EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

PETROKİMYA ENDÜSTRİSİ ATIKSULARININ BİYOLOJİK ARITIMINDA KULLANILMAK AMACIYLA AŞI KÜLTÜRÜ ELDE EDİLMESİ

Caner VURAL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 26.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

Caner VURAL tarafından DOKTORA tezi olarak sunulan "PETROKİMYA ENDÜSTRİSİ ATIKSULARININ BİYOLOJİK ARITIMINDA KULLANILMAK AMACIYLA AŞI KÜLTÜRÜ ELDE EDİLMESİ" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve .....tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı **: .....** **.....**

Raportör Üye **: .....** **.....**

Üye **: .....** **.....**

Üye **: .....** **.....**

Üye **: .....** **.....**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum "Petrokimya Endüstrisi Atıksularının Biyolojik Arıtımında Kullanılmak Amacıyla Aşı Kültürü Elde Edilmesi" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 / 08 / 2015

Caner VURAL

ÖZET

PETROKİMYA ENDÜSTRİSİ ATIKSULARININ BİYOLOJİK ARITIMINDA KULLANILMAK AMACIYLA AŞI KÜLTÜRÜ ELDE EDİLMESİ

VURAL, Caner

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR
Ağustos 2015, 265 sayfa

Son yarım asırdır bilim ve teknolojinin hızla ilerlemesine bağlı olarak, sanayinin gelişmesi ile günlük hayatı kolaylaştırmak için sayısız ürün üreten endüstriler birçok çevresel sorunu da beraberinde getirebilmektedir. Özellikle antropojenik atıklar olarak adlandırılabilecek sanayi atıklarının çevre üzerindeki olumsuz etkileri çevre dengesi ile insan ve hayvan sağlığını tehlikeye atmaktadır. Sanayi atıklarının tam olarak veya hiç arıtılmadan ekosisteme deşarj edilmesi, ekosistem üyeleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Özellikle plastik, ilaç, petrol endüstrisi gibi birçok önemli sanayiler bu tarz çevresel sorunların ana kaynağı olmaktadır. Üretilen atıkların büyük çoğunluğunun ksenobiyotik (zor parçalanabilir) yapıda olması, doğada birikmesi ve canlılar üzerinde toksik etki göstermesinden dolayı giderilmesi ve arıtılması gereken başlıca atıklardır. Petrol sanayisi atıkları ise çoğunluğu ksenobiyotik hidrokarbonlardan oluşan zararlı bileşiklerdir. Bunlardan poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) giderilmesi zorunlu bileşiklerdir. US EPA'nın belirlediği giderilmesi zorunlu olan 16 PAH bileşiği petrol ve türevi maddelerle kirlenmiş alanlarda oldukça sık karşılaşılmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında; terefitalik asit (TFA), asenaften (ace), fluoren (flu), fluoranten (flr), antrasen (ant) ve piren (pyr) hidrokarbon bileşiklerinin mikrobiyolojik yollarla giderilmesi, giderim verimlerinin belirlenmesi, bakteriyel konsorsiyum ile aşı kültürü oluşturulması, aşı kültürünün endüstriyel atık sularda giderim verimlerinin değerlendirilmesi, biyoçoğaltım ve biyoparçalanma esnasında seçili mikroorganizmaların qPCR ile takibi ve bakterilerin PAH'ların biyoiyileştirilmesinde rol alan öncül enzimlerini kodlayan genlerin ifade düzeyleri incelenmiştir.

Bu kapsamda hedef hidrokarbonları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan 13 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar moleküler biyolojik olarak tanılanarak; *Acinetobacter sp., Aeromonas media, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormiae, Burkholderia cepacia, Chryseobacterium sp, Pseudomonas sp., Pseudomonas fluorescens, Raoultella planticola* genus ve türlerine ait oldukları saptanmıştır.

Elde edilen izolatlardan aşı kültürü oluştularak sürekli karışımlı tank biyoreaktörü (SKTR) içinde olgunlaştırılan aktif çamur sisteminde denenmiştir. TFA (50 mg/L), Ace, Flu, Flr ve Ant (20 mg/L) biyoparçalama durumları ve giderim oranları belirlenmiştir. Buna göre çıkış suyu verilerinden hidrokarbonların % giderim oranları sırasıyla %82,3; %100; %100; %100 ve %75,4 olarak belirlenmiştir.

İzolatlar için özel primer prob setleri kullanılarak Real time PCR ile izolat takibi yapılmıştır. Buna göre 55 günlük biyoparçalanma süresi boyunca mikroorganizmaların 10^5 – 10^6 kopya DNA/50 µl miktarları ile sabit kaldıkları gözlenmiştir.

Gen ifadesi çalışmalarında qPCR için optimize edilmiş olan Gram negatif bakterilere özgü PAH RHDα gen bölgesi kullanılmıştır. Bunun için Livak, Pfaffl ve BestKeeper yöntemleri kullanılarak ifade düzeyleri incelenmiştir.

Anahtar sözcükler: Mikrobiyal PAH biyoparçalanması, biyoçoğaltım, biyoiyileştirme, aktif çamur sistemi, petrokimya endüstrisi.

ABSTRACT

OBTAINING MIXED LIQUOR CULTURE USING WITH THE AIM OF BIOLOGICAL TREATMENT OF WASTEWATERS OF THE PETROCHEMICAL INDUSTRY

VURAL, Caner

PhD in Biology
Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR
August 2015, 265 pages

In the last five decades, besides numerous products which makes daily life easier, there have been paved the way for many environmental problems with flourishing of industries depending on the promptly soaring in science and technology. Particularly, negative effects of industrial wastes which could be named anthropogenic wastes on environment are jeopardized ecological balance, human and animal health. Discharging of the industrial wastes to environment with incompleted treatment or without treatment is caused to negative effects on ecosystem members. Important industries, especially, plastics, pharmeceutical, petroleum industries are the main sources such environmental problems. Most of the produced wastes are xenobiotics, accumulated in nature and caused toxic effect on living beings. Therefore, they must mainly be removed and treated. Wastes of the petroleum industry are hazardous compounds and they mostly consist of xenobiotic hydrocarbons. One group of those are polyaromatic hydrocarbons (PAHs) which necessary to remove. 16 PAHs which determined by US EPA frequently found in areas contaminated with petroleum compounds and derivatives.

In this doctoral, thesis some kind of laboratory experiments were carried out and summarized as follows; removal of hydrocarbon compounds named as terephthalic acid (TPA), acenaphthane (ace), fluorene (flu), fluoranthene (flr), anthracene (ant) and pyrene (pyr) via microbiological ways, determination of removal efficiencies, constructing inoculum liquor with bacterial consortium, evaluation of removal efficiencies of inoculum liquor in industrial wastewaters, monitoring of the selected microorganisms with qPCR during bioaugmentation and biodegradation and investigation of expression levels of genes which codes primer enzymes involved in bacterial PAH bioremediation.

In this context, 13 microorganisms were obtained which use the target hiydrocarbons as a sole carbon and energy sources. These microorganism were molecular biologically identified. Bacterial strains belong to *Acinetobacter sp., Aeromonas media, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormiae, Burkholderia cepacia, Chryseobacterium sp, Pseudomonas sp., Pseudomonas fluorescens, Raoultella planticola* genus and species.

An inoculum liquor was prepared with isolated microorganisms and tried in aged activated sludge system in completely stirred tank bioreactor (CSTR). Biodegradation states and removal efficiencies were determined of TPA (50 mg/L), Ace, Flu, Flr and Ant (20 mg/L). According to this, % removal rates of hydrocarbons which obtained from effluent determined as 82,3 %; 100 %; 100 %; 100 % and 75.4 % respectively.

Primer prob sets were used peculiar to isolated microorganisms and bacterial monitoring was carried out using Real time PCR. Accordingly, during the 55 days biodegradation period amount of copy DNA of microorganisms was stable and between 10^5 – 10^6 copy DNA/ 50µl.

Optimized PAH RHDα gene region for Gram negative bacteria was used in gene expression experiments. For this, Livak, Pfaffl and BestKeeper methods were used and compared to evaluate expression levels.

Keywords: Microbial PAH biodegradation, bioaugmentation, bioremediation, activated sludge system, petrochemical industry.

TEŞEKKÜR

Başta; bu tezi hazırlamamda değerli katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü konuda bana yol gösteren, çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarım süresince bana sağladıkları fikir ve akademik destekleri ile yanımda olduklarını hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Nuri AZBAR ve Prof. Dr. Ataç UZEL'e, SANTEZ projesi kapsamında çalışmalarıma katkı sağlayan Burçin KARABEY ve Didem EROĞLU'na, PETKİM personeli Biyolog Bike PASHAYEVA ÖĞÜNLÜ'ye ve tüm Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Elemanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, doktora tezimin oluşması için SANTEZ programı kapsamında 00639.STZ.2010-2 no'lu projeye tüm mali desteği sağlayan T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na ve PETKİM Petrokimya Holding A.Ş.'ye, 2011 FEN 007 No'lu Araştırma Projesine verdiği desteklerden dolayı EGE ÜNİVERSİTESİ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Varlığıyla varlığımı anlamlandıran sevgili Ailem'e…

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

TEŞEKKÜR xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

1. GİRİŞ 1

2. LİTERATÜR ÖZETİ 4

2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar) 4

2.1.1. Molekül yapıları 6

2.1.2. Fizikokimyasal özellikleri 6

2.1.3. PAH'ların oluşumu 11

2.1.4. Çevresel PAH kirliliği 12

2.1.5. PAH'ların çevresel akıbeti 13

2.1.6. PAH'ların toksisite durumları 14

2.2. Türkiye ve Dünya'da Tehlikeli Atıklar İçin Yasal Çerçeveler 19

2.3. PAH'ların Biyoparçalanması ve Biyoiyileştirilmesi 23

2.3.1. Biyoiyileştirmenin kritik önemi ve avantajları 27

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.2. Biyoiyileştirmede PAH'ların parçalanmasını arttırıcı stratejiler 28

2.4. PAH Biyoparçalanmasını Etkileyen Faktörler 34

2.4.1. Çevresel şartlar.....35

2.4.2. Kirletici ile ilişkili faktörler 38

2.4.3. Uygun parçalayıcı mikroorganizmaların varlığı.....41

2.5. PAH Parçalayan Mikrobiyal Popülasyonlar.....42

2.5.1. PAH'ların metabolizması 42

2.5.2. Kirleticilerin Biyoparçalanması 45

2.5.3. PAH metabolize eden enzimler, yapıları ve katalitik mekanizmaları.....49

2.6. Aromatik Hidrokarbonlar ve Biyoparçalanma Yolizleri.....61

2.6.1. Monoaromatik hidrokarbonlar 61

2.6.2. Diaromatik hidrokarbonlar 68

2.6.3. Poliaromatik hidrokarbonlar 70

2.7. PAH Biyoparçalanması İçin Başlangıç Enzimatik Aktivitelerde Etkin Olan Genler.....80

2.8. PAH'ların Biyouyumluluğu.....83

2.9. Mikrobiyal Komünite Analizleri.....88

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.9.1. Kültür - bağımlı yöntemler 88

2.9.2. Kültür - bağımsız yöntemler 89

2.10. Gen Ekspresyonu Çalışmaları İçin qPCR 93

2.10.1. Delta Delta CT 94

2.10.2. PCR verim hesaplamaları 100

2.10.3. Standart eğri oluşturulması 100

2.10.4. Referans (kontrol) gen seçimi 102

2.11. Aktif Çamur Sistemi 103

2.11.1. Konvansiyonel aktif çamur sistemi 103

2.12. Aktif Çamur Biyolojisi 107

2.12.1. Aktif çamur flokları 108

2.13. Atıksu Arıtma Tesisleri ve PAH'lar İle İlişkileri 118

2.14. AAT Giriş suyu içinde PAH'ların Birikmesi 120

2.15. AAT'ler tarafından üretilen PAH'lar 120

3. GEREÇLER VE YÖNTEM 132

3.1. GEREÇLER 132

3.1.1. Enstrümental analizlerde kullanılan kimyasallar maddeler 132

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.2. Nükleik asitlerin görüntülenmesinde kullanılan kimyasallar 132

3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar..... 132

3.1.4. Mikroorganizmaların izolasyonu için kullanılan besiyeri ortamları ve tamponlar..... 134

3.1.5. İzolatların mikroskobik tanılamasında kullanılan kimyasallar 136

3.2. YÖNTEM 138

3.2.1. Hedef hidrokarbonlara Özgü Mikroorganizmaların İzolasyonu..... 138

3.2.2. İzole edilen mikroorganizmalardan biyoparçalama yeteneklerinin belirlenmesi 139

3.2.3. Hedef hidrokarbonların enstrümental analizleri 140

3.2.4. Biyoparçalama etkinliği en iyi olan mikroorganizmaların tanılanması 146

3.2.5. Biyokimyasal testler..... 146

3.2.6. İzolatların saklanması..... 147

3.2.7. Seçilen mikroorganizmaların moleküler biyolojik olarak tanılanması 147

3.2.8. Sürekli karışımlı tank reaktöründe aktif çamur olgunlaştırılması..... 155

3.2.9. SKTR için biyoçoğaltım (biyoaugmentasyon) ile hedef kimyasal giderimi 157

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.10. SKTR örneklerinden hidrokarbon ekstraksiyonu 158

3.2.11. KOİ ölçümleri 159

3.2.12. Flok içi kimyasal absorbsiyonu 160

3.2.13. Real time PCR ile bakteriyel izleme 161

3.2.14. Fluoresan boyama ile flok yapısının incelenmesi 166

3.2.15. Gen ekspresyonu çalışmaları 167

4. BULGULAR 176

4.1. İzolatların Tanılanması 179

4.2. Aerobik Sürekli Karışımlı Tank Reaktörü 181

4.4. Kontrol Tankı Ölçümleri 191

4.5. SKTR İçinde Olgunlaştırılan Aktif Çamurun Makro ve Mikro Boyutta İncelenmesi 195

4.6. Flok Yapısının Fluoresan Mikroskobisi 199

4.7. Flok İçi Kimyasal Absorbsiyonu 200

4.8. Real-Time PCR İle İzolat Takibi 204

4.9. Gen Ekspresyonu 205

5. TARTIŞMA 218

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

6. SONUÇ.....250

7. ÖNERİLER.....251

KAYNAKLAR DİZİNİ 252

ÖZGEÇMİŞ.....266

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

2.1a. US EPA'nın kirletici statüsünde belirlediği 16 PAH ve onların çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri…..…….…….....9

2.1b. US EPA'nın kirletici statüsünde belirlediği 16 PAH ve onların çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri…….……...…….....…10

2.2. Benzo(a)piren yolizlerinin aktivasyonuve detoksifikasyonu..….....17

2.3. Hücre içi PAH metabolizması ve olası ters etkileşimler…….....…19

2.4. Temsili aromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları ve parçalanma ara molekülleri…….……...……44

2.5. PAH'ların mikrobiyal katabolizma yolizleri…….…...…....48

2.6. Aromatik hidrokarbon halka açılımı yapan dioksijenazlar için önerilen katalitik mekanizma.....51

2.7. Aromatik hidrokarbon intradiol halka açılımı yapan dioksijenazlar için önerilen katalitik mekanizması……...…..55

2.8. Aromatik ekstradiol halka açılımı yapan dioksijenazların önerilen katalitik mekanizması.....…….57

2.9. Aromatik hidrokarbon BMM'lerinin önerilen katalitik mekanizması…...….60

2.10. BTEX parçalanması için önerilen yolizleri……..……...…..64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

2.11. Fitalat esterlerinin parçalanması için önerilen yolizleri.....…….....67

2.12. Naftalen, karbaril, fenantren ve antrasen için parçalanma yolizleri…….….69

2.13. Fluoren için önerilen aerobik bakterilerin katabolik yolizleri……..……....72

2.14. Fluoranten için önerilen bakteriler tarafından gerçekleştirilen

katabolik yolizleri……...76

2.15. Önerilen bakteriler tarafından gerçekleşen piren katabolik yolizleri..…..….79

2.16. RHD bölgelerine özgü DNA dizileri ile çıkarılmış filogenetik ağaç modeli..82

2.17. Biyosürfaktanın PAH'ları ayrıştırma mekanizması……...…..……..85

2.18. Işık mikroskobunda (100x büyütme ile) basit boyama sonucu PAH

üzerine tutunmuş halde görülen bakteriler……...….....…...…87

2.19. Real time PCR verimi için log2 tabanında oluşturulan örnek standart

eğri grafiği……101

2.20. Konvansiyonel aktif çamur sistemini gösteren diyagram.….....……...…104

2.21. Şematize edilmiş tipik bir aktif flok ve bünyesinde bulunan

mikrobiyal kommunite yapısı……...…….……...109

2.22. Atık suda özellikle aktif çamurda sıklıkla rastlanılan protozoon grupları....115

2.23. Aktif çamurdaki mikroorganizma süksesyonu……...…...…..116

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

2.24. Aktif çamur sisteminde en yaygın bulunan rotifer türleri……..……...117

3.1a. Hedef hidrokarbonlar için HPLC cihazında oluşturulan standart eğri grafikleri……...144

3.1b. Hedef hidrokarbonlar için HPLC cihazında oluşturulan standart eğri grafikleri……...145

3.2. SKTR'nin şematik görüntüsü……155

3.3. Flok içi kimyasal absorbsiyonu analizi için çöktürülen floklar……..……160

3.4. *Acinetobacter sp*., ve *Chryseobacterium sp*. için Real Time PCR'da oluşturulan standart eğri grafikleri……...…….……...……163

3.5. *Burkholderia cepacia* ve *Pseudomonas fluorescens* için Real Time PCR'da oluşturulan standart eğri grafikleri…….…….....164

3.6. Gen ekspresyonu için olgunlaştırılan çamurun zamana bağlı çökelim durumları……....168

3.7. Gen ekspresyonu çalışmaları için kullanılan primer dizilerinin pozisyonları…….170

4.1. Kimyasallara özgü izolatların parçalama grafikleri…….……..…177

4.2. Kimyasallara özgü izolatların parçalama grafikleri……...……...…178

4.3. SKTR sistemi genel görünüşü……..…...……..….182

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

4.4. SKTR içinde olgunlaşan çamur ve çökeltim kısmı……..……..…....183

4.5. AKM, ÇHİ, KOİ değerlerini gösteren grafik……..184

4.6. SKTR ile asenaften giderim grafiği……..……...……...185

4.7. SKTR ile fluoren giderim grafiği……..…….……186

4.8. SKTR ile antrasen giderim grafiği.…….……188

4.9. SKTR ile fluoranten giderim grafiği……...…….…….189

4.10. SKTR ile piren giderim grafiği.…….……...…….……..190

4.11. SKTR ile TFA giderim grafiği.…….……191

4.12. Kontrol tankı hidrokarbon parçalama verileri…….....……...194

4.13. Biyoçoğaltım yapılan SKTR ile kontrol SKTR örneklerindeki

yüzde giderim oranlarını gösteren grafik ……...……..195

4.14a. Işık mikroskobu ile flok yapısının görüntüsü…..…….....…..…..…198

4.14b. Işık mikroskobu ile flok yapısının görüntüsü……..…….…...……...199

4.15. Canlı/ölü boyama kiti ile boyanmış flok yapısının fluoresan

mikroskobu altındaki görüntüsü…….……..200

4.16. Flok içerisinde tutulan hidrokarbon konsantrasyonlarının

zamana bağlı değişim grafiği.……...……...….202

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

4.17. Flok içerisinde tutulan hidrokarbon konsantrasyonlarının zamana bağlı değişim grafiği……...……203

4.18. Real Time PCR ile izolatların takibini gösteren grafik……..……..…...…..204

4.19. Gen ekspresyonu için olgunlaştırılan aktif çamur görüntüsü…...……..…..205

4.20. Gen ekspresyonu çalışması için çamur aklimasyon grafiği……..……....206

4.21. Rastgele seçilen öerneklerin DP Rieske bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....206

4.22. Livak ve Pfaffl normalizasyon sonuçlarının karşılaştırmalı grafiği…..……208

4.23. Çamur olgunlaştırmasını takiben tank içine eklenen hidrokarbonların süreç içerisindeki giderim grafiği…….……..……..209

4.24. 16S normalizasyonuna göre hedef genin rölatif ifadesi…..……....….210

4.25. 341 – 518 normalizasyonuna göre hedef genin rölatif ifadesi……....….....210

4.26. PCR ile çoğaltılan RHD gen bölgesinin izolatlara ait bantları……..…...211

4.27. 16S gen bölgesi normalizasyonu ile elde edilen rölatif gen ekspresyonu ile çamurun biyoparçalama etkinliğini gösteren grafik…….....…212

4.28. 341 - 518 gen bölgesi normalizasyonu ile elde edilen rölatif gen ekspresyonu ile çamurun biyoparçalama etkinliğini gösteren grafik……...213

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Sayfa

2.1. EPA tarafından 1999 yılında öncelikli kirletici statüsüne alınmış olan 16 PAH molekülü……..8

2.2. Örnek Ct değerleri.....96

2.3. Örnek Ct ve konsantrasyonlar……101

2.4. Örnek Ct ve konsantrasyonlar……101

2.5. Standart aktif çamurdan kültürel yöntemlerle elde edilen bazı aerobik heteretrofik bakteri izolatları……111

2.6. Çevresel biyoremediyasyon ve biyoçoğaltım amaçlı ticari bakteri formülasyonları……123-127

2.7. Biyoçoğaltım amacıyla gerçekleştirilen bazı bilimsel çalışmalar…….128-131

3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler……132

3.2. Bushnell Haas Broth……135

3.3. Plate Count Agar ve Nutrient Agar……135

3.4. Phosphate Buffer Saline (PBS) Tampon Solüsyonu……136

3.5. Kristal Viyole Solüsyonu……136

3.6. Gram İyodür Solüsyonu……137

3.7. Safranin Solüsyonu……137

3.8. Kimyasal analizleri için HPLC protokolleri……142

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge Sayfa

3.9. PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları……..…...151

3.10. Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri……..…….…151

3.11. PCR koşullarını belirten protokol…….……...…….…..152

3.12. İzolatlar için tasarlanan primer-prob dizileri……..…….…...…...154

3.13. Sentetik atık su içeriği…….……156

3.14. Gen ekspresyonu için tanka eklenen kimyasal madde hacimleri

ve karşılık gelen tank içi konsantrasyonları……...……..168

3.15. Gen ekspresyonu için kullanılan primer dizileri…….……171

3.16. cDNA sentezi için gerekli olan reaksiyon karışım oranları.…….…..174

4.1. Tanılanan izolatların genus ve tür düzeyindeki isimleri…….……..179

4.2. İzolatların biyokimyasal testleri……...…….180

4.3. Flok içi ve tank içi örneklerinde bulunan hidrokarbon konsantrasyonları....201

4.4. Gen ekspresyonu çalışması esnasında aktif çamura eklenen kimyasal

konsantrasyonları…….…….……...207

4.5. Her iki housekeeping genler ve hedef genin verileri……..……..215

4.6. Housekeeping vs. BestKeeper verileri…….…….215

4.7. Hedef gen vs. BestKeeper verileri……..…….…….216

4.8. Housekeeping ve hedef gen bölgelerinin BestKeeper'a karşı analizi……...216

1. GİRİŞ

Çoğunluğu antropolojik etkilerle çevresel sisteme verilen tehlikeli atıklar içerisinde belki de en önemli olan grup direkt olarak ekolojik çevreyi ve dolaylı yoldan ise içinde yaşayan canlıları etkileyen ksenobiyotik bileşiklerdir. Ksenobiyotik (xenos: yabancı, bios: yaşam) terimsel anlamda biyolojik sistemler içindeki metabolik faaliyetlere yabancı olan, biyolojik yollarla parçalanmasının ve enerji kazanımı açısından biyolojik faydasının pek mümkün olmadığı, ama aynı zamanda yapısal özelliklerinden dolayı çoğunlukla toksik özellik gösterebilen kimyasal bileşiklerdir (van der Meer et al., 1992). Ksenobiyotikler atık arıtım sistemleri için başlıca sorunlardan birisidir. Çevresel sistemde sorunlara neden olabilen bazı ksenobiyotikler plastik ve pestisitler gibi organokloridler, bazı ilaçlar, antibiyotikler, benzen, poliklorlu bifeniller (PCB'ler), poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), ham petrol ve kömürün bazı bileşenleri örnek olarak verilebilir. Tüm bu ksenobiyotiklerin içerisinde sağlık açısından en tehlikeli olan gruplardan birisi ise PAH'lardır.

Bilimsel anlamda bakıldığında, dünya üzerindeki yaşam; yine üzerinde yaşayan tüm canlıların da etkin bir rol üstlendiği elementlerin (karbon, azot, sülfür) biyojenik döngüleri içindeki dengeye bağlıdır. Modern çağ olarak adlandırdığımız sanayi ve petrokimya tabanlı enerji kazanım yaklaşımlarının popüler hale gelmesinin ardından hızla artan ve gelişen sanayileşme, beraberinde modernizme oranla masum kalmakta ve doğal hayat üzerinde gün geçtikçe daha yıkıcı ve olumsuz tahribatlara sebebiyet vermektedir. Somut veriler sadece bu alanda araştırma yapan bilim insanlarının dikkatlerini çekmekle kalmayıp, yaşanan bazı doğal olmayan çevresel felaketler ile gözle görülür tahribatların meydana gelmesiyle, insanların da ilgisini çekmekte ve daha duyarlı hale getirmektedir. Her ne kadar ekonomi açısından ciddi gelir kaynağı olsa da, kimyasal kirleticilerin (kontaminant) sebep olduğu bu gibi çevresel durumların biyosfer üzerindeki etkileri tamamen negatif yönde olmaktadır. İnsan kaynaklı çevresel kirleticilerin başında ise, özellikle başlıca enerji ve yakıt endüstrisinde kullanılan petrol ve petrol türevi ürünler ve onların kimyasal bileşenleri gelmektedir. Her şeyden önce insan sağlığı açısından düşünüldüğünde, petrol ve türevi bileşiklerin hemen hepsinin başta karsinojenik ve mutajenik özelliğe sahip olmasının yanında birçok fizyolojik ve

metabolik rahatsızlığa neden oldukları günümüzde bilinmektedir (Pinyakong et al., 2003; Peng et al., 2008). Günlük hayatta kullanılan bazı boya, plastik vs. gibi ürünlerin ise yine petrokimya endüstrisi ürünleri olduğu düşünülürse aslında sağlık açısından ne kadar risk altında olduğumuzu görmemek içten değildir. Bu nedenle bu tarz toksik bileşiklerin doğadan uzaklaştırılması için gerekli çalışmaların yapılması ve önlemlerin alınması gerekliliği gün geçtikçe artmaktadır.

Bakıldığında en ilkel canlılardan en gelişmiş yüksek yapılı canlılara kadar gelinen tabloda prokaryotik canlıların özellikle bakterilerin prototip oldukları ve bir çok açıdan yüksek yapılı ökaryotik canlılara oranla daha avantajlı oldukları aşikardır. Özellikle genetik açıdan birçok kompakt özelliğe sahip olmaları ve evrimsel süreçte dış ortam koşullarına daha iyi ve tatminkâr adaptasyonları, onları birçok koşulda yaşayabilir hale getirmektedir. Bakterilerin hızlı adaptasyon ve genetik modifikasyon özelliklerinden yola çıkılarak yapılan araştırmalarda bazı mikroorganizmaların parçalanması güç organik yapıdaki petrol türevi kimyasalları tamamen ya da kısmi olarak parçalayabildikleri, metabolize edebildikleri ve hatta fizyolojik açıdan enerji elde edebildikleri bilinmektedir (van der Meer et al., 1992; Stolz, 2009). Bakteriler bu özellikleri sayesinde kirleticilerin doğal yollarla parçalanması yönündeki çalışmalarda halen yoğun şekilde araştırma konusudur.

Özelikle insan kaynaklı doğal olmayan kirleticilerin yaklaşık son elli yılda yoğun şekilde çevreye verilmesi ve kirletmesi sonucu bu alanlarda yaşamak zorunda olan bakterilerde önemli ve hızlı şekilde modifikasyon ve adaptasyonlara neden olmuştur. Bu modifikasyon ve adaptasyona dayalı kazanımlar parçalama enzimleri ve dolaylı yoldan parçalamada etkin rol oynayan genlerin kazanımı şeklindedir (van der Meer et al., 1992).

T.C. Bilim Sanayi ve Ticaret Bakanlığı tarafından desteklenen Santez programı kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışması ile çeşitli hidrokarbonları parçalama yeteneğinde olan mikroorganizmaların belirlenmesi ile giderilmesi hedeflenen hidrokarbonlara uyumunun sağlanması ve bunun sonucunda aktif çamur sistemine ilavesi ile yerli popülasyonun biyolojik çeşitliliğinin ve metabolik aktivitesinin arttırılması hedeflenmiştir.

Bu kapsamda mikroorganizmaların izolasyonu, moleküler biyolojik yöntemlerle tanılanmaları, biyoparçalama işleminin enstrümental analizleri, mikroorganizmaların özel primer-prob sistemleri ile aktif çamur sisteminde izlenmesi ve gerçek sistemde hedef hidrokarbonların giderim durumlarının ve verimlerinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Bu amaçla, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'da bulunan Endüstriyel ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile Biyoteknoloji Laboratuvarında çeşitli rekalsitrant substratlar (Tereftalik asit (TFA), Asenaften (Ace)**,** Fluoren (Flu), Antrasen (Ant), Fluorantene (Flr), Piren (Pyr)) üzerinde çeşitli deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Teknoloji ve buna bağlı olarak sanayi gelişimi, modern çağda yaşayan biz insanların gereksinimlerinin karşılanması için yeni uygulama alanlarının yaratılması, yeni sanayi kollarının oluşturulması ve ürünlerin üretilmesi kaçınılmaz bir olgudur. Bu sebepten ötürü endüstri gelişiminin hızla yol kat etmesi, bir yandan yaşam kalitemizi arttırırken diğer yandan çevresel ve sağlık açısından pek çok sorunu da beraberinde getirmektedir. Günümüzde endüstriyel üretime dayalı sanayide çoğunlukla kimyasal madde kullanılmakta ve böylece üretim sonucunda tehlikeli atıklar meydana gelmektedir. Dünyada, bugüne kadar yedi milyon civarında kimyasal madde tanımlanmış olmakla birlikte, ortalama her sekiz saatte yeni bir kimyasal madde üretilerek kullanıma sunulmaktadır. Ancak, söz konusu kimyasal ve tehlikeli atıklar çevre ve insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Bu nedenle tehlikeli atıkların bertaraf edilmesi oldukça önemli bir konudur. (Özkaya, 2004).

Son yıllarda, petrokimya bileşenlerinden olan (PAH)'ların biyolojik yollarla en etkin şekilde parçalanması ve doğada daha az zararlı veya zararsız bileşenlere dönüştürülmesi, bu alanda çalışan bilim insanlarının hedef konusu halini almıştır. Normalde doğada kaybolmayan bu bileşiklerin doğal yollarla parçalanabilir olması, çevre kirliliği ile mücadelede umut ışığı olarak görülmektedir. Özellikle mikroorganizmaların rol aldığı ve aktif olduğu biyoparçalama işlemleri oldukça önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarla, doğal yollarla bu kimyasal bileşikleri mineralize etme yeteneğinde olan birçok mikroorganizma doğadan izole edilmiştir (Kanaly and Harayama, 2000; van Hamme et al., 2003).

2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar)

Endüstriyel ve yeşil devrimler dünya genelinde endüstri ve tarım sektörlerinde gelişmelere neden olmuştur. O zamanlardan bu yana, çeşitli sayıda kimyasalların, yakıtların ve pestisitlerin yoğun şekilde kullanımına bağlı olarak aromatik hidrokarbonlar çevremizin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bu bileşiklerden çoğu çevre için kirleticidir. Çevrede bulunan kirleticiler doğal ve antropojenik kaynaklar yoluyla oluşmaktadırlar. Doğal kaynaklar; orman

yangınları, petrol yayılma ve sızıntıları, volkanik patlamalar ve bitki eksudaları olarak karşımıza çıkarken, antropojenik kaynaklar ise; organik bileşiklerin pirolizi (ısıl etkenle bozulması), tamamlanmamış yakıt ya da çöp yakma işlemleri, kömür yakma, trafik, araç egzozları ve endüstriyel atıklar olarak sayılabilir (Seo et al., 2009; Pereira et al., 1999, Singh et al., 2015, Kochany, 2015, Wang et al, 2015). Yakma/piroliz işlemlerinin çeşitliliği ve yanabilen organik maddenin fazlalığı gereğinden fazla PAH bileşiklerinin oluşmasına ve salınmasına neden olmaktadır. Çarpıcı bir örnek Avrupa Gıda Güvenliği Makamı tarafında verilmiştir. Raporda, şehir üzerini kaplayan havada yaklaşık olarak 500 civarında PAH molekülü varlığını tahmin ettikleri yazmaktadır (EFSA, 2008).

Aromatik hidrokarbonların hava, su ve topraktaki kalıcılıkları moleküler ağırlıklarıyla yakından ilişkilidir. Bu moleküllerin sudaki çözünürlüklerinin az olması onların toprak ve sedimentte birikmelerine neden olmaktadır Düşük moleküler ağırlıklı bileşikler çoğunlukla gaz fazında kalırken, yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler ortamda bulunan partiküler maddeler üzerine kolaylıkla adsorbe olurlar. Kimyasal olarak inaktif olan PAH'lar yüksek erime ve kaynama noktalarına sahiplerdir. Ancak partiküler maddelere bağlandıklarında yüksek oranda ısı ve ışık duyarlılığı gösterirler. Yüksek sıcaklık (50°C) yanında, UV ışığı ve görünür ışığa maruz kaldıklarında açılabilme özelliği göstermektedirler (Skupinska et al., 2004).

PAH'ların doğada birikimi, küresel çevrenin kalitesini etkileyen toprak ve su kaynaklarının kalitesini düşüren önemli faktörlerden birisidir. Moleküler açıdan bir ya da iki benzen halkası içeren PAH'lar; hidrofobik ve polar olmayan özellikte organik maddelerin tam yanmamasıyla oluşan doğal yollu bileşiklerdir. Bu moleküller, tipik olarak kompleks karışımlar halinde bulunurlar, mutajenik ve karsinojenik özellikleriyle birlikte epoksidler içinde dönüşüm yaparak memeli canlıların gastro intestinal sisteminde kolaylıkla absorbe edilebilirler (Eiser, 1987; Patel et al., 2014; Mohd Radzi et al., 2015). Tahrip edici bu etkilerine bağlı olarak bu bileşikler EPA gibi birçok çevre koruma ajansı tarafından çevreden temizlenmesi öncelikli bileşikler olarak tanımlanmaktadır.

2.1.1. Molekül yapıları

Yapı olarak en basit aromatik bileşik benzen (C_6H_6)'dir. Ancak, bilindiği üzere kompleks bileşiklerde iki ya da daha fazla aromatik halkalar doğrusal ya da açısal düzenlenmeler ile birleşerek oluşabilmektedirler (Singh et al., 2015; Kochany, 2015). Bu yapılanma onlara daha fazla hidrofobisite kazandırırken daha az suda çözünür hal almaktadırlar. Böyle özellik kazanan rekalsitrant bileşikler polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) olarak adlandırılmaktadırlar (Singh et al., 2015).

PAH'lar iki ya da daha çok birleşik benzen halkalı yapıda, doğrusal, açılı ya da kümeli şekilde düzenlenmiş olan organik bileşikler grubu olarak adlandırılabilirler. En basit yapı olan 2 halkadan oluşan Naftalen ($C_{10}H_8$)'den 6 ya da daha çok halkadan oluşan, alkil grupları içeren ve daha karmaşık yapılara sahip olan hidrokarbonlara kadar çeşitlilik gösterirler (Gallego Blanco, 2012). Yalnızca karbon (C) ve hidrojen (H) atomlarından oluşabildiği gibi, azot (N), sülfür (S) ve oksijen (O) atomları da benzen halkası ile yer değiştirebilir ve PAH'larla yaygın şekilde bulunan heterosiklik aromatik bileşikleri oluşturabilir (Wilson and Jones, 1993). Toksisiteleri, çevrede sıklıkla ve devamlı şekilde bulunmaları nedeniyle PAH'lar öncelikle mücadele edilmesi ve çevresel sistemlerden uzaklaştırılması gereken kimyasal maddeler olarak değerlendirilmektedirler. 1979'da Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA) öncelikli kirleticiler listesine 16 EPA PAH'ları olarak dahil etmiştir (Keith and Telliard, 1979) (Bkz. Çizelge 2.1, Alver ve ark., 2012). Bu liste içeriği düzenleyici otoriteler tarafından alan kirlenmesi ve izleme parametrelerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. 16 EPA PAH'ı çevre alanında yapılan birçok çalışmaya standart bileşikler olmuştur (Gallego Blanco, 2012).

2.1.2. Fizikokimyasal özellikleri

PAH'lardaki en önemli ve göze çarpan fiziko-kimyasal özellikleri, sudaki çözünürlük, buhar basıncı, Henry katsayıları ve oktanol-su katılım katsayısıdır. Bu özellikler hava, su, toprak, sediment, vejetasyon ve diğer biyotalar arasında uygulanan çevresel katılım katsayılarının çeşitliliğini anlamak, ksenobiyotiklerin

çevresel kaderlerini ve benzer fizikokimyasal özellik gösteren bileşikler ile etkileşimlerini tahmin edebilmek için kullanılabilmektedir (Maagd et al., 1997; Mackay and Callicott, 1998; Gallego Blanco'dan, 2012) Bu gibi fiziko-kimyasal özellikler sıcaklığa bağlı olarak değişiklikler gösterebilmekle birlikte, genellikle 20 – 25 °C sıcaklık aralığında ölçülürler (Çizelge 2.1a; 2.1b) (Gallego Blanco, 2012).

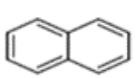
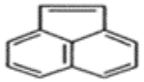
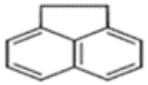
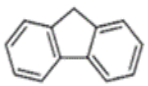
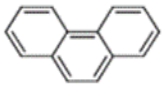
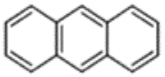
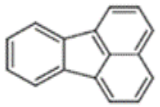
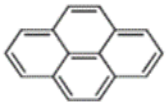
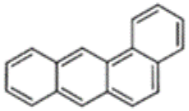
PAH'lar oda sıcaklığında katı kristal yapıdadırlar. PAH'ların hidrofobisitesi $_n$-oktanol - su katılım katsayısı (K_{ow}) olarak ifade edilir. Kow katsayısı suda çözünürlük ile ters orantılıdır. PAH'ın moleküler boyutu arttıkça K_{ow} artmaktadır. Aynı şekilde moleküler ağırlığı ile doğru orantılı olarak kaynama noktası da yükselirken; moleküler boyutuna bağlı olarak sıvı buhar basıncı, Henry yasası sabitleri ve sıvı içindeki çözünürlükleri azalmaktadır. 2 aromatik halkalı PAH'lar dışında genel olarak PAH'ların buhar basınçları nispeten düşüktür. Bunun bir sonucu olarak, birçok PAH normal şartlar altında buharlaşma eğiliminde değildir. Dahası, PAH'lar sudaki çözünürlüklerinin azlığından dolayı çevresel sistemlerde devamlı olarak kalabilmektedirler. Toprak ve diğer partiküller içine adsorblanarak biyouyumluluk ve biyodegradasyon (biyoparçalanma) etkileşimleri gösterebilmektedirler (Gallego Blanco, 2012).

$$Kow = \frac{Oktanol'deki\ kimyasal\ madde\ miktarı\ (mg/L)}{Sudaki\ kimyasal\ madde\ miktarı\ (mg/L)} \qquad (2.1)$$

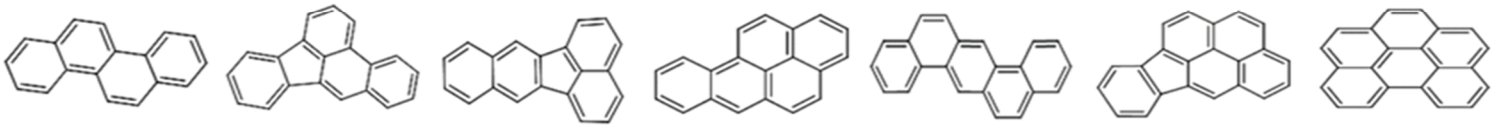
Suda oldukça düşük oranda çözünmeleri, kimyasal özellikleri ve bu bileşiklerin toprak partikülleri tarafından adsorbsiyon kapasitelerinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı, PAH'ların mikroorganizmalar tarafından kullanılması ve biyoparçalanması oldukça düşmektedir (Melcher et al., 2002, Boyd et al., 2008). Genelde, geniş alanlarda PAH kirliliği orta seviyede de olsa kirlilik sebebidir. Bu nedenlerden dolayı, toprak kirliliği için kullanılan fizikokimyasal yöntemler ya da biyoreaktörler ve biyoçoğaltım gibi biyoiyileştirmeyi içeren geleneksel iyileştirme teknikleri yetersiz kalabilmektedir (Wilson and Jones, 1993).

Çizelge 2.2. EPA tarafından 1999 yılında öncelikli kirletici statüsüne alınmış olan 16 PAH molekülü (Alver ve ark., 2012).

1- Naftalen	9- Benzo [a] antrasen
2- Asenaftelen	10- Krisen
3- Asenaften	11- Benzo [b] floranten
4- Floren	12- Benzo [k] floranten
5- Fenantren	13- Benzo [a] piren
6- Antrasen	14- Dibenzo [a,h] antrasen
7- Floranten	15- İndeno[1, 2, 3-cd] piren
8- Piren	16- Benzo [g, h, i] perilen

PAH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CAS Numarası	91-20-3	208-96-8	83-32-9	86-73-7	85-01-8	120-12-7	86-74-8	206-44-0	56-55-3
Molekül Formülü	$C_{10}H_8$	$C_{12}H_8$	$C_{12}H_{10}$	$C_{13}H_{10}$	$C_{14}H_{10}$	$C_{14}H_{10}$	$C_{16}H_{10}$	$C_{16}H_{10}$	$C_{18}H_{12}$
Molekül Yapısı									
Molekül Ağırlığı (g/mol)	128,17	152,20	154,21	166,22	178,23	178,23	202,25	202,25	228,29
Renk	-	-	Beyaz	Beyaz	Renksiz	Renksiz	Mat sarı	Renksiz	Renksiz
Erime Noktası (°C)	80,2	92-93	95	116-117	100	218	109	156	159-162
Kaynama Noktası (°C)	217,9	265-275	96,2	295	340	342	375	393-404	400
Yoğunluk (g/cm3)	-	-	1,225	1,203	0,98	1,283	1,252	1.271	1,274
Sudaki Çözünürlük (mg/L)	31	3,93	1,93	1,98	1,20	0,076	2,0-2,6	0.077	0,010
Buhar Basıncı (mm-Hg)	0,085	0,029	$4,47x10^{-3}$	$3,2x10^{-4}$	$6,8x10^{-4}$	$1,7x10^{-5}$	$5x10^{-6}$	$2.5x10^{-6}$	$2,2x10^{-8}$
Log K_{OW}	3,3	4,07	3,98	4,18	4,45	4,45	4,90	4.88	5,61
Log K_{OC}	-	1,40	3,66	3,86	4,15	4,15	4,58	4.58	5,30
Henry Sabiti (atm.m^3/mol)	0,44	$1,45x10^{-3}$	$7,91x10^{-5}$	$1x10^{-4}$	$2,56x10^{-5}$	$1,77x10^{-5}$	$6,5x10^{-6}$	$1.14x10^{-5}$	$1x10^{-6}$
L/B oranı	1,238	-	-	-	1,463	1,566	1,22	1.257	1,58

Şekil 2.1a. US EPA'nın kirletici statüsünde belirlediği 16 PAH ve onların çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri (Alver ve ark., 2012).

PAH	10	11	12	13	14	15	16
CAS Numarası	218-01-9	205-99-2	207-08-9	50-32-8	53-70-3	193-39-5	191-24-2
Molekül Formülü	$C_{18}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$	$C_{22}H_{14}$	$C_{22}H_{12}$	$C_{22}H_{12}$
Molekül Yapısı							
Molekül Ağırlığı (g/mol)	228.3	252.3	252.3	252.3	278.35	276.3	276.34
Renk	Renksiz	Renksiz	Mat Sarı	Mat Sarı	Renksiz	Sarı	Mat sarı
Erime Noktası (°C)	255-256	168.3	215.7	179	262	163.6	273
Kaynama Noktası (°C)	448	481	480	495	-	530	550
Yoğunluk (g/cm3)	1.274	-	-	1.351	1.282	-	1.329
Sudaki Çözünürlük (mg/L)	2.8x10-3	1.2x10-3	7.6x10-4	2.3x10-3	5x10-4	0.062	2.6x10-4
Buhar Basıncı (mm-Hg)	6.3x10-7	5x10-7	9.59x10-11	5.6x10-9	1.x10-10	1.x10-11	1.03x10-10
Log KOW	5.16	6.04	6.06	6.06	6.84	6.58	6.50
Log KOC	5.30	5.74	5.74	6.74	6.52	6.22	6.20
Henry Sabiti (atm.m^3/mol)	1.05x10-6	1.22x10-5	3.87x10-5	4.9x10-7	7.3x10-8	6.95x10-8	1.44x10-7
L/B oranı	1.78	1.40	1.48	1.50	1.79	1.40	1.12

Şekil 2.1b. US EPA'nın kirletici statüsünde belirlediği 16 PAH ve onların çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri (Alver ve ark., 2012).

2.1.3. PAH'ların oluşumu

Tarihsel olarak, PAH'lar bilinen üç farklı yolla üretilmektedirler: bunlar diyagenetik kökenli (organik materyalin petrogenezisi veya kömür oluşumu gibi), pirolitik kökenli (organik materyalin tam olarak yanmaması ile) ve biyojenezdir. Genel olarak, PAH'lar ham petrol ve türevleri (gas-oil, fuel oil vs.) ve mineral kömür ürünleri (kömür katranı, kreozot vs.) gibi sulu olmayan faz sıvıların (non-aqueous phase liquids-NAPLs) bir kısmı olarak bulunurlar. Bu mineraller, çok geniş çapta kimyasal, fiziksel ve toksikolojik özellikler gösteren yapıtaşı bileşenleri ile oldukça karmaşık karışımlardır (Gallego Blanco, 2012).

Ham petrol veya petrolyum eski çağlardan bu yana fosilleşmiş zooplankton ve alg gibi organik materyallerden - ki bunlar milyonlarca yıl boyunca yüksek basınç ve sıcaklık koşuları (100 – 150°C) altında kalan organik materyallerdir- oluşmaktadırlar (Blumer, 1976; Gallego Blanco'dan, 2012). Ham petrol yoğun, siyah bir sıvıdır ve bünyesinde birçok hidrokarbon bileşikleri ile az oranda kükürt, azot, oksijen ve metalik bileşenler bulundururlar. Ham petrolün esas bileşenleri saflaştırılabilir ve farklı fraksiyonlarda alt kısımlarına ayrıştırılabilir: doygun (alkanlar ya da parafinler, dallanmış ya da izoalkanlar, sikloalkanlar ve naftalenler) aromatik (en az bir benzen halka yapısına sahip bileşikler olarak karakterize edilirler, alkil-benzenleri alkil-PAH'lar), rezin ve asfaltenik fraksiyonlardır (Rossini, 1960; Sugiura et al. 1997; Mills et al., 1999).

Mineral kömür, temel olarak karbon elementi boyunca hidrojen, kükürt, oksijen ve azot gibi değişken elementleri bünyesinde barındıran ve bundan dolayı karmaşık moleküler yapıdan oluşan fosil bir yakıttır. Bataklık kömürü (peat), linyit kömürü (lignite), taş kömürü (antracite) ve yumuşak karbon kömürü (graphite) olmak üzere farklı tip kömürler vardır. Kömür katranı ürününün sıcaklık tesiri ile bozunma (900 – 1200 °C) sonrasında, distilasyon ile (200 – 400°C) ahşap korunmasında geniş çapta kullanılan ve kreozot olarak adlandırılan yağlı bir karışım üretilir. Kömür katranı kreozotu %85 poliaromatik hidrokarbon, %10 fenolik bileşikler ve %5 oranında ise N- S- ve O- heterohalkalarından oluşmaktadır (Mueller et al., 1989). Kreozot gibi pirojenik hidrokarbonlar karakteristik olarak alkillenmiş olan homologlarından daha fazla olarak yer değiştirmeyen esas

PAH'ları içerirler, ancak petrol gibi petrojenik hidrokarbonlar ve onların türevleri ise düşük sıcaklık oluşumlarına bağlı olarak daha yaygın olarak alkillenmiş PAH'lardan oluşurlar (Page et al., 1996). ABD'de kreozotla kirlenmiş birçok alan bulunmaktadır (Mueller et al., 1989). Bununla birlikte, kreozot bileşiklerinin mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi toksik etkilerinden dolayı günümüzde Avrupa ve ABD'de kreozotun üretim ve kullanımı yasaklanmıştır (Commision Directive 2001/90/EC).

2.1.4. Çevresel PAH kirliliği

Genellikle, çevresel PAH kirliliğine sebep olan işlemler doğal ve antropojenik (insan kaynaklı) olarak ikiye ayrılmaktadır. PAH'ların doğal kaynakları olarak; volkanik patlamalar, orman ve çalılık arazi yangınları, bitkilerdeki ve bakterilerdeki biyojenik reaksiyonlar örnek verilebilir (Gallego Blanco, 2012).

Antropojenik kaynaklar ise genel olarak PAH üretiminin ve çevreye salınımının en önemli ana kaynakları olarak değerlendirilmektedir. Antropojenik kaynaklar; fosil yakıtların yakılması, kömür katranının üretilmesi ve kullanılması, fosil yakıtların distilasyonu sonucu oluşturulan kreozot, taşımacılık sırasında meydana gelen kazalar, üretim ve depolama hataları, endüstriyel işlemler, atık çöp yakma, şehir kanalizasyonu ve endüstriyel kanalizasyon çıkış suları olarak sıralanabilir (Cerniglia, 1992, Forsgren, 2015).

PAH'ların antropojenik kaynaklı olarak çevresel sistemlere girişi sıklıkla nokta kaynakları ve düşük seviye giriş kaynakları olarak ikiye ayrılır. Endüstriyel açıdan gelişmiş birçok ülkede, nokta kaynaklı kirlenme çok yaygın olarak görülmektedir ve sıklıkla çevresel kaygıların ve düzenleyici faaliyetlerin odak noktası konumundadır. Nokta kaynaklar, fosil yakıtların gazlaştırılması/sıvılaştırılması, kok üretimi, katalitik parçalama, karbon karası üretimi ve kullanımı, asfalt üretimi ve kullanımı, kömür katranı üretimi ve kullanımı, ham petrolün ve petrol türevi ürünlerin rafinasyonu/damıtımı, katı atık yığın sahaları, yakma/kül üretimi, yakıt/benzin depolanması, taşınması, işlenmesi, kullanımı ve uzaklaştırılması gibi endüstriyel operasyonlar sırasında oluşan

yayılma ve yanlış atık yönetimi (atık giderimi, çamur bertarafı, sızıntı yapan tanklar vs.) olarak sıralanabilir (Gallego Blanco 2012).

Düşük seviye girişleri ise, tipik olarak endüstriyel aktiviteler ve otomobil egzosundan salınan ve genellikle fosil yakıtların tam olarak yanmaması ile oluşan atmosferik çökeltilerden meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra, atık çamurun alan uygulaması ve geniş çaplı dökülme ve yağlı atıkların uzaklaştırılması da katkı sağlayabilmektedir. Atmosferik PAH çökeltisi genellikle çok dağınık kaynaklardır, ama alan yüzeyleri ve sedimentlerin önemli bir miktarını kaplamaktadır. Bu kaynaklardan gelen PAH konsantrasyonları, küresel çapta atmosferik çökelim PAH'ların karasal, sucul ve denizel çevrelere yağış ve süzülme yoluyla ulaşmasında ana yol olmasına rağmen, tipik olarak toprak ve sedimentlerde oldukça düşüktür (Gallego Blanco, 2012; Kochany, 2015).

2.1.5. PAH'ların çevresel akıbeti

Bugün bilinen kimyasal karsinojenlerin büyük bir sınıfını oluşturduklarından dolayı PAH'ların çevresel akıbeti önemlidir. Çevresel sistemlerdeki PAH'ların olası akıbetleri, buharlaşma, fotooksidasyon, kimyasal oksidasyon, biyoakümülasyon, toprak partiküllerine adsobsiyon, liçing ve mikrobiyal parçalama olarak kapsamlandırılır (Cerniglia, 1992).

Topraklarda, naftalen ve metilnaftalenin kaybı buharlaşma yoluyla gerçekleşir. Uçucu olmayan yüksek molekül ağırlıklı PAH bileşikleri için buharlaşma göz ardı edilir (Park et al., 1990). Abiyotik reaksiyonlar genellikle iki ya da üç halkalı PAH bileşikleri kapsamaktadır ve istatistiksel olarak üçten daha fazla aromatik halka içeren PAH bileşiklerinin indirgenmesinde önem arz etmemektedir (Bossert and Bartha, 1986; Wild and Jones, 1993). Dahası, bu bileşikler toprak matriksindeki tecritleri yolu ile biyouygunluklarını azaltarak ortamda uzun süre kalmanın olumsuz etkilerine sahip olurlar (Gallego Blanco, 2012).

Sucul sistemlerde, naftalen ve onun alkil türevleri göreceli olarak çözünür durumdadır. Ancak, üçten daha fazla halkaya sahip olan PAH'lar oldukça

hidrofobik karakterde ve organik materyallerle bağ oluşturma eğilimindedirler. Bundan dolayı sedimentlerde kalmayı tercih etmektedirler. Bazı PAH'lar fotookside olabilirler, buharlaşabilir ve biyolojik olarak parçalanabilirler, ama sucul sistemlerin diplerinde kalan PAH'lar genellikle sadece mikrobiyal aktivite yoluyla biyoparçalanabilirler ve baskın olarak sedimentin alt tabakalarından daha yukarıdaki yüzeylerde bulunurlar (Gardner et al., 1979; Cerniglia and Heitkamp, 1989).

Yukarıda bahsedilen tüm bu doğal ve antropojenik işlemler sonucunda oluşan kirleticilerin belirtilen yöntemlerle giderimi kısmi olarak kalmakta ve çevresel kirleticilerin tekrar dağılımı gerçekleşmektedir. Ancak, mineralizasyonda kısmi parçalanma ya da dönüşüm olmasına rağmen; bakteriler, algler, funguslar ve mayalar tarafından katalizlenen mikrobiyal parçalama kirleticilerin giderilmesi için esas işlemdir (Gallego Blanco, 2012).

2.1.6. PAH'ların toksisite durumları

Özellikle PAH'lar dayanıklı kimyasallar olması ve doğada uzun yıllar kalması, bazılarının toksik olmasına bağlı olarak; teratojenik, mutajenik ve karsinojenik olarak tanımlandıklarından dolayı aromatik bileşikler çevresel sorun teşkil etmektedirler (Singh et al., 2015, Sternbeck 2011). Ayrıca, canlıların bu kimyasal maddelere maruz kalma durumlarında; bu moleküller ağız, solunum, cilt ve göz yolları vasıtasıyla kolaylıkla vücuda girerek, nörolojik, üreme ve gelişimsel hastalıklara sebebiyet vermektedir. Bu aromatik bileşiklerden antrasen, krizen, benzo(a)piren ve benzo(a)antrasen gibi bazıları doğada toksik, mutajenik ve karsinojeniktir (Singh et al., 2015). Benzo(a)piren kesin olarak karsinojen olarak tanımlanan ilk kimyasaldır (Sternbeck 2011). PAH'lara maruz kalan insanlar da bu kimyasalların zararlı etkilerden muzdarip olmaktadırlar. Tabii olarak bu moleküllerin insanlara olan zararlı etkileri 1) PAH dozu ve maruz kalma süresi, 2) solunum, ağız yoluyla yeme içme, cilt teması, 3) Kişilerin maruz kaldıkları diğer kimyasallar, 4) yaş, cinsiyet, sağlık durumu ve beslenme gibi diğer kişisel karakteristikler gibi birçok faktöre bağlıdır (Forsgren, 2015).

PAH'lar çok çeşitli toksik etkiler gösterebilirler ve tek tip toksik etkileri yoktur. Bileşiğe, maruz kalma tipine (akut ya da kronik) organizmalara ve çevresel şartlara bağlı olarak farklı toksisite mekanizmaları rol oynayabilir. Genelde, dört tip toksisite mekanizması görülmektedir. Bunlar; nanpolar narkozis, fototoksisite, biyokimyasal aktivasyon ve hormon düzenlenmesinin tahribatı şeklindedir (Gallego Blanco, 2012).

2.1.6.2. Nanpolar narkozis ya da temel toksisite

Toksisitenin spesifik olmayan şeklidir. Toksikantın biyolojik membranda birikmesi sonucu oluşur. Biyolojik membranları yapısı tahrip olur ki bu, ozmoregülasyon ve nörotransmisyon gibi membrana bağlı esansiyel biyolojik işlemlerin düzenlenmelerini etkileyebilmektedir. Narkozis kısa süreli maruz kalma sonucunca hızlı bir şekilde gelişebilir. Bu tarz toksisite, bir bileşiğin biyolojik membranlarda birikmesini önemli ölçüde tanımlayan oktanol-su katılım katsayısı ile ilişkili olabilir. Bu şekilde toksik etki gösteren PAH'lara örnek olarak naftalen, fluoren ve fenantren verilebilir (Gallego Blanco, 2012).

2.1.6.3. Fototoksisite

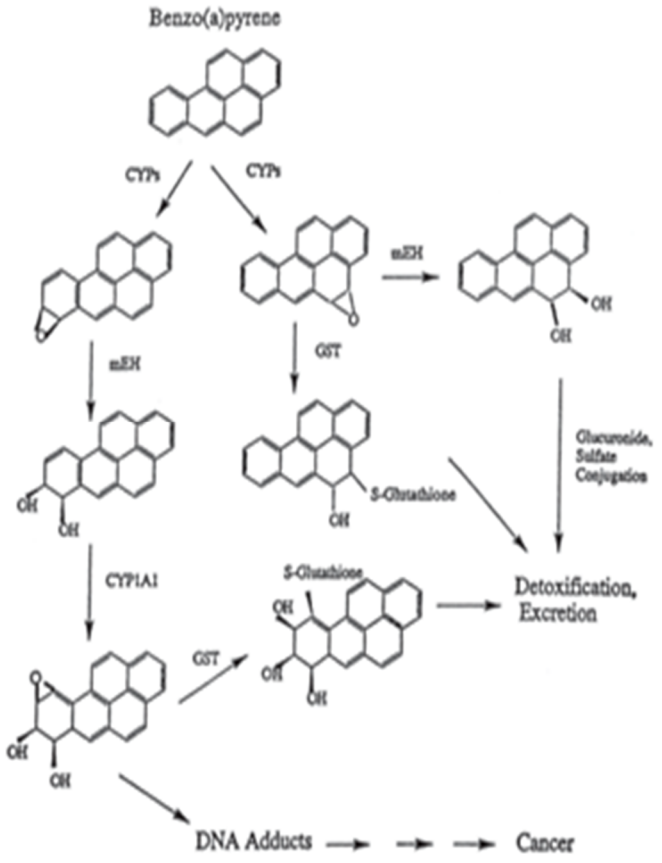
UV ışığı varlığında gerçekleşen özel bir toksisite mekanizmasıdır. Bazı PAH'lar UV ışık enerjisini absorbe etme yeteneğine sahiptir. UV radyasyonu serbest radikallerin oluşmasını indükler ki bu serbest radikaller toksik etki göstererek bir dizi makromolekülün hasarına sebep olur. Işık ile uyarılmış olan PAH molekülleri UV enerjisini bir oksijen molekülüne transfer eder. Bu sayede lipid peroksidasyonu yolu ile hücre membranlarını tahrip eden oksijen radikali yaratılır. Fototoksisite gösteren PAH'lar, antrasen, fluoranten, piren, krizen, benz(*a*)antrasen, benzo(k)floranten, benzo(a)piren, dibenz(a,h)antrasen ve benzo(g,h,i)perilen olarak rapor edilmiştir. Fototoksisite göreceli olarak hızlı gelişebilir olmakla birlikte, hem akut hem de kronik toksisite çalışmalarında gözlemlenebilmektedir (McDonald and Chapman, 2002).

2.1.6.4. Biyokimyasal aktivasyon

En iyi bilinen toksisite mekanizmasıdır. Mevcut PAH'lar enzimatik yollarla başka moleküllere dönüştürülme sırasında enzimatik işlemler devam ederken akabinde üretilen moleküle eklenti oluşumu ile toksisite gerçekleşir. Bu durumda enzimatik dönüşüme uğrayan bir önceki moleküller, protein ve DNA gibi makromoleküllerle kovalent bağlar oluşturabilen oldukça reaktif bileşiklere dönüşürler. Böylesi DNA eklentileri karsinojenez ve teratojenez ile sonuçlanabilen mutasyonları tetikleyebilir. Biyokimyasal aktivasyon özel bir PAH grubu ile sınırlı olan oldukça spesifik (kronik) bir toksisite mekanizmasıdır. Tüm organizmalar bu tarz biyokimyasal aktivasyonu gerçekleştirmek için gerekli olan enzim sistemli ile eşit oranda donatılmamışlardır (Gallego Blanco, 2012).

PAH'lar, insan vücudunda sitokrom P450 [(CYP)1A1] aracılı kompleks fonksiyonlu oksidazların oluşturduğu bir enzim sistemi aracılığıyla epoksidler ve fenoller oluşturarak metabolize edilirler (Gallego Blanco, 2012; Conney, 1982; Stegeman et al., 2001). Bu epoksidler ve fenoller ise daha sonra DNA bazları ile reaksiyona girerek DNA'ya eklenirler ve onkogenler ya da tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar yaratarak kansere sebep olurlar (Garner, 1998; Goldman et al., 2001).

Başlangıç oksidasyon basamağında bu enzim sistemi iş görmektedir ve konjugasyon adımında glutatyon transferaz (GST) M1 enzimleri ile gerçekleşir. Bu enzimler hem polimorfiktir hem de DNA eklenti seviyelerinin modülasyonunda iş görürler. Başarılı oksidasyon adımları baskın şekilde reaktif diol-epoksidleri üretir ve sonraki aşamada bu moleküller reaktif elektrofiller olarak karbonyum iyonlarına dönüştürülerek bu sayede DNA'ya kovalent olarak bağlanabilirler. Bu tarz biyokimyasal işlemler ile oluşturulan DNA eklentilerinin izlenmesi, insanın PAH'lara maruz kalması açısından risk değerlendirmesinde kullanılmaktadır (Gallego Blanco, 2012).



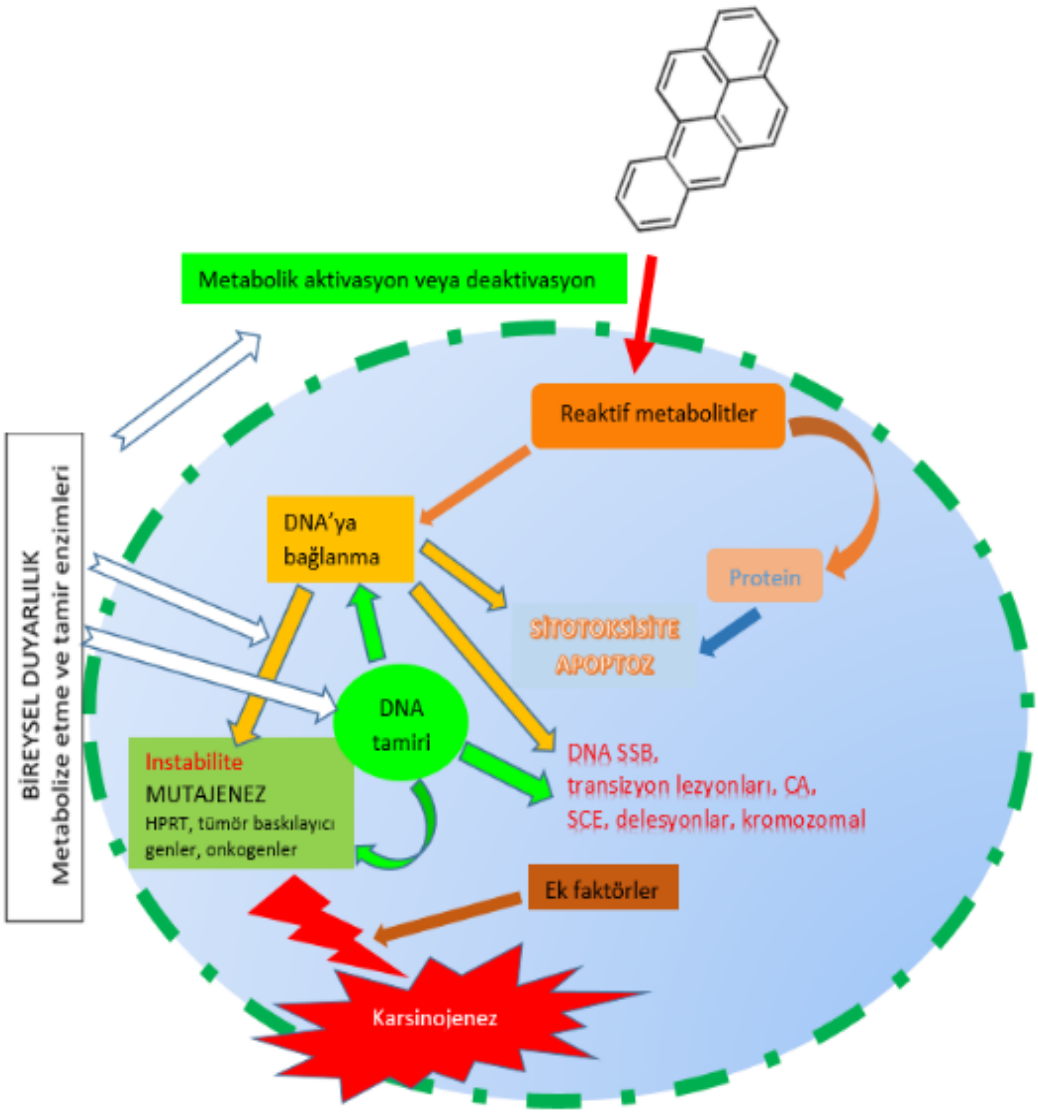
Şekil 2.2. Benzo(a)piren yolizlerinin aktivasyonu ve detoksifikasyonu. CYP'ler: sitokrom P_{450}; mEH: mitokondriyel epoksid hidrolaz; GST: glutatiyon S – transferaz (Galleco Blanco, 2012).

Örneğin, benzo(a)piren oksidasyonu ile 7, 8 - epoksid üretilir -ki bu molekül sonrasında bir epoksid hidrolaz vasıtasıyla bir trans-dihidrodiole dönüştürülür. Bu 7, 8 – trans - dihidrodiol sonrasında diğer pozisyonlarda epokside olabilir. Bu tarz bazı pozisyonlar ile diol-epoksidlerin bazıları yüksek oranda mutajenik ve karsinojenik potansiyeline sahip olarak reaksiyon sonuçlanır. Diol-epoksidler bir glutatyon transferaz aracılığı ile glutatyonla birleşebilir ki bu durum diol-epoksidlerin detoksifikasyonu ile sonuçlanır. Glutatyon ile kaynaşmayan epoksidler, fenoller ve diollere dönüştürülürler. Ancak, bu metabolitler hücre ve dokulardan dışarı atılacak kadar yeterli seviyede polar değildir ve sonraki aşamada atılmak için glukuronik ya da sülfürik asitler ile bileşik oluştururlar (Şekil 2.2). Aslında, hayvanlarda benzo(a)piren ile yapılan denemeler sonucu anlaşılan durumlar göstermektedir ki, bu PAH'ın direk olarak alınması veya solunması sonrasında kötü huylu tümör oluşmaktadır (Gallego Blanco, 2012).

2.1.6.5. Hormon düzenlenmesinin tahribatı

PAH'ların hormon düzenlenme mekanizmalarının tahribatını gerçekleştirdiğine dair bazı kanıtlar mevcuttur. Tahribatın, PAH moleküllerinin ya hormon reseptörleriyle etkileşimleri yolu ile direkt veya hormon metabolizmasına aracılık etmeleri ile dolayı yoldan gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu tip toksisite kronik maruz kalma durumlarını gerektirir. Örneğin, benzo(a)piren ratlarda testosteron üretimini azaltırken (Chung et al., 2011), PAH'lar etkileri sonucu tiroit hormonlarının homeostasisinden sorumlu birçok anahtar bileşeni tahrip ederler (Mastorakos et al., 2007).

Eğer organizmaların PAH'ları kullanma yeteneği varsa sebep oldukları tüm bu toksik etkiler ortadan kaldırılabilir. Bundan dolayı, toksisitenin yanında, PAH konsantrasyonu, biyouygunluk ve hücre içine alım mekanizmaları önemli parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır. PAH'ları ileri seviyelerde metabolize edebilen organizmalar bünyelerinde göreceli olarak düşük kalıntı konsantrasyonlarına sahip olurlar. Bu sayede narkosiz ve fototoksisiteye daha az duyarlı olacaklardır. Öte yandan, yüksek oranda PAH metabolizmasına sahip olan organizmalar daha büyük ihtimalle kimyasalların hücresel moleküllere bağlanma oluşumunun kurbanı olacak ve hormon düzenlenmesinin tahribatına daha çok maruz kalacaklardır (Gallego Blanco, 2012).



Şekil 2.3. Hücre içi PAH metabolizması ve olası ters etkileşimler (Csaba and Csaba, 2011'den uyarlanmıştır).

2.2. Türkiye ve Dünya'da Tehlikeli Atıklar İçin Yasal Çerçeveler

PAH'ların da dahil edilebileceği tehlikeli atıklar için hali hazırda uygulanan veya hazırlanarak uygulanması gereken kurallar ve bunu için düzenlenmesi gereken yasal çerçevelerden bahsetmeden önce, tehlikeli atık yönetimi hakkında bilgi vermek yerinde olacaktır. Tehlikeli atık yönetimi terimi, atıkların direk olarak kaynağından özelliklerine göre ayrılması, toplanması, geçici süre ile depolanması, tekrar geri kazanılması, taşınması, bertarafı ve kontrolü şeklinde ters etkileri baştan sona önleme yönündeki işlemler bütünü olarak tanımlanabilir. Üretim esnasında tehlikeli atık oluşumunu en az düzeye indirmek tehlikeli atık yönetiminin ana

hedefidir. Çevre ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturmayacak şekilde, üretimden uzaklaştırmaya kadarki tüm aşamalarda etkili ve süreklilik arz eden yöntemlerin uygulanmasının yanında, tehlikeli atıkların kontrolü açısından üretici veya işlem sonunda tehlikeli atık oluşturan ürünleri üreten sanayicileri bu konuda teşvik edici mali araçların kullanılması da süreklilik açısından önem arz etmektedir. Olumsuz etki ve özellikleri nedeniyle tehlikeli atıklar bilinen katı atıklardan çok daha sıkı standartlarla yönetilmelidir. Bu durum, tehlikeli atıkların bertaraf edileceği tesislerin üretim esnasında tehlikeli atıkların en aza indirilmesi amacıyla yapılan yatırımın ve işletme giderlerinin yüksek olmasına neden olmaktadır. Ayrıca, tehlikeli atık oluşumundan sorumlu olan kimyasal maddeler yerine alternatiflerinin kullanılması da maliyeti azaltmaktadır (Özkaya, 2004).

Ülkelerin sosyo-ekonomik yapılarındaki farklılıklar, üretilen atık çeşitliliği, yapısal farklılıkları ve miktarları nedeniyle tehlikeli atıkların yönetimine ilişkin ulusal politikalar ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Ancak, bahsi geçen bu farklılıklar bir engel teşkil etmemeli ve tehlikeli atıkların çevre üzerindeki olumsuz etkilerini gidermek veya azaltmak için uluslararası alanda işbirliği zorunluluk arz etmektedir. Dünya genelinde üretilen tehlikeli atıkların yaklaşık olarak %90'lık bir bölümü sanayileşmiş ülkelerin endüstrilerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, tehlikeli atık ticareti konusundaki genel eğilim, tehlikeli atığın, gelişmiş ülkelerden gelişmemiş ülkelere ithali yönündedir. Özellikle mevzuat ve kontrol açısından altyapısını henüz tamamlamamış ülkelere tehlikeli atıkların ithalatının önlenmesi amaçlanarak uluslararası çapta bazı düzenlemelere gidilmektedir. OECD, Avrupa Birliği, Birleşmiş Milletler gibi uluslararası kuruluşlar bu düzenlemeleri desteklemektedir. Bu amaçla, "kirleten öder" prensibi ve "zarar oluşmadan önleme" anlayışı hakim kılınmaya çalışılmakta ve mümkün olan en etkili teknolojinin kullanılması teşviklenmektedir. Türkiye tehlikeli atık ticaretini önlemek üzere bölgesel ve küresel düzeyde sürdürülen çalışmalara katılmakta, bu atıkların OECD ülkelerinden OECD-dışı ülkelere ihracatının yasaklanması yönündeki kararları da desteklemektedir. Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) bünyesinde hazırlanan "Tehlikeli Atıkların sınır Ötesi Taşınımı ve Bertaraf Edilmesine İlişkin Basel Sözleşmesi" tehlikeli atıkların kontrol edilmesi için uluslararası çapta sürdürülen bir çalışma olarak yapılmış ve 1992 yılında yürürlüğe girmiştir. Basel Sözleşmesi'ne göre, özellikle gelişmekte olan ülkeleri tehlikeli atık ticaretine karşı

koruyucu bazı düzenlemeler içermektedir. Basel Sözleşmesi ekinde 45 ayrı atık kategorisi listelenmiş ve atık türleri ile atık bileşenleri olmak üzere atıklar iki ana başlık altında incelenmektedir. Bu kapsamda, atıkların nakil işleminin başladığı noktadan bertarafına kadar olan taşıma serüveni boyunca nakil eden kurum veya kuruluşun tehlikeli atık taşıma belgesi bulundurması zorunludur. Basel Sözleşmesi'ne göre tehlikeli atıkların sınır ötesi taşınımından hemen önce yapılması gereken nakil bildirim işlemi, sözleşme kontrol sisteminin temelini oluşturmaktadır. Bir başka deyişle, tehlikeli atığın taşınımı için ilgili ülkelerin (ithalatcı-ihracatçı, transit ülke) yetkili makamına önceden yazılı bildirimde bulunulması ve onay alınması gereklidir. Bu onayın alınmadığı durumda ise, yasal prosedüre uyulmadığı için yasadışı ticaretten söz edilmektedir (Özkaya, 2004).

Türkiye ise bahsi geçen Basel Sözleşmesi'ne 1994 yılında taraf olmuştur. Ayrıca, 1996 yılında "Akdeniz'de Tehlikeli Atıkların Sınırlar Ötesi Taşınımı ve Bertarafından Kaynaklanan Kirliliğin Önlenmesi"ne ilişkin İzmir Protokolü'nü de imzalayarak, Basel Sözleşmesi'nin bölgesel uygulanmasına yönelik çalışmalara destek vermiştir. (Özkaya, 2004)

Bilindiği üzere, kirli alanlar halk sağlığına potansiyel toksik etkilerinden dolayı büyük endişe kaynaklarıdır. Bunun bir sonucu olarak, gelişmiş ülkeler spesifik problemlere odaklanan düzenleyici programlar benimsemiş ve bu kirli alanların temizlenmesi için standart kılavuzlar, düzenlemeler ve protokoller oluşturmuşlardır. Başlangıçta, çabalar su ve hava kalitesini iyileştirmeye odaklanmıştır. Sonrasında, Birleşik Devletlerde bulunan Love Canal (1976) ve Hollanda'da bulunan Lekkerkerk (1978) gibi yerleşim yerlerindeki kimyasal atık uzaklaştırmasına bağlı olarak su ve hava kaynaklı halk sağlığı üzerinde ciddi tehlikeli durumlara sebep olan birçok endüstriden sonra toprak kalitesine olan ilgi artmıştır. 1980'de yaygın olarak Superfund olarak bilinen, federal CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act) yasası ile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) birçok tehlikeli atık bölgelerinin düzenlenmesi ve temizlenmesi için kaynak sağlanması çalışmalarına başlamıştır. CERCLA kimya ve petrol endüstrilerinin vergileriyle güvenli bir şekilde finanse edilmektedir. ABD hükümeti, endüstriyel kimyasalların ya da halk sağlığını veya çevreyi tehlikeye atabilecek atıkların çevreye salınımına karşılık vermek adına

federal otoriteyi sağlamaktadır. US EPA kuruluşunun aracılığı ile birlikte yönetilmekte olan bu program kapsamında, tehlikeli maddelerin kısa dönem giderimi veya uzun dönem iyileştirilmesine yetki verilmekte, kirlenmiş bölgeler hakkında geniş çaplı bilgi oluşturulmakta ve Birleşik Devletlerdeki kirlenmiş alanlarla ilgili olan yasaklar ve gereklilikler belirtmektedir (Gallego Blanco, 2012).

Türkiye'de tehlikeli atıkların yönetimi, 1995 yılında yürürlüğe giren Tehlikeli Atıkların Kontrolü Yönetmeliği çerçevesinde hayata geçirilmiştir. Bu yönetmelik kapsamında tehlikeli atıkların tanımları ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Atık özelliğine bağlı olarak toksik, yanıcı, yakıcı, parlayıcı gibi en az bir özelliği taşımıyorsa, 1991 yılında yürürlüğe giren Katı Atıkların Kontrol Yönetmeliği'ne istinaden değerlendirilmektedir. Yukarıda temel tanımlamasında da bahsedildiği gibi atıklar, muhtemel kaynakları, bileşenleri ve türleri itibariyle sınıflandırılmış ve bertaraf etme yöntemleri Tehlikeli Atık Yönetmeliği'nde belirlenmiştir. Yönetmelik tehlikeli atıkların toplanması, tesis içinde geçici depolanması, ara depolanması, taşınması, geri kazanılması, nihai bertarafı ile ithalat ve ihracatına ilişkin hukuki ve teknik esasları kapsamaktadır. Türkiye'de tehlikeli atıkları bertaraf etmek üzere lisanslı olarak çalışan tek tesis, yılda yaklaşık olarak 35.000 ton tehlikeli atık yakma kapasiteli İzmit İZAYDAŞ tesisidir. Diğer taraftan, geçtiğimiz yıllarda, sanayi atıkları ile motor yağlarının geri kazanılması amacıyla bazı küçük ölçekli tesislere geçici lisans verildiği de bilinmektedir (Simla Yasemin Özkaya, 2004).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'in 1996 yılında gerçekleştirdiği İmalat Sanayi Atık Envanteri Anketine bakıldığında; Türkiye'de 10 ve daha fazla çalışanı olan toplam 3073 iş yerinin ürettiği endüstriyel katı atık miktarın tümü yaklaşık olarak 14 milyon ton, kimyasal esaslı atıkların (kül ve curuf dahil) miktarı ise yaklaşık 5.6. milyon ton olarak belirtilmiştir. Ulusal Çevre Eylem Planında ise yıllık üretilen tehlikeli atık miktarının 300.000 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Tehlikeli atıkların yıllara bağlı olarak artışı, bu atıkların bertaraf işlemleri için etkin ve akılcı yönetimini gerektirmektedir (Özkaya, 2004).

Yine 1996'da Avrupa Birliği, hava, su ve topraktaki kirlilik korunması ve kontrolü ile ilgili genel durumları içeren 96/61/EC Konsey Yönergesini

oluşturmuştur. Bu yönergenin uygulanması için kirli alanların özellikle bu amaçla kullanılan endüstriyel, askeri aktiviteler ve atık yığma bölgelerinin belirlenmesi ve konumlandırılmasında Avrupa Birliği üyelerinin ortak çalışmasına gereksinim duyulmaktadır. 2000 yılında, Avrupa Çevre Ajansı (European Environmental Agency - EEA) Avrupa Birliği sınırları içerisinde yaklaşık olarak 300.000 kirlenmiş alan, 1.500.000 potansiyel kirli alan olduğunu tahmin etmiştir (Gallego Blanco, 2012).

2.3. PAH'ların Biyoparçalanması ve Biyoiyileştirilmesi

Kirletici bileşiklerin giderilmesi için birçok abiyotik (örneğin, kimyasal oksidasyon, buharlaşma, yakma, fotokatalitik oksidasyon ve immobilize enzimler gibi) ve biyotik (mikroorganizmaların kullanımı) parçalama yöntemleri kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemlerle kıyaslandığında, abiyotik yöntemlerin maliyetli ve tam olarak giderimde yetersiz oldukları görülmektedir. Abiyotik parçalanma esnasında üretilen ara ürünler sıklıkla esas bileşiklerden daha toksik ve rekalsitrant olarak ortaya çıkmaktadır Ancak diğer yandan biyotik uygulamalar kendi kendini idame ettirebilir ve söz konusu olan bu bileşikleri toksik olmayan ürünlere dönüştürme yeteneğindeki mikroorganizmaların kullanımına bağlı olan ucuz bir temizleme teknolojisi (biyoparçalanma) gibi görünmektedir (Singh et al., 2015).

Kirleticilerle kirlenmiş geniş alanların temizlenmesi için yakma ve alan depolaması gibi çeşitli geleneksel yöntemlerin uygulanması da söz konusudur. Ancak bu yöntemlerin uygulanması sırasında muazzam bir gider söz konusudur. Özellikle PAH'larla kirlenmiş alanların önümüzdeki otuz yıl içinde bu şekilde giderimi için milyarlarca dolar harcanması gerektiği bilinmektedir. Sadece ABD'de tüm kirlenmiş alanların restorasyonu için yaklaşık 1,7 trilyon dolar harcanacağı öngörülmektedir (Sharma and Pathak, 2014). Aynı zamanda geleneksel yöntemler çoğu zaman yeterli olamamaktadır. Örneğin yakma ile hava kirliliği, kazma işlemi ile yine toksik hava salınımına neden olmaktadır. Bu gibi sebeplerden dolayı kirli alanların temizlenmesi için daha düşük maliyetli, yoğun emek gerektirmeyen, güvenli ve çevre dostu bir teknolojinin kullanılması gerekliliği vardır (Vidali, 2001).

Yukarıda sözü edilen geleneksel fiziksel ve kimyasal bertarafının maddi açıdan oldukça külfetli olması ve fiziki koşulların her zaman elverişli olmamasından dolayı bilim insanlarının çevresel kirleticileri etkisiz hale getirmek ve kirlilikle başa çıkmak adına geliştirdikleri bir takım biyolojik yöntemler mevcuttur ve etkili şekilde kullanılmaktadır. Çevresel sistemlerdeki kirleticilerin biyolojik yollarla gideriminde kullanılan yöntemlerin başında biyoremediyasyon (biyoiyileştirme) gelmektedir.

Biyoremediyasyon (biyoiyileştirme); kirlenmiş toprak ve sularda bulunan kirleticilerin konsantrasyonunu ve/veya toksisitesinin bakteri, fungus ya da yeşil alg gibi mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinin veya diğer biyolojik sistemlerin kullanılarak azaltılması, etkisizleştirilmesi ve giderilmesi işlemlerinin tümüne verilen genel bir isimdir. Örneğin petrol biyoiyileştirilmesinde genellikle bakteriler ve funguslar kirleticileri parçalayarak daha az tehlikeli maddeler haline dönüştürebilmektedirler. Aynı zamanda, bitkiler de biyoiyileştirmede etkin olarak kullanılabilmektedirler. Genellikle kirlenmiş toprağı havalandırma ve mikrobiyal aktiviteyi düzenlemede iş görebilmektedirler. Ayrıca kullanılan bitkiler tuz ve ağır metal gibi kirleticileri dokularında absorbe edebilirler, bu sayede kirleticiler topraktan uzaklaştırılabilmektedir. Yeşil bitkilerin kullanıldığı biyoiyileştirme **fitoremediyasyon (fitoiyileştirme)** olarak adlandırılır. Fitoiyileştirmenin bir başka çeşidi ise kirleticileri detoksifiye etmede bitki - bakteri arası iletişimlerin etkin olduğu **rizoremediyasyon (rizoiyileştirme)** işlemidir. Ayrıca kimyasal bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynayan bakterilerin çoğaltılması yoluyla yapılan iyileştirme işlemi **biyoaugmentasyon (biyoçoğaltım)** olarak adlandırılmakta ve petrol türevi bileşikler ile kirlenmiş olan sucul çevrelerden uzaklaştırılmasında etkin olarak kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biyoiyileştirme genellikle çevredeki kimyasalların mikroorganizmalar ve onların spesifik enzimleri yoluyla transforme edilmesi veya parçalanmasında kullanılır. Tehlikeli kirleticilerin yok edilmesi veya dönüştürülmesi için bu mikroorganizmaların (esas olarak bakteriler) kullanılması yeni bir fikir değildir. Mikroorganizmalar MÖ 600. yy'dan bu yana Romalılar ve diğer medeniyetler tarafından atıksuların arıtılması için kullanılmıştır (Khoei et al., 2013). Bugün halen atıksuların arıtımında aynı teknolojinin kullanılmasına rağmen, diğer toksik

kirleticilerin giderilmesi konusunda da araştırma odağı olmaktadır. Aslında, biyoiyileştirme işlemi ticari olarak yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadır. Ayrıca, biyoiyileştirme kirli toprak matriksini yer değiştirmeden ya da dağıtmadan yerinde giderim (in situ) için rahatlıkla uygulanabilir.

Biyoiyileştirme sisteminin ilk ticari kullanımı, Pennsylvania eyaletinin Ambler şehrinde 1972 yılında oluşan Sun Oil boru hattında oluşan sızıntının temizlenmesi için kullanılmıştır (Suja et al., 2014). Son yirmi yılda ise mikroorganizmaların topraktaki faaliyetlerinin detaylandırılması ile uygulanması giderek artan bir teknoloji halini almıştır. Özellikle Exon Valdez petrol dağılması ile PAH'larla kirlenmiş alanların temizlenmesi buna güzel bir örnektir. Birçok durumda bu teknolojinin diğer bazı arıtım teknikleriyle kombine kullanılması daha etkilidir çünkü tek başına iyileştirme (remediyasyon) yıllarca hatta on yıllarca yıl gibi uzun zaman alabilmekte ve giderimin verimliliği saptanamayabilmektedir. Hali hazırda genellikle kabul edilebilen bir teknik olmasına karşın, giderim etkinliği ve tahmin edilebilirliği gösterilmelidir. Sonuçta güvenilir bir izleme ve değerlendirme stratejisi gereklidir. İki tip biyoiyileştirme yöntemi vardır; doğal atenüasyon (ortam kirlendiğinde mevcut mikroorganizmaların giderimde iş görmesi) ve biyoçoğaltım (biyoaugmentasyon).

PAH'larla kontamine olmuş çevreleri iyileştirmek için biyolojik sistemlerin kullanımı büyük bir ilgi odağıdır. Biyolojik ıslah prosedürleri bazı tehlikeli organik kirleticiler için geliştirilmiştir ve hem kirletici giderim verimi hem de ekonomik fizibilite açısından alan şartları altında başarılı olduğu görülmüştür. Termal ve diğer fizikokimyasal tekniklerin giderleri biyolojik giderimden daha pahalıdır ve çoğu zaman uygun bir yaşam sistemi olarak çevre tahrip edilir (Wilson and Jones, 1993).

Kirli sucul ve toprak çevrelerin biyoiyileştirilmesi daha geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında etkili bir teknoloji olarak yükselmektedir. Hidrokarbonlar ve onların yan ürünlerini içeren atık maddelerin biyoiyileştirilmesi ile mikroorganizmaların bu toksik bileşikleri kullanarak onları CO_2 ve H_2O gibi toksik olmayan ürünlere dönüştürmesini ve sonucunda da kendileri için biyokütle artışını sağlamaktadırlar (Gargouri, 2015). Biyoparçalama ve biyoiyileştirme uygulamaları yeterli çevresel şartlar sağlandığı kadarıyla, sık rastlanan kirleticileri

parçalama potansiyeli olan mikroorganizmalar kullanılarak kirleticilerin uzaklaştırılması veya etkilerinin en aza indirilmesi amacıyla kullanılan alternatif bir yöntemdir (Gargouri, 2015; Gallego Blanco, 2012). Böyle kirli çevrelerde, organik kirleticiler organik bileşiklerle olduğu kadar sıklıkla sentetik bileşiklerle birlikte de karışım halinde bulunmaktadır. Çeşitli biyoiyileştirme stratejileri hali hazırda mevcuttur, fakat biyokimyasal olarak adapte olma potansiyelleri ile birlikte yerli mikroorganizmaların kullanımı en güçlü yöntemlerden birisi olarak kanıtlanmıştır (Gargouri, 2015).

Kirli alanlarda doğal habitat üyeleri olan bakterilerin hidrokarbon biyoiyileştirilmesi için potansiyel ajanlar olarak görülmesine rağmen, mevcut çoğu bilimsel yayında hidrokarbonları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak büyüyebilen bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine odaklanılmaktadır. Petrol ile ilgili kirleticilerin mikrobiyal biyoparçalanmasına yönelik çalışmaların %80'inden fazlası bakteriyel biyoparçalanma üzerine yapılmıştır. Bu nedenle bakteriler çok çalışılmış mikroorganizmalardır ve birçok araştırmacı sudaki hidrokarbon mineralizasyon esnasında bakterileri kullanmaktadır (Gargouri, 2015). Ama sadece hidrokarbon parçalama yeteneğindeki bakteriler değil, aynı zamanda hidrokarbon ile kirlenmiş alanlardan izole edilen ve petrol ile ilişkili bileşikleri kullanma yeteneğindeki küf ve mayalarla ilgili çalışmalar da mevcuttur (Okerentugba and Ezeronye, 2003; Spencer et al., 2002).

Birçok bakteriyel, fungal ve algal suşlar ikiden beşe kadar geniş çeşitlilikte aromatik halka içeren PAH'ları parçaladıkları gösterilmiştir. Ancak, PAH'lar ile kirlenmiş olan çevrelerin biyoiyileştirilmesi her zaman arzu edilen sonuçları vermemektedir. PAH'lar genellikle parçalanmanın çok zor gözlendiği noktadan sonra belirli bir kalıntı konsantrasyonuna erişinceye kadar hızlı bir şekilde parçalanırlar. Bu olgu, hokey sopası şekilli kinetik olarak adlandırılır. Sınırlı besin konsantrasyonu, PAH'ların organik bir madde içinde bulunması sonucunda daha düşük uygunlukta olması, biyoparçalanma için erişilebilir olmayan mikroporlar içindeki bileşiğin difüzyonu, ve yeterli PAH parçalayan bakterinin bulunmayışı bu kinetiğin sebepleri olabilir (Gallego Blanco, 2012).

2.3.1. Biyoiyileştirmenin kritik önemi ve avantajları

Hidrokarbonla kirlenmiş alanların temizlenmesine yönelik çevresel yöntemlere karşı artan bir ilgi söz konusudur. Biyolojik uygulamalar çoğunlukla az maliyetlidir ve çevreye ilave bir kimyasal girdisi sağlamamaktadır. Fizikokimyasal yöntemlerle kıyaslandığında, petrol kirliliğinde biyoiyileştirme oldukça uygun ve uygulanabilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu teknik hidrokarbon kirlenmesinin temizlenmesinde etkili bir teknoloji olarak görülmektedir. Bunun bir sebebi ise ham petrol ve rafine petrol ürünlerinin içeriğinde bulunan moleküllerin çoğunluğunun biyoparçalanabilir olmasıdır. Belirli seçilmiş mikroorganizmalar kullanılarak yapılan hidrokarbon parçalanması, çevre dostu ve az maliyetli bir işlem olmasından dolayı güzel bir fırsat sunmaktadır. Bu tarz mikrobiyal türler veya belirli suşlar hidrokarbonları tüketebilir, kendi hücre büyümeleri ve üremeleri için gerekli olan besin ve enerjiyi bu karbonlu bileşiklerden sağlayabilirler. Eş zamanlı olarak, bu hidrokarbonların aerobik şartlar altındaki oksidasyonları esnasında mikrobiyal biyokütle artışı gerçekleşirken, toksik ve karmaşık organik moleküllerden CO_2 ve H_2O gibi toksik olmayan ve basit inorganik moleküllere hidrolizlenme gerçekleşir (Gargouri, 2015).

Literatürde birçok bileşiği parçalama yeteneğindeki mikroorganizmaların potansiyel gücü, özellikle petrol sızıntısının çevresel etkilerinin azaltılması yönünde alternatif bir yol olarak kullanılmakta ve daha çok umut vadeden biyolojik giderim olarak gösterilmektedir. Petrol hidrokarbonlarını tüketen ana mikroorganizma gruplarının bakteriler, mayalar ve funguslardan oluştuğu bilinmektedir (Gargouri et al., 2012; van Hamme et al., 2003; Mishra et al., 2001, Sharma and Reddy, 2004). Mikroorganizmalar ile organik kirleticilerin parçalanması işlemine biyoparçalanma denilmektedir. Bu işlem aerobik ya da anaerobik şartlar olarak bilinen oksijenli ya da oksijensiz ortamlarda gerçekleşebilmektedir.

Organik kirletici + O_2^- → H_2O + CO_2 + hücre materyali + enerji (Gargouri, 2015) (2.2)

Yaklaşık 80 yıldır mikroorganizmaların petrol hidrokarbonlarını parçalama yeteneğinde oldukları ve onları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları bilinmektedir. İlk çalışma 1976 yılında Davis tarafından özetlenmiştir. Kirli alanların ıslahı hem fizikokimyasal hem de biyolojik yöntemleri içeren birçok yolla yapılabilmektedir. Büyük oranda yöntem toprakta ve atıksuda petrol ürünlerinin parçalanma oranlarını attırmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemler fiziksel ve kimyasal ıslah yöntemlerinden çok daha uzun sürmektedir. Diğer biyolojik yöntemlerle kıyaslandığı zaman, mikroorganizmalar yoluyla yapılan biyoiyileştirmenin daha etkili olduğu görülmektedir. Ancak, yüksek moleküler ağırlıklı hidrokarbonların düşük çözünürlüğü ve adsorbsiyonu, mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Millioli et al. 2009). Bazı mikroorganizma tipleri petrol hidrokarbonlarını parçalama ve onları bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğindedirler. Parçalama işleminin spesifitesi belirli mikroorganizmaların genetik potansiyelleri ile ilişkilidir. Bu genetik özellikle hidrokarbon molekülü içerisine moleküler oksijeni bağlar ve sonrasında hücrenin enerji elde etmek için kullandığı genel metabolik yol izlerine giren ara moleküller üretirler (Gargouri, 2015). Mayalar genellikle yağlı atıklar, süt ve kümes ürünlerinden yapılan gıdalar ve hidrokarbon ile kirli alanlar gibi hidrofobik substratların bulunduğu çevrelerde bu durumla karşılaşırlar. Birçok çoklu gen ailelerinin varlığından kaynaklanan bu özellik sayesinde trigliseridlerin ve hidrokarbonların etkili parçalanmasını sağlarlar (Fukuda, 2013).

2.3.2. Biyoiyileştirmede PAH'ların parçalanmasını arttırıcı stratejiler

Sonraki bölümlerde PAH biyoiyileştirme stratejilerinde gözlenen önemli parametrelerden iki faz kinetiği, besinlerin sınırlı konsantrasyonu, PAH'ların daha az faydalanabilir olması gibi çok sayıda faktörlere bağlı olduğundan bahsedilecektir. Ancak burada biyoiyileştirilme başlığı altında tanımlanan, mikrobiyal parçalamanın arttırılmasına ve kirleticilerin ortamdaki kalıntılarını azaltmaya yönelik olarak geliştirilen bazı stratejiler bahsedilecektir. Bu stratejilerden birkaçı; biyostimülasyon (biyouyarım) ve rizoremediyasyon olarak adlandırılabilir (Gallego Blanco, 2012).

2.3.2.1. Biyostimülasyon

Biyoiyileştirmedeki başarı bazı besinlerin uygunluğu ve konsantrasyonuna bağlıdır. Genel olarak, ortama ilave besin eklenmesi biyoiyileştirme açısından fayda sağlamaktadır. Ancak, suda çözünen tuzlar gibi bazı esansiyel elementlerin eklenmesi birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlara örnek olarak su ya da toprağa verilen N ve P'un suda çözünen tuzlarının yıkayarak ayrıştırma ve çalkalamaya bağlı olarak ortamda hızlı seyrelmesi ile kirletici parçalamayan bakteriyel popülasyon tarafından kolayca kullanılmasına olanak sağlar. İlaveten, mobil azot konsantrasyonunun arttırılması potansiyel çevre sorunlarını arttırıcı etki gösterebilmektedir. Bu nedenle, oleofilik organik gübreler geliştirilmiştir (Atlas and Bartha, 1973; Xu and Obbard, 2003; Nikolopoulou et al., 2007) ki bu gübreler eklendikten sonra ortamda bulunan hidrofobik kirleticiler (NAPL'ler) ile birlikte kalmakta ve bölgesel olarak hidrokarbon parçalayan bakterileri teşviklemektedir. Bu oleofilik gübrelerin iki özelliği bulunmaktadır: gözle görülür şekilde PAH akışkanlığını ve yüzeyler arası gerilimi azaltmak ve yağ-su arayüzünde besinlerin de desteğiyle PAH biyoparçalanmasını teşvik etmek (Swannell et al., 1996). Örnek olarak Inipol EAP ® 22 verilebilir ki bu ürün Alaska'da gerçekleşen Exxon-Valdez petrol kazasında başarılı şekilde kullanılmıştır (Pritchard and Costa, 1991). Bu ürünün bileşiminde oleik asit (% 26,2), lauril fosfat (% 23,7), 2 – bütoksi – 1 – etanol (% 10,8), üre (% 15,7), ve su (% 23,6) bulunmaktadır (Xu and Obbard, 2004). Üre azot kaynağı olarak bulunurken, lauril fosfat ise fosfor kaynağı olarak iş görmektedir. 2 – bütoksi – 1 – etanol ise sürfaktan olarak, oleik asit ise materyale hidrofobisite kazandırır. Günümüzde, içeriğinde bulunan 2 – bütoksi – 1 – etanolün toksisitesinden dolayı ürünün yeniden formülasyonu yapılmıştır ve S200 isimli yeni ürün olarak kullanılmaktadır. Bu yeni ürün Prestige petrol sızıntısında olduğu gibi biyoparçalama işlemlerinde birçok başarılı saha uygulamalarına sahiptir (Diez et al., 2005; Gallego et al., 2006; Jimenez et al., 2006).

Biyoparçalama işlemlerini teşvik etmede olası bir diğer yöntem ise sürfaktan kullanımıdır. Sürfaktan kullanarak kirleticilerin biyouygunluğu arttırılmaktadır. Sürfaktanlar organik moleküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar ki bunlar genellikle ampifilik özelliktedir yani moleküller yapılarında bir hidrofobik kısım bir de hidrofilik kısım içermektedirler. Hidrofilik kısmı molekülün su içerisinde çözünmesini sağlarken hidrofobik kısım ise hidrofobik karakterdeki kirletici ile su

arasında arayüzey oluşturma görevini üstlenme eğilimindedir. Hava-su ara yüzeyinde bir sürfaktan varlığı yüzey geriliminin azalması ile sonuçlanan bir ortama sebep olur. Diğer taraftan, sulu olmayan faz sıvısında (NAPL) sürfaktanların bulunması yüzeyler arası gerilimin azaltılmasını sağlamaktadır (Volkering et al., 1998). Hidrofilik kısımlarının doğasına bağlı olarak sürfaktanlar iyonik, katyonik, zwitteriyonik ve non-iyonik olarak görünebilirler. Parafinler, oleofinler, alkilbenzenler, alkilfenoller, alkoller gibi sentetik sürfaktanlar ile glikolipidler, fosfolipidleri yağ asitleri, lipopeptidler/lipoproteinler ve biyopolimerik sürfaktanlar gibi biyosürfaktanlar mevcuttur (Gallego Blanco, 2012).

Sürfaktanlar geniş çapta üretilmekte ve biyoiyileştirmede çözgenlerin temizlenmesi, hareketlerinin ve çözünürlüklerinin güçlendirilmesi gibi çok çeşitli uygulama alanlarında görev almaktadırlar. Aynı zamanda, biyoparçalamada güçlendirici olarak da kullanılmaktadırlar. Sürfaktanın çevresel sisteme verilmesi ilk etapta her zaman için bir kirlilik parametresidir ve sürfaktanın toksisitesi, potansiyel parçalanma ürünleri sürfaktan seçiminde en önemli kriterlerdir. Sürfaktanların bakteriler üzerindeki toksik etkileri hücre duvarlarındaki lipidli bileşenlerle etkileşime girerek ve hücresel fonksiyonlarda önemli olan esansiyel proteinlerle reaksiyon vererek hücresel tahribat yaratmasıdır. Non-iyonik sürfaktanlar genellikle bakterilere karşı daha düşük aktiviteye sahiptir. Biyolojik kökenli sürfaktanlar yani biyosürfaktanlar, mikroorganizmalar tarafından doğal olarak oluşturulur ve biyoiyileştirmede kullanımları sentetik olanlarla karşılaştırıldığı zaman daha kabul edilebilirdir. Yine de, bazı biyosürfaktanlar sentetik sürfaktanlar kadar toksik olabilmektedirler (Gallego Blanco, 2012).

2.3.2.2. Rizoremediyasyon (Rizoiyileştirme)

Rizoremediyasyon ise biyoiyileştirme stratejilerinden fitoremediyasyon içinde önemli bir yere sahip olan ve uygulama alanı geniş olan bir yöntemdir. Rizoremediyasyondan bahsetmeden önce fitoremediyasyon teriminden bahsetmek yerinde olacaktır.

Fitoremediyasyon, kirleticilerin bitkiler kullanılarak alandan çıkarılması, alıkonulması ya da detoksifiye edilmesi yöntemidir. Bu yöntem ile kirlenmiş

toprakların temizlenmesi çevre ile uyumlu olduğu için ilgi çekicidir ve aynı zamanda toprağın devamlılığı da sağlanmış olmaktadır.

Rizoremediyasyon, bitki kökleri ile yakınındaki uygun mikrobiyal flora arasındaki mutualistik etkileşimler vasıtasıyla kirli alanların atık ürünleri içindeki spesifik kirleticilerin giderilmesi şeklinde tanımlanabilecek bir biyoiyileştirme koludur (Shukla et al., 2011). Toprağın tümü köke yakın kısım ile kıyaslandığında, köke yakın kısımda bulunan bakteri konsantrasyonlarının daha yoğun, metabolik aktivitenin daha fazla olduğu ve metabolik açıdan aktif olan bakteri sayısında bir artış olduğu görülmektedir (Kuiper et al., 2004). Rizosferde organik asit, şeker, peptid, enzim, vitamin, nükleotid, fungal düzenleyiciler, inhibitörler, cezbediciler ve çeşitli bileşikler bulunmaktadır. Eksudalarda ise organik asitler, şekerler, aminoasitler lipidler, kumarinler, flavonoidler, proteinler, enzimler, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar gibi çok çeşitli bileşiğin rizosferde yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir. Bu sayede, kökler yalnızca bakterilere besin sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kofaktörleri de sağlarlar. Ayrıca kökler, aktif oksijen değişimlerinin olduğu yerlerdir ve bakterilere geniş kolonize olmaları için yüzey alanı sağlarlar. Bu sayede kök yüzeyi boyunca bakteriler toprak altında metrelerce hareket edebilirler. Bakıldığında rizoiyileştirme diğer tekniklerle kıyaslandığında; optimize edilmiş tarımsal tekniklerin avantaj sağlamasıyla kirliliği yönetmede alternatif ve daha ucuzdur. Bitkinin büyümesi için gün ışığı sağlanır ve sırasıyla bakterilerin büyümesini sağlayacak bileşikler verilir.

Genomik, proteomik, transkriptomik ve interaktomik gibi omik'lerin tümüne yeni geliştirilen biyoinformatik araçlarla erişebilirlik son birkaç yılda farklı organizmalar arasında ve onların çevreleriyle olan etkileşimlerinin çalışılmasında önemli katkılar sağlamıştır. Böylelikle, bu etkileşimlerin moleküler tabanda daha iyi anlaşılması sağlanmıştır.

Rizoremediyasyon stratejisinin başarılı olması için, en azından şu ihtiyaçların sağlanması gerekmektedir; Parçalayıcı bakteriler rizosfere verimli bir şekilde kolonize olabilmek zorundadır. Bu bakteriyel populasyon uzun zaman periyodları boyunca devamlı bulunmak zorundadır. Bu, bakterilerin rizosferde mevcut olan

mikroorganizmalar ile yarışmak zorunda olması anlamını taşımaktadır. Ayrıca, uygun parçalama genleri ise uygun seviyelerde ifade edilmek zorundadır.

2.3.2.3. Biyoaugmentasyon (Biyoçoğaltım)

Biyoaugmentasyon (biyoçoğaltım) ya da biyokütle arttıtırılması işlemi istenilen bakterilerin ve enzimlerinin yoğunluğunun arttırılması amacıyla, spesifik operasyonel bir amaçta başarı sağlayan bakteriyel kültürlerin ticari olarak hazırlanması ve atık su arıtım sistemine eklenmesidir. Örneğin, atık su arıtım sistemlerinde bu işlem genellikle çamur üretimini azaltmak ve kötü koku oluşumunu kontrol altına almak için kullanılmaktadır. Bakteriyel kültürlerin sisteme eklenmesiyle arzu edilen bakterilerin yoğunlukları, aktif çamur işleminde ya da anaerobik giderimdeki katı atıklarda ve atıkların sistemde kalma sürelerinde ciddi bir artışa sebep olmadan arttırılmış olur. Biyoçoğaltım ürünlerinin yeterli miktarlarda eklenmesi askıda uçucu katı madde (MLVSS) konsantrasyonu ve ortalama hücre kalma süresini (MCRT) düşürmede etkili olabilir (Gerardi, 2006).

Biyoçoğaltım teknolojisi yaklaşık 40 yıldır bilinen ve kullanılan bir teknolojidir. Bu teknolojide geleneksel atık arıtımında ya da biyoiyileştirme alanlarıyla ilişkili bazı işlemlerin geliştirilmesi için çevresel olarak izole edilerek seçilen mikrobiyal suşlar kullanılmaktadır. Ticari biyoçoğaltım ürünleri istenilen parçalama özelliklerini ve istenilen karakteristiklerini (örneğin düşük nutrient şartlarında büyüme, yüksek toksikant konsantrasyonuna dayanıklılık ve kirli çevrelerde hayatta kalabilme gibi) taşıyan tek mikroorganizma ya da bir mikroorganizma konsorsiyumundan oluşmaktadır. Endüstriyel atık su arıtım tesisleri hali hazırda biyoçoğaltım ürünlerini kullanan en önemli kuruluşlardır. Biyoreaktör içindeki biyoparçalanmayı sürdürmek veya biyoparçalanma potansiyelini güçlendirmek adına biyoreaktöre genellikle seçilmiş olan mikroorganizmalar eklenmektedir. Maalesef, ticari gizliliklerden dolayı karışımların formülasyonları ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır (Forsythet al., 1995; Grubbs, 1984; Rittmann et al., 1990; Bitton'dan, 2005). Biyoçoğaltım işlemi sisteme ani toksik bileşiklerin girmesine karşı geleneksel bir aktif çamurun direnç arttırılması açısından yardımcı olabilir (Quan et al., 2003; Bitton'dan, 2005). Biyoçoğaltım uygulamaları aşağıdaki işlemlerde yapılmaktadır:

- Arttırılmış BOİ giderimi; Mikroorganizma suşları atık su arıtım tesislerinde BOİ gideriminin arttırılması için kulanılabilir. Örneğin, yapılan bir çalışmada anoksijenik fototrofik bakteriler atıksu arıtımında BOİ/KOİ düşürme kapasitelerinden dolayı kullanılmıştır (Sasikala and Ramana, 1995; Bitton'dan, 2005).

- Çamur hacminin düşürülmesi; Büyük miktarlarda biyosolid üretimi aerobik atık arıtımı ile ilişkili ciddi bir problemdir. Bu nedenle biyosolid hacminin azaltılması çok istenilen bir durumdur. Azalma seçilmiş mikroorganizmaların karışım kültürünün eklenmesinden sonra organik madde gideriminin artışıyla olmaktadır. Oluşturulan çamur hacminin yaklaşık olarak %30 oranında azaltıldığı bildirilmektedir (Bitton, 2005).

- Biyosolidlerin gideriminde karışık kültürlerin kullanımı; aerobik gidericilerde, karışık kültür kullanımı önemli ölçüde enerji tasarrufu sağlamaktadır. Anaerobik gidericilerde, biyoçoğaltım işlemi metan üretiminde artış ile sonuçlanmaktadır (Bitton, 2005).

- Hidrokarbon atıklarının biyoarıtımı; Hidrokarbon atıklarının arıtımı için geleneksel olarak ticari bakteriyel formülasyonlar kullanılmaktadır. Örneğin, mutant bakteri kültürlerinin eklenmesi ile petrokimya atık su arıtım tesisi çıkış suyu kalitesinde artış olmaktadır (Christiansen and Spraker, 1983; Bitton'dan, 2005).

Tehlikeli atıkların biyoarıtımı; Fenol, etilen glikol, formaldehid gibi tehlikeli bileşiklerin giderimi için mikroorganizma eklenmesi umut vaad edici bir gelecek sunmaktadır. Yapılan bir çalışmada paraklorofenol parçalayan bakterilerle yapılan biyoçoğaltım işleminde kontrol grubuyla kıyaslandığında 9 saat içinde %96'lık bir giderimle başarı sağlanmıştır. Kontrol grubunda ise aynı koşullarda giderim 58 saat sonunda %57'de kalmıştır (Kennedy et al., 1990). *Candida tropicalis* hücreleri atık sudaki yüksek oranda fenol gideriminde kullanılmıştır (Kumaran and Shivaraman, 1988; Bitton'dan, 2005). *Delsulfomonile tiedjei* metanojenik anaerobic granular-sludge blanket (UASB) sistemine eklendiğinde deklorinat 3-klorobenzoat'ın giderimini arttırdığı belirtilmiştir (Ahring et al., 1992). Anoksijenik fototrofik

bakteriler atıklardaki toksik bileşiklerin parçalanması açısından değerlendirilmektedir (Sasikala and Ramana, 1995; Bitton'dan, 2005). Atık su arıtımında biyoçoğaltma işleminin 2,4-diklorofenol, fenolik bileşikler ve kloranilin'in biyoparçalanmasını arttırdığı gösterilmiştir (Quan et al., 2004; Hajji et al., 2000; Selvaratnam et al., 1997; Bitton'dan, 2005; Boon et al., 2000)

Biyoçoğaltımın ana sorunlarından bazıları, biyoparçalamaya başlamadan önce bir aklimasyon periyoduna ihtiyacın olması, kısa süreli canlı kalma ya da mikrobiyal inokulumun eklenen biyoreaktörde zayıf büyümesi olarak verilebilir. Bu ticari ürünlerin bazılarının değerlendirilmesi bazen negatiftir ya da sonuçsuz kalmaktadır. Dahası, hücresiz ekstraktların eklenmesi biyolojik atık arıtımının performansında ciddi bir artış sağlamamaktadır (Jones and Schroeder, 1989).

Babcock et al. (1992) ve Ro et al. (1997) atık su arıtım tesislerindeki tehlikeli atıkların parçalanması için bazı yeni biyoçoğaltım şemalarının araştırılmakta olduğunu belirtmişlerdir. Buna göre; örneğin, bir aktif çamur sistemi ya da akışkan yataklı reaktöre eklemek için ayrı aklime edilen kültürün devamlılığı ile ilişkili olan zenginleştirici reaktör işlemi biyoparçalamayı ve ksenobiyotiklerin giderimini arttırmamaktadır. Babcock and Stenstrom'a (1993) göre, zenginleştirme kültürleri hedef bileşiğe benzemektedir, ancak az tehlikesi olan indükleyici bir bileşiğin az bir miktar eklenmesiyle en uygun büyüme şartları altında zenginleştirici reaktörde üretilebilir (Bitton, 2005).

Yine Ro et. al.'nun 1997 yılında yaptığı çalışmada, zenginleştirici reaktörden alınan biyokütlenin bir akışkan sabitlenmiş film reaktörüne aralıklarla eklenmesiyle 1-naftilamin gideriminin %90'dan fazla olmasına neden olduğu belirtilmiştir. Bu biyoçoğaltım işlemi az dayanıklılık gösteren atık suların arıtılması için uygun bir yöntemdir (Bitton, 2005).

2.4. PAH Biyoparçalanmasını Etkileyen Faktörler

Biyoiyileştirme deneyimlerinin sonucunu etkileyebilecek birçok faktör bulunmaktadır. En önemli faktörler: toksisite, pH, sıcaklık ve nem gibi (toprak değerlendirme durumunda) çevresel şartlar, kirleticileri parçalama yeteneğinde

olan uygun mikroorganizmaların bulunması, kirleticinin moleküler yapısı, konsantrasyonu ve biyouygunluğu olarak sıralanabilir (Gallego Blanco, 2012).

2.4.1. Çevresel şartlar

PAH biyoparçalanmasını etkileyebilecek önemli çevresel şartlar; toksik kirleticilerin varlığı, oksijen içeriği, pH, sıcaklık, nem ve besin içeriğidir. Tüm bu şartlar aşağıda sırası ile açıklanmıştır.

2.4.1.1. Toksik kirleticilerin varlığı

Bazı durumlarda hidrokarbon kontaminasyonunun şiddeti ortamda var olan diğer önemli kirleticilerin yüksek miktarları ile yakından ilişkili olabilir. Ağır metaller gibi toksik kirleticilerin ortamdaki yüksek konsantrasyonu, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini yavaşlatabilir ve biyokütlenin artışını önleyebilir. Bu tarz ikincil kimyasalların hücrelere olan toksisite mekanizmasının derecesi konsantrasyona, metallerin tipine ve karşı karşıya kalan mikroorganizmalara bağlıdır. Dahası, doğal olmayan mikroorganizma türlerinin kullanılmasıyla yapılan biyoiyileştirme (biyoçoğaltım) işlemlerinde, mikroorganizmalar kirli su ve toprak gibi tamamen adapte olmadıkları ortamda bulunan doğal inhibitörler tarafından etkilenebilir (National Research Council, 1993; Alexander, 1999; Scragg, 2005; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.4.1.2. Oksijen

Oksijenli ortamda PAH parçalanması son bir elektron alıcısına ihtiyacı olan heterotrofik mikroorganizmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Genellikle hidrokarbonların aerobik parçalanması (ki oksijen son elektron alıcısıdır) anaerobik işlemlere kıyasla büyük oranda daha hızlı gerçekleşir. Bunun anlamı; eğer hızlı bir parçalanma gerçekleşmesi isteniyorsa aerobik şartların sürdürülmesi için oksijen kaynağına ihtiyaç vardır. Pratik kullanımdaki hemen tüm biyoiyileştirmeler aerobiktir. Ancak, PAH'ların biyoparçalanması için anaerobik şartlar sağlanarak yapılan hayli fazla çalışmada, oksijen yerine çoğunlukla nitrat, sülfat, ya da ferröz demirin alternatif elektron kaynağı olarak kullanıldığı ve PAH'ların bu sayede parçalanabildiği gösterilmektedir. Ek olarak, biyokütlenin aşırı üretimi neticesinde tıkanma problemi ve yetersiz oksijen kaynağı gibi aerobik işlemlerde karşılaşılan

problemler elektron alıcısı olarak nitrat, Fe (III), sülfat ve karbondioksitin kullanıldığı anaerobik işlemler ile çözülebilir (Lovley et al., 1989; Holliger and Zehnder, 1996; Heider and Fuchs, 1997; Mcnally et al., 1998; Widdel and Rabus, 2001; Jones et al., 2008a; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.4.1.3. Sıcaklık, pH ve tuzluluk

Sıcaklık mikrobiyal büyümeyi direkt olarak etkilemektedir. Biyoiyileştirme işleminin gerçekleşeceği koşullar açısından en önemli faktörlerden birisi, kullanılacak olan mikroorganizmanın sıcaklık gereksiniminin tam olarak karşılanmasıdır. Çünkü düşük sıcaklık seviyelerinde mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen parçalama işlemi de yavaşlamaktadır. Bu nedenden dolayı, zenginleştirilen kültürler çoğunlukla 25-37°C arasında inkübe edilmektedir. Bu kesin bir inkübasyon sıcaklığı aralığı değildir. Çünkü birçok tür de düşük sıcaklıklarda çoğalmaktadır. Menn et al.'a (2000) göre, biyosağaltım çalışmalarında yapılan mikroorganizma çoğaltımı, organizmanın izole edildiği doğal ortamının ya da işlemlerin yapılacağı alanın sıcaklığına göre ayarlanarak yapılmalıdır. Biyoiyileştirme çalışmalarının çoğu mezofilik şartlar altında (20 – 30 °C) yapılmaktadır. Bunun yanında, Whyte et al.'un (1999) belirttiği arktik bölge ya da Sorkoh et al.'un (1993) belirttiği çöl şartları gibi ekstrem sıcaklıklarda başarılı şekilde gerçekleştirilmiş birçok çalışma mevcuttur (Gallego Blanco, 2012).

Topraklar genellikle asidik pH'ya sahipken, okyanuslar ve birçok iç alan suları bazik pH'lara sahiptir. Genelde, biyoparçalama işlemleri için en uygun pH değerleri nötral şartlardır (pH 7,4 - 7,8) . Verstraete ve ark. 1976 yılında kirlenmiş toprak ile yaptıkları bir çalışmada pH'ı 4,5'ten 7,4'e çıkarmanın daha iyi biyoparçalama sonuçları verdiğini göstermişlerdir. Bunun yanında, asidik pH'ya adapte olmuş olan mikrobiyal popülasyonlar ile yapılan çalışmalar da mevcuttur (Stapleton, 1998; Gallego Blanco'dan, 2012).

Okyanuslar ve nehir deltaları yüksek oranda tuzluluğa sahiplerdir (nadiren bazı sular ve topraklar da bu şekildedir). Nehir deltaları, tatlı suyun deniz suyu ile karıştığı çevreler olmakla birlikte; fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan zorlayıcı faktörleri barındırmasından ötürü dinamik çevrelerdir. Bu alanlardaki kaynak heterojenitesi ve sisteme giren organik madde tipleri yapısal bileşiklerin mikrobiyal

açıdan kullanılmasındaki tahminleri oldukça güçleştirmektedir. Doğal karmaşıklık düşünüldüğünde, insan aktiviteleri sonucu nehir deltalarına giriş yapan organik kirleticilerin biyoparçalanabilirliği ve sistemde kalma süresini tahmin etmenin güç olduğu aşikârdır (Boyd et al., 2008).

Atlas and Busdosh'un 1976 yılında yaptığı bir çalışma ile nehir deltaları ve okyanuslardaki tuzluluk durumlarının biyoparçalamada iş gören bazı mikrobiyal türler için ölümcül olabilme olasılığının her zaman mevcut olduğu bildirilmiş, ama tuzca zengin habitatlardan izole edilen parçalayıcı mikroorganizmaların aynı kimyasalı tatlı su ortamında parçalama işini yapmadıklarını gösteren birçok örnek çalışmadan bahsetmişlerdir (Gallego Blanco, 2012).

2.4.1.4. Azot ve fosfor (Besin içeriği olarak)

Azot, fosfat ve potasyum (N, P ve K) gibi mineral besinleri içeren kirlenmemiş doğal çevreler çok nadir ve sınırlıdır. Ancak, bir çevre PAH'lar gibi organik bileşiklerle kirlendiği zaman C:N oranı gözle görülür şekilde artış gösterebilir ve biyoiyileştirmede bu minerallere ait oran sınırlayıcı faktör haline gelebilir. Bahsedilen bu besinler kirli çevrelerdeki mikroorganizmaların büyümelerini teşviklemek için mineral gübre olarak verilebilir (Breedveld and Sparrevik, 2001; Atagana et al., 2003; Gallego Blanco'dan, 2012). Birçok çalışma inorganik ve organik gübre kullanımının kirletici biyoparçalanması üzerine olumlu etkiler gösterdiğini belirtmektedir (Swanell and MacDonagh, 1996; Venosa et al., 1996; Vasudavan and Rajaram, 2001; Gallego Blanco'dan 2012). Ancak, besinlerin doğru bir denge ve konsantrasyonda verilmesi önemlidir. Çünkü yine çoğu çalışmada bu besinlerin ortama eklenmesiyle birlikte mikrobiyal biyoparçalanma üzerine inhibe edici etki gösterdiği belirtilmektedir (Morgan and Watkinson, 1992; Zhou and Crawford, 1995; Margesin and Schinner, 1997; Gallego Blanco'dan, 2012). US EPA'nın kirlenmiş alanlar için tavsiye ettiği en uygun molar oranlar C:N için 100.10 ile 1000:10, aynı şekilde C:N:P'nin molar oranları ise 100:10:1 olarak verilmiştir. Ama literatürde tanımlanan ve en çok kullanılan oranlar 100:10:1'den 300:10:1'e kadar farklılık göstermektedir (Bossert and Bartha 1984; Alexander, 1999; Atagana et al., 2003; Leys et al., 2005; Gallego Blanco'dan 2012).

2.4.1.5. Tamamlayıcı karbon kaynaklar (Kometabolizma)

Scragg'a (2005) göre kometabolizma tanımı, karbon ya da enerji kaynağı olarak kullanılmayan bileşiklerin yıkımı olarak yapılabilir. Genel olarak mikroorganizmaları tek karbon kaynağı olarak yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) PAH'larda büyümedikleri kabul edilmektedir, dolayısı ile bu kimyasalları parçalama yeteneğinde olan mikroorganizmaların diğer kaynaklardan enerji elde etmesi ve bu şekildeki rekalsitrant PAH'ları metabolize etmesi zorunludur. 1989 yılında Keck et al.'un belirttiği üzere, HMW PAH'ların parçalanmasının spesifik olmayan karbon kaynakları ilavesi ile güçlendirilebildiğinin bazı kanıtları mevcuttur. Örneğin, Holman et al.'un (2002) yaptıkları bir çalışmada, humik asitler gibi organik maddelerin piren parçalanmasını düzenlediğini ve ilerlettiğini gözlemlemişlerdir (Gallego Blanco, 2012).

2.4.2. Kirletici ile ilişkili faktörler

2.4.2.1. Moleküler yapı

Gallego Blanco (2012), Cerniglia'ya (1992) ve Kanaly and Harayama'ya (2000) atfen birçok bakterinin yüksek moleküler ağırlıklı PAH'lardan daha çok düşük moleküler ağırlıklı PAH'ları parçaladıklarını belirtmektedir. Genel olarak, PAH'ların biyoparçalanabilirliği molekül ağırlıklarının artışı ile ters orantılı olarak azalmakta ve halka sayısındaki artış beraberinde hidrofobisite ve elektrokimyasal stabilitede artış getirmektedir. PAH'lardaki zor parçalanma olayı aynı zamanda alkil yer değiştirme ve halkaların dağılımı ile de artmaktadır. Açısal düzenlenmeler içerisinde konforme olan PAH'lar doğrusal olarak konfigüre olan PAH'lardan daha kararlıdır. Dolayısıyla, iki ya üç halka yapısına sahip olanlar dört ya da daha çok halka yapısına sahip olanlara göre daha makul oranlarda parçalanırken, diğerleri parçalanmaya karşı daha inatçıdır (Wilson and Jones, 1993; Wild and Jones, 1995; Howsan and Jones, 1998; Gallego Blanco'dan 2012; Boyd et al., 2008).

Çoğu kararlı organik bileşik üzerlerinde taşıdıkları bazı kimyasal yapılar ile doğal bileşiklere benzemektedirler. Bu durum sınırlı da olsa biyoparçalanmaya olanak sağlamaktadır. Yapılan bazı deneysel çalışmalarla birçok organik bileşiğin uygun çevresel şartlar altında parçalandığı gösterilmiştir (Boyd et al., 2008).

Kültüre edilmiş organizmalar için, yapı-aktivite ilişkisi geliştirilmiştir. Başlangıçta, laboratuvar çaplı ya da teorik açıdan yapı – aktivite ilişkisinin alan uygulamalarına dönüştürülmesindeki zorluklar kanıtlanmıştır.

Wolfe ve ark. 1980 yılında doğal su örnekleri ile yaptıkları çalışmalarla biyoparçalanmada fizikokimyasal açıdan zorlayıcı faktörlerin etkilerini göstererek; fitalatlar ve birçok pestisit için doğal su örneklerindeki ikincil dereceden biyoparçalanma oran sabiti ile distile sudaki ikincil dereceden alkali hidroliz oranları arasında mantıklı bir korelasyon bulmuşlardır (Gallego Blanco, 2012; Boyd et al., 2008). Moleküler yapı – aktivite arasındaki ilişki model olarak kullanılmış ve bu konu ile kimyasalın sadece biyoparçalanma potansiyelini değil, aynı zamanda çevresel riski ve potansiyel parçalanma yolizlerini tahmin etmek için bilgisayar algoritması geliştirmişlerdir (Boethling et al., 1989; Kompare, 1998; Dearden, 2002; Jaworska et al., 2003; Hou et al. 2003; Boyd et al.'dan, 2008). Elde edilen verilere rağmen, 2005'te Wammer ve Peters adlı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla sadece kimyasalın yapısına bağlı (örneğin biyouygunluk gibi çevresel zorlayıcı faktörlerin yokluğunda) biyoparçalanma potansiyelinin oldukça dar bir çerçevede olduğunu ki bu çevresel zorlayıcı faktörlerin biyoparçalama oranlarının anlaşılmasında oldukça kritik bir nokta olarak göstermişlerdir (Boyd et al., 2008).

2.4.2.2. Konsantrasyon

Boethling and Alexander'ın 1979 yılında yaptıkları bir çalışmada, biyoparçalanmayı gerektiren bir faktörün de kirleticinin konsantrasyonu olduğunu belirtmektedir. Biyoparçalanmanın metabolik açıdan uygun olmadığı durumlarda eşik bir kirletici konsantrasyonu genel olarak kabul gören bir terimdir (Boyd et al., 2008). Eşik konsantrasyonu, ya substrattan net bir enerji elde edilemeyen kirletici seviye varlığı ya da katabolik enzimlerin sentezi ve ilgili yerlere yerleştirilmelerini uyarmak için yeterli bir kirletici seviyesinin olmadığı durum olarak düşünülebilir (Wiggins et al., 1987; Aelion et al., 1987; Wiggins and Alexander 1988; Boyd et al.'dan, 2008). Eşik konsantrasyon değerinin aşımı sonucunda parçalanma miktarında önemli ölçüde artış olması beklenir (Boethling and Alexander 1979, Alexander 1985; Boyd et al.'dan, 2008). Ortamdaki düşük ve yüksek yoğunluklardaki kirleticiler ile mikrobiyal popülasyonların ilk seferdeki maruziyeti, sonraki aşamalarda farklı konsantrasyonlardaki kirleticilerin

parçalanmasından sorumlu olabilen farklı enzim sistemlerini destekleyen biyoparçalanma yol izlerine etki edebilmektedir (Aelion et al., 1989; Hwang et al., 1989; Boyd et al.'dan, 2008).

Farklı kinetiklere sahip olan bu enzimler kirletici konsantrasyonuna ve ön maruziyete bağlı olarak ifade edilirler (Boyd et al., 2008). Adaptasyon tek yönlü gibi görünmektedir. Roch and Alexander'a (1997) göre kirleticiye adapte olmuş olan hücreler düşük konsantrasyonlardaki bileşikleri parçalama yeteneklerini eninde sonunda kaybetmektedirler (Boyd et al., 2008). Çünkü bir dizi doygunluk değerlerinde çalışan çeşitli enzim sistemleri genellikle toprak, su ve sedimentlerdeki kirletici biyoparçalanmasından sorumludurlar. Enzimlerin biyoparçalama kinetikleri mutlaka ön maruziyete ve kirletici konsantrasyonuna bağlıdır (Scow et al., 1986; Wiggins et al., 1987; Wiggins and Alexander, 1988; Scow et al., 1989; Boyd et al'dan, 2008). Kirletici konsantrasyonu temelde toksisite ve indüklenme olmak üzere iki nedene bağlı olarak önem arz etmektedir (Boyd et al., 2008).

PAH'lar lipofilik özelliktedir ve membran lipid bilayer tabakası içerisinde birikme eğilimindedirler. Bu kirleticiler mikroorganizmaların membran yapılarını tahrip edebilen toksik etkilere ve çözgen özelliklerine sahiplerdir. Hidrokarbon moleküllerinin birikiminin bir sonucu olarak hücreler membran bütünlüğünü kaybederler ve böylece membran geçirgenliği artar. Membran yapısının tahrip olmasıyla birlikte önemli hücresel bileşenlerin hücre dışına sızması, elektrik potansiyeli ve pH gradienti kaybı ya da membran proteinlerinin inhibisyonu gibi membran tabanlı enerji üretim işlemlerinin tahribatını içeren bir takım toksik etkiler gösterebilirler. Yüksek oranda kirletici konsantrasyonu, birçok organizmanın kendisini toksik etkilerden koruyamamasına neden olur (Gargouri, 2015).

Diğer taraftan, bazı kirleticiler ise kirletici seviyesi yalnızca mevcut konsantrasyonlarından daha fazla olduğu durumlarda parçalanabilmektedirler. Sebebi ise belirli bir işleme özgü enzimler yalnızca ilgili substratın, metabolitlerinden birinin ya da olası yakın ilişkili bir molekülün (indüklenebilir enzimler) varlığında belirli bir konsantrasyonda oluşturulur ve aktive edilir. Sulu fazdaki substrat konsantrasyonu, eğer ilgili bileşik petrol, organik çözgen ya da su

ile sulu olmayan sıvı faz arasındaki çok düşük katılım oranının sonucu olarak diğer bir sulu olmayan sıvı içerisinde ise oldukça düşük konsantrasyonda enzim üretimi ile sonuçlanır (Gallego Blanco, 2012). Petrol bileşikleri geleneksel olarak dört gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; doygun haldeki hidrokarbonlar, aromatik hidrokarbonlar, azot-sülfür-oksijen içeren bileşikler (NSO'lar) ve asfaltenler'dir (Gargouri, 2015).

2.4.3. Uygun parçalayıcı mikroorganizmaların varlığı

Kirlilik giderimi için mikroorganizmaların kullanımı ile ilgili ilk teşebbüsler anaerobik giderimde denenmiştir. Sonrasında, endüstriyel atıklarda bulunan pestisitlerin ve diğer kimyasalların parçalama yeteneğindeki mikroorganizmalar izole edilerek kirlilik kontrolleri içn ticari preparasyonlar tasarlanmıştır. 1970'lerde mikrobiyal preparasyonlar atık arıtım işlemlerinin operasyonel açıdan veriminin arttırılması için pazarlanmıştır. Bu yaklaşım daha önceden de bahsedildiği üzere kısaca biyoçoğaltım (biyoaugmentasyon) olarak tanımlanmaktadır (Jhonson et al., 1985; Bitton'dan, 2005).

Mikroorganizmaların PAH'lar gibi organik kirleticileri parçalama kabiliyetleri yıllardır bilinmektedir ve özellikle denizel çevrelerdeki hidrokarbon biyoparçalanmasındaki çevresel faktörlerin kontrolü ile ilgili kapsamlı bir genel bilgi 1981 yılında Atlas tarafından gösterilmiştir. Bu teoriye göre, organik kirleticiler mikrobiyal büyüme ve solunum için sıradan substratları temsil etmelidir (Boyd et al., 2008).

Genellikle, kirlenmiş çevrelerdeki yerli mikrobiyal popülasyonlar PAH parçalama kapasitelerine sahiplerdir. Bu sebepten dolayı, komünite yapısının analiz edilmesi ve mikrobiyal işlemlerin güçlendirilebilmesi ve çevresel şartların optimizasyonu için biyoiyileştirme işlemleri esnasındaki değişimlerin analiz edilmesi önemlidir. PAH'lar gibi birçok organik bileşiğin parçalanmasından önce kimyasalın parçalanmasına dair her hangi bir durumun olmadığı bir period göze çarpmaktadır. Bu zaman aralığı aklimasyon yani alışma, adaptasyon ya da lag evresi olarak adlandırılır. Alışma evresi kimyasallara, çevrelere ve bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak saatlerden aylara kadar değişen süreleri

kapsayabilmektedir. Bir mikrobiyal komünitenin bir substrata adaptasyonu sıklıkla eş zamanlı ve yapısal olarak benzer başka bazı kimyasallara da adaptasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bahsedildiği gibi sıcaklık, pH, havalandırma, N ve P konsantrasyonları gibi bazı etmenler alışma döneminin uzunluğunu etkilemektedir. Daha önceden kimyasal ile kirlenmiş olan alanlar alışma dönemi süresini azaltabilir ve parçalanma oranlarını arttırabilir (Gallego Blanco, 2012).

Ancak, daha önce hiçbir kimyasalla kirlenmemiş olan alanlar parçalama için önemsiz derecede bir mikrobiyal popülasyona sahip olabilir veya olmayabilir. Bu durumda, tür inokülasyonu kimyasalın parçalanmasında etkili olabilir ve aynı zamanda özel çevresel şartları tolere etmede oldukça faydalı olabilmektedir (Vogel, 1996; Aldrett et al., 1997; Hozumi et al., 2000; Gallego Blanco'dan, 2012). Forsyth et al. (1995) ve Grosser et al. (1991) yaptıkları çalışmalarla yerli mikroorganizmalar kullanılarak yapılan biyoçoğaltımın veya kirlenmiş alanlara seçilmiş organizmaların eklenmesiyle yapılan biyoparçalanmanın, bu sayede hızının arttırıldığını ve mikroorganizmaların koşullara alışma döneminin azaldığını göstermiştir (Gallego Blanco, 2012). Bununla birlikte, Venosa et al.'a (1991, 1992) göre bakterinin dışarıdan ortama verilmesinden sonra bakteri hızlı bir şekilde azalmakta ve büyümesi de zayıf olmaktadır (Gallego Blanco, 2012). Yine, Tagger et al. (1983) ve Venosa et al.'a (1996) göre ortama verilen bakterideki bu düşüş belki de yerli popülasyon ile arasındaki rekabetin zayıflığına ve değişen çevre koşullarına olan adaptasyon eksikliğine bağlı olabilir (Gallego Blanco, 2012). Ayrıca, eğer yerli floranın reaksiyonu gerçekleştirme yeteneği varsa dışarıdan bakteri eklemeye gerek olmadığı belirtilmektedir (Gallego Blanco, 2012).

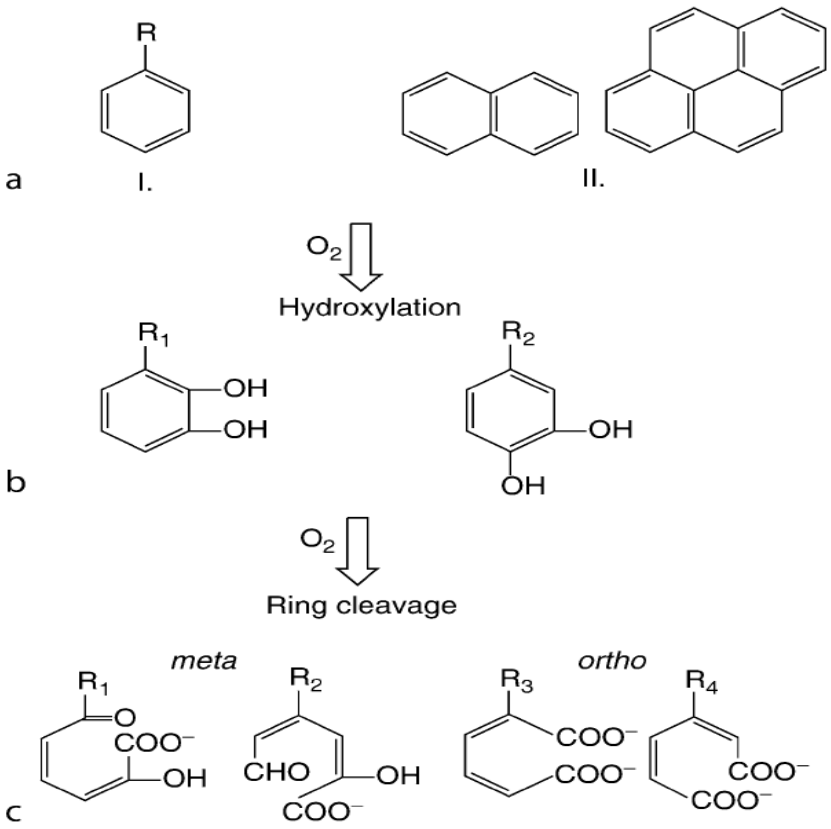
2.5. PAH Parçalayan Mikrobiyal Popülasyonlar

2.5.1. PAH'ların metabolizması

Özelikle insan kaynaklı doğal olmayan kirleticilerin yaklaşık son elli yılda yoğun şekilde çevreye verilmesi ve kirletilmesi sonucu bu alanlarda yaşamak zorunda olan bakterilerde önemli ve hızlı oranda modifikasyon ve adaptasyonlara neden olmuştur. Bu modifikasyon ve adaptasyonel kazanımlar parçalama enzimleri ve dolaylı yoldan parçalamada etkin rol oynayan genlerin kazanımı şeklindedir.

PAH'lar kararlı indirgenmiş bileşiklerdir bu nedenle parçalanmaları genellikle aerobik ya da anaerobik koşullar altında oksidasyon ile ilerler (Gallego Blanco, 2012). Mikroorganizmalar çeşitli aromatik bileşikleri aerobik ya da anaerobik yol izleriyle parçalayabilmektedirler. Mikroorganizmalar aerobik şartlarda aromatik bileşiklerden yararlanmak için ön koşul olan halka açılımını gerçekleştirmede moleküler oksijeni aromatik halkaya saldırmak için bir substrat olarak kullanmaktadır (Haddock, 2010). Aerobik yol izinde, başlangıç adımları oksijenazlar olarak adlandırılan özel bir enzim grubu ile katalizlenmektedir (Gallego Blanco, 2012). Bu enzimler yüksek oksidasyon durumlarıyla birlikte moleküler oksijeni aromatik halka içine katarak hidroksillenmiş bileşikler oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler önceki bileşiklere göre daha çok suda çözünebilir haldedir, bu durum molekülleri ileri parçalanma için daha duyarlı hale getirmektedir.

Gibson and Parales'e göre (2000) aromatik bileşiğe eklenen oksijen atomlarının sayısına bağlı olarak oksijenazlar, monokosigenaz ve dioksijenazlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Monooksijenazlar substrat içerisine bir oksijen (O_2) atomu bağlar ve monohidroksillenmiş ürünler üretirler. Dioksijenazlar ise, substrat içine iki oksijen atomu bağlar ve dihidroksillenmiş ürünler elde edilen halka-hidroksillenmesi reaksiyonlarını gerçekleştirir ya da aromatik diollerin halka açılımını gerçekleştirirler (Singh et al., 2015). Naftalen dioksijenaz gibi bazı dioksijenazlar, monooksijenasyon reaksiyonları gerçekleştirdiği gibi dioksijenasyon reaksiyonlarını da gerçekleştirmektedir. Böyle enzimlerin farmasötik, tarımsal ve çevresel öneme sahip oldukça çeşitli kimyasalların dönüştürülme reaksiyonlarına katıldıklarından ötürü yüksek endüstriyel önemleri vardır (Gibson et al., 1995; Singh et al.'dan, 2015). Diğer taraftan, anaerobik şartlar altında, mikroorganizmalar nitrat, sülfat ya da metal iyonları gibi inorganik bileşikleri elektron alıcısı olarak kullanırlar ve bu sayede biyokütle artışı yanında, reaksiyon ürünleri olarak azot gazı (N_2), hidrojen sülfür (H_2S), metan (CH_4) ve indirgenmiş metal formları oluştururlar (Evans and Fuchs, 1988; DiDonato et al., 2010; Singh et al.'dan, 2015).



Şekil 2.4. Temsili aromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları ve parçalanma ara molekülleri. **(a)** Genellikle mono- ve dioksijenazların katalizlediği reaksiyonlar için substrat teşkil eden yaygın bulunan aromatik hidrokarbon örnekleri. **I.** Tek ya da iki halkalı aromatik hidrokarbonlar. R grubu = H, benzen; CH_3, tolüen; C_6H_5, bifenil. **II.** Polinükleer aromatik hidrokarbonlar (PAH), sırasıyla iki ve dört birleşik halkadan oluşan naftalen ve fenantren. **(b)** Aerobik hidrokarbon parçalanma yolizlerinin mono- ve dioksijenaz enzimleri tarafından katalizlenmesiyle üretilen ortak halka açılım substratları. R1 = : H, katekol; CH_3, 3 - metil katekol; C_6H_5, 2, 3 - dihidroksi bifenil. R2 = : CH_3, 4 - metil katekol; COO^-, protokatekuat. **(c)** Ekstradiol (meta) ve intradiol (orto) halka açılımı yapan dioksijenazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların ortak halka açılım ürünleri R1 = : H, 2 – hidroksi – 6 – okzo – hekza - 2, 4 - diyenoat; CH_3, 2 – hidroksi – 6 – okzo – hepta – 2, 4 - diyenoat; C_6H_5, 2 – hidroksi – 6 – okzo – 6 – fenilhekza – 2 , 4 - diyenoat. R2 = : CH_3, 2 - hidroksi – 4 – metil – 6 – okzo – hekza – 2, 4 - diyenoat; COO^-, 2 – hidroksi – 4 – karboksi – 6 – okzohekza - 2, 4 - diyenoat. R3 = H, cis, cis - mukonat. R4 = COO^-, 3 – karboksi - cis, cis – mukonat (Haddock, 2010).

Aromatik nükleusun oksijenasyon reaksiyonları yoluyla aktive edildiği bu işlemlerde katekoller, protokatekuatlar, gentisatlar ve (hidroksi)benzokinoller gibi birkaç aracı molekül grubu üretilmektedir. Oksijenin hidroksil gruplarına orto-, ya da para- pozisyonunda eklenmesiyle oluşan bu moleküller, merkezi metabolizma

içinde halka açılımı olan ürünlerin ileri parçalanmasını sağlayacak oksijenolitik halka açılımını gerçekleştirirler (Perez – Pantoja et al., 2010).

PAH'ları aerobik veya anerobik yolizleri aracılığıyla parçalama yeteneğinde olan çok çeşitli mikroorganizmaların varlığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Cerniglia, 1992, 1993, 1997; Kanaly and Harayama, 2000; Prince, 2005; Kanaly and Harayama, 2010; Gallego Blanco'dan, 2012; Bondarenko and Gan 2004; DiDonato et al. 2010; Singh et al.'dan, 2015). Geniş bir aromatik spektrumu, devasa katabolik çeşitliliğe sahip faklı mikrobiyal türlerin oluşturduğu mikrobiyal kommuniteler ile bazı katabolik yolizlerinin esnek substrat spesifitesi sayesinde parçalanabilmektedir (Perez-Pantoja et al., 2008; Perez-Pantoja et al.'dan, 2010). Anaerobik PAH parçalanması aerobik parçalanma ile kıyaslandığı zaman oldukça yavaştır. Bu yüzden, biyoiyileştirme stratejilerinde önemli rol oynamamaktadır. Buna rağmen, günümüzde anaerobik biyoparçalanma işlemlerinde iş gören mikrobiyal popülasyonlara olan ilgi giderek artmaktadır (Lovley et al., 1989; Langenhoff et al., 1996; Heider et al., 1999; Widdel and Rabus, 2001; Jones et al., 2008a; Meckenstock and Mouttaki, 2011; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.5.2. Kirleticilerin Biyoparçalanması

Hidrokarbonlar mükemmel bir enerji kaynağı olduğunu ve rutin olarak insanlar tarafından kullanıldığını düşünelim, bu hidrokarbon kirleticilerin şüphesiz ki mikroorganizmalar için de potansiyel bir karbon ve enerji kaynağı olacağı sürpriz değildir. Bakteriler, laboratuar kültürlerinin yaptığı gibi doğada da seyrek olarak büyümelerine rağmen, belirli bir organik maddenin ve besinlerin bol olduğu durumda ise kopiyotrofik bakteriler tek başına organik materyali enerji için kullanmaktan ziyade büyüme ve üreme için kullanacaktır (Boyd et al., 2008). Doğada, bakterilerin hem substratı hem de besinleri bolca bulması nadiren olmaktadır ve çoğunlukla belirli aralıklarla olmaktadır. Mikroorganizmalar genellikle büyüme ve açlık arası bir durumda yaşamlarını sürdürmektedirler (c.f. Kjelleberg et al., 1987; Boyd et al.'dan, 2008). Geniş çaplı hidrokarbon kirlenmesinin olduğu alanlar eğer toksisite etkileri minimumda ise ortamda bulunan mikroorganizmalar için karbon ve enerji açısından tam anlamıyla ziyafet sunmaktadırlar. Besinsiz, prensip olarak azot (protein ve nükleik asitler için) ve

fosfor (ATP ve nükleik asitler için) eksikliğinde organizmalar biyokütle arttırımına gitme konusunda önemli ölçüde sıkıntı yaşamaktadırlar. Bundan dolayı da biyoparçalanma işlemi kısıtlanmaktadır (Boyd et al., 2008). Mikroorganizmalar tipik olarak enerji devamlılığı için karbondan yararlanmaktan daha çok tercihen biyokütle arttırmayı denemektedirler. Cornelissen and Sijm tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada, kullanılabilir enerjinin % 47-83'ü genelde büyüme için kullanıldığını göstermektedir. Aromatik hidrokarbon (tolüen ve PAH'lar) biyoparçalanması daha düşük büyüme verimi göstermiştir (%9-26'sı büyüme için kullanılmış) (Boyd et al., 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise anaerobik koşullarda yeraltı suyunda benzen için ortalama %66 ve tolüen için ortalama %59'luk bir yararlanım ile göreceli olarak yüksek büyüme verimi söz konusu olmuştur. Bu çalışmada, benzen yada tolüen kullanımı ile in situ nütrientler (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3+}) arasında bir ilişki saptanmamıştır (Boyd et al., 2001; Boyd et al.'dan, 2008). Benzer şekilde Guerin and Jones'un 1989 yılında nehir delta sedimentlerinde yaptıkları başka çalışmada ise, PAH biyoparçalanması ile nütrient konsantrasyonları arasında bir korelasyon saptanmamıştır (Boyd et al., 2008). Bu veriler aynı zamanda kimyasalın biyouyumluluğu ve parçalanabilirliği ile doğru orantılıdır.

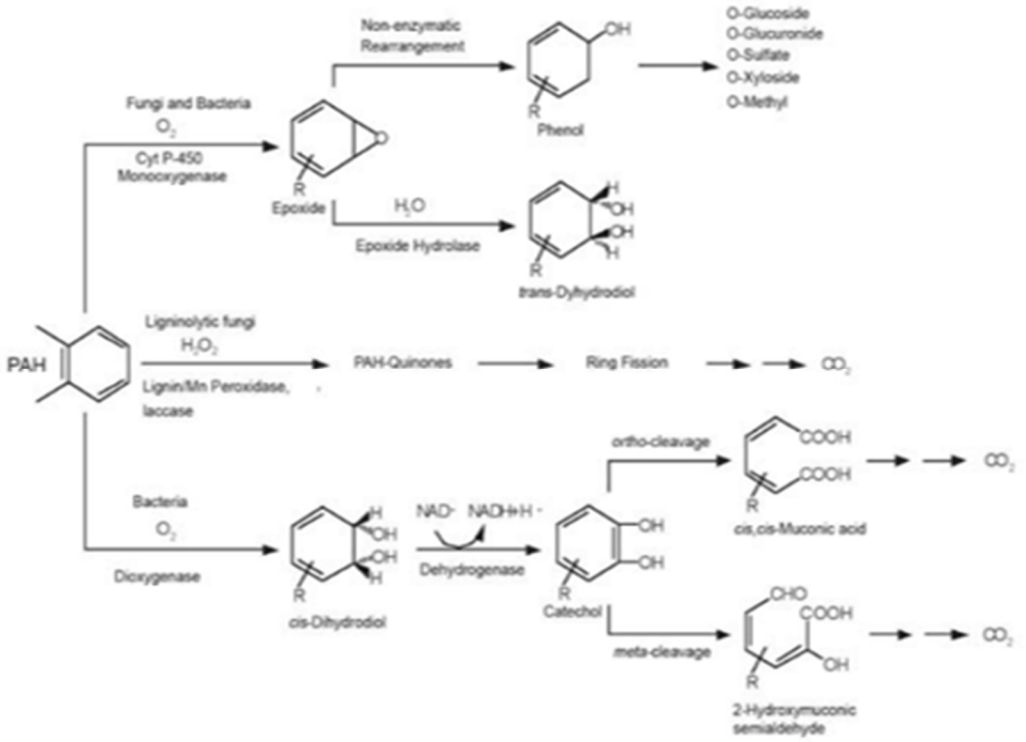
Bakteriler ve funguslar geniş bir organik kirletici çeşitliliğini metabolize ederler. Mikrobiyal parçalama çevreden PAH'ların uzaklaştırılması için temel işlemdir (Prince, 1993; Sutherland et al., 1995). Belirli bir organik substratın biyoparçalanması mikroorganizmalar vasıtasıyla gerçekleştirilebilir. İşi gerçekleştiren mikroorganizmalar bu substratın kullanımına bağlı olarak büyürler (Gallego Blanco, 2012).

Alexander'a (1999) göre, bu işlem üç farklı strateji ile sonlanır: 1) Mikroorganizmalar kimyasalı tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler ve işlem sonunda karbondioksit, su ya da diğer inorganik bileşikler (mineralizasyon) üretirler. 2) Diğer durumlarda mikroorganizmalar yalnızca substratları kısmi olarak parçalarlar ve substratı metabolitlerine dönüştürürler ki bu sonu gelmeyen ya da yarıda kalan ürünlerin (kısmi parçalanma) üretimi ile sonlanır. 3) Bir diğer olasılıkta ise mikroorganizmalar diğer bir organik substratın varlığında büyür fakat ilgili olan substratı metabolize eder (kometabolizma) (Gallego Blanco, 2012).

Grifoll et al. (1995) ve Lopez et al. (2005) yaptıkları çalışmalarla tek bir bakteri suşunun PAH karışımında büyüyebildiğini ve bakterinin bu işlemleri eş zamanlı olarak yapabildiğini göstermişlerdir (Gallego Blanco, 2012). Diğer taraftan, kompleks hidrokarbonların parçalanması çeşitli mikroorganizmaların sıkı efor sarfetmesini gerektirebilir. Mikrobiyal parçalama yolizlerinin aydınlatılması, oluşturulan metabolitlerin toksik ya da biyolojik olarak inaktif olup olmadığı ve çevresel olarak kalıcılık durumlarının belirlenmesi gibi parametrelerle parçalanmanın kapsamını tanımlamak açısından gereklidir (Gallego Blanco, 2012).

Moleküler seviyede bakıldığında, organik kimyasal bileşiklerden hücresel büyüme için substrat olarak yararlanmada bu kimyasal bileşiklerin yapısına uygun, molekülleri katabolize edebilen belirli bir enzim sistemi gerekmektedir bu sayede moleküller merkezi katabolik yol izlerine katılarak karbon ve enerji kaynağı olabilirler (Boyd et al., 2008; Haddock, 2010). PAH'lara istinaden ifade edilen enzim aileleri çoğunlukla multi-enzimlerin upper ya da lower parçalanma yolizleri olarak geniş iki kategorisinden birine ayrılır (Dagley, 1987; Boyd et al.'dan, 2008). Örneğin, naftalen parçalanmasından sorumlu genlerin ifadesinden sorumlu olan bir suş aynı zamanda tipik olarak diğer düşük moleküler ağırlıklı aromatik hidrokarbonların parçalanmasında kullanışlı olan genleri de ifade etmektedir. Kimyasal yapıdaki böyle ufak farklılıklar, upper ya da lower yolizleri enzimleri tarafından tanınmayacak kadar yeni olmadığı sürece hidrokarbon metabolizma oranlarının belirlenmesinde az bir önem arz eder. Kimyasal yapı aynı zamanda PAH'lar gibi metabolik verimde önemli olabilmektedir ki bu PAH'ların termodinamik açıdan kararlı durumları, onların metabolize edilmesinde daha çok hücresel enerji ihtiyacı doğurabilir ve doğal organik madde parçalayıcı mikroorganizmalar (natural organik matter-NOM) ile besin ve oksijen açısından yarışmaya girdiklerinde parçalayıcı mikroorganizmaya dezavantaj sağlayabilir (Boyd et al., 2008).

PAH'ların bakteriyel aerobik parçalanması genellikle multikomponent dioksijenaz enzim sistemiyle başlatılır ki bu enzimler hem oksijenin atomlarını hem de NADH'tan aldığı iki elektronu cis-dihidrodiolleri oluşturmak için birleştirir. Bu multikomponentli dioksijenazlar genellikle bir redüktaz, bir ferrodoksin ve bir demir-kükürt proteininden oluşmaktadır. Sonrasında NAD^+ - bağımlı bir dehidrojenaz tarafından dehidrojenasyon gerçekleştirilir. Devamında dihidroksillenmiş aracılar oluşur ki bunlar en sonunda sitrik asit döngüsü ara moleküllerinin oluşumu ile sonlanan halka açılma yolizleri yoluyla ileri parçalanmaya giderler (Şekil 2.5). PAH'lar aynı zamanda bakterilerde bulunan monooksijenazlar vasıtasıyla metabolize edilerek trans-dihidrodioller oluşturulurlar. Ancak monooksijenaz enzim aktivitesi aynı organizmada bulunan dioksijenaz aktivitesine kıyasla genellikle daha yavaştır (Heitkamp et al., 1988a; 1988b; Gallego Blanco'dan, 2012).



Şekil 2.5. PAH'ların mikrobiyal katabolizma yolizleri (Kastner, 2000; Gallego Blanco'dan, 2012)

2.5.3. PAH metabolize eden enzimler, yapıları ve katalitik mekanizmaları

Yapısında sadece karbon ve hidrojen içeren aromatik hidrokarbonların halka açılımından sorumlu olan temel enzim grupları ve onların aktivasyonları hakkında bilgi sahibi olunması, enzimlerin mekanizmalarının aydınlatılması metabolik yol izlerinin belirlenmesinde ve kimyasalların hücre içindeki kaderlerinin bilinmesi açısından önem arz etmektedir. Bu tarz parçalanma yolizlerinde iş gören başlangıç temel enzim grupları aşağıda açıklanmıştır.

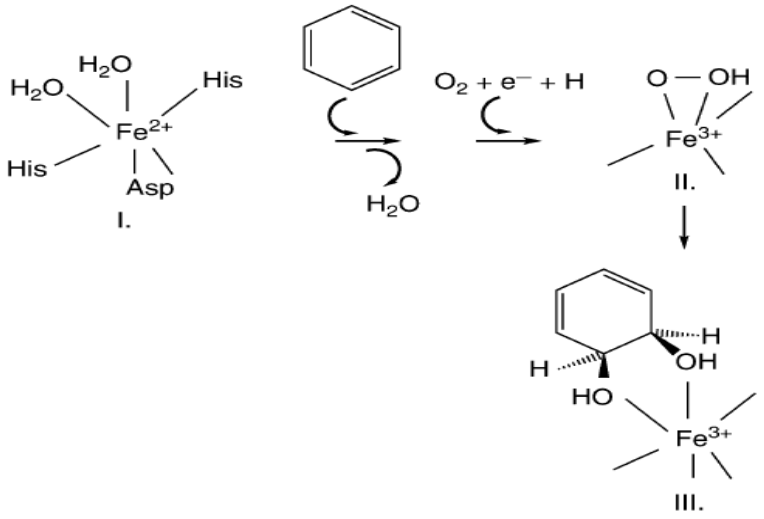
2.5.3.1. Halka - hidroksilleyici dioksijenazlar (Ring - hydroxylating dioxygenases) (EC 1.14.12.)

Halka hidroksilleyici dioksijenazlar (RHD'ler) aromatik halka yapısındaki karbon atomlarına iki adet moleküler oksijen atomu ekleyerek okside eden enzim gruplarıdır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için aynı zamanda iki elektron gereklidir. Reaksiyon ürünleri *cis* - dihidrodioller olarak adlandırılırlar. Çünkü her iki hidroksil grubu, halka karbonları tarafından oluşturulan aynı düzlemde lokalize olurlar. Tolüen, naftalen ve bifenil dioksijenazlar oldukça iyi karakterize edilmiştir. Enzimlerin boyutları, kompozisyonları ve moleküler yapıları açısından oldukça benzer enzimlerdir. Bu multikomponent yapıdaki enzimler üç ayrı protein yapısından oluşur. Yapıdaki bu proteinler suda çözünürler ve membrana bağlanmazlar. Enzimin aktif bölgesi hidroksilaz komponentinde bulunurken, bir redüktaz ve ferrodoksin proteini ise hidroksilaz bölgesine elektron desteği sağlayan kısa bir elektron transport zinciri oluştururlar (Haddock, 2010).

Redüktaz bir redoks merkezi olarak FAD içeren ve NADH okside eden bir flavoproteindir. Redüktaz oluşan elektronları ferrodoksine transfer eder. Ferrodoksin ise bir Rieske tipi [2Fe - S] demir – kükürt redoks merkezi içeren düşük moleküler ağırlıklı bir proteindir. [2Fe - S] Rieske proteinlerinin demir iyonları iki adet sistein ve iki adet histidin bileşiğine sahiptir. Bitki tipi ferrodoksinlerde ise demir iyonları dört sistein bileşiğine sahiptir (Cammack, 1992; Haddock'tan, 2010). İndirgenmiş olan ferrodoksin üzerindeki elektronları enzimin aktif bölgesi olan, bünyesinde moleküler oksijen ve aromatik substrat için bağlanma bölgeleri bulunduran hidroksilaza aktarır. Naftalen dioksijenazın redüktazı FAD'a ek olarak

bir plant-type demir-kükürt merkezi içermesiyle bir nebze olsun diğer dioksijenazlardan farklılık gösterir (Haddock, 2010).

Katalitik hidroksilaz komponenti büyük (α) ve küçük (β) protein alt üniteleri içerirler. Bu iki protein alt ünitesi $\alpha_3\beta_3$ kuarterner yapısı içinde birbirleri ile sıkı şekilde ilişkilidir. *Pseudomonas sp.* suş NCBI 9816-4'ten elde edilen naftalen dioksijenazın hidroksilazının kristal yapısı proteinin altı alt birimin yapıyı oluşturmak için etkileşim halinde olduğunu ortaya çıkarmaktadır. β alt birimleri gövde kısmını oluştururken, α birimleri ise şapka kısmını oluşturu ki bu yapı tipik bir şapkalı mantara benzemektedir (Kauppi et al. 1998; Haddock'tan, 2010). α birimi bir Rieske [2Fe - S] redoks merkezi içerir. Bu merkez, ferrodoksin komponentinden gelen elektronları alır ve bunları aynı zamanda α biriminde lokalize olan bir non-heme mononükleer demir merkezine aktarır (Şekil 2.6). Bir aspartat ve iki histidin mononükleer ferrik demire bağlanan ve aromatik hidrokarbon substralarındaki iki karbon atomuna oksijen atomlarını eklemeden önce moleküler oksijeni aktive eden bileşiklerdir. Enzimin substrat bağlanma bölgesi, mononükleer demir bağlanma bölgesine oldukça yakın bir bölgede bulunmaktadır. β alt biriminin ise yapıyı korumakla ve/veya ferrodoksin ile protein-protein etkileşiminin sağlanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. *Sphingobium yanoikuyae* B1'in bifenil dioksijenazının ve *Sphingomonas sp.* suş CHY-1'in RHD'sinin kristal yapıları naftalen dioksijenaz ile oldukça benzerdir. Bu enzimler 5'li birleşik aromatik halkaya sahip PAH'ları okside edebilmektedirler (Ferrero et al., 2007; Jakoncic et al.,2007; Haddock'tan, 2010).



Şekil 2.6. Aromatik hidrokarbon halka açılımı yapan dioksijenazlar için önerilen katalitik mekanizma. Önerilen aracı moleküllerden bazıları aktif bölge bağlanması ve moleküler oksijenin halka içine sokulması esnasında üretilmektedir. I. Hidroksilaz komponentinin aktif bölgesindeki ferrik mononükleer demirin serbest hali. II. Aromatik substrata bağlandıktan ve moeküler oksijeni bağladıktan sonraki aktif demir bölgesi. Rieske merkezinden aldığı bir elektronu moleküler oksijene transfer etmektedir. III. Halkaya her iki oksijen atomunun eklenmesiyle üretilen cis-dihydrodiol bağ yapısı (Kovaleva and Lipscomb, 2008; Haddock'tan, 2010).

Kovaleva et al.'a (2007) atfen Haddock (2010) aromatik bileşiklerin dihidroksilasyonunun katalitik mekanizmasının detaylı olarak bilinmediğine, mevcut bilgilerin ise büyük çoğunlukla naftalen, benzoat ve fitalat dioksijenazlarla yapılan çalışmalara ait olduğunu belirtmektedir. Moleküler oksijen kolaylıkla organik bileşiklerle reaksiyon vermemektedir ve kataliz aromatik substratlara saldırılmadan önce oksijen atomularının aktifleştirilmesi ile ilişkilidir. Oksijen aktivasyonu oksigenaz komponentinin mononükleer demirine O_2'nin bağlanması ile ilişkilidir. Devamında ise bitişiğindeki aromatik bileşiğin karbonlarına saldırarak cis-dihidrodiol ürünü oluşturan bir aracı oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.6). Kataliz esnasında iki elektron harcanır ve bu elektronlar redüktaz ve ferrodoksin tarafından sağlanır. İlk olarak, bir Rieske demiri Fe (III) iken, diğeri ve mononükleer demir Fe (II) formundadır. Bilim insanları tarafından önerilen reaksiyon adımları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1- Moleküler demire yakın bir bölgede, demir oksidasyon durumunda bir değişiklik olmadan aromatik substratın hidroksilata bağlanması;

2- O_2'nin mononükleer demire bağlanması ve Rieske bölgesinden alınan bir elektronun bir Fe (III) hidroperokso aracısı oluşturmak için mononükleer demire aktarılması;
3- O – O bağ açılımı ve aromatik substratın bitişikteki iki karbonuna saldırı;
4- Mononükleer demini indirgeyen ferrodoksin komponentinden alınan bir elektronun Fe (II)'ye aktarılması ve dihidrodiol ürünlerinin salınması için Fe – O bağlarının kırılması;
5- Son olarak ise, başlangıç durumdaki hidroksilaza dönmek için ferrodoksinden gelen ikinci bir elektron FE (II)'ye indirgenmesi için Rieske demirinden birine aktarılır. Alternatif olarak, 2/3'teki adımlarda FE (III) hidroperokso aracı molekülü aromatik substrata saldıran bir Fe (IV) – okzo – hidrokso türlerine dönüştürülebilir (Haddock, 2010).

2.5.3.2. Cis – dihidrodiol dehidrojenazlar (EC 1.3.1.)

cis - dihidroksidiol dehidrogenazlar, RHD'ler tarafından oluşturulan *cis* - dihidrodiollerin aromatizasyonu ve oksidasyonunu katalizleyen aerobik aromatik bileşik parçalanma yolizlerinin enzimleridir. Enzimatik reaksiyonlar katekollerin oluşturulması ile sonuçlanır, katekoller ise daha sonraki basamaklarda halka açılımı yapan dioksijenazlar için substrat olarak iş görürler. Dehidrogenazlar, genellikle doğal boyutları yaklaşık 110,000 kDa. olan α_4 homotetramerlerdir. *cis* – dihidrodiollerin oksidasyonları katalizlenirken dehidrogenaz enzimleri NAD^+'ı NADH'a indirgerler (Jouanneau and Meyer, 2006; Haddock'tan, 2010). 1998 yılında Hulsmayer et al. tarafından yapılan bir çalışmada, *Burkholderia xenovorans* LB400'den elde edilen NAD^+ bağlı *cis* – 2,3 – dihidroksi – 2,3 – dihidrobifenil dehidrogenazın kristal yapısı gösterilmiştir (Haddock, 2010).

Enzimin yapısını oluşturan 227 aminoasit monomeri kısa zincirli alkol dehidrogenaz / redüktaz enzim (SDR) ailesinin bir üyesi olduğu gösterilmiştir. Enzimin aktif bölgesi SDR enzimlerinde korunmuş bölge olan Ser – Tyr – Lys üçlü aminoasit dizisini içermektedir. Substrat NAD^+ bağının nikotimatid halkasına yakın hidroksillenmiş halka ile derin hidrofobik bir yarık içerisine bağlanır. Bir triptofan aminoasit rezidüsü iki halkalı substratın halkaları arasındaki iki düzlemli (V şeklindeki) açıyı etkileme yolu ile katalizi kolaylaştırabilir. Korunmuş bir asparagin rezidüsü substratlarından birisinin hidroksil gruplarına hidrojen bağlayarak substrat

spesifitesinin belirlenmesiyle ilişkili olabilir. Bu aminoasit naftalen yolizi enziminde valin aminoasiti ile yer değiştirirken *Sphingomonas sp*. suş CHY-1'de ise treonin amino asiti ile yer değiştirir (Jouanneau and Meyer, 2006; Haddock'dan, 2010). Bifenil dihidrodiol aracı molekülünün oksidasyonu yapıdaki C3 pozisyonundan alınan bir H^- iyonunun alınarak NAD^+'a aktarılması işlemi ile ilişkilidir. Reaksiyonun ilk adımında, protonu alınmış tirozin rezidüsünün C3 hidroksil grubundan protonu uzaklaştırdığı düşünülmektedir. Bu durum sonraki aşamalarda halkayı aromatize etmek için keto-enol tautomerizasyon yoluyla tekrardan düzenleyen aracı bir molekül olan halkasal hidroksi – 2,4 – dienon elde edilmesi ile C3 hidrojeninin NAD^+'a aktarılmaktadır (Haddock, 2010).

Sphingomonas sp. suş CHY-1 naftalen, antrasen, fenantren ve krizen gibi iki, üç, dört halkalı polinükleer aromatik hidrokarbonları kullanarak büyümek için bir dioksijenaz yolizinden faydalanır (Demaneche et al., 2004; Haddock'tan, 2010). Dioksijenaz ve ona eşlik eden cis – dihidrodiol dehidrogenaz 2-5 arası birleşik halka yapısı içeren geniş bir substrat spesifitesine sahiplerdir. Dehidrojenaz enzimi yukarıda bahsedilen bifenil dihidrodiol dehidrojenaz enzimine oldukça benzer bir yapıdadır. Ancak, enzim içerisinde bulunan ve potansiyel olarak substrat spesifitesi belirleme ile ilişkili olan korunmuş asparagin, CHY – 1 ve diğer Sphingomonadlarda treonin ile yer değiştirir (Jouanneau and Meyer, 2006; Haddock'tan, 2010).

2.5.3.3. Halka bölünmesi yapan dioksijenazlar (Ring - Cleavage Dioxygenases) (EC 1.13.11.)

Halka bölünmesi yapan enzimler (RDC'ler) dihidroksillenmiş olan aromatik bileşiklerin C – C bağı içine bir moleküler oksijen sokulması ve devamında halka bölünmesi ile sonuçlanan reaksiyonu katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimlerin substratları aerobik aromatik bileşik parçalanma yolizlerinin merkezi aracı molekülleridir. Enzim aktivitesi ile oluşan halka bölünme ürünleri daha ileriki aşamalarda merkezi metabolik yolizlerine giren bileşiklere metabolize olurlar. Bu sayede mikroorganizmaların biyosentez için enerji ve karbon substratları elde etmelerine olanak sağlanır. Substrat örnekleri ve ürünler (bkz. Şekil 2.4) gösterilmektedir. Bu gurupta bulunan enzimler RHD gurubu enzimlerinden oldukça farklıdır. RCD'ler halka hidroksil gruplarının açılma pozisyonuna göre

intradioller ve *ekstradioller* olmak üzere iki ana sınıfta toplanabilirler. Vaillancourt ve ark. 2006 yılında kendi kapsamlı araştırma bulgularını ve diğer RCD'leri içeren bir özet yayınlamışlardır (Haddock, 2010).

2.5.3.4. Intradiol dioksijenazlar (ID'ler)

Intradiol RDC'ler katekollerdeki moleküler oksijen atomlarının her ikisinin de girişini katalizlemek için kofaktör olarak Fe (III)'ten yararlanırlar. Bu sayede, katekollerdeki hidroksil gruplarını taşıyan iki yan halka karbonları arasındaki bağı kırarlar (Orto bölünmesi). Katekolün orto bölünme ürünü cis, cis – mukonat molekülüdür (bkz. Şekil 2.4). Bakteriyel türlerin geniş bir çeşiti bu enzimlerden faydalanır ancak proteinlerin tümü evrimsel olarak akraba gibi görünmektedirler ve benzer özellikler sergilerler. Enzimler arasındaki esas farklılık alt birim kompozisyonları ve kuarterner yapıdaki farklılıklardır. *Acinetobacter baylyi* ADP1 (eski adı *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1)'den elde edilen katekol 1,2 – dioksijenaz (C – 12O) enzimi bir α_2 homodimerdir (34,342 kDa / monomer). Her iki alt birim beşinci bir bileşik olarak hidroksit ile birlikte iki tirozin ve iki histidin bileşiğinin bağlanmasıyla oluşan ve bir Fe (III) iyon bağı içeren katalitik bir domainden oluşurlar. Alt birimler arasındaki bağlantılardan sorumlu olan bir dimerizasyon domaini vardır (Vetting and Ohlendorf, 2000; Haddock'tan, 2010).

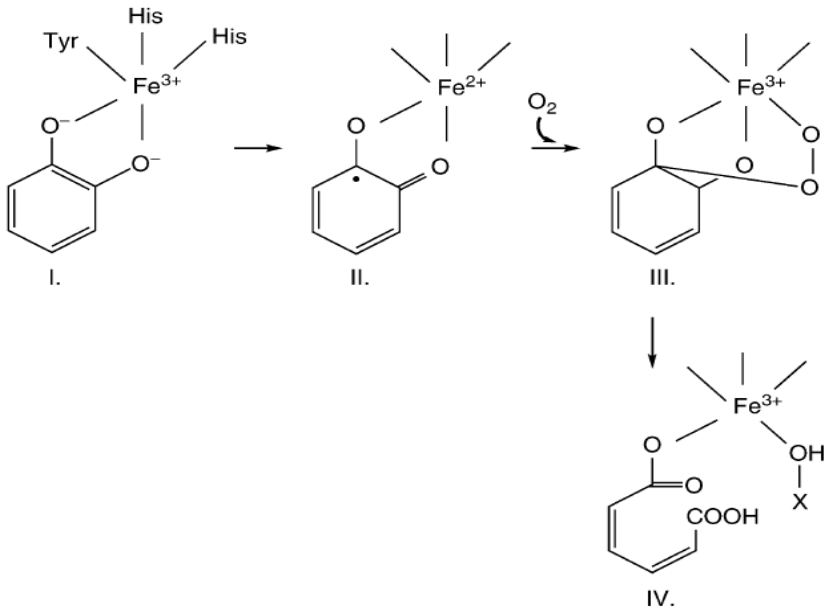
Vetting et al.'a (2000) atfen Haddock (2010) çeşitli bakterilerden saflaştırılan protokatekuat 3, 4 – dioksijenazların α ve β alt birimleri içerdiklerini ve bu enzimlerin $(\alpha\beta)_2$'den $(\alpha\beta)_{12}$ kadar çeşitlilikte konfigürasyonlara sahip olduklarını belirtmektedir. ADP1 suşundan elde edilen enzimin kristal yapısı bir $(\alpha\beta Fe^{+3})_{12}$ kuarterner yapısı göstermektedir. α ve β alt birimleri boyut ve yapı olarak benzerdir ancak iki tirozin ve iki histidin Fe(III) bileşikleri β alt biriminde lokalize olmaktadır.

Vaillancourt et al.'a (2006) göre, ID'lerin katalitik mekanizmaları, O_2 tarafından elektrofilik bir saldırı gerçekleşmesi için substratın aktivasyonunun gerekliliği ile ilişkilidir (Haddock, 2010). Enzimin başlangıçtaki hali iki histidin, iki tirozin ve hidroksit ile koordine olan Fe(III) şeklindedir. Enzim ilk olarak Fe(III)' e iki anyon olarak substrat bağlanmayla düzgün bir mekanizma şeklinde çalışır. Bu işlemi bir tirozin ile bir hidroksit yer değiştirmesi (aromatik hidrokarbonların aerobik parçalanması) ile gerçekleştirir (Şekil 2.7). Bir elektronun

demire aktarılması ve moleküler oksijenin bağlanması ile takip eden süreçte radikal bir substrat oluşturulur. Sonra bu moleküler oksijen sayesinde ekstradiol dioksinazlarınkine benzer bir demir – alkilperokso aracı substrat molekülü üretilir. Criegee düzenlenmesi ve O – O bağ açılımı bir oksijen atomu içeren halkasal anhidrit oluşumu ile diğeri ise hidroksid oluşturacak şekilde Fe(III)'e bağlanması ile sonuçlanır. Hidroksit sonrasında substratın hidroksil gruplarında oluşan karbon atomları arasındaki bağ açılımını yapan anhidriti hidrolizler. İki terminal karboksil grubu taşıyan halka açılım ürünü sonrasında enzimden salınır (Haddock, 2010).

2.5.3.5. Ekstradiol dioksijenazlar (ED'ler)

Ekstradiol halka açılımı yapan dioksijenazlar (ED'ler), yakın hidroksillenmiş ve hidroksillenmemiş karbonlar arasındaki bağı kırmak için (meta bölünmesi) her iki moleküler oksijen atomunu da katekollere bağlamak suretiyle katalizlemede bir kofaktör olarak non-hem Fe (II)'den faydalanırlar. Katekolün meta bölünme ürünü 2 – hidroksi – 6 – okzo – hekza – 2, 4 – dienoat molekülüdür. Bu molekül aynı zamanda 2 – hidroksi – cis, cis – mukonik asit semialdehit olarakta adlandırılır (Şekil 2.4.). Intradiol enzimlerinde olduğu gibi, ekstradiol enzimleri de geniş bir bakteri grubunda bulunur. Ama enzimlerden iki tipi birbirine evrimsel olarak uzaktır ve ED'ler kofaktör olarak non heme Fe (II)'den yararlanırlar (Haddock, 2010).



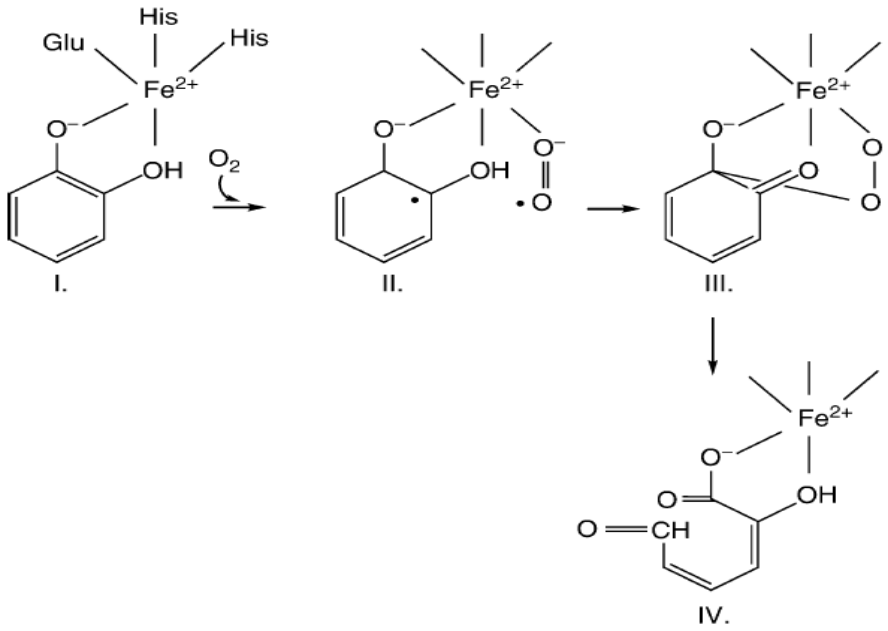
Şekil 2.7. Aromatik hidrokarbon intradiol halka açılımı yapan dioksijenazlar için önerilen katalitik mekanizması. Bazı ara moleküllerin aktif bölgeye bağlanma ve halka içine moleküler oksijenin

sokulması esnasında oluştukları önerilmektedir. I. Ferrik aktif bölgesinin demiri dianyonik katekole bağlanır; II. Substratın aktivasyonu gerçekleşir; III. Bağlı moleküler oksijen ile substrata saldırı gerçekleşir; IV. Aktif bölgeden salınmadan önce intradiol halka açılım ürünü. (Borowski and Siegbahn, 2006; Pau et al., 2007; Haddock'tan, 2010).

Vaillancourt et al.'un 2006 yılında belirttiğine göre, birçok ED yapısal olarak α3 β8 kuarterner yapısı ile bir alt birim tipi içerirler. *Sphingomonas paucimobilis* SYK6 protokatekuat 4, 5 – dioksijenaz bir $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameri ve *Comamonas testosteroni* T – 2 enzimi ise $\alpha_4\beta_4$ heterooktameridir (Haddock, 2010).

Tip I ED'ler bir alt birim içerir ancak, bir ya da iki domaine sahiptirler. Bir domainli alt birimler 21 kDa boyutundadır. İki domainli enzimler 32,5 kDa civarında bir boyuta sahiplerdir ve Fe (II) iyonu ile bağ oluşturan aktif bölge içeren katalitik olarak inaktif N- domaini ve bir C- domaininden meydana gelir. *B. xenovorans* LB400 suşundan ve *Pseudomonas sp*. KKS102 suşundan elde edilen 2, 3 – dihidrobifenil 1, 2 – dioksijenaz ($DHBD_{LB400}$) iki domain α_8 homohekzamerdir (Hans et al., 1995; Senda et at., 1996). Aktif bölge her iki ucundan açık olan bir huni şeklindedir. O_2 ve su her iki uçtan girerken, büyük açıklık yalnızca substratın girmesine olanak sağlar. İki histidin, bir glutamat ve iki su molekülünden oluşan beşli bileşik Fe (II) molekülüne bağlanır (Haddock, 2010).

ED'lerin katalitik mekanizmaları substrat üzerinde nükleofilik saldırı gerçekleştirmek için gerekli olan moleküler oksijenin aktivasyonu ile ilişkilidir (Kovaleva et al., 2007; Siegbahn and Haeffner, 2004; Vaillacount et al., 2006; Haddock'tan, 2010). Bu enzimlerin düzenli mekanizması katekol substratlarına bağlanma ve devamında ise moleküler oksijenin bağlanması şeklindedir (Şekil 2.8). Katekoller iki oksijen atomunun yönlendirmesi ile kendilerinin mono anyonu olan demir molekülüne bağlanırlar (Haddock, 2010).



Şekil 2.8. Aromatik ekstradiol halka açılımı yapan dioksijenazların önerilen katalitik mekanizması. Bazı ara moleküllerin aktif bölgeye bağlanma ve halka içine moleküler oksijenin sokulması esnasında oluştukları önerilmektedir. I. Ferröz aktif bölge demiri monoanyonik katekole bağlanır; II. bağlı moleküler oksijenin ve substratın aktivasyonu gerçekleşir; III. Moleküler oksijen tarafından substrata saldırı gerçekleşir; IV. Aktif bölgeden salınmadan önceki ekstradiol halka açılım ürünü (Kovaleva et al., 2007; Shu et al., 1997; Vaillancourt et al., 2002; Haddock'tan, 2010).

Bağlanma substratı moleküler oksijen üreten bir demir – alkilperokso molekülüne bağlanmak için demiri aktive ederler. Sonrasında, O – O bağı çözülür ve bir oksijen atomu bir lakton üreten halka içine sokulur. İkinci oksijen atomu bir hidroksit iyonu olarak demire bağlandığında halka açılımı tamamlanır. Oksijen atomu hidroliz reaksiyonunda laktona sokulur. Bir ucunda karboksil grubu diğer ucunda ise aldehit içeren halka açılım ürünü sonrasında enzimden salınır (Haddock, 2010).

2.5.3.6. Bakteriyel multikomponent monooksijenazlar (EC.1.14.13)

Bakteriyel multikomponent monookosijenazlar (BMM'ler) O_2'nin bir oksijen atomunu halkaya ya da tolüendeki gibi bir metil grubuna ekleyerek aromatik hidrokarbonlar üzerinde katalitik etki gösterirler. O_2'nin diğer oksijen atomu ise suya indirgenir. Hidroksillenmiş aromatik ürünler benzer ya da farklı enzimler için substratlardır. Bahsi geçen bu enzimler yukarıda bahsedilen RCD'lerin etki edeceği

katekolleri üretmek için ikinci bir monoksijenasyon reaksiyonunu katalizler. Aromatik hidrokarbon BMM'leri çözünebilir metan monooksijenaz (sMMO) ve tolüen monooksijenazları (TMO'lar) içeren bir enzim ailesi üyeleridir (Sazinsky et al., 2004; Haddock'tan, 2010).

Enzimler proteine bağlanan, dört glutamat ve iki histidin rezidüsü, bir [2FE – 2S] – NADH okside eden flavoprotein redüktaz ve bir düzenleyici proteinden oluşan ve iki - demir merkezi içeren aktif bölgeli bir hidroksilaz komponentinden oluşurlar. Hidroksilazın iki-demir içeren merkezi, moleküler oksijene bağlanır ve substarata saldırması için oksijeni aktive eder. BMM'ler 5 – 6 alt gruba ayrılırlar (Notomista et al., 2003; Haddock'tan, 2010). Grup I (fenol hidroksilazlar) ve grup II (tolüen – benzen monooksijenazlar) aromatik hidrokarbonların hidroksilasyonunu katalizler. Bu enzimlerin katalitik komponentleri çoklu alt birimli bir hidroksilazdır. Bu çoklu alt birimli hidroksilaz enzimi, düzenleyici bir proteinle ilişkili $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ heterohekzamerler olarak düzenlenen üç proteinin ve kataliz esnasında hidroksilaza elektron sağlayan bir NAD oksidoredüktazın bileşimidir. İki-demir içeren merkez α alt biriminde konumlanmıştır. Aynı zamanda efektör olarakta adlandırılan düzenleyici protein, enzim aktivitesi için gerekli değildir ancak reaksiyon seviyesini arttırmaktadır. Grup II monooksijenazlar, redüktazdan aldıkları elektronları hidroksilaza aktaran ve "Rieske - tipi ferrodoksin" olarak adlandırılan ilave bir elektron taşıma komponenti içerir. Çoğu aerobik tolüen parçalanma yolizleri substratın başlangıç saldırısını gerçekleştirmek için BMM'leri kullanmaktadır (Parales et al., 2008; Haddock'tan, 2010).

Burkholderia vietnamiensis G4 ten elde edilen tolüen 2 – monooksijenaz (T2MO) enzimi Grup I BMM'ye aittir. Bu enzim 3 – metilkatekol üretmek için tolüenin C2 ve sonrasında C3'ünün monooksijenasyonunu katalizler. Enzim üç komponentten oluşmaktadır. Bunlar; 211 kDa'luk bir hidroksilaz, 40 kDa'luk bir redüktaz ve 10,5 kDa'luk küçük bir efektör proteinidir. Hidroksilaz iki molekülden oluşur ki bunların büyüklükleri 54,5, 37,7 ve 13,5 kDa'luk ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) proteinlerdir. Her bir α alt birimi içinde bir adet iki demir iyonlu aktif merkez bulunmaktadır. Bu merkez tolüenin C2 karbonundan monohidroksilasyonunu katalizler ve sonrasında ise *o* – krezolün C3 karbonundan monohidroksilasyonu katalizler. Oluşan ürün 3 – metil katekoldür. Bu molekül bir *m*– halka açılımı yapan dioksijenaz için substrat

olarak iş görür. Redüktaz NAD ve bir [2FE – 2S] merkezi içerir. Bu birim oksidasyonu katalizler ve elektronları hidroksilaza aktarır. Efektör proteini gerekli değildir ancak varlığı reaksiyon oranlarını yaklaşık olarak 10 kat arttırır. *Pseudomonas sp.* suş CF600 ve *Pseudomonas stutzeri* OX1'den elde edilen fenol hidroksilazlar aynı zamanda Grup I BMM üyeleridir (Cafaro et al., 2004; Haddock'tan, 2010).

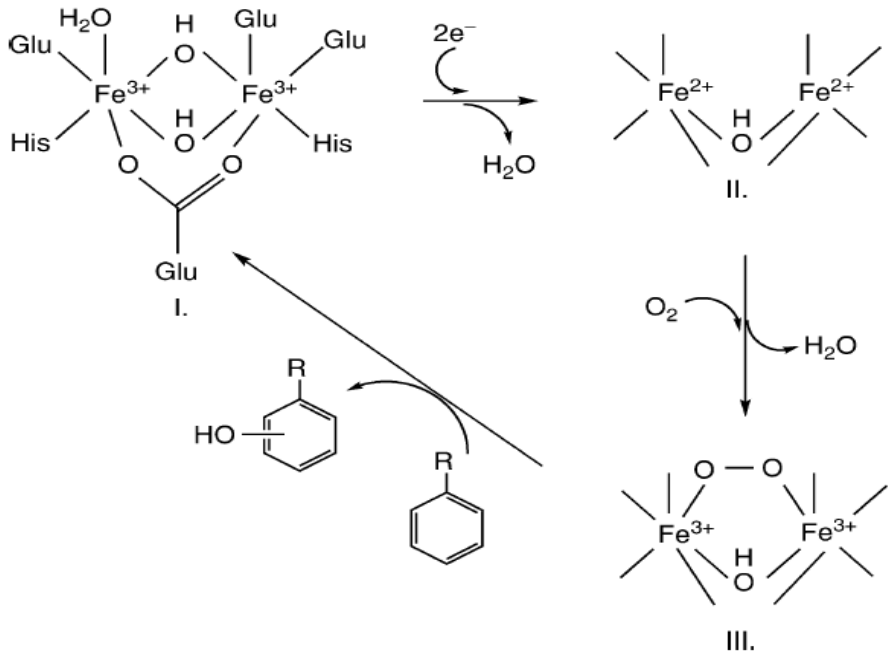
Ralstonia pickettii PK01'den elde edilen tolüen 3 – monoksijenaz (T3MO) enzimi *m* – krezol üretmek için tolüenin C3 karbonunun hidroksilasyonunu katalizler. *m* – krezolün C2 karbonunu ise 3 – metil katekol üretmek için hidroksiller. 3 – metil katekol ise T2MO yolizindeki gibi *m* – halka açılımı yapan dioksijenaz için substrat görevi görmektedir. Ancak T3MO grup 2 BMM'e aittir. Enzim, elektronları redüktazdan hidrolaza aktarmak için bir Rieske tipi ferrodoksinden faydalanır. Enzim aynı zamanda C4 karbonun hidroksilasyonunu katalizleme yeteneğindedir. C4 karbonu hidroksillendiği zaman *p* – krezol üretilir. Ancak parçalanma yolizindeki bu aktivitenin önemi bilinmemektedir (Parales et al., 2008; Haddock'tan, 2010).

Pseudomonas mendocina KR1'den elde edilen tolüen 4 – monooksigenaz (T4MO) p – krezol üretmek için tolüenin C+ karbonunun hidroksilasyonunu katalizlemektedir. Bu enzim grup II BMM'dir ve T3MO için yukarıda tanımlandığı gibi dört komponentten oluşmaktadır. Ama enzim bir tolüen parçalanma yolizine katılır. Burada *p* – krezolün metil grubunun oksidasyonu ve 3 – karboksi – *cis*, *cis* – mukonat üretmek için protokatekuatın *orto* – halka açılımı gerçekleşir (Whited and Gibson, 1991; Haddock'tan, 2010).

P. stutzeri OX1'in tolüen / *o* – ksilen monooksijenaz (ToMO) enzimi bir grup II BMM'dir ve *o*- , *m*- , *p*- krezol üreten substrat hidroksilasyonu için gevşek bir bölgesel seçicilik sergiler. Enzim aynı zamanda benzen ve daha birçok aromatik hidrokarbonun hidroksilasyonunu katalizlemektedir (Bertoni et al., 1996; Haddock'tan, 2010).

BMM'ler ile çalışan katalitik mekanizma hidroksilaz komponentinin aktif bölgesinde bulunan iki demir içeren merkeze moleküler oksijenin bağlanmasını ve

aktivasyonunu gerçekleştirir (Schwartz et al., 2008). TMO'ların aktif bölgesinin yapısı sMMO'larınkine yüksek oranda homolog gibi görünmektedir. (Sazinsky et al., 2004). Enzimin her iki tipinde de iki demir bölgesi dört glutamat ve iki histidin rezidüsü ile enzime bağlanmaktadır. Glutamatlardan birisi demir iyonları arasında karboksilat köprüsü oluşturur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Aromatik hidrokarbon BMM'lerinin önerilen katalitik mekanizması. Bazı önerilen ara moleküller aktif bölgeye bağlanma ve halka içine bir moleküler oksijenin sokulması esnasında oluşur. I. Hidroksilaz α altbiriminin aktif bölgesindeki binükleer Fe(III) çekirdeği; II. Sonrasında bir $Fe(II)_2$ ara ürününe indirgenir ; III. Bir perokso $Fe(II)_2$ ara molekülü oluşturmak için moleküler oksijenin bağlanması gerçekleşir; Devamında bir aromatik hidrokarbon substratın monohidroksilasyonu gerçekleşir (R = CH_3, toluene) (Kovaleva et al., 2007; Murray and Lippard, 2007; Shu et al., 1997; Haddock'tan, 2010).

TMO'ların katalitik mekanizması sMMO'larınki kadar iyi bir şekilde anlaşılmamıştır. ToMO'nun demir iyonları başlangıçta Fe (III) oksidasyon durumundadır. Kataliz esnasında, bu demir iyonları Fe (II)'ye indirgenirler. Devamında ise moleküler oksijenin yapıya bağlanması ile perokso iki demir (III) aracı molekülü üretilir ki bu molekülün substrat halkasını monohidroksilatladığı düşünülmektedir. sMMO'nun katalitik döngüsü esnasında gözlenen iki demir bölgesinin yüksek bağlanma gücü gösteren oksidasyon durumları (örneğin Fe (IV)) saptanmamıştır (Murray et al., 2007; Haddock'tan, 2010).

2.5.3.7. Ksilen Monooksijenaz

Ksilen monooksijenaz enzimi *Pseudomonas putida* mt – 2'de bir tolüen parçalanma yolizindeki tolüen ve ksilenin metil grubunun hidroksilasyonunu katalizlemektedir (Suzuki et al., 1991; Haddock'tan, 2010). Moleküler oksijenin bir atomu tolüene eklenir ve benzil alkol üretilir. Oksijenin diğer atomu ise suya indirgenir. Diğer yolizi enzimleri sonrasında benzoat, dihidroksilasyon ve *m*- halka açılımına oksidasyon yaparlar. Ksilen monooksijenaz iki komponentin bileşiminden oluşmaktadır. XylM 42 kDa büyüklüğünde olan ve aktif bölgesinde iki demir merkezi içeren mebran içerisinde lokalize olmuş katalitik komponenttir. İki demir iyonunun bir histidin bileşiği ile proteine bağlandığı varsayılmaktadır. XylA bitki tipi bir [2FE – 2S] merkezi ile 40 kDa'luk bir flavoprotein redüktazdır. Hücre membranı ile ilişkisinden dolayı enzimin çalışılması oldukça güç olmuştur. Bu nedenle enzimin katalitik mekanizması ve üç boyutlu yapısı bilinmemektedir. Ancak yine de, XylM komponenti mikroorganizmaların alkanlarda büyümesi için kullandıkları AlkB hidroksilaza benzemektedir (Austin et al., 2003; van Beilen et al., 2005; Haddock'tan, 2010).

2.6. Aromatik Hidrokarbonlar ve Biyoparçalanma Yolizleri

2.6.1. Monoaromatik hidrokarbonlar

2.6.1.1. BTEX bileşikleri

Jindrova et al.'ya (2002) göre, BTEX (Benzen, tolüen, etilbenzen ve ksilen) bileşikleri çevresel kirleticilerdir ve bunlar genellikle solventler, plastikleştiriciler ve pestisitlerin hammaddeleri olarak kullanılırlar (Singh et al., 2015). BTEX bileşikleri endüstriyel çözgen atıklarında olduğu kadar petrol ürünlerinde de bolca bulunmaktadırlar. BTEX bileşiklerinin zararlı etkileri karsinojenik, fototoksik ve nörotoksik olarak bilinmektedir (IARC 1989, 2000; Kandyala et al., 2010; Rezazadeh et al., 2012; Rajan and Malathi, 2014; Singh et al.'dan, 2015). BTEX bileşikleri kirlenmiş alanlarda sıklıkla bir karışım halinde bulunmaktadır, bundan dolayı farklı bakteri grupları bu bileşiklerin parçalanmasıyla ilgili gibi görünmektedir (Olsen et al., 1995; Jindrova et al., 2002; Singh et al.'dan, 2015). Mevcut organizmalar birden daha fazla BTEX bileşiği parçalamaktadır (Worsey

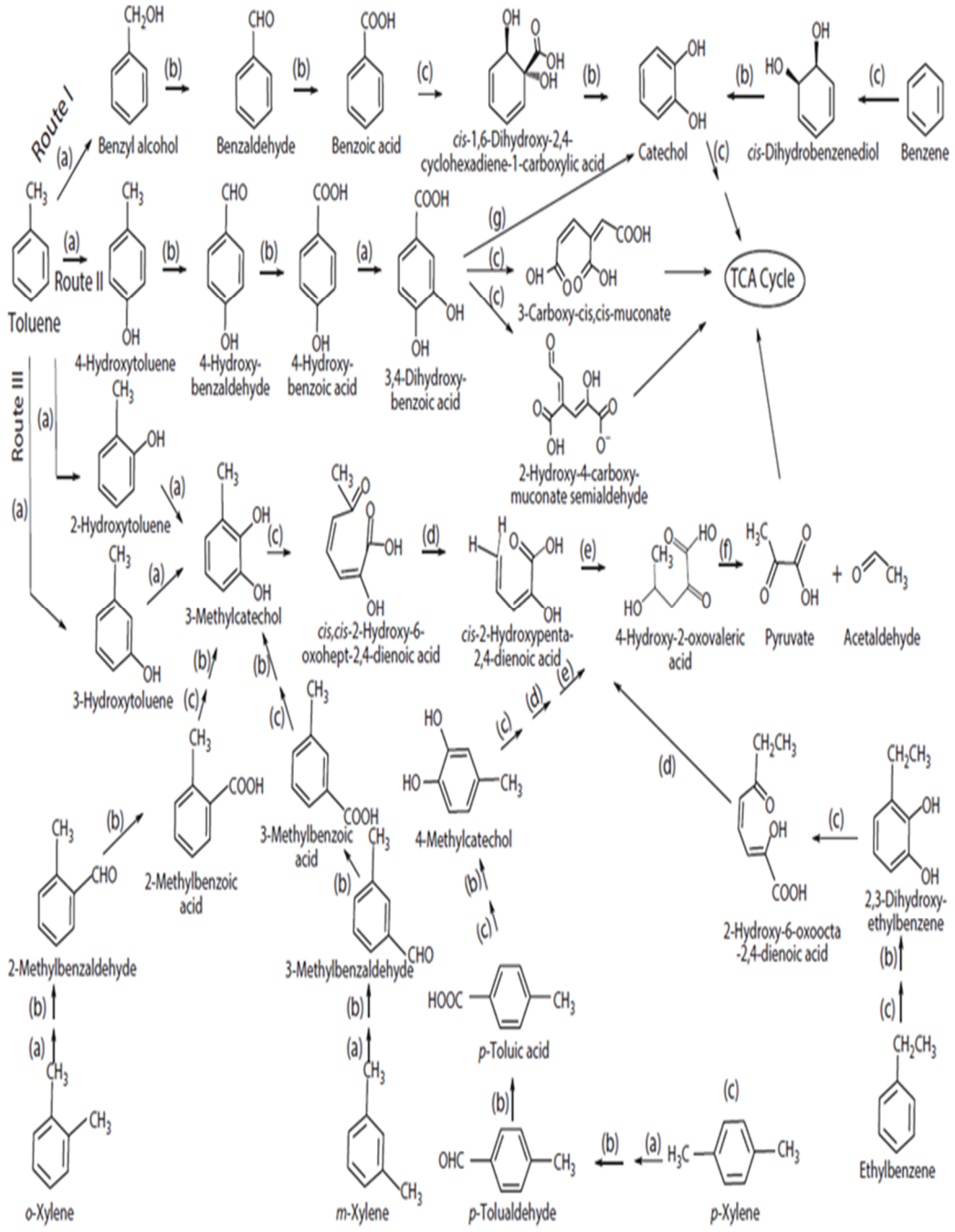
and Williams, 1975; Furukawa et al., 1983; Singh et al.'dan, 2015). BTEX bileşiklerinin parçalanma yol izleri aşağıdaki gibidir (Sighn et al., 2015).

Benzen. Benzen parçalanması Gram-pozitif bakterilerde olduğu kadar Gram-negatif bakterilerde de çalışılmıştır (Jindrova et al., 2002; Singh et al.'dan, 2015). Benzenin parçalanması iki farklı yol izi ile gerçekleşmektedir. İlk basamak her iki yol izinde de ortaktır ki benzen dioksijenaz ile katalizlenen bu basamakta, benzenden *cis* - benzen dihidrodiol oluşturulur. Daha sonra bu bileşik ise *cis* - dihidrobenzendiol dehidrogenaz aktivitesi ile katekole dönüştürülür. Katekol ya katekol 1, 2 - dioksijenaz (intradiol ya da *orto* - açılımı) ya da katekol 2, 3 dioksijenaz (ekstradiol ya da *m*- açılımı) ile metabolize edilir (Şekil 2.10) (Smith, 1990; Singh et al.'dan, 2015).

Tolüen. Tolüen parçalanması ya yan zincir monooksijenazı vasıtasıyla katalizlenen metil grubu oksidasyonu ile (bkz. Şekil 2.10. route I) (Shaw and Harayama, 1992) veya sırasıyla tolüen 2,3 ya da 4-monooksijenaz vasıtasıyla *orto-* , *meta-*, *para-* pozisyonunda hidroksilasyon ile başlar (bkz. Şekil 2.10. route II) (Yen et al. 1991; Olsen et al., 1994; Shields et al., 1995). Diğer bir yol izinde, tolüen dioksijenaz tolüenin yapısına iki oksijen atomu ekler ve parçalanma son olarak 3-metil katekol oluşumu vasıtasıyla gerçekleşir. 3-metil katekol ise katekol 2,3-dioksijenaz vasıtasıyla ileri seviyede metabolize edilir(Şekil 2.10. route III) (Wackett et al., 1988; Singh et al.'dan, 2015).

Ksilen. Bakteriyel suşlarda, ksilen izomeri (*orto*, *meta* ve *para*) parçalanma yol izi monooksijenaz ya da dioksijenaz tarafından başlatılır (Jang et al. 2005; Singh et al.'dan, 2015). *Pseudomonas cepacia* MB2 *o*-ksileni parçalamakta ve *Pseudomonas* Pxy ksilen monoksijenaz yoluyla *m*- ve *p*- ksileni parçalamaktadır. Bu işlemde $-CH_3$ grubu okside edilir ve yol izi *o*-, *m*- ya da *p*- metilbenzil katekol oluşumu yoluyla devam ettirilir (Davey and Gibson 1974; Higson and Focht 1992; Singh et al.'dan, 2015). *Rhodococcus sp*. YU6 ise direk aromatik halka oksidasyonu ve dimetilkatekollerin oluşturulması ile o- ve p-ksileni metabolize etmektedir. Dimetilkatekoller meta-açılım yol izi yoluyla ileri parçalanmaktadır (bkz. Şekil 2.10 route III) (Jang et al. 2005; Singh et al.'dan, 2015).

Etilbenzen. Gibson et al.'a (1973) göre etilbenzen parçalanması etilbenzen dioksijenazın yardımı ile etilbenzen dihidrodiol oluşturulması şeklinde gerçekleşir. Sonraki adımlarda propanoik asit ya da asetaldehit ve pirüvik asit oluşur (Şekil 2.10) (Singh et al., 2015). Etilbenzen parçalanmasının alternatif bir yolu ise, naftalen dioksijenaz ile olmaktadır. Örneğin, *Pseudomonas sp*. NCIB 98164'ten eldeki naftalen dioksijenaz etilbenzen ve sitren ya da asetofenon aracılı metabolitleri için esnek bir özgüllük göstermektedir (Lee and Gibson, 1996; Singh et al.'dan, 2015).



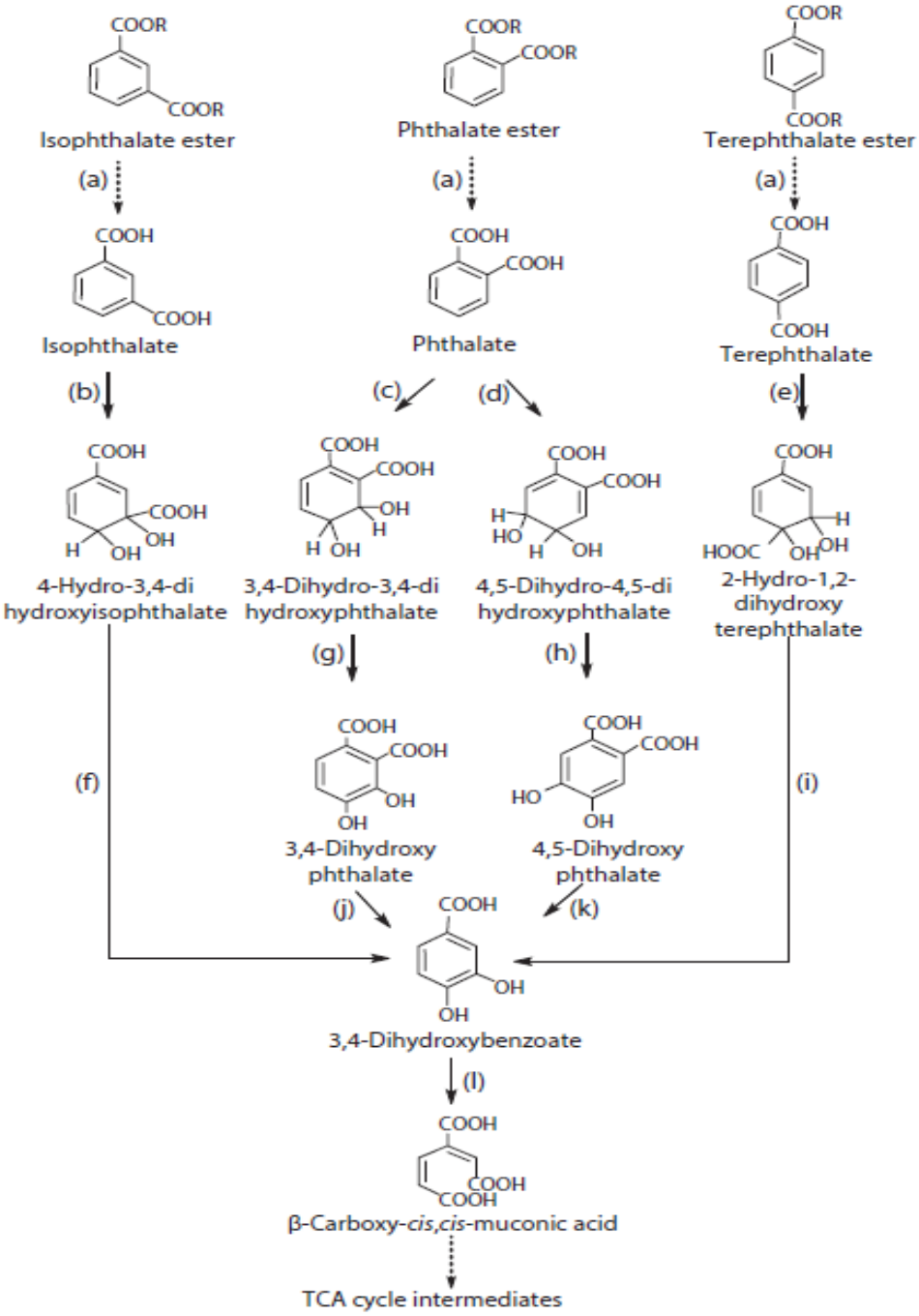
Şekil 2.10. BTEX parçalanması için önerilen yolizleri (benzen, tolüen, etilbenzen ve ksilenler). Genelde parçalanma yolizi ile ilgili olan enzimler (a) monooksijenaz, (b) dehidrojenaz, (c) dioksijenaz, (d) hidrolaz, (e) hidrataz, (f) aldolaz and (g) dekarboksilaz'lardır (Singh et al., 2015).

Fitalat esterleri ve İzomerleri. Fitalat izomerleri ve esterleri çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Çok yaygın kullanılma sebebi ise düşük maliyetli üretimin olması, fabrikasyondaki kolaylık ve bitmiş olan materyale esneklik vermesidir. Fitalatların ilk endüstriyel uygulaması, di – 2 – etil hekzafitalat (DEHP)

içeren kan ünite poşetlerinin üretilmesidir (DEHP, Gesler 1973; Singh et al.'dan, 2015). O zamandan itibaren, fitalat ve esterleri PVC üretiminde, gıda paketlemede, kozmetikte ve süt şişelerinde oldukça yaygın biçimde kullanılmaktadır (Autian, 1973; Singh et al.'dan, 2015). Fitalat izomerleri ve esterlerinin suda çözünürlükleri düşüktür ancak yüksek oktan/su katsayısına sahiplerdir. Bu esterlerin hidrofobisiteleri alkil zincir uzunluklarının artmasına bağlı olarak artar (Autian, 1973; Chang et al., 2004; Singh et al.'dan, 2015). Bu bileşikler gevşek şekilde bağlanırlar ve böylece bitmiş olan üründen kolaylıkla uzaklaştırılabilirler. Fitalatların *para-* ve *meta-* izomerleri olan terefitalat ve izofitalatlar da endüstride kullanılmaktadır ancak fitalat kadar yaygın kullanılmamaktadırlar. Terefitalatlar polietilen terefitalat (PET) şişelerin üretiminde kullanılmaktadır (Autian, 1973; Singh et al.'dan, 2015). Maruz kalınması durumunda, fitalatlar gözler, cilt ve üst solunum yolları mukoz membranları üzerinde sıklıkla derin etki yaratırlar (Autian, 1973; Singh et al.'dan, 2015). Tekrarlı maruziyet alerjik dermatit ve astıma sebebiyet verebilmektedir. Ratlarla yapılan maruziyet çalışmalarında fitalat esterlerinin büyüme geriliği ve üreme organlarda dejenerasyona sebebiyet verdiği görülmüştür (Gesler, 1973; Singh et al.'dan, 2015). Dimetil fitalat (DMP) böcek kaçırıcı olarak kullanılırken, temelde çözgen olarak kullanılan dietil fitalat (DEP)'nin mutajenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Kozumbo et al., 1982; Singh et al.'dan, 2015).

Fitalat esteri parçalanma yol izi Şekil 2.11.'de gösterilmiştir. Yol izi bir esterazla başlamaktadır ki bu enzim fitalat elde etmek için ester bağını hidrolizler (Eaton and Ribbons, 1982; Singh et al.'dan, 2015). Gram – negatif bakterilerde bir halka hidroksilleyen fitalat 4, 5 – dioksijenaz vasıtasıyla bir dihidrodiol ara molekülüne parçalanır, örneğin *Burkholderia cepacia* DBO1'de bu şekildedir (Batie et al., 1987; Singh et al.'dan, 2015). Ancak, Gram – pozitif bakterilerde aynı reaksiyon fitalat 3, 4 - dioksijenaz yoluyla katalizlenir, örneğin, *Rhodococcus sp.* DF17'de bu şekildedir (Choi et al., 2005; Singh et al.'dan, 2015). Fitalat parçalanma yol izi her üç fitalat izomerini de parçalama yeteneğinde olan *Pseudomonas aeruginosa* PP4 ve *P. aeruginosa* PPD'den elde edilen verilerle açıklanmıştır (Vamsee-Krishna et al., 2006; Singh et al.'dan, 2015). Halka hidroksillenmesini takip eden bir sonraki adımda molekül bir dehidrogenaz ile katalizlenmektedir. Burada iş gören dehidrogenaz enzimi fitalat-cis-dihidrodiol molekülünü dihidroksi

fitalat ara molekülüne dönüştürür. Bu molekül ise devamında dekarboksilasyona uğrayarak 3, 4 – dihidroksibenzoat ya da protokatekuata dönüştürülür. Daha sonraki adım dihidroksifitalat dekarboksilaz enzimi yardımı ile katalizlenir. Aynı zamanda, izofitalat, terefitalat ve bunların esterleri metabolik bir ara ürün olan protokatekuat oluşturmak için benzer bir yol ile metabolize olmaktadırlar. Ama izofitalat ve terefitalat için olan parçalanma yol izi dekarboksilaz enzimine ihtiyaç duymaktadır. Bu durumda, ilgili dihidrodioller direkt olarak protokatekuata dönüştürülürler. Her üç fitalat izomerinde iş gören parçalanma yolizleri protokatekuatta birleşmektedir. β - karboksi - *cis, cis* mukonik asit üretmek için protokatekuat dioksijenaz ile protokatekuatta bir halka açılımı olur. Bu ara molekül oluşturulduktan sonra ise, hızlı bir şekilde β - ketoadipat molekülüne okside edilir ve ardından TCA (trikarboksilik asit) döngüsüne katılır (Şekil 2.11) (Singh et al., 2015).



Şekil 2.11. Fitalat esterlerinin parçalanması için önerilen yolizleri. Yolizleri ile ilgili olan enzimler (a) esteraz, (b) izofitalat 3, 4 - dioksijenaz, (c) fitalat 3, 4 - dioksijenaz, (d) fitalat 4, 5 - dioksijenaz, (e) terefitalat 1, 2 - dioksijenaz, (f) izofitalat 3, 4 - dihidrodiol dehidrogenaz, (g) fitalat 3, 4 - dihidrodiol dehidrojenaz, (h) fitalat 4, 5 - dihidrodiol dehidrojenaz, (i) terefitalat 1, 2 - dihidrodiol dehidrojenaz, (j) 3, 4 - dihidroksifitalat dekarboksilaz, (k) 4, 5 - dihidroksifitalat dekarboksilaz ve (l) protokatekuat dioksijenaz'lardır (Singh et al., 2015).

2.6.2. Diaromatik hidrokarbonlar

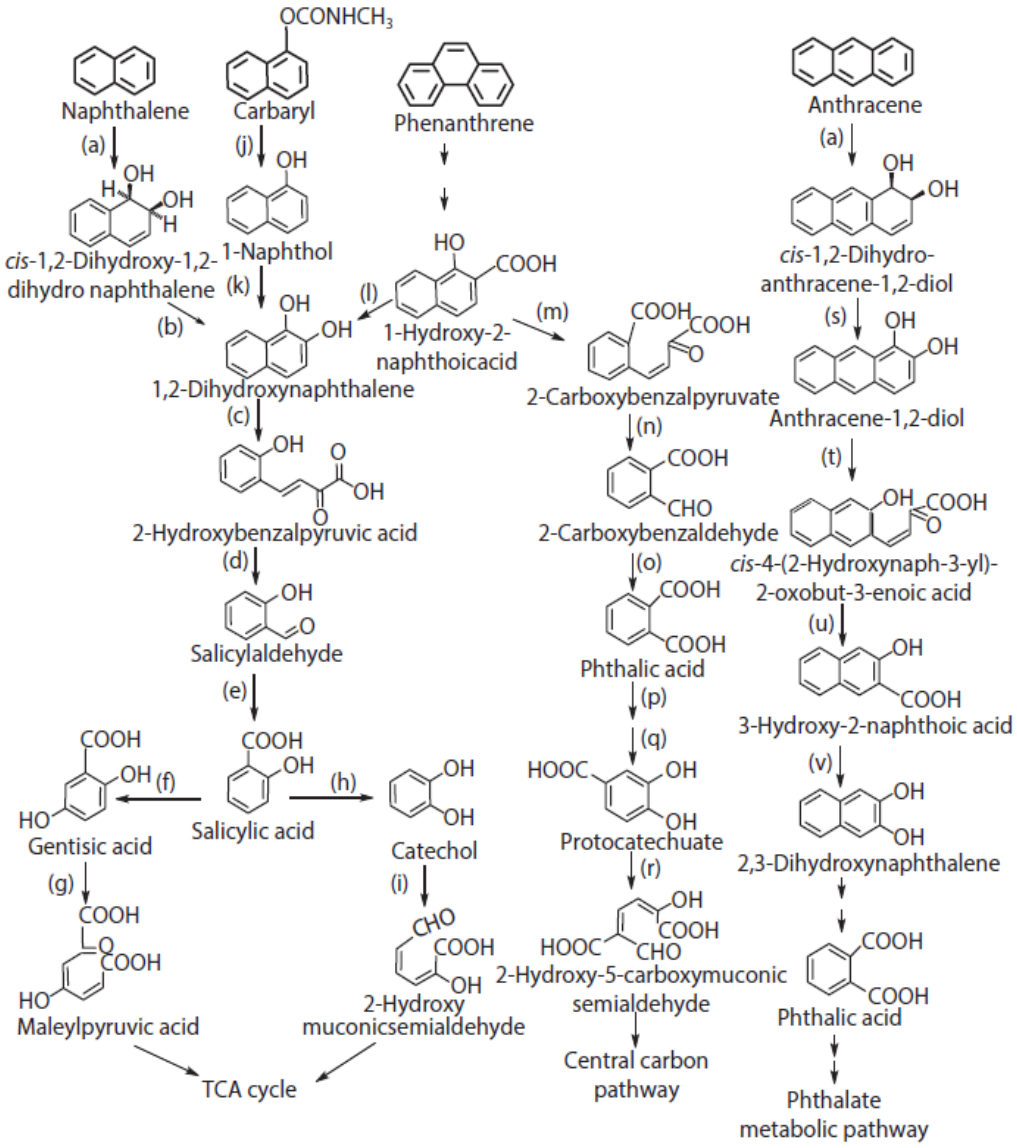
2.6.2.1. Naftalen

Naftalen doğada yaygın şekilde bulunan ve moleküler yapısında iki aromatik halka içeren bir hidrokarbondur. Genellikle, naftalen molekülü karbamat insektisitler, yüzey aktif maddeler, reçineler, boya ara maddesi, sentetik bronzlaştırıcı ürünler, güve kovucu vs. gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Doğada bulunan naftalenin ana kaynakları, dizel, jet yakıtı ve sigara dumanı olduğu kadar, tam olarak yanmamış endüstriyel, evsel ve doğal ürünlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar naftaleni tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir (Patel and Gibson, 1974; Barnsley, 1975; 1976a; 1976b; 1983a; Patel and Barnsley, 1980; Mahajan et al., 1994; Singh et al.'dan, 2015). Bakterilerde naftalenin parçalanması, halkalardan birinde çift hidroksilasyon reaksiyonu ile başlar. Bu reaksiyon naftalenden dihidrodiol ara molekülü oluşturur (Şekil 2.12).

Naftalen parçalanmasında ilk adım [(+) – cis – 1 (R), 2 (S) – dihidroksi - 1, 2 - dihidronaftalen oluşumu] çoklu komponentli naftalen dioksijenaz (NDO) ile gerçekleşmektedir. Bu enzim oksijenaz, ferrodoksin ve redüktaz komponentlerinden oluşmaktadır. NDO'nun oksijenazı α- ve β- alt birimlerden oluşmaktadır. α-alt birimi bir Rieske [2Fe-2S] merkezi ve aktif bölgesinde mononükleer demir içermektedir. NAD(P)H'tan gelen elektronlar redüktaz ve ferrodoksin komponentleri vasıtasıyla NDO'ya aktarılır (Kauppi et al., 1998; Karlsson et al., 2003; Singh et al.'dan, 2015).

Bakteriyel naftalen oksidasyonunda ikinci adım *cis* – 1, 2 – dihidroksi - 1, 2 – dihidronaftalenin 1, 2 – dihidroksinaftalene dönüştürülmesi basamağıdır. Bu reaksiyon NAD- bağımlı naftalen dihidrodiol dehidrogenaz enzimi ile katalizlenir (Patel and Gibson, 1974). 1, 2 – dihidroksinaftalen, 1, 2 – dihidroksinaftalen dioksijenaz enzimi tarafından açılarak *cis* – 2′ - hidroksibenzalpirüvik aside dönüştürülür (Patel and Barnsley 1980; Singh et al.'dan, 2015). Bu molekül ise daha ileri aşamada aldolaz enzimi aktivitesi ile salisilaldehit aracılığıyla salisilata metabolize edilir. Çoğu durumda, salisilat ara molekülü katekole okside edilir ki bu substrat *meta*- ya da *orto*- açılım yol izi ile halka bölünmesini sağlayarak sırasıyla

ya 2 – hidroksimukonik semialdehid ya da *cis, cis* – mukonik asit meydana getirir (Barnsley, 1976; Singh et al.'dan, 2015). Aynı zamanda, salisilat metabolizması gentisik asit (2, 5 – dihidroksi benzoat) yoluyla da meydana gelmektedir (Şekil 2.12. Monticello et al., 1985; Yen and Serdar, 1988; Singh et al.'dan, 2015).



Şekil 2.12. Naftalen, karbaril, fenantren ve antrasen için parçalanma yolizleri. Parçalanma yoliziyle ilişkili enzimler (a) naftalen dioksijenaz, (b) *cis*- dihidrodiol naftalen dehidrojenaz, (c) 1, 2-dihidroksinaftalen dioksijenaz, (d) *trans*- *o*- hidroksibenzilidenpirüvat hidrataz – aldolaz, (e) salisilaldehit dehidrojenaz, (f) salisilat 5- hidroksilaz, (g) gentisat 1, 2- dioksijenaz, (h) salisilat 1-hidroksilaz, (i) katekol 1, 2- dioksijenaz, (j) karbaril hidrolaz, (k) 1- naftol – 2- hidroksilaz, (l) 1-hidroksi – 2- naftoik asit hidroksilaz, (m) 1- hidroksi – 2- naftoik asit dioksijenaz, (n) 2-karboksibenzalpirüvat hidrataz – aldolaz, (o) 2- karboksibenzaldehit dehidrojenaz, (p) fitalat 4, 5-dioksijenaz, (q) dekarboksilaz, (r) protokatekuat 4, 5- dioksijenaz, (s) *cis*- 1, 2- dihidronaftalen

dehidrojenaz, (t) antrasen 1, 2- diol 1, 2- dioksijenaz, (u) cis – 4- (2- hidroksinaf – 3 – yl) – 2- okzobut – 3- enoat hidrataz – aldolaz ve (v) 3- hidroksi - 2- naftoat hidroksilaz (Singh et al., 2015).

2.6.3. Poliaromatik hidrokarbonlar

2.6.3.1. Fenantren

Fenantren toprak, nehir ağzı delta suları, sedimentler ve diğer karasal bölgelerde sıklıkla bulunur. Deniz diyatomları, gastropodlar, kabuklu hayvanlar ve balıklar gibi sucul canlılara karşı toksik etkileri olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, insanda da ciltte ışığa duyarlılık, hafif alerjik durumlar, gap junction inhibitörlüğü ve kardeş kromatid değişimlerinin indükleyicisi olarak etki gösterdikleri bilinmektedir (Mastrangelo et al., 1996; Singh et al.'dan, 2015). Doğada birçok bakterinin fenantreni tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. Fenantren metabolizması, fenantren dioksijenaz vasıtasıyla halkanın çift hidroksilasyonu ile başlar ve akabinde *cis*-3,4-dihidroksi-3,4-dihidrodihidroksi fenantren oluşur. Bir dehidrogenaz vasıtasıyla dihidrodiol görev alarak 3,4-dihidroksifenantren oluşturulur. Bu ara molekül devamında 1 – hidroksi – 2 - naftonik (1-H2NA) aside dönüşür (Barnsley, 1983b; Doddamani and Ninnekar, 2000; Deveryshetty and Phale, 2009; Singh et al.'dan, 2015). Bu yol izi fenantren parçalanmasının genel uyarıcı yol izi olarak bilinmektedir. 1-H2NA molekülünün iki ana parçalanma yolağı çalışılmaktadır:

Fitalat yolağında, 1-H2NA bir dioksijenaz vasıtası ile halka açılımına uğrayarak 2-karboksibenzalpirüvat oluşur (Kiyohara et al. 1976; Barnsley 1983b; Iwabuchi and Harayama, 1998; Deveryshetty and Phale, 2009, 2010; Singh et al.'dan, 2015) ve devamında ise, *o* - fitalat ve protokatekuik asite metabolize olur ki bunlar sonraki basamakta piruvat formuna dönüştürülen moleküllerdir (bkz. Şekil 2.12).

Naftalen yolağında ise, 1 - H2NA 1,2 – dihidroksinaftalen'e dönüştürülür (Evans et al. 1965; Deveryshetty and Phale, 2010; Singh et al.'dan, 2015). Bu molekül ise sonraki adımlarda salisilaldehid aracılığıyla salisilik aside dönüştürülür. Salisilik asit sonraki basamakta gentisat ya da katekole metabolize edilir. Bu ara moleküller ise TCA döngüsü aracıları olabilmeleri için halka açılımına uğrarlar (bkz. Şekil 2.12).

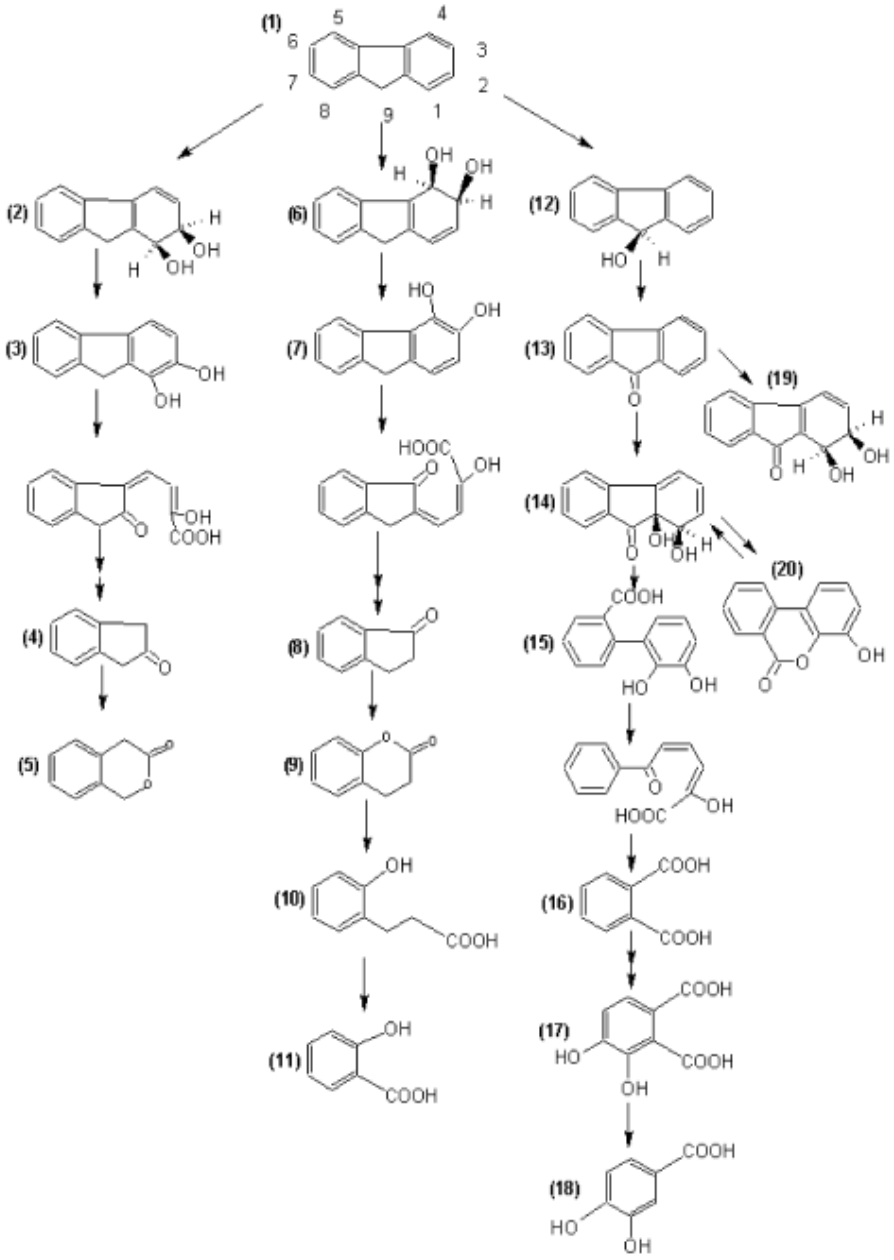
2.6.3.2. Fluoren

Fluoren fosil yakıtların ana bileşenlerinden birisidir. Atmosferde, tatlı suda ve hem nehir hem de deniz sedimentlerinde bulunabilmektedir. Fluoren için üç ana parçalanma yolizi önerilmiştir. Bu yolizlerinden ikisi 1, 2 veya 3, 4 pozisyonunda bir dioksijenasyon ile başlamaktadır. Karşılığında cis dihidrodioller dehidrojenasyona uğrayarak ardından *meta* – açılımı gerçekleşir. Aldolaz reaksiyonundan sonra ve halka birleşim ürününün dekarboksilasyonu indanonların üretimi ile sonuçlanır. İndanonlar biyolojik bir Baeyer – Villiger reaksiyonu için substrat olarak iş görürler. Reaksiyondan aromatik laktonlar 3 – izokromanon ve 3, 4 – dihidrokomarin elde edilir. Sonradan gerçekleşen enzimatik hidroliz 3 – (2 - hidroksifenil) propiyonik asit üretimi ile sonuçlanır. Bu ara molekül katekol vasıtası ile daha ileri seviyede metabolize olur. Bu yolizi ile merkezi metabolizma ile bağlantı kurulmuş olur (Peng et al., 2008).

Fluoren parçalanmasında üçüncü yol ise, 9 – fluorenol üretilmesi için C9 pozisyonunda bir monooksijenasyon reaksiyonu ile başlar. 9 – fluorenol daha sonra 9 – fluorenona dehidrojenlenir (Şekil 2.13) (Peng et al., 2008). 9 – fluorenonun açısal dioksijenasyonu 1, 1 a – dihidroksi – 1 – hidro – 9 – fluorenon oluşumuna olanak sağlar. Bu ara molekül 2′ – karboksi – 2, 3 – dihidroksibifenile dehidrojenlenir. Daha sonrasında spontan olarak 8 – hidroksi – 3, 4 – benzokomarine dönüştürülür. Ardından, metabolit bifenil parçalanma yolizinin analoğu olan bir yolizi ile katalizlenir. Bu yolizi fitalat oluşumuna neden olur (Peng et al., 2008).

Florenin fitalata parçalanmasında rol alan genler flören parçalayan *Terrabacter sp.* suş DBF63'te karakterize edilmiştir. 14,7 kb'lık bir bölge flnRB – dbfA1A2 – flnED1 – ORF16 genlerini içermektedir. Bu genler DBF63 suşunda bulunan floren parçalanmasını gerçekleştiren enzimlerdir. Başlangıçta hem fluorende hem de 9 – fluorenonda gerçekleşen saldırı açısal dioksijenaz (DBfA1 ve DbfA2) tarafından katalizlenir. Katalizlenme sonucunda sırasıyla 9 – fluorenol ve 1, 1a – dihidroksi – 1- hidro – 9 – fluorenon oluşur. FlnB proteini hem 9 – fluorenole hem de 1, 1a – dihidroksi – 1 – hidro – 9 – fluorenona karşı aktivite sergiler. Aktivite ile sırasıyla 9 – fluorenon ve 2′ - karboksi – 2, 3 – dihidroksibifenil üretilir. FlnD1 bir heterodimerik proteindir ve flnD1 ile ORF16 tarafından kodlanır. Bu enzim sınıf

III iki alt birimli ekstradiol dioksijenazların bir üyesidir. FlnE fitalat eldesi sağlayan meta açılım ürünleri için bir serin hidrolaz olarak tanımlanmıştır (Peng et al., 2008).



Şekil 2.13. Fluoren için önerilen aerobik bakterilerin katabolik yolizleri. Yolizlerinde gösterilen bileşikler; Fluoren (1), *cis* – 1, 2 – dihidroksi – 1, 2 – dihidrofluoren (2), 1, 2 – dihidroksifluoren (3), 2 – indanon (4), 3 – izokromanon (5), *cis* – 3, 4 – dihidroksi – 3, 4 – dihidrofluoren (6), 3, 4 – dihidroksifluoren (7), 1 – indanon (8), 3, 4 – dihidrokomarin (9), 3 – (2 – hidroksifenil) propionik asit (10), salisilik asit (11), 9 – fluorenol (12), 9 – fluorenon (13), 1, 1a – dihidroksi – 1 – hidro – 9 – fluorenon (14), 2′ - karboksi – 2, 3 – dihidroksibifenil (15), fitalik asit (16), 4, 5 – dihidroksifitalat (17), protokatekuik asit (18), 1, 2 – dihidro – 1, 2 – dihidroksi – 9 – fluorenon (19) ve 8 – hidroksi – 3, 4 – benzokomarin (20) (Peng et al., 2008).

2.6.3.3. Antrasen

Antrasen dayanıklı ve toksik bir PAH olarak boyalarda, ahşap koruyucularda, ve insektisitlerde kullanılmaktadır. Antrasen birçok Gram – negatif, Gram – pozitif bakteriler ile funguslar tarafından parçalanmaktadır. Antrasen parçalanma yol izi aromatik halkanın bir hidroksilasyonu ile *cis* - 1, 2 – dihidroantrasen - 1, 2 - diol eldesi ile başlar. Bu ara molekül antrasen - 1, 2 - diol'e dönüştürülür ki bu molekül *meta* pozisyonunda açılarak 4 - (2 – hidroksinaf – 3 - yl) – 2 – okzobut – 3 - enoat molekülüne dönüşür. Gram negatif bakterilerde, bu bileşik spontan olarak 6, 7 - benzokomarin üretmek için düzenlenir ya da 3 – hidroksi – 2 – naftoat'a dönüştürülür. İlerleyen basamakta 2, 3 – dihidroksinaftalen yoluyla fitalat molekülüne dönüştürülür. *M. vanbaalenii* PYR-1 gibi diğer bakteriler antrasen 1, 2 – diol'den 1 – metoksi – 2 – hidroksiantrasen üretebilmektedir. Bu ara molekülden ise reaksiyon üçüncü bir yol izine ayrılır. 1, 2 – hidroksilasyon yoluyla başlangıç antrasen parçalanmasına ek olarak, *M. vanbaalenii* PYR-1 antrasenin 9, 10 – hidroksilasyonunu gerçekleştirerek antrasen – 9, 10 – dihidrodiol üretir ki bu molekül ise sonrasında 9, 10 – dihidroksiantrasen'e dönüştürülür ve spontan olarak 9, 10 – antrakinon molekülüne okside olur (Moody et al., 2001; Singh et al.'dan, 2015; Peng et al., 2008).

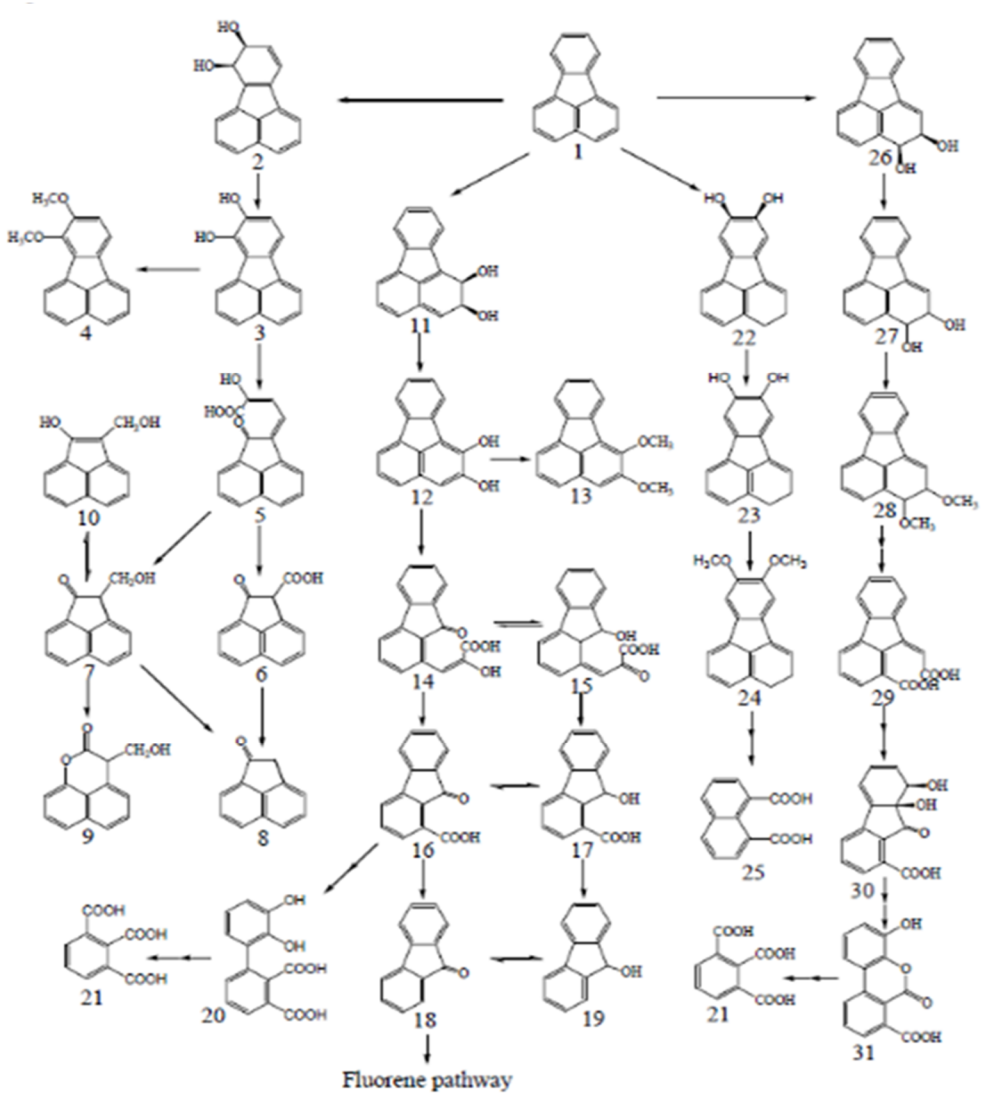
2.6.3.4. Fluoranten

Fluoranten dört halkalı ve çevrede en sık bulunan PAH'lardan biridir. *Burkholderia*, *Pasteurella*, *Rhodococcus* ve *Stenotrophomonas* genuslarına ait suşlar fluoranteni parçalamada iş görebilmeleri için izole edilmiştir. Bu bakteri genusları aynı zamanda fluoranteni tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Ayrıca *Mycobacterium* fluoranten, piren ve benzo[a]piren gibi yüksek moleküler ağırlıklı PAH'ları mineraliz eden ve oldukça kapsamlı çalışılan, ayrıca iyi bilinen bir mikroorganizmadır (Seo et al., 2009). *M. vanbaalenii* PYR-1 mikroorganizmasının fluoranteni parçalama yolizi son yıllarda tanımlanmıştır (Peng et al., 2008). Potansiyel izomerlerini de içeren 37 fluoranten metaboliti kültür ortamından izole edilerek HPLC, GC – MS ve UV absorbsiyonuna göre analiz edilmiştir. Fluorantenle ilişkili olabilecek 53 enzim tanımlanmıştır. Fluoranten parçalanmasıyla ilişkili mono- ve dioksijenasyon reaksiyonları ile başlatılan dört metabolik yolizi önerilmiştir. Dioksijenaz saldırısı fluorantenin C1, 2, C2, 3 ve C7,

8 pozisyonlarında gerçekleşir (Peng et al., 2008; Seo et al., 2009). C7, 8 yolu ekstradiol ve intradiol halka açılımı tarafından üretilen asenaftilen tipi metabolitler aracılığıyla fluoranteni okside ederken, C1, 2 ve C2, 3 dioksijenasyon yolu fluoren tipi metabolitler aracılığıyla fluoranteni parçalar. Dioksijenasyonun esas bölgesi C2, 3 dioksijenasyon yoludur. Bu yolizi 9 – fluorenon – 1 – karboksilik asit ve fitalat aracılığıyla başlangıç halka hidroksilleyici oksijenazlar, NidA3B3, fluorantenin fluoranten *cis* – 2, 3 – dihidrodiol ile birlikte 18 enzimatik adımda gerçekleşir. CYP51'i de içeren 6 sitokrom P450 geni fluorantenin monooksijenasyonundan sorumludur. Sonrasında oluşan monooksijenasyon ürünü, halka hidroksilleyici oksijenazların katalizinde ve *cis* - ya da *trans* – dihidrodiollerin kimyasal dehidrasyonunda monohidroksifluorantenlere dönüştürülür (Peng et al., 2008).

C1, 2 ve C7, 8 – dioksijenasyon reaksiyonları sırasıyla *cis* – 1, 2 – ya da *cis* – 7, 8 – fluoranten dihidrodiol üretir. 7, 8 – dihidroksi fluoranten daha ileriki basamaklarda meta – açılımı geçirerek 2 – hidroksil – 4 – (2 – okzo – 2*H* – asenaftilen – 1 – ylinden) – but – 2 – enoik asit, 2- hidroksimetil – 2*H* – asenaftilen – 1 – on ve 2 – okzo – asenaften – 1 – karboksilik asit vasıtasıyla 1 – asenaftenon ve 3 – hidroksimetil – 3*H* – benzo[*de*] – kromen – 2 – on'a dönüşür. Yapılan bir çalışmada ise, C7 pozisyonunda *o*- metilasyon ile 7, 8 – dihidroksifluoranten oluşturmak için geçici bir *cis* – 7, 8 – fluoranten dihidrodiol dehidrojenasyon geçirdiği gösterilmiştir. Bu molekül 7 – metoksi – 8 – hidroksi – fluoranten oluşturabilmektedir. Ama başka bir çalışmada ise, *Mycobacterium sp*. JS14 suşunda fluorantenin C1, 2 – C2, 3 – C7, 8 ve C8, 9 pozisyonunda dört olası başlangıç dioksijenasyonunun gerçekleştiği ve dört olası dimetoksifluoranten molekülünün oluştuğu önerilmiştir. 1, 2 – dihidroksi – fluoranten aynı zamanda *meta* - açılımı ile daha ileri olarak parçalanmaktadır. *Meta* – açılımı; 9 – fluorenon – 1 – (karboksi – 2 – hidroksi – 1 - propenol) ve 9 – fluorenon – 1 – karboksilik asit vasıtasıyla 9 – fluorenon dönüşümüne neden olmaktadır. Bu iki molekül protonlanma ile sırasıyla 9 – fluorenol – 1 – karboksi – 3 – propenil – 2 – on ve 9 – fluorenol – 1 – karboksilik asite dönüştürülebilir. 9 – fluorenonun 9 – fluorenole dönüşümü de mümkündür (Peng et al., 2008; Seo et al., 2009).

Yapılan başka bir çalışmada ise, fluorantenin 2, 3 – dioksijenasyonu gösterilmiştir. Bu dioksijenasyonda *cis* – 2, 3 – fluoranten dihidrodiol, 9 – karboksimetilen – 9*H* – fluoren – 1 – karboksilik asit, *cis* – 1, 9a – dihidroksi – 1 – hidrofluoren – 9 – on – 8 – karboksilik asit, 4 – hidroksibenzokromen – 6 – on – 7 – karboksilik asit ve benzen 1, 2, 3 – trikarboksilik asit olmak üzere beş metabolit bulunmuştur. Fluoranten dihidrodiol, orto – açılımı yoluyla 9 – karboksimetilen – 9*H* – fluoren – 1 – karboksilik asit, *cis* – 1, 9a – dihidroksi – 1 hidrofluoren – 9 – on – 8 – karboksilik asit ve 4 – hidroksibenzokromen 6 – on – 7 – karboksilik asit aracılığıyla benzen – 1, 2, 3 – trikarboksilik asite dönüşür. Diğer başka bir çalışmada ise, 8, 9 – dimetoksifluoranten saptanmasıyla fluorantenin C8, 9 pozisyonunda dioksijenasyon reaksiyonun varlığı önerilmiştir. 1 – D SDS PAGE, 2 – D SDS PAGE ve nano – LC / MS / MS kullanılarak *Mycobacterium sp*. JS14 suşunda fluoranten katabolizması ile ilişkili 25 protein keşfedilmiştir (Seo et al., 2009).



Şekil 2.14. Fluoranten için önerilen bakteriler tarafından gerçekleştirilen katabolik yolizleri. Yolizlerinde gösterilen bileşikler; fluoranten (1), cis - 7, 8 - fluoranten dihidrodiol (2), 7, 8 – dihidroksifluoranten (3), 7, 8 - dimetoksifluoranten (4), 5, 2 – hidroksi – 4 - (2 – okzo - 2H – asenaftilen – 1 - yliden) – but – 2 - enoik asit (5), 2 – okzo – asenaften – 1 - carboksilik asit (6), 2 - hidroksilmetil - 2H – asenaftilen – 1 – on (7), 1 – asenaftenon (8), 3 – hidroksimetil - 3H – benzo [de] kromen – 2 – on (9), 2 – hidroksimetilasenaftilen – 1 – ol (10), cis – 1, 2 fluoranten dihidrodiol (11), 1, 2 – dihidroksi – fluoranten (12), 1, 2 dimetoksifluoranten (13), 9 – fluorenon – 1 - (karboksi – 2 – hidroksi – 1 - propenol) (14), 9 – fluorenol – 1 – karboksi – 3 – propenil – 2 – on (15), 9 – fluorenon – 1 - karboksilik asit (16), 9 – fluorenol – 1 - karboksilik asit (17), 9 – fluorenon (18), 9 – fluorenol (19), 2′,3′ dihidroksibifenil - 2, 3 - dikarboksilik asit (20), benzen - 1, 2, 3 - trikarboksilik asit (21), cis - 8, 9 - fluoranten dihidrodiol (22), 8, 9 – dihidroksi – fluoranten (23), 8, 9 dimetoksifluoranten (24), naftalen - 1, 8 - dikarboksilik asit (25), cis - 2, 3 - fluoranten dihidrodiol (26), 2, 3 – dihidroksi – fluoranten (27), 2, 3 – dimetoksifluoranten (28), 9 – karboksimetilen - 9H – fluoren – 1 - karboksilik asit (29), cis - 1, 9a – dihidroksi – 1 – hidrofluoren – 9 – on – 8 - karboksilik asit (30), 4 – hidroksibenzokromen – 6 – on – 7 - karboksilik asit (Seo et al., 2009).

2.6.3.5. Piren

Piren dört benzen halkalı bir PAH'tır. Genellikle gazifikasyon işlemlerinde ve diğer tamamlanmamış yanma işlemleri sırasında açığa çıkan bir yan üründür (Seo et al., 2009). Piren aynı zamanda yüksek moleküler ağırlıklık PAH'lar içerisinde model bi hidrokarbondur. Çünkü yapısal olarak çoğu karsinojenik PAH molekülüne benzemektedir (Peng et al., 2008). Birçok bakterinin piren üzerinde büyüdüğü ve pireni mineralize ettiği ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Ana mikroorganizma grubunu *Mycobacterium* ve *Rhodococcus* gibi nokardiyoform aktinomisetler oluşturmakla birlikte, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cephacia, Cycloclasticus sp.* P1, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas sp.* VKM B-2434, *Sphingomonas paucimobilis* ve *Stenotrophomonas maltophila* gibi bakterilerde piren parçalamasını gerçekleştirmektedirler (Peng et al., 2008; Seo et al., 2009).

Pirenin parçalanması için çoklu metabolik yolizleri *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 suşunda çalışılmıştır ve iki tipik monooksijenasyon ve dioksijenasyon reaksiyonlarının iş gördüğü gösterilmiştir (Peng et al., 2008). Yapılan bir çalışmada Heitkamp ve arkadaşları UV, kızılötesi, kütle spektrometresi, NMR, ve GC gibi çoklu analiz metodlarını kullanarak halka oksidasyonu ürünü olarak üç molekül saptamışlardır. Bunlar; piren – *cis* – 4, 5 – dihidrodiol, piren – *trans* – 4, 5 – dihidrodiol ve pirenol'dür. Bunların yanında dört adet halka bölünme ürünü saptamışlardır. Bu ürünler ise, 4 – hidroksiperinaftenon, 4 – fenantroik asit, fitalik asit ve sinnamik asittir. Dioksijenaz enzimi ile üretilen piren – cis - 4, 5 – dihidrodiol ile monooksijenaz tarafından üretilen piren – trans - 4, 5 – dihidrodiol piren üzerinde çoklu başlangıç saldırılarının olduğunu desteklemektedir (Seo et al., 2009).

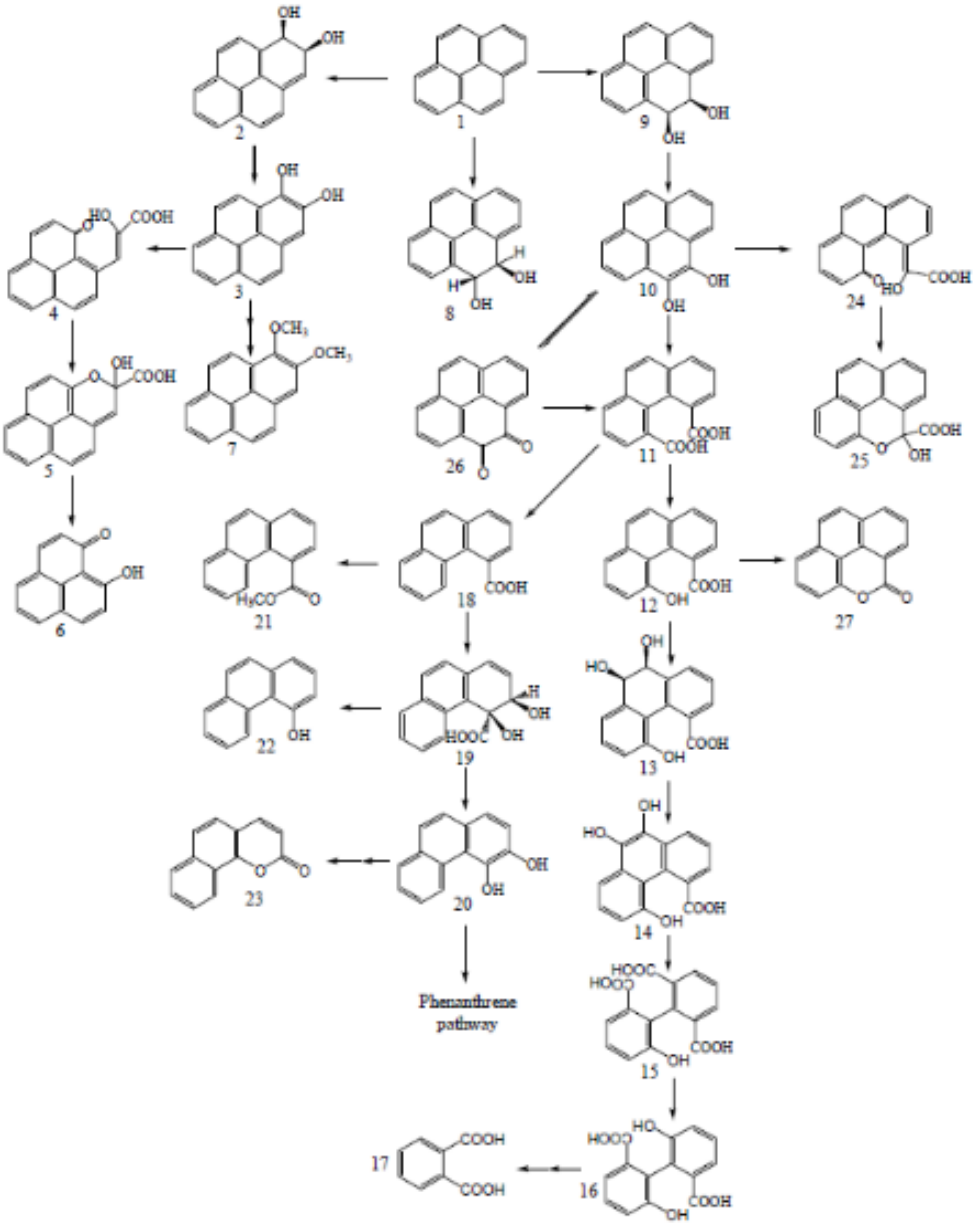
Pirenin C1,2 pozisyolarındaki dioksijenasyon reaksiyonları ile oluşan piren 1, 2 – diol molekülü, *cis* – 2 – hidroksi – 3 – (perinaftenon – 9 – yl) – propenik asit ve 2 – hidroksi – 2*H* – 1 – okza – piren – 2 – karboksilik asit aracılığıyla 4 – hidroksiperinaftenon molekülüne metabolize edilir. Kim ve Freeman ise piren – 1, 2 – diol'ün bir alt ürünü olarak 1, 2 dimetoksipiren molekülünü bulmuşlardır. Piren – 4, 5 – diol *orto* - açılımı ile fenantren – 4, 5 – dikarboksilik asite parçalanır. Bu molekül fenantren – 3, 4 – diol yolizi ve 6, 6′ - dihidroksi – 2, 2′ - bifenil –

dikarboksilik asit yolizi yoluyla daha ileri olarak metabolize edilir. Piren – 4, 5 – diolün meta – açılımı, 2 – hidroksi – 2 – (fenantren – 5 – on – 4 – enil) – asetik asit aracılığıyla 5 – hidroksi – 5*H* – 4 – okza – piren – 5 – karbokslilik asit oluşumuna sebep olur. Yeni bir metabolit olan 6, 6′ - dihidroksi – 2, 2′ - bifenil – dikarboksilik asit Vila ve arkadaşları tarafından *Mycobacterium sp.* suş AP1 tarafından gerçekleştirilen piren parçalanmasında tanımlanmıştır. Başka bir çalışmada ise *Mycobacterium sp.* KMS suşunda piren parçalanmasının başlangıç adımlarında piren 4 – 5 – dion oluşumu ve tanımlanmış hemen tüm enzimlerin gerekli olduğu belirtilmiştir (Seo et al., 2009).

Genomik ve proteomik veriler ışığında 27 enzim tanımlanmıştır. Bu enzimler pirenin tamamen parçalanması için gerekli olan yolizinin oluşmasında gereklidir. Proteomik analizlerde, yolizi içindeki 18 enzimin iki kattan daha fazla upregüle olduğunu göstermektedir. Bu da piren ile büyüyen mikroorganizmanın peptidlerinde artış olduğunu göstermektedir. NidAB2, MvanDraft_0817/0818, PhtAaAb ve NidA3B3 dioksijenaz tarafından katalizlenen dört halka hidroksillenme adımı vardır. Bu dört adım için ferrodoksin redüktaz (PhtAc) ve ferrodoksin redüktaz (PhtAd) olarak adlandırılan iki adet elektron aktarım komponenti bulunmuştur (Peng et al, 2008).

Dioksijenaz NidAB2'nin β ve α alt birimlerinin gen düzenlenmesi diğer bakterilerde nadiren görülmektedir. NidA ve NidB proteinlerinin *Nocardioides sp*. suş KP7 ve *Pseudomonas sp*. suş NCIMB12038'deki eş işlevli olan ilgili enzimlere % 40 – 56 arasında bir benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Halka açılımı yapan oksijenazların (NidAB2, MvanDraft_0818/0818 ve PhtAaAb), dihidrodiol dehidrojenazın (MvanDraft_0815) ve halka açılımı yapan dioksijenazın (MvanDraft_3242) terminal alt birimlerinin üç kopyası pirende büyüyen hücrelerde artış göstermiştir. Ancak, salisilat yoluyla 1 – hidroksi – 2 – naftonat parçalanmasını gerçekleştiren 1 – hidroksi – 2 – naftoat hidroksilaz gibi enzimler için ORF'ler saptanmamıştır. Fitalatların oksidasyonu için opsiyonel yolaklarda bulunan ve

protokatekuatların *meta* – açılımını yapan fitalat 4, 5 – dioksijenaz ve protokatekuat – 4, 5 – dioksijenaz genom dizisinde saptanmamıştır (Peng et al, 2008).



Şekil 2.15. Önerilen bakteriler tarafından gerçekleşen piren katabolik yolizleri. Yolizlerinde gösterilen bileşikler; piren (1), piren – *cis* - 1, 2 – dihidrodiol (2), piren - 1, 2 – diol (3), 2 – hidroksi – 3 - (perinaftenon – 9 – yl) - propenik asit (4), 2 - hidroksi - 2*H* – 1 – okza – piren – 2 - karboksilik asit (5), 4 – hidroksiperinaftenon (6), 1, 2 – dimetoksipiren (7), piren – *trans* - 4, 5 – dihidrodiol (8), piren – *cis* - 4, 5 – dihidrodiol (9), piren - 4, 5 – diol (10), fenantren - 4, 5 - dikarboksilik asit (11), 4 - karboksifenantren- 5 – ol (12), 4 – karboksi – 5 – hidroksi – fenantren - 9, 10 – dihidrodiol (13), 4 – karboksifenantren - 5, 9, 10 – triol (14), 2, 6, 6′ - trikarboksi - 2′ - hidroksibifenil (15), 2, 2′ - dikarboksi - 6, 6′ - dihydroxybiphenyl (16), fitalik asit (17), 4 - fenantroik asit (18), 3, 4 – dihidroksi - 3, 4 – dihidro – fenantren – 4 – karboksilik asit (19), fenantren - 3, 4 – diol (20), 4 - fenantroik asit metil ester (21), 4 – hidroksifenantren (22), 7, 8 – benzokomarin (23), 2 – hidroksi – 2 - (fenantren

– 5 – on – 4 - enil) - asetik asit (24), 5 – hidroksi - 5*H* – 4 – okzapiren - 5- karboksilik asit (25), piren - 4, 5 – dion (26), 4 – okza – piren – 5 – on (Seo et al., 2009).

2.7. PAH Biyoparçalanması İçin Başlangıç Enzimatik Aktivitelerde Etkin Olan Genler

Habe ve Omori (2003) geniş çapta Gram negatif ve bazı Gram pozitif bakterilerdeki aerobik bakteriyel PAH parçalanma yolizlerinde iş gören ve farklı metabolik adımlarla ilişkili enzimleri kodlayan genleri tanımlamışlardır. Genel olarak bakılacak olursa, başlangıçta oksijen molekülünün aromatik halka yapısına katılması ile PAH metabolizması başlamaktadır. Bu işlemi multikomponent aromatik halka açılımı yapan dioksijenaz (RHD) enzimleri gerçekleştirmektedir. Enzimatik reaksiyon cis – dihidrodiol molekülü oluşturur. Bu sistemde terminal dioksijenaz büyük bir α altbirimi ile küçük bir β alt biriminden oluşmaktadır (Cebron et al., 2008).

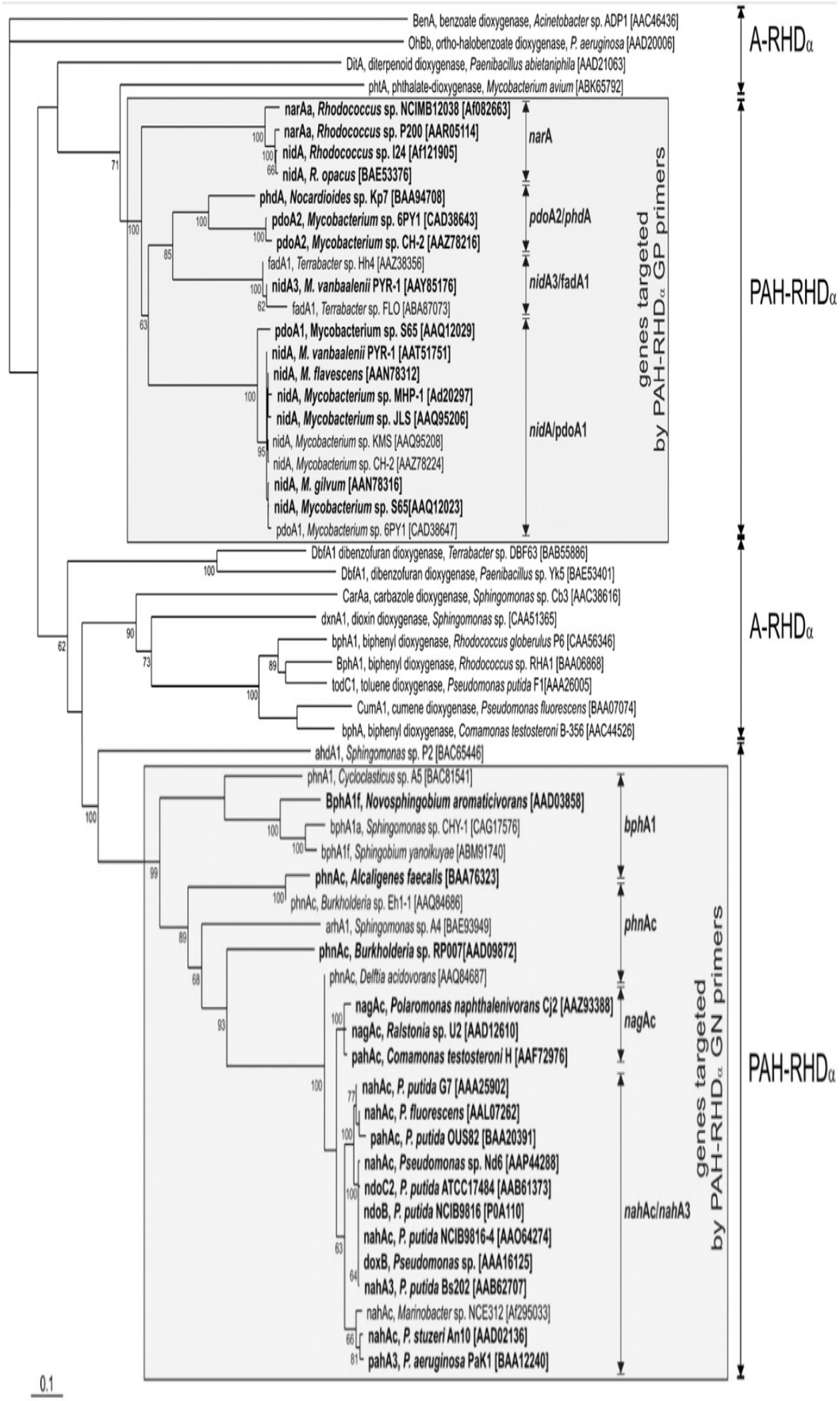
RHD gen ürünleri PAH parçalanmasında ilk adım olan başlangıç halka oksidasyonundan sorumludurlar. PAH – RHD'lerin katalitik domaini (α alt birimi) için kodlanan genler, PAH parçalanma potansiyellerinin belirlenmesi için biyomarker olarak farklı çevresel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenlerde dolayı RHD biyoçeşitliliğinin çalışılmasında bu α alt birim oldukça önemli bir araç olarak görülmektedir (Jurelevicius et al., 2012)

α alt birimi iki adet korunmuş bölge içermektedir. Bunlardan ilki [2Fe - 2S] Rieske merkezi ve diğeri ise mononükleer demir içeren katalitik domaindir. En çok çalışılan PAH dioksijenaz (PAH - RHD_{α}) *P. putida* NCIB 9816-4'te bulunan naftalen 1, 2 dioksijenaz enzimidir. Bu enzimin α alt birimi *nah*Ac geni tarafından kodlanmaktadır. Birçok Gram negatif bakteri benzer enzimleri kodlayan PAH - RHD_{α} genlerine sahiptir. Bu PAH - RHD_{α} genlerinin çoğu test edilen substrat bazında belirlendiğinden dolayı yanıltıcı isimlerle anılmaktadırlar. Habe ve Omori'nin (2003) de açıkladığı üzere, aslında RHD_{α} genleri içerisinde bulunan PAH - RHD_{α} genleri (*nah*Ac, *nah*A3, *nag*Ac, *ndo*B, *ndo*C2, *pah*Ac, *pah*A3, *phn*A3, *phn*Ac, *phn*A1, *bph*Ac, *bph*A1, *dnt*Ac ve *arh*A1) sıkı bir monofiletik küme oluşturmaktadır (Şekil 2.16.). Tanımlanan bu genler α – Proteobacteria (*Sphingomonas*), β – Proteobacteria (*Alcaligenes, Burkholderia, Commamonas,*

Polaromonas) ve γ – Proteobacteria (*Pseudomonas*) gruplarına ait tanımlanan bakteri gruplarının kromozomal ya da plasmid DNA'larında lokalize halde bulunmaktadırlar (Cebron et al., 2008).

Gr pozitif bakteriler hakkındaki genetik bilgiler az olmakla birlikte son yıllarda rapor edildiği üzere, bu grupta da benzer enzimatik dioksijenaz sistemlerinin olduğu ve bu genlerin filogenetik açıdan uzak genler tarafından kodlandığı bilinmektedir. Örneğin *Rhodococcus* türlerinin naftaleni tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıklarını ve bu bakterilerden *Rhodococcus sp*. NCIMB12038 suşundan elde edilen naftalen dioksijenaz enziminin yeni bir demir sülfür proteini izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Ayrıca bu demir sülfür proteinin α ve β alt birimlerini kodlayan *nar*Aa ve *nar*Ab genlerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir (Larkin et al., 1999; Habe and Omori'den, 2003). Yapılan benzerlik analizleri sonucunda, *nar*Aa ve *nar*Ab genlerinin ürünleri diğer bir dizi aromatik halka açılımı yapan dioksijenaz enzimlerinin α ve β alt birimleri ile % 31 – 39 arasında bir oranla aminoasit benzerliği göstermektedir (Habe and Omori, 2003).

Rhodococcus sp. NCIMB12038 suşundan elde edilen narAa geni ile *P. putida* 9816-4 suşundan elde edilen nahAc genleri arasında baştan sona düşük benzerlik olmasına rağmen, her iki gende Rieske [2Fe – 2S] gibi bir korunmuş anahtar katalitik bölgeye sahiplerdir. İki grup arasındaki β alt birimlerinin benzerlikleri ise α alt birimlerine biraz daha düşüktür. Kulakov et al.'un (2000) yaptığı çalışmada ise, cis – naftalen dihidrodiol dehidrogenaz enzimi kodlayan *nar*B geninin narAb geninin 290 bp downstream'inde bulunduğunu saptamışlardır. *Rhodococcus sp*. NCIMB12038 suşundan elde edilen *nar*B geni *P. putida* G7 suşundan elde edilen nahB geni ile %39'lük bir aminoasit benzerliği göstermektedir. *Rhodococcus sp*. NCIMB12038 suşundaki naftalen katabolik genlerinin üsülüne göre (*nar*AaAbB) *Pseudomonas* türlerinin nah genleri ile aynı oldukları bildirilmiştir (Habe and Omori, 2003).



Şekil 2.16. RHD bölgelerine özgü DNA dizileri ile çıkarılmış filogenetik ağaç modeli (Cebron et al., 2008).

Bunun dışında, Gr pozitif bakteriler farklı PAH substratlarına özgüllüğü olan dioksijenaz enzimleri için PAH – RHD_{α} allel genleri kodlamaktadırlar. Bu alleller dört küme altında sınıflandırılabilirler: *Rhodococcus* suşlarından *nar*A - benzeri gen, *Mycobacterium* suşlarından nidA / pdoA1 – benzeri genler, *Nocardioides* ve *Mycobacterium* suşlarından phdA / pdoA2 – benzeri genler ve *Mycobacterium* ve *Terrabacter* suşlarından nidA3 / fadA1 genleri (Şekil 2.16) (Cebron et al., 2008).

Sonuç itibariyle PAH oksidasyonundan sorumlu olan halka açılımı yapan dioksijenazlar (PAH – RHD'ler) her ne kadar benzerlik yönünden uzak olsalarda PAH parçalanma yol izinin ilk adımını katalizleyen Gr negatif bakterilerde *nah*, *nod*, *phn* ve Gr pozitif bakterilerde *nid*, *nir* ve *nar* gibi genler tarafından kodlanarak (Jurelevicius et al., 2012) benzer enzimatik özellikler gösteren α alt birimlerini oluşturmaktadırlar.

Gr negatif ve Gr pozitif bakterilerdeki benzer enzimleri kodlayan farklı genlerin varlığı, tüm bakteriyel kommünitelerin PAH parçalanma potansiyellerinin yeterli biçimde değerlendirilmesinde her iki gruba dikkatleri toplamak gerektiğinin önemini vurgulamaktadır (Cebron et al., 2008).

2.8. PAH'ların Biyouyumluluğu

Organik kirleticilerin biyoparçalanmasını etkileyen diğer parametre ise kirletici biyouygunluğudur. Özellikle toprak ve sedimentlerde bu parametre önemlidir (Boyd et al., 2008). Biyouyumluluk bir bileşiğin biyolojik asimilasyonuna ve olası toksisitesine erişebilirlik olarak tanımlanabilir (Alexander, 2000). Cuypers et al.'a (2002) atfen Gallego Blanco (2012) bir kimyasalın biyouyumluluğunun, mikrobiyal hücrelerin içsel aktivitesi ile ilişkili olan kütle transfer oranı olarak tanımlamaktadır. Buna göre sorpsiyon/desorpsiyon, difüzyon ve ayrışma gibi bir dizi fiziksel ve kimyasal işlemlerle kontrol edilmektedir.

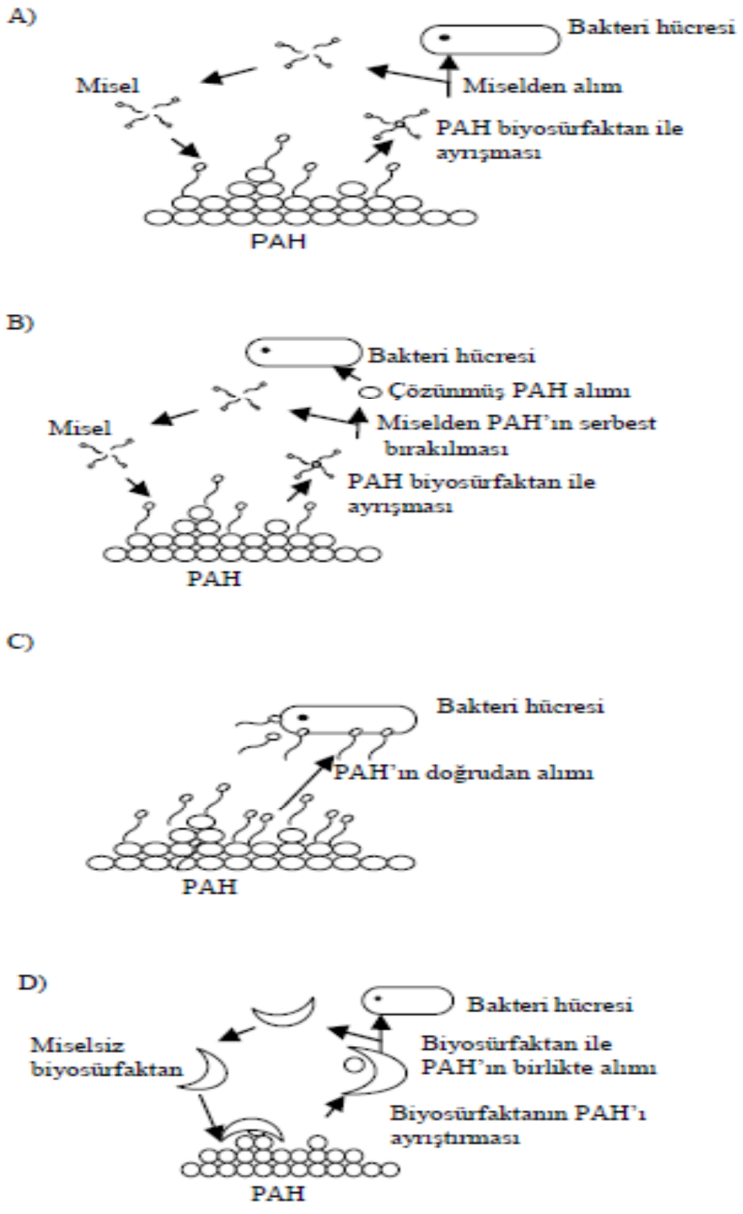
Toprak ve sedimentlerde yıllanmış olan kirleticilerin ekstrakte edilmesi ve biyoparçalanmaya uygun hale gelebilmesi düşüktür. Kirleticilerin mineralizasyonu genellikle bekleme süresinin bir fonksiyonu olarak düşmektedir. Yani kimyasalın

ortamda bekleme süresi arttıkça biyouygunlukta eş zamanlı olarak azalmaktadır (Hatzinger and Alexander, 1995; Boyd et al.'dan, 2008).

Bu girişten daha önceleri, toprak ve sedimentlerdeki PAH'ların biyoiyileştirilmesi genellikle PAH'ların iki aşamalı olarak kaybolması yani PAH parçalanmasının hızlı bir periyodunu takiben daha uzun ve yavaş bir parçalanma süreci gösterdiğine değinilmektedir (Beck et al., 1995; Cornelissen et al., 1997, 1998, Williamson et al., 1998; Gallego Blanco'dan, 2012). Bonten'e (2001) göre iyoiyileştirmenin başlangıç aşaması öncelikli olarak mikrobiyal parçalama kinetikleri (alım ve metabolizma) ile sınırlandırılırken; ikinci aşamada, PAH giderim oranı yavaş PAH ayrışması (hücreye transfer oranı) ile sınırlanmaktadır. Bu durum PAH'ların tam anlamıyla uzaklaştırılmasına engel olmaktadır. Sonuçta kalıntı şeklinde PAH konsantrasyonu iyileştirmeden sonra matrikste kalmaya devam edecektir. Çoğu zaman bu durum esasen PAH ile parçalayıcı mikroorganizma arasındaki biyouyumluluk ile ilişkilidir (Gallego Blanco, 2012).

Farklı mekanizmalar iki aşamalı ayrışmayı açıklamayı desteklemektedirler. Topraklarda, biyouyumluluğu negatif yönde etkileyen ana olgu yaşlanma ve havaya bağlı aşınmadır. Henüz el değmemiş ve bozulmamış ancak gizli ve erişilemeyen olarak kalan böyle bileşikler, yaşlanma ya da havaya bağlı aşınmanın yerine tecrit edilmiş bileşikler olarak adlandırılabilirler. Bu etki farklı mekanizmalar ile üretilir (Alexander, 1999; Gallego Blanco'dan, 2012); i) bileşik emilemez ama mikroorganizmaların parçalayacakları mesafeden biraz uzakta mikroporlar içerisinde kalırlar; mikrometre uzaklığındaki bir poröz içinde ya da akışkan olmayan çevredeki bu mesafe hücreler için önemlidir ve mikroorganizmalar bu mesafe dolayısıyla bileşikleri parçalayamazlar. ii) bileşikler mikroporlardan daha küçük olan nanoporlar içerisinde alıkonulur. Bu boyutlar bakteri küçük olsa bile penetre olup bileşiğe erişebilmesi için oldukça küçük boyutları ifade etmektedir. iii) bileşikler humik asitler veya ortamdaki diğer çevresel bileşenlerle moleküler türler oluşturmak için etkileşime girer. Aslına bakıldığında aynı bileşik ya da onun metabolitleri olmasına rağmen, yeni bileşiklerle kompleks oluşturduğu anda daha olumsuz etki yaratmakta ve eski durumuna göre bakteriler tarafından daha az parçalanabilir hal almaktadır (Weissenfels et al., 1992; Ortega – Calvo and Saiz – Jimenez, 1998; Gallego Blanco'dan, 2012).

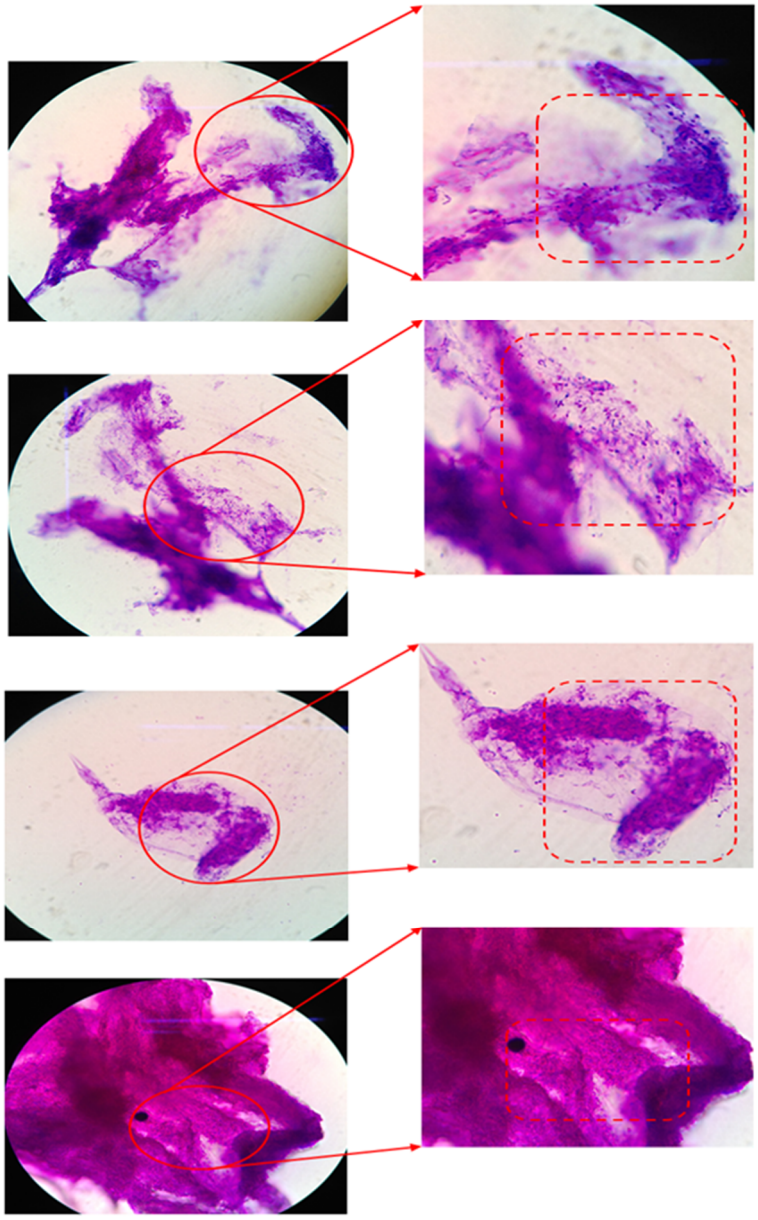
Mikrobiyal popülasyonlar substratları metabolize etmek için kütle transfer sınırlamalarının üstesinden gelmek adına çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan birisi, biyosürfaktan üretimidir ki bu sürfaktan hidrofobik kirleticilerin yüzey alanını arttırırlar, yüzeyden ayrılmalarını sağlarlar ve çözünürlüklerinde gözle görülür artış sağlarlar (Volkering et al., 1998). Biyosürfaktanlar çok çeşitli organizmalar tarafından geniş çeşitlilikte üretilmektedirler ve her sürfaktanın ise kendine özgü çok farklı kimyasal ve yüzey özellikleri vardır (Kanga et al., 1997; Page et al., 1999; Mulligan et al., 2001; Ron and Rosenberg, 2001; 2002; Abalos et al., 2004; Gallego Blanco'dan, 2012).



Şekil 2.17. Biyosürfaktanın PAH'ları ayrıştırma mekanizması (Gök ve Sponza, 2008)

Kirletici biyouyumluluğunu arttırmak için geliştirilen diğer bir mekanizma ise hücre yüzey özelliklerinin modifikasyonlarıdır. Mikroorganizmalar hücre yüzeyleri vasıtasıyla çevreleri ile etkileşim halinde bulunurlar ve kendilerine daha fazla hidrofobik özellik kazandırmak için yüzey özelliklerinde değişiklik yapabilirler. Özellikle hidrofobik faz varlığında büyüyen mikroorganizmalarda bu durum gözlenmektedir (Hanson et al., 1994; Stelmack et al., 1999; Norman et al., 2005; Gallego Blanco'dan, 2012). Arttırılmış hidrofobisite, lipopolisakkaridler, lipoteikoik asitler, lipoglikanlar, glikolipidler, yağ asitleri, nötral lipidler ya da fosfolipidler gibi hücreye bağlı yüzey aktif bileşiklerin varlığıyla sağlanmaktadır (Neu, 1996; Wick et al., 2002a; Obuekwe et al., 2009; Zhao et al., 2005; Gallego Blanco'dan, 2012).

Hücre yüzey özelliklerindeki farklılaşmalar aynı zamanda biyofilm oluşumunda, kolonizasyonda ve yayılmada anahtar belirleyiciler olarak iş görmektedirler. Bilindiği üzere biyofilmler toksik etkilerden korunma, metabolit değişimi, besine erişim ve lateral gen değişimi gibi birçok olay için mikrobiyal olarak hayatta kalmada avantaj sağlamaktadırlar (Stoodley et al., 2002; Gallego Blanco'dan, 2012). PAH kristalleri üzerindeki biyofilm oluşumu PAH kristallerinden bakteri hücrelerine difüzif kütle transferini destekleyebilir ve kirletici biyouygunluğuna etkide bulunabilir (Şekil 2.18). Bu durum biyofilm oluşumunun substrat biyouyumluluğunu optimize etmek için özel bir cevap olabileceğini işaret etmektedir (Wick et al., 2002b; Johnsen and Karlson, 2004; Gallego Blanco'dan, 2012).



Şekil 2.18. Işık mikroskobunda (100x büyütme ile) basit boyama sonucu PAH üzerine tutunmuş halde görülen bakteriler.

Sonuç olarak, biyoparçalanma durumlarında, mikroorganizmaların kirleticiler ile yakın temasta bulunması gereklidir. Bu sebeple, çok sayıda mikroorganizma grubu yüksek konsantrasyonlardaki kirleticilere ya da onların metabolitlerine doğru hareket etmeye imkan sağlayan kemotaktik mekanizmalar geliştirmişlerdir (Ortega – Calvo et al., 2003; Gallego Blanco'dan, 2012). Bununla ilgili olarak söylenebilecek diğer bir olgu ise; bazı bakteriler hareketli olmaları sayesinde kemotaktik cevap mekanizmaları ile kimyasalın bulunduğu yöne doğru hareket ederek onlardan faydalanmalarıdır. Ayrıca, funguslar gibi diğer bazı

mikroorganizmalar ise kirleticilerin bulunduğu ortamlarda filamentli olarak büyüyerek fayda sağlarlar (Gargouri, 2015)

2.9. Mikrobiyal Komünite Analizleri

Ortamda var olan hidrokarbonun parçalanması esnasındaki mikrobiyal komünite yapısının analizi ve komünite dinamikleri, parçalanmada esas işlevleri bulunan anahtar popülasyonun belirlenmesi, birbirleri ve çevreleri ile olan etkileşimleri ve parçalamaya teşvik edilmeleri için gerekli olan şartların anlaşılması genel resmi görebilmek için ilk adımdır.

Mikrobiyal komünite yapısının ve dinamiklerinin çalışılması için tek bir yöntem yoktur, farklı yöntemlerin kombinasyonu geniş pencereden bakmaya olanak sağlayabilir. Bu yöntemler kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Gallego Blanco, 2012).

2.9.1. Kültür - bağımlı yöntemler

Bu yöntemler kapsamında mikroorganizmanın ileri karakterizayonunun yapılabilmesi için kültüvasyonunun yapılması ön şarttır. Bu gruba dahil edilebilecek yöntemler; katı ve sıvı ortamlarda klasik mikroorganizma izolasyonu ve izolatların kültüre edilmesi, en muhtemel sayı (MPN) (Rowe et al., 1977; Wrenn and Venosa, 1996; Gallego Blanco'dan, 2012) ve the Biolog/API gibi hızlı tanılama kitlerinin kullanılması sayılabilir. The Biolog ve API sistemleri hızlı biyokimyasal tanı yöntemlerdir ve çoklu karbohidrat fermentasyonlarına bağlı olarak değerlendirme yapılır (Garland and Mills, 1991; Wünsche et al., 1995; Berthe – Corti and Burns, 1999; El Fantroussi et al., 1999; Gallego Blanco'dan, 2012).

Bu yöntemlerin esas avantajı, ileri analizler ve biyokimyasal uygulamalar için kullanışlı olan saf kültür elde etme olasılığıdır. Ancak, mevcut bu yöntemlerle denizel mikroorganizmaların ancak %0,001-0,1'ini, toprak mikroorganizmalarının ise sadece %0,3'ünün kültüre edilebiliyor olması, mikrobiyal komünite çalışmaları için ciddi sınırlayıcı bir durumdur (Kogure et al., 1980; Ferguson et al., 1984; Torsvik et al., 1998; 2003; Gallego Blanco'dan, 2012). Ayrıca çalışılan alanın

çevresel örneklemeye dayalı olmasından dolayı, hem izolat tanılamadaki sınırlamalar hem de gereğinden fazla iş gücü ve maliyet açısından total komünitenin belirlenmesi oldukça zordur.

2.9.2. Kültür - bağımsız yöntemler

Bu yöntemler tüm komünitenin belirlenmesi ve gözlenmesi için oldukça faydalıdır. Avantajı ise mikroorganizma kültüvasyonu yapılmadan mevcut örnekte var olan tüm grupların belirlenmesidir (Amann et al., 1995; Head et al., 1998; Gallego Blanco'dan, 2005). Bu alanda çalışılan birçok yöntem bulunmasına karşın en sık kullanılan yöntemler; fluoresan in situ hibridizasyonu (FISH), fosfolipid yağ asiti analizi (PLFA) ve yaygın olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı yöntemlerdir. Bu yöntemler spesifik mikrobiyal popülasyonlar ile fizyolojik işlemler arasında bağlantı kurmayı sağlar (Gallego Blanco, 2012).

2.9.2.1. Fluoresan in situ hibridizasyonu (FISH) yöntemi

Fluoresan *in situ* hibridizasyonu (FISH) mikroorganizmaların hızlı bir biçimde filogenetik tanılama yapılmasını ve sayısal olarak anlamlandırılmasını sağlar. Yöntemde lam yüzeyine fikse edilmiş olan hücreler fluoresan boyalar ile işaretlenmiş olan problar ile muamele edilerek mikroorganizmaların hücre içi hedef genetik materyalleri ile hibridizasyonu sağlanır. Bakteriler için bu yöntemde genellikle korunmuş olan *16S* ribozomal RNA kodlayan DNA (*16S* rRNA) bölgeleri hedef olarak seçilir (DeLong et al., 1989; Gallego Blanco'dan, 2012). Bu sayede belirli dalga boylarında ışık absorbsiyonu ve salınımı yapan fluoresan boyalı problar ile işaretlenmiş olan mikroorganizmalar boyaya uygun filtreler bulunan uygun bir fluoresan mikroskop altında gözlemlenir (Gallego Blanco, 2012).

Farklı hedef bölgelere uygun farklı fluoresan özellikli boyalar kullanılarak karışık bir komünite içindeki tüm mikroorganizma üyeleri gözle görülebilir hale getirilebilir. Örneğin bu şekilde; DAPI (4′, 4′ - diamidino - 2 - fenilindol), INT - formizan (iyodonitrotetrazolyum -formizan) ya da CTC (5′ - siyano - 2, 3 – tolil - tetrazolyum klorür) boyaları kullanılabilmektedir. Bu tekniğin ana dezavantajları ise hibridizasyon şartlarının optimize edilmesi, hücre yüzeyinin özel problara karşı

potansiyel sınırlı geçirgenlik göstermesi ve inaktif ya da ölü olan hücrelerin belirlenemeyebilecek olması olarak sıralanabilir (Gallego Blanco, 2012).

2.9.2.2. Fosfolipid yağ asiti analizi (PLFA)

F - hücrelerden ekstrakte edilen fosfolipid yağ asitleri (PLFA) canlı biyokütleyi ve komünite bileşenlerini belirlemede ve karakterize etmede kullanılabilir. Spesifik PLFA'lar bazı mikroorganizma gruplarının filogenisi ve fizyolojisi hakkında bilgi verebilmektedir. Ancak, PLFA bireysel mikroorganizmaların belirlenmesinde ayırt edilemeyeceğinden dolayı kullanılması uygun olmamaktadır (Lechevalier, 1989; Hellman et al., 1997; White et al., 1997; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.9.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı yöntemler

Birçok komünite analiz tekniklerinde spesifik DNA dizilerini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmaktadır. Bilindiği üzere bu yöntemde *16S* rRNA kodlayan DNA bölgeleri ya da fonksiyonel gen dizileri hedef olarak kullanılmaktadır. *16S* rRNA kodlayan DNA bölgeleri evrimsel süreçte korunmuş bölgeler olmakla birlikte türe özgü değişken bölgeler içermektedir. Bu özel bölgeler genelde filogenetik çalışmalarda tür tayini ve türler arası akrabalık derecelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Diğer taraftan biyoiyileştirmede işlevsel olan genler ise DNA baz dizilimleri ve buna bağlı aminoasit zincirleri bakımından benzer mikrobiyal türler arasında bile önemli farklılıklar gösterebilmekte ve parçalama yol izlerin hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Gallego Blanco, 2012).

PCR tabanlı olarak analiz edilen mikrobiyal komünite profillerini değerlendirmek için amaca yönelik kullanılan moleküler yöntemler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Klon kütüphaneleri oluşturulması,
- Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi ve Temperatür Gradient Jel Elektroforezi (DGGE ve TGGE),

- Reverse Sample Genome Probing (RSGP),
- Ribosomal Intergenic Spacer Analizi (RISA),
- Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi (SSCP),
- Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP),
- Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA Analizi (RAPD)
- Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA).

DGGE ve TGGE yöntemleri temelde DNA parçalarının denaturant veya sıcaklık tesiri ile analitik olarak ayrılması temeline dayanmaktadır. Akrilamid jel üzerindeki bantların ayrılması DNA dizileri içindeki baz farklılıklarından ileri gelmektedir. DGGE çoğu komünite yapı analizlerinde başarılı şekilde kullanılmaktadır (Vinas et al., 2005; Jimenez et al., 2007; Vila et al., 2010; Gallego Blanco'dan, 2012). Günümüzde komünite profili çıkarılmasında en sık kullanılan ve iyi şekilde tasarlanmış yöntemdir.

RSGP'de mikroorganizmanın tüm genomu özel bir prob gibi kullanılır. Bu teknik *Mycobacterium, Mycoplasma, Chlamydia, Bacteroides, Pseudomonas, Sphingomonas* ve *Campylobacter* genuslarına ait spesifik türlerin belirlenmesinde başarılı birşekilde kullanılmaktadır (Voordouw et al., 1992; Gallego Blanco'dan, 2012).

T-RFLP, çoğaltılmış olan *16S* rDNA'nın enzimatik olarak kesilen parçalarının kullanılmasıyla komünite analizlerinde kullanılmaktadır (Lui et al., 1997; Gallego Blanco'dan, 2012). Kesim için kullanılacak olan enzimlerin seçimi kritik bir aşama olmakla birlikte örnek içinde var olan bakteriyel gruplar hakkında önceden bilgi sahibi olunması gereklidir.

PCR yöntemleri ile elde edilen veriler için; farklı mikroorganizmalar arasından nükleik asitlerin farklı şekilde alınabilmesi, *16S* genlerinin seçici amplifikasyonu, genetik rekombinasyon ve PCR esnasında kimerik dizi oluşması, farklı organizmalarda *16S* rDNA operonlarının ya da gen kopya sayılarındaki farklılıklar gibi bazı sınırlamalar vardır (Liesack et al., 1991; Cole and Girons, 1994; Amann et al., 1995; Wang and Wang, 1996; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.9.2.4. Spesifik mikrobiyal popülasyonların fizyolojik işlemlerle birlikte doğrulanması yöntemleri

Son on yılda, kararlı izotop problama (Stable Isotop Probing – SIP) yöntemi çevresel örneklerdeki mikrobiyal aktivitenin bir belirteci olarak başarılı şekilde kullanılmaktadır. Verilen bir kirletici için, biyoparçalanma olmayan abiyotik örneklerdeki ^{12}C : ^{13}C oranı sabittir ve abiyotik işlemlerden etkilenmeden kalırlar. Mikrobiyal aktiviteye izotopik olarak seçicilik kazandırılabilir ki bu molekülün tipine ve mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak substrat ve oluşan ürünlerdeki ^{12}C : ^{13}C oranlarında değişikliğe sebep olabilir. Bu yöntemler biyoparçalama işlemleriyle ilişkin mikrobiyal popülasyonlar hakkında bilgi sağlamamaktadır. Ancak, son zamanlarda geliştirilen ^{13}C- işaretli substrat yöntemleri ile komünite profillendirme yöntemlerinin birleştirilmesi, spesifik moleküllerin yıkımından sorumlu olan mikroorganizmaların kesin şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. Bu şekilde kombine uygulanan yöntemlerden bazıları; PLFA - kararlı izotop işaretleme (SIP), DNA - SIP ve RNA - SIP yöntemleridir (Gallego Blanco, 2012).

PLFA-SIP: ^{13}C ile işaretli substrat mikrobiyal komünitede polar lipid yağ asitlerinin işaretlenmesinde kullanılır. Yağ asitleri ekstrakte edilir edilmez ayrılır ve ^{13}C zenginleştirmesi için analiz edilir. Bu analiz işaretli substratın metabolizmasında baskın olan mikroorganizmaları açığa çıkarabilir (Boschker et al., 1998; Gallego Blanco'dan, 2012).

DNA-SIP: Kararlı izotop işaretli DNA (DNA-SIP) yoğunluktaki artışa bağlı olarak karışık mikrobiyal komünitelerden izole edilebilir. Sezyum klorür (CsCl) gradienti kullanılarak yoğun DNA normal DNA'dan santrifüjleme yolu ile ayrılır. Sonrasında, yoğun olan DNA içerisinde bulunan *16S* rDNA'dan klon kütüphaneleri oluşturulur ve ortama eklenen ^{13}C ile işaretli olan substratı asimile eden organizmaları tanılamak için bu klonlar sekanslanır. Bu yöntem piren ve naftalen parçalanmasıyla ilişkili popülasyonu belirlemede kullanılmıştır (Jones et al., 2008; Jeon et al., 2003; Gallego Blanco'dan, 2012).

RNA-SIP: Bu teknik DNA-SIP yerine yalnızca hücre replikasyonu ile ilişkili DNA sentezinin sınırlayıcılığından kurtulmak için kullanılmaktadır. Bu

yöntem de DNA-SIP gibi gerçekleştirilir, ama aktif organizmaları belirlemek için RNA'dan ters transkripsiyon yapılır. Bu yöntem fenol metabolizmasından sorumlu organizmaların tanılanmasında kullanılmıştır (Manefield et al., 2002; Gallego Blanco'dan, 2012).

FISH – MAR: Bir diğer yöntem ise yine spesifik mikroorganizmaları spesifik fonksiyonel işlemlere göre korele etmede kullanılan ve mikrootoradyografi ile ilişkili olan *In Situ* Flouresan Hibridizasyonudur (FISH-MAR). FISH-MAR tek hücre rezolüsyonu ile mikroorganizmaların doğal çevrelerindeki fizyolojik özelliklerini açığa çıkarmada oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem deniz sistemleri ve atıksulardaki mevcut türlerin fonksiyonel özelliklerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Lee et al., 1999; Wagner et al., 2006; Gallego Blanco'dan, 2012). Radyo-işaretli substrat örneğe uygulanır, sonrasında örnek ile fikse edilerek spesifik problarla hibridize edilir ve fluoresan mikroskop ile görünür hale getirilir. Yöntemin dezavantajı uygun florokromların sayılarındaki sınırlamadır (Gallego Blanco, 2012).

Kültüvasyon teknikleri ile ilgili problem ve zorlukların üstesinden gelebilmek için son yılarda geniş çapta kullanılan diğer önemli bir yaklaşım ise metagenomiktir. Yöntem tüm mikroorganizma popülasyonunun direk genomik analizlerine dayanmaktadır (Schmeisser et al., 2003; tyson et al., 2004; venter et al., 2004; Tringe et al., 2005; Gallego Blanco'dan, 2012). Bir diğer yöntem ise DNA mikroarray'leridir. Bir DNA mikroarrayi 16S rRNA genleri ya da katabolik genler gibi spesifik genler için tasarlanan yüzlerce ya da binlerce probun yüksek yoğunluklu bir matriksidir. Bu yöntem biyoparçalamadan sorumlu olan popülasyonun ve biyoparçalamadan sorumlu genlerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Rhee et al., 2004; Gallego Blanco'dan, 2012).

2.10. Gen Ekspresyonu Çalışmaları İçin qPCR

Belirli bir genin aktivitesinin belirlenmesi için Reverse Transkripsiyon ile PCR kombinasyonu olan RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. RT-PCR'ın gen ifadesi belirlenmesinde oldukça güçlü bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Kantitatif PCR (qPCR) çalışmalarında eş zamanlı olarak elde edilen verilerin analizinde

absolüt kantifikasyon ve relatif kantifikasyon olmak üzere iki farklı yaklaşımda bulunulabilir.

Absolüt kantifikasyonda daha önceden oluşturulmuş bir standart eğri vasıtasıyla elde edilen PCR sinyallerinin ilişkilendirilmesi sonucu ilgili transkriptin kopya sayılarına ulaşılabilir.

Rölatif kantifikasyonda ise hedef genin muamele yapılmamış bir kontrol veya çalışma sürecinde sıfırıncı zamandaki bir örnek gibi referans bir gruba göre ifadesindeki oransal değişimleri gösterir.

Absolute kantifikasyon mutlak transkript kopya sayılarının belirlenmesinin gerekli olduğu durumlarda gerçekleştirilmelidir. Bilindiği üzere absolute kantifikasyon Real – time PCR ile kombine edilmiştir ve bilinen kantifikasyon çalışmalarının temelini oluşturur. Bazı durumlarda ise mutlak transkript kopya sayılarının belirlenmesi gereksiz olabilmekle birlikte gen ifadesindeki oransal değişimlerin gösterilmesi yeterli olabilmektedir. Örneğin belirli bir durum altında X geninin ifadesinin 2,5 kat artış göstermesi, o genin ifade edilmesi sırasında hücre başına 1000 kopyadan 2500 kopyaya artış göstermesinden daha çok amaca uygunluk gösterir.

Gen ifadesi çalışmalarında oransal kantifikasyon yapılırken birbirine benzer iki farklı yaklaşım ullanılabilmektedir. Bunlar Delta Delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak) ve Standart eğri (Pfaffl) yöntemleridir. Bu iki yöntem de RNA için qPCR'da ve ChIP yönteminde kullanılmaktadır (McBryan, 2013).

2.10.1. Delta Delta CT

Real – time PCR kullanılarak belirlenen gen ifadesindeki oransal değişimler belirli durumlara, varsayımlara ve verilerin düzgün şekilde analiz edilmesi için bu varsayımların test edilmesine bağlıdır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi Real – time PCR denemelerinden elde edilen gen ifadesindeki oransal değişimleri hesaplamada kullanılabilmektedir. Varsayımları, deneysel tasarım, validasyon teslerini kapsayan

$2^{-\Delta\Delta CT}$ denkleminin türetimi Applied Biosystem User Bulletin No. 2 (P/N 4303859) içerisinde tanımlanmıştır (McBryan, 2013).

2.10.1.1. Livak yöntemi

Daha genel olarak çoğunlukla "Delta Delta CT" (ΔΔCT) ya da $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak bilinir. ΔΔCT yöntemi PCR hakkında önemli bir varsayımda bulunur. Şöyle ki, referans kontrol geni ve ilgilenilen hedef genin amplifikasyon verimleri yaklaşık olarak eşit olmak zorundadır. Özellikle ΔΔCT örnek içindeki materyal miktarının her bir PCR döngüsünde net şekilde ikiye katlandığını varsayar (PCR için amplifikasyon verimi = %100 olarak düşünülür) (Livak and Schmittgen, 2001; McBryan, 2013).

ΔΔCT = ΔCT (indüklenmiş örnek) – ΔCT (indüklenmemiş örnek) (2.3)

Buradaki ΔCT;

ΔCT (örnek) = CT (hedef) – CT (referens) (2.4) , böylece;

ΔΔCT = (CT (indüklenmemiş hedef) – CT (indüklenmemiş referans)) − (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmiş referans)) (2.5)

Buradaki Ct değerleri;

CT (indüklenmemiş hedef) = indüklenmemiş örnekteki ilgili genin CT değeri

CT (indüklenmemiş referans) = indüklenmemiş örnekteki kontrol genin CT değeri

CT (indüklenmiş hedef) = indüklenmiş örnekteki ilgili genin CT değeri

CT (indüklenmiş referans) = indüklenmiş örnekteki kontrol genin CT değeri

Bu aşamadan sonra indüklenmiş olan örnekteki ilgilenilen hedef genin indüklenmemiş örnek ile ilişkili oranı $2^{\Delta\Delta CT}$ alınarak hesaplanabilir (McBryan, 2013).

Bir örnek ile açıklanacak olursa;

Çizelge 2.2. Örnek Ct değerleri

	İndüklenmemiş	**İndüklenmiş**
Referans gen	16,17	15,895
Hedef gen	21,225	19,763

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmemiş hedef) – CT (indüklenmemiş referans)) − (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmiş referans)) (2.6)

$\Delta\Delta CT = (21{,}225-16{,}17) - (19{,}763-15{,}895)$

$\Delta\Delta CT = (5{,}055) - (3{,}868)$

$\Delta\Delta CT = 1{,}187$

$2^{\Delta\Delta CT} = 2^{1.187} = 2.277$

Sonuç olarak bu sayısal örnekte de görüldüğü üzere Livak yöntemi uygulanarak yapılan normalizasyon ve $\Delta\Delta CT$ hesaplarına göre ilgilenilen genin ifadesi indüklenmemiş haline oranla 2,277 kat artmıştır (McBryan, 2013).

Formüle uygularken çıkarma yapmak gerçekte aşırı bir farklılık yaratmaz. Hesaplama yapan kişilerin biraz farklı yaptıkları gözlenebilir. Aşağıda farklı hesaplamalar görülmektedir;

Δ İndüklenmemiş vs Δ İndüklenmiş

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmemiş hedef) – CT (indüklenmemiş referans)) − (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmiş referans)) (2.6)

$\Delta\Delta CT = (21.225 - 16.17) - (19.763 - 15.895)$

$\Delta\Delta CT$=1.187

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmiş referans) – CT (indüklenmiş hedef) − (CT (indüklenmemiş referans) – CT (indüklenmemiş hedef)) (2.7)

$\Delta\Delta CT = (15.895 - 19.763) - (16.17 - 21.225)$

$\Delta\Delta CT = 1.187$

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmemiş referans) – CT (indüklenmemiş hedef)) − (CT (indüklenmiş referans) – CT (indüklenmiş hedef)) (2.8)

$\Delta\Delta CT = (16.17 - 21.225) - (15.895 - 19.763)$

$\Delta\Delta CT = -1.187$

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmiş referans)) − (CT (indüklenmemiş hedef) – CT (indüklenmemiş referans)) (2.9)

$\Delta\Delta CT = (19.763 - 15.895) - (21.225 - 16.17)$

$\Delta\Delta CT = -1.187$

Δ Referans gen vs Δ Hedef gen

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmemiş hedef) − CT (indüklenmiş hedef)) − (CT (indüklenmemiş referans) – CT (indüklenmiş referans)) (2.10)

$\Delta\Delta CT = (21.225 - 19.763) - (16.17 - 15.895)$

$\Delta\Delta CT = 1.187$

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmiş referans) – CT (indüklenmemiş referans)) − (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmemiş hedef)) (2.11)

$\Delta\Delta CT = (15.895 - 16.17) - (19.763 - 21.225)$

$\Delta\Delta CT = 1.187$

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmemiş referans) – CT (indüklenmiş referans)) − (CT (indüklenmemiş hedef) – CT (indüklenmiş hedef)) (2.12)

$\Delta\Delta CT = (16.17 - 15.895) - (21.225 - 19.763)$

$\Delta\Delta CT = -1.187$

$\Delta\Delta CT$ = (CT (indüklenmiş hedef) – CT (indüklenmemiş hedef)) − (CT (indüklenmiş referans) – CT (indüklenmemiş referans)) (2.13)

$\Delta\Delta CT = (19.763 - 21.225) - (15.895 - 16.17)$

$\Delta\Delta CT = -1.187$

İki ΔCT çıkırımı ile sabit kalındığı sürece (örneğin her zaman indüklenmemiş örnekten indüklenmiş örneğin çıkarılması ya da kontrol geninden referans genin

çıkarılması ya da tam tersi durumları) ΔΔCT değerinin büyüklüğü her zaman aynı olacaktır. Tek şey işaret değişecektir.

Bu durum neden bazı araştırıcıların gen ifadesinin oranını $2^{\Delta\Delta CT}$ olarak hesaplarken, diğer bazı araştırıcıların $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak hesapladıklarını belirtir. Farklılık sadece araştırıcının başlangıçta örnekleri etkili bir şekilde kıyaslamak için eşitliği ne şekilde kurduğu ile alakalı bir durumdur.

Her bir örnek için kullanılan her primer çifti için yapılan PCR ile elde edilen ürünün mutlak miktarı oransal olarak 2^{CT}'ye dönüştürülür. Örnekler arasında oluşacak herhangi bir sistematik hataya olanak sağlamamak için aynı örnek içerisindeki bir referans gene (bir internal kontrol) karşı ilgilenilen gen normalize edilir.
Aynı örnek içerisindeki hedef genin referans gene olan oranı $2^{CT\ (hedef)} / 2^{CT\ (referans)}$ olarak ifade edilir.

Ancak, $b^c / b^d = b^{c-d}$ eşitliğinden dolayı yukarıdaki eşitlik $2^{CT(hedef)-CT(referans)}$ olarak yazılmaktadır.

Sonrasında iki örnek arasındaki oran; iki örnek arasındaki hedef genin referans gene oranının bölümü aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$Oran = \frac{2^{CT\ (indüklenmemiş\ hedef)} - 2^{CT\ (indüklenmemiş\ referans)}}{2^{CT\ (indüklenmiş\ hedef)} - 2^{CT\ (indüklenmiş\ referans)}} \quad (2.14)$$

Yularıdaki bu denklem yine ΔΔCT eşitliğine denk olan aşağıdaki işlem ile aynı özelliktedir:

(CT (hedef, indüklenmemiş) – CT (referans, indüklenmemiş)) − (CT (hedef, indüklenmiş) − CT (referans, indüklenmiş)).

2.10.1.2. Pfaffl yöntemi

Delta delta CT yönteminin Pfaffl adlı araştırıcı tarafından geliştirilmiş bir versiyonudur. Yöntemde teorik olarak %100 verimle çalışan bir PCR reaksiyonunda elde edilen PCR verim eğrileri sapmaları ile durum açıklanmaktadır (Pfaffl, 2001; McBryan 2013).

2.10.2. PCR verim hesaplamaları

PCR reaksiyonu döngüsel halde devam ederken oluşan ürünlerin log-linear fazdaki artışının sonucu elde edilen veriler ile oluşturulan grafik PCR verim hesaplamasında kullanılmaktadır. Verim hesabı yapılırken aşağıdaki eşitlikten faydalanılır;

$$\text{Efficiency (Verim)} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1 \times 100 \quad (2.15)$$

Bu eşitlikte PCR verimi "%" değerinden verilebilmektedir.

İdeal PCR verimi % 90 -100 arasında olmalıdır. %100 PCR veriminin elde edilebilmesi için ise standart eğri grafiğinden gelen slope (eğim) değerinin -3,32 olması gerekmektedir. Grafik eğiminin -3,32 değerine yaklaşması ile verim 1 değerine yaklaşmakta ve buna bağlı olarak PCR verimi %100'e yaklaşmaktadır. Eğim değerinin artış veya azalış gösterdiği durumlarda PCR veriminde de artış veya azalış gözlenmektedir.

2.10.3. Standart eğri oluşturulması

Miktarı bilinen ve belirli bir seri dilüyonlar ile hazırlanmış örneklerin belirli PCR koşularında yürütülmesi ile elde edilen amplikonların vermiş oldukları CT değerleri ile oluşturulan bir eğridir. Bu eğri ile elde edilen hata oranları ve eğim hesaplamaları PCR reaksiyonunun % olarak verimi hakkında bilgi sağlar. %100 verimle çalışan bir PCR reaksiyonu için olması gereken amplikon CT değerleri ve konsantrasyonları aşağıda örneklemiştir;

Çizelge 2.3. Örnek Ct ve konsantrasyonlar.

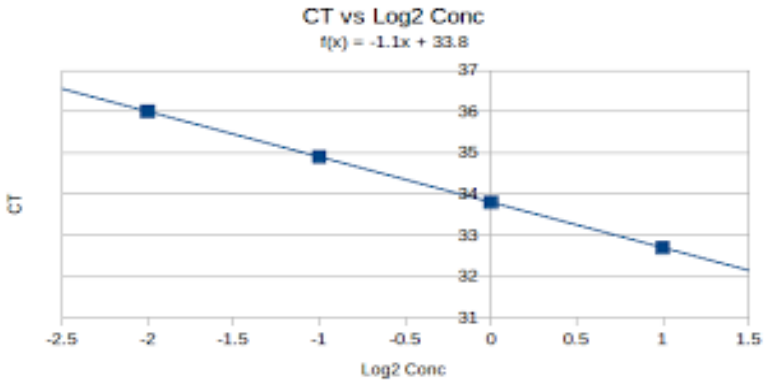
CT Değeri	Konsantrasyon
36	0.25
35	0.5
34	1
33	2

Ancak gerçekte durum pek böyle olmamaktadır. Eğer reaksiyon sonunda elde edilen CT değerlerin arasında oransal olarak büyük farklılıklar varsa PCR verimi beklenenin aksine düşük olacaktır (McBryan, 2013).

Çizelge 2.4. Örnek Ct ve konsantrasyonlar.

CT Değeri	Konsantrasyon
36	0.25
34.9	0.5
33.8	1
32.7	2

Bu durumda, CT değerleri ile konsantrasyonun logaritması kıyaslanarak PCR veriminin gerçekte ne kadar düşük olduğu belirlenebilir. log2 ya da log10 tabanından biri kullanılarak yapılmasına rağmen, herhangi bir log skalasında gerçekleştirilebilir. Sonuçlar her türlü aynı çıkacaktır (McBryan, 2013). Genelde log10 slakası kullanılmasına rağmen, PCR ikilenme özelliğinden yola çıkılarak en iyi uyum sağlayacak olan log2 tabanına göre hazırlanmış bir standart eğri grafiği üzerinden bir örnekle konu açıklacak olursa;



Şekil 2.19. Real time PCR verimi için log2 tabanında oluşturulan örnek standart eğri grafiği.

Burada ilgilenilmesi gereken nokta eğim çizgisinin slope (eğim) değeridir. Yukarıdaki durunda slope değeri -1,1 olarak hesaplanmıştır (McBryan, 2013).

Reaksiyon verimi aşağıdaki denklem ile hesaplanabilir;

Verim = $[2^{-1/\text{slope}}]$ - 1 = $[2^{-1/-1.1}]$ – 1 = 1.878 – 1 = 0,878 (2.16)

Onun için, her döngü sonrasında ideal şartlarda teorik olarak 2 kopya üretilmesi gereken durumda, bu reaksiyon için her döngü sonunda 1,878 kopya üretilmiştir denilebilir (McBryan, 2013).

Verim yukarıda hesaplanan verimden 1 çıkarılması ile elde edilen 0-1 aralığıdaki bir değer ile temsil edilir. Bu değerin 100 katsayısı ile çarpımı sonucunda % verim elde edilir;

% verim = verim x 100 = 0,878 x 100 = % 87,8

Çalışılmak istenen her primer seti (referans gen ve hedef gen) için bir standart eğri çıkarılmak istendiği takdirde bunları Delta Delta CT eşitliği içinde birleştilerek aşağıdaki denklem elde edilebilir;

$$Oran = \frac{Verim\ (Hedef)^{CT\ (indüklenmemiş\ hedef) - CT\ (indüklenmiş\ hedef)}}{Verim\ (Referans)^{CT\ (indüklenmemiş\ referans) - CT\ (indüklenmiş\ referans)}} \qquad (2.17)$$

2.10.4. Referans (kontrol) gen seçimi

Çalışmalarda en az bir adet housekeeping özelliği taşıyan gen kontrol olarak çalışılmalıdır. Eğer seçilen genin indüklenmiş ve indüklenmemiş durumları arasındaki ifade düzeyleri arasında oldukça geniş bir aralık varsa bu tarz kontrol genlerin kullanıldığı çalışmalarda hedef gen için genelde yanlış sonuçlar vermektedir.

Kontrol genleri arasındaki bu farklılıkları minimum seviyede tutmak için, tek bir kontrol geni yerine birden çok kontrol geni kullanılarak aralarında CT değerlerinin geometrik ortalaması alınabilir. Yine de özgün çalışamalarda referans genlerin stabilitesi için seçimde hassas davranmak gerekmektedir (Pffafl et al., 2004)

2.10.5. Gen ifadesi çalışmaları için kullanılan yazılımlar

Bu tarz çalışmalarda genellikle internetten ücretsiz olarak edinilebilen REST2009 ve pyQPCR gibi bilgisayar yazılımlarından faydalanılabilir. Yine ücretli olarak ise GenEx adlı program edinilebilir. En etkili ve kullanışlı olarak REST2009 programı tavsiye edilmektedir (McBryan, 2013).

2.11. Aktif Çamur Sistemi

Aktif çamur askıda büyüme işlemidir ve ilk olarak yüzyılın başında İngiltere'de başlamıştır. Bu işlem evsel atıksuların ikincil biyolojik arıtımı olarak dünya çapında kabul görmektedir. İşlem esasen organik maddenin CO_2 ve H_2O, NH_4'e oksidasyonunun sağlandığı ve yeni hücre biyokütlesinin oluşturulduğu aerobik arıtımdan oluşmaktadır. Gerekli olan hava bir diffüzör ya da mekanik havalandırma yoluyla sağlanmaktadır. Mikrobiyal hücreler arıtma tankına yerleşmeye olanak sağlayan flok yapılarını oluştururlar (Bitton, 2005).

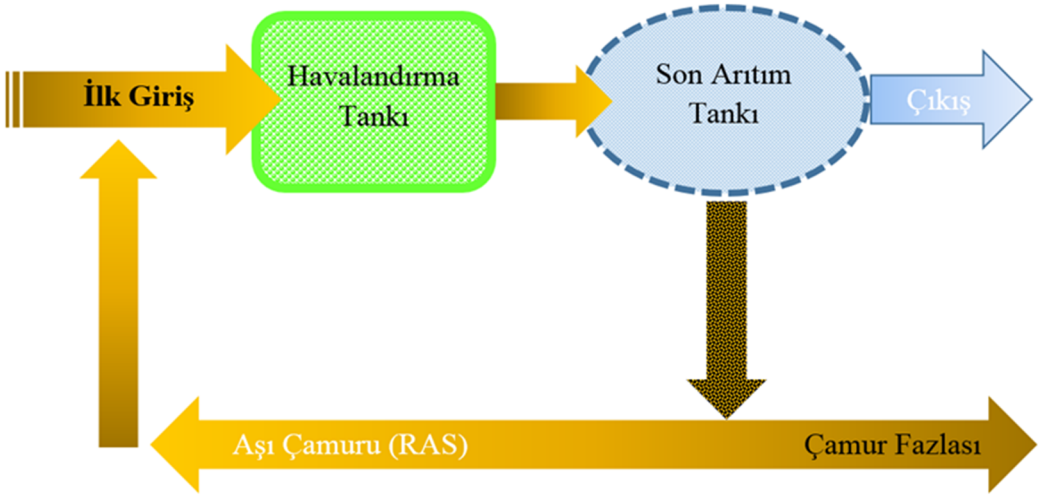
2.11.1. Konvansiyonel aktif çamur sistemi

Aktif çamur sistemi aşağıdaki işlemleri içerir;

Havalandırma tankı. Organik maddelerin aerobik oksidasyonu bu tank içerisinde geçekleştirilir. Başlangıç suyu tanka girer ve geri sisteme verilmiş olan aktif çamur (return activated sludge RAS) ile likor karışımı oluşturur. Bu karışım yaklaşık olarak 1500-2500 mg/L askıda katı madde içerir. Havalandırma mekanik olarak gerçekleştirilir. AÇS'nin en önemli karakteristiği biyokütlenin büyük çoğunluğunun dönüştürülmesidir. Bu işlemde tank içinde hücrenin kalma süresi hidrolik alıkonma süresinden daha yüksektir (Sterritt and Lester, 1988; Bitton'dan,

2005). Bu sayede yüksek miktarda organik bileşik çok sayıda mikroorganizma tarafından kısa sürede ve etkili bir şekilde okside edilir. Havalandırma havuzunda alıkonma süresi 4 - 8 saat arasında değişiklik gösterir.

Çökeltim tankı. Bu tank havalandırma tankındaki oksidasyon fazı esnasında oluşan mikrobial flok (çamur) yapısının çökeltimi için kullanılır. Bu çökeltinin bir kısmı havalandırma tankına geri gönderilirken geri kalan kısmı uygun bir F/M (besin mikroorganizma oranı) oranını korumak için atılır (Bitton, 2005).



Şekil 2.20. Konvansiyonel aktif çamur sistemini gösteren diyagram (Bitton, 2005'ten uyarlanmıştır).

2.11.1.1. Askıda katı madde (AKM - Mixed Liquor Suspended Solids - MLSS)

Aktif çamur sistemindeki havalandırma tankının içeriği mixed liquor olarak adlandırılır. MLSS karışık likördeki askıdaki organik (mikroorganizma dahil) ve mineral katıların toplam miktarını ifade eder. AKM reaktörden belirli bir hacimde alınan aktif çamur (karışık likör) örneğinin membran filtrasyonu ile 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilmesinden sonra filtre üzerinde kalan çamurun 103 – 105 °C'de 1 saat süre ile kurutulması ile elde edilen mg/L cinsinden verilen çamur kuru ağırlığıdır. Bu uygulamada kullanılan membran filtrenin önceden 1 saat süre ile 103 - 105°C'de kurutularak darası alınır daha sonra membran filtrasyonu gerçekleştirilir. Uygulama sonrasında aradaki fark çıkarılarak AKM hesaplaması yapılır. Hesaplama aşağıdaki formülle yapılmaktadır:

$$AKM\ (MLSS) = \frac{(\mathrm{A-B})\ \mathrm{x}\ 1000}{\text{numune hacmi (ml)}} \quad (2.18)$$

A: Filtrat + filtre edilebilen katı maddenin mg cinsinden ağırlığı,

B: Filtrenin mg cinsinden ağırlığı.

2.11.1.2. Askıda uçucu katı madde (mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS)

MLVSS ile temsil edilen MLSS'nin organik kısmı, canlı ya da ölü mikroorganizmalar ve onların hücresel kalıntıları kadar mikrobiyal olmayan organik maddeleri de içermektedir. MLVSS filtratın 600 – 650 °C'de kurutulması ile belirlenir. MLSS'nin yaklaşık % 65 - 75'ini temsil eder.

2.11.1.3. Besin / mikroorganizma Oranı (F/M)

F/M oranı aktif çamur sistemi içindeki organik yükü belirtir ve günlük kg MLSS başına BOİ kg olarak ifade edilir.

$$F/M = \frac{\mathrm{Q\ x\ BOİ}}{MLSS\ x\ V} \quad (2.19)$$

Q: günlük kanalizasyon suyunun milyon galon cinsinden akış oranı,

BOİ: 5 günlük biyokimyasal oksijen ihtiyacı (mg/L),

MLSS: mixed liquor suspended solids (mg/L),

V: galon cinsinden havalandırma tankının hacmi.

F/M oranı aktif çamur atım oranı ile kontrol edilir. Yüksek atım oranı yüksek F/M oranını gerektirir. Konvansiyonel havalandırma tankında F/M oranı 0,2 - 0,5 lb $BOİ_5$ / gün / lb MLSS'dir. Ancak yüksek saflıkta oksijen kullanıldığında 1,5 üzerine çıkabilir. Düşük F/M oranı havalandırma tankı içindeki mikroorganizmaların aç olduklarını gösterir. Bu durumda genellikle daha verimli bir arıtım gerçekleşir (Bitton, 2005).

2.11.1.4. Hidrolik alıkonma süresi (HRT)

HRT aktif çamur işlemindeki havalandırma tankına giren sıvının (çözünmüş haldeki bileşik) tank içinde geçirdiği sürenin ortalamasıdır. HRT seyreltme oranı olan D ile ters orantılıdır.

$$HRT(\theta) = \frac{1}{\mathrm{D}} = \frac{V}{Q} \quad (2.20)$$

$$\left[= \frac{VT}{Q} = \frac{Vr + Vs}{Q}\right]$$

VT (V): Toplam havalandırma tankı hacmi,

Q: giren atıksuyun havalandırma tankı içindeki akış oranı,

D: seyrelme oranı,

Vr: Aerobik reaktör hacmi,

Vs: Çökeltim tankı hacmi.

2.11.1.5. Çamur hacmi

Reaktör içinden alınan aktif çamur örneğinin statik koşulda 30 dakikada çökebildiği hacmi (ml/ml) temsil etmektedir.

2.11.1.6. Çamur hacim indeksi (ÇHİ)

Çamur hacminin 1000 katsayısı ile çarpılarak AKM değerine bölünmesi ile hesaplanan ml/g cinsinden değerdir.

$$\text{ÇHİ} = \frac{\text{ÇH x 1000}}{\text{AKM}} \quad (2.21)$$

2.11.1.7. Çamur yaşı

Çamur yaşı mikroorganizmaların sistemdeki ortalama kalış süresidir. HRT saatlerle ifade edilebilirken, ortalama hücre kalma süresi günlerle ifade edilir. Bu

parametre mikrobiyal büyüme oranı μ ile ters orantılıdır. Reaktör içinde bulunan mevcut aktif çamurun kalitesi hakkında bilgi veren bir hesaplamadır. Sürekli sistemde çamur yaşının kontrol edilmesi gerekliliği vardır. Çamur yaşı aşağıdaki denklem ile hesaplanmaktadır ve gün olarak sonuç verilir.

$$\theta c\ (\text{gün}) = \frac{MLSS\ x\ V}{SSe\ x\ Qe + SSw\ x\ Qw} \qquad (2.22)$$

SSe: Çıkış suyundaki askıda katı madde (mg/L),

Qe: çıkış suyu miktarı (m^3/Gün),

SSw: atık çamurdaki askıda katı madde (mg/L),

Qw: atık çamurun miktarı (m^3/gün).

Aktif çamurdaki çamur yaşı 5 ila 15 gün arasında değişiklik gösterebilir. Yıl içindeki mevsimlere göre değişiklik gösterbilir. Örneğin kış aylarında çamur yaşı yaz aylarına göre daha fazladır.

Aktif çamur kontrolündeki önemli parametreler organik yük miktarları, oksijen miktarı, son çökeltim tankının kontrolu ve operasyonu. Bu tankın iki fonsiyonu vardır; durultma ve yoğunlaştırma. Rutin operasyonda çamur çökelebilirliğinin mutlak ölçümü çamur hacim indeksi (sludge volume index, SVI) ile tanımlanır (Bitton, 2005).

2.12. Aktif Çamur Biyolojisi

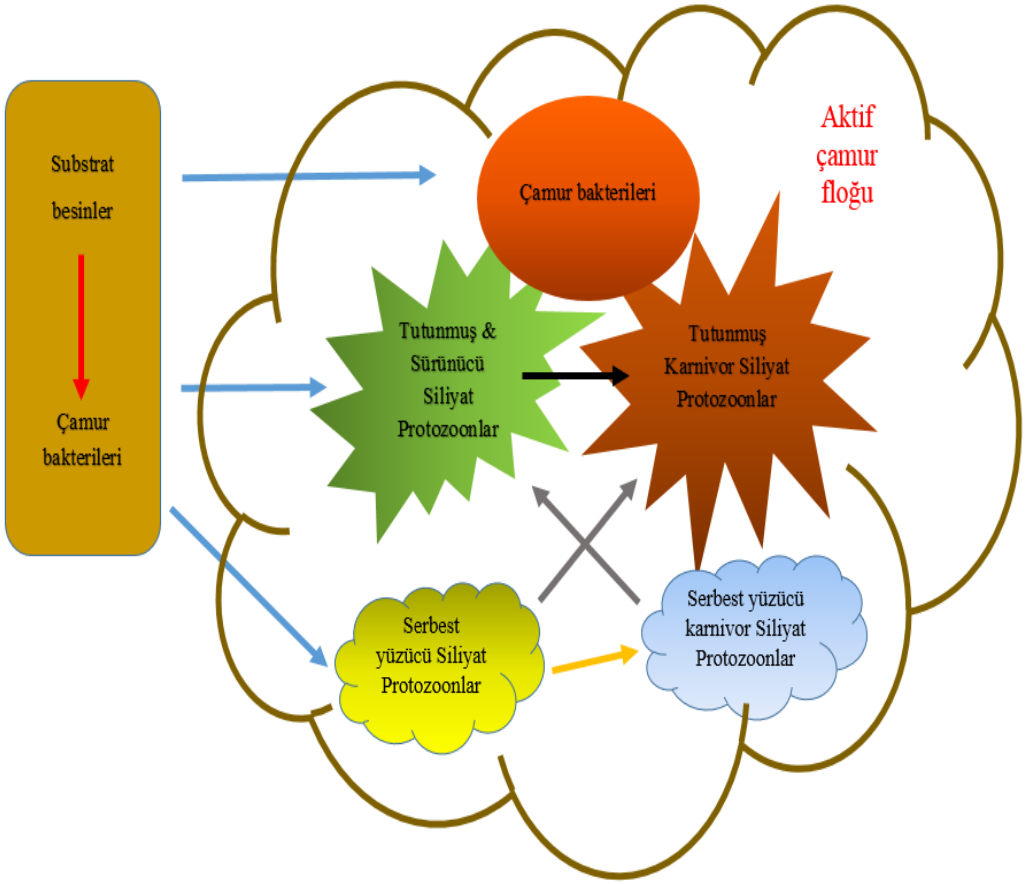
Aktif çamur sisteminin temelde 1) biyoparçalanabilir organik maddenin havalandırma tankında oksidasyonu (çözünebilir organik madde böylece yeni hücre kütlesine dönüşür) ve 2) flokülasyon, yani yeni oluşan biyokütlenin arıtılan çıkış suyundan ayrılması gibi iki hedefi vardır.

2.12.1. Aktif çamur flokları

Aktif çamur flokları çoğunlukla bakteriyel hücrelerin oluşturduğu, yapıya diğer mikroorganizmalar ve organik - inorganik partiküllerin katıldığı dinamik bir yapıdır (Şekil 2.21). Flok boyutları <1µm - ≥1000µm arasında değişiklik gösterebilir.

Weddle and Jenkins adlı araştırıcıların 1971 yılında ATP analizi ve dehidrogenaz aktivitesi dayalı yaptıkları çalışmalara göre flok içindeki toplam hücrelerin %5 – 20'nin bu yöntemlerle sayılabileceğini gösterilmiştir (Bitton, 2005). Hanel 1988 yılında aktif çamur içinde bulunan bakterilerin aktif fraksiyonunda toplam bakterilerin yalnızca % 1 – 3 arası olabileceğinin tahmin edildiğini söylemiştir. Ancak, daha etkili belirleme yöntemleri olarak; floresan ile işaretlenmiş oligonükleotid probları (FISH probu), DAPI (4-6 diamidino-2 phenylindole) (aktif çamurda %50, çökmüş çamurda %80), ve florojenik canlılık/aktivite boyaları ile birlikte yapılan akış sitometrisi (Flow cytometry) (%62) yöntemleri kullanılmaktadır.

Mikrosensor teknolojisi sayesinde mikroelektrodlar kullanılarak floğun oksijen, pH, redoks potansiyeli, Nitrat, amonyak ya da sülfat mikroprofili çıkarılabilmektedir. Bu mikroelektrodlar flok içindeki mikrobiyal aktivite hakkında bilgi vermektedir. Aktif çamur prokaryotik ve ökaryotik birçok mikroorganizma içermektedir (Bitton, 2005).



Şekil 2.21. Şematize edilmiş tipik bir aktif flok ve bünyesinde bulunan mikrobiyal kommunite yapısı (Bitton, 2005'ten uyarlanmıştır).

2.12.1.1. Bakteriler

Flok içindeki oksijen seviyesinin difüzyonundaki sınırlamalardan dolayı flok kütlesi arttıkça aktif aerobik bakteri sayısı azalmaktadır. Tankın içindeki oksijen konsantrasyonlarına bağlı olarak flok içinde anoksik zonlar oluşabilir. Bu zonlar oksijen seviyesi 4 mg/L'yi aştığında kaybolur (Li and Bishop, 2004; Bitton'dan, 2005). Büyük bir flok yapısının içine girildiğinde metanojenler ya da sülfat redükleyici bakteriler (SRB) gibi zorunlu anaerobik bakterilerin olduğu gözlenir (Lens et al., 1995; Bitton'dan, 2005). Bu bakterilerin varlığı flok içinde çok sayıda anaerobik odacıkların oluştuğu ya da mevcut metanojen veya sülfat redükleyen

bakterilerin oksijene tolerans sağlamaları ile açıklanabilir. Bu durum anaerobik reaktör kurulumu için iyi bir başlangıç olabilmektedir.

Aktif çamur floklarının başlıca ev sahipleri bakteriler, özelliklede Gram negatif özelliktedirler. Yüzlerce bakteri suşu aktif çamur sisteminde gelişim gösterebilmekte, ancak sadece belirli küçük bir grubu kültür tabanlı metodlarla belirlenebilmektedir. Bu bakteriler organik madde oksidasyonu, besin dönüşümleri ve mikrobiyal biyokütlenin flokulasyonu için önemli olan polisakkaritlerin ve diğer polimerik maddelerin üretiminden sorumludur.

Standart bir aktif çamurda toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 10^8 kob/mg çamur olarak bilinmektedir.

Kültür tabanlı teknikler ile flok içinde belirlenebilen temel organizma genusları;

- *Zooglea spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Flavobacterium spp.*
- *Alcaligenes spp.*
- *Achromobacter spp.*
- *Coryneobacterium spp.*
- *Brevibacterium spp.*
- *Acinetobacter spp.*
- *Bacillus spp*
- Filamentli microorganizmalar (bazıları kılıflı bakteriler, örn. *Sphaerotilus sp.* ve sürünücü bakteriler, örn. *Beggiota sp.* ve *Vitreoscilla sp.*) çamur şişmesinden sorumludur (Bitton, 2005).

Kültür Tabanlı teknikler ile direk mikroskobik sayımlarla elde edilen bakteri sayılarından %10 daha az sayısal sonuç vermektedir.

Çizelge 2.5. Standart aktif çamurdan kültürel yöntemlerle elde edilen bazı aerobik heteretrofik bakteri izolatları (Bitton, 2005)

Genus veya Grup	**% Toplam izolat**
Comamonas - Pseudomonas	50.0
Alcaligenes	5.8
Pseudomonas (fluorescent grubu)	1.9
Paracoccus	11.5
Unidentified (Gram – negatif çubuklar)	1.9
Aeromonas	1.9
Flavobacterium – Cytophaga	13.5
Bacillus	1.9
Micrococcus	1.9
Coryneform	5.8
Arthrobacter	1.9
Aureobacterium – Microbacterium	1.9

Alternatif olarak moleküler tabanlı teknikler (in situ belirleme için 16S, 23S rRNA oligonükleotid fluoresan probları) kullanılmaktadır. Bu sayede belirlenen başlıca genuslar *Proteobacteria* sınıfı içindeki β (beta) alt gurubuna dahildir, β alt grubundaki baskın grup β1 grubudur ve bu gruba dahil olan bakteriler;

- *Comamonas*
- *Hydrogenophaga*
- *Acidovorax*
- *Sphaerotilus natans*
- *Leptothrix discophora*
- Birçok *Pseudomonas* grubu.

Diğer gruplar α (alpha) alt grubu üyeleri (*Sphingomonas spp*.), γ (gamma) alt grubu üyeleri (*Cytophaga – Flavobacterium* kümesi), yüksek G – C DNA içeriğine sahip Gr pozitif bakteriler (*Acinetobacter, Arcobacter*, potansiyel insan patojenleridir) (Bitton, 2005).

Caulobacter dallanan bir bakteridir ve genelde organik madde yönünden zayıf sularda bulunur, ayrıca arıtım tesislerinde özellikle aktif çamurda bulunur. *Hyphomicrobium* Gram negatif tomurcuklanan bir bakteridir ve aktif çamurda kümeleştirici olarak görev alır. Bu genus üyelerinden bazıları metanolü C kaynağı olarak kulanıp denitrifikasyon yapar. 16S rRNA analizlerine göre kimya endüstrisi atıksularında *Hyphomicrobium* suşlarının olduğu gözlenmiştir. 16S rRNA analizlerine göre aktif çamurun yaklaşık % 5'ini oluşturmaktadır (Bitton, 2005).

G bakterileri olarak adlandırılan Gram negatif koklar, glukoz ve asetat ile beslenen bioreaktörlerde saptanmıştır. Mikroskop altında tetrad şekilli ya da agregatlar olarak görülmektedir. Bu organizmalar zayıf fosfor giderimi olan havuzlarda gözlenir çünkü fosfor akümüle eden bakteriler (PAO) dışındadır ve polifosfatlar yerine polisakkaritleri akümüle ederler. G bakterilerinden *Tetracoccus cechii* ve α proteobacteria grubuna dahil iki bakteri tanılanmıştır. Fluoresan işaretli RNA probları ile G bakterilerinden *Amaricoccus* belirlenmiş, bu bakterinin 46 farklı aktif çamur örneğinde yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir (Bitton, 2005).

Zooglea ekzopolisakkarit üreten bir bakteridir ve genellikle aktif çamurda ve organik açıdan zengin diğer sularda bulunur. Parmak benzeri uzantılar yapan *Zooglea* agregatları polisakkarit matriks ile çevrili haldedir. Bu bakteriler arıtımın çeşitli aşamalarında bulunmasına rağmen kültürel tekniklerle mixed liquor'un %0,1-1'ini oluşturduğu bilinirken moleküler yöntemlerle (poliklonal antibadiler, SEM, RT-PCR vs) %10 kadarını oluşturduğu saptanmış (Bitton, 2005)..

Aktif çamur aynı zamanda ototrofik bakterilere de ev sahipliği yapmaktadır. Nitrifiye ediciler (*Nitrosomonas, Nitrobacter* gibi) amonyumu

nitrata dönüştürürler. 16S hedefli prolarla yapılan çalışmalarda Nitrosomonas ve Nitrobacter türlerinden oluşan kümelerin aktif çamur floklarında ve biyofilmlerle yakından ilişkili oldukları gösterilmiştir. Mor kükürtsüz bakterileri gibi fototrofik bakteriler (Rhodosprillaceae familyası üyeleri) yaklaşık 10^5 hücre/ml oranında bulunmaktadır. Mor ve yeşil kükürt bakterileri daha düşük seviyelerde bulunmaktadır. Fototrofik bakteriler aktif çamur BOİ gideriminde küçük bir role sahiptir denilebilir (Bitton, 2005).

2.12.1.2. Funguslar

Aktif çamurun çoğunlukla fungus gelişimine katkıda bulunmamasına rağmen bazı fungal filamentler aktif çamur floğunda görülmektedir. Funguslar düşük pH, toksisite, azotsuz atıklar gibi özel şartlar altında yaygın büyüyebilir. Aktif çamurda baskın olarak bulunan fungus genusları;

- *Geotrichum*
- *Penicillium*
- *Cephalosporium*
- *Cladosporium*
- *Alternaria*

Çamur şişmesine sebep olan *Geotrichum candidum* asitli atıkların oluşturduğu düşük pH'lı aktif çamurlarda bol bulunur (Bitton, 2005).

Laboratuvar çalışmalarında fungusların nitrifikasyon ve denitrifikasyon gerçekleştirme yeteneğinde oldukları saptanmıştır. Bu durum, uygun şartlar altında atıksudaki azotun gideriminde bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Fungus tabanlı arıtım sisteminin bazı avantajlarından birisi fungusların nitrifikasyonu tek bir basamakta gerçekleştime yetenekleri ve inhibitör özelliği olan bileşiklere karşı bakterilerden daha dirençli olmaları söylenebilir (Bitton, 2005).

2.12.1.3. Protozoonlar

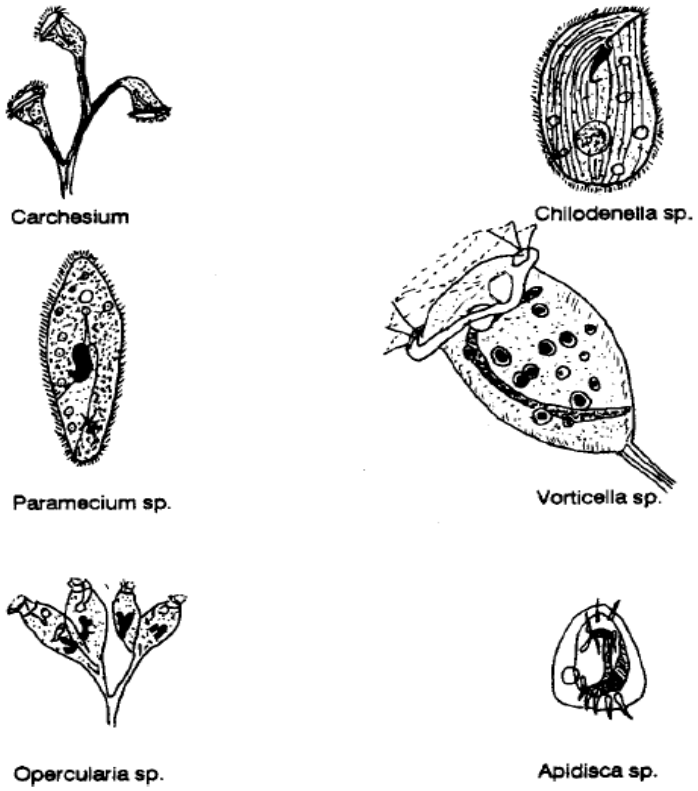
Protozoonlar doğal sucul sistemlerde ve aktif çamurda bakterilerin önemli predatörleridirler. Bakteriler üzerinde otlanan protozoonlar ^{14}C- ya da ^{35}S- işaretli bakteriler ya da fluoresan işaretli bakterilerin alınmasının ölçülmesiyle deneysel

olarak belirlenebilir. Bakteriler üzerinde predasyon aynı zamanda, *Aequorea Victoria* adlı denizanasından elde edilen yeşil fluoresan proteini (GFP) ile işaretlenmiş bakteriler kullanılarak deneysel olarak belirlenebilir. Bu yaklaşım aktif çamurda siliyatlar tarafından bakterilerin yenmesi ve sindirilmesini takip etmede kullanılmaktaydı. Protozoonların bakteriler üzerinde bu tarz bir otlanma sergilemesi aktif çamurda ağır metaller gibi bazı toksik maddelerin bulunmasıyla önemli ölçüde azalabilir. Örneğin, aktif çamurda kadmiyum varlığının *Aspidia costata*'nın bakteri üzerinde beslenmesini azalttığı gösterilmiştir. Protozoonlar aynı zamanda *Cryptosporium* ookistlerini yiyebilir ve bu sayede protozoon parazitlerinin dağıtılmasını ve bulaşmasında fayda sağlayabilirler (Bitton, 2005).

2.12.1.4. Siliyatlar

Siliyatlar aktif çamurda en çok bulunan protozoonlardır. Serbest, sürünücü veya dallı siliatlar olarak altgruplara ayrılırlar. Serbest siliyatlar flok dışındaki serbest bakterilerle beslenirler. Aktif çamurda en çok bulunan genuslar;

- *Chilodonella*
- *Colpidium*
- *Blepharisma*
- *Euplotes*
- *Paramecium*
- *Lionotus*
- *Trachelophyllum*
- *Spirostomum*



Şekil 2.22. Atık suda özellikle aktif çamurda sıklıkla rastlanılan protozoon grupları (Bitton, 2005).

Sürünücü siliyatlar aktif çamur floklarının yüzeyinde sürünerek yüzeydeki bakterilerle beslenirler. İki önemli genus *Aspidisca* ve *Euplotes*'tir. Saplı siliatlar, saplarıyla floklara tutunurlar. Dalları kasılmayı sağlayan miyonem denilen bir tür kas yapısına sahiptir. Baskın saplı siliatlar *Vorticella* (örn. *V. convallaria*, *V. microstoma*), *Carchesium*, *Opercularia* ve *Epistylis*'tir (Bitton, 2005).

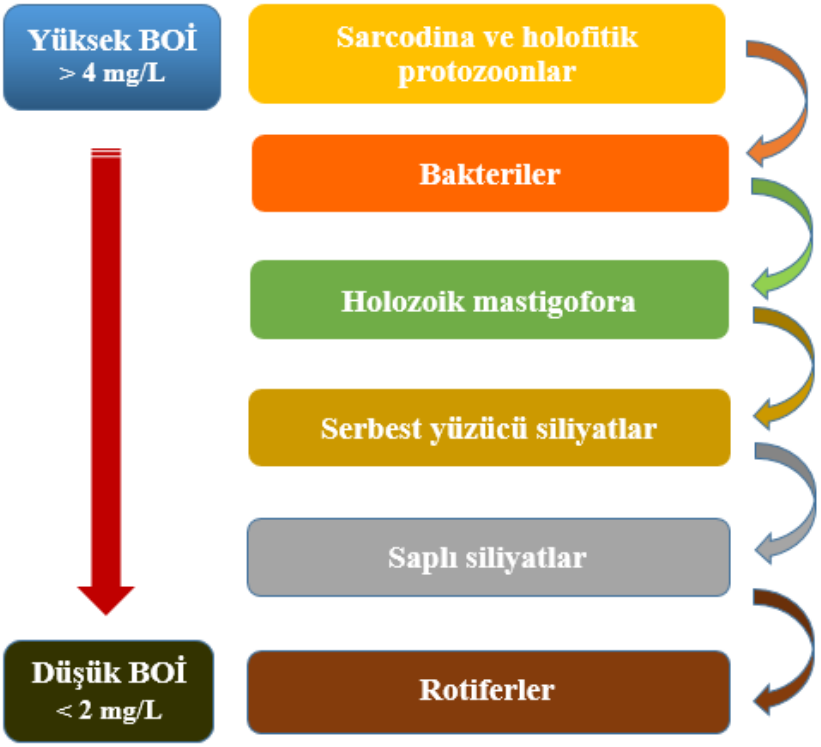
2.12.1.5. Filajellatlar

Bu protozoonlar tek ya da çoklu filajelleri vasıtasıyla hareket ederler. Yiyeceklerini bir ağız açıklığı veya hücre duvarı absorbsiyonuyla alırlar. Aktif çamurda bulunan bazı önemli filajellatlar *Bodo spp. Pleuromonas spp., Monosiga spp., Hexamitus spp.,* ve kolonial protozoonlardan *Poteriodendron spp.*'dir (Bitton, 2005).

2.12.1.6. Rhizopoda (Amebae)

Amebae pseudopodları vasıtasıyla yavaşça hareket ederler. İki alt gruba ayrılırlar bunlar, *Amoeba proteus'*ın dahil olduğu ameba alt gurubu ve bir kabukla çevrili olan thecameba alt grubudur (örneğin, *Arcella*) (Bitton, 2005).

Flajellalı protozoonlar ve serbest yüzücü siliatlar genellikle yüksek bakteri konsantrasyonlarıyla (>10^8 hücre/ml) ilişki halindeyken, saplı siliatlar düşük bakteri konsantrasyonlarında (<10^6 hücre/ml) gözlenir. Protozoonlar, askıda katı maddelerin ve patojen bakterilerin de dahil olduğu bakteri sayılarının ve BOİ'nin düşmesinde önemli katkılar sağlarlar. Askıda katıdaki protozoonların sayısı ile aktif çamur çıkış suyunun KOİ ve askıda katı madde konsantrasyonu arasında ters bir ilişki söz konusudur. Protozoon kommünitesindeki değişiklikler tesis işletim şartları, havalandırma tankındaki F/M oranı, nitrifikasyon, çamur yaşı ya da çözünmüş oksijen seviyesini yansıtmaktadır. Aktif çamurdaki protozoon türlerinin kompozisyonu işlemin BOİ giderim verimi hakkında bilgi verebilir. Örneğin, saplı siliatların ve rotiferlerin sayısındaki artış düşük BOİ seviyesini gösterir (Bitton, 2005).

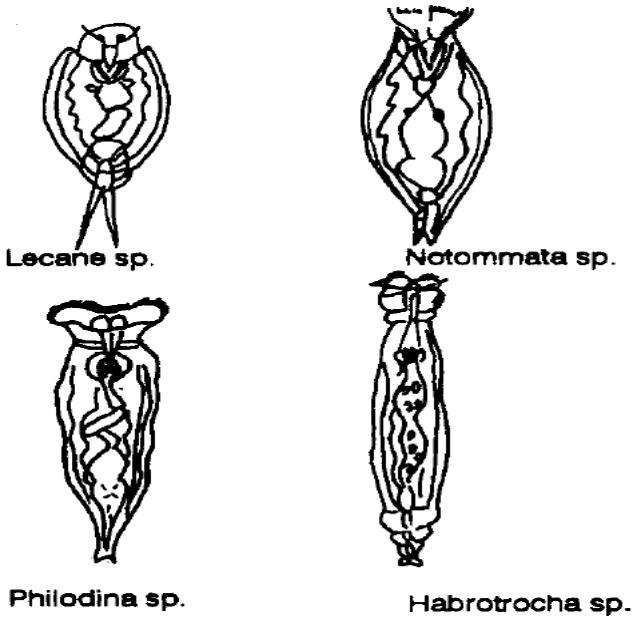


Şekil 2.23. Aktif çamurdaki mikroorganizma süksesyonu (Bitton, 2005)

2.12.1.7. Rotiferler

Rotiferler 100 µm – 500 µm arasında değişiklik gösteren boyutlara sahip metazoonlardır (çok hücreli organizmalar). Bünyeleri flok partikülleri ile kaplıdır ve genellikle flok yüzeyinde gerginlik sağlarlar. Atıksu arıtım tesislerinde en çok bulunan rotiferler iki ordoya aitlerdir, bunlar; Bdelloidea (*Philodina spp.*,

Habrotrocha spp.) ve Monogononta *(Lecane spp,* ve *Notommata spp*.) aktif çamur sisteminde en sık bulunan ve filtre sızdırmasına neden olan dört rotifer Şekil 2.24'de gösterilmektedir (Bitton, 2005).



Şekil 2.24. Aktif çamur sisteminde en yaygın bulunan rotifer türleri (Bitton, 2005).

Aktif çamurdaki rotiferlerin rolü iki türlüdür;

- Serbest suspanse bakterileri (örn floküle olmayan bakteriler) ve diğer küçük partikülleri gidermede yardımcıdırlar. Bu sayede atıksuyun temizlenmesine katkı sağlarlar. Aynı zamanda *Cryptosporidium* ookistlerini yiyerek bu parazitin yayılmasında vektör olarak iş görürler.
- Mukusla çevrili fekal pelletler oluşturarak flok oluşuma katkı sağlarlar.

Rotiferlerin görülmesi aktif çamurun son safhalarını belirtir. Beslenirken kuvvetli şekilde sil hareketleri yaparak süspanse halde bulunan bakterilerle beslenir ve süspanse haldeki bakterilerin sayısında azalmaya yardımcı olurlar ve bu hareketleri sayesinde protozoonlardan daha güçlü bir temilezleme işlevi görürler (Bitton, 2005).

2.13. Atıksu Arıtma Tesisleri ve PAH'lar İle İlişkileri

Aktif çamur sistemi, aerobik biyolojik aktif ürünlerin (mikroorganizma) özel havalandırma havuzlarında atıksu ile havalandırılarak karıştırıldığı ve oluşan flokların ayrı havuz sistemleri içinde çökeltildiği sürekli bir sistemdir. Bu sistemde üretilen biyolojik çamurun bir kısmı aşı çamuru olarak kullanılması amacıyla geri alınarak sürekli gelen atıksu ile karıştırılır. Aktif çamur sisteminde mikroorganizmalar atıksudaki organik maddeleri çözümleyip oksidasyon sentez işlemi ile CO_2, H_2O, N_2 ve SO_4 gibi son ürünlere dönüştürmektedir. Bilindiği üzere bu oksidasyon işlemi arıtımın etkinliği ve verimi açısından oldukça önem arz etmektedir.

Bir tesisin sürekli ve verimli bir şekilde işletilmesi için, giren suda bol miktarda bulunan kirletici kimyasalları metabolize edebilen ve sedimentasyon tankında oldukça hızlı çökebilen flokları oluşturma kabiliyetinde olan mikrobiyal kommunitenin oluşturulmasını gerektirmektedir. Bir aktif çamur biyoreaktöründe bu parametreleri sağlamak amacıyla, mikroorganizmaların maksimum seviyede işlev görebilmesi için istedikleri şartların optimum seviyede sunulması gerekmektedir.

Aktif çamur kommunitesinde genellikle organotrofik bakteriler baskındır. Bunların büyük bir kısmı çamur floklarına dahil olmakla birlikte bazıları sıvı içerisinde serbestçe dağılmış halde bulunurlar. Bakteriler gibi saprofit protozoonlarda, holozoik protozoonlar ve rotiferler için bir besin kaynağı olurlar.

Bu tip sistemlere parçalanması zor rekalsitrant bileşiklerin aniden girişi veya giriş suyunda bu tarz bileşiklerin oranının artması sistemi başarısızlığa uğratır. Bu sistemdeki arıtım verimi düşüklüğünün başlıca nedeni ortamdaki bu rekalsitrant bileşikleri parçalama kabiliyetindeki bakteri populasyonunun azalmasından dolayıdır. Günümüzde bu şekilde oluşan sistem başarısızlığını iyileştirmek için en kuvvetli strateji duruma özgü bakterilerin bir grubunu kullanarak gerçekleştirilen biyoçoğaltım işlemidir (Makinen et al., 1993).

Biyoçoğaltım, çevresel açıdan tehlike arz eden bileşiklerle kirlenmiş olan atık bölgelerinde yerli, yabancı veya genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar ile bu bileşiklerin uzaklaştırılmasını hızlandıran bir işlemdir (van Limbergen et al., 1998).

Uygulamanın avantajlarından bazıları; $BOİ_5$ (biyokimyasal oksijen ihtiyacı) ve KOİ uzaklaştırılmasının hızlandırılması, gres ve oil gibi bileşiklerin uzaklaştırılması, nitrifikasyonun arttırılması, filamentöz mikroorganizma kaynaklı şişmenin kontrol edilmesi, soğuk havalarda giderim performansının arttırılması, sistemin arıtım kapasitesinin arttırılması, çamur üretiminin azaltılması, kirlenmiş suların biyoiyileştirilmesi şeklinde belirtilebilir.

Bu işlemde aşı olarak kullanılan organizmalar laboratuar koşullarında biyodegradasyonu hedeflenen ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasında yüksek oranda etkilidirler. Ancak doğal koşullar altında bu laboratuar strainleri mikrobiyal kommuniteyi oluşturmak için ortamdaki mikroflora ile yarışmak zorundadır (Goldstein et al., 1985).

En fazla doğaya karışan ve parçalanması sorun olan bileşikler; uçucu aromatikler; alkanlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlardır.

Çamur yakma işlemi dışında Atık Su Arıtım Tesisleri (AAT) PAH oluşturmamaktadır. PAH'lar AAT'ne giriş suyu ile gelmektedir. Daha önceden de bahsedildiği üzere PAH'lar hareketli ve durağan birçok kaynaktan türevlenmektedir. Örneğin, milyonlarca aracın bulunduğu büyük şehir alanları otomatik olarak büyük miktarda PAH oluşturan milyonlarca kaynak halini almaktadır. Kanalizasyon sistemleri aracılığıyla PAH'lar direkt olarak AAT'ne toplanmaktadır. Bazı PAH'lar AAT bünyesinde işleyen doğal arıtım işlemleri ile giderilirken, bazı suda çözünebilir halde olanları ise arıtılan çıkış suyu ile sistemden çıkmaktadır. Yine bazı PAH'lar ise partiküllere adsorbe olarak çamurda konsantrasyon artışına neden olmaktadır. AAT bu nedenlerden dolayı birikim, konsantrasyon ve deşarj açısından PAH'ların ana nokta kaynaklarıdır. PAH giderimi için uygulanan alet, cihaz ve yöntemler önemli çevresel etki sağlayabilirler (Forsgren, 2015).

2.14. AAT Giriş suyu içinde PAH'ların Birikmesi

Bilindiği üzere PAH'lar yanma esnasında açığa çıkar ve ekseriyetle gaz fazında atmosfere karışırlar, ayrıca partiküllere adsorbe olurlar ve bunun sonucunda toprak veya su sistemlerinde birikirler. Şehirlerde ortaya çıkan PAH'ların büyük kısmı otomobiller tarafından oluşturulur ve egzoslar ile hızlı şekilde yayılarak otoyolların etrafındaki yakın çevrelerde birikirler. Yağmur suyu ile bu bölgeler bir şekilde yıkanır ve çevrede birikmiş olan PAH'lar bu yağmur suları ile birlikte kanalizasyon sistemine giriş yaparlar. AAT sistemine en genel giriş bu yolla gerçekleşir. Şehir boşaltım havzaları için bu anlatılan yol esas kaynaktır ki Tokyo'da yapılan bir çalışmada sokak tozlarının birkaç µg/g'dan daha fazla PAH içermekte olduğu gözlenmiştir (Takada et al. 1991; Forsgren'den, 2015). Los Angeles ve Kaliforniya'da ise mil başına düşen günlük araç sayısı 81 milyondan daha fazladır. Bu veri şu şekilde ifade edilebilir; güney Kaliforniya körfezinde sadece trafikteki araçlardan ortaya çıkan yıllık PAH miktarı yaklaşık olarak 740 kg'dır (Stein et al. 2006; Forsgren'den, 2015). Benzer şekilde, sularla deşarj edilerek kanalizasyon çamurunda toplanan PAH miktarı hesaplanmamaktadır (Forsgren, 2015). Araştırma kanalizasyon çamurunun tüm lipofilik kirleticiler için oldukça iyi bir emici olduğunu ve kirleticilerin bu sayede kanalizasyon sisteminde toplandıklarını göstermektedir (Strandberg et al. 2001; Forsgren'den, 2015). PAH'lar lipofilik yani hidrofilik karakterdedir ve bu sayede kanalizasyon sisteminde güçlü şekilde yoğunlaşırlar. Bu nedenle atık su arıtım işlemleri sonucu üretilen katı atıklardaki kirleticilerin kaderi ile ilgili artan bir çevresel endişe vardır (Forsgren, 2015).

2.15. AAT'ler tarafından üretilen PAH'lar

PAH'lar çamur yakma işlemi de dahil olmak üzere, organik maddelerin yanması ile ortaya çıkmaktadır (Mininni et al., 2004, Sun, 2011; Forsgren'den, 2015). Atık su arıtım tesisinde gerçekleşen diğer bazı işlemler sonucunda da PAH üretilmesine karşın, yakma ile oluşan miktarlar karşısında gözardı edilebilir durumdadır. Havalandırma havuzlarından çıkan gazlar AAT'ler tarafından üretilen PAH'ların diğer potansiyel kaynaklarıdır. İki mekanizma ile oluşması beklenebilir: düşük molekül ağırlıklı PAH'ları da içeren uçucu türler ki bunlar havalandırma

gazına karışırlar ya da sıvı yüzeyde patlayan baloncuklar tarafından atmosfere salınan partiküller üzerinde absorbe olan PAH'lar şeklindedir.

Arizona'daki AAT'lerde koku kontrolü yapılarak veya yapılmadan havalandırma havzalarından elde edilen partiküler materyal salınımları ölçümlerinin yapıldığı bir çalışmada, havada atıksu kaynağı olduğu tespit edilmiş ancak, havalandırma havuzlarının partiküler madde kütlesi veya PAH'larla ilişki partiküller açısından önemli bir kaynak olmadığı (daha ziyade AAT sınırları içinde dolaşan partiküllerin hastalık kaynağı ajanları taşıdığını düşündüren sonuçlar ile) gözlenmiştir (Upadhyay et al., 2013; Forsgren'den, 2015).

Aynı zamanda yapılan diğer bir çalışmada ise, bu yolla atmosfere salınan PAH miktarlarının düşük olduğu, bu şekilde buharlaşma ile geleneksel AAT'lerde sadece yaklaşık olarak PAH'ların % 1 – 2'nin uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (Manoli and Samara 2008; Forsgren'den, 2015). Bir diğer çalışmada yine havalandırma tanklarından çıkan gaz örneklerine ait hava örnekleri incelenmiş ve PAH'ların buharlaşma yolu ile havaya karışma miktarlarının minimum seviyelerde olduğu ve giriş suyundaki miktarlar kadar endişe yaratmaması gerektiği vurgulanmıştır (Kappen, 2003; Forsgren'den, 2015).

Aerobik şartların hüküm sürdüğü ve güneş ışığı altında olan çökeltim tanklarının mevcut PAH'ları oksijenlenmiş PAH'lar veya oxy-PAH'lara dönüştürebildiklerine dair bazı veriler mevcuttur (Kalmykova et al., 2014; Forsgren'den, 2015). Oxy-PAH'lar hem insan hem de çevre için toksik olduğundan dolayı önem arz etmektedirler. Aynı zamanda normal PAH'lara göre daha inatçı ve suda daha çok çözünür halde bulunmakta ve bu sayede daha hareketli haldedirler (Lundstedt et al., 2007; Forsgren'den, 2015). Bu daha çok dikkat edilmesi gereken bir konudur (Forsgren, 2015).

Kanada'da bulunan Ontario bölgesinde ikisi Hamilton limanı (bu liman büyük göller bölgesindeki en yoğun şekilde PAH'la kirlenmiş olan ve hem havasında hem de sedimentinde yüksek oranda PAH içeren bölgelerden birisidir) bir diğeri ise daha temiz olan kuzeydoğu Erie gölünde bulunan üç Kanada kolonisi iki tepeli karabatak kuşları ile yapılan çalışma kapsamında, bölgede iki yıl boyunca

örnekleme yapılmış ve endüstriyel PAH salınımının yılda binlerce kilogram oranında olduğu gözlenmiştir. Hamilton körfezinde yaşayan kuş yavrularındaki mutasyon seviyesinin diğer bölgedekilere oranla altı kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Kuşların safra keseleri ve karaciğerlerinden alınan örneklere yapılan analizler benzo(a)piren varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç, PAH'lara maruz kalan karabatak kuşlarının kimyasallarla etkileştiği, onları metabolize etmek zorunda kaldıkları ve bünye içindeki PAH'ların mutasyona sebep oldukları gözlenmiştir (King et al., 2014; Forsgren'den, 2015). Bu çalışma petrol sızıntısından ziyade, belki de vahşi kuşlarda çevresel olarak kimyasal bulaşının sebep olduğu PAH metabolitlerinin belirlenmesi yönünde yapılan ilk ve tek çalışmadır (Forsgren, 2015).

Günümüzde atıksu arıtım tesislerinde hala geleneksel aktif çamur sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle atıksuyun kolay parçalanabilir bileşikleri için iş gören sistemlerdir. Ancak rekalsitrant bileşiklerin bu sistemlere aniden girişi veya giriş suyunda onların oranının artması sistemi başarısızlığa uğratmaktadır. Bu sistemin verim düşüklüğü başlıca rekalsitrant bileşikleri parçalama kabiliyetindeki bakteri populasyonundaki azalmadan dolayıdır. Boya, ilaç, plastikleştiriciler, temizlik kimyasalları gibi birçok endüstriyel ve evsel atık, mikroorganizmalara yabancı olan ve mikroorganizmalarca parçalanmaya dirençli olan insan yapımı kimyasalları içerebilir. Bu tarz atıkların biyolojik yollarla arıtımında büyük zorluklar görülebilir. Böyle durumlarda, yerli populasyon ya biyoiyileştime ya da biyoçoğaltım işlemleriyle spesifik kirleticilerin parçalanması gerçekleştirilebilir. Bunun için mikrobiyal komünitenin güçlendirilmesi veya seçilmiş özel bakterilerin eklenmesi gerekmektedir. Dünya üzerinde çeşitli ülkeler tarafından üretilerek pazarlanan bir takım mikroorganizma formülasyonları bulunmaktadır. Çizelge 2.6.'da görüldüğü gibi birçok şirket tarafından çeşitli özellikteki bakteriler kullanım alanlarına göre satılmaktadır.

Çizelge 2.6. Çevresel biyoremediyasyon ve biyoçoğaltım amaçlı ticari bakteri formülasyonları.

Firma	Ürün	Özellikleri
Bi-Chem®	1002 CG	Atıksularda fenol, krezol ve ilgili bileşiklerin giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1003 FG	Gıda endüstrisi atıksularında yağ - gres giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1004 TX	Atıksularda deterjan giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1005 PP	Kağıt endüstrisi atıksularının arıtılması, kuru bakteriyel formülasyon
	1006 KT	Keton ve ilgili bileşiklerin giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1008 CB	Çeşitli atıksularda kompleks organik madde giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1738 CW	Soğuk hava şartlarında organik madde giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	1010 N 20xS	Nitrifikasyon, sıvı bakteriyel formülasyon
	Odor Cap™	Atıksu arıtma tesislerinde koku giderimi ve denitrifikasyon veriminin iyileştirilmesi, kuru bakteriyel formülasyon
	Biosulfox	H_2S kontrolü için nitrat içeren elektron alıcısı, sıvı bakteriyel formülasyon
	IF 500	Aromatik, poliaromatik bileşikler, selüloz, siyah likör ve bazı lignin bileşikleri gibi parçalanması zor maddelerin giderimi, kuru bakteriyel formülasyon
	XP 146	Anaerobik sistemlerin ve biyogaz tesislerinin optimizasyonu, kuru bakteriyel formulasyon

	1010 N 20xS	Nitrifikasyon veriminin İyileştirilmesi, sıvı bakteriyel formülasyon
	2009 GT	Terfi merkezlerinde patentli BioS™ 3122 formülasyonu ile ileri biyolojik yağ arıtımı, sıvı bakteriyel formülasyon
Ativa Biosciences	Bioclean®	Konsantre kuru bakteriyel formülasyon, Ürünün her gramı 4 milyar kadar bakteri içerir.
Epicore BioNetworks Inc	EPIZYM-100	Özel mikroorganizma karışımı
	EPIZYM-200	Daha kompleks atıksuların arıtımı için özel mikroorganizma karışımı
Envirosan International Ltd.	Bioclean ™ STP	Konsantre kuru bakteriyel formülasyon, Ürününün hergramı 4 milyar kadar bakteri ve 58 farklı suş içerir içerir.
Telamode Co	Tela-MS7 - Dry Concentrate Bioactive Formulation Waste Degrader	Konsantre kuru bakteriyal formülasyon.
Environmental Leverage Co	MicroClear 201	Kentsel atıksular için konsantre kuru bakteriyal formulasyon.
	MicroClear 205	Yağlı, gresli atıksular için konsantre kuru bakteriyal formülasyon.
	MicroSolv 118	Selülozik atık içeren atıksular için konsantre kuru bakteriyal formülasyon.
	MicroSolv 400	Kimya sanayi ve rafineri atıksular için konsantre kuru bakteriyal formülasyon.
	MicroSolv 600L	Nitrifikasyon denitrifikasyon proseslerini kolaylaştırmak için konsantre kuru bakteriyel formülasyon.

Aquabio Environmental Technologies Inc.	C/F 7001	Soğuk havalarda kentsel atıksuları arıtılmasını kolaylaştıran kuru bakteriyal formülasyon. Sporlu Bacillus ve 4 vejetatif gram negatif strain içerir. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7002	Endüstriyel ve kentsel atıksularda Fenol/hidrokarbon parçalayan konsantre kuru bakteriyal formülasyon. 4 sporlu *Bacillus* ve 5 vejetatif gram negatif suş içerir. Ürünü her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7004	Endüstriyel ve kentsel atıksularda deterjan ve sürfaktan parçalayan konsantre kuru bakteriyal formülasyon. 4 sporlu *Bacillus* ve 7 vejetatif gram negatif suş içerir. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7005	Endüstriyel ve kentsel atıksularda lignin ve lignosülfonat parçalayan konsantre kuru bakteriyal formulasyon. 3 sporlu Bacillus ve 5 vejetatif gram negatif strain içerir. Ürünün hergramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7006	Keton ve aseton parçalayan 7 özel suş içerir. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7007	Kentsel atıksularda iş yapan 2 gram pozitif ve 12 vejetatif gram negatif suş içerir. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7008	Endüstriyel atıkları parçalayan 12 geniş spetrumlu strain içerir. Ürünün hergramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7015	Özellikle Endüstriyel ve kentsel atıksularda filamentli ve *Nocardia* tarafından oluşmuş köpükleri yok edilmesini sağlayan flok oluşturucu bakteri strainleri içerir. 6 endospor oluşturan *Bacillus* suşu ve 9 vejetatif gram negatif bakteri içerir. Ayrıca siyanür parçalayan *Bacillus megaterium* AMC 300 içermektedir. Ürünün hergramında 5 milyar kadar bakteri bulunmaktadır.

	C/F 7030	Özellikle etilen glikol, propilen glikol ve benzer bileşikleri parçalayan 4 spor oluşturan *Bacillus* suşu ve 16 vejetatif gram negatif bakteri içerir. Ürünün hergramında 5 milyar kadar bakteri bulunmaktadır.
	C/F 7036	Geniş spektrumda hidrokarbon parçalayan 4 spor oluşturan *Bacillus* strainleri ve 16 vejetatif gram negatif bakteri içerir. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir.
	C/F 7037	Benzen, toluen, ksilen, naftalen, metilnaftalen, antrasen ve dizelde bulunan C10 - C17 gibi bileşikleri parçalayan spesifik 4 spor oluşturan *Bacillus* suşu ve 5 vejetatif gram negatif içerir. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir
	C/F 7038	Gazolinin parçalanmaya direçli bileşiklerinden benzen, toluen ve ksilen gibi bileşikleri parçalayan spesifik 1 spor oluşturan Bacillus strainleri ve 3 vejetatif gram- negatif içerir. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir.
Usabioproducts Co	BactaClean - PHC, Type 1	
	BactaClean - PHC, Type 2	Petrol hidrokarbonlarının biyolojik arıtımını gerçekleştirmek için mikroorganizma karışımını içerir. Daha ağır hidrokarbon fraksiyonlarına etkilidirler. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	BactaClean - PHC, Type 3	Petrol hidrokarbonlarının biyolojik arıtımını gerçekleştirmek için mikroorganizma karışımını içerir. Gazolin, jet yakıtı, fenoller, dizel, ham petrol ve daha birçok hidrokarbon üzerine etkilidir. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.
	BactaClean - PHC, Type 4	Petrol hidrokarbonlarının, rafineri, kimya, tekstil ve farmasötik atıkların aktif çamur sisteminde uzaklaştırılmasına katkıda bulunur. Ürünün her gramı 5 milyar kadar bakteri içerir.

	BactaClean - WWT, Type 1	Kentsel organik atıkların arıtılmasına katkıda bulunan fakültatif mikroorganizmalar içerir. BOİ/KOİ, total katı madde ve fosfor miktarında azalma sağlar. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir.
	BactaClean - WWT, Type 2	Selüloz, lignin içeren atıksuların arıtılmasına katkıda bulunur. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir.
	BactaClean - WWT, Type 6	Kağıt endüstrisinde yüksek sıcaklık uygulamalarında hidrokarbon ve kimyasalları parçalanmasını sağlayan termofilik bakterileri içerir. Ürünün her gramı 3 milyar kadar bakteri içerir.
	BactaClean - WWT, Type 8	Aktif çamurda yağın, oilin ve gresin parçalanması amacıyla gramda 5 milyar kadar bakteri içerir.

Çizelge 2.7. Biyoçoğaltım amacıyla gerçekleştirilen bazı bilimsel çalışmalar.

Ref. No	Yıl	Mikroorganizma	Proses tipi	Reaktör Hacmi	Verimlilik
a)	2004	2,4-diklorofenol parçalayan mikroorganizmalar	Laboratuar ölçekli, sürekli akışlı, tam karışımlı reaktör	16 L	Biyoçoğaltım olmayan reaktörde 2,4-D mineralizasyonu %71-85 iken, biyoçoğaltımlı reaktörde verim %95-100.
b)	1998	Aktif çamur sisteminden izole edilmiş ve fenol parçalama yeteneğindeki genleri klonlanmış *Pseudomonas putida BH* (PS10-45)	Laboratuar ölçekli batch çalkalamalı kültür reaktörü (sentetik atıksu)	100 ml	Orijinal *P.putida*'ya göre genetik modifiye *P.putida* Sequenching batch mode'da fenol giderimi daha fazla olmaktadır. Semi cont.'da %100, şok yüklemede yükleme miktarı attıkça orijinal %25,2 - 50,3, genetik modifiye %30,6 - 99,8 oranında parçalama yeteneği sergilemiş.
c)	2006	4-chlorophenol parçalayan *P. putida CP1* ve *Ala* strainleri	Koni şeklinde erlende aerobik çalkalamalı Sequenching batch.	1L	1,56mM/200ml 4-klorofenol'ün tamamı 48 h içinde parçalanmış. Aktivite gösteren bakterilerin görüntülenmesi GFP ile gerçekleştirilmiş.
d)	2009	3-chloroaniline parçalayan *C. Testosteroni SB3* (plazmid aracılı pNB2)	1-Semicont. Moving bed biofilm reactor with wood chips on biofilm carrier. 2-Semicont. Aktif çamur reaktörü	Total hacim 1L, çalışma hacmi 600ml	Aktif çamurun kullanıldığı C2 tip reaktörde en yüksek verimlilik yakalanmış, C1'de ise parçalama gerçekleşmemiş. Nedeni plazmidin *C.testosteroni* dışında mevcut organizmalara aktarımı olabileceği yönünde görüşler var.

e)	2003	- Bakteriyel konsorsiyum (*Clavibacter michiganensis* (E-863-61), *Rhodococcus erythropolis* (E-863-AP1.1), *P.putida* (AS-6-10), *Methylobacterium mesophilicum* (E865-LA-2)), Metal working fluid (MWF) community	Habbecikli kolon reaktörü	2 L	Bakteriyel komunite içeren reaktörlerde yerli komunite varlığında %56, yerli komunite yokluğunda %71 oranında verim artışı var.
f)	2002	3-kloroanilin parçalayan *C. testosteroni 12gfp*	Yarı kesikli aktif çamur reaktörü	Toplam hacim 2 L, Çalışma hacmi 1,2 L	12 gün sonunda 250mg/L 3-CA tamamen parçalanmış. Bu parçalanmanın ortamdaki *C.testosteroni* varlığı ile doğru orantılı olduğu görülmüş. İmmobilize edilmiş hücrelerin kullanıldığı reaktörlerde %90 verim artışı belirtilmiş.
g)	2009	*Agrobacterium sp, Bacillus sp, Enterobacter cloacae, Gordonia, P. stutzeri,P. putida* sentetik ve kentsel atıksuların degradasyonunda kullanılmıştır.	Aktif çamur reaktörü	250 ml erlen çalışma hacmi 150 ml	*Enterobacter cloacae,Gordonia ve P.putida* sentetik atıksularda organik maddeyiönemli ölçüde degrede etmiştir.Bioaugmentasyonla toplam organik karbonun degredasyonu %10-15 artış göstermiştir.
h)	2009	Farklı petrokimya atıksu arıtım tesislerinden izole edilip zenginleştirilen *Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacter, Flavobacterium* ve *Micrococcus* içeren karışık kültür	Önceden alıştırılmış petrokim. Atık suyuna inokülasyon. Full-scale Bioaug.-line atıksu arıtım tesisinde kontrollü	60x40x8m Derinlik 7,2 m	KOİ-> Biyoçağaltımlı arıtımda (S1) %84,9-81-72,8; normal arıtımda %76,8-77,8-75,6. NH_4^+-N-> biyoçoğaltımlı arıtımda (S2) %67,2-94,9-69,2; normal arıtımda %8,6-27,2-17,3. S1'de 24 saat sonunda arıtım başlarken, S2'de 5 günde arıtım başlamış. (0,6-0,9-1,1 kgKOİ/m^3d). S1, S2'den daha verimli.

i)	2006	Atıksu arıtım tesisinden izole edilen *Sphingomonas xenophaga QYY* suşu - Bromamid asit (BAA) parçalamada etkin.	30°C'de pH:6-7-8'de 150 rpm çalkalamalı reaktör	250ml'de 50ml yapay atıksu	İmmobilize edilen hücreler ile süspanse hücreler pH ve sıcaklık gibi parametrelerde karşılaştırılmış ve en iyi sonuç 30C'de pH:7'de immobilize edilmiş hücrelerden (immob. hücre %98, süsp. hücre %80 giderim) alınmış. İmmobilize hücrelerin 4°C'de 60 gün bekletildiğinde dahi parçalama aktiviteleri %90'larda olduğu görülmüş.
j)	2008	Pestisitlerle kontamine olmuş yerlerden alınmış piridin degrade eden mikroorganizmalar/ Konsorsiyum.	Erlenlerde	1 L	Reaktöre belirli aralıklarla piridin şok yüklemesi (10-20-50mg/L) yapılmış; 10mg/L piridin %99'dan fazla parçalanmış, 20mg/L piridin %99'dan fazla parçalanmış, 50mg/L piridin %52 oranında parçalanmış. (96h)
k)	2005	*P.putida* pNB2 (donör), *Commomonas testosteroni* pNB2-transkonjugant (alıcı)	Yarı kesikli aktif çamur reaktöründe 120 rpm çalkalamalı	1 L erlende 500ml	Donör ve alıcı hücreleri içeren üç farklı reaktörde biyoaugmentasyona bakılmış. Alıcının olduğu reaktörde degradasyonun iyi olduğu (4 günde <10mg/L parçalama) görülmüş. Mobil hücreler arasında kromozomal gen (NB2) transferine bakılmış. Alıcı ve donör birlikte 12 günde 50mg/L'ye kadar parçalama gerçekleştirmişler.
l)	1994	*P. putida* ve PAH degrede eden organizmalar	Zenginleştirici reaktör sistemleri; 1-sürekli akışlı reaktörler 2-sıralı	1-15 L 2-5 L	Aktifçamurla karşılaştırıldığında zenginleştirici rekatör sistemlerin degredasyon oranını arttırdığı ancak, naftalin konsantrasyonu 5,7µg/l olduğu zaman bu yeteneğini kaybettiği görülmüştür.
m)	2005	*S. xenophaga QYY*	Sıralı takım reaktörleri	250 ml	1-aktif çamur +süspanse hücreler (ASSC) 2-aktif çamur +immobilize hücreler (ASIC) BAA seviyesi 220mg/l olduğunda ASSC sistemi durmaktadır. Ve BAA parçalanma oranı %70dir. Ancak ASIC sistemi 520mg/l BAA seviyesinde çalışmaktadır. Verim ASIC 'te daha yüksektir.

n)	2000	*Comamonas testosteroni 12gfp*	Laboratuar ölçekli yarı kesikli aktif çamur sistemi	500 ml	Biyoaugmentasyon 3-CA 'nın %50'sinin parçalanmasını sağlasa da, düzenli olarak yeniden uygulama gerektirmektedir.
o)	2002	Phenol degradasyonunda GEM (genetically engineered microorganism) olarak *Comamonas sp rN7* straini kullanılmıştır.*C.testosteroni* R5 strainnin phc genleri kromozomlarına integre olmuştur.	Aeration tank (3 L) Settling tank (2 L)	ND	Transformasyon sonucu fenol oksijenaz aktivitesi 3 kat arttırılmıştır.
p)	2006	Çevresel örneklerde Naftalen degradasyonu yapan mikroorganizmaların belirlenmesi	Real time PCR ile naftalen parçalayan mikroorganizmaların filogenetik ilişkisi belirlenmiştir.		Sonuç olarak γ ve β- Proteobacteria' ya ait 3 grup altında ayrılmışlardır.

- **Not: Çizelge 2.7. için referans listesi** a) Quan et al., 2004; b) Soda et al., 1998; c) McLaughlin et al., 2006; d) Bathe et al., 2009; e) van der Gast et al., 2003; f) Boon et al., 2002; g) Chen et al., 2009; h) Ma et al., 2009; i) Qu et al., 2006; j) Lodha et al., 2008; k) Bathe et al., 2005; l) Cardinal and Stenstrom, 1991; m) Qu et al., 2006 n) Boon et al., 2000; o) Watanabe et al., 2002; p) Nyyssönen et al., 2006.

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Enstrümental analizlerde kullanılan kimyasallar maddeler

Çalışmaların tümünde kullanılan kimyasal maddelerin listesi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler.

Kullanılan Kimyasal Malzeme Listesi	
Asenaften (Sigma) 215376-100G	Dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma 2,5L
Fluoren (Sigma) 128333-100G,	Metanol (MeOH) Sigma 2,5L
Antrasen (Sigma) 3885 -100G	Luria Bertani Broth (Sigma) L3022-1KG
Fluoranten (Sigma) 423947-25G	Bushnell Hass Medium (Sigma) B5051-500G
Piren (Sigma) 185515-100G (x5)	$HgSO_4$ (Merck) 1044810 -100G
Terefitalik asit (Sigma) 185361-500G	K_2Cr_2O7 (Sigma) 207802-500G
Etilen diklorür (Sigma) 284505-1L	

3.1.2. Nükleik asitlerin görüntülenmesinde kullanılan kimyasallar

Mikroorganizmalardan izole edilen genomik DNA'lar agaroz jel elektroforez sisteminde, Agaroz (Sigma) Tris Asetik Asit (TAE) tamponu kullanılarak görüntülenmiştir. DNA'ların agaroz jelde görünebilmeleri için GelRed (Biotium) floresan tabanlı nükleik asit boyası kullanılmıştır.

3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

- Hassas Terazi (Denver Instrument): Çalışmalarda kullanılan tüm besiyeri ortamları ve kimyasal maddelerin hassas şekilde tartılması amacıyla kullanılmıştır.

- Otoklav (Hirayama Hiclave - HV 50L): Hazırlanan taze ortamların ve kullanılmış organizmalı ortamların sterilizasyonunda kullanılmıştır.
- Laminar Flow Steril Kabin: Yapılan tüm ekim işlemlerinde kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır.
- DNA/RNA Steril Kabini (Biosan): Moleküler biyolojik çalışmalar esnasında kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılmıştır.
- Statik inkübatörler (Memmert): Statik koşullarda yapılan inkübasyonlarda 25-37ºC'de kullanılmıştır.
- Çalkalayıcı ve soğutmalı inkübatörler (New Brunswick Scientific Innova 4340, Biosan Inkübatör ES - 20 ve Memmert IPP400): Erlen ve tüplerde yapılan sıvı ortam inkübasyonları için kullanılmıştır.
- Spektrofotometre (Hettich - Carry 300 Bio): Mikroorganizmaların optik yoğunluk değerlerinin belirlenmesinde ve başlangıç miktarlarının ayarlanmasında kullanılmıştır.
- HPLC (Agilent 1100 Series): Kimyasal maddelerin biyoparçalanmasının gözlenmesi ve takibi için enstrümental analizlerde kullanılmıştır.
- Gradient Thermal Cycler (Techne FE-FCT Plus/02): Genomik ve plazmid DNA'ların çoğaltılmasında kullanılmıştır.
- Real Time PCR (Roche LightCycler 1.5): DNA ve RNA moleküllerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde ve gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmıştır.
- Sürekli karışımlı Tank Reaktörü: Aktif çamur oluşturulmasında, olgunlaştırılmasında ve hedef kimyasal maddelerin biyoparçalanmasında kullanılmıştır.
- Termoreaktör ve spektrofotometre (WTW CR2200, WTW Photolab S12): Aktif çamurun kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizinde kullanılmıştır.
- Mobil pH Ölçer (WTW pH 3110): Aktif çamur sisteminin yerinde pH analizi için kullanılmıştır.
- Mobil Oksijen Ölçer (WTW Oxi 3205): Aktif çamur sisteminin yerinde çözünmüş oksijen analizi için kullanılmıştır.
- Mikroskop (Olympus): Organizmaların morfolojik, gram reaksiyonlarının gözlenmesinde ve oluşturulan aktif çamur floklarının izlenmesinde ullanılmıştır.

- pH metre (VWR): Kullanılan besiyeri ortamları ve tamponların asit – baz dengelerinin sağlanmasında kullanılmıştır.
- Vortex (VWR): Ekstraksiyon basamağında ve diğer tüm karıştırma işlemlerinde kullanılmıştır.
- Dikey Derin Dondurucu (WiseCryo WUF-500): Tüm genomik materyallerin, moleküler biyolojik analizlerde kullanılacak kitlerin, liyofilize haldeki izolatların ve oluşturulan aktif çamurun saklanması için kullanılmıştır.
- Dry Block Heater (Stuart ST-SBH130D): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
- Elektroforez Tankları (OWL OW-A1, OW-B1A, OW-B2): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
- Elektroforez Güç Kaynağı (OWL OW-EC300XL2): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
- Jel Görüntüleme sistemi (UVP Biospectrum 800): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
- Nanodrop Spektrofotometre sistemi (Thermo Nanodrop 2000c): DNA/RNA miktar tayini ve saflık ölçümünde kullanılmıştır.
- Konsol Tip Liyofilizatör (Labconco 7753030): İzolatların ve aktif çamurun kurutulmasında kullanılmıştır.
- Mikropipetler (Eppendorf): 10µl, 100µl ve 1000µl hacimlerindeki otomatik mikropipetler küçük hacimli sıvıların aktarılmasında kullanılmıştır.
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich):Terefitalik asidin HPLC analizinde kullanılmıştır.
- Mikrosantrifüj (Hettich): Mikrosantrifüj tüpü kullanılan çöktürme işlemlerinde kullanılmıştır.
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich): Genomik DNA ve plazmid DNA çöktürmesinde kullanılmıştır.

3.1.4. Mikroorganizmaların izolasyonu için kullanılan besiyeri ortamları ve tamponlar

Hedef hidrokarbonların parçalanmasını gerçekleştiren mikroorganizma izolatlarının elde edilmesi ve bu izolatlardan konsantrasyon/süre açısından en etkili

biyoparçalama işlemi yapan izolatların belirlenmesi amacıyla kullanılan besiyeri ortamlarının içerikleri ve tampon solüsyonu içerikleri Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Bushnell Haas Broth

Bileşen	**Miktar (g/L)**
Magnezyum Sülfat	0,20
Kalsiyum Klorür	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00
Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorür	0,05

Çizelge 3.3. Plate Count Agar ve Nutrient Agar

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

Çizelge 3.4. Phosphate Buffer Saline (PBS) Tampon Solüsyonu

Bileşen	**Konsantrasyon**
NaCl	0,12 M
Na_2HPO_4	0,01 M
KH_2PO_4	5 mM
Distile su	1000ml
pH	7,5

3.1.5. İzolatların mikroskobik tanılamasında kullanılan kimyasallar

Hedef kimyasallara karşı aktivite gösteren mikroorganizmaların morfolojik yapısının ve hücre duvarı gram reaksiyonlarının belirlenmesi açısından gram boyama yöntemi kullanılmıştır. Gram boyama işlemleri için kullanılan boya solüsyonlarının içerikleri Çizelge 3.5, 3.6 ve 3.7'de belirtilmiştir. Hazırlanan kristal viyole solüsyonu iyice karıştırıldıktan sonra 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Toz haldeki safranin boyası %95 v/v saflıktaki etanolde (EtOH) çözülerek distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır. Safranin boyası 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Gram iyodür solüsyonu potasyum iyodür ve iyotun bir kapta iyice ezilerek yavaş yavaş su eklenmesiyle hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Kristal Viyole Solüsyonu

Bileşen	**Miktar**
Kristal Viyole boyası (%90)	2 g
Etanol (%95 v/v)	20 ml
Amonyum okzalat	0,8 g
Distile Su	80 ml

Çizelge 3.6. Gram İyodür Solüsyonu

Bileşen	**Miktar (g/300 ml)**
Potasyum iyodür	2 g
Iyot	1 g

Çizelge 3.7. Safranin Solüsyonu

Bileşen	**Miktar**
Safranin O	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Deiyonize Su	100 ml

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hedef hidrokarbonlara Özgü Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu amaçla, PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. Biyolojik Arıtım Tesisi'nden arıtımın iyi olduğu çeşitli dönemlerde (Mart – Nisan 2010) aktif çamur örnekleri ve ayrıca Kemalpaşa Nif Çayı (İzmir) civarında kirlenmiş toprak örnekleri alınmıştır. Örnekler homojen hale getirilip ardışık olarak 10^{-4}'e kadar bir seri dilüsyon halinde seyreltilerek % 0,1 referans hidrokarbon bulunan 50 ml hacmindeki Bushnell Hass (BH) Petroleum Broth (Sigma - Aldrich) besiyeri ortamına her örnekten 1'er ml aktarılmış ve 27 – 30 ^{o}C'de örneğe bağlı olarak birkaç hafta inkübasyona bırakılmıştır.

Yaklaşık 7 günlük inkübasyon sonrasında besiyeri ortamındaki bulanıklık mevcut bir üreme varlığını gösterdiğinden, bu şekilde bulanıklık olan erlenlerden %5 oranında örnek alınarak % 0,1 bireysel referans hidrokarbon (TFA, Ace, Flo, Flr, Ant ve Pyr) bulunan BH sıvı ortamına aşılanmıştır. Ardışık olarak 3 hafta boyunca bu işlem tekrarlanmış ve mevcut koşullarda üreyebilen mikroorganizmaların hedef kimyasal maddelere adaptasyonu sağlanmıştır.

Ace, Flo, Flr, Ant ve Pyr hidrokarbonları Dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözülerek 1000 ppm stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hem izolasyon hem de degredasyon deneme erlenlerinde son konsantrasyon 50 ppm olacak şekilde deneme erlenlerine aktarımlar yapılmıştır. TFA ise DMSO'da çözülerek 2000 ppm stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Adaptasyon için yaklaşık 30 gün süren pasajlamaları takiben erlen içerisinde bulunan karışık mikrobiyal popülasyondan saf koloniler elde etmek amacıyla, içeriğinde bireysel hidrokarbonların bulunduğu aynı özellikteki steril BH agar besiyerlerine çizgi ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 27°C'de 7 gün statik ve karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda BH agar petrileri üzerinde üreyen ve koloni kültür özellikleri bakımından birbirinden belirgin şekilde ayrılan kolonilerin morfolojileri ve gram reaksiyonlarının belirlenebilmesi amacıyla genel besiyerleri olan Plate Count Agar (PCA) ve Nutrient Agar (NA) ortamları kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda seçilen koloniler bu besiyeri ortamlarında tekrar çizgi ekime tabi tutularak saf olduklarında emin olunan koloniler seçilmiştir.

PCA ve NA ortamlarından seçilen saf kolonilerden ileri parçalama çalışmalarının yapılabilmesi için BH medium ortamında çoğaltılması sağlanmıştır. Bu sebeple, elde edilen her bir saf koloniden bir öze dolusu mikroorganizma alınarak bu defa 10 ml tüplere hazırlanan ve içinde %0,1 referans hidrokarbon bulunan BH sıvı ortamlarına aktarılmıştır. Bu işlem için inkübasyon koşuları karanlıkta, 150 rpm çalkalamalı inkübatörde, 27ºC'de ve 7 gün olarak belirlenmiştir.

3.2.2. İzole edilen mikroorganizmalardan biyoparçalama yeteneklerinin belirlenmesi

İnkübasyon sonunda, yine aynı özellikteki steril BH sıvı besiyerinden 250ml'lik erlenler içerisinde 50ml besiyeri olacak şekilde hazırlanmış olan steril BH medium içerisine ayrı ayrı her bir kimyasaldan son konsantrasyon 100 ppm olacak şekilde eklenmiş ve iyice çalkalanarak kimyasalların besiyeri içerisinde homojenize olması sağlanmıştır. İzole edilen mikroorganizmalardan biyoparçalama yeteneklerinin belirlenmesi için 50 ml Nutrient Broth (NB) ortamına ekilerek 25ºC de 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda erlenlerden steril mikrosantrifüj tüplerine 1 ml örnek alınarak soğutmalı santrifüj yardımıyla 5000 rpm'de 25°C'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp pellet üzerine 1 ml steril PBS tampon solusyonu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi üç kez tekrarlanmış ve son olarak yeniden 1ml steril su ile süspanse hale getirilmiştir.

Hücre süspansiyonları spektrofotometre vasıtasıyla 540 - 600 nm dalga boyunda ölçülerek izolatların yoğunluklarının 0,3 - 0,5 OD (optik yoğunluk) olması sağlanmıştır. 0,3 - 0,5 OD olarak ayarlanan hücre süspansiyonları 10^{-7}'ye kadar

seyreltilmiş ve PCA ortamına dökme plaka yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda 0,3 - 0,5 OD'ye ayarlanmış olan mikroorganizma süspansiyonundan aktarılan mikroorganizma sayısının yaklaşık olarak 10^6 – 10^7 kob/ml olduğu belirlenmiştir. Böylece daha sonraki deneme erlenlerine aktarılan mikroorganizma miktarı OD bazında optimize edilmiştir.

Sonrasında her bir saf kültürden ilgili hedef hidrokarbonun belirlenen konsantrasyonlarını içeren BH sıvı ortamlarına % 5 oranında olacak şekilde (yaklaşık $1x10^7$ hücre/ml) aktarılarak ileri parçalama çalışmalarına geçilmiştir. Erlenler için inkübasyon koşulları karanlıkta olacak şekilde 150 rpm çalkalamalı inkübatörde, 27ºC olarak belirlenmiştir. Biyoparçalanma süresinin belirlenmesi için enstrümental analizlere ihtiyaç duyulduğundan eş zamanlı olarak bu analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan deneysel yöntemin doğrulanması amacıyla bahsedilen aynı deney şartları aynı ortam ve kimyasal içeriğine sahip steril erlenler kullanılarak kör olarak değerlendirilmiştir. Hidrokarbonların kimyasal kararlılığını kontrol bu yöntem kullanılmıştır.

3.2.3. Hedef hidrokarbonların enstrümental analizleri

Enstrümental analizlere başlamadan önce HPLC vasıtasıyla hedef hidrokarbonlar için en uygun protokoller oluşturulmuştur. Protokoller oluşturulurken kimyasalların yapılarına göre mobil fazlar oluşturularak diyot array dedektörü (DAD) vasıtasıyla hangi dalga boyunda en iyi pikleri verdikleri ve bu piklerin süreleri saptanmıştır. HPLC cihazında 220, 230, 240 ve 254 nm olmak üzere dört farklı dalga boyunda ölçüm yapılmasına olanak sağlayan DAD dedektöründen yararlanılmıştır. Çizelge 3.8'de kimyasallara özgü protokoller verilmiştir.

Yine bulanıklılığa bağlı olarak ortamdaki tek karbon kaynaklarını metabolize eden kültürlerin erlen içerisinde başlangıçta standardize edilmiş konsantrasyonlarda (TFA için 100 ppm, diğer PAH'lar için 50 ppm) olan hedef hidrokarbonları metabolik açıdan ne ölçüde parçaladıkları veya metabolize ettikleri, erlen içeriğinin ön işlemlerden geçirilmesi sonrasında HPLC (Agilent 1100) cihazı ile analiz edilerek saptanmıştır. Analitik açıdan öneme sahip bu işlemler sonunda,

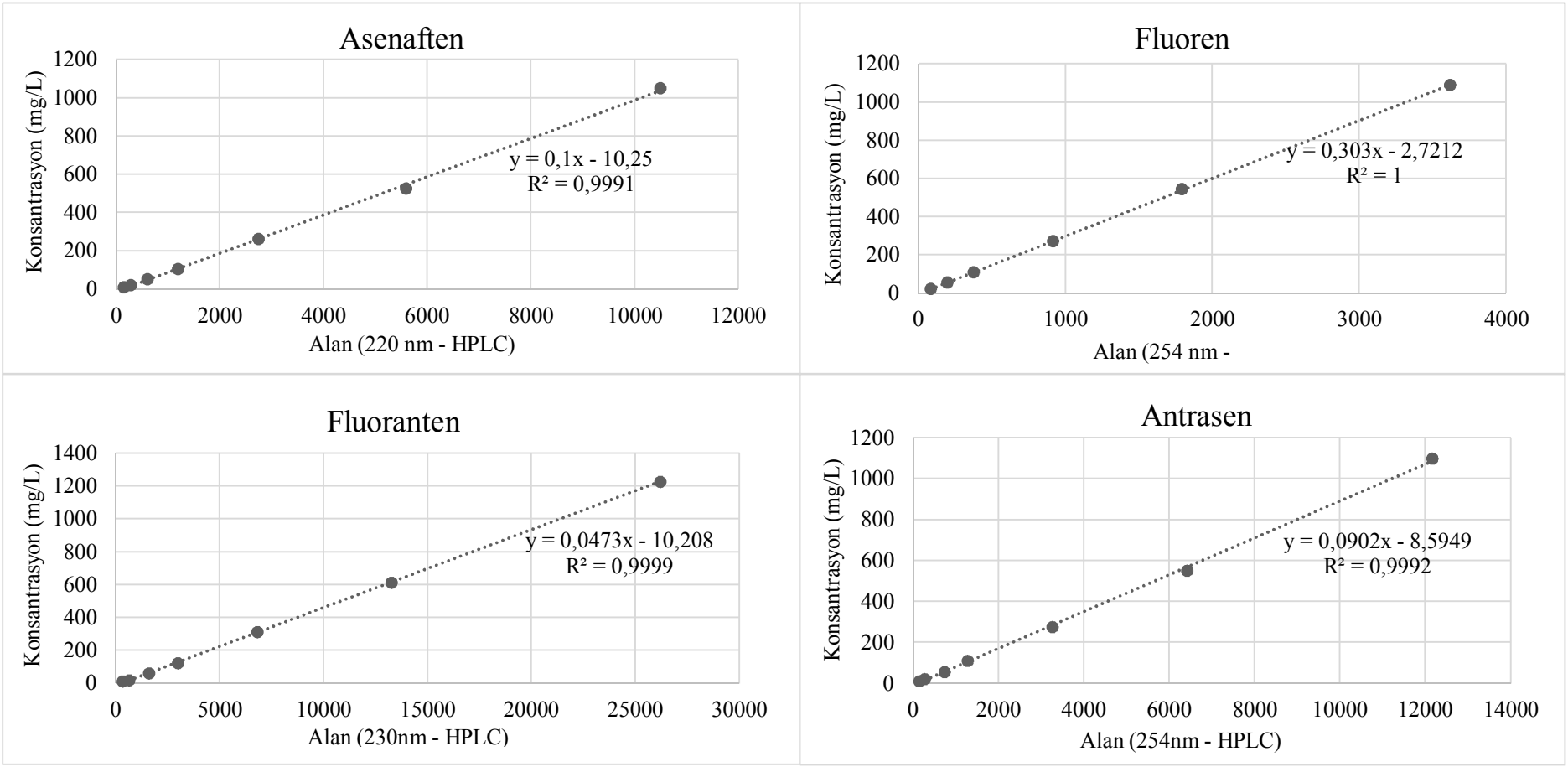
hücresel metabolik faaliyetleri için referans hidrokarbonlardan maksimum fayda sağlayan bakteriler seçilerek hedef kimyasallara özgü izolatlar olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 3.8. Kimyasal analizleri için HPLC protokolleri.

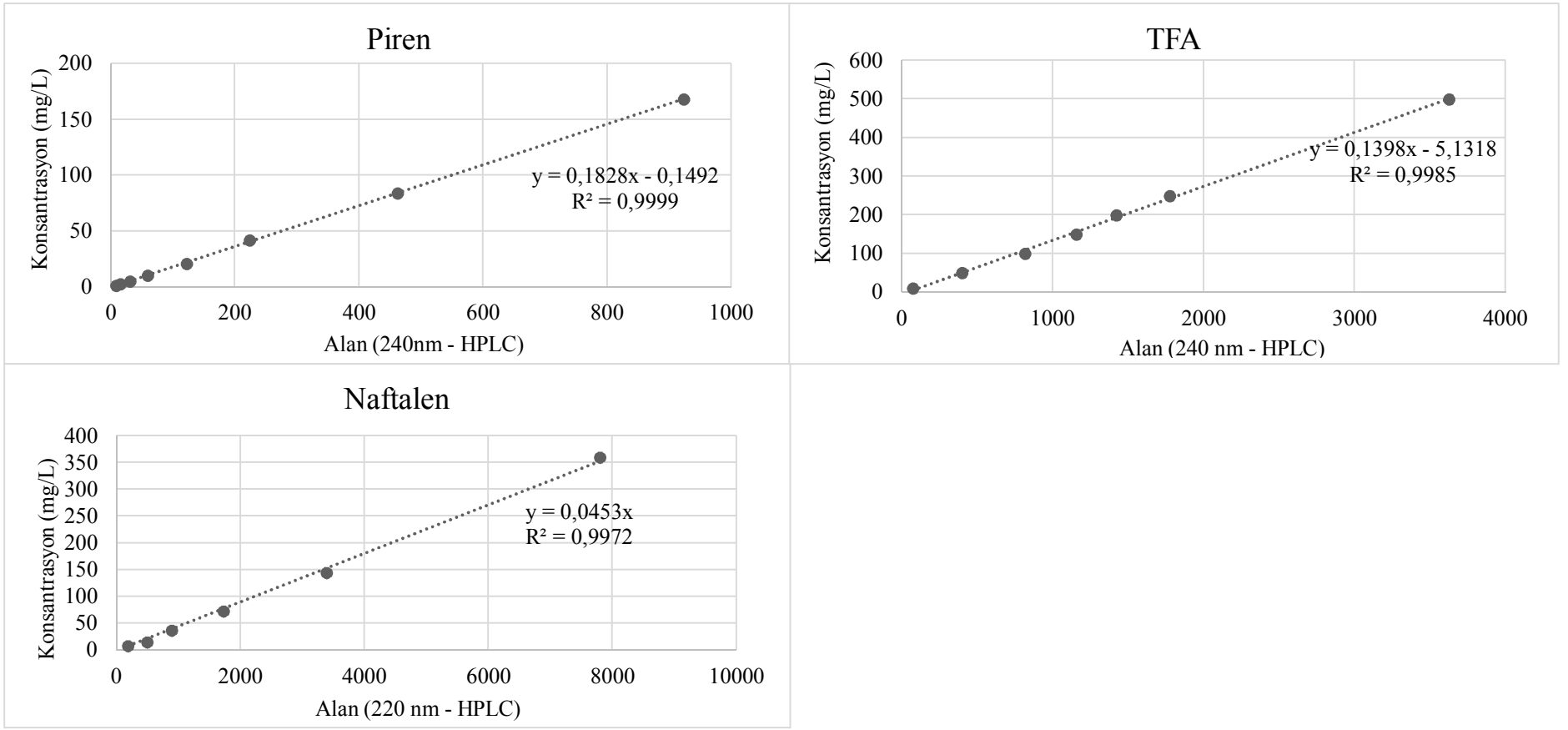
Hidrokarbon	Mobil faz	Enjeksiyon hacmi	Akış hızı/dk	Dalga boyu nm	Alıkonma süresi (RT)/dk
TFA	%80 – 20 Metanol – Su	1 µL	0,4 mL	240	2,07
Ace	%60 – 40 Asetonitril – Su	1 µL	1 mL	220	4,1
Flo	%60 – 40 Asetonitril – Su	1 µL	1 mL	240	4,3
Flr	%60 – 40 Asetonitril – Su	1 µL	1 mL	230	7,5
Ant	%60 – 40 Asetonitril – Su	1 µL	1 mL	254	6,6
Pyr	%60 – 40 Asetonitril – Su	1 µL	1 mL	240	11.7
	0 - 12 dk % 50 – 100 gradiyent				

3.2.3.1. Hedef hidrokarbonlar için standart eğri grafiklerinin oluşturulması

Yukarıda belirtilen kimyasal maddelerin HPLC cihazı ile doğru bir şekilde ölçülmesi için tüm bu kimyasalların DMSO içerisinde bir seri dilüsyonları hazırlanarak cihazda yürütülmüş ve çözgen içindeki konsantrasyonlara karşı pik alanları belirlenerek standart eğriler oluşturulmuştur. Bu standart eğrilerden elde edilen sabit katsayılar bilinmeyen örnekteki kimyasal madde konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Analizler neticesinde oluşturulan standart eğri grafiklerine ait veriler aşağıda görülmektedir (Şekil 3.1a, Şekil 3.1b).



Şekil 3.1a. Hedef hidrokarbonlar için HPLC cihazında oluşturulan standart eğri grafikleri.



Şekil 3.1b. Hedef hidrokarbonlar için HPLC cihazında oluşturulan standart eğri grafikleri.

3.2.3.2. Fermentasyon sıvısından hidrokarbon ekstraksiyonu

Deney erlenlerinden PAH ekstraksiyon işlemi için her bir erlenden steril mikrosantrifüj tüplerine 500 µl örnek alınmıştır. Alınan örnekler üzerine 1ml saf hekzan eklenerek 5 dk boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir. Daha sonra ependorf tüplerinde oluşan susuz üst faz dikkatli bir şekilde alınarak HPLC viallerine aktarılmıştır. TFA'nın suda çözünürlüğünde bir sıkıntı olmadığı için, deney erlenlerinden steril mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler mikrosantrifüj cihazı yardımıyla 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek, direk süpernatant alınmıştır. Süpernatant örnekleri direkt olarak HPLC cihazı ile analize alınmıştır (Çizelge 3.8).

3.2.3.3. İzolatların kimyasalları parçalama durumlarının analizi

İzolatların zamana bağlı kimyasalları parçalanmasını gözlemlemek için erlenlerden belirli zaman aralıklarıyla hidrokarbon ekstraksiyonları yapılmış ve belirtilen HPLC şartlarında (Çizelge 3.8) analize tabi tutulmuştur. HPLC ile elde edilen veriler standart eğri grafiklerinden elde edilen katsayılar ile çarpılarak mevcut kimyasal değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 3.1a; 3.1b).

3.2.4. Biyoparçalama etkinliği en iyi olan mikroorganizmaların tanılanması

Elde edilen izolatların kültürel özellikleri (koloni şekli, koloni rengi, koku, koloni pigmentasyonu vb.), mikroskobik özellikleri (hücre çeperi gram reaksiyonları, hücrelerin morfolojik yapıları ve boyutları vb.) ile temel biyokimyasal (katalaz, oksidaz vb testler) özellikleri saptanmıştır. Bu amaçla, izolatlar (PCA) ortamına çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve petriler 27°C'de 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürler yukarıda bahsedilen özellikleri bakımından incelenmiştir.

3.2.5. Biyokimyasal testler

3.2.5.1. KOH testi

Gram reaksiyonu bakımından negatif özellikte olan mikroorganizmaların doğrulandığı bu testte, temiz bir lamın üzerine %3'lük KOH çözeltisinden birer

damla kadar damlatılarak üzerine 27°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiş olan taze izolatlardan bir öze dolusu konulmuş ve devamında bir cam çubukla karıştırılmıştır. Süspansiyon ile uzamanın olduğu izolatlar Gram – negatif olarak desteklenmiştir (Eroğlu Bayrak, 2013).

3.2.5.2. Oksidaz testi

%1'lik Tetrametil – *p* – fenilendiamin – diklorür (Sigma) solüsyonu kullanılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır. Bu solüsyondan birkaç damlası alınarak temiz bir filtre kağıdı üzerine damlatılmıştır. Üzerine bir gecelik inkübasyonla büyütülen taze izolatlardan platin bir öze vasıtasıyla birer öze dolusu alınarak iyice yedirilmiştir. Yaklaşık 10 saniye içerisinde mavi – menekşe renk oluşumu testin pozitif olduğunu belirtmektedir (Eroğlu Bayrak, 2013).

3.2.5.3. Katalaz testi

Bir gece boyunca büyütülen taze izolatların üzerine 1ml %3'lük H_2O_2 çözeltisi damlatılarak gaz kabarcığı varlığı gözlenmiştir. Gaz kabarcıklarının varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Eroğlu Bayrak, 2013).

3.2.6. İzolatların saklanması

İzolatların daha sonraki çalışmalarda da kullanılabilmesi, aktivitelerini kaybetmemeleri ve uzun süre saklanabilmesi açısından hem gliserolde hem de skim milk içinde liyofilizatör yardımıyla kurutularak toz halinde – 80°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır. % 80'lik steril gliserolden son konsantrasyonda % 16 gliserol olacak şekilde, 200 µl gliserol alınara 800 µl bakteri süspansiyonu ile karıştırılarak örnekler hazırlanmıştır.

3.2.7. Seçilen mikroorganizmaların moleküler biyolojik olarak tanılanması

Laboratuar çapında yapılan ön biyodegradasyon çalışmaları neticesinde elde edilen izolatların temel mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik açıdan tanılanması ile, elde edilen bu mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri, fizyolojileri ve genetik yapıları hakkında web tabanlı veri elde edilmesi, çalışmada tanılanan

mikroorganizmaların daha önce literatüre kazandırılıp kazandırılmadıkları, kazandırıldılar ise hangi açıdan ele alındıkları gibi nedenler bu doktora tezinin, verimliliği ve özgünlüğü açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle moleküler biyolojik çalışmalara ağırlık verilmiştir.

Klasik tanılama yöntemleri olarak kullanılan bu ön tanılama testlerine takip eden zamanlarda moleküler biyolojik tanılama yöntemleri de eklenerek izolatların tanılama işlemleri kesinleştirilmiştir. Bu amaçla, öncelikli olarak yapılması gereken işlemin organizmanın DNA'sına ulaşmak olduğundan, bu aşamada genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. Genomik DNA izolasyonu

Bu iş için ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ izolasyon kiti (Zymo D6005) kullanılmıştır. DNA izolasyonları yapılırken aşağıda belirtilen kit kullanım adımlarına riayet edilmiştir. DNA izolasyon aşamaları şu şekildedir;

1-Yaklaşık olarak 50 – 100 mg yaş ağırlığa sahip fungal/bakteriyel hücre 200 µl PBS tamponu içinde yeniden süspanse edilerek BashingBead™ Lysis tüpüne aktarılır ve üzerine 750 µl Lysis Solution eklenir.

2- BashingBead™ Lysis tüpü vorteks yardımıyla maksimum hızda 5 dk boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.

3- Daha sonra 10.000x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

4-Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400 µl, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo – Spin IV spin filtreye aktarılmış ve bir mikrosantrifüj yardımıyla 7.000x g'de 1dk boyunca çöktürülmüştür.

5- Toplama tüpündeki biriken filtrat üzerine 1200 µl Fungal/bakteriyal bağlanma tamponu ilave edilmiştir.

6- Bu aşamadan elde edilen karışımdan 800 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

7- Sonra 6. basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır.

8- 200 µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000x g'de 1dk çöktürülmüştür.

9- 500 µl Fungal/bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000x g'de 1dk çöktürülmüştür.

10- Zymo – Spin IIC kolonu 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 100 µl DNA toplama tamponu doğrudan kolon içerisine ilave edilmiştir. Daha sonra tampon 10.000x g'de 30 sn çöktürülmüştür. Çöktürme sonrası mikrosantrifüj tüpleri içerisinde DNA elde edilmiştir.

3.2.7.2. DNA saflık kontrolü

DNA miktarı ve saflık kontrolü için Nanodrop (Thermo Scientific 2000c) ile ölçümler yapılmıştır. Bu amaçla izolasyonu yapılan DNA örneğinden 1,5 µl cihaza yerleştirilerek 260 ve 280 nm dalga boylarında fluoresan absorbans ölçümleri yapılarak A_{260}/A_{280} oranı belirlenmiştir. PCR için uygun kalitede DNA'lara ait A_{260}/A_{280} değerleri 1,80 civarında olması ile doğrulanmıştır.

3.2.7.3. Agaroz jelin hazırlanması

100 ml 1xTAE ve 1 g agaroz tartılarak temiz bir erlen içerisine konulmuştur. Mikrodalga fırında 600Watt enerji altında agaroz tampon içerisinde tamamen eriyip solüsyon şeffaf bir hal alıncaya kadar kaynatılmıştır. Agaroz jel, 70 – 80ºC'ye kadar soğutularak içerisine belirtilen %2,5 oranında GelRed (Biotium®) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elektroforez küvetine uygun bir tarak yerleştirilerek, agaroz jel içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yaklaşık 1 – 2 mm kalınlıkta dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika kadar bekletilerek iyice donması sağlanmıştır. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jel yüzeyinin üzerini 1 – 2 mm kadar kaplayacak şekilde 1 x TAE (Tris asetik asit) tamponu ilave edilmiş ve ardından tarak çıkarılmıştır.

3.2.7.4. Genomik DNA'ların elektroforez ile belirlenmesi

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Bu amaçla; 1x TAE (Tris asetik asit) tamponu ile içerisine ana stoktan 2,5 µl GelRed ilave edilerek %1'lik konsantrasyonda hazırlanan agaroz (Sigma) jelin mini elektroforez tankına dökülmesiyle agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez tankı için 1x TAE tamponu kullanılmıştır. 2µl DNA solüsyonu, 1µl yükleme boya solüsyonu ve 3µl su ile karışımı hazırlanmıştır. DNA boyutlandırmasını yapabilmek adına belirteç olarak 1,0 kb'lık DNA Ladder (Nanohelix) kullanılmıştır. Genomik DNA ve belirteç DNA yükleme boyasıyla birlikte ayrı ayrı kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Elektroforez işlemi bir güç kaynağı vasıtasıyla 80V'da yaklaşık olarak 1 saat sürdürülmüş ve süre sonunda elektroforez sonlandırılmıştır. Jel dikkatlice küvetten alınarak UVP Biospectrum cihazı kullanılarak jel üzerindeki bantlar görüntülenmiş. Bant boyutları belirteç DNA bantları ile karşılaştırılarak fikir edinilmiştir. Elektroforez sonucunda jelde yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen genomik DNA'ların tam ve doğru elde edildiğini göstermektedir. Elde edilen genomik DNA daha sonra PCR analizleri için kullanılmak üzere – 20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.7.5. Genomik DNA'lar için PCR (polimeraz zincir reaksiyonu)

Bu aşamadan sonra tanılama için yeterli miktarda DNA elde edebilmek amacıyla, DNA'ların in vitro koşullarda sentetik olarak çoğaltılması için PCR yönteminin uygulanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Amaç izolatların moleküler açıdan tanılanması olduğundan, *16S* rRNA kodlayan ve evrimsel açıdan herhangi bir değişikliğe uğramadan korunmuş olarak kalan DNA bölgeleri baz alınarak PCR reaksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 27F – 1492R universal primer seti kullanılmıştır. Sentetik olarak DNA çoğaltılması işleminde Taq DNA Polimeraz Kiti (NanoHelix HelixAmp^{TM}) kullanılmıştır. Amplifikasyon için PCR tüpüne eklenecek PCR bileşenleri ve reaksiyon basamakları uygulanırken kit içeriğindeki kullanma klavuzuna bağlı kalınmıştır. Kit protokolü Çizelge 3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.9. PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları

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

DNA izolasyonları başarılı olan izolatların moleküler biyolojik olarak tanılanması için universal olarak korunmuş olan *16S* rDNA bölgesine spesifik primer dizileri (Çizelge 3.10) kullanılarak genomik DNA parçaları çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.10. Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri

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

Çizelge 3.11. PCR koşullarını belirten protokol

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

3.2.7.6. PCR ürünlerinin elektroforezi

Reaksiyon sonunda elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez analizleri yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez ile agaroz jel üzerinde yürüyen DNA bantlarının boyutları, yüklenen belirteç DNA dizisi ile ölçülmüştür. Universal primerlerin çoğaltacağı DNA uzunluğu yaklaşık olarak 1500 bp'dir, bu nedenle jel üzerinde bu bölgeye denk gelen DNA bantları dikkate alınarak PCR işleminin doğruluğu saptanmıştır. DNA bantlarının saf olduklarından emin olunduğu andan itibaren çoğaltılmış olan DNA'lar, daha sonraki aşamada DNA dizi analizi yapılabilmesi için – 20°C'de saklanmıştır.

3.2.7.7. PCR ürünlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi

Universal primerler ile çoğaltılan korunmuş gen bölgelerinin baz dizileri, izolatların tanılanmasında önemli bir anahtar olduğu için, bu bölgelerin analizi Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (YBUAM) tarafından her bir izolat için çoğaltılan DNA parçalarının çift yönlü dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. YBUAM tarafından her bir izolat için belirlenen *16S* rRNA nükleotid dizileri, BioEdit ve DNA Baser 3,5 programları vasıtasıyla değerlendirilmiştir.

Elde edilen DNA parçalarına dizilenen bazlar, MEGA 5.0 dizi analiz programı kullanılarak temizlenmiş, düzgün pik veren baz dizi bölgeleri seçilerek

online veri tabanlarından en popüler ve işlerliği iyi olan National Center for Biotechnology Information (NCBI)'ın web sayfasında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) yardımıyla izolatların tanılanması gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmede mevcut sistemde kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve blastlama sonucu % benzerlik oranlarına göre organizmalar tanılanmıştır. Tüm izolatların veritabanında örtüşen dizi oranlarında %97 ve üzeri benzerliği olanlar değerlendirilerek genus ve tür düzeylerinde tanıları yapılmıştır (Çizelge 4.1). Aynı zamanda belirlenen sekanslardan bazıları NCBI web sayfasına kayıtlanarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere aksesyon numaraları alınmıştır.

3.2.7.8. Tanılanan izolatlar içi primer-prob tasarımı

Bazı izolatlar için dizisi belirlenen DNA parçaları temelinde web tabanlı (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_genscript_result.cgi) adresi kullanılarak primer – prob setleri tasarlanmıştır. Diğer bazıları ise literatür tabanlı olarak sentezletilmiştir. Bu primer – prob setleri sentezletilerek mikroorganizmaların laboratuvar ölçekli sürekli karışımlı tank reaktörü (SKTR) içinde aşılandıkları andan itibaren, Real – time PCR (qPCR) aracılığı ile varlıklarının tespiti ve sayısal olarak miktar analizlerinin yapılabilmesi için kullanılmıştır.

Çizelge 3.12. İzolatlar için tasarlanan primer-prob dizileri

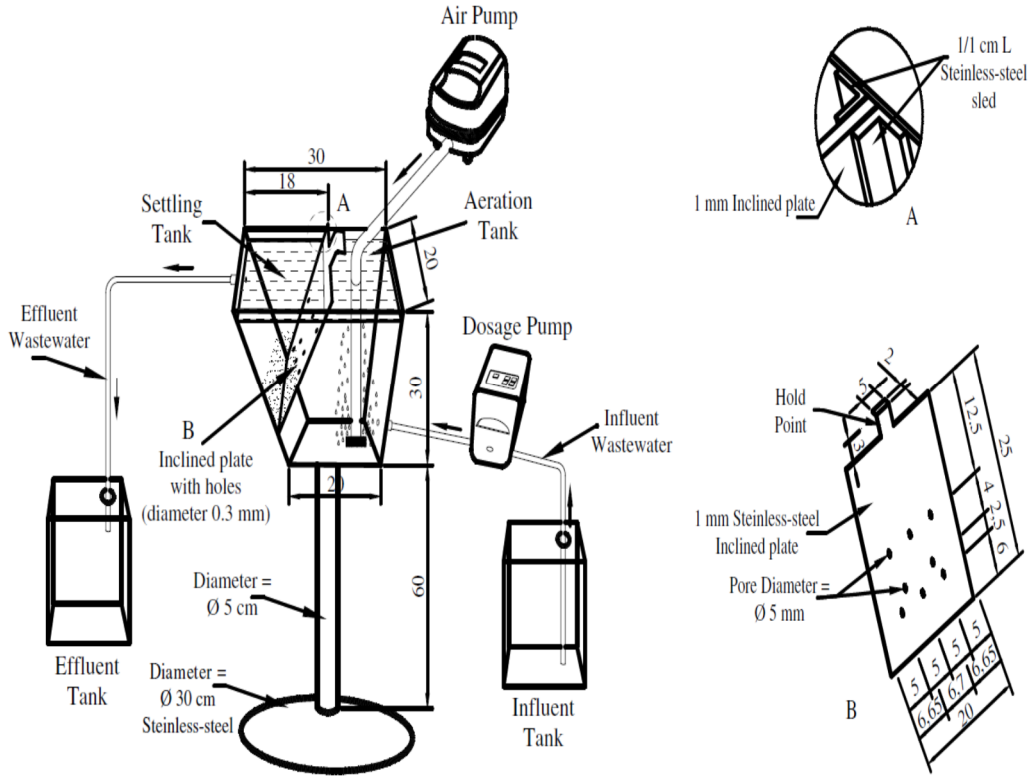
Prob	Primer (F)	Primer (R)	
	P. fluorescens		
Pf 60 FAM- CCAGTGCCTTCTTCAACGGT-BHQ2	CTGACACCAAGGCTATCG	GCCTTGTACAACCGACAG	1
	Acinetobacter sp.		
	Ac434 – TTTAAGCGAGGAGGAGG	Ac676 – ATTCTACCATCCTCTCCC	2
	Burkholderia cepacia		
5'Fam-CTGGGCCTCGATATCGCGCT-3'Tamra	AAGACATCCAGGTCGTCTCC	GGACCGTAGATTTCGACCAC	3
	Chryseobacterium sp.		
5'Fam-ACAGATCCGCCTACGGACCCTTT-3'Tamra	CGTTATCCGGATTTATTGGG	CCTGCAGTATCAATGGCAGT	4
	Raoultella planticola		
5′ TxRED- ACT GCA ACT ACT TAT TAA ACT CCT TTG ATT -BHQ2 3′	TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TG	CCR TTR GTN ACR TAV CCC CA	5
	Arthrobacter protophormiae		
5'Fam-TGCTCCATGATGATCCAGTT-3'Tamra	TCTGTTAAAGGGTGCGTCTG	CCCGCTGTCCTCCCATTGGT	6
	P. putida		
5'Fam- TCGACCACCGTAAACGCCCA -3'Tamra	GTGTTCCTTCCTCCCAGGTA	CCTTGATATCGTCAGGAGCA	7

- **Not:** Çizelge 3.12. için kullanılan referanlar: 1- Saha, R., et al., 2012, 2- Vanbroekhoven, K., et al. 2004, 5- Bjornsdottir-Butler K., et al. 2011, 3-, 4-, 6-, 7- Bu çalışmada tasarlandı.

3.2.8. Sürekli karışımlı tank reaktöründe aktif çamur olgunlaştırılması

Hidrokarbon parçalama etkinliği en iyi olan izolatların Laboratuvar ölçekli reaktörde denenmesi için, PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. Biyolojik arıtım tesisi aerobik havalandırma havuzundan alınan aktif çamur kullanılmıştır.

Gerçek şartları temsil etmesi açısından laboratuvar ölçekli reaktör olarak, sürekli karışımlı tank reaktörü (SKTR) kullanılmıştır. SKTR 9 L hacminde bir havalandırma ünitesi ile 1,3 L hacminde çökeltim tankından oluşmaktadır. Paslanmaz çelik malzemeden üretilmiştir. Her iki ünite 45 derecelik bir açı yapacak şekilde konumlanan bir plaka ile birbirinden ayrılmıştır. Bu plaka üzerinde olgunlaşan çamurun geri dönüşümünü sağlayabilmek için 0,3 mm çapında delikler bulunmaktadır (Şekil 3.2). Sistemin beslenmesi ve havalandırma tank tabanından sağlanmıştır. Bekleme süresince reaktörden çıkış suları ise üst kısımdan alınmıştır. Sistem yapılandırması Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. SKTR'nin şematik görüntüsü (Sponza ve Gök, 2012)

PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. Atık Giderme ünitesi Biyolojik havuzundan belirli bir dönemde alınan aktif çamur, olgunlaştırma için öncül çamur olarak kullanılmıştır. Çamurun sürekli olarak beslenmesi 1500 mg/lt glukoz içeren ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) teorik olarak yaklaşık 1600 mg/lt olan yapay atık su ile sağlanmıştır. Yapay atık su 40 x stok olarak hazırlanmış, besin ilavesinin gerçekleştiği zamanlarda tank hacmine oranlanarak son hacimde 1x olacak şekilde eklenmiştir. Bunun için tank reaktörleri formülasyonu Çizelge 3.13'de verilen sentetik atık su ile beslenmiştir.

Tank reaktörünün HRT ortalama 48 saat olarak belirlenmiştir. Çamur hacmi (ÇH), AKM ölçümleri, çözünmüş oksijen (ÇOİ) ve pH değerleri günlük analiz edilerek mikroskop atında flok oluşum yapıları ve değişimleri izlenmiştir. Tank reaktörüne giriş ve çıkış sularının KOİ (mg/l) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tank içindeki ortalama askıda katı madde 2000 - 3000 ppm civarında sabitlenmiştir. Çözünmüş oksijen yaklaşık 4 mg/l, pH ise 1M HCl ve 1N NaOH tampon çözeltileri ile ortalama pH 7,5'e sabitlenmiştir. Ayrıca çamur yaşı hesaplanmıştır.

Çizelge 3.13. Sentetik atık su içeriği (gr/L) (ortalama KOİ 1500 mg/l olacak şekilde).

Bileşik	**gr/L**
Glukoz	1,5
Pepton	0,6
Üre	0,1
$Na_2HPO_4.12H_2O$	0,0836
KH_2PO_4	0,0136
NaCl	0,03
KCl	0.014
$CaCl_2.2H_2O$	0,01854
$MgSO_4.7H_2O$	0,00262
$FeCl_3.6H_2O$	0,0166

3.2.9. SKTR için biyoçoğaltım (biyoaugmentasyon) ile hedef kimyasal giderimi

SKTR'de çamur aklimasyon çalışmaları yaklaşık 45 gün sürmüştür. Çamur olgunlaştırması sağlandıktan sonra, her bir izolat 250 ml'lik erlenler içinde 50 ml Nutrient Broth içeren ortamlara aşılanmış ve 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 27°C'de 24 – 48 saat inkübasyona tabi tutularak yeniden çoğaltılmışlardır. Tanka eklenecek aşı miktarı %10 olarak belirlendikten sonra, inkübasyon sonunda her bir erlen içeriği 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek izolatlara ait hücreler toplanmıştır. Her bir izolat için ortalama mikroorganizma miktarı yaklaşık 10^7cfu/10,3 lt olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su ile seyreltilerek karışık mikroorganizma solusyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan mikroorganizma solüsyonu sonrasında olgunlaşan çamura eklenmiştir. Bu işlem aktif çamur parametrelerinde ve mikroskobik görüntülerde değişim olması durumunda tekrarlanmıştır.

Tankta referans hidrokarbonların biyoparçalanma çalışmaları, elde edilen HPLC değerleri sabitleninceye kadar sürdürülmüştür. Her 48 saat sonunda HPLC analizleri gerçekleştirilerek mevcut giderim durumları incelenmiştir. HPLC için çıkış suyu ve reaktör içi flok örnekleri değerlendirmeye alınmıştır (Çizelge 3.8).

Daha önceden hazırlanan hidrokarbon stok çözeltisi kompozisyonu; dimetilsülfoksit (DMSO) içinde asenaften, fluoren, fluoranten, antrasen, piren 20 mg / lt, terefitalik asit (TFA) 50 mg / lt ve 548 ml / lt olacak şekilde toplamda 11200 mg/lt stok kimyasaldan gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Mikroorganizma aşılandıktan hemen sonra tüm referans hidrokarbonları içeren hidrokarbon stok çözletisinden tank içi son konsantrasyonu her bir PAH için 20 mg/lt, TFA için ise 50 mg/lt olacak şekilde hesaplanarak tanka 142,5 ml / 10,3 lt eklenmiştir.

Bu sayede tank içi doğal mikroflora topluluğu içerisine hem izolat bakteri karışım solusyonu hem de referans hidrokarbon solusyonu eklenerek ilk temasları sağlanmıştır. Bu ilk anda tank içinden aktif çamur örneği alınarak tank içi ilk değerlerin ölçümü gerçekleştirilmiş ve tank içindeki mevcut hidrokarbonların başlangıç konsantrasyonları saptanmıştır.

Bu aşamadan itibaren HPLC'de elde edilen her pik alanı mg/lt konsantrasyon cinsinden hesaplanarak kaydedilmiştir. Başlangıçtan itibaren 55 gün süren biyoparçalanma işlemi için her HRT süresi sonunda tank içi ve tank çıkış suyundan kompozit numuneler alınarak yukarıda belirtilen analizlere ek olarak KOİ analizleri yapılmış ve çamur yaşı hesaplanmıştır. Hidrokarbonlar kesikli şekilde (her 48 saatte bir) reaktör içine verildiği için kompozit numune alım yöntemi tercih edilmiştir. Tüm veriler bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

3.2.10. SKTR örneklerinden hidrokarbon ekstraksiyonu

Yukarıda bahsedildiği şekilde olgunlaştırılan ve TFA ve PAH'larla muamele edilen aktif çamurdan flok örnekleri alınarak HPLC için hidrokarbon ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için HRT sonunda tankın iyi şekilde karışan yerlerinden flok örneği alınarak 1,5 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüplerine 1'er ml aktarılmıştır.

TFA analizi için alınan örneklerden birisi santrifüj yardımıyla 10000x rpm hızında 3 dakika çöktürülerek süpernatantlar HPLC viallerine aktarılmıştır. PAH analizi için öncelikli olarak sonifikasyon işlemine tabi tutulan örnek içindeki flok yapısının tamamen dağılması hedeflenmiştir. Bunun için aktif çamur örneğini taşıyan mikrosantrifüj tüpü buz içerisine konularak sonifikasyon cihazı (Sonopuls, Bandelin Electronics, Berlin) ile 100x tam güçte 3 saniye şiddet uygulanarak 1 dakika boyunca flokların parçalanması sağlanmıştır. Bu işlem her örnek için toplamda 3 dakika olacak şekilde ardışık olarak 3 defa uygulanmıştır.

DMSO su ile mobil faz oluşturmamaktadır. Ayrıca fermentasyon sıvısındaki DMSO konsantrasyonu oldukça düşüktür. Bu nedenlerle, HPLC kolonu için örneğin direk alınarak PAH analizi için kullanılması mümkün değildir. Bunun için su ile net bir mobil faz oluşturan ve HPLC kolonu için daha uygun bir çözgen olan hekzan kullanılmıştır. Flok yapısı dağılan aktif çamur örneği üzerine 500 µl hekzan eklenerek vorteks yardımıyla tam hızda 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Santrifüj yardımıyla 10000x rpm'de 5 dakika boyunca çöktürülen örneklerde oluşan iki fazdan toplam hacmi 500 µl olan hekzan üst fazı dikkatli bir şekilde alınarak HPLC

viallerine aktarılmıştır. Bu sayede aktif çamur floklarından ekstrakte edilen hidrokarbonlar HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir.

3.2.11. KOİ ölçümleri

KOİ, 1 L su içindeki okside olabilen maddelerle reaksiyona giren potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) tan gelen oksijen miktarının bir ifadesidir. Yani belirli bir hacimdeki su içerisinde var olan okside olma özelliğindeki tüm kimyasal maddelerin okside edilmesi için gerekli olan oksijen miktarıdır. 1 mol $K_2Cr_2O_7$ 1,5 mol O_2'e eşittir. Analiz sonuçları KOİ (mg/l) = O_2 (mg/l) olarak ifade edilir.

Yöntem tam olarak yüksek ekzotermik olarak gerçekleşen kimyasal oksidasyon işlemidir. Reaksiyon, gümüş sülfatın katalizörlüğünde potasyum dikromatın yüksek sıcaklıktaki sülfirik asit solüsyonu ile okside edilir. Sudaki klorür civa sülfat ile maskelenir. Reaksiyon süresince tüketilmemiş olan sarı renkteki Cr_2O_7 iyonları fotometrik yöntemlerle belirlenir. Bu yöntem DIN ISO 15705 ve onun analoğu olan EPA 410.4, APHA 5220 D ve ASTM D1252-06 B yöntemleri ile aynıdır.

KOİ testi dikromat tarafından okside edilebilen organik ve inorganik bileşikleri ölçmektedir. Ancak, piridin gibi heterosiklik bileşikler, kuarterner azot bileşikleri ve uçucu hidrokarbonlar gibi bazı bileşikler bu test kapsamında okside olmamaktadırlar.

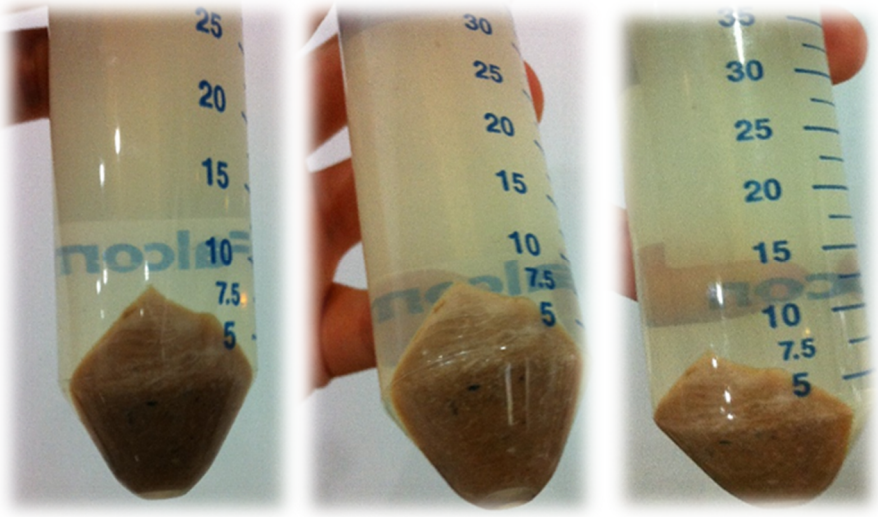
KOİ analizi yapılmadan hemen önce yapılması gereken bazı ön işlemler vardır. Bunlardan en önemlisi termoreaksiyon işleminin gerçekleşeceği cihazın önceden çalıştırılarak 148°C'ye gelmesi sağlanmalıdır. SKTR'den alınan çıkış suyu örneklerindeki KOİ miktarlarının belirlenmesi için Spectroquant® 114895 COD Cell Test Kiti (Merck) kullanılmıştır. Aktif çamurun KOİ değerlerinin, kitin belirleyebileceği aralık olan 15 – 300 mg/L'den yaklaşık olarak 10 kat fazla olduğu tespit edildiği için alınan örnekler distile su ile aynı anda 10 kat seyreltilerek homojen hale getirilmiştir.

2 ml hacminde örnekler işleme alınmıştır. $K_2Cr_2O_7$ bulunan reaksiyon tüpü içerisine aktarılan homojen örnek tüpün kapağının sıkıca kapatılmasından sonra derhal iyice çalkalanarak termoreaksiyon koşuluna getirilmiştir. Bu esnada potasyum dikromat aktif çamur ile tepkimeye girdiğinden dolayı tüpün yüzeyi oldukça ısınmaktadır.

Örnekler önceden 148°C'ye kadar ısıtılmış olan termoreaktör içerisine konularak 120 dakika boyunca ısı ile muamele edilmiştir. Süre sonunda termoreaktörden çıkarılan tüp oda sıcaklığına gelinceye dek en az 30 dakika boyunca soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra spektrofotometre ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Flok içi kimyasal absorbsiyonu

SKTR içerisinde olgunlaşan ve aktif biyoparçalama yapan ve HPLC analizleriyle desteklenen aktif çamurdan 50 ml'lik santrifüj tüplerine örnekler alınarak 10000x rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Çöktürme sonrası süpernatant dökülerek pellet üzerine saf su eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Devamında ise aynı şekilde santrüfüj işlemi ile çöktürülüp süpernatant atılmıştır. Bu şekilde 3 defa tekrarlanan yıkama işlemini takiben, daha önceden belirtildiği üzere flok yapısı dağıtılan örnekler hidrokarbon ekstraksiyon metodu uygulanarak (bkz. 3.2.10 SKTR örneklerinden hidrokarbon ekstraksiyonu) HPLC analizleri için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.3. Flok içi kimyasal absorbsiyonu analizi için çöktürülen floklar.

3.2.13. Real time PCR ile bakteriyel izleme

Tank içindeki aşı kültürlerinin biyoparçalama esnasında eş zamanlı olarak izlenmesi için Real Time PCR cihazı kullanılmıştır. Bu bağlamda, öncelikle izolatların sistemde saptanabilmesi için bazı izolatlara özgü primer – prob setleri tasarlanmış, bazıları için ise literatürden primer – prob setleri seçilmiştir. Devamında ise cihazda belirlenebilme durumlarına bağlı olarak her izolat için standart eğriler oluşturulmuştur (Şekil 3.4, 3.5). Bu sayede Real – time PCR'da primer – prob optimizasyonları tamamlanmıştır.

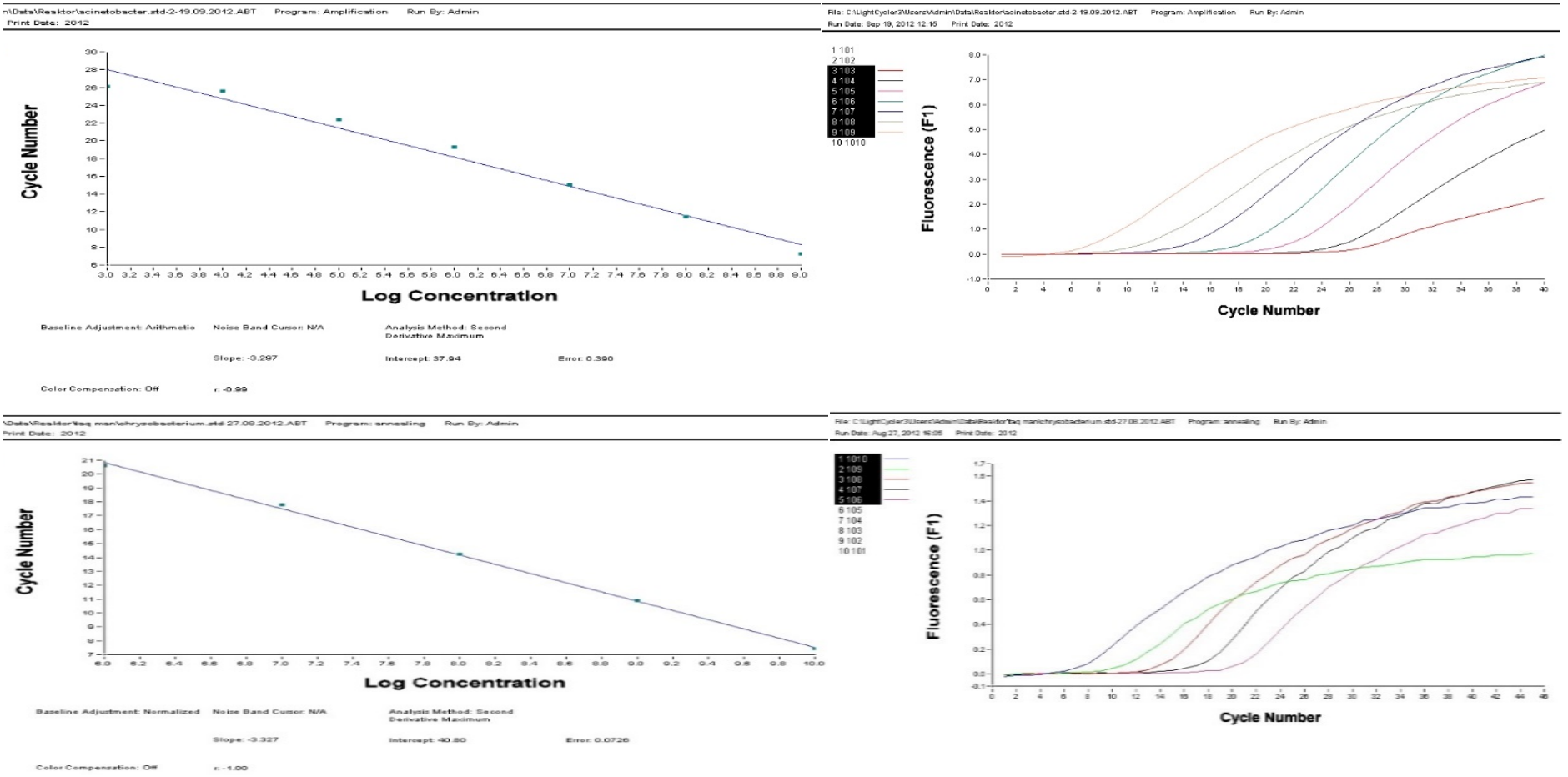
Real – time PCR protokolleri Roche LightCycler 1.5 instrument cihazı ile LightCycler 3.5 tool ara yüzü kullanılarak yapılmıştır. Kalitatif ve kantitatif analizlerde SYBR®Green I boyası ile TaqMan® probu yöntemleri kullanılmıştır. Analizlerde Roche LightCycler FastStart DNA Master Sybr®Green I ve TaqMan® kitleri kullanım kılavuzuna bağlı kalınarak çalışılmıştır. Sybr®Green I protokolü *Acinetobacter sp*. için kullanılırken, *Burkholderia cepacia*, *Chryseobacterium sp*. ve *P. fluorescens.* izolatları için ise TaqMan® probu yöntemi kullanılmıştır. Izolatların belirlenmesi için kullanılan primer-prob dizileri Çizelge 3.12.'de verilmiştir.

Acinetobacter sp. için oluşturulan protokol basamakları; başlangıç denatürasyon adımı 95°C'de 10 dakika olacak şekilde 1 döngüdür. Devamında amplifikasyon adımı toplamda 45 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C'de 10 dak., 20 C°/sn., amplifikasyon 48°C'de 5 sn., 20 C°/sn., uzama 72°C'de 10 sn., 20C°/sn. olarak gerçekleştirilmiştir. Protokol erime adımı ile sonlandırılmıştır. Bunun için 1 döngü olacak şekilde; 95°C'de 0 sn., 20 C°/sn., 65°C'de 60 sn., 20 C°/sn., ve 95°C'de 0 sn., 0.1 C°/sn. Ile döngü boyunca sinyal alımı gerçekleştirilmiştir. Son basamak ise soğuma basamağıdır. Bunun için 1 döngü olacak şekilde; 40°C'de 30 sn., 20C°/sn., olarak çalışılmıştır.

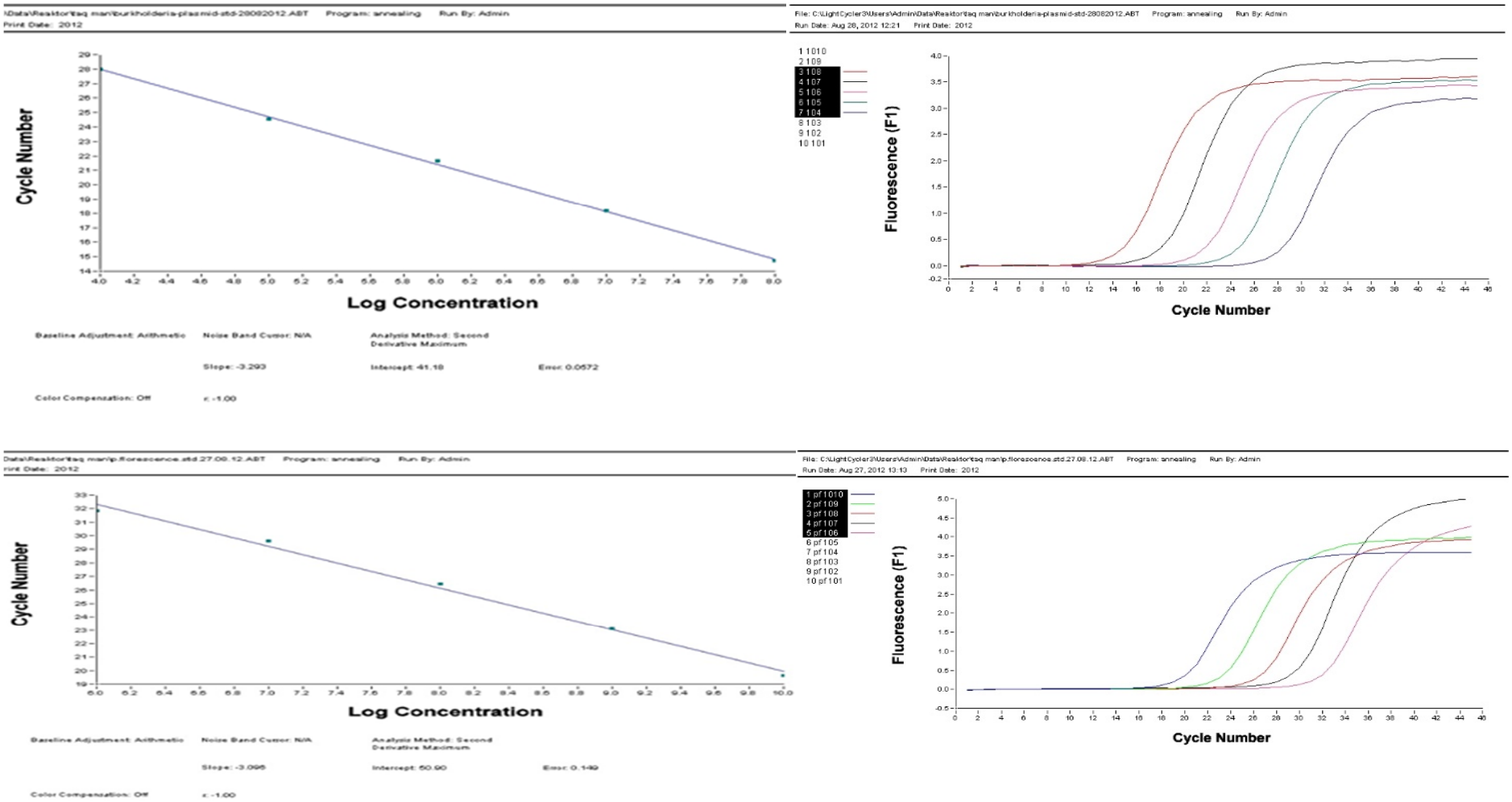
B. cepacia için; başlangıçta 95°C'de 10 dak., 20 C°/sn., amplifikasyon basamağı 46°C'de 30 sn., 20 C°/sn., uzama basamağı ise 72°C'de 1 sn., 20C°/sn. olacak şekilde 45 döngü olarak tasarlanmıştır.Devamında ise 1 döngü olarak 40°C'de 30 sn., 20C°/sn. soğuma basamağı kullanılmıştır.

Chryseobacterium sp. için, başlangıçta 95°C'de 10 dak., 20 C°/sn., amplifikasyon basamağı 55°C'de 30 sn., 20 C°/sn., uzama basamağı ise 72°C'de 1 sn., 20C°/sn. olacak şekilde 45 döngü olarak tasarlanmıştır.Devamında ise 1 döngü olarak 40°C'de 30 sn., 20C°/sn. soğuma basamağı kullanılmıştır.

P. fluorescens için, başlangıçta 95°C'de 10 dak., 20 C°/sn., amplifikasyon basamağı 40°C'de 30 sn., 20 C°/sn., uzama basamağı ise 72°C'de 1 sn., 20C°/sn. olacak şekilde 45 döngü olarak tasarlanmıştır.Devamında ise 1 döngü olarak 40°C'de 30 sn., 20C°/sn. soğuma basamağı kullanılmıştır.



Şekil 3.4. *Acinetobacter sp.,* ve *Chryseobacterium sp.* için Real Time PCR'da oluşturulan standart eğri grafikleri.



Şekil 3.5. *Burkholderia cepacia* ve *Pseudomonas fluorescens* için Real Time PCR'da oluşturulan standart eğri grafikleri.

3.2.13.1 Standart eğri için PCR verim hesaplamaları

Real time PCR protokollerinin randımanlı ve kantitatif anlamda güvenilir çalışılabilmesi için standart eğri grafiklerini oluştururken verim hesaplaması yapılmalıdır. Bu nedenle (2.15) No'lu eşitlik kullanılarak Real time PCR'da belirlenecek olan izolatların PCR verimleri hesaplanmıştır (3.1.; 3.2; 3.3; 3,4 No'lu eşitlikler).

Verim (E) = $[10^{(-1/slope)}]$ - 1 x 100 (2.15) eşitliği kullanılarak sırasıyla;

Acinetobacter sp. için verim:

E = ($[10^{(-1/-3,297)}]$ – 1) x 100 = (2,01 – 1) x 100 = % 101 (3.1)

Chryseobacterium sp. için verim:

E = ($[10^{(-1/-3,327)}]$ – 1) x 100 = (1,998 – 1) x 100 = % 99,8 (3.2)

Burkholderia sp. için verim:

E = ($[10^{(-1/-3,293)}]$ – 1) x 100 = (2,01 – 1) x 100 = % 101 (3.3)

P. fluorescens için verim:

E = ($[10^{(-1/-3,095)}]$ – 1) x 100 = (2,1 – 1) x 100 = % 110 (3.4)

P. fluorescens için PCR veriminin yüksek çıkmasının olası nedenleri DNA seyreltmesinde oluşabilecek bir hata veya dışarıdan PCR reaksiyonunun inhibe edecek herhangi bir maddeden kaynaklanabildiği düşünülmektedir.

3.2.14. Fluoresan boyama ile flok yapısının incelenmesi

Genel flok yapısının fluoresan mikroskobunda görüntülenmesi amacıyla LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit L – 7007 (Life & Science Co.) kullanılmıştır. Bu kitin içeriğinde bulunan ve canlı – ölü hücrelere nospesifik olarak bağlanarak fluoresan ışıma yapan iki tip boya bulunmaktadır. Boyalardan birisi SYTO® 9 adıyla bilinen yeşil flouresan nükleik asit boyası, diğeri ise propidium iodide olarak bilinen kırmızı fluoresan nükleik asit boyasıdır. Bu iki boya uyarılma ve salınım yaptıkları dalga boyları ile birlirinden farklı spektrumlarda gözlemlenebilmektedir. Her iki boya da bakteri hücre duvarından geçerek nükleik asite penetre olma yeteneğindedir.

Tek başına SYTO®9 boyası kullanıldığında genelde popülasyonda bulunan, hücre membranları hasarlı olan ve olmayan tüm bakteriler bu boya ile boyanacak ve morfolojiler fluoresan yeşili olarak gözlemlenecektir (Şekil 4.15). Bunun tersi olarak propidium iodide boyası ile birlikte kullanıldığında ise, propidium iodide boyası hasarlı membran yapısına sahip bakterilerde SYTO®9 fluoresan boyasının indirgenmesine sebep olacağından hasarlı hücreler sadece kırmızı renkte görünecektir. Bu sayede hücrem membranı sağlam olan canlı hücreler yeşil görünürken, membran yapısı hasarlı veya ölü olan hücreler kırmızı fluoresan renkte görülecektir. SYTO®9 için uyarılma ve ışıma dalga boyları 480 nm ile 500 nm iken, propidium iodide için bu değerler 490 nm ve 635 nm dalga boylarıdır. Bu sayede her iki bakteri de farklı dalga boyu spektrumlarında güçlü ışık verdiklerinden dolayı aynı ortamda girişim yapmazlar ve birbirlerini söndürmezler. Canlılık Testi için Kit içeriği;

1- SYTO®9 boyası, 1,67 mM / Propidium iodide boyası, 1,67 mM (A Bileşiği), DMSO'da 300 µL solüsyon.
2- SYTO®9 boyası, 1,67 mM / Propidium iodide boyası, 18,3 mM (B Bileşiği), DMSO'da 300 µL solüsyon.
3- *Bac*Light mounting oil (C Bileşiği), 10 mL, (membrana immobilize bakteriler için).

Boya optimizasyonu için; normalde iki boya bileşiğinden 1:1 ölçüde karıştırılarak kullanılır. Bu ölçü çoğu uygulamada canlı/ölü belirlenmesi için iyi bir ölçüdür.

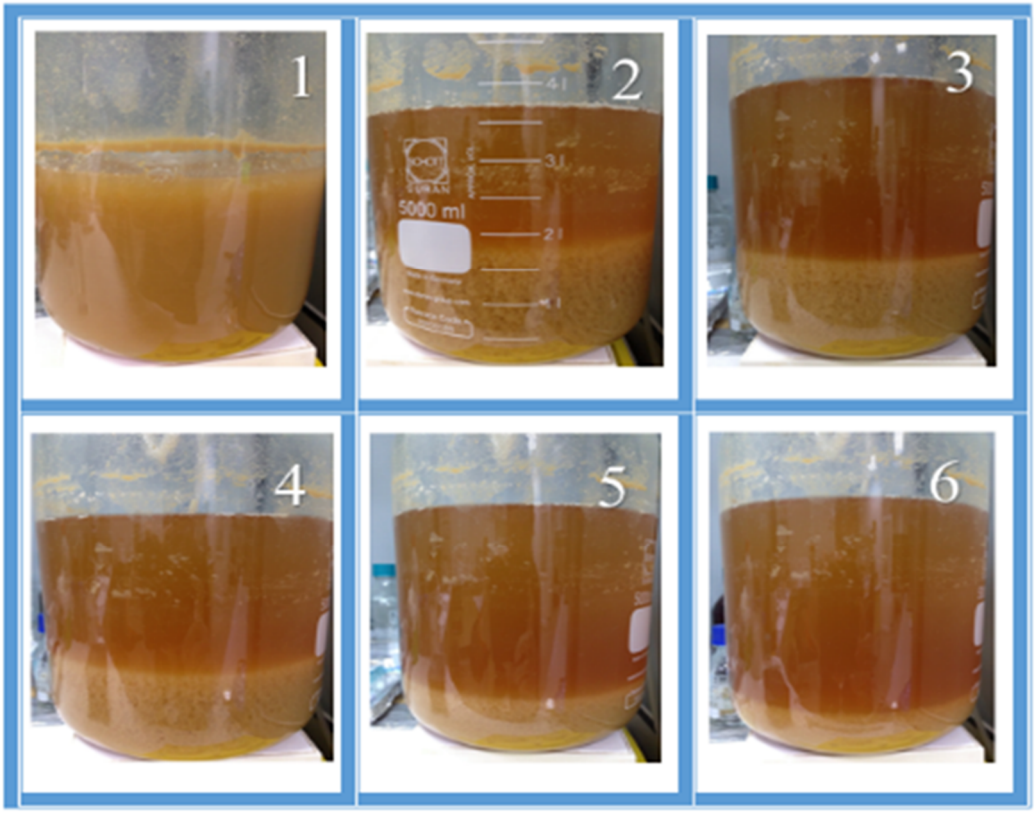
Preparat boyama işlemi

1- Bileşik A ve bileşik B'den eşit hacimde bir mikrosantrifüj tüpüne konularak nazikçe karıştırıldı.
2- Tanktan alınan yaklaşık 0,5 ml flok örneği temiz bir lam üzerine yayıldı.
3- 1:1 ölçü ile hazırlanan 3 µL boya karışımı (% 0,3'lük DMSO'da hazırlanmış olan) flok üzerine eklenerek hafifçe karışması sağlanmıştır.
4- Boya - flok karışımı 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
5- Fluoresan mikroskobu (Leica) altında uygun filtreler ile gözlenmiştir (Şekil 4.4.).

3.2.15. Gen ekspresyonu çalışmaları

Gen ekspresyonu çalışmaları için öncelikli olarak daha önce SKTR'nden elde edilen ve liyofilizasyonla kurutulan çamur kullanılarak tekrardan aktif çamur elde edilmiştir. Bu nedenle 5 L hacmindeki kapaklı ortam şişesi içerisine 40x yapay atıksu (Çizelge 3.13) stoğundan 1x olacak şekilde distile su ile seyreltilerek toplamda 3 L'lik fermentasyon sıvısı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ortam içerisine liyofilize haldeki çamurdan 10 gr tartılarak eklenmiştir. Manyetik karışıtırıcı üzerine oturtulan fermentasyon şişesi içerisine steril bir manyetik balık atılarak sürekli şekilde tam karışım yapılması sağlanmıştır. Hava motoru ile silikon boru vasıtasıyla ortam içerisine hava girişi sağlanmıştır. Ortalama çözünmüş oksijen miktarı 4 mg/l ve pH ise 7,5 civarı olarak ayarlanmıştır. Yaklaşık 10 gün süren çamur olgunlaştırma aşamasından sonra, daha önceden hazırlanan stok kimyasal karışımından kademeli olarak 2,5; 7,5; 10; 20 ve 40 ml olacak şekilde fermentasyon ortamına eklenmiştir. Eklenen hacimlerde fermentasyon sıvısında bulunan kimyasal konsantrasyonları Çizelge 3.14'te gösterilmiştir. 2,5 ml kimyasal eklendikten sonra çamurun kimyasal karışımına aklimasyonu beklenmiştir. Çamur aklimasyonda iken bir defa çöktürülerek üst sıvı toplam hacmin yarısı kadar olacak şekilde dökülerek üzerine taze su eklenmiştir (Şekil 3.6). Bu aşamadan HPLC

analizlerine göre tüm kimyasallar tükendikten sonra 7,5 ml kimyasal karışımı eklenerek gen ekspresyonu çalışmasına başlanmıştır. Naftalen için ayrıca standart grafik oluşturulmuştur. Naftalen için %60 – 40 Asetonitril – Su mobil fazında 0 – 12 dakika %50 – 100 gradyan olarak çalışılmıştır. Naftalen için alıkonma süresi 5,4 dakika olarak belirlenmiştir.



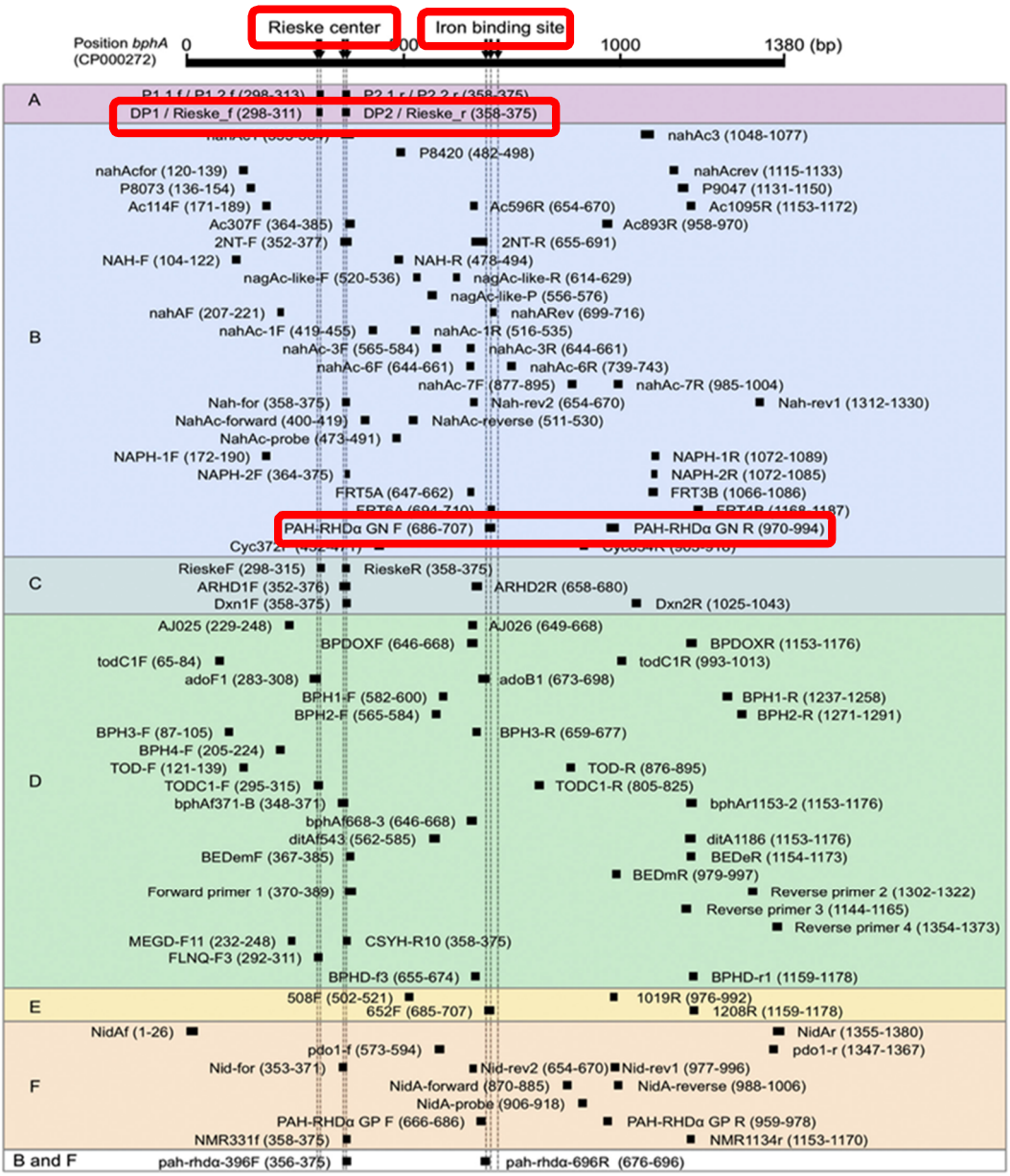
Şekil 3.6. Gen ekspresyonu için olgunlaştırılan çamurun zamana bağlı çökelim durumları (1, 0. dk; 2, 5. dk; 3, 10. dk; 4, 15. dk.; 5, 20. dk; 6, 30. dk.)

Çizelge 3.14. Gen ekspresyonu için tanka eklenen kimyasal madde hacimleri ve karşılık gelen tank içi konsantrasyonları.

mg/L	Naf	Ace	Flr	Flo	Ant	Pyr
7,5 ml	28,17	24,77	5,45	26,83	55,58	13,11
10 ml	26,89	28,12	5,95	30,48	67,11	18,71
20 ml	73,98	69,30	16,14	74,95	113,61	45,61
40 ml	127,35	131,27	34,51	143,44	189,40	81,61

Analizler için literatür taraması sonucu seçilen hedefe özgü iki farklı primer çifti sentezletildi. Öncelikli olarak izolatların sahip oldukları PAH Ring - Hydroxylating Dioksijenaz (PAH RHDα) genlerini taşıyan bölgenin saptanabilmesi için bu enzim kompleksini kodlayan gen dizisinin iki ana korunmuş bölgesinden Rieske Center (RC)'e özgü dejenere primerlerin (1) kullanılması ile genel bir gen taraması yapılması hedeflenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen 12 izolatın 8 tanesi Gram reaksiyonu bakımından negatif özellik taşıdıklarından dolayı ikinci bir primer seti (2) bu bakteriler için sentezletilmiştir (Çizelge 3.15). Üçüncü aşamada ise, bu izaolatların belirlenen genlerinin mevcut hidrokarbon varlığında ne şekilde davrandığını belirlemek için gen ifade düzeyleri saptanmıştır. Bunun için $\Delta\Delta Ct$ analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla Real time PCR cihazından yararlanılarak kalitatif ve kantitatif düzeyde qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle sentezletilen diğer primer setleri (3 ve 4) ise korunmuş ve ifade anlamında artış veya azalış göstermeyecek özellikte (housekeeping) gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Belirlenmek istenen gen bölgelerinin genomik ve/veya plazmid DNA'da bulunma durumlarından dolayı, 13 izolatın genomik DNA ve plazmid DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerde Zymo Fungal Bacterial DNA isolation kit ve Zymo Plasmid DNA isolation kitleri kullanmış ve kullanma kılavuzuna uygun şekilde izolasyonlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Gen ekspresyonu çalışmaları için kullanılan primer dizilerinin pozisyonları (Iwai et al., 2011)

Çizelge 3.15. Gen ekspresyonu için kullanılan primer dizileri.

Primerler	Dizi
1- DP1, Rieske_f (Forward)	TGYMGNCAYMGNGG*
1- DP2, Rieske_r (Reverse)	CCANCCRTGRTANSWRCA*
2- PAH-RHDα GN F	GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA#
2- PAH-RHDα GN R	AGCTGTTGTTCGGGAAGAYWGTGCMGTT#
3- 16S rRNA F	AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT¥
3- 16S rRNA R	CGGGGATTTCACATCTGACT¥
4- 16S sRNA (F341)	CCTACGGGAGGCAGCAG§
4- 16S rRNA (R518)	ATTACCGCGGCTGCTGG§

* Chadhain et al., 2006; # Cebron et al., 2008; ¥ Adnan et al., 2011 ;§ Zhao et al., 2012.

3.2.14.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu yapılırken tüm yüzeyler, kullanılan pipetler ve pipet uçları için gerekli aseptik koşullara çok dikkat edilmiştir. Tüm kullanılan plastik malzemeler (özellikle otomatik pipet uçları ve mikrosantrifüj tüpleri) RNAz free özellikte seçilmiştir. İzolasyon esnasında mikrosantrifüjden herhangi bir bulaş olmaması için santrifüjün içi ve rotör kısmı sırası ile Sodyum Hipoklorit ve saf etanol ile temizlenmiştir. Gerekli olan tüm fiziksel koşullara riayet edilmiştir. Tüm çalışma buz içerisinde yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için TRIzol® MaxTM Bacterial RNA Isolation Kit (Life Technologies Co. USA) kullanılmıştır. Bu kit için tavsiye edilen uygulama basamakları aşağıdaki gibidir;

* Aktif çamurdan 1,5 ml alınarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu.

* 6000x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi.

* Santrifüj esnasında, daha önceden sıcaklığı 95°C'ye ayarlanmış termal blok üzerinde 200 µl Max Bacterial Enhancement Reagent 95°C'ye kadar ısıtıldı.

* Santrifüj sonrasında, süpernatant döküldü ve pellet bir önceki basamakta ısıtılan reaktant ile süspanse hale getirilerek otomatik mikro pipet vasıtasıyla yukarı aşağı hareketiyle karıştırıldı.

* Karışım termal blok üzerinde 95°C'de 4 dakika inkübe edildi.

* 1 ml TRIzol® reaktantı lizat üzerine eklendi ve iyice karıştırıldı.

* Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında faz ayırım aşamasına geçildi.

Faz Ayırımı için;

* Derin dondurucuda soğutulmuş olan soğuk kloroformdan 0,2 ml alınarak lizat üzerine eklendi ve el ile 15 saniye boyunca iyice çalkalandı.

* Oda sıcaklığında 2 – 3 dakika inkübe edildi.

* 12000x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında, karışım altta kırmızı faz, penol kloroform fazı, bir ara faz ve RNA'yı içeren renksiz sulu faz olmak üzere fazlara ayrılacaktır. Sulu fazın hacmi yaklaşık 400 µl kadardır. Bu aşamadan sonra çöktürme aşamasına geçildi.

RNA Çöktürülmesi;

* Yaklaşık 400 µl olan ve RNA'yı içeren renksiz üst fazı yeni bir tüpe aktarıldı.

* RNA'yı çöktürmek için 0,5 ml soğuk izopropanol bu sulu faz üzerine eklendi ve mikrosantrifüj tüpü alt üst edilerek karıştırıldı.

* Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

* 15000x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.

* Mikrosantrifüj tüpünün dibindeki RNA pelletine (tüp dibinde köşede gel benzeri bir yapı şeklinde görünecek) dokunmadan dikkatli bir şekilde üstteki süpernatant uzaklaştırıldı.

* RNA Pelleti 1 ml % 75'lik etanol ile çözülüp vorteks ile iyice karıştırıldı.

* 7500x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant döküldü.

* RNA pelleti oda sıcaklığında havada kurutuldu. Tam olarak kurutulamamasına özen gösterildi, aksi taktirde RNA'nın çözünürlüğü azalacaktır.

* RNA pelleti 50 µl RNAz free su içinde mikropipet ile yuları aşağı hareketi yaparak çözüldü ve 60°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Tahmini RNA Kantitasyonu;

Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) ile saflık ölçümlerinde RNA için A260/280 oranı 1,8'den büyük olmalıdır. Ölçüm için her bir RNA izolatından 1,5 µl örnek alınarak nanodrop cihazında ölçümler yapılmıştır. Her bir örnek için 3 farklı ölçüm yapılarak ortalamaları alınmış ve RNA saflıkları ölçülmüştür.

Elde edilen tüm RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA'lar daha sonraki çalışmalar için – 80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.14.2. Total RNA'dan cDNA sentezi

Gen ifadesi çalışmaları için RNA izolasyonundan sonraki ikinci önemli basamak cDNA sentezidir. Bunun için etkili, aktivite bakımından stabil ve optimizasyonu iyi yapılmış bir reverse transkriptaz enziminin seçilmesi çalışmanın kalitesi açısından yerinde olacaktır. cDNA sentezi çalışmaları için SuperScript® VILO™ cDNA Sentez Kiti kullanılmıştır. İçeriğinde bulunan SuperScript® III Reverse Transkriptaz enzimi kantitatif Real time PCR (qRT-PCR) için gerekli olan ilk ipliğin sentezlenmesinde oldukça başarılı bir enzimdir. SuperScript® enzim karışımında SuperScript® III Reverse Transkriptaz enzimi, RNaseOUT™ rekombinant ribonükleaz inhibitörü ve patentli bir yardımcı protein bulunmaktadır. Enzim, tasarımı sayesinde RNaz H aktivitesi azaltılmıştır ve sıcaklık stabilitesi

arttırılmıştır. Enzimden 42 – 60°C aralığında cDNA sentezi yapılabilmektedir çünkü ribozomal RNA ve transfer RNA tarafından önemli bir inhibisyon olmamaktadır. Bu nedenle total RNA'dan cDNA sentezi iççn uygundur. RNaseOUT™ rekombinant ribonükleaz inhibitörü sayesinde ribonükleaz kontaminasyonuna bağlı bir hedef RNA degradasyonunu engellemektedir. Kit içeriğindeki VILO™ reaksiyon karışımında ise qRT – PCR için optimize edilmiş konsantrasyonlarda random primerler, $MgCl_2$ ve dNTP'ler bulunmaktadır. cDNA sentezi için kit içeriğine uygun olarak uygulanan protokol aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.16. cDNA sentezi için gerekli olan reaksiyon karışım oranları.

5 x VILO™ Reaksiyon karışımı	4 µl
10 x . SuperScript® enzim karışımı	2 µl
RNA örneği (2,5 µg'a kadar)	x µl (RNA içeriğine bağlı)
DEPC'li su	20 µl'ye tamamla

- Tüm karışımlar eklendikten sonra tüp içinde nazikçe karışrıtıldı ve 25°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Sonraki basamakta 42°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Enzimatik reaksiyon 85°C'de 5 dakika inkübasyonla sonlandırıldı.
- cDNA'lar – 20°C' de muhafaza edildi.

Kit içeriğinde farklı qPCR metodları için farklı cDNA konsantrasyonları önerilmektedir. Gen ifadesi çalışmalarında SYBR®Green I boyası kullanılacağı için, qPCR çalışmaları esnasında bu boyaya özel konsantrasyonlarda cDNA örnekleri hazırlanmıştır. SYBR®Green ya da SYBR®GreenER™ boyası için önerilen cDNA konsantrasyonları şu şekildedir;

Eğer başlangıçtaki total RNA miktarı 100 ng veya altında ise qPCR için reaksiyon hacminin % 10 kadarı olan cDNA örneği direk olarak seyreltilmeden kullanılabilir. Örneğin 20 µl qPCR reaksiyon hacmi için seyreltilmemiş cDNA'dan 2 µl'ye kadar kullanılabilir.

Eğer başlangıç total RNA miktarı 100 ng'dan fazla ise o zaman, qPCR'a başlamadan önce cDNA miktarının azaltılması için seyreltme önerilmektedir. Çünkü yüksek cDNA konsantrasyonu SYBR®Green ve SYBR®GreenER™ reaksiyonlarındaki baseline sinyalini etkilemektedir. Örneğin eğer başlangıç total RNA miktarı 2 µg ise 20 kat seyreltilmiş bir cDNA elde edilmesi için RNA miktarının 100 ng civarına seyreltilmesi gerekmektedir. Sonra 20 µl qPCR reaksiyon hacmi için seyreltilmiş cDNA'dan 2 µl'ye kadar kullanılabilir (qPCR hacmi ≤ %10 olmalıdır).

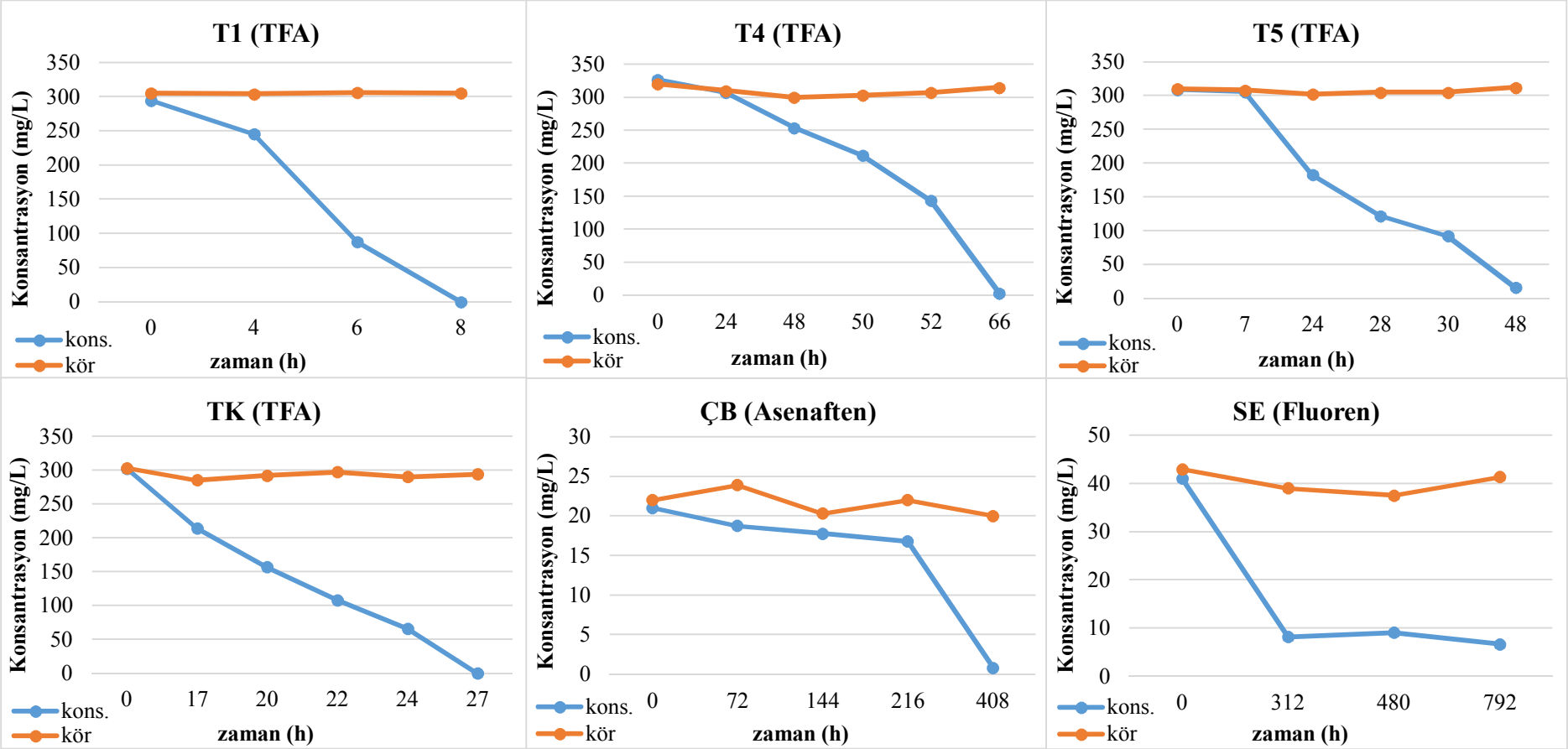
3.2.14.3. PAH RHDα için real time PCR uygulaması

Gen ekspresyonu için hedef gen bölgesi ve iki farklı housekeeping gen bölgesi olarak seçilen üç farklı primer setine uygun tek bir protokol kullanılmıştır (Çizelge 3.15). PCR'da non – spesifik bağlanmaları engellemek adına gradient PCR yapılmıştır. Ayrıca ilave bir sıcaklık basamağı uygulanarak enzim aktivitesinden daha yüksek sıcaklıkta sinyal alımı gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prokotol aşağıdaki gibidir;

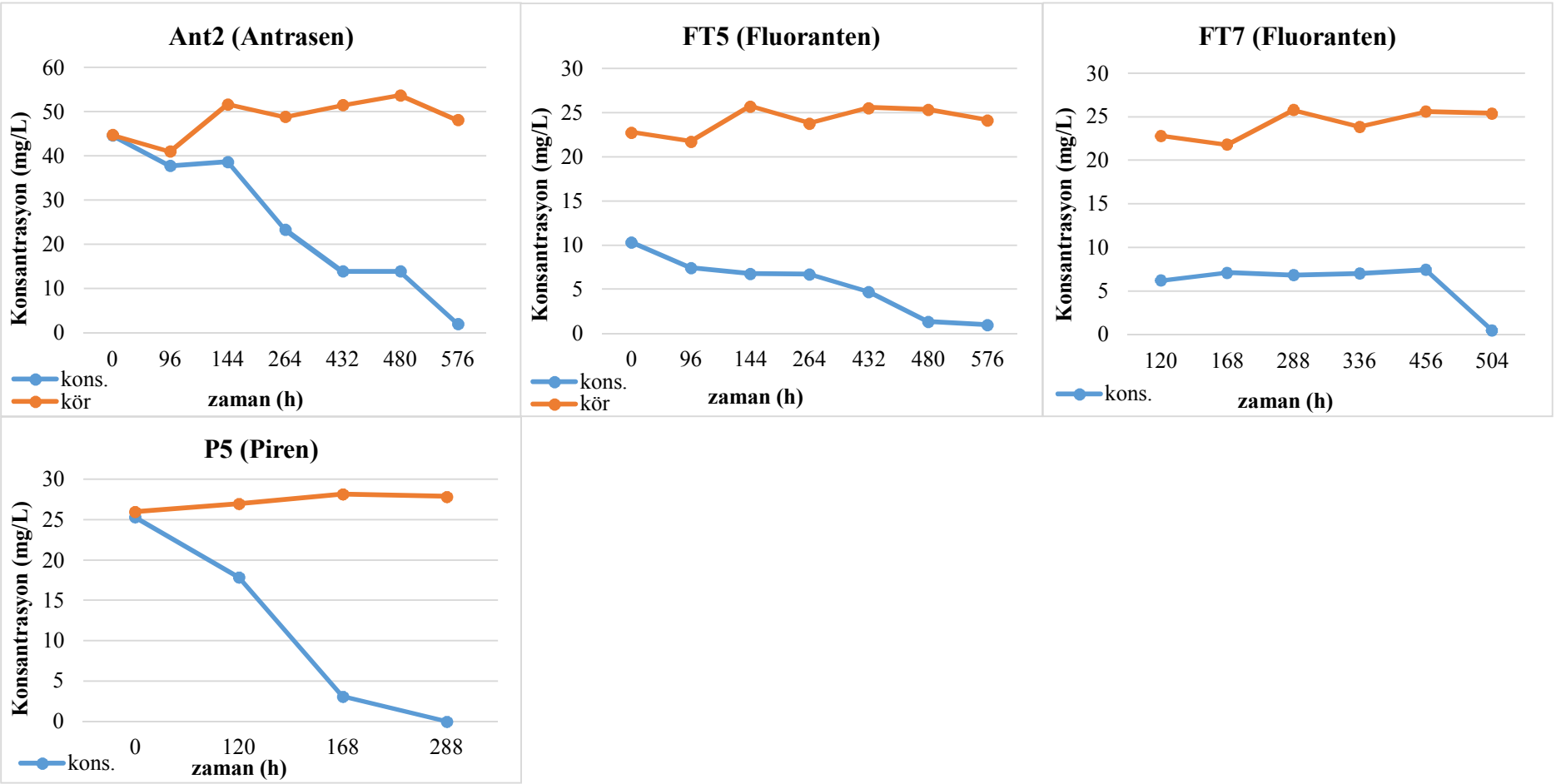
Protokol basamakları; başlangıç denatürasyon adımı 95°C'de 10 dak., 20°C/sn. olacak şekilde 1 döngüdür. Devamında amplifikasyon adımı toplamda 45 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C'de 10 dak., 20 °C/sn., amplifikasyon 61°C'den 58°C'ye 5 sn., 20°C/sn. (her döngüde 0,2°C düşüş uygulanarak), uzama adımı 72°C'de 12 sn., 20C°/sn. olarak gerçekleştirilmiştir. Devamında 80°C' 10sn., 20C°/sn ek adım uygulanarak sinyal alımı bu adım sonunda gerçekleştirilmiştir. Protokol erime adımı ile sonlandırılmıştır. Bunun için 1 döngü olacak şekilde; 95°C'de 0 sn., 20 °C /sn., 65°C'de 60 sn., 20 °C /sn., ve 95°C'de 0 sn., 0.1 °C /sn. ile döngü boyunca sinyal alımı gerçekleştirilmiştir. Son basamak ise soğuma basamağıdır. Bunun için 1 döngü olacak şekilde; 40°C'de 30 sn., 20°C /sn., olarak çalışılmıştır.

4. BULGULAR

Elde edilen izolatlar ile yapılan ön biyoparçalama denemeleri ile elde edilen parçalama verileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bu veriler ışığında, T1 izolatının TFA'yı 8 saatte tamamen parçaladığı görülürken, T4, T5 ve TK izolatlarının ise sırasıyla 66, 48 ve 27. Saatlerde parçaladıkları görülmektedir. ÇB izolatı asenafteni 408. saatte tamamen parçalarken, SE izolatı fluoreni 792. Saatte 10mg/L'nin altına kadar parçalamıştır. Ant2 antraseni ve FT5 fluoranteni 576. saatte bitirirken, FT7 fluoranteni 504. saatte bitirmiştir. P5 izolatı ise pireni 288. saatte tamamen parçalamıştır.



Şekil 4.1. Kimyasallara özgü izolatların parçalama grafikleri.



Şekil 4.2. Kimyasallara özgü izolatların parçalama grafikleri.

4.1. İzolatların Tanılanması

Tek karbon kaynağı olarak kullanılan kimyasal maddelerde üreyen ve saflaştırıldıktan sonra parçalama kapasiteleri belirlenen mikroorganizma izolatlarının moleküler biyoloji tanılanmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için kullanılan yöntemler daha önce açıklandığı gibidir. Saf kültürlerden elde edilen DNA'lar 16S rRNA bölgesine özgü primerler ile çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Devamında Mega 5.0 programı kullanılarak diziler temizlenmiş ve NCBI/Blast tool kullanılarak izolatlar genus ve tür düzeylerinde tanılanmışlardır. Bu kapsamda tanılanan izolatlara ait tablo aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tanılanan izolatların genus ve tür düzeyindeki isimleri.

İzolat Kodu	**Organizma adı**	**Hedef Kimyasal**	**Benzerlik Oranı**	**Accession No.**
FT5	*Acinetobacter sp.*	Flr	%99	Alınacak
FT7	*Raoultella planticola*	Flr	%99	Alınacak
ANT2	*Pseudomonas fluorescens*	Ant	%98	Alınacak
P5	*Aeromonas media*	Pyr	%98	Alınacak
T4	*Chryseobacterium sp*	TFA	%99	JX480628[#]
T5	*Burkholderia cepacia*	TFA	%100	JX480629[#]
ÇB	*Arthrobacter protophormiae*	Flo	%100	JQ922111[*]
SE	*Arthrobacter sp.*	Flo	%100	JX073088[*]
SD	*Arthrobacter protophormiae*	Ace	%100	Alınacak
T1	*Pseudomonas sp.*	TFA	%100	JX480627[#]
TK	*Arthrobacter nicotianae*	TFA	%100	JX480630[#]
218	*Acinetobacter sp.*	Ace	%100	JX029141[*]

[#] Eroğlu Bayrak, 2013, *Saygılı, 2012.

Çizelge 4.2. İzolatların biyokimyasal testleri.

İzolat Kodu	**Organizma adı**	**KOH**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**Gram Reaksiyonu**
FT5	*Acinetobacter sp.*	+	+	+	-
FT7	*Raoultella planticola*	?	-	-	-
ANT2	*Pseudomonas fluorescens*	?	+	+	-
P5	*Aeromonas media*	?	+	+	-
T4	*Chryseobacterium sp.*[#]	+	+	+	-
T5	*Burkholderia cepacia*[#]	+	+	+	-
ÇB	*Arthrobacter protophormiae**	-	+	+	+
SE	*Arthrobacter sp.**	-	+	+	+
SD	*Arthrobacter protophormiae*	-	+	+	+
T1	*Pseudomonas sp.*[#]	+	+	+	-
TK	*Arthrobacter nicotianae*[#]	-	+	+	+
218	*Acinetobacter sp.**	+	+	+	-

[#] Eroğlu Bayrak, 2013, *Saygılı, 2012.

4.2. Aerobik Sürekli Karışımlı Tank Reaktörü

Sürekli Karışımlı Tank Reaktörünün (SKTR) aklimasyon çalışmaları yaklaşık 45 gün sürmüştür. Tankın hidrolik alıkonma süresi (HRT) 2 gün olarak belirlenmiştir. Her HRT sonunda pH, çözünmüş oksijen (DO) ve askıda katı madde (MLSS) değerleri ölçülmüş ve 1N HCl ve 1N NaOH tamponları kullanılarak ortalama pH 7.0-7.5 civarında sabit tutulmuştur. Bu sayede aktif çamur yapısı kontrol altında tutulmuştur. Çamur olgunlaşması gerçekleştiği andan itibaren pH: 7,0 - 7,5; DO: 4 mg/l; MLSS: 2500 mg/lt civarında sabitlendiği görülmüştür. Çamur yaşı 9 gün olarak hesaplanmıştır.

$$HRT\ (\theta) = \frac{V}{Q} \qquad (2.20)$$

$$= \frac{0{,}0103}{2{,}9\ x\ 1440\ x\ 10^{-6}} = 2{,}47 \text{ gün}$$

$$\theta c\ (\text{gün}) = \frac{MLSS\ x\ V}{SSe\ x\ Qe + SSw\ x\ Qw} \qquad (2.22)$$

$$= \frac{3188\ x\ 10{,}3}{219\ x\ 0{,}005 + 2500\ x\ 0{,}001} = 9{,}1 \text{ gün}$$

Tank içinde uygun askıda katı madde (AKM) değerlerine ulaşıldığı anda izolatlar 50 ml LB Broth içeren erlenlerde ortalama 48 saat inkübasyona bırakılmış, tanka eklenecek aşı miktarı %10 olarak belirlendikten sonra inkübasyon sonunda her bir erlenden organizmalar 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip toplanarak karışım elde edilmiştir. Mikroorganizma karışımı 10,3 L hacme sahip tanka eklenmiştir. AKM miktarları 2500 mg/L değerini geçtiği zamanlarda tankın çökeltim kısmından çamur atılarak aktif çamurun stabilizasyonu sağlanmıştır.

Tankta referans hidrokarbonların biyoparçalanma çalışmaları, elde edilen HPLC değerleri sabitleninceye kadar sürdürülmüştür. Bu süre 55 gündür. Her HRT dolduğu zaman bir 1340 ppm yapay atıksu ve 160 ppm referans hidrokarbonları içeren stok kimyasaldan SKTR'ye eklenmiştir. Ekleme yapılmadan önce KOİ, AKM, çamur hacmi analizleri yapılmıştır. Real time PCR ve HPLC için örnekler

alınmış, her analiz süresince pH ve çözünmüş oksijen değerleri kaydedilmiştir. Tamponlama ile pH değeri 7 – 7,5 arasında tutulmuştur. Çözünmüş oksijen ise ortalama 4,0 mg/L olarak gözlenmiştir.

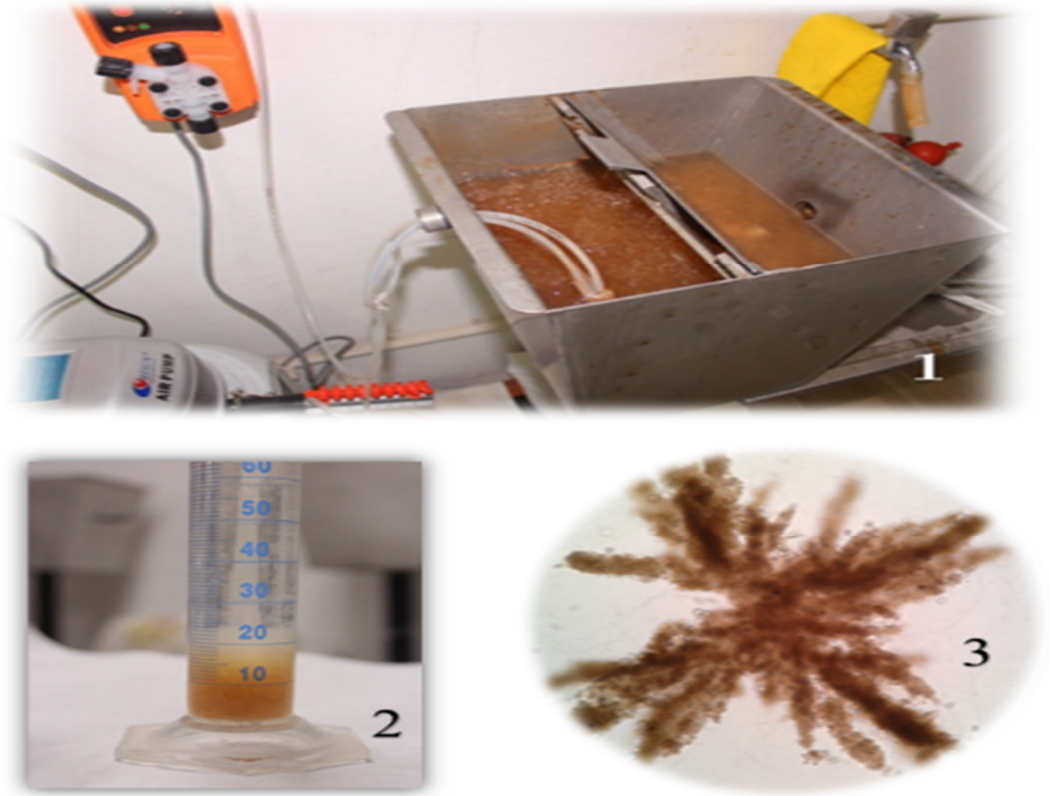
Her 48 saat sonunda HPLC analizleri gerçekleştirilerek mevcut giderim durumları incelenmiştir. HPLC için çıkış suyu ve reaktör içi flok örnekleri değerlendirmeye alınmıştır. HPLC şartları Piren hariç tüm kimyasallar için %60-40 Asetonitril - Su mobil fazında sağlanmıştır. Çalışma sonunda ise piren belirlenmesinde % 60 - 40 Asetonitril - Su gradyan mobil fazı kullanılarak piren giderim oranları belirlenmiştir.



Şekil 4.3. SKTR sistemi genel görünüşü.

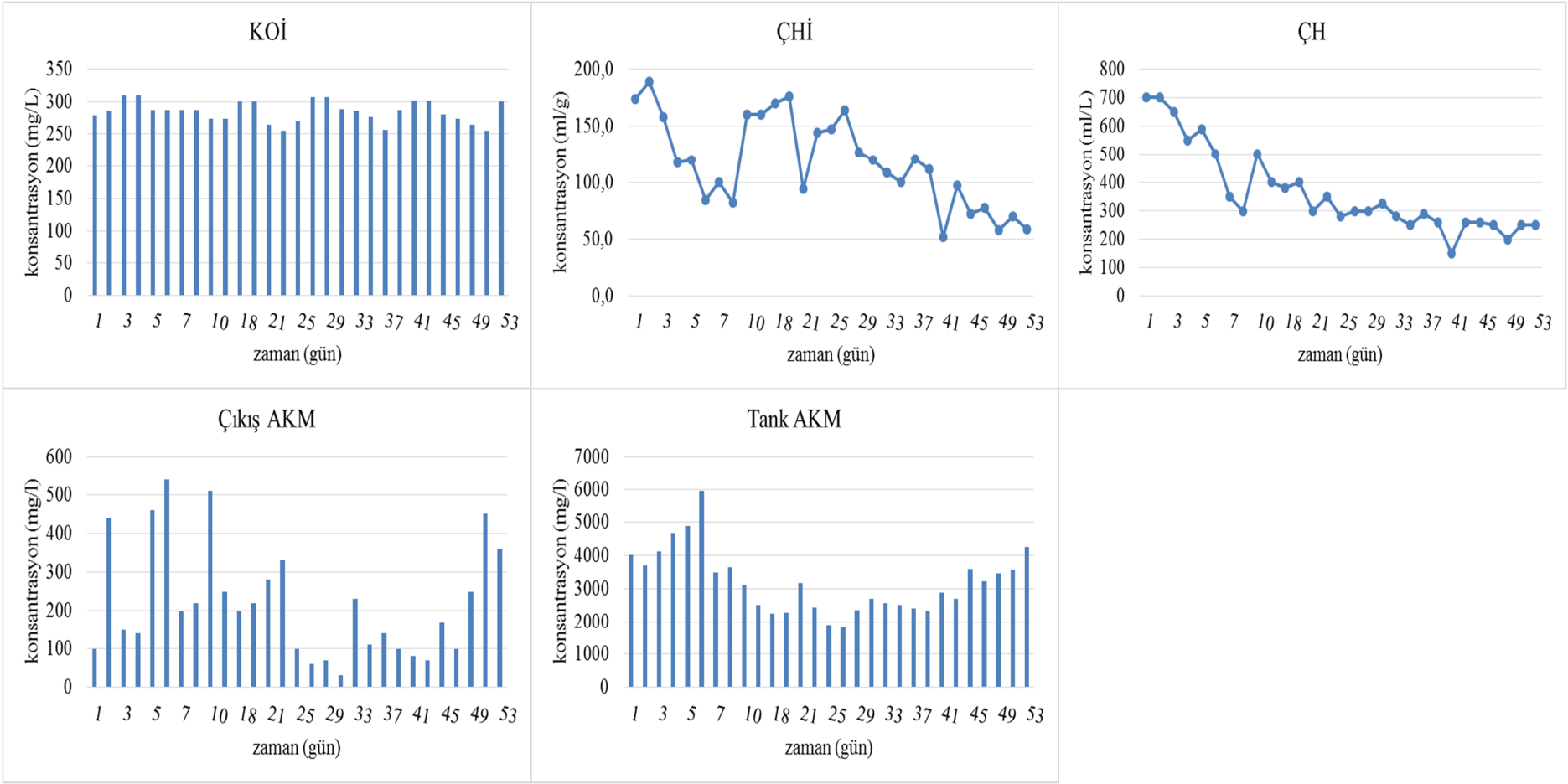
30 dakikalık çamur çöktürmesi sonunda gözlenen çamurda ise; çöken çamurun oldukça kompakt ve hacimsel olarak az, üst sıvı fazının ise oldukça berrak olması çamurun olgunlaştığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Mikroskop gözlemleri yapılarak mikrobiyal değişimler ve sonrası stabilizasyonu ile desteklenmiştir. Mikroskopta gözlenen filamentli bakteriler üzerindeki yoğun bakterial biyofilm kütlelerindeki artış, kütlelerin turuncu-kahverengi olması, hareketli siliyatların fazla oluşu, saplı siliyat varlığı ve nadiren görülen rotiferlerin

oluşu aktif çamurun mikrobiyolojik açıdan olgunlaştığının ve olgun bir çamur yaşına sahip olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.4. SKTR içinde olgunlaşan çamur ve çökeltim kısmı (1) ile çamur hacmi belirlenmesi ile çöken çamur (2) ve olgun flok yapısının mikroskobik görüntüsü (3).

45 gün sonunda olgunlaşan aktif çamura HRT değeri olan 48 saatte bir kimyasal solüsyonun eklenmesiyle birlikte her 24 saatte bir pH dengelemesi yapılmış, çözünmüş oksijen değerleri kaydedilmiştir. Ayrıca, yine günlük olarak tank içi ve çıkış suyu AKM'leri, çamur hacim indeksi ve KOİ değerleri ölçülerek hesaplanmıştır (Şekil 4.5). 55 gün süren biyoparçalama işlemi süresince tank içi AKM maksimum, minimum ve ortalama değerleri 5940 mg/L, 1830 mg/L ve 3188 mg/L olarak ölçülmüştür. Çıkış AKM maksimum, minimum ve ortalama değerleri 540 mg/L ve 30 mg/L 219 mg/L olarak ölçülmüştür. Tank içi KOİ maksimum, minimum ve ortalama değerleri 307 mg/L, 255 mg/L ve 285 mg/L olarak ölçülmüştür. Tank içi ÇHİ maksimum, minimum ve ortalama değerleri ise 189 ml/g, 52 ml/g ve 118 ml/g olarak ölçülmüştür.

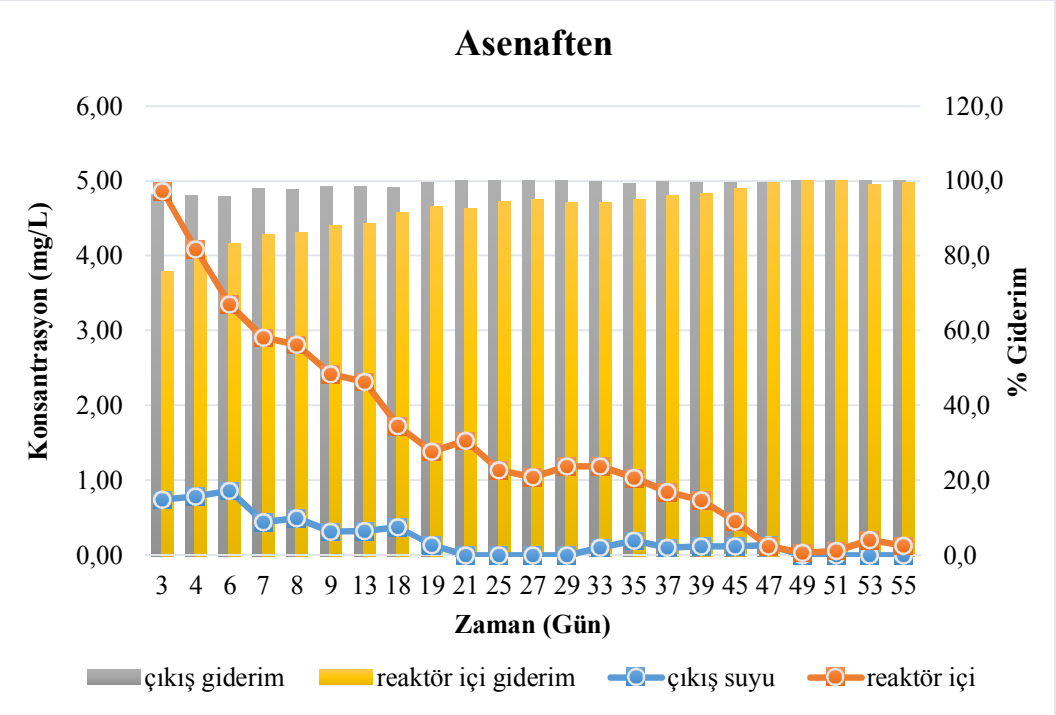


Şekil 4.5. SKTR için ölçülen KOİ (Kimyasal oksijen ihtiyacı), AKM (Askıda katı madde), ÇH (Çamur hacmi),ÇHİ (Çamur hacim indeksi) değerlerini gösteren grafikler.

4.3. Kimyasalların Aktif Çamur İçinde Parçalanma Durumları

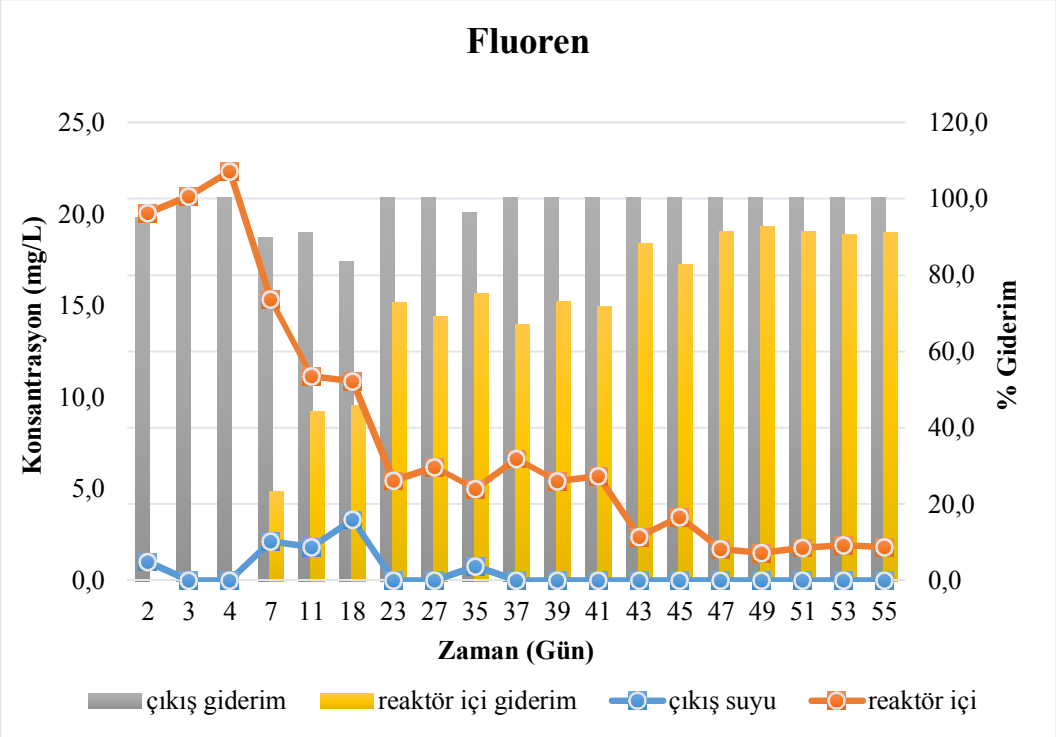
Biyoparçalanma süresi boyunca hem aktif çamurun hem de çıkış suyunun kimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki grafiklerden de anlaşılacağı üzere SKTR içi alınan flok örneği analizlerinin, çıkış suyu analizlerine göre daha tutarlı ve anlamlandırılabilir olduğu söylenebilir.

Asenaften için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 72. saat sonunda 4,87 mg/L'ye kadar düşerken ilk 72 saat sonundaki giderim oranı %75,7 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 0,74 mg/L iken çıkış suyu giderimi % 96,3 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki asenaften konsantrasyonu 0,13 mg/L'ye gerilerken tank içi konsantrasyon azalım oranı % 99,4'e yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki asenaften miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte asenaften giderimi devamlı artarak %99,4 ve üstü olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. SKTR ile asenaften giderim grafiği.

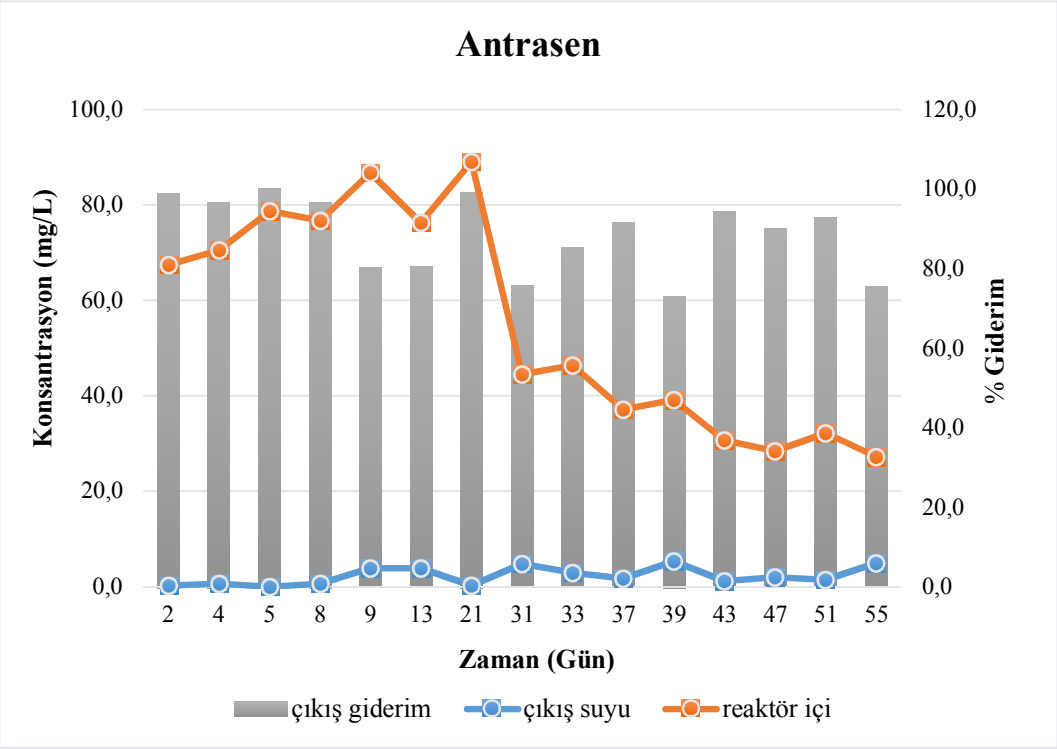
Fluoren için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 168. saat sonunda 15,4 mg/L'ye kadar düşerken ilk 168 saat sonundaki tank içi konsantrasyon azalım oranı % 23,2 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyunda 48. saat sonunda kalan fluoren konsantrasyonu 1 mg/L ölçülürken, çıkış suyu giderimi % 95,2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte tank içinde kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki fluoren konsantrasyonu 1,81 mg/L'ye gerilerken tank içi konsantrasyon azalım oranı % 90,9'a yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki sadece üç gün boyunca sırasıyla 2,1 mg/L, 1,8 mg/L ve 3,3 mg/L konsantrasyonlarında olarak ölçülmüş, geri kalan süreçte kademeli olarak azalmıştır. 55 gün sonunda çıkış suyundaki fluoren miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı % 100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte flouren giderimi devamlı artarak % 90,9 ve üstü olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. SKTR ile fluoren giderim grafiği.

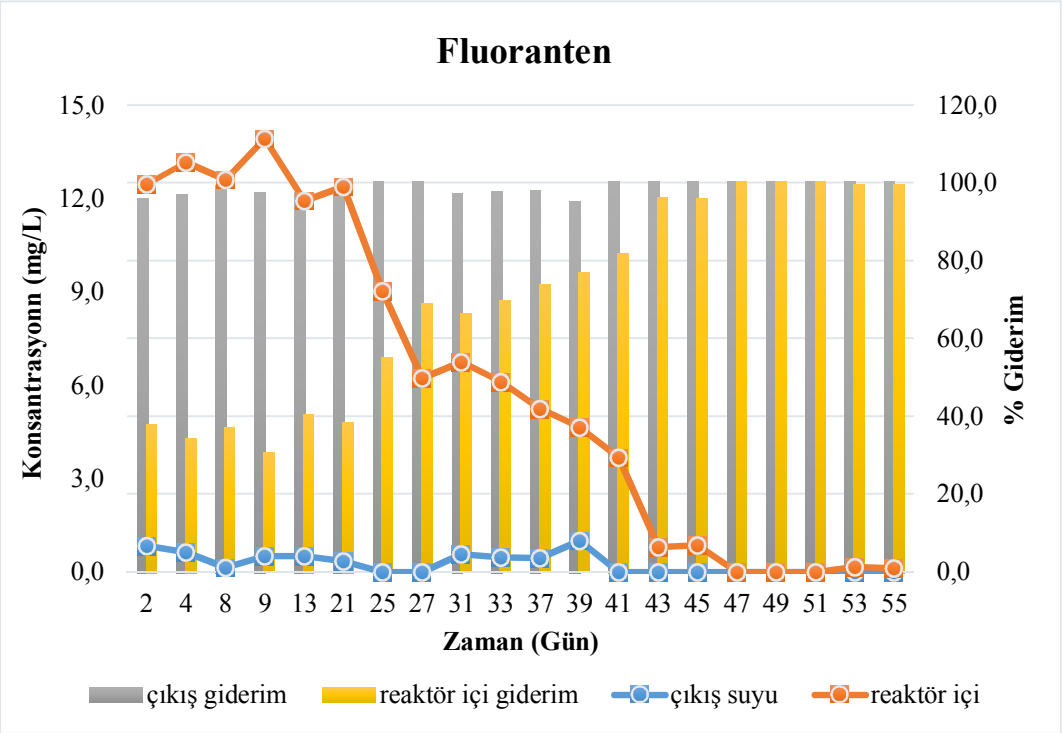
Antrasen için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon her 48 saatte bir aynı konsantrasyonda ekleme yapılmasıyla birlikte artış göstermiştir. Tank içindeki antrasen konsantrasyonu ilk 21 günde toplam 89,1 mg/L'ye yükselirken, tank içerisinde başlangıç konsantrasyonuna oranla 4 katlık bir birikme söz konusudur. Tank içerisinde nispeten anlamlı düşüşler 31. günden itibaren gözlenmiştir. Bu süreye kadar antrasen konsantrasyonlarında aşırı dalgalanmalar olduğu gözlenmiştir. 31. gün yapılan HPLC analizlerinde tank içi antrasen konsantrasyonunun 44,6 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir. Bu süreçten itibaren tank için antrasen konsantrasyonu kademeli olarak düşse de 55. gün sonunda mevcut konsantrasyonun 27,2 mg/L'ye gerilediği ancak hala başlangıç konsantrasyonu olan 20 mg/L'nin altına düşmediği için konsantrasyon azalım oranlarının hesaplaması yapılamamıştır.

Ancak çıkış suyunda bulunan antrasen konsantrasyonu 48. saat sonunda 0,27 mg/L olarak ölçülürken giderim % 98,7 olarak hesaplanmıştır. Süreç devamında çıkış suyundaki konsantrasyonu 5,43 mg/L'ye kadar artış göstermiştir. Bu noktada giderim %72,9'a kadar gerilemiştir. 55. gün sonunda çıkış suyunda saptanan antrasen konsantrasyonu 4,9 mg/L olarak ölçülmüştür. Çıkış suyu giderimi ise %75,4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



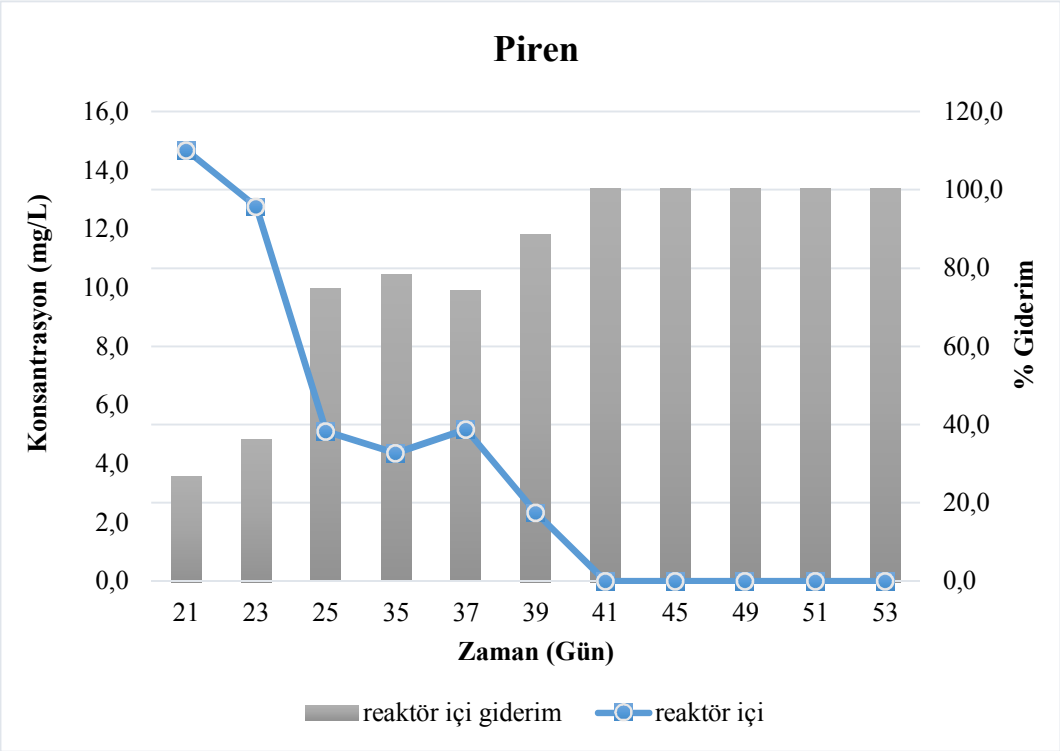
Şekil 4.8. SKTR ile antrasen giderim grafiği.

Fluoranten için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 48. saat sonunda 12.5 mg/L'ye düşerken ilk 24 saat sonundaki tank içi konsantrasyon azalım oranı % 37,6 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 0,85 mg/L iken çıkış suyu giderimi % 95,8 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki fluoranten konsantrasyonu 0,12 mg/L'ye gerilerken tank içi konsantrasyon azalım oranı % 99,4'e yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki fluoranten miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte fluoranten giderimi devamlı artarak %99,4 ve üstü olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.9).



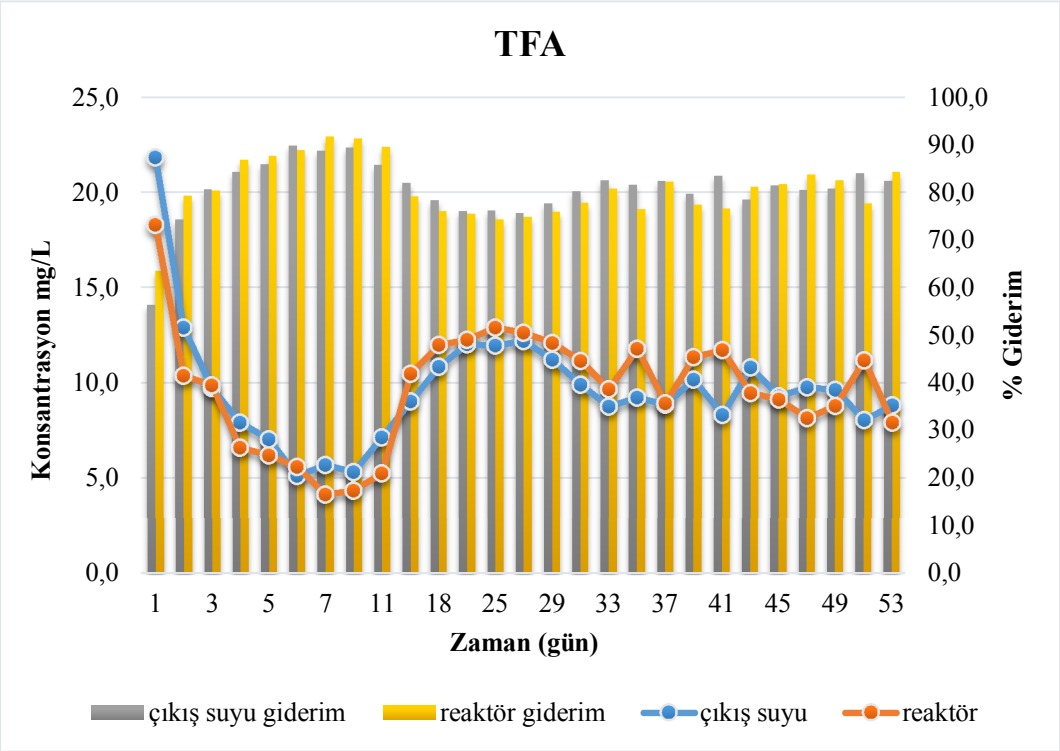
Şekil 4.9. SKTR ile fluoranten giderim grafiği.

Piren için başlangıçta HPLC için belirli bir metod geliştirilememesinden dolayı rutin analizler için örnekleme yapılırken 50 ml steril falkon tüplerine aktif çamur örnekleri toplanarak – 80 °C'de saklanmıştır. 55 gün sonunda yapılan ve önceki bölümde belirtilen HPLC metodu kullanılarak önceden toplanmış olan örneklerden piren analizleri gerçekleştirilmiştir. Çıkış suyu örneklerinde pirene rastlanmazken, tank içi örneklerinde 21. günden itibaren olan anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Tank içinde 21. gündeki piren konsantrasyonu 14,7 mg/L olarak ölçülürken, reaktör içi konsantrasyon azalımı % 26,5 olarak hesaplanmıştır. 39. Günden itibaren alınan örneklerde piren konsantrasyonu HPLC cihazının okuyabileceğinden az olduğu için 0 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu sayede giderim % 100 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. SKTR ile piren giderim grafiği.

TFA için tank içine verilen ortalama 50 mg/L konsantrasyon 24. saat sonunda 18,3 mg/L'ye düşerken ilk 24 saat sonundaki konsantrasyon azalım oranı % 63,4 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 21,8 mg/L iken çıkış suyu giderimi % 56,4 olarak hesaplanmıştır. 55. gün sonunda tank içindeki TFA konsantrasyonu 7,9 mg/L'ye ölçülürken tank içi konsantrasyon azalım oranı % 84,2'de kalmıştır. Aynı şekilde çıkış suyundaki TFA miktarı 8,8 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı % 82,3 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte TFA giderimi %84,2 civarında olmuştur. (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. SKTR ile TFA giderim grafiği.

4.4. Kontrol Tankı Ölçümleri

Elde edilen izolatlarla gerçekleştirilen biyoçoğaltım işlemlerini takiben biyoparçalanma verimlerinin değerlendirilebilmesi açısından ikinci bir SKTR sistemi oluşturulmuştur. Tüm parametreler bakımından paralel özellikte olan bu tankta olgunlaştırılan aktif çamur örneği, farklı bir kaynak olan Pakmaya atık su arıtım tesisinden (Kemalpaşa / İzmir) alınmıştır. Aktif çamurun olgunlaşma süresi yaklaşık bir ay sürmüştür. Çamur olgunlaşma süreci benzer şekilde mikroskobik olarak gözlenmiş ve çamur hacimleri ölçülerek genel makro flok karakteristiklerine bakılmıştır. Biyolojik ve fiziksel karakteristiklerinin tatmin edici bulunduğu birinci ayın sonunda tank içerisinde bulunan aktif çamura daha önceden uygulanan şekilde ve konsantrasyonlarda hidrokarbon karışımları eklenmiştir. Devamında yine 48 saatte bir hidrokarbon eklemesi yapılarak her 24 saatte bir de hem çıkış suyu hem de tank içi flok örnekleri için HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplam deneme süreci 26 gündür.

Bakıldığında esas parçalama işleminin olduğu biyoçoğaltım tankına benzer şekilde 26 günlük süreçte yine TFA dalgalanmasının ve antrasen birikiminin olduğu

gözlenmektedir. Her 48 saat sonunda kimyasal karışımı eklenmeden hemen önce alınan örneklerde TFA'nın 48. saatte tank içinde 28,6 mg/L olduğu ve 26 gün sonunda 21,8 mg/L'ye düştüğü görülmüştür. TFA için tank içi giderim yüzdesi 48. saatte % 42,9 iken, 26. gün sonunda %56,3 olmuştur. Ancak süreç içerisinde tank içinde kademeli olarak TFA artışı ve hemen akabinde kısmen azalışlar gözlenmiştir. Özellikle denemenin devam ettiği 19. günde tank içi TFA konsantrasyonunun 58,9 mg/L'ye kadar yükseldiği ve devamındaki 48. Saatte 12 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir (Şekil 4.12).

Kimyasal eklendikten sonra yapılan ölçümlerde tank içindeki TFA konsantrasyonunun her defasında 50 mg/L'nin üzerinde olduğu saptanarak giderim verimi hesaplanması gerçekleştirilememiştir (Şekil 4.12).

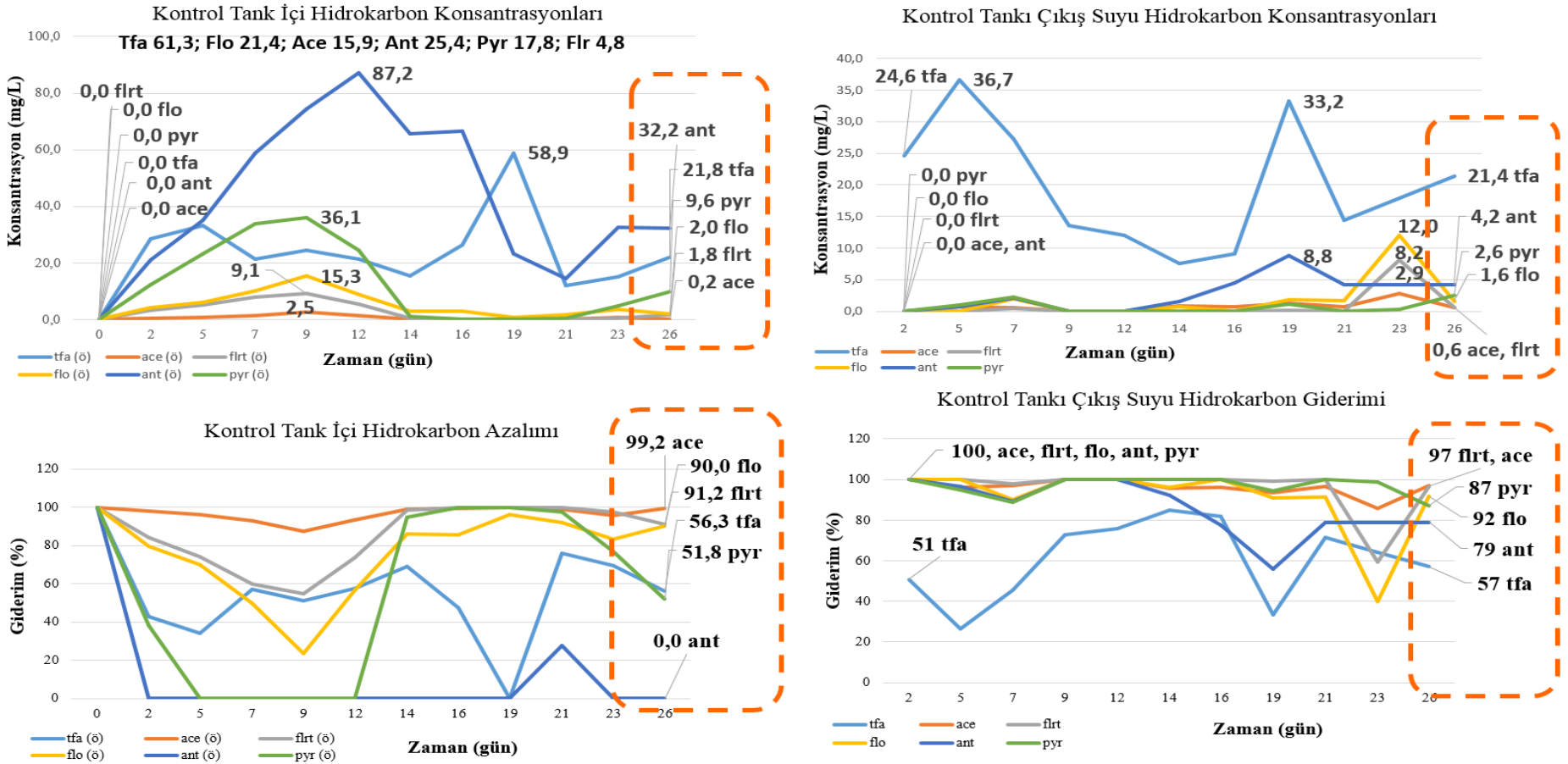
Benzer şekilde çıkış suyu TFA konsantrasyonu 48. Saatte 24,6 mg/L iken 5. günde 36,7 mg/L'ye yükselmiş devamındaki süreçte ise 7,5 mg/L'ye kadar gerilemiştir. Ancak 19. günde yapılan analizde çıkış suyu TFA konsantrasyonu 33,2 mg/L'ye kadar yükseldiği 26. gün sonunda ise 21,4 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir. TFA için çıkış suyu giderim oranları başlangıçta % 51 iken 26. gün sonunda %57 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).

Aynı şekilde kontrol tankında tank içi verilerine bakıldığında antrasenin hiçbir şekilde parçalanmadan kaldığı görülmüş ve giderim oranlarının ise %0 olduğu hesaplanmıştır. Çıkış suyu verilerinde ise 48. saat antrasen konsantrasyonu 0 mg/L olarak saptanırken, 16. günden itibaren 4 mg/L'nin üzerine çıkmıştır. Bu verilere göre giderim oranı 48. saatte % 100 olarak görülürlen, 26. gün sonunda % 79'a gerilediği gözlenmiştir (Şekil 4.12).

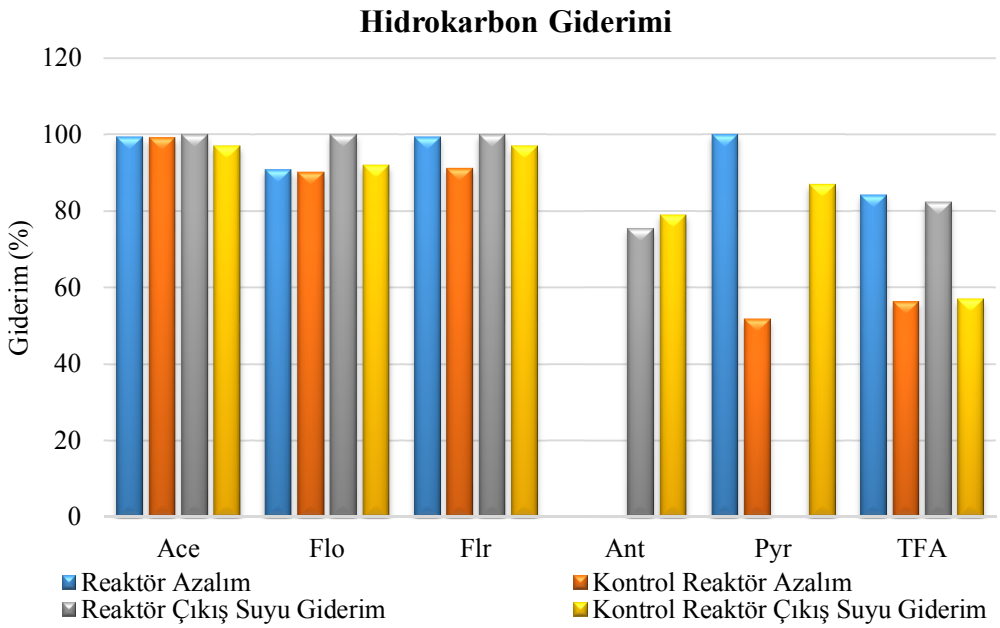
Tank içinde asenaften gideriminin %99,2, fluoranten gideriminin % 91,2, fluoren gideriminin % 90 ve piren gideriminin ise % 51,8 oranında olduğu görülmüştür. Çıkış suyunda ise asenaften ve fluorantenin giderim oranları %97, floren %92 ve piren ise % 87 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).

Biyoçoğaltım yapılan SKTR'ye göre kontrol SKTR'de TFA'nın çok daha az giderildiği gözlenmiştir. Antrasen çıkış suyunda biyoçoğaltım SKTR ve kontrol SKTR'de aynı ölçüde giderilmiş görünmekle birlikte, çıkış flok içinde yüksek miktarlarda birikim yapmış olması bu kimyasalın parçalanmadan flok içerisinde absorbe halde kaldığını göstermektedir.

Her ne kadar dalgalanmalar olmuş olsa da biyoçoğaltım SKTR'de 21. günden itibaren flok içi antrasen miktarının 89,1 mg/L'den 27,2 mg/L'ye gerilemiş olması antrasen giderimi açısından gecikmeli ancak iyi bir giderim olduğunun göstergesidir. Aynı koşullarda kontrol SKTR'de antrasen konsantrasyonu 87,2 mg/L'den 32,2 mg/L'ye gerilemiştir. İki tank arasında birbirine yakın sonuçların çıktığı gözlenmiştir. Asenaften ve fluoranten giderimi kontrol ve biyoçoğaltım SKTR'lerinde aynı sonuçları vermiştir. Fluoren tank içinde aynı sonuçları verirken, çkış suyunda %8'lik bir giderim azalışı sergilemiştir. Piren ise biyoçoğaltım SKTR'de flok içi giderimde %100 giderim sağlarken, kontrol SKTR'de % 51,8'de kalmıştır. Ancak biyoçoğaltım SKTR'de çıkış suyu verilerinin olmayışından dolayı kontrol SKTR'nin %87 giderim verimi tek başına değerlendirilmiştir.



Şekil 4.12. Kontrol tankı hidrokarbon parçalama verileri.



Şekil 4.13. Biyoçoğaltım yapılan SKTR ile kontrol SKTR tank içi ve çıkış suyu örneklerindeki yüzde giderim oranlarını gösteren grafik.

4.5. SKTR İçinde Olgunlaştırılan Aktif Çamurun Makro ve Mikro Boyutta İncelenmesi

SKTR içinde yaklaşık 15 günlük olgunlaştırma sürecinden geçtikten sonra mikroskobik ve çamur makro yapısı bakımından olgunlaştığı görülen aktif çamurdan diğer analitik işlemler devam ederken, her 24 saate bir örneklemeler yapılarak ışık mikroskobu altında mikro boyutta flok yapısı gözlenmiştir.

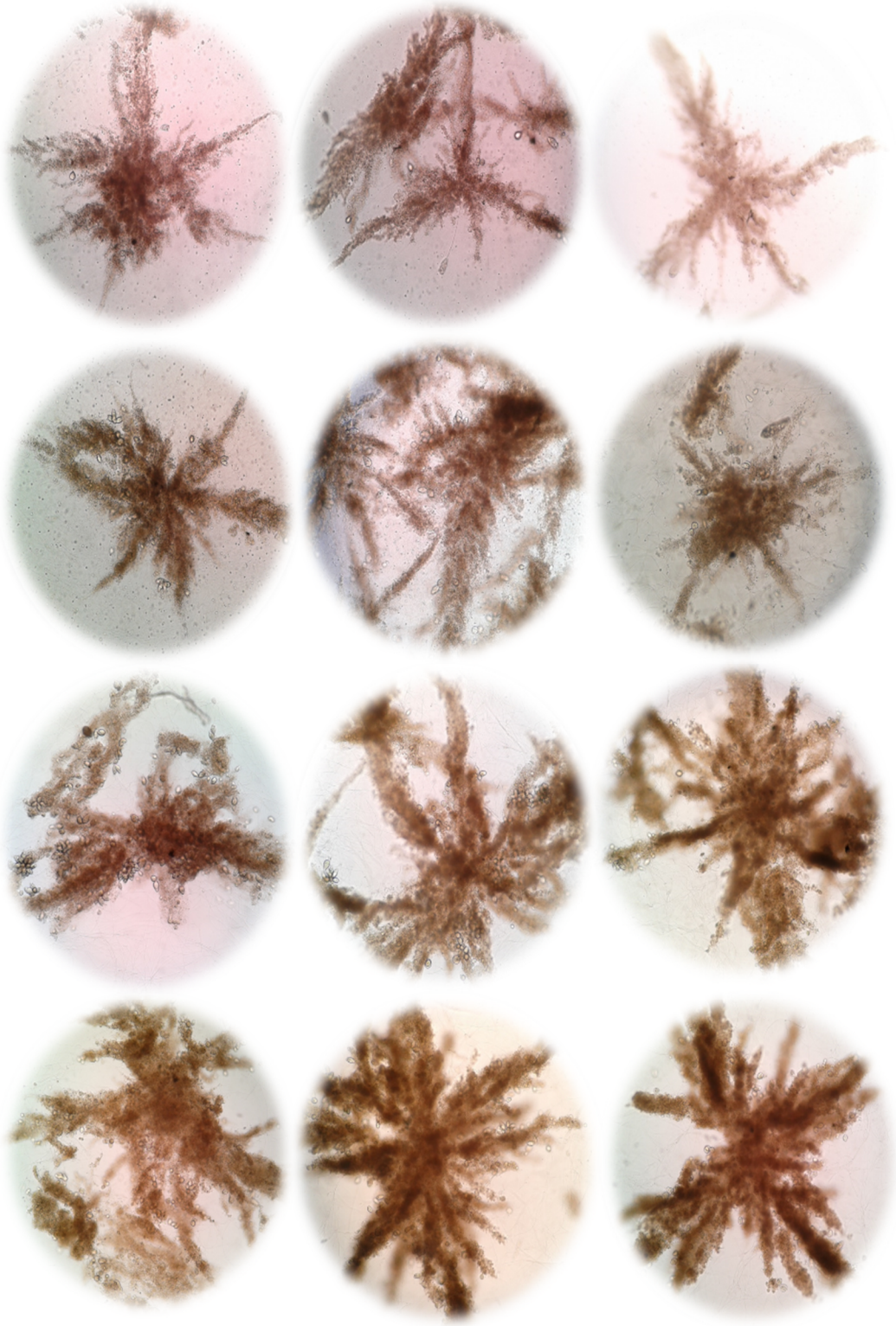
Tüm biyoçoğaltım ve parçalama işlemleri boyunca yapılan mikroskobik gözlemler için izlenen yöntem şu şekildedir; yaklaşık 10 µl flok örneği temiz bir lam yüzeyine nazik bir şekilde bırakılarak ışık mikroskobu (Leica) altında 40x objektif büyütmesi ile incelenmiştir (Şekil 4.14a; 4.14b). 24 saatte bir yapılan incelemelerde başlangıç flok yapısının detaylı seçilebilecek düzeyde temiz olduğu gözlenmiştir. Özellikle flok oluşumunun öncül mikroorganizma gruplarından filamentli bakteriler ile onların üzerilerine tutunmuş bakteriler dışında tek ve net görülen saplı siliyatlar ile yüzücü siliyatlar gözlenmiştir. Bu nokta aktif çamurun en iyi aktivite gösterebildiği noktadır.

Stok kimyasalların eklendiği ilk anda flok genel kompozisyonunda ve hacminde bir azalma veya farklılaşma görülmemiştir. Flok rengi turuncu-kahverengi yerine beyaz - gri renkte gözlenmiştir. Kimyasal eklenmesinin hemen ardında ani pH düşüşlerine bağlı olarak tankta köpük oluşumu gözlenmiş ilk aşamalarda tween 80 ve polietilen glikol gibi takviye köpük kırıcılar eklenerek köpük oluşumunun önüne geçilmiştir. Devam eden 24 saat sonunda flok yapısında bir takım değişiklikler gözlenmiştir. Bu süreçte, özellikle flok yapısı içinde mat gri renk hakim olurken genel canlılıkta, saplı ve yüzücü siliyatlarda azalma ile flok yapısında göreceli olarak dağılma gözlenmiştir. Mikroskop görüntülerinde, ilk kimyasal eklenmesinden itibaren flok dinamizminde bir azalma, durağanlaşma, saplı ve yüzücü siliyatlarda gözle görülür bir azalma saptanmıştır. Her inokulasyonu takip eden sürelerde belirtilen organizma gruplarının gözlenen mikroskop alanlarında sadece ortalama 48 saat canlılık gösterebildiği gözlenmiştir.

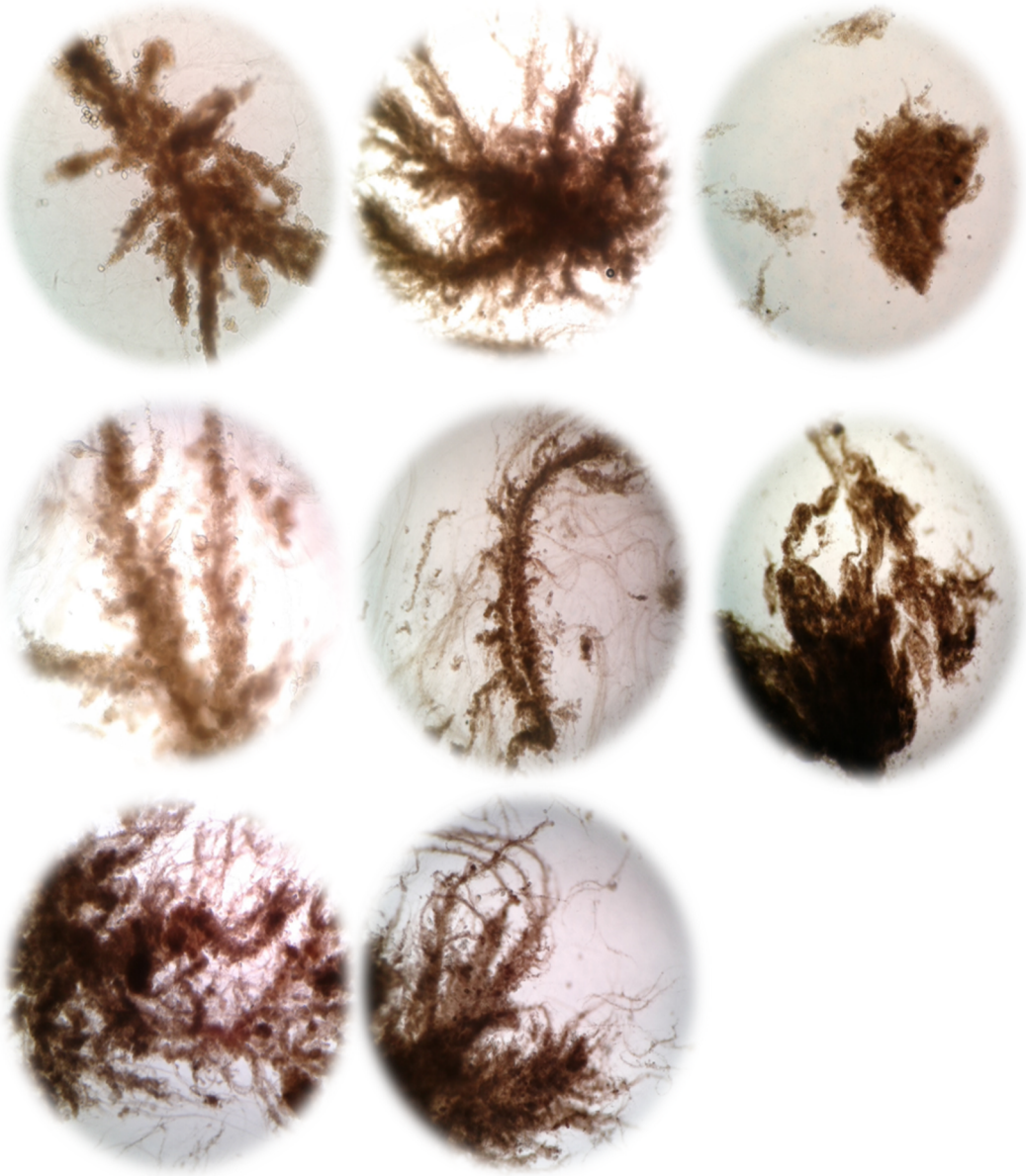
Biyoparçalama işleminin ilk zamanlarında gözlenen bu olguyu düzeltmek için, kimyasal karışımının eklendiği bu noktalarda daha önceden bahsedilen şekilde belirli sayıda ve hacimde mikroorganizma karışımı tanka eklenmiştir. Giderim süresi boyunca 3 defa izolat inokulasyonu gerçekleştirilmiş, ilk inokulasyon dışında diğer iki inokulasyon akabinde ani düşüşler gözlenmemiştir. Bu durum izolatların adaptasyon süreçleri ve çamurun fizikokimyasal yapısı ile açıklanabilir.

Devam eden 24 saatlik periyotlarda benzer olumsuz görüntülere rastlanmamıştır. Süreç devamında aktif çamur yapısında gözle görülebilen makro flok yapıları azalırken, mikroskop altında gözlenen mikro flok yapılarında bir değişim gözlenmemiştir. Aksine filamentli bakteriler üzerinde tutunmuş olan bakterilerin hacimsel olarak artış gösterdiği ve özellikle saplı siliyatlarda artış olduğu gözlenmiştir. Flok rengi parlak turuncu haline gelmiştir. Bu noktada eklenen kimyasal kimyasal solüsyonu ile oluşan ani pH değişimi ve gri renk oluşumu gözlenmemiştir. Muhtemel olumsuz etkileri, yoğun hacimli flok yapısında bulunan ekstra polimerik maddelerin (EPS) oluşturduğu tahmin edilen hücre dışı materyaller sayesinde en aza indirgenmektedir. Burada kimyasal maddeler hücre dışı materyale kısa süreli absorbe olarak direkt hücre üzerinde olumsuz etki yaratması ve dolayısıyla hücresel canlılıkta ve harekette bir azalma gözlenmezken, köpük oluşumu da gözlenmemiştir.

Aktif çamurun bu olumlu hali biyoparçalama süresi olan toplan 55 günün son 30 günü devam etmiştir. Biyoparçalamanın yaklaşık son on günlük döneminde özellikle rotiferlerde artış olmuş ve çeşitli kurtlar ortamda görünmeye başlamışlardır. Bu noktadan itibaren belirtilen bu protozoonların floklara agresif saldırıları ve BOİ ile F/M oranında teorik azalmalardan dolayı flok yapısını oluşturan bakterilerde azalma gözlenmiştir. Bu etkilerden dolayı filamentli bakteriler açığa çıkmış ve sağlıklı bir flok yapısından söz etmek mümkün olmamıştır.



Şekil 4.14a. Işık mikroskobu ile flok yapısının görüntüsü.

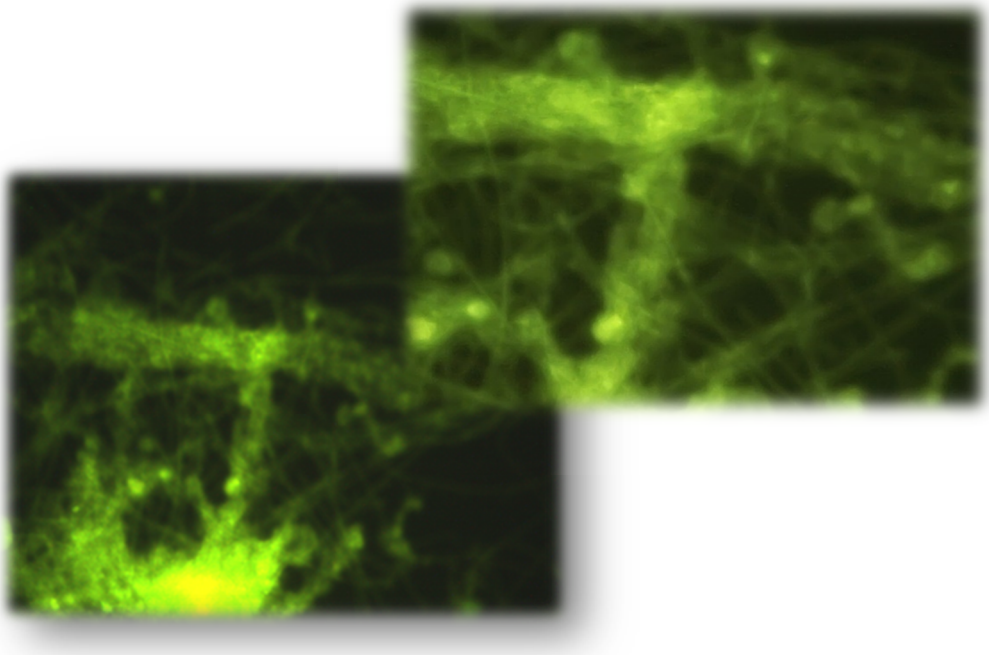


Şekil 4.14b. Işık mikroskobu ile flok yapısının görüntüsü.

4.6. Flok Yapısının Fluoresan Mikroskobisi

Aktif çamurun en iyi biyoparçalama değerlerine ulaştığı bir zamanda alınan flok örneği LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit içeriğindeki SYTO® 9 boyası ile boyanarak (bkz. 3.2.14. Fluoresan boyama ile flok yapısının incelenmesi) tüm flok yapısı gözlenmiştir. Fluoresan boyama yapılmasındaki amaç, daha önceden bahsedilen, ÇHİ, AKM, çamur yaşı gibi çeşitli parametreler yönünden şartları sağlayan olgun ve tam randımanla iş gören aktif çamurun istenilen formda

olup olmadığının gözlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Özellikle filamentli bakteriler ile flok oluşturan bakteriler (Şekil 4.15) net bir şekilde gözlenmiştir (bkz. 2.12.1. Aktif çamur flokları).



Şekil 4.15. Canlı/ölü boyama kiti ile boyanmış flok yapısının fluoresan mikroskobu altındaki görüntüsü.

4.7. Flok İçi Kimyasal Absorbsiyonu

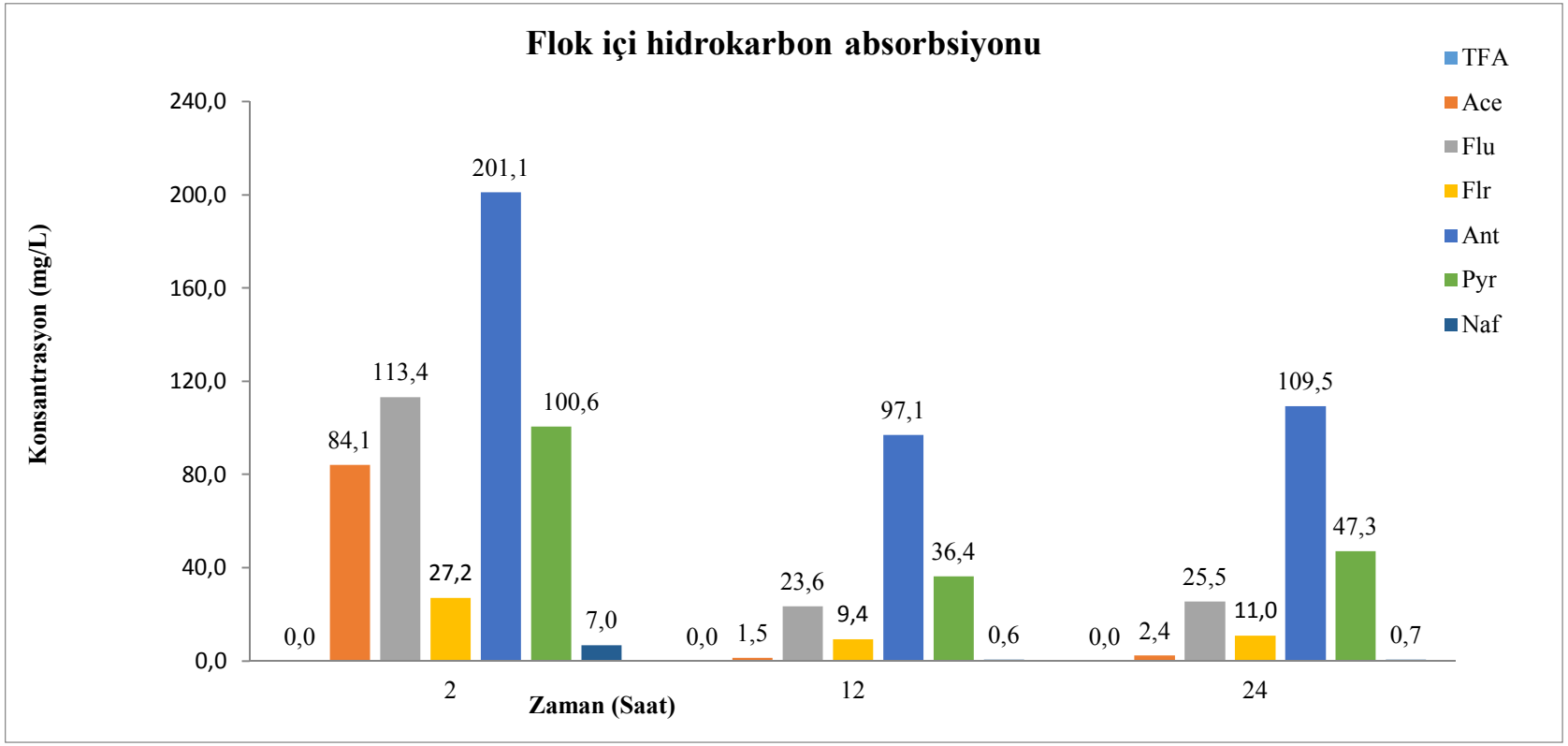
Özellikle antrasen ve piren gibi moleküler ağırlığı yüksek hidrokarbonların sulu sistemde yüksek hidrofobik karakter göstermesinden dolayı flok yapısı içerisine hapsolduğu hem biyoçoğaltım yapılan SKTR çalışmalarında hem de kontrol SKTR çalışmalarında enstrümental analizlerle gösterilmiştir. Bu nedenle, bu tarz yüksek hidrofobik karakterdeki hidrokarbonların flok içerisine absorbe olma durumları ve devamındaki süreçte flok içinde ya da flok dışına salınarak gerçekleştirilen parçalama durumlarının incelenmesi amacıyla absorbsiyon çalışması yapılmıştır. Aktif çamur içerisine teorik olarak 100 mg/L olacak şekilde kimyasal karışım solüsyonundan eklenmiş ve kimyasalların absorbe olması için 2 saat beklenmiştir. İlk analiz 2 saat sonra, devamındaki analizler ise 12. saat ve 24. saatte alınmıştır. Eş zamanlı olarak tank içinden alınan süspande sıvı örneklerine

normal hidrokarbon analizleri (Çizelge 3.8) uygulanmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.16). Hidrokarbon ekstraksiyonu daha önce belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

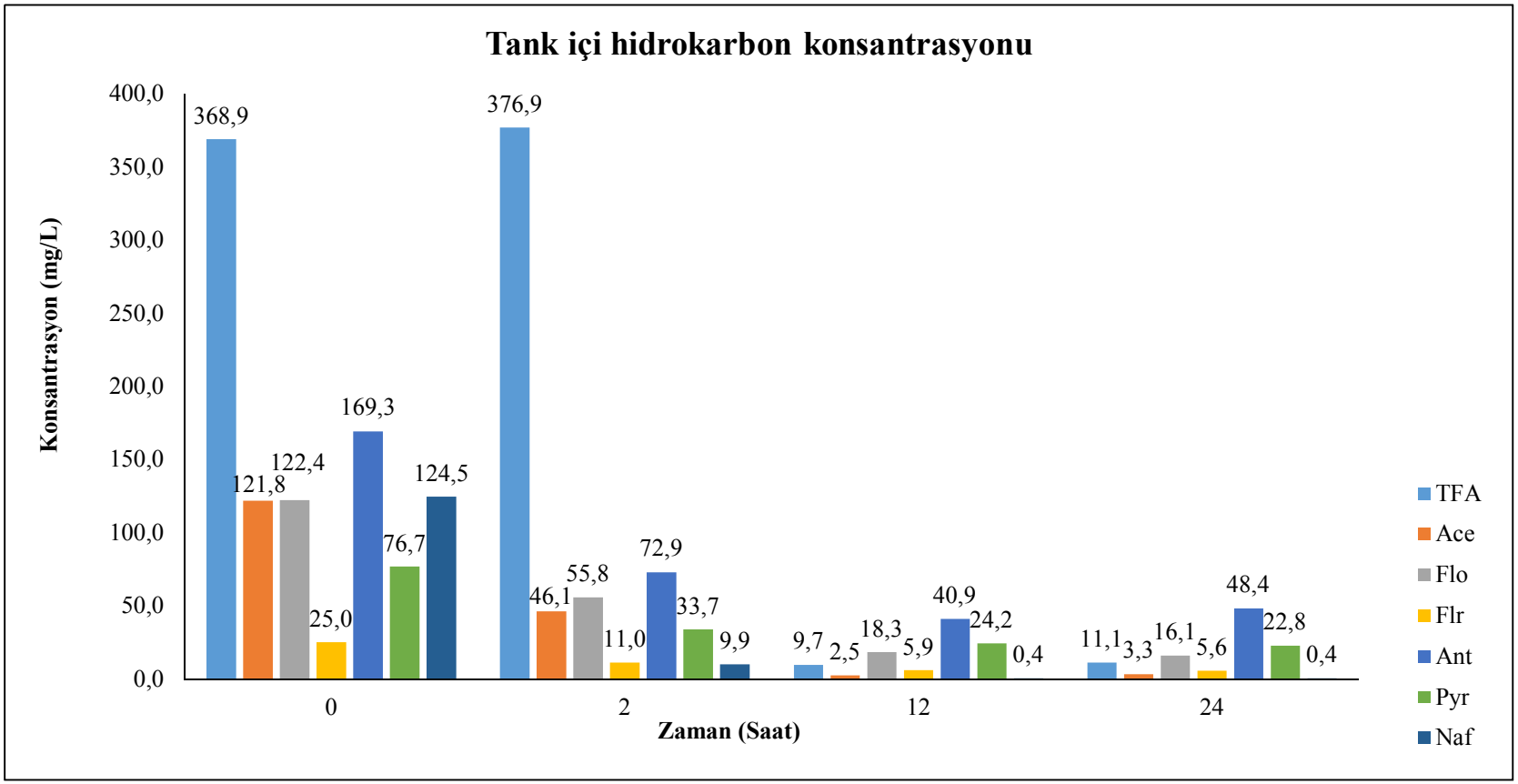
Çizelge 4.3. Flok içi ve tank içi örneklerinde bulunan hidrokarbon konsantrasyonları.

Flok içi	TFA	Naf	Ace	Flo	Flr	Ant	Pyr
0.	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	7	84,1	113,4	27,2	201,1	100,6
12.	-	0,6	1,5	23,6	9,4	97,1	36,4
24.	-	0,7	2,4	25,5	11	109,5	47,3
Tank içi	**TFA**	**Naf**	**Ace**	**Flo**	**Flr**	**Ant**	**Pyr**
0.	368,9	124,5	121,8	122,4	25	169,3	76,7
2.	376,9	9,9	46,1	55,8	11	72,9	33,7
12.	9,7	0,4	2,5	18,3	5,9	40,9	24,2
24.	11,1	0,4	3,3	16,1	5,6	48,4	22,8

Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi TFA ve asenaften'in flok içi absorbsiyonunun olmadığı tank içi verileri ile doğrulanmaktadır. Bu nedenle, TFA ve asenaften'nin tamamına yakını tank içinde parçalanmıştır denilebilir. Floren'in tank içindeki konsantrasyonlarının flok içindekilere göre daha fazla olmasına rağmen, 2. saatten itibaren tank içindeki absorbsiyonunun % 50 daha az olduğu görülmektedir. Floranten'de ise tank içi ve flok içindeki konsantrasyonlarında bir faklılık gözlenmemiştir. Ancak yine floranten'de de flok içi absorbsiyonunun tank içi absorbsiyonuna göre % 50 civarında daha fazla olduğu saptanmıştır. Antrasen ve piren'in flok içerisinde çok daha fazla birikme eğilimide olduğu görülmektedir. Her iki hidrokarbonun da flok içindeki 2. saat konsantrasyonları tank içi örneklerindeki 2. saat konsatrasyonundan 30 - 40 mg/L civarı daha fazladır Şekil 4.16; 4.17).



Şekil 4.16. Flok içerisinde tutulan hidrokarbon konsantrasyonlarının zamana bağlı değişim grafiği.

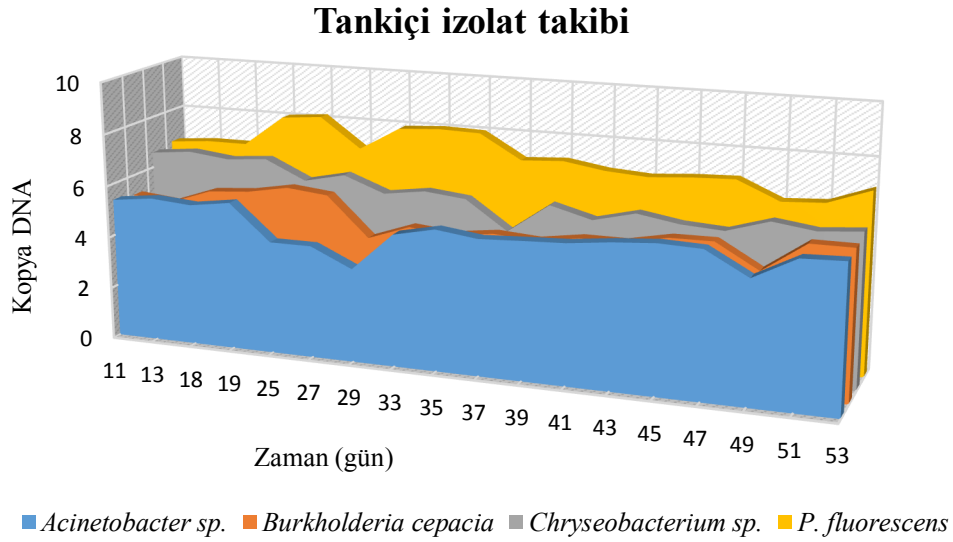


Şekil 4.17. Flok içerisinde tutulan hidrokarbon konsantrasyonlarının zamana bağlı değişim grafiği.

4.8. Real-Time PCR İle İzolat Takibi

Bunun için Çizelge 3.12'de verilen primer-prob setleri kullanılarak her analiz anında tank içinde bulunan izolatların DNA kopya sayıları belirlenmiştir. Tanısı yapılan *Burkholderia sp.* ve *Chryseobacterium sp.* için moleküler klonlama işlemi gerçekleştirilmiş, diğer izolatlar için ekstra bir işlem uygulanmamıştır. *Acinetobacter sp.* için SYBR®Green I boyası kullanılırken diğer izolatlar için TaqMan® prob yöntemi kullanılmıştır. Kopya DNA sayıları belirlenen izolatlara ait grafik Şekil 4.18'te verilmiştir. DNA kopya sayıları oluşturulan standart eğri grafikleri vasıtasıyla hesaplanmıştır (bkz. Şekil 3.3, 3.4).

Aktif çamur aklimasyonu sonucu, hidrokarbonların ve izolatların eklenmesini takip eden 11. günden itibaren, HPLC verileri ışığında her 48 saatte bir SKTR'den aktif çamur örneği alınarak genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Genomik DNA saflıkları nanodrop ile belirlendikten sonra, daha önceden belirtilen primer-prob setleri kullanılarak reaktörde var olan izolatların saptanması gerçekleştirilmiştir. İki izolat SYBRGreen I, üç izolat ise TaqMan probu kullanılarak belirlenmiştir. Realtime PCR neticesinde elde edilen değerler ortalama 10^5 - 10^6 kopya DNA / 50 µl'dir (Şekil 4.18). Tank içinde biyoparçalama işlemi sırasında yaklaşık 40 gün izlenen izolatların sayılarında anlamlı düşüş ya da artış şekilinde bir değişim olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.18. Real Time PCR ile izolatların takibini gösteren grafik.

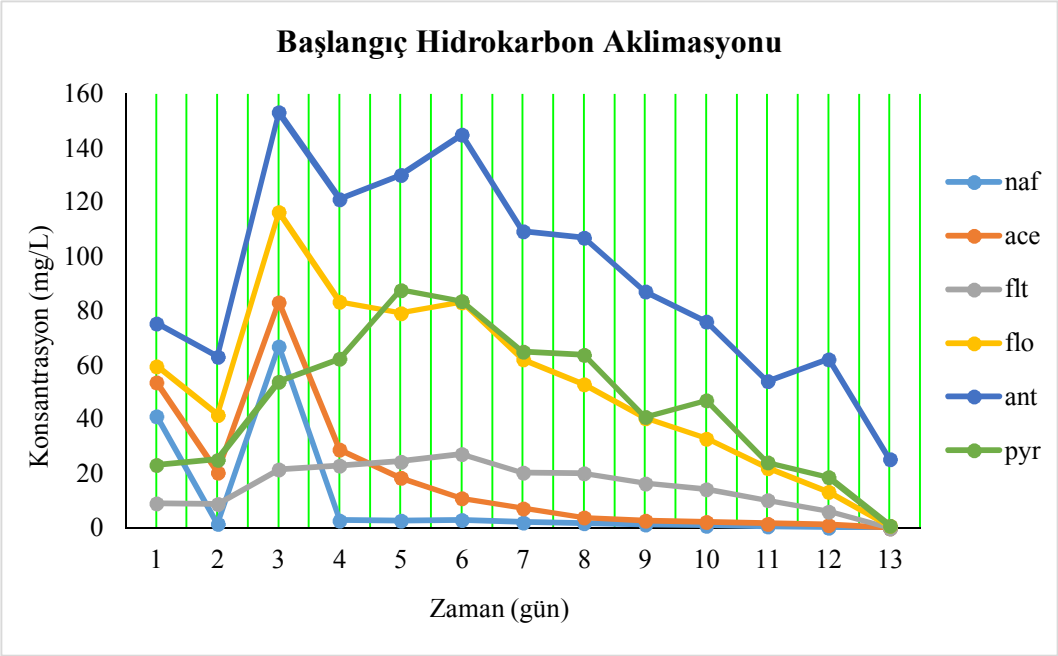
4.9. Gen Ekspresyonu

Bunun için aktif çamur yaklaşık on gün olgunlaştırıldıktan sonra on üç gün boyunca 2,5 ml kimyasal stok solüsyonundan (naftalen 41,26 mg/L, asenaften 53,65 mg/L, floranten 9,01 mg/L, fluoren 59,69 mg/L, antrasen 75,42 mg/L ve piren 23,18 mg/L) eklenerek aktif çamur içindeki mikroorganizmaların aklimasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.19). Tank içinde başlangıç hidrokarbon miktarlarının tamamen tükendiği anda 7,5 ml kimyasal stok solüsyonundan eklenerek (Çizelge 4.4.; Şekil 4.23) gen ekspresyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Gen ekspresyonu daha önceden gen ekspresyonu çalışmaları başlığı altında bahsedildiği gibi belirlenmiştir. Bunun için hedef bölge belirlenmesinde PAH RHDα GN primer seti kullanılmıştır. Housekeeping gen bölgeleri için ise 16S ve 341 – 518 primer dizileri kullanılmıştır.

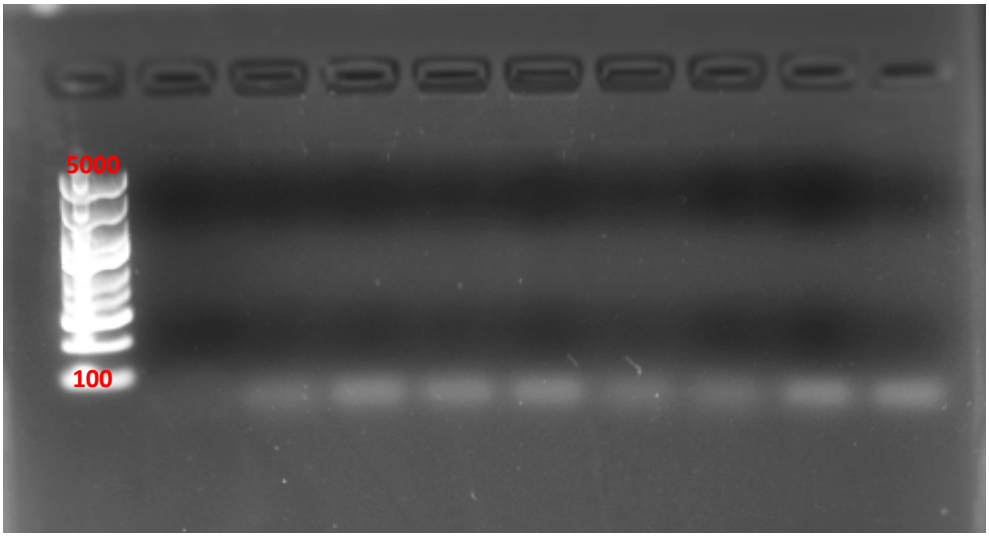


Şekil 4.19. Gen ekspresyonu için olgunlaştırılan aktif çamur görüntüsü.



Şekil 4.20. Gen ekspresyonu çalışması için çamur aklimasyon grafiği.

RHD enzimlerini kodlayan gen bölgesinin α alt birimi içerisinde bulunan ve korunmuş olan Rieske [2Fe – 2S] aktif merkezine özgü sentezletilen DP1 ve DP2 primer çifti ile bu gen bölgesinin var olup olmadığı araştırılmıştır. Bu bölgeyi belirlemek için rastgele seçilen izolat DNA'ları DP1 – DP2 primer seti ile konvansiyonel PCR yardımıyla bölge çoğaltılmıştır. Standart PCR protokolünde 43 – 48 °C gradiyent sıcaklık uygulanmıştır. Çoğaltılan bölge yaklaşık olarak 79 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Rastgele seçilen örneklerin DP Rieske bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (kuyucuklar soldan sağa sırası ile, marker (5000bp), negatif, T1, T4, TK, Ant2, SE, ÇB, FT5, FT7).

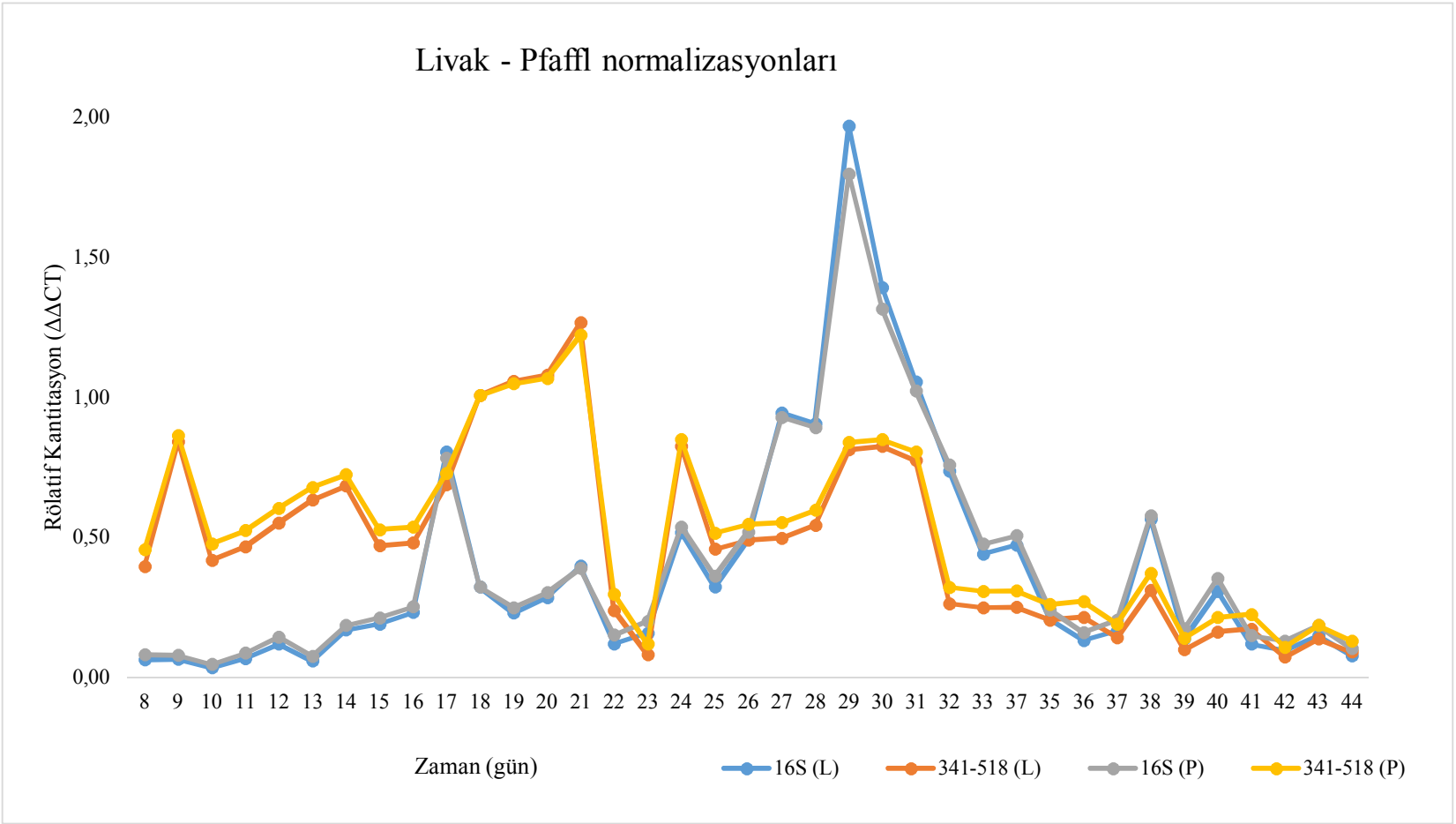
Analizlerden elde edilen ham veriler daha önceden bahsedilen ve qPCR için sıklıkla kullanılan Livak ve Pfaffl yöntemleri kullanılarak anlamlandırılmıştır. Livak yöntemi kullanılarak 16S ve 341 – 518 genleri ile normalize edilmiş olan hedef gen için elde edilen sonuçlar ile oluşturulan grafikler Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Gen ekspresyonu çalışması esnasında aktif çamura eklenen kimyasal konsantrasyonları.

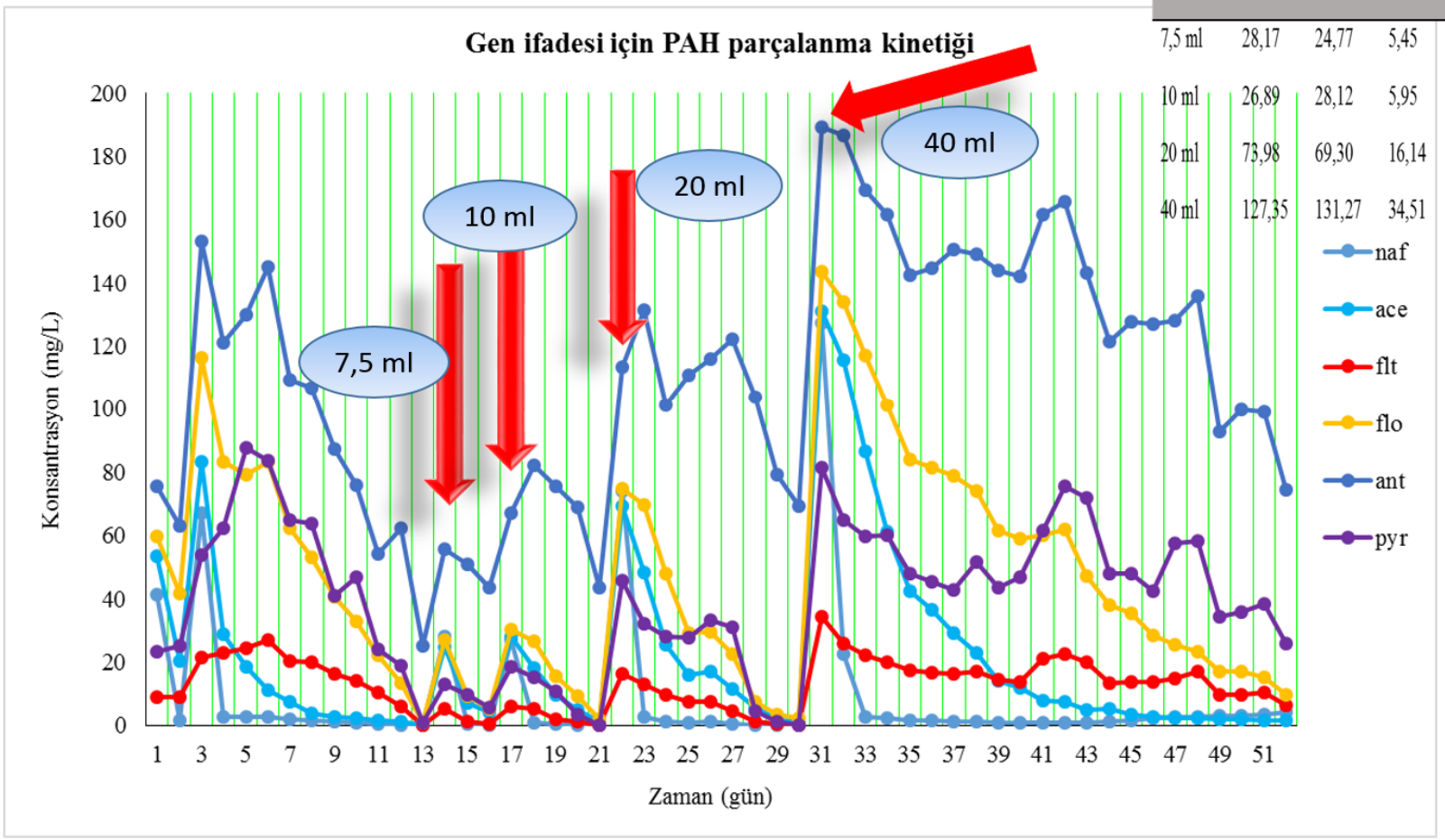
	Naf (mg/L)	Ace (mg/L)	Flr (mg/L)	Flo (mg/L)	Ant (mg/L)	Pyr (mg/L)
14. gün 7,5 ml	28,2	24,8	5,4	26,8	55,6	13,1
17. gün 10 ml	26,9	28,1	5,9	30,5	67,1	18,7
22. gün 20 ml	74,0	69,3	16,1	74,9	113,6	45,6
31. gün 40 ml	127,4	131,3	34,5	143,4	189,4	81,6

Bakıldığı zaman 7,5 ml, 10 ml ve 20 ml hidrokarbon karışımının eklenmesinin hemen ardından gen ifadelerinde artışlar gözlenmiştir. İfadedeki en fazla artış 16S normalizasyonu ile 40 ml kimyasal karışımının eklendiği 31. günden sonra 36. günde 1, 39 kat rölatif bir artış olurken, 341 – 518 normalizasyonu ile 20 ml kimyasal karışımının eklendiği 22. günden sonraki 27. günde 1,27 kat rölatif bir atış gözlenmiştir. 16S normalizasyonu verilerinde ani bir artış ve azalış gözlenirken, 341 – 518 normailzasyonu verilerinde kademeli bir artış gözlenmiştir.

Pfaffl yöntemini uygulamak için ürün veren PCR veriminin hesaplaması yapılmıştır. Buna göre 16S primerleri için verim 1,87; 341 – 518 primerleri için verim 1,80; ve PAH RHDα GN primerleri için verim 1,80 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra Pfaffl yöntemi için kullanılan formül vasıtasıyla rölatif gen ifadeleri bulunmuştur. İki yöntemin doğrulaması için yöntem sonuçları kıyaslanmıştır (Şekil 4.22).

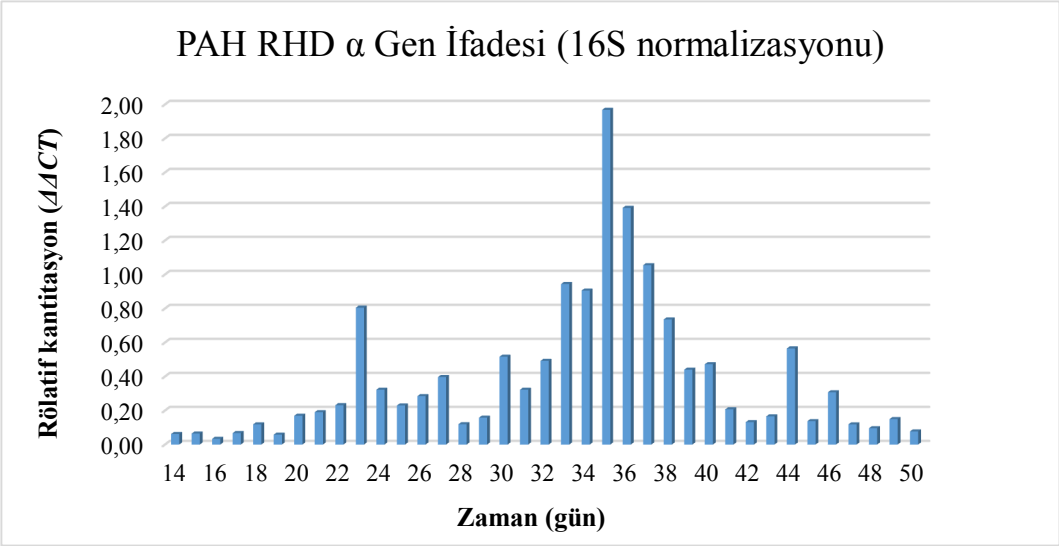


Şekil 4.22. Livak ve Pfaffl normalizasyon sonuçlarının karşılatırmalı grafiği

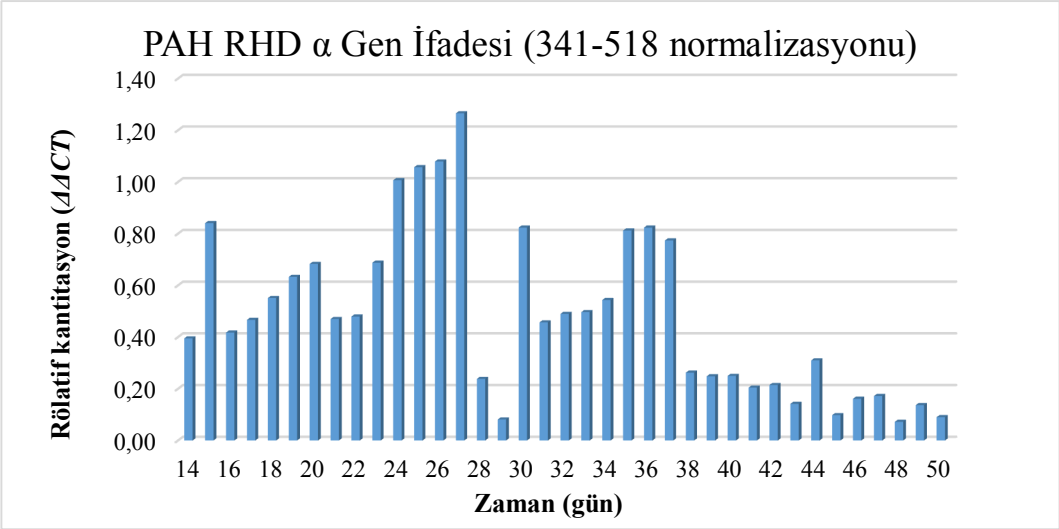


mg/L	Naf	Ace	Flr	Flo	Ant	Pyr
7,5 ml	28,17	24,77	5,45	26,83	55,58	13,11
10 ml	26,89	28,12	5,95	30,48	67,11	18,71
20 ml	73,98	69,30	16,14	74,95	113,61	45,61
40 ml	127,35	131,27	34,51	143,44	189,40	81,61

Şekil 4.23. Çamur olgunlaştırmasını takiben tank içine eklenen hidrokarbonların süreç içerisindeki giderim grafiği.



Şekil 4.24. 16S normalizasyonuna göre hedef genin rölatif ifadesi.

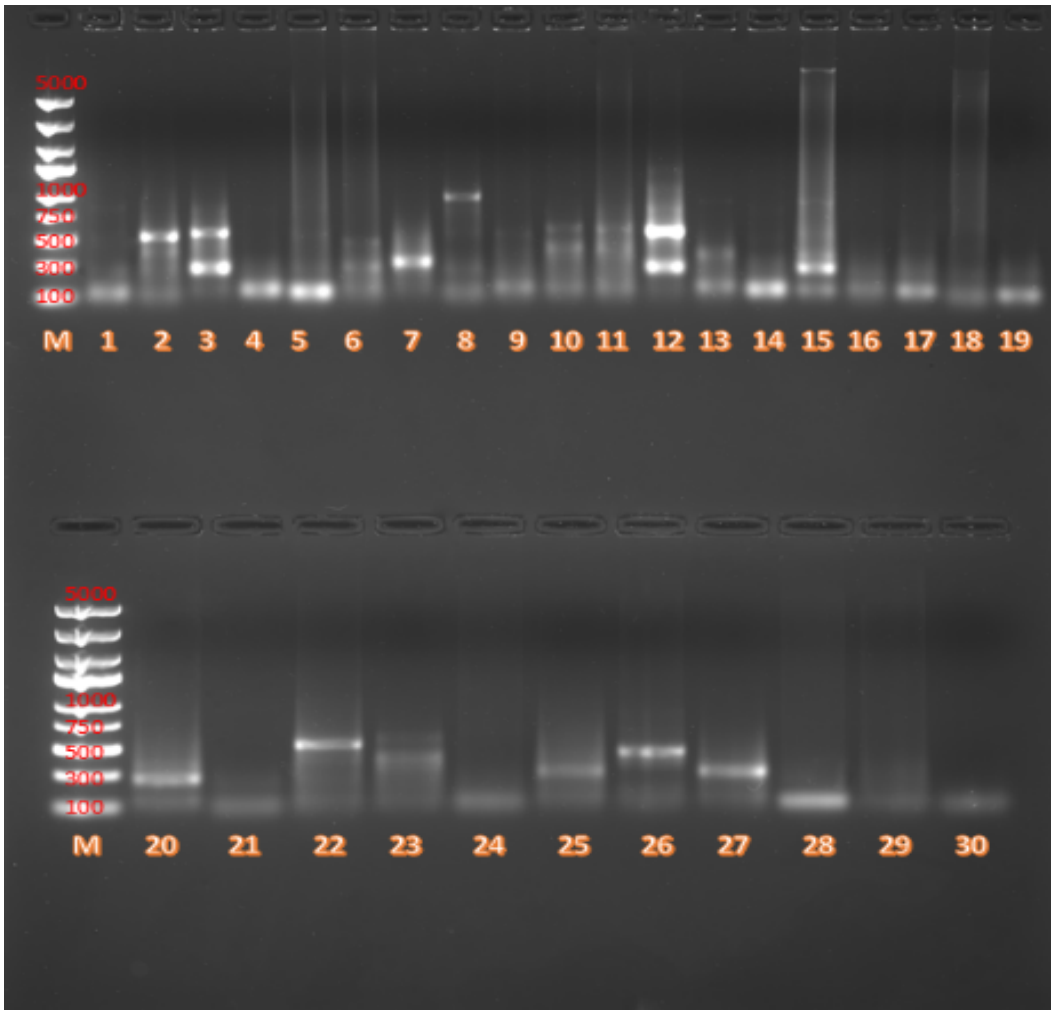


Şekil 4.25. 341 – 518 normalizasyonuna göre hedef genin rölatif ifadesi.

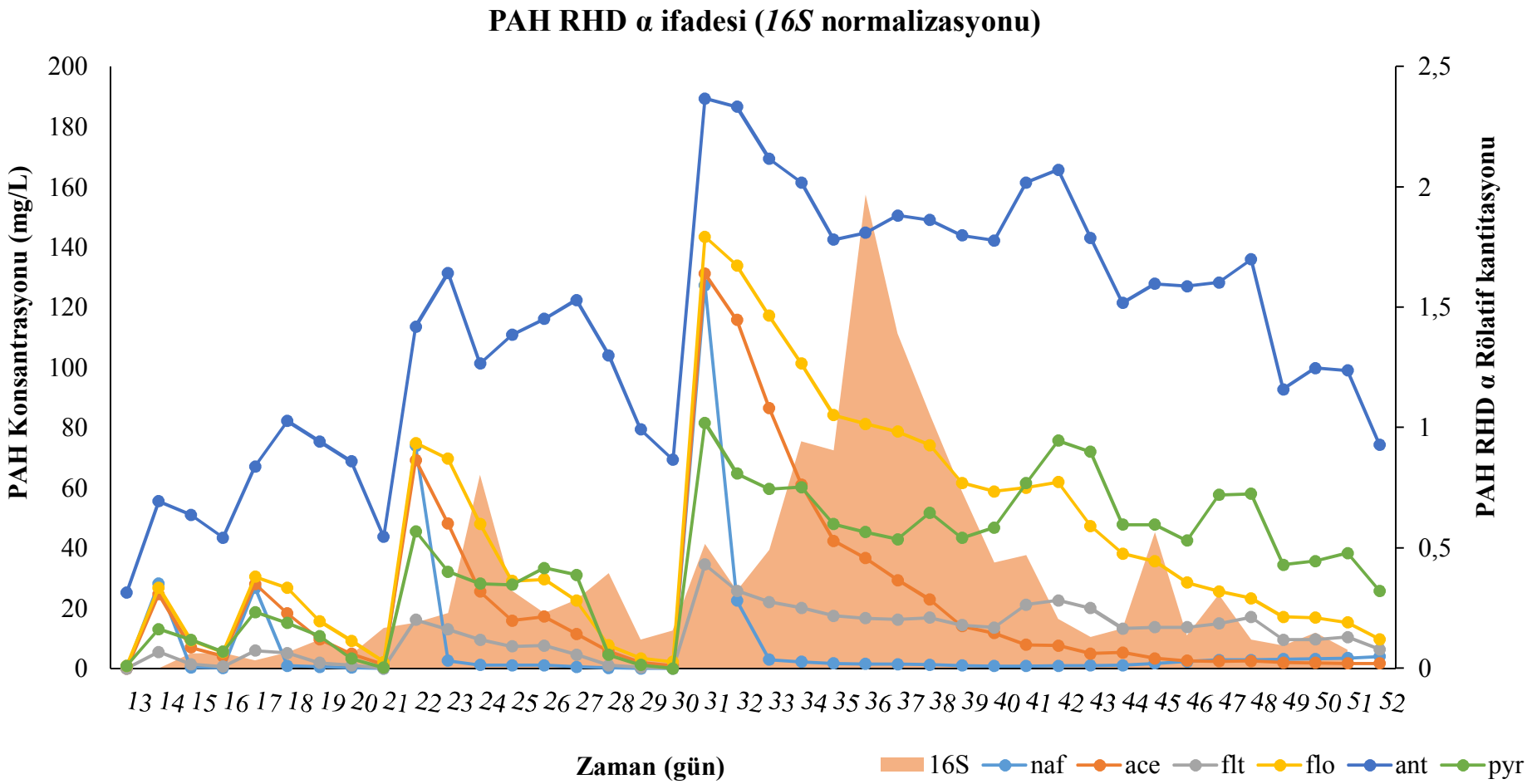
Gen ekspresyonu için tanktan alınan örneklerin dışında başlangıçta hidrokarbon spesifik izolatların genomik DNA'ları ve plasmid DNA'ları da çalışmaya dahil edilerek mevcut ekspresyon analizi gerçekleştirilen gen bölgesinin, hidrokarbon parçalama kapasitesinde olan izolatlarda olup olmadığı, bulunuyor ise genomik DNA ya da plasmid DNA kökenli olup olmadığı araştırılmıştır. Bu sebeple gen ekspresyonu için uygulanan Real Time PCR protokolü izolatlar için de uygulanmıştır. Real Time PCR'da pozitif görünen ve belirli bir CT değerine sahip olan PCR ürünleri mikrosantrifüj yardımıyla kapillerlerden mikrosantrifüj tüplerine

toplanarak agaroz jelde görüntülenmiştir. Agaroz jel elektroforez protokolü yöntem başlığı altında açıklanmıştır.

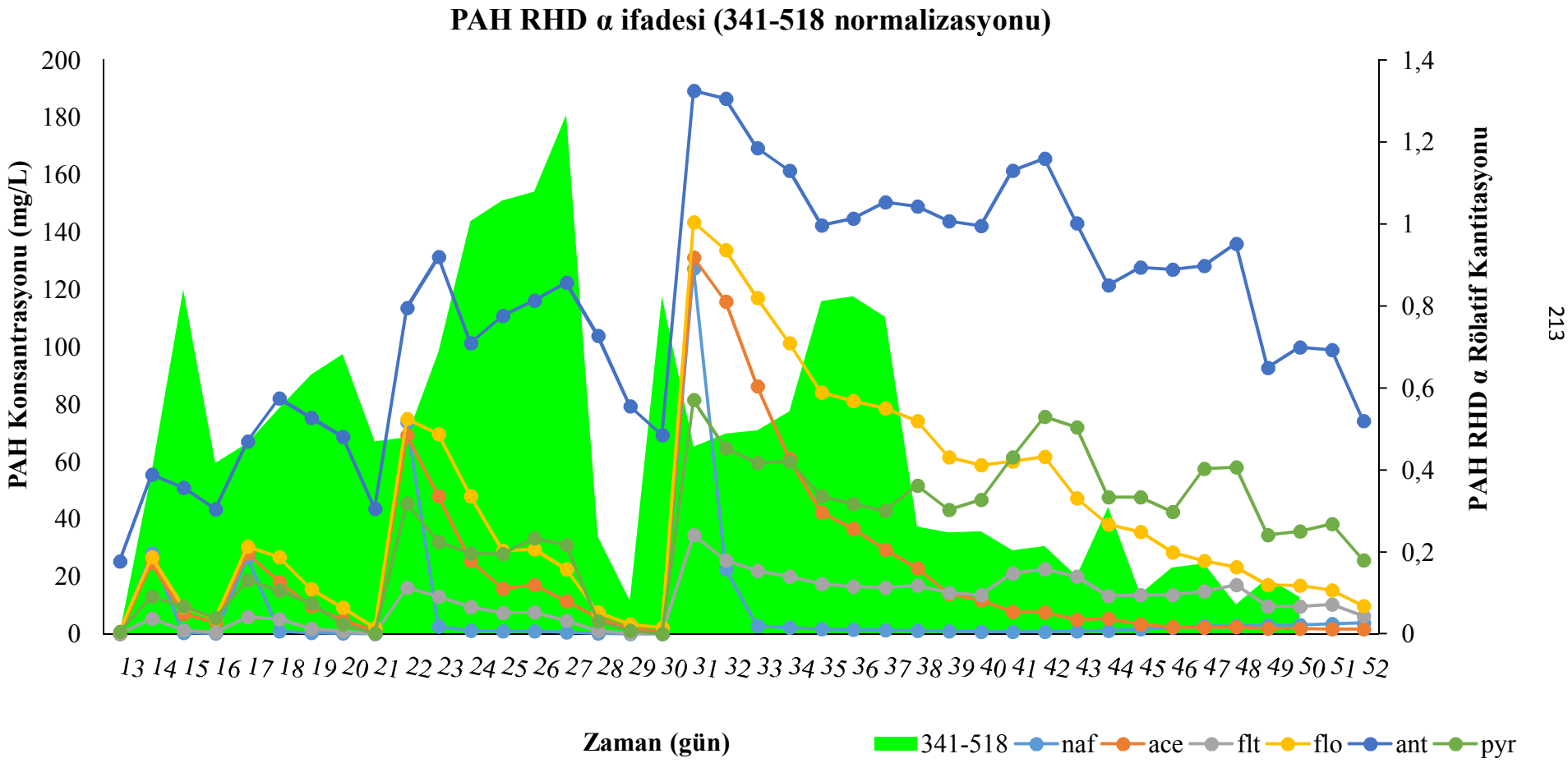
Buna göre elde edilen jel görüntülerinden marker'da yaklaşık olarak 300 baz çiftine denk gelen bölge RHDα GN gen bölgesine tekabül etmektedir. Ancak bunun dışında bazı izolatlarda 100, 500, 1000 baz çifti uzunluğunda olan farklı bölgelerin de çoğaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.26. PCR ile çoğaltılan RHD gen bölgesinin izolatlara ait bantları. 1- SD, 2- pTK, 3- p218 4- SE, 5- SD, 6- P5, 7- Fermentör, 8- T4, 9- T5, 10- FT5, 11- FT7, 12- 218, 13- TK(pH), 14- SE, 15- Ant2, 16- P5, 17- E2B, 18- T1 , 19- ÇB, 20- pAnt2, 21- pT4, 22- pT5, 23- pFT7, 24- pT1, 25- pFermentör üst sıvı, 26- pChr, 27- pFermentör flok, 28- pÇB, 30- Pc231113. M- marker (5000bp).



Şekil 4.27. 16S gen bölgesi normalizasyonu ile elde edilen rölatif gen ekspresyonu ile çamurun biyoparçalama etkinliğini gösteren grafik.



Şekil 4.28. 341 - 518 gen bölgesi normalizasyonu ile elde edilen rölatif gen ekspresyonu ile çamurun biyoparçalama etkinliğini gösteren grafik.

Teorikte, Livak ve Pfaffl yöntemleri için kullanılan housekeeping gen bölgelerinin CT değerlerinde anlamlı bir değişiklik olması beklenmez ve bu nedenle normalizasyon hesaplamalarında CT değerlerinin aritmetik ortalamaları kullanılmaktadır. Çalışmalar housekeeping genlerine istinaden hesaplanmaktadır. Ancak pratikte her zaman housekeeping gen bölgelerinin CT değerleri birbirlerine yakın olmamakta ve değişmektedir. Bu nedenle aritmetik ortalamaya dayalı olarak kullanılan housekeeping gen bölgelerinin CT verileri ile yapılan normalizasyon çalışmaları yerine ***BestKeeper*** adlı excel tabanlı bir istatistik veri – formül programı kullanılmaktadır. Bu programda 10 farklı housekeeping gen bölgesinin CT değerleri ve PCR verimleri aynı anda kullanılarak gen ekspresyon çalışmalarına uygunlukları analiz edilebilmektedir (Pfaffl et al., 2004).

Özellikle 16S gen bölgesine ait CT değerlerindeki görece tutarsızlıklar nedeniyle çalışmanın bu aşamasında *BestKeeper* programı kullanılarak 16S ve 341 – 518 gen bölgelerinin uygunlukları ve bunların PAH RHDα GN gen bölgesinin ifade düzeylerine etkileri analiz edilmiştir. Bu sayede Livak ve Pfaffl yöntemlerinde elde edilen rölatif kantitasyon kat sayıları ile korelasyonları kontrol edilmiştir.

Bunun için her iki housekeeping gen bölgesinin tüm CT verileri ve PCR verimleri istenilen yerlere yazılarak çalışmaya başlanmıştır.

Çizelge 4.5. Her iki housekeeping genler ve hedef genin verileri.

Housekeeping ve Hedef Genlerin CT verileri:			
	16S	**341-518**	**Rhd GN**
N	**37**	**37**	**37**
Geo. mean [CT]	12,69	5,76	30,69
Ar. mean [CT]	12,79	5,80	30,71
min [CT]	9,46	4,69	28,20
max [CT]	15,54	8,15	33,03
Std dev [± CT]	1,34	0,50	0,84
CV [% CT]	10,48	8,65	2,74
min [x-fold]	-7,57	-1,88	-4,31
max [x-fold]	5,94	4,06	3,97
Std dev [± x-fold]	2,31	1,37	1,64

Çizelge 4.6. Housekeeping vs. BestKeeper verileri.

	16S	**341 - 518**	**BestKeeper**
N	37	37	37
Geo Mean [CT]	12,69	5,76	8,55
Ar Mean [CT]	12,79	5,80	8,59
min [CT]	9,46	4,69	7,08
max [CT]	15,54	8,15	10,14
Std dev [± CT]	1,34	0,50	0,64
CV [% CT]	10,48	8,65	7,41

Çizelge 4.7. Hedef gen vs. BestKeeper verileri.

	RHDα GN	BestKeeper
N	**37**	**37**
Geo Mean [CT]	30,69	8,55
Ar Mean [CT]	30,71	8,59
min [CT]	28,20	7,08
max [CT]	33,03	10,14
Std dev [± CT]	0,84	0,64
CV [% CT]	2,74	7,41

Çizelge 4.8. Housekeeping ve hedef gen bölgelerinin BestKeeper'a karşı analizi.

Regresyon Analizi:	***HKG vs. BestKeeper***		***BestKeeper vs. Hedef gen***
	16S vs. BK	**341-518 vs. BK**	**RHDα GN vs. BK**
coeff. of corr. [r]	0,820	0,737	0,364
coeff. of det. [r^2]	0,672	0,543	0,132
Intercept [CT]	-1,215	0,531	26,289
Slope [CT]	1,631	0,613	0,514
SE [CT]	±0,917	±0,453	±1,06
p-value	0,001	0,001	0,027
Power [x-fold]	2,78	1,43	1,35

- **Not:** tabloya ait kısaltmalar: N: örnek sayısı; GM [CP]: CT'lerin geometrik ortalaması; AM [CP]: CT'lerin aritmetik ortalaması; Min [CP] ve Max [CP]: CT'lerin ekstrem değerleri; SD [± CP]: CT'lerin standart sapması; CV [%CP]: CT seviyesindeki bir yüzde olarak ifade edilen değiken katsayısı; Min [x-fold] ve Max [x-fold]: mutlak bir x - kat üst ya da alt regülasyon katsayısı olarak ifade edilen ifade düzeylerinin ekstrem değerleri; SD [± x-fold]: mutlak regülasyon katsayılarının standart sapması.

İki housekeeping gen bölgesi ile yapılan Bestkeeper analizleri göstermektedir ki; Her iki gen bölgesinin CT verilerinin geometrik ortalamalarının alınması ve geometrik ortalamalarının ortalamasının alınması ile elde edilen temel BestKeeper verileri hedef gen bölgesine uygulandığında rölatif açıdan anlamlı bir sonuç vermektedir. Ancak 16S gen bölgesinin hem standart sapma değeri 1,34 olduğundan hem de max ve min x - katlanma değerleri arasında oldukça fazla aralık olmasından (-7,57 – 5,94) dolayı stabil ve güvenilir bir housekeeping gen bölgesi olarak kullanılamayacağı sonucuna varılabilir. 341 – 518 gen bölgesinin ise hem standart sapma değeri hem de istatistiksel p – değeri (0,001) oldukça anlamlı sonuçlar verdiği ve ayrıca maks – min x – katlanma değerleri (-1,88 – 4,06) aralığının görece fazla olmamasından dolayı bu gen bölgesi güvenilir bir houskeeping gen bölgesi olarak kullanılabilir denilebilir.

Ayrıca hedef gen bölgesinin BestKeeper normalizasyonu olmadan artan ya da azalan bir ifadeye sahip olduğu (-4,31 – 3,97; standart sapma 1,64) görülmektedir. Hedef gen maksimum 3,97 kat ifade olabilirken, regresyon analizleri neticesinde hedef gen bölgesinin katlanma gücünün 1,35 olduğu hesaplanmıştır.

Sonuç olarak 16S gen bölgesinin CT değerlerindeki dalgalanmalardan dolayı gen ekspresyonu analizlerinde pek uygun olmadığı, ancak uygun olarak kabul edildiğinde hedef gen bölgesinin ifadesinin Livak ve Pfaffl analiz verilerine benzer sonuçlar sergilediği görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Son birkaç on yılda ksenobiyotikler olarak adlandırılan yabancı bileşikler çevresel sistemlere fazlaca deşarj edilmektedir. Bu bileşikler genellikle biyolojik yollarla parçalanmaya dirençli yapıdadırlar. Halojenlenmiş hidrokarbonlar, halojenlenmiş aromatikler, pestisidler ve PCB'ler gibi halojenlenmiş organik bileşikler mikrobiyal parçalanmaya karşı oldukça dirençlidir. Bu bileşikler aynı zamanda doğal orijinin dayanıklı bileşikleridir. Genellikle denizel çevrelerde bulunmakla birlikte içeriklerinde halojenlenmiş doğal bileşikler olduğu kadar humik maddeler ve lignin de barındırırlar (Bitton, 2005).

Peki bu yeni bir problem midir? Bakıldığında, kirleticilerin çevresel sorun oluşturmasında insan aktivitelerinin ana kaynak olduğu ve gün geçtikçe artan bir problem halini aldığı bazı verilerden anlaşılmaktadır. Örneğin Danimarka'da yapılan bir çalışmada, 1914 yılına kadar giden bir tarih skalasında, II. Dünya Savaşı'ndan önce düşük seviyelerde kirlilik saptanırken, sonrasında ciddi bir artış gözlenmiştir (Vikelsoe et al., 2002; Forsgren'den, 2015). Antarktika'da bulunan Admiralty Körfezi'nde yapılan bir çalışmada ise mevcut PAH miktarlarının son 30 yılın en yüksek konsantrasyonlarına ulaştığı gözlenmiştir. Doğal olarak bu veriler, Güney Amerika'da artan sanayi aktivitelerin ve bölgede bulunan fazla araştırma istasyonlarından kaynaklandığını akla getirmektedir (Martins et al. 2010; Forsgren'den, 2015).

Endüstriyel atık sular, normal evsel atık sulara oranlar göreceli olarak daha yüksek konsantrasyonlarda rekalsitrant bileşikler içerirler. Bu bileşikler toksik, mutajenik, karsinojenik ya da östrojenik olabilmektedirler. Ayrıca biyota tarafından hücre ve doku içine biriktirilme durumları söz konusudur. Çevrede yüksek besinsel seviyelerde olduğunda hücre içerisindeki konsantrasyonları artmaktadır. Böyle atıksular çoğunlukla fizikokimyasal yöntemlerle yerinde arıtılarak yüzey sularına veya evsel atık su arıtım tesislerine deşarj edilmektedir (Bitton, 2005).

Çok hücreli canlılardan balıklar ve yumuşakçalar üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalarla ksenobiyotiklerden önemli bir grup olan PAH'ların bünyesel birikimi incelenmiştir (EFSA, 2008). Geleneksel görüşe göre PAH'lar karasal ve sucul

bitkilerde, balıklarda ve invertebratlarda da birikmektedir. Ancak, birçok hayvanın ise PAH'ları metabolize etme ve elimine etme yetenekleri vardır. Biyokonsantrasyon faktörler – dokudaki konsantrasyonun ortamdaki konsantrasyon ile kıyaslanması – balıklarda ve kabuklu su canlılarında 10 ile 1000 kat daha fazladır. Yüksek yapılı canlılardaki PAH biyokonsantrasyon çalışmaları çok fazla yoktur. Aslında, geleneksel görüş özellikle ihtiyaç görüp bu konuyu dikkate almamaktadır. Kanada'da Ağustos 2014 tarihinde karabatak yavruları üzerinde yapılan bir çalışmada PAH'larla ilişkili bir takım mutasyonlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar rahatsız edicidir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Forsgren, 2015).

Mikroorganizmalar biyojeokimyasal döngülerde roller üstlenmektedirler. Özellikle karbon döngüsüde rolleri çeşitli ve önemlidir. Doğal ya da antropojenik olarak üretilen substratları çoğunlukla CO_2, H_2O ya da CH_4'e dönüştürürler. Mikroorganizmaların tüm doğal organik bileşikleri parçalayabildikleri düşünülmektedir. Parçalanmaya karşı oldukça dirençli olan humik maddeler ve lignin bileşikleri de buna dahil edilmektedir (Bitton, 2005).

Biyoiyileştirme teknolojilerindeki uygulamalar için hidrokarbonoklastik konsorsiyumun kullanışlı olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, son yapılan çalışmalardan birinde bir endüstriyel atıksu arıtım tesisinden izole edilen konsorsiyumun aklimasyonu ile yapılan biyoçoğaltım değerlendirilmiştir. Doğal çevrelerde hidrokarbonları parçalayan mikroorganizmaların alışkanlıklarını etkileyecek çeşitli faktörler ile in situ performanslar değerlendirilmiştir (Gargouri et al, 2013).

Biyotransformasyon ise organik bileşiklerin mikroorganizmalar ve/veya mikrobiyal konsorsiyumlar tarafından dönüştürülmesi işlemidir. Bir ksenobiyotik bileşiğin biyotransformasyonu mineralizasyon, akümülasyon ya da polimerizasyon şeklinde olmaktadır (Bollag, 1979; Hardman, 1987; Bitton'dan, 2005). Mineralizasyon organik bileşiklerin halojen asit tuzuna (klor, brom vs.), CO_2 ve/veya CH_4'e dönüşümü olarak ifade edilir (Rochkind-Dubinsky et al., 1987; Bitton'dan, 2005).

Atıksu arıtım tesislerinde organik kirleticilerin kaderi ile ilgili iki durum söz konusudur: 1- Atıksu arıtım tesislerinde organik kirleticilerin biyoparçalanması. Bu işlemde organik kirleticinin CO_2'ye kadar parçalanması ya da en azından daha az toksik bir bileşiğe dönüştürülmesi arzu edilir. 2- Ksenobiyotiklerin atıksu mikroorganizmalarına toksisiteleri. Biyojenik organik bileşiklerin gideriminde sonraki indirgenme olabilir (daha düşük BOİ indirgenmesi) ya da nitrifikasyonun inhibisyonu (Boethling, 1984; Bitton'dan, 2005) ve metan üretimi (Fedorak and Hrudey, 1984; Bitton'dan, 2005).

Hidrofobik organik bileşikler genellikle atıksu arıtımıyla etkili bir şekilde giderilmektedirler (Paxeus et al., 1992; Bitton'dan, 2005). Biyolojik atıksu arıtımı yoluyla organik bileşiklerin giderimi temel olarak atık kompozisyonuna, arıtım tipine ve katı alıkonma süresine bağlıdır. Geleneksel aerobik biyolojik arıtım ile çözünmüş organik karbonun % 85'e yakını giderilmektedir (Bitton, 2005). Biyolojik olarak arıtılmış olan atıksudaki karbohidratlar ve proteinler gibi kolay parçalanabilen bileşikler çözünmüş organik karbonun yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır (Giger and Roberts, 1978; Manka et al., 1974; Bitton'dan, 2005). Aktif çamur ve damlatma filtre prosesleri kullanılarak birçok organik toksik bileşiğin giderimi araştırılmıştır (Hannah et al., 1986; 1988; Bitton'dan, 2005).

Kentsel atıksularda evsel, endüstriyel, ticari kuruluşlar, okullar, üniversiteler, hastaneler ve şehir yağmur sularından kaynaklanan ksenobiyotik özellikte birçok organik bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler fenoller, alifatik, polisiklik ve klorinlenmiş aromatik hidrokarbonlar, fitalatlar, fosfat esterleri, eterler, terpenler, steroller, aldehidler, asitler ve onların esterleri gibi farklı birçok kategoride toplanırlar (Bitton, 2005).

Literatürde atıksu arıtım tesislerinde toksik kirleticilerin biyolojik yollarla parçalanabilirliği üzerine çokça veri olmasının yanında, bu işi yapan mikroorganizmaların tanılanması yapılmaktadır. Bir çok araştırmacı çeşitli sınıflardaki organik maddeyi kısmi yada tamamen parçalama yeteneğinde olan mikroorganizmaları ya da mikrobiyal konsorsiyum üyelerini izole ederek tanılamışlardır. Güncel olan konu ise biyoparçalamanın genetik mekanizmasının

anlaşılmasıdır. Özellikle ksenobiyotiklerin biyoparçalanma işinde görev alan katabolik plazmidlerin çalışılması günümüzde oldukça popülerdir (Bitton, 2005).

Biyoiyileştirme teknolojisindeki nihai hedef ise tehlikeli atık bölgelerinin biyoiyileştirilmesi için kullanılacak olan mikrobiyal suşların oluşturulmasıdır. Birçok sebepten dolayı çoğu halojenlenmiş ksenobiyotikler mikrobiyal parçalanmaya karşı oldukça dirençlidir. (Bitton, 2005).

Kimyasal maddelerin biyolojik parçalanmaya dirençlilikleri şu etmenlerin bir sonucu olarak oluşmaktadır (Alexander, 1985; Anderson, 1989; Hanstveit et al., 1988; Bitton'dan, 2005): 1- Moleküler yapı (örneğin klor ve diğer halojenlerle yer değiştirme), 2- Uygun permeazların yokluğuna bağlı olarak bileşiğin hücre içine giriş yapamaması, 3- Kimyasal bileşiğin çözünmemesi ya da adsobsiyonunundan kaynaklanan uygunsuzluğu mikrobiyal parçalama için erişilemez yapabilir, 4- Uygun elektron alıcısının olmaması, 5- Sıcaklık, ışık, pH, O_2, nem, ya da redoks potansiyeli gibi istenmeyen çevresel faktörler, 6- Azot ve fosfor gibi mikroorganizmaların büyümeleri için gerekli olan bazı besinsel faktörlere erişilememesi, 7- Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyoparçalanma potansiyeli parçalanacak bileşiğin toksisitesi ile etkilenebilir. Bileşiklerin detoksifiye edilmesi için birçok yol vardır (katabolik plazmidler gibi). Biyoparçalamanın bir sonucu olarak üretilen bazı metabolitler esas bileşikten daha toksik olabilmektedirler, 8- Düşük substrat konsantrasyonu aynı zamanda mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyoparçalanmayı etkileyebilir. Çok düşük substrat konsantrasyonunda büyüyen organizmalar substratlar için yüksek afiniteye sahiplerdir (çok düşük yarı doygunluk sabiti Ks) (Bitton, 2005).

Toksik kirleticilerin biyoparçalanmasına yönelik uygun bilgilerin fazla olması ve mikroorganizmaların zenginleştirilmiş inokulumlarının kullanılması yoluyla kirli alanların iyileştirilmesine yönelik ilgi gittikçe artmaktadır. Bu işlem yıllardır atıksuların, tarım alanlarının ve ormanların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Singh et al., 2015).

Çevredeki bazı mikroorganizmalar eşik bir konsantrasyon seviyesi altında bulunan organik substratları asimile edemeyebilir ve büyüyemeyebilir. Çoğu

biyoparçalama çalışmaları yüksek substrat konsantrasyonları kullanılarak yapılmaktadır. Çevresel konsantrasyonlar olarak gerçekçi bir yaklaşım olmamaktadır çünkü substratlar laboratuvar şartları altında çalışılan konsantrasyonların aksine gerçekte daha düşük konsantrasyonlarda (ppm ya da ppb seviyesinde) bulunmaktadır (Alexander, 1985; Bitton'dan, 2005). Birçok bakterinin laboratuvar şartları altında çeşitli aromatik hidrokarbonları parçalamaktadırlar ancak, bu bakterilerin birçoğu gerçek şartların olduğu alan çalışmalarında başarısız olmaktadırlar. Başarısız olmalarındaki nedenler, suboptimal büyüme koşulları, iyi adapte olmuş yerel mikroorganizmalarla yarışma durumu ve çevresel faktörlere bağlı olarak mevcut katabolik genlerin baskılanması şeklinde sıralanabilir (Govantes et al 2009; Singh et al.'dan, 2015).

Substrat konsantrasyonu temelinde mikroorganizmalar iki kategoriye ayrılırlar: 1- yüksek substrat konsantrasyonlarında hızlıca büyüyen kopiyotroflar ve 2- düşük konsantrasyonlarda yavaş büyüyen oligotroflar. Oligotroflar substratlara yüksek afinite sergilerler (düşük Ks). Bu sayede düşük substrat konsantrasyonlarında yavaş ancak etkili şekilde büyürler. Mikroorganizmalar düşük konsantrasyonlardaki nütrientlere morfolojik açıdan adapte olarak tepki verirler. Bu adaptasyon hücrelere yüksek yüzey – hacim oranları sağlar (Bitton, 2005).

Genelde aktif çamur prosesinin birçok öncelikli kirleticinin konsantrasyonlarının düşürülmesinde ve diğer ksenobiyotiklerin konsantrasyonlarının belirlenen limitlerin altına düşürülmesinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Grady, 1986; Bitton'dan, 2005). Genelde aktif çamur prosesi uçucu ve yarı uçucu organik kirleticilerin gideriminde en iyi sonuçları vermektedir. Aktif çamur ve damlatma filtre prosesleri kullanılarak yapılan uçucu organik kirletici giderimi %91'in üzerinde olduğu saptanmıştır. Ancak, yarı uçucu bileşiklerin giderim yüzdeleri damlatma filtre prosesi ile %41 – 91 arasında değişkenlik gösterirken, aktif çamur sisteminde %57 – 96 arasında olmaktadır (naftalen %95, fenantren %93, piren %91, fluoranten %92) (Hannah et al., 1988; Bitton'dan, 2005).

Uçucu aromatiklerin çevrede kalma süreleri kısa olduğu için özellikle alkanlar ve polisiklik aromatiklerin biyoçoğaltımı ile ilgili olarak dünyada pek çok başarılı çalışmalar yapılmıştır. Selvaratnam et al. 1997'de fenolu katekole dönüştüren *P. putida* ATCC 11172 strainini aktif çamur biyoremediasyonunda kullanmışlardır. Bu çalışmada, 41 gün sonra mikroorganizma ile güçlendirilmemiş çamurda % 40 fenol giderimi olurken P. putida ilave edilmiş çamurda %95 - %100 oranında fenol giderimi olduğu gözlenmiştir. Nüblein ve ark. 1992'de yaptıkları çalışmada genetik olarak modifiye edilen Pseudomonas suşları kullanılarak – kloro benzoat ve 4 – metil benzoat parçalanması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu suşların ilave edildiği çamurda 3 gün sonra bu bileşikler 1mM konsantrasyonunda saptanırken inokule edilmeyen çamurda 4mM saptandığı belirtilmiştir (Boon et al., 2003).

Genel hidrokarbon ve özellikle PAH biyoparçalanma kontrolü ile ilgili birçok eğilim varsa da, çoklu çevreler ve çoklu zorlayıcı faktörlerin etkisini tanımlayan kapsamlı bir çalışma mevcut değildir. Mikroorganizmaların karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına uygun karbonlu bileşiklerden ziyade, genellikle PAH'lar istisna olarak değerlendirilmektedir (Boyd et al., 2008).

Çalışmalardan elde edilen deneyimlerden yararlanılarak, hidrokarbonların, özellikle poliaromatik yapıda olanların yüksek hidrofobik karakterde olması, organik çözgenler ile homojen hale getirilen bu hidrokarbonların belirli süreler sonunda tekrar kristal yapıya dönüşmeleri, bu kristallerden bakterilerin maksimum fayda sağlamalarını kısıtlamakta ve analitik veriler açısından her zaman sabit ve sağlıklı sonuçlar verememekte oldukları söylenebilir. Buna bağlı olarak, hidrofobik karakterdeki bu hidrokarbonları içeren sıvı besiyerinden bakteri izolasyonunun zorluk ve belirsizlikleri, çalışamaların diğer basamaklarını önemli ölçüde etkilemiştir. Bu sebepten dolayı, kimyasal karakteristiklere bağlı uygun izolasyon ortamlarının geliştirilmesi, ilk aşamada uygun ve etkin bir bakteri izolasyonunun sağlanmış olması için önemlidir. Yapılan izolasyon çalışmalarından elde edilen bakterilerin seçilen referans hidrokarbonları parçalayabilme yeteneklerinin analitik olarak belirlenmesi hedeflenen hidrokarbon biyoiyileştirmesinin temel amacını teşkil etmektedir. Bu noktada, aktivitesi en yüksek olan bakteriyel kültürlerin

belirlenmesi ve ileri parçalama çalışmalarına bu kültürler ile devam edilmesi önem kazanmıştır.

Literatürde aktif çamur sistemlerine giriş yapan fenolik bileşikler, benzoatlar ve ilişkili bileşikler, hidrokarbonlar ve sürfaktanlar, pestisitler (DDT, Linurin, 2, 4 – D, 2, 4, 5 – T, Parathion gibi) olarak sınıflandırılan bazı ksenobiyotik bileşiklerin biyoparçalanmasından sorumlu bazı mikroorganizmalar verilmiştir (Bitton, 2005). Bunlar; *Achromobacter, Alcaligenes, Acinetobacter, Arthrobacter, Azotobacter, Bacillus spp., Bacillus cereus, B. sphaericus, Candida sp., Candida tropicalis, Citrobacter, Cladosporium, Clostridium resinae, Corynebacterium, Debaromyces subglobosus, Escherichia coli, Flavobacterium, Micrococcus, Moraxella, Mycobacterium, Nocardia, Trichosporon cutaneoum, Pseudomonas sp., Pseudomonas spp., P. aeruginosa, P. cepacia, P. fluorescens, P. putida, P. stutzeri*, olarak sıralanabilir.

Tez çalışması kapsamında petrokimya endüstrisi aktif çamur sisteminden tek karbon ve enerji kaynağı olarak seçilen hidrokarbonların kullanılması ile elde edilen izolatlar; *Acinetobacter sp., Aeromonas media, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormiae, Burkholderia cepacia, Chryseobacterium sp, Pseudomonas sp., Pseudomonas fluorescens, Raoultella planticola*'dır. Bakıldığında *Burkholderia cepacia, Chryseobacterium sp* ve *Raoultella planticola* mikroorganizmalarının yeni olduğu ve listeye ilave edilebileceği söylenebilir.

Ayrıca, Seo et al. 2009 yılında yayınladıkları kapsamlı bir derleme çalışmasında birçok PAH molekülünü parçalama yeteneğindeki mikroorganizmaları liste halinde göstermişlerdir. Listede tez çalışması kapsamında elde edilen izolatların hemen hepsi farklı PAH bileşiklerine özgü parçalayıcı olarak belirtilmiştir. Ancak, listede sadece *Raoultella planticola* bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen *Raoultella planticola* biyoçoğaltım için oluşturulan konsorsiyuma özgünlük katmaktadır.

Bakıldığında biyoparçalama teknolojisine katkı sağlamak amacıyla yapılan çalışmaların çoğu tek tip mikroorganizma ile yapılmaktadır. Konsorsiyum çalışmaları ve buna bağlı olarak kometabolik ilişkiler hala açık olmadığı söylenmektedir. Ancak, atıksuda kometabolizmanın varlığı ile ilgili bazı kanıtlar vardır (Jacobson et al., 1980; Bitton'dan, 2005). 14C işaretli herbisitlerin metabolik ürünleri uzun süreli inkübasyon sonunda steril olmayan birincil çamur çıkışında gözlenmiştir. Ancak karbonlu bileşikler atıksu mikroorganizmalarının metabolizmalarına katılmadıkları ve bu bileşikler mikroorganizmalar için karbon kaynağı olarak iş görmedikleri gösterilmiştir (Bitton, 2005).

Ksenobiyotiklerin parçalanması için oluşturulan kometabolizmada, bir organik bileşik metabolik ürünlere dönüştürülür fakat mikroorganizmalar için bir karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmez (Alexander, 1981; 1985; Bitton'dan, 2005). Organizmalar enerji ve karbon ihtiyaçlarını birincil substartlardan sağlarlar. Ancak, bu iş için kullanılan substratlar ksenobiyotikler değildir. Kometabolizmada ksenobiyotikler ikincil substratlar olarak iş görürler. Kometabolizma ile ilişkili reaksiyonlar dehalojenasyon, hidroksil grupların eklenmesi, halka açılımı ya da metil gruplarının oksidasyonları şeklinde gerçekleşmektedir (Rittmann et al., 1988; Bitton'dan, 2005).

Kometabolizma insektisitler, herbisitler, sürfaktanlar, alifatikler ve aromatik hidrokarbonlar ve diğer endüstriyel kimyasallar gibi geniş bir bileşik skalası için saf kültür ve karışık kültürlerde gösterilmiştir. Buna bağlı olarak kometabolizmanın doğada gerçekleştiği önerilmiştir (Alexander, 1979; Horvath, 1972; Bitton'dan, 2005).

Doğal çevrelerde yerli mikroorganizmaların biyoparçalama becerilerini arttırmak amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde kullanılan maddelerin esas amacı, ortamda var olan kimyasal maddelerin çözünürlüğünü arttırmaktır. Bu yöntemlerden biri, toprakta parçalanmayı arttırmak için siklodekstrinler ve inorganik besinlerin eklenmesi gibi toprak destek maddelerinin kullanılmasıdır. Siklodekstrinler topraktaki kirleticilerin çözünürlüğünü arttırmakta ve kirletici geri salınımını arttırmaktadır (Allan et al. 2007; Singh et al.'dan, 2015). Sürfaktanlar ya da yüzey aktif maddeler de kirlenmiş toprağın iyileştirilmesinde

çözücü maddeler olarak kullanılmaktadırlar (Lee et al. 2002; Singh et al.'dan, 2015).

Biyoiyileştirmede biyosürfaktanların kullanımı, onların biyoparçalanabilirlikleri, düşük toksisiteleri, biyoparçalamayı güçlendirmedeki etkileri, düşük çözünürlüklü bileşikleri çözebilirlikleri açısından umut vaadetmektedirler. Biyosürfaktan üreten *P. aeruginosa* suş 64 kirli toprağın biyoiyileştirilmesini güçlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Toprağa eklenen mikroorganizmanın PAH'ları parçalamadığı ancak, ortama salgıladığı ramnolipidler ile PAH'ların diğer organizmalar tarafından parçalanabilirliğini arttırdığı görülmüştür (Mullgan 2005). Diğer bir yaklaşım ise seçimli olarak hedef karbonlu bileşiği kullanan yeni mikroorganizmaların uygulanması olabilir. Örneğin *P. putida* CSV86 glukoz ve organik asitler yerine tercihen aromatik bileşikleri kullanmaktadırlar (Basu et. al. 2006; Basu and Phale 2008; Singh et al.'dan, 2015).

Benzer şekilde, Sponza ve Gök 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada SKTR içinde 15 farklı PAH giderimi için 15mg/L civarında ramnolipid kullanımının PAH parçalanmasında gözle görülür bir etki yarattığını göstermişlerdir.

İmmobilize enzimlerle kirli alanların biyoiyileştirilmesi, kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması için alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli mikroorganizmalardan hücre dışı olarak salgılanan bu enzimler toksik bileşikleri daha az toksik formlara dönüştürmektedir. Bu yaklaşımda, enzimler katı bir taşıyıcı üzerine immobilize edilir. Örneğin, enzim immobilizasyonu ile yapılmış olan bir çalışmada, bitki polifenol oksidazları kullanılarak tekstil ve tekstil dışı boyaların dekolorizasyonunda ve gideriminde başarı sağlanmıştır (Khan and Husain 2007; Singh et al.'dan, 2015). Organofosfat parçalayan enzim A (OpdA) yüksek oranda porözlü yapıda olan fibriler polyester ürünler üzerine kovalent olarak bağlanmış ve organofosfat pestisid parçalanmasında kullanılmıştır (Gao et al. 2014; Singh et al.'dan, 2015). Bu şekilde geniş skalada aromatiklerin parçalanmasında iş gören enzimler taşıyıcı bir matriks üzerine immobilize edilebilir ve bahsedilen uygulamalara benzer yaklaşımlarla yoğun olarak kirlenmiş olan alanların temizlenmesinde kullanılabilir.

Her ne kadar hidrokarbon biyoparçalanmasının teşvik edilmesi için ortama ilave besin eklenmesi gerektiği söylense de alan çalışmalarında bu durumun sorun oluşturduğu görülmüştür. Yapılan bir araştırmada besin ile zenginleştirilmiş alanlarda fenol gideriminin olmadığı saptanırken (Paris and Rogers, 1986; Boyd et al.'dan, 2008) başka bir çalışmada ise besin takviyesinin nitrofenol giderimi için aklimasyon süresini azalttığı görülmüştür (Jones and Alexander, 1988; Boyd et al.'dan, 2008). Aklimasyon sadece substratlara değil aynı zamanda arttırılmış besin konsantrasyonlarına karşı da olabilir ki, bu durum mikrobiyal toplulukların biraraya gelme durumlarında değişikliğe sebep olabilecek önemli bir etki göstermekte ve parçalayıcı mikroorganizmaların toplam popülasyon içindeki yüzdelerini belirgin şekilde ön plana çıkmasını teşvikleyecek nitelikte olabilmektedir. Besin ekleyerek organik kirleticilerin parçalanmasını teşvik etmek için araştırıcılar mevcut çevreyi değiştirerek diğer organik maddelerin parçalanması için ortam oluşabildiğini göstermişlerdir, ancak bu durumda istenilen organik kirleticinin parçalanmadığını görmüşlerdir (Steffensen and Alexander, 1995; Boyd et al.'dan, 2008). Bu olgu, atmosferik oksijenin anaerobik yeraltı suları ile birleşecek şekilde tasarlanan ve tamamen tüm bakteriyel üretimin büyük oranda teşviklendiği bir yeraltı suyu sirkülasyon sisteminde petrol ile kirlenmiş yeraltı suyunda gözlenmiştir. Fakat, anaerobik ortamda benzen ve tolüen kullanımı neredeyse bertaraf olmuştur (Boyd et al., 2001; Boyd et al.'dan, 2008).

Biyoparçalanmanın teşvik edilmesi açısından, mikrobiyal katabolik aktiviteyi güçlendirmek için kirlenmiş olan alanları besinlerle iyileştirme yoluna gitmek için çok çaba sarfedilmiştir ancak, kesin ve net bilgi sağlayan çalışmalar azdır (Venosa et al., 1996; Macnaughton et al., 1999; Venosa et al., 2002; Röling et al., 2004; Jiménez et al., 2006; Boyd et al.'dan, 2008). Ham petrol biyoparçalanması besin ilaveleri ile teşvik edilmiş gibi görünmesine karşın (Venosa et al. 1996, Wrenn et al. 1997; Boyd et al.'dan, 2008), PAH ve aromatik bileşiklerin parçalanması oldukça az gibi görünmektedir (Garcia – Blanco et al., 2007). Yapılan bir çalışmada ise biyoparçalanma kinetiklerinde değişiklik olmayabilirken, gübre ilavesi mikrobiyal kompozisyonda değişikliğe sebep olduğu görülmüştür (Ogino et al., 2001; Boyd et al.'dan, 2008). Bu durum spesifik organik kirletici parçalanması için kommünite kompozisyondaki değişimin önemli bir prekursör olabileceğini göstermektedir (Boyd et al., 2008).

Besin ilavesi teşvik edilmiş kirletici biyoparçalanmasında sınırlı etki göstermesi yanında, spesifik hidrokarbon parçalayıcı bakterilerin ortama eklenmesi yani biyoçoğaltım (biyoaugmentasyon) daha çok problem oluşturmaktadır. Birçok kısım için, sonradan eklenen mikroorganizmalar ile *in situ* mikrobiyal konsorsiyum genellikle başarılı olmaktadır (Chapelle, 1999; Boyd et al.'dan, 2008). Yukarıda da bahsedildiği gibi, organik kirleticilerle yüklenen çevrelerdeki mikrobiyal biraraya getirme işleminde parçalayıcı bakteriler daha aktif komponentler halini almaktadır. Ancak, parçalayıcı bakterilerin sayısal artışı ya da toplam bakteriyel artış ile güçlendirilmiş kirletici kullanımı arasında bir bağlantı kurmak güçtür (Hickman and Novak, 1989; Boyd et al.'dan, 2008). Genellikle, özgün mikroorganizma suşları ile yapılan biyoçoğaltım klorlu çözgen biyoiyileştirilmesinde umut vadetmektedir (Ellis et al. 2000, Morrill et al. 2005, Da Silva et al. 2006; Boyd et al.'dan, 2008). Mikrokozmos ve tasarlanmış iyileştirme sistemlerinde bazı başarılar elde edilmiştir (Jouanneau et al., 2005; Yu et al., 2005; Trably et al., 2003; Domde et al., 2007; Boyd et al.'dan, 2008). Biyoçoğaltımdan sonra kirlenmiş çevrelerde eklenmiş olan mikroorganizmalar saptanmasına rağmen (Mishra et al., 2001; Boyd et al.'dan, 2008), PAH biyoiyileştirilmesi için yapılan in situ biyoçoğaltım oldukça etkisiz bir arıtım gibi görünmektedir (Johnsen et al. 2007; Boyd et al.'dan, 2008).

Nehir ağzı çalışmalarında elde edilen veriler ışığında, yukarıda belirtilen başarısızlığın genel sebeplerinden biri olarak toprak hidrokarbon kütleleri ve sucul sedimentlerinin moleküler oksijenin bir noktada kullanılma durumudur ki bu nokta kirleticilerin anaerobik zonlarda birikme eğiliminde olduğu yerlerdir. Örneğin yeraltı sularında, kirleticilerin esas yayılımı toksik ve kirletici yoğunluğunun düşük olduğu yerlerden ziyade anaerobik ve kirleticilerin yoğun olduğu yerler olabilir. Sedimentlerde ise, bu yerler genellikle organik karbon kullanımının oksijen difüzyonunu aştığı bazı derinliklerin altında oluşur. Anaerobik PAH giderimi sülfat (Coates et al., 1996; Coates et al., 1997; Boyd et al.'dan, 2008) ve nitrat indirgenmesinin olduğu yerlerde (McNally et al. 1998; Boyd et al.'dan, 2008) olmasına rağmen, genel görüş doğal koşullar altında anaerobik parçalanmanın aşırı yavaş olduğudur (Quantin et al. 2005; Boyd et al.'dan, 2008). Nehir ağızlarında ve su sistemlerinde gerçekleşen PAH biyoparçalanmasının devamı için ana faktör çözünmüş oksijen olarak göze çarpmaktadır (Bauer and Capone, 1985; Brubaker and Stroo, 1992; Montgomery et al., 2002; Boyd et al., 2005; Boyd et al.'dan, 2008).

Boon et al. (2003) yaptığı bir çalışmada aktif çamur bünyesinde bulunan mevcut mikrobiyal yapıyı 3 – kloroanilin şok yüklemesine karşı korumak amacıyla bir araç olarak biyoçoğaltım prosesini kullanmışlardır. Denemelerinde nitrifikasyon, karbon uzaklaştırılması gibi fonksiyonlardaki değişiklikleri çamurdaki mikrobiyal kommunite yapısı ile ilişkili olarak incelemişler ve bu amaçla yapısal incelemeleri Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), Real time PCR ve Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırıcılar, bakteri inokulasyonu yapılan tesiste şok yükleme yapıldığı zamanlarda organizmalar tarafından 3 – kloroanilinin mineralizasyonunun yapıldığını ve hızlı bir nitrifikasyon dönüşümü olduğunu saptamışlardır (Boon et al., 2003).

2009 yılında geliştirilen bir bakteri karışımının hidrokarbon içeren petrokimya atıksuyuna uygulanmasıyla biyoçoğaltım gerçekleştirmiş ve uygulama yapılan aktif çamur tesisinde 20 gün sonra %84,2 oranında KOİ giderimi sağlanırken; biyoçoğaltım uygulanmamış aktif çamur tesisinin KOİ gideriminin %74,4 oranında kaldığı saptanmıştır (Ma et al., 2009).

Biyoçoğaltım ile yapılan çalışmalarda hem mevcut mikroorganizmalar hem de biyoçoğaltılmış suşlarla bir arada biyoparçalanmanın güçlendiği görülmüştür (Gargouri et al., 2012; Mancera – Lopez et al., 2008; Gargouri'den, 2015). Giderim veriminin bu denli artışının kirleticilere maruz kalmış olan SKTR içindeki mikrobiyal konsorsiyumdan kaynaklandığı belirtilmektedir (Gargouri, 2015).

Mikroorganizmaların yüzeye tutulması damlatma filtreleri, su dağıtım boruları ve suda kullanılan materyaller gibi çeşitli çevrelerde biyofilm oluşmasına neden olur. Kalıntı organik bileşikler fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemlerle su ve atıksulardan uzaklaştırılabilir. Fixed-film ya da biyofilm prosesleri su ve atıksulardan kalıntı organik bileşiklerin biyolojik olarak giderilmesi için basit ve ucuz yöntemler olarak değerlendirilebilir (Namkung et al., 1983; Rittmann and McCarty, 1980a,b; Williamson and McCarty, 1976; Bitton'dan, 2005).

Biyoiyileştirmeyi etkileyebilecek diğer önemli bir unsur ise, mikroorganizmaların kimyasal maddeye karşı stres cevaplarıdır. Stres cevapları

biyoiyileştirmede adaptasyonu sürecini hem kısaltabilir hem de arttırabilir. Stres yanıtları mevcut kimyasalın mikroorganizmalara karşı toksisiteleri, molekül yapıları ve karbon ve enerji kaynağı olarak hızlı veya zor kullanılabilir olma durumlarına göre değişiklik gösterebilir. Örneğin, eşik konsantrasyonun üzerine çıkılırsa mikroorganizma popülasyonunu stres cevabı hayatta kalma yönümde olacağından, biyoparçalamanın sğresi uzarken, kalitesi azalabilmektedir. Böyle bir durumda etkin bir biyoiyileştirmeden söz edilemeyebilir. Substrata bağlı faktörler dışında, O_2, nem, pH, sıcaklık gibi fiziksel ve kimyasal etkenler de mikroorganizmaların direk ya da dolaylı yoldan stres cevaplarını etkilemektedir.

Mikrobiyal hücrelerin toksik maddelere maruz kalması stres proteinlerinin indüklenmesine neden olur. Bu proteinlerden bazıları ısı şok ve açlık proteinleri ile çakışmakta oldukları poliakrilamid jel elektroforezi ile gözlenmiştir (Neidhardt et al., 1984; Matin et al., 1989; Bitton'dan, 2005). Ancak diğerler stres proteinleri spesifik inorganik ve organik toksikantlara cevap olarak üretilirler (Blom et al., 1992; Bitton'dan, 2005).

Stres protein örnekleri toksik kimyasallara maruziyet indeksi olarak kullanılabilir. Isı şok proteinleri aynı zamanda toksik kimyasalları da içeren diğer çevresel stresler tarafından da indüklenebilir. Isı şok – biyolüminesen gen birleşimini içeren biyosensör özellikli bakteriyel suşlar ışık üretimine bağlı olarak ortamdaki kimyasal maddeleri varlığını belirlemede kullanılmaktadır. Bu biyosensörler göreceli olarak yalnızca yüksek kimyasal konsantrasyonlarına cevap vermektedir. Biyolüminesen indüklenmesi genellikle toksik kimyasalın yüksek seviyelerinde ışık üretiminin baskılanmasıyla devam eder. Bu yüzden, mevcut çevresel örneğin bir seri dilüsyonu test edilmelidir (van Dyk et al., 1994; Bitton'dan, 2005).

Atıksu mikroorganizmaları tarafından gerçekleştirilen organik maddelerin biyoparçalanma olgusu çeşitli etkenlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle klorlu bileşiklerin biyoparçalanması düşüktür. Atıksu mikrobiyal kommünitelerinin toksik kimyasallara maruz kalması sonucu ortamda dirençli mikroorganizmalar kalacak ve onların uygun enzim sistemleri ile ksenobiyotikler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılacaktır. Bu işlem

aklimasyon ve adaptasyon olarak adlandırılmaktadır. Çoğu organizma metabolizmanın aktifleşmesinden önce bir aklimasyon periyoduna ihtiyaç duymaktadır. Ksenobiyotiklere önceden maruz kalma durumu aklimasyon sürecini kısaltmaya yardımcı olmaktadır (Hallas and Heitkamp, 1995; Bitton'dan, 2005).

Sürekli karışımlı tank biyoreaktörlerinde (SKTR) uygun şartlar sağlanarak gerçekleştirilen biyoçoğaltım ve biyoiyileştirme işlemleri için ön aklimasyonun spesifik mikroorganizmaların çoğalması ve giderimin maksimum performansta olması için gereklidir. Bu sayede spesifik kirleticiler daha hızlı ve etkili şekilde parçalanmaktadır (Moscoso et al., 2012). Yapılan bir çalışmada hidrokarbonlara maruz kalan mikrobiyal kommünitelerde seçici zenginleştirme yoluyla hidrokarbonlara adaptasyon olduğu ve mikroorganizmaların genetik değişimlere maruz kaldıkları ve bunun sonucunda parçalama yapmayan bakterilere karşı hidrokarbon parçalayan bakterilerin oranında artış olduğu gözlenmiştir (Okerentugba and Ezeronye, 2003; Gargouri'den, 2015). Real time PCR verilerinden elde edilen sayısal sonuçlarda 55 gün boyunca biyoçoğaltımla elde edilen ve tanka eklenmiş olan hidrokarbon parçalayıcı bakteri türlerinde azalma gözlenmemesi bahsedilen çalışma verileri ile desteklenmektedir. 55 gün süren biyoparçalama işlemi süresince tank içi AKM ortalama değeri 3188 mg/L olarak ölçülmüştür. Çıkış AKM ortalama değerleri 219 mg/L olarak ölçülmüştür. Tank içi KOİ ortalama değeri 285 mg/L olarak ölçülmüştür. Tank içi ÇHİ ortalama değeri ise 118 ml/g olarak ölçülmüştür. Verilere bakıldığında ortalama ÇHİ değerinin 118 ml/g olması çamur kalitesinin oldukça iyi olduğunu ancak ortalama AKM değerinin 3188 mg/L olması ise flok yapılarının normalden daha küçük olduğu fikrini vermektedir. KOİ değeri ise giriş suyundaki ortalama 1600 mg/L girişin 285 mg/L'ye düşmesiyle birlikte gerçek aerobik biyolojik aktif çamur sistemlerinde olması gereken ortalama değerler civarında seyretmesi aklime olan çamurun iyi olduğunu göstermektedir.

Hidrokarbonları parçalamak için önceden kirlenmiş alanlardan kültüre edilen yerli mikroorganizmaların kullanması bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım başlangıç lag fazını azaltma veya ortadan kaldırmada etkili olarak tüm işlem süresi boyunca optimize halde çalışılmasını sağlamaktadır (Gargouri, 2015).

Çalışmada elde edilen tüm mikroorganizma izolatları aynı mantık çerçevesiyle izole edilerek kullanılmıştır.

Ticari olarak plastikleştiriciler olarak kullanılmaktadır ve U.S EPA tarafından öncelikli temizlenmesi gereken kirleticiler listesinde yer alan fitalat esterleri aktif çamur mikroorganizmaları tarafından kolaylıkla parçalanırlar. Bileşiklerin moleküler ağırlıkları yükseldikçe biyolojik olarak parçalanabilirlikleri de azalmaktadır (O'Grady et al., 1985; Shugatt et al., 1984; Bitton'dan, 2005).

TFA için tank içine verilen ortalama 50 mg/L konsantrasyon 24. saat sonunda 18,3 mg/L'ye düşerken ilk 24 saat sonundaki konsantrasyon azalım oranı %63,4 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 21,8 mg/L iken çıkış suyu giderimi %56,4 olarak hesaplanmıştır. 55. gün sonunda tank içindeki TFA konsantrasyonu 7,9 mg/L'ye ölçülürken tank içi konsantrasyon azalım oranı %84,2'de kalmıştır. Aynı şekilde çıkış suyundaki TFA miktarı 8,8 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %82,3 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte TFA giderimi %84,2 civarında olmuştur.

Benzen, ksilen, tolüen, naftalen, antrasen, sitren, fenantren ve benzo(a)piren gibi bileşikler PAH gruplarını oluşturmaktadır. Bu kimyasallardan birçoğu ya da oksidasyon ürünleri karsinojenik olarak belirtilmektedir. Bu kimyasallar aerobik şartlar altında parçalanmaktadır (Crawford and O'Reilly, 1989). Bu koşullar altında benzen katekole dönüştürülür. Devamında ise CO_2 ve H_2O veren halka açılımı reaksiyonları takip eder (Gibson and Subramanian, 1988; Bitton'dan, 2005).

BTEX bileşiklerinin çoğunlukla konsorsiyum tarafından parçalanmasına rağmen, in situ şartlarda tek kültürlerin de bu bileşikleri parçalayabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, deniz suyundan izole edilen Janibacter suş SB2'nin kültürü zenginleştirilerek yapılan çalışmada, sulu çamurda bulunan BTEX bileşiklerini parçalayabildiği gözlenmiştir (Jin et al., 2013; Singh et al.'dan, 2015). Fitalatların biyoparçalanmasının gerçekleştirildiği tatlısu, atıksu, aktif çamur ve doldurulmuş alanlar gibi oldukça geniş skaladaki sistemlerde başarı sağlandığı bildirilmektedir (Liang et al. 2008; Singh et al.'dan, 2015). Doğal sistemlerde fitalatların parçalanması çoğunlukla sintrofi ile gerçekleşmektedir. Örneğin

Klebsiella oxytoca Sc ve *Methylobacterium mesophilicum* Sr adlı iki suşun ortak davranış sergileyerek işbirliği içinde fitalatları tamamen parçaladıkları gösterilmiştir (Gu et al. 2005; Singh et al.'dan, 2015). Başka bir çalışmada ise *Entorococcus sp.* suş OM1, *Bacillus benzoevorans* suş S4, *Sphingomonas sp.* suş O18 ve Coryneobacterium sp. suş DK4 olarak farklı bakteri kültürleriyle oluşturulmuş bir karışım ile aktif çamurda bulunan dört farklı fitalat molekülünün parçalandığı gözlenmiştir (Chang et al. 2004; ; Singh et al.'dan, 2015). Literatürde konsorsiyum bakterilerinin fitalatları parçaladığına dair veriler bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamında fitalat üyesi olan TFA gideriminde maksimum %84,2'lik değerle SKTR'de kullanılan aktif çamurun başarı sağladığı gözlenmiştir.

Fenantren PAH biyoparçalanması çalışmalarında en çok kullanılan kimyasallardan biridir. Fenantrenin biyoçoğaltımı zordur çünkü toprakta kaldıkça mikroorganizmaların kullanımı zorlaşmaktadır. Ama bakteriler ile yapılan tekrarlı inokülasyonlar ile toprakta bulunan fenantrenin mineralizasyonu sağlanmıştır (Schwarz and Scow 2001; Singh et al.'dan, 2015). *Sphingomonas paucimobilis* 200006FA toprak mikroçevresinde var olan fenantreni parçaladığı gösterilmiştir (Coppotelli et al. 2008; Singh et al.'dan, 2015). *Sphingobium yanoikuyae* ve *Mycobacterium parafortuitum* ile bataklıkta yapılan fenantren parçalanması çalışmalarında, bu iki bakterinin in situ olarak fenantren gideriminde başarısız olduklarını göstermiştir (Tam and Wong 2008; Singh et al.'dan, 2015).

Naftalen, antrasen ve fenantren gibi düşük moleküler ağırlıklı PAH'ların parçalanma durumları kapsamlı şekilde çalışılmıştır. Çok sayıda Gram negatif bakterinin (*Pseudomonas, Sphingomonas, Burkholderia* ve *Comamonas* gibi) bu hidrokarbonları kullanarak büyüdükleri bilinmektedir (Cerniglia, 1992; Kastner, 2000; Gallego Blanco'dan, 2012). Aynı zamanda enzimlerin ve ilgili genlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili bol miktarda çalışma mevcuttur (Menn et al., 1993; Sanseverino et al., 1993; Gallego Blanco'dan, 2012). Yine de, daha güncel çalışmalar nocardioform Gram pozitif organizmaların (Mycobacterium, Nocardia ve Rhodococcus türleri) üç ya da daha fazla halka yapısına sahip olan PAH'ları parçalayabilme yeteneğinde olduklarını belirtmiştir (Kanaly and Harayama, 2000; Kanaly and Harayama, 2010; Gallego Blanco'dan, 2012) Özellikle Gram pozitif bakterilerin hidrokarbon parçalama mekanizmaları ve

mevcut yolizleri hakkında bilgiler sınırlıdır. O nedenle bu gruptaki bakterilerin biyoparçalama etkinlikleriyle ilgili çalışılması gerekliliği vardır (Gallego Blanco, 2012).

Literatürde çoğunlukla tek tip mikroorganizmalarla yapılan biyoparçalama çalışmaları mevcuttur. SKTR ile yapılan konsorsiyum çalışmasına göre daha önce tanılanan izolatlarla birlikte aktif çamur prosesi ile elde edilen veriler; Asenaften için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 72. saat sonunda 4,87 mg/L'ye kadar düşerken ilk 72 saat sonundaki giderim oranı %75,7 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 0,74 mg/L iken çıkış suyu giderimi %96,3 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki asenaften konsantrasyonu 0,13 mg/L'ye gerilerken tank içi giderim oranı %99,4'e yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki asenaften miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte asenaften giderimi devamlı artarak %99,4 ve üstü olarak gerçekleşmiştir.

Fluoren için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 168. saat sonunda 15,4 mg/L'ye kadar düşerken ilk 168 saat sonundaki giderim oranı %23,2 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyunda 48. saat sonunda kalan fluoren konsantrasyonu 1 mg/L ölçülürken, çıkış suyu giderimi %95,2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte tank içinde kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki fluoren konsantrasyonu 1,81 mg/L'ye gerilerken tank içi giderim oranı %90,9'a yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki sadece üç gün boyunca sırasıyla 2,1 mg/L, 1,8 mg/L ve 3,3 mg/L konsantrasyonlarında olarak ölçülmüş, geri kalan süreçte kademeli olarak azalmıştır. 55 gün sonunda çıkış suyundaki fluoren miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte flouren giderimi devamlı artarak %90,9 ve üstü olarak gerçekleşmiştir.

Antrasen için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon her 48 saatte bir aynı konsantrasyonda ekleme yapılmasıyla birlikte artış göstermiştir. Tank içindeki antrasen ilk 21 günde toplam 89,1 mg/L'ye yükselirken, tank içerisinde

başlangıç konsantrasyonuna oranla 4 katlık bir birikme söz konusudur. Tank içerisinde nispeten anlamlı düşüşler 31. günden itibaren gözlenmiştir. Bu süreye kadar antrasen konsantrasyonlarında aşırı dalgalanmalar olduğu gözlenmiştir. 31. Gün yapılan HPLC analizlerinde tank içi antrasen konsantrasyonunun 44,6 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir. Bu süreçten itibaren tank için antrasen konsantrasyonu kademeli olarak düşse de 55. gün sonunda mevcut konsantrasyonun 27,2 mg/L'ye gerilediği ancak hala başlangıç konsantrasyonu olan 20 mg/L'nin altına düşmediği için giderim verimi hesaplaması yapılamamıştır. Ancak çıkış suyunda bulunan antrasen konsantrasyonu 48. saat sonunda 0,27 mg/L olarak ölçülürken giderim %98,7 olarak hesaplanmıştır. Süreç devamında çıkış suyundaki konsantrasyonu 5,43 mg/L'ye kadar artış göstermiştir. Bu noktada giderim %72,9'a kadar gerilemiştir. 55. gün sonunda çıkış suyunda saptanan antrasen konsantrasyonu 4,9 mg/L olarak ölçülmüştür. Çıkış suyu giderimi ise %75,4 olarak hesaplanmıştır.

Fluoranten için tank içine verilen ortalama 20 mg/L konsantrasyon 48. saat sonunda 12.5 mg/L'ye düşerken ilk 24 saat sonundaki giderim oranı %37,6 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde çıkış suyu değerleri ise kalan konsantrasyon 0,85 mg/L iken çıkış suyu giderimi %95,8 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ilerleyen süreçte kademeli olarak azalmış ve 55. gün sonunda tank içindeki fluoranten konsantrasyonu 0,12 mg/L'ye gerilerken tank içi giderim oranı %99,4'e yükselmiştir. Aynı şekilde çıkış suyundaki fluoranten miktarı 0 mg/L olarak ölçülürken, çıkış suyu giderim oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında 55 günlük süreçte fluoranten giderimi devamlı artarak %99,4 ve üstü olarak gerçekleşmiştir.

Piren için başlangıçta HPLC için belirli bir metod geliştirilememesinden dolayı rutin analizler için örnekleme yapılırken 50 ml steril falkon tüplerine aktif çamur örnekleri toplanarak – 80 °C'de saklanmıştır. 55 gün sonunda yapılan ve önceki bölümde belirtilen HPLC metodu kullanılarak önceden topalnmış olan örneklerden piren analizleri gerçekleştirilmiştir. Çıkış suyu örneklerinde pirene rastlanmazken, tank içi örneklerinde 21. günden itibaren olan anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Tank içinde 21. Gündeki piren konsantrasyonu 14,7 mg/L olarak ölçülürken, reaktör içi konsantrasyon azalımı %26,5 olarak hesaplanmıştır. 39.

Günden itibaren alınan örneklerde piren konsantrasyonu HPLC cihazının okuyabileceğinden az olduğu için 0 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu sayede giderim %100 olarak hesaplanmıştır.

SKTR kullanılarak yapılan bazı çalışma sonuçlarına bakılacak olursa; Sponza ve Gök 2010 yılında bu tez çalışmasında kullanılan aynı SKTR ile yaptıkları çalışmada, sürfaktanın PAH giderimine etkisini incelemişlerdir. Sürfaktan eklenmeyen SKTR içerisinde 25 gün içinde çıkış suyu verilerine göre asenaften, fluoren, antrasen, fluoranten ve piren için giderim yüzdeleri sırası ile %80, %59, %78, %69, ve %60 olarak verilmiştir. Başlangıç tank içine verilen PAH konsantrasyonu ise 65,36 ng/ml (0,06536 mg/L)'dir. Bu tez çalışmasında ise başlangıç PAH konsantrasyonları her bir PAH için 20mg/L, TFA için ise 50mg/L'dir. Ayrıca, çıkış suyu giderim yüzdelerinin ise piren hariç yine sırasıyla %100, %100, %100, %75,4 ve TFA için %82,3 olduğu göz önüne alınırsa, hem konsantrasyon hem de giderim verimleri açısından bu tez çalışmasında biyoçoğaltımı yapılan aktif çamurun SKTR'de çok daha iyi bir verimle iş gördüğü söylenebilir.

Yine aynı şekilde, yağ rafinerisi atıksu arıtım tesisinden alınarak toprak içerisine yapılan (50 gr toprak içerisine %0,07 w/w atıksu) biyoçoğaltım çalışmasında, 30 günde alkan parçalanmasının %24'ten %80'e, PAH parçalanmasının ise %49'dan %77'ye yükseldiği gösterilmiştir (Juteau et al., 2003). Bu aklimasyon ve biyoçoğaltım çalışması sonucunda elde edilen %77'lik giderim verimi yine bu tez çalışması ile elde edilen giderim verimlerinden düşüktür.

Batch reaktör ile yapılan bir başka çalışmada ise, oluşturulan hidrokarbonoklastik bir konsorsiyum ile 50 günlük süreçte toplam petrol hidrokarbon giderim veriminin %94 civarında olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda, yalnızca maya biyoçoğaltımı yapılan aynı çalışmada toplam petrol hidrokarbon giderim verimi %60 civarında olduğu belirtilmektedir (Gargouri, 2015). Bu çalışmaya istinaden yalnızca maya kullanımının giderimde sınırlı etki gösterdiği söylenebilir.

Bir diğer çalışmada ise, fenantren, piren ve benzo-a-piren parçalanması araştırılmıştır. Bunun için aklimasyonla seçilen Bacillus pumilis ve Staphylococcus warneri bakterileri ile seçilen PAH'ların 24 saat içerisinde %90 oranında parçalandıkları belirtilmektedir (Moscoso et al., 2012).

Kirlenmiş toprak örneklerinden toplam petrol hidrokarbonu giderimi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, SKTR ile mikrobiyal konsorsiyum oluşturularak 10^4 cfu/g olacak şekilde kirli toprağa eklenmiştir. 60 gün içerisinde topraktaki toplam petrol hidrokarbon giderimi %96 civarında gerçekleşirken, konsorsiyum yapılmadan çalışılan kontrol örneklerinde giderim %35 civarında kalmıştır. Eklenen mikroorganizma miktarlarını 30 gün sonunda 10^5 cfu/g civarında sabitlendiği gözlenmiştir. (Gargouri et al., 2014).

SKTR ile yapılan bir diğer çalışmada ise aklime edilmiş mikrobiyal konsorsiyum ile 225 günde toplam petrol hidrokarbon konsantrasyonunun 320mg/L'den 8mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. Burada oluşturulan mikrobiyal konsorsiyumda *Aeromonas punctata*, *Bacillus cereus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Stenotrophomas maltophilia*, *Rhodococcus sp*. ve *Achromobacter sp*. gibi farklı mikroorganizmalar kullanılmıştır (Gargouri et al., 2011).

Bakıldığı zaman literatürde farklı hedefler doğrultusunda çeşitli varyasyonlarla SKTR ile yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Burada mikrobiyal konsorsiyum kullanılmasının, aklimasyon ve biyoçoğaltım yapılmasının genel anlamda petrol hidrokarbonlarının gideriminde pozitif sonuçlar verdiği ve giderim verimlerini arttırdığı görülmektedir. Ancak Sponza ve Gök'ün kullandığı SKTR dışında yapılan SKTR çalışmalarının hemen hepsi kapalı sistem biyoreaktör çalışmalarıdır. Kapalı sistem biyoreaktör çalışmalarında sıcaklık, pH, oksijen gibi parametrelerin optimize edilmiş olması bir avantaj oluşturmasına rağmen, bu tez çalışmasında kullanılan açık sistem SKTR ile elde edilen giderim verimlerinin literatür çalışmalarındaki tüm verilerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, çalışmaya özgü seçilmiş mikroorganizmalarla oluşturulan mikrobiyal konsorsiyumun, yapılan aklimasyon ve biyoçoğaltımın seçilen PAH'ların ve TFA'nın gideriminde oldukça etkili ve çok daha fayda sağlar

olduğu görülebilmektedir. Literatür çalışmaları ile aradaki farkların açıkça belirgin olmasından dolayı bu tez çalışmasının özgünlüğü ortaya çıkmaktadır.

Kontrol tankı ile yapılan biyoparçalama çalışmasında, TFA dalgalanmasının ve antrasen birikiminin olduğu gözlenmiştir. TFA'nın 48. saatte tank içinde 28,6 mg/L olduğu ve 26 gün sonunda 21,8 mg/L'ye düştüğü görülmüştür. TFA için tank içi giderim yüzdesi 48. saatte %42,9 iken, 26. gün sonunda %56,3 olmuştur. Ancak süreç içerisinde tank içinde kademeli olarak TFA artışı ve hemen akabinde kısmen azalışlar gözlenmiştir. Özellikle denemenin devam ettiği 19. günde tank içi TFA konsantrasyonunun 58,9 mg/L'ye kadar yükseldiği ve devamındaki 48. Saatte 12 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir. Biyoçoğaltım tankındaki %77,3 ve %79,7'luk giderimlere karşın, kontrol tankında giderim %56,3 ve %57'de kalmıştır. Bu durumda biyoçoğaltımla yapılan giderimin daha başarılı olduğu söylenebilir.

Kontrol tankında tank içi verilerine bakıldığında antrasenin hiçbir şekilde parçalanmadan kaldığı görülmüş ve giderim oranları ise %0 olarak hesaplanmıştır. Çıkış suyu verilerinde ise 48. saat antrasen konsantrasyonu 0 mg/L olarak saptanırken, 16. günden itibaren 4 mg/L'nin üzerine çıkmıştır. Bu verilere göre giderim oranı 48. saatte %100 olarak görülürken, 26. gün sonunda %79'a gerilediği gözlenmiştir.

Kontrol tankı içinde asenaften gideriminin %99,2, fluoranten gideriminin %91,2, fluoren gideriminin %90,2 ve piren gideriminin ise % 51,8 oranında olduğu görülmüştür. Çıkış suyunda ise asenaften ve fluorantenin giderim oranları %97, floren %92 ve piren ise %87 olarak hesaplanmıştır.

Biyoçoğaltım yapılan SKTR'ye göre kontrol SKTR'de TFA'nın çok daha az giderildiği gözlenmiştir. Antrasen çıkış suyunda biyoçoğaltım SKTR ve kontrol SKTR'de aynı ölçüde giderilmiş görünmekle birlikte, çıkış flok içinde yüksek miktarlarda birikim yapmış olması bu kimyasalın parçalanmadan flok içerisinde absorbe halde kaldığını göstermektedir. Her ne kadar dalgalanmalar olmuş olsa da biyoçoğaltım SKTR'de 21. günden itibaren flok içi antrasen miktarının 89,1 mg/L'den 27,2 mg/L'ye gerilemiş olması antrasen giderimi açısından gecikmeli ancak iyi bir giderim olduğunun göstergesidir. Aynı koşullarda kontrol SKTR'de

antrasen konsantrasyonu 87,2 mg/L'den 32,2 mg/L'ye gerilemiştir. İki tank arasında birbirine yakın sonuçların çıktığı gözlenmiştir. Asenaften ve fluoranten giderimi kontrol ve biyoçoğaltım SKTR'lerinde aynı sonuçları vermiştir. Fluoren tank içinde aynı sonuçları verirken, çkış suyunda %8'lik bir giderim azalışı sergilemiştir. Piren ise biyoçoğaltım SKTR'de flok içi giderimde %100 giderim sağlarken, kontrol SKTR'de %51,8'de kalmıştır. Ancak biyoçoğaltım SKTR'de çıkış suyu verilerinin olmayışından dolayı kontrol SKTR'nin %87 giderim verimi tek başına değerlendirilmiştir.

Biyoçoğaltım yapılan SKTR ile kontrol SKTR çıkış suyu hidrokarbon değerleri ve giderim yüzdelerine bakıldığında, biyoçoğaltım yapılan SKTR'nin tüm hidrokarbonların giderimi açısından kontrol SKTR'ye göre çok daha başarılı olduğu görülmektedir. Özellikle TFA giderimindeki başarı açıktır. Bu nedenle biyoçoğaltım yapılan SKTR içindeki aşı kültürünün aromatik hidrokarbonların gideriminde başarı sağladığı söylenebilir.

TFA ve asenaftenin flok içi absorbsiyonunun olmadığı tank içi verileri ile doğrulanmaktadır. Bu nedenle, TFA ve asenaftenin tamamına yakını tank içinde parçalanmıştır denilebilir. Floren'in tank içindeki konsantrasyonlarının flok içindekilere göre daha fazla olmasına rağmen, 2. saatten itibaren tank içindeki absorbsiyonunun %50 daha az olduğu görülmektedir. Floranten'de ise tank içi ve flok içindeki konsantrasyonlarında bir faklılık gözlenmemiştir. Ancak yine floranten'de de flok içi absorbsiyonunun tank içi absorbsiyonuna göre %50 civarında daha fazla olduğu saptanmıştır. Antrasen ve piren'in flok içerisinde çok daha fazla birikme eğilimide olduğu görülmektedir. Her iki hidrokarbonun da flok içindeki 2. saat konsantrasyonları tank içi örneklerindeki 2. saat konsantrasyonundan 30 – 40 mg/L civarı daha fazladır.

Gram pozitif bakteriler içinde belki de model olabilecek ilk mikroorganizma pireni mineralize edebilen *Mycobacterium sp*. PYR-1' dir (sonradan *M. vanbaaleni* PYR-1 olarak isimlendirilmiştir). İzolat, düşük konsantrasyonlarda organik besinlere ihtiyaç duymasına rağmen pireni mineralize etme kabiliyetindedir (Heitkamp et al., 1988; Gallego Blanco'dan, 2012). Bu suş büyümesi esnasında başlangıç mikrobiyal halka oksidasyon ürünleri olarak cis- ve trans- 4,5 piren

dihidrodioller ve pirenol gibi farklı metabolitleri biriktirirler. Diğer ürünler ise 4 – fenantroik asit (en çok bulunan metabolit), 4 – hidroksiperinaftenon, sinnamik ve fitalik asit gibi halka parçalanma ürünleri olarak belirlenmiştir. Ara molekül olarak trans-dihidrodiol'ün belirlenmesi *M. vanbaalenii*'nin dioksijenasyon veya monooksijenasyon aracılığı ile PAH'lara saldırabildiğini göstermektedir. Bu ürün daha önceleri metabolik çalışmalar esnasında *Cunninghamella elegans* fungusuyla fark edilerek belirlenmiştir (Cerniglia et al., 1985; Gallego Blanco'dan, 2012). Bu ürün sitokrom P450 monooksijenasyonun bir sonucudur. $18O_2$ kullanılarak yapılan sonraki çalışmalarla, *M. vanbaalenii* PYR-1 suşu tarafından pirenden trans izomer üretimini onaylanmıştır. Bu işlem, sitokrom P450- bağımlı monooksijenazların hareketinin bir sonucu olarak gösterilmektedir. *Mycobacterium sp*. PYR-1 aynı zamanda antrasen, fenantren, fluoranten ve benz(a)piren gibi düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı PAH'ları mineralize edebilmektedir (Cerniglia, 2003; Gallego Blanco'dan, 2012).

1991 yılında Water ve ark. tek karbon kaynağı olarak pireni kullanarak büyüyebilen ilk suşu *Rhodococcus sp.* UW1 olarak tanımladılar. Beş yıl sonra, 1996'da, Schneider ve ark. *Mycobacterium sp*. RJGII-135 suşu tarafından pirenin parçalanmasında aracı molekül olarak 4, 5 – fenantroik asiti tanıladılar. Gram negatif bakteriler tarafından PAH parçalanmasının meta-açılım mekanizması karakteristiği yerine pirenin *orto*- açılımını önerdiler. Aynı yıl, Dean-Ross ve Cerniglia Mycobacterium flavescens suşunun tek karbon kaynağı olarak pireni kullanarak büyüyebildiğini ve *cis* – 4, 5 – pirendiol, 4 – fenantroik asid, fitalik asit ve 4, 5 – fenantroik asit birikimiyle karakterize edilmiştir. Bu metabolitlerin karakterizasyonuyla ilk piren parçalanma yolizi önerilmiş oldu. 1998 yılında yeni bir piren parçalayan mikroorganizma *Mycobacterium sp*. KR2 bahsedilen bazı ara metabolitlerin yanında yeni tanılanan 2 – karboksibenzaldehit, protokatekuik asit ve 1 – hidroksi – 2 – naftoik asitleri de yol izine eklenmiştir (Rehmann et al., 1998 -a). Sonraki çalışmalarla *Mycobacterium gilvum* AP1 suşunun pirenin iç halkalarının açılımından sorumlu olan ve daha önce belirlenmesine rağmen ilk defa tanımlanan 6, 6′ - dihidroksi – 2, 2′ - bifenil dikarboksilik asit ara metaboliti literatüre kazandırılmıştır (Vila et al, 2001; Gallego Blanco'dan, 2012). Orto – dioksijenasyon yanında, bu yol izinin ayırt edici karakteristiği olası son ürünler

olarak trans – dihidrodiol ve bifenil ara ürünlerine sebep olan lateral non – prodüktif oksidatif dalların varlığıdır (Gallego Blanco, 2012).

Son on yılda, pirenin başlangıç oksidasyonundan sorumlu olan dioksijenazlar karakterize edilmiştir (Khan et a., 2001; Krivobok et al., 2003; Kim et al., 2006; Gallego Blanco'dan, 2012) ve en son olarak, M. vanbaaleenii PYR-1 ve M. gilvum PYR – GCK'nın tüm genom dizileri piren molekülünün parçalanma yol izinin genetik temellerinin tespit edilmesinde yeni ilerlemelere olanak sağlamıştır (Kim et al., 2007; Gallego Blanco'dan, 2012).

Fenolik bileşiklerin toksisitesi atıksu arıtım tesislerinde geniş çapta çalışılmıştır. Fenol ve p – krezol konsantrasyonları sırasıyla 2000 ve 1000 mg/L üzerine çıktığı zaman metan üretimini inhibe ederler (Fedorak and Hrudey, 1984; Bitton'dan, 2005). Fenol toksisitesi aynı zamanda fixed – film biyolojik reaktörlerinde 1000 – 3000 mg/L konsantrasyonlarında da gözlenmiştir (Sayama and Itokawa, 1980; Bitton'dan, 2005).

ABD'de yaygın şekilde pestisit olarak kullanılan pentaklorofenol bileşiği metanojenik bakterilerde ATP sentezini ve metan üretimini inhibe eder (Roberton and Wolfe, 1970; Bitton'dan, 2005). Bileşik aynı zamanda aklime olmamış metanojenlere 200mg/L eşik konsantrasyonunda ihnibitör etkisi göstermektedir. Aklimasyon eşik değerini 600mg/L'kadar arttırmaktadır (Guthrie et al., 1984; Bitton'dan, 2005).

2, 4 – dinitrofenol, 4 – nitrofenol, 2 – nitrofenol gibi nitrofenol bileşikleri anaerobik sistemlere toksik etki göstermektedir. Özellikle 2, 4 – dinitrofenol yüksek toksisite göstermektedir (Uberol and Bhattacharya, 1997; Bitton'dan, 2005). İnhibitörler mikroorganizmalar ile yapılan substrat giderimini enzimatik aktiviteyi etkilediklerine benzer şekilde etkilerler (Hartmann and Laubenberger, 1968; Volskay et al., 1988; Bitton'dan, 2005).

Polar olmayan kalıntı organikler atıksu içindeki katılara adsorbe olma eğilimindedirler ve bu şekilde bazıları çamur çöktürmesi ile uzaklaştırılabilir. Bakteriler, funguslar ve algal hücrelerin organik kirleticileri adsorbe ettikleri ve

biriktirildikleri iyi bilinmektedir (Baughman and Paris, 1981; Lal and Saxena, 1982; Bitton'dan, 2005). Aktif çamur biyokütlesi lindan, diazinon, pentaklorofenol ve PCB'ler gibi organik kirleticileri adsorbe edebilmektedirler. Bu bileşiklerin adsorbsiyonu genellikle Freundlich izotermine uygun olmaktadır. Bileşik adsorbsiyonu ile oktanol/su katılım katsayısı arasında iyi bir korelasyon bulunmaktadır. Organik bileşiklerin adsorbsiyonu genellikle tersinir olduğundan dolayı çamurların alan uygulamasını takip eden leaching'leri büyük endişe uyandırmaktadır (Bell and Tsezos, 1987; Bitton'dan, 2005).

Biyoparçalama teknikleri hem biyosorpsiyon hem de biyoparçalanma işlemlerinden oluşmasına rağmen, kimyasal maddelerin tamamen mineralizasyonu göz ardı edilmektedir. Özellikle, PAH'ların % 20'den daha azının mikrobiyal hücrelerin içinde absorbe halde kaldıkları gözlenmiştir (Moscoso et al., 2012). Yapılan flok içi kimyasal absorbsiyonu çalışmaları sonucunda TFA'nın flok içinde birikmediği gözlenmekle birlikte, konsantrasyonun 368,9 mg/L'den 24 saat sonra 11,1 mg/L'ye gerilediği gözlenmiştir. Naftalenin flok ve tank içi değerleri aynı seviyelerdedir. Başlangıç tank içi miktarı 124,5 mg/L iken, 2., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla flok içinde 7; 0,6 ve 0,7 mg/L'ye gerilerken, tank içindeki konsantrasyonları sırasıyla 9,9; 0,4 ve 0,4 mg/L olarak ölçülmüştür.

Tank içi ve flok içi konsantrasyonlarındaki benzer miktarlar naftalenin yarı uçuculuk durumları ile açıklanabilir (Bitton, 2005). Asenaftenin tank içi başlangıç konsantrasyonu 121,8 mg/L iken, 2. saatteki flok içi ve tank içi konsantrasyonları sırasıyla 84,1 ve 46,1 mg/L olarak ölçülmesi asenaftenin flok içinde yaklaşık iki kat daha fazla absorbe olduğunu göstermektedir. Asenaftenin 12 ve 24. saatteki flok içi ve tank içi konsantrasyonları sırasıyla 1,5; 2,4 mg/L ve 2,5; 3,3 mg/L olarak ölçülmüştür. Bu durumda asenaften için aktif çamurda sulu kısım yerine flok içine iki kat kadar daha fazla absorbe olduğu ancak, buna rağmen flok içindeki gideriminin daha etkili olduğu söylenebilir. Fluorenin başlangıç tank içi konsantrasyonu 122,4 mg/L olarak ölçülürken, 2., 12. ve 24. saat sonunda flok içi ve tank içi konsantrasyonları sırasıyla 113,4; 23,6; 25,5 mg/L ve 55,8; 18,3; 16,1 mg/L olarak ölçülmüştür.

Bakıldığında fluorenin flok içi absorbsiyon yaklaşık iki daha yüksek iken 24. saat sonunda her iki kısımdaki giderim oranlarının aynı olduğu gözlenmektedir. Bu durumda fluoren için flok içine absorbsiyonunun daha fazla olduğu ancak giderim açısından flok içi veya tank için değerleri kıyaslandığında birinin diğerine oranla daha iyi olduğu söylenemez. Fluoranten, antrasen ve piren için de durum fluoren ile benzerdir. Her üç kimyasalın tank içi başlangıç konsantrasyonları ile 2. 12. ve 24. Saat konsantrasyonuları incelendiğinde, flok içindeki absorbsiyon miktarının tank içine göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu söylenebilir. Fluoranten için giderim oranları fluoren ile yakın olsa da, antrasen ve piren için durum biraz daha farklıdır.

Antrasende flok içi bikimi tank içine göre daha fazla olmasına rağmen flok içindeki giderimin %50 civarında olmasıyla tank içindeki giderimden daha fazla olduğu söylenebilir. Piren için ise flok içi absorbsiyonu tanak içine göre yaklaşık 3 kat daha fazladır. 12. Saatten itibaren flok içinde bir miktar piren birikimi olmasına rağmen 2. saat konsantrasyonuna göre %50 azalma gözlenmiştir.

Aynı şekilde pirenin tank içi konsantrasyonu 2. saatten itibaren azalmış ancak bu azalış yaklaşık 10 mg/L civarında olmuş ve 2 saatten sonra çok değişiklik göstermemiştir. Bu verilerden yola çıkarak pirenin flok içinde daha fazla biriktiği ve daha fazla giderildiği sonucu çıkarılabilir. Ayrıca, naftalenden pirene doğru gidildiğkçe hidrokarbonların molekül ağırlıkları, halka yapıları ve buna bağlı olarak hidrofobisiteleri arttığından dolayı flok içi birikimlerinin artış gösterdiği ancak absorbsiyonun artışına nazaran flok içindeki giderimin oldukça iyi olduğu söylenebilir.

Birçok ksenobiyotik bileşik halkasal yapıya sahip olduklarından dolayı mikroorganizmalar bu bileşiklerin halkasal yapılarını açma yeteneğinde olmak zorundadırlar (Bitton, 2005). Yan zincirleriyle birlikte hidrokarbonlarla ilgili olarak, biyoparçalama ya halka bölünmesi yoluyla veya yan zincir oksidasyonu ile gerçekleşebilir (Gibson and Subramanian, 1988; Bitton'dan, 2005). Bu nedenle mikroorganizmalar halka açılmasında etkin rol alan çeşitli enzim sistemlerine sahip olmalıdırlar.

Genetik ekologları doğal mikrobiyal kommunitelerin gen çoğaltılması ve/veya ifadesinin arttırılması için gen seviyelerinde kapasitelerinin güçlendirilmesine yönelik çalışmaktadırlar (Olson and Goldstein, 1988; Olson, 1991; Bitton'dan, 2005). Doğal mikrobiyal kommünitelerin arttırılmış aktivitesi toksik organik kirleticilerin biyoparçalanmasını ve metallerin biyodönüştürülmesinin güçlendirilmesine olanak sağlayabilir. Bu sayede biyota için olabilen en düşük toksisitede bileşiklere dönüştürülebilir. Bu yaklaşım genetik olarak geliştirilerek çevreye verilen mikroorganizmalardan daha az sorun oluşturacak gibi görünmektedir (Bitton, 2005).

Genetik tabanlı ekolojik yaklaşımda bazı avantajlar vardır. İlki, genler spesifik fonksiyonları kontrol ederlerken, tüm hücreler bir çoğu belirli bir hedef için kullanışlı olmayan bir çok fonksiyonu gerçekleştirirler. Ek olarak, belirli bir fonksiyon (örneğin ksenobiyotik bileşiklerin biyoparçalanması gibi) kodlayan genler genetik manipülasyonlar yoluyla çoğaltılabilir. Bu, istenilen bir plazmitin kopya sayılarının arttırılması şeklinde olabilir. Çünkü birçok katabolik plazmit çevrenin manipülasyonu aracılığıyla gen transferinin teşviklenmesi sonucu bir ksenobiyotik bileşiğin biyoparçalanmasının arttırılabildiği rapor edilmiştir (Olson, 1991; Bitton'dan, 2005). Bugüne kadar kültür bağımsız yöntemler kullanılarak 300'ü aşkın katabolik gen tanımlanmıştır (Widada et al., 2002; Bitton'dan, 2005)

Bir çok ksenobiyotik katabolizmasını düzenleyen genler plazmid kaynaklıdır. Katabolik ya da parçalayıcı plazmitler ksenobiyotik bileşiklerin dönüştürlmesini kontrol eden ekstra kromozomal DNA elementleridir. Bu elenmentler sınırlı bakteri tipinde tanımlanmıştır. Bu bakteriler çoğunlukla Pseudomonas genusu üyeleridir (Sayler and Blackburn, 1989; Bitton'dan, 2005).

Bu katabolik plazmidler spesifik substratlar ortamda bulunmadığı zaman kaybolabilirler. En iyi bilinen ve karakterize edilen plazmid TOL plazmitidir. Ham petroldeki hidrokarbonların biyoparçalanması için multiplazmit içeren mikrobiyal suşlar yapılandırılmıştır (Friello et al., 1976; Bitton'dan, 2005). Bu suşlar tolüen, ksilen, kamfor, oktan ve naftalen parçalama yeteneğindedirler (Saunders and Saunders, 1987; Bitton'dan, 2005). Parçalayıcı plazmitler aynı zamanda klorinlenmiş bileşikler olarak adlandırılan ve yüksek oranda kalıcı ve toksik özellik

gösteren ksenobiyotiklerin biyoparçalanması için de yapılandırılmıştır. Ancak, bu tarz yeni plazmit taşıyan mikroorganizmaların alan şartları altında kullanımı tam olarak araştırılmalıdır (Bitton, 2005).

Tez çalışması kapsamında gen ekspresyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için normal atık su mikrobiyal profilini oluşturan mikroorganizmaların çoğunun Gram negatif reaksiyon vermesinden dolayı, genel Gram negatif bakteri grubuna özgü primer bölgesi tercih edilmiştir. Bugüne kadar PAH parçalayan mikroorganizmalara özgü birçok primer seti tasarlanıp çalışılmıştır. Bunların bazıları az sayıda dejenere baz dizilerine sahipken bazıları değildir. Yine diğer bazı çalışmalarda primerlerdeki dejenere baz dizilerinde artış sağlanarak daha geniş bir aromatik dioksijenaz enzim çeşitliliğine hitap edilmesi istendiğinde ise, bu primerlerin bazı genleri çoğaltmada hata verdikleri veya hedef bölge spesifitesinin olmadığı gözlenmiştir (Cebron et al., 2008).

Bu nedenle Cebron et al. 2008 yılında yaptıkları bir çalışma ile gen ifadesi çalışmalarında kullanılmak üzere Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere özgü primer tasarımı gerçekleştirmişlerdir. Özellikle Gram negatif bakteriler için tasarlanan primer setleri Gram negatifler içerisinde geniş çeşitlilikteki bakteri gruplarını hedef almıştır. Toprak, sediment ve arktik bölgeden alınan örneklerle yapılan iki ayrı çalışmada gen karakterizasyonları yapılmış ve bu gen bölgelerine sahip bakteriyel gruplar *Pseudomonas, Polaromonas, Alcaligenes, Ralstonia, Comamonas, Acidovorax, Sphingomonas, Marinobacter, Delftia, Cycloclasticus, Novosphingobium, Sphingobium* ve *Burkholderia* genusları olarak saptanmıştır. PAH RHDα enzimlerini üreten çoğunluğu nahAc- olmakla birlikte, nagAc-, pahAc-, arhAc, ve phnAc- benzeri genlerdir (Cebron et al., 2008; Jurelevicius et al., 2012). Bu genler kromozom ya da plazmitlerde lokalize olabilmektedir (Cebron et al., 2008).

PAH RHDα gen kopya sayıları kromozom yada plazmitte bulunma durumları ve genlerin bir çok allele sahip olmaları gibi sebeplerden dolayı değişebilmektedir. Örneğin, *P. putida* KT2440 ve Mycobacterium türleri sırasıyla 7 ve 1–2 tam ribozomal operon içermektedir, respectively (Leys et al., 2005; Nyyssönen et al.,

2006) ve *P. putida* G7 suşu hücre başına PAH RHD gen operonun bulunduran 50 – 100 plazmit kopyasına sahip olabilmektedir (Cebron et al., 2008).

Yüksek kirlilik olan yerlerde PAH RHDα genlerinin 16S rRNA genlerine oranlarının % 0,001 ile 0,922 arasında olduğu saptanmıştır. Bu oran kirlilik olmayan bölgelerdekine göre yaklaşık 10 kat daha fazladır (Cebron et al., 2008).

Bakıldığı zaman 7,5 ml, 10 ml ve 20 ml hidrokarbon karışımının eklenmesinin hemen ardından gen ifadelerinde artışlar gözlenmiştir. İfadedeki en fazla artış 16S normalizasyonu ile 40 ml kimyasal karışımının eklendiği 31. günden sonra 36. günde 1, 39 kat rölatif bir artış olurken, 341 – 518 normalizasyonu ile 20 ml kimyasal karışımının eklendiği 22. günden sonraki 27. günde 1,27 kat rölatif bir atış gözlenmiştir. 16S normalizasyonu verilerinde ani bir artış ve azalış gözlenirken, 341 – 518 normalizasyonu verilerinde kademeli bir artış gözlenmiştir.

Pfaffl yöntemini uygulamak için ürün veren PCR veriminin hesaplaması yapılmıştır. Buna göre 16S primerleri için verim 1,87; 341 – 518 primerleri için verim 1,80; ve PAH RHDα GN primerleri için verim 1,80 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra Pfaffl yöntemi için kullanılan formül vasıtasıyla rölatif gen ifadeleri bulunmuştur. Teorik olarak Livak yönteminde PCR veriminin %100 olduğu kabul edilerek işlemler yapılırken, Pfaffl yöntemi PCR verimleri üzerinden hesaplandığı için Livak yöntemine göre daha gerçek sonuçları yansıtmaktadır. Bu nedenle her iki yöntem sonuçları kıyaslanmıştır. Sonuçlarda hemen hiç bir fark görülmemiştir. Bu da her iki yöntem açısından sonuçların doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Teorikte, Livak ve Pfaffl yöntemleri için kullanılan housekeeping gen bölgelerinin CT değerlerinde anlamlı bir değişiklik olması beklenmez ve bu nedenle normalizasyon hesaplamalarında CT değerlerinin aritmetik ortalamaları kullanılmaktadır. Çalışmalar housekeeping genlerine istinaden hesaplanmaktadır. Ancak pratikte herzaman housekeeping gen bölgelerinin CT değerleri birbirlerine yakın olmamakta ve değişmektedir. Bu nedenle aritmetik ortalamaya dayalı olarak kullanılan housekeeping gen bölgelerinin CT verileri ile yapılan normalizasyon çalışmaları yerine BestKeeper adlı excel tabanlı bir istatistik veri – formül programı kullanılmaktadır. Bu programda 10 farklı housekeeping gen bölgesinin CT

değerleri ve PCR verimleri aynı anda kullanılarak gen ekspresyon çalışmalarına uygunlukları analiz edilebilmektedir.

İki housekeeping gen bölgesi ile yapılan Bestkeeper analizleri göstermektedir ki; Her iki gen bölgesinin CT verilerinin geometrik ortalamalarının alınması ve geometrik ortalamalarının ortalamasının alınması ile elde edilen temel BestKeeper verileri hedef gen bölgesine uygulandığında rölatif açıdan anlamlı bir sonuç vermektedir. Ancak 16S gen bölgesinin hem standart sapma değeri 1,34 olduğundan hem de max ve min x - katlanma değerleri arasında oldukça fazla aralık olmasından (-7,57 – 5,94) dolayı stabil ve güvenilir bir housekeeping gen bölgesi olarak kullanılamayacağı sonucuna varılabilir. 341 – 518 gen bölgesinin ise hem standart sapma değeri hem de istatistiksel p – değeri (0,001) oldukça anlamlı sonuçlar verdiği ve ayrıca maks – min x – katlanma değerleri (-1,88 – 4,06) aralığının görece fazla olmamasından dolayı bu gen bölgesi güvenilir bir houskeeping gen bölgesi olarak kullanılabilir denilebilir.

Ayrıca hedef gen bölgesinin BestKeeper normalizasyonu olmadan artan ya da azalan bir ifadeye sahip olduğu (-4,31 – 3,97; standart sapma 1,64) görülmektedir. Hedef gen maksimum 3,97 kat ifade olabilirken, regresyon analizleri neticesinde hedef gen bölgesinin katlanma gücünün 1,35 olduğu hesaplanmıştır.

Gen ekspresyonu için çamur aklimasyonunu takiben Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi giderek artan konsantrasyonlarda stok kimyasal solüsyonundan eklenmiş ve gen ekspresyon durumları analiz edilmiştir. Şekil 4.23'e bakıldığında başlangıçta verilen 2,5 ml'lik stok kimyasal ilk 13 günlük aklimasyon süresince naftalen ve asenaften hızlı bir şekilde azalırken, piren ve floranten konsantrasyonlarında bir artış olduğu devamındaki 4. günden itibaren düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Floren ve antrasende birikim söz konusu olmamıştır. Floren 3. günden itibaren kademeli olarak düşerken, piren 5. günden itibaren, floranten ve antrasen 6. Günden itibaren yavaş yavaş düşüş sergilemiştir. 13. gün sonunda antrasen dışındaki tüm hidrokarbonların bitmesiyle birlikte 7,5 ml ve devamında 10 ml kimyasal solüsyonu eklenmiştir. Bu iki hacimdeki kimyasallar antrasen hariç sırası ile yaklaşık 2 ve 4 gün süre ile parçalanmıştır. 17. günde eklenen 20 ml

kimyasal solüsyonunun parçalanma süresi yaklaşık olarak 8 gün sürmüştür. Parçalama süresi sonunda eklenen 40 ml kimyasal solüsyonunun parçalanma süresi yaklaşık 21 gün sürmüştür. 21 günlük süre sonunda naftalen ve asenaften haricindeki hidrokarbonların tam anlamıyla parçalanmadığı, özellikle antrasen ve pirenin tamamen parçalanması için çok daha uzun sürelere ihtiyaç olduğu görülmüştür. Şekil 4.23'e bakıldığında kimyasal konsantrasyonu arttıkça giderim sürelerinde de artış olduğu görülmektedir.

Hidrokarbon parçalanması devam ederken aynı zamanda gen ekspresyonu için alınan örnekler ile yapılan analşizler neticesinde 16S housekeeping gen bölgesinin ifadesinde sapmalar olduğu, 341 - 518 gen bölgesinin ise daha stabil ifadeye sahip olduğu gözlenmiştir.

Artan konsantrasyonlardaki hidrokarbonların parçalanması ile bu süreçteki gen ifadelerinin durumları Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de belirgin şekilde görülmektedir. Bestkeeper analizleri ile kullanımının çok uygun olmadığı anlaşılan 16S gen bölgesi normalizasyonu yerine 341 – 518 bölgesi normalizasyonun tartışılması daha anlamlı olacaktır. Bakıldığında Şekil 4.28'de özellikle 13 – 30 günleri arasında kimyasal konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak gen ifadesinde değişimlerin olduğu gözlenmiştir. 31. günden itibaren kimyasal konsantrasyonlarındaki artış ile daha uzun bir zamana yayılan parçalanmada gen ifade düzeyleri 13 – 30 günleri arasındakine göre göreceli olarak daha düşük olmuştur. Şekil 4.28'deki grafikten anlaşılacağı üzere, en yüksek gen ifadesi 20 ml kimyasal solüsyonunun eklendiği ve devamındaki 8 günlük süreçte gözlenmiştir. 22. Günde tank içinde ölçülen hidrokarbon konsantrasyonları sırası ile; Naf 26,9 mg/L; Ace 28,1 mg/L; Flo 30,5 mg/L; Flr 5,9 mg/L; Ant 67,1 mg/L ve Pyr 18,7 mg/L'dir. Görüldüğü üzere konsantrasyon gen ifade düzeyi karşılaştırmasında, antrasen dışındaki diğer kimyasalların 20 - 30 mg/L civarında olduğunda PAH RHDα gen bölgesinin en yüksek aktivitede iş gördüğü yorumu yapılabilir.

Sonuç olarak 16S gen bölgesinin CT değerlerindeki dalgalanmalardan dolayı gen ekspresyonu analizlerinde pek uygun olmadığı, ancak uygun olarak kabul edildiğinde hedef gen bölgesinin ifadesinin Livak ve Pfaffl analiz verilerine benzer sonuçlar sergilediği görülmektedir.

Belirtildiği üzere rekalsitrant bileşiklerin bulunduğu atıksulardan izole edilen temel mikroorganizma gruplarının çeşitliliği, her mikroorganizma grubunun kendi içinde çok çeşitli enzim kodlayan gen sistemlerinin olma olasığı, bu genlerin farklı kimyasallara verdikleri cevaplar, mikroorganizmalar arasındaki kometabolik ilişkiler ve çalışılan gen bölgesinin kendi içindeki varyasyonları dikkate alındığında, sadece Gram – negatif bakterilerin belirli bazı genuslarını kapsayan tek bir genel primer çifti ile yapılan gen ifadesi analizlerinin yetersiz kaldığı sayısal verilerden de anlaşılabilir. Bunun için hem Gram – negatif hem de Gram – pozitif mikroorganizmaları kapsayan halka açılımından sorumlu enzimleri kodlayan gen bölgelerinin birlikte çalışılması, genlerin karakterizasyonu ve belki mayaların çalışmaya dahil edilmesi, daha önce belirtildiği üzere halkasal yapıdaki aromatik bileşiklerin metabolize edilmesi için kullanılan RHD dışındaki diğer enzim sistemlerine özgü genlerin çalışılması ile genel tablo ortaya çıkacaktır.

6. SONUÇ

Çevrede doğal olarak bulunan birçok mikroorganizmanın aromatik yapıdaki hidrokarbonlar ve pestisitlerden tek karbon kaynağı olarak yararlandıkları ve bu tarz kimyasalları parçaladıkları uzun zamandır bilinmektedir. Mikroorganizmaların metabolik yol izleri ve enzimleri hakkındaki bilgilerin zenginleşmesi yoğun olarak kirli alanların mikrobiyolojik yollarla iyileştirilmesinin geliştirilmesi için yol gösterici olabilir. *in situ* parçalanmanın başarısı ile ilgili oldukça fazla çalışma ve veri olmasına karşın, bu toksik kirleticilerin mikroorganizmalar tarafından tamamen parçalanmasının arttırılması ve etkisinin güçlendirilmesi için alternatif stratejilere herzaman ihtiyaç duyulmaktadır.

Çeşitli rekalsitrant substratlar (Tereftalik asit (TFA), Asenaften (Ace), Fluoren (Flu), Antrasen (Ant), Fluorantene (Flr), Piren (Pyr)) üzerinde çeşitli deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmaları sonucunda başarılı sonuçlar alınan mikroorganizmalar kullanılarak ülkemize has yeni, oldukça etkili, performansı ve katma değeri yüksek mikroorganizma karışımlarının üretilebilmesi, çeşitli yönleriyle incelenmesi ile tamamen yerli üretim olan bu mikroorganizma kültür karışımlarının mevcut arıtım sistemlerinde kullanılabilmesi sağlanmıştır.

7. ÖNERİLER

HPLC ile yapılan analitik analizler sonucu elde edilen verilerden, biyoparçalanması istenen hedef kimyasalların büyük oranda giderildiği ve teorik olarak parçalandığı gözlenmiştir. Ancak, bilinen bakteriyel metabolik parçalanma yolizleri ile hedef hidrokarbonların tam olarak metabolize edilip edilmedikleri net olarak bilinmemektedir. Bunun, reaktör içinde yapılan çalışmalarda aklime edilmiş aktif çamur kullanılması, dolayısı ile karışık bir kommünite çalışması olması ve karışık hidrokarbon kullanımı olarak iki temel nedeni vardır. Ayrıca HPLC metodu bu noktada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, bu tarz karışık kommünite ve karışık hidrokarbon kullanarak yapılacak çalışmalarda analitik belirleme yöntemi olarak GC-MS ve/veya LC-MS/MS gibi daha hassas ölçüm cihazları kullanılması ile tablo daha net olarak anlaşılabilecektir.

Moleküler biyolojik yöntemlerle genus ve tür düzeyinde belirlenen ancak net bir sonuca varılamadığından dolayı genus düzeyinde verilen bakterilerin API profillendirmesi yapılması ile izolatların tür düzeyinde tam olarak isimlendirilmesine karar verilebilmesi için ilave veriler sağlanabilecektir.

Ayrıca DGGE gibi metagenomik yaklaşımlarla moleküler biyolojik profillendirme ile baskın popülasyon üyelerinin belirlenmesi, parçalamadan sorumlu olduğu düşünülen hedef genlere özgü primer setleri kullanılarak popülasyon içinde baskın katalitik aktiviteye sahip enzimleri kodlayan genlerin belirlenmesi, bu sayede genlerin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ile hedef gen olup olmadıkları, bu genlerin ifade düzeylerinin araştırılması gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adnan, M., Morton, G. and Hadi, S., 2011, Analysis of rpoS and bolA gene expression under various stressinduced environments in planktonic and biofilm phase using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 357:275-282pp.

Ahring B.K., Christiansen, N., Mathrani, I., Hendriksen, H.V., Macario, A.J.L. and de Macario, E.C., 1992, Introduction of a de novo bioremediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with desulfomonile tiedjei, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11):3677-3682pp.

Alver, E., Demirci, A. ve Özcimder M., 2012, Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve sağlığa etkileri, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3 (1):45-52s.

Atlas, R.M. and Bartha, R., 1973, Simulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers, *Environmental Science & Technology*, 7:538-541pp.

Bathe, S., Schwarzenbeck, N. and Hausner, M., 2005, Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3): 242–247pp.

Bathe, S., Schwarzenbeck, N. and Hausner, M., 2009, Bioaugmentation of activated sludge towards 3-chloroaniline removal with a mixed bacterial population carrying a degradative plasmid. *Bioresource Technology*, 100:2902–2909pp.

Bitton, G., 2005, *Wastewater microbiology* 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 746p.

Bjornsdottir-Butler, K., Jones,J.L., Benner Jr., R.A. and Burkhardt 3rd, W., 2011, Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method, *Food Microbiology*, 28:1284-1292pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Boon, N., De Gelder, L., Lievens, H., Siciliano, SD., Top, EM. and Verstraete W., 2002, Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach. *Environmental Science and Technology*, 36(21):4698–704pp.

Boon, N., Goris, J., de Vos, P., Verstraete, W. and Top, E.M., 2000, Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading Comamonas testosteroni Strain, I2gfp, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2906-2913pp.

Bossert, I.D. and Bartha, R., 1986, Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37:490-495pp.

Boyd, T.J., Smith, D.C., Apple, J.K., Hamdan, L.J., Osburn, C.L. and Montgomery, M.T., 2008, Evaluating pah biodegradation relative to total bacterial carbon demand in coastal ecosystems: are pahs truly recalcitrant?, 1-38, Microbial Ecology Research Trends, van Dijk, T. (Ed.), Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-60456-179-1.

Cardinal, LJ., and Stenstrom, K.M., 1991, Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process, *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 63(7): 950–57pp.

Cebron, A., Norini, M-P., Beguiristain, T. and Leyval, C., 2008, Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDα) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples, *Journal of Microbiological Methods,* 73:148–159pp.

Cerniglia, C.E., 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation*, 3:351-368pp.

Cerniglia, C.E and Heitkamp, M.A, 1989, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment, 41-68, *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, Varasi, U. (Ed.), CRC Press, Inc, Boca Raton, (Florida), 345p**.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chen, Y., Lin, CJ., Jones, G., Fu, S. and Zhan, H., 2009, Enhancing biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. *Journal of Hazardous Materials,* 171(1–3): 948–53pp.

Chung, J-Y., Kim, Y-J., Kim, J.Y., Lee, S.G., Park, J-E., Kim, W.R., Yoon, Y-D., Yoo, K.S. and Kim, J-M., 2011, Benzo[a]pyrene reduces testosterone production in rat leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery, *Environmental Health Perspectives*, 119(11):1569-1574pp.

Comission Directive 2001/90/EC, 2001, *Official Journal of the European Communities*, 283:41-43pp.

Conney, A.H., 1982, Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial lecture, *Cancer Research*, 42:4875-4917pp.

Csaba, P. and Csaba, J., 2011, Water resources management and water quality protection,*http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0032_vizkeszletgazdalkodas_es_vizminoseg/ch14s09.html,* (Erişim tarihi: 25.06.2015)

Diez, S., Sabate, J., Vinas, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M. and Albaiges, J., 2005, The prestige oil spill. I. Biodegradation of a heavy fuel oil under simulated conditions, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9):2203-2217pp.

EFSA (European Food and Safety Autority), 2008, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *The EFSA Journal,* 724:1-114pp.

Eisler, R., 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report,* 85(1.11):55p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Eroğlu Bayrak, D., 2013, Petrokimya tesisinden izole edilen bazı mikroorganizmaların terefitalik asit ve 1,2 dikloroetan biyoparçalanma etkinliğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 74s.

Forsgren A.J., 2015, Wastewater Treatment Occurrence and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 235p.

Fukuda, R., 2013, Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast yarrowia lipolytica, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(6):1149-1154pp.

Gallego Blanco, S., 2012, Biodegradation of PAHs: analysis and stimulation of degrading bacterial populations, PhD Thesis, Universitat de Barcelona, 171p (unpublished).

Gallego, J.R., Gonzalez-Rojas, E., Pelaez, A.I., Sanchez, J., Garcia-Martinez, M.J., Ortiz, J.E., Torres, T. and Llamas, J.F., 2006, Natural attenuation and bioremediation of Prestige fueloil along the Atlantic coast of Galicia (Spain), *Organic Geochemistry*, 37:1869–1884pp.

Gardner W.S., Lee, R.F., Tenore, K.R. and Smith, L.S, 1979, Degradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments: importance of microbes and polychaete worms, *Water, Air and Soil Pollution*, 11:339-347pp.

Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F. and Sayadi, S., 2011, Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents, *Journal of Hazardous Materials*, 189:427–434pp.

Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F. and Sayadi, S., 2014, Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by bacterial consortium isolated from an industrial wastewater treatment plant, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89:978–987pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gargouri, B., 2015, Laboratory-Scale Bioremediation Experiments on Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Wastewater of Refinery Plants, 235-248, *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*, Chandra, R. (Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 423 p.

Garner, R.C., 1998, The role of dna adducts in chemical carcinogenesis, *Mutation Research*, 402:67-75pp.

van der Gast, CJ., Whiteley, AS., Starkey, M., Knowles, CJ. and Thompson, IP., 2003, Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents, *Biotechnology Progress*, 19(4):1156–61pp.

Gerardi, M.H., 2006, Wastewater bacteria, *John Wiley & Sons*, Inc., Hooken, New Jersey, 255p.

Goldman, R., Enewold, L., Pellizzari, E., Beach, J.B., Bowman, D., Krishnan, S.S. and Shields, P. G., 2001, Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue, *Cancer Research*, 61:6367-6371pp.

Goldstein, M.G., Mallory, L.M., and Alexander, M., 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation, *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4):977–983pp.

Gök, O. ve Sponza, D., 2008, Poliaromatik hidrokarbonların aerobik giderimlerine biyosürfaktanın etkisi, *İTÜ Dergisi/e su kirlenmesi*, 18(2-3):31-40s.

Habe, H. and Omori, T., 2003, Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2):225-243pp.

van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P., 2003, Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiology and Molecular Microbiology Reviews*, 67(4):503-549pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Haddock, J.D., 2010, Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons: Enzyme Structures and Catalytic Mechanisms, 1058-1069, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis K.N., (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 4699p.

Hajji, K.T., Lepine, F., Bisaillon, J-G., Beaudet, R., Hawari, J. and Guiot, S.R., 2000, Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds, *Biotechnology and Bioengineering*, 67(4):417-423pp.

Iwai, S., Johnson, T.A., Chai, B., Hashsham, S.A. and Tiedje, J.M., 2011, Comparison of the Specificities and Efficacies of Primers for Aromatic Dioxygenase Gene Analysis of Environmental Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11):3551-3557pp.

Jimenez, N., Vinas, M., Sabate, J., Diez, S., Bayona, J.M., Solanas, A.M. and Albaiges, J., 2006, The prestige oil spill. 2. enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer, *Environmental Science and Technology*, 40:2578-2585pp.

Jones, W.L. and Schroeder, E.D., 1989, Use of cell-free extracts for the enhancement of biological wastewater treatment. *Journal of Water Pollution and Control Federation*, 61(1):60–65pp.

Jurelevicius, D., Alvarez, V.M., Peixoto, R., Rosado A.S. and Seldin, L., 2012, Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases (PAH-RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula, *Applied Soil Ecology,* 55:1–9pp.

Juteau, P., Bisaillon, J.G., Lépine, F., Ratheau, V., Beaudet, R. and Villemur, R., 2003, Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. *Biodegradation*, 14(1):31-40pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kanary, R.A. and Harayama, S., 2000, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of Bacteriology*, 182(8):2059-2067pp.

Keith, L.H. and Telliard, W.A., 1979, Priority pollutants I-a perspective view, *Environmental Science and Technology*, 13(4):416-423pp.

Kennedy, M.S., Grammas, J. and Arbuckle, B., 1990, Parachlorophenol Degradation Using Bioaugmentation, *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 62(3):227-233pp.

Khoei, J.K., Farmohammadi, S., Noori, A.S. and Padash, A., 2013, Bioremediation; a nature-based approach towards having a healthier environment, *Annals of Biological Research*, 4 (2):43-46pp.

Kochany, J., 2015, PAHs in Natural Waters: Natural and anthropogenic sources, and environmental behavior, 11-45, *Wastewater Treatment Occurrence and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, Forsgren, A.J, (Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 235p.

Kuipfer, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J., 2004, Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(1):6-15pp.

van Limbergen, H., Top, E.M., and W. Verstraete, W., 1998, Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50:6–23pp.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25:402–408pp.

Lodha, B., Bhadane, R., Patel, B. and Killedar, D., 2008, Biodegradation of pyridine by an isolated bacterial consortium/strain and bio-augmentation of strain into activated sludge to enhance pyridine biodegradation, *Biodegradation*, 19(5):717–23pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ma, F., Guo, JB., Zhao, LJ., Chang, CC. and Cui, D., 2009, Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresource Technology*, 100(2): 597–602pp.

de Maagd, P.G-J., ten Hulscher, D.E.M, van den Heuvel, H., Opperhuizen, A. and Sijmi D.T.H.M., 1997, Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and henry's law constants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2): 251-257pp.

Makinen, P.M., Theno, T.J., Ferguson, J.F., Ongerth, J.E. and Puhakka JA., 1993, Chlorophenol toxicity removal and monitoring in aerobic treatment: recovery from process upsets. *Environmental Science and Technology*, 27:1434–1439pp.

Mastorakos, G., Karoutsou, E.I., Mizamtsidi, M and Creatsas, G., 2007, The menace of endocrine disruptors on thyroid hormone physiology and their impact on intrauterine development, *Endocrine*, 31(3):219-237pp.

McBryan, T., 2013, Computational Biology, Bioinformatics and Other Things, qpcr normalisation, *http://blog.mcbryan.co.uk/2013/06/qpcr-normalisation.html* (Erişim tarihi: 15 Temmuz 2015)

McDonald, B.G. and Chapman, P.M., 2002, PAH phototoxicity – an ecologically irrelevant phenomenon?, *Marine Pollution Bulletin*, 44:1321-1326pp.

McLaughlin, H., Farrell, A. and Quilty, B., 2006, Bioaugmentation of activated sludge with two Pseudomonas putida strains for the degradation of 4-chlorophenol. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 41(5): 763–777pp.

van der Meer, J.R, de Vos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J.B., 1992, Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews*, 56(4): 677-694pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Melcher, RJ., Apitz, S.E. and B.B. Hemmingsen., 2002, Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6):2858-2868pp.

Mills, M.A., McDonald, T.J., Bonner, J.S, Simon, M.A. and Autenrieth, R.L., 1999, Method for quantifying the fate of petroleum in the environment, *Chemosphere*, 39(14):2563-2582pp.

Mohd Radzi, N-A-S., Tay, K-S., Abu Bakar, N-K., Emenike C.U., Krishnan, S., Hamid, F.S. and Abas, M-R., 2015, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (pyrene and fluoranthene) by bacterial consortium isolated from contaminated road side soil and soil termite fungal comb, *Environmental Earth Sciences*, DOI 10.1007/s12665-015-4552-y.

Moscoso, F., Teijiz, I., Sanroman, M.A. and Deive, F.J., 2012, On the suitability of a bacterial consortium to implement a continuous PAHs biodegradation process in a stirred tank bioreactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51:15895-15900pp.

Mueller, J.G., Chapman, P.J. and Pritchard, P.H., 1989, Creosote-contaminated sites: their potential for bioremediation, *Environmental Science and Technology,* 23(10):1197-1201pp.

Ni Chadhain, Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J. and Zylstra, G.J., 2006, Microbial Dioxygenase Gene Population Shifts during Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6):4078-4087pp.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. and Kalogerakis, N., 2007, Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers, *Desalination,* 211:286–295pp**.**

Nyyssönen, M., Piskonen, R. and Itavaara, M., 2006, A targeted real time PCR assay for studying naphthalane degradation in the environment, *Microbial Ecology*, 52: 533–543pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Xu, R. and Obbard, J.P, 2003, Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments, *Journal of Environmental Quality*, 32:1234–1243pp.

Okerentugba, P.O., and Ezeronye, O.U., 2003, Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria, *African Journal of Biotechnology*, 2(9):288-292pp.

Özkaya, S.Y., 2004, "Tehlikeli atıklar ve çevre", Uluslararası Ekonomik Sorunlar Dergisi, Sayı XV, Dışişleri Bakanlığı Yayınları. *http://www.mfa.gov.tr/tehlikeli-atiklar-ve-cevre.tr.mfa*, (Erişim tarihi: 25 Haziran 2015).

Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E., Burns, W.A. and Mankiewicz, P.J., 1996, The natural petroleum hydrocarbon backround in subtidal sediments of prince William sound, alaska, USA, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(8):1266-1281pp.

Park, K.S., Sims, R.C. and Dupont, R.R., 1990, Transformation of pahs in soil systems, *Journal of Environmental Engineering*, 116(3):632-640pp.

Patel, J.G., Kumar, N., Kumar, R. N. and Khan, S. R., 2014, Isolation and characterization of three and four ring pahs degrading bacteria from contaminated sites, Ankleshwar, Gujarat, India, *International Journal of Environment*, 4(1):130-140pp.

Peng, R-H., Xiong, A-S., Xue, Y., Fu, X-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y-S. and Yao, Q-H., 2008, Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiology Reviews*, 32:927-955pp.

Pereira, W.E., Hostettler, F.D., Luoma, S.N., van Geen, A., Fuller, C.C. and Anima, R.J., 1999, Sedimentary record of anthropogenic and biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California, *Marine Chemistry*, 64:99–113pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Perez-Pantoja, D., Gonzalez, B. and Pieper, D.H., 2010, Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons, 800-837, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis K.N., (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 4699p.

Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research,* 29(9):2002-2007pp.

Pfaffl, M.W., Tichopat, A., Prgomet, C. and Neuvians T.P., 2004, Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26:509–515pp.

Pinyakong, O., Habe, H. and Omori, T., 2003, The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49:1-19pp.

Pritchard, P.H. and Costa, C.F., 1991, EPA's Alaska oil spill bioremediation Project, *Environmental Science and Technology*, 25(3): 372-379pp.

Qu, Y., Zhou, J., Wang, J., Song, Z., Xing, L. and Fu, X., 2006, Bioaugmentation of bromoamine acid degradation with Sphingomonas xenophaga QYY and DNA fingerprint analysis of augmented systems, *Biodegradation*, 17(1): 83–91pp.

Quan, X., Shi, H., Liu, H., Lv, P. and Qian, Y, 2004, Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture*, Water Research,* 38 (2004) 245–253pp.

Rossini, F.D., 1960, Hydrocarbons in petroleum, *Journal of Chemical Education*, 37(11):554-561pp.

Saha, R., Bestervelt, L.L. and Donofrio, R.S., 2012, Development and validation of a real-time taqman assay for the detection and enumeration of pseudomonas fluorescens ATCC 13525 used as a challenge organism in testing of food equipments, *Journal of Food Science,* 77(2):150-155pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Saygılı, B., 2012, Asenaften ve floren biyoparçalama kapasitesindeki mikroorganizmaların izolasyonu, tanılanması ve parçalama etkinliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 81s.

Selvaratnam, S., Schoedel, B.A., McFarland, B.L. and Kulpa, C.F., 1995, Application of Reverse Transcriptase PCR for Monitoring Expression of the Catabolic dmpN Gene in a Phenol-Degrading Sequencing Batch Reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11):3981-3985pp.

Seo J.S., Keum Y.S., and Li Q.X., 2009, Bacterial degradation of aromatic compounds*, International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6:278-309pp.

Sharma, S. and Pathak, H., 2014, *Pseudomonas* in biodegradation, *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(1):213-222pp.

Shukla, K.P., Sharma, S., Singh, N.K., Singh, V., Tiwari, K. and Singh, S., 2011, Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation, *African Journal of Biotechnology*, 10(48), 9717-9724pp.

Singh, R., Karandikar, R. and Phale, P.S., 2015, Microbial degradation of aromatic compounds and pesticides: challenges and solutions, 67-95, Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste, Chandra, R. (Ed.), *CRC Press, Taylor and Francis Group*, New York, 423p.

Skupinska, K., Misiewicz, I and Kasprzycka-Guttman, T., 2004, Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 61(3): 233-240pp.

Soda, S., Ike, M. and Fujita, M., 1998, Effects of inoculation of a genetically engineered bacterium on performance and indigenous bacteria of a sequencing batch activated sludge process treating phenol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (1): 90–96pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Suguira, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. and Harayama, S, 1997, Physicochemical properties and biodegradability of crude oil, *Environmental Science and Technology*, 31(1):45-51pp.

Suja, F., Rahim, F., Taha, M.R., Hambali, N., Razali, M.R., Khalid, A. and Hamzah, A., 2014, Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations, *International Biodeterioration & Biodegradation,* 90:115-122pp.

Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L. and Laluce, C., 2002, Non-conventional yeasts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:147-156pp.

Sponza, D.T. and Gök, O., 2010, Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater, *Bioresource Technology,* 101:914–924pp.

Sponza, D.T. and Gök, O., 2012, Aerobic biodegradation and inhibition kinetics of poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) in a petrochemical industry wastewater in the presence of biosurfactants, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87:658–672pp.

Stegeman, J.J., Schlezinger, J.J., Craddock, J.E. and Tillitt, D.E., 2001, Cytochrome p450 1a expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones, *Environmental Science and Technology*, 35(1):54-62pp.

Sternbeck, J., 2011, Using sludge on arable land: Effect based levels and longterm accumulation for certain organic pollutants. *Nordic Council of Ministers. TemaNord*, 506, 100p.,

Stolz, A., 2009, Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81:793-811pp.

Swanell, R.P.J., Lee, K. and McDonagh, M., 1996, Field evaluation of marine oil spill bioremediation, *Microbiology Reviews*, 60:342-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A., Wattiau, P., De Mot, R. and Springael, D., 2004, Acinetobacter diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology,* 50:37-50pp.

Vidali, M., 2001, Bioremediation. An overview, *Pure and Applied Chemistry*, 73(7):1163-1173pp.

Volkering, F., Breure, A.M. and Rulkens, W.H., 1998, Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation, *Biodegradation*, 8: 401–417pp.

Wang, Y.B., Liu, C.W., Kao, Y.H. and Jang C.S., 2015, Characterization and risk assessment of PAH-contaminated river sediment by using advanced multivariate methods, *Science of the Total Environment* 524–525:63–73pp.

Watanabe, K., Teramoto, M. and Harayama, S., 2002, Stable augmantation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium, *Environmental Microbiology,* 4(10):577–83pp.

Wild, S.R and Jones, K.C., 1993, Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(1):5-12pp.

Wilson, S.C. and Jones, K.C, 1993, Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Environmental Pollution*, 81:229-249pp.

Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Yao, Z., Zhang, L., Bie, X., Lu, F. and Lu, Z., 2012, Genome shuffling of Bacillus amyloliquefaciens for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39:889–896pp.

ÖZGEÇMİŞ

Caner Vural, 15 Eylül 1982 yılında Ankara'da dünyaya gelmiştir. Sırasıyla; 1993 yılında Adana Cebesoy İlkokulu'ndan, 1996 yılında Adana 24 Kasım Ortaokulu'ndan, 1999 yılında Ankara Batıkent Kaya Beyazıtoğlu Lisesi'nden, 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başlamış ve 2007 yılında LLP/ Erasmus öğrenci değişim programı bursunu kazanarak Hollanda Groningen Üniversitesi Tıp Merkezine bağlı Biyomedikal Mühendisliği bölümünde 3 ay süre ile çalışmıştır.

Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. 2009 yılında Araştırma Görevliliği süresi dolduğu için Teknisyen kadrosuna atanmıştır. Aynı yıl lisansüstü tez savunmasını vererek yüksek lisansını tamamlamıştır. Yine 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başlamıştır. 2011 yılında Ege Üniversitesi Rektörlüğü Personel Dairesi Başkanlığı'nın açmış olduğu ünvan değişikliği sınavını kazanarak Biyolog ünvanı ile Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne atanmıştır.

2014 – 2015 yılları arasında 6 ay süre ile Ankara'da bulunan Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ziyaretçi araştırmacı olarak görevlendirilmiştir ve Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araşturma Merkezi ile ortak olarak doktora deneyimlerini arttımak için çeşitli laboratuvar çalışmaları yürütmüştür. Halen Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Biyolog ünvanı ile çalışmakta ve Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda akademik çalışmalarını sürdürmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.