

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Priestia megaterium SA3'ÜN 2,4-DCP'Yİ BİYODEGRADASYON
OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar SERDAR

EKİM 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Priestia megaterium* SA3'ÜN 2,4-DCP'Yİ BİYODEGRADASYON
OPTİMİZASYONU**

Pınar SERDAR

ORCID :

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 / 09 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 24 / 10 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

ORCID :

Tez İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Hatice KATI

Trabzon 2025

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Pınar SERDAR Tarafından Hazırlanan**

***Priestia megaterium* SA3'ÜN 2,4-DCP'Yİ BİYODEGRADASYON
OPTİMİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 25 / 09 / 2025 gün ve 2121 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“*Priestia megaterium* SA3’ün 2,4-DCP’yi Biyodegradasyon Optimizasyonu” isimli tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı’nda hazırlanmıştır.

Bu çalışma süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, çalışmamın yürütülmesi sürecinde, laboratuvar uygulamaları ve araştırmalarım boyunca her zaman desteğini esirgemeyen, kendisinin değerli katkıları, yönlendirmeleri ve anlayışlı yaklaşımı, çalışmamın gelişiminde büyük rol oynamış ikinci danışman hocam Prof. Dr. Hatice KATI’ya, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, laboratuvar çalışmalarımnda her zaman yanımda olduğunu hissettiren, yol göstericiliği, anlayışı ve samimiyeti bu çalışmanın gerçekleşmesinde benim için büyük bir güç kaynağı olmuş değerli hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, tez çalışmam kapsamında transkriptom analizine destek sağlayan hocam Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e, MTT analizinde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU ŞENOCAK ve Ömer Faruk Öztürk’e, fitotoksitite analizi için bilgi birikiminden faydalandığım Dr. Murat KAÇAĞAN’a çalışmaya verdikleri katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince her zaman yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen eşim Miraç SERDAR ve çocuklarım Tuana Ebrar SERDAR ve Burak Haktan SERDAR’a teşekkürlerimi sunarım.

Pınar SERDAR

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Priestia megaterium* SA3’ün 2,4-DCP’yi Biyodegradasyon Optimizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verilen/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 24/10/2025

Pınar SERDAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Klorofenoller ve Toksisite.....	3
1.3. 2,4-Diklorofenol ve Kimyasal Özellikleri.....	8
1.4. 1.4. Klorofenollerin Bozunmasına Yönelik Yaklaşımlar.....	9
1.4.1. Fotodegradasyon	10
1.4.2. Kimyasal Degradasyon (Oksidasyon, Redüksiyon, Hidroliz)	10
1.4.3. Adsorpsiyon ve Toprak Etkileşimi	10
1.4.4. Biyolojik Degradasyon (Biyodegradasyon).....	11
1.5. 2,4-DCP'nin Biyolojik Gideriminde Mikroorganizma Seçimi	12
1.6. DCP'nin Bakteriyal Degredasyonunda <i>Bacillus</i> ve <i>Priestia</i> Cinslerinin Rolü	13
1.7. Klorofenollerin Bakteriyal Degredasyon Yolakları	15
1.8. 2,4-DCP'nin Bakteriyel Bozunumu.....	16
1.9. 2,4-Diklorofenol'ün Çevresel Kaynakları ve Riskleri	18
1.10. 2,4-Diklorofenol'ün Biyolojik Bozunmasına Yönelik Yaklaşımlar ve Enzimlerin Rolü	19
1.11. Klorofenol Degredasyonunda Etkin Olan Bakteriyal Genler.....	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25
2.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	25
2.2. Kullanılan Besiyerleri.....	25
2.3. Kullanılan Tamponlar.....	26
2.4. Kullanılan Bakteriler ve Hücreler	26

2.5.	2,4-DCP'yi Degrede Edebilen Bakteriyal İzolatların Seçimi	27
2.6.	<i>Priestia megaterium</i> SA3 İzolatının Kültür Ortamında 2,4-DCP'yi Degredasyonunun Optimizasyonu	28
2.7.	<i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP Degradasyonun HPLC ile Analizi.....	28
2.8.	<i>Priestia megaterium</i> SA3'ün Transkriptom Analizi ile 2,4-DCP'yi Degradasyonunda Rol Alan Muhtemel Genlerinin Belirlenmesi.....	29
2.9.	2,4-DCP İçeren ve İçermeyen <i>Priestia megaterium</i> SA3 Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu.....	29
2.10.	Transkriptom Analizi	30
2.10.1.	RNA-Seq Kütüphane Hazırlama ve Dizileme	30
2.10.2.	Ham Veri Kalite Kontrolü ve Filtreleme	31
2.10.3.	Okuma Hizalama ve Gen İfadesi Nicelleştirme.....	31
2.10.4.	Diferansiyel Gen Ekspresyon Analizi.....	32
2.10.5.	Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (GO Analizi).....	32
2.10.6.	Veri Görselleştirme	33
2.11.	<i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP'yi Degradasyonunun Toksisite Testleri.....	33
2.11.1.	Hücre Toksisite Testi (MTT).....	33
2.11.2.	Fitotoksisite Testi.....	34
3.	BULGULAR.....	36
3.1.	2,4-DCP'yi Karbon Kaynağı Olarak Kullanan En İyi Bakteriyal İzolatın Seçimi	36
3.2.	<i>Priestia megaterium</i> SA3 İzolatının 2,4-DCP'yi Degredasyonunun Optimizasyonu.....	37
3.3.	Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	37
3.4.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	38
3.5.	Substrat (2,4-DCP) miktarının Optimizasyonu	39
3.6.	İnoküle Edilen Bakteri Miktarının 2,4-DCP Biyodegradasyona Etkisinin Optimizasyonu	41
3.7.	Minimal Besiyerine İlave Edilen Ek Karbon Kaynaklarının 2,4-DCP Degradasyonuna Etkisinin Optimizasyonu	42
3.8.	Minimal Besiyerine İlave Edilen Glukoz Konsantrasyonunun 2,4-DCP Degradasyonuna Etkisinin Optimizasyonu	43
3.9.	2,4-DCP içeren MSM Besiyerinde Çalkalama Hızının Biyodegradasyona Etkisinin Optimizasyonu	44
3.10.	2,4-DCP İçeren MSM Besiyerinde <i>Priestia megaterium</i> SA3 Kültürünün İnokülasyon Süresinin Biyodegradasyona Etkisinin Optimizasyonu	45
3.11.	HPLC Sonuçları	46

3.12. Transkriptom Analizi	47
3.13. RNA-Seq Veri Kalitesi.....	47
3.14. Okuma Hizalama Sonuçları.....	48
3.15. Diferansiyel Gen Ekspresyon Sonuçları.....	49
3.16. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizleri (GO).....	52
3.17. 2,4-DCP Degredasyonunun Sitotoksik Etkisi	54
3.18. 2,4-DCP Degredasyonunun Fitotoksik Etkisi	55
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇLAR.....	64
6. ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

Priestia megaterium SA3'ÜN 2,4-DCP'Yİ BİYODEGRADASYON OPTİMİZASYONU

Pınar SERDAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabil Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 84 Sayfa

Klorofenoller hem ekosistemler hem de insan sağlığı açısından önemli riskler oluşturmaktadır. Çok farklı nedenlerle tabiata salınmaktadırlar. Bir klorofenol olan 2,4-D bir herbisit olup tarım alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. 2,4-DCP, 2,4-D'nin degradasyon ürünlerinden bir olup sağlık açısından oldukça zararlıdır.

2,4-DCP'nin degradasyonu oluşturduğu risklerin ortadan kaldırılması açısından önem arz etmektedir. Farklı yaklaşımlar ile degradasyon mümkündür ancak bunlar arasında yer alan biyodegradasyon ürettiği son ürün dikkate alındığında en doğa dostu olandır. Bu çalışmada 2,4-DCP'nin yerel bir izolat olan *Priestia megaterium* SA3 tarafından biyodegradasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla minimal besiyerinde belli oranlarda 2,4-DCP içeren kültürler yapılmış olup inkübasyonlar neticesinde 2,4-DCP'nin degradasyonu fenol tayin analizi ile teyid edilmiştir. Ardından bakteriyal izolatın 2,4-DCP'yi degradasyonunun kültürde optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Degradasyon HPLC analizi ile teyid edilmiştir. Kültürde 2,4-DCP'nin degradasyonu sırasında *Priestia megaterium* SA3'ün gen regülasyonundaki değişim transkriptom analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca kültürün inkübasyonu sonucunda oluşan son degradasyon ürünlerinin toksititesi fitotoksitite ve sitotoksitite testleri ile gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda *Priestia megaterium* SA3 bakterisinin 50-100 ppm aralığında 2,4-DCP'yi biyodegrade edebildiği ve oluşan son ürünlerin toksititelerinin 2,4-DCP'ye göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum dikkate alındığında çalışma sonuçları çevre dostu bir yaklaşımı ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: 2,4-DCP, toksitite, *Priestia megaterium* SA3

Master Thesis

SUMMARY

OPTIMIZATION OF 2,4-DICHLOROPHENOL BIODEGRADATION BY *Priestia megaterium* SA3

Pınar SERDAR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 84 Pages

Chlorophenols pose significant risks to both ecosystems and human health. They are released into the environment for a variety of reasons. 2,4-D, a chlorophenol, is a herbicide and is extensively used in agricultural areas. 2,4-DCP is one of the degradation products of 2,4-D and is highly harmful to health.

Degradation of 2,4-DCP is crucial for eliminating the risks it poses. Degradation is possible using various approaches, but biodegradation is the most environmentally friendly approach considering the end product it produces. In this study, the biodegradation of 2,4-DCP by a local isolate, *Priestia megaterium* SA3, was studied. For this purpose, cultures containing certain amounts of 2,4-DCP were cultivated in minimal medium, and after incubations, 2,4-DCP degradation was confirmed by phenol determination analysis. Subsequently, the bacterial isolate's 2,4-DCP degradation was optimized in culture. Degradation was confirmed by HPLC analysis. Transcriptome analysis revealed changes in gene regulation in *Priestia megaterium* SA3 during 2,4-DCP degradation in culture. Furthermore, the toxicity of the final degradation products formed during culture incubation was demonstrated by phytotoxicity and cytotoxicity tests.

The study revealed that *Priestia megaterium* SA3 can biodegrade 2,4-DCP at concentrations around 50-100 ppm, and the toxicity of the final products is much lower than that of 2,4-DCP. Considering this, the study results demonstrate an environmentally friendly approach.

Key Words: 2,4-DCP, toxicity, *Priestia megaterium* SA3

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Klorofenollerin ve türevlerinin kimyasal yapıları	5
Şekil 2. 2,4-Diklorofenol'ün 2D yapısı	9
Şekil 3. 2,4-diklorofenolün bakteriyal bozunma yolları (a) orto-kırılma, (b) distal meta-kırılma	17
Şekil 4. Klorofenoller ve poli-klorofenollerin anaerobik bozunumu. (a) pentaklorofenolün anaerobik dehalojenasyonu ve bozunumu, (b) 2-klorofenol için iki biyotransformasyon yolu (c) 2,4-diklorofenol için anaerobik minerilizasyon.....	17
Şekil 5. 2,4-diklorofenolün biyolojik bozunma yolları. (0) 2,4-diklorofenol, (1) 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol), (2) 2,4-dikloro-6-(2,4-diklorofenoksi) fenol, (3) Hidrokinon, (4) Fenol, (5) Benzoquinon.	21
Şekil 6. Elli ppm 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde izolatların üreme görüntüleri A: <i>Serratia proteamaculans</i> ABT1, B: <i>Stutzerimonas stutzeri</i> FAD2, C: <i>Lelliotia steviae</i> ABT2, D: <i>Priestia megaterium</i> SA3, E: <i>Klebsiella varicola</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Petdeg9.....	36
Şekil 7. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP içeren ortamda üremesine pH'ın etkisi.....	37
Şekil 8. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine pH'ın etkisi.....	38
Şekil 9. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP içeren ortamda üremesine sıcaklığın etkisi	39
Şekil 10. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine sıcaklığın etkisi	39
Şekil 11. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün üremesine 2,4-DCP konsantrasyonunun etkisi.....	40
Şekil 12. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine 2,4-DCP konsantrasyonunun etkisi.....	40
Şekil 13. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün üremesine inoküle edilen bakteri miktarının etkisi.....	41
Şekil 14. İnoküle edilen bakteri miktarının 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 15. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün üremesine karbon kaynağı etkisi	42
Şekil 16. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün 2,4-DCP'yi biyodegradasyonuna karbon kaynağı etkisi	42

Şekil 17.	2,4-DCP içeren MSM besiyerinde <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün üremesine glukoz konsantrasyonunun etkisi	43
Şekil 18.	Glukoz Konsantrasyonunun 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu üzerine etkisi.....	43
Şekil 19.	2,4-DCP içeren MSM besiyerinde <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün üremesine çalkalama hızının etkisi	44
Şekil 20.	<i>Priestia megaterium</i> SA3'ün çalkalama hızının (rpm) 2,4-DCP'nin biyodegradasyona etkisi.....	44
Şekil 21.	İnokülasyon süresinin bakteri üremesine etkisi.....	45
Şekil 22.	İnokülasyon süresinin 2,4-DCP' nin biyodegradasyonuna etkisi.....	45
Şekil 23.	50 ppm 2,4-DCP+MSM'ye ait HPLC grafiği	46
Şekil 24.	50 ppm 2,4-DCP+MSM + <i>Priestia megaterium</i> SA3 'ye ait süpernatantın HPLC grafiği.....	46
Şekil 25.	<i>Priestia megaterium</i> SA3 izolatından izole edilen RNA örnekleri. (1) MSM ve (2) 2,4-DCP+ MSM ortamda üretilen <i>Priestia megaterium</i> SA3'den izole edilen total RNA.....	47
Şekil 26.	S2 ve S1 (2,4-DCP uygulanmamış ve uygulanmış hücre) koşulları arasındaki diferansiyel gen ekspresyonunu gösteren volkan grafiği	50
Şekil 27.	S2 ve S1 koşulları arasında, FDR değerine göre sıralanmış en anlamlı 50 diferansiyel olarak eksprese genin ısı haritası	51
Şekil 28.	Birleşik (BOTH) gen listesi için biyolojik süreç (GO:BP) kategorilerinde yapılan fonksiyonel zenginleştirme analizinin bar grafiği.....	54
Şekil 29.	Birleşik (BOTH) gen listesi için biyolojik süreç (GO:BP) kategorilerinde yapılan fonksiyonel zenginleştirme analizinin balon grafiği.....	54
Şekil 30.	HDFa hücre hattı kullanılarak yapılan MTT testi sonucunda elde edilen % canlılık değerleri.....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. 2,4-DCP degradasyonu için MSM besiyerinde üretilen bakteriyal izolatların 24 saatlik OD ₆₀₀ değerleri.....	36
Tablo 2. Filtreleme ve trimleme sonuçları karşılaştırması.....	48
Tablo 3. Referans genoma göre hizalama sonuçlarının karşılaştırılması.....	48
Tablo 4. En anlamlı 10 diferansiyel olarak ifade edilen gen (FDR değerine göre sıralı).....	52
Tablo 5. <i>Priestia megaterium</i> SA3'ün inkübasyonu ile elde edilen kültür süpernatantları ile yapılan Börülce fasülyesi fitotoksisite çalışması sonuçları.....	56

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ddH ₂ O	: Çift distile su
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dk.	: Dakika
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
LB	: Luria Bertani Broth
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
mRNA	: Elçi RNA
MSM	: Minimal Salt Medium
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	: Sodyum klorür
OD	: Optikal Yoğunluk
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
sn.	: Saniye
U	: Ünite
°C	: Derece
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
2,4-DCP	: 2,4-diklorofenol

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde çevre kirliliği, sanayileşme, tarımsal faaliyetler ve günlük yaşamda yaygın olarak kullanılan kimyasallar nedeniyle giderek artan küresel bir sorun haline gelmiştir. Bu kirlilik kaynaklarından biri olan klorofenoller, hem ekosistemler hem de insan sağlığı açısından önemli riskler barındırmaktadır. Klorofenoller; fenol halkasına bir veya daha fazla klor atomunun bağlanmasıyla oluşan, doğada zor bozunan ve bu nedenle “ksenobiyotik” olarak tanımlanan organik bileşiklerdir [Crosby, 1981; Kumaran ve ark., 1996].

Bu bileşikler; ahşap koruyucular, böcek ve mantar öldürücüler, soğutma suyu inhibitörleri, pestisitler, herbisitler, biyositler ve çeşitli endüstriyel ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [Tobajas ve ark., 2012]. Ayrıca, kağıt ve kağıt hamuru fabrikaları, tekstil, ilaç, petrokimya ve rafineri gibi sektörlerin atık sularında sıkça tespit edilmiştir [Owens, 1991; Hassan ve ark., 2016].

Klorofenoller, yalnızca endüstriyel kaynaklı olmayıp, içme ve atık suların klorlanması sonucu da ikincil ürün olarak oluşabilmektedir [Şahinkaya ve Dilek, 2007]. Bu maddelerin çevredeki kalıcılığı; kimyasal yapısı, toprak yapısı, sıcaklık, nem, pH ve güneş ışığı gibi birçok faktöre bağlı olarak günlerden yıllara kadar sürebilmektedir [Doxtader ve Croissant, 1992].

Klorofenoller, hem suda hem de karasal ortamlarda güçlü biyosidik etkileri ve keskin kokuları ile canlı organizmalar için ciddi riskler oluştururlar. İnsanlarda ağız yaraları, ishal, uykusuzluk ve görme bozukluklara neden olabilmektedirler [Hollinger ve ark., 1988]. Klorofenollerin birçoğu biyokimyasal fonksiyonları inhibe ederken, aynı zamanda substrat inhibitörü olarak biyotransformasyon süreçlerini de baskılar [Boyd ve ark., 1989; Ganthner ve Wackett, 1991]. Bu özellikleri nedeniyle ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmışlardır [LaGrega ve ark., 1994].

Klorofenoller arasında özellikle dikkat çeken bileşiklerden biri olan 2,4-diklorofenol (2,4-DCP); hem doğrudan endüstriyel kullanım sonucu çevreye yayılmakta hem de çevrede yaygın bulunan bazı bileşiklerin bozunması ile ikincil olarak oluşmaktadır. Özellikle triklosan (TCS) gibi yaygın kullanılan antimikrobiyal ajanların çevresel dönüşümü

sonucunda oluşan 2,4-DCP, ciddi çevresel ve sağlık tehditleri oluşturmaktadır [Canosa ve ark., 2005]. TCS, 30 yılı aşkın süredir kişisel bakım ürünlerinde kullanılmakta, lipofilik yapısı nedeniyle çevrede birikmekte ve UV ışığı ile 2,4-DCP gibi toksik bileşiklere dönüşebilmektedir [Bedoux ve ark., 2012; Dann ve Hontela, 2011].

2,4-DCP, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinin atıklarında ortalama 14,49 µg/L düzeyinde tespit edilmiş olup [Kumar ve ark., 2013], besin zincirine girerek insan sağlığına ulaşmaktadır. Nitekim insan idrarında 0,8–1,0 µg/L düzeylerinde 2,4-DCP tespit edilmiştir [Ye ve ark., 2012]. EPA tarafından bildirilen vakalarda, erimiş haldeki 2,4-DCP'nin yalnızca vücut yüzeyinin %1'ine temas etmesi durumunda dahi ölümcül olabileceği rapor edilmiştir [Kintz ve ark., 1995].

Benzer şekilde, tarımsal faaliyetler kapsamında yaygın olarak kullanılan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) gibi herbisitler de çevresel 2,4-DCP yükünü artırmaktadır. 2,4-D, geniş yapraklı otların kontrolü amacıyla sıklıkla tercih edilen bir herbisit olup, toprakta birikerek sızıntı yoluyla yer altı su kaynaklarını kirletmektedir [Munro ve ark., 1992; Sparks, 2003]. Bozunması sonucu 2,4-DCP gibi toksik ara ürünlerin oluşması çevre sağlığı açısından ilave bir tehdit oluşturur [Kumar ve ark., 2016].

Pestisitlerin çevresel davranışları, kimyasal yapılarına ve çevresel koşullara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Çözünürlük, kalıcılık, adsorpsiyon kapasitesi ve toksisite gibi özellikleri, onların çevrede birikme potansiyelini artırır [Guthrie ve Perry, 1980]. Nitekim birçok pestisit; toprak, su ve hava yoluyla çevreye yayılmakta, bitkiler ve hayvanlar tarafından absorbe edilerek biyobirikime neden olmaktadır [Doxtader ve Croissant, 1992]. Bu bağlamda, mikrobiyal faaliyetlerle gerçekleşen biyolojik parçalanma, pestisitlerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır.

Klorofenollerin doğadaki kalıcılıkları, yalnızca fiziksel ve kimyasal dirençlerinden değil, aynı zamanda mikrobiyal sistemler tarafından parçalanmalarındaki zorluklardan da kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalar tarafından biyolojik yollarla parçalanabildikleri de rapor edilmiştir. Literatürde, bu tür toksik ve dirençli aromatik bileşiklerin abiyotik (fotodekompozisyon, uçuculuk vb.) ve biyotik (mikrobiyal) süreçlerle belirli oranda zayıflatılabileceği belirtilmektedir [Boyd ve Shelton, 1984; Ganthner ve Wackett, 1991]. Bu durum, biyolojik arıtım yaklaşımlarının önemini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda geleneksel fiziksel ve kimyasal arıtım yöntemlerinin; toksik ara ürün üretimi, maliyet, enerji ihtiyacı gibi nedenlerle yetersiz kaldığı görülmüştür. Bu bağlamda, ekonomik ve çevre dostu biyolojik arıtım yöntemleri, özellikle Klorofenoller gibi dirençli

kirleticilerin giderilmesinde önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır [Geed ve ark., 2017]. Toprak ve suda bulunan mikroorganizmalar, çeşitli pestisitleri ve türevlerini parçalayarak bu bileşiklerin etkilerini azaltma potansiyeline sahiptir [Doxtader ve Croissant, 1992].

Sonuç olarak, 2,4-diklorofenol (2,4-DCP), hem doğrudan endüstriyel kaynaklardan hem de TCS gibi öncül bileşiklerin çevresel bozunmasıyla oluşarak doğaya yayılmakta; çevresel ve halk sağlığı açısından önemli riskler barındırmaktadır. Bu durum, 2,4-DCP'nin giderimi için yenilikçi ve etkili biyolojik yaklaşımların geliştirilmesini kaçınılmaz kılmaktadır.

Bu çalışmada, özellikle 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) bileşiği üzerinde ele alınmış ve bu maddenin biyodegradasyonu optimize edilmiştir. 2,4-DCP'nin toksik etkileri, kalıcılığı, biyobirikimi ve parçalanabilirliği; hem temel çevre bilimleri hem de biyoteknolojik yaklaşımlar açısından önemli bir inceleme alanı oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada 2,4-DCP'yi parçalayarak zararlı etkilerini azaltan biyolojik bir degradasyon süreci üzerinde durulmaktadır. Bu amaçla 2,4-DCP'yi karbon kaynağı olarak kullanarak degrade edebilen yerli bir bakteriyal izolatın degradasyon kapasitesi ve degradasyon ürünleri araştırılmıştır. Bu bağlamda çalışmanın temel amacı, 2,4-DCP'nin toksisite düzeyini ve biyolojik olarak parçalanma potansiyelini değerlendirmek ve bu bilgiler ışığında etkili bir biyolojik iyileştirme stratejisi ortaya koymaktır.

1.2. Klorofenoller ve Toksisite

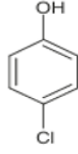
Klorofenoller, benzen halkasına bağlı bir ya da daha fazla klor içeren fenol yapısındaki renksiz, zayıf asidik ve zehirli organik bileşiklerdir. Yani, klorofenoller, bir veya daha fazla kovalent bağlı klor atomu içeren fenol türevleridir. Bakteri, böcek ve zararlı ot öldürücü olarak kullanılan bu bileşiklerin büyük bir bölümü fenolün klorla tepkimeye sokulmasıyla, bazıları da poliklorlu benzenin hidrolizi ile elde edilebilir.

Klorofenoller, USA EPA'nın ve Avrupa Birliği Çevre Yönetmeliği'nin (2455/2001/EC) birinci dereceden toksik kirleticiler grubunda yer alır. Çünkü klorofenollerin pek çoğu toksiktir; biyolojik parçalanması ve çevreden giderimi çok zor, kanserojen ve mutajenik özellikleri nedeniyle ekolojik önem taşıyan kirleticiler arasında yer almaktadırlar. Yarılanma ömrü aerobik sularda 3,5 aya çıkarken, organik sedimentlerde birkaç yılı bulabilir. Kirliliğe neden olabilecek pek çok kaynak olabilir. Klorofenoller,

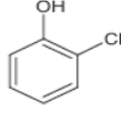
Çevreye; içme sularının dezenfeksiyon amacıyla klorlanması, atıkların yakılması, pestisit ve herbisitlerin kontrolsüz kullanımı ve kâğıt endüstrisinde klorla ağartma sonucu yan ürün oluşumu gibi çoğunlukla insan aktiviteleri sonucu geçer. Ayrıca odun, boya, bitkisel lifler ve dericilikte koruma ve dezenfeksiyonda kullanılır. Yabancı ot, mantar, böcek öldürücü ve tarım ilacı, eczacılıkta ilaç üretiminde ve boya üretiminde hammadde veya sentez ara ürünü olarak da pek çok endüstriyel işlemden kullanılır. Klorofenollerin yoğun olarak kullanımları, yeraltı ve yüzeysel sularda değişik derişimlerde klorofenol kirliliğine neden olmaktadır. İçme suyunda klorofenol derişimi Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1 µg.L⁻¹ olarak belirlenmiştir. 0,1 µg.L⁻¹ gibi düşük derişimlerde içme sularında kötü koku ve tada neden olabilir ve çevreyi olumsuz yönde etkiler [Uysal ve Türkman, 2004]



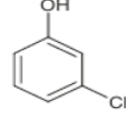
MONOKLOROFENOLLER



4-Klorofenol

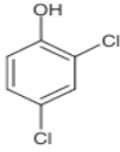


2-Klorofenol

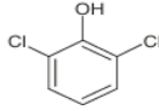


3-Klorofenol

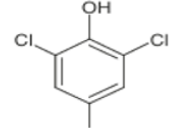
POLİKLOROFENOLLER



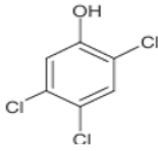
2,4-Diklorofenol



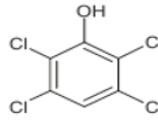
2,6-Diklorofenol



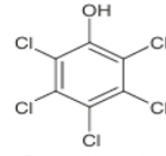
2,4,6-Triklorofenol



2,4,5-Triklorofenol

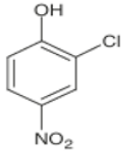


2,4,5,6-Tetraklorofenol

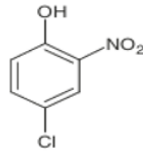


Pentaklorofenol

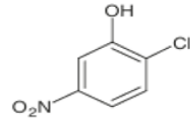
KLORONİTROFENOLLER



2-Kloro-4-nitrofenol

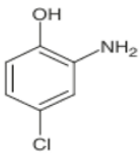


4-Kloro-2-nitrofenol

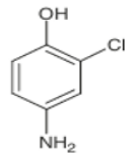


2-Kloro-5-nitrofenol

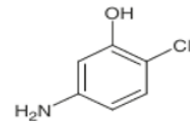
KLOROAMİNOFENOLLER



4-Kloro-2-aminofenol

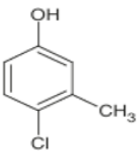


2-Kloro-4-aminofenol

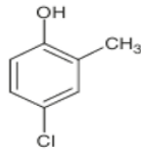


2-Kloro-5-aminofenol

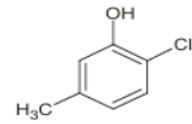
KLOROMETİLFENOLLER



4-Kloro-3-metilfenol



4-Kloro-2-metilfenol



2-Kloro-5-metilfenol

Şekil 1. Klorofenollerin ve türevlerinin kimyasal yapıları

Antimikrobiyal özellikleri ve kimyasal kararlılıkları sayesinde klorofenoller geçmişte herbisit, pestisit ve dezenfektan olarak yaygın şekilde kullanılmışlardır. Ancak düşük biyolojik parçalanabilirlikleri ve çevresel kalıcılıkları, yer altı ve yüzey sularında ciddi kirlenmelere neden olmaktadır [Wen ve ark., 2013; Ya ve ark., 2017].

Toksitite, biyolojik sistemleri olumsuz etkileme yeteneği olarak tanımlanan kimyasal maddelerin özelliğidir. Genellikle, biyolojik sistem içinde yayılma derecesi ve zamanı, kimyasal miktarı ile ilişkilendirilir. Klorofenollerin toksikliği, bağlı klor sayısı arttıkça artar. Klorofenoller, çevrede toksik etkileri ve biyolojik olarak zor parçalanabilen yapıları nedeniyle kalıcı organik kirleticiler (POPs) sınıfında yer almaktadır.

Hidroksil grupları ile ilgili olarak 3 veya 3,5-pozisyonunda klor atomu içeren klorofenollerde 2 veya 2,6-pozisyonundaki izomerlerine göre mikrobiyal bozunmaya karşı daha kararlı olduğu bilinmektedir (Liu ve Ark., 1982; Saito ve Ark., 1991). Ayrıca 2-pozisyonunda klor atomu bağlı olan klorofenollerin diğer klorofenollerden daha az toksik olduğu gözlemlenmiştir. Eğer klor atomları 3-, 4- ve 5- pozisyonunda bağlı ise klorofenollerin toksikliği artar. Bu kural diğer klorofenollerle karşılaştırıldığında 3,4,5-triklorofenolün neden daha yüksek toksikliğe sahip olduğunu açıklayabilir. Bu aynı zamanda 2,6-diklorofenol ve 3,5-diklorofenolün toksisitelerini karşılaştırarak da doğrulanabilir. Yapılan araştırmalarda 2,6- diklorofenolün 3,5-diklorofenole göre daha az toksik olduğu rapor edilmiştir (SalkinojaSalonen ve Ark., 1981; Saito ve Ark., 1991). Bu gerçeklerden yola çıkarak poliklorofenollerin diğer klorofenollerden daha toksik olduğu ileri sürülebilir. Bunun tersine, Liu ve Ark. (1982) ve Saito ve Ark. (1991) tarafından yapılan araştırmalar göstermiştir ki 3,4,5-triklorofenoller gerçekte daha az toksiktir.

Bütün klorofenoller, fitotoksik etki gösterir ve organik halkada klor sayısı arttıkça ve klor atomu orto-pozisyonu yerine meta veya para pozisyonunda yer aldıkça organizmalarda biyolojik olarak da birikme eğilimindedir. Daha fazla klor içeren klorofenollerin lipofilik (yağda çözünebilme) özelliği arttığından organizma içine daha yüksek oranda alınır ve toksik etkisi daha fazla olur. Orto-substitüe cinsler genellikle meta ve paraya göre daha düşük toksisitelidir, çünkü orto-substitüe klorlar organizmalara aktif olarak bağlanan hidroksil grubuna engel olur. Diğer yandan, klorofenollerin ayrışması düşük pH değerlerinde daha baskındır bu nedenle asidik ortamlarda klorofenoller daha toksiktir.

Bu bileşikler, özellikle pestisit ve antiseptik üretim süreçlerinden sonra doğrudan veya dolaylı yollarla çevreye yayılmaktadır [Olaniran ve Igbinsosa, 2011]. Bu durum, klorofenollerin hem karasal hem de sucul ekosistemler üzerinde uzun vadeli ve ciddi etkiler

oluşturmasına yol açmaktadır. Klorofenoller, özellikle tekstil kimyasında bakteri, küf ve mantar oluşumunu önlemek amacıyla kullanılan yardımcı kimyasal maddeler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, insan vücudunda terleme sonucu oluşabilecek bakteriyel faaliyetlerin neden olduğu kötü kokuların giderilmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar. Ancak, bu bileşikler cilt yoluyla, solunum veya terleme aracılığıyla emilebildikleri için, başta üreme sistemi olmak üzere çeşitli biyolojik sistemler üzerinde toksik etkiler oluşturabilmektedir. Bu toksik etkiler nedeniyle, klorofenoller bazı ülkelerde yasaklı kimyasallar sınıfına alınmıştır.

Bu grupta yer alan ve kimya endüstrisinde pestisit üretimi için ham madde olarak yaygın biçimde kullanılan bileşiklerden biri de 2,4-diklorofenol'dür [Cao ve ark., 2016; Wen ve ark., 2013]. Yüksek toksisiteye sahip olan bu bileşik, sınırlı biyo-bozunabilirliği nedeniyle çevre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dolayısıyla, Klorofenollerin ve özellikle 2,4-DCP'nin etkili bir şekilde giderilmesi, çevresel sürdürülebilirlik açısından kritik öneme sahiptir.

Klorofenoller arasında çevresel önemi en fazla olanlardan biri olan 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) hem triklosanın çevresel bozunma ürünü olması hem de potansiyel kanserojen özellik taşıması nedeniyle öncelikli kirletici olarak tanımlanmıştır [Jiang ve ark., 2017; Xu ve ark., 2016]. 2,4-DCP'nin suda düşük çözünürlüğe sahip olması ve yüksek toksisitesi, sucul organizmalar ve mikroorganizmalar üzerinde ciddi olumsuz etkilere yol açmaktadır.

Bu bağlamda, Klorofenollerin arıtımı için hem biyolojik hem de kimyasal ve elektrokimyasal yöntemler araştırılmaktadır [Zhang, 2003; Arora & Bae, 2014; Lei ve ark., 2019]. Bu süreçlerde, klor atomlarının molekülden uzaklaştırılması (dehalojenasyon), bileşiğin toksisitesini azaltmakta ve biyolojik olarak parçalanabilirliğini artırmaktadır [Farré ve ark., 2007]. Özellikle biyolojik yöntemler, daha az toksik ara ürünler oluşturmaları ve ekonomik olmaları nedeniyle ön plana çıkmaktadır.

Geleneksel fiziksel ve kimyasal arıtma yöntemleri, 2,4-DCP gibi kalıcı bileşiklerini tam olarak uzaklaştırmakta yetersiz kalmakta, hatta süreç sonunda daha toksik ara ürünlerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda biyolojik arıtım yöntemleri alternatif bir çözüm olarak ön plana çıkmaktadır. Bakteri veya mantar temelli biyoremediasyon yaklaşımları, çevre dostu, düşük maliyetli ve daha sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır [Olaniran & Igbiosa, 2011].

Biyolojik bozunma, toksik organik bileşikleri daha az toksik ya da toksik olmayan son ürünlere parçalayan, çevre dostu ve düşük maliyetli bir arıtma yöntemidir [Yan ve ark.,

2017; Felshia ve ark., 2017; Arora ve Bae, 2014]. Ancak, 2,4-DCP gibi yüksek toksisiteye sahip bileşiklerin mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkileri, biyolojik bozunmanın verimliliğini sınırlandırmaktadır [Nalbur ve Alkan, 2007].

Literatürde, 2,4-DCP'nin bozunumu için farklı mikroorganizma türlerinin kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, *Pseudomonas putida* [Kargi ve ark., 2005], *Delftia sp.* [Gonzalez ve ark., 2012] ve *Chlorella fusca* [Tsujiyama ve ark., 2013] gibi mikroorganizmaların bu bileşiği bozabildiği gösterilmiştir. Ancak, yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-DCP'nin parçalanması için gereken sürenin uzun olması, endüstriyel uygulamalarda sorun teşkil etmektedir. Ayrıca, mikrobiyal konsorsiyumlar arasında türler arası antagonizma oluşması, sistemlerin verimliliğini düşürmektedir [Herrera ve ark., 2008].

Son yıllarda, birçok toksik ve dirençli aromatik bileşik çevreye salınmıştır. Bu ksenobiyotiklerle kirlenmiş toprak ve su ekosistemlerinin başarılı bir şekilde biyolojik olarak iyileştirilmesi, uygun mikroorganizmaların mevcudiyetine bağlıdır. Çoğu çalışma bakterilerle yapılmış olsa da, bazı bazidiomiset mantarlar da aromatik ksenobiyotikleri parçalama kapasiteleri nedeniyle dikkat çekmektedir [Bogan ve ark., 1999; Bumpus, 1989].

Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-DCP'yi tolere edebilen ve kısa sürede bozabilen bireysel mikroorganizma suşlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

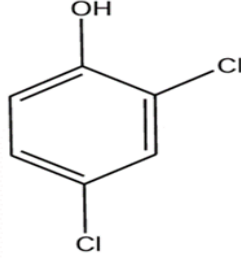
1.3. 2,4-Diklorofenol ve Kimyasal Özellikleri

2,4-diklorofenol (2,4-DCP), önemli bir klorofenolik bileşik olup toksisitesi, çevresel kalıcılığı ve kimya endüstrisindeki kullanımı nedeniyle dikkatle incelenmektedir. Bu bileşiğin arıtılmasına yönelik ilgi son yıllarda giderek artmıştır. 2,4-DCP'nin temel fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir:

- Kimyasal formülü: $C_6H_4Cl_2O$
- Molekül ağırlığı: 163 g/mol
- Erime noktası: 45 °C
- Kaynama noktası: 210 °C (760 mmHg basınçta)

2,4-DCP, renksiz kristal halde bulunan, nötr pH aralığında suda kısmen çözünebilen bir bileşiktir. Etanol, benzen gibi organik çözücülerde ise oldukça iyi çözünür. Hafif asidik karakterde olup, alkali ortamlarda çözündüğünde kendi tuzunu oluşturabilir [EPA, 1980].

Aşağıda 2,4-DCP'nin iki boyutlu kimyasal yapısı sunulmuştur:



Şekil 2. 2,4-Diklorofenol'ün 2D yapısı

1.4. 1.4. Klorofenollerin Bozunmasına Yönelik Yaklaşımlar

Klorofenoller, birçok pestisit ve özellikle herbisit formülasyonlarında yer alan, toksik, kalıcı ve biyolojik olarak zor parçalanan aromatik bileşiklerdir. Çevreye tarımsal uygulamalar, endüstriyel atık deşarjları ve yan ürün oluşumları yoluyla karışabilen bu bileşikler, hem sucul hem de karasal ekosistemlerde önemli bir kirletici grubunu temsil etmektedir [Zhao ve ark., 2009]. Klorofenollerin çevresel etkilerini azaltmak amacıyla, bu bileşiklerin degradasyon mekanizmaları yoğun olarak araştırılmış ve çeşitli parçalanma yolları tanımlanmıştır.

Klorofenolik bileşiklerin çevrede kalıcılığını azaltmak ve toksisitelerini gidermek amacıyla çeşitli arıtma teknolojileri geliştirilmiştir. Bunlar arasında adsorpsiyon [Melián ve ark., 2013], ozonlama [Aziz ve ark., 2018], biyolojik arıtma [Guo ve ark., 2023] ve elektrokimyasal arıtma [Liu ve ark., 2019] gibi yöntemler yer almaktadır. Ancak bu tekniklerin etkinliği, maliyeti ve yan ürün oluşumu açısından bazı sınırlamaları bulunmaktadır.

2,4-DCP ve benzeri bileşiklerin giderimi için çeşitli arıtma teknolojileri geliştirilmiştir. Bu teknolojiler arasında ozonlama, adsorpsiyon, çözücü ekstraksiyonu, ters ozmoz ve biyolojik yöntemler bulunmaktadır [Lu ve ark, 2006; Yasman ve ark., 2006; Hu ve Wang, 2007]. Ancak, fizikokimyasal yöntemlerin yüksek maliyetli ve sınırlı uygulanabilirliğe sahip olması, biyolojik yaklaşımları daha cazip hale getirmektedir. Pek çok çalışma, *Micrococcus sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Mucor sp.* gibi mikroorganizmaların 2,4-DCP'yi parçalayabildiğini göstermiştir [Gallizia ve ark., 2003; Vroumsia ve ark., 2005].

Genel olarak, klorofenolik herbisitlerin parçalanması fiziksel, kimyasal ve biyolojik mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu süreçler; fotodegradasyon, hidroliz, oksidasyon, redüksiyon, adsorpsiyon ve özellikle mikroorganizmaların etkili olduğu biyodegradasyon gibi yollarla ilerlemektedir [Pignatello ve ark., 2006].

1.4.1. Fotodegradasyon

Fotodegradasyon, güneş ışığındaki UV veya görünür ışığın etkisiyle klorofenol moleküllerinin parçalanmasını ifade eder. Bu süreç, özellikle açık arazilerde uygulanan herbisitler için önemlidir. Yüzeyde kalan pestisit kalıntıları, güneş ışığına maruz kaldıklarında fotokimyasal tepkimelerle yapısal olarak değişime uğrayabilir. Bu değişim ya çevre için daha az zararlı ürünlerin oluşumuyla sonuçlanabilir ya da toksik ara ürünler meydana gelebilir [Kudlek ve ark., 2012]. Bu süreçte UV ışınları, klorofenollerin aromatik halkalarında kırılmaları neden olur ve daha az toksik bileşiklerin oluşmasına yol açar [Mill ve ark., 1987]. Ancak, bu tür parçalanmalar yalnızca yüzey sularında etkili olabilmekte ve derin ya da gölgeli ortamlarda sınırlı kalmaktadır.

1.4.2. Kimyasal Degradasyon (Oksidasyon, Redüksiyon, Hidroliz)

Klorofenollerin kimyasal bozunumu ortamdaki bileşiklerin enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlarla (hidroliz, oksidasyon, redüksiyon vb.) parçalanmasıdır. Bu süreç özellikle pH, sıcaklık ve iyonik bileşenlerin etkisiyle hız kazanabilir. Örneğin, ester yapılı herbisitlerin hidrolizi, nötr ya da alkali pH değerlerinde daha hızlı gerçekleşmektedir [Singh ve ark., 2004]. Klorofenollerin kimyasal degradasyonu, genellikle ozon, hidrojen peroksit gibi oksidanlarla veya redüksiyon ajanlarıyla gerçekleşir. Oksidatif degradasyonda, fenolik halka yapısı parçalanarak karboksilik asitler gibi daha biyobozunur formlara dönüşebilir [Goi ve Trapido, 2002]. Hidroliz ise daha çok pestisit esterlerinin parçalanmasında etkili olup klorofenoller de sınırlı etkiye sahiptir.

1.4.3. Adsorpsiyon ve Toprak Etkileşimi

Klorofenolik herbisitler toprak partiküllerine adsorbe olarak biyolojik olarak parçalanmalarına karşı direnç kazanabilir. Bu durum, biyo yararlanabilirliklerini sınırlayarak parçalanma hızlarını azaltabilir [Weber ve ark., 2001]. Ancak, bazı aktif karbon ya da kil mineralleri gibi yüzeyler, bu bileşiklerin geçici tutulmasını sağlayarak sucul ortama geçişlerini engelleyebilir.

Fiziksel kayıplar ise herbisitlerin buharlaşma (volatilizasyon), yüzey akışıyla taşınma veya toprak yüzeyine adsorpsiyon gibi mekanizmalarla çevreden uzaklaştırılmasıdır. Bu mekanizmalar parçalanma değil, çevreden uzaklaşma yolları olsa da çevresel yükün

azalmasına katkıda bulunur. Özellikle uçucu özellikteki bileşiklerde volatilizasyon önemli bir kayıp yolu olabilir [Zhang ve ark., 2018].

1.4.4. Biyolojik Degradasyon (Biyodegradasyon)

Mikrobiyal (biyolojik) bozunma, toprak ve su ortamlarında bulunan mikroorganizmaların herbisit moleküllerini metabolize ederek daha basit ve genellikle toksik olmayan bileşiklere dönüştürmesini içerir. Bu süreç, çevre dostu ve sürdürülebilir bir yöntem olarak değerlendirilmekte olup, herbisit yapısına, mikroorganizma türüne, çevresel koşullara ve mevcut besin elementlerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [Aislabie ve Lloyd-Jones, 1995]. Örneğin bazı *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Sphingomonas* türlerinin, fenolik ve klorlanmış herbisitleri parçaladığı bilinmektedir.

Degradasyon yollarının etkili olması; herbisit kimyasal yapısı, uygulama şekli, çevresel sıcaklık, nem, mikrobiyal aktivite ve toprak yapısı gibi pek çok faktöre bağlıdır. Günümüzde pestisit kalıntılarının azaltılması için biyolojik arıtım teknolojileri ve mikrobiyal temelli yaklaşımlar ön plana çıkmakta, bu yöntemler toksik bileşiklerin çevreye zarar vermeden bertaraf edilmesi açısından umut vadetmektedir [Cycoń ve ark., 2017].

Klorofenollerin çevresel olarak en önemli degradasyon yolu biyolojik parçalanmadır. Bu süreçte bakteriler, mantarlar ve bazı algler gibi mikroorganizmalar klorofenollerini enerji ve karbon kaynağı olarak kullanarak yapısal olarak ayrıştırırlar. Bu parçalanma sırasında dehalojenasyon, hidroksilasyon, aromatik halka açılması gibi çeşitli metabolik adımlar devreye girer [Field ve Sierra-Alvarez, 2008]. Özellikle *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Priestia* türleri gibi mikroorganizmalar, 2,4-diklorofenol gibi bileşiklerini parçalayabilme yeteneğine sahiptir [Sridevi ve ark., 2012].

Dehalojenasyon, klor atomlarının hidrojene dönüşmesiyle gerçekleşen birincil adımdır. Bu adımı takip eden aromatik halka açılması ile molekül biyolojik olarak daha kolay parçalanabilir hale gelir. Biyodegradasyon süreci, ortamın pH'ı, sıcaklığı, oksijen düzeyi, mevcut mikroorganizma türleri ve organik madde yoğunluğu gibi çeşitli çevresel parametrelerden etkilenmektedir.

Klorofenollerin giderimi için fizikokimyasal ve biyolojik pek çok yöntem geliştirilmiştir. Ancak, bazı konvansiyonel yöntemler yüksek maliyet, yetersiz bozunma ve toksik ara ürünlerin oluşması gibi dezavantajlara sahiptir [Olaniran ve Igbiosa, 2011]. Buna

karşılık biyolojik arıtım yöntemleri, çevre dostu ve ekonomik olmaları bakımından tercih edilmektedir.

Fiziksel ve kimyasal yöntemlere kıyasla, biyolojik prosesler çevre dostu, düşük maliyetli ve kalıntı oluşturmeyen çözümler sunmaktadır [Gallizia ve ark., 2003]. Özellikle bazı aerobik mikroorganizmalar 2,4-DCP'yi oksidatif deklorinasyon yoluyla parçalayabilirken, bazı anaerobik organizmalar ise redüktif deklorinasyon gerçekleştirebilmektedir [Annachhatre ve Gheewala, 1996; Vroumsia ve ark., 2005; Lin ve ark., 2008]. Bununla birlikte, mikrobiyal arıtma süreçlerinin süresi nispeten uzun olabilir. Bu nedenle, literatürde bu süreyi kısaltmak ve verimliliği artırmak amacıyla enzimatik arıtım süreçlerinin kullanılması önerilmektedir [Tabak ve ark., 2009].

Bu yöntemlerle kirleticiler, inorganik bileşenlere kadar parçalanarak tamamen yok edilebilmektedir. Klorofenollerin biyolojik bozunması, özellikle bakteriler (özellikle *Bacillus* türleri), mantarlar ve algler kullanılarak başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir [Chris Felshia ve ark., 2018; Sandhibigraha ve ark., 2020]. Bu bağlamda, fenol ve klorofenollerle kirlenmiş atık suların çevreye deşarj edilmeden önce etkin biçimde arıtılması büyük önem taşımaktadır.

1.5. 2,4-DCP'nin Biyolojik Gideriminde Mikroorganizma Seçimi

Biyolojik bozunma, toksik bileşikler daha az toksik ya da toksik olmayan son ürünlere dönüştüren çevre dostu ve uygun maliyetli bir yöntemdir [Yan ve ark., 2017; Felshia ve ark., 2017; Arora ve Bae, 2014]. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda 2,4-DCP'nin mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki göstermesi, biyolojik arıtımın etkinliğini sınırlar [Nalbur ve Alkan, 2007].

Mikrobiyal konsorsiyumların kullanımı, 2,4-DCP bozunmasında bazı avantajlar sağlamakla beraber, organizmalar arası antagonizmalar nedeniyle mikroorganizma seçimini zorlaştırmaktadır [Herrera ve ark., 2008]. Bu nedenle, yüksek toleransa sahip ve tekli mikroorganizma suşlarının geliştirilmesi ve kullanımı daha avantajlı olmaktadır.

Bu doğrultuda, *Pseudomonas putida* [Kargi ve ark., 2005], *Delftia sp.* [Gonzalez ve ark., 2012], *Chlorella fusca* [Tsujiyama ve ark., 2013] gibi türler incelenmiş, ancak yüksek konsantrasyonlarda parçalanma süresi uzun olduğundan endüstriyel uygulamalara adaptasyon zorluğu ortaya çıkmıştır.

Özellikle *Bacillus* türlerinin 2,4-DCP biyotransformasyonunda oynadığı rol literatürde desteklenmekte ve biyoremediasyon uygulamalarında bu türlerin önemi giderek artmaktadır [Tallur ve ark., 2006; Hasan ve Jabeen, 2015].

2,4-DCP ve dolayısıyla klorofenoller, fenol türevleridir ve fenol türevlerinin mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanması kapsamlı şekilde incelenmiştir. Bu alanda birçok fenol parçalayıcı bakteri izole edilmiş ve fizyolojik ile genetik düzeyde detaylı olarak karakterize edilmiştir [Kountny ve ark., 2003; Ho ve ark., 2009; Shen ve ark., 2004; P.N., 2005]. Ancak, yüksek tolerans düzeyine sahip mikroorganizmalar hakkında bilgi hâlen sınırlıdır. Özellikle yüksek fenol konsantrasyonların da aerobik olarak üreyebilen yeni mikroorganizmaların izolasyonu için çalışmalar devam etmektedir.

Birçok mikrobiyal suş, fenolü tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu organizmalara örnek olarak *Alcaligenes faecalis* [Bai ve ark., 2006], *Aureobasidium pullulans* [Dos ve ark., 2009], *Candida tropicalis* [Jiang ve ark., 2006], *Pseudomonas putida* [Abuhamed ve ark., 2004; El-Naas ve ark., 2009] ve *Ralstonia taiwanensis* [Chen ve ark., 2007] verilebilir. Bununla birlikte, yüksek fenol konsantrasyonların da substrat inhibisyonu nedeniyle mikrobiyal büyüme oranları düşmekte, bu da biyolojik bozunma sürecini kısıtlamaktadır.

Bu bilgiler ışığında, fenol ve klorofenollerle kirlenmiş ortamlarda etkili mikroorganizmaların belirlenmesi ve kullanılması, biyolojik arıtımın başarısı için kritik bir öneme sahiptir.

1.6. DCP'nin Bakteriyal Degredasyonunda *Bacillus* ve *Priestia* Cinslerinin Rolü

Priestia cinsi [Ash ve ark., 2008] *Bacillus* cinsinden ayrılmış bir cins olup fenotipik özellikleri açısından *Bacillus*'a benzerlik göstermektedir. Bu cinslere ait mikroorganizmalar, genellikle çubuk formunda, düz ya da düze yakın yapıda ve tekli ya da uzun zincirler halinde görülen bakterilerdir. Gram pozitif özellik gösteren bu mikroorganizmalar, olumsuz çevresel koşullara karşı oldukça dirençlidir. Hücrelerinin her tarafında yer alan flagellalar sayesinde hareket kabiliyetine sahiptirler. Aerobik ve fakültatif anaerob ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmekte olup, çoğunlukla oksijeni terminal elektron alıcısı olarak kullanırlar.

Bu cinslere ait türler, koloni morfolojisi açısından büyük çeşitlilik göstermektedir. Çoğunlukla beyaz veya krem renkli koloniler oluştursalar da, bazı türlerde sarı, pembe, portakal ve siyah gibi pigmentli koloni formlarına da rastlanabilmektedir. Bu bakterilerin en

önemli özelliklerinden biri, uygun olmayan çevresel koşullarda spor oluşturabilme yetenekleridir. Oluşturdukları endosporlar silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şekillerinde olabilir. Hücre duvarları, hücre yüzeyini tamamen örten yarı kristal yapılı bir yüzey katmanına sahiptir.

Bacillus/Priestia türleri genellikle toprak kökenli olmakla birlikte, süt ve süt ürünleri, hava, su ve çeşitli gıda ürünleri gibi farklı doğal ortamlarda da yaygın olarak izole edilebilmektedir [Kalaylı ve Beyatlı, 2003]. Fizyolojik özellikleri oldukça geniş yelpazeye sahiptir. Farklı pH ve sıcaklık aralıklarında üreyebilen türler mevcuttur. Örneğin, *Bacillus stearothermophilus* 35 °C’de üremezken, 65 °C’ye kadar yükselen sıcaklıklarda optimum üreme göstermektedir. Diğer yandan, *Bacillus anthracis*’in kapsülleri 42–43 °C sıcaklıkta parçalanarak patojenitesini kaybetmekte ve sınırlı patojenik potansiyel göstermektedir [Holt ve ark., 1993].

Bu cinslerin üyeleri, yaşamlarını tehdit eden olumsuz çevresel koşullarda spor formuna geçerek varlıklarını sürdürebilirler. Bazı türlerin suşları, şekerli ortamlar, az miktarda mineral tuzlar, aminoasit solüsyonları veya gerekli üreme faktörlerinin bulunduğu ortamlarda yüksek oranda çoğalabilirken; bazı türler ise daha karmaşık beslenme gereksinimleri duymaktadır [O’Leary, 1989]. Genellikle pH 7, *Bacillus* türlerinin üremesi için uygun bir ortam olmakla birlikte, farklı pH değerlerinde çoğalabilen birçok tür de mevcuttur [MacFaddin, 2000].

Genellikle 35–37 °C sıcaklıkta ve pH 7 civarında optimum üreme gösterirler. Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde başarılı bir şekilde gelişim gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca, karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak ise amonyum bulunduran sentetik ortamlarda, doğal ortamlara kıyasla daha yoğun üreyebildikleri gözlemlenmiştir.

Bu cinslere ait türler toprakta yaygın olarak bulunmaları, biyolojik olarak aktif çeşitli metabolitler üretmeleri ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı spor formları oluşturma yetenekleri; ekonomik ve kolay elde edilebilir olmalarıyla birlikte biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmalarını mümkün kılmakta ve bu alanlarda alternatif bir yaklaşım sunmaktadır [Kalaylı ve Beyatlı, 2003].

Fenolik bileşiklerin biyolojik parçalanmasında *Bacillus* türlerinin önemli bir rol oynadığı literatürde yaygın olarak bildirilmektedir [Tallur ve ark., 2006; Hasan ve Jabeen, 2015]. *Bacillus subtilis* gibi türler, endospor oluşturabilen, Gram-pozitif ve çevre koşullarına dayanıklı mikroorganizmalar olup, 2,4-DCP’nin biyotransformasyonunda umut verici

sonuçlar vermektedir. Mevcut çalışmalarda, *Bacillus subtilis* hücrelerinin 2,4-DCP'yi parçalayabilme yeteneği defalarca doğrulanmıştır [Hassan ve ark., 2016; Sandhibigraha ve ark., 2020; Farag ve ark., 2021]. Bu nedenle, güncel biyoremediasyon uygulamalarında güvenli *Bacillus subtilis* suşları kullanılarak 2,4-DCP ve benzeri kirleticilerin etkili şekilde giderilmesi hedeflenmektedir.

Ayrıca, fenol adaptasyonu yapılmış *Bacillus licheniformis* suşlarının 2,4-DCP'ye tolerans gösterdiği ve yüksek parçalanma verimliliği sağladığı rapor edilmiştir. Örneğin, bu suşlar optimum şartlarda %96'ya varan giderim oranlarıyla dikkat çekmektedir [Chris Felshia, 2014].

1.7. Klorofenollerin Bakteriyal Degredasyon Yolakları

Klorofenollerin ve türevlerinin aerobik bozunumu bakterilerde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu bileşikler tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen birçok bakteri izole edilmiştir [Field ve Sierra-Alvarez, 2008]. Klorofenollerin ve türevlerinin bakteriyel bozunmasında çeşitli enzimatik mekanizmalar rol oynayabilmektedir:

(i) Monooksijenazlar, klorofenolik halkaların orto-pozisyonlarında hidroksilasyonu katalize edebilir ve bu reaksiyon sonucunda, halka açılımından önce orto- [Solyanikova ve Golovleva, 2011] ya da meta-kırılma [Hollender ve ark., 1997; Mars ve ark., 1997] yoluyla daha fazla parçalanabilen klorokatekol bileşikler oluşabilir.

(ii) Aynı enzimler, halkaların para-pozisyonlarında hidroksilasyonu katalize ederek, halka kırılmasından önce hidroksilasyon [Nordin ve ark., 2007] veya dehalojenasyon [Xun ve ark., 1992] yoluyla parçalanabilen klorohidrokinon türevlerinin oluşumuna neden olabilir.

(iii) Kloronitrofenollerin bozunması, genellikle hidroksilasyon [Arora ve Jain, 2012], indirgeyici dehalojenasyon [Pandey ve ark., 2011] veya nitro grubunun indirgenmesi [Arora ve ark., 2012] ile başlatılmaktadır.

(iv) ACP'lerin (amino-klorofenoller) bozunması ise, halka kırılması [Arora ve ark., 2013] veya dehalojenasyonun [Arora ve ark., 2014] ardından, enzimatik deaminasyon ile amonyum iyonlarının uzaklaştırılması yoluyla başlatılabilmektedir.

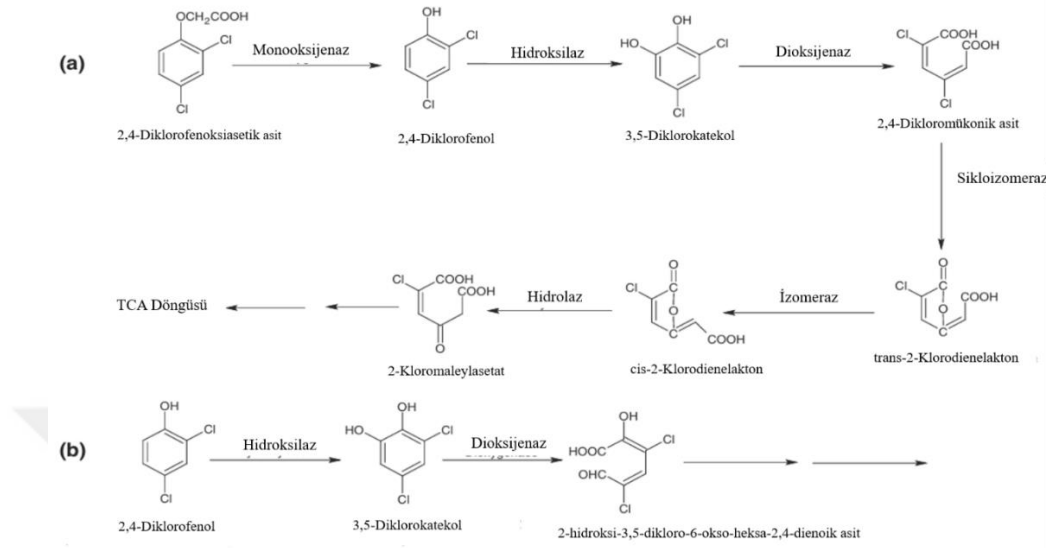
1.8. 2,4-DCP'nin Bakteriyel Bozunumu

2,4-Diklorofenol (2,4-DCP), bir herbisit olan 2,4-diklorofenoksiasetik asidin (2,4-D) bozunma yolunda oluşan ilk ara üründür. Bu bileşiği karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen çeşitli bakteriler izole edilmiştir. Bu bakteriler arasında *Pseudomonas* türü DP-4 [Tarao ve Seto, 2000], *Rhodococcus opacus* 1G [Finkel'shtein ve ark., 2000], *Rhodococcus erythropolis* [Goswami ve ark., 2002] ve *Pseudomonas* türü NCIB9340 [Tyler ve ark Finn, 1974] yer almaktadır. [Wang ve ark., 2000], *Bacillus insolitus* türünün 2,4-DCP'yi etkin şekilde uzaklaştırabildiğini bildirmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki klorofenoller mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilir. Bu toksisite, mikroorganizmaların bu bileşiklere adaptasyonu ve alternatif büyüme substratlarının kullanımıyla azaltılabilir [Vander Meer ve ark., 1992; Andretta ve ark., 2004]. Ancak bazı mikroorganizmalar 0,15 µg/ml ile 100-200 µg/ml arasında değişen 2,4-DCP konsantrasyonlarında bile gelişim gösterememektedir [Valo ve ark., 1990]. Çalışmada, düşük konsantrasyonlardaki (10–50 mg/L) 2,4-DCP'nin, immobilize hücreler tarafından daha hızlı bozunduğu; yüksek konsantrasyonlarda (50–200 mg/mL) ise serbest ve immobilize hücrelerin benzer düzeyde uzaklaştırma performansı gösterdiği belirtilmiştir [Wang ve ark., 2000].

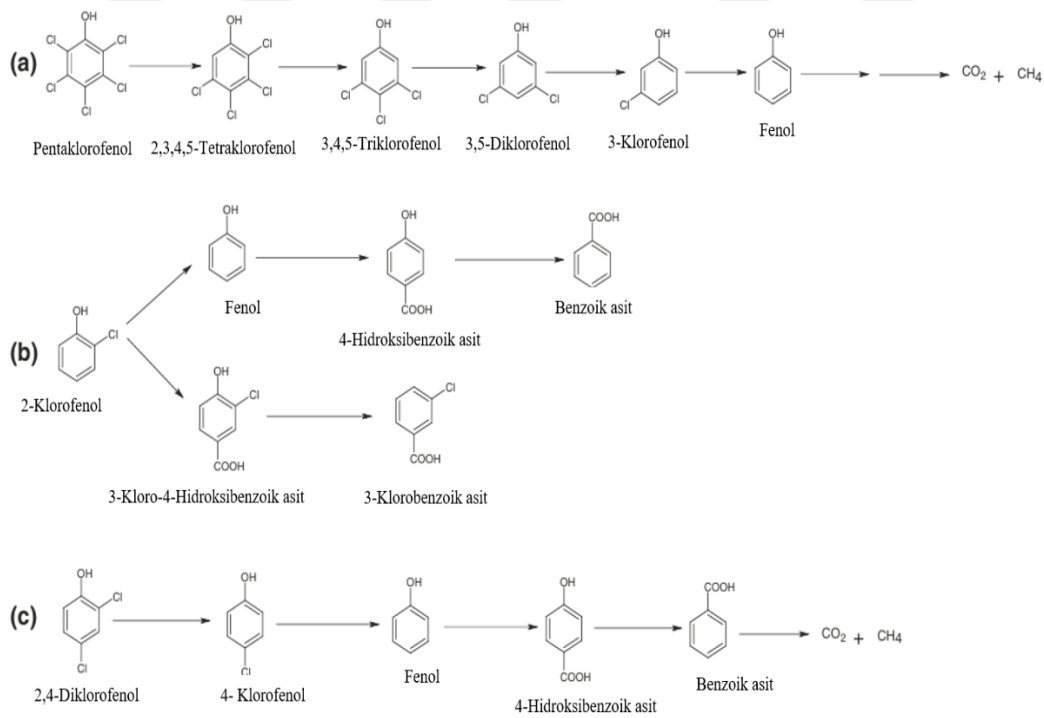
2,4-D'nin bakteriyel bozunumu, 2,4-diklorofenoksiasetat- α -ketoglutarat dioksijenaz enzimi [EC 1.14.11.-] tarafından katalizlenen ve 2,4-DCP oluşumuyla başlayan bir süreçtir [Fukumori ve Hausinger, 1993]. Oluşan 2,4-DCP, 2,4-DCP-hidroksilaz enzimi [EC 1.14.13.20] tarafından 3,5-diklorokatekole dönüştürülerek parçalanmaya devam eder [Perkins ve ark., 1990]. Bozunmanın bir sonraki aşamasında, 3,5-diklorokatekol, 3,5-diklorokatekol dioksijenaz [EC 1.13.11.-] aracılığıyla orto-yıkım yoluyla 2,4-dikloromukonik aside dönüştürülür (Şekil 3a). Ardından, 2,4-dikloromukonik asit izomeraz [EC 5.2.1.10] enzimi, bir klor grubunun uzaklaştırılmasıyla bu bileşiği trans-2-klorodienelaktone izomerize eder. Bu bileşik, bir izomeraz aracılığıyla tosis-2-klorodienelaktone dönüşür ve ardından bir hidroksilaz enzimi tarafından kloromaleilasetat oluşumu yoluyla parçalanır [Perkins ve ark., 1990]. Kloromaleilasetat, klor grubunun uzaklaştırılmasıyla maleilasetata dönüştürülür ve ardından maleilasetat redüktaz [EC 1.3.1.32] tarafından 3-oksodipik aside parçalanarak süreç devam eder.

Koh ve arkadaşları [Koh ve ark., 1997], *Cupriavidus necator* JMP222'nin (plazmit pJP4'ü kaybetmiş bir *C. necator* JMP134 türevi) okrezolde yetiştirilen hücrelerinin, 2,4-DCP'yi distal meta-kesilme yolu ile parçalayabildiğini bildirmiştir. Bu yolda, 2,4-DCP ilk

olarak 3,5-diklorokatekole oksitlenmekte, ardından 2-hidroksi-3,5-dikloro-6-okso-hekza-2,4-dienoik asit oluşumu aracılığıyla parçalanmaktadır (Şekil 3b).



Şekil 3. 2,4-diklorofenolün bakteriyel bozunma yolları (a) orto-kırılma, (b) distal meta-kırılma



Şekil 4. Klorofenoller ve poli-klorofenollerin anaerobik bozunumu. (a) pentaklorofenolün anaerobik dehalojenasyonu ve bozunumu, (b) 2-klorofenol için iki biyotransformasyon yolu (c) 2,4-diklorofenol için anaerobik minerilizasyon.

Yukarıda verilen iki örnekte de görülebildiği gibi 2,4-DCP'nin bakteriyal degradasyon yolları ve degradasyon ürünleri organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. Gerçekleştirilecek olan çalışmalar neticesinde hem etkili degradasyon yapabilen hem de degradasyon ürünleri 2,4-DCP ile karşılaştırıldığında olabildiğince daha az toksik olan ürünleri üretebilen organizmaların ortaya çıkarılması ya da geliştirilmesi önem arz etmektedir.

1.9. 2,4-Diklorofenol'ün Çevresel Kaynakları ve Riskleri

2,4-D, yaygın kullanımı nedeniyle çevreye tehdit oluşturan bir herbisittir ve 2,4-DCP, bu bileşiğin bozunma ara ürünüdür [Kumar ve ark., 2016]. 2,4-D'nin toprakta birikimi, hem bitkiler hem de insan sağlığı için risk teşkil etmektedir [Bradberry ve ark., 2005; Wang ve ark., 2015]. Bu nedenle, 2,4-DCP'nin çevresel birikimi ciddi şekilde ele alınmalıdır.

Ayrıca 2,4-DCP'nin çevredeki bir diğer önemli kaynağı ise triklosan (TCS) gibi antimikrobiyal maddelerin çevresel dönüşümüdür. TCS, son 30 yıldır kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmakta olup lipofilik yapısı nedeniyle yağ dokularında birikmektedir (Dann & Hontela, 2011; Bedoux [et al.](#), 2012). Atık su arıtım sistemlerine taşınan TCS, özellikle deniz suyunda UV ışığına ve yüksek sıcaklığa maruz kaldığında toksik türevi olan 2,4-DCP'ye dönüşebilmektedir (Canosa [et al.](#), 2005).

Çevresel açıdan 2,4-DCP, pek çok endüstriyel faaliyetin yan ürünü olarak doğaya yayılmaktadır. Örneğin, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinin atıklarında ortalama 14,49 µg/L 2,4-DCP tespit edilmiştir [Kumar ve ark., 2013]. Bu bileşik, besin zincirinde birikerek insan sağlığına da ulaşabilmektedir. İnsan idrarında da 0,8-1,0 µg/L kadar 2,4-DCP bulunması, maruziyetin yaygınlığını göstermektedir [Ye ve ark., 2012]. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), 2,4-DCP'ye maruz kalmanın ölümle sonuçlanabileceğini rapor etmiş ve özellikle erimiş haldeki 2,4-DCP'nin, vücut yüzeyinin yalnızca %1'inden daha az bir alana temas etmesi halinde bile ölümcül olabileceğini belirtmiştir [Kintz ve ark., 1995]. Bu sebeplerle, EPA 2,4-DCP'yi öncelikli kirletici olarak sınıflandırmıştır [LaGrega ve ark., 1994].

Fenolik bileşiklerin insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri birçok çalışmada vurgulanmıştır. Örneğin, düşük konsantrasyonlarda dahi fenoller, sucul organizmalar için öldürücü olabilmekte ve içme sularında ciddi sağlık risklerine yol açabilmektedir [Prado vd., 2002; Anku ve ark., 2017]. İnsan sağlığı üzerinde karaciğer,

böbrek ve sindirim sistemi gibi organlarda toksik etkilere neden olabildikleri bildirilen fenolik bileşikler [Anku ve ark., 2017], içme suyunda 1 mg/L gibi düşük düzeylerde dahi ciddi halk sağlığı riskleri ve ekosistem tahribatı oluşturabilmektedir [Prado vd., 2002]. Özellikle triklorosan ve 2,4-D gibi kimyasalların çevresel bozunma ürünlerinden biri olan 2,4-diklorofenol (2,4-DCP), bu bileşiklerin yaygın çevresel dönüşüm ürünleri arasında yer almaktadır [Melián ve ark., 2013].

İnsanlar tarafından solunum, deri, göz ve sindirim yolları aracılığıyla maruz kalınabilen 2,4-diklorofenol, zehir sınıfı 3 olarak tanımlanmakta olup, bu sınıf maddeler güçlü toksinler kategorisinde değerlendirilmektedir [Merck KGaA, Darmstadt, 2000]. Yüksek toksisiteleri, ayrışmaya karşı gösterdikleri direnç, biyolojik birikim potansiyelleri ile kanserojen ve mutajenik özellikleri nedeniyle, klorofenoller ekolojik açıdan önem taşıyan kirleticiler arasında sınıflandırılmaktadır [Uysal ve Türkmen, 2004].

Fenoller, protoplazmik zehirler olmaları nedeniyle tüm canlı hücre türlerine zarar verebilmektedir. Öldürücü dozları deri tarafından adsorbe edilebilen bu bileşikler, suda 0,01–0,1 mg/L konsantrasyonların da tat ve koku yoluyla algılanabilir. Fenol içeren suların tüketilmesi, şiddetli böbrek hasarlarına, ağır sistemik sarsıntılara ve hatta ölüme yol açabilmektedir. Klor içeren fenollerin toksik etkisi ise izomer yapılarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Klorlu fenollerin büyük bir kısmı deri ve göz üzerinde ciddi yıpratıcı etkilere sahiptir ve toksik düzeydeki miktarları da yine deri yoluyla adsorbe edilebilmektedir [ATSDR, 1999].

1.10. 2,4-Diklorofenol’ün Biyolojik Bozunmasına Yönelik Yaklaşımlar ve Enzimlerin Rolü

Klorofenol bileşiklerden biri olan 2,4-DCP, 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) gibi herbisitlerin üretiminde kullanılmakta ve büyük ölçekli kullanımı su ve toprak kirliliğine neden olmaktadır.

Substrat-spesifik enzimler, yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-DCP’yi saatler içerisinde parçalama kapasitesine sahip olduklarından endüstriyel uygulamalar için umut vericidir. Bu enzimler, 2,4-DCP gibi hedef kirleticiler varlığında sentezlenmekte ve biyolojik bozunma için etkili şekilde kullanılabilir.

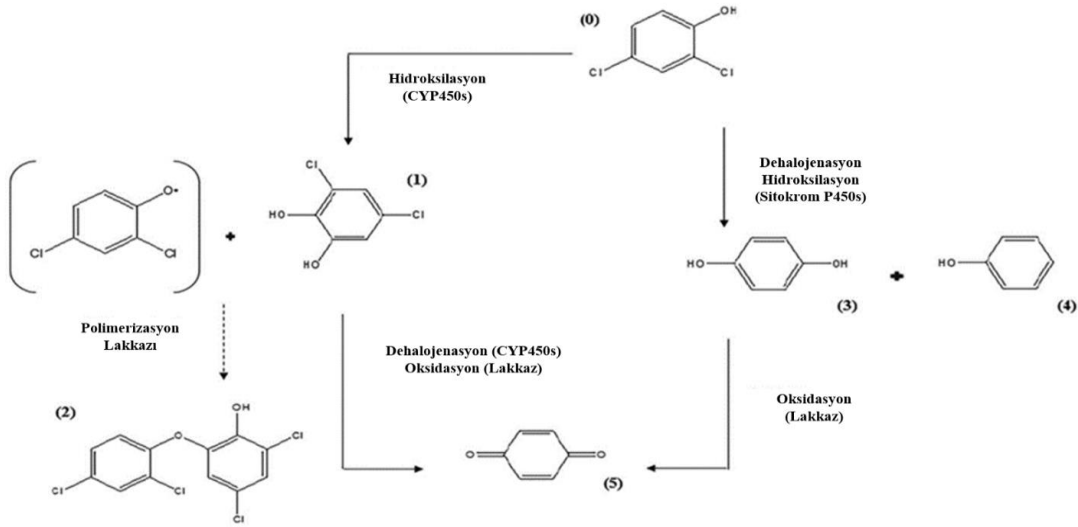
Klorofenollere bir örnek olan 2,4-DCP'nin biyotransformasyonu için çeşitli umut verici yaklaşımlar geliştirilmiştir. Özellikle *Bacillus subtilis* hücreleri ve onun lakkaz enzimi kullanılarak, aerobik koşullarda yüksek verimli biyotransformasyon süreçleri elde edilmiştir.

2,4-DCP'nin degradesyonunda etkin olan enzimler genel olarak klorofenol degradesyonunda etkin rol oynarlar ancak farklı klorofenollerin degradesyonlarında farklı enzimlerin rol oynayabilecekleri bilinmektedir. Bu açıdan bakıldığında tabiatta bulunan farklı bakterilerin bu tip molekülleri farklı son ürünlere degrades edebilme ve toksik etkilerini artırma veya ortadan kaldırma aktivitelerinin olabileceği anlaşılmaktadır.

2,4-DCP'nin biyolojik bozunması öncelikle sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından katalize edilen hidroksilasyon reaksiyonları ile başlar. Bu süreçte çeşitli ara ürünler (ürün 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol) ve ürün Hidrokinon) oluşmaktadır [Arora & Bae, 2014]. Hidroksillenmiş ürün 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol), orto pozisyonundaki halkaların doğrudan hidroksilasyonu ile oluşurken, ardışık dehalojenasyon ve hidroksilasyon reaksiyonları sonucunda ürün hidrokinon meydana gelir.

Ürün (hidrokinon), lakkaz enzimi tarafından katalizlenen ileri oksidasyon reaksiyonlarıyla fenol'e dönüşür. Lakkaz, fenolik ve aromatik bileşiklerin oksidatif enzimatik arıtımında temel bir enzimdir [Chandra & Chowdhary, 2015; Chairin ve ark., 2013]. Nihai ürün olan ürün benzoquinon'un oluşumu ise iki farklı yolla gerçekleşebilir: ya ürün hidrokinon'un doğrudan lakkaz katalizli oksidasyonu ile ya da 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol)'in P450 monooksijenazlar ile indirgeyici dehalojenasyonunu takiben lakkaz ile oksidasyonu sonucu oluşur.

Ayrıca, 2,4-dikloro-6-(2,4-diklorofenoksi) fenol lakkaz aracılığıyla ürün 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol)'in polimerizasyonu sonucu oluşabilir. Bu enzimatik süreçler, 2,4-DCP'nin mikrobiyal ve enzimatik dönüşümünde çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, *Thielavia sp.* HJ22 suşu tarafından 2,4-DCP bozunumu sırasında elde edilen metabolitler, bu mekanizmalarla uyumlu sonuçlar vermiştir [Arora & Bae, 2014; Zhuo ve ark., 2018]. (Şekil 5)



Şekil 5. 2,4-diklorofenolün biyolojik bozunma yolları. (0) 2,4-diklorofenol, (1) 3,5-diklorobenzen-1,2-diol (3,5-diklorokatekol), (2) 2,4-dikloro-6-(2,4-diklorofenoksi) fenol, (3) Hidrokinon, (4) Fenol, (5) Benzoquinon.

1.11. Klorofenol Degradasyonunda Etkin Olan Bakteriyal Genler

Klorofenollerin bozunmasından sorumlu genler, hem plazmit hem de kromozomal DNA üzerinde yer alabilmektedir. Plazmit kaynaklı genler arasında şunlar yer almaktadır: (i) *Cupriavidus necator* JMP134 suşuna ait pJP4 plazmitinde bulunan iki farklı *tfd* operonu [Don ve ark., 1995];

(ii) pJP4 plazmidinde yer alan *tcpRXABCYD* gen kümesi [Sánchez ve González, 2007];

(iii) *Pseudomonas knackmussii* plazmiti pB13 (pWR1) üzerinde bulunan *clc* operonu [Chatterjee ve ark., 1981];

(iv) *Pseudomonas* sp. P51'in pP51 plazmidindeki *tcb* operonu [van der Meer] ve ark., 1991].

JMP134 suşuna ait pJP4 plazmidinde tanımlanan iki *tfd* gen kümesi (*tfdCIDIEIFI* ve *tfdDIICIIIEIIFII*), 4-klorokatekol (4CC) metabolizmasında görevli enzimleri kodlamaktadır.

Bu kümelerdeki genlerden:

- *tfdC*, klorokatekol-1,2-dioksijenaz (TfdC; EC 1.13.11.-);
- *tfdD*, kloromukonat sikloizomeraz (TfdD; EC 5.5.1.7);
- *tfdE*, diene lakton hidrolaz (TfdE; EC 3.1.1.45);
- *tfdF*, maleilasetat redüktaz (TfdF; EC 1.3.1.32) enzimlerini kodlamaktadır [Don ve ark., 1995].

Van der Meer ve ark. [van der Meer] ve ark., 1991], *Pseudomonas* sp. P51'e ait pP51 plazmidinde yer alan *tcb* operonu içerisinde bulunan *tcbC*, *tcbD* ve *tcbE* genlerinin; sırasıyla 3,4-diklorokatekol ve 3,4,6-triklorokatekol/kloromaleyl asetat bozunumunda görev alan katekol 1,2-dioksijenaz II (EC 1.13.11.1), sikloizomeraz II (EC 5.5.1.7) ve hidrolaz II (EC 3.1.1.45) enzimlerini kodladığını bildirmiştir.

clc operonu, *Pseudomonas* sp. P51'in pP51 plazmidinde bulunan ve klorokatekol (CC) kullanımını sağlayan genleri içermektedir [Chatterjee ve ark., 1981]. Bu genlerden:

- *clcA*, katekol oksijenaz II'yi (EC 1.13.11.1);
- *clcB*, mukonat sikloizomeraz II'yi (EC 5.5.1.7);
- *clcD*, diene lakton hidrolazı (EC 3.1.1.45) kodlamaktadır.

2,4,6-Triklorofenol (2,4,6-TCP) bozunumunda görev alan genler ise *C. necator* JMP134 suşuna ait pJP4 plazmidinde bulunan *tcpRXABCD* gen kümesinde yer almaktadır [Sánchez ve González, 2007].

- *tcpA*, 2,4,6-TCP'yi 6-klorohidroksikinol'a dönüştüren, FADH₂ bağımlı bir monooksijenazı (TcpA; EC 1.14.13.-) kodlar.
- Bu reaksiyon için gerekli olan FADH₂ ise, *tcpX* geni tarafından kodlanan flavin redüktaz (TcpX) tarafından sağlanır.
- *tcpB*, nitroredüktaz genleri ile benzerlik gösterdiğinden, flavin redüktaz aktivitesi gösterebilir.
- *tcpC*, klorohidroksikinol'u 2-kloromaleylasetata dönüştüren 6-klorohidroksikinol-1,2-dioksijenazı (TcpC; EC 1.13.11.-) kodlar.
- *tcpD*, kloromaleylasetatı β -keto adipata dönüştüren maleilasetat redüktazı (TcpD; EC 1.3.1.32) kodlamaktadır.
- *tcpR* geni, bu kümeyi düzenleyen bir regülatör olarak görev yaparken; *tcpY*'nin fonksiyonu henüz net olarak belirlenememiştir [Sánchez ve González, 2007].

Ralstonia pickettii DTP0602 suşunda ise 2,4,6-TCP'nin 3-oksodipik aside dönüşümünde görev alan iki gen kümesi (*hadXABC* ve *hadYD*), *hadR* ve *hadS* genleri tarafından düzenlenmektedir [Hatta ve ark., 2012].

Torii ve ark. [Torii ve ark., 2013], HadR proteininin bu katabolik yolun gen ekspresyonunu nasıl düzenlediğini araştırmış ve HadR'nin *hadX* promotör bölgesine bağlandığını göstermiştir. Ayrıca, klorofenoller, nitrofenoller ve tribromofenoller gibi 16 farklı ikame fenolün varlığında HadR-DNA kompleks oluşumunun indüklendiği gözlemlenmiştir.

Rhodococcus opacus 1CP suşunda, 3-klorokatekol (3CC)'ün modifiye edilmiş yeni bir orto-kırılma yoluna dahil olan dört geni (*clcA2*, *clcB2*, *clcD2* ve *clcF*) içeren bir gen kümesi tanımlanmıştır [Tyler ve Finn, 1974].

Bu genler sırasıyla, 3-klorokatekol-1,2-dioksijenaz (*ClcA2*), kloromukonat sikloizomeraz (*ClcB2*), diene lakton hidrolaz (*ClcD2*) ve mukonolakton izomerazla ilişkili bir enzim (*ClcF*) kodlamaktadır. Aynı organizmada, proteobakteriyel genlerle benzerlik gösteren ikinci bir klorokatekol bozunma gen kümesi daha bulunmaktadır [Moiseeva ve ark., 2002].

Arthrobacter chlorophenolicus'ta ise, 4-klorofenol (4CP) bozunmasında görev aldığı belirlenen *cph* gen kümesi tanımlanmıştır [Nordin ve ark., 2005]. Bu küme, CP'lerin parçalanmasında görev yapan enzimleri kodlayan genlere benzerlik gösteren on açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir.

Örneğin, *cphA-1* ve *cph-11* genleri, işlevsel hidroksikinol-1,2-dioksijenaz enzimini kodlar. Özellikle *cphA-1* geninin yönlendirilmiş mutagenез ile bozulduğu bir mutant suş, 4CP'yi tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanamamıştır.

Kümedeki diğer genler arasında:

- *cphC-I*, *cphC-II* (varsayımsal monooksijenazlar),
- *cphF-I*, *cphF-II* (varsayımsal maleilasetat redüktazlar),
- *cphB* (NADH:flavin adenin dinükleotid oksidoredüktaz),
- *cphX*, *cphR*, *cphS* bulunmaktadır.

Ancak bu genlerin çoğunun biyolojik işlevleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [Cámara ve ark., 2009].

Pseudomonas reinekei MT1 suşunda, klorokatekol bozunmasında görev alan *ccaBARCD* gen kümesi tanımlanmıştır [Cámara ve ark., 2009].

Bu kümeye ait:

- *ccaA* → katekol-1,2-dioksijenaz,
- *ccaB* → (kloro) mukonat sikloizomeraz,
- *ccaC* → trans-dienelakton hidrolaz,
- *ccaD* → maleilasetat redüktaz enzimlerini kodlamaktadır.
- *ccaR* ise, IclR ailesine ait bir transkripsiyonel düzenleyici olup, gen kümesinin ekspresyonunu kontrol etmektedir [Cámara ve ark., 2009].

Burkholderia phenoliruptrix AC1100 suşunda, 2,4,5-triklorofenol (2,4,5-TCP) bozunmasına katılan genler tanımlanmış ve detaylı biçimde karakterize edilmiştir [Gisi ve

Xun, 2009; Zaborina ve ark., 1998; Hubner ve ark., 1998; Danganan ve ark., 1994; Daubaras ve ark., 1995]. Bu süreçte, *tftCD* ve *tftEFGH* gen kümeleri, 2,4,5-TCP'nin 3-oksodipik asit yoluna dönüşümünde rol oynamaktadır.

Sphingomonas chlorophenolicum L-1 suşunda ise, pentaklorofenol (PCP) bozunmasına katılan dört ana gen tanımlanmıştır:

- *pcpB* → PCP-4-monooksijenaz (EC 1.14.13.50),
- *pcpC* → TeCH-redüktif dehalojenaz (EC 1.8.99.-),
- *pcpA* → DiCHQ-1,2-dioksijenaz (EC 1.13.11.-),
- *pcpE* → maleilasetat redüktaz (EC 1.3.1.32) [116].

pcpB, PCP'nin bakteriyel bozunmasındaki ilk basamak olan para-pozisyonda hidroksilasyon ve klorür iyonunun uzaklaştırılmasıyla TeCHQ'ya dönüşümünü katalizleyen flavin monooksijenaz enzimini kodlar [Xun ve ark., 1992]. Bu gen, geniş substrat özgüllüğüne sahiptir ve çeşitli ikame aromatik bileşikler üzerinde işlev gösterebilir.

Ayrıca, *pcpB* geni, *Sphingomonas chlorophenolicum*'un üç farklı suşunda (RP-2, SR-3, ATCC 33790) tespit edilmiştir [Karlson ve ark., 1996, Ederer ve ark., 1997]. Bunların tümünde özdeş *pcpB* dizileri bulunurken, *Sphingomonads* suşu UG-30'da bu genin dizisi, *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 ile %90 benzerlik göstermiştir [Cassidy ve ark., 1999; Leung ve ark., 1999; Leung ve ark., 1997].

PcpB genine ait homologlar, poliklorlu bileşikleri parçalayabilen *Novosphingobium* sp. *MT1* suşunda [Tirola ve ark., 2002] ve ayrıca PCP'yi parçalama yeteneğine sahip olmayan iki β - ve γ -proteobakteriyel suşta da tespit edilmiştir [Saboo ve Gealt, 1998].

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Yeast Ekstrakt (Merck), 2,4-Diklorofenol(C₆H₄Cl₂O) (Sigma), Amonyum hidroksit (NH₄OH) (J.T. Baker), Potasyum ferrisiyanür (Sigma), Aminoantipirin (Sigma), Maltoz (Merck), Laktoz (Merck), Sükroz (Merck), Amonyum nitrat (NH₄NO₃) (Merck), Dipotasyum fosfat (K₂HPO₄) (Merck), NaCl (Merck), Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (Carlo Erba), Magnezyum (II) sülfat heptahidrat (MgSO₄ · 7H₂O) (Merck), NaOH (Merck), Kalsiyum Klorür (CaCl₂) (Merck), HCl (Merck), Nutrient Broth (Merck), D-(+)-Glukoz monohidrat (Sigma), Nutrient Agar (Merck). One Step RNA Reagent (Bio Basic), RNasey® PowerClean® Pro Cleanup Kit(Qiagen).

2.2. Kullanılan Besiyerleri

Nutrient Broth (NB) sıvı besiyeri ve Nutrient Agar (NA) katı besiyeri, *Priestia megaterium* SA3'ün çoğaltılmasında kullanıldı. 1 L NB (Merck) ve NA (Merck) hazırlamak için üretici firmanın önerdiği miktarlarda toz besiyeri karışımı tartıldı ve 1 L distile suda çözüldü. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

Minimal salt medium (MMS), *Priestia megaterium* SA3'nun üreme optimizasyonunda kullanılmak üzere hazırlandı ve 1 Atm basınçta 121 °C'de otoklavda 15 dk steril edildi.

İzolasyon ve zenginleştirme için kullanılan minimal salt medium (MMS)'in içerdiği elementler (g/l):

(NH ₄) NO ₃	: 2,0
Yeast ekstrakt	: 2,0
NaCl	: 0,5
K ₂ HPO ₄	: 1,5
KH ₂ PO ₄	: 0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	: 0,5
CaCl ₂	: 0,02

Ortamın pH'ı, sterilizasyondan önce 0,1 N NaCl veya 0,1 N HCl kullanılarak 5,0 ± 0,2'ye ayarlandı [Manikandan ve ark., 2009].

2.3. Kullanılan Tamponlar

0,1 M Tris-HCl tamponu: MSM'un pH 'ının ayarlanmasında pH=6-9 arasındaki Tris-HCl tamponu kullanıldı.

Tris base (0,1 M)

Distile su

2,428 g 0,1 M Tris base tartılıp distile su ile 200 ml tamamlanarak çözelti hazırlandı [Gomori, 1955].

0,1 M Citrat-fosfat tamponu: MSM'un pH 'ının ayarlanmasında pH=4-5 arasındaki Citrat-fosfat tamponu kullanıldı.

0,1 M Sitrik asit (1 L'de 21,09 g)

0,1 M Na-Sitrat (1 L'de 29,41 g) alınıp son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı [Gomori, 1955].

HCl ve NaOH çözeltisi tamponların pH'larını ayarlamak amacı ile kullanılmıştır (Gürdöl, 2014).

50 ml %10 FBS %1 Pen-Strep içeren RPMI 1640 besiyeri:

45,450 ml RPMI 1640 besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

MTT solüsyonu hazırlanışı: Ticari yollarla temin edilen MTT, 5 mg/ml konsantrasyona sahip olacak şekilde PBS içinde çözülerek 1,5 ml eppendorf tüplere alikotlanmıştır. -20 °C'de ve ışık almayacak şekilde muhafaza edilmiştir.

2.4. Kullanılan Bakteriler ve Hücreler

Tez çalışmasında, KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında farklı çevresel kaynaklardan izole edilerek karakterizasyonları yapılmış olan bakteriyal izolatlar kullanıldı. Bu izolatlar, *Bacillus megaterium* SA3, *Stutzerimonas stutzeri* FAD2, *Klebsiella varicola subsp. pneumoniae* Petdeg9, *Serratia proteamaculans* ATB1 ve *Lelliotia steviae* ATB2'dir. MTT testi için HDFa (ATCC PCS-201-012™) hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı, ATİGEN Hücre ve Doku Merkezi Trabzon Şubesi'nden temin edilmiştir.

2.5. 2,4-DCP'yi Degrede Edebilen Bakteriyal İzolatların Seçimi

Priestia megaterium SA3, *Stutzerimonas stutzeri* FAD2, *Klebsiella varicola* subsp. *pneumoniae* Petdeg9, *Serratia proteamaculans* ATB1 ve *Lelliotia steviae* ATB2 bakterilerinin 2,4-DCP'yi karbon kaynağı olarak kullanım potansiyelleri öncelikle yukarıda da içeriği verilen MSM besiyerinde test edildi. Öncelikle 3 ml'lik hacimlerde olmak üzere 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L oranında 2,4-DCP içeren besiyerlere herbir bakteriden hazırlanan gece kültürlerinden $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde inokülasyonlar yapıldıktan sonra 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de inkübasyonlar gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından 24 saatlik periyotlarda OD_{600} 'de spektrofotometrede ölçümler alınarak 2,4-DCP içermeyen kontrol tüpündeki üreme ile karşılaştırmalar yapılarak, 2,4-DCP'yi karbon kaynağı olarak kullanım yani degrades edebilme potansiyeli ortaya çıkarıldı.

Yukarıda ifade edilen şekilde 2,4-DCP'li ortamda üreyebilen izolatların 2,4-DCP'yi degrades edebilme yetenekleri ortamdaki fenolik madde miktarındaki azalmanın ölçümüne bağlı olarak 4-aminoantipirin yöntemi [Yang ve Humphery, 1975] ile tespit edildi.

Fenol tayin yöntem çözeltileri:

0,5 N Amonyum Hidroksit (NH_4OH) çözeltisi; 3,5 mL taze derişik NH_4OH distile su ile 100 mililitreye tamamlanır.

Fosfat tampon çözeltisi; 5,2 gram KH_2PO_4 ve 3,6 gram K_2HPO_4 suda çözülerek 50 mililitreye seyreltilir.

4-Aminoantipirin çözeltisi; 2 gram 4-aminoantipirin distile suda çözülerek 100 mL'ye seyreltilir.

Potasyum ferrisiyanür çözeltisi; 8 gram $K_3Fe(CN)_6$ distile suda çözülerek 100 mL'ye seyreltilir.

Fenol tayin yöntemi prosedürü:

Fenol tayini için hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilere 500 μ L 0,5 N NH_4OH çözeltisi, 19,5 ml steril su ve 500 μ L numune eklenir. Sonrasında fosfat tamponu ile pH $7,9\pm0,1$ 'e ayarlanır. 200 μ L 4-aminoantipirin çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır. 200 μ L $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır. 15 dk bekledikten sonra küvetlere konur, spektrofotometre de 510 nm dalga boyunda şahide karşı absorbans değerleri okunur.

Gerçekleştirilen çalışmada, 2,4-DCP'li ortamda üreme ve 4-aminoantipirin yöntemi ile ortamdaki fenolik madde miktarındaki azalmanın ortaya konmasına bağlı olarak çalışmada kullanılmak üzere yukarıda da belirtilen bakteriyal izolatlardan en yüksek aktivite

gösteren *Priestia megaterium* SA3 seçilerek bundan sonraki çalışmalara bu izolat ile devam edildi.

2.6. *Priestia megaterium* SA3 İzolatının Kültür Ortamında 2,4-DCP'yi Degredasyonunun Optimizasyonu

Yukarıda ifade edilen çalışmalar sonucunda 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu çalışmalarında *Priestia megaterium* SA3 izolatının kullanımı öngörülmüştür. Çalışma süresince izolat Nutrient agarda +4 °C'de ve gliserol stoklarda -20 °C'de muhafaza edilmiştir. KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen, izolatın üreme optimizasyonu çalışmalarında üreminin en iyi Nutrient Broth besiyerinde 37 °C'de gerçekleştiği belirlendiğinden bundan sonraki çalışmalarda organizmanın kültürlenmesi amacıyla bu parametreler kullanılmıştır.

Stok kültürlerden Nutrient broth ortamına ekim yapılarak 1 gece süreyle 150 rpm çalkalama hızında ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmış olup, bu kültürlerden 2,4-DCP degradasyonuna yönelik çalışmalar için inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları içeriği yukarıda verilen Minimal Salt Medium'da (MSM) gerçekleştirildi. Bu amaçla inkübasyon sıcaklığının (30, 37 °C) ve süresinin (12-48 saat), gece kültüründen inokülasyon miktarının, besiyeri pH'ının (pH 4-9), karbon kaynağının (glukoz, sakkaroz, laktoz ve maltoz), 2,4-DCP konsantrasyonunun (50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/l) optimizasyonu gerçekleştirildi. Deneysel süreçte reaksiyon süresi, pH, karbon kaynağı, başlangıç substrat konsantrasyonu ve sıcaklık gibi parametreler test edildi ve her birinin etkisi değerlendirildi. Her bir üreme denemesi sonucunda ortamda bulunan 2,4-DCP konsantrasyonu fenol tayin metodu olan 4-aminoantipirin yöntemi [Yang ve Humphery, 1975] ile tayin edildi. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları neticesinde belirlenen optimum şartlarda *Priestia megaterium* SA3 izolatı kültürlenerek elde edilen kültür süpernatantı ve/veya pelleti kullanılarak aşağıda prosedürleri verilen HPLC analizleri, fitotoksosite testi, MTT testi, total RNA analizi ve transkriptom analizleri gerçekleştirildi.

2.7. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP Degradasyonun HPLC ile Analizi

Yukarıda ifade edilen optimum şartlar altında 2,4-DCP içeren ve içermeyen ortamlarda 2 gün boyunca üretimleri gerçekleştirilen *Priestia megaterium* SA3 kültürlerine

ait süpernatantlar HPLC analizine tabi tutularak kültürlerdeki 2,4-DCP'nin degradasyonu ve degradasyon oranları ortaya çıkarıldı.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi, 260 nm dalga boyunda UV dedektörü bulunan Agilent 1260 Infinity serisi cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, kolon sıcaklığı 40 °C'de sabitlenen Eclipse Plus C₁₈ analitik kolon (100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılarak yapılmıştır. Hareketli (mobil) faz, asetonitril (çözücü A) ile % 0,5 sulu asetik asitten (çözücü B) oluşmuş ve 1:1 (h/h) oranında, 1,0 mL/dk akış hızında izokratik olarak uygulanmıştır. Analizlerde enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir.

2.8. *Priestia megaterium* SA3'ün Transkriptom Analizi ile 2,4-DCP'yi Degradasyonunda Rol Alan Muhtemel Genlerinin Belirlenmesi

2.9. 2,4-DCP İçeren ve İçermeyen *Priestia megaterium* SA3 Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu

Yukarıda ifade edilen optimum şartlar altında 2,4-DCP içeren ve içermeyen ortamlarda 2 gün boyunca üretimleri gerçekleştirilen *Priestia megaterium* SA3 kültürlerinin santrifüjlenmesi ile oluşturulan kültür pelletleri RNA izolasyonu için kullanıldı.

RNA izolasyonları TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Her bir örnek için 1,5 mL kültür örneği 12.000 × g kuvvetinde 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenerek hücre pelletleri elde edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra her pellet 1 mL TRIzol ile homojenize edildi ve 5 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından üzerine 200 µL kloroform eklendi, tüpler kuvvetlice çalkalandı ve 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım 12.000 × g'de 15 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenerek faz ayrımı sağlandı. Üstte oluşan sulu faz dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı.

RNA'nın çöktürülmesi amacıyla eşit hacimde (%100) izopropanol ilave edilerek tüpler 10 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 12.000 × g'de 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenerek RNA pelletleri elde edildi. Pelletler %75 etanol ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve RNaz içermeyen uygun hacimde DEPC-treated su ile 40 µL hacimde çözüldü.

Elde edilen total RNA örneklerine, genomik DNA kontaminasyonunu gidermek amacıyla RNaz-free DNaz I (Qiagen, Germany) uygulandı. Her örnek için üretici firmanın

önerdiği protokol izlenerek DNaz karışımı hazırlandı ve 37 °C’de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. DNaz inaktivasyonu sonrasında RNA örnekleri, RNeasy MinElute Cleanup Kit [Qiagen, Germany] kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda saflaştırıldı. Bu işlem sırasında RNA’lar spin kolona bağlandı, yıkama adımları tamamlandı ve saflaştırılmış RNA’lar RNaz içermeyen su ile elüe edildi.

İzolasyon sonrası RNA örneklerinin bütünlüğü %1,2 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Saflık ve derişimleri NanoDrop™ 2000c spektrofotometresi [Thermo Scientific, USA] ile 260/280 ve 260/230 nm absorbans oranları değerlendirilerek belirlendi. Uygun kalite kriterlerini karşılayan RNA örnekleri, transkriptom analizlerinde kullanılmak üzere ayrıldı.

2.10. Transkriptom Analizi

2.10.1. RNA-Seq Kütüphane Hazırlama ve Dizileme

RNA-Seq kütüphanelerinin hazırlanması, Refgen Biyoteknoloji [İstanbul, TÜRKİYE] firması tarafından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi. İzole edilen toplam RNA örnekleri, kullanılan kitin [NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit] üretici talimatlarına uygun olarak kütüphane oluşturma işlemine tabi tutulmuştur. Kütüphane hazırlama sürecinde ribozomal RNA uzaklaştırma (rRNA depletion) adımı uygulanarak mRNA zenginleştirilmiş, ardından fragmentasyon, cDNA sentezi, adaptör ligasyonu ve PCR çoğaltma basamakları tamamlanmıştır.

Hazırlanan kütüphaneler kalite kontrol aşamasından geçirilmiş, kütüphane boyut dağılımı Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılarak belirlenmiş ve konsantrasyon ölçümleri Qubit fluorometre ile yapılmıştır. Kalite kriterlerini karşılayan kütüphaneler, yüksek verimli dizileme için Illumina (NovaSeq 6000 / HiSeq 4000) platformuna yüklenmiştir.

Sekanslama işlemi çift yönlü (paired-end) olarak, her bir okuma başına 150 baz çifti (2 × 150 bp) uzunluğunda gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, gen ekspresyonunun doğru kantifikasyonu ve yeni transkriptlerin tanımlanması için yüksek kapsama derinliği ve hassasiyet sağlamaktadır.

2.10.2. Ham Veri Kalite Kontrolü ve Filtreleme

Illumina sekanslama platformundan elde edilen ham okuma verileri (FASTQ formatında), kalite değerlendirmesi amacıyla FastQC (v0.11.9) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Her bir örnek için oluşturulan kalite raporlarında okuma uzunluğu, baz başına kalite skorları, GC içeriği, sekans çoğulluk (duplication) oranı ve adaptör kontaminasyonu gibi temel kalite metrikleri değerlendirilmiştir.

Kalite kontrol adımlarının ardından, düşük kaliteli baz bölgeleri ve olası adaptör sekanslarını temizlemek amacıyla fastp (v0.23.2) yazılımı kullanılmıştır. Bu işlem sırasında:

Kalite skoru $Q < 20$ olan bazlar uç kısımlardan kesilmiş, uzunluğu 50 bp'nin altına düşen okumalar veri setinden çıkarılmış, adaptör dizileri otomatik olarak tespit edilip temizlenmiştir.

Temizlenmiş (trimlenmiş) okumalar, tekrar FastQC analizi ile doğrulanmış ve tüm örneklerin kalite metriklerinin yüksek kaliteli RNA-Seq analizleri için kabul edilen sınırlar içerisinde olduğu teyit edilmiştir.

2.10.3. Okuma Hizalama ve Gen İfadesi Nicelleştirme

Temizlenmiş okuma verileri, *Priestia megaterium* türüne ait referans genom dizisine (Accession no: GCF_006094495.1) hizalanmıştır. Referans genom ve anotasyon dosyaları (FASTA ve GFF formatlarında) NCBI GenBank veri tabanından temin edilmiştir. Hizalama işlemleri, yüksek doğruluk ve hız avantajı nedeniyle HISAT2 (v2.2.1) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hizalama sırasında eşleşme toleransı, intron uzunluk limitleri ve eşleşmeyen bazlar için varsayılan parametreler kullanılmıştır. Elde edilen SAM formatındaki hizalama dosyaları, SAMtools (v1.14) kullanılarak BAM formatına dönüştürülmüş ve sıralanmıştır.

Gen ifadesi düzeylerinin nicelleştirilmesi, anotasyon dosyasında tanımlı gen bölgelerine düşen okuma sayılarının belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla feature Counts (v2.0.3) aracı kullanılmış ve her gen için toplam okuma sayıları içeren ham sayım matrisi elde edilmiştir. Bu sayım matrisi, diferansiyel gen ekspresyon analizi adımıyla kullanılmak üzere kaydedilmiştir.

2.10.4. Diferansiyel Gen Ekspresyon Analizi

Ham okuma sayıları matrisi kullanılarak diferansiyel gen ekspresyon analizi, edgeR (v3.42.4) paketi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde, düşük seviyede ifade edilen genlerin çıkarılması amacıyla Counts Per Million (CPM) > 1 kriteri uygulanmıştır. Bu filtreleme, istatistiksel gücü artırmak ve çok düşük okuma sayısına sahip genlerden kaynaklanan gürültüyü azaltmak için yapılmıştır.

Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin seçiminde mutlak $\log_2$ kat değişimi ($|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$ ve False Discovery Rate (FDR) $< 0,05$ eşikleri temel kriterler olarak belirlenmiştir. FDR değerleri, çoklu test düzeltmesi için Benjamini–Hochberg yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Karşılaştırmalar, kontrol grubu (*Priestia megaterium* SA3'ün+MSM) ile deney grubu (*Priestia megaterium* SA3'ün+MSM+ 2,4-DCP) arasında gerçekleştirilmiştir. Filtreleme ve istatistiksel analiz adımları sonucunda, yukarı regüle edilen, aşağı regüle edilen ve tüm diferansiyel gen listeleri sonraki fonksiyonel analizlerde kullanılmak üzere kaydedilmiştir.

2.10.5. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (GO Analizi)

Diferansiyel olarak eksprese edilen genlerin biyolojik süreç (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) kategorilerinde işlevsel olarak yorumlanması için R ortamında clusterProfiler (v4.14.6) paketi kullanılmıştır.

Analizlerde kullanılmak üzere, gen kimliklerini (*GeneID*) ilgili GO terimleri ile eşleştiren özel bir TERM2GENE dosyası hazırlanmış ve GO terim açıklamalarını içeren TERM2NAME dosyası eklenmiştir.

Fonksiyonel zenginleştirme analizi; yukarı regüle edilmiş (UP), aşağı regüle edilmiş (DOWN) ve her iki grubu içeren birleşik (BOTH) gen listeleri için ayrı ayrı yürütülmüştür. Analiz parametreleri şu şekilde belirlenmiştir:

- p-değeri eşiği: 0,05
- q-değeri eşiği (FDR): 0,05
- Minimum gen seti boyutu (minGSSize): 10
- Maksimum gen seti boyutu (maxGSSize): 500

Elde edilen sonuçlar tablo formatında kaydedilmiş ve enrichplot (v1.26.6) paketi ile *bar plot* ve *dot plot* grafik çıktıları üretilmiştir.

2.10.6. Veri Görselleştirme

Diferansiyel gen ekspresyon analizleri ve fonksiyonel zenginleştirme sonuçlarının görselleştirilmesi, R (v4.4.3) yazılım ortamında gerçekleştirilmiştir. Görselleştirme sürecinde farklı veri tiplerine uygun olarak çeşitli paketler ve grafik kütüphaneleri kullanılmıştır. Volcano plot, bar plot ve dot plot türündeki grafikler, yüksek esneklik ve özelleştirme imkânı sunan ggplot2 (v3.5.2) paketi ile hazırlanmıştır. Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin kümeleme temelli görselleştirilmesi için ısı haritaları, pheatmap (v1.0.13) paketi kullanılarak üretilmiştir. Fonksiyonel zenginleştirme analizlerinden elde edilen biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen kategorilerinin görselleştirilmesinde clusterProfiler (v4.14.6) ve enrichplot (v1.26.6) paketlerinden yararlanılmıştır. Bu paketler aracılığıyla GO terimlerinin barplot ve dotplot formatında sunumu sağlanmıştır. Grafiklerin düzenlenmesi, çoklu panel kombinasyonlarının oluşturulması ve nihai figür formatlarının hazırlanmasında cowplot (v1.2.0) paketi ile birlikte temel base R fonksiyonları kullanılmıştır. Tüm grafikler, hem yüksek çözünürlükte hem de yayın formatına uygun olacak şekilde kaydedilmiş ve analiz raporuna entegre edilmiştir.

2.11. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP'yi Degradasyonunun Toksisite Testleri

2.11.1. Hücre Toksisite Testi (MTT)

- Hücrelerin Kültür Edilmesi

HDFa hücreleri %10 FBS ve %1 pen-strep içeren RPMI 1640 besiyeri ile 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edildikten sonra hücreler, mikroskopik olarak kontrol edilip yoğunlukları belirlendi. T75 flask üzerinde %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Pasajlama işleminde, flaska tutanan hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri döküldükten sonra 3 ml PBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak amacıyla, yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin EDTA solüsyonu (T75 flask için ortalama 2 ml) hücreler üzerine eklenerek 37 °C'de yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılması invert mikroskopta kontrol edildi ve tripsini durdurmak için ortama %10 FBS içeren besiyeri ilave edildi. Flasklardan toplanan hücreler 15 ml falkon tüplere alınarak 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve RPMI 1640 besiyeri ile

tekrar süspanse edilerek yeni flasklara aktarıldı. Pasajlama işlemi tamamlanan hücreler, 37 °C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

- Hücre Sayımı

Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı ve Hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenmesi için öncelikle hücreler tripan mavisini ile boyanarak sayıldı. Hücre süspansiyonundan ve tripan mavisinden 1:1 oranında alınıp bir endorf tüp içinde pipetaj ile karıştırıldı. Thoma lamına lamel yerleştirildi ve hücre boya karışımı kareler içeren bölgeye yayıldı. İnvert mikroskop altında inceleme yapıldı. Parlak görünen hücreler canlı; mavi boya almış olan hücreler ise ölü hücre olarak değerlendirildi. Thoma lamında sayım yapıldıktan sonra total canlı hücre sayısı “(Hücre sayısı/2) × dilüsyon faktörü x 10⁴ x süspansiyon hacmi” formülü ile hesaplandı.

- MTT Testi

Bu işlemde, MSM, MSM+DCP ve MSM+DCP+*Priestia megaterium* SA3’un iki günlük kültürlerine ait süpernatantlar ile 24 saat inkübe edilen HDFa hücre hattının bulunduğu 96-well pleytin her kuyusuna 5 mg/ml konsantrasyona sahip MTT boyasından kuyu içerisinde %10 olacak şekilde eklenmiştir (100 µl volume içerisinde 10 µl). Ardından %5 CO₂ içeren, 37 °C sıcaklığa sahip ve ışık almayan etüv içerisinde yaklaşık 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kuyu içerisindeki MTT boyası içeren besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL DMSO ilave edilerek pleytler aynı ortam şartlarına sahip etüvde 30 dk inkübe edilmiştir. Sarı renkli tetrazolium tuzlarının, yalnızca canlı hücrelerde mor renkli formazan kristallerine dönüşmesiyle oluşan mor renk şiddetinin absorbanı, 570 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

2.11.2. Fitotoksisite Testi

Yukarıda ifade edilen optimum şartlar altında 2,4-DCP içeren ve içermeyen MSM besiyerinde üretilen *Priestia megaterium* SA3 kültürlerin 10.000 × g’de 10 dak santrifüjlenmesi ile elde edilen kültür süpernatantları ile bakteri inokülasyonunun yapılması 2,4-DCP içeren MSM ve 2,4-DCP içermeyen MSM besiyerleri de kullanılmak suretiyle tohum çimlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Deneyde kuru börülce fasülyesi (*Vigna unguiculata*) tohumları kullanıldı. Tohumlar, herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için öncelikle 10 dakika boyunca %6 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi ile sterilize edildi. Süre sonunda steril saf su ile tohumlar hızlıca yıkanarak tohumlar üzerinde olabilecek

sodyum hipoklorit kalıntısı uzaklaştırıldı. Sterilize edilen tohumlar, önceden steril edilip kurutulan 2 kat filtre kâğıdı üzerine olacak şekilde petri kabına yerleştirildi. Her deney için gelişi güzel seçilen börülce tohumlarından 10'ar adet seçildi. Yukarıda da ifade edildiği gibi dört farklı örnekten (MSM+ *Priestia megaterium* SA3, MSM + 2,4-DCP + *Priestia megaterium* SA3, MSM + 2,4-DCP, sadece MSM) 5'er ml alınarak petrilerdeki tohumlar ıslatıldı. Petri kapakları kapatılarak tohumlar 30 °C'de karanlık bir etüvde inkübe edildi. Aynı şartlar altında musluk suyu kullanılarak oluşturulan kontrol grubu da inkübasyona bırakıldı. 2 gün sonunda çimlenen tohum sayısı (kök ve filiz çıkışı) sayılarak çimlenme yüzdesi hesaplandı. Bu amaçla çimlenme hesabı yapıldıktan sonra her bir grup tohum gövde, kök ve filizlerden amilaz izolasyonu yapıldı. Çimlenmiş/çimlenmemiş her bir grup tohum bir havan içerisinde tamamen un haline gelinceye kadar ezilerek 2 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile örnekler çözüldü. Elde edilen çözelti 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmından alınan örnekler ile Beckman Coulter Biyokimya Analizörü cihazında amilaz aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi.

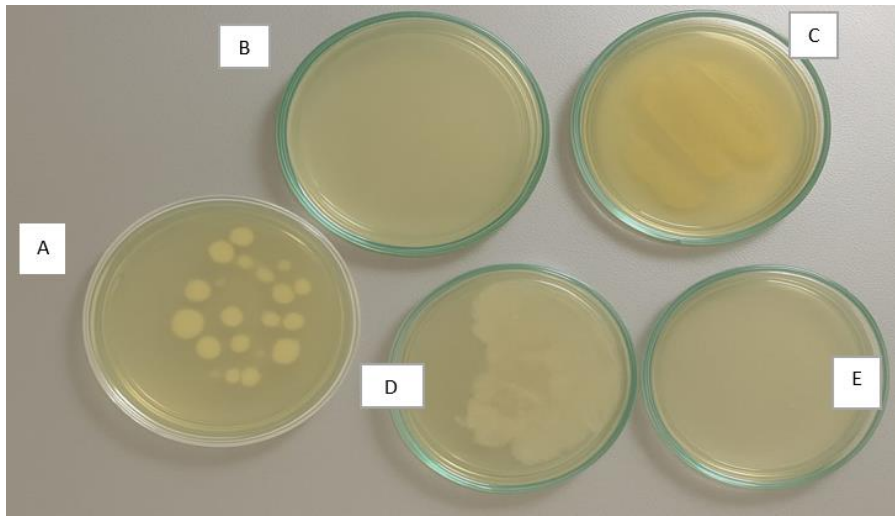
3. BULGULAR

3.1. 2,4-DCP'yi Karbon Kaynağı Olarak Kullanan En İyi Bakteriyal İzolatın Seçimi

Priestia megaterium SA3, *Stutzerimonas stutzeri* FAD2, *Klebsiella varicola* subsp. *pneumoniae* Petdeg9, *Serratia proteamaculans* ATB1 ve *Lelliotia steviae* ATB2 bakterilerinin 50 ppm 2,4-DCP'yi karbon kaynağı olarak kullanım testlerinin sonucunda Şekil 6 ve Tablo 1'de görüldüğü gibi en potansiyel izolatın *Priestia megaterium* SA3 olduğu görüldü.

Tablo 1. 2,4-DCP degradasyonu için MSM besiyerinde üretilen bakteriyal izolatların 24 saatlik OD₆₀₀ değerleri

İzolat Adı	Bakteri Üremesi (OD ₆₀₀)	
	1. Gün	2. Gün
<i>Priestia megaterium</i> SA3	2,83	3,44
<i>Stutzerimonas stutzeri</i> FAD2	1,85	2,11
<i>Klebsiella varicola</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Petdeg9	1,51	1,69
<i>Serratia proteamaculans</i> ATB1	2,20	2,54
<i>Lelliotia steviae</i> ATB2	2,53	2,91



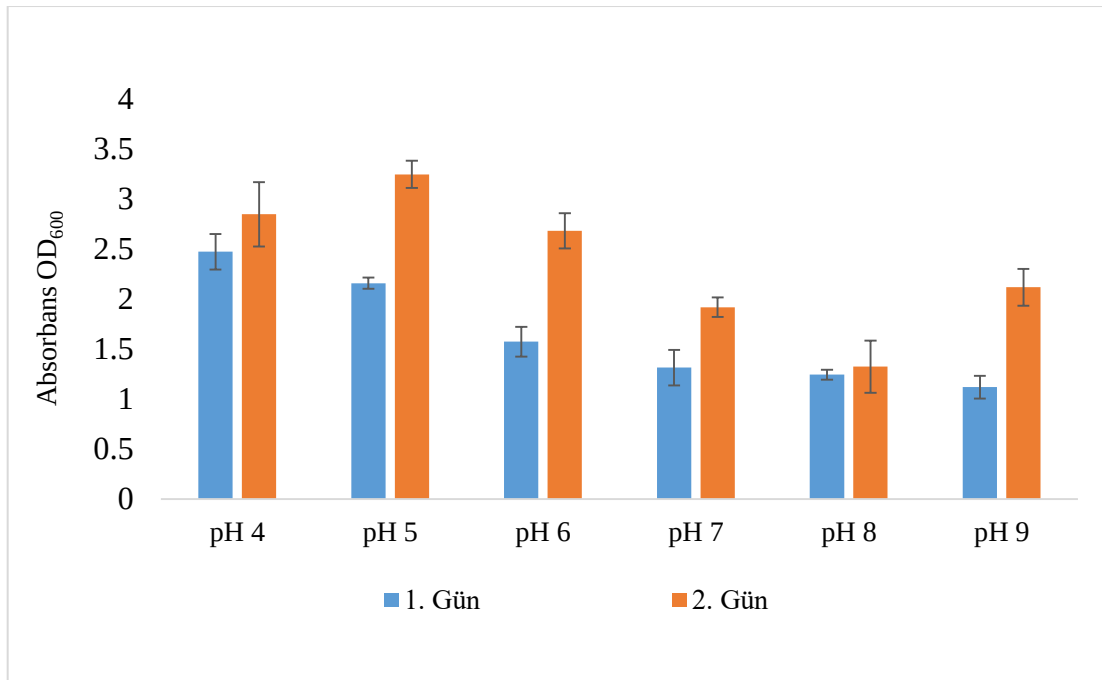
Şekil 6. Elli ppm 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde izolatların üreme görüntüleri A: *Serratia proteamaculans* ABT1, B: *Stutzerimonas stutzeri* FAD2, C: *Lelliotia steviae* ABT2, D: *Priestia megaterium* SA3, E: *Klebsiella varicola* subsp. *pneumoniae* Petdeg9.

3.2. *Priestia megaterium* SA3 İzolatının 2,4-DCP'yi Degredasyonunun Optimizasyonu

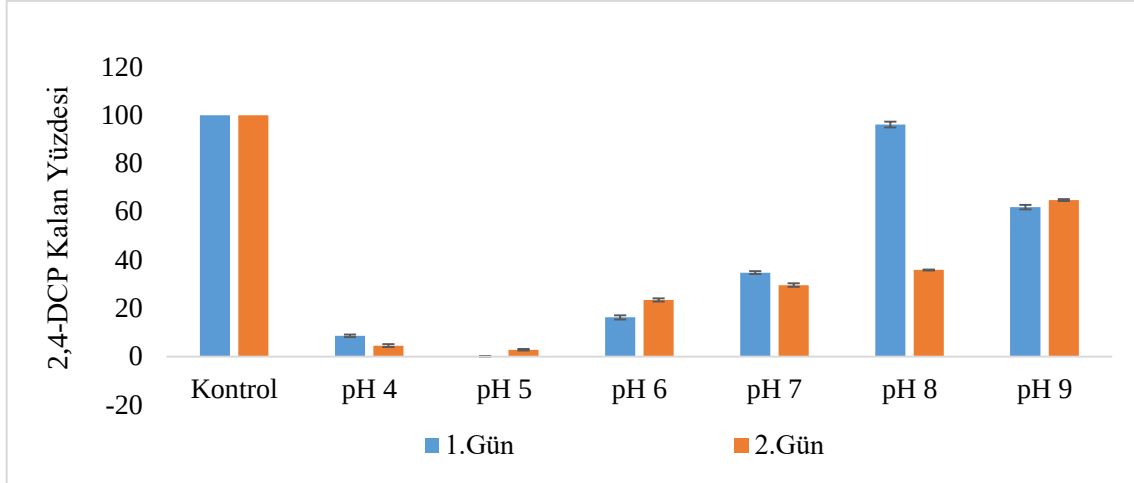
Çalışmada kullanılmak üzere *Priestia megaterium* SA3 izolatının seçilmesinin ardından optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup bu çalışmalarda besiyeri olarak MSM kullanılmıştır. Üreme ve degradasyonun optimizasyonu çalışmalarında 2,4-DCP miktarının optimize edilmesi çalışmasının dışında MSM besiyerine 50 mg/L oranında 2,4-DCP ilave edilmiştir.

3.3. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Optimum pH'ın belirlenmesi için öncelikle 50 mg/L oranında 2,4-DCP içeren MSM besiyerinin pH'ı 4,0 ile 9,0 arasına ayarlandıktan sonra *Priestia megaterium* SA3 gece kültüründen 3 ml'lik hacimlerdeki besiyerlere $OD_{600}=0,5$ olacak şekilde aşılama yapıldı. İnokülasyonların ardından kültürler 37 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Kültürlerden 500 µL örnekler alınarak üreme oranları tespit edildikten sonra alınan kültür örnekleri $10.000 \times g$ 'de 10 dak santrifüjlendikten sonra fenol tayin metodu ile içerdikleri 2,4-DCP miktarları belirlendi. Çalışma sonucunda Şekil 8'da görüldüğü gibi en iyi üreme ve 2,4-DCP degradasyonunun pH 5,0 'da olduğu tespit edildi.



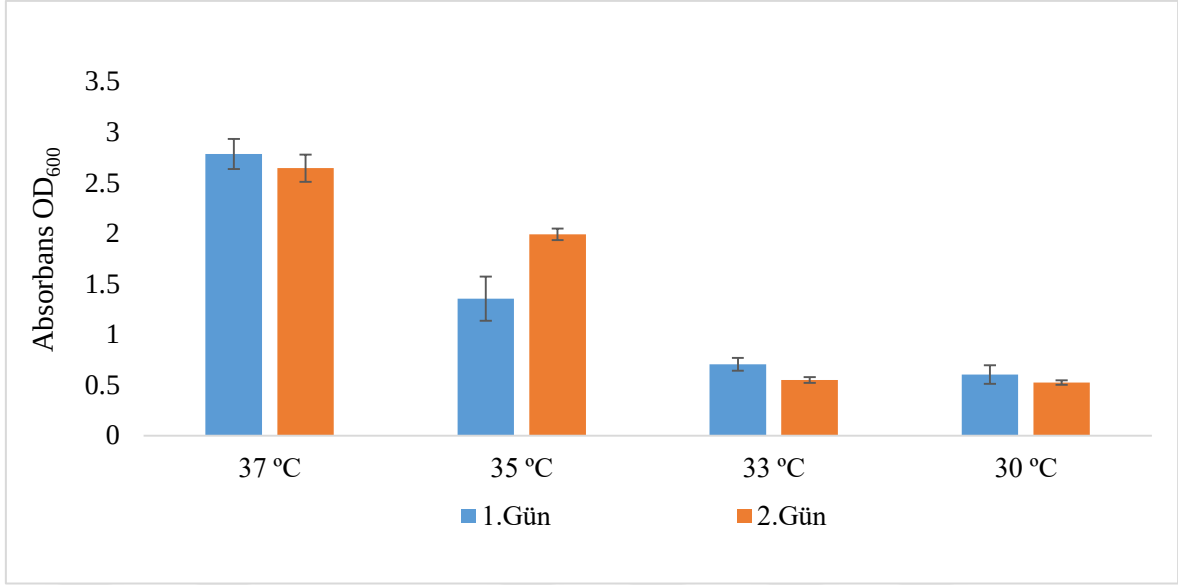
Şekil 7. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP içeren ortamda üremesine pH'ın etkisi



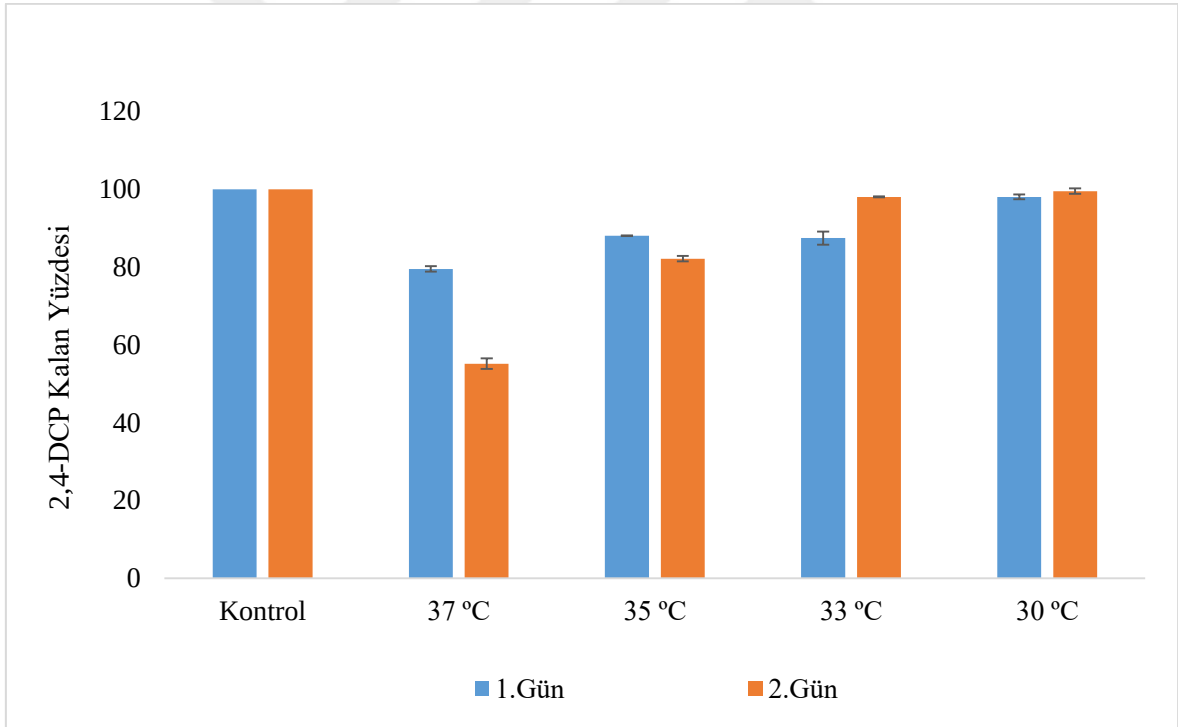
Şekil 8. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine pH'ın etkisi

3.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Optimum üreme ve 2,4-DCP degradasyon sıcaklığının belirlenmesi için öncelikle 50 mg/L oranında 2,4-DCP içeren MSM besiyerinin pH'ı bir önceki aşamada belirlenen optimum pH olan 5'e ayarlandıktan sonra *Priestia megaterium* SA3 gece kültüründen 3 ml'lik hacimlerde OD₆₀₀=0, 5 olacak şekilde aşılamlar yapıldı. İnokülasyonların ardından kültürler 30, 33, 35 ve 37 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Kültürlerden 500 µl örnekler alınarak üreme oranları tespit edildikten sonra alınan kültür örnekleri 10.000 × g'de 10 dak santrifüjlendikten sonra fenol tayin metodu ile içerdikleri 2,4-DCP miktarları belirlendi. Çalışma sonucunda Şekil 10'da görüldüğü gibi en iyi üreme ve 2,4-DCP degradasyonunun 37 °C olduğu tespit edildi.



Şekil 9. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP içeren ortamda üremesine sıcaklığın etkisi

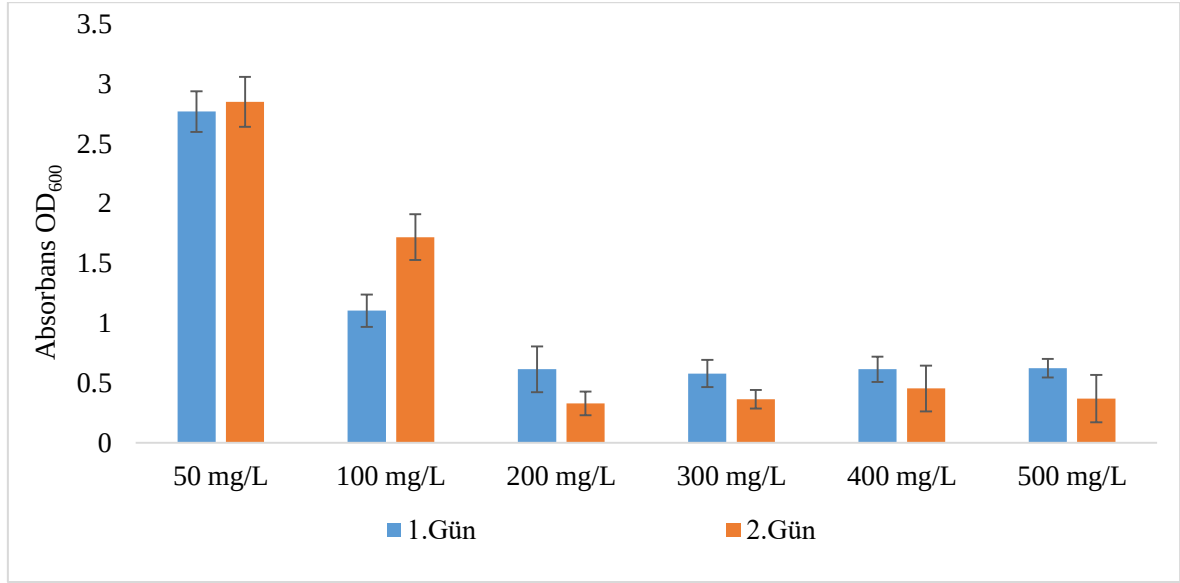


Şekil 10. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine sıcaklığın etkisi

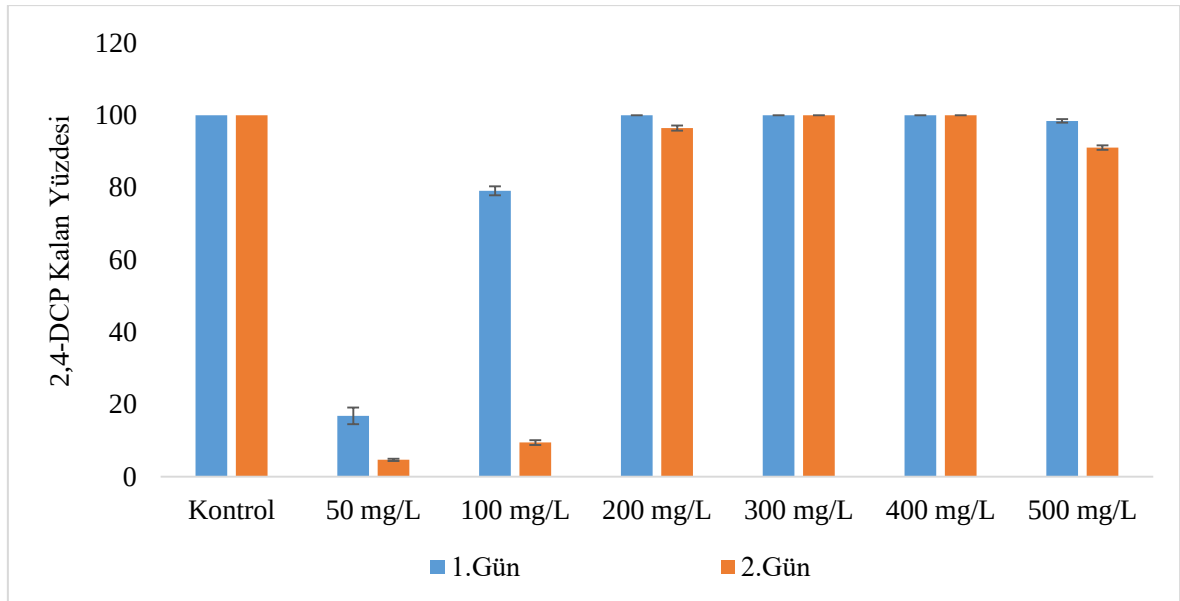
3.5. Substrat (2,4-DCP) miktarının Optimizasyonu

Biyodegradasyon çalışmalarında MSM içindeki 2,4-DCP konsantrasyonunun hem *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine hem de 2,4-DCP'nin degradasyonuna etkisi 50–500

mg/L 2,4-DCP aralığında test edildi. Yapılan testlerde, düşük konsantrasyonlarda daha yüksek verimin olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre, 50 mg/L başlangıç konsantrasyonunda %95 2,4-DCP bozunma oranı ile en yüksek verim sağlanmıştır. Ancak konsantrasyon 100 mg/L ve üzerine çıktığında bu oranlarda belirgin düşüşler gözlemlenmiştir.



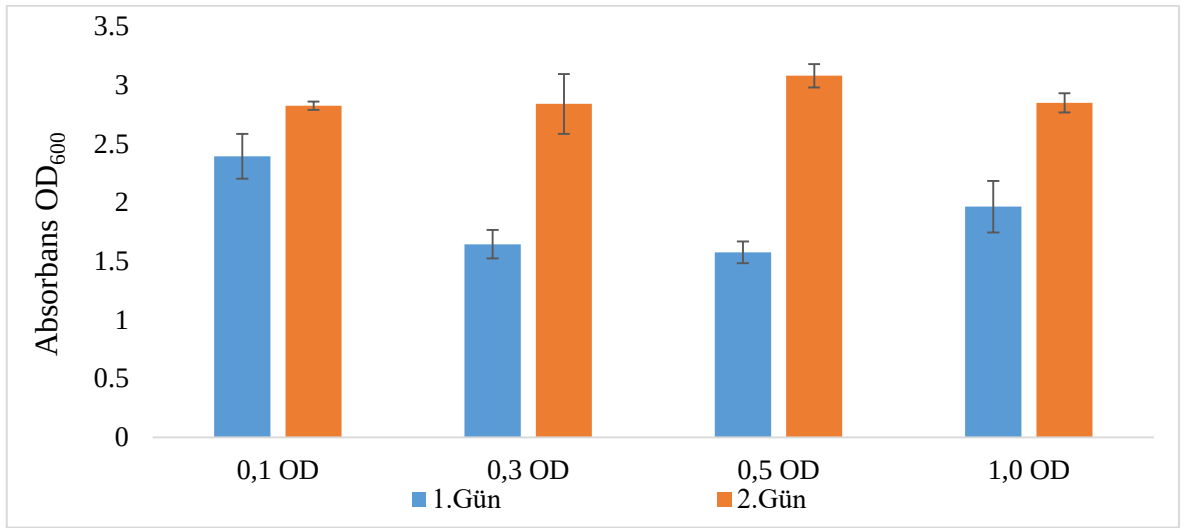
Şekil 11. *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine 2,4-DCP konsantrasyonunun etkisi



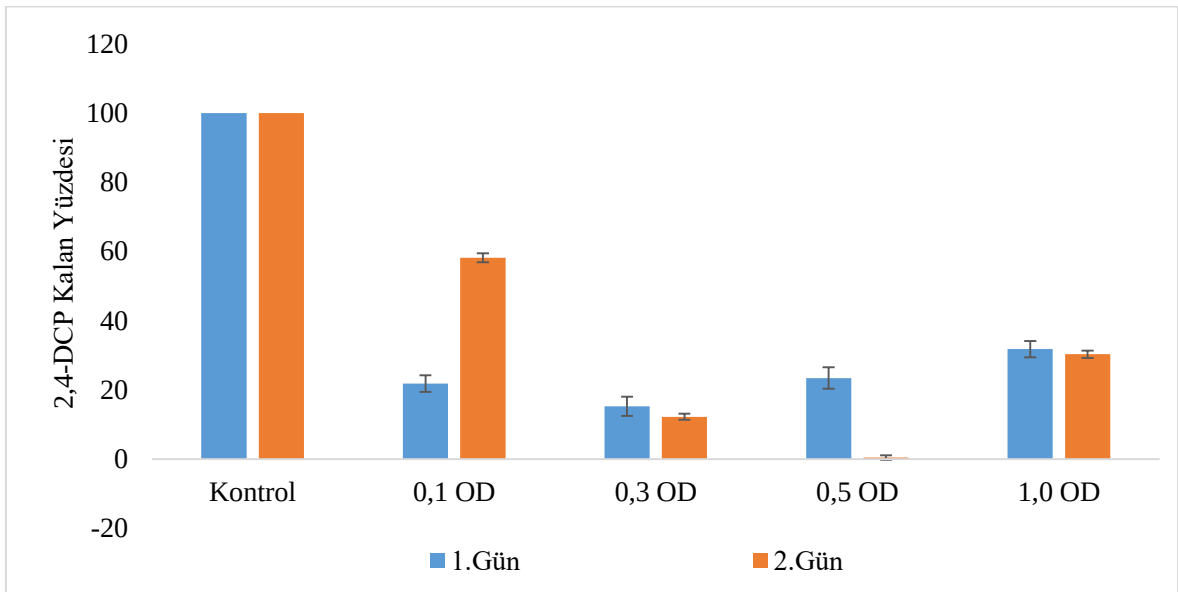
Şekil 12. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP biyodegradasyonu üzerine 2,4-DCP konsantrasyonunun etkisi

3.6. İnoküle Edilen Bakteri Miktarının 2,4-DCP Biyodegradasyonuna Etkisinin Optimizasyonu

2,4-DCP'nin biyodegradasyonuna inoküle edilen bakteri miktarının etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan *Priestia megaterium* SA3 gece kültüründen 50 mg/L oranında 2,4-DCP içeren MSM besiyerine OD₆₀₀= 0,1, 0,3, 0,5 ve 1,0 olmak üzere inokülasyonlar gerçekleştirildi. Şekil 14'da da görüldüğü gibi en iyi degradasyon aktivitesinin bakteri yoğunluğu OD₆₀₀= 0,5'de olduğu tespit edildi.



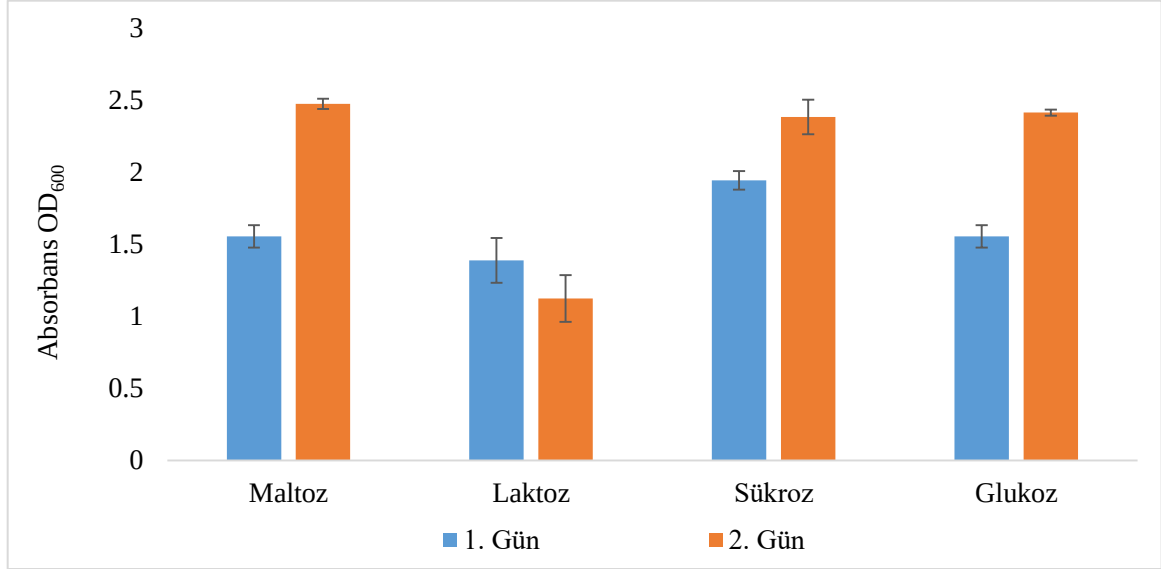
Şekil 13. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine inoküle edilen bakteri miktarının etkisi



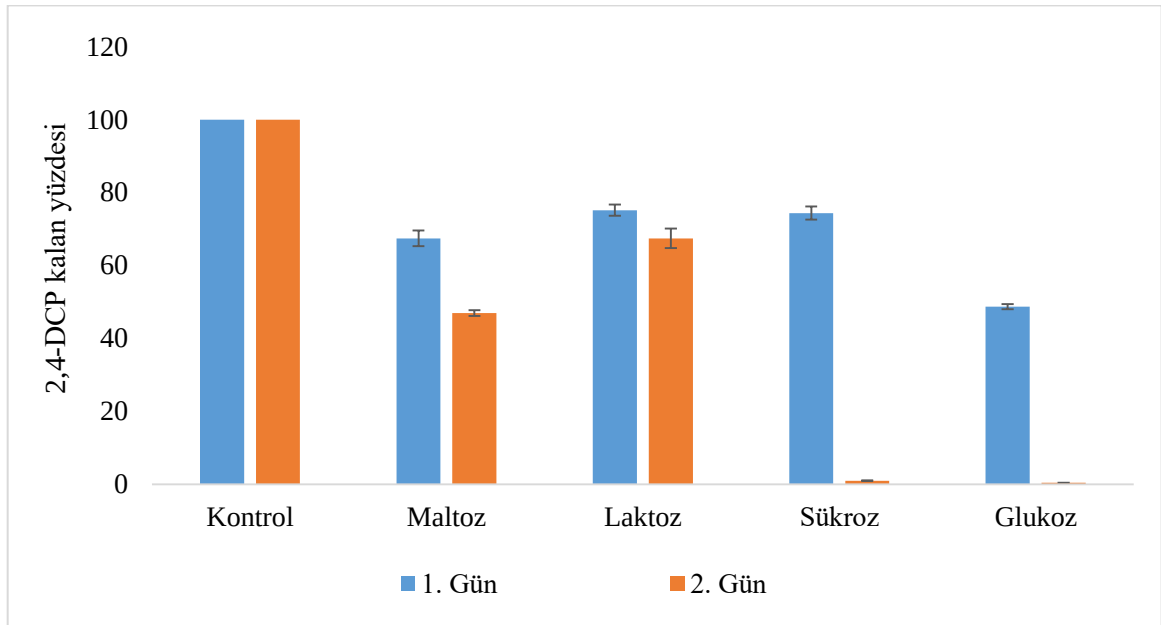
Şekil 14. İnoküle edilen bakteri miktarının 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu üzerine etkisi

3.7. Minimal Besiyerine İlave Edilen Ek Karbon Kaynaklarının 2,4-DCP Degradasyonuna Etkisinin Optimizasyonu

Priestia megaterium SA3'ün 2,4-DCP'yi biyodegradasyonuna karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi amacıyla maltoz, laktoz, süktroz ve glukoz % 0,2 oranında kullanılarak araştırıldı. Yapılan testler neticesinde en iyi degradasyon aktivitesinin karbon kaynağı glukoz kullanımı ile olduğu belirlendi.



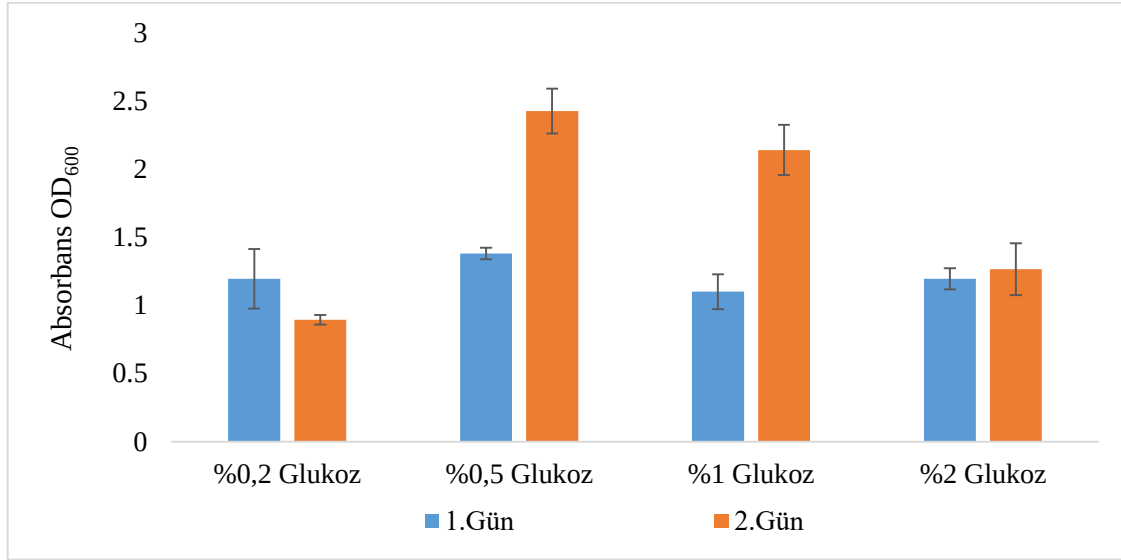
Şekil 15. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine karbon kaynağı etkisi



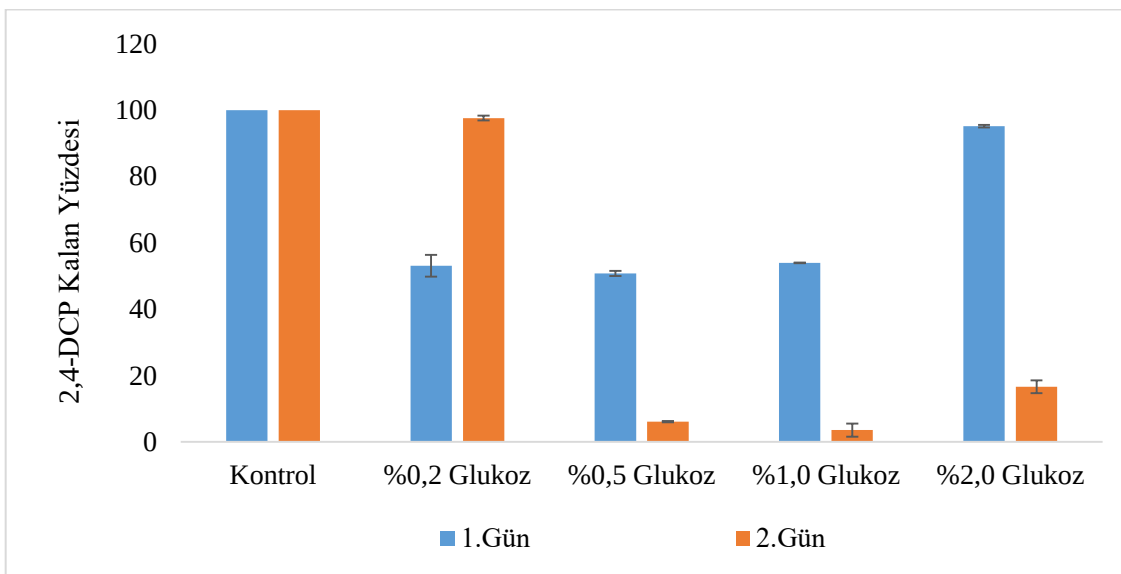
Şekil 16. *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP'yi biyodegradasyonuna karbon kaynağı etkisi

3.8. Minimal Besiyerine İlave Edilen Glukoz Konsantrasyonunun 2,4-DCP Degradasyonuna Etkisinin Optimizasyonu

Priestia megaterium SA3'ün 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu için en iyi ek karbon kaynağının glukoz olduğunun belirlenmesinin ardından optimum glukoz konsantrasyonunu belirlemek için % aktivite değerleri ölçülerek Şekil 18'de gösterildi. Yapılan ölçümler neticesinde en iyi aktivitenin glukoz konsantrasyonu % 0,5'de olduğu belirlendi.



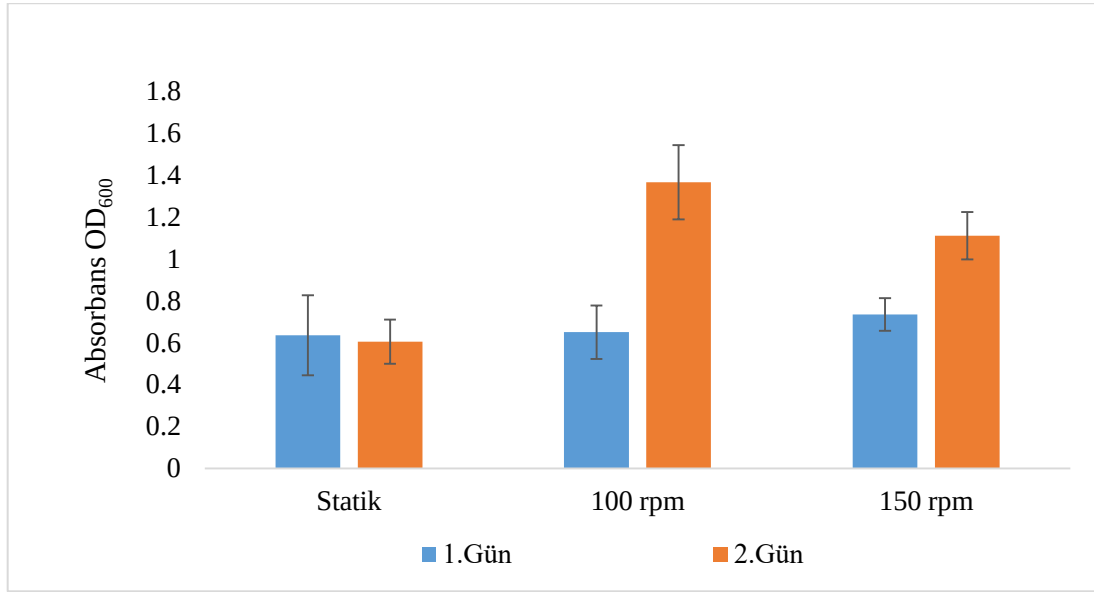
Şekil 17. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine glukoz konsantrasyonunun etkisi



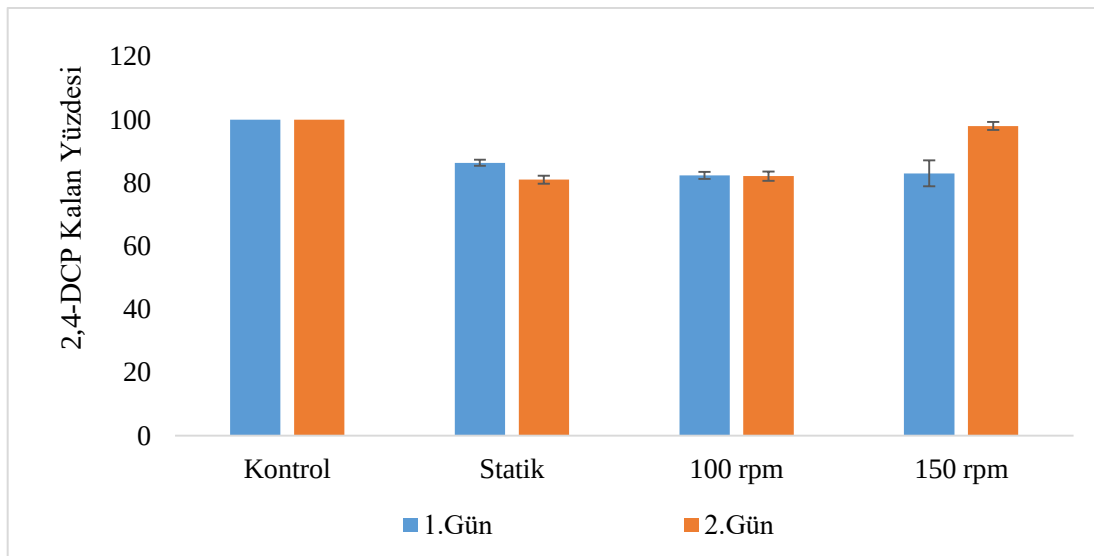
Şekil 18. Glukoz Konsantrasyonunun 2,4-DCP'nin biyodegradasyonu üzerine etkisi

3.9. 2,4-DCP içeren MSM Besiyerinde Çalkalama Hızının Biyodegradasyona Etkisinin Optimizasyonu

2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP'nin biyodegradasyon etkisi durağan 150 rpm arasında çalkalamalar kullanılarak belirlendi ve elde edilen sonuçlar % aktivite değerleri olarak Şekil 20 de gösterildi. Çalışma sonucunda en yüksek biyodegradasyon aktivitesinin 100 rpm'lik çalkalama hızında olduğu belirlendi.



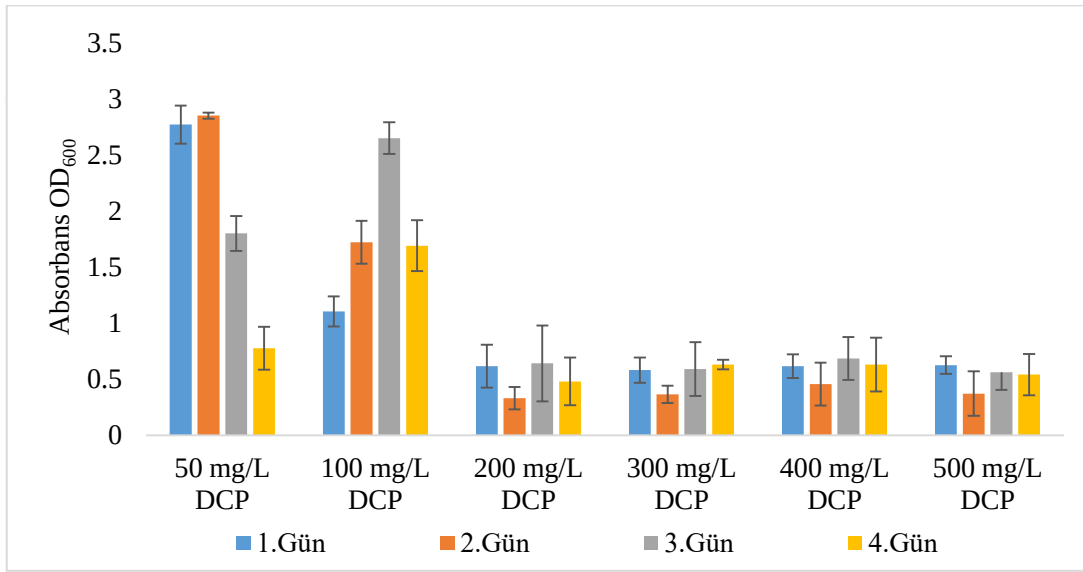
Şekil 19. 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3'ün üremesine çalkalama hızının etkisi



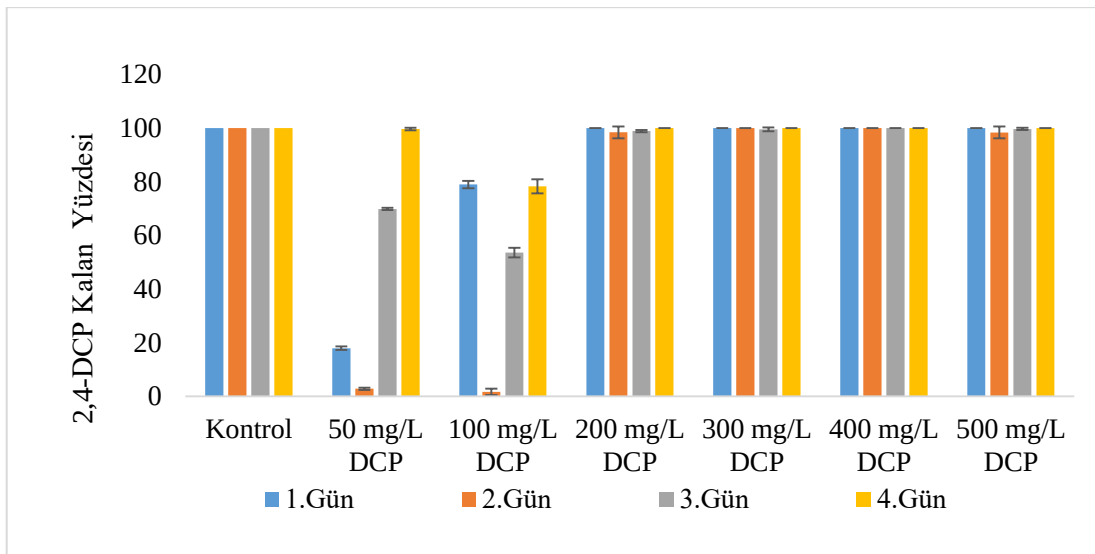
Şekil 20. *Priestia megaterium* SA3'ün çalkalama hızının (rpm) 2,4-DCP'nin biyodegradasyona etkisi

3.10. 2,4-DCP İçeren MSM Besiyerinde *Priestia megaterium* SA3 Kültürünün İnokülasyon Süresinin Biyodegradasyona Etkisinin Optimizasyonu

Çalışmada reaksiyon süresinin artırılmasının giderim performansı üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Sürenin 12 ila 24 saat arasında uzatılmasıyla birlikte, bozunma (biyodegradasyon) oranların da azalma eğilimi gözlemlenmişken bu sürenin artmasıyla bozunma oranları azalma göstermiştir. Yapılan tüm çalışmalarımızda bu süreyi 24 saat üzerine çıkararak ölçümleme yapıldığında bozunma ve bakteri büyümeleri azalmıştır (Şekil 22).



Şekil 21. İnokülasyon süresinin bakteri üremesine etkisi

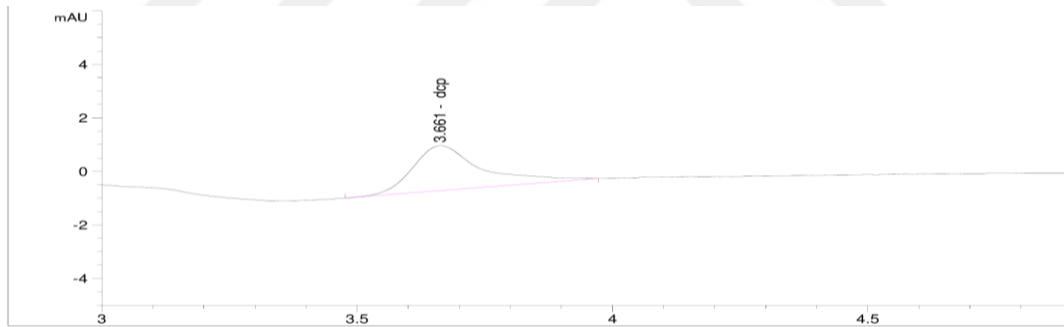


Şekil 22. İnokülasyon süresinin 2,4-DCP' nin biyodegradasyonuna etkisi

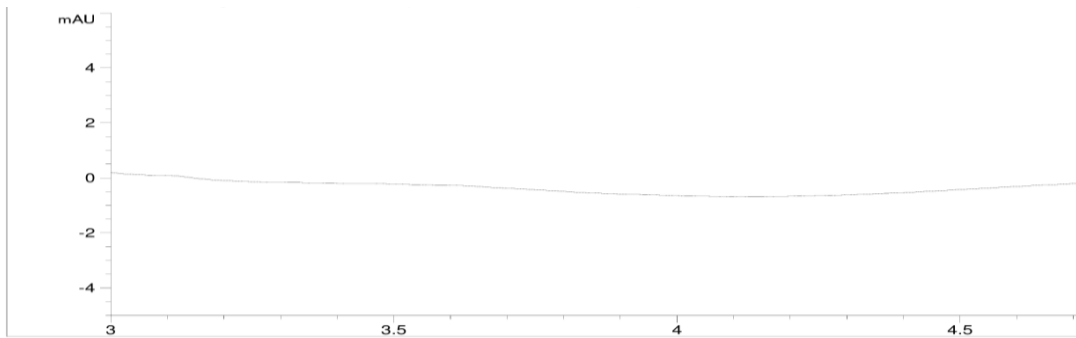
Bu durum, degradasyonun başlangıçta daha çok enzimatik parçalanma ile gerçekleştiğini, zaman ilerledikçe ise yüzey adsorpsiyonunun baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu bulgu, enzimatik süreçler ile adsorpsiyon arasında zamana bağlı bir orantı olduğunu düşündürmektedir.

3.11. HPLC Sonuçları

Yüz ppm 2,4-DCP içeren MSM besiyerinde *Priestia megaterium* SA3 izolatının iki günlük inkübasyonu sonucu 2,4-DCP'nin degradasyonu HPLC analizi sonuçları Şekil 23, 24' de görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde kontrol olarak MSM+ 2,4-DCP analizinde öngörülen 2,4-DCP pikinin görüldüğü buna karşın MSM+ 2,4-DCP+ *Priestia megaterium* SA3 analizinde ise degradasyona bağlı olarak 2,4-DCP pikinin ortadan kaldığı görülmektedir. Kontrol analizinde (Şekil 23) 0.104817 mg/μl 2,4-DCP mevcut iken *Priestia megaterium* SA3 ile muamele edilen reaksiyon (Şekil 24) sonucunda ise hiç 2,4-DCP'nin olmadığı görülmektedir.



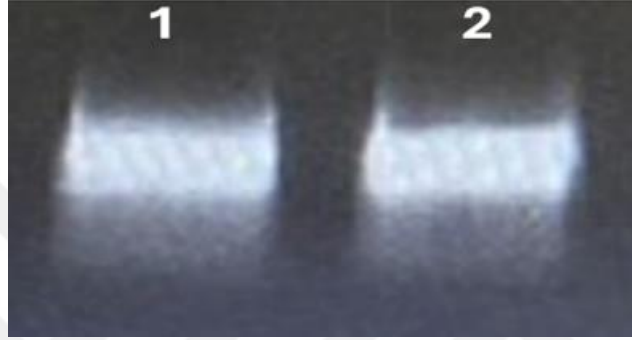
Şekil 23. 50 ppm 2,4-DCP+MSM'ye ait HPLC grafiği



Şekil 24. 50 ppm 2,4-DCP+MSM + *Priestia megaterium* SA3 'ye ait süpernatantın HPLC grafiği

3.12. Transkriptom Analizi

Priestia megaterium SA3 izolatının 2,4-DCP içermeyen MSM (1) ve 2,4-DCP içeren MSM (2)'de iki günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen kültür pelletinden izole edilen RNA'lara ait görüntü Şekil 25'de görülmektedir. İzole edilen RNA'lar RNeasy® PowerClean® Kiti kullanılarak temizlendikten sonra kalite kontrolleri yapılmış ve Refgen Firmasına gönderilerek transkriptom analizine tabi tutulmuştur.



Şekil 25. *Priestia megaterium* SA3 izolatından izole edilen RNA örnekleri. (1) MSM ve (2) 2,4-DCP+ MSM ortamda üretilen *Priestia megaterium* SA3'den izole edilen total RNA.

3.13. RNA-Seq Veri Kalitesi

Ham RNA-Seq verilerinin kalite kontrolü FastQC aracı ile yapılmış, ardından filtreleme ve kırpma (trimming) işlemleri fastp (v0.23.4) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen iki biyolojik örneğe (RP25-145-3 ve RP25-145-4) ait kalite metrikleri aşağıda Tablo 2' de özetlenmiştir.

Genel kalite metrikleri (Ham Veri) açısından değerlendirildiğinde, her iki örnek için de per-base quality score dağılımı yüksek olup, okuma uzunluğu boyunca Phred kalite skorları genellikle 30'un üzerinde seyretmiştir. Ortalama GC içeriği RP25-145-3 için %51,2, RP25-145-4 için %50,9 olarak hesaplanmıştır. Ham veride duplikasyon oranı RP25-145-3 için %13,7, RP25-145-4 için %12,9 olarak tespit edilmiştir.

Filtreleme ve trimleme sonuçları açısından değerlendirildiğinde, ham okuma çiftlerinden düşük kaliteli bazlar, adaptör sekansları ve çok kısa okumalar çıkarıldıktan sonra okuma sayıları Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. Filtreleme ve trimleme sonuçları karşılaştırması

Örnek ID	Ham Okuma Sayısı	Filtre Sonrası Okuma Sayısı	Kayıp (%)	Temiz Veri Oranı (%)
RP25-145-3	15.894.606	15.742.830	0,95	99,05
RP25-145-4	11.470.080	11.362.214	0,94	99,06

Kalite iyileşmesi aşamasında, trimleme sonrası her iki örnek için de per-base quality score dağılımında belirgin bir iyileşme gözlenmiş, düşük kaliteli uç bazlar temizlenmiştir. Adaptör kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırılmış, GC içeriği ise ham veri ile benzer seviyede korunmuştur. Duplikasyon oranı minimal seviyede değişmiş olup, bu durum verinin biyolojik tekrarlara dayalı yüksek güvenilirliğini göstermektedir.

3.14. Okuma Hizalama Sonuçları

RNA-Seq ham verileri, referans genom dizisi ile hizalama işlemi için HISAT2 (v2.2.1) kullanılarak analiz edilmiştir. Hizalama sonrası istatistikler, samtools flagstat (v1.14) komutu ile elde edilmiştir. Her örnek için toplam okuma sayısı, haritalanan okuma sayısı ve yüzdesi, properly paired oranı ve ortalama kapsama derinliği hesaplanmıştır.

Hizalama sürecinde, her iki biyolojik tekrarın da yüksek hizalanma oranlarına (%83–85) sahip olduğu ve kapsama derinliklerinin (402–503x) RNA-Seq veri setlerinin aşağı akış analizleri için yeterli olduğunu göstermektedir. Properly paired oranlarının %80'in üzerinde olması, eşleşen çift uçlu okumaların büyük oranda referans genoma doğru şekilde hizalandığını göstermektedir.

Tablo 3. Referans genoma göre hizalama sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek Kodu	Toplam Okuma Sayısı	Haritalanan Okuma (n)	Haritalanan Okuma (%)	Properly Paired (n)	Properly Paired (%)	Ortalama Kapsama Derinliği (X)
RP25-145-3	15.489.606	13.098.016	84,56	12.694.694	81,96	502,95
RP25-145-4	11.470.080	9.614.998	83,83	9.209.150	80,29	402,11

* *Toplam Okuma Sayısı*: QC sonrası kalan toplam çift uçlu okuma sayısı. *Haritalanan Okuma (%)*: Referans genoma başarıyla hizalanan okumaların yüzdesi. *Properly Paired (%)*: Çift uçlu okumaların her iki ucunun da doğru şekilde hizalandığı oran. *Ortalama Kapsama Derinliği*: Referans genoma düşen ortalama okuma sayısı (X).

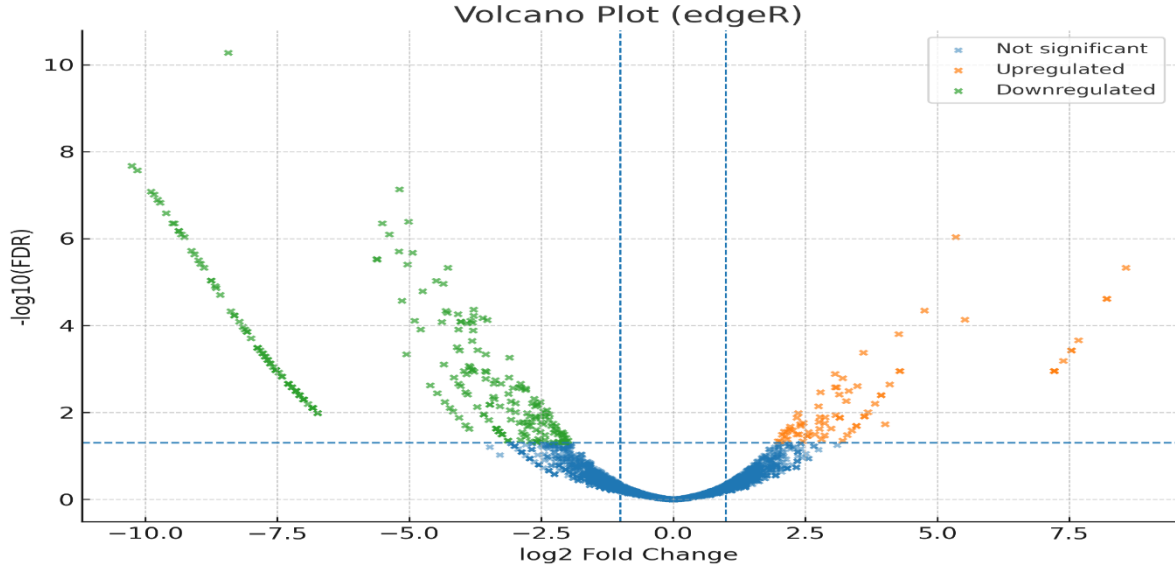
Bu istatistikler, hizalama işleminin verimli olduğunu ve elde edilen verilerin güvenilir diferansiyel gen ekspresyonu analizleri için uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

3.15. Diferansiyel Gen Ekspresyon Sonuçları

Hizalama sonrası elde edilen gen-bazlı sayımlar edgeR ile analiz edilmiştir. Kütüphane boyutları TMM yöntemiyle normalize edilmiş, diferansiyel ifade için $FDR < 0.05$ ve $|\log_2FC| \geq 1$ eşikleri kullanılmıştır. Bu kriterlerle toplam 3.999 gen test edilmiş; bunların 319'u anlamlı farklılık göstermiştir. Anlamlı genlerin 74'ü yukarı regüle (ARTMA), 245'i aşağı regüle (AZALMA) olup, aşağı regüle genlerin fazlalığı ($\approx 3,3$ kat) 2,4-DCP maddesi uygulamasının baskılayıcı/transkripsiyonel susturucu etkisinin baskın olabileceğine işaret etmektedir. Transkriptom analizine göre RS01625, RS10325, RS19005, RS06395 ve RS21685 genlerinin transkript düzeylerinde artış görülmektedir. Bu durum ifade edilen bu genlerin 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) bozunmasıyla ilişkili metabolik süreçlerde aktif rol oynadığını düşündürmektedir. Bu genlerin ekspresyonundaki yükselme, bakterinin 2,4-DCP varlığına bir cevap olarak katabolik sistemlerini yeniden düzenlediğini göstermektedir. RS01625 ve RS10325 genlerinin oksijenaz veya dehalogenaz tipinde enzimleri kodladığı bilinmektedir. Böylece bu gen ürünlerinin aromatik halkaların hidroksilasyonuna ve klor atomlarının uzaklaştırılmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. Redüktaz/transferaz aktivitesine sahip olduğu bilinen RS19005 geninin ise ara ürünlerin metabolizmasında yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca RS06395 geninin olası bir transkripsiyonel düzenleyici olarak 2,4-DCP'nin degradasyonunda görev alan genlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği, RS21685 geninin ise 2,4-DCP'nin hücre içine alımını veya toksik ara ürünlerin taşınmasını düzenleyen bir taşıyıcı protein kodladığı öngörülmektedir. Bu bulgular, söz konusu genlerin artan ekspresyonunun 2,4-DCP'nin bakteriyal degradasyonunda önemli enzimatik ve düzenleyici işlevler üstlendiğini göstermekte ve 2,4-DCP detoksifikasyonunun moleküler düzeydeki mekanizmalarına ışık tutmaktadır.

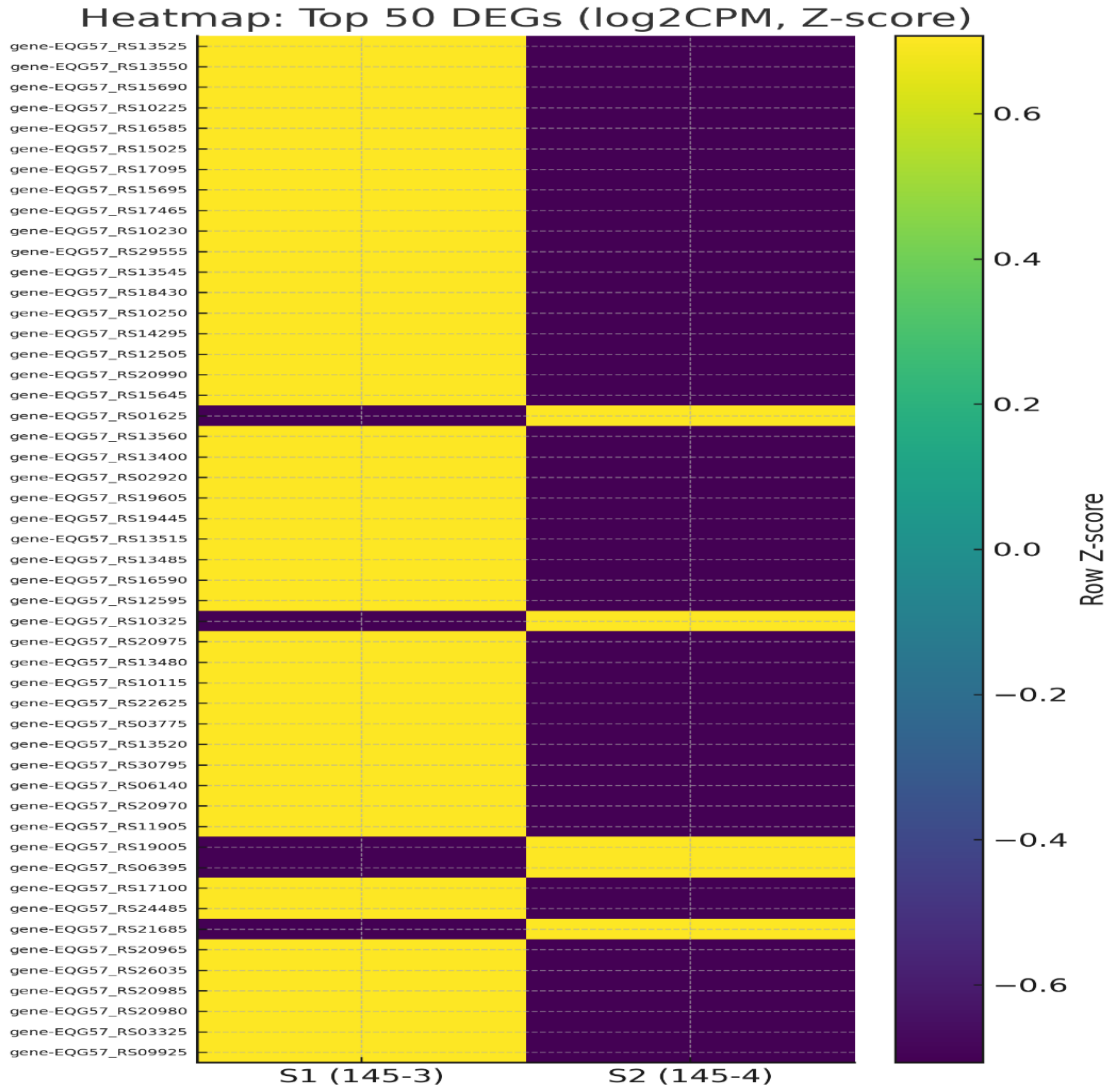
Anlamlı genlerde etki büyüklüğü geniş bir aralığa yayılmıştır: $\log_2FC$ -10,256 ile +8,567 arasında değişmektedir. İstatistiksel güvenilirlik de yüksektir; FDR değerleri $5,35 \times 10^{-11}$ ile 0,048 aralığındadır. Bu desen, güçlü baskılanan bir gen kümesiyle birlikte belirgin düzeyde aktive olan genlerin de bulunduğunu göstermektedir. Sonuçların görsel özeti için hazırlanan volcano plot'ta (Şekil 26) (x-ekseni $\log_2FC$, y-ekseni $-\log_{10}FDR$)

$\log_2FC = \pm 1$ ve $FDR = 0.05$ eşikleri kesikli çizgilerle işaretlenmiş; bu sınırların dışında kalan noktalar anlamlı genleri açıkça ayırt etmiştir.



Şekil 26. S2 ve S1 (2,4-DCP uygulanmamış ve uygulanmış hücre) koşulları arasındaki diferansiyel gen ekspresyonunu gösteren volkan grafiği

Ek olarak, en anlamlı 50 genin (FDR'e göre) $\log_2CPM$ değerleri kullanılarak oluşturulan ısı haritasında (Şekil 27) satır-z skoru ile normalize edilmiş ifade profilleri iki koşul arasında net bir ayrışma göstermiş, kümelenme sonuçları deneysel ayrımı desteklemiştir.



Şekil 27. S2 ve S1 koşulları arasında, FDR değerine göre sıralanmış en anlamlı 50 diferansiyel olarak eksprese genin ısı haritası

Çalışmada FDR'e göre ilk 10 aday gen ayrıca tablo halinde sunulmuştur (Tablo 4) (gen kimliği, $\log_2FC$, $\logCPM$, P-değeri, FDR ve yönelim bilgileri). Bu bütüncül değerlendirme, X maddesinin *Priestia megaterium*'da geniş kapsamlı ancak yönü ağırlıkla down-regülasyon olan bir transkriptomik yanıt tetiklediğini göstermektedir.

Tablo 4. En anlamlı 10 diferansiyel olarak ifade edilen gen (FDR değerine göre sıralı)

Gen ID	log ₂ FC	logCPM	P-Değeri	FDR	Yönelim
EQG57_RS13525 xanthine dehydrogenase family protein molybdopterin- binding subunit	-8.427	4.315	1.34×10^{-14}	5.35×10^{-11}	AZALMA
EQG57_RS13550 hypothetical protein	-10.256	2.823	1.05×10^{-11}	2.10×10^{-8}	AZALMA
EQG57_RS15690 Hsp20/alpha crystallin family protein	-10.153	2.723	2.02×10^{-11}	2.69×10^{-8}	AZALMA
EQG57_RS10225 cytochrome P450	-5.187	5.761	7.33×10^{-11}	7.33×10^{-8}	AZALMA
EQG57_RS16585 undecaprenyl- diphosphate phosphatase	-9.888	2.470	1.05×10^{-10}	8.37×10^{-8}	AZALMA
EQG57_RS15025 hypothetical protein	-9.833	2.417	1.46×10^{-10}	9.76×10^{-8}	AZALMA
EQG57_RS17095 spore coat protein CotJB	-9.765	2.352	2.23×10^{-10}	1.27×10^{-7}	AZALMA
EQG57_RS15695 hypothetical protein	-9.717	2.307	2.97×10^{-10}	1.49×10^{-7}	AZALMA
EQG57_RS17465 NAD(P)-dependent alcohol dehydrogenase	-9.604	2.199	5.89×10^{-10}	2.62×10^{-7}	AZALMA
EQG57_RS10230 serine/threonine protein kinase	-5.015	4.390	1.03×10^{-9}	4.10×10^{-7}	AZALMA

3.16. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizleri (GO)

Diferansiyel gen ekspresyon analizinden elde edilen ARTMA, AZALMA ve birleşik (BOTH) gen listeleri kullanılarak biyolojik süreç (GO:BP) kategorilerinde fonksiyonel zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, clusterProfiler paketi ile over-representation analysis (ORA) yaklaşımı uygulanmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyinin belirlenmesinde Benjamini–Hochberg (BH) yöntemi ile düzeltilmiş p-değerleri (p.adjust) kullanılmıştır. Çalışmada yalnızca p.adjust < 0.01 kriterini sağlayan biyolojik süreç terimleri raporlanmıştır.

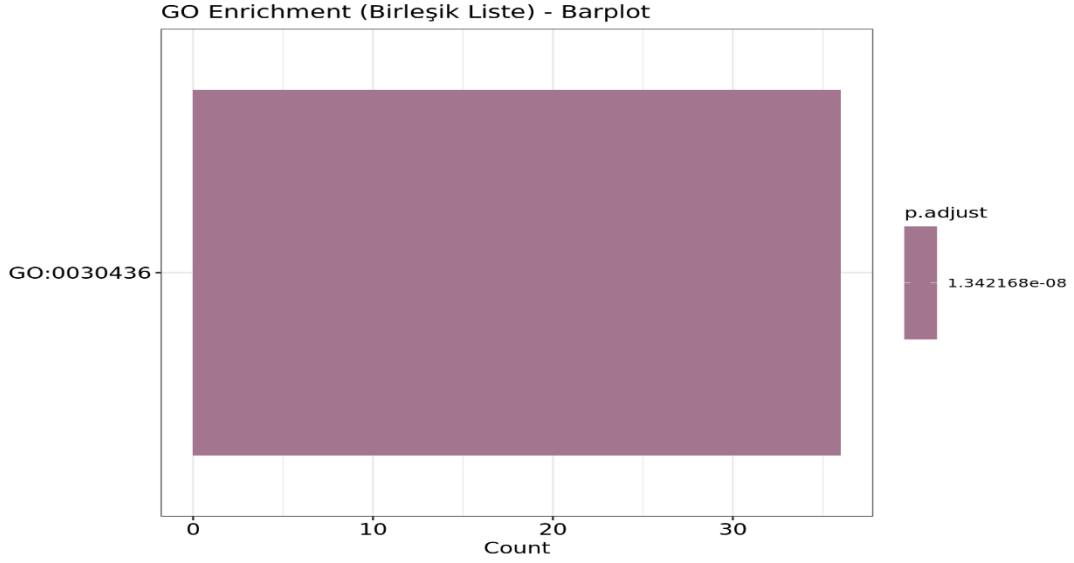
Analiz sonuçları incelendiğinde, ARTMA ve AZALMA gen listeleri için belirtilen anlamlılık eşikini sağlayan herhangi bir biyolojik süreç terimi saptanmamıştır. Bu durum,

tek başına yukarı veya aşağı yönde farklılaşan genlerin belirgin bir biyolojik süreç sinyali oluşturmadığını, ancak bu genlerin birlikte değerlendirildiğinde ortak biyolojik süreçlerde zenginleşme gösterebileceğini düşündürmektedir.

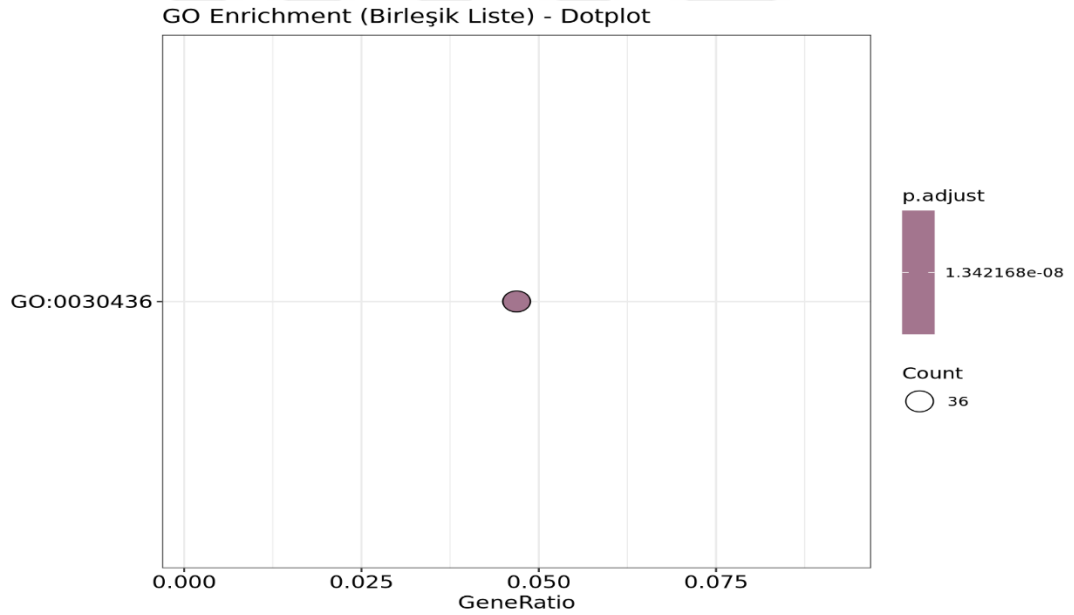
Birleşik (BOTH) gen listesi incelendiğinde ise GO:0030436 kodlu biyolojik süreç teriminin istatistiksel olarak anlamlı derecede zenginleştiği belirlenmiştir ($p.adjust = 1.34 \times 10^{-8}$). Bu terim, toplam 768 farklılaşan genin 36'sında yer almakta olup, arka plandaki 3.322 gen içinde yalnızca 56 genin bu terimle ilişkilendirildiği görülmüştür. Fold enrichment değeri 2,78, z-score değeri ise 7,37 olarak hesaplanmış ve bu değerler, ilgili biyolojik sürecin diferansiyel genler arasında beklenenden yaklaşık üç kat fazla temsil edildiğini göstermektedir. Bu bulgular, söz konusu biyolojik sürecin çalışmanın biyolojik bağlamında merkezi bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, bar plot (Şekil 28) ve dot plot (Şekil 29) görselleştirmeleri ile desteklenmiştir. Dot plot grafiğinde yatay eksen GeneRatio değerini, balon büyüklüğü süreç ile ilişkili gen sayısını (Count), renk yoğunluğu ise $p.adjust$ değerini göstermektedir. Bu grafikte, GO:0030436 teriminin yüksek anlamlılık düzeyi koyu renk tonuyla açıkça görülmektedir. Bar plot grafiğinde ise yatay eksen gen sayısı (Count), renk tonunda ise $p.adjust$ değerleri gösterilmiş; GO:0030436 teriminin diğer süreçlere kıyasla belirgin şekilde öne çıktığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, fonksiyonel zenginleştirme analizleri, yalnızca birleşik gen listesinde anlamlı bir biyolojik süreç zenginleşmesi olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, yukarı ve aşağı regüle genlerin birlikte değerlendirilmesinin, ilgili biyolojik süreçlerin tespitinde kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. GO:0030436 teriminin yüksek anlamlılığı ve yüksek zenginleşme katsayısı, bu sürecin deneysel sistemin biyolojik mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. İlerleyen aşamalarda bu sürecin biyolojik işlevi ve ilgili genlerin rolü daha detaylı fonksiyonel analizlerle incelenmelidir.



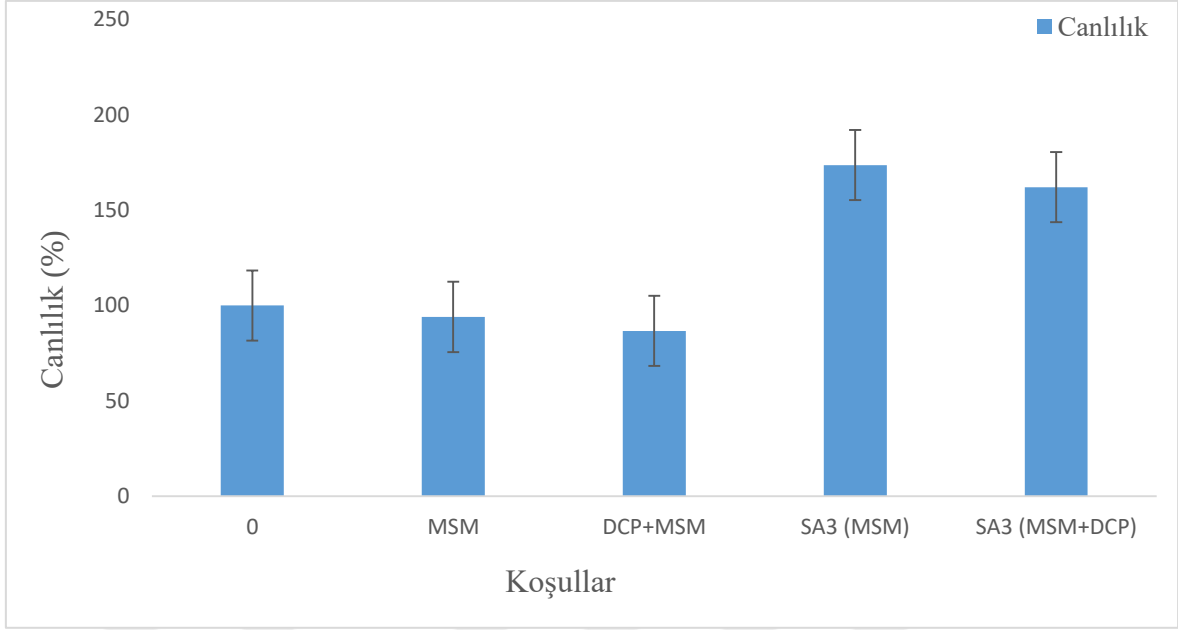
Şekil 28. Birleşik (BOTH) gen listesi için biyolojik süreç (GO:BP) kategorilerinde yapılan fonksiyonel zenginleştirme analizinin bar grafiği



Şekil 29. Birleşik (BOTH) gen listesi için biyolojik süreç (GO:BP) kategorilerinde yapılan fonksiyonel zenginleştirme analizinin balon grafiği

3.17. 2,4-DCP Degredasyonunun Sitotoksik Etkisi

MSM, MSM+DCP ve MSM+DCP+*Priestia megaterium* SA3'un iki günlük kültürlerine ait süpernatantlar ile 24 saat inkübe edilen HDFa hücre hattı kullanılarak yapılan MTT testi sonucunda Şekil 30'da verilen sonuçlar elde edildi.



Şekil 30. HDFa hücre hattı kullanılarak yapılan MTT testi sonucunda elde edilen % canlılık değerleri

Şekil 30 incelendiğinde görüldüğü gibi *Priestia megaterium* SA3'ün uygulandığı hem MSM ortamında hem de 2,4-DCP içeren MSM ortamının uygulandığı hücrelerdeki canlılık değerleri oldukça artmıştır. Bu sonuç uygulanan bakterinin 2,4-DCP'nin toksisitesini azalttığını göstermektedir.

3.18. 2,4-DCP Degredasyonunun Fitotoksik Etkisi

MSM, MSM+DCP ve MSM+DCP+*Priestia megaterium* SA3'un iki günlük kültürlerine ait süpernatant numuneleri kullanılarak yapılan tohum çimlenmesi denemeleri sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 5'de görülmektedir. Tablo 5'de de görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan numunelerdeki çimlenmelerin genel olarak diğer tüm deney gruplarına göre daha düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 5. *Priestia megaterium* SA3'ün inkübasyonu ile elde edilen kültür süpernatantları ile yapılan Börülce fasülyesi fitotoksisite çalışması sonuçları

Madde	Çimlenen Tohum (adet)	Adet/Filiz uzunluğu(cm)	Amilaz Aktivitesi (U/L)
1- MSM	13	4 X 1 1 X 1,5 4 X 2 3 X 3 1 X 4	4500
2- DCP+MSM	15	6 X 1 1 X 1,5 6 X 2 2 X 2,5	2768
3- SA3+ MSM	15	4 X 1 1 X 1,5 6 X 2 4 X 2,5	3174
4- SA3+DCP+MSM	15	2 X 1 2 X 1,5 3 X 2 4 X 3 1 X 3,5 3 X 4	3984
5- SU (Çeşme)	17	1 X 3 13 X 4 3 X 5	4453

4. TARTIŞMA

Üzerinde biyodegradasyon çalışması gerçekleştirilen bir klorofenol olan 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) çevre açısından toksik/kalıcı bir kirletici olup ABD Çevre Koruma Ajansı'nın insan sağlığı kriter belgelerinde öncelikli olarak ele alınmaktadır [U.S. EPA., 2015]. 2,4-DCP'nin zayıf asit karakteri ($pK_a \approx 7,5-7,9$) çevresel pH'ta nötral/anyonik türler arasında denge oluşturur; bu denge membran geçişi, adsorpsiyon ve enzimatik oksidasyon hızlarını doğrudan etkiler [U.S. EPA., 1980; NCBI 2025, 2025].

Klorofenoller kalıcılık, toksisite ve membranlardan geçiş özellikleri nedeniyle biyolojik arıtım için zorlu hedeflerdir. Giderim çoğu zaman iki eşzamanlı sürecin birleşimidir: (i) hücre yüzeylerine/ortam katılarına adsorpsiyon ve (ii) enzimatik biyodegradasyon (çoğu sistemde her ikisi de anlamlı katkı verir). Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları incelendiğinde uzun temas sürelerinde giderimde adsorpsiyonun baskınlaşabildiğine dair bulgular, 2,4-DCP gibi orta hidrofobik bileşikler için beklenen bir sonuçtur.

Çalışmamızda 2,4-DCP'nin degradasyonu için kullanılan *Priestia megaterium* türü öncelikle *Bacillus megaterium* olarak adlandırılmış olmasına karşın *Bacillus* cinsinden *Priestia* cinsinin ayrılması ile birlikte yeniden adlandırılarak *Priestia* cinsinin bir üyesi olarak dizayn edilmiştir [Parte ve ark.,2020]. *Priestia* cinsine ait bakteriler spor oluşturabilen, mezofilik ve oksijenli koşullarda hızla üreyebilirken fenolik/klorofenolik substratların parçalanmasında sık kullanılan mikroorganizmalardır [NCBI, 2025; Gupta ve ark., 2016].

Bu çalışmada *Priestia megaterium* SA3 ile 2,4-DCP degradasyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen 2,4-DCP degradasyonunun optimizasyonunda en yüksek giderimin ortam pH'ının 5,0, 37 °C sıcaklıkta, bakteri inokülasyonu miktarının $OD_{600} = 0,5$, kültürün çalkalama hızının 100 rpm, degradasyonun optimum gerçekleştiği kültür ortamındaki ikincil karbon kaynağının glukoz (% 0,5), 2,4-DCP miktarının 50 mg L⁻¹ ve inkübasyonun süresinin ise 48 saat olduğu tespit edilmiştir.

Klorofenollerin çevresel kimyası pH'a duyarlıdır ve 2,4-DCP'nin pK_a 'sı $\sim 7,9$ 'dur; dolayısıyla pH 7–8 civarında bu bileşik çoğunlukla nötral formda bulunur, pH düştükçe tam nötral forma yaklaşır. Bu, zar geçirgenliği/adsorpsiyon ve enzimatik oksidasyon adımlarını etkileyebilir [NCBI, 2025; UKTAG, 2007]. Bu çalışmada elde edilen optimum değer olan

pH 5,0, iki temel mekanizmayla uyumludur. Daha önce üzerinde benzer bir çalışma gerçekleştirilen *Bacillus subtilis* AAK'nın 2,4-DCP gideriminde optimum pH'nın 8,0 ve sıcaklığının ise 37 °C olduğu görülmektedir [Menale ve ark., 2012]. Genel olarak bu pH değerlerinde 2,4-DCP'nin nötral fraksiyonu artar ve hücre zarından geçiş/adsorpsiyon kolaylaşır [U.S. EPA., 2015; NCBI, 2025]. Klorofenollerin enzimatik oksidasyonunda görev alan enzimlerden biri olan lakkaz ve benzeri oksidazlar için asidik pH'lar (5–5,5) çoğu çalışmada en verimli çalışma aralığıdır [Zhang ve ark.,2007; Bhattacharya ve Banerjee, 2008; Deng ve ark., 2022]. Gerçekleştirilen bu çalışmada optimum pH'ın 5,0 olarak tespit edilmiş olması belirtilen bu pH'da stabil çalışma, hem enzim stabilitesini hem de kütle aktarımını destekleyerek hızları maksimize etme açısından önemli görülmektedir [Menale ve ark., 2012]. *Priestia megaterium* SA3'ün optimum pH'nın asidik-nötr bandında olması (pH 5–7) literatürler ile uyumludur. pH'ın azalması yani asidik yöne kayması, 2,4-DCP'nin (daha hidrofobik) nötral formunu artırarak hücre zarından geçişi ve/veya yüzeye adsorpsiyonunu kolaylaştırabilir; aynı zamanda lakkaz benzeri oksidatif enzimlerinde asidik pH'larda daha etkin olması da bu etkiyi artırmaktadır [UKTAG, 2007; Liang ve ark., 2023]. Bu tez çalışması kapsamında direkt olarak lakkaz aktivitesi üzerine çalışma yapılmamasına rağmen *Priestia megaterium* veya *Bacillus megaterium*'un lakkaz aktivitesine sahip olduğunun bilinmesi önem arz etmektedir.

Mezofilik mikroorganizmalar ve dolayısıyla *Priestia* fizyolojisi için 30-37°C aralığı, enzimatik hızlar ve membran akışkanlığı açısından optimum değerdir. 2,4-DCP giderimi amaçlı bir çalışmada *B. subtilis* AAK'nin optimizasyonu 37 °C'de yapılmış ve yüksek giderimler gözlemlenmiştir; bu aralık *Priestia megaterium* SA3 için de biyokimyasal olarak benzer şekilde bulunmuştur. 37°C'nin *Priestia megaterium* SA3'te en yüksek performansı vermesi, fenolik halkaya yönelik oksijenaz/oksidaz etkinliğinin Arrhenius davranışıyla uyumunu gösterir. Lakkaz enzimi tabanlı klorofenol bozunumlarında 30–45°C civarında yüksek aktiviteler gözlemlenmiştir [Bhattacharya ve Banerjee, 2008; Menale ve ark., 2012; Cao ve ark., 2022]. *Priestia megaterium* SA3'ün lakkaz pozitif bir bakteri olması 37 °C'de en iyi performansı göstermesi, mezofilik *Priestia* fizyolojisi ve 2,4-DCP bozunumunda 37°C civarında yüksek verim rapor eden çalışmalarla uyum göstermektedir. *Priestia megaterium* SA3 için 30-37°C aralığı, zar akışkanlığı ve enzimatik hızların Arrhenius davranışı açısından optimum seviyededir fakat daha yüksek sıcaklıklarda enzim denatürasyonu/zar stresleri nedeniyle verim düşebilmektedir.

Priestia megaterium SA3 kültürde 2,4-DCP degradasyonunun $OD_{600}=0,5$ olacak şekilde yapılan inokülasyonda maksimum olarak görülmesi; (i) düşük yoğunluklarda lag fazı ve enzim indüksiyonu yetersizliği, (ii) çok yüksek yoğunluklarda ise oksijen ve elektron alıcılarına rekabet nedeniyle özgül hız düşüşüyle uyumlu görülmektedir [Klöckner ve ark., 2013; Heyman ve ark., 2019; Running ve Bansal, 2016; Ihling ve ark., 2021]. Özellikle aromatik halka oksidasyonunu yürüten oksijenazların aktivitesi, çözünmüş oksijen ve redoks potansiyeli ile ilgilidir; bu nedenle kültür miktarı, kütle aktarımı ile metabolik talep arasında en uygun dengeyi kurmaktadır.

2,4-DCP'nin aerobik yıkımı için O_2 transferi önemlidir. Sallayıcılardaki erlenlerde çalkalama hızı arttıkça gaz-sıvı kütle aktarım katsayısı ve oksijen alım miktarı artar; ancak çok yüksek çalkalamalarda hücre stresi verimi düşürebilir [Klöckner ve ark., 2013]. *Priestia megaterium* SA3 ile erlen kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda optimum çalkalamanın orta düzey değerlerde (ör. 100–200 rpm) çıkması, oksijen transferini artırıp sınırlama açısından biyolojik olarak anlamlıdır. Erlen de 2,4-DCP gibi oksijen gereksinimli sistemlerde 150–200 rpm aralığı sıklıkla tercih edilmektedir ve oksijen eksikliğini azaltır [Mohseni ve ark., 2016].

Heterotrofik metabolizmaya sahip bakterilerde klorofenollerin degradasyonu “ko-metabolizma” ile hızlanır. Üremeyi destekleyici bir karbon kaynağının (ör. glukoz) sağlanması enzim üretimini, redoks potansiyelini ve enerji dengesini güçlendirir. Birçok çalışmada ilave karbon kaynağı olarak şekerlerin (glukoz, sakkaroz vb.) kullanımının 2,4-DCP biyodegradasyonunu anlamlı biçimde arttırdığı gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak verilebilecek olan bir çalışma ise *B. subtilis* AAK suşuyla gerçekleştirilmiş olup çalışmada altı farklı karbon kaynağı test edilmiştir ve karbon kaynağı ilavesinin genel olarak degradasyonu arttırdığı görülmüştür [Farag, 2021]. Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen sonuçlar, 2,4-DCP'nin çoğu bakterinin üremesini sürdürmek için yetersiz bir tek karbon kaynağı olması ve ko-metabolizma gerektirmesi ile uyumludur. Glukoz, hızlı enerji ve redoks potansiyeli (NAD(P)H) sağlayarak fenol hidroksilaz ve katekol 2,3-dioksijenaz gibi enzimlerin sentez/aktivitesini artırır. *Bacillus licheniformis* SL10'da 2,4-DCP biyodegradasyonu, fenol hidroksilaz içeren bir ekstraselüler enzim bileşimi ile ilişkilendirilmiş ve metabolik akışın biyodegradasyon yönünde ilerlediği belirlenmiştir [Felshia ve ark., 2018]. Elde edilen veriler, *Priestia megaterium* SA3'te glukoz varlığında gözlenen hızlanmayı açıklamaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada biyodegradasyon aktivitesinin ilave karbon kaynağı olarak glukoz kullanımında olduğu yukarıda belirtilmiştir. Kullanılan glukozun kültür ortamındaki oranı önemli bir parametre olup bu çalışmada, karbon kaynağı olarak kullanılan %0,5 glukozda en iyi verim elde edilmiştir. Bu sonuç, düşük-orta düzey karbon akışının ko-metabolik enzim sentezini desteklediği, karbon kaynağının %1–2 ve üzerinde pH düşüşü ve ozmotik stres ile net hızın azaldığı bilgisini destekler mahiyettedir. Lakkaz/oksidaz temelli oksidasyonlarda düşük pH'ın yararları olsa da, fazla karbon kaynaklı asitleşme enzim stabilitesini ve hücresel dengeleri olumsuz etkileyebilmektedir; bu nedenle tamponlama ve gerekiyorsa geri beslemeli (fed-batch) glukoz stratejisi kullanılmasının faydalı olacağı önerilmektedir [Felshia ve ark., 2018; Farag, 2021; Gupta ve ark., 2003]. Yukarıda verilen bilgiler dikkate alındığında, *Priestia megaterium* SA3 için glukozun %0,1–1 aralığında optimum verim göstermesi; daha yukarı yüzdelerde ise ortam pH'ının düşmemesi için tamponlama/geri besleme gerekliliği beklenen bir durumdur. Bu sonuç, hem ko-metabolik hipotezle hem de glukozun yüksek dozlarda katabolit baskılanma oluşturabileceğine dair bulgularla uyumludur.

Gerçekleştirilen çalışmada, *Priestia megaterium* SA3'ün 2,4-DCP'yi optimum olarak 50 mg L⁻¹'de degrade edebildiğinin gözlenmesi substrat inhibisyonu kavramıyla uyumludur. *Bacillus* izolatlarında orta derişimlerde (25–100 mg L⁻¹) bu tip bulguların elde edildiği bilinmektedir. Daha yüksek derişimlerde membran hasarı, oksidatif stres ve enzim inhibisyonu gözlenebildiğinden biyodegradasyon sekteye uğramaktadır. Literatürler incelendiğinde *Bacillus cereus* GN1'in, 400–560 µM (66–93 mg L⁻¹) aralığa kadar 2,4-DCP'yi parçaladığı gözlenirse de, bunun üzerindeki derişimlerde parçalama verim düşüşleri rapor edilmiştir [Matafonova ve ark., 2007; Matafonova ve ark., 2006]. *B. licheniformis* SL10 için 2,4-DCP'nin inhibitör derişimi 55,74 mg L⁻¹ olarak hesaplanmış olup sodyumsuz koşullarda optimumda %97'ye varan biyodegradasyon bildirilmiştir. Ayrıca 50 mg L⁻¹'lik örneklerde iki saat içinde %98'e varan enzimatik parçalanma gösterilmiştir [Felshia ve ark., 2020]. *Bacillus* izolatlarında daha yüksek konsantrasyonlarda da biyodegradasyon mümkün olup bu organizmalara örnek olarak *Bacillus endophyticus* izolatları verilebilir. Bu organizmada, 300 mg L⁻¹'ye kadar 2,4-DCP'yi degrade edebilme kapasitesi tespit edilmiştir [Patel ve Kumar, 2016]. *Priestia megaterium* SA3 için optimumun biyodegradasyon konsantrasyonunun 50 mg L⁻¹ (50 ppm) değerinde çıkması bu durumla uyumludur. Daha yüksek derişimlerde hem toksisite hem de oksijen/ko-substrat kısıtları nedeniyle verimin

düştüğü literatürle uyumludur. Bu aralıkta gözlenen yüksek giderimin bir kısmının adsorpsiyon katkısı olduğunu göz önünde bulundurmak gerekir.

Priestia megaterium SA3'ün 2,4-DCP'yi maksimum biyodegradasyonun 2. günde gözlenmesi, erken fazda adsorpsiyon ile ilk oksidasyonun baskın olması ve ilerleyen süreçte (3–4. gün) ara ürün birikimi ve oksijen/besin kısıtlılığının devreye girmesi ile açıklanabilir. 2,4-DCP'nin biyodegradasyon yoluyla parçalandığı *B. licheniformis* SL10 ile gerçekleştirilen bir çalışmada oluşan ara ürünlerin (katekol/quinon türevleri) bir kısmının geçici toksisiteye neden olabildiği ve net parçalanmayı yavaşlatabildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada maksimum degradasyonun 2. günde gözlenmesi bu açıdan bakıldığında önemlidir [Felshia ve ark., 2020; Felshia ve ark., 2006].

Bu çalışmada gerçekleştirilen RNA-Seq ve diferansiyel gen ekspresyonu analizleri, belirlenen deney hipotezini genel anlamda destekler niteliktedir. Deney hipotezi minimal kültür ortamına 2,4-DCP'nin ilavesiyle belli gen gruplarının ekspresyonunun artması veya azalmasına dayanmaktadır. Elde edilen diferansiyel gen ekspresyonu sonuçları, incelenen koşullar altında gen ekspresyon profillerinde anlamlı değişimlerin meydana geldiğini açıkça ortaya koymuştur. Özellikle $FDR < 0.05$ ve $|\log_2 FC| \geq 1$ kriterleri dikkate alındığında, anlamlı düzeyde yukarı ve aşağı regüle edilen genlerin sayısının yüksek olması, biyolojik sistemde güçlü bir cevabın tetiklendiğini göstermektedir.

Fonksiyonel zenginleştirme (GO) analizleri, bu ekspresyon değişimlerinin rastlantısal olmadığını, aksine belirli biyolojik yollar ve süreçler üzerinde yoğunlaştığını ortaya koymuştur. En dikkat çekici bulgular arasında, stres yanıtı, hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, protein katlanması ve oksidatif hasar yanıtı ile ilişkili yolların güçlü şekilde zenginleşmiş olması yer almaktadır. Hem yukarı hem de aşağı regüle gen listelerinde yer alan biyolojik süreçler, incelenen koşulların hücre içi homeostaz, enerji metabolizması ve savunma mekanizmaları üzerinde çok yönlü etkiler yarattığını göstermektedir.

Özellikle GO:0030436 – Otokatalitik süreçler ve GO:0006950 – Stres yanıtı gibi terimlerdeki yüksek anlamlılık ($p.adjust < 0.01$), deney koşullarının hücrede metabolik yeniden programlama ve adaptif yanıt mekanizmalarını devreye soktuğunu güçlü şekilde desteklemektedir. Bunun yanı sıra, oksidatif stresle ilişkili süreçlerdeki zenginleşme, incelenen biyolojik sistemin çevresel veya metabolik baskılara karşı önemli ölçüde tepki verdiğini düşündürmektedir.

Tüm bu veriler, çalışmanın başlangıçta ortaya konulan hipotezini destekleyerek, incelenen biyolojik koşulların belirli fonksiyonel ağlar üzerinde etkili olduğunu, bu ağların

ise potansiyel olarak hedeflenebilir biyolojik süreçler arasında yer aldığını göstermektedir. Elde edilen bulgular, hem biyolojik mekanizmaların daha derinlemesine anlaşılmasına hem de ilerleyen aşamalarda yapılacak deneysel doğrulamalara sağlam bir temel oluşturmaktadır.

Yapılan MTT analizinde kontrol grubuna göre MSM ortamında hücre canlılığında belirgin bir değişim gözlenmemiştir (%94), bu da mineral tuz ortamının (MSM) hücrelere doğrudan toksik bir etki yapmadığını göstermektedir. Buna karşın, 2,4-DCP ilavesi hücre canlılığını %86'ya düşürmüştür, bu da literatürde bildirildiği üzere DCP'nin oksidatif stres ve membran hasarı yoluyla hücreler üzerinde toksik etki oluşturduğu bilgisiyle uyumludur (Field ve Sierra-Alvarez, 2008).

Buna karşılık, *Priestia megaterium* SA3'ün DCP içeren MSM ortamında üretilmesiyle elde edilen kültür süpernatantının ilavesi, hücre canlılığında belirgin bir artışa (%173) yol açmıştır. Bu durum, bakterinin 2,4-DCP varlığında salgıladığı metabolitlerin hücre metabolizmasını uyarıcı ve canlılığı artırıcı etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, 2,4-DCP içeren ortamda yetiştirilen *Priestia megaterium* SA3'ten elde edilen kültür süpernatantının, hücre canlılığını ve proliferasyonunu destekleyici etkilere sahip olabileceği; bu etkinin probiyotik bakterilerin kendileri veya salgıladıkları metabolitlerin biyolojik aktivitesine atfedildiği önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir [Ouweland ve ark., 2002]. Özellikle, bazı mikroorganizmaların ürettiği biyolojik bileşiklerin antioksidan özellikleri sayesinde MTT testinde artmış absorbans değerleri ile proliferatif etki gösterebildiği bilinmektedir [Liu ve ark., 2011].

Gerçekleştirilen MMT testinde en dikkat çekici sonuç ise ortamda 2,4-DCP'nin varlığında *Priestia megaterium* SA3'e ait süpernatantın etkisidir. Bu durumda, 2,4-DCP'nin toksik etkisine rağmen hücre canlılığı %162 seviyesinde kalmıştır. Bu bulgular, *Priestia megaterium* SA3'e ait süpernatantının 2,4-DCP'ye karşı koruyucu/antagonistik bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, kirletici bileşiklerin biyolojik bozunumu ve/veya detoksifikasyonunda mikroorganizmaların rolü daha önce de vurgulanmıştır [Solyanikova ve Golovleva, 2011]. Elde edilen sonuçlar, 2,4-DCP varlığında *Priestia megaterium* SA3'e ait süpernatantın yalnızca toksik ortamda hücreleri korumakla kalmayıp, aynı zamanda canlılığı artırıcı bir potansiyele de sahip olabileceğini göstermektedir.

Fitotoksisite testleri, kimyasal kirleticilerin bitki büyümesi ve enzim aktiviteleri üzerindeki olumsuz etkilerini değerlendirmede yaygın olarak kullanılan biyolojik yaklaşımlardır. Çimlenme yüzdesi, kök ve filiz uzunluğu ile enzim aktivitelerindeki

değişimler, tohumların maruz kaldığı stres faktörlerinin belirlenmesinde önemli biyomarkırlar olarak kabul edilmektedir [OECD, 2006; Wang ve ark., 2001].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, 2,4-DCP varlığında tohumların çimlenme oranının çok fazla etkilenmediğini ancak filiz uzunluğunda belirgin bir azalma olduğunu ve amilaz aktivitesinin baskılandığını göstermektedir. Nitekim fenolik bileşiklerin, özellikle de klorlu türevlerinin, hücre bölünmesi ve uzamasını engelleyerek kök ve filiz gelişimini sınırladığı daha önce de rapor edilmiştir [Boyd ve Shelton, 1984; Bedoux ve ark., 2012]. Bu durum, DCP'nin fitotoksik etkisinin, enzimatik aktiviteler ve metabolik süreçler üzerinden gerçekleştiğini desteklemektedir.

Diğer yandan, *Priestia megaterium* SA3 süpernatantının ilave edildiği uygulamalarda, hem filiz uzunluğu hem de amilaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Özellikle *Priestia megaterium* SA3'e ait süpernatantı + 2,4-DCP grubunda, 2,4-DCP'nin toksik etkisinin büyük ölçüde azaldığı; filiz gelişiminin belirgin şekilde iyileştiği ve amilaz aktivitesinin kontrol düzeylerine yaklaştığı belirlenmiştir. Bu bulgu, bazı mikroorganizmaların fenolik kirleticileri biyotransformasyona uğratarak veya bitki kök çevresinde (rizosferde) stres azaltıcı bileşikler üreterek toksisiteyi azalttığına dair literatür ile uyumludur [Barzkar, 2020; Bumpus, 1989].

Sonuç olarak, *Priestia megaterium* SA3 tarafından 2,4-DCP varlığında üretilen süpernatantın, fitotoksisiteyi azaltmada biyokoruyucu bir potansiyele sahip olduğu; bu etkinin hem bitki gelişim parametreleri hem de metabolik enzim aktiviteleri üzerinde belirgin şekilde ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, çevresel kirleticilerin etkilerini azaltmaya yönelik biyoteknolojik uygulamalar için umut verici bir örnek teşkil etmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma, özellikle *Priestia megaterium* SA3 gibi mikroorganizmaların biyotransformasyon kabiliyetlerini ortaya koyarak, 2,4-DCP'nin güvenli ve etkili bir şekilde giderilebileceğini göstermektedir.

Bu bağlamda, mevcut çalışma klorofenole adapte olmuş *Priestia megaterium* SA3'nun 2,4-DCP'yi parçalama yeteneğini incelemekte olup, organizmanın 50 ppm'ye kadar olan konsantrasyonlarda üreme gösterdiği ve optimum koşullarda %95 degradasyon verimi tespit edilmiştir. Deneysel bulgulara göre, 50–100 mg/L arasındaki 2,4-DCP konsantrasyonlarında yüksek düzeyde bozunma gözlemlenmiş, ancak 100 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlar mikroorganizmalar için toksik etki göstermiştir.

Çalışmada elde edilen veriler, pH 5'in 2,4-DCP'nin degradasyonu açısından en uygun şart olduğunu göstermektedir. Giderimin pH 4,0 ile 7,0 arasında olduğu görülmektedir.

Çalışmada elde edilen veriler 2,4-DCP'nin giderimi açısından en uygun sıcaklık şartının 37 °C olduğu tespit edildi.

Priestia megaterium SA3'nun 2,4-DCP'yi parçalama ortamında ikincil karbon kaynağı olarak glukozun en iyi kaynak olduğu ve kültür içindeki glukoz oranının optimum değerinin % 0,5-1,0 arasında olduğu belirlendi.

Priestia megaterium SA3'nun 2,4-DCP'yi kültürde degrades edebildiği en iyi bakteri inokülasyonu değeri $OD_{600}=0,5$ ve çalkalama hızı 100 rpm olarak tespit edildi.

Kültür ortamında 2,4-DCP'nin degradasyonu sonucunda toksisitedeki azalma MTT testi ile tespit edildi ve *Priestia megaterium* SA3'nun 2,4-DCP'yi degrades ederek toksik etkiyi büyük oranda ortadan kaldırdığı tespit edildi.

Kültür ortamında 2,4-DCP'nin degradasyonu sonucunda toksititedeki azalma bürölce fasülyesi tohumlarının kullanıldığı fitotoksitesite testi ile tespit edildi ve *Priestia megaterium* SA3'nun 2,4-DCP'yi degrades ederek toksik etkiyi büyük oranda ortadan kaldırdığı tespit edildi.

Kültür ortamında karbon kaynağı olarak 2,4-DCP'nin kullanılmasıyla *Priestia megaterium* SA3'nun üretildiği kültür pelleti ile 2,4-DCP'nin kullanılmadığı kültür pelletinden izole edilen total RNA'ların transkriptom analizleri neticesinde iki grup arasında transkripsiyonu artan ve azalan genler açısından açık ve anlamlı bir farklılık tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Literatürler incelendiğinde 2,4-DCP bozunma yollarının henüz tam olarak aydınlatılamadığı görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada transkriptom analizi ve GC-MS analizleri sonuçlarının analiziyle bozunma yolu, ileride geliştirilebilecek yeni biyodegradasyon modellerinin ortaya konmasında faydalı olacaktır.

2,4-DCP'nin degradasyonunda hem mikroorganizmanın tipi hem de ortam şartları etkin olmaktadır. Bu nedenle biyoremediasyon çalışmaları yalnızca etkili mikroorganizmaların belirlenmesine odaklanmamalı, aynı zamanda bu mikroorganizmaların etkili çalışabileceği çevresel koşullar da detaylı biçimde optimize edilmelidir. Bu bağlamda, çalışmanın bulguları, çevre biyoloji alanındaki ileri düzey uygulamalara ışık tutmaktadır.

2,4-DCP'nin degradasyonunda lakkaz gibi oksidoredüktazların etkin olduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılan organizma olan *Priestia megaterium* SA3'ün lakkaz pozitif olması dikkate alındığında sonraki çalışmalarda 2,4-DCP'nin degradasyonunda direkt olarak bu lakkazın kullanılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoglu, T., & Mehmetoglu, U. (2004). Kinetic model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 39, 983–988.
- Agostini, E., Coniglio, M. S., Milrad, S. R., Tigier, H. A., & Giulietti, A. M. (2003). Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(2), 139–144.
- Aislabie, J., & Lloyd-Jones, G. (1995). A review of bacterial degradation of herbicides including phenoxyalkanoic acids and substituted phenylureas. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 58(2–3), 215–235. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)00696-V](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)00696-V)
- Aktaş, O., & Çeçen, F. (2007). Bioregeneration of activated carbon: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.01.003>
- Ali, M. H. H., Al-Qahtani, K. M., & El-Sayed, S. M. (2019). Enhancing photodegradation of 2,4,6-trichlorophenol and organic pollutants in industrial effluents using nanocomposite of TiO₂ doped with reduced graphene oxide. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45(4), 321–328.
- Andretta, C. W. S., Rosa, R. M., Tondo, E. C., Gaylarde, C. C., & Henriques, J. A. P. (2004). Identification and molecular characterization of a *Bacillus subtilis* IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol. *Chemosphere*, 55, 631–639.
- Annachhatre, A. P., & Gheewala, S. H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology*, 14(1), 35–56.
- Anku, W. W., Mamo, M. A., & Govender, P. P. (2017). Phenolic compounds in water: Sources, reactivity, toxicity and treatment methods. In *Phenolic compounds – Natural sources, importance and applications* (pp. 419–443).
- Arora, P. K., & Bae, H. (2014). Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31>
- Arora, P. K., & Jain, R. K. (2012). Metabolism of 2-chloro-4-nitrophenol in a gram-negative bacterium, *Burkholderia* sp. RKJ 800. *PLOS ONE*, 7(6), e38676.
- Arora, P. K., Sharma, A., Mehta, R., Shenoy, B. D., Srivastava, A., & Singh, V. P. (2012). Metabolism of 4-chloro-2-nitrophenol in a gram-positive bacterium, *Exiguobacterium* sp. PMA. *Microbial Cell Factories*, 11, 150.

- Arora, P. K., Srivastava, A., & Singh, V. P. (2013). Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in *Burkholderia* sp. RKJ 800. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2167-y>
- Arora, P. K., Srivastava, A., & Singh, V. P. (2014). Novel degradation pathway of 2-chloro-4-aminophenol in *Arthrobacter* sp. SPG. *PeerJ Preprints*, 2, e194v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.194v1>
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00608.x>
- ATSDR. (1999). *Toksikolojik profil: Cıva*. Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>
- Aziz, K. H. H., Miessner, H., Mueller, S., Mahyar, A., Kalass, D., Moeller, D., Khorshid, I., & Rashid, M. A. M. (2018). Comparative study on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions via ozonation, photocatalysis and non-thermal plasma. *Journal of Hazardous Materials*, 343, 107–115.
- Baden, W. (Ed.). (2000). *Chemical reagents*. Merck KGaA.
- Bai, J., Wen, J. P., Li, H. M., & Jiang, Y. (2006). Kinetic modelling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochemistry*, 42, 510–517.
- Barr, D. P., & Aust, S. D. (1994). Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*, 28, 78A–87A. <https://doi.org/10.1021/es00051a002>
- Barzkar, N. (2020). Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229.
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., & Le Bot, B. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1044–1065.
- Bhattacharya, S. S., & Banerjee, R. (2008). Laccase-mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using response surface methodology. *Chemosphere*, 73(1), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.005>
- Boer, A. S., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–4.
- Bogan, B. W., Lamar, R. T., Burgos, W. D., & Tien, M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 250–254.

- Boyd, S. A., & Sheldon, D. R. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 272–277.
- Boyd, S. A., Mikesell, M. D., & Lee, J. F. (1980). Chlorophenols in soils. In *Reactions and movements of organic chemicals in soils* (pp. 209–228). American Society of Agronomy.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24, 93–106.
- Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 154–158.
- Cámara, B., Nikodem, P., Bielecki, P., Bobadilla, R., Junca, H., & Pieper, D. H. (2009). Characterization of a gene cluster involved in 4-chlorocatechol degradation by *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4905–4915.
- Canosa, P., Morales, S., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., & Gómez, M. (2005). Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in the presence of free chlorine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 1119–1126.
- Cao, Z., Zhang, M., Zhang, J., & Zhang, H. (2016). Impact of continuous and intermittent supply of electric assistance on high-strength 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) degradation in electro-microbial system. *Bioresource Technology*, 212, 138–143.
- Cao, M., Yu, J., Zhang, X., Li, X., Wu, X., & Liu, G. (2022). Laccase-functionalized magnetic framework composite enables degradation of chlorophenols as a potential remediation for fungicide residues in leather. *Journal of Leather Science and Engineering*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s42825-022-00094-3>
- Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T., & Zablotowicz, R. B. (1999). Chlorophenol and nitrophenol metabolism by *Sphingomonas* sp. UG30. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, 232–241.
- Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., & Lumyong, S. (2013). Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus *Trametes polyzona*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(2), 539–545. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9990-3>
- Chakrabarti, T., Subrahmanyam, P. V. R., & Sundaresan, B. B. (1988). Biodegradation of recalcitrant industrial wastes. In D. L. Wise (Ed.), *Biotreatment systems* (Vol. 2). CRC Press.
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2), 326–342. <https://doi.org/10.1039/C4EM00627E>
- Chatterjee, D. K., Kellogg, S. T., Hamada, S., & Chakrabarty, A. M. (1981). Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified ortho pathway. *Journal of Bacteriology*, 146(2), 639–646.

- Chris Felshia, S., Ashwin Karthick, N., Thilagam, R., & Gnanamani, A. (2020). Elucidation of 2,4-dichlorophenol degradation by *Bacillus licheniformis* strain SL10. *Environmental Technology*, 41(3), 366–377. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1498923>
- Chris Felshia, Y. A., Varadharajan, K., Mandal, A. B., *et al.* (2014). Maximum phenol tolerance and subsequent degradation profile of *Bacillus pumilus* strain MCG 03 isolated from tannery wastewater contaminated soil. *International Journal of Current Research*, 6, 9734–9744.
- Crosby, D. G. (1981). Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure and Applied Chemistry*, 53, 1051–1080.
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.087>
- Danganan, C. E., Ye, R. W., Daubaras, D. L., Xun, L., & Chakrabarty, A. M. (1994). Nucleotide sequence and functional analysis of the genes encoding 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase in *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4100–4106.
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 285–311.
- Daubaras, D. L., Hershberger, C. D., Kitano, K., & Chakrabarty, A. M. (1995). Sequence analysis of a gene cluster involved in metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1279–1289.
- Deng, W., Zhao, W., & Yang, Y. (2022). Degradation and detoxification of chlorophenols with different structure by LAC-4 laccase purified from white-rot fungus *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13), 8150. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138150>
- Don, R. H., Weightman, A. J., Knackmuss, H. J., & Timmis, K. N. (1995). Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *Journal of Bacteriology*, 161(1), 85–90.
- Doxtader, K. G., & Croissant, R. L. (1992). *Soil: Fate of pesticides in soil*. Colorado State University Cooperative Extension, Crop Series No. 0.515.
- Dıǵrak, M., & Özçelik, S. (1995). Chlorpyrifos-methyl'in bakteriler ve zenginleştirilmiş toprak tarafından parçalanması. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 7(1), 57–72.
- Ederer, M. M., Crawford, R. L., Herwig, R. P., & Orser, C. S. (1997). PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus *Sphingomonas*. *Molecular Ecology*, 6, 39–49.

- El-Naas, M. H., Al-Muhtaseb, S. A., & Makhoul, S. (2009). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol gel. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 720–725.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1980, May 31). *Ambient water quality criteria for 2,4-dichlorophenol* (EPA 440/5-80-042).
- Environmental Protection Agency (EPA). (2002). *Toxicological review of phenol*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Es, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2065–2082.
- Exon, J. H. (1984). A review of chlorinated phenols. *Veterinary and Human Toxicology*, 26(6), 508–520.
- Fakhruddin, A. N. M., & Quilty, B. (2005). The influence of glucose and fructose on the degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1541–1548.
- Farag, A. M. (2021). Biodegradation and enhancement of 2,4-dichlorophenol by marine halophilic *Bacillus subtilis* AAK. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 47(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2021.04.001>
- Farré, M. J., Franch, M. I., Ayllón, J. A., Peral, J., & Domènech, X. (2007). Biodegradability of treated aqueous solutions of biorecalcitrant pesticides by means of photocatalytic ozonation. *Desalination*, 211(1–3), 22–33.
- Felshia, S. C., Karthick, N. A., Thilagam, R., & Gnanamani, A. (2017). Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics. *Journal of Environmental Management*, 197, 373–383.
- Felshia, S. C., Ashwin Karthick, N., Thilagam, R., & Gnanamani, A. (2018). Elucidation of 2,4-dichlorophenol degradation by *Bacillus licheniformis* strain SL10. *Environmental Technology*, 40(3), 366–377. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1498923>
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147), 752–758. <https://doi.org/10.1126/science.1236281>
- Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated phenols. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(3), 211–241. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9135-6>
- Finkel'shtein, Z. I., Baskunov, B. P., Golovlev, E. L., Moiseeva, O. V., Vervoort, J., Rietjens, I., & Golovleva, L. A. (2000). Dependence of the conversion of chlorophenols by rhodococci on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology*, 69, 40–47.

- Fukumori, F., & Hausinger, R. P. (1993). Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24311–24317.
- Gallizia, S., McClean, S., & Banat, I. M. (2003). Bacterial biodegradation of phenol and 2,4-dichlorophenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 959–963.
- Geed, S. R., Kureel, M. K., Giri, B. S., Singh, R. S., & Rai, B. N. (2017). Performance evaluation of malathion biodegradation in batch and continuous packed bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 227, 56–65.
- Genthner, C. J., & Wackett, L. P. (1991). Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition metal coenzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 715–722.
- Gisi, M. R., & Xun, L. (2003). Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase (TftD) and NADH: flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2786–2792.
- Goi, A., & Trapido, M. (2002). Ozonation and advanced oxidation processes for treatment of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol. *Ozone: Science and Engineering*, 24(6), 381–388. <https://doi.org/10.1080/01919510208901627>
- Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in enzymology* (Vol. 1, pp. 138–146). Academic Press.
- González, A. J., Gallego, A., Gemini, V. L., Papalia, M., Radice, M., Gutkind, G.,... Korol, S. E. (2012). Degradation and detoxification of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by an indigenous *Delftia* sp. strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66, 8–13.
- Goswami, M., Shivaraman, N., & Singh, R. P. (2002). Kinetics of chlorophenol degradation by benzoate-induced culture of *Rhodococcus erythropolis* M1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 779–783.
- Goswami, M., Shivaraman, N., & Singh, R. P. (2005). Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and o-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in co-culture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *African Journal of Microbiology Research*, 160, 101–109.
- Gu, M., & Choi, S. (2001). Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria. *Water Science and Technology*, 43, 147–154.
- Gujer, W., & Zehnder, A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 15, 127.
- Guo, C., Cheng, M., Zhang, G., Xiong, W., Zhou, C., Song, B., Du, L., Li, L., Tang, C., Wang, G., & Liu, H. (2023). Degradation of organic contaminants by peroxymonosulfate activated with zeolitic imidazolate frameworks-based catalysts. *Environmental Science: Nano*, 10, 1528–1552.

- Gupta, P., Sreekrishnan, T. R., & Shaikh, Z. A. (2018). Evaluating the effects on performance and biomass of a hybrid anaerobic reactor treating effluents containing 4-chlorophenol. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2643–2650.
- Gupta, R. S., Naushad, S., Fabros, R., & Adeolu, M. (2016). A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, 565–587.
- Gupta, A., Rao, G., & Venkatasubramanian, K. (2003). A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(3), 351–358. <https://doi.org/10.1002/bit.10740>
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades using genome-based phylogeny. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004498>
- Guthrie, F. E., & Perry, J. J. (1980). *Introduction to environmental toxicology*. North Carolina State University.
- Gürdöl, F. (2014). *Tıbbi biyokimya anabilim dalı laboratuvar uygulamaları*. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi.
- Häggblom, M. M. (1992). Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 103(1), 29–71.
- Hasan, S. A., & Jabeen, S. (2015). Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29, 45–53.
- Hassan, H., Schulte-illingheim, L., Jin, B., & Dai, S. (2016). Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus subtilis* with concurrent electricity generation in microbial fuel cell. *Procedia Engineering*, 148, 370–377.
- Hatta, T., Fujii, E., & Takizawa, N. (2012). Analysis of two gene clusters involved in 2,4,6-trichlorophenol degradation by *Ralstonia pickettii* DTP0602. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 892–899.
- Henry, H. T., Cecil, W. C., & Paul, W. K. (1964). Microbial metabolism of aromatic compounds I. Decomposition of phenolic compounds and aromatic hydrocarbons by phenol-adapted bacteria. *Journal of Bacteriology*, 87(4), 910–919.
- Herrera, Y., Okoh, A. I., Alvarez, L., & Giraldo, E. (2008). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 55–60.
- Hollender, J., Hopp, J., & Dott, W. (1997). Degradation of 4-chlorophenol via the meta-cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4567–4572.

- Holliger, C., Stams, A. J. M., & Zehnder, A. J. B. (1988). Anaerobic degradation of recalcitrant compounds. In D. Hall & P. Hobson (Eds.), *Anaerobic digestion* (pp. 211–244). Pergamon Press.
- Holt, J. G. (1993). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins.
- Hoos, R. (1978). Patterns of pentachlorophenol usage in Canada: An overview. In K. R. Rao (Ed.), *Pentachlorophenol* (pp. xx–xx). Plenum Press.
- Hu, J., & Wang, J. (2007). Degradation of chlorophenols in aqueous solution by γ -radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 76, 1489–1492.
- Huang, Y., Xi, Y., Yang, Y., Chen, C., Yuan, H., & Liu, X. (2014). Degradation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by immobilized laccase on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MSS-NH}_2$. *Chinese Science Bulletin*, 59, 509–520.
- Hubner, A., Danganan, C. E., Xun, L., Chakrabarty, A. M., & Hendrickson, W. (1998). Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2086–2093.
- Ihling, N., Munkler, L. P., Berg, C., Reichenbacher, B., Wirth, J., Lang, D., Wagner, R., & Büchs, J. (2021). Time-resolved monitoring of oxygen transfer rate of CHO cells in shake flasks. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 649005. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.649005>
- Jiang, H. L., Tay, J. H., Maszenan, A. M., & Tay, S. T. L. (2006). Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two co-aggregating bacterial strains. *Environmental Science & Technology*, 40, 6137–6142.
- Jiang, H. L., Tay, S. T. L., Maszenan, A. M., & Tay, J. H. (2006). Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiology Ecology*, 57, 182–191.
- Jiang, G., Lan, M., Zhang, Z., Lv, X., Lou, Z., Xu, X., Dong, F., & Zhang, S. (2017). Identification of active hydrogen species on palladium nanoparticles for electrocatalytic hydrodechlorination of 2,4-dichlorophenol. *Environmental Science & Technology*, 51, 7599–7605.
- Kalaylı, E., & Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA'ları*. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12), 24–35.
- Kargi, F., & Eker, S. (2005). Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 in batch culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 25–28.
- Karlson, U., Rojo, F., van Elsas, J. D., & Moore, E. (1996). Genetic and serological evidence for recognition of pentachlorophenol-degrading strains as *Sphingomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 539–548.

- Kintz, P., Cirimele, V., Tracqui, A., et al. (1995). Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human hair by GC–MS. *Journal of Chromatography B*, 670, 162–166.
- Klößner, W., Gacem, R., Anderlei, T., & Büchs, J. (2013). Correlation between mass transfer coefficient $k_L a$ and operating parameters in shaken bioreactors. *Journal of Biological Engineering*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-28>
- Knackmuss, H. J., & Reineke, W. (1988). Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology*, 42, 263–287.
- Koh, S., McCullar, M. V., & Focht, D. D. (1997). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal meta-fission pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 2054–2057.
- Kountny, M., Ruzicka, J., & Chlachula, J. (2003). Screening for phenol-degrading bacteria in pristine soils of South Siberia. *Applied Soil Ecology*, 23, 79–83.
- Kudlek, E., Dudziak, M., & Bohdziewicz, J. (2012). Photodegradation of selected micropollutants in aquatic environment. *Archives of Environmental Protection*, 38(2), 105–115. <https://doi.org/10.2478/v10265-012-0017-4>
- Kumar, A., Bhunia, B., Dasgupta, D., & Oinam, G. (2013). Optimization of culture conditions for phenol degradation by *Alcaligenes faecalis*. *Desalination and Water Treatment*, 51, 3153–3163.
- Kumar, A., Trefault, N., & Olaniran, A. O. (2016). Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Enzymes and genes involved. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42, 194–208.
- Kumaran, P., & Paruchuri, Y. L. (1996). Kinetics of phenol biotransformation in water. *Water Research*, 31(1), 11–22.
- Kurniawati, S., & Nicell, J. A. (2008). Characterization of *Trametes versicolor* laccase for transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, 99, 7825–7834.
- LaGrega, M. D., Buckingham, P. L., & Evans, J. C. (1994). *Hazardous waste management*. McGraw-Hill.
- Lei, C., Liang, F., Li, J., Chen, W., & Huang, B. (2019). Electrochemical reductive dechlorination of chlorinated volatile organic compounds: Effects of molecular structure. *Chemical Engineering Journal*, 358, 1054–1064.
- Lejeune, R., & Baron, G. (1995). Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 249–258.
- Leung, K. T., Campbell, S., Gan, Y., White, D. C., Lee, H., & Trevors, J. T. (1999). Role of *Sphingomonas* UG30 pentachlorophenol-4-monooxygenase in *p*-nitrophenol degradation. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 247–253.

- Leung, K. T., Cassidy, M. B., Shaw, K. W., Lee, H., Trevors, J. T., Lohmeier-Vogel, E. M., & Vogel, H. J. (1997). Pentachlorophenol biodegradation by *Pseudomonas* spp. UG25 and UG30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 305–313.
- Li, J. W., Cai, W. J., & Zhu, L. (2011). Characteristics and enzyme activities of 4-chlorophenol biodegradation by *Fusarium* sp. *Bioresource Technology*, 102(3), 2985–2989.
- Liang, Y., Chen, X., Zeng, J., Ye, J., He, B., Li, W., & Sun, J. (2023). Mesoporous polymeric ionic liquid via confined polymerization for laccase immobilization. *Molecules*, 28(6), 2569. <https://doi.org/10.3390/molecules28062569>
- Lin, J., Reddy, M., Moorthi, V., & Qoma, B. E. (2008). Bacterial removal of toxic phenols from industrial effluent. *African Journal of Biotechnology*, 7(13), 2232–2238.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., & Chen, M. J. (2011). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2746–2752. <https://doi.org/10.1021/jf104626x>
- Liu, Y., Yan, Z., Chen, R., Yu, Y., Chen, X., Zheng, X., & Huang, X. (2019). 2,4-Dichlorophenol removal using an electrochemical method. *Journal of Hazardous Materials*, 377, 259–266.
- Loh, K. C., & Wang, S. J. (1998). Enhancement of biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by medium augmentation. *Biodegradation*, 8, 329–338.
- Lu, Q., Yu, J., & Gao, J. (2006). Degradation of 2,4-dichlorophenol by glow discharge electrolysis. *Journal of Hazardous Materials*, 136, 526–531.
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- Mahmoodi, N. M., Saffar-Dastgerdi, M. H., & Hayati, B. (2020). Covalently immobilized enzyme bio-nanocomposite for pollutant destruction. *Composites Part B: Engineering*, 184, 107666.
- Marco-Urrea, E., & Reddy, C. A. (2012). Degradation of chloro-organic pollutants by white rot fungi. In *Microbial degradation of xenobiotics*. Springer.
- Mars, A. E., Kasberg, T., Kaschabek, S. R., van Agteren, M. H., Janssen, D. B., & Reineke, W. (1997). Meta-cleavage pathway in chlorobenzene mineralization. *Journal of Bacteriology*, 179, 4530–4537.
- Matafonova, G., Shirapova, G., Zimmer, C., Giffhorn, F., Batoev, V., & Kohring, G. W. (2006). Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.007>

- McClure, G. W. (1970). Contributions of the Boyce Thompson Institute. *Plant Research*, 24, 235.
- Melián, E. P., Díaz, O. G., Rodríguez, J. D., Araña, J., & Peña, J. P. (2013). Adsorption and photocatalytic degradation of 2,4-dichlorophenol. *Applied Catalysis A: General*, 455, 227–233.
- Menale, C., Nicolucci, C., Catapane, M., Rossi, S., Bencivenga, U., Mita, D. G., & Diano, N. (2012). Optimization of chlorophenol biodegradation by laccase system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 45–50.
- Mill, T., Hendry, D. G., & Richardson, H. (1987). Photodecomposition of hazardous waste chemicals. *Environmental Science & Technology*, 21(4), 357–364.
- Mohn, W. W., & Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews*, 56, 482–507.
- Moiseeva, O. V., Solyanikova, I. P., Kaschabek, S. R., Gröning, J., Thiel, M., Golovleva, L. A., & Schlömann, M. (2002). Modified ortho cleavage pathway of 3-chlorocatechol. *Journal of Bacteriology*, 184(19), 5282–5292.
- Mohseni, M., Sharifi Abdar, P., & Borghei, S. M. (2016). Inhibition coefficient of phenol biodegradation. *Water Science and Technology*, 73(5), 1033–1040.
- Mtibaa, R., Olicón-Hernández, D. R., Pozo, C., Nasri, M., Mechichi, T., González, J., & Aranda, E. (2018). Degradation of bisphenol A by thermotolerant fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Munro, I. C., Carlo, G. L., Orr, J. C., Sund, K. G., Wilson, R. M., Kennepohl, E., . . . Lynch, B. S. (1992). Safety evaluation of the herbicide 2,4-D. *International Journal of Toxicology*, 11(5), 559–664.
- Nakagawa, A., Osawa, S., & Hirata, T. (2006). 2,4-Dichlorophenol degradation by *Mortierella* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(2), 525–527.
- Nalbur, B. E., & Alkan, U. (2007). Inhibitory effects of chlorophenols on SBRs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60, 178–188.
- National Center for Biotechnology Information. (2025). *PubChem compound summary for 2,4-dichlorophenol (CID 8449)*.
- Nordin, K., Unell, M., & Jansson, J. K. (2005). Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6538–6544.
- Nutman, P., Thornton, H., & Quastel, J. (1945). Plant growth substances as selective weed killers. *Nature*, 155, 498–500.
- OECD. (2006). *OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 208: Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test*. OECD Publishing.

- Olaniran, A. O., & Igbinosa, E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*, 83, 1297–1306.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1–4), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Owens, J. W. (1991). The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment—A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 1511–1540.
- O’Leary, W. M. (1989). *Practical handbook of microbiology*. CRC Press.
- Pahuja, N., Hoondal, G. S., Soni, S. K., & Nandanwar, H. S. (2011). Laccase from the fungus *Simplicillium* sp. GSH1: Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability. *Pharmacologyonline*, 3, 1077–1084.
- Özgörücü, B., Ekmekçi, S., Gönüz, A., & Tort, A. (1992). Tütünde Antakol uygulamasının toprak mikrofungusları üzerine etkileri. 11. *Ulusal Biyoloji Kongresi Bildirileri*, Elazığ, 235–246.
- Polymenakou, P. N., & Stephanou, E. G. (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 16, 403–413.
- Pandey, J., Heipieper, H. J., Chauhan, A., Arora, P. K., Prakash, D., Takeo, M., & Jain, R. K. (2011). Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol by *Burkholderia* sp. strain SJ98. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 597–607.
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Patel, B. P., & Kumar, A. (2016). Optimization study for maximizing 2,4-dichlorophenol degradation by *Kocuria rhizophila*. *Desalination and Water Treatment*, 57(39), 18314–18325. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1091988>
- Perkins, E. J., Gordon, M. P., Caceres, O., & Lurquin, P. F. (1990). Organization and sequence analysis of 2,4-dichlorophenol hydroxylase operons of plasmid pJP4. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2351–2359.
- Peteinatos, G. G., Weis, M., Andújar, D., Rueda-Ayala, V., & Gerhards, R. (2014). Potential use of ground-based sensor technologies for weed detection. *Pest Management Science*, 70(2), 190–199.
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>

- Reineke, W., & Knackmuss, H. J. (1984). Microbial metabolism of haloaromatics: Isolation of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 395–402.
- Running, J. A., & Bansal, K. (2016). Oxygen transfer rates in shaken culture vessels. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(8), 1729–1735. <https://doi.org/10.1002/bit.25938>
- Rutgers, M., & Bogte, J. J. (1993). Growth and enrichment of pentachlorophenol-degrading microorganisms in the Nutristat. *Applied and Environmental Microbiology*, 3373–3377.
- Saboo, V. M., & Gealt, M. A. (1998). Gene sequences of the *pcpB* gene of pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 667–675.
- Sahinkaya, E., & Dilek, F. B. (2007). Effect of feeding time on sequencing batch reactor performance. *Journal of Environmental Management*, 83(4), 427–436.
- Sandhibigraha, S., Chakraborty, S., Bandyopadhyay, T., & Bhunia, B. (2020). Kinetic study of 4-chlorophenol biodegradation by *Bacillus subtilis*. *Environmental Engineering Research*, 25(1), 62–70.
- Schulte, A., Jordan, A., Klöckner, W., Schumacher, M., Corves, B., & Büchs, J. (2025). Effect of high-speed shaking on oxygen transfer in shake flasks. *Biotechnology Journal*, 20(4), e70013. <https://doi.org/10.1002/biot.70013>
- Sevindik, E., Akgül, H., Alataş, Ö., Aktaş, T., & Aktaş, E. (2023). Chemical composition of *Vitex agnus-castus* L. flowers. *Notulae Scientia Biologicae*, 15(1), 11377. <https://doi.org/10.15835/nsb15111377>
- Shen, L., Wania, F., Lei, Y. D., Yi, S., Teixeira, C., Muir, D. C. G., . . . Jantunen, L. M. (2005). Atmospheric distribution of organochlorine pesticides. *Environmental Science & Technology*, 39(2), 409–420.
- Shukla, G., Kumar, A., Bhanti, M., Joseph, P. E., & Taneja, A. (2006). Organochlorine pesticide contamination of groundwater. *Environment International*, 32(2), 244–247.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59, 201–222.
- Singh, B. K., Walker, A., & Wright, D. J. (2004). Bioremedial potential of pesticide-degrading isolates. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.010>
- Solyanikova, I., & Golovleva, L. (2011). Degradation of pollutants by *Rhodococcus*. *Mikrobiologiya*, 80(5), 579–594.
- Sparks, D. L. (2003). *Environmental soil chemistry* (2nd ed., pp. 75–113). Academic Press.

- Sridevi, V., Sridhar, S., & Swaminathan, T. (2012). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol using *Bacillus megaterium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.006>
- Suidan, M. T., Najm, J. N., Pfeffer, J., & Vang, Y. T. (1988). Anaerobic degradation of phenol. *Journal of Environmental Engineering (ASCE)*, 114, 1359–1376.
- Sánchez, M. A., & González, B. (2007). Genetic characterization of 2,4,6-trichlorophenol degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2769–2776.
- Tabak, Ö., Gedikli, S., Aytar, P., Ünal, A., Çabuk, A., & Kolankaya, N. (2009). *Trametes versicolor* lakkazı ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 7(3), 13–23.
- Tallur, P., Megadi, V., Kamanavalli, C., & Ninnekar, H. (2006). Biodegradation of *p*-cresol by *Bacillus* sp. strain PHN1. *Current Microbiology*, 53, 529–533.
- Tarao, M., & Seto, M. (2000). Estimation of the yield coefficient of *Pseudomonas* sp. strain DP-4 with a low substrate (2,4-dichlorophenol) concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 566–570.
- Tirola, M. A., Männistö, M. K., Puhakka, J. A., & Kulomaa, M. S. (2002). Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 173–180.
- Tobajas, M., Monsalvo, V. M., Mohedano, A. F., Rodriguez, J. J., & Casas, J. A. (2012). Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol. *Journal of Environmental Management*, 95, S116–S121.
- Torii, H., Machida, A., Hara, H., Hatta, T., & Takizawa, N. (2013). Regulatory mechanism of 2,4,6-trichlorophenol catabolic operon expression. *Microbiology*, 159, 665–677.
- Tsujiyama, S., Muraoka, T., & Takada, N. (2013). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by shiitake mushroom. *Biotechnology Letters*, 35, 1079–1083.
- Tyler, J. E., & Finn, R. K. (1974). Growth rates of a *Pseudomonas* on 2,4-D and 2,4-dichlorophenol. *Applied Microbiology*, 28, 181–184.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1980). *Ambient water quality criteria for 2,4-dichlorophenol* (EPA 440/5-80-063). Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2015). *Update of human health ambient water quality criteria: 2,4-Dichlorophenol* (EPA 820-R-15-100). Washington, DC.
- UK Technical Advisory Group. (2007). *Proposed EQS for 2,4-dichlorophenol*. Water Framework Directive.
- Uysal, A., & Türkmen, A. (2004). Klorofenollü bileşiklerin ayrışabilirliğinin biyosüpfektan kullanımı ile hızlandırılması. *SKDD*, 14, 23–30.

- Uysal, A., & Türkmen, A. (2005). Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 40, 2745–2749.
- Ünal, A. (2004). *Lakkaz enzimi ile bazı toksik klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonu* (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Dos Santos, V. L., Monteiro-Ade, S., Braga, D. T., & Santoro, M. M. (2009). Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1413–1420.
- Valli, K., & Gold, M. H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 345–352.
- Valo, R. J., Häggblom, M. M., & Salkinoja-Salonen, M. (1990). Bioremediation of chlorophenol-containing groundwater. *Water Research*, 24, 253–258.
- Van der Meer, J. R., van Neerven, A. R., de Vries, E. J., de Vos, W. M., & Zehnder, A. J. B. (1991). Cloning and characterization of plasmid-encoded genes. *Journal of Bacteriology*, 173(1), 6–15.
- Van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S., & Zehnder, A. J. B. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56, 677–694.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., & Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium* as an industrial host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 957–967.
- Vineh, M. B., Saboury, A. A., Poostchi, A. A., Rashidi, A. M., & Parivar, K. (2018). Stability and activity improvement of horseradish peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1314–1322.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & Benoit-Guyod, J. L. (2005). Fungal bioconversion of 2,4-D and 2,4-DCP. *Chemosphere*, 60(10), 1471–1480.
- Wang, C. C., Lee, C. M., & Kuan, C. H. (2000). Removal of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus insolitus*. *Chemosphere*, 41(3), 447–452.
- Wang, W., Gorsuch, J. W., & Hughes, J. S. (2001). *Plants for environmental studies*. CRC Press.
- Wang, Y., Ren, H., Pan, H., Liu, H., & Chen, J. (2015). Enhanced remediation of PCBs and 2,4-DCP by transgenic alfalfa. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 269–275.
- Wang, Y., Merkel, B. J., Li, Y., & Li, F. (2007). Vulnerability of groundwater to organic contaminants. *Environmental Geology*, 53(3), 479–484.
- Weber, J. B., Wilkerson, G. G., & Reinhardt, C. F. (2001). Herbicide behavior in soil and water. In R. L. Zimdahl (Ed.), *Fundamentals of weed science* (2nd ed., pp. 161–206). Academic Press.

- Wen, Q., Yang, T., Wang, S., Chen, Y., Cong, L., & Qu, Y. (2013). Dechlorination of 4-chlorophenol in bioelectrochemical systems. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245, 743–749.
- Xiangchun, Q., Hanchang, S., Yongming, Z., Jianlong, W., & Yi, Q. (2003). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in an air-lift honeycomb-like ceramic reactor. *Process Biochemistry*, 38, 1545–1551.
- Xiaoming, Z., & Wiegel, J. (1990). Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1119–1127.
- Xu, J., Liu, X., Lowry, G. V., Cao, Z., Zhao, H., Zhou, J. L., & Xu, X. (2016). Dechlorination mechanism of 2,4-dichlorophenol by magnetic MWCNTs supported Pd/Fe nanohybrids. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 7333–7342.
- Xun, L., Topp, E., & Orser, C. S. (1992a). Diverse substrate range of a *Flavobacterium* pentachlorophenol hydroxylase and reaction stoichiometries. *Journal of Bacteriology*, 174, 2898–2902.
- Xun, L., Topp, E., & Orser, C. S. (1992b). Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. *Journal of Bacteriology*, 174, 8003–8007.
- Ya, M., Wu, Y., Li, Y., & Wang, X. (2017). Anthropogenic organochlorine compounds as potential tracers for regional water masses. *Chemosphere*, 170, 75–82.
- Yan, Z., He, H., Yang, C., Zha, C., & Zhang, Y. (2017). Biodegradation of 3,5-dimethyl-2,4-dichlorophenol in saline wastewater by newly isolated *Penicillium* sp. *Journal of Environmental Sciences*, 57, 211–220.
- Yasman, Y., Bulatov, V., Rabin, I., Binetti, M., & Schechter, I. (2006). Enhanced electrocatalytic degradation of chloroorganic compounds in the presence of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 271–277.
- Ye, X., Zhou, X., Wong, L.-Y., Needham, L. L., Calafat, A. M., Hipp, J. A., . . . Calafat, A. M. (2012). Concentrations of bisphenol A and other phenols in pooled sera from children. *Environmental Science & Technology*, 46(22), 12664–12671.
- Zaborina, O., Daubaras, D. L., Zago, A., Xun, L., Saido, K., Klem, T., Nikolic, D., & Chakrabarty, A. M. (1998). Novel pathway for conversion of chlorohydroxyquinol to maleylacetate. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4667–4675.

- Zhang, J., Liu, X., Xu, Z., Chen, H., & Yang, Y. (2008). Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(4), 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.015>
- Zhang, W. X. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation. *Journal of Nanoparticle Research*, 5(3–4), 323–332.
- Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2018). Global pesticide consumption and pollution. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1), 1–27.
- Zhang, Z., Cissoko, N., Wo, J., & Xu, X. (2008). Factors influencing the dechlorination of 2,4-dichlorophenol by Ni–Fe nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 78–86.
- Zhao, X., Zhou, Y., Ye, L., & Zhang, Y. (2009). Degradation of chlorophenols by laccase from *Trametes versicolor*. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 6(4), 555–562. <https://doi.org/10.1007/BF03326084>
- Zhuo, R., Yu, H., Yuan, P., Fan, J., Chen, L., Li, Y., Ma, F., & Zhang, X. (2018). Heterologous expression and characterization of three laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.055>

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta eğitimini doğduğu yerde tamamladı. 1997 yılında Trabzon Fatih Lisesinden mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fizik bölümünden, 2019 yılında Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Öğretmenliği bölümünden mezun oldu. Evli ve 2 çocuk annesidir.

