

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LİGNİNOLİTİK BAKTERİLERİN ENDÜSTRİYEL DÜZEYDE ÇEVRESEL ATIK SU
KİRLİLİĞİNE KARŞI ETKİN KULLANIMININ GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Murat KAÇAĞAN

**KASIM 2024
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LİGNİNOLİTİK BAKTERİLERİN ENDÜSTRİYEL DÜZEYDE ÇEVRESEL ATIK SU
KİRLİLİĞİNE KARŞI ETKİN KULLANIMININ GELİŞTİRİLMESİ**

Murat KAÇAĞAN

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02 / 10 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 01 / 11 / 2024

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
ORCID : - - -

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Ligninolitik Bakterilerin Endüstriyel Düzeyde Çevresel Atık Su Kirliliğine Karşı Etkin Kullanımının Geliştirilmesi” isimli tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programı’nda hazırlanmıştır. Bu araştırma KTÜ BAP birimi tarafından FBA-2018-7260 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışma süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, samimiyetini her zaman hissettiren ve beni doğru yolda yönlendiren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, tez izleme komitemde yer alarak çalışmamı onurlandıran, çalışmanın hayata geçirilmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, doktora tez izleme komitesi üyesi olarak çalışmamı onurlandıran, yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’a, tez savunma jürisi olmayı kabul edip bizleri onurlandıran değerli hocalarım Prof. Dr. Kamil IŞIK ve Prof. Dr. Hatice KATI’ya, çalışmaya verdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ’a, lisansüstü eğitim hayatım boyunca her türlü desteği benden esirgemeyen, değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e, Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Dr. Öğr. Üyesi Fulya AY ŞAL’a, Öğr. Gör. Dr. Ayşegül ÖZER’e, Arş. Gör. Esma CEYLAN’a ve Araş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU ŞENOCAK’a, laboratuvar çalışmalarında yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma ve Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Acil Laboratuvardaki mesai arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan KTÜ BAP birimine (FBA-2018-7260) çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi, bu çalışmayı hazırlarken de her aşamada bana yardımcı olan sevgili eşim Özlem KAÇAĞAN’a, çocuklarım Oğuzhan Deniz KAÇAĞAN ve Ahmet Alptuğ KAÇAĞAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Murat KAÇAĞAN
TRABZON 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Ligninolitik Bakterilerin Endüstriyel Düzeyde Çevresel Atık Su Kirliliğine Karşı Etkin Kullanımının Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01/11/2024

Murat KAÇAĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Atık Su Arıtımında Kullanılan Metotlar	3
1.2.1. Zeytin Atık Sularında Arıtma.....	3
1.2.2. Tekstil Atık Sularında Arıtma	6
1.2.3. Kâğıt Atık Sularında Arıtma	9
1.3. Atık Su Arıtımında Kullanım Potansiyeli Olan Lignin Degrede Edici Enzimler... 11	
1.3.1. Lignin Peroksidazlar (E.C.1.11.1.14).....	13
1.3.2. Lakkaz (Lac, EC 1.10.3.2)	15
1.3.3. Mangan Peroksidazlar (MnP, EC 1.11.1.13).....	18
1.3.4. Versatil Peroksidaz (VP, EC 1.11.1.16).....	19
1.3.5. Boya Giderici Peroksidazlar (dye-decolourizing peroxidase (DyP, EC 1.11.1.19).....	20
1.4. Ligninolitik Bakterilerin Atık Su Arıtımındaki Rolü	21
1.5. Atık Su Arıtımında Toksisite Çalışmaları	24
1.6. Çalışma Hipotezi.....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1. Kullanılan Kimyasallar	27
2.2. Atık Su Örneklerinin Toplanması.....	27
2.3. Atık Sulardaki Fizikokimyasal Analizler	28
2.3.1. pH Ölçümü	28

2.3.2. Sülfatlar	28
2.3.3. Toplam Çözünmüş Katılar (TDS)	29
2.3.4. Toplam Askıda Katı Madde (TSS).....	29
2.3.5. Nitrat Konsantrasyonu.....	29
2.3.6. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)	29
2.3.7. Renk Ölçümü.....	30
2.3.8. Lignin Ölçümü	29
2.4. Atık Sulardan Bakteri İzolasyonu.....	30
2.4.1. Ligninolitik Aktiviteye Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi.....	31
2.5. Bakterilerin Sınıflandırılması	33
2.6. Çalışmada Kullanılan Rekombinant Bakteriler	34
2.7. Bakteriyel İzolatların Üreme Optimizasyonu	36
2.7.1. Bakteriyolojik LB Besiyerinde Üreme Optimizasyonu	36
2.7.2. Kraft Lignin İçeren Besiyerinde Üremesinin Araştırılması	36
2.8. Ligninolitik Bakteriyel İzolatların Ligninolitik Enzim Aktivitelerin Test Edilmesi.....	37
2.8.1. Lignin Peroksidaz Aktivitesi.....	37
2.8.2. Lakkaz Aktivitesi	37
2.8.3. Mangan Peroksidaz Aktivitesi.....	38
2.9. Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Kısmi Karakterizasyonu	38
2.9.1. Lignin Peroksidaz Kısmi Karakterizasyonu.....	38
2.9.2. Lakkaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu.....	39
2.10. Bakteriyel İzolatlara ait Ligninolitik Enzimlerinin SDS-PAGE ve Zimogram analizleri.....	39
2.11. Atık Su Çalışmalarında Bakterilerin Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu	41
2.11.1. Zeytin Atık Suyunda Optimizasyon	41
2.11.2. Tekstil Atık Suyunda Optimizasyon	42
2.11.3. Kâğıt Atık Suyunda Optimizasyon.....	43
2.12. Atık Suların Rekombinant Bakteriler ve Bakteriyel İzolatlarla Muamelesi Sonrası Yapılan Analizler.....	44
2.12.1. Lignin Degredasyonunun Belirlenmesi.....	44
2.12.2. Renk Açılması Ölçümü	45
2.12.3. pH Değişimleri	45

2.12.4. Ağır Metal Ölçümü	46
2.12.5. GC-MS Analizleri	46
2.12.6. Fitotoksisite Çalışmaları.....	47
3. BULGULAR.....	49
3.1. Atık Su örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	49
3.2. Atık Sulardan Bakteri İzolasyonu.....	49
3.2.1. Lakkaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi	50
3.2.2. Lignin Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi.....	51
3.2.3. Mangan Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi	51
3.3. Bakterilerin Sınıflandırılması	52
3.4. İzole Edilen Ligninolitik Bakteriyel İzolatların Üreme Optimizasyonu	57
3.4.1. Bakteriyolojik LB Besiyerinde Üreme Optimizasyonu	57
3.4.2. Kraft Ligninli Besiyerinde Üreme Optimizasyonu	57
3.5. Bakteriyel İzolatların Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Kısmı Karakterizasyonu	59
3.5.1. Lignin Peroksidazın Kısmı Karakterizasyonu.....	60
3.5.2. Lakkazın Kısmı Karakterizasyonu	60
3.6. Bakteriyel İzolatlara Ait Ligninolitik Enzimlerinin SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri.....	61
3.7. Atık Sularda Bakterilerin Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu.....	62
3.7.1. Zeytin Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerinde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu.....	62
3.7.2. Tekstil Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu.....	63
3.7.3. Kağıt Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu	64
3.8. Bakteriyel İzolatların Atık Sular ile Muamelesi Sonrası Yapılan Analizler	65
3.8.1. Lignin Degradasyonu	66
3.8.2. Renk Açılması	68
3.8.3. pH Değişimi	71
3.8.4. Bakteri Üremeleri Sonucunda Atık Su İçeren Kültürlerdeki Ağır Metal Analizleri (ICP-MS).....	74
3.8.5. GC-MS Analizleri	77
3.8.6. Fitotoksisite Çalışmaları.....	96
4. TARTIŞMA	102

5. SONUÇLAR.....	110
6. ÖNERİLER.....	113
7. KAYNAKLAR	114
8. EKLER.....	126
ÖZGEÇMİŞ	



Doktora Tezi

ÖZET

LİGNİNOLİTİK BAKTERİLERİN ENDÜSTRİYEL DÜZEYDE ÇEVRESEL ATIK SU KİRLİLİĞİNE KARŞI ETKİN KULLANIMININ GELİŞTİRİLMESİ

Murat KAÇAĞAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2024, 126 Sayfa, 7 Ek Sayfa

Bu çalışmada daha önce gerçekleştirilen Tübitak 1001 (Tübitak 113Z741) projesi ve Doktora tezi (Ayşegül ÖZER, 2018) kapsamında dizayn edilen ligninolitik genleri içeren rekombinant *B. subtilis* WB800 suşlarının ve çalışma kapsamında kullanılan zeytin atık suyundan izole edilen SA1, SA2, SA3 bakteriyal izolatlarının kağıt fabrikası atık suyu, zeytin üretim tesisi atık suyu ve tekstil fabrikası atık sularının biyoremediasyonundaki kullanım potansiyelleri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, atık sulardan ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin izolasyonu ve sınıflandırılması, bakterilerle muamele edilen ve edilmeyen atık su örneklerinin bazı fizikokimyasal analizlerinin yapılması, örneklerin GS-MS, ICP-MS analizlerinin gerçekleştirilmesi ve bakterilerle muamele edilmiş ve edilmemiş atık su örneklerinin tohum çimlenmesine etkisinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda rekombinant bakteriler ile atık su örneklerinin muamelesi sonucunda istenilen seviyede ve tutarlı sonuçlara ulaşılamazken atık sulardan izole edilen ve SA1, SA3 ve SA6 olarak adlandırılan yaban tip bakteri suşlarında ise her üç su üzerinde belli bir seviyede biyoremediasyona katkı sağladığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ligninolitik enzimler, biyoremediasyon, atık su

PhD. Thesis

SUMMARY

IMPROVEMENT OF THE EFFECTIVE USAGE OF LIGNINOLYTIC BACTERIA AGAINST ENVIRONMENTAL WASTEWATER POLLUTION AT INDUSTRIAL SCALA

Murat KAÇAĞAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2024, 126 Pages, 7 Appendix Pages

In this study, the potential of recombinant *B. subtilis* WB800 strains containing ligninolytic genes designed within the scope of the previously carried out TUBITAK 1001 (TUBITAK 113Z741) project and PhD thesis (Özer., 2018) and SA1, SA2, SA3 bacterial isolates isolated from olive wastewater used in the study in the bioremediation of paper mill wastewater, olive production plant wastewater and textile factory wastewater was investigated. In this context, isolation and classification of bacteria with ligninolytic activity from wastewater, some physicochemical analyzes of wastewater samples treated and not treated with bacteria, GS-MS, ICP-MS analyzes of the samples and investigation of the effect of wastewater samples treated and not treated with bacteria on seed germination were carried out. As a result of the studies carried out, while the desired level of consistent results could not be achieved as a result of the treatment of wastewater samples with recombinant bacteria, it was observed that the wild type bacterial strains isolated from wastewater and named SA1, SA3 and SA6 contributed to bioremediation at a certain level on all three waters.

Keywords: Ligninolytic enzymes, bioremediation, wastewater

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Lignin peroksidazın katalitik döngüsü.....	13
Şekil 2.	Lakkaz enziminin katalitik döngüsü.....	17
Şekil 3.	Mangan peroksidazın katalitik döngüsü	19
Şekil 4.	Çalışmada kullanılacak olan rekombinant ligninolitik enzimlere ait SDS-PAGE görüntüsü. <i>Bacillus subtilis</i> WB800 hücresindeki çözünür proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü.....	35
Şekil 5.	Quaiacol içeren LB agar petrisinde lakkaz enzim aktivitesinin test sonuçları ..	50
Şekil 6.	İzolatların metilen mavisi içeren LB agar petrilerinde lignin peroksidaz aktivitesinin gösterimi	51
Şekil 7.	İzolatların fenol kırmızısı içeren GPM agar petrilerinde lignin peroksidaz aktivitesinin gösterimi.	52
Şekil 8.	İzolatlardan izole edilen genomik DNA'lar (A) ve genomik DNA'ların kalıp olarak kullanımı ile gerçekleştirilen 16S rRNA genlerine ait PCR reaksiyonlarının agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 9.	<i>Priestia</i> sp. SA1 ve <i>Priestia</i> sp. SA3 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizilerine dayalı neighbour-joining filogenetik dendogramı	55
Şekil 10.	<i>Bacillus</i> sp. SA6 izolatının 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizilerine dayalı neighbour-joining filogenetik dendogramı.	56
Şekil 11.	İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesine ait optimum pH grafiği	58
Şekil 12.	İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesine ait optimum sıcaklık grafiği.....	58
Şekil 13.	İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesinde farklı pH'lardaki Lignin degradasyonu-Renk açılması grafiği	59
Şekil 14.	<i>Priestia</i> sp. SA1 ve <i>Bacillus</i> sp. SA6 bakteriyel izolatların Lignin peroksidaz enzimi optimum pH ve sıcaklık grafiği.....	60
Şekil 15.	<i>Priestia</i> sp. SA3 bakteriyel izolatının Lakkaz enzimi optimum pH ve sıcaklık grafiği	61
Şekil 16.	Bakteriyel izolatlara ait Ligninolitik Enzimlerin SDS-PAGE(A) ve Zimogram analizleri(B-C)	62
Şekil 17.	Zeytin atık suyunun minimal besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği	63

Şekil 18.	Tekstil atık suyunun minimal besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği	64
Şekil 19.	Kağıt atık suyunun eser element besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği.....	65
Şekil 20.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı	66
Şekil 21.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı.....	67
Şekil 22.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı.....	68
Şekil 23.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği.....	69
Şekil 24.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği	70
Şekil 25.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği	71
Şekil 26.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği.....	72
Şekil 27.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği.....	73
Şekil 28.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği	74
Şekil 29.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromatogramları	79
Şekil 30.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve <i>Priestia sp.</i> SA1, <i>Priestia sp.</i> SA3, <i>Bacillus sp.</i> SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromatogramları	81
Şekil 31.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmiş kültürlerinin TMS (trimethylsilyl) ile silyasyonu sonucunda yapılan GC-MS analizi kromatogramı	84
Şekil 32.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromatogramları	87
Şekil 33.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve <i>Priestia sp.</i> SA1, <i>Priestia sp.</i> SA3, <i>Bacillus sp.</i> SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromatogramları	89

Şekil 34.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmiş kültürlerinin TMS (trimethylsilyl) ile siliasyonu sonucunda yapılan GC-MS analizi kromotogramı	92
Şekil 35.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları	94
Şekil 36.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve <i>Priestia sp.</i> SA1, <i>Priestia sp.</i> SA3, <i>Bacillus sp.</i> SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları	96
Şekil 37.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen bakteriyel izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zammalarda ve tohum sayısı ile yapılan börülce tohumlarında oluşan çimlenme resimleri (1).....	98
Şekil 38.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen bakteriyel izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zammalarda ve tohum sayısı ile yapılan börülce tohumlarında oluşan çimlenme resimleri(2)..	99
Şekil 39.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyere inoküle edilen bakteriyel izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu börülce tohumlarında oluşan çimlenme (1. SA1, 2. SA3, 3. Kontrol (Bakteri muamelesi yapılmayan atık su), 4. SA6)	100
Şekil 40.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyere inoküle edilen bakteriyel izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zammalarda ve tohum adetiyle yapılan Börülce tohumlarında oluşan çimlenme resmi (1. Kontrol (Bakteri muamelesi yapılmayan atık su), 2. SA1, 3. SA3, 4. SA6).....	101

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Tablo 1. Literatüre kazandırılmış lignin degrade eden bakteriler.....	22
Tablo 2.	Atık su örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	49
Tablo 3.	İzolatların ligninolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları	52
Tablo 4.	İzolatların 16 S rRNA sekans sonucuna göre yakın türler ile nükleotid benzerlikleri	57
Tablo 5.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.....	75
Tablo 6.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.....	76
Tablo 7.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.....	77
Tablo 8.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.....	80
Tablo 9.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.	82
Tablo 10.	Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inoküle edilmeyen kontrol numunesi ile <i>Priestia sp.</i> SA3 ve <i>Bacillus sp.</i> SA6 bakteriyel izolatlarıyla inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarının trimetilsili ile türevlendirilmesi sonucunda GC-MS analizi piklerindeki değişimler	85
Tablo 11.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.....	88
Tablo 12.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler	90
Tablo 13.	Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inoküle edilmeyen kontrol numunesi ile <i>Priestia sp.</i> SA3 ve <i>Bacillus sp.</i> SA6 bakteriyel izolatlarıyla inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarının trimetilsili ile türevlendirilmesi sonucunda GC-MS analizi piklerindeki değişimler	93
Tablo 14.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler	95

Tablo 15.	Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.....	96
Tablo 16.	Kağıt, tekstil ve zeytin atık suyu içeren minimal besiyerlerde üç bakteriyel izolatın inkübasyonu ile elde edilen kültür süpernatantları ile yapılan Börülce fasülyesi fitotoksitite çalışması sonuçları.	97



KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
ddATP	: Dideoksiadenin trifosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
ddTTP	: Dideoksitimidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH ₂ O	: Distile su
dk.	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
LB	: Luria Bertani Broth
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
mRNA	: Elçi RNA
NaCl	: Sodyum klorür
OD	: Optikal Yoğunluk
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
sn.	: Saniye
U	: Ünite
°C	: Derece
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre

liP	: Lignin Peroksidaz enzimi
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
MnP	: Mangan Peroksidaz enzimi
Lac	: Lakkaz enzimi
DyP	: Dye-decolourizing peroksidaz enzimi
VP	: Versatil peroksidaz enzimi
TDS	: Toplam çözünmüş madde
TSS	: Toplam Askıda Katı Madde
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
BOİ	: Biyolojik Oksijen İhtiyacı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünyamızın yüzeyinin yaklaşık %71'i sularla kaplı olmasına rağmen, bunun yalnızca %2,5'i tatlı sudan oluşmaktadır. Tatlı su kaynaklarının büyük bir kısmı buzullar ve yeraltı sularında depolanmıştır. İnsanların doğrudan erişebildiği tatlı su miktarı ise toplamın yalnızca %1'inden daha azdır. Ancak, bu değerli kaynak sınırlıdır ve insan faaliyetleri sonucunda giderek azalmakta ve kirlenmektedir. Bugün tatlı su kaynaklarının korunması, sürdürülebilir bir geleceğin en önemli şartlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanlık, doğal kaynakların sınırlı olduğu gerçeğini kabul etmeli ve bu kaynakların korunması için adımlar atmalıdır.

Bununla birlikte, iklim değişikliği ve artan nüfus gibi faktörler, su kıtlığı sorununu giderek derinleştirmektedir. Su kıtlığına karşı alınabilecek önlemler arasında suyun geri dönüşümü, su tasarrufu, yenilikçi arıtma teknolojileri ve biyoremediasyon gibi yöntemler ön plandadır. Toplumun bilinçlendirilmesi ve çevre koruma yasalarının etkin uygulanması, su kaynaklarının korunması için vazgeçilmezdir.

Günümüzde su kaynakları, kirlilik ve aşırı kullanım nedeniyle büyük tehdit altındadır. Endüstriyel atıklar, tarımsal kimyasallar, evsel atıklar ve plastikler su kaynaklarını kirletmektedir. Bu durum, sadece doğal ekosistemlerin değil, aynı zamanda insan sağlığının da zarar görmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda içerdiği kimyasallar ve toksik maddeler ile su ekosistemlerini tahrip ederek biyolojik çeşitliliği azaltır. Yeraltı sularına sızan kirleticiler, içme suyu kaynaklarının kalitesini düşürür ve tüm canlı yaşamını tehdit eder.

Atık suların arıtılmadan doğrudan doğal çevreye bırakılması, çevre kirliliğinin en ciddi sebeplerinden biridir. Bu durum hem su kaynaklarını hem de çevredeki ekosistemleri olumsuz etkiler. Gelişmekte olan ülkelerde endüstriyel olarak kirlenmiş sularla tarımsal sulama yapılmaktadır. Bu uygulama toksik maddelerin besin zincirinde birikmesine yol açmaktadır. Bu nedenle fabrika atıklarının çevreye boşaltılmadan önce endüstriyel kirleticilerin sulardan giderilmesi önemlidir. Bununla birlikte çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler (elektrokoagülasyon, ozonlama ve ultrafiltrasyon) kullanılmakta ve atık suların kirliliğinin uzaklaştırılması için bir seri kombinasyonlar kullanılmaktadır. Fakat bu

uygulamalar çok yoğun enerjiye ihtiyaç duymakta ve işlem sonrasında kalıntı bırakabilmektedir. Bu nedenle biyolojik süreç daha uygundur ve maliyetinden dolayı da tercih edilmektedir. Dolayısıyla etkili enerji kullanımı ve daha az maliyetli çevre dostu teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Suların çeşitli kullanımlar sonucunda atık su haline dönüşerek kaybettikleri fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerinin bir kısmını veya tamamını tekrar geri kazandırmak ve ayrıca atıldıkları ortamın doğal fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerini değiştirmeyecek hale getirebilmek için yapılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma işlemlerinin her birine atık su arıtma işlemi denilmektedir. Su kaynaklarını korumanın bir yolu, atık suların arıtılarak yeniden kullanılmasıdır. Özellikle tarımda arıtılmış suyun kullanımı hem çevre hem de ekonomi açısından önemli bir çözüm sunar. Arıtılmış sular, bitkilerin büyümesi için gerekli besin maddelerini içerir ve temiz su tüketimini azaltır. Bu yöntem, suyun daha verimli kullanılmasını sağlarken, aynı zamanda tarımın sürdürülebilirliğini de artırır. Ancak bu sürecin dikkatle yönetilmesi gereklidir. Yetersiz arıtma, toprakta tuz birikimine, bitki sağlığının bozulmasına ve halk sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Bu nedenle, modern ve etkin arıtma teknolojilerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır.

Kirlenmiş su kaynaklarının temizlenmesinde biyoremediasyon gibi çevre dostu yöntemler önemli bir rol oynar. Artan endüstriyel faaliyetler, şehirleşme ve tarımsal üretim, çevresel kirliliği hızla artırırken su kaynaklarını tehdit eder hale gelmiştir. Bu durum, özellikle atık suların etkili bir şekilde arıtılmasını hayati bir gereklilik haline getirmiştir. Geleneksel arıtma yöntemleri kimi zaman yetersiz kalırken, çevreye zarar verme potansiyeli taşıyan kimyasal süreçlere neden olabilir. İşte bu noktada biyoremediasyon, hem sürdürülebilir hem de çevre dostu bir çözüm olarak karşımıza çıkar. Biyoremediasyonun merkezinde yer alan bakteriler ise bu sürecin en önemli aktörleridir.

Bakteriler, doğanın biyolojik döngüsünde hayati bir rol oynar ve çeşitli kirleticileri parçalayarak veya dönüştürerek doğal dengeyi korurlar. Atık suların biyoremediasyonunda bakteriler, organik ve inorganik kirleticileri ayrıştırarak onları daha az zararlı bileşiklere çevirir. Örneğin, aerobik bakteriler oksijenli ortamlarda organik maddeleri enerji ve üreme için kullanırken, anaerobik bakteriler oksijensiz ortamlarda metan gibi yararlı gazlar üretebilir. Bakterilerin bu adaptif yetenekleri, farklı türdeki kirleticilerle mücadelede büyük avantaj sağlar.

Atık su arıtımında bakterilerle yapılan biyoremediasyonun birçok avantajı bulunmaktadır. Öncelikle, bu süreç doğal ve çevre dostudur. Geleneksel kimyasal yöntemlerin aksine, biyoremediasyon ekosisteme zarar vermez ve sürdürülebilir bir çözüm sunar. Ayrıca, düşük maliyetli olması nedeniyle ekonomik bir alternatiftir. Bunun yanı sıra, bakteriler yerinde uygulanabilirlik (in situ) avantajı sunar ve kirleticilerin bulunduğu alanda doğrudan etki gösterebilir.

Ancak, bakterilerin biyoremediasyondaki etkili kullanımı için belirli zorluklar da mevcuttur. Bakterilerin optimum sıcaklık, pH ve oksijen seviyeleri gibi çevresel koşullara ihtiyaç duyması, bu sürecin verimliliğini etkileyebilir. Ayrıca, toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları bakterilerin metabolik aktivitelerini engelleyebilir. Bu nedenle, biyoremediasyon süreçlerinde uygun bakteri türlerinin seçimi ve çevresel parametrelerin dikkatle yönetilmesi büyük önem taşır.

Sonuç olarak, atık suların biyoremediasyonu, çevre kirliliğiyle mücadelede etkili ve sürdürülebilir bir yöntemdir. Bakteriler, bu sürecin temel taşı olarak, organik ve inorganik kirleticileri doğal yollarla arıtma konusunda eşsiz bir potansiyele sahiptir. Doğanın bu görünmez kahramanları sayesinde, su kaynaklarını koruma ve ekolojikdengeyi sağlama yolunda önemli adımlar atılabilir. Tatlı su kaynaklarının korunması, sadece bugünkü nesiller için değil, gelecek nesillerin yaşamı için de bir zorunluluktur.

1.2. Atık Su Arıtımında Kullanılan Metotlar

Gerçekleştirilen tez çalışmaları kapsamında üç farklı atık suyun bakterier aracılığı ile biyoremediasyonu üzerinde durulacaktır. Çalışmada zeytin atık suyu, tekstil atık suyu ve kâğıt atık suyu üzerinde bakteriler ile biyoremediasyon gerçekleştirilecektir.

1.2.1.Zeytin Atık Sularında Arıtma

Ülkemiz önemli bir zeytin üreticisi olup, bölgeden bölgeye değişmekle beraber ekim ayı sonuna doğru başlayıp şubat ayına kadar devam eden zeytin hasat döneminde zeytin üretimi yapılmaktadır. Bu üretim döneminde hasat edilen zeytinin cinsi ve olgunluğu, hasat edildiği bölgeye ve işleme yöntemlerine bağlı olarak zeytin karasuyu adı verilen atık sular meydana getirmektedir. Oluşan bu atık sular çok koyu olduğu için zeytin karasuyu diye

adlandırılır. Kimyasal içeriği oldukça zengin olan bu atık su, koyu renginin yanı sıra kötü kokusu, düşük pH içeriği, yüksek organik madde konsantrasyonu ve çevre için oldukça zararlı olan fenolik bileşiklerce zengin bir atık sudur. Bu kirli suyun içeriğinde yağ bulunması sebebiyle verildiği sucul ortamlarda suyun yüzeyine yayılarak sudaki canlıların oksijen ve güneş ışığı alımını engellemektedir. Yüksek organik madde içeriği nedeniyle de çözünmüş oksijenin tüketilmesine neden olmaktadır. Zeytin üretim bölgeleri geneline yayılan küçük tesislerde yapılan zeytin ve zeytinyağı üretimi sonucu dönem dönem atık su miktarında ve içeriğinde değişiklikler meydana gelmektedir. Oluşan bu kirli sular günümüzde birkaç değişik yöntem kullanılarak doğal çevre için zararsız hale getirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar aşağıda ifade edildiği gibidir.

- **Fiziksel, Kimyasal ve Elektrokimyasal Arıtım**

Fiziksel arıtım yönteminde, buharlaştırma ve çöktürme metotları kullanılmaktadır. Lagünlerde buharlaştırma genelde en çok kullanılan yöntemdir. Atık sular genelde geniş ve derin olmayan lagün havuzlarında buharlaşmaya bırakılmaktadır. Havuzların kurulduğu iklim koşulları ve derinliği yöntemin verimliliğini etkilemektedir. Yağmur alan bölgelerde ve derin kurulan lagün havuzlarında buharlaşma yavaş olacağından kurutma zamanı uzayacaktır. Enerji maliyetinin yüksek olması dolayısıyla çok fazla tercih edilmeyen bir yöntem ise çöktürme yöntemidir. Bu yöntemde zeytin karasuyuna santrifüj işlemi uygulanmakta ve üç farklı faz oluşmaktadır. En alt tabakada çözünmeyen katı faz birikir, orta tabakada karasu ve en üst tabakada ise yağ kalmaktadır. Üst tabakada kalan yağ geri alınabilmektedir. Fiziksel metotlar zeytin atık suyunun konsantrasyonunu azaltsa da düşük pH, zararlı organik maddeler ve fenolik bileşikler bakımından halen daha yüksek kirleticiliğe sahip olması sadece atık suyun ön arıtması için kullanılabilen bir yöntem olabilmesine imkân sağlamaktadır (Karakaya vd., 2011).

Kimyasal arıtmada genellikle oksidasyon, pıhtılaştırma ve kimyasal çöktürme kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı kimyasallar kullanılarak atık sulardaki kolloid maddelerin sularda çözünmesi engellenerek çöktürme ile ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanır. FeCl_3 , FeSO_4 ve HCl gibi kimyasallar kullanılır (Aktaş vd., 2001). Bu yöntemlerle atık suyun inorganik içeriği yüksek oranda giderilirken, organik içeriğinde ise fazla bir verim elde edilememektedir. Ayrıca bu yöntemin kullanılması sonucunda yüksek miktarda kimyasal içeren çamur meydana gelecektir. Oksidasyon yönteminde ise zeytin

kara suyu için kullanılan oksidasyon işlemiozonlama ve ileri oksidasyon teknikleridir. Bu metotta hidroksil radikalleri açığa çıkartarak KOİ ve fenolik bileşiklerin giderimi sağlanmaktadır (Beltran vd.,1999).

Elektrokimyasal arıtım ise sıvı ortamda elektrotlar sayesinde elektriksel akım geçirilerek yapılan bir arıtma metodudur. Elektrolitlerin çıkardığı oksijen ve hidrojen gazları kolloid yapıya yapışır ve kolloidlerin sıvı yüzeyine çıkmasına neden olur. Yüzeyde toplanan kolloidler mekanik bir sıyrıcı ile toplanır ve ortamdan uzaklaştırılır. Elektrik maliyetinin yüksek olması metod için dezavantajdır. Ayrıca kirleticileri uzaklaştırmada tek başına etkili değildir (İkizoğlu ve Haskök., 2005). Zeytin karasuyunda demir ve alüminyum elektrotları ile yapılan elektrokoagülasyon işlemiyle yapılan arıtma çalışmasında alüminyum elektrot kullanıldığında %49 lignin, %70 fenol, %35 KOİ ve %90 renk giderimi, demir elektrot kullanıldığında ise %55 lignin, %80 fenol, %40 KOİ ve %80 renk giderimi elde edilmiştir (Uğurlu vd., 2006).

• Biyolojik Arıtım

Zeytin atık karasuyunun mikrobiyolojik canlılar kullanılarak farklı metotlarla ayrışılabilirliği test edilmiştir. Atıkların oksijenli ortamda organik içeriğinin parçalanması için aerobik bakteriler ve mantarlar kullanılır (McNamara vd., 2008; Fountoulakis vd., 2002). Karasuyun içerisindeki polifenolik bileşikler ve lipitler biyolojik olarak şekerler ve diğer uçucu yağ asitlerine göre daha geç parçalandığından henüz etkili bir yöntem bulunamamıştır. Zeytin karasuyunun içeriğindeki yoğun kirlilik ve fenolik bileşiklerden dolayı kirli su içerisinde biyolojik yaşam kısıtlanmaktadır. Bundan dolayı yöntemin etkili olması için aerobik arıtmadan önce mikroorganizmaların üremesini engellememesi için ortam suyunun seyreltilmesi gerekebilir. Anaerobik arıtım metotları ise aerobik mikrobiyolojik canlılara göre daha yoğun ve zor koşullarda arıtım yapabilmektedir. Muamele sonucunda 15-20 kat daha az atık çamur oluşturması ve muamele esnasında ortaya çıkan metan gazlarının enerji üretiminde kullanılması aerobik tekniğe göre daha az maliyetlidir (Paraskeva ve Diamadopoulos, 2006).

1.2.2. Tekstil Atık Sularında Arıtma

Artan nüfusun ihtiyaçları ile birlikte tekstil endüstrisinde gün geçtikçe daha fazla atık su ortaya çıkarmaktadır. Tekstil kimyasal işleme sırasında yıkama, ağartma, boyama, baskı ve terbiye gibi ıslak işleme operasyonları su kirliliğinin başlıca nedenleridir. Tekstil atık suyunun yoğun renginin en büyük nedeni boyama ve boyama sonrası yıkama işlemidir. Bu sırada boyanın %50 kadarı atık suya salınabilir. Boyama sırasında boyanın çoğu elyaf üzerine bağlanır, ancak sabitlenmemiş boya atık suya girerek koyu renge neden olur. İşlemden kullanılan çok sayıda boya ve diğer kimyasallar nedeniyle atık su bileşimi açısından son derece değişkendir. Sorun, ticari olarak temin edilebilen binlerce boya maddesi nedeniyle daha da karmaşık hale gelir. Farklı boyaların kullanımı elyafın özelliklerine, uygulanacak belirli renge ve elyaf üzerinde istenen son kata bağlıdır.

Tekstil atık suları yüksek miktarlarda boya içermesinden dolayı oldukça renkli olmasının yanı sıra yüksek oranda KOİ, BOİ ve askıda katı madde içerir. Bu maddeler atık suyun görünümünü bozar ve bırakıldıkları doğal çevrede hayat için gerekli olan oksijen miktarını düşürerek canlı yaşamını olumsuz etkilerler (Dörtkol vd., 2014). Sucul ortamlara kontrolsüzce bırakılan tekstil atık suları ışığın su ortamına nüfuz etmesine engel olur ve fotosentez faaliyetlerini engeller. Bazen de tekstil atık suları içerisindeki boya ve benzeri maddeler sucul organizmalarda birikir ve hem toksik hem de kanserojenik ürünler meydana getirebilir. Çevresel kirleticilerin ortadan kaldırılması ve doğal hayatın olumsuz etkilenmemesi için tekstil atık sularındaki boyar maddeler dâhil zararlı maddelerin ortadan kaldırılması doğal çevre ve canlı yaşamı açısından önem kazanmaktadır (Kocaer vd., 2002). Her bir işlemde kullanılan maddeler aynı zamanda atık suyun kompozisyonunu oluşturmaktadır. Yıkama, boyama ve ağartma işlemleri büyük miktarda su kullanımını gerektirdiğinden yüksek hacimli, renkli ve düşük organik madde içeren atık suların oluşmasına neden olabilmektedir. Suda çok az miktarda boya bulunması bile boyaların yüksek renk değeri nedeniyle oldukça belirgindir.

• Fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal Arıtım

Tekstil atık sularında koagülant madde kullanılarak renk giderimi bilinen bir yöntemdir. Alüminyum, ferrik iyonları ve kalsiyum gibi maddelerin tekstil atık suyuna katılarak kimyasal çöktürme yapılır. Çöktürme işlemi metal hidroksitlere bağlanarak

çöktürölmek suretiyle giderilir. Aynı zamanda yumaklaştırmak içinde polielektrolit uygulaması yaygındır. İşlemin pH'a bağımlılık göstermesi ve son ürün olarak yoğun şekilde çamur oluşumu metodun dezavantajıdır (Baburşah vd., 2004; Kocaer vd., 2002). Sonraki adımlarda oksidasyon nedeniyle rengin tekrar ortaya çıkması da karşılaşılan kritik bir sorundur.

Adsorbsiyon gaz, buhar ve sıvı moleküllerin herhangi bir reaksiyona girmeden temas eden yüzeyde kendiliğinden yoğunlaşmasıdır ve atık sulardaki organik maddelerin konsantrasyonunu düşürmek için etkili bir yöntemdir. Aktif karbon, atık suların renk gideriminde kullanılan önemli bir absorbanttır. Aktif karbon adsorpsiyonu, atık sulardan renk gideriminde en yüksek verim sağlayan işlemlerden biri olmasına rağmen bazı asit ve reaktif boyalar yüksek çözünürlüğe sahip olduklarından dolayı aktif karbonun adsorpsiyon yöntemi ile atık sulardan giderilmeleri zordur (Şahin vd., 2006; Baburşah vd., 2004).

Kimyasal arıtmada, boyalar kimyasal oksidasyon işlemine tabi tutularak parçalanırlar. İşlem daha az kimyasal gerektirmesi ve kolay uygulanması sebebiyle en çok kullanılan metottur. Temel esas kimyasallar arasında elektron transferine dayalıdır. Temel amaç atık su içerisindeki maddenin oksitlenerek kararsız bir ara veya son ürüne dönüşmesidir. Aynı zamanda kimyasal oksitlenme ile boya molekülünün aromatik halkalarının kırılması sağlanır (Dörtkol vd., 2014). Boyar maddenin yapısında bulunan kromofor gruplarındaki konjuge bağlar parçalanarak boyanın rengi kırılmış olur. Sodyum hipoklorit atık sularda renkleri uzaklaştırmada kullanılan önemli bir maddedir. pH 3,5 - 10,0 arasında en iyi renk giderici olarak hipoklorit rapor edilmektedir. Renk giderimi için sodyum hipoklorit kullanmak ucuzdur ancak sonrasında kimyasal veya biyolojik olarak atık sudan hipokloritin uzaklaştırılması gerekmektedir (Vijayaraghvan vd., 2001).

Tekstil endüstrisindeki atık suların bileşiklerle oksitlenmesini sağlamak kullanılan arıtma yöntemleri arasındadır. Klor iyonları kirli sulardaki boya moleküllerinin amino gruplarına etki ederek azo bağlarının kırılmasını sağlar. Renk giderimi kullanılan klor konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Reaktif boyaların arıtımı için ise daha uzun zamana ihtiyaç vardır. Son yıllarda sucul ortamlarda meydana getirdiği olumsuz etkilerinden dolayı boya içeren tekstil veya diğer atık sulardan boyar maddelerin gideriminde klor kullanımı azalmıştır (Kocaer vd., 2002).

Elektrokimyasal iyon değişimi ile tekstil fabrikası atık sularında renk, askıda çözünmüş maddeler, krom, bakır ve çinko gibi ağır metallerin giderilmesinde kullanılan bir

teknolojidir. Çelik elektrotlar yardımıyla direkt olarak sistem demir hidroksit üretmek için kirli su elek şeklinde hazırlanmış elektrotlar arasından geçmektedir ve elektrotlara temas etme prensibiyle çalışmaktadır. Elektrotlar arasına doğru akım bağlanarak sistem çalışır hale getirilir. Akım bir elektrottan diğerine uygulamasuyu aracılığıyla akarken, elektrotların (anotların) pozitif yüklü tarafları demir iyonları yayar. Negatif taraflarda (katotlar) su hidrojen gazı ve hidroksillere ayrışır. Genel reaksiyon, hidrosilikat, demir hidroksit ve demir oksihidroksit oluşumuyla sonuçlanır (Vlyssides vd., 2000).

• Biyolojik Arıtım

Biyolojik arıtma, tekstil boyama işlemlerinden kaynaklanan atık su için en yaygın kullanılan arıtma yöntemlerinden biridir. Bu nihai olarak atık suyun biyolojik olarak parçalanabilir bileşenlerini, örneğin karbonhidratları, mumları ve kolayca parçalanabilen yardımcı bileşikler uzaklaştırır, ancak boyalar, fenolik bileşikler ve yüzey aktif maddeler gibi daha karmaşık ksenobiyotik bileşikler olduğu gibi kalır. Bu yüzden bu karmaşık bileşikler parçalayabilen mikroorganizma arayışı halen daha devam etmektedir. Mikrobiyolojik sistemin rengi gidermedeki etkisizliği, alıcı sularda estetik sorunlara yol açmış ve atık suyu deşarj edilebilir hale getirmek için başka alternatifleri araştırmaya teşvik etmiştir. Boyalar genellikle oksidatif biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir, çünkü ticari boyalarda var olan en önemli özelliklerden biri kimyasal ve ışık kaynaklı oksidasyonun neden olduğu solmaya karşı dirençli olmalarıdır.

Biyolojik canlıların kullanılması ile boya/reng giderimi yapan çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Banat vd., 1996). Tekstil boyalarını parçalanması çalışmaları 1977’lerde *Bacillus subtilis* ile başlamıştır (Horitsu vd., 1977) ve *Bacillus cereus* ile devam etmiştir (Wuhrmann vd., 1980). Renk giderimi yapabilen bu bakterilerin izole edilmesi ve atık sularda uygun koşullar altında kültüre edilmeleri başlangıç aşamasında oldukça zordu. Sentetik boyaların biyolojik proseslerde giderimi ucuzdur, maliyeti oldukça düşük olmakla beraber oluşan son ürünlerde çevre ve canlılar açısından zehirli değildir (Forgacs vd., 2004). Biyolojik işleme tabi tutulan tekstil suları sonucunda çamur oluşumunun az olması ayrıca avantajdır (Holkar vd., 2016). Tekstil endüstrisinde gelişen renk teknolojiyle beraber zor indirgenebilen ve bozunmaya karşı dirençli boyaların kullanılması sonucu mikroorganizmalar renklerin giderilmesinde daha az etkin olmaya başlamıştır. Köpük oluşumunda mikroorganizmaların üremesini engellemektedir. Anaerobik bakterilerin

kullanılması ile yapılan çalışmada renk ve ağır metallerin gideriminde önemli sonuçlar alınmıştır. Atık su içerisinde yoğun boya ve maddelerden oluşan aktif çamur içerisinde anaerobik yaşam devam ederek renk ve zararlı bileşenlerin giderimini sağlamıştır. Aynı zamanda aerobik olarak parçalanmayan ve giderilemeyen renkli boya maddeleri anaerobik olarak giderilmeye çalışılmaktadır (Bahadır vd., 2012).

1.2.3. Kâğıt Atık Sularında Arıtma

Tatlı su kullanımıyla ilgili artan endişeler, artan ekonomik kaygılar ve katı çevre düzenlemeleri, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde su kullanımının ve verimli atık su arıtımının önemini vurgulamaktadır. Üretilen atık suyun uygun şekilde arıtıldıktan sonra geri dönüştürülmesi ve yeniden kullanılması, tatlı su kullanımını azaltmayı amaçlamaktadır. Kâğıt sektörü aşırı su tüketimi ve ürettiği atık sudaki biyolojik olarak parçalanamayan kimyasallar dolayısıyla etkisi çevresel açıdan en güçlü ve tehlikeli olan endüstriyel alanlardan biridir. Yüksek miktarda su tüketiminin sonucu olarak işlem sonrasında ortaya çıkan atık su miktarı ve bu atık suyun kirliliği de diğer endüstrilere göre daha yüksektir. Bu sebeple kâğıt üretimi sonucunda ortaya çıkan atık sular tehlikeli sonuçlara neden olabilir. Bütün bu sorunlar dikkate alınarak kâğıt üretiminde açığa çıkan atık su, çevre dostu olarak deşarj edilmeli ya da tekrar kullanılabilmesi için iyileştirilmelidir. Kâğıt ve kâğıt hamuru fabrikalarından çıkan atık suları arıtmak için seçilen yöntem, uzaklaştırılacak katı veya sıvı atık maddenin özelliklerine ve arıtılmış suyun saflığına ilişkin gerekliliklere bağlıdır.

• Fiziksel ve kimyasal Arıtım

Katıların kâğıt atık sularından fiziksel ayrılması elekler ve çöktürme tankları yardımıyla gerçekleştirilir. Genel prensip atık sulardan askıda katıları, kolloidal parçacıkları, toksik bileşikler, yüzen maddeleri ve renkleri gidermek için fiziksel yöntemlerin kullanılmasıdır. Eleklerin işlevi atık sulardan iri hacimli ve lifli bileşenleri ayırmaktır. Aktif olarak kullanılan diğer bir yöntem ise sedimentasyon teknolojisi olup katı maddeleri sıvı fazdan ayırmanın en basit ve en ekonomik yöntemidir. Atık sularda asılı duran katı maddeler mümkün olduğunca tamamen bir sedimentasyon tankına çöktüğünde ve çöken çamur sedimentasyon tankından çıkarıldığında, sonraki atık su arıtma

işlemlerinde yüksek verimlilik elde edilir. Kâğıt endüstrisinde, özellikle yüksek lif konsantrasyonlu atık sular için, lamel şeklinde geçit setlerine sahip sedimantasyon ekipmanları kullanılır (Bhattacharjee vd., 2007).

Kimyasal arıtmada, atık sulara kimyasal madde ilave edilerek askıda veya kollaidal formda bulunan kirleticilerin çöktürülebilir forma dönüştürülmesi amaçlanır. Bu işlemde atık su içerisinde toplanan maddeler flok adını alır ve bu floklar bir araya gelerek floklaşma oluşur. Flokların uzun süreli karıştırılması sonrasında büyük kütleli yumaklar oluşur ve bu oluşumlar çöktürme ile atık sudan uzaklaştırılır (Özyonar ve Karagözoğlu., 2011; Kuokkanen vd.,2016). Atık su ortamına ilave edilen bir koagülant hızlıca karıştırılarak homojen bir karışım oluşturulur, daha sonra ilave yardımcı koagülantlar eklenir ve topaklaşmanın büyümesi için yavaşça karıştırılarak kirliliğe sebep olan maddelerin birbirine yapışarak büyümesi sağlanır. Çöktürme ile istenmeyen maddeler ortamdan uzaklaştırılır (Akanser vd., 2010; Özyonar ve Karagözoğlu, 2011).

• Biyolojik Arıtım

Çoğu atık su arıtma tesisi, atık sulardaki organik kirleticileri gidermek için aerobik veya anaerobik biyolojik uygulamalar kullanır. Aerobik uygulamalar, işletim kolaylığı ve nispeten düşük sermaye ve işletme maliyetleri nedeniyle çoğu kâğıt hamuru ve kâğıt fabrikasında tercih edilir (Mulligan vd., 2002). Aerobik teknolojiler arasında, aktif çamur (AS) ve havalandırılabilir lagünler kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılır (Pokhrel & Viraraghavan, 2004). Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde anaerobik işlemlerin kullanımı yaygın olmasada, daha düşük çamur üretimi, yenilenebilir enerji üretimi (biyogaz), daha küçük alan gereksinimleri ve kirleticilerin daha fazla parçalanması nedeniyle bir dizi fabrika farklı anaerobik teknolojiler kullanmıştır (Buzzini vd., 2005). Aerobik uygulamaların yüksek çamur üretimi ve anaerobik bakterilerin ise toksik maddelere duyarlılığı gibi belirli dezavantajları vardır. Atık su arıtma tesislerinin sera gazı emisyonu, arıtma sisteminde kullanılan uygun biyolojik uygulamaların seçimi için kullanılabilecek önemli bir faktördür. Aerobik işlemler yalnızca CO₂ üretirken, anaerobik uygulamalar güçlü bir sera gazı olan metan içeren biyogaz üretir.

1.3. Atık Su Arıtımında Kullanım Potansiyeli Olan Lignin Degrede Edici Enzimler

Hem endüstriyel hem de tarımsal sektörlerden lignoselülozik atıkların artan üretimi, kısmen zayıf atık yönetimi nedeniyle küresel olarak çevresel bir sorun oluşturmaya devam etmektedir. Ancak, lignoselülozik atıkların katma değerli ürünler için değerlendirilmesi olasılığı, etkili atık yönetimi stratejileri olarak yeterli olacaktır. Lignoselülozik biyokütle üzerindeki mikrobiyal aktiviteler, enzimler, etanol, organik asitler, mikrobiyal polisakkaritler ve vitaminler dahil olmak üzere endüstriyel açıdan önemli ürünler de üretebilir. Enzimlere olan ilgi, muazzam endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarından kaynaklanmaktadır. Ancak, enzim üretiminin maliyeti artmaya devam etmektedir. Bu nedenle, maliyet açısından etkili bir üretim yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, enzim üretimi için önemli bir maliyet düşürme stratejisi, fermantasyon için alternatif ucuz karbon kaynaklarının araştırılmasını içerir ve lignoselülozik biyokütle, ucuz karbon kaynağı amacına hizmet edebilir. Bolluk, bulunabilirlik ve yenilenebilir doğa, lignoselülozik biyokütleyle ucuz bir karbon kaynağının neredeyse mükemmel adaylığı statüsünü kazandırır (Asgher vd., 2012; Knezevic vd., 2013).

Lignin, doğada en bol bulunan yenilenebilir aromatik polimer kaynağıdır ve ayrışması karbon geri dönüşümü için vazgeçilmezdir. En yaygın doğal aromatik heteropolimerdir ve lignoselülozik biyokütlenin temel yapı taşlarından biridir. Lignin (%15-30), selüloz (%30-50) ve hemiselüloz (%15-30) ile birlikte bitkilerin ikincil hücre duvarının bir parçasını oluşturur ve selüloz/hemiselüloz/pektin matrisinin bütünlüğüne katkıda bulunur (Boerjan vd., 2003). Ligninin reaktivitesini etkileyen içeriğinde yer alan fenol hidroksil, metoksil, karboksil grupları ve alkol hidroksil gibi fonksiyonel grupların olmasıdır (Christopher vd., 2014). Petrol türevi maddelerin yerini alabilecek ürünlerin elde edilebilmesi, biyoyakıt ve kâğıt endüstrisindeki ürünlerinin potansiyeli, çok büyük yüzey alanına ve gözenek hacmine sahip karbon liflerinin ve aktif karbonları içermesi sebebiyle lignosellülozik maddelere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Brebü vd., 2010, Fisher vd., 2014, Asina vd., 2016). Bunun yanında karmaşık, heterojen yapısı ve standart tekrarlayan kovalent bağlardan yoksun olması nedeniyle çoğu organizma tarafından parçalanmaya karşı kimyasal olarak dirençlidir.

Lignin ve klorlanmış fenolik bileşikler kâğıt ve kâğıt işlenmesinden sonra ortaya çıkan en büyük kirliliğe yol açan bileşiklerdir. Lignin, güneşten gelen ışığı azaltarak ve

kalıcı bulanıklık sağlayarak fototropik mikroorganizmaların büyümesini engeller (Karrasch vd., 2006). Klorlanmış fenolik bileşikler ise hem flora hem de fauna için toksik özelliktedir. Klorlanmış organik bileşikler örneğin: dioxin ve furanlar'a maruz kalan organizmalarda genetik mutasyonlara sebep olmaktadır. Bu klorlu bileşikler balıkların biyolojisine bir şekilde girerler ve karsinojenik, endokrinik ve mutajenik etkiler gösterebilmektedir. Bunlarla kontamine balıklar insan sağlığı içinde bir problemdir. Öyle ki dioxin ve furan deri zararlarına, deri kanseri ve derinin yenilenmemesine neden olurlar (Malik vd., 2009; Theodorakis vd., 2006; Easton vd., 1997).

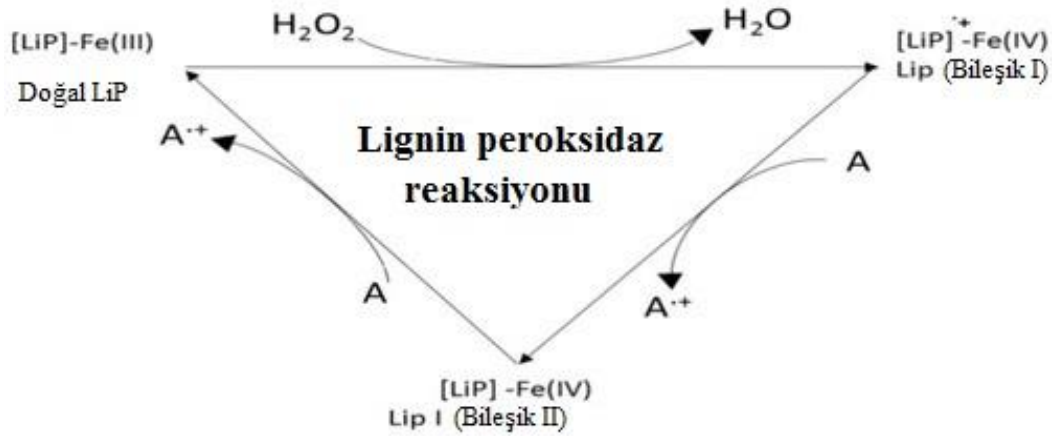
Ligninin biyolojik degradasyonu veya ayrışması mantarlar ve bakteriler tarafından gerçekleştirilebilir (Mandal vd., 2023; Zhu vd., 2017). Ligninolitik bakteriler toprakta, hayvanlarda, kompostta, tortularda, böcek bağırsaklarında ve lağımda bulunabilirler (Yadav vd., 2022; Zhu vd., 2017). Mantarlar ve bakteriler tarafından ligninin parçalanması sonucu açığa çıkan maddeler çevre için ikincil bir kirlilik içermediğinden yeşil ve temiz bir çevre açısından çevre dostu bir uygulama olarak kabul edilir (Niu vd., 2021). Lignin bozunmasında etkin olan biyolojik yöntemler kimyasal süreçlere göre tercih edilir çünkü lignin parçalanması durumunda biyolojik süreçlerde verim kaybı olmaz. Seçici ligninolitik enzimler ve mikroorganizmalar kullanılarak biyolojik yöntemlerde ligninin parçalanmasının yönetilmesi ve sonuçta istenmeyen ürünlerin oluşmaması alternatifsiz bir durumdur (Christopher vd., 2014).

Lignin degrade edebilen enzimlerin ana grupları arasında lignin peroksidazlar, mangan peroksidazlar ve lakkazlar bulunur. Peroksidazlar, H_2O_2 ile aktivasyonu ve bileşik I ve bileşik II ara ürünlerinin substrat indirgenmesini içeren katalitik döngülere sahip hem içeren enzimlerdir. Lignin peroksidazlar, yüksek redoks potansiyeline sahip fenolik olmayan aromatik substratlarda C-C bağlarının ve eter (C-O-C) bağlarının oksidatif olarak parçalanmasını katalize etme konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Mangan peroksidazlar, fenolik bileşiklerin bozunmasını kolaylaştıran veya fenolik olmayan bileşiklerin parçalanması için ikinci bir aracılığı oksitleyen (Mn(II)'yi Mn(III)'e) enzimlerdir. Lakkazlar, moleküler oksijenin suya eş zamanlı indirgenmesiyle fenolik substratların oksidasyonunu katalize eden çoklu bakır içeren enzimlerdir (Wong vd., 2009). Mikroorganizmalardan elde edilen lignin degrade eden enzimler zeytin, kağıt, boya ve tekstil endüstrisinde atık sularda fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması ve renk gideriminde kullanılabilirliğinden dolayı sanayide çevre kirliliğinin önlenmesi için önem

arz ederler (Arora, 2004). Bu enzimlerin kullanımı enerji ve kaynak tüketimindeki tasarrufu, yeni fonksiyonlar oluşturmaları ve çevre üzerindeki zararlı etkileri azalttığından tehlikeli ve pahalı kimyasallar yerine tercih edilmektedir (Xu vd., 2004). Bu açıdan bakteri ve mantarlardaki ligninolitik enzimlerin aktiviteleri önem arz eder.

1.3.1. Lignin Peroksidazlar (E.C.1.11.1.14)

Lignin peroksidazlar (LiP), lignin ve ilgili bileşiklerin depolimerizasyonunda merkezi bir rol oynayan ve veratril alkolü veratraldehite okside eden enzimler olarak bilinirler. İlk olarak beyaz çürükçül mantar olan *Phanerochaete chrysosporium*'dan izole edilmiştir (Kirk & Farrell, 1987).



Şekil 1. Lignin peroksidazın katalitik döngüsü (Datta vd., 2017)

Lignin peroksidazlar (LiP) fenolik olmayan lignin ünitelerinin oksidasyon katalizini başlatabilmesi için birincil olarak hidrojen peroksit ihtiyacı duyarlar (Şekil 1). Çeşitli polimerik substratları içeren çeşitli indirgeyici substratları oksite etme yeteneğine sahiptir (Oyadomari vd., 2003). Yüksek redoks potansiyeli ve geniş substrat aralığından dolayı çeşitli endüstriyel alanlarda uygulanabilirliği yüksektir (Erden vd., 2009). Lignin peroksidazların substrat spesifikliğı azdır ve çok geniş ligninli bileşiklerle bazen de ligninle ilgili olmayan bileşiklerle de etkileşimde bulunabilirler (Barr&Aust, 1994). LiP, ligninin %90'ına yakını oluşturulan fenolik olmayan yapıların oksidasyonu için yüksek redoks potansiyeline sahiptir (Martinez vd., 2005). Ayrıca, çok çeşitli aromatik bileşiklerini oksitleme yeteneğı de vardır. Fenolik olmayan substratların karakteristik oksidasyonunun

yanı sıra, LiP ayrıca çeşitli fenolik bileşikler oksitleme yeteneği de göstermiştir (Bacchiocchi vd., 2001).

LiP oksidatif özellikleri, bir elektron oksidasyonu yoluyla radikal katyon oluşumunu içerir ve bu eylem yan zincir kopmasına, metilasyona, molekül içi eklemeye ve yeniden düzenlemelere yol açar (Kirk vd., 1986; Mikivd.,1986; Wongvd., 2009). Benzilik metilen gruplarının hidroksilasyonu, benzil alkollerin karşılık gelen aldehitlere veya ketonlara oksidasyonu ve fenol oksidasyonu, LiP ile ilişkili diğer mekanik oksidatif süreçlerdir (Furukawa vd., 2014; Paliwal vd., 2012).

Beyaz çürüklük mantarlarının yanı sıra bazı bakterilerin lignin peroksidaz üretme potansiyeline sahip olduğu da bildirilmiştir. Bu bakteri grupları aktinomisetler, α -proteobakteriler, proteobakteriler olarak sınıflandırılmıştır (Bugg vd., 2011; Paliwal vd., 2012). Lignin peroksidaz enzim aktivitesine sahip mantarlar ve bakteriler kullanılarak özellikle koyu renkli zeytin atık suyunun renk azalması ve atık su içeriğindeki fenolik bileşiklerin degradasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır (Zerva vd., 2016). Ancak, bakteriyel lignin peroksidaz daha az çalışılmıştır, bu nedenle geniş spektrumlu ve yüksek enzim aktivitesine sahip yeni lignin peroksidaz üretme yeteneğine sahip bakteri türleri için biyoteknolojik araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Lignin peroksidazlar sadece lignin gibi biyolojik olarak zorlu bileşenleri değil, aynı zamanda petrol türevli kirleticiler ve kimyasal atıklarında degrade ederler. Bu geniş substrat yelpazesi, LiP'nin atık su arıtma tesislerinde çok çeşitli kirleticilerin giderilmesinde kullanılabilmesini sağlar. LiP, özellikle aromatik yapılar içeren kirleticilere olan yüksek afinitesi sayesinde, birçok endüstriyel atığı biyolojik olarak bozunabilir hale getirir (Bugg & Davies., 2012; Hofrichter., 2002). Atık sularındaki toksik organik bileşenleri ve kirleticileri oksidatif reaksiyonlar aracılığıyla daha zararsız bileşiklere biyolojik olarak dönüştürmesi kimyasal işlemlere kıyasla daha çevre dostudur. Bu süreç, çevre dostu bir yaklaşım sunarak, doğrudan çevreye zarar vermeyen ürünlerin elde edilmesini sağlar. LiP özellikle atık suların ve kirli ortamların doğal arıtma süreçlerine katkıda bulunur ve bunun sonucunda biyoremediasyon alanında geniş bir uygulama alanı sunar (Wesenberg vd., 2003).

Son zamanlarda LiP'in uygulamaları, kozmetik ve dermatolojik ürünlerin geliştirilmesine kadar uzanmıştır. Bu ürünlerin en dikkat çekenleri, "elure cilt aydınlatıcı krem" (www.elureskin.com) olarak pazarlanan 'Melanozyme' (lignin peroksidaz bazlı

ürün) ve katalitik cilt tonu aydınlatıcısı olarak etki eden Luminase'dir. Her ikisi de Syneron Medical Ltd, Irvine, California, ABD tarafından hiperpigmentasyon (güneş lekeleri veya yaşlılık lekeleri) tedavisi ve cilt aydınlatması için üretilmektedir. Bu cilt aydınlatıcı ürünlerin geliştirilmesinde kullanılan LiP bir mantar türü olan *Phanerochaete chrysosporium*'dan üretilmektedir.

1.3.2. Lakkaz (Lac, EC 1.10.3.2)

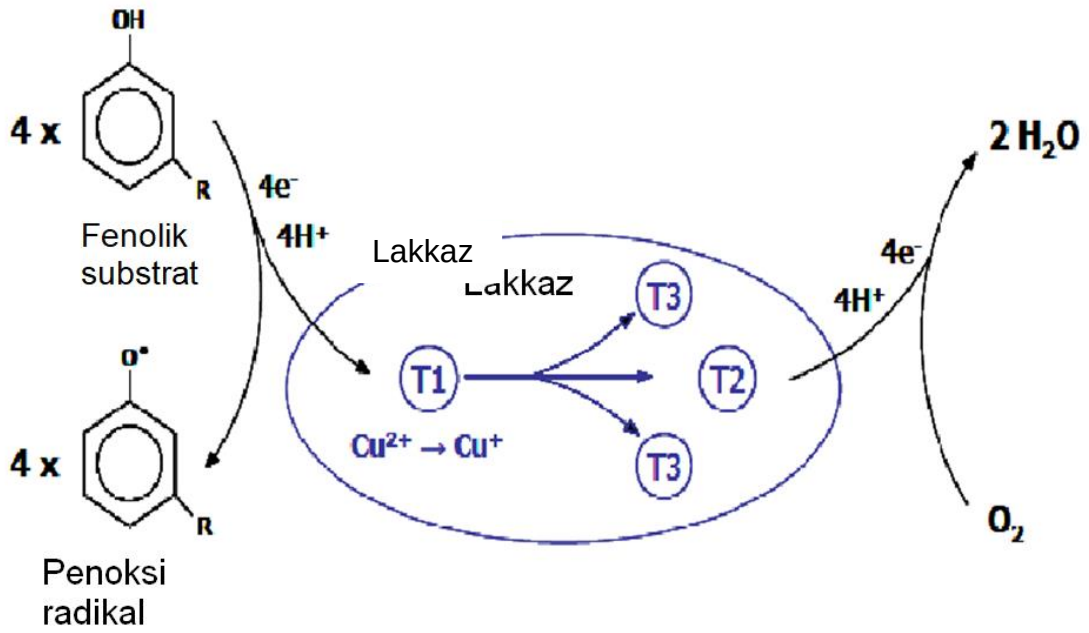
Lakkaz, fenolik bileşikler, aromatik aminler ve diğer bileşiklerin dört ardışık tek elektronlu oksidasyonunu katalizleyen mavi bakır oksidazlardır. Ligninolitiklakkazın endüstride kullanım alanları geniştir. Lakkazlar gıdalarda rengi ağartmak ya da modifiye etmek ve meşrubatlarda kararmaya ve bulanıklığa sebep olan istenmeyen fenolik bileşiklerini elimine etmek için çeşitli işlemlerde kullanılırlar (Rodriguez ve Toca, 2006). Bu enzimler fenolik bileşikler ve aromatik aminleri oksitleyebilmeleri yanında aynı zamanda oldukça çeşitli substrat üzerinde aktivite gösterebilirler. Bu özelliklerinden dolayı lakkaz enzimi tekstil ve boya endüstrisinde enzimatik modifikasyonla boya ağartmada potansiyel bir kullanım alanı bulmuştur (Abadulla vd., 2000; Kunamneni vd., 2008). Günümüzde özellikle tekstil fabrikalarının atık sularından boyar maddelerin uzaklaştırılması için kullanılan yöntemler etkili ve ekonomik değildir (Rodriguez&Toca, 2006). Bu nedenle, lakkazla ilgili bu gelişmeler endüstrideki sentetik boyaların kimyasal degradasyonu için ilgi çekici bir çözüm olmuştur (Abadulla vd., 2000; Wong&Yu, 1999). Buna ek olarak mutajenik ve karsinojenik özelliklerinden dolayı insan sağlığına ciddi risk oluşturan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) da lakkazlar tarafından degrade edilirler (Bamforth ve Singleton, 2005).

Lakkazlar böcekler, mantarlar, bakteriler ve bitkiler dahil birçok organizma tarafından üretilirler (Fisher vd., 2014). Lakkazlar spektroskopik ve manyetik özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar: tip 1-mavi bakır merkezi, tip 2-normal bakır merkezli, tip 3-eşlenmiş binükleer bakır merkezli lakkazlar.

Lakkazın aktif bölgesinde 4 bakır atomu ve T1, T2 ve T3 şeklinde 3 grupta incelenir (Solomon vd., 1996). Fenolik substrat için OH grubundan bir proton çıkarılır ve fenoksilradikaline dönüşür. Serbest kalan elektron T1 bakır atomunu Cu^{+2} formundan Cu^{+} ya indirgenir. Burada elde edilen elektronlar enzimin sabit formunu aktif forma dönüştürür

ve T2-T3 kompleksine aktarılır. Bu aşamada lakkaz enziminin aktif merkezinde bulunan bakırın tam indirgenmesi için 4 elektron oksidasyon reaksiyonu gereklidir (Şekil 2). Aromatik fenoller ve aminler oksitleyerek aromatik halkanın kararlılığını bozabilir. Peroksidazlar ve lakkazlar, hidroksiller gibi düşük molekül ağırlıklı serbest radikalleri kullanarak lignini parçalar, bu radikaller fenolik ve fenolik olmayan gruplar içeren lignin polimerlerini depolimerize eder ve çözünmeyen lignini mineralize eder (Janusz vd., 2017). Bu enzimler spesifik değildir ve çeşitli fenolik aromatik bileşikler ve fenolik olmayan lignin bileşiklerini oksitler. Lakkazlar geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir ve peroksidazlar tarafından kullanılan hidrojen peroksit yerine elektron vericisi olarak atmosferik oksijeni kullanabilir (Christopher vd., 2014).

Lakkaz medyatörleri (küçük bileşikler) bazen daha etkili lignin parçalanması için kullanılır. Küçük bir kimyasal bileşik olan bu aracı bileşik lakkaz tarafından sürekli olarak oksitlenir ve substrat tarafından indirgenir. Substrat, lakkazın aktif bölgesi için çok büyük olduğundan, aracının rolü, enzim ve substrat arasındaki elektronların transferidir, böylece aralarındaki sterik (iyonların ve moleküllerin şeklini (konformasyonunu) ve reaktivitesini etkileyen bağ oluşturan etkileşimler) problem çözülür (Li vd., 1999). Aracı olarak kullanılan bu mediatörlerin bazı örnekleri şunlardır: 3-hidroksiantranilik asit, 4-hidroksibenzoik asit, fenolsülfonftalin, asetosiringon, vanilin ve metil siringat (Christophervd., 2014). Lakkaz üreten bazı bakterilere *Ecsherichia coli*, *Streptomyces cinnamoneus* (Januszvd., 2017) ve *Brevibacillus thermoruber* (Niu vd., 2021) örnek olarak verilebilir.



Şekil 2. Lakkaz enziminin katalitik döngüsü (Prajavati & Minocheherhomji, 2018)

Atık sularda çeşitli türlerde ve istenmeyen miktarda bulunan boyar maddeler renk kirliliğine neden olmakta ve sudaki yaşamı olumsuz yönde etkileyen kimyasallardır (Paloheimo vd., 2004). Lakkaz enzimlerinin oldukça geniş bir çeşitlilikteki substratlar üzerinde aktivite gösterebilme yeteneği, son zamanlarda bu enzimlerin tekstil boyalarının renk giderimleri, kâğıt hamurunun biyolojik olarak ağartılması ve biyoremediasyon gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılmalarına yol açmıştır. Tekstil sanayisinde kullanılan boyaların sentetik orijinleri nedeniyle çoğunun renk giderimlerini (dekolorizasyon) sağlamak da oldukça zordur. Üstelik farklı kategorilere sahip olan tekstil boyalarının tamamını fiziksel veya kimyasal yöntemler kullanarak parçalamak veya renk-giderimlerini sağlamak da mümkün değildir. Bazen bu boyaların parçalanma ürünleri çok daha toksik olabildiğinden, tekstil boyası içeren atıkların muamelesinde fiziko-kimyasal yöntemler yerine lakkaz kökenli enzimatik yöntemler tercih edilmektedirler (Spadaro vd., 1998). Tekstil boyalarını içeren atık suların muamelesine ek olarak, lakkaz enzimlerine dayalı arıtma sistemleri zeytinyağı fabrika atıklarındaki renkli fenolik bileşiklerin oksidasyonlarını sağlayarak bu atıkların muamelesinde de kullanılmaktadırlar (Dias vd., 2004). Lakkazlar, atık sulardaki pestisitler, fenolik bileşikler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi toksik organik bileşiklerin biyolojik olarak ayrıştırılmasında etkili bir enzimdir. Lakkazın bu bileşikleri oksidatif yollarla daha az

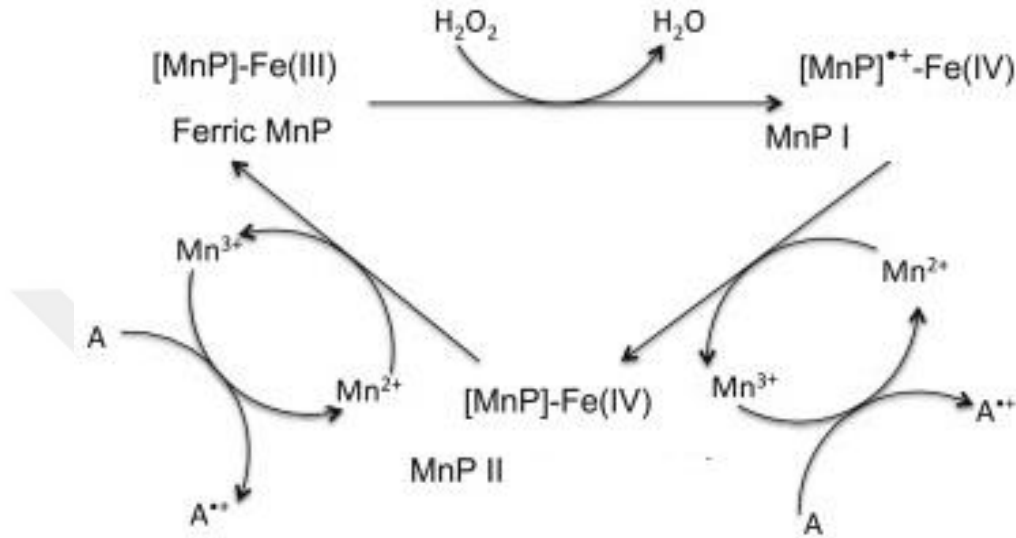
toksik veya tamamen biyobozunur ürünlere dönüştürdüğü belirlenmiştir (Rodriguez Couto., 2007).

1.3.3. Mangan Peroksidazlar (MnP, EC 1.11.1.13)

Mangan peroksidazlar (MnP'ler) doğada lignin substratlarını hidrolize eden benzersiz bir enzim grubudur. Mangan peroksidazlar, lignin degrade eden mantarlar ve çok az sayıda bakteri tarafından üretilirler. Oksidant olarak hidrojen peroksiti kullanarak Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e oksitlerler. Bu enzimler ligninden polisiklik aromatik hidrokarbonlara kadar çok çeşitli bileşikler oksitleyebilirler ancak fenolik olmayan lignin model bileşiklerini okside edemezler (Steffen vd., 2003). MnP, enzimin aktif bölgesinden uzaktaki hedefleri okside etme yeteneğine sahip, yayılabilir bir yük transfer aracı olarak Mn^{3+} üretme yeteneği ile karakterize edilir (Kuan vd.,1993). MnP oksidatif aktivitesinin aralığı, Mn^{3+} 'yi kararlı komplekslerde şelatlayan oksalik asit gibi organik asitlerin salınmasıyla genişletilebilir. Ayrıca demir iyonları da içerir. MnP, fenolik hidroksil gruplarındaki metil gruplarını giderebilir ve küçük moleküller oluşturmak için sonraki bozunma adımlarına katkıda bulunur (Niu vd., 2021).

Mangan peroksidazlar son zamanlarda atık suların biyoremediasyonunda, kâğıt endüstrisinde, ağartma ve biyoetanol üretiminde kullanılmaktadır (Rodriuez vd., 2009). Bu enzimler çeşitli organik kirleticilerin ve lignin model bileşiklerinin bozunmasını katalize edebilen hem içeren bir ekstraselüler enzimdir. Ligninolitik enzimler kompleksinin bir parçası olarak MnP doğal olarak bitki lignininin depolimerizasyonunu katalize eder. Bu nedenle, bu enzimin endüstri ve tarım alanında çok fazla potansiyeli vardır çünkü lignini, selülozu ve hemiselülozu parçalayabilir. Boyalar ve lignin arasındaki yapısal benzerlik mikroorganizmaların ligninolitik enzim sistemleri aracılığıyla bu boyaları parçalamasına yardımcı olur. MnP, çeşitli endüstrilerde çevre koruma için yaygın olarak kullanılan bir araçtır. MnP ayrıca insan sağlığına oldukça zararlı olan klorofenoller, nitroaromatik bileşikler, endüstriyel boyalar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi organik kirleticilerin parçalanmasına yardımcı olur. Son zamanlarda, MnP'nin biyoremediasyon potansiyelinin önemine çok fazla vurgu yapılmıştır (Hattem vd., 2009). MnP, atık sulardaki toksik ve biyolojik olarak dirençli organik kirleticileri daha kolay parçalayarak biyolojik arıtma süreçlerini destekler. Bu süreç, atık su arıtma tesislerinde mikroorganizmaların

etkinliğini artırır (Elisashvili & Kachlishvili., 2009). MnP üreten bakterilere örnek olarak *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* sp. ve *Microbacterium* sp., *Arthrobacter* sp. C2 ve *Brevibacillus thermoruber* (Janusz vd., 2017; Asina vd., 2016; Jiang vd., 2019; Niu vd., 2021) verilebilir.



Şekil 3. Mangan peroksidazın katalitik döngüsü (Steffen vd., 2003)

1.3.4. Versatil Peroksidaz (VP, EC 1.11.1.16)

Versatil peroksidaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidazın katalitik aktivite özelliklerine sahiptir. Yüksek redoks potansiyeline sahip fenolik olmayan daha düşük potansiyele sahip aromatik bileşikler ve aminleri degrede edebilir (Pérez-Boada vd., 2005). VP, lignin peroksidazın olağan substratları olan metoksi benzenler, veratril alkol ve fenolik olmayan model lignin bileşiklerinin yanı sıra Mn²⁺'yi de oksitler. VP, aynı zamanda araçların yokluğunda azo boyaları ve yüksek redoks potansiyeline sahip diğer fenolik olmayan bileşikler oksitleme yeteneğine sahiptir (Garcia-Ruiz vd., 2014; Hofrichter vd., 2010). VP, tekstil endüstrisinden kaynaklanan atık sularda azo ve antrakınon boyalar gibi boyar maddeleri parçalayarak renk gideriminde etkili bir yöntem sunar. Enzim, boyar maddelerin aromatik halkalarını oksitleyerek daha basit ve renksiz bileşiklere dönüştürür (Torres vd., 2003). Ayrıca VP, atık sulardaki antibiyotikler ve hormon bozucu kimyasallar gibi farmasötik atıkları oksidatif reaksiyonlarla daha az toksik

bileşiklere dönüştürür. Bu süreç, özellikle mikro kirleticilerin giderilmesi açısından önemlidir (Marco-Urrea vd., 2009).

1.3.5. Boya Giderici Peroksidazlar (dye-decolourizing peroxidase (DyP, EC 1.11.1.19))

DyP'ler filogenetik olarak VP, LiP ve MnP ile ilişkili değildir ve yeni bir hem peroksidaz ailesine aittir (Zámocký vd., 2015). Bir hem peroksidaz olan DyP bitki ve mikrobiyal peroksidazlarla ilişkili farklı bir yapıya ve özelliklere sahiptir (Falade vd., 2017). Fungal ve bakteriyel enzimlerle birlikte dört (A, B, C ve D) DyP alt ailesi vardır (Santos vd., 2014). DyP peroksidaz lignin parçalanmasının yanı sıra boyaları ve veratril alkol gibi fenolik olmayan lignin bileşiklerini oksitleme yeteneğine sahiptir. DyP'lerin fungal lignin degrades edebilen peroksidazların bakteriyel eşdeğeri olduğu ileri sürülmektedir (Colpa vd., 2014). DyP üreten bakterilere örnek olarak *Pseudomonas putida* ve *Enterobacter lignolyticus* verilebilir (Janusz vd., 2017). Boya giderici peroksidazlar özellikle tekstil endüstrisinde tekstil atıktan sularından renkli boyar maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır.

Son yıllarda, DyP tipi peroksidazlar biyoremediasyon ve endüstriyel uygulamalarda geniş bir substrat ve kullanım yelpazesi sergilemiştir (Le vd., 2016). Bugüne kadar tekstil atık sularındaki sentetik boyaların bozunmasında DyP'lerin oynadığı rol hakkında birkaç çalışmamabulunmaktadır (Cuamatzi-Flores vd., 2019). Bununla birlikte, atık suda yüksek renk, yüksek sıcaklık, yüksek pH, yüksek tuzlar konsantrasyonu, yüksek metal iyonları, yüksek BOD, yüksek COD ve yüksek askıda katılar gibi çeşitli faktörler DyP'lerin kullanımını kısıtlamıştır (Zhang vd., 2023). Bu faktörler arasında sıcaklık ve tuz, boya atık suyunun verimli arıtımı için temel endişeler haline gelmiştir. Ek olarak boya parçalayıcı enzimlerin tuzlara olan duyarlılığı, bunların büyük ölçekte uygulanmasını sınırlar. Tuz konsantrasyonları boya atık sularında 150-200 g/L'ye kadar çıkabilir; bu nedenle, aktif çamur, biyolojik arıtmadan önce tuz içeriğini azaltmak için bir ön işlem gerektirecektir ve bunu yapmanın maliyeti, arıtma için gereken ekstra atık su nedeniyle artacaktır (Yaseen & Scholz., 2018). Bu gibi durumlar DyP tipi peroksidazların atık sularda kullanım potansiyellerini sınırlamaktadır.

1.4. Ligninolitik Bakterilerin Atık Su Arıtımındaki Rolü

Atık su arıtımında biyolojik uygulamalar dünya çapında kabul görmektedir. Biyolojik uygulamaların çevre dostu, güvenilir ve genellikle uygun maliyetli olduğu düşünülmektedir. Fenolik maddeler mikroorganizmalar için toksik olduğu için, kullanılan mikroorganizmaların seçimi ve arıtılan atık sularına adaptasyonu dikkate alınmalıdır (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006). Özellikle zeytin atık suyunda bulunan fenolik bileşikler antimikrobiyal özelliklerinden dolayı hem aerobik hem de anaerobik bakterilerin atık suyu degradasyonunu olumsuz etkilemektedir. Bundan dolayı bu tür atık suların bioremediasyonunda atık sularda aerobik veya anaerobik büyüme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar kullanılarak yürütülmüştür. Ligninolitik enzimlere sahip olan mikroorganizmalar aerobik veya anaerobik koşullarda atık sularda bulunan fenolik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanıp belirli bir konsantrasyona kadar parçalayabilmektedir. Bakteriler tarafından atık sulardaki fenolik bileşiklerin metabolize edilebilir hale dönüştürülmesinde lignin peroksidazlar, mangan peroksidazlar ve lakkaz enzimleri etkili olmaktadır (Asses vd., 2009, Kotzabasis & Papazi., 2008). Bilim insanları, bu bakterilerin ligninin endüstriyel kullanım ve parçalanması sürecinde önemli bir rol oynadığını fark etmişlerdir (Bugg vd., 2011a). Ligninolitik bakteriler birçok alanda geniş bir uyum yeteneğine sahiptirler. Ligninolitik bakterilere bilim dünyasının ilgisi gün geçtikçe artmaktadır (Tablo 1). Aynı zamanda, endüstriyel işlemler sonucunda açığa çıkan ligninli atıklar bakteriler kullanılarak çeşitli katma değerli ürünlere dönüştürülebilmektedir (Xu vd. 2018). Ligninolitik enzimler olan lignin peroksidazlar ve mangan peroksidaz enzimleri, demir iyonları içeren lignin parçalayıcı proteazlar olması sebebiyle ilki, ligninin içindeki hidroksil içeren aromatik halkayı parçalarken, ikincisi halkadaki metoksi grubunu kaldırarak, bir sonraki parçalanma adımına girmeyi kolaylaştırır (Bharagava vd., 2018). *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* cinsine ait olan birçok bakteri türü lignini parçalayabilir (Bugg vd. 2011a).

Tablo 1. Literatüre kazandırılmış lignin degrede eden bakteriler

<i>Bacillus altitudinis</i> SL7	Khan vd., 2015
<i>Bacillus flexus</i> RMWW II	Kumar vd., 2019
<i>Bacillus pumilus</i>	Huang vd., 2013
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Huang vd., 2013
<i>Bacillus cereus</i>	Singh vd., 2009
<i>Bacillus megaterium</i>	Morii vd., 1995
<i>Bacillus endophyticus</i>	Ojha ve Tiwari 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Yadav ve Chandra 2015
<i>Arthrobacter</i> sp. C2	Jiang vd., 2019
<i>Planococcus</i> sp. TRC1	Majumdar vd., 2019
<i>Pseudomonas putida</i> NX-1	Xu vd., 2018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tian vd., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tiku vd., 2010
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Paliwal vd., 2015
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	Niu vd., 2023
<i>Streptomyces badius</i> ATCC 39117	McCarthy 1987
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	He vd., 2017
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Ahmad vd., 2010

Kâğıdın endüstriyel üretimi, kâğıt hamurundaki ligninin ayrıştırılmasını ve kâğıt hamurundan uzaklaştırılmasını (delignifikasyon) gerektirmektedir. Kâğıdın geleneksel tekniklerle üretildiği ve kirliliğe yol açan klorin temelli beyazlatma işlemleri ise çeşitli çevresel sorunlara yol açmakta ve bu da yeni çözüm arayışına yol açmaktadır (Kuhad vd., 1998). Delignifikasyonun oksijen ile sağlandığı süreçler ise endüstriyel olarak kullanılmaktadır (Carter vd., 1997). Fakat odunsu kâğıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle ön muamelesi ile yapılan delignifikasyon işlemi, hem daha ılımlı işlem koşulları gerektirmesi hem de daha çevre dostu olmasının yanında kâğıdın ana yapısı olan selülozun bütünlüğünü de korumaktadır (Kuhad vd., 1998). Alternatif biyo-beyazlatma sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırmaların çoğunluğu ise lignin-degradasyonunu gerçekleştiren mikroorganizmalardan elde edilen lignin peroksidaz, mangan bağımlı

peroksidaz ve lakkazlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan yoğun araştırmalara rağmen, modern kimyasal beyazlatma tekniklerinin sunduğu delignifikasyon/beyazlatma yeteneğini sunabilen yalnızca birkaç enzimatik muamele belirlenebilmiştir (Begüm vd., 2015). Bu genellemenin birkaç istisnasından birisini ise kraft hamuru için geliştirilmiş olan ve patenti alınmış olan lakkaz modifiye edilmiş sistemi (LMS) delignifikasyon teknolojisi oluşturmaktadır (Call vd., 1997). Kâğıt ve kâğıt hamurunun beyazlatılmasında biyolojik sistemlerin kullanılması kâğıt fabrikalarında, kâğıt hamurunun beyazlatılması amacıyla klorin kullanımını ortadan kaldırmaktadır. Bunun sonucu olarak da bu fabrikaların atıkları aracılığı ile çevreye verilen ve toksik olan klorinli bileşikler elimine edilmektedirler. Lignin bileşiklerinde reaktif radikaller oluşturma yeteneğine sahip olan lakkazlar, aynı zamanda odun liflerinin maksatlı olarak modifikasyonunda da kullanılabilirler (Chandra vd., 2002, Kenealy vd., 2003). Örneğin, sunta gibi lignoselüloz temelli kompozit materyallerin üretilmesinde odun liflerinin birbirine enzimatik olarak yapışmasını sağlamak amacıyla lakkazlar kullanılabilir. Lakkazlar, sunta gibi odunlu kompozit materyallerin üretimi esnasında odun liflerine bağlı olan ligninin aktive edilmesini sağlayarak liflerin birbirine yapışmasını sağlayacak ve böylece elde edilen suntalar, iyi bir mekanik özellik taşıırken aynı zamanda toksik olan sentetik yapıştırıcıları içermeyeceklerdir (Huttermann vd., 2001, Felby vd., 1997).

Tekstil endüstrisi boyar madde üretiminin üçte ikisini kullanmaktadır (Riu vd., 1998). Tekstil ürünlerinin işlenmesini sağlayan yaş işlemler esnasında büyük hacimlerde su ve kimyasal madde tüketilmektedir. Tekstil sanayinde kullanılan kimyasal ajanlar ise kimyasal çeşitlilik açısından oldukça fazla olup inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar değişmektedir (Mishra & Tripathy 1993, Juang vd., 1996). Kimyasal yapıları nedeni ile tekstil boyaları ışığa, suya ve farklı kimyasal oksitleyici ajanlara maruz kaldıklarında ise renk solmalarına karşı oldukça dirençlidirler (Poots & McKay 1976, McKay vd., 1979). Ayrıca sentetik orijinleri nedeniyle bu boyaların çoğunun renk giderimlerini (dekolorizasyon) sağlamak da oldukça zordur. Üstelik farklı kategorilere sahip olan tekstil boyalarının tamamını fiziksel veya kimyasal yöntemler kullanarak parçalamak veya renk-giderimlerini sağlamak da mümkün değildir. Bazen bu boyaların parçalanma ürünleri çok daha toksik olabildiğinden, tekstil boyası içeren atıkların muamelesinde fiziko-kimyasal yöntemler yerine enzimatik yöntemler tercih edilmektedirler (Spadaro vd., 1994). Özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, son

zamanlarda endüstriyel atıklardaki boyaların giderilmesi konusundaki yasal zorunluluklar her geçen gün daha zorlayıcı olmaktadır. Bazı boyaların ise benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi bilinen kanserojenlerden elde edilmesi nedeniyle, bu konudaki kaygılar giderek artmaktadır (Baughman & Perenich, 1988). Boya içeren atık suların arıtılmasında kullanılan geçerli metotların çoğu ise etkili olmadığı gibi ekonomik de değildirler (Cooper P., 1995, Stephen JA., 1995). Tekstil boyalarının enzimatik olarak parçalanmasını veya renk giderimini sağlayan yaklaşımlar ise genellikle LiP, MnP ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Lakkaz enzimlerinin LiP ve MnP enzimlerine göre daha kullanılabilir olmaları ve aromatik bileşiklerin oksidasyonlarını çok daha az özgüllükte sağlamaları nedeniyle, lakkazlar çok fazla çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilecek bir potansiyele sahiptirler (Stephen JA., 1995). Tekstil boyalarını içeren atık suların muamelesine ek olarak, lakkaz enzimlerine dayalı arıtma sistemleri zeytinyağı fabrika atıklarındaki renkli fenolik bileşiklerin oksidasyonlarını sağlayarak bu atıkların muamelesinde de kullanılmaktadırlar (D'Annibale vd., 2004, Dias vd., 2004). Ayrıca dokumaların ağartılmasında ve hatta boyaların sentezinde de lakkazın kullanılması nedeniyle, lakkazenzimlerinin tekstil endüstrisinde kullanımı her geçen gün hızla artmaktadır (Setti vd., 1999). Aynı zamanda lakkaz enzimleri, redoks-aracıları ile kullanıldığında ise indigo boyasının beyazlatılmasını sağlayarak, kullanılmış görüntüsü veren kotların üretiminde kullanılmaktadır (Camarero vd., 2004, Pazarlıoğlu vd., 2005). Tzanov ve ark. yaptıkları çalışmada kısa süreli lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiğini ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir (Tzanov vd., 2003).

1.5. Atık Su Arıtımında Toksisite çalışmaları

Toksisite testleri çevresel risk değerlendirmesinde yararlı bir araç olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, endüstriyel atıklar atık su arıtma süreçleri sırasında polifenol ve nonifenol karboksilatlar gibi bilinmeyen ürünlere yol açar. Bunun yanında alkil fenollerin ise canlılarda endokrin bozucu etkileri vardır (Sonnenschein ve Soto, 1998). Günümüzde Endüstriyel atıkların kontrolünde çözünmüş organik maddeler ve kimyasal oksijen ihtiyacı gibi parametrelerin ölçülmesi belirleyici rol oynamaktadır. Biyolojik olarak bu tür atıkların etkisinin test edilmesi için maliyeti düşük, hızlı ve etkili

testler geliştirilmiştir. Bu testler mikroorganizmaların, bitkilerin, omurgasızların ve balıkların kullanımına dayanmaktadır. Atık su ve çamurdaki ana toksik bileşenleri belirlemek için hedef bileşiklerin kimyasal analiziyle beraber biyolojik toksisite analizlerini birleştiren yöntemler gün geçtikçe önem arz etmektedir. Kimyasal bir maddeye maruz kalan farklı canlı organizmalarda oluşan biyolojik tepki çeşitlidir ve toksik maddelere karşı duyarlılıklarına bağlıdır. Atık sulardaki zararlı kimyasalların çevresel tehlikesini tahmin etmek ve seviyesini belirlemek için farklı biyolojik testler kullanılmaktadır. Bu yeni testler balık gibi daha yüksek organizmaların kullanımından kaynaklanan etik sorunlar olmadan toksisiteyi canlı hücreler veya organeller üzerindeki etkilerine göre doğrudan, hızlı ve uygun maliyetle değerlendirebilir. Rutin olarak kullanılan balık öldürücülük testleri, toksik maddeye maksimum 96 saat maruz kalmayı içerir. Gökkuşaağı alabalığı bu testler için en yaygın kullanılan türdür (Duran vd., 2017).

Algler endüstriyel tuzlu atık su örneklerinde veya deniz suyundaki toksik maddelerin biyolojik değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (ISO, 1995). 72-96 saat boyunca atık suya maruz kalan alg hücreleri sürenin sonunda alg sayısı otomatik bir partikül sayacı kullanılarak değerlendirilir. Alg büyümesinin inhibisyonu toksisitenin göstergesi olarak kullanılır. Alg kullanımının dezavantajı kültürünün zorluğu ve tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır (Levy vd., 2005).

Bitkilere dayalı çeşitli biyolojik toksisite analizleri (çimlenme oranı, biyokütle ağırlığı, enzim aktivitesi) geliştirilmiştir. Bitkilere dayalı biyolojik testlerin düşük maliyeti, hızlı test sonucunu vermesi ve zararlı atıkların çevresel etkilerinin belirlenmesi gibi avantajları vardır. Bu amaçla, yulaf, fasulye, Çin lahanası gibi türler kullanılmaktadır (Ferrari vd., 1999). Bitkilerin kullanılmasıyla yapılan bioassay testleri çimlenme ve kök uzunluğu ölçümlerini gerekli kıldığı için genellikle 4-6 gün gerektirir. Toksisitenin belirlenmesi için tohum çimlenmesi sırasında amilaz enzimin miktarı kriter olarak kullanılır. Amilaz enzimi tohumda çimlenme süresince nişastanın şekerlere parçalanmasında en önemli aktif rol oynayan enzimdir (Perata vd., 1997; Vartapetian & Jackson, 1997). Bitkiler tohumları çimlenmeye başladıkları zaman ihtiyaç duydukları enerjiyi tohumlarında depo ettikleri karbonhidrat ve protein gibi maddelerin yıkımından elde ederler (Subbarao vd., 1998). Çimlenme olayının devam etmesi için embriyonun enerji ihtiyacını karşılamada kullandığı karbonhidrat ve şekerlerin sürekli olarak temin edilmesi gereklidir. Tohumlarda karbonhidratların depo formu nişastadır ve çimlenen

tohum embriyosu bu formda karbonhidratları kullanamamaktadır (Ricard vd., 1998; Guglielminetti vd., 2000). Bu nedenle çimlenmenin başlamasıyla beraber depo maddelerini embriyonun kullanabileceği forma dönüştüren amilaz enziminin miktarının belirlenmesi atık suların tohumun çimlenmesine etkisinin ortaya çıkarılması için belirleyicidir.

1.6. Çalışma Hipotezi

Belli sayıda bakteri türünün lignin degradasyonu yapabildiği ve çeşitli atık suların biyoremediasyonunda etkin olduğu bilinmektedir (Gaur vd., 2018). Buna rağmen günümüzde halen daha atık suların biyoremediasyonu ilgili oldukça açıklık mevcuttur. Bu çalışmada kullanılan rekombinant ve yaban tip bakteriler ile endüstriyel alanlardaki kirliliğin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar ve patentler incelendiğinde, bu tip çalışmaların çoğunun mantarlar üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Çalışmalardaki mantarların enzimlerine bakıldığında ligninolitik enzimlerden birini veya ikisini içerdikleri tespit edilmiştir. Üç ana enzimi (lignin peroksidaz, lakkaz ve mangan peroksidaz) birden içeren organizma çok nadir bulunmaktadır. Bu alanda bakterilerle ilgili yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.

Yukarıda verilen bilgiler dikkate alındığında gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amacı KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim dalında daha önce oluşturulan ligninolitik genlere ait rekombinant bakteriler ile çalışmada kullanılan zeytin atık suyundan izole edilen yabanıl formlu bakteriyel izolatların üç farklı atık su üzerindeki bioremediasyon etkisinin karşılaştırılması olarak araştırılmasıdır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu tez çalışması KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen Tübitak 104T286 kapsamında oluşturulan ligninolitik enzim içeren klonlar ve yapılan bu çalışma kapsamında toplanan atık sulardan izole edilen ligninolitik aktivite gösteren bakteriyel izolatlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Trypton (Multicell 800-158-CG), NaCl (BBI Life Sciences A610476), Yeast Ekstrakt (BBI Life Sciences A505245-0500), Agar (Sigma 05039), D-Glukoz monohidrat (TEK-KİM TK090271.01002), CommassieBrillant Blue R-250 (Fischer Scientific BP101), Akri- lamid (Sigma-Aldrich A8887), Glisin (Biomatik A2716), Amonyum peroksi sülfat (MERCK K19415400), Bis-akrilamid (Sigma Aldrich 128910), TEMED (SERVA 35925.01)), ABTS (Sigma A9941-50Tab), H₂O₂ (MERCKK50671809838), Sodyum Asetat (Isolab 969.176.1000), Amonyum Asetat (Isolab 9.030.261.000), Trizma Baz (Sigma Aldrich T1503), NaOH (Isolab 964969.113.1000), HCl (Sigma Aldrich 30721), β- merkaptotetanol (Sigma Aldrich M6250), SDS (Fischer scientific BP166), dNTP Seti (Promega), GoTaq® DNA polimeraz kiti (Promega M3001), Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti Manuel (Promega A1120), Magnezyum Klorür (Sigma M2670), Lignin (Sigma 370959), Quaiacol (Sigma G5502), Magnezyum Sülfat (Sigma M7506), Metilen Mavisi (Isolab C152015) ve Fenol Red (Merck 107241).

2.2. Atık Su Örneklerinin Toplanması

Kahramanmaraş Kâğıt Sanayi ve Ticaret A.Ş' nin KÜTAHYA Kâğıt Fabrikasına gidilerek, fabrika atıklarının toplandığı havuzların değişik yerlerinden 10 litre atık su alınarak soğuk zincire uygun şekilde en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir. Atık su numunelerinin alınması sırasında homojen bir karışım alınması konusunda fabrika görevlisinden yardım alınarak atık suyun biriktiği havuz karıştırılarak örnek alınmıştır.

Aydın ili Söke ilçesindeki tekstil fabrikasına (Söktaş Tekstil Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi /SÖKTAŞ TEKSTİL FABRİKASI) gidilerek, fabrika atıklarının toplandığı

havuzların değişik yerlerinden 10 litre atık su alınarak soğuk zincire uygun şekilde en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir. Atık su numunelerin alınması sırasında fabrika görevlisi eşliğinde havuz karıştırılarak homojen bir karışımdan steril 5 litrelik kaplar kullanılarak örnekler alınmıştır.

Aydın ili Söke ilçesindeki OLİVAM Gıda Tekstil Tarım Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine ait zeytin işleme fabrikasının atık su toplama havuzundan 10 litre atık su (siyah pirina suyu) alınarak soğuk zincire uygun şekilde olabilecek en kısa zamanda laboratuvara getirildi. Atık sular havuzun değişik yerlerinden alındı ve 5'er litrelik steril kaplara doldurularak laboratuvara taşınmaları sağlandı.

2.3. Atık Sulardaki Fizikokimyasal Analizler

2.3.1. pH Ölcümü

pH sıfırdan 14'e kadar değerler alabilen, bir çözelti içerisindeki hidrojen iyonunun yoğunluğunun ölçüsü olan ve çözeltilerin asitlik ya da alkalilik derecesini gösteren ölçek-tir. pH tayini, numunenin asidik mi yoksa bazik mi olduğunu bulmak için önemlidir. Bu amaçla laboratuvarımızda bulunan Jenson marka pH metre cihazının ölçüm probu alınan atık suların içerisine direk batırılarak pH ölçümü yapılmıştır.

2.3.2. Sülfatlar

Numunenin sülfat konsantrasyonunu belirlemek için EPA yöntemi 0375 Baryum krometrisi kullanıldı (APHA, 2012).

Reaktifler

Tampon çözelti A: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (30g), sodyum asetat (5g), KNO_3 (1g), 20 ml %99 asetik asit 500ml damıtılmış suya eklendi. Çözöldükten sonra çözelti 1 litreye seyreltildi.

Tampon çözelti B: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (30g), sodyum asetat (5g), KNO_3 (1g), 0,111g sodyum sülfat, 20 ml %99 asetik asit, 500 ml damıtılmış suya eklendi. Çözöldükten sonra çözelti 1 litreye seyreltildi. 50 ml numuneye, 5 ml tampon A ve B solüsyonu eklendi. Daha sonra 0,15 g $BaCl_2$ kristalleri ilave edildi ve 30 saniye karıştırıldı. Absorbans 420 nm'de ölçöldü.

2.3.3. Toplam Çözünmüş Katılar (TDS)

Askıda kalan katıların uzaklaştırılması için atık su numuneleri filtre kağıdı yardımıyla filtrelendi. Filtrelenen numune daha sonra, başlangıçta tartılan sterilize edilmiş behere aktarıldı. Numune, kurutma için 105 °C'de 1 saat fırında tutulmuştur.

Toplam çözünmüş katılar aşağıdaki formül kullanılarak ölçüldü:

Toplam çözünmüş katı madde (mg / L) = (A-B) × 1000 / numune hacmi (mL)

A, kurutulmuş kalıntı ve tabak ağırlığıdır (mg), B ise tabağın ağırlığıdır (mg).

2.3.4. Toplam Askıda Katı Madde (TSS)

Filtre kâğıdı analitik terazide tartıldı ve kuru ağırlığı 100 ml'lik karıştırılmış numune süzüldü. Filtre etüvde 105 °C'de 1 saat kurutuldu ve toplam askıda katı madde, aşağıdaki formül kullanılarak ölçüldü:

Toplam askıda katı madde (mg / l) = (A-B) × 1000 / numune hacmi (ml)

A, filtre ve kurutulmuş artığın ağırlığıdır (mg), B ise filtre ağırlığıdır (mg).

2.3.5. Nitrat Konsantrasyonu

Sudaki nitrat konsantrasyonunu belirlemek için EPA yöntemi 4500 NO₃-N kullanıldı (Patnaik vd., 2010). Yöntemi takiben 25 ml filtrelenmiş numune balona alındı ve numuneye 0,5 mL 1 molar HCl eklendi. Numunenin karıştırılmasından sonra nitrat seviyesi spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

2.3.6. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)

Kullanılan KOİ flakonlarının ölçüm aralığı 25-1500mg / L idi, bu nedenle atık su numuneleri KOİ değerlerini düşürmek için önce damıtılmış suyla seyreltildi. Pipet kullanılarak KOİ şişelerine 3 mL seyreltilmiş atık su numunesi koyularak üzerine reaktif eklendi. Reaksiyon şişesi 120 dakika önceden ısıtılmış termal reaktörde 148 °C'de ısıtıldı.

Sıcak şişe, termal reaktörden çıkarıldı ve su kullanılmadan bir test tüpü rafında 10-30 dakika soğumaya bırakılır. Ölçüm, spektrofotometrik olarak gerçekleştirilir.

2.3.7. Renk Ölçümü

Toplanan atık sulardaki başlangıçtaki renk ölçümleri, Kanada Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Birliği'nin (CPPA, 1974) standart yöntemine göre ölçüldü. Örnekler, askıda katıları uzaklaştırmak için 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi ve süpernatantın pH'ı 7,6'ya ayarlandı. 465 nm'de absorbans, kör olarak damıtılmış su kullanılarak ölçüldü ve ardından aşağıdaki formül kullanılarak renk birimlerine (PtCO) dönüştürüldü.

$$CU (PtCO) = 500A_2 / A_1$$

A₁, 500 CU standart platin-kobalt solüsyonunun (0,1214) absorbansdır ve A₂, numunenin absorbansdır.

2.3.8. Lignin Ölçümü

Toplanan atık sulara bulunan lignin içeriği, daha önce Pearl ve Benson (Pearl ve Benson, 1940) tarafından bildirilen yöntemle göre ölçüldü. Bu yöntemde 50 ml numuneye 1ml NaNO₃ (%10) ve 1ml CH₃COOH (%10) eklenmiştir. 15 dakika sonra karışıma 2 ml NH₄OH ilave edildi ve 5 dakika bekletildi, daha sonra 430 nm'de absorbans ölçüldü. Kör için 2 ml NH₄OH ve 1ml CH₃COOH (% 10) 50 ml distile suya eklendi ve 15 dakika sonra 1ml NaNO₃ eklenerek, 5 dakika sonra absorbans alındı.

2.4. Atık Sulardan Bakteri İzolasyonu

Tekstil, zeytin ve kâğıt fabrikalarından alınan atık sular içerisindeki bakteri varlığının araştırılması ve elde edilecek olan ligninolitik aktiviteye sahip izolatların atık giderimimde kullanılabilmesi için 3 farklı çalışma gerçekleştirildi. 1. çalışmada atık su içerisinde olabilecek yaban tip ligninolitik bakterilerin izolasyonu için sadece ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin üreyebildiği seçici bir besiyeri olan sıvı lignin besiyerlerine 5'er ml atık

su örneklerinden ekimleri yapıldı. 37 °C 5 günlük inkübasyonun ardından sıvı ligninli besiyerlerinde üreyen bakterilerden bakteriyolojik LB agar petrilere yapılan inokülasyonlar neticesinde üreyen bakteriyel kolonilerin saflaştırılması için çizgi ekimi yapıldı. Petrilere üreyen bakteri kolonilerinin morfolojik özellikleri göz önüne alınarak farklı kolonilerden bir seri ekimler sonucu saf kültürler elde edildi. % 20'lik gliserol stokları yapılarak -80 °C saklandı. 2. çalışmada ise toplanan atık sular 0,45 mikronluk steril filtrelerden süzülde, işlem sonrası filtreler seçici ligninli agar petrilere yerleştirilerek 37 °C' de 5 gün inkübasyona tabii tutuldu. Seçici besiyerinde üreyen bakteriler bakteriyolojik LB agar içeren petrilere ekilerek saflaştırıldı ve çalışmada kullanılmak üzere % 20'lik gliserol stokları yapılarak -80 °C saklandı. Üçüncü bir yöntem olarak alınan atık sular hiçbir işleme tabi tutulmadan, 250 ml lik erlenler içerisinde 30 ml bakteriyolojik LB besiyerine 5'er mililitre her bir kirli su örneğinden ayrı ayrı ilave edilerek kültüre edildi. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen bakteriler LB agar petrilere çizgi ekimi yapılmak suretiyle saflaştırılarak çalışmada kullanılmak üzere % 20'lik gliserol stokları -80 °C saklandı.

Ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin üreyebildiği seçici besiyerinin içeriği şu şekildedir: Na₂HPO₄, 2,4; K₂HPO₄, 2,0; NH₄NO₃, 0,1; MgSO₄, 0,01; CaCl₂, 0,01, (gr/L)) ilave olarak %1,25 oranında kraft lignin (gr/L) eklenerek (pH = 7,4) besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyerinin 500 ml'si sıvı kültür için ayrıldı, 500 ml ise agar (15gr/lt) eklenerek katı agarlı besiyerleri hazırlanarak 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Luria Bertani (LB) besiyeri ise şu şekilde hazırlandı:1L LB için; 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt ve 5 g NaCl 1L distile suda çözündürüldü. pH 7,4'ye ayarlandı ve hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Macwilliams vd., 2006).

2.4.1. Ligninolitik Aktiviteye Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi

- **Lakkaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi**

Atık sulardan elde edilen izolatlar lakkaz aktivitesine sahip bakterilerin üreyebildiği ve üreme sonucunda kolonilerin kahverengiye dönüşümü ile ayırd edilebilen bir besiyeri olan guaiacol LB besiyeri kullanıldı. Quaiacol besiyeri içeriği ve hazırlanışı şu şekildedir: Litre başına % 1 glukoz, %0,2 peptone, %0,1 yeast extract, % 0,5 NaCl, % 0,0025 Cu²⁺ ve 16gr agar konularak (pH 7,4) otoklav edilir ve otoklav sonrasında kültür içerisinde %0,02

konsantrasyonda olacak şekilde guaiacol (filtre ile steril edilerek) hazırlanan besiyerine ilave edilir. Hazırlanan seçici besiyerine izolatların inokülasyonu gerçekleştirildi ve 3 gün boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kolonileri kahverengiye dönüşen bakteriler lakkaz pozitif kabul edildi ve çalışmada kullanılmak üzere ayrıldı.

• Lignin Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyal İzolatların Seçimi

Atık sulardan izole edilen izolatlar metilen mavisi (0,25 g/L) içeren bakteriyolojik LB besiyerine ekimleri sonucunda lignin peroksidaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin seçimi yapıldı. Lignin peroksidazlar metilen mavisini substrat olarak oksitleyebilirler (Rath vd., 2022). Hazırlanan seçici kültüre izolatların ekimi yapılarak 37 °C de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda üreyen bakteri kolonileri etrafında oluşan açık mavi zon lignin peroksidaz aktivitesini göstermektedir. Ligninolitik aktiviteyi belirlemek için her bir bakterilerin üremesi sonucu oluşan koloni çapı (C) ile metilen mavisi boyasının renksizleşmesi nedeniyle oluşan bölgenin çapının (H) ölçümünün birbirine oranı (H/C) günlük olarak takip edildi. Metilen mavisi kullanılarak yapılan taramada yüksek ligninolitik aktivite gösteren (H/C oranı yüksek) bakteri izolatları lignin peroksidaz enzim aktivitesi açısından pozitif kabul edilip çalışmada kullanılmak üzere ayrıldı (Denise vd., 1996).

• Mangan Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyal İzolatların Seçimi

Toplanan atık sulardan izole edilen bakteriler fenol red ayracı kullanılarak mangan peroksidaz aktivitesi yönünden taramaları yapıldı. Bu amaçla glukoz, pepton, dipotasyum fosfat, magnezyum sülfat kimyasallarını içeren seçici bir (Glucose peptone dipotassium phosphate magnesium sulphate =GPM) besiyeri hazırlandı. Besiyerinin içeriğinde g L^{-1} , glucose 1 %, peptone 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, K_2HPO_4 0,1 %, agar 16 gram (içerisine 0,1 mM phenol red) eklenerek 121 °C de 20 dk otoklav edildi. Hazırlanan petrilere dökülen agar besiyerine yapılan bakteri ekimleri 3 gün 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakterinin etrafındaki kırmızı bölgenin sarıya dönerek zon oluşturması MnP aktivitesinin varlığını gösterir (Kumar vd., 2016).

2.5. Bakterilerin Sınıflandırılması

Toplanan fabrika atık sularından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen 13 izolattan ligninolitik aktivite gösterdiği belirlenen ve SA1, SA3 ve SA6 olarak ön adlandırılması yapılan 3 yeni izolatın sınıflandırma çalışmaları gerçekleştirildi. Saf kültürleri elde edilen bakteri izolatlarının sınıflandırılması 16S rRNA gen sekansına göre yapıldı. Öncelikle ilgili izolatlardan genomik DNA'lar izole edildi. DNA izolasyonu için bakteriyel izolatlar LB besiyeri ortamında 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. 13.000 rpm'de 2 dk'lık santrifügasyon ile hücreler çöktürüldü. Ardından pelletten, Promega Wizard genomik DNA izolasyon kiti yardımı ile genomik DNA izolasyonu yapıldı. Kitin prosedürüne göre; Çöktürülen hücreler, 480 µl EDTA (50 mM) ile çözüldü. Gram pozitif olan her iki bakterinin de hücre duvarlarının zayıflatılması için, çöktürülmüş hücreler, 120 µl lizozim (10 mg/ml) ile 37 °C'de 60 dk. inkübe edildi. Ardından 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Ortama, 600 µl *Nucleilysis* solüsyonu eklenerek 80 °C'de 5 dk'lık inkübasyon ile hücreler patlatıldı. Hücre içinde bulunan RNA'ların degradasyonu için solüsyona, 2 µl RNazeklenerek, 37 °C'de 60 dk daha inkübe edildi. Örnek, oda sıcaklığında biraz soğutulduktan sonra, solüsyona 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi. 20 sn vorteksleme yapıp buz üzerinde 5 dk inkübasyon ile hücre içi proteinler degrades edildi ve 13.000 rpm'de 5 dk'lık santrifügasyonla çöktürüldü. Süpernatantta kalan DNA 600 µl izopropanol ile pellet oluşumu gözlenene kadar konsantre edildi ve oluşan pellet 13.000 rpm'de 2 dk santrifüsasyon ile çöktürüldü. Pelletin iyice kurduğundan emin olunduktan sonra, %70'lik etanol ilavesiyle DNA'lar yıkandı ve 13.000 rpm'de 2 dk. daha santrifüj edildi. Etanolü tamamen uçurmak amacıyla 37 °C'de 15 dk. inkübasyon yapıldı. Son olarak, genomik DNA'lar, 100 µl DNA Rehydration solüsyonu'nda 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

Genomik DNA'ların miktarları nanodropta ölçüldü, ayrıca elektroforezde yürütülerek *Biorad Gel Analyzer* (ChemiDoc MP 731BR01164) ile analiz edildi. Kullanıma hazır hale gelen bakteri izolatlarının genomik DNA'ları +4 °C muhafaza edildi.

Bu genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 27F'(5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ileri ve 1494R' (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA) geri 16S rRNA universal primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR reaksiyon şartları şu şekildedir: 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mMTris-

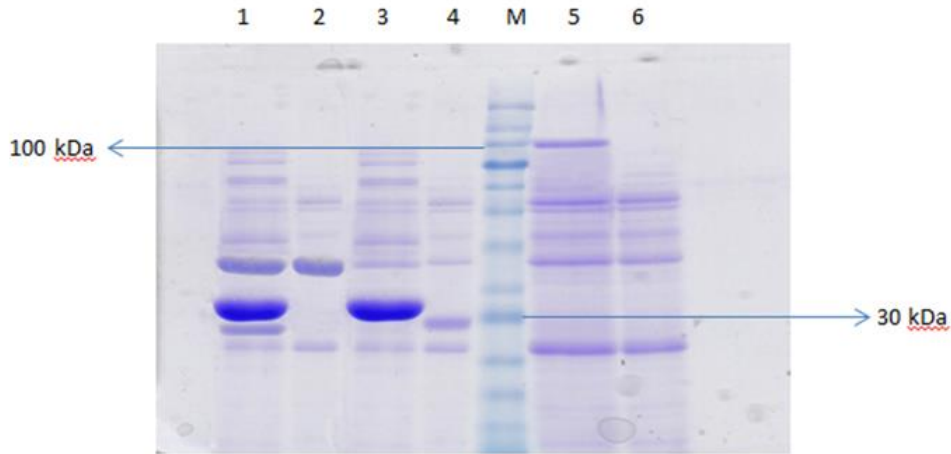
HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl lik PCR tüplerinde 'Biometra Personal Cycler' marka PCR cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu şu şekildedir: ilk denatürasyon basamağı 95 °C de 2dk, sonrasında 36 döngü olacak şekilde 94 °C 1 dk (denatürasyon), 56 °C de 1 dk (hibridizasyon) ve 72 °C de 2 dk (polimerasyon) olacak gerçekleştirilmiştir. PCR'ın ardından oluşturulan ürünler %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek *Biorad Gel Analyzer* (ChemiDoc MP 731BR01164) ile analiz edilerek resimlendi. Elde edilen 16S rRNA genleri Macrogen firmasına (Hollanda) gönderilerek 27F (5'-AGAGTTTGATCMGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerler kullanılarak sekans ettirildi. Sekans analizi sonrasında primerlere ait okumalar karşılaştırılarak her organizmaya ait FASTA formatında 16S rRNA geni nükleotit dizileri elde edildi. Elde edilen 16S rRNA geni nükleotit dizileri sırası Ek-1'de verildi.

İzolatların 16S rRNA gen bölgesine ait sekans analizleri tamamlandıktan sonra elde edilen diziler, EzTaxon Server (Kim ve ark., 2012b) ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanlarına yüklenmiştir. Bu platformlardaki global hizalama araçları kullanılarak izolatların en yakın akraba mikroorganizmaları belirlenmiş ve bu türlerle olan 16S rRNA nükleotit dizi benzerlik oranları hesaplanmıştır. Filogenetik analizler için MEGA 6 yazılımı kullanılmış ve çoklu hizalamalar Clustal-W algoritması (Tamura ve ark., 2013) ile gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaçlar neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987), maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) ve maximum-parsimony (Fitch, 1971) algoritmalarına dayanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık matrisi olarak Jukes-Cantor (Jukes ve Cantor, 1969) yöntemi tercih edilmiştir. Filogenetik ağaçların güvenilirliği, 1000 tekrarlı bootstrap analizi (Felsenstein, 1985) ile değerlendirilmiştir.

2.6. Çalışmada Kullanılan Rekombinant Bakteriler

Çalışmada, yukarıda da belirtildiği gibi daha önce gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen ligninolitik genleri içeren klonlar kullanılmıştır (Özer., 2018. Tübitak 104T286). Kullanılan klonlar şunlardır:

- Klonlama hücresi olarak kullanılan pMA0911 plazmidini içeren *Bacillus subtilis* WB800 hücresi (BSWB800/PMA),
- *Bacillus megaterium* bakterisine ait lakkaz enzim geninin klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 (BSWB800/PMA-*BmgLac* (Lak Klon))
- *Rhodococcus jostii* bakterisine ait lignin peroksidaz enzim geninin klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 (BSWB800/PMA-*RjoLiP* (Lig Klon)),
- GSTaz, lakkaz ve lignin peroksidaz genlerini füzyon düzeninde klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 (BSWB800/PMA-*kpnGst-BmgLac-RjoLiP*_füz (Füzyon)),
- GSTaz, lakkaz ve lignin peroksidaz genlerini operon düzeninde klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 (BSWB800/PMA-*kpnGst-BmgLac-RjoLiP*_ope (operon)),
- *Bacillus subtilis* WB800 hücresi



Şekil 4. Çalışmada kullanılacak olan rekombinant ligninolitik enzimlere ait SDS-PAGE görüntüsü. *Bacillus subtilis* WB800 hücresindeki çözünür proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü, 1: Üç enzimin operon düzeninde oluşturulan protein bantları; 2: Lignin peroksidaz; 3. GST; 4: Lakkaz; M: Marker; 5: Füzyon; 6: *Bacillus* WB800 kontrol hücresi (Özer A., 2018).

Çalışmada kullanılan rekombinant enzimlere ait optimizasyon deneyleri yukarıda da ifade edildiği şekilde Özer (Özer., 2018) tarafından yapılan çalışmada ortaya çıkarılmış olup bu bilgiler ifade edilen kaynaktan elde edilmiştir. Bu kapsamda rekombinant lakkaz, lignin peroksidaz, lakkaz-GSTaz-LiP operon ve lakkaz-GSTaz-LiP füzyonunun optimum

pH, optimum sıcaklık değerleri dikkate alınarak atık su uygulamalarında ortam şartları oluşturuldu.

2.7. Bakteriyel İzolatların Üreme Optimizasyonu

2.7.1. Bakteriyolojik LB besiyerinde Üreme Optimizasyonu.

İzole edilen bakteriyal izolatların öncelikle farklı pH'larda (4,0-9,0) hazırlanan bakteriyolojik LB besiyerlerinde izolatların optimum üreme pH'sı belirlendi. Hazırlanan kültürlerde 18 saat inkübasyon sonucunda üremeleri OD₆₀₀ nm de spektrometrik olarak ölçülerek optimum üredikleri pH belirlendi. Optimum pH'sı belirlenen bakteriyel izolatlar optimum pH da hazırlanan LB besiyeriyle değişik sıcaklıklarda (20-45 °C) üremeleri 18 saatlik inkübasyonlarının ardından OD₆₀₀ nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlendi.

2.7.2. Kraft Lignin İçeren Besiyerinde Üremesinin araştırılması

Fabrika atık sularından izole edilen ligninolitik yaban tip bakteriler, lignin içeren sıvı besiyerinde üreme, renk açılması ve lignin degradasyonu açısından test edildi. Bu işlem için % 0,5 kraft lignin içeren besiyeri hazırlandı. Hazırlanan ligninli sıvı besiyerinin içeriği şu şekildedir: %0,50 oranında kraft lignin, g⁻¹: KH₂PO₄ 1g, C₄H₁₂N₂O₆ 0,5g, CuSO₄.5H₂O 0,001g, MgSO₄.7H₂O 0,5g, Fe₂(SO₄)₃ 0,001g, Maya özütü 0,01g, CaCl₂.2H₂O 0,01g, MnSO₄.H₂O 0,001g şeklindedir. Kraft lignin içeren minimal besiyeri kullanılarak üç bakteriyel izolatın bu besiyerinde üretim optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle farklı pH'larda (pH 4,0-9,0 [0,5 aralık]) hazırlanan ligninli besiyerlerinde bakterilerin üreme, renk açılması ve lignin degradasyonu ölçümleri yapılarak izolatların kraft lignini degrade etme kapasiteleri belirlendi. Ayrıca belirlenen optimum pH'da %0,5 oranında lignin içeren kültür besiyeri hazırlanarak 20-45 °C sıcaklıklarında 48 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan spektrofotometrik ölçümler ile optimum sıcaklıkları belirlendi. Kültürlerdeki bakteri üremesi OD₆₀₀ spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. Kültürlerdeki lignin degradasyonu OD₂₈₀'de, renk açılması ise OD₄₆₅'de yapılan spektrofotometrik absorbans ölçümleri ile belirlendi. Lignin degradasyon oranı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ Degredasyon} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

Kültürlerdeki renk değişimi ise şu formülle hesaplandı:

$$\% \text{ Renk açılması} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

Bu çalışma sonucunda izolatların besiyeri ortamında lignini degrede etme özelliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2.8. Ligninolitik Bakteriyal İzolatların Ligninolitik Enzim Aktivitelerin Test Edilmesi

Bir önceki basamakta Kraft lignini degrede edebildiği gösterilen üç adet bakteriyal izolatın sahip olduğu ligninolitik enzim aktiviteleri aktivite testleri yardımıyla spektrofotometrik olarak araştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki enzim aktivite testleri gerçekleştirildi.

2.8.1. Lignin Peroksidaz Aktivitesi

Bakterilerin kraft lignin içeren minimal besiyerinde optimum üreme sıcaklığı olan 37 °C’de 3 günlük inkübasyonu ile elde edilen kültürler 10.000 rpm de 10 dk çöktürülmesiyle elde edilen süpernatant lignin peroksidaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanıldı. Lignin peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak ABTS kullanıldı. Standart aktivite belirlenmesi için 100 µl süpernatant, 200 µl tampon pH:6 (50 mM), 50µl ABTS (10 mM), 50µl H₂O₂ (5 mmol) ve 600 µl su ile 1ml son hacim olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve 30 °C de 10 dakika inkübe edilerek 420 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi (Ahmad 2011).

2.8.2. Lakkaz Aktivitesi

Bakterilerin kraft lignin içeren minimal besiyerinde optimum sıcaklığı olan 37 °C’de 3 günlük inkübasyonu ile elde edilen kültürler 10.000 rpm de 10 dk çöktürülmesiyle elde

edilen süpernatant lakkaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanıldı. Lakkaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak ABTS kullanıldı. Aktivite için 100 µl süpernatant, 200 µl tampon pH:6 (50 mM), 50µl ABTS (10mM), ve 650 µl su ile 1ml son hacim olacak şekilde 30 °C de 10 dakika inkübe edilerek 420 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. (Barapatre vd., 2017).

2.8.3. Mangan Peroksidaz Aktivitesi

Bakterilerin kraft lignin içeren minimal besiyerinde optimum sıcaklığı olan 37 °C’de 3 gün inkübasyonu ile elde edilen kültürler 10.000 rpm de 10 dk çöktürülmesiyle elde edilen süpernatant mangan peroksidaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanıldı. Mangan peroksidaz enzim aktivitesi için çöktürülen kültürlerin süpernatant kısmından reaksiyon karışımına 500 µl enzim, 300µl quaiacol (4 mmol), 1500 µl pH; 6,0 buffer (50 mM), 60 µl MnSO₄ (10 mmol), 60 µl H₂O₂ (5 mmol) ve 580 µl su eklendi, 30 °C de 2 dk inkübe edildi. 465 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapılarak aktivite belirlendi (War-iishi vd., 1992).

2.9. Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Kısmi Karakterizasyonu

Yapılan enzim aktivite testleri ve petri deneylerine bağlı olarak seçilen üç adet ligninolitik izolattan SA3’ün lakkaz aktivitesine sahip olduğu, SA1 ve SA6’nın lignin peroksidaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Mangan peroksidaz aktivitesine sahip bir izolat tespit edilememiştir. Bu yüzden kısmi enzim karakterizasyonunda mangan peroksidaz çalışılmamıştır.

2.9.1. Lignin Peroksidaz Kısmi Karakterizasyonu

Kraft lignin içeren besiyerinde üç gün boyunca ligninolitik bakteriyel izolatların optimum sıcaklığı olan 37 °C de 3 gün boyunca çalkalanarak inkübe edilen bakteri kültürlerinin 10.000 rpm’de 10 dk çöktürülmesi sonucu elde edilen süpernatant lignin peroksidazın kısmi karakterizasyon çalışmasında kullanıldı. Bu amaç için standart enzim aktivite reaksiyonları gerçekleştirildi. Öncelikle enzim aktivitesi için optimum pH araştırıldı. pH

2,0-9,0 arasında 37 °C’de reaksiyonlar gerçekleştirdi. Bu amaçla tampon sistemi olarak 50 mM Glisin tampon (pH 2,0-3,0), 50 mM sitrat tamponu (pH 3,5-6,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve 50 mM Glisin tamponu (pH 9,0) kullanıldı. Yapılan üç tekrarlı çalışmalar sonucunda lignin peroksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH belirlendi. İzolatlara ait lignin peroksidazların optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi için standart reaksiyonlar bir önceki aşamada belirlenen optimum pH’da reaksiyonlar hazırlanarak 20, 25, 30, 35, 37, 40 ve 45 °C’de bekletilerek spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi.

2.9.2. Lakkaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu

Lignin besiyerinde ligninolitik bakteriyel izolatların optimum sıcaklığı olan 37 °C de bakterilerin üç günlük inkbasyonaları sonucunda kültürler 10.000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöktürülen kültürlerin sparnatantları alınak lakkazın kısmı karakterizasyonlarında kullanıldı. Değişik pH aralıklarında (pH;2,0-9,0) 37 °C de standart enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülerek lakkaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH belirlendi. Optimum pH aktivite çalışmalarında 50 mM Glisin tampon (pH 2,0-3,0), 50 mM sitrat tamponu (pH 3,0-6,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve 50 mM Glisin tamponu (pH 9,0) tampon sistemleri kullanıldı.

İzolatlara ait lakkaz enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için optimum pH’da gerçekleştirilen standart aktivite deneyi ile 20, 25, 30, 35, 37, 40 ve 45 °C ye ayarlanmış ısıtıcılarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile yapıldı.

2.10. Bakteriyal İzolatlara Ait Ligninolitik Enzimlerinin SDS-PAGE ve Zimogram analizleri

Bakterilerin ligninolitik enzimlerinin SDS-PAGE protein profillerinin belirlenmesi için fermentasyon besiyeri kullanıldı. Besiyerinin içeriği şu şekildedir: 0,8 g/L glukoz, 10,5 g/L pepton, 15 g/L maya özütü, 0,3 g/L MgSO₄·7H₂O, 4 g/L sodyum sitrat, 1 g/L CaCl₂, 1 g/L NaCl ve 1 g/L FeSO₄·7H₂O içeren fermentasyon besiyeri (FB) hazırlandı. Besiyeri, 121 °C’de 20 dakika boyunca otoklav edilerek steril edildi. Otoklav işleminden sonra, lig-

ninolitik enzimlerin kültür ortamında indüklenmesi amacıyla filtre ile steril edilerek 4 ml/L guaiakol ilave edildi. Bakteriyel izolatlar, FB besiyerinde gerçekleştirilen 48 saatlik kültürlerinin ardından 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Kültür süpernatantı direkt olarak enzim ekstraktı olarak alındı. Ayrıca, elde edilen pellet sonikasyonla patlatılarak santrifüjlenmesinin ardından hücre içi çözünebilir proteinler elde edildi. Elde edilen protein örneklerinin konsantrasyonu Bradford ve ark. (1976)'nin geliştirdikleri metoda göre ölçüldü. Bu şekilde elde edilen hücre içi ve hücre dışı proteinler eşit miktarlarda (10 µg) SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Protein jel elektroforezleri Hoeffer SE 600 marka elektroforez ünitesinde %12'lik jel kullanılarak 13 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 SDS; %20 Gliserol; %6 β-merkaptoetanol) tamponu ilave edildi. Örnekler 95 °C'de 5 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, %10 Asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solüsyonunda (%7 asetik asit, %5 metanol, %88ddH₂O) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

Zimogram analizleri için bakteriyel izolatlar FB besiyerinde gerçekleştirilen 48 saatlik inkübasyonun ardından kültürler 10.000 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek çöktürüldü. Herbir enzime ait zimogram analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, lignin peroksidaz enzimi için ABTS, lakkaz enzimi için substrat olarak quaiacol kullanıldı. SDS-PAGE analizinde ifade edildiği gibi elde edilen hücre içi ve hücre dışı proteinlerden uygun miktarlarda (10 µg) alınarak bu ürüne eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8 ve %20 Gliserol) ilave edildikten sonra, numuneler %12'lik doğal poliakrilamid jeline (PAGE) yüklendi. 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 13 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi sonrasında lignin peroksidaz enzim aktivitesi doğal PAGE jel 50 mM glisin tamponu (pH 3,0) içerisinde substrat olarak 10 mM ABTS ve 0,75 ml %3 H₂O₂ ile hazırlanan solüsyon içerisinde 37 °C de 1 saat inkübe edilerek yeşil-sarı aktivite bantının oluşması için takip edildi (Ahmad 2011). Lakkaza ait zimogram analizi için ise doğal PAGE'e yüklenen protein örneklerinin elektroforezi sonucunda elde edilen

jel 50 mM fosfat tamponunda (pH 5,0) substrat olarak 4 mmol quaiacol ile hazırlanan solüsyon ile 37 °C de 1 saat inkübe edilerek ilgili bant oluşumu takip edildi (Wilkesman vd., 2014).

2.11. Atık Su Çalışmalarında Bakterilerin Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu.

KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen TÜBİTAK 104T286 kapsamında üretilen rekombinant bakterilerin karaft ligninli besiyerindeki optimum üreme şartları belirlenmişti. Ancak toplanan atık sularda optimum üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması optimizasyonu yapılmamıştı. Bundan dolayı atık sulardaki biyoremediasyon özelliklerinin etkinliğinin araştırılması için hem yeni izole edilen ligninolitik bakteriyel izolatlar hem de rekombinant bakterilerin atık sulardaki optimizasyonu aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

2.11.1. Zeytin Atık Suyunda Optimizasyon

Zeytin fabrikalarından alınan atık sular fenolik bileşikler ve kirlilik konsantrasyonu açısından oldukça yoğun olduğundan zeytin atık suyundaki bu yoğun kirliliğin bakteriyel izolatların üremesini inhibe edebilme olasılığı yüksektir. Bu durumdan dolayı yapılan optimizasyon çalışmalarında öncelikle bakterilerin üreyebildikleri en yüksek atık su konsantrasyonları test edildi. Bu amaçla %10-20-30-40-50-75 oranlarında zeytin atık suyu içerecek şekilde minimal besiyeri ile sulandırılan kültürler hazırlanarak bakteriyel izolatların ve rekombinant *Bacillus subtilis* W800 klonlarının üreme optimizasyonu çalışmaları yapıldı. Bu amaçla kullanılan minimal besiyerinin içeriği şu şekildedir: litre başına 1,0 g (NH₄)₂SO₄, 1,0 g K₂HPO₄, 1,0 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g CaCl₂, 0,05 g FeSO₄, 0,005g CuCl₂, 0,02 g MnSO₄, pH 7,0 olacak şekilde hazırlandı. Belirlenen atık su minimal besiyeri dilüsyonlarında bakteriyel izolatların önceden belirlenen optimum sıcaklık ve pH şartlarında 2 gün boyunca inkübe edildiler. Kültürlerdeki bakterilerin üremeleri OD₆₀₀ de spektrofotometrik olarak takip edildi. İnkübasyon sonucunda 465 nm’de kültürdeki renk açılması ve 280 nm’de lignin degradasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bakterilerin üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması kriterleri göz önüne alınarak en yüksek ak-

tivite gösterdikleri atık su konsantrasyonu yapılacak olan bakteri-zeytin atık suyu muamelesi için kullanılacak atık su konsantrasyonu olarak belirlendi ve bu aşamadan sonra yapılan tüm üreme deneylerinde belirlenen oranda zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri kullanıldı.

Bakteriyel izolatlar ve rekombinant bakterilerin üremesi için kullanılacak optimum atık su konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından zeytin atık suyu ile bakterilerin muamelesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir; 250 ml'lik erlende 50 ml son hacim olacak şekilde yukarıdaki çalışmada belirlenmiş olan atık su konsantrasyonu + uygun miktardaki minimal besiyeri ile dilue edilerek minimal besiyeri ortamı hazırlandı. İlgili her bir bakteriden hazırlanan taze gece kültürlerinden $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde zeytin atık suyu içeren kültür ortamına aşılama yapılarak hazırlanan kültürler 37 °C 120 rpm de 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerlerinde gerekli testler gerçekleştirildi. Ayrıca, her üç ligninolitik bakteriyel izolatların atık sularda konsorsiyum olacak şekilde etkisini GC-MS analizleriye belirlemek için bakteriyel izolatların gece kültürlerinden toplam $OD_{600} = 0,3$ olacak şekilde her birinden $OD_{600}=0,1$ alınarak oluşturulan konsorsiyum, zeytin atık suyu minimal besiyeriyle 6 gün boyunca inkübasyona bırakılması sonucunda GC-MS analizleri yapılmıştır.

2.11.2. Tekstil Atık Suyunda Optimizasyon

Tekstil fabrikasından alınan atık sular %10-20-30-40-50-60-75 konsantrasyonlarında minimal besiyeri ile seyreltilerek yapılan tekrarlı ölçümler sonucunda bakterilerin üreyebildiği en yüksek tekstil atık suyu kültür konsantrasyonu belirlendi. Bu işlem için test edilen bakteriler önceden kraft lignin içeren besiyerinde belirlenen optimum üreme şartları sağlanarak değişik dilüsyonlardaki tekstil atık suyu içeren minimal besiyerine inokülasyonları yapıldı. Kültürlerin 120 rpm'de 2 günlük inkübasyonları sonucunda OD_{600} 'de spektrofotometrik olarak optimum üremeleri belirlendi. Aynı zamanda 465 nm'de renk açılması ve 280 nm'de lignin degradasyonu spektrofotometrik olarak inkübasyon sonucunda ölçüldü. Her üç parametre yönünden yapılan üç tekrarlı ölçümler sonucunda belirlenen en iyi aktivitenin olduğu en yüksek tekstil atık suyu konsantrasyonu yapılacak çalışmalarda kültür ortamı olacak şekilde belirlendi ve bu aşamadan sonra yapılan tüm üreme deneylerinde belirlenen oranda tekstil atık suyu içeren minimal besiyer kullanıldı.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum tekstil atık suyu konsantrasyonu kullanılarak oluşturulan besiyerinde bakterilerin kültürel ortamda tekstil atık suyu ile muamelesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir; 250 ml'lik erlende 50 ml son hacim olacak şekilde yukarıda çalışmada belirlenen atık su konsantrasyonu uygun miktardaki minimal besiyeri ile seyreltilerek kültür ortamı hazırlandı ve bakteriler inoküle edildi. Her bir bakteriden hazırlanan taze gece kültürlerinden $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde hazırlanan dilusyonlu tekstil atık suyu minimal besiyerlerine aşılama yapıldı ve 37 °C 120 rpm de 6 gün boyunca inkübasyon sonucunda gerekli testler gerçekleştirildi. Bunun yanında, her üç ligninolitik bakteriyel izolatın tekstil atık suyunda konsorsiyum oluşturacak şekilde muamele çalışmaları yapıldı. Bu muamelenin ardından, GC-MS analizi ile muamele öncesi ve sonrası oluşacak değişimler belirlenmedi. Bu amaçla bakteriyel izolatların gece kültürlerinden toplam $OD_{600} = 0,3$ olacak şekilde her birinden $OD_{600} = 0,1$ alınarak oluşturulan konsorsiyum, tekstil atık suyu minimal besiyeriyle 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve ardından GC-MS analizleri yapılmıştır.

2.11.3. Kâğıt Atık Suyunda Optimizasyon

Kâğıt fabrikasından alınan atık sularda bakterilerin üreyebildiği en yüksek kâğıt atık suyu konsantrasyonunun belirlenmesi için %10-20-30-40-50-75 konsantrasyonlarında minimal besiyeri ile dilüsyonlu kültürler hazırlandı. Bakterilerin optimum üreme gösterdiği şartlarda hazırlanan dilüsyonlu kâğıt atık suyu minimal besiyerleri ile bakterilerin inokülasyonu sonucu kültürlerdeki değişimler takip edildi. 37 °C 120 rpm de 2 günlük inkübasyon sonucunda bakteri üremeleri OD_{600} 'de, renk açılması 465 nm'de ve lignin degradasyonu 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bakteriyel üremenin yanında kültürlerde meydana gelen lignin degradasyonu ve renk açılması optimizasyonun belirlenmesinde kriterler olarak kullanıldı. Yapılan tekrarlı ölçümler sonucunda bu kriterler göz önüne alınarak bakterilerin üreyebildiği en yüksek kâğıt atık suyu konsantrasyonu çalışmalarda kullanılmak üzere belirlendi ve bu aşamadan sonra yapılan tüm üreme deneylerinde belirlenen oranda kâğıt atık suyu içeren minimal besiyer kullanıldı.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda çalışmada kullanılacak kâğıt atık suyu konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından dilusyonlu kâğıt atık suyu minimal besiyerine bakterilerin inokülasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 250 ml'lik erlenlerde yukarıdaki

Çalışma sonucu belirlenen kağıt atık suyu konsantrasyonunu içeren minimal besiyerden 50 ml'lik kültür muamele ortamı hazırlandı ve bakteriler ile muamelesi yapıldı. Bakterilerden hazırlanan taze gece kültürlerinden $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde hazırlanan kültür ortamına aşılama yapılarak 37 °C 120 rpm'de 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gerekli testler yapıldı. Kağıt atık suyunda yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında, bakteriyel izolatların kağıt atık suyunda konsorsiyum etkisini belirlemek için GC-MS analizleri yapılmıştır. Her üç ligninolitik bakteriyel izolatın gece kültürlerinden toplam $OD_{600} = 0,3$ olacak şekilde her birinden $OD_{600} = 0,1$ alınarak oluşturulan konsorsiyum, kağıt atık suyu minimal besiyeriyle 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

2.12. Atık Suların Rekombinant Bakteriler ve Bakteriyel İzolatlarla Muamelesi Sonrası Yapılan Analizler

Çalışmada kullanılan bakterilerin atık suların optimizasyonları sonucunda belirlenen şartlarda atık suları içeren minimal besiyerlerin de 6 günlük inkübasyon çalışmaları sonucunda elde edilen kültürler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. ktrme sonucu süpernatant kısımları alınarak gerekli analizler gerçekleştirildi. Analizlerde lignin degradasyonu, renk açılması, pH değişimi, ICP-MS ile ağır metal analizleri, inkübasyon sonrasında kültürlerde meydana gelen moleküllerin değişimi (GC-MS) analizleri ve fitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi.

2.12.1. Lignin Degradasyonunun Belirlenmesi

Bakteriler ile atık su içeren minimal besiyerlerin 6 günlük muameleleri sonucunda çöktürülen kültürlerin süpernatant kısmından alınan örnekler ile kültürlerde meydana gelen lignin degradasyonu ölçümleri günlük takip edildi. Bakteriler ile atık su kültürlerinin başlangıç absorbansları sıfırıncı dakikaya alınan örneklerin spektrofotometre de 280 nm'de ölçülmesiyle belirlendi. Herbir rneklemeye alınan örnekler lignin degradasyonu için spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol olarak aynı inkübasyon şartlarında bekletilmiş herhangi bir bakteriyel izolat inoküle edilmemiş atık su içeren besiyerler kullanıldı. Kültürlerdeki lignin degradasyon oranlarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ Degredasyon} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

2.12.2. Renk Açılması Ölçümü

Bakteriler ile atık suları içeren minimal besiyerlerin muamelesi sonucu kültürlerde meydana gelen renk değişikliği aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi. Bakteriler ile inoküle edilen atık su içeren minimal besiyerlerin başlangıç absorbansları sıfırıncı dakikada alınan örneklerin spektrofotometre de 465 nm’de ölçülmesiyle belirlendi. Bakteriyel izolatlar ile optimum kültür şartlarında 6 gün inkübasyonu yapılan atık su muamele minimal kültürlerinin takibi günlük yapılmıştır. Günlük yapılan örneklem kültürleri çöktürüldü ve süpernatantlardan alınan numuneler 465 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek absorbansları belirlendi. Kontrol olarak aynı inkübasyon şartlarında bekletilmiş herhangi bir bakteriyel izolat inoküle edilmemiş atık su içeren minimal besiyerler kullanıldı. Her bir örnek kendi kontrolüne karşı aşağıdaki formül kullanılarak kültürlerde inkübasyon sonucunda meydana gelen renk açılması yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Renk açılması} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

2.12.3. pH Değişimleri

Toplanan atık suları optimum oranda içeren minimal besiyerinde üretilen bakteriyel izolatlar ve rekombinant bakteriler ile 6 günlük inkübasyonları süresince pH değişimi günlük olarak ölçülerek takip edildi. Kültürlerden günlük alınan örnekler moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarındaki pH metre yardımıyla ölçülerek inkübasyon sonucunda kültür ortamında meydana gelen pH değişimi belirlendi.

2.12.4. Ağır Metal Ölçümü

Toplanan atık suları optimum oranda içeren minimal besiyerinde bakterilerin inokülasyonu ve altı günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen kültürlerde bulunan ağır metallerde meydana gelen değişimler ICP-MS ile belirlenmiştir. ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) ve Kütle Spektrometresi (MS) olmak üzere iki ünitenin bileşiminden oluşmaktadır. Herbir atık suyu içeren minimal besiyeri ile bakterilerin inokülasyonu yukarıda ifade edildiği gibi altı gün olarak gerçekleştirildi ve bu sürenin sonunda kültürlerin santrifüjlenmesinin sonucunda elde edilen kültür süpernatantı ICP-MS ile hizmet alımı yöntemi ile analiz edildi. Bu işlemde numunedeki elementler ICP’de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine (MS) gönderilir ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak ölçümleri yapılır. Kontrol olarak herbir atık suyu içeren minimal besiyerlerin bakteri inokülasyonu yapılmayan formları kullanıldı.

2.12.5. GC-MS Analizleri

Herbir atık suyu içeren minimal besiyerlerin belirlenen optimum şartlarda bakteriler ile inokülasyonu ile oluşan kültürleri 6 gün sonunda 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek kültürler çöktürüldü. Bu aşamadan sonra GC-MS analizi için 2 farklı yöntem uygulandı. Yöntemlerden biri örneklerin içerdiği uçucu moleküllerin diğeri ise uçucu olmayan moleküllerin GC-MS analizi için kullanılmıştır. İlk yöntemde elde edilen kültür süpernatantı hiçbir muameleye tabi tutulmadan direk olarak GC-MS cihazında analiz edildi. Bunun için 5 μ L numune GC-MS enjektör portuna enjekte edildi (Shimadzu Corporation, GC-2014C, Japonya). DB-FFAP kılcal kolon (30m x 0,25 μ m x 0,25 mm) (Agilent Technologies, Wilmington, DE, ABD) kullanılarak kolon sıcaklığı 120–280 °C’ye (dakikada 10 °C artış) ve dakikada 1,5 mL akış hızına ayarlandı. Çözücü giderme süresi 3.0 dakikaya ve elektron iyonizasyon kütle spektrumları 50–750 (m/z) aralığına ayarlandı. Kültürlerdeki lignin ve benzeri bileşiklerin bozunma ürünlerinin tespiti, test örneğindeki ürünlerin tutulma süresi ve kütle spektrumlarının Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) kütüphanesinde bulunan mevcut kütle spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi. Çalışmada kontrol olarak her bir atık suyu içeren bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmemiş minimal besiyeri kullanıldı.

İkinci yöntemde ise moleküllerin türevlendirilmesi gerçekleştirildi. Bu amaçla, bakteri kültürlerine ait süpernatantlar 6 M HCl ile pH değeri 1-2 olacak şekilde ayarlandı. Üzerine 3 hacim olacak şekilde (150 ml) etilasetat eklendi. Oluşan organik tabaka pipet yardımıyla toplandı ve susuz sodyum sülfat ile karıştırıldı. Oluşan karışım vacumlu evaporator ile kurutuldu. Sonrasında üzerine 100 µl dioxane, 10 µl pyridine takiben 50 µl trimetilsili eklenerek 60 °C de 15 dakika boyunca periyodik olarak sallanarak çözüldü. Çözülen numune GC-MS cihazında yukarıda ifade edildiği gibi analiz edildi. Çalışmada kontrol olarak her bir atık suyu içeren bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmemiş minimal besiyeri kullanıldı. Trimetilsililasyon bir bileşiğin uçuculuğunu artırmak için kullanılır ve bu da ortamdaki uçucu olmayan maddelerin GC-MS analizini mümkün kılar.

2.12.6. Fitotoksisite Çalışmaları

Bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmiş atık suları içeren minimal besiyerindeki altı günlük kültürlerden santrifüleme ile elde edilen süpernatantlar fitotoksisite değerlendirmesi amacıyla tohum çimlenme bioassay testinde kullanılmıştır. Deneyde kuru börülce fasülyesi (*Vigna unguiculata*) tohumları kullanılmıştır. Tohumlar, herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için 10 dakika boyunca %6 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi ile sterilize edilmiştir. Süre sonunda steril saf su ile tohumlar hızlıca yıkanarak tohumlar üzerinde olabilecek sodyum hipoklorit kalıntısı uzaklaştırıldı. Sterilize edilen tohumlar, önceden steril edilip kurutulan 2 kat filtre kâğıdı üzerine olacak şekilde petri kabına yerleştirildi. Her deney için geliş güzel seçilen börülce tohumlarından 10'ar adet seçildi. Bakterilerin atık sulu minimal besiyerinde 6 günlük inkübasyonunun ardından elde edilen atık sulu kültürler 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürme sonucu elde edilen süpernatantlardan 5'er ml alınarak petrilere tohumlar ıslatıldı. Petri kapakları kapatılarak tohumlar 30 °C'de karanlık bir etüvde inkübe edildi. Bakteri ile muamele edilmemiş steril atık sulu minimal besiyerler ve musluk suyu da aynı şartlar altında 2 farklı kontrol grubu olarak tohumlarla aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. 2 gün sonunda çimlenen tohum sayısı (kök ve filiz çıkışı) sayılarak çimlenme yüzdesi hesaplanmıştır. Bu amaçla çimlenme hesabı yapıldıktan sonra her bir grup tohum gövde, kök ve filizlerden amilaz enzimi izolasyonu yapıldı. Çimlenmiş/çimlenmemiş her bir grup tohum bir havan içerisinde tamamen un haline gelinceye kadar ezilerek 2 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile

örnekler çözüldü. Elde edilen çözelti 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmından alınan örnekler ile Beckman Cuolter Biyokimya cihazında amilaz enzim aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi.



3. BULGULAR

3.1. Atık Su örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Her üç fabrikadan elde edilen atık suların soğuk zincire uyularak olabildiğince kısa bir sürede laboratuvara getirilmesinin ardından herhangi bir izolasyon ve kültürleme çalışması yapılmadan öncelikle su numunelerinin Tablo 2’de belirtilen fizikokimyasal özellikleri belirlendi ve sonuçlar Tablo 1’de gösterildi.

Tablo 2. Atık su örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Parametreler	Kâğıt Fabrikası Atık suyu	Tekstil Fabrikası Atık suyu	Zeytin Tesisi Atık Suyu
pH	7,4	7,2	5,0
KOİ	31291	1320	28600
Sülfat	550	340	630
TDS	415	403	416
TSS	500	600	600
Renk	1940	1210	2520
Nitratlar	134	186	198
Lignin	8240	3420	5310

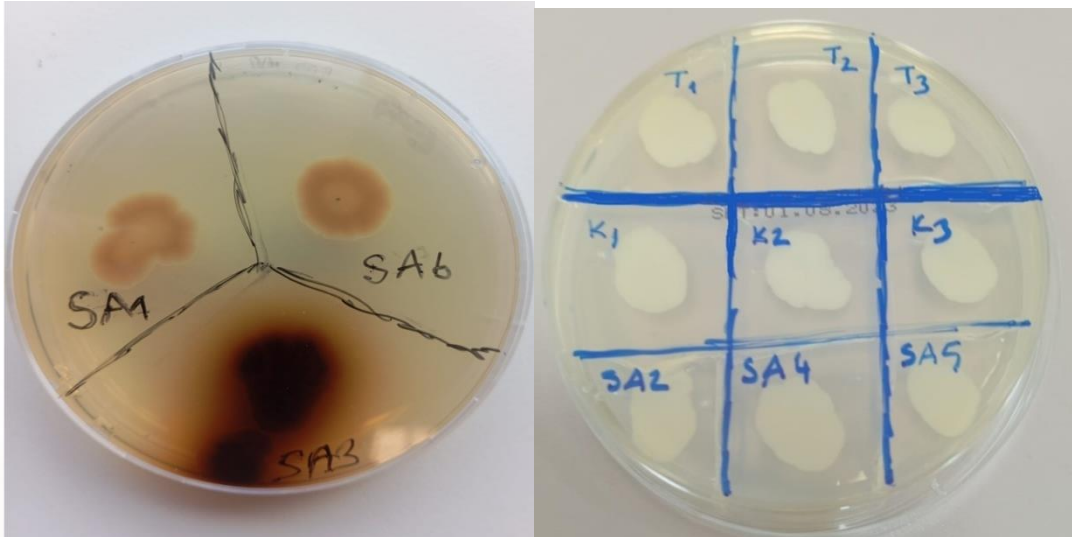
3.2. Atık Sulardan Bakteri İzolasyonu

Soğuk zincir altında laboratuvar getirilen her bir atık sudan ayrı ayrı bakteri izolasyonu çalışmaları yapıldı. Ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin üreyebildiği seçici besiyerine 5’er ml her bir atık suyun ekimiyle yapılan ilk çalışmada zeytin atık suyundan 3 bakteri izole edilirken diğer atık sulardan bakteri izolasyonu bu çalışmada yapılamadı. İkinci çalışmada ise 0,45 mikronluk filtrelerle yapılan atık suların süzülmesi sonucu seçici besiyerli ligninli agara yapılan ekimlerde zeytin atık suyundan 2 adet bakteri izole edilirken tekstil atık suyundan 1 ve kâğıt atık sduyunda 1 bakteri izolasyonu yapıldı. Toplanan

atık sular her hangi bir işleme tabi tutulmaksızın bakteriyolojik LB içerisine direk yapılan 5'er ml'lik atık su inokülasyonu sonucunda ise zeytin atık suyundan 1, tekstil atık suyundan 2 ve kağıt atık suyundan 2 bakteri izolasyonu yapıldı. Yapılan tüm izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 12 adet bakteriyel izolat elde edildi. Saf kültürlerin eldesinin ardından kâğıt atık suyundan izole edilen bakteriler K1, K2 ve K3, tekstil atık suyundan izole edilen bakteriler T1, T2 ve T3, zeytin atık suyundan izole edilen bakteriler ise SA1, SA2, SA3, SA4, SA5 ve SA6 olarak ön adlandırılmaları yapıldı. (T= Tekstil atık suyundan, K=kağıt atık suyundan ve SA= zeytin atık suyundan izole edilen izolatları göstermektedir).

3.2.1. Lakkaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel izolatların Seçimi

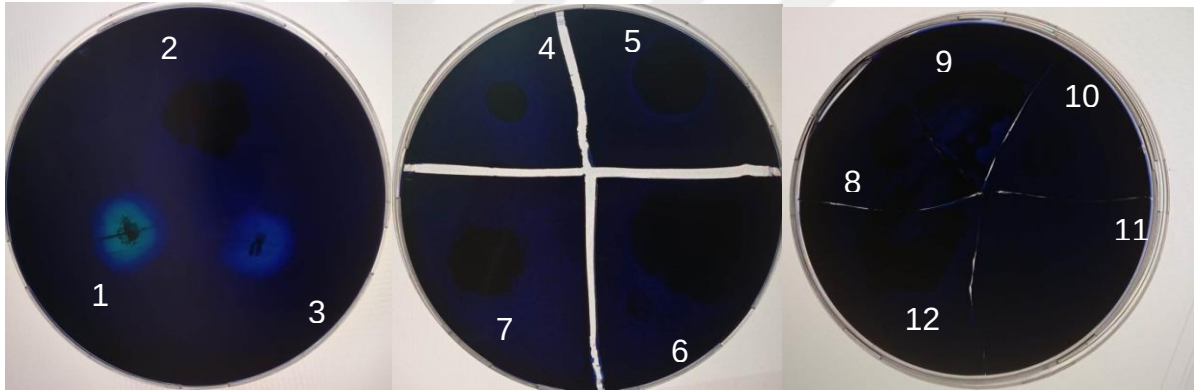
Elde edilen 12 yeni izolat arasında lakkaz aktivitesine sahip bakterilerin ortaya çıkarılması için izolatlar guaiacol içeren LB agar besiyerlerine inoküle edildi. Üç günlük inkübasyon sonucunda sonucunda kolonilerin kahverengiye dönüşümü pozitif olarak kabul edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda SA3 izolatının petri üzerinde koyu kahverengi bir görüntü oluşturduğu görüldü. Bunun yanında SA1 ve SA6 izolatlarının ise oldukça düşük lakkaz aktivitesine sahip olduğu ve diğer izolatların lakkaz enzim aktivitesi yönünden negatif olduğu belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Quaiacol içeren LB agar petrisinde lakkaz enzim aktivitesinin test sonuçları.

3.2.2. Lignin Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi

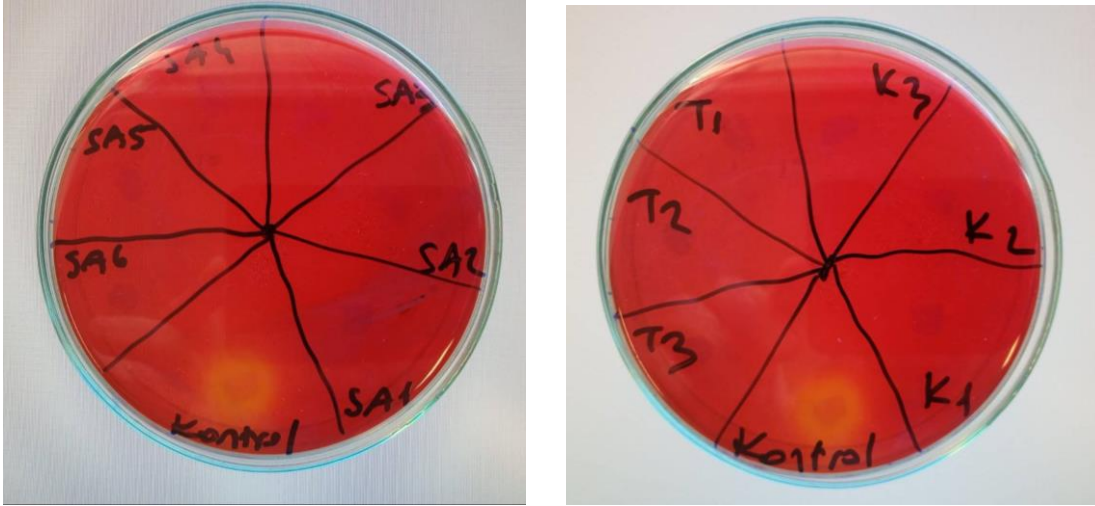
Lignin peroksidaz metilen mavisi içeren LB agar besiyerine yapılan ekimler sonucunda üreyen izolatların oluşturduğu kolonilerin etrafında oluşan açık mavi renkli zonun varlığı lignin peroksidaz enzim aktivitesi açısından pozitif olarak kabul edildi. 3 günlük inkübasyonu takiben bakterilerin üremesi sonucu oluşan koloni çapı (C) ile metilen mavisi boyasının renksizleşmesi nedeniyle oluşan bölgenin çapının (H) ölçümünün birbirine oranı (H/C) günlük olarak takip edildi. SA1 ve SA6 bakterilerinin yapılan zon ölçümlerinde en yüksek aktivite gösterdikleri belirlendi. SA1 ve SA6 bakterilerinin H:C oranı sırasıyla 2,4 ve 2,2 cm olarak belirlendi. Diğer izolatlarda her hangi bir zon oluşumu gözlenmedi (Şekil 6).



Şekil 6. İzolatların metilen mavisi içeren LB agar petrilerinde lignin peroksidaz aktivitesinin gösterimi. 1. SA1, 2. SA3, 3. SA6, 4. T1, 5. T2, 6. T3, 7. K1, 8. K2, 9. K3, 10. SA2, 11. SA4, 12. SA5.

3.2.3. Mangan Peroksidaz Aktivitesine Sahip Bakteriyel İzolatların Seçimi

Toplanan atık sulardan izole edilen bakterilerin fenol red içeren GPM seçici besiyerine inokülasyonu sonucunda petrilerde herhangi bir zon oluşumu gözlemlenmedi. Bu sonuçtan yola çıkılarak izolatların mangan peroksidaz aktivitesine sahip olmadıkları sonucuna varıldı.



Şekil 7. İzolatların fenol kırmızısı içeren GPM agar petrilerinde lignin peroksidaz aktivitesinin gösterimi. Sarı zon pozitif kontrolü göstermektedir.

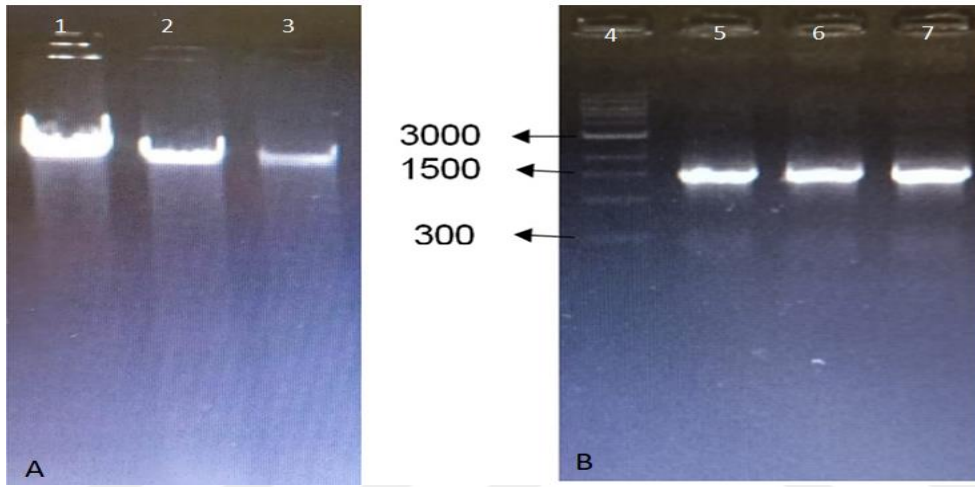
Toplanan atık sulardan izole edilen 12 izolat olmasına rağmen yapılan lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzim aktivitesi tarama çalışmaları sonucunda toplam 12 izolattan sadece ligninolitik enzim aktivitesi gösteren ve bu özellik sayesinde lignin degradasyonu yapabilecek SA1, SA3 ve SA6 izolatlarının çalışmaya dahil edilmesine karar verildi (Tablo 3).

Tablo 3. İzolatların ligninolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları.

İzolat	Lignin degradasyonu	Lignin peroksidaz	Lakkaz	Mangan peroksidaz
T1/T2/T3	-	-	-	-
K1/K2/K3	-	-	-	-
*SA1	+	+	+-	-
*SA3	+	-	+	-
*SA6	+	+	+-	-
SA2/SA4/SA5	-	-	-	-
+: Aktivite iyi / +-: Oldukça zayıf aktivite/ - : Aktivite yok				
*: Çalışmada kullanılmak üzere seçilen izolatlar				

3.3. Bakterilerin Sınıflandırılması

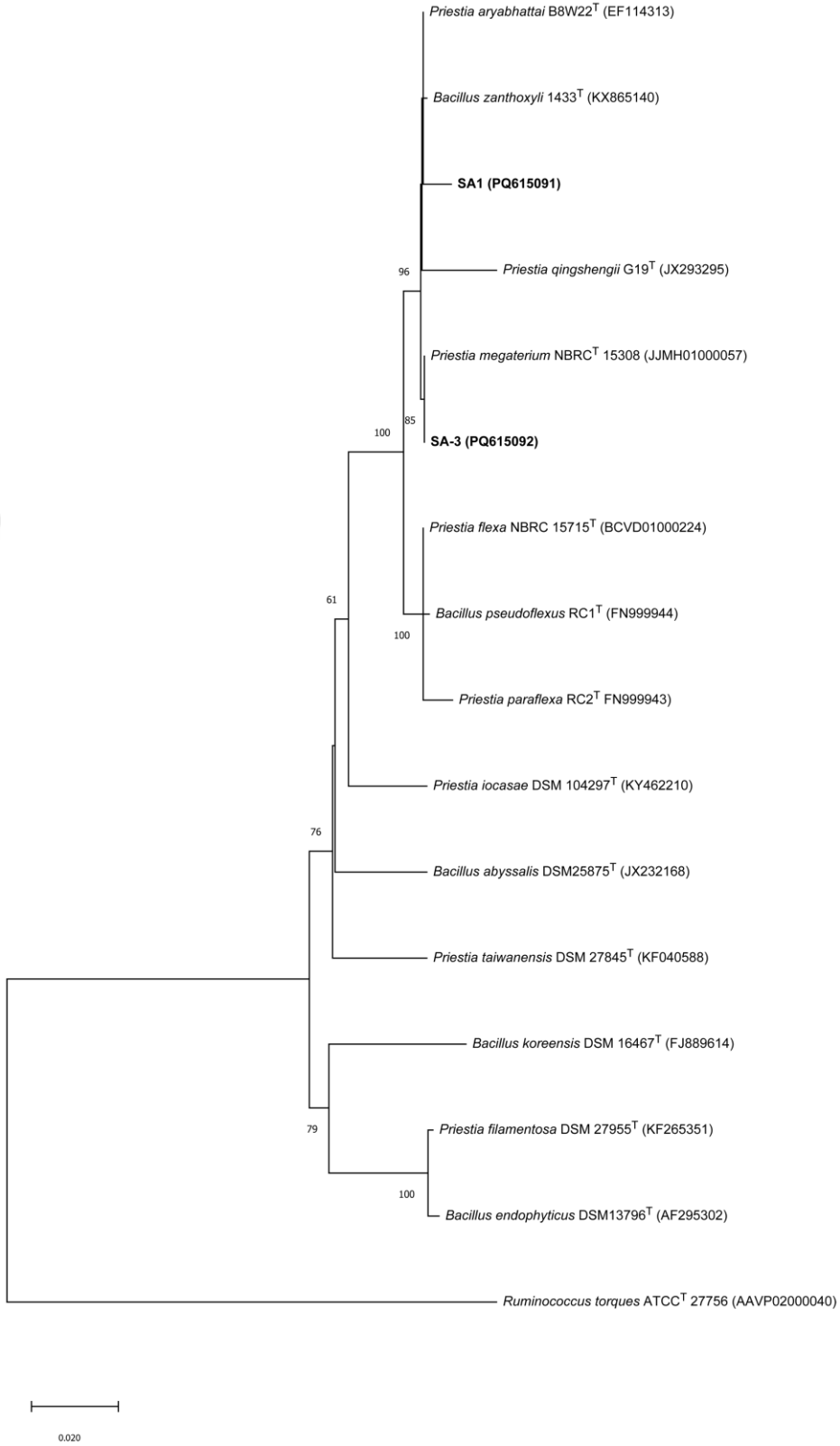
Atık sulardan izole edilen izolatların sistematığının yapılması amacıyla genomik DNA'ları izole edildi (Şekil 8A). Bu genomik DNA kullanılarak uygun üniversal primerler aracılığı ile 16S rRNA genleri PCR ile artırıldı (Şekil 8B). Elde edilen PCR ürünleri sekans ettirildi. Sekans sonucu izolatların analiz edilen nükleotid sayısı ve diğer türler ile oluşan benzerlik ve farklılıklar Tablo 3'de verilmiştir.



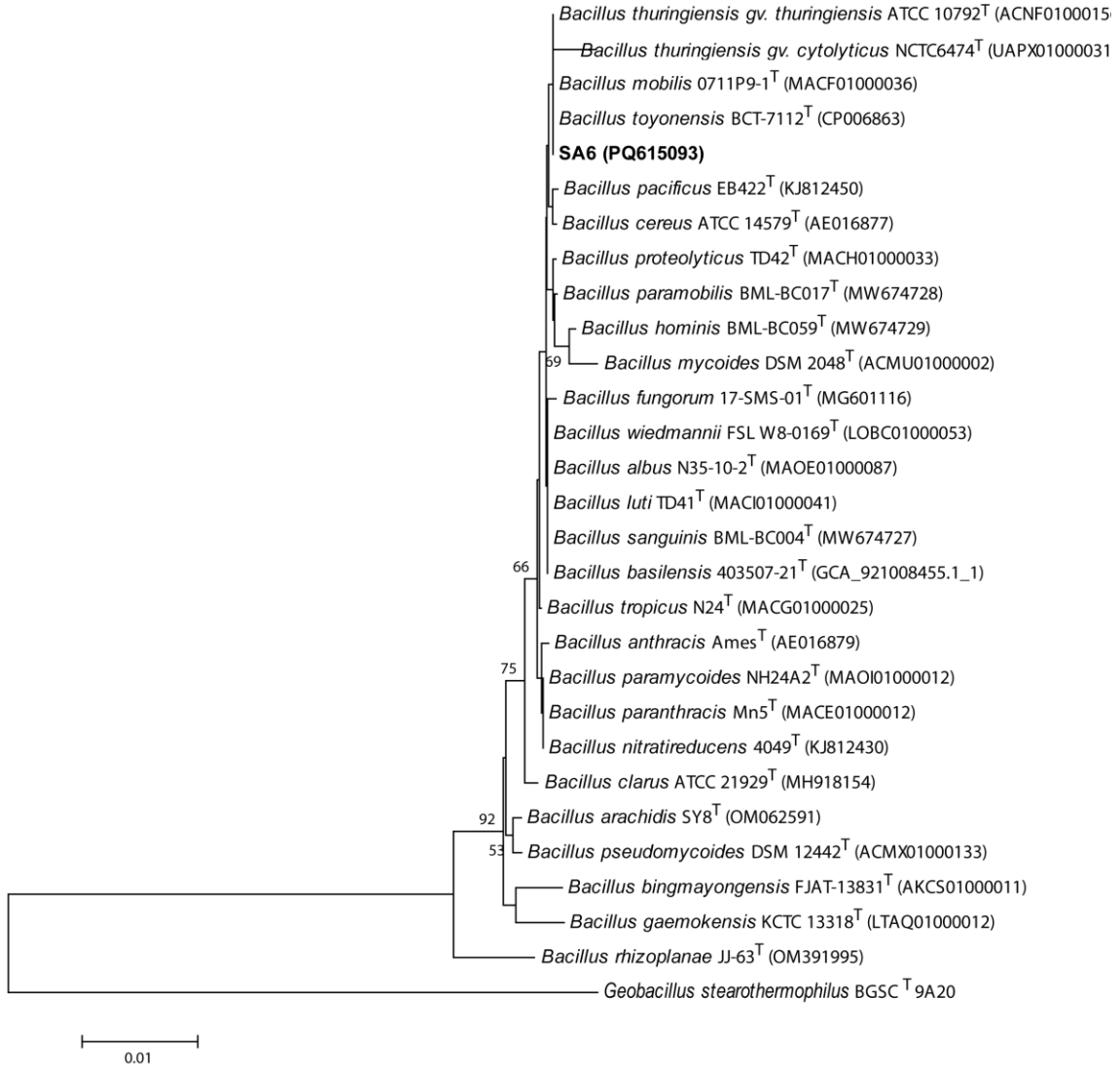
Şekil 8. İzolatlardan izole edilen genomik DNA'lar (A) ve genomik DNA'ların kalıp olarak kullanımı ile gerçekleştirilen 16S rRNA genlerine ait PCR reaksiyonlarının agaroz jel görüntüsü (B) 1. SA1, 2. SA3, 3. SA6, 4. DNA ladder, 5. SA1, 6. SA3, 7. SA6

Her bir izolat için Eztaxon ve NCBI'da yapılan nükleotid karşılaştırmalarına göre SA1 izolatının *Priestia* cinsine ait olduğu ve *Priestia aryabhatai*'a % 98,83, *Priestia megaterium*'a %98,71, *Bacillus zanthoxyl*'a %98,71, *Priestia flexa*'a %97,92 ve kalan diğer *Priestia* türlerine %97,91'in altında benzerlik gösterdiği belirlenen bu izolat *Priestia* sp. SA1 olarak isimlendirildi. SA3 izolatının ise *Priestia* cinsine ait olduğu ve *Priestia megaterium*'a %100,0, *Priestia aryabhatai*'a %9,86, *Bacillus zanthoxyl*'a %99,37 ve kalan diğer *Priestia* türlerine %98,56'nın altında benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup bu yeni izolat *Priestia* sp. SA3 olarak isimlendirildi. *Priestia* sp. SA1 ile *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatlarının 16S rRNA genleri sekans analizi sonuçlarına göre yapılan nükleotid karşılaştırmasında birbirlerine %99,41 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. *Priestia* sp. SA1 ile *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatlarının birbirlerine yakın benzerlik göstermesi dolayısıyla yapılan filogenetik ağaç çalışmalarında aynı ağaç üzerinde gösterimi

yapılmıştır. *Priestia* sp. SA1 ile *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatların 16S rRNA gen sekans analizleri sonucu elde edilen diziler ile neighbor-joining yöntemi ve MEGA6 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik Ağacı şekil 9’de verilmiştir. Yapılan sekans analizi sonucunda SA6 izolatının ise *Bacillus* cinsine ait olduğu ve *Bacillus thuringiensis*’a %99,93, *Bacillus mobilis*’a %99,93, *Bacillus toyonensis*’e % 99,93 ve diğer literatürde kalan diğer *Bacillus* türlerine %99,86-95,21 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi ve *Bacillus* sp. SA6 olarak isimlendirildi. *Bacillus* sp. SA6 izolatın 16S rRNA gen sekans analizleri sonucu elde edilen diziler ile neighbor-joining yöntemi ve MEGA6 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik Ağacı şekil 10’da verilmiştir. Bakteriyel izolatların 16S rRNA genleri sekans analizi sonuçlarına göre filogenetik ağaçları mega 6 programı kullanılarak maximum likelihood ve maksimum parsimoni yöntemlerine göre ile çizilen filogenetik ağaçları Ekler bölümünde verilmiştir (maximum likelihood (Ek-1; *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3, Ek-2; *Bacillus* sp. SA6), maximum parsimoni (Ek-3; *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3, Ek-4; *Bacillus* sp. SA6). *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının 16S rRNA genlerine ait sekans sonuçları ekte sırasıyla Ek-5, Ek-6 ve Ek-7’te verilmiştir. *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 GenBank erişim numaraları sırasıyla PQ615091, PQ615092 ve PQ615093 olarak erişime açılmıştır. İzolatların 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre yakın türlerle nükleotid benzerliğinin karşılaştırılması Tablo 4’te verilmiştir. Elde edilen yeni bakteriyel izolatlar su kirliliğine karşı etkin olarak kullanılabilirliğini araştırmak için bütün atık sularla muamele edilmek üzere çalışmaya dâhil edildi.



Şekil 9. *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizilerine dayalı neighbour-joining filogenetik dendogramı.



Şekil 10. *Bacillus* sp. SA6 izolatının 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizilerine dayalı neighbour-joining filogenetik dendrogramı

Tablo 4. İzolatların 16 S rRNA sekans sonucuna göre yakın türler ile nükleotid benzerlikleri

<i>Priestia</i> sp. SA1		<i>Priestia</i> sp. SA3		<i>Bacillus</i> sp. SA6	
Tür/benzerlik oranı	Toplam nükleotit/Fark	Tür/benzerlik oranı	Toplam nükleotit/Fark	Tür/benzerlik oranı	Toplam nükleotit/Fark
<i>Priestia aryabhatai</i> % 98,83	1391/16	<i>Priestia megaterium</i> % 100,0	1421/0	<i>Bacillus thuringiensis</i> % 99,93	1403/1
<i>Priestia megaterium</i> % 98,71	1391/18	<i>Priestia aryabhatai</i> % 99,86	1421/2	<i>Bacillus mobilis</i> % 99,93	1403/1
<i>Bacillus zanthoxyl</i> % 98,71	1391/18	<i>Bacillus zanthoxyl</i> % 99,37	1421/9	<i>Bacillus toyonensis</i> % 99,93	1403/1
<i>Priestia flexa</i> %97,92	1391/31				

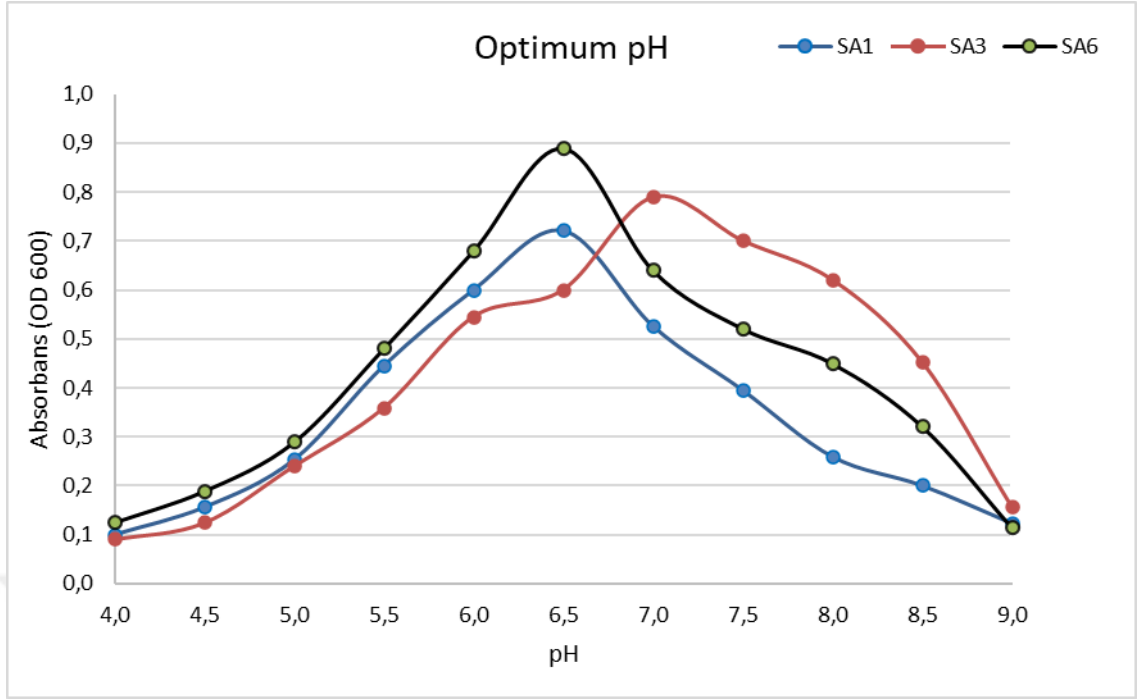
3.4. İzole Edilen Ligninolitik Bakteriye İzolatların Üreme Optimizasyonu

3.4.1. Bakteriyolojik LB besiyerinde Üreme Optimizasyonu

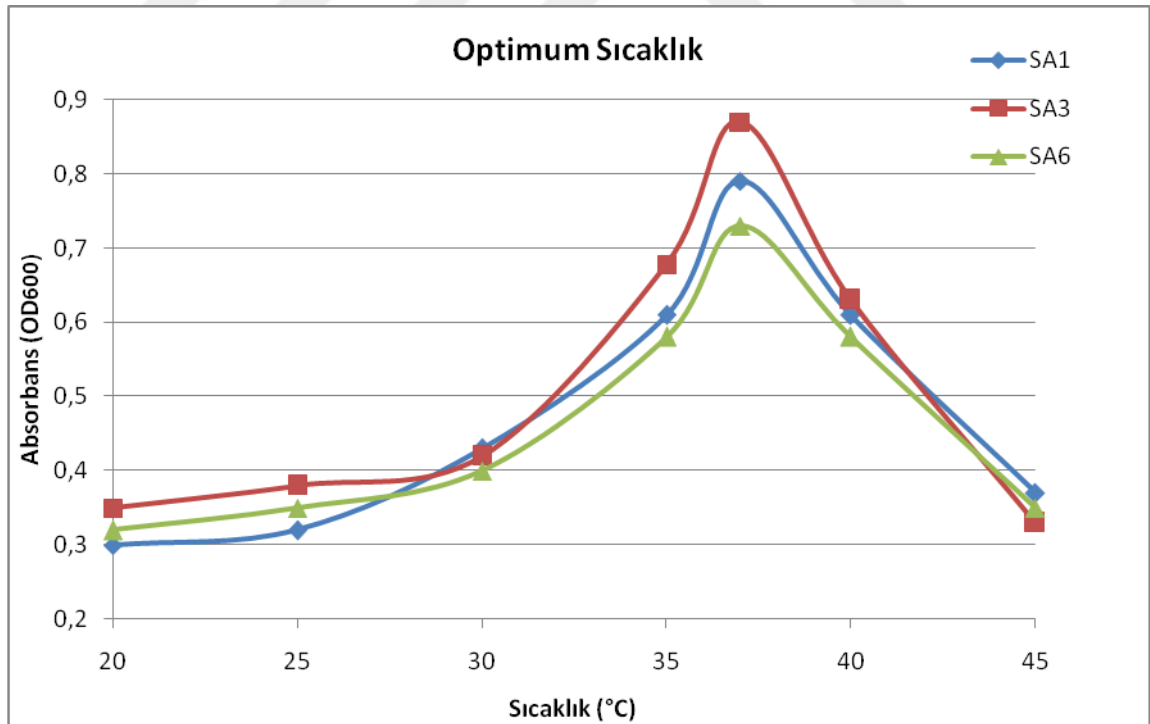
İzole edilen yeni yaban tip ligninolitik bakteri izolatlarının yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bakteriyolojik LB besiyerinde 3 bakteriyel izolatında optimum pH'nın 7.4 ve optimum üreme sıcaklığının ise 37 °C olduğu belirlendi.

3.4.2. Kraft Ligninli Besiyerinde Üreme Optimizasyonu

Kraft ligninli minimal besiyerinde yapılan optimum pH çalışmalarında *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatları pH 6,5 de en iyi üreme gösterirken, *Priestia* sp. SA3 bakterisi pH 7,0 en iyi üremeyi gösterdikleri belirlendi (Şekil 11). Kraft lignin içeren minimal besiyerinde yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında ise 3 bakteriyel izolatın da 37 °C de optimum üreme gösterdikleri belirlendi (Şekil 12).

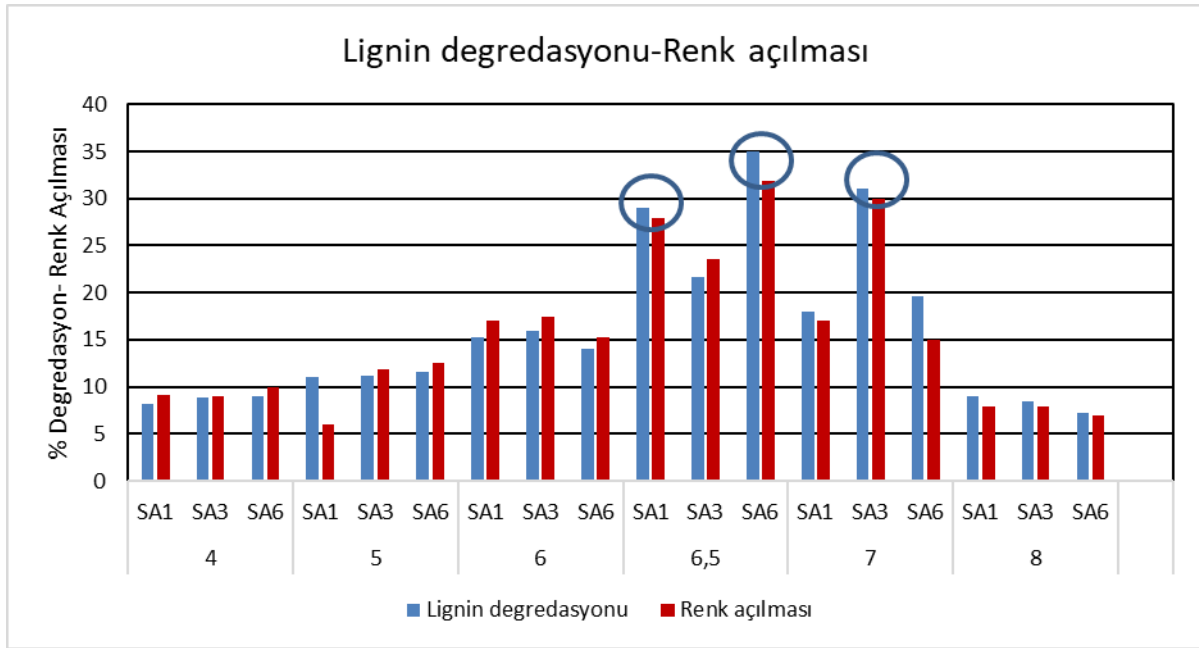


Şekil 11. İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesine ait optimum pH grafiği.



Şekil 12. İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesine ait optimum sıcaklık grafiği.

Bu izolatların ligninli besiyerinde optimum üredikleri pH ve sıcaklıkta lignin de-gradasyonu ve renk açılması kriterleri göz önüne alındığında her iki özellik bakımından da doğru orantılı olarak en iyi aktiviteyi gösterdikleri dolayısıyla bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda kültürlerin 37 °C de, *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatları için pH 6,5 ve *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatı için pH 7,0 olacak şekilde kültür ortamının ayarlanmasına karar verildi (Şekil 13).



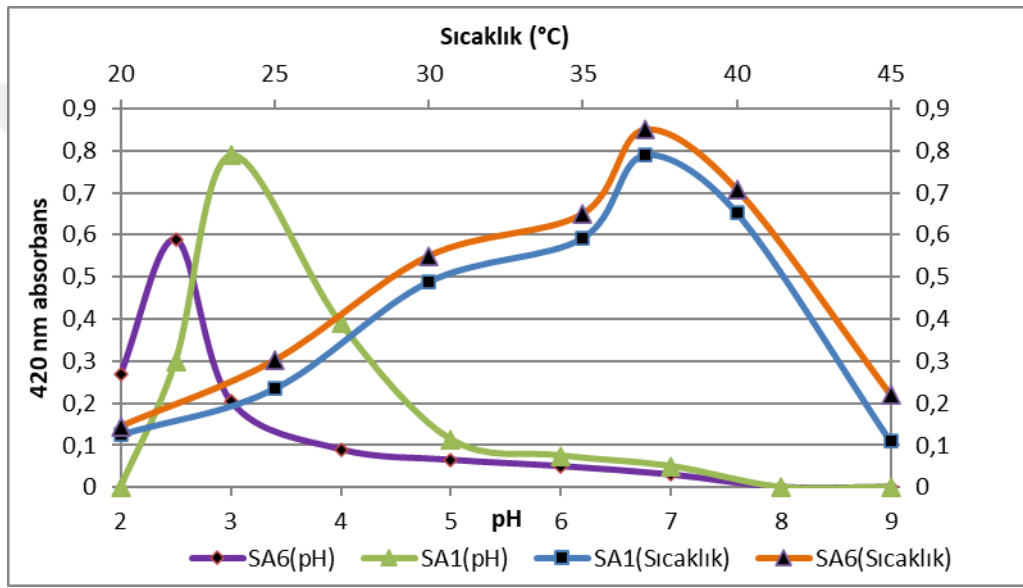
Şekil 13. İzolatların kraft ligninli minimal besiyerinde üremesinde farklı pH'lardaki Lignin degradasyonu-Renk açılması grafiği.

3.5. Bakteriyel İzolatların Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Kısmi Karakterizasyonu

Bakteriyel izolatların ligninli minimal besiyerinde 37 °C 3 günlük inkübasyonları sonucunda 10.000 rpm de 10 dk kültürlerin çöktürülmesiyle süpernatant kısmından elde edilen kaba enzim eldesiyle kısmi karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Mangan peroksidaz aktivitesi belirlenmediğinden dolayı karakterizasyonu yapılamadı. Diğer iki ligninolitik enzimin kısmi karakterizasyonunda 3 günlük inkübasyon sonucunda çöktürülen süpernatanttan alınan kaba enzim eldesi ile aktivite testleri gerçekleştirildi.

3.5.1. Lignin Peroksidazın Kısmı Karakterizasyonu

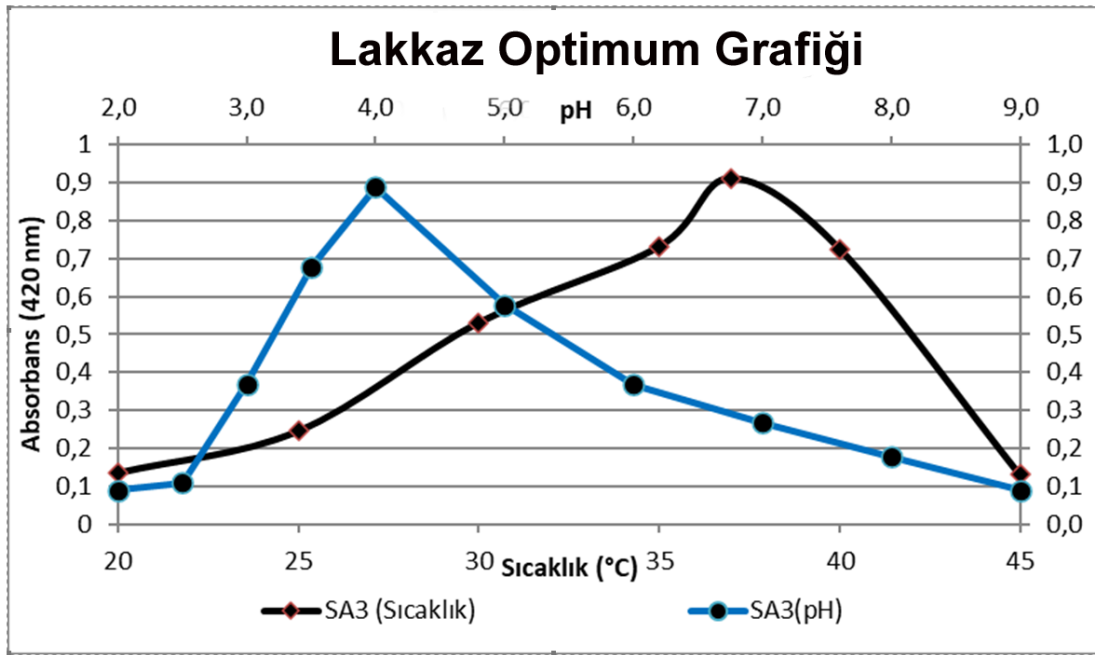
Yapılan lignin peroksidaz optimum pH ve sıcaklık enzim aktivitesi çalışmaları sonucunda *Priesta* sp. SA1 bakteriyel izolatının pH 3'te ve 37 °C'de en iyi aktivite gösterdiği belirlendi. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatının ise en iyi aktiviteyi pH 2,5'te ve 37 °C verdiği yapılan deneysel çalışmalarla belirlendi (Şekil 14). Lignin peroksidaz aktivitesi açısından *Priesta* sp. SA3 bakteriyel izolatının enzim aktivitesi seçici ligninli minimal besiyerinde büyümesine rağmen belirlenemedi.



Şekil 14. *Priesta* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatların Lignin peroksidaz enzimi optimum pH ve sıcaklık grafiği.

3.5.2. Lakkazın Kısmı Karakterizasyonu

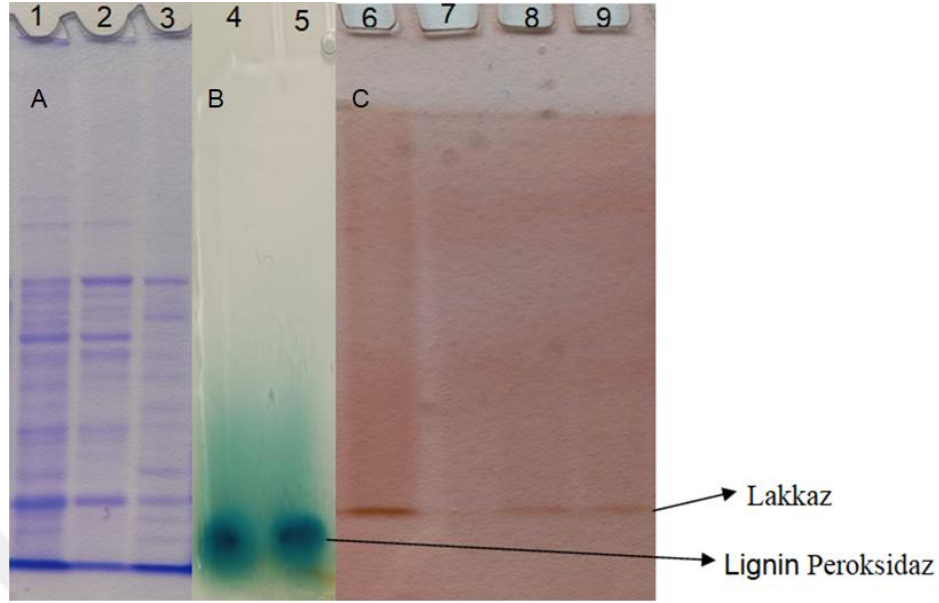
Lakkaz enzimine yönelik yapılan petri deneyi ve aktivite çalışmaları sonucunda yalnızca *Priesta* sp. SA3 bakteriyel izolatının aktivite gösterdiği belirlendi. Enzimin kısmı karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi için yapılan çalışmalarda optimum pH'sı 4,0 ve sıcaklığı ise 37 °C olarak belirlendi (Şekil 15). *Priesta* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarıyla yapılan petri deneylerinde 3 günlük inkübasyon sonucunda zayıfta olsa aktivite görülmesine rağmen yapılan enzim aktivite çalışmalarında lakkaz enzim aktivitesi belirlenemedi.



Şekil 15. *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatının Lakkaz enzimi optimum pH ve sıcaklık grafiği.

3.6. Bakteriyel İzolatlar Ait Ligninolitik Enzimlerinin SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri.

FB Besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen kültür süpernantlarının protein profili SDS-PAGE ile analiz edildi. Ayrıca her üç ligninolitik bakteriyel izolatın içerdiği enzimlerin aktivitelerine ait zimogram analizleri gerçekleştirildi. Yapılan zimogram analizlerinde lignin peroksidaz aktivitesi açısından pozitif olduğu aktivite testleri ile tespit edilen *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6'nın SDS-PAGE'de görülen protein bandının hizasında aktivite bantlarına sahip olduğu görüldü. Ayrıca lakkaz zimogram görüntüsünde de SDS-PAGE görüntüsünde mevcut olduğu görülen proteinler ile aynı hizada lakkaz aktivite bantların mevcut olduğu, aktivite testlerinde yüksek aktivite gösteren *Priestia* sp. SA3 izolatına ait lakkaz aktivite bandının güçlü olduğu görülürken *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6'nın lakkaz aktivite bandının zayıfta olsa mevcut olduğu tespit edildi.



Şekil 16. Bakteriyal izolatlar ait Ligninolitik Enzimlerin SDS-PAGE(A) ve Zimogram analizleri(B-C). 1; *Priestia* sp. SA1, 2; *Priestia* sp. SA3, 3; *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarına ait süpernatant jel resmi, 4; *Priestia* sp. SA1 lignin proksidaz, 5; *Bacillus* sp. SA6 lignin peroksidaz, 6; *Priestia* sp. SA3 lakkaz, 7; Kontrol, 8; *Priestia* sp. SA1 lakkaz, 9. *Bacillus* sp. SA6 lakkaz zimogramları.

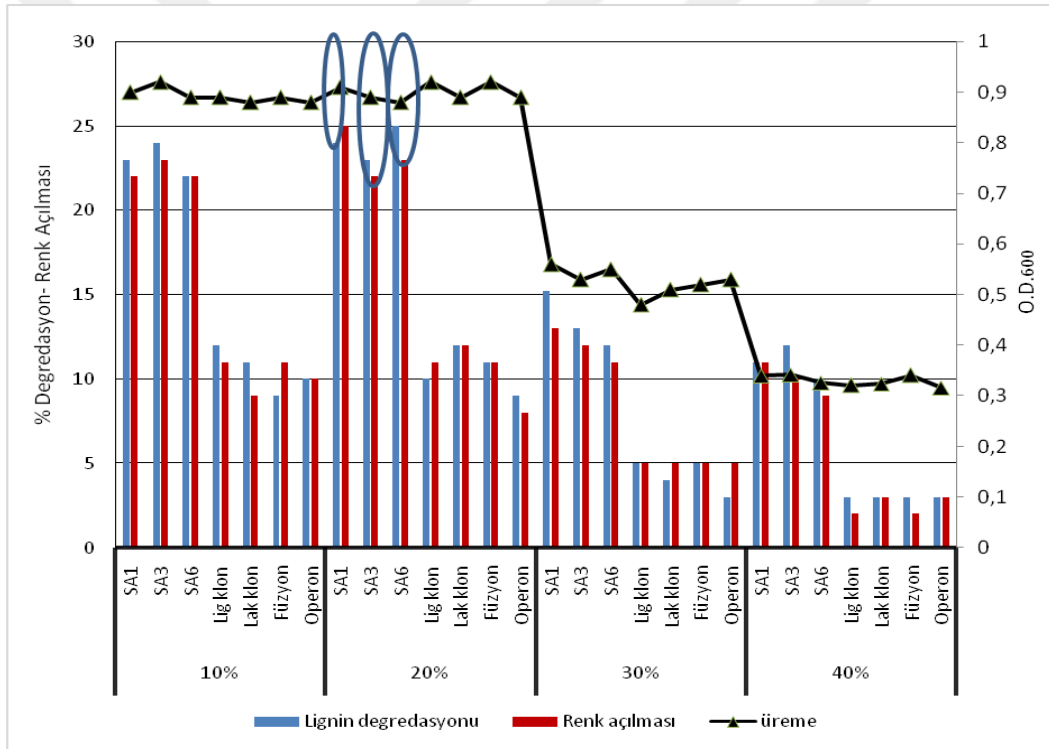
3.7. Atık Sularda Bakterilerin Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu

Optimum üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması kriterleri göz önünde tutularak yapılan optimizasyon çalışmalarında rekombinant ve bakteriyel izolatların atık sulardaki biyoremediasyon özelliklerinin etkinliği belirlendi. Çalışmada kullanılan atık suların, hazırlanan minimal besiyerine ilavesiyle elde edilen seri dilüsyonlarında yapılan kültürlerinde yukarıda değinilen üç ana kriter göz önünde tutularak en yüksek atık su konsantrasyonunda muamele şartları yapılan ölçümler ile belirlendi.

3.7.1. Zeytin Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerinde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu

Minimal besiyeri kullanılarak zeytin atık suyunun %10-20-30-40-50-60-70-80 oranında hazırlanan dilüsyonlu kültürlerinin bakteriler ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda yapılan ölçümler ile zeytin atık suyu kültürlerinde rekombinant ve yaban tip izolatların

üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması optimizasyonu gerçekleştirildi. Hazırlanan dilüsyonlu kültürler üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması kriterleri açısından takip edilerek bakterilerin en iyi aktivite ve üreme gösterdikleri en yüksek atık su konsantrasyonunu belirlendi. Deneyler sonucunda yaban tip bakterilerin %10 ve %20 dilüsyonlu kültürlerde yüksek lignin degradasyonu, renk açılması ve üreme gösterdiği %30 ve sonrasında ise bakterilerin degradasyon aktivitesi ve üremelerinin azaldığı tespit edildi (Şekil 17). Rekombinant bakterilerin ise %10 ve %20 dilüsyon oranında zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinde en iyi lignin degradasyon aktivitesi ve üreme gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak yapılacak olan çalışmalarda zeytin atık suyunun %20 dilüsyon yapılarak hazırlanan kültürlerde bakterilerle muamele edilmesine karar verildi.

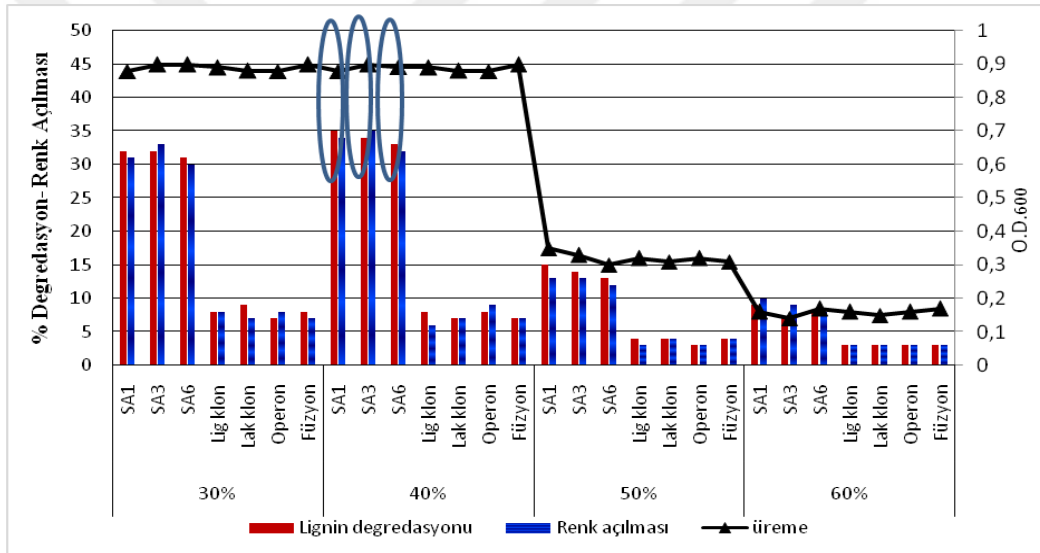


Şekil 17. Zeytin atık suyunun minimal besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği.

3.7.2. Tekstil Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu

Tekstil atık suyunun minimal besiyeri kullanılarak %10-20-30-40-50-60-70-80-90 oranında sulandırılmasıyla hazırlanan dilüsyonlu besi ortamlarının bakteriler ile 48 saatlik

inokülasyonu sonucunda yapılan ölçümler ile çalışmalarda kullanılmak üzere tekstil atık suyu kültürünün atık su içeriği optimizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan ölçümlerle kültürlerde bakteri üremesi ile kültür ortamında gerçekleşen lignin degradasyonu ve renk açılması kriterleri göz önünde tutularak bakterilerin en iyi aktivite gösterdikleri en yüksek atık su konsantrasyonu olan dilüsyon oranı belirlendi. Tekstil atık suyunun %10-40 arasındaki dilüsyonlarında benzer şekilde yüksek üreme, lignin degradasyonu ve renk açılmasının olduğu, %50 den sonrasında üreme, lignin degradasyonu ve renk açılmasının azaldığı belirlendi (Şekil 18). Bu sonuçlar doğrultusunda yapılacak olan çalışmalarda en iyi aktivitenin olduğu en yüksek tekstil atık suyunun % 40'lık konsantrasyonun yapılacak olan çalışmalarda kültür ortamı olarak kullanılmasına karar verildi.

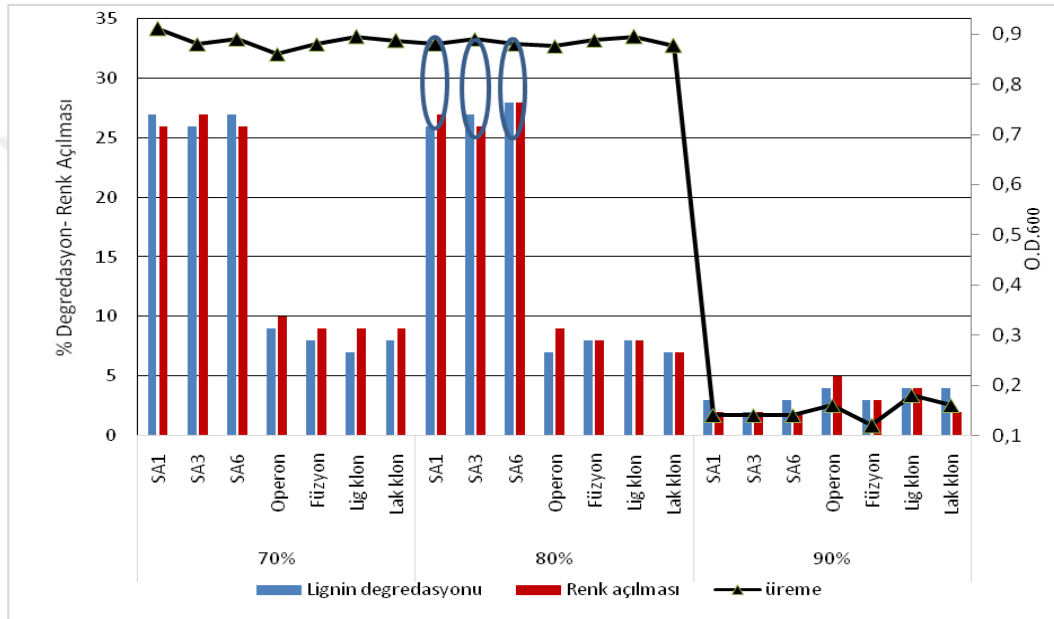


Şekil 18. Tekstil atık suyunun minimal besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği.

3.7.3. Kağıt Atık Suyu İçeren Minimal Besiyerde Üreme ve Biyoremediasyon Optimizasyonu

Minimal besiyeri kullanılarak %10-20-30-40-50-60-70-80 ve 90 oranında kağıt atık suyu ile sulandırılan besiyerler ile hazırlanan kültürlerin optimum sıcaklıkta 48 saatlik inkübasyonu sonucunda bakterilerin optimum üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması kriterleri açısından gerekli ölçümler gerçekleştirildi. Kağıt atık suyunun %70 ve % 80 oranında yapılan dilüsyonlarında bakteriler iyi üreme, lignin degradasyonu ve renk

açılması gösterirken, %90'lık dilüsyonda aktivitenin keskin bir biçimde azaldığı yapılan ölçümler neticesinde tespit edildi. Rekombinant bakterilerinde aynı konsantrasyonda en iyi aktivite gösterdikleri belirlendi (Şekil 19). Bu sonuçlar dikkate alındığında kağıt atık suyu ile yapılacak olan bakteri muamelesi çalışmalarında atık suyun konsantrasyonunun üreme, lignin degradasyonu ve renk açılmasının belirlendiği en yüksek kağıt atık suyu içeren % 80 oranındaki dilüsyon oranının çalışmalarda kullanılacak kültür ortamı olmasına karara verildi.



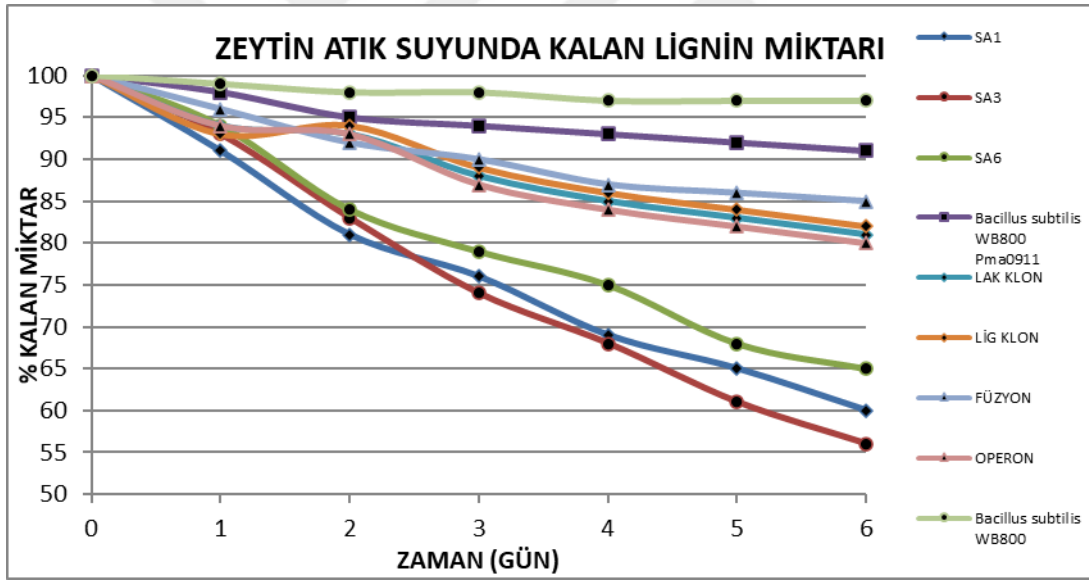
Şekil 19. Kağıt atık suyunun eser element besiyeri ile dilüsyonu sonucunda bakterilerin kültürlerdeki üreme, lignin degradasyonu ve renk açılması grafiği.

3.8. Bakteriyal İzolatların Atık Sular ile Muamelesi Sonrası Yapılan Analizler

Çalışmada kullanılan bakterilerin belirlenen optimum şartlarda atık su içeren minimal besiyerleri ile yapılan 6 günlük inkübasyonları sonucunda elde edilen kültürler yapılacak analizler öncesinde 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürme sonucu süpernatant kısmından alınan örnekler ile gerekli analizler gerçekleştirildi. Bu analizler lignin degradasyonu, renk açılması, pH değişimi ve reaksiyon sonrasında kültürlerde meydana gelen moleküllerin değişimi (ICP-MS/GC-MS)'dir.

3.8.1. Lignin Degredasyonu

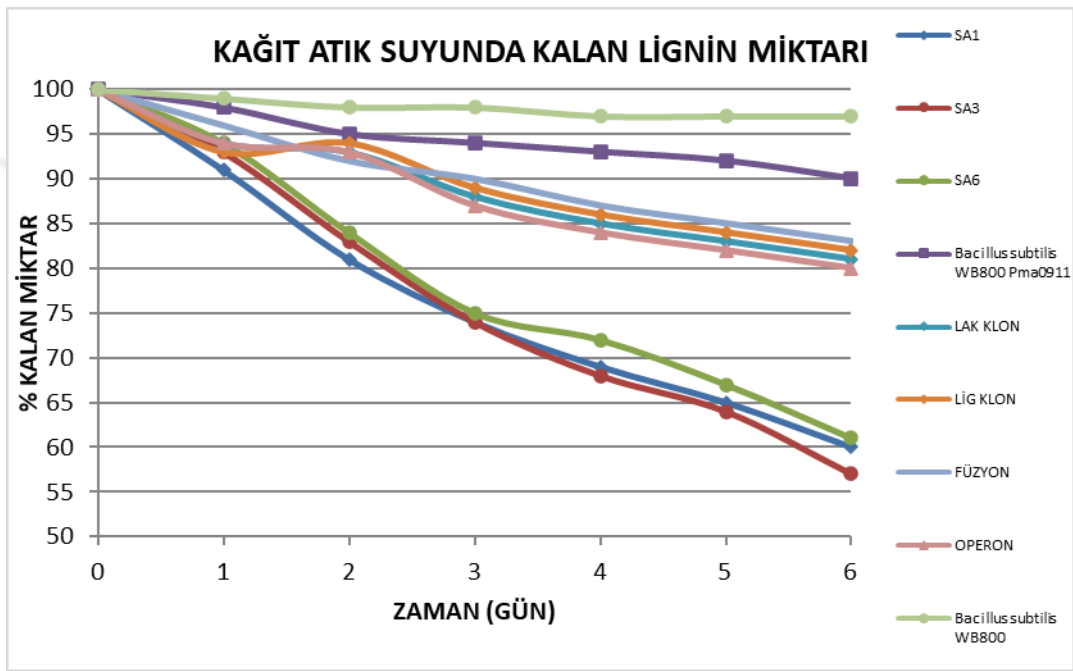
Zeytin Atık suyunun yukarıda belirlenen oranda atık su içeren minimal besiyerinde rekombinant ve yaban tip bakteriyel izolatların 6 günlük inkübasyonu sonucunda kültürlerde kalan lignin miktarı günlük spektrofotometrik olarak ölçüldü ve inkübasyon sonucunda yüzde kalan lignin miktarları yukarıda verilen formül ile hesaplandı. Rekombinant bakterilerin zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri ile yapılan 6 günlük inkübasyonu sonucunda en fazla %20 oranında lignin degradasyonu olduğu belirlendi. Bunun yanında ligninolitik bakteriyel izolatlar ile zeytin atık suyu içeren aynı minimal besiyerinin muamelesi sonucunda ise *Priestia* sp. SA3 izolatu %44 oranında lignin degradasyonu yaparken *Priestia* sp. SA1 %40 ve *Bacillus* sp. SA6 ise %35 oranında kültürlerdeki lignini degrede ettiği tespit edildi (Şekil 20).



Şekil 20. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı.

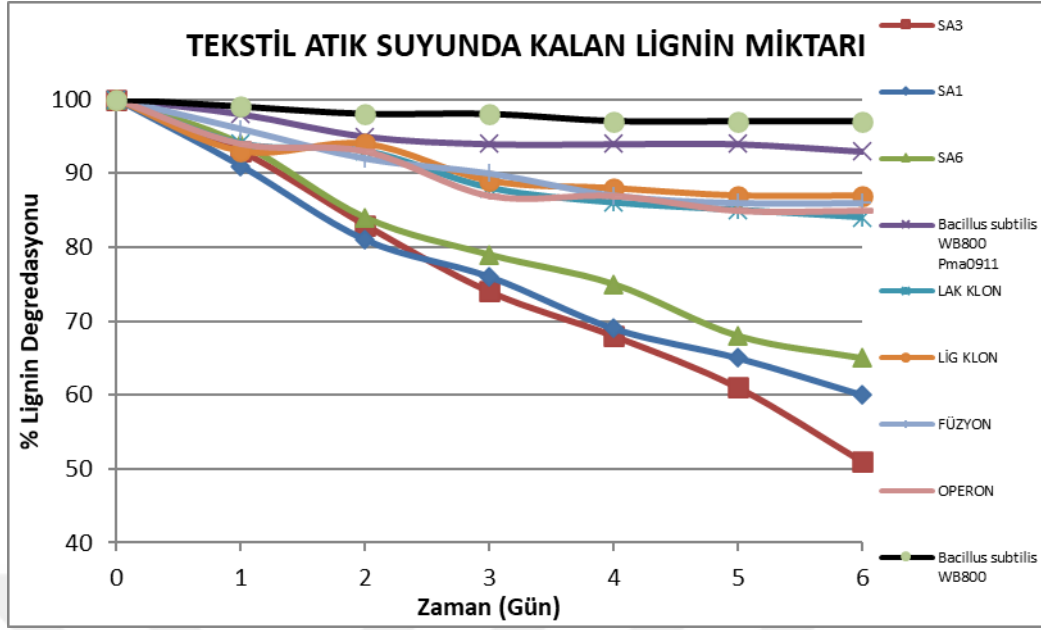
Kağıt atık sularını içeren minimal besiyerin bakteriler ile 6 günlük inkübasyonu sonucunda kültürlerde kalan lignin miktarı günlük spektrofotometrik olarak ölçüldü ve inkübasyon sonucunda yüzde kalan lignin miktarları yapılan çalışmalar bölümünde lignin degradasyonu kısmında verilen formül ile hesaplandı. Rekombinant bakterilerin kağıt atık suyu içeren minimal besiyer ile yapılan 6 günlük inkübasyonu sonucunda kültürlerde en

fazla lignin degradasyonunun yaklaşık %20 ile operon klonu ile gerçekleşirken diğer rekombinant bakterilerin %20'nin altında lignin degradasyonu gerçekleştirdiği belirlendi. Bunun yanında daha önce belirlenen optimum üreme şartları altında ligninolitik bakteriyel izolatlar ile Kağıt atık sularını içeren aynı minimal besiyerinin muamelesi sonucunda ise *Priestia sp* SA3 izolatı %43 oranında lignin degradasyonu yaparken *Priestia sp* SA1 %40 ve *Bacillus sp.* SA6 ise %38 oranında kültürlerdeki lignini degrede ettiği belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı.

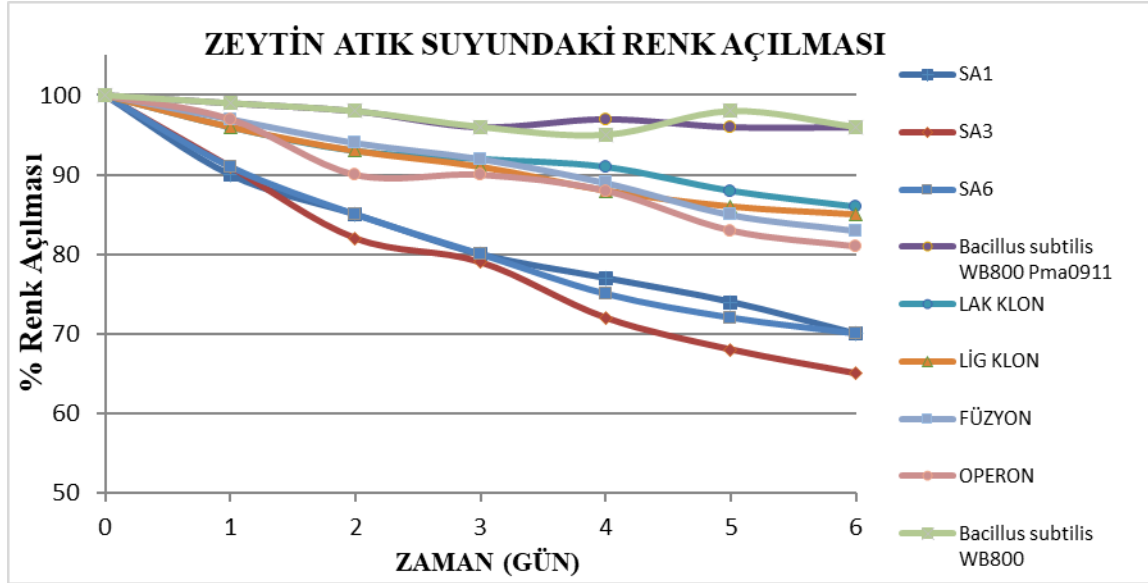
Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inokülasyonu sonucunda kültürlerde kalan yüzde lignin miktarı şekil 22'de görülmektedir. Rekombinant bakterilerin tekstil atık suyu ile yapılan 6 günlük inkübasyonu sonucunda kültürlerde en fazla lignin degradasyonunu yaklaşık %18 ile lakkaz enzim klonu ile gerçekleşirken diğer rekombinant bakterilerin lignin degradasyon oranının %15'den az olduğu belirlendi. Bunun yanında ligninolitik bakteriyel izolatlar ile Tekstil atık suyu içeren aynı minimal besiyerinin 6 günlük inkübasyonu sonucunda ise *Priestia sp.* SA3 izolatı %50 oranında lignin degradasyonu yaparken *Priestia sp.* SA1 %40 ve *Bacillus sp.* SA6 ise %35 oranında kültürlerdeki lignini degrede ettiği belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu yüzde kalan lignin miktarı.

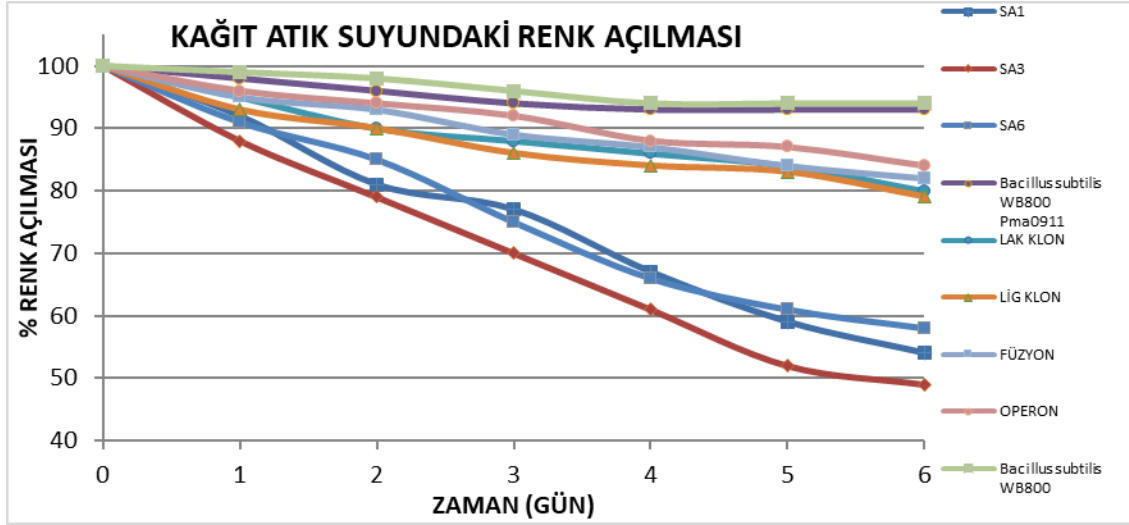
3.8.2. Renk Açılması

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin bakteriler ile inokülasyonu sonucunda kültürlerdeki renk açılması 6 günlük inkübasyon süresi boyunca kültürlerden alınan günlük örnekleme ile yukarıda verilen yüzde renk açılması formülü kullanılarak belirlendi. Rekombinant bakterilerin tekstil atık suyu ile muamelesi sonucunda en iyi renk açılması %20 ile operon bakterisinde olurken diğer bakterilerin kültürlerdeki renk açılması üzerine etkilerinin %15 in altında kaldığı görüldü. Ligninolitik bakteriyel izolatlar ise kültürlerdeki renk açılması en fazla olan %35 ile *Priestia* sp. SA3 izolatında olurken, *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 izolatlarında ise %30 olduğu belirlendi (Şekil 23).



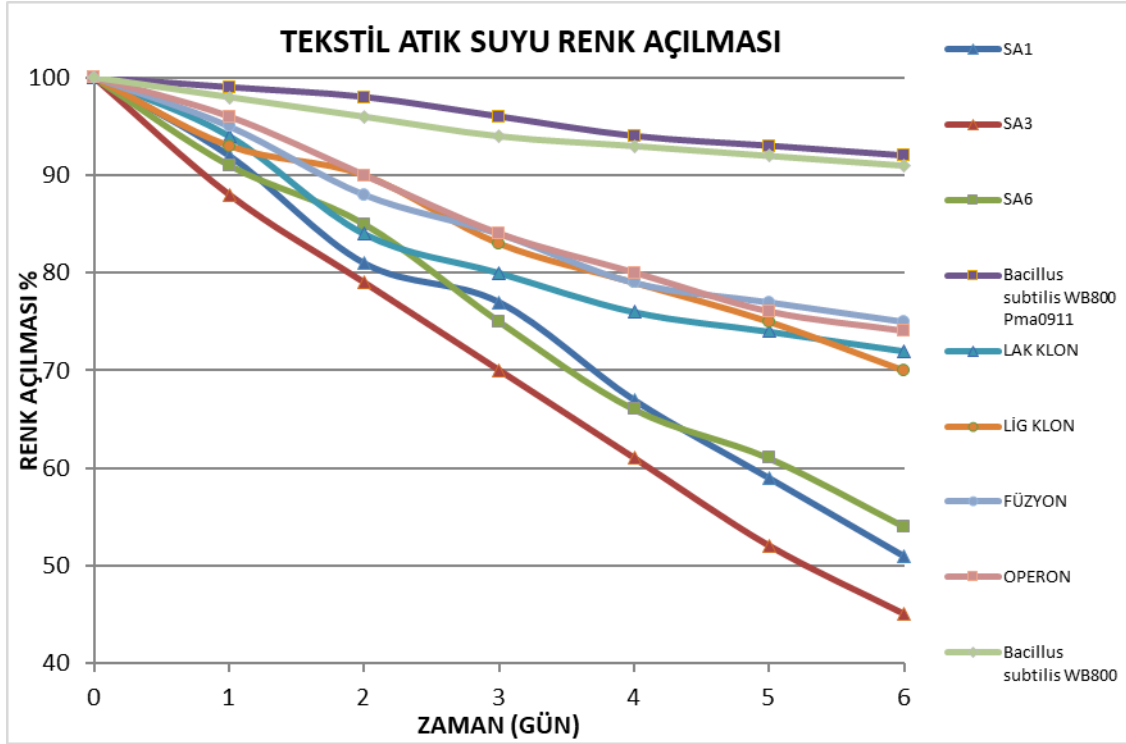
Şekil 23. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği

Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin çalışmadaki bakteriler ile 6 günlük muamelesi sonucunda kültürlerde meydana gelen renk açılması günlük spektrofotometrik olarak ölçüldü ve inkübasyon sonucunda yüzde renk açılması yapılan çalışmalar bölümünde renk açılması kısmında verilen formül ile hesaplandı. Rekombinant bakterilerin kağıt atık suyu ile muameleleri sonucunda kültürlerde en fazla renk açılması yaklaşık %22 ile lignin peroksidaz klonu (Lig Klon) yaparken diğer rekombinant bakterilerin %20 den az renk açılması sağladığı belirlendi. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin ligninolitik bakteriyel izolatlar ile inokülasyonu sonucunda ise *Priestia* sp. SA3 izolatı %52 oranında renk açılması yaparken *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 ise sırasıyla %46 ve %43 oranında kültürlerdeki rengi açtığı belirlendi (Şekil 24).



Şekil 24. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği

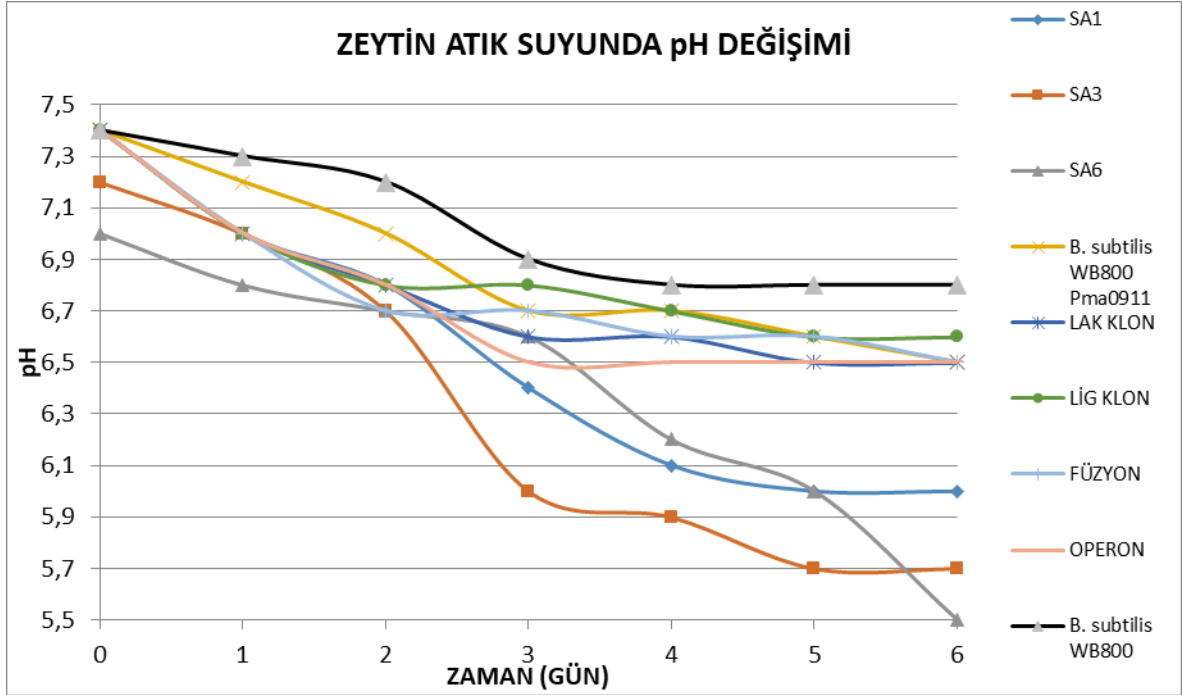
Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile muamelesi sonucunda kültürlerdeki renk açılması Şekil 25'te görülmektedir. Rekombinant bakterilerin tekstil atık suyu ile yapılan 6 günlük inkübasyonları sonucunda kültürlerde en fazla renk açılması yaklaşık %30 ile lignin peroksidaz enzim klonunu içeren bakteri ile sağlanırken diğer rekombinant bakterilerin %25 den az renk açılması yaptığı belirlendi. Ligninolitik bakteriyel izolatlar ile aynı besiyerin inokülasyonu sonucunda ise *Priestia* sp. SA3 izolatu %56 oranında kültürdeki rengi açarken, *Priestia* sp. SA1 % 49 ve *Bacillus* sp. SA6 ise % 37 oranında kültürlerdeki rengi açtığı belirlendi (Şekil 25).



Şekil 25. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki renk açılması grafiği.

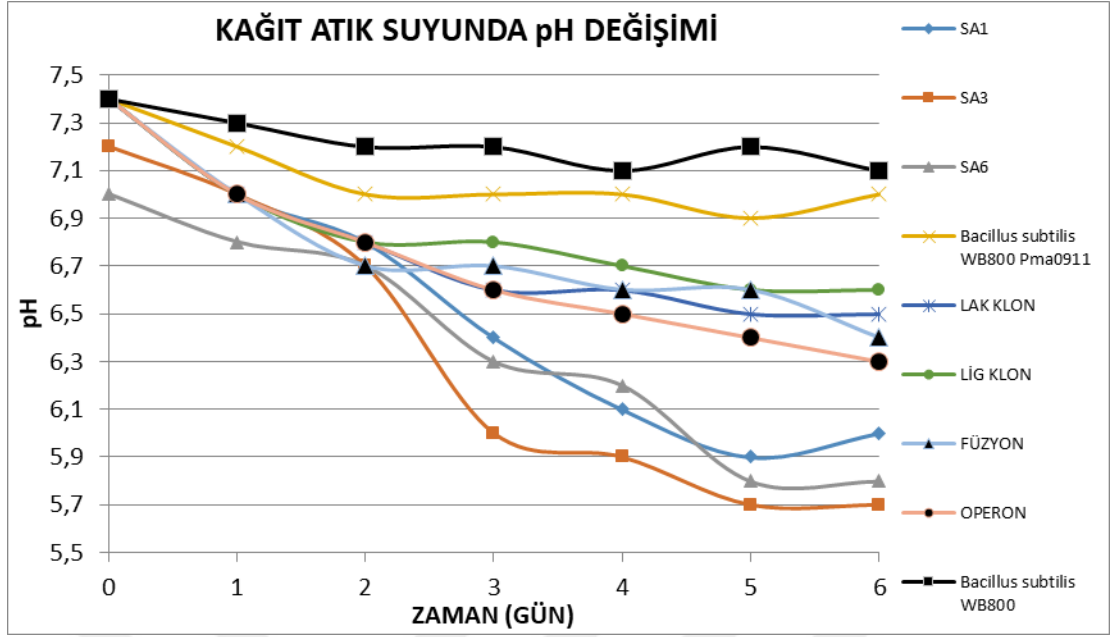
3.8.3. pH Değişimi

Zeytin Atık suyu içeren minimal besiyerin rekombinant bakteriler ve bakteriyel izolatlar ile 6 günlük inkübasyonu süresince kültürler günlük olarak pH değişimi açısından takip edildi. Başlangıçta her bir bakteri kültürü kendi optimum pH'sında kültüre edilmiş ancak inkübasyon süresince alınan örnekler üzerinde laboratuvarındaki pH metre ile yapılan ölçümler neticesinde zaman ilerledikçe kültürlerdeki asitlik derecesinin arttığı belirlenmiştir. Rekombinant bakterilerin kültürlerindeki pH değerleri inkübasyon sonucunda pH 6,5-6,8 arasında olduğu belirlendi. Bunun yanında ligninolitik bakteriyel izolatların zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri ile inokülasyonu sonucunda ise *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının pH değerleri sırasıyla 6,0-5,7-5,5 olarak ölçülmüştür (Şekil 26).



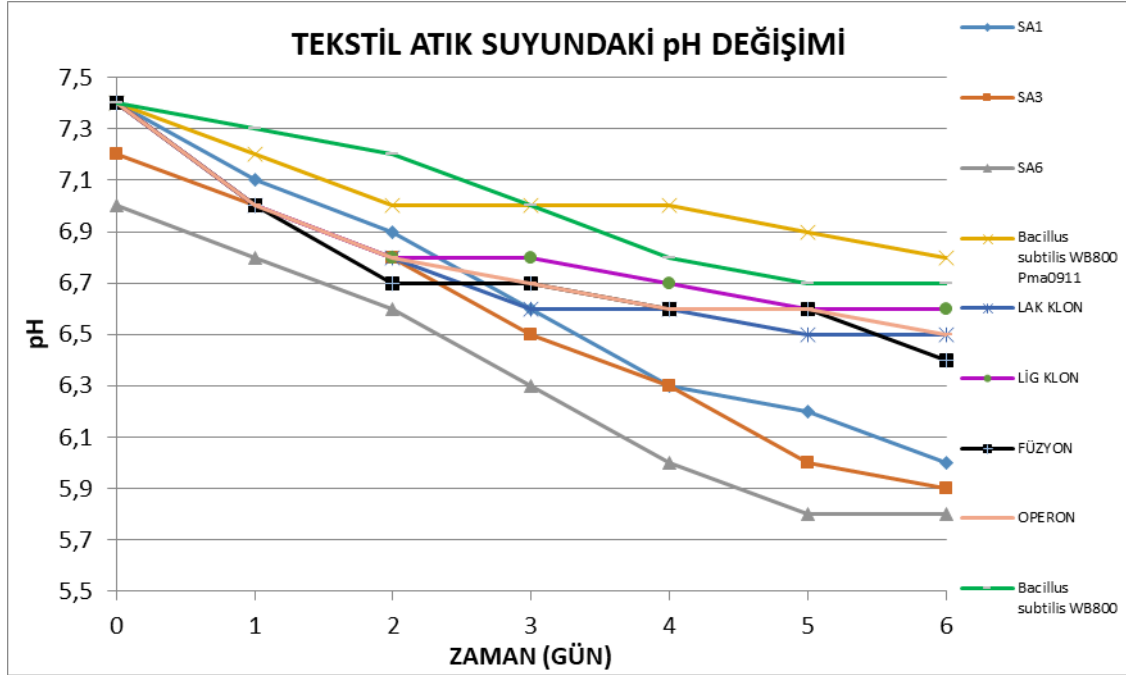
Şekil 26. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği.

Kâğıt atık suyu içeren minimal besiyerin çalışmada kullanılan bakteriler ile 6 günlük muamelesi sonucunda kültürlerde meydana gelen pH değişimi günlük olarak ölçüldü (Şekil 27). Rekombinant bakterilerin kâğıt atık suyu içeren minimal besiyer ile inokülasyonu sonucunda operon klon kültürünün pH değerinin 6,3 olduğu belirlendi. Diğer rekombinant bakterilerde ise pH değeri 6,5-7,1 arasında ölçüldü. Kâğıt atık sularının ligninolitik bakteriyel izolatlar ile muamelesi sonucunda kültürlerdeki pH değeri *Priestia* sp. SA3, *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 izolatlarında sırasıyla 6,0-5,7 ve 5,8 olarak ölçüldü.



Şekil 27. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği.

Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inokülasyonu sonucunda kültürlerde meydana gelen pH değişimi Şekil 28’de görülmektedir. Rekombinant bakterilerin tekstil atık suyu ile yapılan 6 günlük inkübasyonları sonucunda kültürlerdeki pH değerleri 6,4-6,8 olarak belirlendi. Ligninolitik bakteriyel izolatlar ile aynı kültürlerin muamelesi sonucunda ise *Priestia* sp. SA3, *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 ise pH değerleri sırasıyla 6,0-5,9 ve 5,8 olarak ölçüldü.



Şekil 28. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerde bakterilerin üremesi sonucu kültürdeki pH değişim grafiği.

3.8.4. Bakteri Üremeleri Sonucunda Atık Su İçeren Kültürlerdeki Ağır Metal Analizleri (ICP-MS)

Herbir bakterinin optimum üreme ve ligninolitik aktivite gösterdiği şartlarda hazırlanan atık su içeren minimal besiyeri kültürleri ile bakterilerin 6 günlük inokülasyonu sonucunda kültürler 10.000 rpm’de 10 dk çöktürüldü. Kültürlerin santrifüjlenmesinin sonucunda elde edilen kültür süpernatantı ICP-MS ile hizmet alımı yöntemi ile analiz edildi. Çöktürme sonucunda süpernatant kısmından alınan analiz örnekleri ile yapılan ölçümlerde zeytin, kağıt ve tekstil atık suyu içeren minimal besiyerlerinde meydana gelen değişimler sırasıyla Tablo 5, Tablo 6 ve Tablo 7’de verilmiştir. Çalışmada kontrol olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan atık suyu içeren minimal besiyeri kullanıldı.

Tablo 5. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.

Madde	Priestia sp. SA1	Priestia sp. SA3	Bacillus sp. SA6	Lak klon	LiP klon	Füzyon	Operon	Kontrol
Li	68.4	69.3243	72.9	66.9	70.2	76.7	75.4	79,7
Be	283.9	282.901	283.3	289.6	281.3	287.8	282.5	284,1
B	1763.2	1415.7	1685.9	1532.2	1450.2	1631.9	1688.3	1783,4
Na	PPP	969432	PPP	1015222.0	PPP	PPP	PPP	PPP
Mg	24825.7	18924.3	25003.8	23895.0	17503.2	5314.7	14360.5	39363,2
Al	584,3	639.5	1447.8	873.4	784.1	1036.9	934.4	1262,6
K	916456	756890	838323	828715	543750	1130026	102645	1174331
Ca	22455	17652.8	24259.8	15703.6	19675.1	23128.8	24735.3	37391,2
V	89,5	71.8	83.4	70.9	78.3	155.6	89.1	71,7
Cr	54,8	42.6	52.7	47.4	49.4	55.1	52.1	52,2
Mn	189,8	136.9	214.8	62.2	99.3	140.3	120.2	358,4
Fe	2249,3	1558.6	2274.2	1519.1	1978.1	2375.6	2189.5	2979,0
Co	5,3	4.3	5.8	3.2	4.8	16.2	7.1	4,04
Ni	227,4	64.6	407.6	94.1	136.7	188.1	198.1	257,7
Cu	119,1	95.2	94.3	126.1	127.1	130.9	103.2	115,2
Zn	411	350.2	431.5	396.7	632.1	1045.8	789.3	731,7
Ga	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
As	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
Se	192,7	189.2	188.8	188.5	186.1	188.9	185.7	183,8
Se	390,5	345.7	362.2	362.0	354.3	345.7	342.9	345,7
Rb	630,3	21.6	638.3	646.9	642.8	672.6	654.7	826,9
Sr	32,6	0.0	47.9	36.7	41.6	35.9	39.6	80,1
Mo	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
Ag	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
Cd	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
Te	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
Ba	2,6	0.45	16.2	4.6	8.9	0.3	5.4	42,0
Tl	2,2	6.46	6.7	6.5	6.2	6.7	6.5	6,6
Pb	0,0	1.39	3.4	2.8	1.8	2.8	2.1	1,0
U	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0
PPP: Ölçüleyecek kadar yüksek								

Tablo 6. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.

Madde	<i>Priestia</i> sp. SA1	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6	Lak klon	Lip klon	Füzyon	Operon	Kontrol
Li	24,8	27,1	22,1	24,1	23,8	22,3	24,1	27,7
Be	29,0	27,5	31,4	29,5	26,8	28,3	27,9	26,8
B	4165,4	4172,8	4024,5	4109,4	4179,2	3817,5	3983,1	4270,1
Na	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP
Mg	16937	17514	17826	15470	15980	14758	15632	18086
Al	51,7	126,5	51,5	39,6	53,9	38,9	46,7	47,9
K	97368	88501	227549	78089	113691	224105	187312	71221
Ca	26691	22149	24516	23813	23879	20892	21476	27824
V	71,4	67,9	103,2	61,4	68,9	97,8	87,3	63,3
Cr	10,1	9,6	12,4	10,7	9,7	10,3	10,1	7,17
Mn	4,1	4,7	5,1	3,2	3,9	3,7	4,0	4,5
Fe	298,9	324,5	387,1	258,8	269,4	230,4	241,9	288,1
Co	2,9	1,7	5,3	1,3	1,6	5,0	3,7	1,4
Ni	5,6	9,1	1,6	7,2	3,7	0,9	1,9	8,2
Cu	206,5	163,9	177,7	182,9	168,3	146,2	154,8	199,7
Zn	57,1	28,9	254,6	31,2	103,6	261,6	176,5	22,3
Ga	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
As	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Se	22,4	25,5	31,7	24,1	23,4	25,2	24,7	19,8
Rb	40,9	35,1	89,8	34,1	54,8	89,1	60,7	33,8
Sr	321,1	275,4	269,8	277,8	276,9	231,5	243,4	340,8
Mo	2,4	2,4	6,7	1,1	2,7	2,5	2,8	0,5
Ag	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Te	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ba	17,8	16,6	12,8	15,6	14,7	10,2	11,6	18,5
Tl	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6
Pb	0,2	0,2	0,9	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4
U	3,3	2,4	2,9	2,1	2,4	2,8	2,7	3,1

PPP: Ölçüleyecek kadar yüksek

Tablo 7. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerinde bakterilerin inkübasyonu ve üremesi sonucunda elde edilen kültür süpernatantının ICP-MS analiz sonuçları.

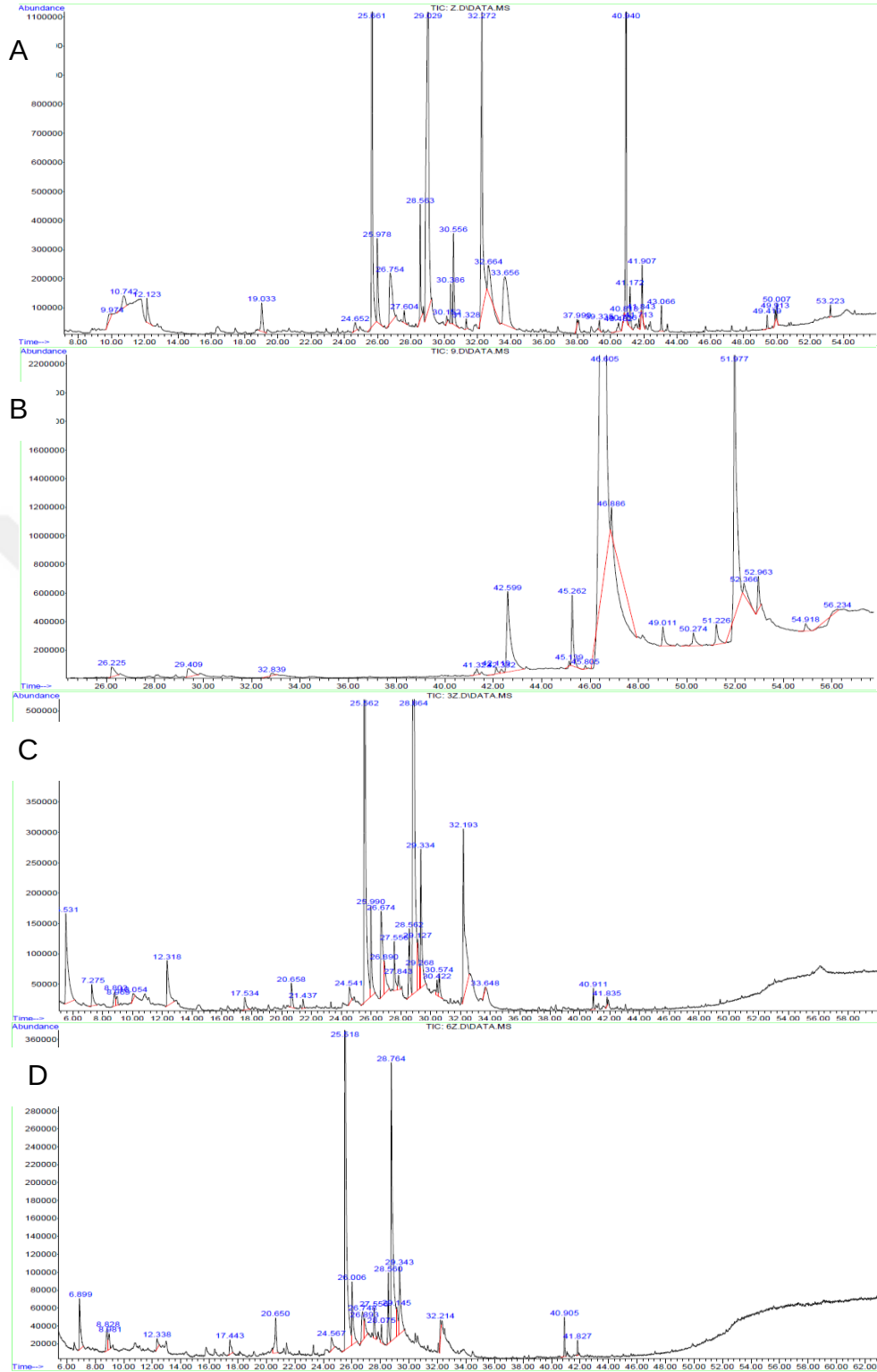
Madde	<i>Priestia</i> sp. SA1	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6	Lak klon	LiP klon	Füzyon	Operon	Kontrol
Li	21,1	27,9	21,5	32,8	23,5	19,5	21,4	20,9
Be	28,1	29,4	29,1	32,0	28,5	30,8	29,3	29,7
B	1167,6	1390,8	960,1	1690,3	1230,1	978,2	965,2	915,6
Na	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP
Mg	18238	18522	19244	18088	17895	12665	13544	14837
Al	50,7	55,2	55,8	116,6	53,4	39,1	41,7	56,8
K	93668	97869	PPP	90349	PPP	250789	237301	61203
Ca	14409	13843	12871	12108	13140	13949	12566	13075
V	64,0	50,4	117,6	61,7	62,5	120,7	98,6	53,8
Cr	9,8	10,1	17,1	10,5	11,2	13,9	12,4	9,7
Mn	6,8	5,4	6,8	5,1	5,3	6,2	6,1	5,4
Fe	182,1	258,8	249,1	292,2	256,7	216,4	232,7	189,4
Co	2,9	2,75	7,1	2,1	3,1	8,3	6,2	1,2
Ni	12,5	23,6	15,3	17,2	16,2	5,6	7,9	5,4
Cu	149,1	175,6	200,5	150,6	132,6	179,1	179,5	102,8
Zn	54,4	45,2	367,6	35,9	69,8	360,6	152,7	40,5
Ga	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
As	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Se	24,5	27,7	32,4	26,5	27,8	32,5	25,3	21,1
Rb	39,4	37,4	102,1	34,0	42,8	101,4	79,6	24,1
Sr	191,5	170,3	161,3	172,6	168,9	163,5	171,6	172,3
Mo	3,2	4,6	6,7	1,0	1,9	5,1	3,8	0,5
Ag	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Te	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ba	12,0	8,1	10,1	11,1	9,8	8,6	9,1	11,7
Tl	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6
Pb	0,1	0,1	0,7	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2
U	1,9	1,43	1,7	1,6	1,3	1,9	1,4	1,5
PPP: Ölçüleyecek kadar yüksek								

3.8.5. GC-MS Analizleri

Yukarıda gerçekleştirilen renk açılması ve lignin degradasyonu deneylerinde rekombinant bakterilerin atık su içeren minimal besiyer ile yapılan kültürlerinde kayda değer bir etkinlik gösterememesinden dolayı atık su içeren ortamlarda üretim sonucu metabolitlerin GC-MS ile analizi bu organizmalar açısından gerçekleştirilmemiştir. GC-MS çalışmalarında üç adet yabancı tip ligninolitik bakteri kullanılmıştır. Gerçekleştirilen inkübasyonlar net-

icesinde bakteri içeren kültürlerdeki metabolitlerdeki (fenolik maddelerdeki) değişimler kontroller (kullanılan besiyerlerin bakteri inokülasyonu yapılmamış hali) dikkate alınarak GC-MS ile analiz edildi. Gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar aşağıda görülmektedir. Analizler sonucunda aşağıdaki şekillerde de görüldüğü gibi kontroller ile karşılaştırıldığında bazı numunelerde yeni metabolit piklerinin oluştuğu, bazı piklerin kaybolduğu veya miktarlarının azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde, bu çalışma kapsamında izole edilen *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının atık su içeren kültür ortamındaki metabolitlerin değişiminde etkin oldukları görülmüştür.

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin bakteriyel izolatlarla yapılan muamelesi sonucunda elde edilen kültürün 10.000 rpm'de 10 dak santrifüjlenmesi ile oluşan süpernatantlar GC-MS analizine tabi tutuldu. Yapılan GC-MS analizine göre bakteriyel izolatlarla muamele edilmemiş kontrol örneğinde Şekil 29'da görüldüğü gibi dimethylbenzaldehyde, 1-Fluoro-1-phenylethylene, 5-Undecanol, methyl-3-heptanol, methyl-3-heptanol octane ve Di-tert-butyl-1-oxaspiro pikleri mevcut iken *Priestia* sp. SA1 ile muamele edilen zeytin atık suyunda Dimethylbenzaldehyde, 1-Fluoro-1-phenylethylene, 5-Undecanol, methyl-3-heptanol pikleri kaybolmuş olup methyl-3-heptanol octane ve Di-tert-butyl-1-oxaspiro piklerinde artış tespit edilmiştir. *Priestia* sp SA3 ile muamele edilen zeytin atık suyunda 1-Fluoro-1-phenylethylene, 5-Undecanol pikleri aynı kalırken methyl-3-heptanol octane pikinde belirgin azalma olurken Dimethylbenzaldehyde, methyl-3-heptanol ve Di-tert-butyl-1-oxaspiro pikleri yok olmuştur. *Bacillus* sp. SA6 ile muamele edilen aynı kültür ortamında ise kontrolde bulunan 1-Fluoro-1-phenylethylene ve 5-Undecanol pikleri haricindeki bütün pikler yok olmuştur (Tablo 8).

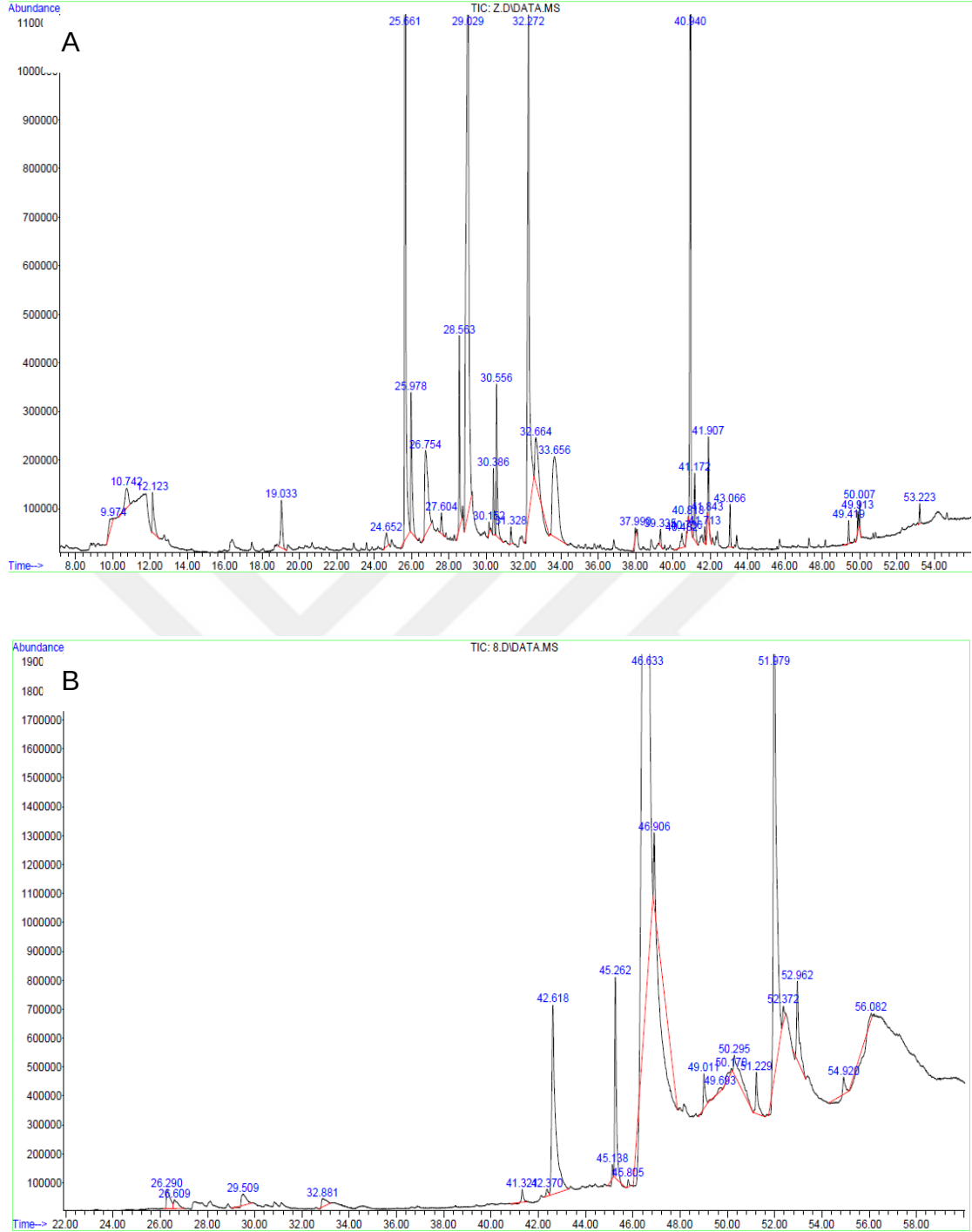


Şekil 29. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları (B; *Priestia* sp. SA1, C; *Priestia* sp. SA3, D; *Bacillus* sp. SA6).

Tablo 8. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Madde	Tutulma süresi (RT)	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA1	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6
3-Propanetriol	9,97	+	-	-	-
2-Fluoro-2-methylpropane	10,73	+	-	-	-
1-Phenyl-3-triazole	12,12	+	-	-	-
2,4-dimethylbenzaldehyde	19,03	+	-	-	-
Chloroacetic acid	24,64	+	-	-	-
1-Fluoro-1-phenyl ethylene	25,61	+	-	+	+
5-Undecanol	29,02	+	-	+	+
Methyl-3-heptanol	30,55	+	-	-	-
Methyl-3-heptanol octane	32,27	+	++	+-	-
Di-tert-butyl-1-oxaspiro	40,94	+	++	-	-
	(+)=var	(++)=artma	(+)=azalma	(-)=yok	

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyer ile 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumunun 6 günlük inkübasyonu sonucunda aynı besiyerin hiç bir bakteri inoküle edilmemiş kontrol numunesinin GC-MS analizlerinde 3-Propanetriol, 2-Fluoro-2-methylpropane, 1-Phenyl-3-triazole, 2,4-dimethylbenzaldehyde, Chloroacetic acid, 1-Fluoro-1-phenyl ethylene, 5-Undecanol, Methyl-3-heptanol, Methyl-3-heptanol octane ve Di-tert-butyl-1-oxaspiro pikleri oluşurken (Şekil 30), 3 bakteriyel izolatın konsorsiyum halinde muamele edildiği zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin GC-MS analizinde kontrolden tamamen farklı olarak n-Hexadecanoic acid, cis-13-Octadecenoic acid, Oleic acid, cis-Vaccenic acid, Olealdehyde, 9-cis-Oleic acid, 17-hexacosatrienoate, Bicyclo heptan-2-ol ve orisocopalan piklerinin meydana geldiği tespit edildi (Tablo 9).



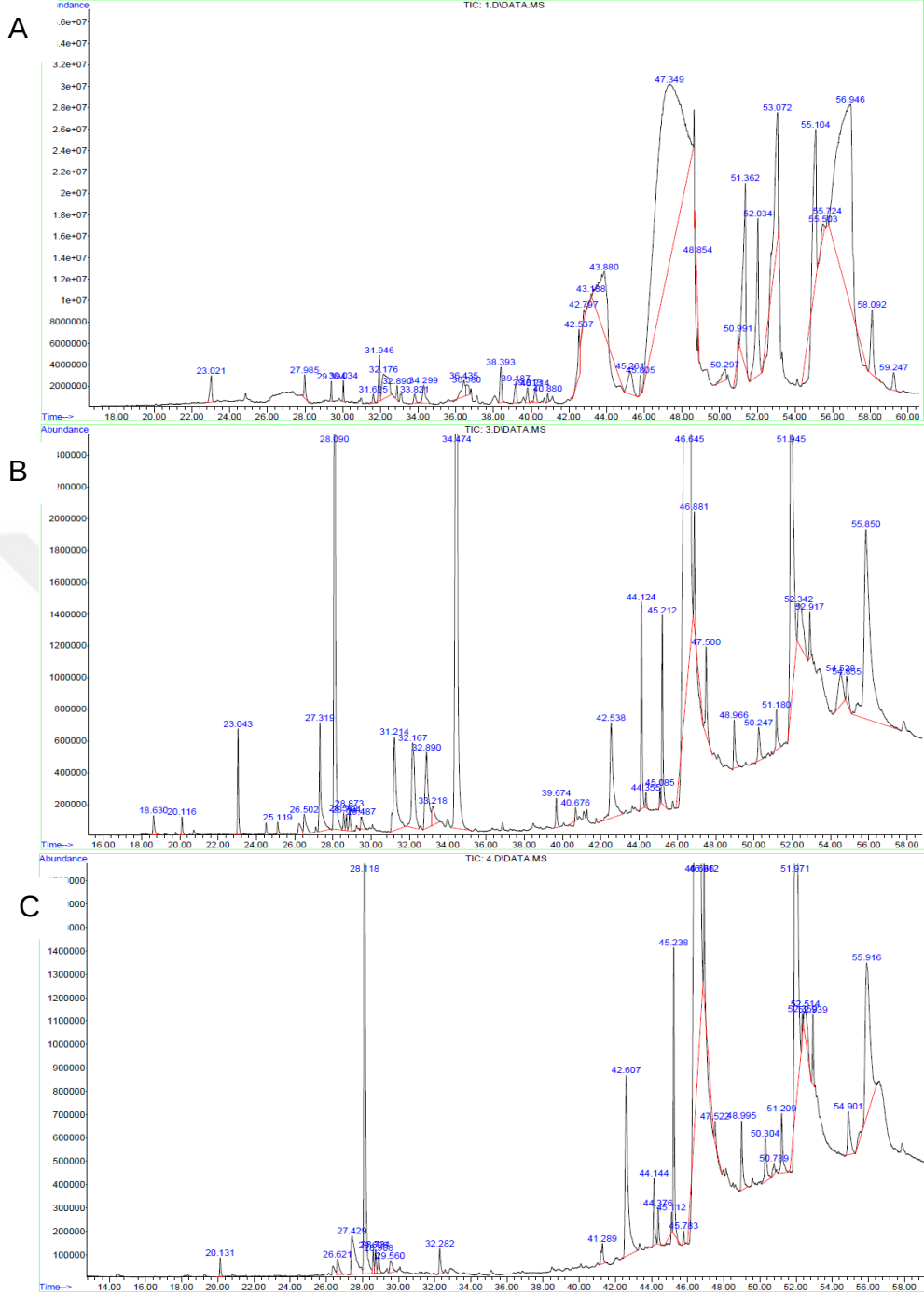
Şekil 30. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları

Tablo 9. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimle

Madde	Tutulma süresi (RT)	Kontrol	SA1/SA3/SA6 konsorsiyumu
3-propanetriol	9,97	+	-
2-fluoro-2-methylpropane	10,73	+	-
1-phenyl-3-triazole	12,12	+	-
2,4-dimethylbenzaldehyde	19,03	+	-
Chloroacetic acid	24,64	+	-
1-fluoro-1-phenyl ethylene	25,61	+	-
5-undecanol	29,02	+	-
methyl-3-heptanol	30,55	+	-
methyl-3-heptanol octane	32,27	+	-
di-tert-butyl-1-oxaspiro	40,94	+	-
n-hexadecanoic acid	42,66	-	+
cis-13-octadecenoic acid	45,26	-	+
oleicacid	46,70	-	+
cis-vaccenic acid	46,95	-	+
olealdehyde	51,98	-	+
9-cis-oleic acid	54,93	-	+
17-hexacosatrienoate	57,07	-	+
bicyclo heptan-2-ol	57,92	-	+
orisocopalan	58,56	-	+
	(+)=var / (-)=yok	(++)=artmış	(+)=azalmış

GC-MS analizine hazırlanan örneklerden bir bölümü analizden önce uçucu metabolitlerin analiz edilebilmesi için trimetilsilyasyona maruz bırakılmıştır. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri ile bakteriyel izolatların kültürel muamelesi sonucunda elde edilen kültürlerin yapılan trimetilsilyasyonu sonucu yapılan GC-MS analizlerine göre bakteriyel inokülasyonun yapılmadığı kontrol atık örneğinde Şekil 31’de görüldüğü gibi 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl, 4-hexylphenol, Hexadecane, 4-hydroxyphenylethanol, 2-nitrodibenzothiophene, 9-octadecene, Cyclononasiloxane, N-hexadecanoic acid, 11-octadecenoic acid, Oleicacid-redoil, 9,12-octadecadienoic acid, 1-docosene, siliconeoil, 1-(hydroxymethyl)ethyl ester, 4-chloro-3,5-dimethyl-1h-pyrazole, 2h-isoindole-2-acetic acid, 7-(spiropentylidene) dispiro, Difluoro (methylamino) phosphinesulfide ve Benzothiophene-2-carboxaldehyde piklerinin oluştuğu belirlendi. Silyasyonlanmış zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinde *Priestia* sp. SA3 izolatının inokülasyonu sonucunda yapılan GC-MS analizlerinde ise kontrolde var olan 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl, 4-

hexylphenol, Hexadecane, 2-nitrodibenzothiophene, 9-octadecene, Cyclononasiloxane, 11-octadecenoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, 1-docosene, Siliconeoil, 1-(hydroxymethyl)ethyl ester, 4-chloro-3,5-dimethyl-1h-pyrazole, 2h-isoindole-2-acetic acid, 7-(spiropentylidene)dispiro, Difluoro(methylamino)phosphinesulfide, Benzothiophene-2-carboxaldehyde piklerinin yok olduğu, 4- hydroxyphenylethanol, N-hexadecanoic acid ve Oleic acid-redoil piklerinin aynı kaldığı görüldü. Bunun yanında *Priestia* sp. SA3 izolatu ile inokülasyon sonucunda ise kontrolden ve *Bacillus* sp SA3 izolatından farklı olarak 2-(2'-methyl-1'-propenyl), 1,3-butadiene, Benzeneacetic acid, 3-hexen-1-ol, 2-(10'-oxodeca-2',4'-dienylidene), 13-octadecenoic acid, Vaccenic acid ve 3-hydroxy-2-p-tolyl-2-butenenitril piklerinin meydana geldiğı görüldü. *Bacillus* sp. SA6 bakterisinin zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri ile inokülasyonu sonucunda trimetilsilyasyon yapılmış kültür süpernatantının analizinde *Priestia* sp. SA3' e benzer olarak kontrolden var olan 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl, 4-hexylphenol, Hexadecane, 2-nitrodibenzothiophene, 9-octadecene, Cyclononasiloxane, 11-octadecenoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, 1-docosene, Siliconeoil, 1-(hydroxymethyl)ethyl ester, 4-chloro-3,5-dimethyl-1h-pyrazole, 2h-isoindole-2-acetic acid, 7-(spiropentylidene)dispiro, Difluoro(methylamino)phosphinesulfide, Benzothiophene-2-carboxaldehyde piklerinin yok olduğı, 4- hydroxyphenylethanol, N-hexadecanoic acid ve Oleic acid-redoil piklerinin aynı kaldığı görüldü. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatu ile inokülasyon sonucunda ise hem *Priestia* sp. SA3 izolatından hem de kontrolden farklı olarak 8-chloro-2,5-dimethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran, 4-hexylphenol, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-3-methoxyphenyl, 10-methyl-9-oxabicycloan, methylstearate (stearic acid), 11-hexacosyne, olealdehyde ve 2,3-dihydroxypropyl ester piklerinin oluştuğı belirlendi (Tablo 10).

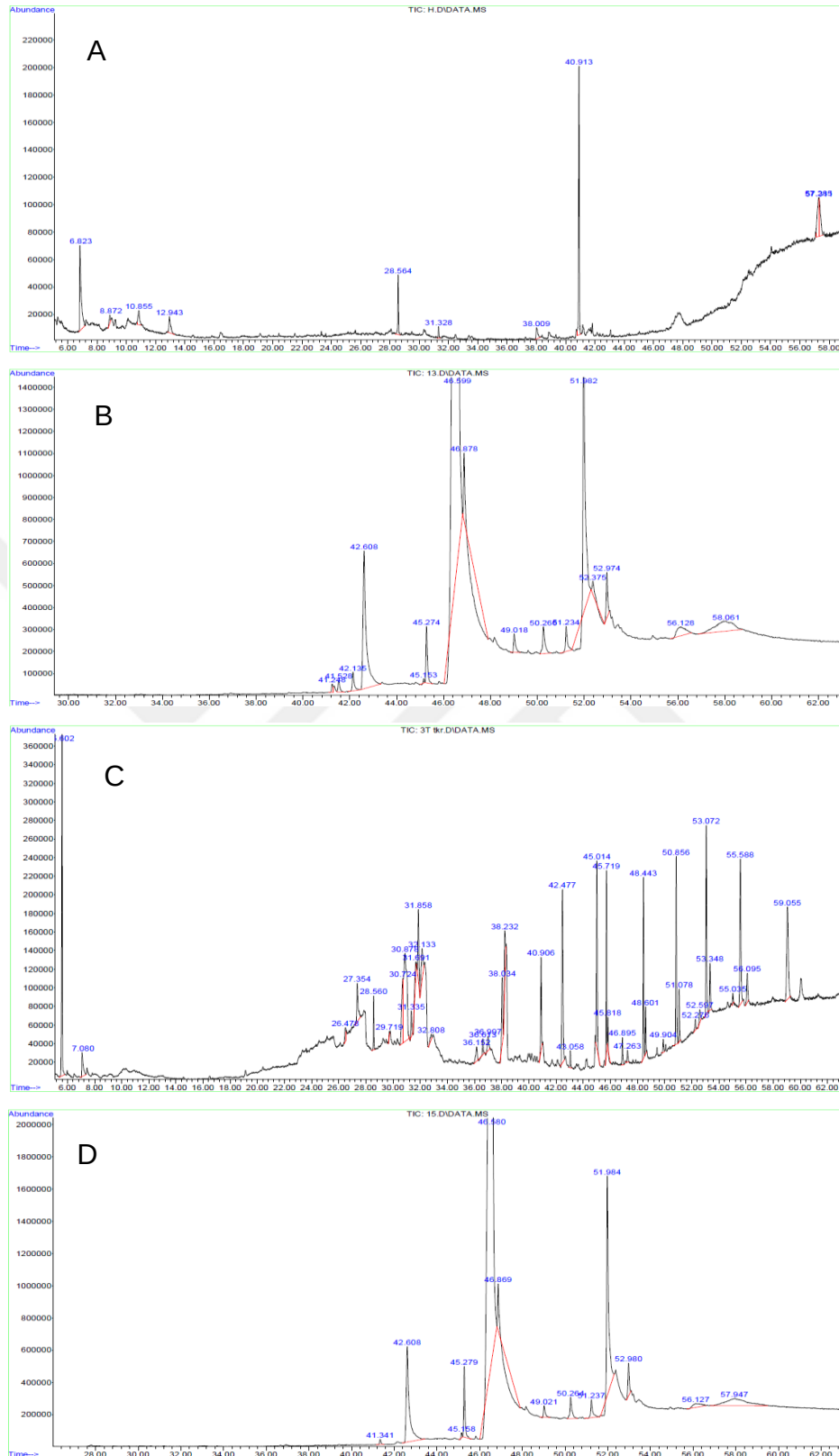


Şekil 31. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmiş kültürlerinin TMS (trimethylsilyl) ile siliasyonu sonucunda yapılan GC-MS analizi kromotogramı (A; kontrol, B: *Priestia* sp. SA3, C: *Bacillus* sp. SA6)

Tablo 10. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inoküle edilmeyen kontrol numunesi ile *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp SA6 bakteriyel izolatlarıyla inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarının trimetilsili ile türevlendirilmesi sonucunda GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Kimyasal madde	Tutulma süresi	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6
2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl	23,01	+	-	-
4-hexylphenol	27,98	+	-	-
Hexadecane	29,39	+	-	-
4-hydroxyphenylethanol	30,03/28,09	+	+	+
2-nitrodibenzothiophene	33,81	+	-	-
9-octadecene	36,43	+	-	-
Cyclononasiloxane	38,39	+	-	-
N-hexadecanoic acid	42,79/43,18/44,12	+	+	+
11-octadecenoic acid	45,26	+	-	-
Oleicacid-redoil	47,35	+	+	+
9,12-octadecadienoic acid	48,85	+	-	-
1-docosene	50,29	+	-	-
Siliconeoil	50,99	+	-	-
1-(hydroxymethyl)ethyl ester	51,36	+	-	-
4-chloro-3,5-dimethyl-1h-pyrazole	52,03	+	-	-
2h-isoindole-2-acetic acid,	55,10	+	-	-
7-(spiropentylidene)dispiro	55,50	+	-	-
Difluoro(methylamino)phosphinesulfide	55,72	+	-	-
Benzothiophene-2-carboxaldehyde	58,09	+	-	-
2-(2'-methyl-1'-propenyl)	20,13	-	+	-
1,3-butadiene,	27,32	-	+	-
Benzeneacetic acid	31,21	-	+	-
3-hexen-1-ol	32,89	-	+	-
2-(10'-oxodeca-2',4'-dienylidene)	34,47	-	+	-
13-octadecenoic acid	45,21/47,50	-	+	-
Vaccenicacid	46,88	-	+	-
3-hydroxy-2-p-tolyl-2-butenenitril	54,85	-	+	-
8-chloro-2,5-dimethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran	20,13	-	-	+
4-hexylphenol	28,11	-	-	+
4-[(trimethylsilyl)oxy]-3-methoxyphenyl	32,28	-	-	+
10-methyl-9-oxabicycloan	44,38	-	-	+
Methylstearate (stearic acid)	45,78	-	-	+
11-hexacosyne	52,94	-	-	+
Olealdehyde	54,90	-	-	+
2,3-dihydroxypropyl ester	55,91	-	-	+
		(-)=yok	(+)=var	

Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlar ile inokülasyonu sonucu kültür süpernatantları üzerinde yapılan GC-MS analizleri sonucu Şekil 32’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmeyen negatif kontrolde methoxy-phenyl, 2-Butyloctanol, 5-Nitrobenzofuran-2-Carboxylic, Phenol, di-tert-butyl-1-oxaspiro ve Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan piklerinin varlığı belirlendi. *Priestia* sp. SA1 bakterisi ile inokülasyon sonucu elde edilen kültür süpernatantında ise kontrolde var olan bütün piklerin yok olduğu görülürken ortamda kontrolden tamamen farklı n-hexadecanoic acid, elaidicacid, oleic acid, 9-octadecenoic acid, 9-octadecenal ve 11-hexacosyne pikleri meydana geldiği tespit edildi. *Priestia* sp. SA3 bakterisi ile atık su içeren minimal besiyerin inokülasyonu sonucunda tetracosamethyl-cyclododecasiloxan piki kontrol ile aynı kalırken, kontrolden ve *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatından farklı olarak Hexadecamethyl-Cyclooctasiloxane, 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro, Eicosamethyl-cyclodecasiloxane, Siliconeoil ve dimethyloxanilicacid pikleri yeni meydana geldi. *Bacillus* sp. SA6 bakterisi ile inokülasyon sonucu ise *Priestia* sp. SA1 bakterisine benzer ama kontrolden tamamen farklı n-hexadecanoicacid, elaidicacid, oleicacid, 9-octadecenoic acid, 9-octadecenal ve 11-hexacosyne piklerinin yeni meydana geldiği görüldü (Tablo 11).



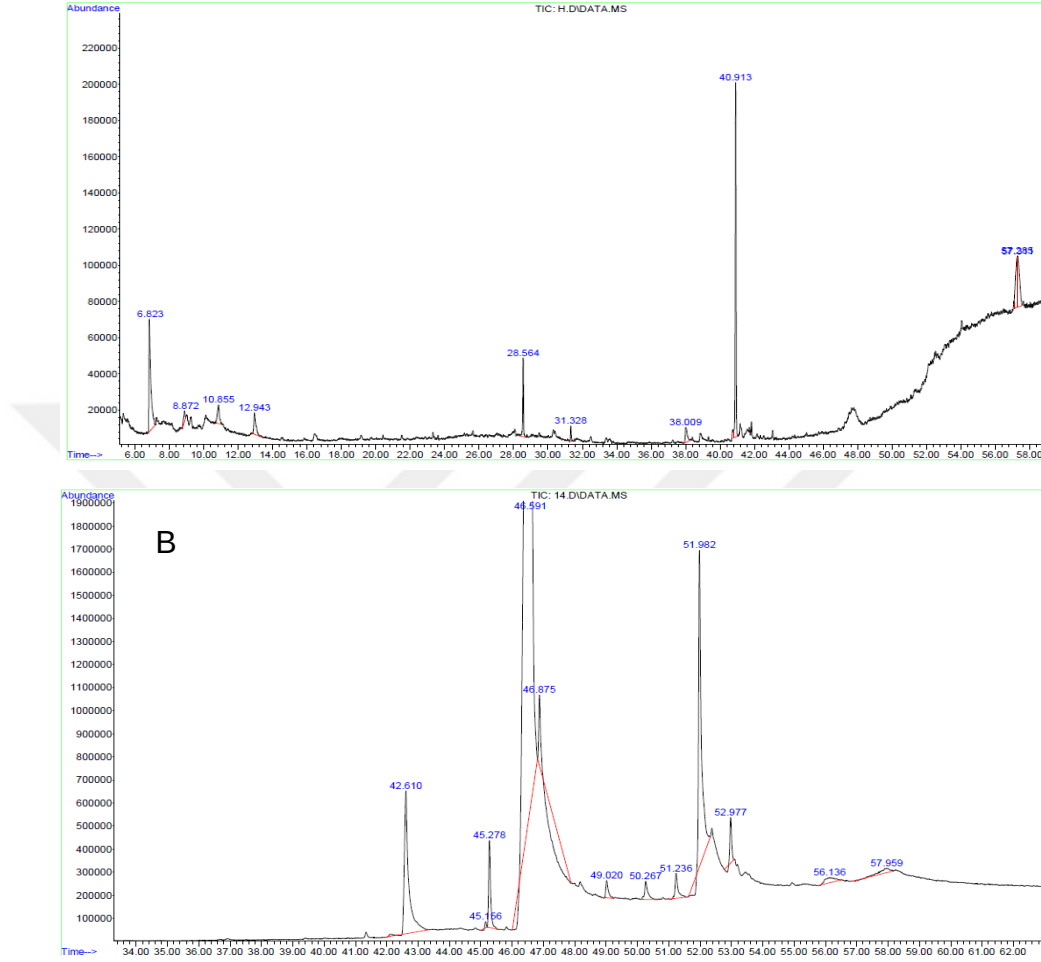
Şekil 32. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromatogramları (B; *Priestia* sp. SA1, C; *Priestia* sp. SA3, D; *Bacillus* sp. SA6).

Tablo 11. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Madde	Tutulma zamanı	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA1	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6
methoxy-phenyl	6,8	+	-	-	-
2-Butyloctanol	8,87	+	-	-	-
5-Nitrobenzofuran-2-Carboxylic	12,94	+	-	-	-
Phenol	28,56	+	-	-	-
di-tert-butyl-1-oxaspiro	40,93	+	-	-	-
Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan	57,38	+	-	+	-
n-Hexadecanoic acid	42,61	-	+	-	+
Elaidic acid	45,27	-	+	-	+
Oleic acid	46,59	-	+	-	+
9-Octadecenoic acid	46,87	-	+	-	+
9-Octadecenal	51,98	-	+	-	+
11-hexacosyne	52,97	-	+	-	+
Hexadecamethyl-Cyclooctasiloxane	30,87	-	-	+	-
7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro	40,90	-	-	+	-
Eicosamethyl-cyclodecasiloxane	42,47	-	-	+	-
Siliconeoil	48,44/59,05	-	-	+	-
Dimethyloxanilic acid	56,09	-	-	+	-
	(+) = var			(-) = yok	

Priestia sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyum şeklinde tekstil atık suyu içeren minimal besiyerine inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarında yapılan GC-MS analizleri sonucu Şekil 33'te görüldüğü gibi bakteri inokülasyonu yapılmamış kontrolde methoxy-phenyl, 2-butyloctanol, 5-nitrobenzofuran-2-carboxylic, phenol, di-tert-butyl-1-oxaspiro ve tetracosamethyl-cyclododecasiloxan piklerinin varken 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile muamele edilen kültür süpernatantında ise kontrolden tamamen farklı olarak N-hexadecanoic acid, 9-octadecenoic acidmethyl ester, 9-octadecenoic acid, oleic acid, cis-9-octadecenal, 9-

hexadecenyl acetate, 2-hydroxy cyclopentadecanone ve cis-vaccenic acid piklerinin yeni meydana geldiği görüldü (Tablo 12).



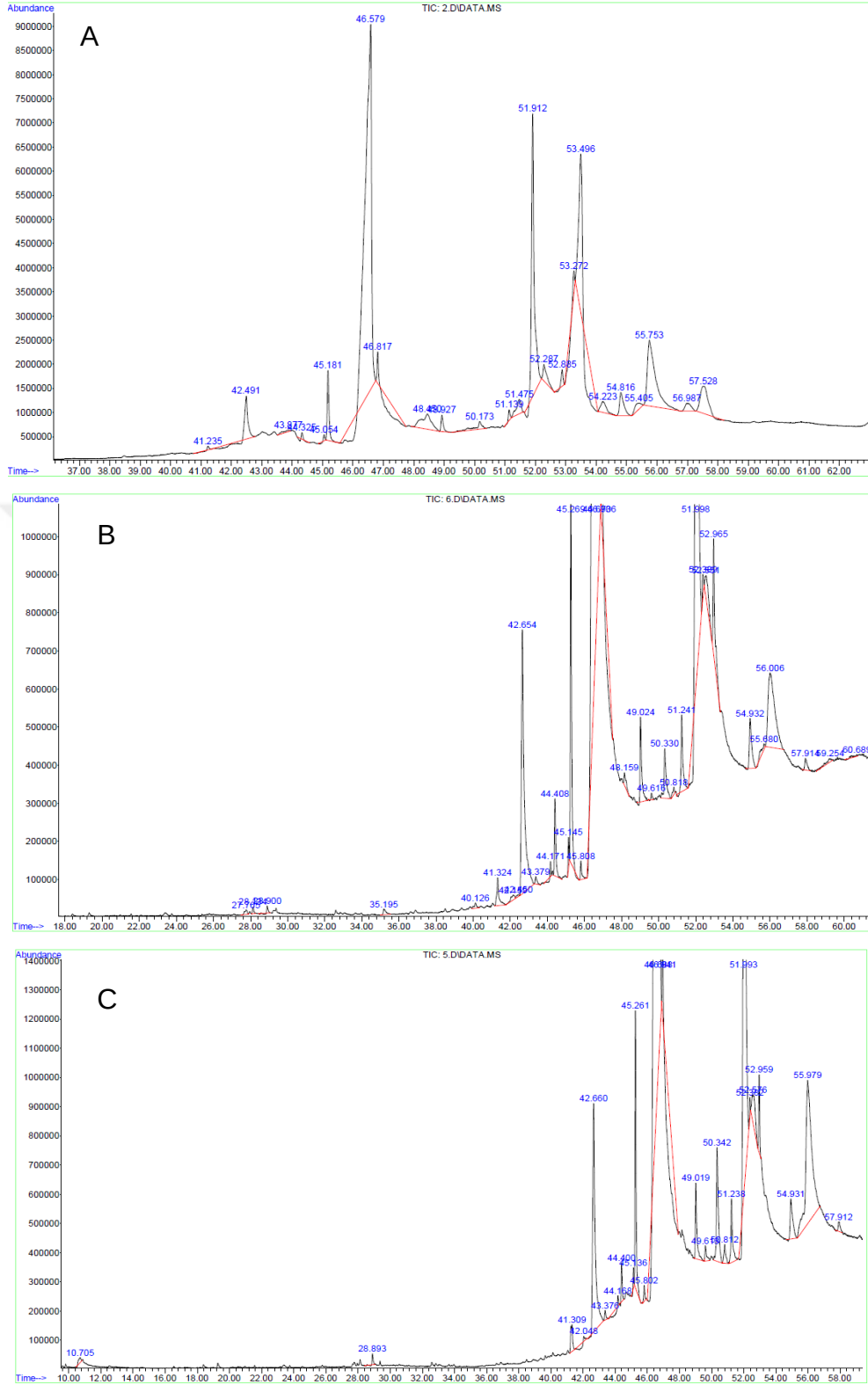
Şekil 33. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları.

Tablo 12. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Madde	Tutma zamanı	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA1, <i>Priestia</i> sp. SA3, <i>Bacillus</i> sp. SA6 Konsorsiyumu
methoxy-phenyl	6,8	+	-
2-Butyloctanol	8,87	+	-
5-Nitrobenzofuran-2-Carboxylic	12,94	+	-
Phenol	28,56	+	-
Di-tert-butyl-1-oxaspiro	40,93	+	-
Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan	57,38	+	-
N-hexadecanoic acid	42,61	-	+
9-octadecenoic acidmethyl ester	45,27	-	+
9-octadecenoic acid,	46,59/46,87	-	+
Oleicacid	50,26	-	+
Cis-9-octadecenal	51,97	-	+
9-hexadecenyl acetate	52,97	-	+
2-hydroxy cyclopentadecanone,	56,13	-	+
Cis-vaccenicacid	57,95	-	+
		(+)=var	(-)=yok

Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantının Trimetilsili (TMC) ile türevlendirilmiş formlarının GC-MS analizi piklerindeki değişimler Şekil 34'te görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi kontrol numunesinde hexadecanoic acid, 9-octadecenoic acid, oleic acid, cis-vaccenic acid, tetracosamethyl-cyclododecasiloxan, 6-octadecenoic acid, 9-octadecenal, trans-13-octadecenoic acid, stigmastan-3,5-diene, 3-phenyl-2-propen ve vitamin E piklerinin olduğu belirlendi. *Priestia* sp. SA3 izolatının inoküle edildiği kültür süpernatantın da kontrol ile benzer olarak sadece 9-octadecenoic acid ve Oleicacid pikleri aynı kalırken diğer bütün piklerin ortadan kaybolduğu görüldü. Bunun yanında *Priestia* sp. SA3 izolatının inokülasyonu sonucunda elde edilen örnekte ise kontrolden farklı 2-fluoro-2-methyl propane,

Hexadecanoic acid, methyl ester, N-hexadecanoic acid, 2-methyl-e, e-2,13-octadecadien, 9-tricosene ve Cyclopropaneoctanal-2-octyl pikleri meydana geldiği tespit edildi. *Bacillus* sp. SA6 izolatının inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantında ise kontrol besiyerinde var olan hexadecanoic acid, 9-octadecenoic acid ve tetracosamethylcyclododecasiloxan piklerinin aynı kaldığı ama kontrolde var olan bu üç bileşiğin haricinde kalan bütün piklerin tamamının kaybolduğu belirlendi. *Priestia* sp. SA3 izolatının inokülasyonu sonucu sadece hexadecanoic acid ve methyl ester piklerinin *Bacillus* sp. SA6 izolatının inoküle edildiği kültürle ortak olduğu geriye kalan bütün piklerin *Bacillus* sp. SA6 izolatından farklı olduğu belirlendi. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatı hem kontrol hem de *Priestia* sp. SA3 bakterisinin inoküle edildiği kültürlerin analizinden tamamen farklı olarak N-phenylethylisovaleramide, 2-ethoxy-acetate ethenol, Thiosulfuric acid, Methylstearate, 1-cyclohexylnonene, Cyclopentadecanone, 2-hydroxy ve 1-nonadecene piklerinin meydana geldiği görüldü (Tablo 13).



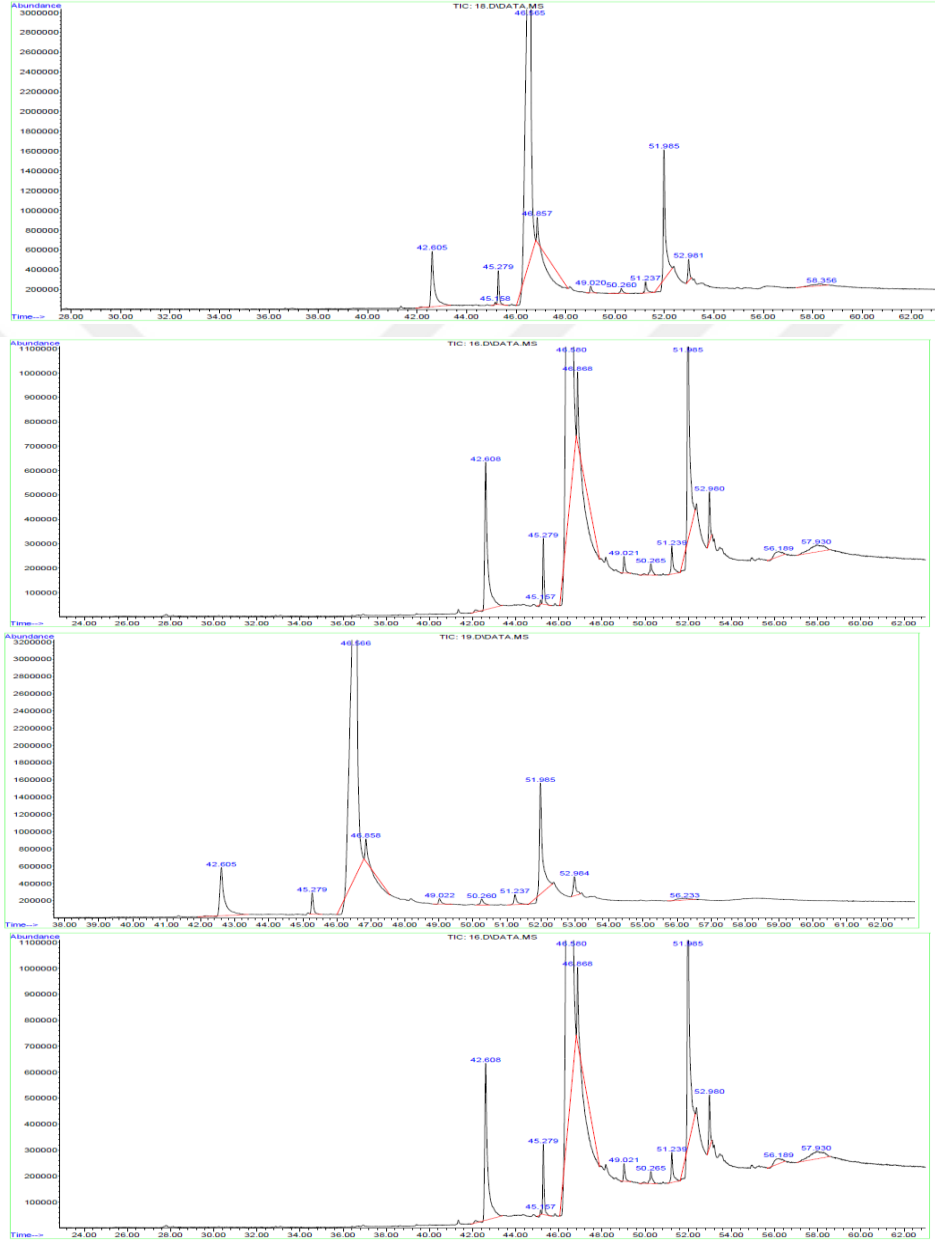
Şekil 34. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmiş kültürlerinin TMS (trimethylsilyl) ile siliasyonu sonucunda yapılan GC-MS analizi kromotogramı (A; kontrol, B: *Priestia* sp. SA3, C: *Bacillus* sp. SA6).

Tablo 13. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriler ile inoküle edilmeyen kontrol numunesi ile *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp SA6 bakteriyel izolatlarıyla inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarının trimetilsili ile türevlendirilmesi sonucunda GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Kimyasal madde	Tutma zamanı	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Priestia</i> sp. SA6
Hexadecanoic acid	41,23	+	-	+
9-octadecenoic acid	45,18	+	+	+
Oleic acid	46,57	+	+	-
Cis-vaccenic acid	46,81	+	-	-
Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan	48,45	+	-	+
6-octadecenoic acid	48,92	+	-	-
9-octadecenal	51,91	+	-	-
Trans-13-octadecenoic acid	52,29	+	-	-
Stigmastan-3,5-diene	53,27/53,49	+	-	-
3-phenyl-2-propen	54,81	+	-	-
Vitamin E	56,98	+	-	-
2-fluoro-2-methyl propane	10,70	-	+	-
Hexadecanoicacid, methyl ester	41,30	-	+	+
N-hexadecanoic acid	42,66	-	+	-
2-methyl-E-2,13-octadecadien	44,40	-	+	-
9-tricosene	45,80	-	+	-
Cyclopropaneoctanal, 2-octyl	57,91	-	+	-
N-phenylethylisovaleramide	35,19	-	-	+
2-ethoxy-acetate ethenol	40,12	-	-	+
Thiosulfuric acid	43,38	-	-	+
Methylstearate	45,80	-	-	+
1-cyclohexylnonene	52,96	-	-	+
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy	54,93	-	-	+
1-nonadecene	55,68	-	-	+
		(-)=yok	(+)=var	

Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerinde inoküle edilen bakteriyel izolatların 6 günlük inkübasyonu sonucunda 10.000 rpm’de 10 dak santrifügasyonla elde edilen kültür süpernatantları ile aynı besiyerin herhangi bir bakteri inoküle edilmemiş kontrol numunesinin GC-MS analizi sonuçları şekil 35’te görülmektedir. Şekil’de de görüldüğü gibi kontrolde n-Hexadecanoic acid, cis-13-Octadecenoic acidmethyl ester, Oleic acid, 9-Octadecenoic acid, cis-Vaccenic acid, 2-octyl-cyclopropaneoctanal ve E-2-Octadecadecen-1-ol piklerinin oluştuğu tespit edilmiştir. *Priestia* sp. SA1 bakteriyel izolatında kontrol ile aynı pikleri oluşturduğu görüldü. *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatı ise kontrolden ve *Priestia* sp. SA1 bakteriyel izolatından farklı olarak oleic asid pikinde artış olurken yine

farklı olarak 1-Nonadecene ve glutaric acid piklerinin meydana geldiği görüldü. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatının üremesi sonucunda ise *Priestia* sp SA3 bakteriyel izolatı ile aynı pikler ortamda varken yalnızca Glutaric acid pikinin kaybolduğu belirlendi (Tablo 14).

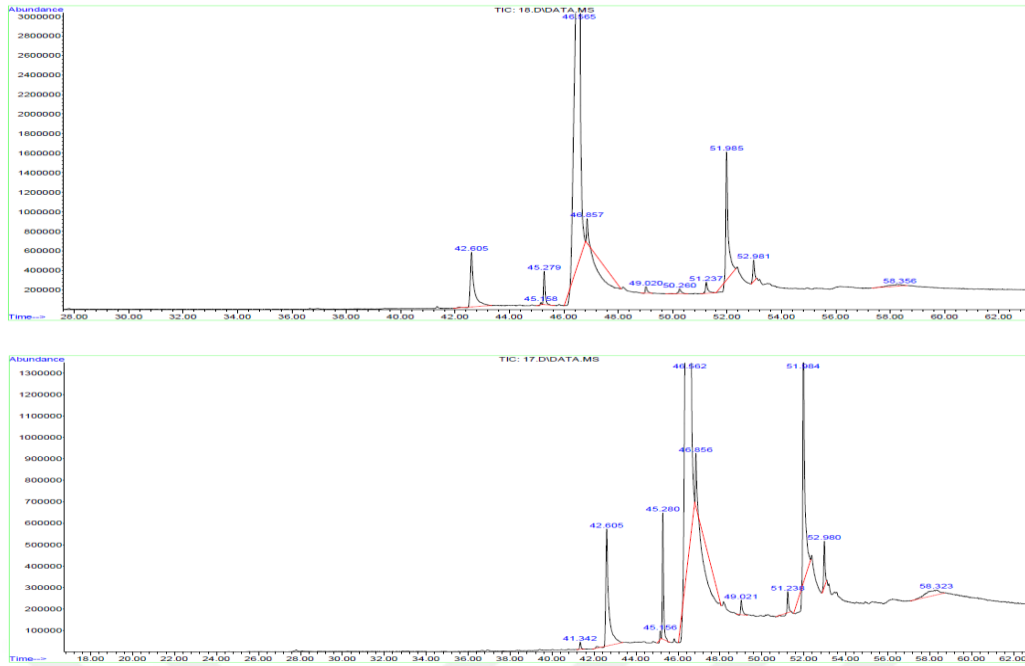


Şekil 35. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve ligninolitik izolatlarla inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları (B; *Priestia* sp. SA1, C; *Priestia* sp. SA3, D; *Bacillus* sp. SA6)

Tablo 14. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler

Kimyasal madde	Tutulma zamanı	Kontrol	<i>Priestia</i> sp. SA1	<i>Priestia</i> sp. SA3	<i>Bacillus</i> sp. SA6
Glutaric acid	42,13	-	-	+	-
n-Hexadecanoic acid	42,60	+	+	+	+
cis-13-Octadecenoic acidmethyl ester	45,27	+	+	+	+
Oleic acid	46,58/50,26	+	+	++	++
9-Octadecenoic acid,	46,88/51,98	+	+	+	+
cis-Vaccenic acid	49,01	+	+	+	+
2-octyl-cyclopropaneoctanal	50,23	+	+	+	+
E-2-Octadecadecen-1-ol	52,98	+	+	+	+
1-Nonadecene	56,09	-	-	+	+
		(+)=var	(-)=yok	(++)=artma	

Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inkübasyonu sonucu Şekil 36'da görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi besiyerinin kontrol numunesinde n-Hexadecanoic acid, 11-Octadecenoic acid, Oleic acid, 9-Octadecenoic acid, cis-Vaccenic acid, hydroxymethylve hexadecen-1-ol acetate pikleri olduğu belirlendi. 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile oluşturulan kültürde ise kontrole göre cis-13-Octadecenoic acidmethyl ester ve 9-Octadecenoic acid piklerinde artış olmasına rağmen diğer piklerde her hangi bir değişiklik olmadığı görülmektedir (Tablo 15).



Şekil 36. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakteriyel izolatlarla inoküle edilmemiş (A) ve *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının konsorsiyumu (B) ile inoküle edilmiş kültür süpernatantlarının GC-MS analiz kromotogramları.

Tablo 15. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyerin 3 bakteriyel izolatın konsorsiyumu ile inokülasyonu sonucu GC-MS analizi piklerindeki değişimler.

Kimyasal madde adı	Tutma zamanı	Kontrol	SA1/SA3/SA6 konsorsiyumu
N-Hexadecanoic acid	42,60	+	+
Cis-13-Octadecenoic acidmethylester	45,27	+	++
Oleic acid	46,58/50,26	+	+
9-Octadecenoic acid,	46,88/51,98	+	++
Cis-Vaccenic acid	49,01	+	+
2-octyl-cyclopropaneoctanal	50,23	+	+
E-2-Octadecadecen-1-ol	52,98	+	+
	(+)=var	(-)=yok	(++)=artmış

3.8.6. Fitotoksisite Çalışmaları

Kağıt, tekstil ve zeytin atık suyu içeren minimal besiyerlerde üç bakteriyel izolatın inkübasyonu ile elde edilen kültür süpernatantları (deney grubu) ile aynı besiyerlerin bakteriyel izolatlar ile inoküle edilmeyen kontrol numuneleri kullanılarak yapılan tohum çimlenmesi denemeleri sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 16’da görülmektedir. Tablo

15’de de görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan numunelerdeki çimlenmelerin genel olarak diğer tüm deney gruplarına göre daha düşük olarak görülmektedir.

Tablo 16. Kağıt, tekstil ve zeytin atık suyu içeren minimal besiyerlerde üç bakteriyel izolatin inkübasyonu ile elde edilen kültür süpernatantları ile yapılan Börülce fasülyesi fitotoksitite çalışması sonuçları.

	Zeytin atık suyu			Tekstil atık suyu			Kâğıt atık suyu		
	Çimlenen Tohum (adet)	Adet/Filiz uzunluğu (cm)	Amilaz Miktarı (U/L)	Çimlenen Tohum (adet)	Adet/Filiz uzunluğu (cm)	Amilaz miktarı (U/L)	Çimlenen Tohum (adet)	Adet/Filiz uzunluğu (cm)	Amilaz miktarı (U/L)
<i>Priestia</i> sp. SA1	8	2X2 3X3 3X4	1846	8	6X3 2X4	1798	9	2X3 4X4 3X5	2114
<i>Priestia</i> sp. SA3	9	5X1 2X2 2X4	1569	9	1X2 3X3 5X4	1387	9	3X2 4X3 1X4 1X5	2109
<i>Bacillus</i> sp. SA6	7	3X3 4X4	1571	8	3X2 3X3 1X4 1X5	1410	9	4X3 3X4 2X5	2473
Konsor-siyum	6	1X1 2X2 3X3	2029	9	4X2 3X3 2X4	1467	10	4X3 2X4 2X5 2X6	3167
KONTROL (ATIK SU)	3	2X1 1X2	1099	4	2X1 2X2	696	6	1X1 3X2 2X3	1070
SU	10	1X1 7X2 2X3	1445	10	5X1 3X2 2X3	1451	10	3X1 2X2 3X3 2X4	1400

Tabloda görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan ve herhangi bir bakteriyolojik inokülasyona tabi tutulmayan herbir atık suyu içeren minimal besiyer numunelerinin diğer tüm bakteriyolojik inokülasyona tabi tutulan deney gruplarından daha az çimlenme ve filiz uzunluğuna sahip olduğu görülmektedir. Çimlenme sonrası ise yapılan amilaz enzim miktarı ölçümlerinde de herhangi bir inokülasyon yapılmayan kontrol numunelerinin düşük miktarda amilaz ürettiği görülmektedir.

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerin çalışmada kullanılan üç ligninolitik bakteriden biri olan *Priestia* sp. SA3 bakterisi ile inokülasyonu sonucu elde edilen kültür

süpernatantının yapılan Börülce fasülyesi biyoassay testinde 9 tohum ile en fazla tohum çimlenmesini sağladığı buna karşın aynı zeytin atık suyu ile hazırlanan kontrol testinde ise sadece 3 tane tohumun çimlendiği tespit edildi. Ayrıca Tablo 15’de görüldüğü gibi bu denemelerde en uzun filiz uzunluğu 4 cm ile *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3 bakterilerinin inoküle edildiği deney gruplarında görülmüştür. İlaveten, bakteriyal izolatların inokülasyonu sonucu oluşan kültürlerinn süpernatantları ile ıslatılan börülce tohumlarının filiz uzunluğunun musluk suyuyla sulanan tohumlardan daha uzun olduğu tespit edildi. Tohum gövde ve filizlerinden ezilerek elde edilen toplam amilaz enzim miktarının kontrole göre yaklaşık 2 kat arttığı da kaydedilmiştir (Şekil 37-38).



Şekil 37. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen bakteriyal izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zamanlarda ve tohum sayısı ile yapılan börülce tohumlarında oluşan çimlenme resimleri (1. Kontrol, 2. *Priestia* sp. SA1, 3. *Priestia* sp. SA3, 4. *Bacillus* sp. SA6)



Şekil 38. Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen bakteriyel izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zammalarda ve tohum sayısı ile yapılan börölce tohumlarında oluşan çimlenme resimleri (1. Kontrol, 2. *Priestia* sp. SA1, 3. *Priestia* sp. SA3, 4. *Bacillus* sp. SA6) .

Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin *Priestia* sp SA1, *Priestia* sp SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatları ve her 3 bakteriden oluşan konsorsiyum şeklinde inokülasyon çalışması sonucunda elde edilen kültür süpernatantlarının Börölce fasülyesi fitotoksitite çalışması Tablo 15'te görülmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi deney gruplarında kullanılan 10 tohumdan %90'ında çimlenirken, kontrol atık suyu ile çimlenme sadece % 40 oranında meydana gelmiştir. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyer ve bakteriyel izolatlar ile inokülasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantı kullanılarak yapılan çalışmada kök uzunlukları kontrole göre deney gruplarında çok daha uzun olmuştur. *Bacillus* sp SA6 bakterisinin inoküle edildiği tekstil atık suyu içeren minimal besiyer örneğinde 5 cm kadar kök uzunluğu gözlenirken, bakterinin inoküle edilmediği kontrol numunesi ile ısıtılan tohumlarda kök uzunluğu en fazla 2 cm olmuştur. Çalışmada diğer bir kontrol olarak kullanılan musluk suyuyla ısıtılıp çimlendirilmeye bırakılan 10 tohumdan en uzun kök uzunluğu 3 cm iken, *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatların bir arada olduğu konsorsiyumun ürettiği kültürün muamelesiyle 4 cm, *Bacillus* sp. SA6 bakterisi ile ise 5 cm kök uzunluğu oluşmuştur (Şekil 39). Bakteriler ile muamele edilmiş ve kontrol tekstil atık suyuyla ısıtılan tohumların tohum ve köklerinden izole edilen amilaz miktarı kontrol numunesinde 699 U/L iken, *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 ve 3 bakteri konsorsiyumu ile muamele edilen tohumla da muamele sonucunda bu miktar sırasıyla 1798, 1387, 1410 ve 1467 (U/L) olmuştur (Tablo 15).



Şekil 39. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerine inoküle edilen bakteriyal izolatların kültür süpernatantları ile farklı zamanlarda yapılan muamele sonucu börülce tohumlarında oluşan çimlenme resmi (1. *Priestia* sp. SA1, 2. *Priestia* sp. SA3, 3. Kontrol (Bakteri muamelesi yapılmayan atık su), 4. *Bacillus* sp. SA6).

Kâğıt atık suyu içeren minimal besiyerin *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 izolatları ile ayrı ayrı inokülasyonu sonucu elde edilen kültürlerin santrifügasyonu sonucu elde edilen kültür süpernatantlarının Börülce fasülyesi ile muamelesi sonucunda 9 tohum çimlenirken, 3 bakterinin konsorsiyumu ile elde edilen kültür süpernatantı ile yapılan muameleyle 10 tohumun hepsi çimlenmiş buna karşılık kağıt atık suyu içeren minimal besiyer kontrolüyle yapılan ıslama sonucunda ise sadece 6 tohum çimlenmiştir. Çimlenen tohumların filiz uzunluğu ise *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakterilerinin üremesiyle elde edilen süpernatant örneklerinde en uzun 5 cm olurken, 3 bakterinin konsorsiyumu ile elde edilen örnek numunesi ile ıslanan tohumlarda 6 cm olmuştur. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyer kontrolü ile ıslanan tohumlarda ise filiz uzunluğu 3 cm olarak tespit edilirken musluk suyuyla yapılan ıslamada ise bu uzunluk 4 cm olarak ölçülmüştür. Çalışma sonucunda elde edilen tohumlardan elde edilen amilaz enzim miktarları ise kağıt atık suyu içeren minimal besiyer kontrolünde 1070 U/L olurken *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 ve 3 bakteri konsorsiyumu ile sırasıyla 2114, 2109, 2473 ve çalışmadaki en yüksek değer olan 3267 U/L olmuştur.



Şekil 40. Kağıt atık suyu içeren minimal besiyere inoküle edilen bakteriyal izolatların kültür süpernatantları ile muamele sonucu farklı zamlalarda ve tohum adetiyle yapılan Börölce tohumlarında oluşan çimlenme resmi (1. Kontrol (Bakteri muamelesi yapılmayan atık su), 2. *Priestia* sp. SA1, 3. *Priestia* sp. SA3, 4. *Bacillus* sp. SA6).

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, *Bacillus megaterium* ve *Rhodococcus jostii* bakterileri kaynaklı sırasıyla lakkaz ve lignin peroksidaz enzimlerini içeren klonlar kullanıldı. Daha önce KTÜ Biyoloji Anabilim dalında Tübitak 1001 projesi (Çanakçı, 2016) kapsamında gerçekleştirilen doktora tezinde (Özer A., 2018) yukarıda ifade edilen bakterilere ait ilgili genler *Bacillus subtilis* W800 suşuna pMA0911 vektörü yardımıyla öncelikle tek olarak ve ardından üçlü olarak füzyon ve operon düzeninde klonlanmıştı. Rekombinant *Bacillus subtilis* klonlarına ilave olarak çalışmada toplanan atık su numunelerinden 12 adet bakteri izole edildi. İzole edilen bu bakterilerden ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin büyüye-bildiği seçici besiyerleri kullanılarak yapılan kültürlerden sadece 3'ünün ligninolitik aktiviteye sahip bakteri olduğu belirlendi ve SA1, SA3 ve SA6 olarak ön isimlendirmeleri yapıldı. İzolatlardan yapılan 16S rRNA geni sekans analizlerine göre SA1 ve SA3 izolatlarının *Priestia* sp. cinsine, SA6 ise *Bacillus* sp. cinslerine ait oldukları belirlendi ve bakteriyel izolatlar *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 olarak isimlendirildiler. *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 suşlarının 16S rRNA geni sekans analizleri sonucunda kendi cinsindeki diğer yakın türlere yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. Ancak *Priestia* sp. SA1 suşunun ise 16S rRNA geni sekans analizi sonucuna göre yakın türlere benzerliği *Priestia aryabhatai*'a % 98,83, *Priestia megaterium*'a %98,71, *Bacillus zanthoxyl*'a %98,71 ve *Priestia flexa*'a %97,92 benzerlik gösterdiği ve yeni bir tür olma olasılığının yüksek olduğu belirlendi.

Gerçekleştirilen bu çalışmada her bir fabrikadan alınan atık sular ile rekombinant bakteriler altı gün süreyle atık suları içeren minimal besiyerinde inoküle ve inkübe edildi. Muamele sonucunda çöktürme ile elde edilen süpernatantlar üzerinde fizikokimyasal, biyokimyasal ve biyolojik çalışmalar yapıldı. Elde edilen sonuçlara ait grafikler, kromatogram analizleri, şekiller ve tablolar bulgular bölümünde görülmektedir. Bütün bu sonuçlar incelendiğinde rekombinant bakteriler için tam kesin olarak sadece tek bir bakterinin bütün deneylerde istenilen aktivite ve sonuçları sağlayamadığı, belli sonuçlar için iyi olan bir bakterinin diğer atık su örnekleri veya parametrelerin tam istenilen sonucu vermediği görülmüştür. Bu tutarlılığı çok yüksek olmayan sonuçların ortaya çıkmasının nedeni olarak rekombinant bakterilerin ilgili genleri ekspresyonu için uyarılmalarının tam olarak

gerçekleştirilememiş olması düşünülmektedir. Zira rekombinant bakterilerde kullanılan promotor quorum sensing (çoğunluk algılama) ile indüklenen bir promotordur ve ortamda ki bakteri sayısı bu uyarılmalarda etkindir. Rekombinant bakteriler ile gerçekleştirilen çalışmalarda materyal metot bölümünde de belirtildiği gibi minimal tuz besiyeri ve herbir atık sudan belli miktarlarda ilaveyle oluşturulan besiyerler kullanıldığından rekombinant bakterilerin optimum üreme seviyesi yakalanmamış olabilir. Optimum üreme seviyesinin yakalanmaması durumunda da quorum sensing ile uyarılacak olan promotorun uyarılmasında bazı problemler oluşmuş olabilir. Çalışmada tam olarak tekrar edilebilir sonuçların alınamamasının bir nedeni bu olabilir.

Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan rekombinant bakterilerden çok daha etkin sonuçların alınması beklenmekteydi. Ancak elde edilen sonuçlar incelendiğinde durumun bu şekilde olmadığı görüldü. Bu durumun nedeninin ise rekombinant sistemde lakkaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin çalışması için ihtiyaç duydukları aracı maddelerin kültürasyon ortamına dışarıdan sentetik olarak ilave edilemediğinden enzimlerin etkin olarak çalışmamasının yattığı düşünülmektedir. Örneğin lignin peroksidaz enzimi reaksiyon başlatmak için H_2O_2 'ya ihtiyaç duyar. Kültürasyon ortamına H_2O_2 ilave edilmesi ise lakkaz enziminin çalışmasını inhibe etmektedir. Yine lakkaz enziminin çalışması için gerekli olan ABTS ise kültürasyon ortamında sıcaklığın etkisiyle kısa sürede bozunmaktadır. Oysaki söz konusu enzimleri üreten yaban tip bakterilerin enzimlerin çalışabileceği aracı maddeleri çeşitli ara yollardan doğal olarak ürettikleri göz önüne alındığında atık sulara uygulanmaları açısından daha etkin oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle her üç proteini eş zamanlı olarak üretebilen rekombinant suşlar atık sularda efektif olarak kullanılamayacağı bu çalışma sonucunda da görülmüştür.

Yapılan literatür araştırmalarında bu çalışmada izole edilen üç bakteri türüne ait farklı suşların atık su bioremediasyonunda kullanıldığı görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında 2021 yılında yapılan bir çalışmada tekstil atık suyundan izole edilen *Priestia aryabhatai* SMNCH17-07 suşu ile tekstil boyalarında renk açılması üzerine yapılmış olan bir çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonucunda acid blue 193 boyasını % 14 oranında giderdiği, 216 saatlik bir muamele sonucu ise boyada %33 oranında giderim sağlandığı belirtilmiştir (Korcan vd., 2021). Bu çalışmada izole edilen *Priestia* sp. SA1 suşu ise genel olarak tüm tekstil boyalarını içeren tekstil atık suyunda 144 saatlik muamele sonucunda %

50 oranında renk açılması gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlar ışığında yeni bakteriyel izolatin tekstil boyaları üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir.

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin bakteriyel izolatlarla muamele edilme-yen kontrol kültürünün trimetilsilyasyonu sonucu yapılan GC-MS analizinde tespit edilen 1-docosene için Amerika Birleşik Devletleri Milli Tıp Kütüphanesi" (National Library of Medicine, USA) tarafından yutulması ve solunum yollarına girmesi halinde %66,7 oranında ölümcül olabilir uyarısı bulunmaktadır. Ayrıca bu bileşiğin temas halinde %100 göz ve deri tahrişine sebep olur uyarısı yapılmaktadır. Kontrol kültürünün GC-MS analizinde tespit edilen 4-hexylphenol maddesi için ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına yol açabilir uyarısı varken, 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl, 4-hydroxyphenylethanol, 2- ve nitrodi-benzothiophene kimyasal maddeleri içinse temas halinde gözde ve deride tahriş neden olabilir uyarıları yapılmaktadır. *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarıyla zeytin atık su kültürünün muamelesi sonucu zararlı olan bu kimyasal maddelerin tamamen ortadan kalktığı belirlendi. Tekstil suyu içeren minimal besiyerinin bakteriyel izolatlarla muamele öncesi kontrol kültürünün trimetilsilyasyonu sonucu yapılan GC-MS analizinde tespit edilen 3-phenyl-2-propen için Amerikan Milli Tıp Kütüphanesi %85 oranında deri ve solunum yolu tahrişi yapabilir uyarısı yapmaktadır. Kontrol kültüründe tespit edilen 13-octadecenoic acid için ise %100 deri ve ciddi göz tahrişine sebep olur uyarıları yapılmaktadır. *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarıyla tekstil atık su kültürünün muamelesi sonucu zararlı olan bu iki kimyasal maddeninde tamamen ortadan kalktığı, yeni oluşan piklere ait kimyasalların hiçbirinin aynı merkezce zararlı veya tahriş edici olarak kabul edilmediği belirlendi. Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerinin muamele öncesi kontrol atık kültürünün GC-MS analizinde tespit edilen methoxy-phenyl, 2-Butyloctanol için su yaşamı için çok ciddi toksik madde uyarısı bulunmaktadır. Aynı zamanda, kontrol atık suyunda tespit edilen Di-tert-butyl-1-oxaspiro için ise göz ve solunum yolu tahrişi yapar uyarısı mevcuttur. Tekstil atık suyunun *Priestia* sp. SA1, *Pirestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının hem korsorsiyum düzeninde hem de ayrı ayrı her bir bakteri ile yapılan tekstil suyu içeren minimal besiyerinin inoküle kültürleri sonucunda Amerikan Milli Tıp Kütüphanesi tarafından zararlı listesinde yer alan kimyasal maddelerin tamamen ortadan kalktığı ve muamele sonucunda oluşan yeni piklerin ait olduğu kimyasalların zararsız olduğu görülmüştür.

Zeytin atık suyu içeren minimal besiyerinin muamele öncesi kontrol atık su minimal besiyer numunesinde GC-MS analizinde tespit edilen 3-Propanetriol, 2-Fluoro-2-methylpropane, 1-Phenyl-3-triazole, 2,4-dimethylbenzaldehyde ve Methyl-3-heptanol kimyasalları için Amerikan Milli Tıp Kütüphanesi deri, göz ve solunum yollarında tahriş edici uyarısı yaparken, aynı merkez Chloroacetic acid kimyasalı için solunması halinde ölüme neden olur (%42,7), temas edilmesi halinde deride, gözde tahriş yaper ve solunması halinde solunum yollarında tahriş edici uyarısı yapmaktadır. Zeytin atık suyunun *Priestia* sp. SA1, *Pirestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatları ile yapılan atık su muamele kültürleri sonucunda Amerikan Milli Tıp Kütüphanesi tarafından zararlı listesinde yer alan kimyasal maddelerin tamamen ortadan kalktığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde *Priestia megaterium* bakterisi kullanılarak 2019 da yapılan bir çalışmada, tekstil sanayisinde yoğun olarak kullanılan ve Avrupa kimyasal ajansı tarafından sucul sistemler için zararlı organik madde ilan edilen acid red 337(2-(Trifluoromethyl) benzenaminediazo and 6-amino-4-hydroxynaphthalene-2-sulfonic acid) boyasının adı geçen bakteri ile 10 günlük muamele sonucunda boyayı parçaladığı, ancak çalışmada yapılan GC-MS analizleri sonucu bakteri muamelesi öncesi acidred 337 boyasının oluşturduğu piki (RT 6,20) muamele sonrası tamamen ortamdan yok edemediği rapor edilmiştir (Ayman vd., 2019). Bu tez kapsamında yapılan çalışmada kullanılan, renk ve kimyasal içerik yönünden yoğun olan tekstil atık suyunun *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 izolatlarıyla atık suların muamele edilmesi sonucu yapılan GC-MS analizide ise kontrol atık suyunda var olan phenol dahil bütün pikleri ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Yukarıda ifade edilen sonuçlar ve literatür bilgisi dikkate alındığında yapılan bu tez çalışmasında izole edilen ve atık su arıtımında etkinliği ortaya konmaya çalışılan bakteriyel izolatların ümit verici aktivitelere sahip olduğu görülmektedir.

Zeytin atık suyunun renk açılmasını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda rekombinat ve yeni bakteriyel izolatların zeytin fabrika atık sularını içeren minimal besiyerine yapılan inokülasyonu sonucunda lakkaz enzim geninin klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 %18, lignin peroksidaz enzim geninin klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 %16, lakkaz ve lignin peroksidaz genlerini füzyon düzeninde klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 %15, lakkaz ve lignin peroksidaz genlerini operon düzeninde klonlandığı pMA0911'i içeren *B. subtilis* WB800 ise %20 oranında renk açılması sağlarken, bakteriyel izolatlar ise aynı şartlarda *Priestia* sp. SA1 %40,

Priestia sp. SA3 %44 ve *Bacillus* sp. SA6 %35 oranında renk açılması sağlamıştır. Chandra ve arkadaşlarının 2011 de yapmış olduğu *Serratia marcescens* (GU193982), *Klebsiella pneumoniae* (GU193983) ve *Citrobacter* sp. (HQ873619) bakterileriyle gerçekleştirilen çalışma ile benzer şartlarda gerçekleştirilmiş olup bakterilerin daha iyi üremesi için atık su kültürüne %1 glukoz eklemesine rağmen renk açılması sırasıyla %44, %43 ve % 41 olarak bulmuştur (Chandra vd., 2011). Bu çalışmada kullandığımız rekombinant bakteriler Chandra ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre daha az renk açılması sağlarken, izole edilen ligninolitik bakteriyel izolatlar ise her hangi bir glukoz besin desteğinin kültüre eklenmesine gerek kalmaksızın benzer şekilde renk açılması gerçekleştirdiği belirlendi. Chandra ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu bu çalışmada zeytin atık sularının bakteriler ile muamelesi sonucu kültürlerde kalan lignin miktarları ise *Serratia marcescens*'te %36, *Klebsiella pneumoniae*'da %42 ve *Citrobacter* sp. %39 olurken, yaptığımız çalışmada kullandığımız rekombinant bakteriler kültürlerdeki lignin miktarında %20 nin altında bir azalma meydana getirirken, *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarında sırasıyla %35, %45 ve % 40 olmuştur. Chandra ve arkadaşlarının bu çalışmada yapmış oldukları fitotoksisite çalışmalarında *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Citrobacter* sp. bakterileri ile muamele edilen zeytin atık suyu ile börülce fasulyesi tohumları üzerinde çimlenme deneyleri gerçekleştirmiştir. Tohumlarda çimlenmenin başlamasıyla beraber depo maddelerini embriyonun kullanabileceği forma dönüştüren amilaz enziminin miktarlarında yapılan ölçümlerde *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Citrobacter* sp. konsorsiyumu ile muamele edilen kültür kullanılarak yapılan tohum çimlenmesinde amilaz miktarı 600 U/L iken (kontrol 300 U/L), bu çalışmada *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 ve 3 bakteri konsorsiyumu ile zeytin atık suyunun muamelesi sonucu yapılan börülce fasulyesi toksisite sonucundaki amilaz miktarları sırasıyla 1846, 1569, 1571 ve 2029 U/L (kontrol 1099 U/L) olmuştur. Elde edilen sonuçlar ve ifade edilen literatür sonuçları karşılaştırıldığında yeni izole edilen bakteriyel izolatların zeytin atık suyu içeren minimal besiyeri ile muamelesi sonucunda meydana gelen renk açılması, kalan lignin miktarı ve fitotoksisite çalışması sonuçları dikkate elindiğinde literatürde kullanılan bakteriler ile yarışabilir nitelikte olduğu görülmüştür.

Raj ve arkadaşları (2007) kâğıt hamuru ve kâğıt fabrikası atık sularında ligninolitik *Paenibacillus* sp. bakterisi ile biyoremediasyon ve toksisitenin azaltılması amacıyla yapmış

olduğu çalışmada atık su ile bakteri muamelesi gerçekleştirirken kültür ortamına karbon kaynağı olarak glukoz ve azot kaynağı olarak pepton ilave edilmesine rağmen 144 saatlik inkübasyon sonucu kültürdeki renk açılması %68 olmuştur. Yapmış olduğumuz bu çalışmada izole edilen ve çalışmada kullanılan yaban tip 3 bakteride kültür ortamına atık su ile muamelede glukoz ve pepton ilavesi yapılmadan sadece minimal besiyer kullanılmasına rağmen 144 saatlik inkübasyon sonucunda kültürlerdeki renk açılması, *Priestia* sp. SA3 bakterisinde %50, *Bacillus* sp. SA6 bakterisinde %54 ve *Priestia* sp. SA1 bakterisinde %58 olmuştur. Ortama katılan glukoz ve pepton ilk 48 saatte bakterinin ligninli kültüre uyum sağlamasına imkân verirken, renk giderimi için bakteriye avantaj sağladığı bu saat-ten sonra renk gideriminin başladığı rapor edilmiştir.

2009 yılında Chandra ve arkadaşları tarafından *Bacillus cereus* ile kâğıt atık suyu üzerinde yapılan bir çalışmada 30 °C de 6 gün boyunca kâğıt atık sularının bakteri ile inkübasyonu sonucunda kültürlerdeki renk açılması %45 olurken ortamdaki lignin azalma oranı ise %30 olarak rapor edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada 37 °C de 6 gün boyunca kâğıt atık sularının rekombinant bakteriler ile inkübasyonu sonucu kültürlerde %20 veya daha az renk açılması gerçekleşirken izole edilen ligninolitik bakteriler *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 ile kâğıt atık sularının muamelesi sonucunda renk açılması sırasıyla %45, %52 ve % 42 olarak gerçekleşmiştir. Muamele sonucunda kalan lignin miktarları ise sırasıyla %40, %45 ve % 39 olmuştur. *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 izolatları kâğıt atık suyunda *Bacillus cereus* ile benzer yüzde renk açılması gerçekleştirirken, kültür ortamında kalan lignin miktarında ise daha üstün bir aktivite göstermişlerdir. *Priestia* sp. SA3 bakterisi ise çalışmada kullanılan hem *Bacillus cereus*'dan hem de bizim çalışmada kullandığımız rekombinant bakteriler, *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6'dan daha üstün renk açılması ve lignin azaltma aktivitesi göstermiştir.

Khan ve Malik tarafından 2017'de tekstil atık suyu kullanılarak gerçekleştirilen börülce fasulyesi toksisite çalışmasında atık su ile muamele edilmiş tohumların %86'sı çimlenmiş ve çimlenme sonrasında en uzun kök uzunluğu 1,25 cm olarak belirlenmiştir. Benzer şartlarda tekstil atık suyu ile yaptığımız bu çalışmada gerçekleştirilen fitotoksisite çalışmaları sonucunda her hangi bir muameleye tabi tutulmayan kontrol numunesi ile % 40 oranında tohum çimlenmesi sağlanırken en fazla kök uzunluğu 2 cm olarak elde edilmiştir. Yaptığımız fitotoksisite çalışmasında musluk suyu ile ıslatılan tohumlarda % 100 çimlenme ve en fazla 3 cm kök uzunluğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Priestia* sp. SA1 bakterisi

ile %80 tohum çimlenmesi ve en fazla 4 cm kök uzunluğu, *Priestia* sp. SA3 bakterisi ile %90 tohum çimlenmesi ve en fazla 4 cm kök uzunluğu, *Bacillus* sp. SA6 bakteri ile % 80 oranında tohum çimlenmesi ve en fazla 5 cm kök uzunluğu gözlenirken üç ligninolitik bakterinin korsorsiyumu ile %90 tohum çimlenmesi ve en fazla 4 cm kök uzunluğu meydana gelmiştir. Tohum çimlenmesi deneylerinde ligninolitik bakterilerin inoküle edildiği atık su içeren minimal besiyer ile muamele sonucu oluşan kök uzunluğu standart musluk suyuyla yapılan kontrol çalışmaları sonucu oluşan kök uzunluğundan daha uzun olmuştur. Buradan yola çıkılarak bakterilerle muamele sonucu atık sular içindeki bazı kimyasal maddelerin bakteriler tarafından parçalanıp tohumların uzamasını pozitif yönde etkilemesi sonucu tohumun kök ve filiz uzamasını olumlu etkilediği ve tohuma çimlenme ve kök uzamasına destek olduğunu söyleyebiliriz.

Bu sonuçlar ele alınarak literatürle yapılan karşılaştırmada genel olarak kök uzunluğunda gerçekleştirdiğimiz çalışmanın belirgin bir şekilde daha iyi sonuç verdiği göze çarpmaktadır.

Ligninolitik enzimler genel olarak lignin liyazlar olarak adlandırılırlar ve lignin degradasyonunda görev yaparlar. Ligninolitik enzimlerin kullanım alanlarına bakıldığında kâğıt endüstrisinden kozmetik ve gıda alanına kadar birçok sektörde kullanıldığı göze çarpmaktadır. Bakterilerin ligninolitik enzimlerinin araştırılması ve bunların kâğıt endüstrisinde, polisiklik aromatik maddelerin biyoremediasyonunda, atık su arıtımında, boyaların gideriminde ve sanayinin diğer alanlarında kullanılması ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu tip çalışmalar genellikle mantarlar ile yapılmıştır ve yapılmaktadır (Niu vd., 2021). Yapılan alternatif çalışmalarda lignin degrede eden mikroorganizmalardan yararlanılmaya çalışılmaktadır. Mantarların lignini degrede edebilen güçlü enzim sistemleri bulunmaktadır (Singhal&Thakur, 2009). Fakat mantarlar yüksek pH, sınırlı oksijen gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarında yararlı olamamaktadır. Bu yüzden günümüzde adaptasyon yetenekleri güçlü olan bakteriler dikkat çekmeye başlamıştır ve bakterilerin lignin degrede eden sistemleri üzerindeki çalışmalarda artış olmuştur (Tyagi vd., 2014; Tiku vd., 2010; Raj vd., 2014). Son zamanlarda çalışılan ligninolitik enzimlere bakıldığında bu enzimlerden üçü lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda öne çıkmaya başlayan mangan peroksidazdır (EC 1.11.1.13). Literatürler incelendiğinde bakteriyel kaynaklı bu tip enzimler üzerinde fazla

miktarda çalışmanın olmadığı görülmekte olup bakteriyel kaynaklı bu tip enzimlerin klonlanması ile ilgili çalışmalar ise yok denecek kadar azdır.

Yapılan bu çalışma sonucu elde edilen veriler ışığında daha önce literatürde yapılmış benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmada toplanan atık sulardan izole edilen yaban tip ligninolitik bakterilerin zeytin, tekstil ve kağıt atık sularının renk açılması, lignin ve fenolik bileşiklerin degradasyonu, toksisitenin giderilmesi gibi çevresel kirliliğe yol açan parametrelerin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesinde etkin rol oynayabilecekleri görülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatürler ile karşılaştırıldığında sonuçların literatürler ile yarışabilecek nitelikte olduğu görülmektedir.



5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kâğıt fabrikası atık suyu, zeytin üretim tesisi atık suyu ve tekstil fabrikası atık sularının biyoremediasyonunda daha önce araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada dizayn edilen rekombinant *B. subtilis* WB800 suşları ile fabrikalardan alınan atık sulardan izole edilen yaban tip ligninolitik *Priestia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3, *Bacillus* sp. SA6 bakterilerin atık sularda biyoremediasyon etkinliğinin araştırılması gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında, atık sulardan ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin izolasyonu ve sınıflandırılması, bakterilerle muamele edilen ve edilmeyen atık su örneklerinin bazı fizikokimyasal analizlerinin yapılması, örneklerin GC-MS analizlerinin gerçekleştirilmesi ve bakterilerle muamele edilmiş ve edilmemiş atık su örneklerinin tohum çimlenmesine etkisinin araştırılması gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında zeytin atık suyundan izole edilen SA1 izolatının yapılan 16S rRNA gen sekans analizine göre *Priestia* cinsine ait olduğu ve *Priestia aryabhatai*'a % 98,83, *Priestia megaterium*'a %98,71, *Bacillus zanthoxyl*'a %98,71 ve *Priestia flexa*'a % 97,92 benzerlik gösterdiği ancak çizilen 16S rRNA filogenetik ağacındaki dallanma durumu dikkate alındığında izolatın yeni tür olma potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu amaçla genom analizi yapılarak literatüre kazandırılması gereklilik haline gelmiştir.

Toplanan atık sulardan izole edilen ligninolitik bakteriyel izolatların kraft lignin içeren minimal besiyerindeki optimizasyon çalışmaları sonucunda *Priestia* sp. SA1 ve *Bacillus* sp. SA6 izolatları pH 6,5 da en iyi üreme gösterirken, *Priestia* sp. SA3 ise pH 7,0 da en iyi ürettiği belirlendi. Toplanan fabrika atık suları içeren minimal besiyerlerinin *Priestia* sp. SA3, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarıyla optimum şartlarda 6 günlük muamelelerinin ardından kalan lignin miktarı açısından yapılan ölçümlerde *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatı zeytin, kâğıt ve tekstil atık sularında sırasıyla %44, % 43 ve %50 oranında lignin degradasyonu yaparak en iyi sonucu veren bakteriyel izolat olduğu belirlendi. Zeytin, kâğıt ve tekstil suları içeren minimal besiyerlerinin *Priestia* sp. SA3, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarıyla muamelesi sonucunda yapılan renk açılması ölçümlerinde ise yine *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatı sırasıyla %35, %52 ve %56 oranında renk açılması yaparak en iyi sonucu verdiği belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda rekombinant bakteriler ile atık su örneklerinin muamelesi

sonucunda istenilen seviyede ve tutarlı sonuçlara ulaşılamazken atık sulardan izole edilen ve *Piesticia* sp. SA1, *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 olarak adlandırılan yaban tip bakteri suşlarının ise her üç atık su üzerinde önemli seviyede biyoremediasyona katkı sağladığı görüldü.

Yeni izole edilen yaban tip ligninolitik bakterilerin kültürlerdeki pH değişimi, sıcaklık ve yüksek atık su konsantrasyonunda üreme gibi zor koşullarda literatürdeki diğer bakterilere göre daha iyi aktivite gösterdikleri görüldü. Atık suları içeren minimal besiyerlerin bakterilerle inokülasyonu sonucu yapılan GC-MS analizlerine göre yeni izolatların kontrol numunelerindeki birçok fenolik, asitik ve kimyasal içerikli bileşiklerin kromatogram piklerinin çoğunu ya azalttığı yada tamamen ortadan kaldırdığı görülmüştür. Ligninolitik bakterilerin atık suları içeren minimal besiyerine inokülasyonu ile gerçekleştirilen kültür ortamının santrifügasyonu ile elde edilen süpernatant ile yapılan bürölce fasulyesi bioassay çalışmalarında bakterilerle muamele edilen atık suların tohumların çimlenme sayısını artırdığı ve kök uzunluğunu etkin bir biçimde uzattığı görülmüştür.

Zeytin, kâğıt ve tekstil atık suları içeren minimal besiyerde ligninolitik bakteriyel izolatların üretimi ile elde edilen süpernatantların Bürölce fasulyesi çimlenme deneyinde 10 tohumdan *Priesticia* sp. SA1 bakterisinde 8 tohum, *Priestia* sp. SA3 bakterisinde 9 tohum, *Bacillus* sp. SA6 bakterisinde 9 ve her üç bakteri ile aynı anda korsorsiyum olarak muamele sonucunda ise 6 tohum çimlenmiştir. Bunun yanında kontrol atık suyu içeren minimal besiyeri ile yapılan denemede sadece 3 tohumun çimlenmiş olması ligninolitik bakterilerin zeytin atık suyunun zararlı etkisinin ortadan kaldırılmasında kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Tekstil atık suyu içeren minimal besiyerin bakterilerle muamelesi sonucu yapılan toksisite çalışmalarında ise her 10 tohumdan *Priesticia* sp. SA1 bakterisinde 8 tohum, *Priestia* sp. SA3 bakterisinde 9 tohum, *Bacillus* sp. SA6 bakterisinde 8 ve her üç bakteri ile aynı anda korsorsiyum olarak muamele sonucunda ise 9 tohum çimlenmiştir. Bunun yanında kontrol atık suyunda sadece 4 tohum çimlenmiş olması ligninolitik bakterilerin tekstil atık suyunun zararlı etkisinin ortadan kaldırılmasında kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Kâğıt atık suyu içeren minimal besiyerin bakterilerle inokülasyonu sonucu yapılan toksisite çalışmalarında ise her 10 tohumdan *Priesticia* sp. SA1 bakterisinde 9 tohum, *Priestia* sp. SA3 bakterisinde 9 tohum, *Bacillus* sp. SA6 bakterisinde 9 ve her üç bakteri ile

aynı anda korsorsiyum olarak muamele sonucunda ise 10 tohumun tamamı çimlenmiştir. Bunun yanında kontrol atık suyunda sadece 6 tohumun çimlenmiş olması ligninolitik bakterilerin kağıt atık suyunun zararlı etkisinin ortadan kaldırılmasında kullanılabilir olduğunu göstermektedir.



6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, atık sulardan ligninolitik aktiviteye sahip bakterilerin izolasyonu ve sınıflandırılması, bakterilerle muamele edilen ve edilmeyen atık su örneklerinin bazı fizikokimyasal analizlerinin yapılması, örneklerin GC-MS analizlerinin gerçekleştirilmesi ve bakterilerle muamele edilmiş ve edilmemiş atık su örneklerinin bazı bitki tohumları üzerinde toksisite etkisinin araştırılması gerçekleştirildi.

İzole edilen yaban tip ligninolitik bakterilerden *Priestia* sp. SA3 ve *Bacillus* sp. SA6 bakterisindeki lignin peroksidaz enziminin sırasıyla pH 3,0 ve 2,5' te optimum aktivite göstermesi atık suların pH içeriğinin yüksek olması ($pH > 5,5$) sebebiyle enzimin optimum çalışamamasına sebep olmuş olabilir. Bunun yanında bakteriler pH 3,0 veya daha asidik koşullarda çok az sınırlı üreyebilmektedir. Bu bakterilerdeki lignin peroksidaz enziminin klonlanıp, çoğaltılarak saf olarak elde edilmesi ve zaten düşük pH ya sahip çoğu atık sularla enzimin optimum çalışabileceği pH'larda muamele edilmesiyle daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Düşük pH'larda optimum aktivite gösteren bu enzimin düşük pH'larda üreyebilen bir mikroorganizmaya aktarılarak bu rekombinant organizmanın düşük pH'lı atık suların bioremediasyonunda kullanılması sağlanabilir. Ayrıca diğer bir yaklaşımla, enzimi kodlayan gen üzerinde yapılacak mutasyon çalışmaları sonucu hedef atık suyun pH değerine yakın optimum aktivite göstermesi sağlanabilir. Her üç durumda da aktivite artışı atık sulardaki renk veya doğal çevre için zararlı olan bileşiklerin ortadan kaldırılması için daha etkili olabilir.

Atık sulardaki renk doğal çevre açısından fiziksel olarak görülebilen birinci sorundur. Bu çalışmada kullanılan bakterilerin atık sularla muamelesi sonucu atık suların renklerinde meydana gelen renk açılması atık sulardaki kötü görüntünün bir kısmını ortadan kaldırmaktadır. Bu bakteriler veya içerdikleri enzimler ile yapılacak olan daha detaylı çalışmalar sonucunda atık sularda renk giderici olarak kullanılabilirlikleri artırılabilir.

Priestia sp. SA1 bakterisinin 16S rRNA sekans sonucuna göre literatürdeki türlere benzerliği ve filogenetik ağaçlardaki dallanmalarından dolayı yeni tür olma olasılığını destekler niteliktedir. *Priestia* sp. SA1 bakterisinin genom analizin yapılarak yeni tür olup olmadığı belirlenmeli ve literatüre kazandırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.-H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G.M. (2000). "Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*". *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3357-3362.
- Ahmad, M. (2011). Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry*, 50, 5096-5107.
- Ahmad, M., Taylor, C.R., Pink, D., Burton, K., Eastwood, D., Bending, G.D., & Bugg, T.D.H. 2010. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol. Biosyst*, 6, 815–821.
- Aktaş, E., Imre, S., & Ersoy, L. (2001). Characterization and lime treatment of olive oil mill wastewater. *Water Research*, 35(9), 2336-2340.
- APHA. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Arora, D. S., & Chander, M. (2004). Decolourisation of diverse industrial dyes by some *Phlebia* spp. and their comparison with *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of basic microbiology*, 44(5), 331–338.
- Asgher, M., Iqbal, H.M.N., & Irshad, M. (2012). Characterization of Purified and Xerogel Immobilized Novel Lignin Peroxidase Produced from *Trametes versicolor* IBL-04 Using Solid State Medium of Corncobs. *BMC Biotechnology*, 12, 46.
- Asina, F., Brzonova, I., Voeller, K., Kozliak, E., Kubátová, A., Yao, B., & Ji, Y. (2016). Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. *Bioresource Technology*, 220, 414–424.
- Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Benrejeb, I., Gargouri, M., & Hamdi, M. (2009). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology*, 100(7), 2182–2188.
- Baburşah, S. (2004). *Tekstil Endüstrisi Atıksularının Geri kazanımı ve yeniden kullanılması*. İstanbul Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Bacocchi, E., Bietti, M., Gerini, M.F., Lanzalunga, O., & Mancinelli, S. (2001). Oxidation of non-phenolic β -O-aryl-lignin model dimers catalysed by lignin peroxidase. Comparison with the oxidation induced by potassium 12-tungstocobalt(III)ate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2 (9), 1506-1511.
- Bahadır, E. B. 2012. *Tekstil endüstrisi arıtılmış atıksularında renk ve öncelikli kirleticilerin ozon teknolojisi ile gideriminin araştırılması*. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi. Tekirdağ.

- Bamforth, S.M. & Singleton, I. (2005). "Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(7), 726-736.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D. & Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. *Bioresource Technol.*, 58, 217–227.
- Barr, D. P. & Aust, S. D. (1994). Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants. *Environmental Science & Technology*, 28(2), 78-87.
- Baughman, G.L., & Perenich, T.A. (1988). Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. *Environ Toxicol Chem*, 7, 183–99.
- Beltran F.J., Garcia-Araya J.F., Frades J., Alvarez P., & Gimeno O. (1998). Effects of single and combined ozonation with H₂O₂ or UV radiation the chemical degradation and biodegradability of debittering table olive industrial wastewaters, *Water Research*, 33(3), 723-732.
- Bharagava, R. N., Mani, S., Mulla, S. I., & Saratale, G. D. (2018). Degradation and decolourization potential of an ligninolytic enzyme producing *Aeromonas hydrophila* for crystal violet dye and its phytotoxicity evaluation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 166–175.
- Bhattacharjee, S., Datta, S., & Bhattacharjee, C. (2007). Improvement of wastewater quality parameters by sedimentation followed by tertiary treatments. *Desalination*, 212, 92-102.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol*, 54, 519–546.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 28(12), 1883.
- Buzzini, A. P., Gianotti, E. P. & Pires, E. C. (2005). UASB performance for bleached and unbleached kraft pulp synthetic wastewater treatment, *Chemosphere*, 59, 55-61.
- Call, H.P., & Mucke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). *Journal of Biotechnology*, 53(2), 163-202.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microb Technol*, 35, 113–20.

- Carter, DN., McKenzie, D.G., Johnson, A.P., & Idner, K. (1997). Performance parameters of oxygen delignification. *Tappi J*, 80: 111–17.
- Chandra, R., Abhishek, A., & Sankhwar, M. (2011). Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. *Bioresource Technology*, 102(11), 6429–6436.
- Chandra, RP., & Ragauskas, A.J. (2002). Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme Microb Technol*, 30, 855–61.
- Christopher, L.P., Yao, B. & Ji, Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. Energy Res*, 2, 12.
- Colpa, D. I., Lončar, N., Schmidt, M., & Fraaije, M. W. (2017). Creating Oxidase-Peroxidase Fusion Enzymes as a Toolbox for Cascade Reactions. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 18(22), 2226–2230.
- Cooper, P. 1995. Removing colour from dye house wastewater. *Asian Textile J*, 3, 52–6.
- Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6), 558–569.
- Cuamatzi-Flores, J., Esquivel-Naranjo, E., Nava-Galicia, S., López-Munguía, A., Arroyo-Becerra, A., Villalobos-López, M. A., & Bibbins-Martínez, M. (2019). Differential regulation of *Pleurotus ostreatus* dye peroxidases gene expression in response to dyes and potential application of recombinant Pleo-DyP1 in decolorization. *Plos One*, 14(1), e0209711.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federic, F., Fenice, M., (2004). *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res Microbiol*, 155, 596–603
- Datta, R., Kelkar, A., Baraniye, D., Molaei, A., Moulick A., Meena, R.S. & Formanek, P. (2017). Enzymatic Degradation of Lignin in Soil. *A Review, Sustainability*, 9, 7, 1163.
- Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., & Duman, D. C. (2015). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4), 351-368.
- Denise, B.M., Maria, L.A., Elba, B., Julio S.A.N., Sergio, H.K. (1996). Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate. *Biotechnol Tech*, 10(4), 273–276
- Dias, A. A., Sampaio, A., & Bezerra, R. M. (2007). Environmental Applications of Fungal and Plant Systems: Decolourisation of Textile Wastewater and Related Dyestuffs. *Environmental Bioremediation Technologies*, 445–463.

- Dias, A.A., Bezerra, R.M., Pereira, A.N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and depolymerization of olive mill wastewater. *Biores Technol*, 92, 7-13.
- Dörtkol M. (2014). Doğal ve Modifiye Kil ile Sulu Çözeltilerden Boyar Madde Giderimi. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 86s, Nevşehir.
- Easton, M.D.L., Kruzynski, G.M., Solar, I.I., & Dye, H.M. (1997). "Genetic toxicity of pulp mill effluent on juvenile Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) using flow cytometry". *Water Science & Technology*, 35, 347–355.
- Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 37–42.
- Erden, E., Uçar, C. M., Gezer, T. & Pazarlıoğlu, N. K. (2009). Screening for Ligninolytic Enzymes from Autochthonous Fungi and Applications for Decolorization of Remazole Marine Blue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 346-353.
- Ewida, A. Y. I., El-Sesy, M. E., & Abou Zeid, A. (2019). Complete degradation of azo dye acid red 337 by *Bacillus megaterium* KY848339.1 isolated from textile wastewater. *Water Science*, 33(1), 154–161.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open*, 6(1), e00394.
- Felby, C., Pedersen, L.S., Nielsen, B.R. (1997). Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung*, 51: 281–86.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Ferrari, B., Radetski, C. M., Veber, A.-M., & Ferard, J.-F. (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6), 1195–1202.
- Fisher, A.B. & Fong, S.S. (2014). Lignin biodegradation and industrial implications. *AIMS Bioeng*, 1, 92–112
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, 20:4, 406-416.
- Forgacs, E., Cserháti, T., & Oros, G. (2004). Removal Of Synthetic Dyes From Wastewaters: A Review. *Environment International*, 30: 953–971

- Fountoulakis, M., Dokianakis, S., Kornaros, M., Aggelis, G., & Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 36(19), 4735–4744.
- Furukawa, T., Bello, F. O., & Horsfall, L. (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, 9(6), 448–471.
- Garcia-Ruiz, E., Mate, D.M., Gonzalez-Perez, D., Molina-Espeja, P., Camarero, S., Martínez, A.T., Ballesteros, A.O., & Alcalde, M. (2014). Directed evolution of ligninolytic oxidoreductases: From functional expression to stabilization and beyond. In *Cascade Biocatalysis*; Riva, S., Fessner, W.D., Eds.; Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, pp. 1–22.
- Gaur, N., Narasimhulu, K., & Setty Y.P. (2018). Extraction of ligninolytic enzymes from novel *Klebsiella pneumoniae* strains and its application in waste water treatment. *Applied Water Science*, 8:111.
- Guglielminetti, L., Busilacchi, H.A. & Alpi, A. (2000). Effect of anoxia on amylase induction in maize caryopsis. *J. Plant Res*, 113,185-92
- He, Y., Li, X., Ben, H., Xue, X., & Yang, B. (2017). Lipid production from dilute alkali corn stover lignin by *Rhodococcus* strains. *ACS Sustain. Chem. Eng*, 5, 2302–2311.
- Hofrichter, M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 454–466
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 87, 871–897.
- Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. (2016). A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Management*, 182, 351–366.
- Horitsu, H., Takada, M., Idaka, E., Tomoyeda, M., & Ogawa, T. (1977). Degradation of p-Aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *European Journal of Applied Microbiology*, 4(3), 217–224.
- Huang, X.F., Santhanam, N., Badri, D.V., Hunter, W.J., Manter, D.K., Decker, S.R., Vivanco, J.M., & Reardon, K.F. (2013). Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. *Biotechnol. Bioeng*, 110, 1616–1626.
- Huttermann, A., Mai, C., & Kharazipour, A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55(4), 387–94.
- İkizoğlu E., Haskök S. (2005). Zeytin karasuyunun fiziksel, kimyasal ve ileri oksidasyon yöntemleri ile arıtımı. *Su ve Çevre Teknolojileri Dergisi*, 4, 36-40.

- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 941–962.
- Jiang, C., Cheng, Y., Zang, H., Chen, X., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Shen, X., & Li, C. (2019). Biodegradation of lignin and the associated degradation pathway by psychrotrophic *Arthrobacter* sp. C2 from the cold region of China. *Cellulose*, 27, 1423–1440.
- Juang, R.S., Tseng, R.L., Wu, F.C., & Lin, S.J. (1996). Use of chitin and chitosan in lobster shell wastes for colour removal from aqueous solutions. *J Environ Sci Health Part A Environ Sci Eng*, 31: 325–38.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In ‘Mammalian Protein Metabolism (Volume III), Academic Press, 21-132.
- Karakaya A. (2011). Zeytinyağı fabrikası sıvı atığının rhodotorula glutinis ve debaryomyces hansenii mayaları ile biyoarıtımının incelenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.
- Karrasch, B., Parra, O., Cid, H., Mehrens, M., Pacheco, P., Urrutia, R., ... Zaror, C. (2006). Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Science of The Total Environment*, 359 (1-3), 194–208.
- Kenealy, W., Klungness, J., Tshabalala, M., Horn, E., Akhtar, M., & Gleisner, R. (2003). Modification of lignocellulosic materials by laccase. TAPPI Fall Techn Conf, Engineering, Pulping & PCE&I Chicago, IL.
- Khan, S.I., Zarin, A., Ahmed, S., Hasan, F., Belduz, A.O., Çanakçı, S., Khan, S., Badshah, M., Farman, M., & Shah, A.A. (2022). Degradation of lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 isolated from pulp and paper mill effluent. *Water Sci. Technol*, 85, 420–432.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H. & Won, S. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence data base with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721.
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-501.
- Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., & Čilerdžić, J. (2013). Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138, 117–123.
- Kocaer, F. O., Alkan, U. (2002). Boyar Madde İçeren Tekstil Atıksularının Arıtım Alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 7 (1), 47- 55.

- Korcan, S. E., Çitektepe, K., Aydın, B., Abed, A. B., & Akkuş, G. U. (2022). *Bacillus aryabhattai* SMNCH17-07 Strain: First Isolation and Characterization from Textile Wastewater with Evaluation of Its Decolorization Ability against Azo Dyes. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 32(2), 99-107.
- Kuan, I.C., Johnson, K.A., & Tien, M. (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *J. Biol. Chem.* 268, 20064–20070.
- Kuhad, R.C., Singh, A., & Eriksson, K.E.L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell Wall. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 57, 47–125.
- Kumar, A., Priyadarshinee, R., Singha, S., Sengupta, B., Roy, A., Dasgupta, D., & Mandal, T. (2019). Biodegradation of alkali lignin by *Bacillus flexus* RMWW II: Analyzing performance for abatement of rice mill wastewater. *Water Sci. Technol*, 80, 1623–1632.
- Kumar, V., & Chandra, R. (2018). Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(32).
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. & Alcalde, M. (2008). “Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers”, *Process Biochemistry*, 43(2), 169-178.
- Kuokkanen, V.V. (2016). Water Treatment by Electrocoagulation. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
- Levy, J. L., Stauber, J. L., & Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of The Total Environment*, 387(1-3), 141–154.
- Li, K., Xu, F., & Eriksson, K. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2654e2660.
- MacWilliams, M.P., & Liao, M. (2006). Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol.
- Majumdar, S., Priyadarshinee, R., Kumar, A., Mandal, T., & Dasgupta Mandal, D. (2019). Exploring *Planococcus* sp. TRC1 for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. *J. Clean. Prod*, 211, 1389–1402.
- Malik, M.K., Kumar, P., Seth, R., & Rishi, S. (2009). “Genotoxic effect of paper mill effluent on chromosomes of fish *Channapuntatus*”. *Current World Environment*, 4, 353–357.

- Mandal, D.D., Singh, G., Majumdar, S., & Chanda, P. (2023). Challenges in developing strategies for the valorization of lignin—a major pollutant of the paper mill industry. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 11119–11140.
- Maniatis, T., Fritsch E.F. & Sambrook, J.K. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Caminal, G., & Vicent, T. (2009). Dechlorination of 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 1141–1147.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira Neila, P., Camarero, S., Guillén, F., Martinez, M. J., Gutiérrez, A., & Del Río, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8, 195-204.
- McCarthy, A.J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev*, 3, 145–163.
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O’Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 127–134.
- Mishra, G., & Tripathy, M. (1993). A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*, 40: 35–8.
- Morii, H., Nakamiya, K., & Kinoshita, S. (1995). Isolation of a lignin decolorizing bacterium. *J. Ferment. Bioeng*, 80, 296–299.
- Mulligan, C.N. (2002). *Environmental Biotreatment. Technologies for Air, Water, Soil, and Wastes*. ABS Consulting, Government Institutes, Maryland, USA.
- Niu, J., Li, X., Qi, X., & Ren, Y. (2021). Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*. *Bioresource technology*, 341, 125875.
- Ojha, A.K., & Tiwari, M. (2016). Lignin decolorization and degradation of pulp paper mill effluent by ligninolytic bacteria. *Iran. J. Energy Environ*, 7, 282–293.
- Oyadomari, M., Shinohara, H., Johjima, T., Warishi, H., & Tanaka, H. (2003). Electrochemical Characterization of Lignin Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 291-297.
- Özer, A. (2018). Bakteriyel kaynaklı ligninolitik üç enzimin eş zamanlı ve füzyon olarak üretimi ve kağıt ağartılmasına etkisi. K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.

- Ozyonar, F., & Karagözoğlu, B. (2011). Mezbahane Atık sularından KOI, Yağ-Gres ve Bulanıklık Giderimi Üzerine Bir Çalışma: Kimyasal Koagülasyon Prosesiyle Ön Arıtım. C. U. Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, Cilt 32, No.1.
- Paliwal, R., Rawat, A. P., Rawat, M., & Rai, J. P. N. (2012). Bioligninolysis: Recent Updates for Biotechnological Solution. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167(7), 1865–1889.
- Paliwal, R., Uniyal, S., & Rai, J.P.N. (2015). Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation. Environ. Sci. Pollut. Res, 22, 6842–6853.
- Paloheimo M., Valtakari L., Puranen T., Kruus K., Kallio J., & Mantyla A. (2004). ‘Novel laccase enzyme and use there of’ United States Patent and Trademark Office (USPTO) Applicaton: 20060063246, Class: 435183000.
- Papazi, A., & Kotzabasis, K. (2008). Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxical phenolic compounds. Journal of biotechnology, 135(4), 366–373.
- Paraskeva P., & Diamadopoulos E. (2006). Teknologies for olive mill wastewater treatment: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81, 1475-1485.
- Pazarlıoğlu, N.K., Sarıışık, M., & Telefoncu, A. (2005). Laccase: production by Trametes versicolor and application to denim washing. Process Biochem, 40, 1673–78.
- Perata, P., Guglielminetti, L. & Alpi, A. (1997). Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. Ann. Bot-London, 79: 9-56.
- Pérez-Boada, M.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Pogni, R.; Basosi, R.; Choinowski, T.; Martínez, M.J.; Piontek, K.; Martínez, A.T., 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. J. Mol. Biol, 354, 385–402.
- Pokhrel D., & Viraraghavant. T. ((2004)). Treatment of pulp and paper mil wastewater- a review. Sciece of the total environment, 333, 37-58.
- Poots, V.J.P., & McKay, J.J. (1976). The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents- Peat. Water Res, 10, 1061–66.
- Prajavati, H. V. & Minocheherhomji, F. P. (2018). Laccase- A wonder molecule: A review of its properties and aplications. International journal of pure and Applied bioscience, 6, 766-773.
- Raj, A. , Reddy, M.K. & Chandra, R. (2007) Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading Bacillus sp. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 82(4), 399–406.

- Rath S., Paul M., Kumar H. B., & Thatoi H. (2022). Response surface methodology mediated optimization of Lignin peroxidase from *Bacillus mycoides* isolated from Simlipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20,2.
- Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Bouacem, K., Zenati, B., Kourdali, S., Badis, A., & Jaouadi, B. (2018). Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 125, 514-525.
- Ricard, B., Van Toai, T., Chourey, P., & Saglio, P. (1998). Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiol*, 116, 1323–1331.
- Riu, J., Schönsee, I., & Barcelo, D. (1998). Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 33, 653–63.
- Rodriguez, S., & Toca, J.L. (2006). ‘‘Industrial and biotechnological applications of laccases’’. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513.
- Şahin, Y. (2006). ‘‘Asit Boya Banyosu Atıksularının Kimyasal Prosesler İle Ön Arıtılabilirliğinin İncelenmesi’’ İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 137s, İstanbul.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., & Martins, L.O. (2014). New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94; towards biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2053–2065.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G., & Pifferi, P.G. (1999). Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb Technol*, 25, 285–89.
- Singh, S., Singh, B.B., & Chandra, R. (2009). Biodegradation of phenol in batch culture by pure and mixed strains of *Paenibacillus* sp. and *Bacillus cereus*. *Pol. J. Microbiol*, 58, 319–325.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases, *Chemical Reviews*, 96, 2563-2606.
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65(1-6), 143–150.

- Spadaro, J. T., Isabelle, L., & Renganathan, V. (1994). Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environmental Science & Technology*, 28(7), 1389–1393.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M. (2003). Degradation of Benzopyrene by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of Manganese Peroxidase, 69, 3957-3964.
- Stephen, J.A. (1995). Electrooxidation of dyestuffs in waste waters. *J Chem Technol Biotechnol*, 62, 111-7.
- Subbarao, K.V., Datta, R. & Sharma, R. (1988). Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. *Phytochemistry*, 49, 657- 666.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Theodorakis, C.W., Lee, K.L., Adams, S.M., & Law, C.B. (2006). “Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in red breast sun fish from a pulp-mill contaminate driver”. *Environmental Science & Technology*, 40, 377–386.
- Tian, J.H., Pourcher, A.M., Bouchez, T., Gelhaye, E., & Peu, P. (2014). Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 98, 9527–9544.
- Tiku, D.K., Kumar, A., Chaturvedi, R., Makhijani, S.D., Manoharan, A., & Kumar, R. (2010). Holistic bioremediation of pulp mill effluents using autochthonous bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 64, 173–183.
- Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G., Cavaco-Paulo, A. (2003). Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromol Mat Eng*, 288, 807–10.
- Uğurlu M., Kula İ., Gürses A. (2006). Removal of some organic compounds and color from olive mill wastewater by electrocoagulation. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15(10), 1256-1265.
- Vartapetian, B.B., & Jackson, M.B. (1997). Plant adaptations to anaerobic stress. *Ann. Bot-London*, 79, 3-20.
- Vijayaraghavan, K., Ramanujam, T. K., & Balasubramanian, N. (2001). In situ hypochlorous acid generation for the treatment of textile wastewater. *Coloration Technology*, 117(1), 49–53.
- Vlyssides, A.G., Papaioannou, D., Loizidou, M., Karlis, P.K., & Zorpas, A.A. (2000). Testing an Electrochemical Method for Treatment of Textile Dye Wastewater. *Journal of Waste Management*, 20, 569-574

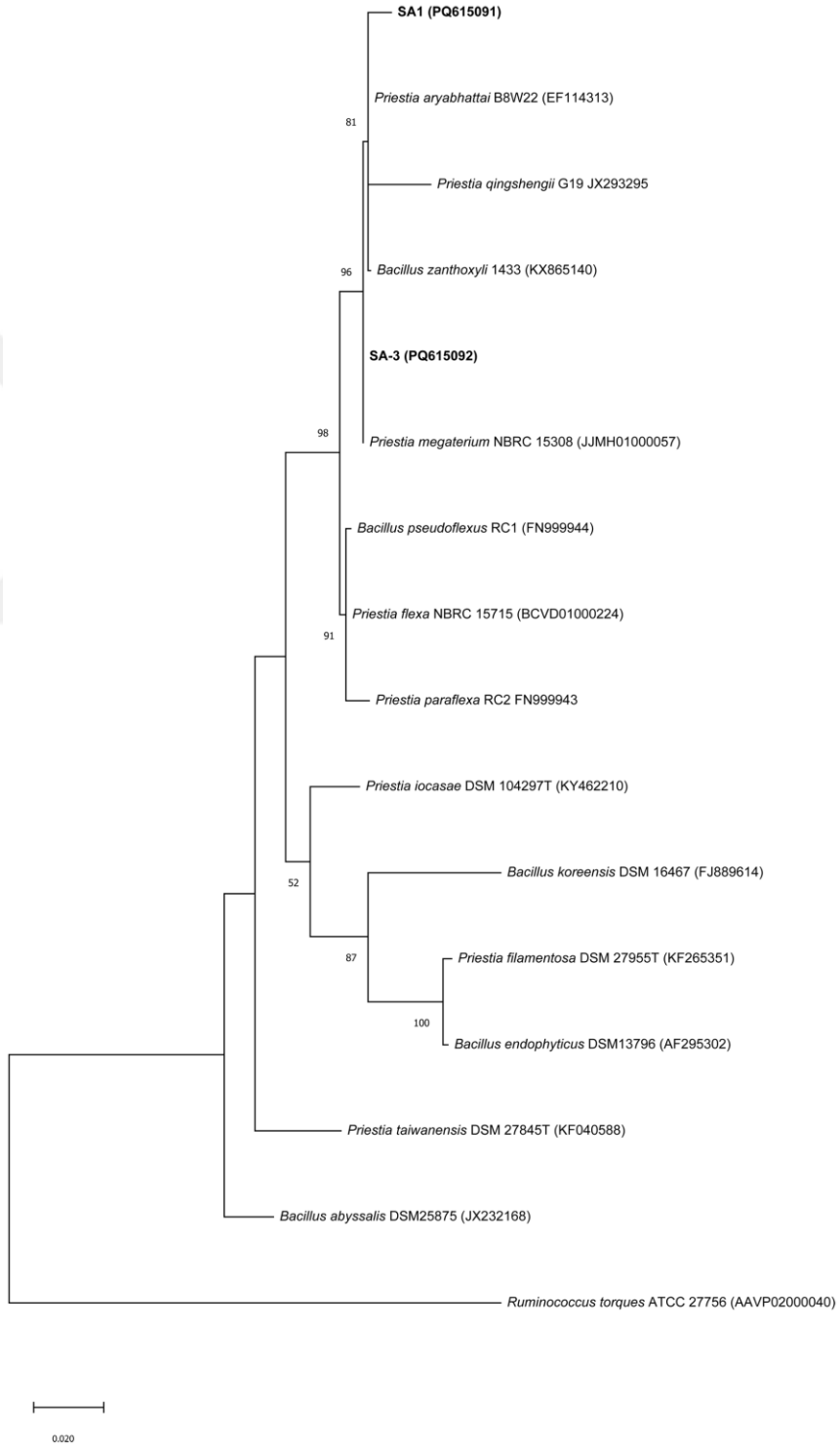
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *The Journal of biological chemistry*, 267(33), 23688–23695.
- Wesenberg at. Al. (2003). “White Rot Fungi and Their Enzymes for The. Treatment Of Industrial Dye Effluent. *Biotechnology Advances*, 22: 161-187.
- Wilkesman, J., Castro, D., Contreras, L. M., & Kurz, L. (2014). Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(5), 420–426.
- Wong, K.-S., Cheung, M.-K., Au, C.-H., & Kwan, H.-S. (2013). A Novel *Lentinula edodes* Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation. *PLoS ONE*, 8(6), e66426.
- Wong, Y. & Yu, J. (1999). ‘‘Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes’’. *Water Research*, 33(16), 3512-3520.
- Wuhrmann, K., Mechsner, K., & Kappeler, T. (1980). Investigation on rate ? Determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9(4), 325–338.
- Xu, Q.H., Qin, M.H., Shi, S.L., & Zhang, A.P. (2004). Deinking of old newspaper with laccase-mediator system. *Transactions of China Pulp and Paper*, 19, 48–51.
- Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Han, H., Zhao, S., Kakade, A., Khan, A., Du, D., & Li, X. (2018). Lignin depolymerization and utilization by bacteria. *Bioresource Technology*, 269, 557-566.
- Xu, Z., Qin, L., Cai, M., Hua, W., & Jin, M. (2018). Biodegradation of kraft lignin by newly isolated *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, and *Ochrobactrum tritici* strains. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 25, 14171–14181.
- Yadav, S., & Chandra, R. (2015). Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* for degradation of Kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. *J. Environ. Sci*, 33, 229–238.
- Yadav, V. K., Gupta, N., Kumar, P., Dashti, M. G., Tirth, V., Khan, S. H., Yadav, K. K., Islam, S., Choudhary, N., Algahtani, A., Bera, S. P., Kim, D. -H., & Jeon, B. -H. (2022). Recent Advances in Synthesis and Degradation of Lignin and Lignin Nanoparticles and Their Emerging Applications in Nanotechnology. *Materials*, 15(3), 953.
- Yaseen, D. A., & Scholz, M. (2018). Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1193-1226.

- Zámocký M, Hofbauer S, Schaffner I, Gasselhuber B, Nicolussi A, Soudi M, Pirker KF, Furtmüller PG, & Obinger C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Arch Biochem Biophys*, 574, 108-119.
- Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, 203, 791–798.
- Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W.-J., & Yang, B. (2017). Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1).

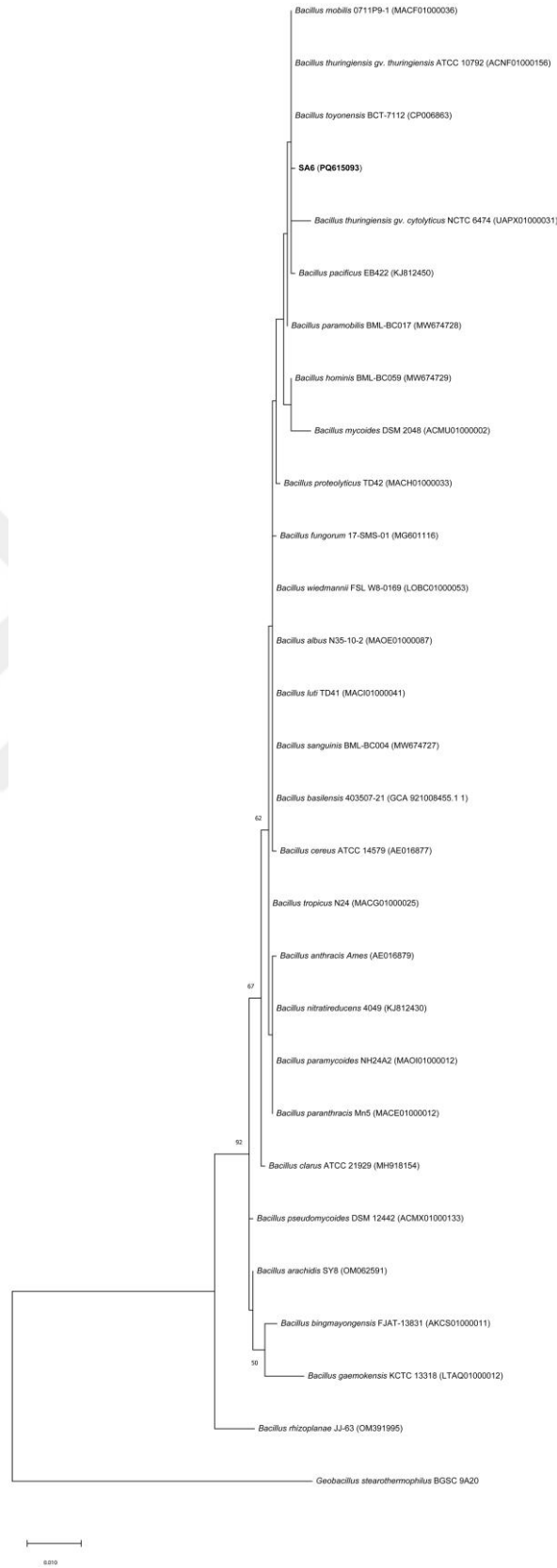


EKLER

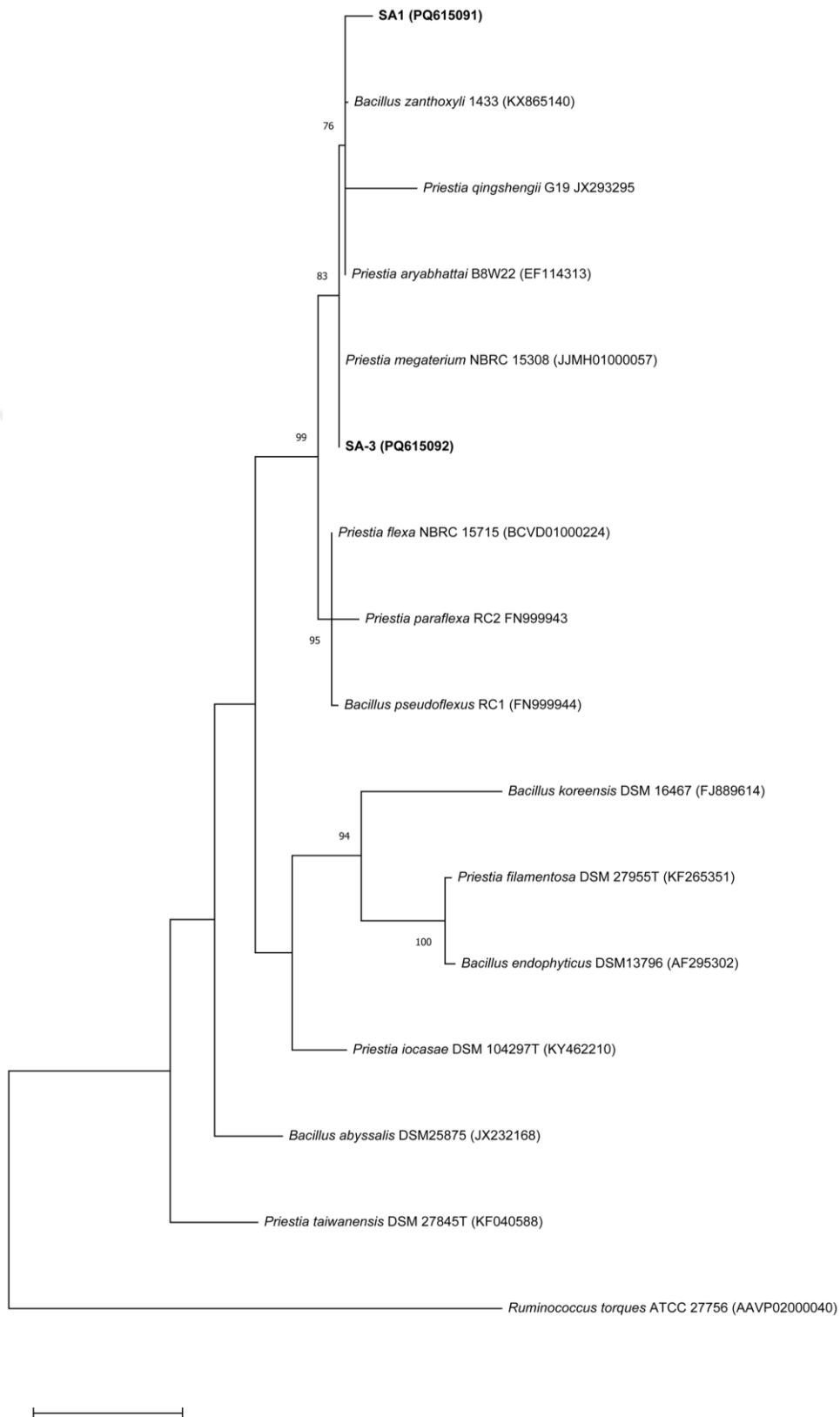
Ek-1. *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatalarının maximum likelihood yöntemine göre mega 6 programı ile çizilen filogenetik ağacı.



Ek-2. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatının maximum likelihood yöntemine göre Mega 6 programı ile çizilen filogenetik ağacı.



Ek-3. *Priestia* sp. SA1 ve *Priestia* sp. SA3 bakteriyel izolatalarının maximum parsimoni yöntemine göre mega6 programı ile çizilen filogenetik ağacı.



Ek-4. *Bacillus* sp. SA6 bakteriyel izolatlarının maximum parsimoni yöntemiyle göre mega 6 programı ile çizilen filogenetik ağacı.



Ek-5. *Priestia* sp. SA1 izolatının 16S rRNA sekans analizi nükleotid sırası.

GCAGTCGTGACGAAGCGTGAAGTCTCAGTACGCTTGCTTCTATGACTTAGCGGCGGACGGT
AACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGG
ATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATG
GGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCG
TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGCGGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAGAGATAGAGC
GTTCCCTTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACC
GCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCTCGG
CCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAC

Ek-6. *Priestia* sp. SA3 izolatının 16S rRNA sekans analizi nükleotid sırası.

ATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGG
 TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAAT
 ACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTAC
 AGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCA
 TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
 TGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACT
 GCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTT
 CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC
 TGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
 GAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
 TCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA ACTCTAGAGAT
 AGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG CATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTA
 GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCA
 AGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
 CGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
 CCGGGCCTTGTAACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGTG
 AGTAACCGTAAGGAGCTAG

Ek-7. *Bacillus* sp. SA6 izolatının 16S rRNA sekans analizi nükleotid sırası.

CAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
 ACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA
 ACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGAC
 CCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
 CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
 CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGC
 AGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACC
 AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTT
 TCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTT
 CTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCAC
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGA
 GGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT
 GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTT

ÖZGEÇMİŞ

Murat KAÇAĞAN, İlk ve orta eğitimini doğduğu yerde tamamladı. 1996 yılında Trabzon Fatih süper liseden mezun oldu. 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar bölümünden önlisans mezunu, 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji bölümünden lisans mezunu, 2008 yılında aynı bölümden yüksek lisans mezuniyeti aldı. 2002 yılından beri Trabzon Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Acil Laboratuvarda çalışmaktadır. Son 8 yıldır çalıştığı bölümün sorumluluğunu yürütmektedir. Evli ve 2 çocuk babasıdır.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. **Kacagan, M.**, Canakci, S., Sandalli, C., Inan, K., Colak, D.N., & Belduz, A.O. (2008). Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia*, 63, 599-606.
2. Canakci, S., **Kacagan, M.**, Inan, K., Belduz, A.O., & Saha B.C. (2008). Cloning, purification, and characterization of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 61-68
3. Sandalli, C., **Kacagan, M.**, Canakci, S., & Belduz A.O. (2008). Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. *Annals of microbiology*, 58, 245-251
4. **Kacagan, M.**, Inan, K., Belduz, A.O., & Canakci, S. (2013). *Flavobacterium anatoliense* sp. nov., isolated from fresh water, and emended description of *Flavobacterium ceti*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (6),2075-2081.
5. Inan, K., **Kacagan, M.**, Ozer, A., & Belduz, A.O. (2015). *Algoriphagus trabzonensis* sp. nov., isolated from freshwater, and emended description of *Algoriphagus alkaliphilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(7), 2234-2240.
6. **Kacagan, M.**, Inan, K., Canakci, S. Guler, H.I., Belduz, & A.O. (2015). *Thermus anatoliensis* sp. nov., a thermophilic bacterium from geothermal waters of Buharkent, Turkey. *Journal of basic microbiology* 55 (12), 1367-1373