştirmesiyle sağlanır ve bu durum bileşiğin yıkıma karşı direncini azaltırken aynı zamanda metabolik yollarda toksik ara ürünlerin oluşma riskini de azaltır (Hardman ve Ark., 1981).

1. 2. 2. Kometabolizma (Yan Metabolizma)

Kometabolizma, birincil bir karbon kaynağının varlığında ikinci bir bileşiğin, reaksiyonu katalizleyen enzimin spesifite eksikliği nedeniyle besinsel bir fayda olmaksızın yıkımı olarak tanımlanır ve yıkıma uğrayan ikinci bileşiğe kosubstrat denir. Halojen yan grup olarak klor atomu bulunduran bileşiklerin çoğu kometabolik yolla parçalanır. Örneğin *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Corynebacteria* türleri PCB' nin farklı türevlerinden klor atomu çıkarırlar ve durum bakteriye enerji sağlamaz (Abramowicz, 1990)

1. 3. BENZOİK ASİT

Tablo 1. Benzoik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Sarıkaya ve Ark., 2003)

Sistematik ismi	Benzoik asit, benzen karboksilik asit, fenil karboksilik asit	
Moleküler formülü	C ₇ H ₆ O ₂	
Molekül ağırlığı	122,12 g/mol	
Görüntü	Renksiz kristal katı	
Çözünürlük	Düşük hidrofilik, yüksek lipofilik özellik	
Erime sıcaklığı	122,4 °C	
Kaynama sıcaklığı	249 °C	
Pk	4, 19	
Molekül şekli		

Benzoik asit doğal olarak yaban mersini, böğürtlen, erik gibi meyvelerde 14 mg/kg, patates, bezelye ve tahıl ürünlerinde 0,2 mg/kg, fındıkta ise 1,2-11 mg/kg miktarlarında bulunur. Böğürtlen ve diğer birçok meyvenin sekonder metabolizma ürünü olarak oluşan benzoik asidin, bitkisel dokularda kolonize olan mantar ve mikroorganizma gelişimini inhibe etmek için evrimsel süreç içerisinde ortaya çıktığı savunulmaktadır (Hazan ve Ark., 2004).

Besin koruyucu zayıf organik asitlerin başında gelen benzoik asit özellikle mantarlara karşı antifungal özellik göstermektedir (Krebs ve Ark., 1983). *Zygosaccharomyces bailii* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mantarların gelişimi, düşük pH'da, yüksek oranda şeker, düşük oranda su içeren yiyecek ve içeceklerin bozulmasında önemli bir etkidir. Asidik pH'da benzoik asidin çözünmemiş formu mikroorganizma hücre membranından geçer ve sitosolde pH 6-7 civarında çözünerek konjuge baz oluşturur. Bu anyon hücre içinde çok yüksek seviyelerde birikir ve tekrar hücre dışına difüze olmaz. Protonların sitosolde yayılması pH'ı düşürerek mikroorganizma gelişimini inhibe eder.

Birçok çalışmanın sonuçları benzoik asit gibi zayıf organik asitlerin mikroorganizmaların membran organizasyonunu bozduğu görüşünü desteklemektedir. Örneğin; *Saccharomyces cerevisiae* benzoik aside maruz kaldığında mitokondrisini kaybederek otofaja uğramaktadır (Thorsness ve Ark., 1996). Ayrıca benzoik asit miktarı mikroorganizma tarafından inhibe edilebilir konsantrasyonu aştığı zaman oksidatif strese neden olarak membran homeostasisi ve mitokondriyal fizyolojinin bozulmasına yol açabilir (Piper, 1999).

Membran organizasyonu ve homeostasinin bozulması çeşitli şekillerde olabilir. En geçerli olasılık plazma membranının bariyer permeabilitesinin non-spesifik olarak bozulmasının sitosidal efekte neden olmasıdır (Restaino ve Ark.,1982). İkinci olasılık membran akışkanlığı ve membran mikrodomenlerinin organizasyonunun değişmesi ve bunun sonucu olarak membran trafiği ve dinamiklerinin bozulmasıdır. Buradan da anlaşıldığı üzere benzoik asit mikroorganizmalara karşı membran bozan ajan olarak davranarak mikroorganizma gelişimini inhibe eder.

1. 4. BENZOİK ASİDİN ENDÜSTRİDE KULLANIMI

Benzoik asit antimikrobiyal özelliği sayesinde hazır gıdalarda mikrobiyal bozulmayı önlemek amacıyla gıda katkı maddesi (GKM) olarak kullanılmaktadır (Sarıkaya ve Ark., 2003). Gıda endüstrisinde genellikle benzoik asidin sodyum hidroksitle nötralizasyonu sonucu elde edilen sodyum benzoat kullanılır (Ngugi ve Ark., 2007). Sodyum benzoat benzoik asitten 200 kat daha fazla çözünür ve ilave edildiği gıdanın tadını değiştirir (Kahraman ve Ark., 2005). Gıda etiketlerinde benzoat veya E210-E213 olarak gösterilir ve en çok kullanıldığı gıdalar çikolata, meyve suyu, şekerleme, dondurma, krema, ciklet, gazlı içecekler, ketçap, turşu, cips, margarin, sofralık zeytin, kakaolu mamüller, bisküvi, gofret gibi ürünlerdir (Warth, 1991; Krebs ve Ark., 1983). Benzoik asidin GKM olarak kullanımında izin verilen en üst düzey Amerika Birleşik Devletleri'nde 0,1%, diğer ülkelerde 0,15-0,25 %'dir (Chipley,1983). Avrupa Birliğinin benzoik asit ve sodyum benzoat için limiti ise 0,015-1,5 %'dir. Yapılan bir çalışmada Ankara piyasasından sağlanan meyve sularında benzoik asit miktarının izin verilen değeri aştığı saptanmıştır (Yentür ve Ark., 1990). Gıda endüstrisinin yanı sıra sigara, parfüm, kozmetik ürünler, diş macunu, böcek ilacı, boya ve plastik gibi maddelerde de benzoik asit ve sodyum benzoat kullanılmaktadır (Sugimoto ve Ark.,2007). Ayrıca sodyum benzoat otomotiv sektöründe antifriz olarak kullanıldığı gibi fotografik banyoda stabilize edici madde olarak ta kullanılmaktadır. Ticari olarak benzoik asit toluen'in oksidasyonu ile hazırlanır ve kobalt ya da manganezin bu reaksiyonu katalizleyen enzimin kofaktörü olarak ortamda bulunması gerekir.

1.5. BENZOİK ASİDİN HAYVANLAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Benzoik asidin insanlarda astım, deri döküntüleri, alerjik kaşıntılar, egzama, baş ağrıları, ishal ve gastrik rahatsızlıklara, çocuklarda ise hiperaktiviteye neden olduğu saptanmıştır (Yurttagül, 1993). İngiltere'nin Southhampton kentinde üç yaşındaki çocuklar üzerinde yapılan bir araştırmaya göre cips, şekerleme ve gazozla beslenen çocuklarda davranış bozukluğu olduğu,

diyetlerinden bu besinler çıkarıldığında ise davranış bozukluğunun düzeldiği, diyetlerine tekrar eklendiğinde ise davranış bozukluğunun yeniden ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Fareler, 5-10 gün boyunca yüksek dozda (>1800 mg/kg) benzoik asit içeren besinlerle beslendiğinde beyin ve karaciğerlerinde histopatolojik değişimler ortaya çıkmıştır. Serum parametreleri ve organ boyutlarında da değişimler gözlenmiştir. Ayrıca 0.25, 250 ve 1200 mg/kg benzoik aside, 4 hafta boyunca haftada 5 gün 6'şar saat maruz kalan farelerin karaciğerinde fibrosis oluşmuştur. Farelerin dermal ve ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde sodyum benzoatın degranülasyon etkisini görmek için, sodyum benzoat ağız ve enfeksiyon yoluyla farelere (*Mus musculus domesticus*) verilmiş, mast hücrelerindeki degranülasyon Transmission Electron Microscope (TEM) ile incelenmiştir. Sonuç olarak hem dermal bağ dokusu mast hücrelerinde, hem de ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon tesbit edilmiştir (Sarıkaya ve Ark., 2003).

Diğer bir çalışmada, *Drosophila melanogaster* larvalarına benzoik asidin farklı konsantrasyonları (50Mm, 75Mm, 100Mm) uygulanarak benzoik asidin her konsantrasyondaki letalitesi ölçülmüştür. Deney sonuçlarına göre benzoik asidin konsantrasyonu arttıkça larvaların yaşama yüzdesi azalırken, toplam mutasyon artar. Bu sonuçlar benzoik asidin hem toksik hem de mutajenik olduğunu gösterir (Sarıkaya ve Ark., 2003).

Beslenme yoluyla vücuda giren benzoik asidin yıkımı sonucu hayvanlarda farklı bileşikler oluşur. Örneğin; tavuklarda dibenzoil ornitin, yarasalarda benzoil glutamik asit, kene ve böceklerde benzoil arjin oluşur. Herbivor memelilerde ise besinlerle alınan benzoik asit sindirim sistemi tarafından absorbe edilerek karaciğerde hippurik aside (N-benzoglisin) parçalanır ve günde yaklaşık 0,44 g/lt hippurik asit idrarla birlikte dışarı atılır. İnsanlar günlük 5 mg/kg benzoik asit alımını tolere edebilir ve lethal doz (LD) insanlarda 500 mg/kg, farelerde 1700 mg/kg, kedilerde ise 300 mg/kg'dır.

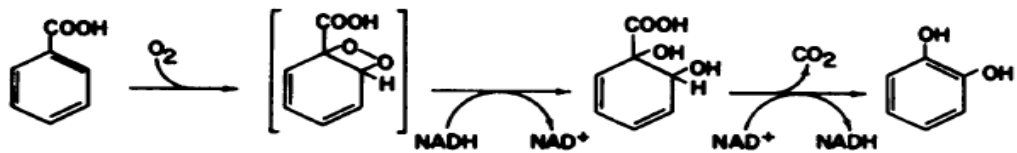
Dünya çapında yılda 638.000 ton benzoik asit üretimi olduğu tahmin edilmektedir ve benzoik asit hava, su, toprak gibi hemen hemen tüm çevresel

bileşenlerde bulunur . Arabaların eksoz gazlarında toluenin oksidasyon ürünü olarak oluşan benzoik asit atmosfere verilir (Kawamura ve Ark., 1985). Norveç ve İsveç'te ağaç üretim endüstrisinin atık sularında benzoik asit saptanmıştır (Carlberg ve Ark., 1986). Atık sularda bulunan benzoik asit nehirlere karıştığı zaman balıkların yağ dokusunda birikir ve besin zincirinin üst basamaklarına doğru çıkıldıkça canlılardaki birikimi artar. İnsan vücudundaki birikiminin ise kanserojen etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

1. 6. BENZOİK ASİDİN BİYOLOJİK YIKIMI

Benzoik asit ile kirlenmiş doğal çevrelerde, oksijen yetersizliği nedeniyle benzoik asidin yıkımı oldukça güçtür, fakat aerobik koşullar benzoik asit yıkımını kolaylaştırır ve hızlandırır (Kahraman ve Ark., 2005). Benzoik asit, karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli mikroorganizmaların gelişimini desteklemektedir. Bu mikroorganizmalar; *Rhodotorula glutinis*, *Penicillium frequentans*, *Alcaligenes denitrificans* (Migues ve Ark., 1995), *Desulfomicrobium escambiens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ralstonia* ve *Pseudomonas* (Sharak ve Ark.,1997).

Aerobik bakterilerin benzoik asidi yıkımı sırasında, benzoik asit dioksijenaz enzim aktivitesiyle DHB'ye (1,2-dihidro-1,2-dihidroksi benzoik asit), DHB'de oksidatif dekarboksilasyonu sağlayan DHB dehidrogenaz enzim aktivitesiyle orta ara ürün olan katekole dönüşür (Şekil 4). Bu aşamadan sonra katekol, β -ketoadipat yoluyla süksinat ve asetil CoA'ya parçalanarak TCA'ya(trikarboksilik asit döngüsü) girer (Reiner,1971; Feist veArk., 1969).



Şekil 4. Benzoik asidin 1,2-dihidro-1,2-dihidroksi benzoik asit yoluyla katekole dönüşümü (Reiner,1971)

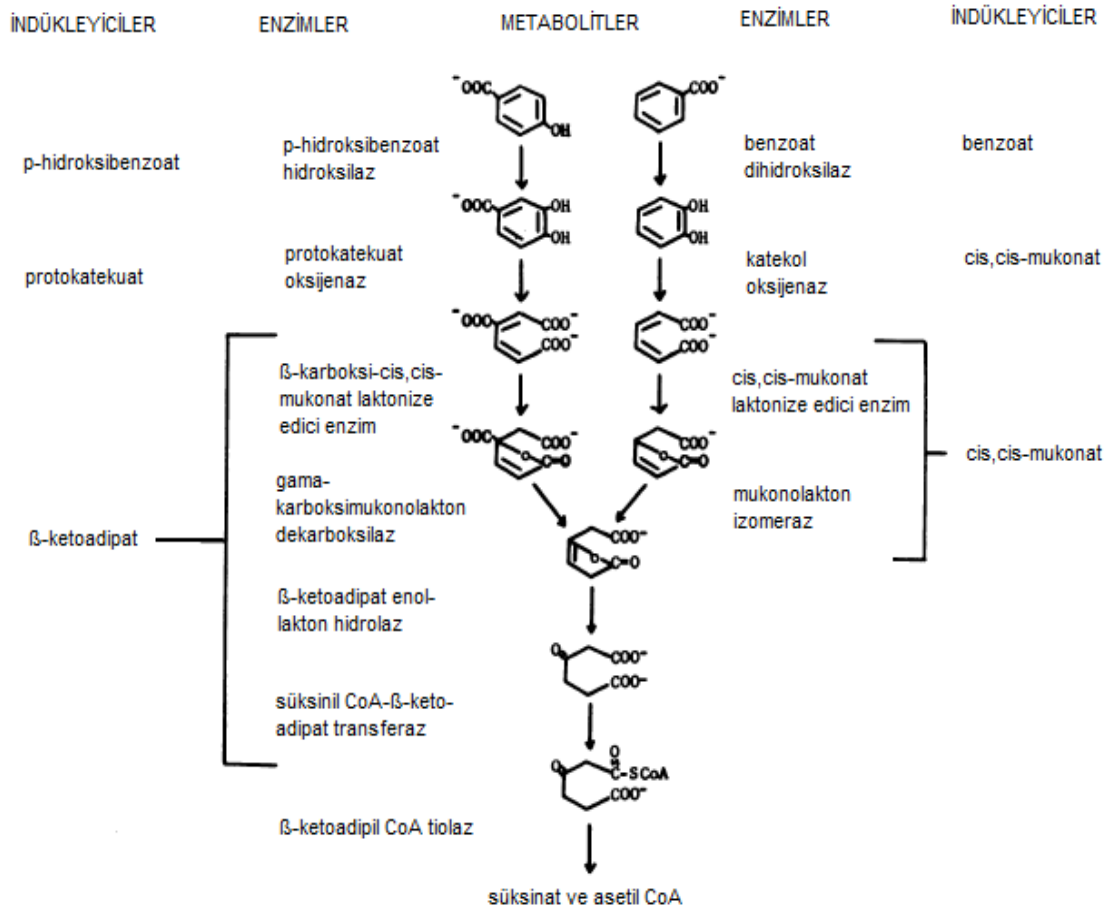
β -ketoadipat yolu, protokatekuat yada katekolün yıkımı sonucu süksinat ve asetil-CoA oluşumunu sağlayan metabolik bir yoldur (Kukor ve Ark.,1988; Morales ve Ark.,2004). Bu yol benzoat ve p- hidroksibenzoatın aerobik bakteriler tarafından yıkımı sırasında yaygın olarak kullanılır (Ornston, 1966) ve reaksiyonlar indüklenebilir enzimlerle katalizlenir (Kemp ve Ark.,1968; Hollaway, 1969).

Pseudomonas hücrelerine p-hidroksibenzoat girdiği zaman hidroksilaz enziminin sentezini indükler ve bu enzim p-hidroksibenzoatı protokatekuata dönüştürür. Benzoat girdiğinde ise dihidroksilaz enziminin sentezini indükler ve bu enzim benzoatı katekole dönüştürür (Ornston, 1971). β -ketoadipat yolunun sonunda benzoat ve p-hidroksibenzoat süksinat ve asetil CoA'ya kadar parçalanır (Şekil 5).

1.7. PSEUDOMONAS

Pseudomonas, gram-negatif, düz yada kıvrık çomak şeklinde , boyları 1,5-5,0 μm arasında değişen ve bir yada çok sayıda polar flagellası olan bakterilerden oluşur. Fotosentetik pigmentleri yoktur, katalaz ve oksidaz pozitif, indol ve metilred negatiftir. Non-fermentatif özelliktedirler ve bazı karbohidratları (glukoz, riboz,glukonat gibi) oksidatif metabolizmada kullanırlar. Bu organizmalar zorunlu aerob olarak tanımlansa da bazı durumlarda nitratı alternatif elektron alıcısı olarak kullanarak anaerobik gelişim gösterirler ve düşük moleküler ağırlıktaki organik bileşikleri yıkımları nedeniyle diğer aerobik bakterilerden ayrılırlar. *Pseudomonas* 'lar minimal nutrientlere ihtiyaç duyar ve kemoorganotrof olarak geniş sıcaklık aralıklarında (4°C, 42°C), nötral pH'da gelişirler. Bazı türleri H₂ ve CO₂'i elektron verici olarak kullanarak kemolitotrofik özellik gösterir (Murray ve Ark., 1994). *Pseudomonas* türleri, diğer bakterilerin parçalayamadığı organik bileşikleri parçalayabilen enzimleri kodlayan plazmitler ve bu organik substratların yıkımını sağlayan indüklenebilen operonlar içerirler (Holloway ve Ark., 1979). *Pseudomonas* 'lar çeşitli toksin ve enzimleri içeren virülans faktörlere sahiptir. Bunlar arasında pilus ya da fimbria, polisakkarit kapsül, endotoksin, ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz, proteazlar ve fosfolipaz C sayılabilir. Bazı *Pseudomonas*

türleri fikosiyenin (mavi), floresein (sarı) ve fiyorubin (kırmızı-kahve) gibi difüze edilebilen pigmentler üretirler. Ekolojik olarak önemli organizmalardır, çünkü bitki ve hayvan artıklarının parçalanması sonucu oluşan pek çok bileşiğin yıkımından sorumludur. Pek çok türü psychrotrophic olduğu için yumurta, et, süt, balık ve sebze gibi buzdolabında saklanan yiyeceklerin bozulmasına neden olur (Robinson ve Ark.,1999).



Şekil 5. *Pseudomonas putida*'da β-ketoadipat yolu (Ornston, 1971)

1.7.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Fluorescent *Pseudomonas*'lar arasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa* genellikle nemli çevrelerde yaygın gelişim gösterir ve organik büyüme faktörleri gerektirmediği için çok çabuk gelişerek üst üste yığılan üzüm salkımı şeklinde koloniler oluşturur. Canlılar için toksik olan birçok heterohalkasal aromatik bileşiği doğal olarak yıkabilme potansiyeline sahiptir (Kahraman ve Ark.,2005). Zorunlu parazit değildir ancak fırsatçı patojen olduğu için vücut savunması düşük insanlarda enfeksiyona neden olur. Patojen özelliği, endotoksin ya da lipopolisakkarit, ADP-ribosiltransferaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A ve ekzoenzim S gibi toksinler, hemolizinler, sitotoksinler ve proteazlar gibi ekstraselüler ürünlerinden kaynaklanır. Genellikle hastanelerde yaygın olarak bulunur ve gastrointestinal sistem, üriner sistem, göz, kulak, merkezi sinir sistemi ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları sistik fibrosis hastalarında, travmatik deri zedelenmesi ve ciddi yanık vakalarında da yaygın olarak görülür. Organizma yaygın kullanılan pek çok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir ve dirençlilik çeşitli antibiyotiklerin detoksifikasyonunu sağlayan genleri taşıyan direnç transfer plazmitinden (R plazmit) kaynaklanmaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

- 1) Spektrofotometre (Cecil 5000 Series)
- 2) Kuvartz Küvetler
- 3) Etüv (Termal Laboratuar Aletleri)
- 4) Santrifüj (Ependorf Centrifuge 5415 D)
- 5) pH-metre (Jenway 3010)
- 6) Otoklav
- 7) 1000'lik mikropipet (Eppendorf ve Gilson)
- 8) Ependorf tüp (1.5 ml, Sarstedt)
- 9) Mikropipet uçları (beyaz, mavi, Biosphere Filtler Tips)
- 10) 250 ml'lik erlenler
- 11) Potasyum fosfat (dibazik) (K_2HPO_4) (Merck)
- 12) Amonyum fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$) (Merck)
- 13) Magnezyum nitrat ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) (Merck)
- 14) Mangan sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$) (Merck)
- 15) Demir klorür ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (Merck)
- 16) Kalsiyum sülfat ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) (Merck)
- 17) Benzoik asit ($C_7H_6O_2$) (Merck)
- 18) Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) (Sigma)
- 19) Adenintrifosfat (ATP) (Merck)
- 20) Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Merck)
- 21) Çinko klorür ($ZnCl_2$) (Needham Market Suffolk England)
- 22) Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- 23) Hidroklorik asit (HCl) (Riedel-de Haën)
- 24) Mangan klorür ($MnCl_2$) (Merck)

2. 1. Molar Absorbsiyon Katsayısının (ϵ) Hesaplanması

İlk olarak dalga boyu, 200-450 nm arasında 10'ar 10'ar arttırılarak 0.002 M 'lık benzoik asit çözeltisinin absorbansı ölçüldü ve maximum absorbans gösterdiği dalga boyu 270 nm olarak belirlendiği için bu dalga boyunda çalışıldı.

Sonrasında molar absorpsiyon katsayısını belirlemek için stok olarak hazırlanan 0.002 M'lık benzoik asit çözeltisinden beş farklı konsantrasyonda benzoik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar sırasıyla; 0.0001 M, 0.00015 M, 0.001 M, 0.0015 M ve 0.002 M'dir. Bu konsantrasyonlardaki benzoik asit çözeltilerinin 270 nm'de absorbansı ölçüldü ve iki farklı spektrofotometre kullanıldığı için iki ayrı tablo çizildi (Tablo 2 ve Tablo 3).

Tablo 2'deki değerler biyoloji bölümündeki spektrofotometre kullanıldığında, Tablo 3'deki değerler ise fizikokimya bölümündeki spektrofotometre kullanıldığında elde edilen sonuçları göstermektedir.

Tablo 2. Molar absorpsiyon katsayısını belirlemek için kullanılan 5 farklı konsantrasyondaki benzoik asit çözeltisinin 270 nm'deki absorbans değerleri

Konsantrasyon	Absorbans (270 nm)
0.0001 M	0.049
0.00015 M	0.084
0.001 M	0.550
0.0015 M	0.791
0.002 M	1.051

Tablo 2'deki değerler kullanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği (Grafik 1) çizildi ve çizilen grafikteki lineer eğrinin eğiminden ϵ (molar absorpsiyon katsayısı) belirlendi ve biyoloji bölümünde yaptığımız ölçümlerin sonuçları buna göre değerlendirildi.

$$\begin{aligned} \tan \alpha &= \frac{y}{x} \\ &= \frac{1.051}{0.002} \\ &= 525.5 \end{aligned}$$

Tablo 3. Molar absorpsiyon katsayısını belirlemek için kullanılan 5 farklı konsantrasyondaki benzoik asit çözeltisinin 270 nm'deki absorbans değerleri

Konsantrasyon	Absorbans (270 nm)
0.0001 M	0.035
0.00015 M	0.065
0.001 M	0.368
0.0015 M	0.540
0.002 M	0.713

Tablo 3'deki değerler kullanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği (Grafik 2) çizildi ve çizilen grafikteki lineer eğrinin eğiminden ϵ (molar absorpsiyon katsayısı) belirlendi ve fizikokimya bölümünde yaptığımız ölçümlerin sonuçları buna göre değerlendirildi.

$$\begin{aligned}\tan \alpha &= \frac{y}{x} \\ &= \frac{0.713}{0.002} \\ &= 356.5\end{aligned}$$

2. 2. Minimal Kültür Ortamı

Minimal kültür ortamı, 0.002 M benzoik asit ve çeşitli nutrientleri içerir. Minimal kültür ortamı Tablo 4’de gösterildiği gibi hazırlandı (Kahraman ve Ark., 2005).

Tablo 4. Minimal kültür ortamı için kullanılan kimyasal maddeler

Besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler	Miktar (1000ml için)
K_2HPO_4	1.39 g
$(NH_4)_2.HPO_4$	2.5 g
$Mg(NO_3)_2.6H_2O$	0.097 g
$MnSO_4.H_2O$	0.025 g
$FeCl_3.6H_2O$	0.005 g
$CaSO_4.2H_2O$	0.001 g
$C_7H_6O_2$	0.244 g

Kullanılan kimyasal maddeler 500 ml distile su içerisine eklendi ve mıknatıs karıştırıcı ile karıştırıldı, sonra bu çözeltinin üzerine son hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su eklendi ve 1-2 saat daha karıştırıcıyla karıştırılarak kimyasal maddelerin çözünmesi beklenildi.

Hazırlanan çözeltiden 100'er ml alınarak 250 ml'lik iki farklı erlene konuldu ve erlenlerdeki çözeltilerden biri deney grubu, diğeri ise kontrol grubu olarak adlandırıldı. Kontrol grubunun içerdiği bileşikler her deneyde sabit tutuldu, deney grubuna ise her deneyde farklı kofaktörler eklenerek eklenen kofaktörlerin bakteri sayısındaki artışa ve benzoik asidin yıkım oranına olan etkisi karşılaştırıldı. Deney grubuna şu kofaktörler eklendi; 0.00005 M NADH, 0.0001 M NADH, 0.00002 M ATP, 0.0002 M Fe^{+++} , 0.0004 M Fe^{+++} , 0.0002 M Mg^{++} , 0.0004 M Mg^{++} , 0.001 M Mn^{++} , 0.0001 M Cu^{++} , 0.0009 M Zn^{++} ve 0.0003 M Ca^{++} . Kofaktörlerin molariteleri eklenen miktarlarına göre hesaplandı.

100 ml'lik benzoik asit çözeltisine (deney grubuna) 0.0035 g NADH ($M_A=709.4$ g) eklendi ve eklenen NADH'nin molaritesi aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\begin{array}{lcl}
 1 \text{ mol NADH} & 709,4 \text{ g} & M = \frac{n(\text{mol})}{V(\text{hacim})(\text{lt})} \\
 \underline{x \text{ mol NADH}} & \underline{0.0035 \text{ g}} & \\
 x = \frac{0.0035 \text{ g} \cdot 1 \text{ mol}}{709.4 \text{ g}} & & M = \frac{0.000005 \text{ mol}}{0.1 \text{ lt}} \\
 x = 0.000005 \text{ mol} & & M = 0.00005 \text{ M NADH}
 \end{array}$$

100 ml'lik benzoik asit çözeltisine (deney grubuna) 0.005 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($M_A=270.3$ g) eklendi ve eklenen Fe^{+++} ($M_A=55.8$)'ün molaritesi aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\begin{array}{lcl}
 270.3 \text{ g FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O} & 55.8 \text{ g Fe}^{+++} & \\
 \underline{0.005 \text{ g FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}} & \underline{x \text{ g Fe}^{+++}} & \\
 x = 0.001 \text{ g Fe}^{+++} & & \\
 \\
 1 \text{ mol Fe}^{+++} & 55.8 \text{ g} & M = \frac{n(\text{mol})}{V(\text{hacim})(\text{lt})} \\
 \underline{x \text{ mol Fe}^{+++}} & \underline{0.001 \text{ g}} & \\
 x = 0.00002 \text{ mol} & & M = \frac{0.00002 \text{ mol}}{0.1 \text{ lt}} \\
 & & M = 0.0002 \text{ M Fe}^{+++}
 \end{array}$$

Sonraki deneylerde ise bu kofaktörlerin ikili, üçlü, dördü ve beşli kombinasyonları deney grubuna eklendi. Deney grubuna sırasıyla şu kofaktörlerin kombinasyonları eklendi; (NADH, Fe^{+++}), (NADH, Mg^{++}), (NADH, Mn^{++}), (NADH, Ca^{++}), (NADH, Cu^{++}), (NADH, Zn^{++}), (NADH, Fe^{+++} , Mg^{++}), (NADH, Cu^{++} , Mn^{++}), (NADH, Ca^{++} , Zn^{++}), (Fe^{+++} , Mg^{++} , Cu^{++}), (Fe^{+++} , Mg^{++} , Zn^{++}), (Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++}), (Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++}), (Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++}) (NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++}) ve (NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++}).

Kofaktörler eklendikten sonra her deneyde, deney ve kontrol grubuna 1 M'lık NaOH çözeltisinden 1-2 ml eklenerek pH 7'ye ayarlandı, otoklav yapıldı.

Son olarak yapılan deneylerde ise optimum pH değerini belirlemek için pH 5, pH 6, pH 8 ve pH 9'da çalışıldı.

2.3. Bakteri Ekimi

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi türü kullanıldı. Stok olarak hazırlanan *Pseudomonas aeruginosa* sıvı besiyerinden 3'er ml alındı, 250 ml'lik iki farklı erlenmeyerde bulunan 100'er ml olan deney ve kontrol grubuna bakteri ekimi yapıldı. Besiyerlerine bakteri ekimi yapılırken kontaminasyonu engellemek için bek alevi yanında çalışıldı.

2.4. Absorbans Ölçümü

Deneye başlanılan ilk anda (0. zaman) dahil her dört saatte bir deney ve kontrol grubuna ait besiyerlerinden yaklaşık 2'şer ml örnek alınarak kuvartz küvetlere konuldu, 270 nm'de benzoik asit miktarındaki azalmayı, 600 nm'de ise bakteri miktarındaki artışı görmek için spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Ölçüm yapılırken kuvartz küvetlerden birine kör olarak kullanılan distile su, diğerine ise besiyerinden alınan örnek konuldu ve örnek alma işlemi sırasında kontaminasyonu engellemek için bek alevi yanında çalışıldı. İçinde distile su bulunan kuvartz küvet spektrofotometredeki bölmelerden birine konuldu, absorbans ölçülerek sıfırlandı, sonrasında bu küvet çıkarılarak aynı bölmeye içinde örnek bulunan küvet konuldu ve absorbans ölçüldü.

Deneye başlarken ilk olarak kontrol ve deney grubundan alınan örneklerin 270 nm'de absorbansı ölçüldü, sonrasında bu besiyerlerine 3'er ml bakteri ekimi yapılarak ekim yapılan besiyerlerinden alınan örneklerin 600 nm'de absorbansı ölçüldü. Ölçümün ardından deney ve kontrol grubuna ait besiyerleri 37 °C'ye ayarlanmış etüv içine konuldu ve inkübasyona bırakıldı. Yetmişiki saat tamamlanıncaya kadar her dört saatte bir deney ve kontrol grubundan alınan örneklerin önce 600 nm'de, sonra 270 nm'de absorbansı ölçüldü. 270 nm'de

absorbans ölçümü yapılırken önce örnekler 1.5 ml'lik ependorf tüplere konularak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant bir mikropipet yardımıyla alınarak kuvarz küvete konuldu ve absorbans ölçüldü. Her deneyin sonunda kontrol grubuna ait besiyeri 4 °C'de saklandı ve bir sonraki deneyde stok *Pseudomonas aeruginosa* kültürü olarak kullanıldı.

Tablo 5. NADH ve Mg⁺⁺ un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.942	0.077	1.673	0.073
4	1.867	0.088	1.513	0.075
8	1.731	0.094	1.51	0.078
20	1.573	0.125	1.398	0.102
24	1.404	0.157	1.363	0.119
28	1.346	0.189	1.266	1.125
32	1.258	0.206	1.221	0.138
44	0.984	0.235	1.177	0.169
48	0.878	0.265	1.151	0.177
52	0.790	0.293	1.094	0.194
64	0.707	0.317	0.926	0.218
68	0.672	0.336	0.885	0.239
72	0.655	0.344	0.884	0.24

3. BULGULAR

Tablo 6. NADH'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.938	0.043	1.286	0.027
4	1.782	0.048	1.170	0.031
8	1.753	0.062	1.145	0.049
12	1.590	0.096	1.102	0.065
24	1.428	0.130	1.029	0.078
28	1.347	0.154	1.014	0.083
32	1.230	0.183	0.956	0.101
36	1.034	0.207	0.878	0.120
48	0.838	0.232	0.800	0.148
52	0.754	0.245	0.690	0.165
56	0.691	0.256	0.600	0.175
60	0.646	0.281	0.528	0.191
72	0.602	0.311	0.452	0.204

270 nm'de deney grubunun absorbans farkı, $1.938-0.602= 1.336$

270 nm'de kontrol grubunun absorbans farkı, $1.286-0.452= 0.834$

$$\frac{100-0.834}{x} \cdot 160 \quad 160-100=\% 60$$

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %60 arttı.

600 nm'de deney grubunun absorbans farkı, $0.311-0.043=0.268$

600 nm'de kontrol grubunun absorbans farkı, $0.204-0.027=0.177$

$$\frac{100-0.177}{x} \cdot 151.4 \quad 151.4-100=\% 51.4$$

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %51.4 arttı.

Tablo 7. ATP'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.277	0.040	1.155	0.044
4	1.130	0.043	1.062	0.047
8	1.086	0.052	1.026	0.053
20	1.030	0.066	0.966	0.061
24	0.936	0.098	0.931	0.076
28	0.870	0.146	0.883	0.142
32	0.820	0.170	0.790	0.150
44	0.701	0.192	0.693	0.163
48	0.648	0.217	0.622	0.180
52	0.526	0.230	0.532	0.198
56	0.445	0.243	0.438	0.219
68	0.382	0.253	0.329	0.241
72	0.364	0.256	0.291	0.244

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %5.6 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %8 arttı.

Tablo 8. Fe⁺⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.186	0.085	1.164	0.060
4	1.105	0.087	1.109	0.063
16	0.934	0.095	0.995	0.068
20	0.914	0.100	0.981	0.075
24	0.883	0.114	0.923	0.090
28	0.780	0.128	0.863	0.107
40	0.678	0.173	0.825	0.117
44	0.547	0.205	0.726	0.147
48	0.509	0.236	0.705	0.160
52	0.475	0.258	0.651	0.203
64	0.408	0.277	0.439	0.229
68	0.360	0.288	0.398	0.244
72	0.358	0.292	0.380	0.259

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %5.6 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %4 arttı.

Tablo 9. Mg⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.211	0.043	1.153	0.040
4	1.148	0.052	1.143	0.044
16	0.975	0.090	0.928	0.058
20	0.914	0.098	0.896	0.064
24	0.860	0.119	0.866	0.102
28	0.842	0.136	0.859	0.118
40	0.700	0.185	0.686	0.155
44	0.558	0.210	0.554	0.170
48	0.526	0.228	0.531	0.208
52	0.466	0.246	0.471	0.232
64	0.352	0.259	0.314	0.244
68	0.309	0.265	0.298	0.250
72	0.273	0.271	0.265	0.258

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %5.6 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %4.5 arttı.

Tablo 10. Mn⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.554	0.480	1.361	0.078
4	1.482	0.488	1.234	0.089
8	1.471	0.496	1.200	0.106
12	1.455	0.519	1.180	0.125
24	1.378	0.558	1.143	0.172
28	1.353	0.593	1.138	0.207
32	1.318	0.606	1.008	0.236
36	1.295	0.637	0.974	0.284
48	1.257	0.666	0.832	0.319
52	1.213	0.694	0.780	0.354
56	1.179	0.741	0.650	0.403
60	1.148	0.798	0.602	0.448
72	0.972	0.820	0.534	0.520

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %29.6 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %23 azaldı.

Tablo 11. Cu⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.787	0.088	1.553	0.063
4	1.714	0.092	1.371	0.080
8	1.681	0.109	1.352	0.096
20	1.622	0.121	1.225	0.119
24	1.588	0.144	1.191	0.138
28	1.541	0.150	1.158	0.166
32	1.509	0.158	1.131	0.196
44	1.453	1.171	0.905	0.230
48	1.428	0.190	0.867	0.266
52	1.397	0.202	0.836	0.290
56	1.348	0.218	0.820	0.314
68	1.312	0.258	0.715	0.388
72	1.262	0.265	0.543	0.419

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %48 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %50 azaldı.

Tablo 12. Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.672	0.094	1.556	0.076
4	1.526	0.101	1.423	0.079
8	1.492	0.106	1.372	0.082
12	1.461	0.120	1.330	0.088
24	1.372	0.136	1.239	0.129
28	1.282	0.149	1.137	0.136
32	0.936	0.168	1.006	0.144
36	0.890	0.194	0.803	0.161
48	0.673	0.204	0.761	0.178
52	0.507	0.250	0.616	0.184
56	0.447	0.300	0.572	0.210
60	0.369	0.370	0.498	0.253
72	0.300	0.390	0.468	0.295

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %26 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı % 35 arttı.

Tablo 13. NADH, Fe⁺⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.922	0.106	1.647	0.080
4	1.901	0.118	1.520	0.086
8	1.881	0.132	1.491	0.093
12	1.736	0.154	1.422	0.102
24	1.593	0.196	1.198	0.125
28	1.475	0.210	1.123	0.140
32	1.411	0.227	1.056	0.149
36	1.303	0.255	0.958	0.162
48	0.993	0.273	0.870	0.190
52	0.879	0.308	0.824	0.204
56	0.765	0.319	0.770	0.212
60	0.639	0.328	0.759	0.220
72	0.432	0.334	0.746	0.222

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %65 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %60.5 arttı.

Tablo 14. NADH, Mg⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	1.942	0.077	1.673	0.073
4	1.867	0.088	1.513	0.075
8	1.731	0.094	1.51	0.078
20	1.573	0.125	1.398	0.102
24	1.404	0.157	1.363	0.119
28	1.346	0.189	1.266	1.125
32	1.258	0.206	1.221	0.138
44	0.984	0.235	1.177	0.169
48	0.878	0.265	1.151	0.177
52	0.790	0.293	1.094	0.194
64	0.707	0.317	0.926	0.218
68	0.672	0.336	0.885	0.239
72	0.655	0.344	0.884	0.24

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %63 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı % 59.8 arttı.

Tablo 15. NADH, Mn^{++} 'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.784	0.262	0.694	0.039
4	0.768	0.265	0.686	0.043
16	0.720	0.278	0.609	0.052
20	0.703	0.297	0.567	0.076
24	0.682	0.319	0.526	0.084
28	0.613	0.323	0.508	0.090
40	0.555	0.331	0.441	0.108
44	0.526	0.342	0.380	0.127
48	0.509	0.355	0.346	0.141
52	0.479	0.362	0.313	0.163
64	0.417	0.374	0.216	0.176
68	0.386	0.383	0.173	0.194
72	0.332	0.389	0.114	0.195

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %22 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %18 azaldı.

Tablo 16. Ca^{++} 'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisi

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.745	0.036	0.687	0.033
12	0.658	0.062	0.583	0.069
16	0.591	0.094	0.517	0.096
20	0.565	0.104	0.478	0.115
24	0.518	0.112	0.429	0.127
36	0.498	0.121	0.364	0.139
40	0.444	0.138	0.335	0.157
44	0.411	0.145	0.301	0.171
48	0.389	0.156	0.274	0.185
60	0.337	0.187	0.216	0.199
64	0.323	0.196	0.182	0.212
68	0.306	0.200	0.165	0.214
72	0.282	0.208	0.160	0.218

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %12 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı % 7 azaldı.

Tablo 17. NADH, Ca⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.818	0.081	0.717	0.072
4	0.807	0.085	0.700	0.080
8	0.790	0.091	0.688	0.085
20	0.767	0.096	0.676	0.090
24	0.731	0.114	0.655	0.094
28	0.707	0.126	0.629	0.103
32	0.680	0.139	0.603	0.114
44	0.628	0.155	0.540	0.138
48	0.592	0.176	0.496	0.154
52	0.567	0.195	0.474	0.168
56	0.544	0.201	0.418	0.177
68	0.492	0.211	0.363	0.189
72	0.474	0.216	0.350	0.213

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %6 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %4 azaldı.

Tablo 18. NADH, Cu⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.811	0.062	0.727	0.033
4	0.786	0.066	0.708	0.036
8	0.759	0.070	0.691	0.039
20	0.736	0.078	0.670	0.048
24	0.711	0.081	0.626	0.053
28	0.688	0.090	0.600	0.060
32	0.657	0.099	0.575	0.075
44	0.622	0.118	0.515	0.082
48	0.606	0.121	0.488	0.096
52	0.584	0.130	0.365	0.112
56	0.560	0.142	0.342	0.128
68	0.532	0.148	0.218	0.153
72	0.502	0.150	0.211	0.161

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %40 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %31 azaldı.

Tablo 19. NADH, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.824	0.085	0.714	0.061
4	0.803	0.089	0.687	0.066
8	0.792	0.092	0.682	0.071
20	0.769	0.112	0.678	0.090
24	0.689	0.124	0.664	0.103
28	0.663	0.134	0.652	0.115
32	0.636	0.148	0.646	0.122
44	0.612	0.169	0.637	0.135
48	0.589	0.193	0.628	0.142
52	0.572	0.225	0.612	0.162
56	0.548	0.240	0.548	0.170
68	0.498	0.278	0.519	0.188
72	0.487	0.299	0.512	0.195

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %66 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %59 arttı.

Tablo 20. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.890	0.078	0.687	0.058
4	0.809	0.084	0.683	0.064
8	0.771	0.088	0.671	0.071
20	0.701	0.099	0.626	0.084
24	0.670	0.112	0.595	0.095
28	0.649	0.127	0.575	0.115
32	0.626	0.140	0.560	0.122
44	0.549	0.151	0.545	0.131
48	0.529	0.164	0.527	0.140
52	0.501	0.193	0.507	0.146
56	0.483	0.218	0.486	0.150
68	0.466	0.236	0.446	0.153
72	0.447	0.244	0.426	0.158

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı % 69 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %66 arttı.

Tablo 21. NADH, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.822	0.303	0.707	0.054
4	0.813	0.305	0.644	0.061
8	0.797	0.310	0.631	0.070
20	0.781	0.318	0.615	0.080
24	0.777	0.322	0.571	0.093
28	0.769	0.329	0.532	0.099
32	0.760	0.334	0.505	0.108
44	0.756	0.341	0.427	0.145
48	0.752	0.346	0.401	0.156
52	0.747	0.352	0.356	0.171
56	0.738	0.357	0.292	0.198
68	0.728	0.365	0.208	0.222
72	0.721	0.366	0.196	0.225

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %80 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %63 azaldı.

Tablo 22. NADH, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.814	0.144	0.705	0.058
4	0.795	0.154	0.648	0.062
8	0.767	0.161	0.626	0.069
20	0.724	0.178	0.602	0.078
24	0.686	0.194	0.573	0.092
28	0.654	0.208	0.566	0.106
32	0.628	0.219	0.550	0.116
44	0.592	0.237	0.539	0.122
48	0.578	0.248	0.498	0.135
52	0.541	0.253	0.451	0.148
56	0.529	0.261	0.416	0.166
68	0.493	0.270	0.371	0.189
72	0.485	0.274	0.347	0.195

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %8 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %5 azaldı.

Tablo 23. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Cu⁺⁺’ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.830	0.067	0.701	0.041
4	0.773	0.071	0.672	0.045
8	0.767	0.078	0.644	0.050
20	0.705	0.084	0.624	0.057
24	0.688	0.092	0.607	0.068
28	0.665	0.102	0.579	0.082
32	0.651	0.116	0.561	0.095
44	0.622	0.124	0.534	0.125
48	0.613	0.139	0.521	0.150
52	0.606	0.154	0.504	0.164
56	0.592	0.166	0.488	0.170
68	0.589	0.175	0.393	0.179
72	0.586	0.189	0.383	0.187

270 nm’de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %23 azaldı.

600 nm’de deney grubunda bakteri absorbansı %16 azaldı.

Tablo 24. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺’nın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.835	0.133	0.713	0.037
4	0.704	0.138	0.681	0.040
8	0.664	0.144	0.638	0.045
20	0.634	0.169	0.624	0.066
24	0.618	0.181	0.611	0.081
28	0.605	0.203	0.582	0.085
32	0.593	0.232	0.573	0.098
44	0.578	0.259	0.555	0.112
48	0.535	0.284	0.538	0.138
52	0.485	0.296	0.513	0.142
56	0.462	0.320	0.484	0.151
68	0.389	0.331	0.370	0.190
72	0.359	0.339	0.349	0.206

270 nm’de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %30 arttı.

600 nm’de deney grubunda bakteri absorbansı %21 arttı.

Tablo 25. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.817	0.288	0.688	0.044
4	0.778	0.293	0.647	0.054
8	0.757	0.302	0.638	0.067
20	0.723	0.315	0.619	0.092
24	0.709	0.331	0.589	0.105
28	0.696	0.348	0.560	0.112
32	0.673	0.356	0.546	0.120
44	0.626	0.382	0.528	0.138
48	0.605	0.396	0.507	0.144
52	0.578	0.409	0.481	0.155
56	0.553	0.414	0.468	0.167
68	0.538	0.431	0.429	0.172
72	0.523	0.448	0.425	0.183

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %11 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %15 arttı.

Tablo 26. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.831	0.218	0.726	0.029
4	0.806	0.224	0.690	0.032
8	0.782	0.231	0.675	0.040
20	0.750	0.243	0.643	0.064
24	0.734	0.258	0.636	0.072
28	0.718	0.266	0.618	0.080
32	0.696	0.296	0.603	0.089
44	0.671	0.313	0.586	0.104
48	0.652	0.325	0.559	0.120
52	0.622	0.337	0.538	0.133
56	0.588	0.345	0.519	0.141
68	0.549	0.376	0.466	0.158
72	0.506	0.381	0.457	0.161

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %20 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %23 arttı.

Tablo 27. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.690	0.424	0.641	0.036
4	0.682	0.431	0.603	0.039
8	0.670	0.441	0.590	0.051
20	0.658	0.463	0.577	0.080
24	0.642	0.476	0.554	0.095
28	0.628	0.489	0.541	0.109
32	0.611	0.501	0.529	0.118
44	0.589	0.518	0.496	0.140
48	0.566	0.529	0.479	0.162
52	0.542	0.538	0.447	0.182
56	0.525	0.547	0.412	0.208
68	0.503	0.555	0.371	0.220
72	0.494	0.561	0.355	0.230

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %31 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %29 azaldı.

Tablo 28. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.695	0.519	0.655	0.036
4	0.688	0.523	0.636	0.039
8	0.680	0.532	0.615	0.052
20	0.661	0.546	0.596	0.071
24	0.652	0.553	0.587	0.083
28	0.640	0.565	0.571	0.092
32	0.627	0.578	0.560	0.105
44	0.605	0.585	0.542	0.129
48	0.587	0.593	0.526	0.138
52	0.563	0.605	0.501	0.147
56	0.546	0.610	0.489	0.156
68	0.526	0.616	0.441	0.167
72	0.516	0.620	0.411	0.170

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %26 azaldı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %24 azaldı.

Tablo 29. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.712	0.367	0.696	0.020
4	0.652	0.371	0.653	0.027
8	0.588	0.386	0.628	0.035
20	0.483	0.399	0.595	0.053
24	0.457	0.412	0.577	0.069
28	0.394	0.428	0.551	0.082
32	0.371	0.442	0.537	0.094
44	0.283	0.467	0.505	0.121
48	0.266	0.488	0.481	0.134
52	0.230	0.518	0.458	0.142
56	0.212	0.531	0.433	0.152
68	0.193	0.569	0.390	0.158
72	0.186	0.580	0.363	0.161

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %58 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %51 arttı.

Tablo 30. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.719	0.360	0.655	0.043
4	0.648	0.382	0.622	0.051
8	0.602	0.394	0.589	0.058
12	0.569	0.405	0.561	0.064
24	0.512	0.426	0.524	0.079
28	0.481	0.438	0.507	0.090
32	0.453	0.455	0.476	0.098
36	0.409	0.471	0.453	0.121
48	0.351	0.490	0.411	0.148
52	0.318	0.528	0.393	0.160
56	0.256	0.540	0.377	0.171
60	0.216	0.562	0.361	0.177
72	0.178	0.581	0.323	0.186

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %63.4 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %54.5 arttı.

Tablo 31. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.706	0.346	0.630	0.079
4	0.681	0.355	0.615	0.093
16	0.654	0.378	0.592	0.116
20	0.631	0.390	0.576	0.124
24	0.608	0.412	0.553	0.138
28	0.587	0.425	0.541	0.144
40	0.497	0.441	0.516	0.168
44	0.460	0.465	0.483	0.177
48	0.428	0.489	0.463	0.192
52	0.383	0.510	0.447	0.211
64	0.326	0.558	0.409	0.230
68	0.274	0.579	0.380	0.236
72	0.159	0.616	0.289	0.241

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %66.6 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %60.4 arttı.

Tablo 32. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.726	0.351	0.671	0.082
4	0.690	0.371	0.656	0.090
16	0.669	0.386	0.627	0.123
20	0.648	0.397	0.597	0.141
24	0.619	0.427	0.579	0.156
28	0.587	0.448	0.548	0.172
40	0.545	0.466	0.516	0.189
44	0.507	0.495	0.488	0.197
48	0.451	0.520	0.465	0.219
52	0.393	0.545	0.431	0.227
64	0.319	0.593	0.386	0.234
68	0.274	0.616	0.359	0.245
72	0.166	0.624	0.343	0.251

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %65 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %61.5 arttı.

Tablo 33. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.706	0.301	0.653	0.073
4	0.686	0.312	0.640	0.088
16	0.651	0.328	0.628	0.105
20	0.632	0.340	0.616	0.116
24	0.621	0.355	0.597	0.129
28	0.618	0.367	0.577	0.138
40	0.587	0.389	0.560	0.151
44	0.563	0.406	0.548	0.167
48	0.538	0.419	0.526	0.174
52	0.511	0.431	0.511	0.188
64	0.473	0.453	0.483	0.206
68	0.445	0.471	0.463	0.212
72	0.428	0.498	0.436	0.224

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %28 arttı.

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %30.4 arttı.

Tablo 34. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.698	0.324	0.638	0.071
4	0.676	0.336	0.621	0.086
16	0.652	0.353	0.613	0.107
20	0.635	0.368	0.597	0.119
24	0.619	0.391	0.578	0.128
28	0.606	0.415	0.560	0.142
40	0.574	0.432	0.532	0.155
44	0.556	0.448	0.515	0.167
48	0.537	0.467	0.502	0.179
52	0.511	0.487	0.487	0.186
64	0.484	0.492	0.461	0.196
68	0.462	0.501	0.454	0.200
72	0.440	0.507	0.445	0.204

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı % 33.6 arttı

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %37.5 arttı

Tablo 35. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.712	0.300	0.669	0.091
4	0.705	0.309	0.662	0.098
8	0.693	0.315	0.651	0.105
12	0.682	0.322	0.643	0.117
24	0.658	0.337	0.628	0.124
28	0.641	0.342	0.615	0.136
32	0.634	0.356	0.607	0.140
36	0.621	0.362	0.589	0.148
48	0.609	0.376	0.576	0.153
52	0.598	0.381	0.560	0.159
56	0.593	0.388	0.552	0.166
60	0.587	0.394	0.549	0.171
72	0.581	0.401	0.548	0.178

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı % 8 arttı

600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %16 arttı

Tablo 36. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.706	0.316	0.667	0.093
4	0.695	0.320	0.661	0.095
8	0.678	0.323	0.650	0.097
12	0.661	0.325	0.629	0.101
24	0.643	0.330	0.607	0.108
28	0.633	0.334	0.591	0.112
32	0.621	0.337	0.582	0.115
36	0.607	0.340	0.576	0.118
48	0.598	0.344	0.563	0.121
52	0.586	0.346	0.554	0.124
56	0.581	0.349	0.549	0.125
60	0.579	0.351	0.547	0.126
72	0.572	0.353	0.542	0.127

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %6.4 arttı

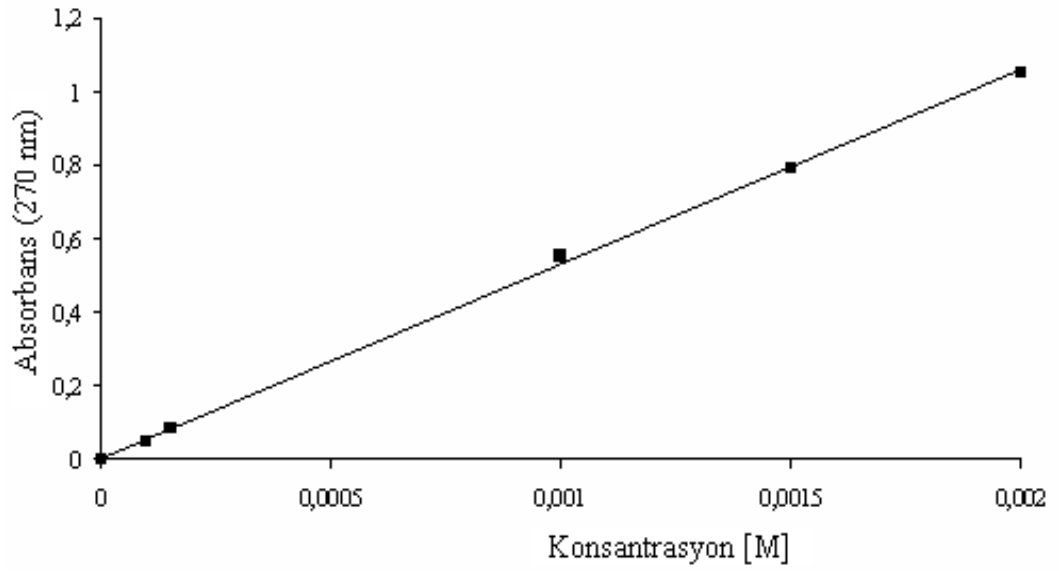
600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %8.8 arttı

Tablo 37. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkileri

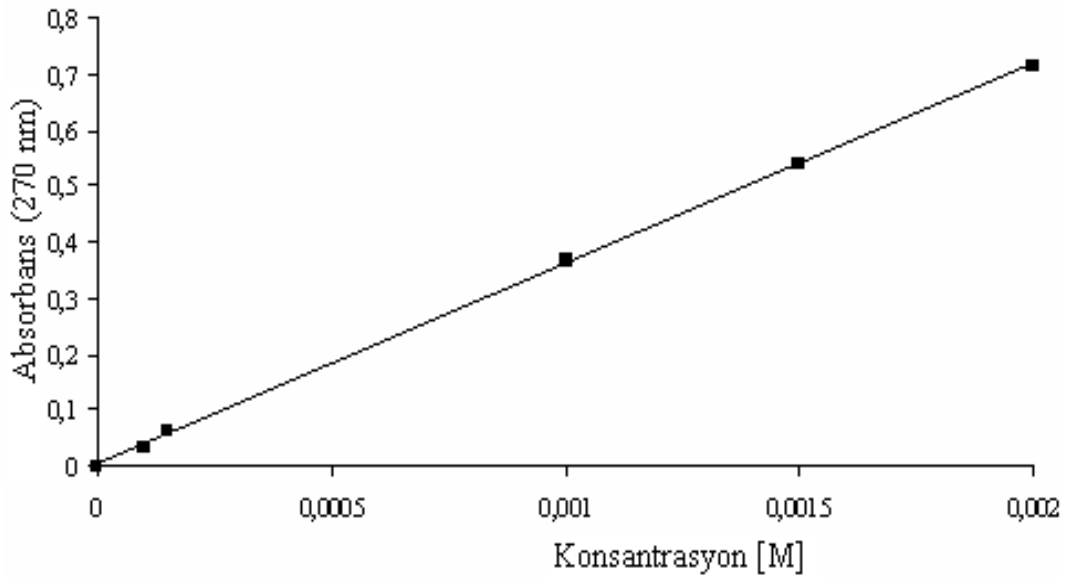
Zaman	Deney		Kontrol	
	270nm	600nm	270nm	600nm
0	0.695	0.344	0.639	0.098
4	0.668	0.358	0.608	0.105
16	0.627	0.373	0.586	0.118
20	0.612	0.381	0.563	0.127
24	0.593	0.397	0.547	0.138
28	0.571	0.416	0.531	0.145
40	0.530	0.425	0.509	0.162
44	0.507	0.439	0.485	0.176
48	0.479	0.454	0.466	0.188
52	0.451	0.468	0.442	0.194
64	0.408	0.486	0.419	0.204
68	0.372	0.507	0.394	0.211
72	0.312	0.524	0.380	0.217

270 nm'de deney grubunda benzoik asidin yıkımı %47.8 arttı

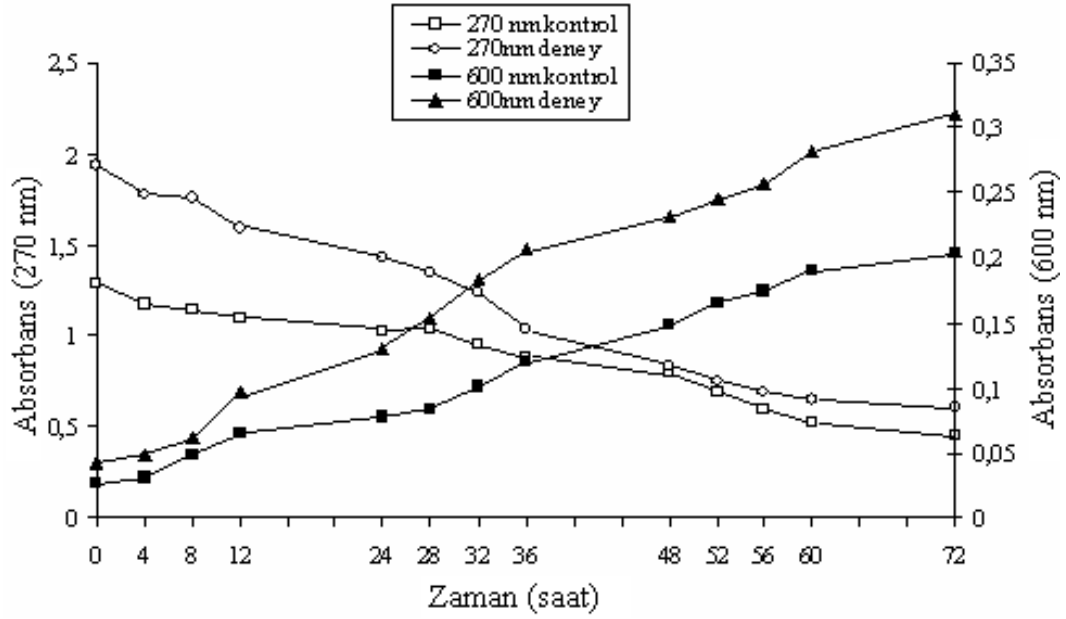
600 nm'de deney grubunda bakteri absorbansı %51 arttı



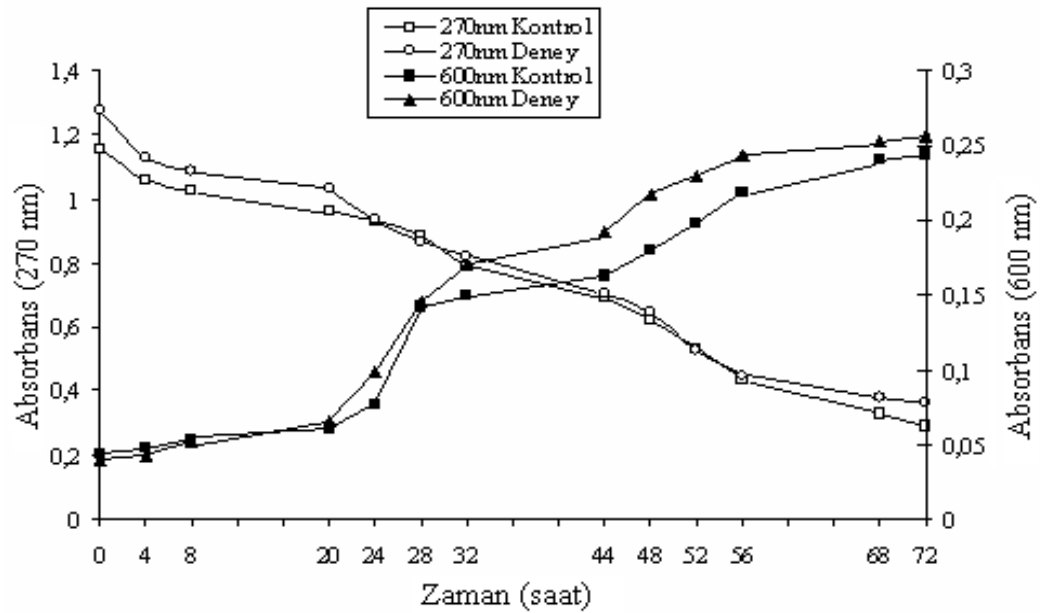
Grafik 1. Benzoik asidin standart eğrisi



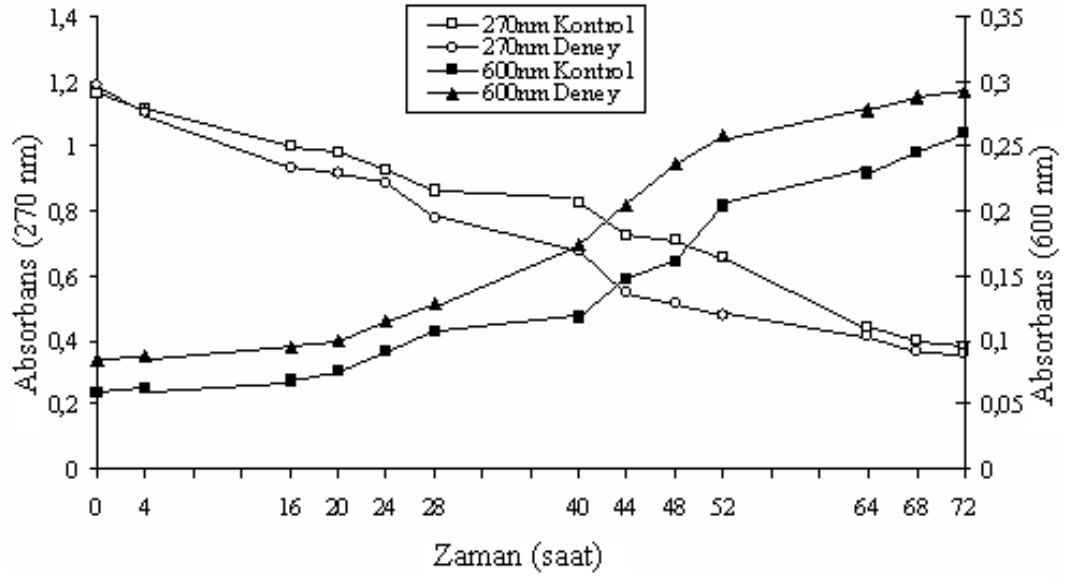
Grafik 2. Benzoik asidin standart eğrisi



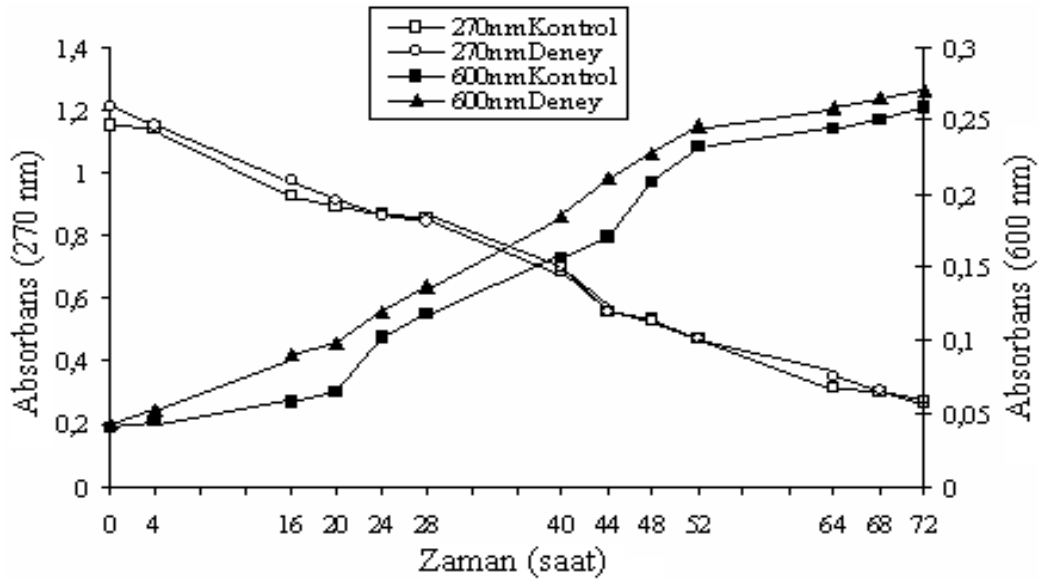
Grafik 3. NADH'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



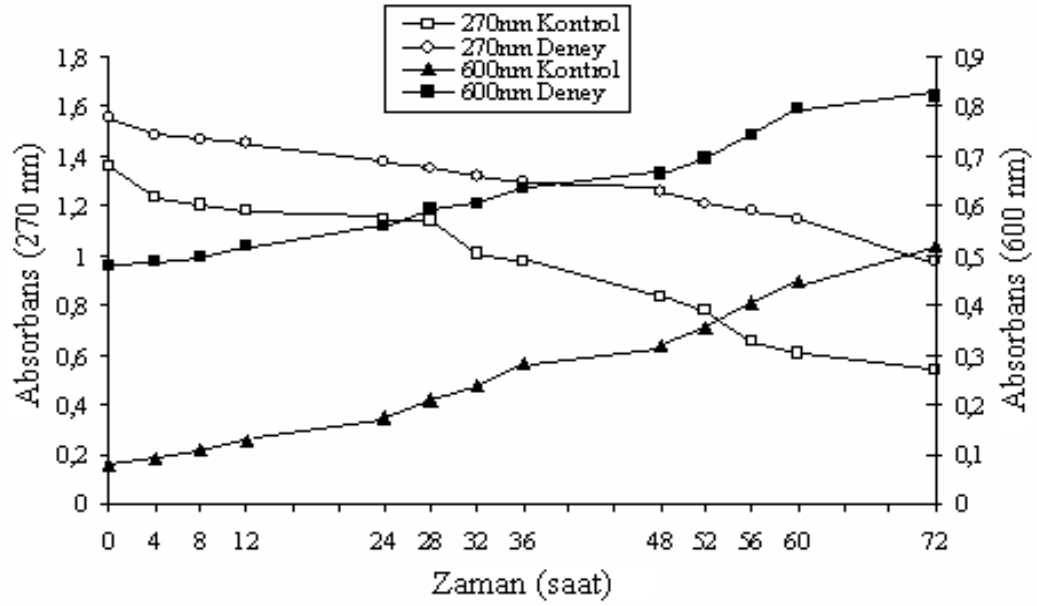
Grafik 4. ATP'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



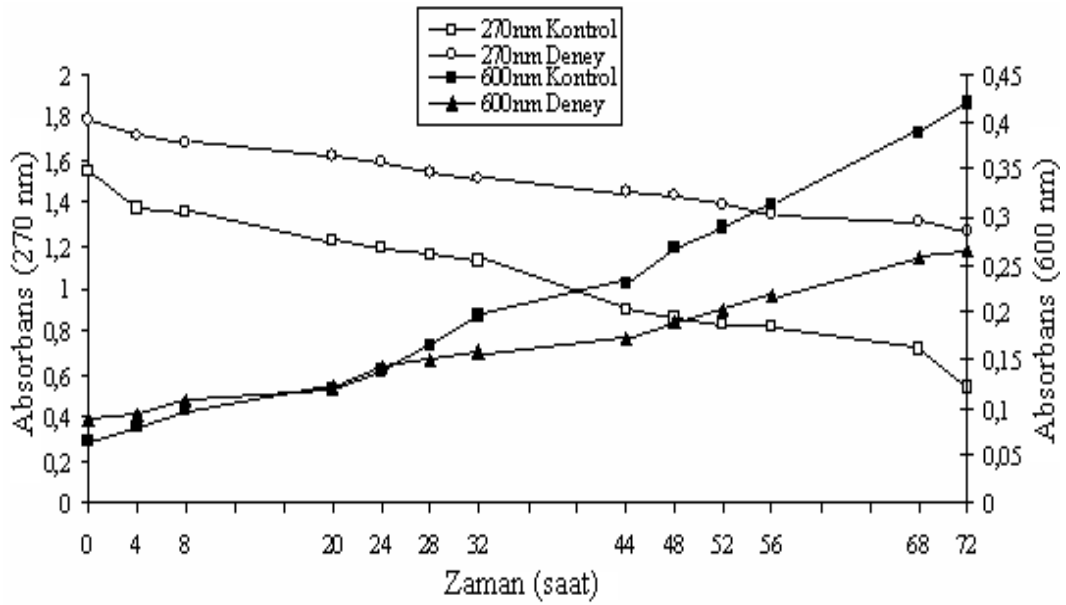
Grafik 5. Fe⁺⁺⁺'ün benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



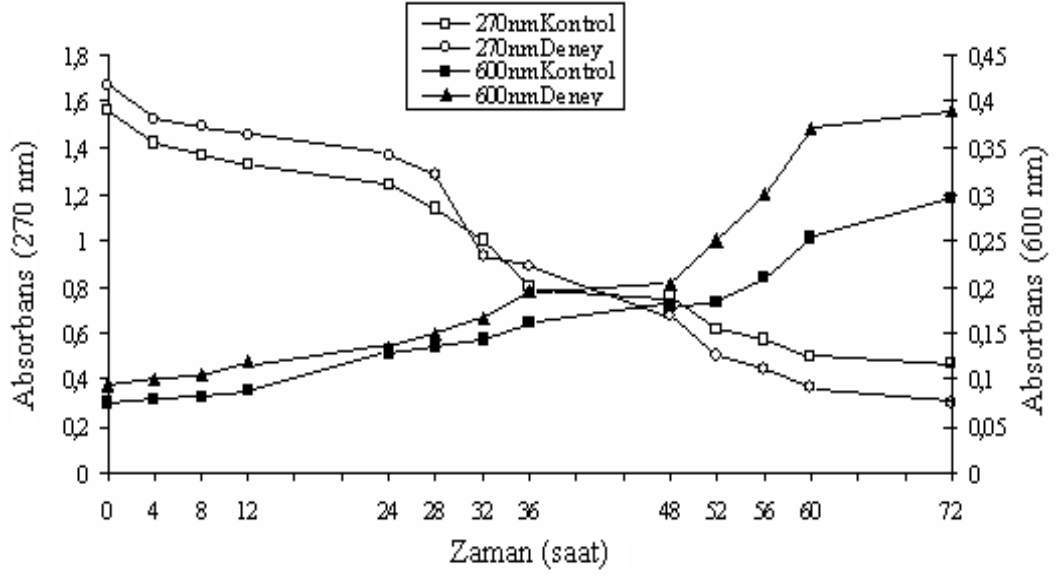
Grafik 6. Mg⁺⁺'ün benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



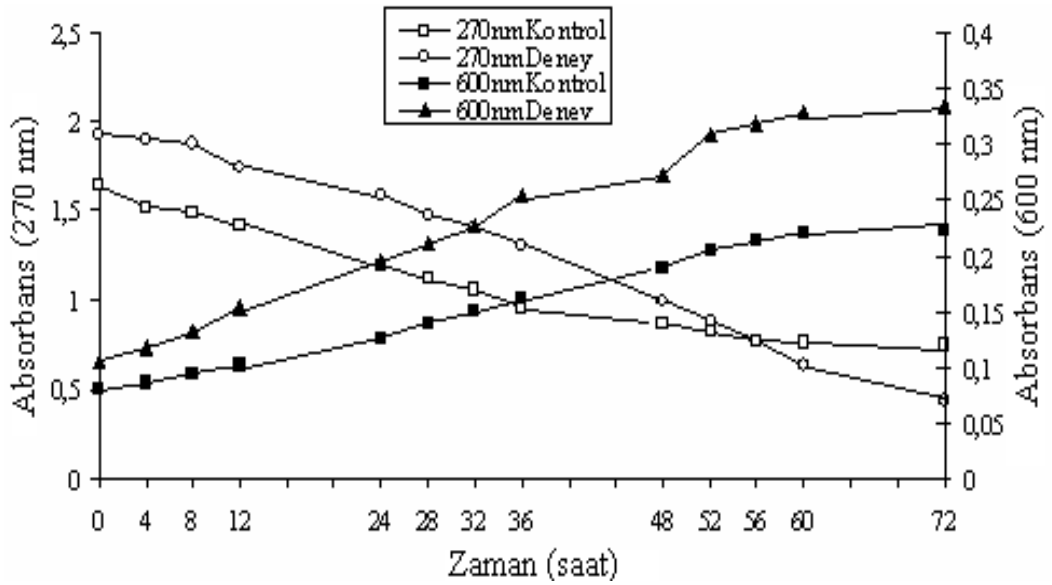
Grafik 7. Mn⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorban ilişkisi



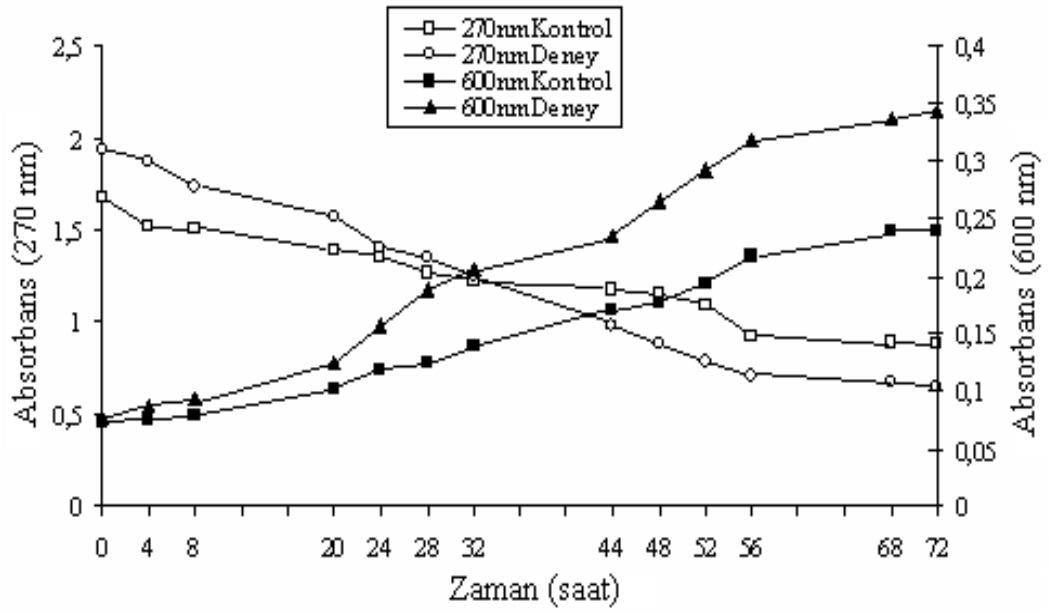
Grafik 8. Cu⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorban ilişkisi



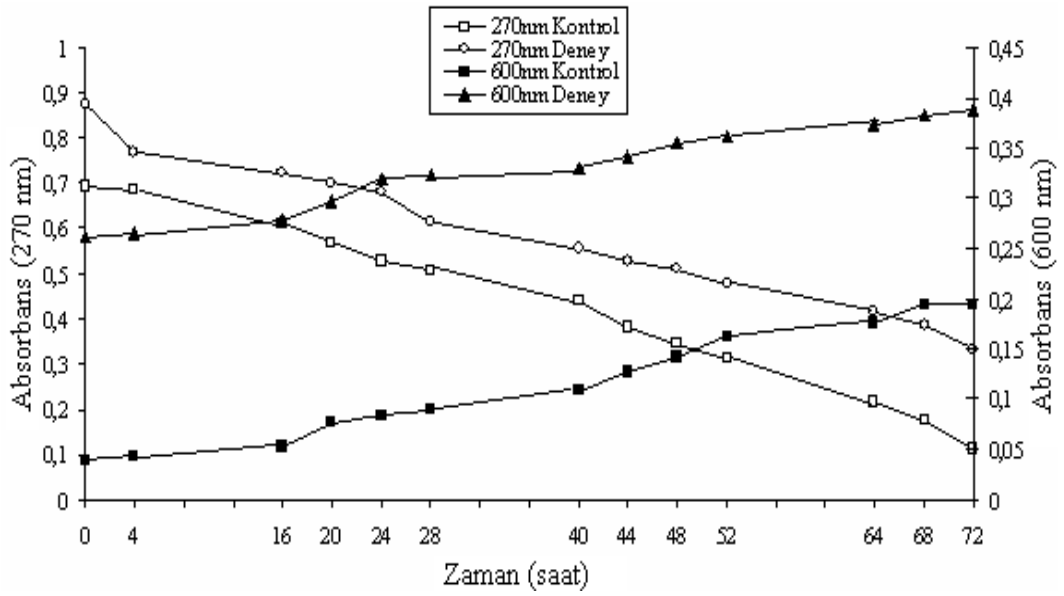
Grafik 9. Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorban ilişkisi



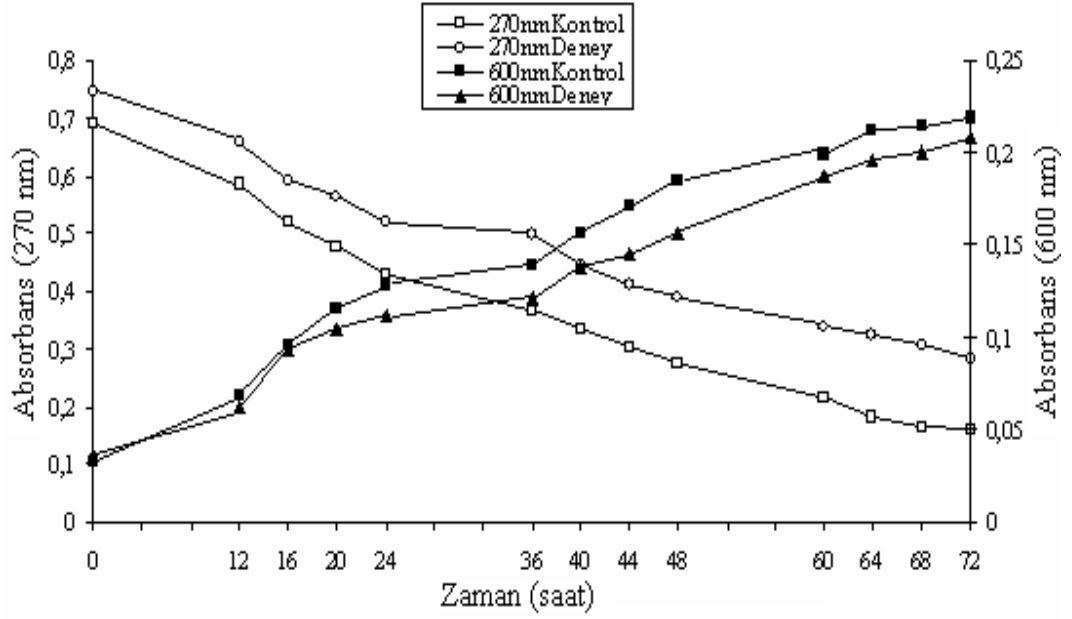
Grafik 10. NADH, Fe⁺⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorban ilişkisi



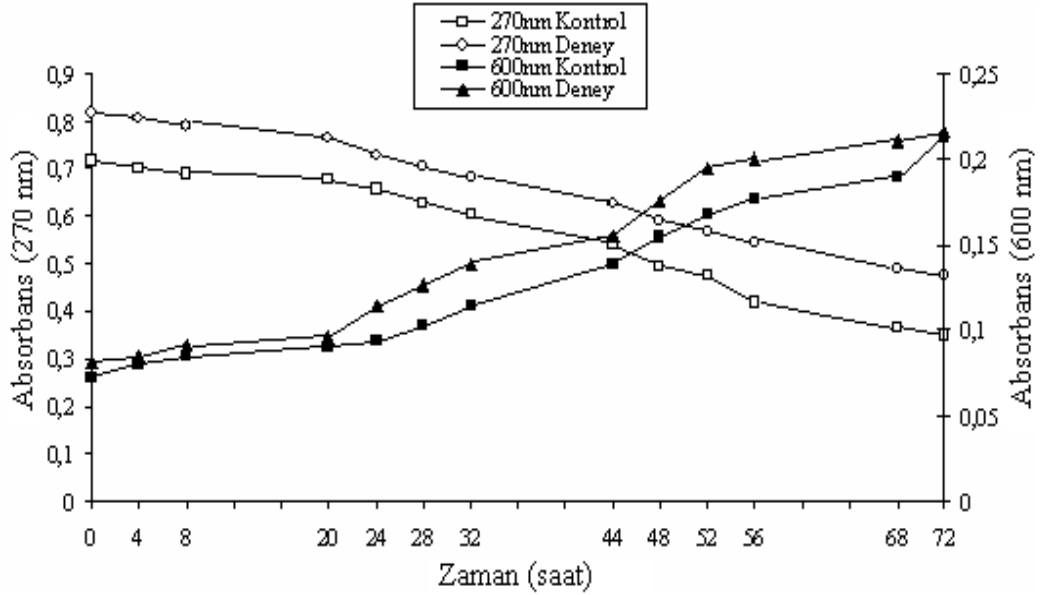
Grafik 11. NADH, Mg⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



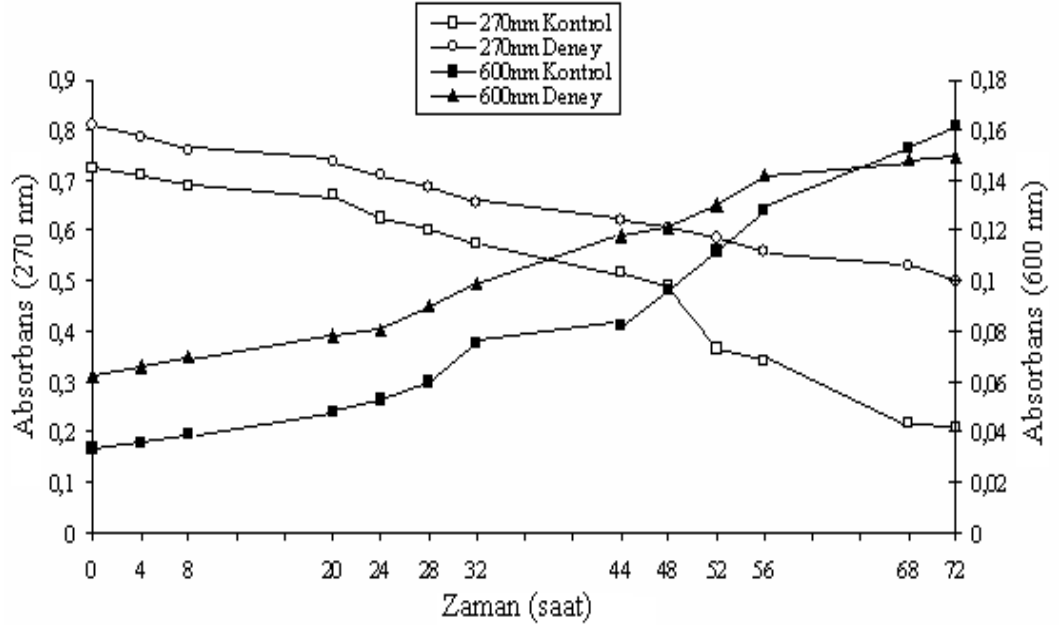
Grafik 12. NADH, Mn⁺⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



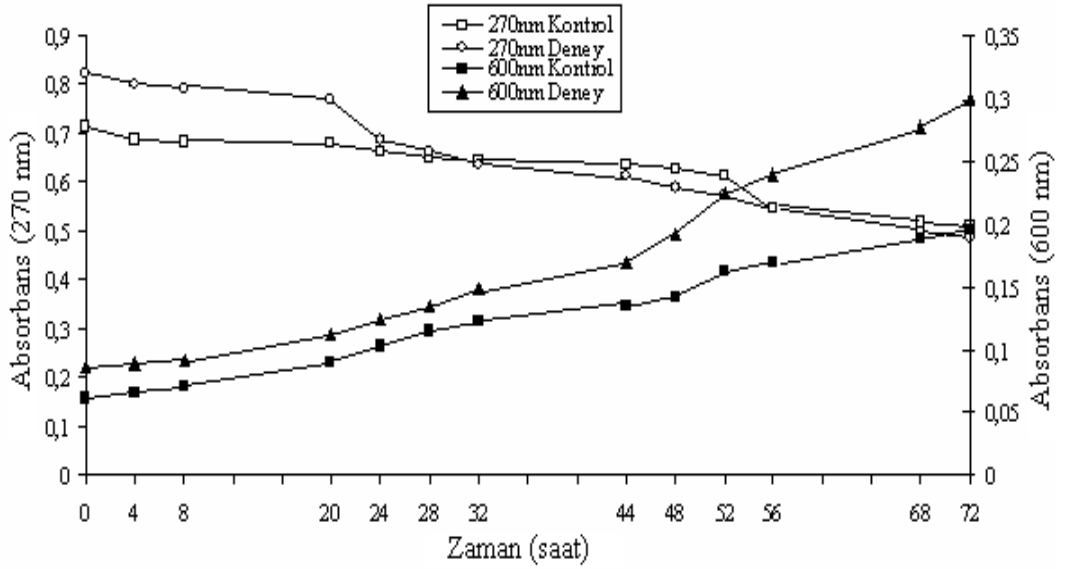
Grafik 13. Ca⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



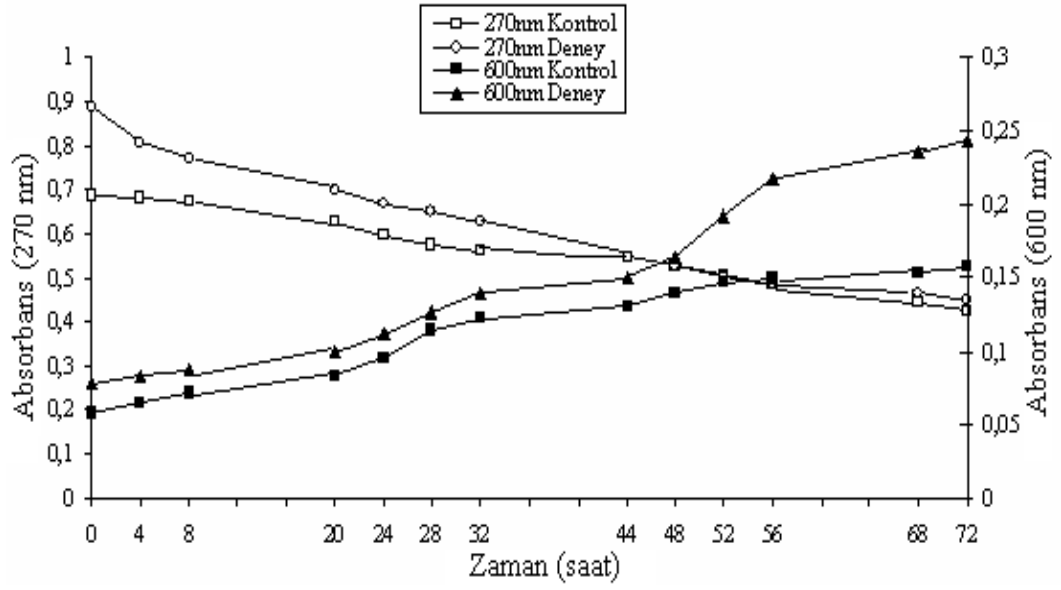
Grafik 14. NADH, Ca⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



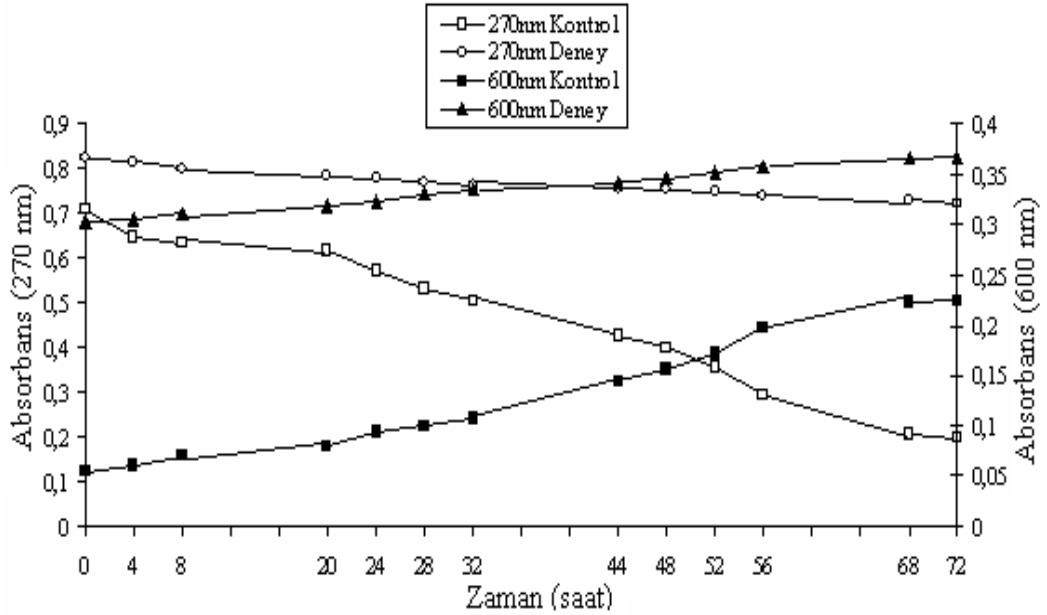
Grafik 15. NADH, Cu^{++} 'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



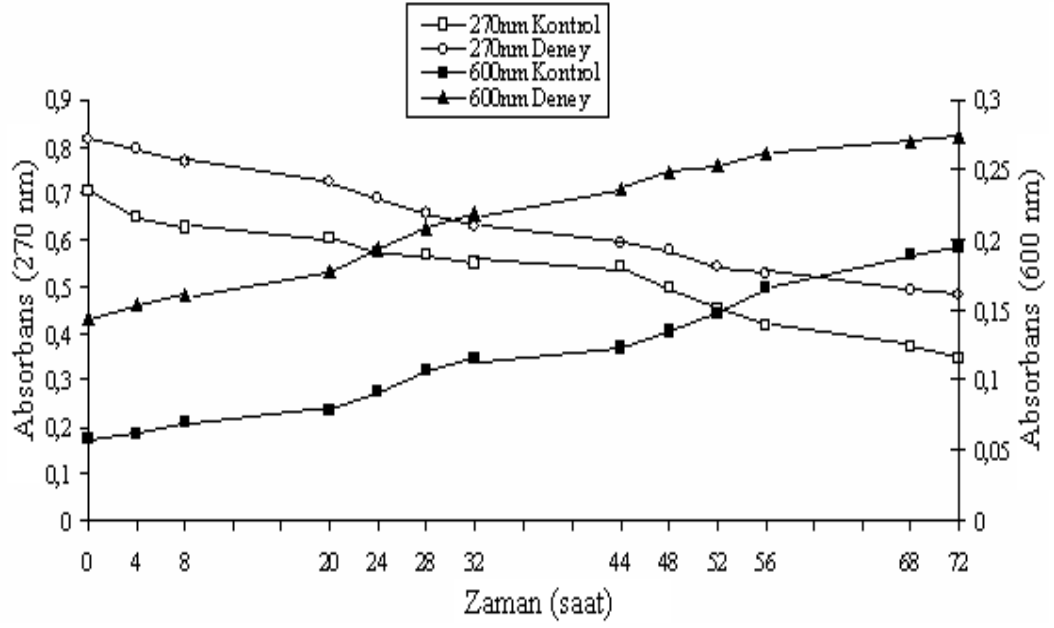
Grafik 16. NADH, Zn^{++} 'nın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



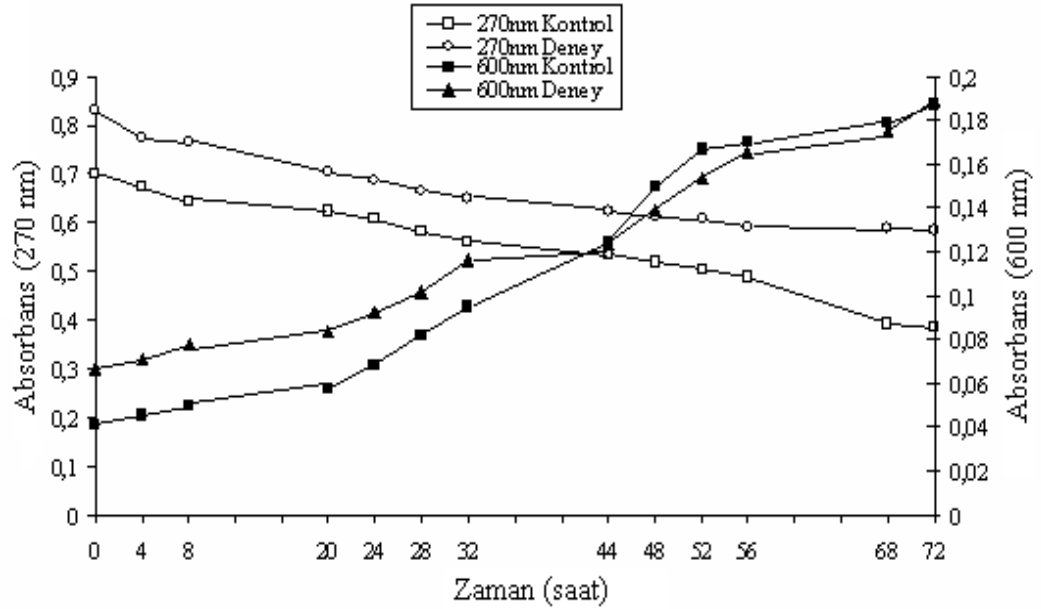
Grafik 17. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺'un benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



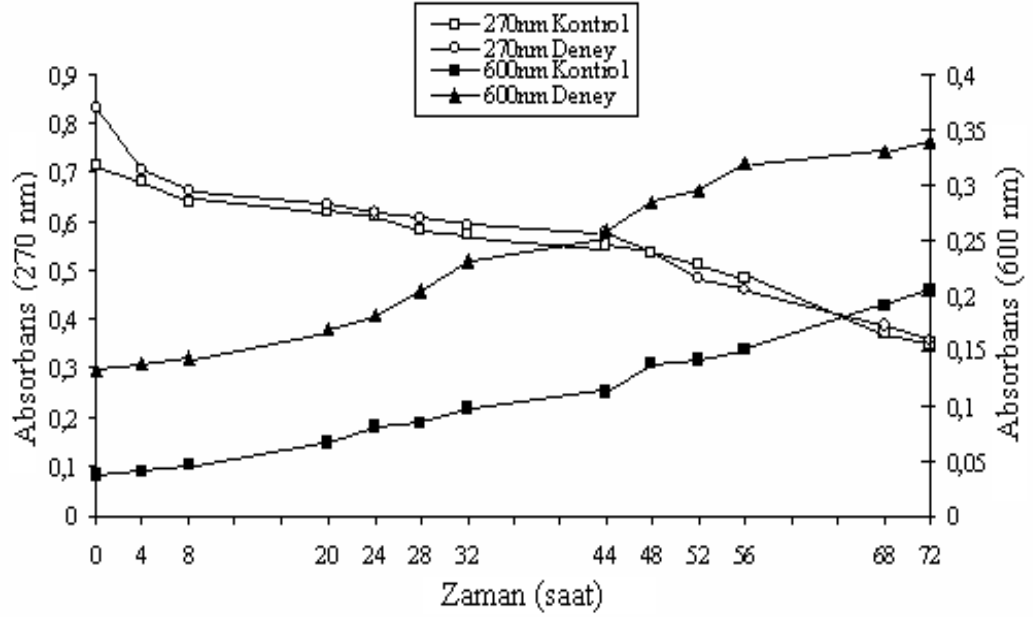
Grafik 18. NADH, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺'in benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



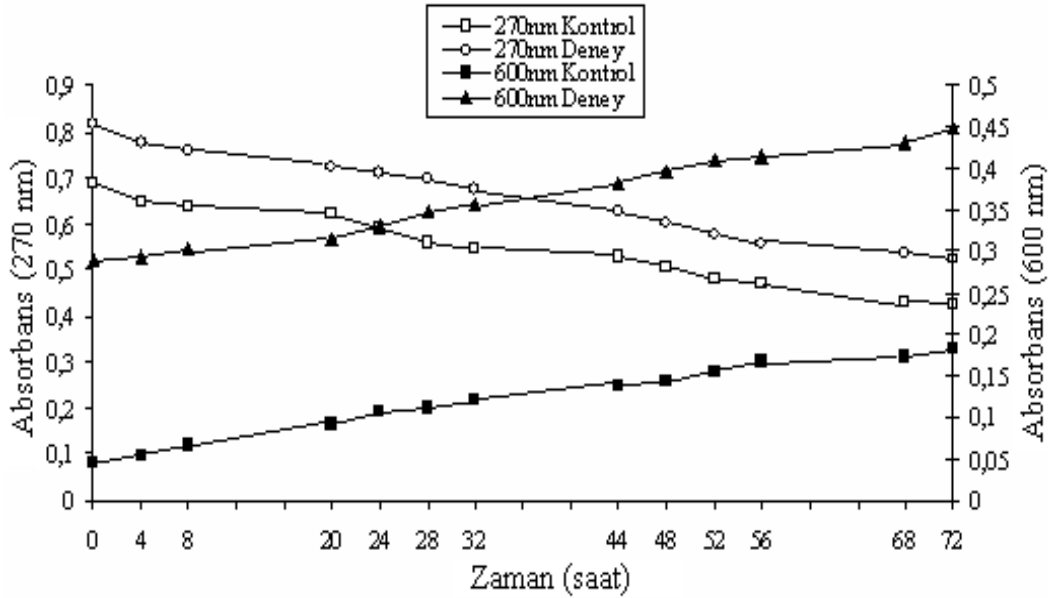
Grafik 19. NADH, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



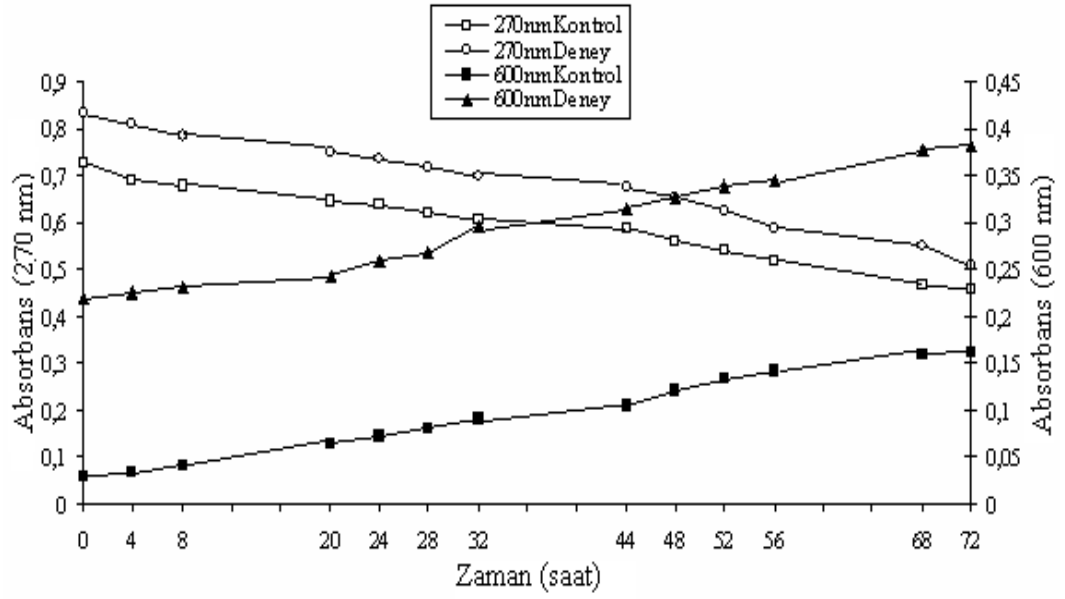
Grafik 20. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Cu⁺⁺⁺'ün benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



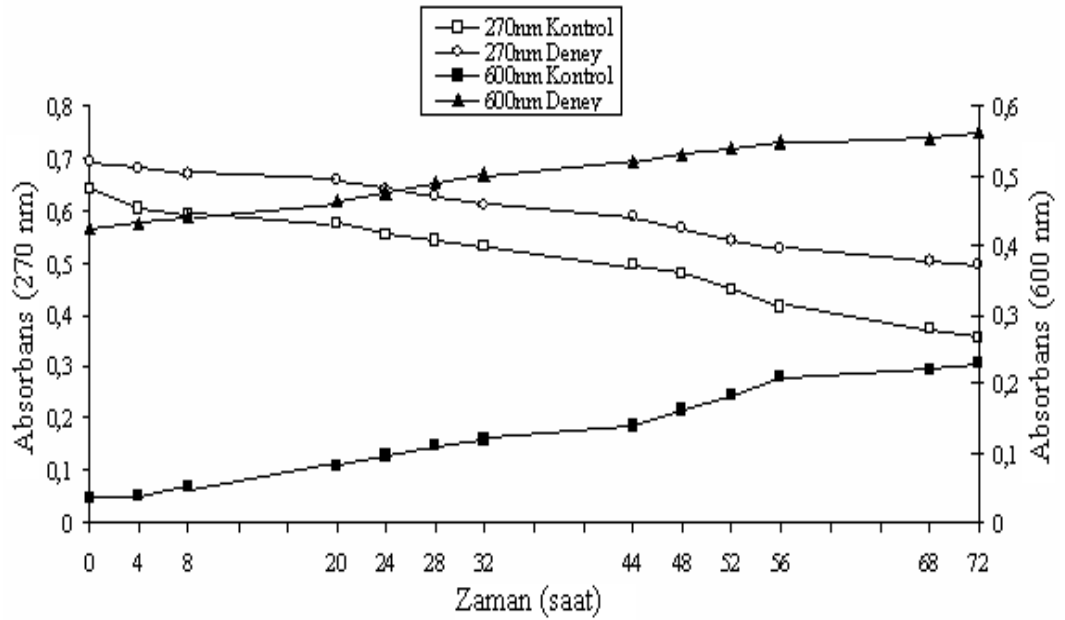
Grafik 21. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



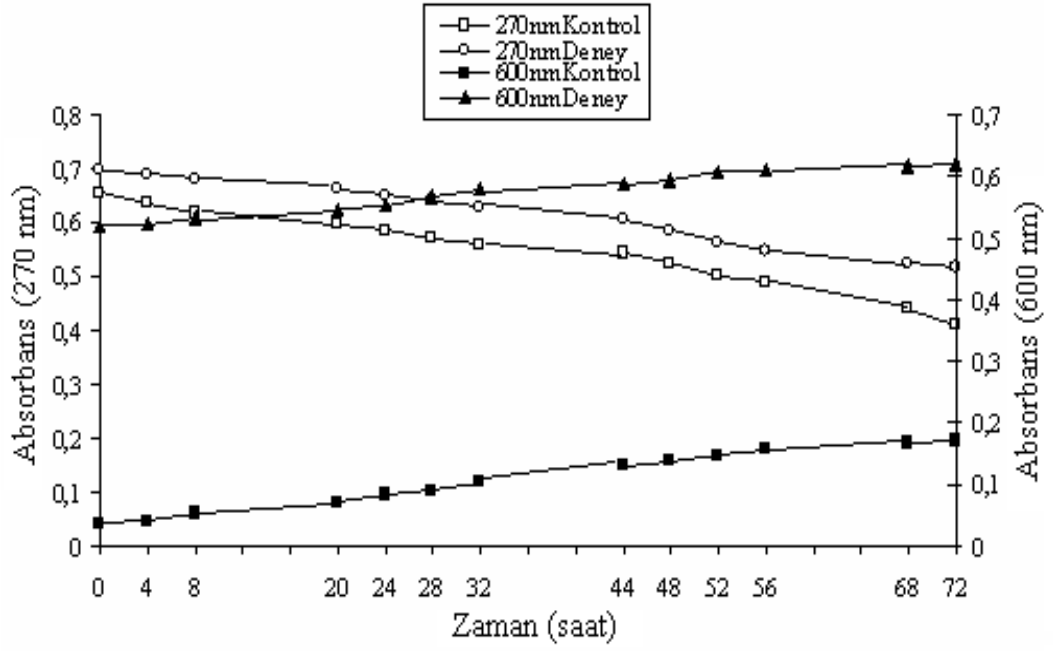
Grafik 22. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



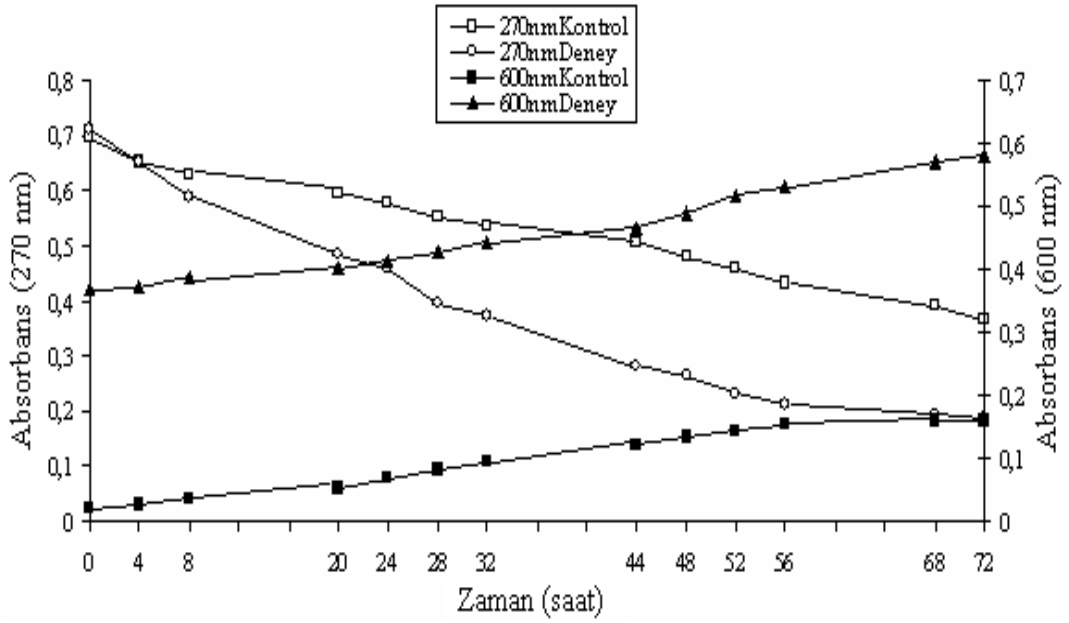
Grafik 23. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺⁺ nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



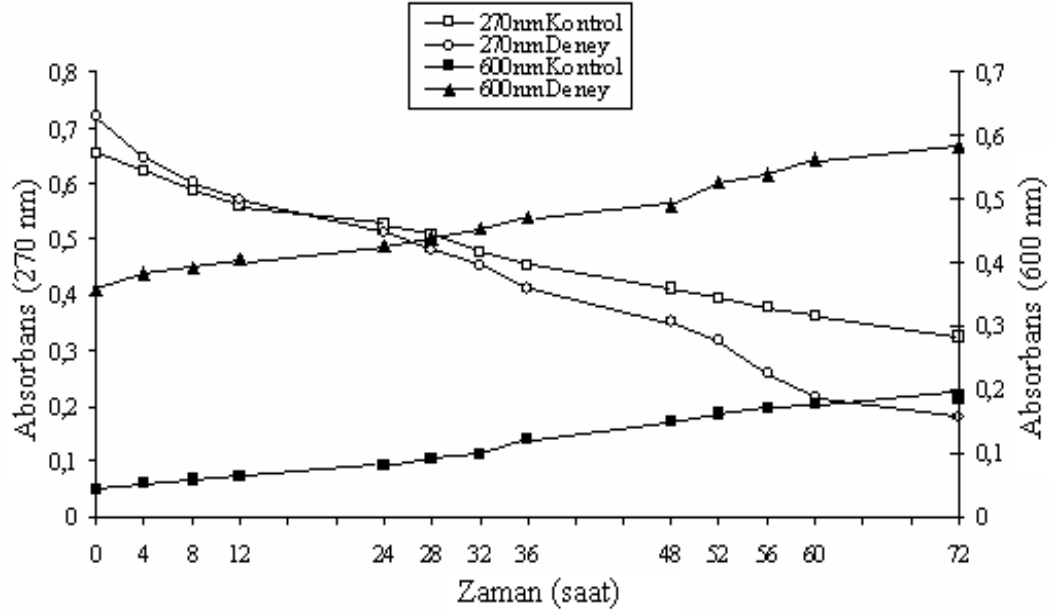
Grafik 24. Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺⁺ ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



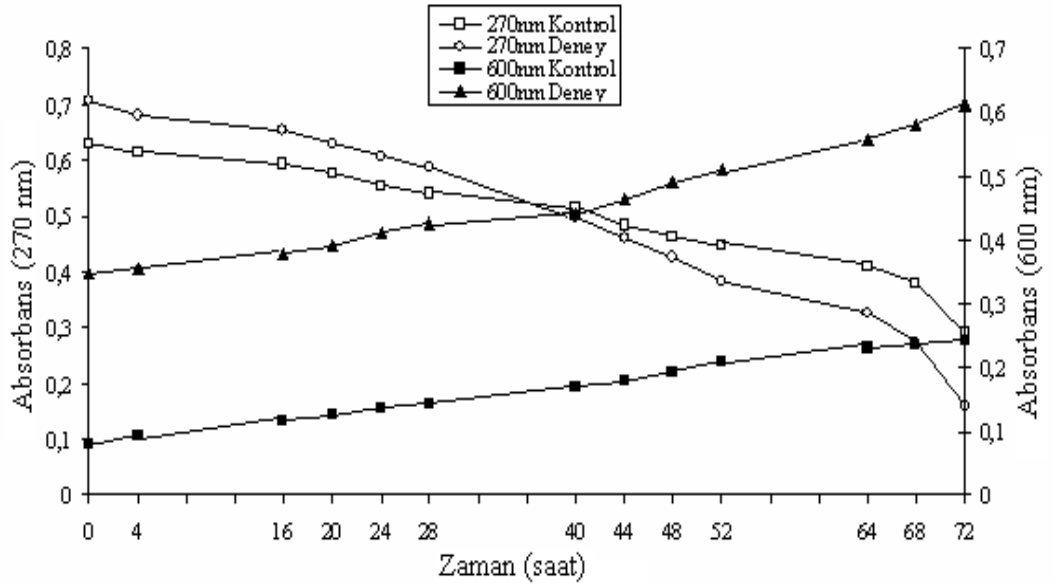
Grafik 25. NADH, Fe³⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺'ın benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



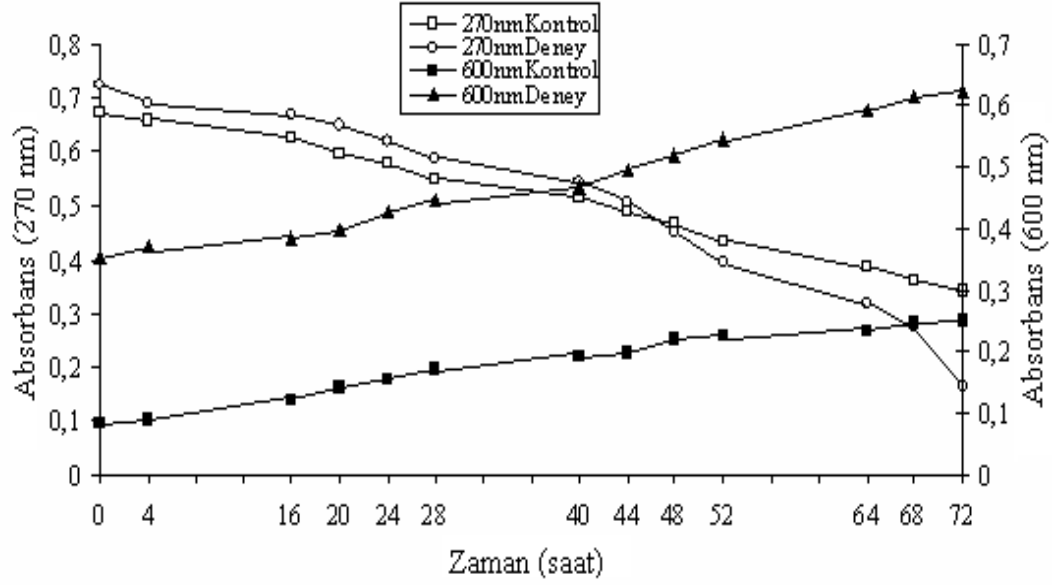
Grafik 26. NADH, Fe³⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



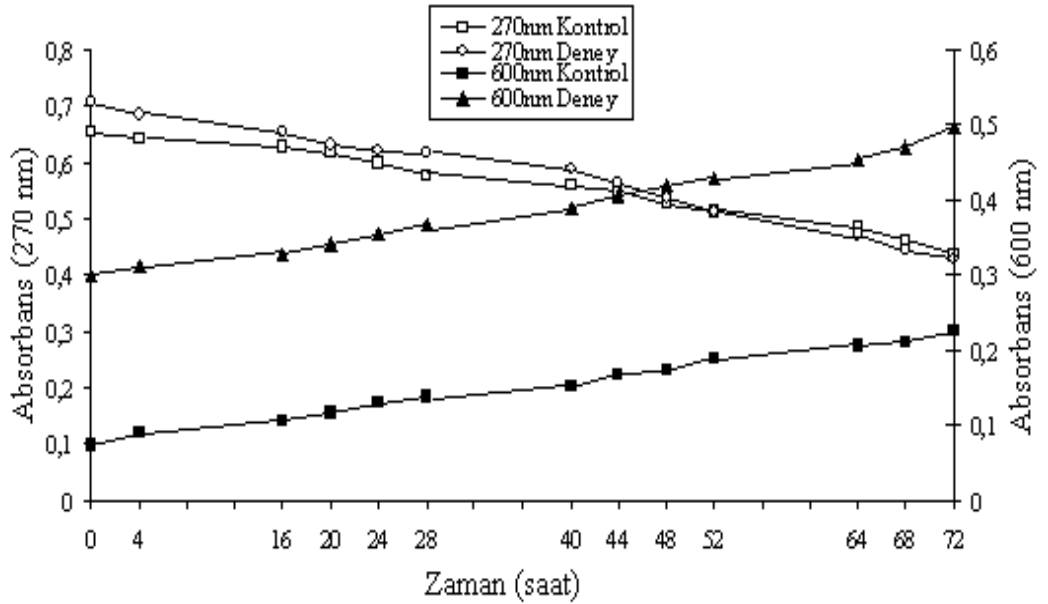
Grafik 27. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



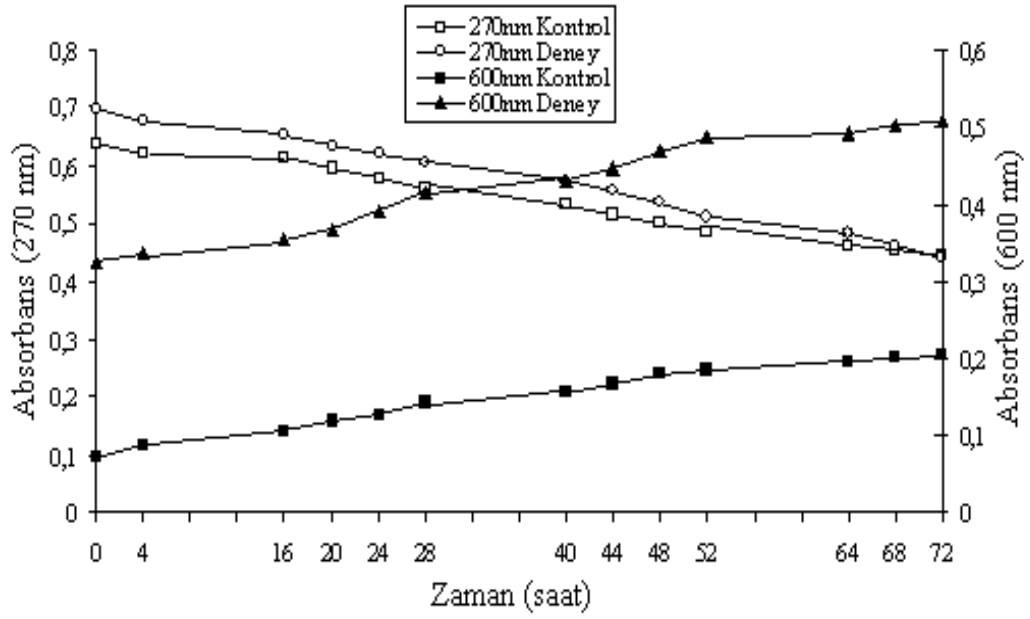
Grafik 28. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



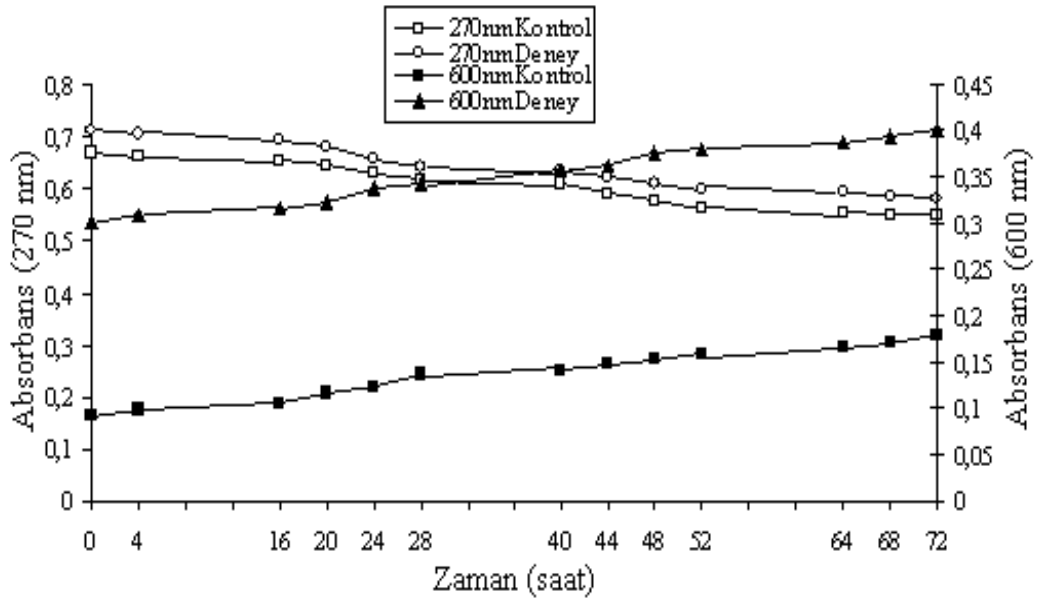
Grafik 29. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



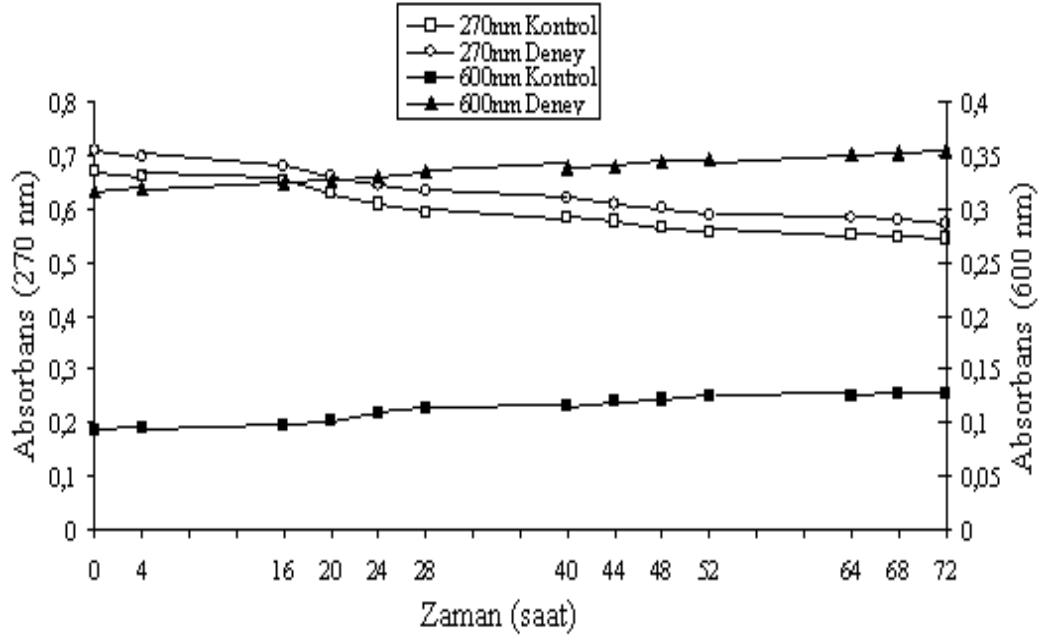
Grafik 30. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorbans ilişkisi



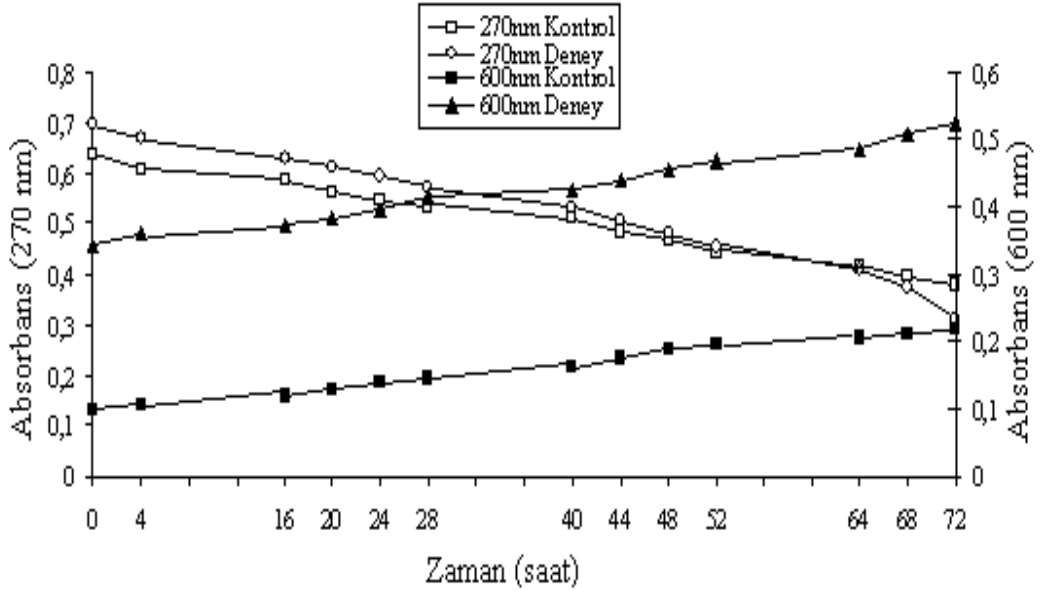
Grafik 31. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



Grafik 32. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nun benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağlı absorptans ilişkisi



Grafik 33. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağı absorbans ilişkisi



Grafik 34. NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺'nin benzoik asidin yıkımı üzerindeki etkisinin zamana bağı absorbans ilişkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Benzoik asit çoğu çevrelerde çözünmüş ya da çözünmemiş formda yaygın olarak bulunan bir metabolittir (Chipley, 1983). Benzoik asidin toprak ve su gibi çevrelere yayılmasında en önemli faktör besin koruyucu olarak kullanılmasının yanı sıra diş macunu ve kozmetik ürünlerde de bulunmasıdır. Fizikokimyasal yapısına bakıldığında benzoik asit sudan ve topraktan buharlaşarak atmosfere geçemez, ya da toprak partikülleri ve sediment tarafından absorbe edilemez. Bu nedenle asıl eliminasyonu aerobik ve anaerobik biyotik mineralizasyonla olur (Kameya ve Ark., 1995).

Benzoik asit aromatik hidrokarbonların yıkımında anahtar ara üründür (Nguji ve Ark., 2007) ve bilim adamları tarafından yapılan çeşitli çalışmalar örneğin; Miguez ve Ark., (1995) benzoik asidi parçalayan bakterilerin toprakta, Brune ve Ark., (1995) ağaçla beslenen beyaz karıncaların bağırsağında, Harwood ve Ark., (1997) ise saf kültürlerde olduğunu rapor etmektedir.

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'yı kullanmamızın en önemli nedeni bu bakterinin toksik özellikteki kimyasalların biyolojik yıkımını gerçekleştirebilmesi ve solventlere karşı en dirençli bakteriler arasında olmasıdır (Sardessai ve Ark., 2003). *Pseudomonas aeruginosa* suşları benzoik asit gibi hidrofobik substratlar üzerinde geliştikleri zaman aktif denitrifiye edici ajan özelliği gösterir ve biyoyileşirmede kullanılan önemli bir bileşik olan biyosülfektanları (ramnolipid) üretirler (Kahraman ve Ark., 2005).

Bakteriler genellikle pH 6-8 aralığında optimum üreme göstermektedir (Sıdal ve Ark., 1999), bu nedenle çalışmamızda optimum pH değerini belirlemek için önce pH 7'de, sonra pH 6, pH 8, pH 5 ve pH 9'da çalışıldı. Kültür sıcaklığı da bakterilerin üremesinde ve bakteriyal enzimlerin çalışmasında oldukça önemlidir. Yaptığımız deneylerde 37 °C'de inkübasyon yapılırken son deneyde ise 30 °C'de çalışıldı fakat beklenen sonuç alınamadı. Kahyaoğlu ve Ark. (2006) ile Kahraman ve Ark. (2005) yaptığı çalışmalarda da *Pseudomonas aeruginosa* için optimum inkübasyon sıcaklığının 37°C olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlendi ve 72 saat süresince aldığımız örneklerde benzoik

asidin yıkımında ve bakteri hücrelerinin miktarında artış ya da azalış olup olmadığı gözlemlendi.

Yapılan çalışmada deney grubuna çeşitli kofaktörler eklendi ve eklenen bu kofaktörlerin benzoik asidin yıkımı üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak çalışıldı. Deney grubuna NADH eklendiğinde deney grubunun kontrol grubuna oranla % 60 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %51.4 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 6) (Grafik 3). Besiyerine NADH eklendiğinde benzoik asidin daha fazla yıkılmasının nedeni NADH'ın benzoik asidin katekole parçalanmasını katalizleyen dioksijenaz enziminin kofaktörü olarak görev yapmasıdır (Reiner,1971).

Deney grubuna ATP eklendiğinde deney grubunun %5.6 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %8 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 7) (Grafik 4). Benzoik asit *Pseudomonas aeruginosa* bakteri hücresine girdiği zaman ATP konsantrasyonunun azalmasına neden olur (Krebs ve Ark.,1983), bu nedenle kültüre ATP eklendiğinde benzoik asidin yıkımında ve bakteri miktarında artış olmaktadır.

Deney grubuna Fe^{+++} eklendiğinde deney grubunun %5.6 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %4 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 8) (Grafik 5). Wang ve Ark. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* tarafından benzoik asidin yıkımını sağlayan katekol 1,2-dioksijenaz enziminin optimizasyonu ve karakterizasyonunu yaptıkları çalışmada, kültüre Fe^{++} eklendiğinde enzim aktivitesinin %18 arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya benzer olarak bizim sonuçlarımızdaki bu artış da katekol 1,2-dioksijenaz enziminin aktivitesinin Fe^{+++} eklendiğinde artması ve daha fazla benzoik asidi yıkıma uğratması ile uyum göstermektedir. Deney grubuna Fe^{+++} ve NADH birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %65 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %60 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 13) (Grafik 10).

Deney grubuna Mg^{++} eklendiğinde deney grubunun %5.6 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %4.5 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 9) (Grafik 6). Wang ve Ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada da

kültüre Mg^{++} eklendiğinde enzim aktivitesinin %4 arttığı gözlemlenmiştir ve çalışmamızla uyum göstermektedir.

Deney grubuna NADH ve Mg^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %63 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %59.8 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 14) (Grafik 11).

Deney grubuna Mn^{++} eklendiğinde deney grubunun kontrol grubuna oranla %29.6 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %23 daha az olduğu görüldü (Tablo 10) (Grafik 7). Wang ve Ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada da kültüre Mn^{++} eklendiğinde enzim aktivitesinin %64 azaldığı gözlemlenmiştir ve buna bağlı olarak da çalışmamızda enzim aktivitesinde düşmeye neden olmaktadır. Deney grubuna NADH ve Mn^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %22 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %18 daha az olduğu görüldü (Tablo 15) (Grafik 12). NADH dioksijenaz enziminin aktivitesini artırırken (Bagneris ve Ark.,2004), Mn^{++} 'ın yüksek konsantrasyonda kullanımı inhibisyona neden olur.

Deney grubuna Cu^{++} eklendiğinde deney grubunun %48 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %50 daha az olduğu görüldü (Tablo 11) (Grafik 8). Wang ve Ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada da kültüre Cu^{++} eklendiğinde enzim aktivitesinin %81 azaldığı gözlemlenmiştir. Cu^{++} elektron taşıma sisteminde görev yapan sitokrom oksidaz enziminin katalitik aktivitesinde önemli rol oynamasına karşın (Gözükara, 2001) yaptığımız çalışmada inhibitör olarak rol oynamaktadır. Deney grubuna NADH ve Cu^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %40 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %31 daha az olduğu görüldü (Tablo 18) (Grafik 15).

Deney grubuna Zn^{++} eklendiğinde deney grubunun %26 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %35 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 12) (Grafik 9). Zn^{++} , NAD^+ ve $NADP^+$ bağımlı dehidrogenaz enzimlerinde mevcut olup hidrid iyonlarının substrattan NAD^+ ve $NADP^+$ kofaktörlerine transferini sağlarken ayrıca DNA ve RNA polimeraz enzimlerinin temel yapısal bileşeni olarak ta görev yapmaktadır (Gözükara, 2001). Deney grubuna NADH ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %66 daha fazla

benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %59 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 19) (Grafik 16).

Deney grubuna Ca^{++} eklendiğinde deney grubunun kontrol grubuna oranla %12 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %7 daha az olduğu görüldü (Tablo 16) (Grafik 13). Wang ve Ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada kültüre Ca^{++} eklendiğinde enzim aktivitesinin %7 azaldığı gözlemlenmiştir ve buna bağlı olarak Ca^{++} çalışmamızda enzim aktivitesinde düşmeye neden olmaktadır. Deney grubuna NADH ve Ca^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %6 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %4 daha az olduğu görüldü (Tablo 17) (Grafik 14).

Deney grubuna NADH, Fe^{+++} ve Mg^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %69 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %66 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 20) (Grafik 17). Fe^{+++} sitokromların bir kısmını oluşturur ve enzimler ve elektron taşıyan proteinler için kofaktördür. Mg^{++} ise pek çok enzimin aktivitesi için kofaktör olarak rol oynar, ATP ile kompleks yapar ve hücre zarı ve ribozumu stabilize eder (Prescott ve Ark., 1996).

Deney grubuna NADH, Cu^{++} ve Mn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %80 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %63 daha az olduğu görüldü (Tablo 21) (Grafik 18). Mn^{++} fosfat gruplarının transferini sağlayan enzime yardımcı bir kofaktör olmasına rağmen (Prescott ve Ark., 1996) çalışmamızda inhibitör etkisi yapmaktadır.

Deney grubuna NADH, Ca^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %8 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %5 daha az olduğu görüldü (Tablo 22) (Grafik 19).

Deney grubuna Fe^{+++} , Mg^{++} ve Cu^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %23 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %16 daha az olduğu görüldü (Tablo 23) (Grafik 20).

Deney grubuna Fe^{+++} , Mg^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %30 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %21 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 24) (Grafik 21).

Deney grubuna Fe^{+++} , Mg^{++} ve Mn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %11 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %15 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 25) (Grafik 22). Deney grubuna Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %20 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %23 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 26) (Grafik 23). Zn^{++} bazı enzimlerin aktif kısmını oluşturduğu için (Prescott ve Ark., 1996) bu üçlü kombinasyona eklendiği zaman benzoik asidin yıkımında ve bakteri miktarında artışa neden olur. Buna karşılık deney grubuna Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Cu^{++} birlikte eklendiğinde ise deney grubunun %31 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %29 daha az olduğu görüldü (Tablo 27) (Grafik 24). Burada bu üçlü kombinasyona eklenen Cu^{++} 'in inhibitör etkisi oldukça kuvvetlidir. Deney grubuna NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Cu^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %26 daha az benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %24 daha az olduğu görüldü (Tablo 28) (Grafik 25). Bundan önce yapılan deneyle karşılaştırılınca NADH eklendiğinde enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak benzoik asidin yıkımında artış olduğu görülmektedir.

Deney grubuna NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %58 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %51 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 29) (Grafik 26). Bu deneyde daha önceki deneylerde kullanılan Mangan sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$)'dan farklı olarak Mangan klorür ($MnCl_2$) kullanıldı. Deney grubuna NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %63.4 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %54.5 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 30) (Grafik 27). Bu deneyde NADH'in konsantrasyonu iki katına çıkarıldığı için bir önceki deneye göre daha fazla benzoik asidin yıkıldığı görülmektedir. Deney grubuna NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %66.6 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %60.4 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 31) (Grafik 28). Bu deneyde hem NADH'in hem de Fe^{+++} 'in konsantrasyonu iki katına çıkarıldı. Deney grubuna NADH, Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} birlikte eklendiğinde deney grubunun %65 daha fazla

benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %61.5 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 32) (Grafik 29). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı. Yapılan bu 4 deneyin sonuçlarına bakıldığında sonuçların birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Burada eklenen kofaktörlerin konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin artması ve buna bağlı olarak ta benzoik asidin yıkım oranının artması beklenmektedir, fakat substrat miktarı yani benzoik asidin konsantrasyonu sabit olduğu için elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu düşünülmektedir.

Bundan sonraki deneylerde optimum pH değerini belirlemek amacıyla farklı pH'larda çalışıldı. Deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %28 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %30.4 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 33) (Grafik 30). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve pH 6'da çalışıldı. Deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %33.6 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %37.5 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 34) (Grafik 31). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve pH 8'de çalışıldı. Lambert ve Ark. (1997)'nin yaptığı çalışmada pH 6.5'da kültür ortamına benzoik asit eklenildiği zaman büyüme oranının 10 kat azaldığı, pH 8'de ise büyüme oranının biraz azaldığı gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da pH 6'da ve pH 8'de çalışıldığı zaman bakteri miktarının azaldığı görülmektedir. pH 6.5'da ribozomal alt ünite proteinlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun baskılanması nedeniyle bakterilerin büyüme oranının azaldığı düşünülmektedir. Deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %8 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %16 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 35) (Grafik 32). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve pH 5'de çalışıldı. pH 4 ve pH 4.5 gibi düşük pH'larda hücre içi pH optimum büyüme oranının önemli ölçüde altına düşer (Lambert ve Ark., 1997). Deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %6.4 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve

bakteri miktarındaki artışın ise %8.8 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 36) (Grafik 33). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve pH 9'da çalışıldı. Yapılan bu 4 deneyin sonuçlarına bakıldığında deney grubuna kofaktörler eklenmesine rağmen deney ve kontrol grubu arasındaki benzoik asidin yıkım oranı farkının azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni 7'den büyük ve 7'den küçük pH'larda çalışıldığı zaman kültür ortamına kofaktörler eklense bile bu kofaktörler tarafından aktivite edilen enzimlerin bu pH'larda optimum aktivite gösterememesidir.

Deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %47.8 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %51 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 37) (Grafik 34). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve 30 °C'de inkübasyon yapıldı. Daha önce yapılan bir deneyde ise deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Zn⁺⁺ birlikte eklendiğinde deney grubunun %65 daha fazla benzoik asidi yıktığı ve bakteri miktarındaki artışın ise %61.5 daha fazla olduğu görüldü (Tablo 32) (Grafik 29). Bu deneyde NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺'un konsantrasyonu iki katına çıkarıldı ve 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Bu iki deneyin sonuçları karşılaştırıldığında benzoik asidin yıkımı için optimum sıcaklığın 37 °C olduğu düşünülmektedir.

Yapılan tüm deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde, deney grubuna NADH, Fe⁺⁺⁺ ve Mg⁺⁺ birlikte eklendiğinde, pH 7'de ve 37 °C'de inkübasyon yapıldığında deney grubunda benzoik asidin yıkımının maksimum değerinde (%69) arttığı görülmektedir. Bu deneyde sağlanan koşullar *Pseudomonas aeruginosa* tarafından benzoik asidin biyolojik yıkımının gerçekleştirildiği optimum koşullardır denilebilir. Buna karşılık deney grubuna NADH, Cu⁺⁺ ve Mn⁺⁺ birlikte eklendiğinde, pH 7'de ve 37 °C'de inkübasyon yapıldığında deney grubunda benzoik asidin yıkımının maksimum değerinde (%80) azaldığı görülmektedir.

Bu çalışma literatürdeki diğer çalışmalardan kuşkusuz farklı niteliktedir, çünkü benzoik asidin *Pseudomonas aeruginosa* tarafından biyolojik yıkımını optimize eden bu denli kapsamlı bir çalışma henüz mevcut değildir. Bu

Çalışmadan elde edilen verilerin kullanılması benzoik asit ile kirlenmiş olan çevrelerin biyo-iyileştirilmesinde önemli rol oynayabilir.

5. KAYNAKLAR

Abramowicz D. A. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs. *Critical Rev. Biotechnol.*, 10: 241- 251

Alexander M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211: 132-138

Bagneris C., Cammack R., Mason J. R. (2005). Subtle difference between benzene and toluene dioksigenases of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1570-1580

Bedding N. D., Mcinntyre A. E., Perry R., Lster J. N. (1983). Organic contaminants in the aquatic environment II. Behavior and fate hidrological cycle. *The Science of The Total Environment*, 26: 255-312

Bourdeau P., Haines J. A., Klein W., Krishna Murti C.R. (1989). Ecotoxicology and Climate with Special Referance to Hot and Cold Climates, 79-89

Brune A., Emersion D., Breznak A. (1995). The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2681-2687

Carlberg G. E., Drangsholt H., Gjoes N. (1986). Identification of cholorinated compounds in the spent cholorination liquor from differently treated sulphite pulps with special emphasis on mutagenic compounds. *Siencie of the Total Environmental*, 48: 157-167

Chipley JR (1983). Antimicrobials in foods, 11-35

Cirino P. C., Arnold F. H. (2002). Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 130-135

Diaz E., Ferrandez A., Prieto M. A., Garcia J. L. (2001). Biodegradation of Aromatic Coumpouns by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 523-569

Feist C. F., Hegeman G. D. (1969). Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathway. *Journal of Bacteriology*, 100: 869-877

Fetzner S., Lingens F.(1994). Bacterial dehalogenases : biochemistry, genetics, and biotechnological aplications. *Microbiological Reviews*, 58: 641-685

Field J. A. (2001). Review of scientific literature on microbial dechlorination and chlorination of key chlorinated compounds. 3-28

Goulding C., Gillen G. J., Bolton E. (1988). Biodegradation of substituted benzenes. *Journal of App. Bacteriol*, 65: 1-5

Gözükara E. M. (2001). *Biyokimya* . Dördüncü Baskı, 715-720

Guerrra-Santos L., Kapeli O., Fiechter A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continious culture whit glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbial.*, 48:301-305

Hardman D J., Slater J H. (1981). Dehalogenases in soil bacteria . *J. Gen. Microbial.*,123: 117-128

Harwood C. S., Gibson J. (1997). Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes. *J. Bacteriol.*, 179:301-309

Hazan R., Levine A., Abeliovich H. (2004). Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4449-4457

Hofrichter M., Fritsche W., Rehm J., Reed G., Pühler A., Stadler P., Klein J. (2000). *Environmental Process II. Soil Decontamination*, 11(6): 147-167

Hollaway B. W. (1969). Genetic of *Pseudomonas*. *Bacteriological Reviews*, 33: 419-443

Hollaway B. W., Krishnapillai V., Morgan A. F. (1979). Chromosomal Genetic of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, 43: 73-102

Janssen D. B., Oppentocht J. E., Poelarends G. J. (2001). Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 254-258

Johnsen A. R., Wick L. Y., Harms H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71-84

Kahraman H., Geckil H. (2005). Benzoik asidin *Vitreoscilla* hemoglobin geni aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa* tarafından yıkımı. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(2):342-348.

Kahyaoğlu M., Konar V. (2006). Şeker fabrikası atık maddeleri kullanılarak *pseudomonas aeruginosa*'dan ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesi. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimi Dergisi*, 18(4): 493-498

Kameya T., Murayama T., Uranu K., Kitano M. (1995). Biodegradation ranks of priority organic compounds under anaerobic conditions. *Sci. Total Environ.*, 170:43-51

Kawamura K., Ng L. L., Kaplan I. R. (1985). Determination of acids (C1-C10) in the atmosphere, motor, exhausts, and engine oils. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic and carcinogenic agents in humans. *Environmental Science and Technology*, 19: 1082-1086

Kemp M. B., Hegeman G. D. (1968). Genetic control of β -Ketoadipate pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 96: 1488-1499

Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.*, 39(4) 295- 304

Krebs H. A., Wiggins D., Stubbs M. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* ,214: 657-663

Kukor J. J., Olsen R. H., Ballou D. P. (1988). Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of Bacteriology*, 170: 4458-4465

Lambert L.A., Abshire K., Blankenhorn D., Slonczewski J. L. (1997). Protein induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *Journal of Bacteriology*, 179: 7595-7599

Leahy J. G., Colwell R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in environment. *Microbial Reviews*, 54: 305-315

Mars A. E., Kasberg T., Kaschabek S. R., Agterén M. H., Janssen D. B., Reineke W. (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.*, 179: 4530- 4537

Meer J.R., Vos W. M., Harayama S., Zehnder A. J. B. (1992). Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological reviews*, 56: 677-694

Miguez C. B., Greer C. W., Ingram J. M., Macleod R. A. (1995). Uptake benzoic acid and chloro-substituted benzoic acids by *Alcaligenes denitrificans* BRI 3010 and BRI 6011. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4152-4159

Morales G., Linares J. F., Beloso A., Ablar J.P., Martines J. L., Rojo F. (2004). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the Expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *Journal of Bacteriology*, 186: 1337-1344

Murray P.R., Kobayashi G.S., Pfaller M.A., Rosenthal K.S. (1994). *Medical Microbiology*. Second Edition, 253-260

Ngugi D. K., Tsanua M. K., Boga H. I. (2007). Benzoic acid-degrading bacteria from the intestinal tract of *Macrotermes michaelseni* sjöstedt. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 87-92

Nilsson A. (2001). Persistent pollutants: Guide to basic concepts: 2-18

Ornston L. N. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *The Journal of Biological Chemistry*, 241: 3800-3810

Ornston L. N. (1971). Regulation of catabolic pathway in *Pseudomonas*. *Bacteriological Reviews*, 35: 87-116

Pieper D. H., Reineke W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion Biotechnology*, 11: 262-270

Piper P. W. (1999). Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 1219-1227

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (1996). *Microbiology*. Third Edition, 98-113

Pries F., Van der Ploeg J. R., Dofling J., Janssen D. B. (1994). Degradation of halogenated aliphatic compounds: The role of adaptation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15: 279-295

Ramana K. V., Karanth N. G. (1989). Production of biosurfactants by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotech. Lett.*, 11(6): 437-442

Reiner A. M. (1971). Metabolism of benzoic acid by bacteria: 3, 5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid is an intermediate in the formation of catechol. *Journal of Bacteriology*, 108: 89-94

Restaino L., Lenovich L. M., Bills S. (1982). Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeast. *J. Food Prot.*, 45: 1138-1141

Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. (1999). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, 1864-1870

Salager J. L. (2002). Surfactants types and uses, 2: 2-34

Sardesai Y. N., Bhosle S. (2002). Tolerance of bacteria to organic solvents. *Res. Microbiol* 153: 263-268

Sardessai Y. N., Bhosle S. (2003). Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, 22 (33): 655- 660

Sarıkaya R., Solak K. (2003). Benzoik asit'in *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksitesinin araştırılması. GÜ , Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi , 23(3):19-32

Šepič E., Bricelj¹ M., Leskovšek H. (1997). Biodegradation studies of polyaromatic hydrocarbons in aqueous media. Journal of Applied Microbiology, 83: 561-568

Sharak G., Townsend G. T., Blattman B. O. (1997). Reduction of 3-chlorobenzoate, 3-bromobenzoate, and benzoate to corresponding alcohols by *Desulfomicrobium escambiense*, isolated from a 3-chlorobenzoate-dechlorinating coculture. Applied and Environmental Microbiology, 63:4698-4703

Sıdal U., Kolankaya N., Kurtonur C. (2000). *Pseudomonas* sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosümfektan eldesi. Turk J. Biol., 24: 611-625

Sikkema J., De Bont J. (1995). Poolman B mechanisms of solvent toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev., 59: 201-222

Sugimoto K., Nomura K., Nishiura H., Ohdan K., Nishimura T., Hayashi H., Kuriki T. (2007). Novel transglucosylating reaction of sucrose phosphorylase to carboxylic compounds such as benzoic acid. Journal of Bioscience and Bioengineering, 104: 22-29

Thorsness P. E., Weber E. R. (1996). Escape and migration of nucleic acids between chloroplast, mitochondria, and the nucleus. Int. Rev. Cytol., 165: 207-234

Tonge G. M., Harrison D. E. F., Higgins I. J. (1977). Purification and properties of the methane mono-oxygenase enzyme system from *Methylophilus trichosporium* OB3b. *Biochem. J.*, 161: 333- 344

Yentür G., Bayhan A. (1990). Bazı gıda maddelerinde sorbik ve benzoik asit miktarlarının araştırılması. *Gıda*, 15(2): 79

Yurttagül M. (1993). Hızlı hazır yemek fast food sisteminde kullanılan katkı maddeleri. *Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını*: 6

Wang C.L, You S.L, Wang S.L (2006). Purification and characterization of a novel catechol 1,2- dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a source. *Process Biochemistry*, 41: 1594 -1601

Warth A. D. (1991). Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*:Effects on glycolytic metabolite levels,energy production,and intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3410-3414

6. ÖZGEÇMİŞ

Sivas, 1979 doğumlu Yasemin MÜŞTERİ, ilk ve orta öğrenimini sırasıyla Sivas Süleyman Sami Kepenek İlk Öğretim Okulu (1985-1990), Sivas Behrampaşa Orta Okulu (1990-1993) ve Sivas Kongre Lisesi'nde (1993-1997) tamamladı. 1998 yılında kazandığı Samsun Ondokuzmayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2003 senesinde bitirdi. 2005-2006 öğretim yılı bahar döneminde Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.