



**TRİKLOKARBANIN MİKROBİYAL
DEGRADASYONU**

Ziya ALJOUJA

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK BİLİM
DALI**

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK BİLİM DALI

TRİKLOKARBANIN MİKROBİYAL DEGRADASYONU

(Microbial Degradation of Triclocarban)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ziya ALJOUJA

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Erzurum

2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ziya ALJOUJA tarafından hazırlanan “Triklokarbanın Mikrobiyal Degradasyonu” başlıklı çalışması 02 / 09 / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Danışman: *Atatürk Üniversitesi*

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof. Dr. SERKAN ÖRTÜCÜ
Erzurum Teknik Üniversitesi

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-12261

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Hakan ÖZKAN danışmanlığında sunulan “Triklorbarbanın Mikrobiyal Degradasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	1	30
Kuramsal Temeller	13	30
Materyal ve Metot	25	35
Araştırma Bulguları	10	20
Tartışma ve Sonuçlar	5	20
Tezin Geneli	12	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ziya ALJOUJA	Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
2.9.2024	2.9.2024
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamı tamamlamamda katkıları olan danıőmanım Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a değerli rehberliği ve bilgeliği için teşekkür ederim. Tez çalıőmam boyunca hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Arő. Gör. Elanur DAŐDEMİR'e destekleri ve önerileri için minnettarım. Ayrıca çalıőmalarım sırasında yardımları için Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN, Sayın Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI'ya teşekkür ederim.

Uzakta olmalarına rağmen yanımda olan aileme, başta Ramiz ve Muaaz olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez alıőmamı FYL-2023-12261 numaralı proje ile destekleyen "Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi"ne teşekkür ederim.

Ziya ALJOUJA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRİKLOKARBANIN MİKROBİYAL DEGRADASYONU

Ziya ALJOUJA

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Amaç: Atıksularda sıklıkla tespit edilen, farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinden (PPCP'ler) biri olan triklokarbanın (TCC) biyodegradasyonunu en iyi şekilde gerçekleştirebilen yeni, yerel mikroorganizma türlerinin taranması ve keşfedilmesi, seçilen mikroorganizma ile oluşturulacak biyoremediasyon ortamının optimizasyonu ile TCC degradasyonunun artırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Erzurum ilinde bulunan belediye atıksu arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunelerinden, triklokarbanı karbon kaynağı olarak kullanabilen ve TCC'li ortamda büyüeyebilen mikroorganizmalar izole edildi ve alt kültüre alınarak saflaştırıldı. Saflaştırılan izolatların inoküle edildiği degradasyon besiyerleri hazırlandı ve en yüksek degradasyon yeteneğine sahip olan ZA10 kodlu küf izolatı çalışmanın sonraki basamakları için seçildi. Seçilen ZA10 kodlu küf izolatı 18S rRNA dizi analizi kullanılarak tanımlendi. Ardından tek karbon kaynağı olarak TCC'nin katıldığı mineral tuz ortamları (MSM) hazırlandı ve bu ortam için çeşitli parametreler (pH, sıcaklık, TCC konsantrasyonu ve inkübasyon süresi) optimize edilerek degradasyon verimi artırıldı. Triklokarbanın parçalanma sonrası ortaya çıkan dönüşüm ürünleri GC-MS ile analiz edildi. TCC'nin degradasyonunda rol oynayan mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz (LAC) enzim aktiviteleri belirlendi.

Bulgular: Erzurum ilindeki belediye atıksu arıtma tesisinden alınan ve zenginleştirme kültüründe kullanılan aktif çamur numunesinden triklokarbanı degrade etme potansiyeline sahip olan 5 farklı küf izolatı elde edildi. Yüksek parçalama yetenekleri açısından test edilen bu izolatlar arasından, diğerlerine oranla daha yüksek degradasyon gösteren ZA10 kodlu izolat ileri çalışmalar için seçildi. ZA10 kodlu küf izolatı 18S rRNA dizi analizine göre *Penicillium crustosum* olarak tanımlandı. Ardından mevcut izolatın TCC parçalama yeteneğinin en yüksek olduğu ortam koşulları araştırıldı ve optimal koşullar; pH: 5, sıcaklık: 30°C, TCC konsantrasyonu: 10 mg/L ve 7 günlük inkübasyon süresi olarak belirlendi. ZA10 suşunun optimal parametrelerde TCC'yi 3,4-dikloroanilin ve 4-kloroanilin ana metabolitlerine ayrıştırdığı ve % 88 oranında degradasyon sağladığı tespit edildi.

Sonuç: Erzurum ilindeki belediye atıksu arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunelerinden izole edilen ve *Penicillium crustosum* olarak tanımlanan yerel izolatın, antimikrobiyal bir ajan olan ve atıksularda sıklıkla rastlanması sebebiyle tehlike arz eden triklokarbanı, 10mg/L'lik konsantrasyonda, belirlenen optimal koşullarda %88'e kadar degrade edebildiği ortaya konuldu.

Yapılan bu tez çalışması ile; dünyada önemli kirlilik sorunlarından biri haline gelen triklokarbanın mikrobiyal degradasyon yöntemi ile ortadan kaldırılmasında kullanılabilecek yeni, yerel bir mikroorganizma keşfedildi ve bu mikroorganizma ile uygulanabilecek ileri düzeyli biyoremediasyon yöntemi geliştirme konusunda ilk adım atılarak, bu konu üzerinde yapılacak diğer çalışmalara zemin hazırlandı.

Anahtar Kelimeler: Atıksu, PPCP, antimikrobiyal ajan, triklokarban, biyodegradasyon.

2024, 75 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

Microbial Degradation of Triclocarban

Ziya ALJOUJA

Supervisor: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Purpose: It is aimed to screen and discover new, local microorganism species that can best biodegrade triclocarban (TCC), one of the pharmaceutical and personal care products (PPCPs) frequently detected in wastewater, and to increase TCC degradation by optimizing the bioremediation environment to be created with the selected microorganism.

Method: Microorganisms that can use triclocarban as a carbon source and grow in TCC medium were isolated from activated sludge samples taken from the municipal wastewater treatment plant in Erzurum province and purified by subculture. The degradation media in which the purified isolates were inoculated were prepared and the mold isolate ZA10 with the highest degradation ability was selected for the next steps of the study. The selected mold isolate ZA10 was identified using 18S rRNA sequence analysis. Then, mineral salt media (MSM) with TCC as the sole carbon source was prepared and various parameters (pH, temperature, TCC concentration and incubation time) were optimized to increase the degradation efficiency. The transformation products of triclocarban after degradation were analyzed by GC-MS. Manganese peroxidase (MnP) and laccase (LAC) enzyme activities involved in the degradation of TCC were determined.

Findings: 5 different mold isolates with the potential to degrade triclocarban were obtained from the activated sludge sample taken from the municipal wastewater treatment plant in Erzurum province and used in enrichment culture. Among these isolates tested for their high degradation abilities, the isolate ZA10, which showed higher degradation compared to the others, was selected for further studies. The mold isolate ZA10 was identified as *Penicillium crustosum* according to 18S rRNA sequence analysis. Then, the environmental conditions under which the TCC degrading ability of the current isolate was highest were investigated and the optimal conditions were; pH: 5, temperature: 30°C, TCC concentration: 10 mg/L and incubation period of 7 days. It was determined that ZA10 strain degraded TCC to 3,4-dichloroaniline and 4-chloroaniline main metabolites and achieved 88% degradation at optimal parameters.

Results: The local isolate, identified as *Penicillium crustosum*, isolated from activated sludge samples taken from a municipal wastewater treatment plant in Erzurum province, was determined to be able to degrade triclocarban, which is an antimicrobial agent and poses a danger due to its frequent occurrence in wastewater, up to 88% under optimal conditions at a concentration of 10mg/L.

With this thesis study, a new, local microorganism that can be used to degrade triclocarban, which has become one of the major pollution problems in the world, by microbial degradation method was discovered and the first step was taken in developing an advanced bioremediation method that can be applied with this microorganism, and the ground has been prepared for further studies on this field.

Keywords: Wastewater, PPCP, antimicrobial agent, triclocarban, biodegradation.

2024, 75 pages

İçindekiler

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	3
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Farmasötikler ve kişisel bakım ürünleri (PPCP'ler).....	4
PPCP'lerin çevreye girme şekli.....	5
Atık sularda PPCP'lerin varlığı.....	5
PPCP'lerin sudaki konsantrasyonları.....	5
PPCP kategorileri.....	6
Çevre ve sağlık riskleri.....	8
PPCP'lerin kaldırılması.....	9
PPCP'nin biyodegradasyonu.....	9
PPCP'lerin mikroorganizmalar tarafından biyodegradasyonu.....	10
Küfler ve algler.....	10
Bakteriler.....	10
PPCP kirleticileri ve sınırlamaları üzerine mikrobiyal bazlı biyoremediasyon.....	10
PPCP'lerin analitik yöntemleri.....	11
Triklorobenzen (TCC).....	12
TCC'nin ortaya çıkışı, akıbeti ve potansiyel riskleri.....	14
Belediye atık su arıtma tesislerinde TCC'nin kaderi.....	14
Su ortamlarında TCC'nin oluşumu.....	15
Çamur, biyokatıllar, tortu ve toprakta TCC oluşumu.....	15
TCC'nin biyodegradasyonu.....	15
TCC'nin metabolizması ve dönüşüm ürünleri.....	16
MATERYAL ve YÖNTEM.....	19

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları	19
Kullanılan kimyasal maddeler	20
Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı	21
Yöntem	22
Numune alınması ve triklokarbanı degrade edebilen mikroorganizmaların izolasyonu ..	22
TCC parçalayan küflerin karşılaştırılması	23
TCC'yi yüksek verimle degrade edebilen izolatın tanınması	24
Seçilen ZA10 kodlu küf izolatından DNA izolasyonu:	24
PCR işlemi	25
PCR ürünlerinin jel elektroforezi	26
Klonlama	27
Kompetent hücrenin hazırlanması	27
Ligasyon işlemi	27
Transformasyon işlemi	27
Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım	27
Koloni PCR ve koloni PCR işlemi	28
Plazmit izolasyonu	29
Plazmitlerin kontrol edilmesi	29
Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması	29
DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi ve değerlendirilmesi	29
Optimal koşullar ve triklokarban degradasyonu	30
Analitik yöntemler	36
ARAŞTIRMA BULGULARI	39
TCC parçalayan küflerin izolasyonu ve tanınması	39
TCC parçalayan küflerin izolasyonu	39
TCC parçalayan izolatların degradasyon yüzdesi	40
Sekans analiz sonuçları	41
Optimal koşullar ve triklokarban degradasyonu	44
Optimal sıcaklık belirlenmesi	44
Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi	45
Optimal triklokarban konsantrasyonunun belirlenmesi	46
Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi	47
Optimal parametreler ile hazırlanan örneğin GC-MS ile analizi	52
TARTIŞMA VE SONUÇ	56
Kaynaklar	59
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. farmasötikler ve kişisel bakım ürünlerin sınıflandırılması	7
Tablo 2. Triklorbarbanın fiziko-kimyasal özellikleri	13
Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:.....	19
Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler:.....	20
Tablo 5. Kullanılan PCR karışımı	25
Tablo 6. PCR parametreleri	25
Tablo 7. Koloni PCR’da kullanılan PCR karışımı	28
Tablo 8. Koloni PCR parametreleri.....	28
Tablo 9. İzolatların TCC degradasyon yüzdesi.	41
Tablo 10. Farklı İnkübasyon süresinde HPLC ile belirlenen degradasyon yüzdesi.....	48
Tablo 11. Farklı inkübasyon sürelerinde HPLC ile belirlenen degradasyon sonucu.	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Triklokarban 'ın yapısı.....	12
Şekil 2. Önceki çalışmalara dayanan TCC biyodegradasyon yolu.....	16
Şekil 3. Triklokarbanın klorsuz dönüşüm ürünleri.....	17
Şekil 4. Erzurum belediyesi atıksu arıtma tesisi.....	22
Şekil 5. Erzurum ilindeki belediye atık su arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi.....	23
Şekil 6. DNA izolasyonu	25
Şekil 7. Elektroforez işlemi	26
Şekil 8. Enzim aktivitesi ölçümü yapılırken renk değişikliği.....	31
Şekil 9. Biyokütle ağırlığı ölçümü için hazırlanan besiyeri.	32
Şekil 10. Farklı sıcaklıklarda inkübasyon için hazırlanan örnekler.....	33
Şekil 11. TCC varlığında farklı pH 4-5-6-7 konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler	34
Şekil 12. Farklı TCC konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler	35
Şekil 13. Farklı inkübasyon sürelerinde ölçülmek için hazırlanan numune.....	36
Şekil 14. GC-MS ve HPLC analizi için hazırlanan numune	37
Şekil 15. GC-MS analizi için ekstraksiyon işlemi.....	38
Şekil 16. İzole edilen mikroorganizmalar.....	39
Şekil 17. PDB içerisinde geliştirilen küf izolatları	40
Şekil 18. İzolatların enzim aktivite ve biyokütle ölçüm sonuçları.	40
Şekil 19. ZA10 kodlu izolatın, 18S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining filogenetik ağacı	42
Şekil 20. ZA10 <i>Penicillium crustosum</i> 4.gün.....	42
Şekil 21. ZA10 <i>Penicillium crustosum</i> 6.gün.....	43
Şekil 22. ZA10 <i>Penicillium crustosum</i> 8.gün.....	43
Şekil 23. PDA+ABTS üzreinde ZA10 izolatının lakkaz enzimi salgıladığını gözlemlemek (renk değişimi).....	44
Şekil 24. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu.....	45
Şekil 25. Farklı pH konsantrasyonunda enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu	46
Şekil 26. Farklı TCC konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu.	47
Şekil 27. Farklı inkübasyon süresinde enzim aktivitesi ve biyokütle sonucu.	48
Şekil 28. TCC'nin ve dönüşüm ürünlerinin 4-kloroanilin (4CA) ve 3,4-dikloroanilinin (3,4-DCA) GC-MS tanımlaması.	54
Şekil 29. TCC'nin degradasyon ürünleri.	55

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

TCC	triklokarban
PPCP	farmasötikler ve kişisel bakım ürünleri
μg	mikrogram
mg	miligram
mg l^{-1}	litre başına miligram
g	gram
g l^{-1}	litre başına gram
kg	kilogram
mg kg^{-1}	kilogram başına miligram
ml	mililitre
μl	mikrolitre
mM	milimolar
mm	milimetre
$^{\circ}\text{C}$	santigrat derece
NSAID	steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç
AAT	atık su arıtma tesisi
DNA	deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksinükleotid trifosfatlar
FeCl_3	demir klorür
FeSO_4	demir sülfat
KH_2PO_4	potasyum dihidrojen fosfat
KCl	potasyum klorür
$\text{MgC}_{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	magnezyum klorür dihidrat
MgSO_4	magnezyum sülfat
MnSO_4	manganez sülfat
MSM	mineral tuz ortamı
HPLC	yüksek performanslı sıvı kromatografisi

GİRİŞ

Farmasötiklerin ve kişisel bakım ürünlerinin yoğun kullanımı, sularla ilgili ciddi endişeleri de beraberinde getirmiştir. Artan dünya nüfusu ve değişen yaşam tarzları, PPCP'lere yönelik aşırı bir talebe yol açmış, ve bunların aşırı üretimi ve kullanımı, en sonunda PPCP'lerin en büyük havuzu olan atıksu arıtma tesislerine (AAT'ler) boşaltılmasıyla sonuçlanmaktadır (Kumar *et al.* 2020). Su ortamına ve insan sağlığına yönelik olası tehditleri yüzünden, PPCP'leri son zamanlarda yeni ortaya çıkan kirleticiler olarak daha fazla dikkat çekmektedir. Çeşitli organik bileşikler içerirler (metabolitleri ve dönüşüm ürünleriyle birlikte) bunlar; farmasötik ilaçlar ve yüksek miktarlarda kullanılan sabunlar, diş macunları, losyonlar, güneş kremleri, kokular vb. Son yıllarda yoğun çalışmalarla önemli bir organik kirletici grubu olan PPCP'lerin dünya çapında su ortamında yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Liu and Wong 2013), bu kirleticiler sürekli olarak çevreye boşaltılan bir grup organik kirletici maddedir (Chopra and Kumar 2018). Toksik ve dirençli performansları nedeniyle geleneksel atık su arıtma tesisleri tarafından etkili bir şekilde giderilemedikleri için çevrede her yerde bulunur hale gelmektedirler (Wang and Wang 2016). Refrakter özelliklerinden dolayı, PPCP'ler atıksu arıtma tesisleri tarafından verimli bir şekilde parçalanmadığı için, PPCP ve yan ürünleri, AAT'lerden deşarj edilen arıtılmış su ile birlikte alıcı su kütlelerine ulaşmaktadır (Khan *et al.* 2019; Kumar *et al.* 2020).

Farmasötik ve kişisel bakım ürünler su ortamına girme yolları çoğunlukla hastane veya belediye atık su deşarjları, kanalizasyon arıtma tesisi atık suları yoluyla girmekte ve atık sularda, yüzey sularında ve hatta içme sularında bile tespit edilmektedirler (Yu *et al.* 2013). Evsel atık suların yaklaşık yüzde 80'i, gelişmekte olan ülkelerde ön arıtma yapılmadan doğrudan yüzeysel su kaynaklarına verilmektedir. Kirlenen su kütleleri, gıda döngüsü, su temini ve rekreasyonel değerler gibi, ekosistemdeki önemli rollerinden birçoğunu kaybetmiştir (Bi *et al.* 2019). Buna ek olarak, düşük su kalitesi dünya çapında hastalıklara neden olan bir sorundur ve güvenli olmayan içme suyundan kaynaklanan gastrointestinal hastalıklar nedeniyle yılda 800,000'den fazla ölüm kaydedilmiştir (Bi *et al.* 2019). İçme suyunun güvenilir olup olmadığı, su kütlelerindeki mikrokirleticilerin miktarı ve varlığıyla ilişkilidir. Mikrokirleticiler birçok çeşitli sınıflardan oluşur; kişisel bakım ürünleri, farmasötikler, yüzey aktif maddeler, endüstriyel kimyasallar ve pestisitler gibi. Giderilmelerinin zorluğunun yanı sıra, nörotoksisite, gelişimsel ve üreme toksisitesi ve metabolik etkileşime kadar uzanabilen olumsuz sağlık etkileri nedeniyle

su kaynaklarında mikrokirleticilerin oluşumu içme suyunun güvenliği için kritik bir sorun haline gelmiştir (Al-Baldawi *et al.* 2021).

Çalışmalar, bu farmasotik ve kişisel bakım ürünlerinin su ortamındaki konsantrasyonlarının ng/L ile µg/L arasında değiştiğini ve insan sağlığı ve su yaşamı için ciddi riskler oluşturduğunu göstermektedir. Bu olası risklerin içinde endokrin bozukluğundan kaynaklanan olumsuz değişiklikler, akut ve kronik toksisite ve antibiyotik direnç genlerinin ortaya çıkması sayılabilmektedir (Rahman *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2020). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı yaptıkları tanımına göre farmasötikler ve kişisel bakım ürünler; tarım endüstrisi tarafından çiftlik hayvanlarının büyümesini veya sağlığını desteklemek için kullanılan veya bireyler tarafından kişisel sağlık veya kozmetik amaçlarla kullanılan herhangi bir madde olarak tanımlamaktadır. Bu kirletici sınıfı binlerce farklı bileşikten oluşmaktadır (Cizmas *et al.* 2015; Al-Baldawi *et al.* 2021).

Son zamanlarda, PPCP'leri de içeren mikrokirleticiler, toksisiteleri ve hücrelerdeki kalıcılıkları nedeniyle artan ilgi görmektedir. farmasotik ve kişisel bakım ürünlerini uzun süre kullanımı ve onlara uzun süreliğine maruz kalmak hem insan sağlığını hem de su ortamını olumsuz etkileyebilirler. PPCP'ler, uygun olmayan şekilde imha edilme ve üretim tesislerinden boşaltılma gibi çeşitli yollarla çevreye salınır ve daha sonra su kütlelerindeki PPCP'lerin ana kaynağı olarak kabul edilen kanalizasyon arıtma tesislerine ulaşır (Li *et al.* 2019). Bu tür kimyasalları içeren geri kazanılmış su ve çamur uygulamalarının çevresel risklerini azaltmak için, bunların degradasyonu ve sorpsiyonunun incelenmesi önemlidir (de Jongh *et al.* 2012; Yu *et al.* 2013). Atık sulara ve biyokatılarda tespit edilen yaygın PPCP'ler arasında antimikrobiyal ajan triklokarban (3-(4-klorofenil)-1-(3,4-diklorofenil) üre (TCC) yer alır (Lozano *et al.* 2013; Thelusmond *et al.* 2018).

Triklokarban (TCC, 3,4,4'-triklorokarbanilid), TCC yüksek hacimli bir kimyasaldır, 1957'den beri plastiklerde, tekstillerde, diş macunu, sabun ve yara dezenfektanlarında, kozmetik dahil kişisel bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmakta olan, poliklorlu aromatik bir antibakteriyel maddedir. Erişilebilir üretim miktarları farklılık göstermektedir; yıllık küresel üretimi yaklaşık 0,0006 - 10.000 ton arasında değişmektedir (Wang *et al.* 2022). Hidrofobik yapısından dolayı biyokatılarda 2900 ila 51.000 ngg⁻¹ arasında değişen yüksek TCC konsantrasyonları tespit edilmiştir (Cha and Cupples 2009).

TCC, olası antimikrobiyal dirence yol açabileceğinden insan sağlığı ve çevre güvenliği için önemli bir tehdit oluşturabilir ve mahsullerde, alglerde ve balıklarda birikebilir ve besin zinciri yoluyla insan vücudunda birikmesi halinde hamile kadın ve fetüs için olumsuz sonuçlar

yaratabilir. (Halden and Paull. 2005 ; Wang *et al.* 2022). TCC ile ilişkili karbanilidler ve fenil üre pestisitleri gibi yaygın kirleticiler için daha etkili arıtma stratejileri geliştirmek için, bu bileşikler ve atık su mikroorganizmaları arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. (Miller *et al.* 2010). TCC'nin mikrobiyolojik bozunması ve dönüşümü, yüksek verimlilik ve çevre dostu özelliklerinden dolayı Fiziksel ve kimyasal tekniklerle karşılaştırıldığında, TCC'nin mikrobiyolojik bozunması çeşitli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, TCC'nin dirençliliği ve antimikrobiyal özellikleri göz önüne alındığında, TCC'yi etkili bir şekilde bozan mikrobiyal türler üzerindeki araştırmalar sınırlıdır (Li *et al.* 2022).

Tez çalışmasının temel amacı, atık sulardaki TCC'nin giderilmesi için yeni bir biyolojik bozunma ajanı elde etmektir. Bu doğrultuda benimsenen yaklaşım (1) Türkiye/Erzurum ilinde bulunan Belediye Atıksu Arıtma Tesisinden alınan aktif çamur numunelerinden TCC parçalayan mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanmasını içermektedir. Aktif çamurdan izole edilen küf suşu, 18S rRNA gen dizisi analizi ile tanımlandı, (2) Deneysel koşullar, TCC bozunmasını arttırmak ve küflerin aktif büyümesini kolaylaştırmak için optimize edildi, (3) TCC'nin ara ürünlere dönüşümünün GC-MS ile tanımlanması, HPLC ile degradasyon yüzdesi ve olası biyolojik bozunma yollarının aydınlatılması rapor edilmiştir. Ayrıca, TCC'nin biyodegradasyonunda anahtar enzimlerin analizleri yapıldı ve rapor edildi. Çalışmamız ile, dünyada önemli kirlilik sorunlarından biri haline gelen Triklorokarbanın mikrobiyal degradasyon yöntemi ile ortadan kaldırılmasında kullanılabilecek yeni mikroorganizma keşfi, bu mikroorganizma ile uygulamalar geliştirilmesi konularında adım atılmış olacak ve bu konu üzerinde yapılacak diğer çalışmalara zemin hazırlanmış olacaktır.

KURAMSAL TEMELLER

Farmasötikler ve kişisel bakım ürünleri (PPCP'ler)

Su ortamlarında varlığını sürdürmeleri nedeniyle, farmasötikler ve kişisel bakım ürünleri (PPCP'ler) giderek artan bir endişe kaynağı teşkil eden kirleticilerdir. "PPCP'ler" terimi genel olarak insanlar ve/veya hayvanlar için sağlık, tıbbi veya kozmetik amaçlı kullanılan çeşitli ürünleri ifade eder. PPCP'ler; evsel atık su, su arıtma tesisleri (AAT'ler), üreticilerin uygun olmayan şekilde bertaraf etmesi, kanalizasyon arıtma tesisleri ve hastane deşarjları gibi birçok yolla su ortamlarına salınmaktadır (Leung *et al.* 2012; Liu and Wong 2013). Evsel atık su ile karşılaştırıldığında hastane atık sularında genellikle hem daha sık hem de daha yüksek konsantrasyonda karşılaşılmaktadır. Atılan PPCP'ler ya orijinal konsantrasyonlarını ve yapılarını koruyabilir ya da sudaki matrislerdeki yaşamları boyunca harekete geçirilip diğer aktif (veya aktif olmayan) bileşiklere dönüştürülebilirler (Yang Y. *et al.* 2017). Farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinin kapsamlı uygulamaları (sanayi, tıp, su ürünleri yetiştiriciliği, hayvancılık ve insanların günlük yaşamı gibi birçok alanda) ve biyolojik atık su arıtma tesisleri tarafından giderilmelerinin zorluğu nedeniyle çevrede yaygın hale gelmişlerdir. Farklı kullanım amaçlarına göre çeşitli sınıflara ayrılabilirler (Daughton and Ternes 1999).

Farmasötiklerin çoğu suda çözünebilir olarak tasarlanmıştır, çünkü bu ortamda çalıştıkları varsayılır, bu da onları pestisitler ve patlayıcılar gibi geleneksel organik kirleticilerden ayırır. Bu maddeler çevreye ulaşmadan önce insanların veya hayvanların sindirim sisteminden geçerek özel bir biyolojik ortama ve biyokimyasal metabolizmaya maruz kalır, ekosisteme değiştirilmiş ve stabilize edilmiş bir biçimde ulaşır. Değişmeden kalan farmasötikler genellikle ekosistemlerde dönüşüme veya biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir (Al-Baldawi *et al.* 2021). PPCP'lerin sürekli salınımı, antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına ek olarak kanserojen veya teratojenik ve endokrin bozucu etkiler de dahil olmak üzere genellikle insanlar ve su toplulukları üzerinde uzun vadeli toksisiteyle ilişkili bir dizi bireysel, sinerjistik veya antagonistik etkiye yol açabilir (Sutar *et al.* 2019). İlaç kalıntılarının neden olduğu kirlilik, çeşitli ülkeler tarafından çevreye yönelik gerçek bir tehdit olarak nitelendirilmiştir, ancak ne yazık ki bugüne kadar endüstriyel tesislerden ve AAT'lerden ekosisteme atık deşarjları için bu toksik bileşiklerin düzenleyici seviyeleri belirlenmemiştir (Shetty and Gupta 2019; Al-Baldawi *et al.* 2021).

1993 yılında PPCP'lerin dünya çapındaki üretimi 1×10^6 tonun üzerindeyken, 2015'ten sonra yıllık üretimi 2×10^7 tonun üzerine çıkmış, üstelik bu üretim, PPCP'lerin hastalıkları önleme veya iyileştirme, su ürünleri yetiştiriciliği ve hayvancılık gibi ekonomik kalkınmanın

sürdürülmesindeki yüksek talepleri nedeniyle hala artmaktadır (Richardson *et al.* 2005, Wang and Wang 2016). Farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinin çevredeki akıbeti, iki ana nedenden dolayı küresel olarak dikkat çekmektedir. Bunun bir nedeni, yaygın kullanımlarından kaynaklanan PPCP'lerin çevrede her yerde bulunmasıdır; diğer neden ise insanların PPCP'leri iz düzeyinde tespit etmesini sağlayan analitik teknolojiye ulaşılmıştır (Wang and Wang 2016).

PPCP'lerin çevreye girme şekli

PPCP'ler doğrudan ve dolaylı yollarla çevreye verilebilir. PPCP'lerin çevreye girme şekli Mompelat ve ark. tarafından incelenmiştir (Mompelat *et al.* 2009). PPCP'ler endüstriler, hastaneler, evler ve atık su arıtma tesisleri tarafından doğrudan yüzey suyuna deşarj yoluyla ve liç veya banka filtrasyonu yoluyla yeraltı suyuna ulaşabilen biyokatıların tarım arazilerine yayılması durumunda arazi akışı yoluyla yüzey suyuna girebilir. Yüzey suyu bölmesinde tortu, çeşitli bağlanma bölgelerine sahip olduğundan PPCP'leri adsorbe edebilir (Wang and Wang 2016). Toprak aynı zamanda farmasötik ve kişisel bakım ürünleri için de bir depo olabilir. Bu ürünleri içeren, arıtılmış veya arıtılmamış atık su ile sulama yoluyla toprağa aktarılabilir, ve bu ürünlerin bazıları da atmosferik ıslak birikim yoluyla toprağa geçebilir (Wang and Wang 2016).

Atık sularda PPCP'lerin varlığı

Atık su arıtma tesislerinden çıkan atık sular dünyanın birçok bölgesinde; tarım, peyzaj sulama, aşırı çekilen akiferlere yeraltı suyu beslemesi vb. dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. 2006 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'nde tahminen $9,8 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ arıtılmış belediye atık suyu (üretilen toplamın yaklaşık %7-8'i) yeniden kullanılmıştır. Ancak arıtılmış atık suyun yeniden kullanımının faydalarının yanı sıra, insanların atık sudan kaynaklanan organik kirleticilerden kaynaklanan olumsuz etkilerle yüzleşmesi gibi olumsuzluklar da bulunmaktadır. PPCP'ler gibi ortaya çıkan bazı organik kirleticilerin atık sularda mevcut olduğu rapor edilmektedir. Bu kirleticiler, atık sularda eser düzeylerde de olsa, uzun süreli sulama yapılması durumunda muhtemelen toprakta birikecek ve bu da yeraltı sularının kirlenme riski dahil çeşitli çevresel sorunlara yol açabilecektir. Bu bakımdan, ıslah edilmiş atık su ile sulama yapılan tarım topraklarında atık su kaynaklı kirleticilerin akıbeti, özellikle kalıcılığının ve adsorpsiyon kapasitesinin araştırılmasını gerektirmektedir. (Xu *et al.* 2009; Xu and J. W. 2009).

PPCP'lerin sudaki konsantrasyonları

Geçtiğimiz on yılda, analitik teknoloji ve araçların gelişimi, farklı ortamlarda eser düzeydeki bileşiklerin tespit ve analiz yeteneklerini geliştirmiştir. Çeşitli çevresel ortamlarda mevcut olabilen, ekosistem ve insan sağlığı üzerinde potansiyel olumsuz etkilere sahip PPCP konsantrasyonlarını bildiren çeşitli çalışmalarla kanalizasyondaki konsantrasyonların ng/L ile

$\mu\text{g/L}$ arasında değişmekte olduğunu göstermiştir (Ren *et al.* 2021). Farklı alışmalar PPCP'lerin; yzey sularında ng/L 'den $\mu\text{g/L}$ 'ye kadar değişen konsantrasyonlarda, (Calamari *et al.* 2003; Roberts *et al.* 2016), yeraltı sularında ng/L ile mg/L , sedimentte ve toprakta ise $\mu\text{g/kg}$ konsantrasyon seviyelerine ulaşabildiğini göstermiştir (Wang and Wang 2016).

PPCP kategorileri

PPCP'ler genellikle ürünün tktim amacına, daha sonra bireysel olarak bileşenlerine ve özelliklerine göre çeşitli gruplara ayrılabilir. Farmasötik rnler temel olarak hem reçeteli hem de reçetesiz ilaçları, veterinerlik ilaçlarını, yasa dışı ilaçları ve bunlara ilaveten çeşitli metabolitleri ve konjugatları içermektedir. Yaklaşık 3000 maddenin farmasötik bileşen olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir (Rodriguez-Narvaez *et al.* 2017; Al-Baldawi *et al.* 2021). Patojenik bakterilerin büyümesini engellemek için antibiyotikler kullanılır. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar ateş düşürücü, analjezik ve antiinflamatuvar etkilere sahip bileşikler içerir ve sıklıkla reçetesiz temin edilebilirler (Dey *et al.* 2019). Hormonlar organizmalarda büyümeyi ve fiziksel gelişmeyi düzenleyen, insanlar ve hayvanlar tarafından doğal olarak ifade edilebilen (strojen gibi) (Dey *et al.* 2019) ve burada aslında farmasötik olarak kabul edilmezken, endüstriyel olarak da üretilen farmastiklerdir (rneğin etinilestradiol) (Al-Baldawi *et al.* 2021).

İnsanların yaşam koşullarını iyileştirmek amacıyla kullanılan ve pazarlanan tüm kimyasallar, kişisel bakım rnleri (PCP'ler) kategorisine girmektedir. Ağız hijyeni ürünlerini, şampuanları, sa boyalarını makyaj ürünlerini, sa sprelerini, parfümleri, deodorantları, güneş koruyucu kremleri, vücut losyonlarını ve çeşitli kremleri içeren PCP'ler temel olarak; dezenfektanlar, böcek kovucular, kokular, koruyucular, güneş ışığı UV filtreleri gibi alt kategorilere ayrılır. Bu rnler öncelikle biyokimyasal değişikliklere neden olmadan kişisel hijyeni korumanın yanı sıra tat, koku, görünüm ve dokunma duyularını geliştirmek için kullanılır. Kişisel bakım ürünleri flavonoidler ve renklendirici maddeler gibi gıda katkı maddeleri ve takviyeleri de içerir (Dey *et al.* 2019). Bu bileşiklerin kentsel yüzeysel akış ve yeraltı sularındaki konsantrasyonları son yıllarda önemli lde artmıştır. Bu rnlerin üretiminde kullanılan başlıca bileşikler arasında şunlar yer almaktadır: Atık sularda sıklıkla izlenen antimikrobiyaller olarak triklosan ve triklokarban, N,N-dietil-m-toluamid (DEET), sentetik misklerdir (Ellis 2006; Rodriguez-Narvaez *et al.* 2017; Al-Baldawi *et al.* 2021).

PPCP'lerin moleküler yapıları, her bir bileşiğin fonksiyonel gruplarıyla (hidroksil, karboksil, amin ve keton) ilgili farklılıklar gösteren büyük ve karmaşık olarak tanımlanabilir. Kimyasal yapıdaki kk farklılıklar her bir bileşiğin znrlğn, polaritesini ve diğer özelliklerini farklı şekilde etkileyebileceğinden, Farmasötiklerin aktif gruba göre

sınıflandırmanın mutlaka tek tip bir kimyasal davranış izleyecekleri anlamına gelmediğini belirtmek gerekir (Al-Baldawi *et al.* 2021).

Tablo 1. farmasötikler ve kişisel bakım ürünlerin sınıflandırılması (Liu and Wong 2013).

	Alt gruplar	Temsilci bileşikler
Farmasötikler (İlaçlar)	Antibiyotikler	Klaritromisin Eritromisin Sülfametoksazol Sülfadimetoksin Siprofloksasin Norfloksasin Kloramfenikol
	Hormonlar	Estron (E1) Estradiol (E2) Etinilestradiol (EE2)
	Analjezikler ve anti-enflamatuar ilaçlar	Diklofenak İbuprofen Asetaminofen Asetilsalisilik asit
	Antiepileptik ilaçlar	Karbamazepin Primidon
	Kan lipit düzenleyicileri	Klofibrat Gemfibrozil
	β -blokerler	Metoprolol Propranolol
	Kontrast medya	Diatrizoat iyopromid
	Sitostatik ilaçlar	İfosfamid Siklofosfamid
	Kişisel Bakım ürünleri	Antimikrobiyal ajanlar/dezenfektanlar
Sentetik miskler/Kokular		Galaksolid (HHCB)

		Toksalid (AHTN)
	Böcek kovucular	N,N-dietil-m-toluamid (DEET)
	Koruyucular	Parabenler (alkil-p-hidroksibenzoatlar)
	Güneş koruyucu UV filtreleri	2-etil-heksil-4-trimetoksisinnamat (EHMC) 4-metil-benzilidin-kafur (4MBC)

PPCP'lerin kalıcı kirleticilerinin tamamen uzaklaştırılmaması, fizikokimyasal özellikler, karmaşık yapı ve düşük biyoyararlanım ile doğrudan ilişkili olabilir. Kirleticileri gidermek için etkili ve çevre dostu alternatif bir arıtma süreci bulmak büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, geri kazanılabilirlik ve yeniden kullanılabilirlik potansiyeline sahip mikroorganizmaları (*Bacillus badius*, *B. cereus*, *B. Licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Exiguobacterium* sp. RD3, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Candida tropicalis*, *Fusarium solani*, *F. pisi*, *Pseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., vb.) kullanarak su sistemlerinden kaynaklanan PPCP'lerin kalıcı kirleticilerini iyileştirmeye odaklanmaktadır. Mikroorganizmalar, su sistemindeki kalıcı PPCP kirleticilerini bozabilir ve (toksik ila toksik olmayan) aktarabilir (Narayanan *et al.* 2022). Hangi kirleticilerin bozunma potansiyeline sahip olduğu çoğunlukla enzimatik aktivitelerine bağlıdır (Saxena *et al.* 2020; Narayanan *et al.* 2022). Aktif mikrobiyal enzimler, organik ve inorganik kalıcı PPCP kirleticilerini ekosisteme zarar vermeden su, karbondioksit, metan, biyokütle ve diğer yan ürünlere ayrıştırabilir (Abatenh *et al.* 2017; Grasso *et al.* 2019; Narayanan *et al.* 2022).

Çevre ve sağlık riskleri

PPCP'lerin alıcı su kütlelerinde yaygın olarak görülmesi, çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinden dolayı giderek artan bir endişe kaynağıdır. PPCP'ler kanalizasyonda, göllerde, nehirlerde ve yeraltı sularında yaygın olarak bulunur. Hayvan ve insan sağlığına zararlı olabilirler çünkü kalıntıları, arıtılmış kanalizasyon ve atık suların boşaltılması ve çamurun tarımsal uygulamalar için yeniden kullanılması yoluyla gıda zincirine girip birikebilir

(Vithanage *et al.* 2014). AAT'lerdeki PPCP'lerin ng/L ile µg/L arasında değişen düşük konsantrasyonlarına rağmen, insanların bu kimyasallara maruz kalmasının bilinmeyen uzun vadeli etkileri de olabilir. PPCP'lerin ekosistemler üzerindeki olumsuz etkileri insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır, çünkü bu bileşiklerin kalıntıları meyveler, sebzeler ve içme suyu da dahil olmak üzere gıda zincirimizde tespit edilmiştir (Yang Y. *et al.* 2017).

PPCP'lerin kaldırılması

Çevredeki PPCP konsantrasyonları düşük olmasına rağmen, bu bileşiklere sürekli maruz kalmak, uzun vadeli etkileri bilinmeyen kritik bir endişedir, bu nedenle PPCP'lerin kaldırılması büyük ilgi görmektedir. Genel olarak PPCP'lerin giderim yöntemleri üç kategoriye ayrılır: fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemler (Wang and Wang 2016);

1-PPCP'lerin fiziksel adsorpsiyon işlemleriyle çıkarılması: Adsorpsiyon, sudaki eser miktardaki organik kirleticilerin uzaklaştırılmasında sıklıkla kullanılan en yaygın fiziksel işlemdir. 2- PPCP'lerin biyolojik degradasyon işlemi ile giderilmesi: Mikrobiyal degradasyon, hafif çalışma koşulları ve düşük maliyeti gibi birçok avantajı nedeniyle organik kirleticilerin çevreden uzaklaştırılması için en önemli mekanizmadır. Mikroorganizmalar kirleticileri metabolik işlevlerinde kullanarak giderir ve bazı durumlarda farklı mikroorganizma türleri kirleticileri gidermek için birlikte çalışabilir. 3- PPCP'lerin kimyasal ileri oksidasyon işlemleri ile giderilmesi: Fenton, Ozonlama, UV/H₂O₂, gama ışınlama ve sonoliz ve elektrokimyasal oksidasyon içeren diğer ileri oksidasyon prosesleri gibi kimyasal oksidasyon prosesleri, sulu çözeltilerdeki toksik veya zor organik kirleticilerin parçalanmasında etkili olmuştur (Wang and Wang 2016).

PPCP'nin biyodegradasyonu

Mikroorganizmalar organik madde ve yabancı kimyasalların ayrıştırılmasında hayati bir rol oynar ve besin ağındaki diğer organizmalara besin sağlar. Mikrobiyal işlev gruplarındaki değişiklikler ekosistem süreçlerindeki değişikliklerle ilişkili olduğundan, mikrobiyal topluluklar ekosistem işlevlerinin sürdürülmesi için gereklidir ve bu da onları doğal bir ekosistemin kalitesi için temel hale getirir. Sonuç olarak, doğal ekosistemin kalite durumuna katkıda bulunan genel süreçlerde gereklidirler (Reed *et al.* 2007; Caracciolo *et al.* 2015).

Su ve topraktaki doğal mikrobiyal topluluklar, ekosistemlerin kalitesini kontrol eden ve çevreye salınan kirliliğin akıbetini düzenleyen birçok süreçte kilit rol oynamakta ve böylece 'düzenleme' olarak bilinen bir ekosistem hizmeti sağlamaktadır. Mikroorganizmalar, kirleticileri metabolik ve/veya ko-metabolik yollarla parçalayabildikleri için ekosistemin kendi kendini temizleme

süreçlerinde yer alırlar. Biyodegradasyon, farmasötikler gibi çoğu ksenobiyotiklerin ortadan kaldırılması için kullanılan en önemli süreçtir (Topp *et al.* 2013; Caracciolo *et al.* 2015).

Biyodegradasyon, mikrobiyal toplulukların metaller, organik ve inorganik maddeler gibi atıksu çamur içeriklerinin/bileşenlerinin yapısını parçalamak veya değiştirmek için çok önemli roller oynadığı doğal bir çürüme veya bozunma sürecidir. Atıksu bileşenlerinin biyolojik olarak parçalanması biyolojik ayrışmayı (katıların çökeltme özelliği), biyokatı birikimini (fungal arıtma ile biyokatı üretimi), filtrelenebilirliği ve susuzlaştırılabilirliği önemli ölçüde artırır (Mannan *et al.* 2005).

PPCP'lerin mikroorganizmalar tarafından biyodegradasyonu

Küfler ve algler

Küfler ve algler, farklı su sistemlerinde farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinin (PPCP'ler) parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Beyaz küfler, PPCP'lerin farklı konsantrasyonlarda ürettiği birçok kirletici türünü parçalama yeteneğine sahiptir. Bu beyaz çürükçül küfler, peroksidazlar, sitokrom P450, hücre içi enzimler, ligninolitik enzimler ve lakkazlar dahil olmak üzere çeşitli katalitik enzimleri sentezleyebildiğinden, oksidasyon, halojenleşme, kirleticilerin hidroksilasyon, formilasyon ve deaminasyon reaksiyonlarına maruz kalmasına neden olabilirler. Beyaz çürükçül küf grubu, karbamazepin, propranolol, diklofenak, atenolol, ibuprofen, klofibrinik asit, norfloksasin ve siprofloksasin gibi farmasötiklerdeki kalıcı kirleticileri etkili bir şekilde indirger (Costa *et al.* 2019; Narayanan *et al.* 2022).

Bakteriler

Mikroorganizmaların, özellikle de bakterilerin farmasötik ve kişisel bakım ürünlerini biyolojik olarak ayrıştırma kabiliyeti daha da zordur, çünkü farmasötikler bakteriler için toksik olacak şekilde tasarlanmakta ve üretilmektedir. Neyse ki, az sayıda yerleşik bakteri türü, farmasötiklerin spesifik kalıcı kirleticilerini karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanarak bozabilir. Heterotrofik bakteriler klofibrinik asidi laktik asit ve 4-klorofenol gibi daha basit bileşiklere dönüştürebilir. Mikroorganizmalar kompleks yapıyı bozduktan veya indirgeme işlemine tabi tuttukten sonra, yerel mikroorganizmalar indirgenmiş PPCP'leri daha düşük veya toksik olmayan PPCP kirleticilerine parçalayabilir. (da Silva Rodrigues *et al.* 2020; Narayanan *et al.* 2022).

PPCP kirleticileri ve sınırlamaları üzerine mikrobiyal bazlı biyoremediasyon

Mikroorganizmalar, enzimatik yolları aracılığıyla çevredeki farmasötikler ve mikro kirleticiler ile birlikte çeşitli kimyasal kirleticileri stabilize edebilir, bozabilir, uzaklaştırabilir,

değiştirebilir veya detoksifiye edebilir. Enzimler, su ve toprak ortamlarında kalıcı kirleticileri bozan biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler olarak hareket eder. Aktif biyolojik iyileştirme için, mikrobiyal hücrelerin kalıcı kirleticilere karşı biyolojik iyileştirme sürecini ilerletmek için çeşitli türde destekleyici faktörlere ihtiyacı vardı (Zhang *et al.* 2020; Narayanan *et al.* 2022).

Sınırlamalar; PPCP'ler, enerji sağlayan bileşenlerin üretilmesini ve hücrel homeostazın korunmasını gerektirir. Mikroorganizma biyoremediasyonunun etkinliği, reaksiyona giren ortamın fiziksel ve kimyasal yapısı, kirleticilerin doğası ve konsantrasyonu ve mikroorganizmalar için kullanılabilirliği gibi birçok faktöre bağlıdır. Biyolojik kısıtlamalar arasında sınırlı karbon kaynakları için mikroorganizmalar arasındaki rekabet, antagonistik ilişkiler, mikrobiyal predasyon ve kirletici konsantrasyonu ile mikrobiyal popülasyon arasındaki dengesizlik yer almaktadır (Jousset 2012; Narayanan *et al.* 2022). Çevresel faktörlere dayalı sınırlamalar şunlardır: mikrobiyal büyüme ve aktivite sıcaklık, oksijen içeriği, pH, besinler, nem, toprak yapısı, saha özellikleri, redoks potansiyeli vb.'den etkilenebilir. Ayrıca kirleticilerin fizikokimyasal ve biyoyararlılığı özellikleri biyoremediasyon sürecini kısıtlamaktadır. Aktif büyüme, metabolizma ve üreme için dengeli besin takviyeleri (C: N: P oranı), biyolojik iyileştirmenin hızını ve etkinliğini belirler (Abatenh *et al.* 2017; Narayanan *et al.* 2022).

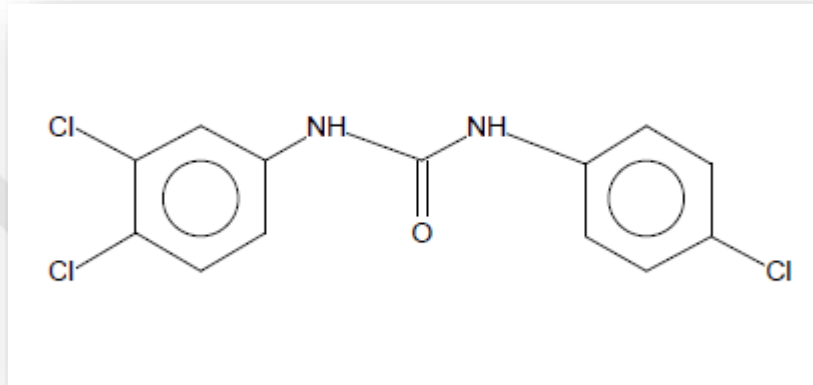
PPCP'lerin analitik yöntemleri

Analitik analiz, PPCP'lerin çevredeki akıbetini incelemek için esastır. Hedef bileşikler için analiz etme süreci uygun analitik cihazın seçilmesi ile başlar: En yaygın kullanılan cihazlar gaz kromatografisi (GC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). HPLC analizi için Numune hazırlığı GC analizine göre daha kolaydır. Cihaz seçimi hedef bileşiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır; GC uçucu bileşikler için kullanılırken, HPLC termal olarak kararsız ve uçucu olmayan bileşikler için kullanılır (Wang and Wang 2016). kromatografinin LC-MS/MS ve GC-MS/MS gibi kütle spektrometrisi ile entegre edilmesindeki gelişmeler, PPCP'lerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi aralığını genişletmiştir, çünkü bu teknikler nanogram/litre seviyesinde bir tespit limitine ulaşabilmektedir (Wang and Wang 2016).

Bu çalışmada kullanılan bileşik olan, atık su ve biyokatılarda tespit edilen yaygın PPCP'ler arasında bir antimikrobiyal ajan olan triklokarban (3,4,4'-triklorokarbanilid, TCC) bulunmaktadır. Atık su arıtma tesislerinde bozunması genellikle zordur ve %70'ten fazlası kg başına mg konsantrasyonunda biyokatı olarak taşınmaktadır (Yun H. *et al.* 2017a).

Triklokarban (TCC)

Triklokarban oldukça etkili, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ve dezenfektandır. Kişisel bakım ürünlerinde 60 yılı aşkın süredir başarıyla kullanılmaktadır. Genellikle türdeş triklosan (TCS) ile birlikte anılır. TCC bir difenil üredir (N-(4-klorofenil)-N'-(3,4-diklorofenil)üre) (Iacopetta *et al.* 2021). Triklokarban (3,4,4'-triklorokarbanilid, C₁₃H₉Cl₃N₂O, TCC), yağ asidi sentezini ve mikropların hücre zarı oluşumunu bozarak etki eden, bozulma ve enfeksiyonun önlenmesi için kişisel bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır (Taweetanawanit *et al.* 2019; Yun H. *et al.* 2020). TCC'nin fizikokimyasal özelliklerinden bazıları Tablo 2'de listelenmiştir (Kor-Bicakci *et al.* 2020).



Şekil 1. Triklokarban 'ın yapısı

3,4,4'-trichlorocarbanilide olarak da bilinen TCC, diarylurea veya bis-arylurea sınıfına ait küçük bir moleküldür. TCC, kişisel bakım ürünlerinde, özellikle de antibakteriyel kalıp/sıvı sabunlar, vücut losyonları, deodorantlar, deterjanlar, tıbbi dezenfektanlar, traş sonrası sabunlar, el dezenfektanları, diş macunu, el yıkama ve ağız gargarası, vücut yıkama ürünleri, temizleme losyonları gibi dermal temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bir içeriktir. Dezenfektan özellikleri nedeniyle bebek diş kaşiyıcıları ve mendilleri, oda spreyleri, kumaş ve deri terbiye maddelerinde fungusit ve koruyucu olarak görev yaparlar (Iacopetta *et al.* 2021; Arifin *et al.* 2023).

Katkı maddesi miktarı %0,5 ile %5 (a/a) arasında değişmektedir (Yun H. *et al.* 2020), TCC 1957'den beri yaygın olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır; ABD'de kişisel bakım ürünlerindeki yıllık tüketim 500.000 ila 1.000.000 pound arasında değişmektedir. 2013-2014 Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırmasına göre, ABD'deki idrar örneklerinin %36,9'unun TCC içermektedir. Sağlık hizmeti ortamlarındaki faydası tartışmasız olmasına rağmen, antimikrobiyal aktivite bakımından faydaları çok azdır veya hiç yoktur (Ye *et al.* 2016; Halden *et al.* 2017; Iacopetta *et al.* 2021).

Yüksek tüketim seviyesi nedeniyle, TCC yüksek üretimli bir kimyasal olarak kategorize edilmektedir. 2010'larda Çin'de TCC ve triklosan için yıllık talep 1220 ton civarındaydı (Yun H. *et al.* 2020). 2013 yılından önce, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kullanımına kısıtlamalar getirene kadar talep her yıl artmıştır. FDA'nın TCC'nin sabunlarda kullanımını yasaklamasına rağmen talep yüksek kalmaya devam etti. Çin ve Hindistan'da ise TCC kullanımı henüz yasaklanmamıştır. AAT atık sularında ve çamurunda tespit edilen TCC kalıntılarının litre başına nanogram ve kilogram başına miligram seviyeleri, çeşitli ortamlarda sıklıkla tespit edilen ve dünya çapında ortaya çıkan en önemli kirleticiler arasında yer almaktadır. Ek olarak, klorsuz türdeşleri dikloro-karbanilid (DCC), monokloro-karbanilid (MCC) ve süstitüe edilmemiş karbanilid (NCC) ile kloro-dönüşüm ürünleri 3,3',4,4'-tetraklorokarbanilid (3'-Cl-TCC)) anoksik çökeltilerde de tespit edilmiştir. Çevresel matrislerin yanı sıra, bitkilerden, hayvanlardan ve insanlardan alınan örneklerde de TCC bulunmuştur; bu da onların potansiyel çevresel endişelerini ve acil sağlık risklerini göstermektedir (Zhao *et al.* 2013; Souchier *et al.* 2015; Brose *et al.* 2019; Chen *et al.* 2019; Yun H. *et al.* 2020).

Tablo 2. Triklokarbanın fiziko-kimyasal özellikleri (Kor-Bicakci *et al.* 2020).

Özellik	Triklokarban
CAS kayıt numarası	101-20-2
Moleküler formül	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O
Molekül ağırlığı (g/mol)	315.578
IUPAC adı	3,4,4'-Triklorokarbanilid 1-(4-klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil)üre
Ticaret adı	Solubacter
Kullanım	Antiseptik ve dezenfektan
Klor içeriği (ağırlıkça %)	36.7
pK _a : Ayrışma sabiti.	12.7
Erime noktası (°C)	255–256
Suda çözünürlüğü (mg/L, 25 °C)	0.65–1.55
Buhar basıncı (25 °C'de mm Hg)	3.61 × 10 ⁻⁹

TCC, reçeteli ve reçetesiz ilaçlar ve temizlik maddeleri de dahil olmak üzere geniş ve çeşitli kimyasal grupları içeren farmasötik ve kişisel bakım ürünlerine (PPCP'ler) dahildir. PPCP'ler atık su arıtma tesislerine ana bileşikler, konjuge bileşikler veya metabolitler olarak idrar ve dışkı atılımıyla neticesinde boşaltılır. TCC'nin endokrin bozucu olduğu ve halojenli bir hidrokarbon

olduğu için biyolojik olarak parçalanmasının zor olduğu gösterilmiştir. Kişisel bakım ürünlerinde yaygın kullanımı ve geleneksel Atık Su Arıtma Tesisleri sırasında kısmi giderilebilmesi, onun çevresel bir kirletici madde olarak değerlendirilmesine yol açmış ve organik kirleticiler listesine yerleştirilmiştir. Çok sayıda çalışma, TCC ve ara ürünlerinin atık su, biyokatılar, yüzey suyu, tortuda ve toprakta varlığını göstermiştir ve TCC, yeni ortaya çıkan endişe verici 10 kirletici arasında yer almaktadır. Atık su arıtma tesislerine iletdikten sonra PPCP'ler, atık su ve biyokatılar yoluyla arazi uygulaması için çevreye deşarj edilmeden önce atık su arıtma süreçleri sırasında değişmeden kalabilir veya kısmen veya tamamen dönüşüme uğrayabilir (Vimalkumar *et al.* 2019; Iacopetta *et al.* 2021).

TCC'nin ortaya çıkışı, akıbeti ve potansiyel riskleri

TCC'nin çevresel döngüsü, insanların kişisel bakım ürünlerini kullanımıyla başlar ve her türlü yaşam formunun alımıyla sona erer. AAT'ler, TCC'nin atık su ve biyokatı olarak ayrıldığı evsel atık su ile fabrika kanalizasyonunun birleşme noktası olup; her ikisi de dolaylı olarak TCC'nin gıda zincirlerine nihai girdisine katkıda bulunmaktadır (Yun H. *et al.* 2020).

Belediye atık su arıtma tesislerinde TCC'nin kaderi

AAT'lerde TCC'nin giderim verimliliği %11,4-97 arasında değişmektedir. TCC'nin yaklaşık %3'ü atık su ile boşaltılırken, yaklaşık %21'i bozunmuş ve %76-79'u kanalizasyon çamuru ile salınmış ancak katı fazdadır. DCC, 3,4-dikloroanilin (DCA) ve 4-kloroanilin (4CA) dahil olmak üzere az miktarda hidroliz ve indirgeyici deklorinasyon ürünleri tespit edilmiştir. Susuzlaştırılmış çamurda, TCC'nin çoğu absorbe edilmiş ve ABD ve Çin'den çamurlarda ortalama $12,6 \pm 3,8$ mg/kg tespit edilerek <3 ila 43,3 mg/kg kuru ağırlık arasında değişen konsantrasyonlarla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bu kalıcı kirleticinin aslında AAT'lerden sınırlı miktarda uzaklaştırıldığını ve TCC kütlesinin yaklaşık dörtte üçünün herhangi bir değişiklik olmadan geniş çapta salındığını göstermiştir (Halden and Paull 2005; Yun H. *et al.* 2020).

TCC'nin 1960'lı yıllara dayanan tortulardan tespit edildi ve o zamandan beri gündemde. Suda zayıf çözünürlüğü ve dirençliliği nedeniyle, ABD'deki Atık Su Arıtma Tesisi girişlerinde 84 ng/L ila 11,4 µg/L TCC tespit edilmiştir, bu veriler Kanada ve Çin kaynaklarında ölçülenlerden kat kat daha yüksektir (sırasıyla 14–270 ng/L ve 4,7–170,0 ng/L). Bu eşitsizliğin ABD'deki nispeten yüksek TCC tüketiminden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. AAT arıtmasının ardından ABD, Çin ve Kanada'dan gelen atık sularda maksimum kalıntılar sırasıyla 380, 227,7 ve 3,3 ng/L olmuştur. ABD'de atık su arıtma tesislerinin temizleme verimliliği nispeten yüksekti; Buna karşılık, Güney Afrika'daki atık su arıtma tesislerinin arıtma verimliliği düşüktü ve atık sularda hâlâ 1,89 µg/L kadar yüksek bir TCC vardı ve toplam giderme

verimliliği %40 civarındaydı ve TCC içeren atık sular ise doğrudan doğal su havzasına girebilirdi (Lehutso *et al.* 2017; Yun H. *et al.* 2020).

Su ortamlarında TCC'nin oluşumu

TCC, çoğu yüzey suyunda ve hatta içme suyunda 0,05-6,750 ng/L aralığında değişen konsantrasyonlarda, çoğunlukla Çin ve ABD'den alınan verilerle tespit edilmiş olup, Hindistan ve Güney Afrika gibi diğer ülkelerde tespit edilen maksimum konsantrasyonlar ise sırasıyla 1119 ve 360 ng/L idi. Dünya çapında yüzey sularında tespit edilen TCC'nin medyan değerleri 10-100 ng/L civarında değişmekte olup, musluk suyunda ve arıtılmış içme suyunda sırasıyla 51–347 ng/L ve 7,5–102 ng/L TCC izlenmiştir (Shen *et al.* 2012; Yun H. *et al.* 2020).

Çamur, biyokatılar, tortu ve toprakta TCC oluşumu

TCC'nin yüksek hidrofobikliği, atık su arıtma tesisi çamurunda veya biyokatılarda kilogram başına mikrogram ila miligram seviyesinde birikmesini kolaylaştırır, dolayısıyla arazi uygulamasıyla ortamlara yeniden dahil edilmesine yol açar. Amerika Birleşik Devletleri'nde, TCC konsantrasyonları ham çamurda 8,5-69,7 mg/kg ve biyokatılarda 6,05-24,6 mg/kg arasında değişmektedir. Güney Afrika'da, TCC ham çamurda 3.65-11.8 µg/kg ve biyokatılarda 2.59-8.23 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Avrupa'da, TCC sulu fazda nadiren rapor edilirken, katı fazda 1.2-343 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiştir.

Çin'de her yıl çamurla birlikte 42,2 tonun üzerinde TCC salınmaktaydı; Çin'in güney ve kuzey bölgelerinden alınan biyokatılarda ise 2,18 mg/kg ve 34,9 mg/kg kadar yüksek TCC rapor edilmiştir. Karşılaştırmalı olarak, çamur ve biyokatı maddelerde tespit edilen en yüksek TCC'ye ABD sahipken, Avrupa en düşük sırada yer almıştır (Shen *et al.* 2012; Yun H. *et al.* 2020).

TCC'nin biyodegradasyonu

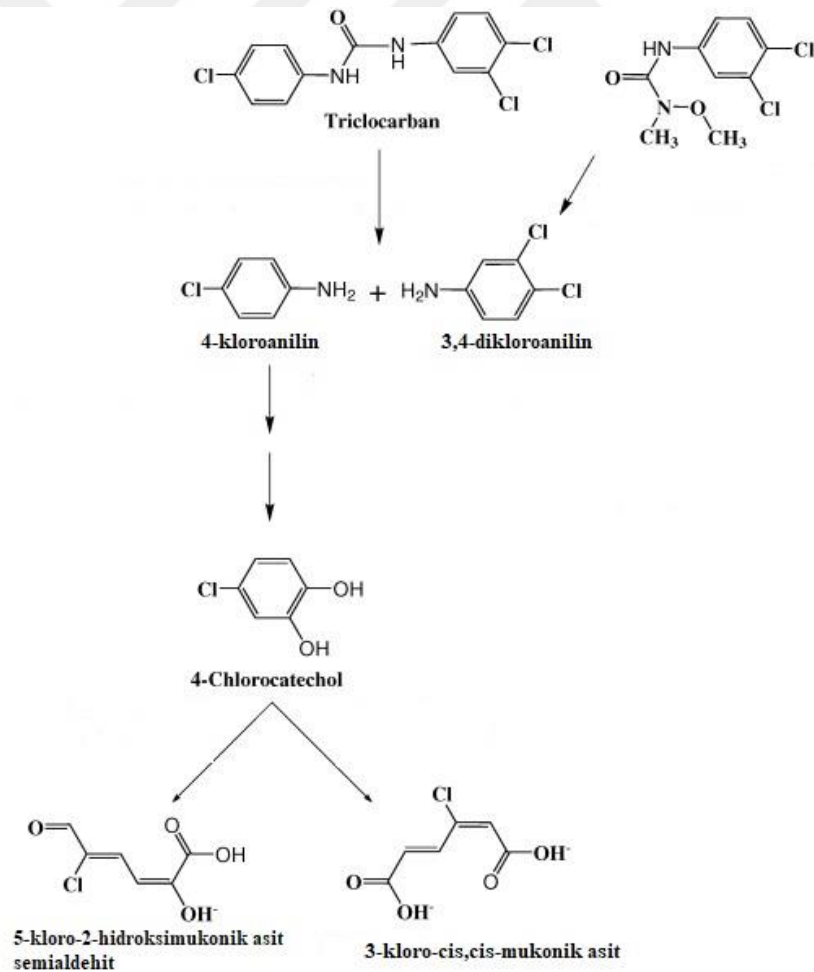
Kimyasal yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, TCC'nin biyolojik dönüşümü veya bozunması, özellikle mikroorganizmalar ile; nispeten yüksek verimlilik, maliyet etkinliği ve çevre dostu olma gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bu yaklaşımlar ile mikro kirleticiler, hafif koşullar altında spesifik metabolizma veya birlikte sindirim yoluyla dönüştürülebilir. Farklı mikroorganizma kaynakları ise anaerobik veya aerobik koşullar altında farklı biyotransformasyon kabiliyetlerine sahiptir. (Yun H. *et al.* 2020).

TCC'nin toprak mikroorganizmaları tarafından biyolojik olarak parçalanması makul bir uzaklaştırma mekanizmasıdır. TCC'yi parçalayan izolatlar elde edilmiş olmasına rağmen, bu mikroorganizmaların tarım topraklarında mevcut olup olmadığı ve/veya aktif olup olmadığı genel olarak bilinmemektedir. TCC biyolojik parçalanmasıyla ilişkili bakteriler arasında;

Alcaligenaceae, *Sphingomonas* sp. YL-JM2C suşu, *Ochrobactrum* sp. TCC-1, *Ochrobactrum* sp. MC22, *Ochrobactrum* sp. TCC-2 ve *Pseudomonas fluorescens* MC46 sayılabilir (Mulla *et al.* 2016; Thelusmond *et al.* 2018).

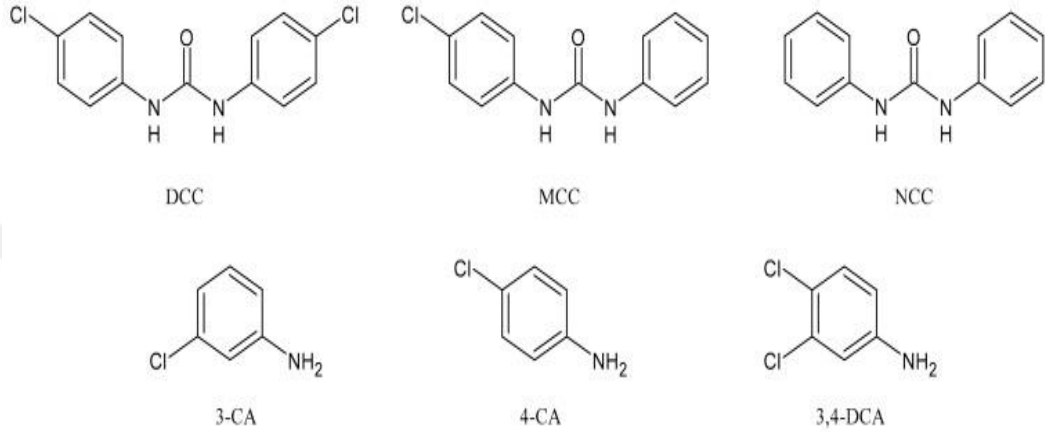
TCC'nin metabolizması ve dönüşüm ürünleri

TCC içeren ürünler cilde uygulandıktan sonra insan vücuduna girebilir, metabolize edilebilir ve insan sağlığı için potansiyel bir risk oluşturabilir, insan kanında 0,45 ng/mL ve idrarda ise 3,85 ng/mL tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalar, insanların banyo sırasında ve sonrasında sabundaki TCC'nin önemli bir kısmını deri yoluyla emdiğini göstermiştir. İnsanlarda, TCC metabolitlerinin idrarla atılımına dayanarak TCC'nin %0,6'sının (yaklaşık 70 µg) emilebileceği tahmin edilmektedir. TCC ayrıca külot astarlarında, tamponlarda ve hijyenik pedlerde da mevcuttur, ancak aktarım oranları bilinmemektedir. TCC maruziyeti ayrıca su veya yiyecek tüketimi yoluyla da meydana gelebilir, anne ve göbek kordonu serumlarında ise sırasıyla 2,75 ve 0,82 µg/L değerlerine ulaştığı rapor edilmiştir. TCC, faz I ve faz II metabolizmasına uğrayabilir. (Costa *et al.* 2020; Iacopetta *et al.* 2021).



Şekil 2. Önceki çalışmalara dayanan TCC biyodegradasyon yolu (Miller *et al.* 2010).

TCC klorsuzlaştırma reaksiyonları, 4,4'-diklorokarbanilid (DCC), karbanilid (NCC) ve 1-(3-klorofenil)-3-fenilüre (MCC) dahil olmak üzere karbanilidlere veya biyolojik veya biyolojik olmayan olarak 4- kloroanilin (4-CA) oluşumuna yol açar. İlk kez nehir ağızı sedimanlarında TCC'nin indirgeyici klorsuzlaşmasının meydana geldiği ileri sürülmüş, ancak TCC klorsuzlaştırmanın tortu ortamıyla sınırlı olup olmadığı veya AAT'lerin klorsuzlaştırma yoluyla TCC kirliliğinin azaltılmasına da katkıda bulunup bulunmadığı hususları açık değildir. (Pycke *et al.* 2014; Iacopetta *et al.* 2021).



Şekil 3. Triklorokarbanin klorsuz dönüşüm ürünleri.

Antimikrobiyal TCC atık su ve çamur arıtma proseslerinde çeşitli biyotik ve abiyotik yollarla kısmen veya tamamen çeşitli dönüşüm ürünlerine dönüştürülebilmektedir. İndirgeyici klorsuzlaştırma, anoksik ve anaerobik koşullar altında TCC'nin azaltılmış klor içeriğine sahip türdeşlere biyotransformasyonu için önemli bir zayıflatma mekanizması olarak bilinir. Çekirdek karbanilid yapısının detoksifikasyon reaksiyonları yoluyla biyolojik olarak parçalanmaya uygun olabilmesi için TCC'nin indirgeyici klorsuzlaştırmaya tabi tutulması gerekir. Tri-klorlu TCC ve bunun tetra-klorlu üretim yan ürünü (4-Cl-TCC) ilk olarak diklorokarbanilide dönüştürülür. DCC daha sonra monoklorokarbanilide (MCC), ardından klorsuz karbanilide (NCC) diklorlama işlemine tabi tutulabilir. Öte yandan, TCC'nin saf bakteri tarafından parçalanmasının mekanizması Mulla ve ark. tarafından incelenmiştir (2016). *Sphingomonas sp.*'nin Çin'deki bir AAT'nin aktif çamurundan izole edilen YL-JM2C suşu, TCC'yi 3,4-dikloroanilin, 4-kloroanilin ve 4-klorokatekol gibi ana metabolitlerine ayırtmıştır (Mulla *et al.* 2016; Kor-Bicakci *et al.* 2020).

Bu çalışma ile, atık sudaki TCC'nin ortadan kaldırılması için yeni bir biyolojik bozunma yöntemi geliştirmek amaçlanmakta olup, TCC'yi bozan küflerin belediye atık çamurundan izole edilmesini ve tanımlanmasını içermektedir. İzole edilen küf suşu, 18S rRNA gen dizi analizi ile tanımlandı. Deneysel koşullar, TCC bozunmasını arttırmak ve küf büyümesini

kolaylaştırmak için optimize edildi. Çalışma aynı zamanda TCC'nin ara maddelere dönüşümünün ve olası biyodegradasyon yollarının tanımlanmasını da içermektedir. TCC'nin bozulmasında rol oynayan enzimler de araştırılmıştır. Bu alışma, atık suyun TCC'den arıtılmasında yeni bir biyodegradasyon yönteminin potansiyelini ortaya koymaktadır.



MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları

Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:

Etüv	Binder
UV-Spektrofotometre	Beckman Coulter
Mikropipet takımı	Eppendorf
Buzdolabı	Vestel
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC135-90
PH metre	Mettler-Toledo
PCR cihazı	Sensoquest Labcycler
Mikroskop	BOECO
Otoklav	HMC Hirayama
Steril kabin	Telstar Bio-II-A
Elektroforez tankı	Biorad -dikey
Santrifüj	Hettich
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Magnetik karıştırıcı	Heidolph
Vorteks	Wisemix VM-10
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY 2102C
Saf su cihazı	MP Minipure
Çoklu blok ısıtıcısı	Lab-Line

Su banyosu	Grant 6G)
------------	-----------

Kullanılan kimyasal maddeler

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler:

Triklokarban (TCC) (3,4,4-Trichlorocarbaniide) (%98)	Trade TCI Mark, Japan
Patates dekstroz agar	Sigma
Distile su	Thermo
MgSO₄·7H₂O	Sigma
MnSO₄	Sigma
FeSO₄	Sigma
MgSO₄	Sigma
MnSO₄.H₂O	Sigma
dNTP	Sigma
NaCl	Sigma
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
KH₂PO₄	Sigma
Etil alkol	Sigma
EDTA	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
CuSO₄	Sigma
ZnSO₄	Sigma
Maya ekstraktı	Merck

Metanol	İso-Lab Chemicals
ABTS	Sigma
Fenol red	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
NaOH	Sigma
Etanol	İso-Lab Chemicals
N,O-Bis(Trimethylsilyl)- Trifluoroacetamide(BSTFA)	Sigma
Küf genomik DNA izolasyon kiti	Bio basic
Sodyum tartarat	Thermo

Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

Triklokarban bozunma çalışmaları için kullanılan mineral tuz ortamı (MSM): Mineral tuz ortamı (MSM): mono-potasyum fosfat (KH_2PO_4 , 1 g/L), sodyum hidrojen karbonat (NaHCO_3 , 0,03 g/L), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L), magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L), amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L), 3 mL/L mikro besin çözeltisi [(çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L), manganez (II) klorür tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L), demir sülfat (FeSO_4 , 0,005 mg/L) ve bakır (II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L)]'dan oluşmaktadır. MSM ortamının pH'sı (1 M NaOH veya 1 M H_2SO_4 kullanılarak) 5-7'ye ayarlandı ve besiyerleri kullanılmadan önce 121 °C'de 30 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edildi. (Silambarasan and Vangnai 2016; Yun H. *et al.* 2017b; Sipahutar and Vangnai 2017; Balakrishnan and Mohan, 2021).

%1'lik agaroz jel: 0,9 g agaroz 90 ml 1X TAE'de çözdürüldü ve 2 µl etidyum bromür eklendi.

1X Tris Asetat EDTA (TAE) tamponu: 10X TAE'den 100 ml alındı, üzerine 900ml distile su eklendi.

%70'lik EtOH: EtOH'den 70 ml alındı, üzerine 30 mL distile su ilave edilerek hazırlandı.

Yöntem

Numune alınması ve triklokarbamı degrade edebilen mikroorganizmaların izolasyonu

- ▶ Öncelikle; Erzurum ilindeki Belediye Atıksu Arıtma Tesisinden aktif çamur numunesi alındı.
- ▶ Atık organik maddeleri (karbon kaynakları) uzaklaştırmak için 24 saat havalandırıldı. Havalandırma işleminden sonra; aktif çamur numuneleri (10'ar ml); önceden hazırlanan 100 ml MSM'ye (mineral tuz ortamı, pH:7) aktarıldı. Elde edilen 100'er ml'lik kültür ortamlarına karbon ve enerji kaynağı olarakta 10 mg/L'lik nihai konsantrasyon ile triklokarban eklendi.
- ▶ Erlenmayerler, daha sonra karanlık koşullar altında 9 gün boyunca 30°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürden alınan örnekler, PDA'ya ekildi ve 6 gün boyunca 30°C'de inkübe edildi. Bu katı besiyerleri üzerinde gelişen mikroorganizmalar alt kültüre alınarak saflaştırıldı. (Mulla *et al.* 2016; Sipahutar and Vangnai 2017; Yun H. *et al.* 2017b)



Şekil 4. Erzurum belediyesi atıksu arıtma tesisi



Şekil 5. Erzurum ilindeki belediye atık su arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi

TCC parçalayan küflerin karşılaştırılması

Bu aşamada izole edilen küfler TCC parçalama yetenekleri açısından birbiri ile kıyaslandı. Çalışmalar 100 mL mineral tuz ortamı (MSM, pH: 7) içeren 250 mL'lik erlenmayerlerde gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak izole edilmiş küfler PDA'ya ekildi, ardından PDA petrilerinde büyüyen miselden 1x1 cm ölçülerinde bir parça alıp MSM ortamına ekildi (Bu aşamada TCC tek karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldı ve böylece küf izolatlarının TCC'ye yönelerek onu parçalaması amaçlandı). Erlenmayer şişeleri, 30°C'de, karanlık koşullarda çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi ve 9 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

Biyolojik bozunma işlemi ve inkübasyon işlemi ardından, tüm örnekler, 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantları kullanarak; manganez peroksidaz (MnP) ve lakkaz (LAC) enzim aktivitesi, kuru biyokütle ağırlık ölçümü ve HPLC ile TCC degradasyon yüzdesi analizleri yapıldı. MnP enzim aktivitesi; fenol kırmızısının oksidasyonu ile, LAC enzim aktivitesi ise ABTS substratının oksidasyonu ile belirlendi (enzim aktiviteleri ve HPLC işlemleri sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak anlatıldı). (Wang et al., 2018; Thelusmond et al., 2019; Balakrishnan & Mohan, 2021). Analiz sonucunda elde edilen enzim aktiviteleri, biyokütle ağırlığı ve TCC degradasyon yüzdesi oranları karşılaştırılarak, kullanılan TCC'yi en iyi şekilde degrade edebilen suş seçildi ve çalışmanın sonraki aşamalarında kullanıldı.

TCC'yi yüksek verimle degrade edebilen izolatın tanınması

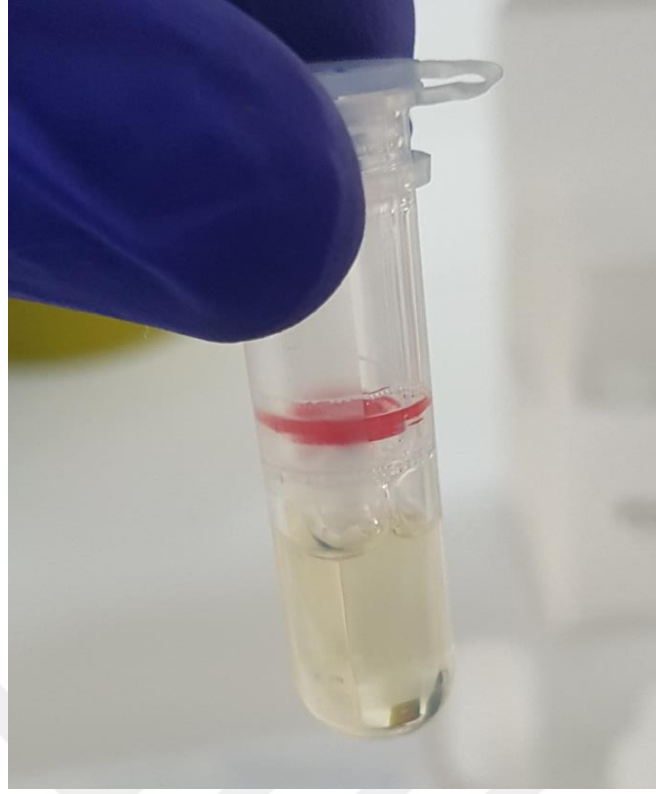
TCC'de en iyi biyobozunmayı ve hücre büyüme kabiliyetini gösteren küf türünün tanınması, 18S rRNA dizisi kullanılarak yapıldı. ZA10'un moleküler incelemesi ve filogenetik analizleri, ITS ribozomal geninin amplifikasyonu ve dizi analizi temel alınarak gerçekleştirildi.

Seçilen ZA10 kodlu küf izolatından DNA izolasyonu:

ZA10 kodlu küf izolatının genomik DNA'sı, Küf Genomik DNA İzolasyon Kiti (BIO BASIC) kullanılarak ekstrakte edildi. Bahsedilen kit protokolü aşağıda verilmiştir.

Protokol:

1. Sıvı azotta 3 ml küf kültürünün santrifüj edilmesinden elde edilen 400 mg spor veya hücre peletlerini bir havanda öğütüldü. Öğütülmüş numuneyi temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Universal Digestion'ı 65 ° C'de önceden ısıtıldı. Numuneye 400 µl Universal Digestion eklendi. Tüpü 5 defadan fazla ters çevirerek iyice karıştırıldı.
3. Ara sıra karıştırarak 65 ° C'de 20 dakika inkübe edildi.
4. 200 µl Universal Buffer PF eklendi. Tüpü birkaç kez ters çevirerek hafifçe karıştırın. 5 dakika boyunca -20°C'de inkübe edildi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantı yeni ve temiz bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
6. Süpernatant üzerine 0,2 ml kloroform eklendi, 10 kez ters çevirerek iyice karıştırıldı. 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı dikkatlice temiz bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
7. Çözeltiye eşit hacimde izopropanol (yaklaşık 0,4 ml) eklendi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2,5 dakika inkübe edildi. 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edip, süpernatantı dikkatlice atıldı.
8. Tüpe önceden soğutulmuş %75'lik etanolden 1 ml eklendi, 10 kez ters çevirerek iyice karıştırıp. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj ederek, süpernatantı atıldı.
9. Basamak 8 tekrarlandı.
10. Pelet oda sıcaklığında kapağı açık olarak 25 dakika boyunca havayla kurutuldu.
11. DNA peletini çözmek için 100 µl TE tamponu eklendi. DNA'yı tamamen çözmek için yukarı ve aşağı karıştırıldı. Saflaştırılmış DNA kullanıma hazır hale geldi. Uzun süreli saklama için DNA'yı -20 ° C'de saklandı.



Şekil 6. DNA izolasyonu

PCR işlemi

İzolattan elde edilen DNA, primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı. PCR, primerler ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan PCR karışımı tabloda 4'te ve PCR parametreleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan PCR karışımı

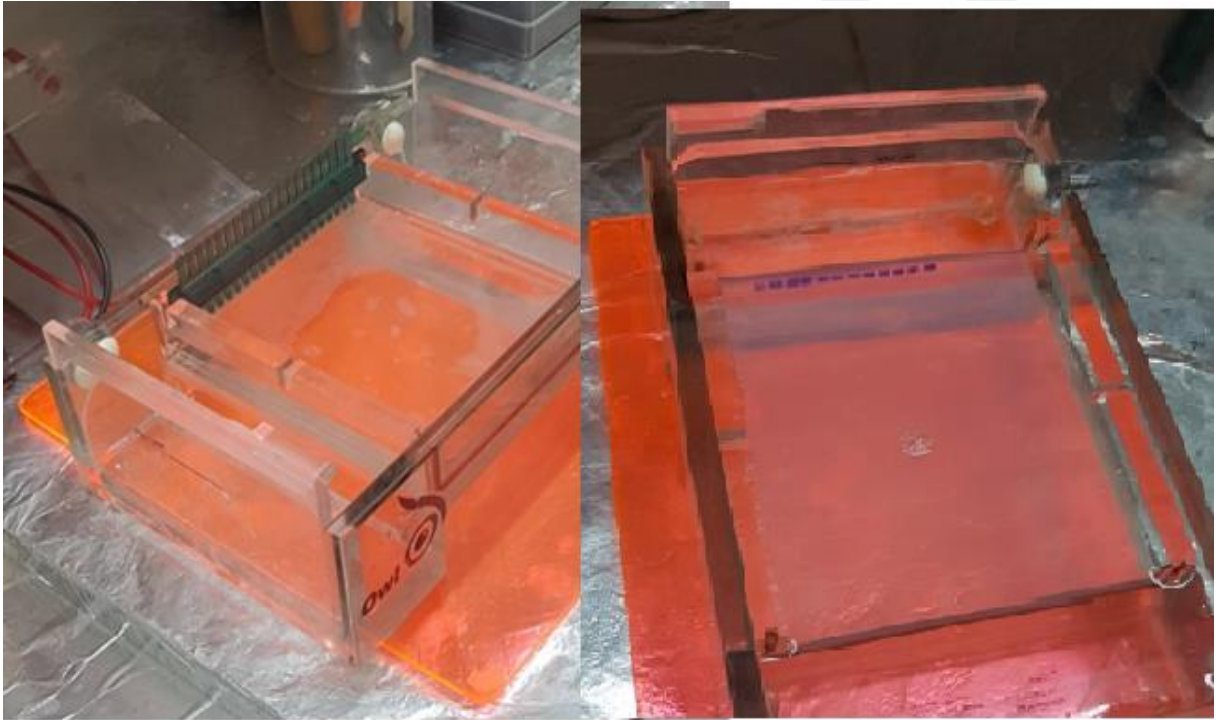
Reaktifler (konsantrasyon)	MİKTAR (µl)
PCR buffer 10X	3
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dNTP (10 mM)	0,6
Primer R (10 p/Mol)	2,5
Primer F (10 p/Mol)	2,5
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,3
Distile su	12,1
DMSO %99	1,2
DNA (100 ng/µl)	5

Tablo 6. PCR parametreleri

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön denatürasyon	95	4	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	53	1	36
Uzama	72	2	36
Son uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	-

PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforez işlemi için 1X TAE kullanılarak %1'lik agaroz jeli hazırlandı. Hazırlanan agaroz jeli donması için elektroforez tankına döküldü ve tarakları yerleştirildi. Jel tamamen donduktan sonra tarak çıkarıldı ve ilk kuyucuğa 10 kb'lık DNA markırından (4µl), diğer kuyucuklara PCR örneklerinden 4 µl + 1 µl 6X yükleme tamponu yüklendi. Jel elektroforezi 90 Volt, 60 dk yapıldı. Sonrasında Quantum Vilber Lournat cihazı ile görüntüledi ve DNA bantları analiz edildi.



Şekil 7. Elektroforez işlemi

Klonlama

Kompetent hücrenin hazırlanması

Escherichia coli JM101 suşu stoktan alınarak canlandırıldı, ardından geliştirilen kültürden tek bir koloni alıp, LB besiyerine aktarıldı ve 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 1 gece inkübe edildi.

Hazırlanan kültürden alınması gereken miktar aşağıda yazılan formül ile hesaplandı;

$$(30 \times 0,1) / (\text{Absorbans Değeri} \times 10)$$

(30 hazırlanacak miktar (ml), 0,1 sabit değer, 10 seyreltme faktörünü temsil etmektedir)

Hesaplamaadan elde edilen değer kadar 30 ml LB broth üzerine kültür eklenildi ve OD (600 nm’de) değerleri 0,4-0,5’e ulaşılmaya kadar kültür 37°C’de 60-90 dk inkübe edildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan kültür 4 °C’de 4400 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 100 mM CaCl₂ çözeltisinden 10 ml eklendi. Sonrasında 30-45 dk buzda bekletildi. Ardından 4400 rpm 10 dk 4°C’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelti üzerine soğuk 2 ml 100 mM CaCl₂’den eklendi buzdolabında 1 gece bekletildi.

Ligasyon işlemi

0,2 ml’lik tüplerde hazırlanan ligasyon karışımı (5 µl 2X ligasyon tamponu, 3 µl PCR ürünü, 1 µl vektör, 1 µl T4 DNA ligaz) 16°C’de 13-15 saat inkübe edildi.

Transformasyon işlemi

Önceden hazırlanan kompetent hücrelerden ependorf tüpüne 200 µl konuldu, üzerine 5 µl ligasyon ürünü eklendi ve 30 dk boyunca buzda bekletildi. Ardından 42°C’ye ayarlanmış su banyosunda 2 dk bekletilerek ısı şokuna uğratıldı. Ardından ependorf tüplere 900 µl LB besiyeri eklendi ve 1 saat 40 dk süre ile 37°C’de bekletildi. Amfisilin bulunan katı besiyerlerine 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG eklendi. Ligasyon ürünü ve kompetent hücre karışımının 150 µl alınarak petrilere ekim yapıldı ve drigalski yardımı ile petriye iyice yayıldı. Petriler, 37°C’de yaklaşık 14 saat boyunca inkübe edildi.

Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım

14 saatlik inkübasyonun ardından petrilere mavi ve beyaz kolonilerin gelişmesi gözlemlendi. Beyaz ve mavi koloniler içerisinden, beyaz olanlar seçildi ve bir pipet ile alınıp, içinde 3 ml amfisilinli LB broth bulunan tüplere aktarıldı ve bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR ve koloni PCR işlemi

Amfisilinli LB broth besiyerinde geliştirilen kültür içerisinde 4 µl alındı ve içerisinde 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı. tüpler 10 dk kaynayan su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve 2 dk buz üzerinde bekletilerek ısı şokuna uğratıldı, daha sonra 5 dk 12000 rpm'de santrifüj edildi. süpernatant kısım yeni tüplere alındı ve PCR işlemine geçildi. Kullanılan koloni PCR karışımı tabloda 7'de ve koloni PCR parametreleri tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 7. Koloni PCR'da kullanılan PCR karışımı

Reaktifler	MİKTAR (µl)
Süpernatant	3
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dNTP	0,6
MgCl ₂ 'li tampon	3
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
Distile su	16,1
DMSO	1,2
DNA (100 ng/µl)	5
T7 Primer: 5'-AATACGACTCACTATAG-3'	
SP6 Primer: 5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'	

Tablo 8. Koloni PCR parametreleri

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
Ön denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	-

PCR işleminden sonra %1'lik agaroz jele istenen genin bulunduğu pozitif kontrol, istenen genin bulunmadığı negatif kontrol, markır ve PCR ürünü yüklendi. 90 voltta 1 saat yürütüldü. jel

görüntüleme sistemi ile bantlar görüntülendi. İstenilen aralıkta bant veren koloniler belirlendi ve plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth sıvı besiyerine inoküle işlemi gerçekleştirildi.

Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanılarak izolasyon gerçekleştirildi. Bunun için; 4 ml amfisilinli LB broth da geliştirilen kültürler, 12000 rpm'de 10 dk üre ile santrifüj edildi ve ardından süpernatant uzaklaştırıldı, kalan pelletin üzerine, 250 µl cell resuspension solüsyon eklendi ve pipetlenerek homojenize hale getirildi. üzerine 250 µl cell lysis solution ekleyerek, karışım alt üst edildi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma 10 µl alkaline protease solüsyonu ilave ederek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. ardından 350 µl Neutralization Solution ilave edildi. Alt-üst edilerek iyice karıştırıldı. 12,000-14,000 rpm'de oda sıcaklığında 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. 650–750 µl Süpernatanttan alınarak, içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı. 1dk. 12,000-14,000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt kısma geçen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 750µl wash solution eklendi ve 1 dk boyunca oda sıcaklığında 12,000- 14,000 rpm'de santrifüj işlemi uygulandı. Tekrardan 250µl etanol ilave edilmiş wash solution eklendi ve yeniden 2 dk. boyunca oda sıcaklığında 12,000-14,000 rpm'de santrifüj edildi ve alta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Ardından 1dk. boyunca 12,000-14,000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi. Kolon yeni bir tüpün içerisine alındı ve üzerine 100 µl Nuclease-free water eklendi, 1dk. 12,000-14,000 rpm'de santrifüj edildi. kolon çıkarıldı ve uzaklaştırıldı. sonra ölçüm yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Plazmitlerin kontrol edilmesi

Plazmitler EcoRI ile kesildi (7 µl plazmit, 2 µl 5X tampon, 0,5 µl enzim ve 0,5 µl su ile 37°C'de 3–12 saat) ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

998 µl saf su ve 2 µl plazmit karışımı spektrofotometrede OD260 ile ölçüldü. $A_{260} \times 50$ (sabit) $\times 500$ (dilüsyon oranı) denklemi kullanılarak hesap yapıldı ve çıkan sonucun 100 – 200 ng aralığında olduğu teyit edildi. Son olarak 30 – 50 µl uygun konsantrasyondaki plazmit sekans analizi için MacroGen firmasına gönderildi.

DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi ve değerlendirilmesi

MacroGen firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak analiz edildi. Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin blast çalışması

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri

kullanılarak yapıldı ve % benzerlik oranları belirlendi. Elde edilen sonuçlar baz alınarak, bilgileri Genbank'a girildi.

Optimal koşullar ve triklokarban degradasyonu

Seçilen küf izolatının TCC parçalama verimini arttırmak için çeşitli ortam koşulları (sıcaklık (25, 30 ve 37 °C), pH (4-5-6 ve 7), TCC konsantrasyonu (5, 10 ve 30 mg/L) ve inkübasyon süresi (3-9 gün) optimize edildi. TCC degradasyon deneyleri 250 ml'lik erlenmayerlerde hazırlanan 100 ml'lik numunelerde MnP ve LAC enzim aktiviteleri ölçülerek belirlendi ve biyokütle ağırlığı ölçüldü. (Balakrishnan and Mohan 2021; Li *et al.* 2022).

Optimizasyon parametreleri tek değişkenli olarak yürütüldü ve sırayla sıcaklık, pH, TCC konsantrasyonu, inkübasyon süresi parametrelerinin degradasyon üzerindeki etkisi araştırıldı. Denenen ortam şartlarında inkübe edilen tüm örnekler, 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar; manganez peroksidaz (MnP) ve lakkaz (LAC) enzim aktivitelerini ölçmek için kullanıldı. MnP enzim aktivitesi, fenol kırmızısının oksidasyonu ile; LAC enzim aktivitesi ise ABTS substratının oksidasyonu ile belirlendi. Elde edilen enzim aktivite sonuçları ile optimizasyon koşulları belirlendi. (Tian *et al.* 2018; Mallak *et al.* 2020; Balakrishnan and Mohan, 2021;).

Lakkaz enzim aktivitesi oksidasyon (3.ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) ile belirlendi. Reaksiyon karışımı 0,5 mM ABTS, 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 5 ve 50 µL enzim içeriyordu. Absorbans 420 nm'de okundu.

Manganez peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak test edildi. Reaksiyon karışımı, 0,1mL 0,25 M sodyum laktat, 0,05 mL 2 mM MnSO₄, 0,2 mL %0,5 sığır serum albümin, 0,1 mL %0,1 fenol kırmızısı, 0,5 mL enzim ve 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH 8.0) içinde 0,05 mL 2 mM H₂O₂ içeriyordu. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve reaksiyon 0,04 mL NaOH 2N ile sonlandırıldı. Absorbans 610 nm'de okundu (Tian *et al.* 2018; Mallak *et al.* 2020; Balakrishnan and Mohan, 2021) .

Enzim aktiviteleri aşağıdaki formülle hesaplandı (Baltierra-Trejo *et al.* 2015)

$$U/L = \frac{(\Delta A)(Vt)(Df)10^3}{(t)(\epsilon)(d)(Vs)}$$

U: Enzim aktivitesi (µmol dk⁻¹ L⁻¹).

ΔA: Son absorbans – ilk absorbans.

Vt: Reaksiyonun toplam hacmi (mL).

t: Reaksiyon süresi (dak).

ϵ : Molar yok olma katsayısı ($M^{-1} cm^{-1}$ veya $L mol^{-1} cm^{-1}$).

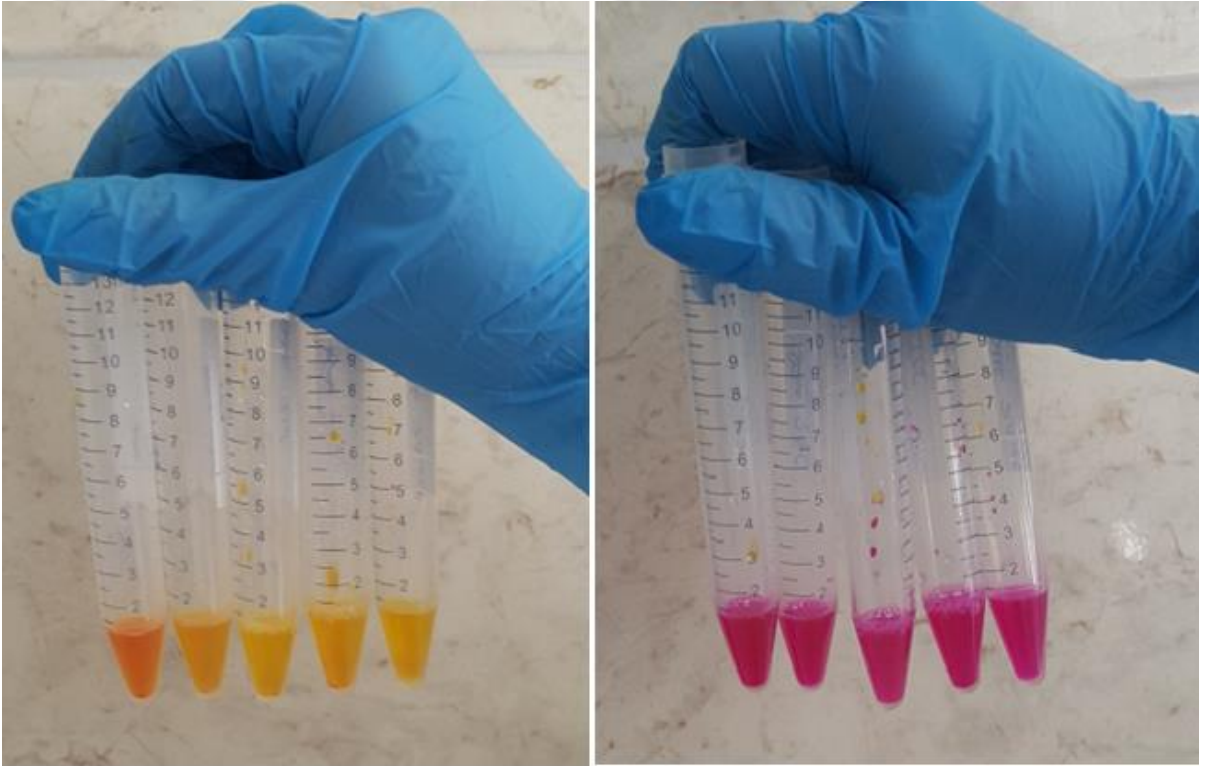
D: Optik yol (1 cm).

Vs: Örnek hacmi (mL).

Df: Seyreltme faktörü.

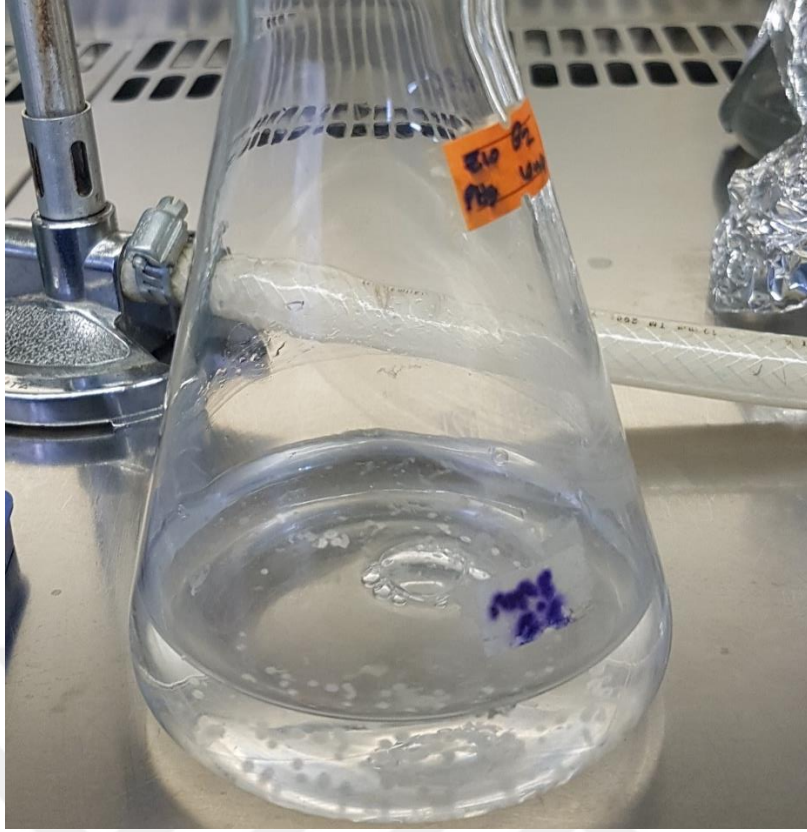
10^3 : Düzeltme faktörü ($\mu mol mol^{-1}$)

Aktivite U/L cinsinden ifade edildi. Bir aktivite birimi, dakikada 1 μmol substratı oksitlemek için gereken enzim miktarı olarak tanımlandı.



Şekil 8. Enzim aktivitesi ölçümü yapılırken renk değişikliği

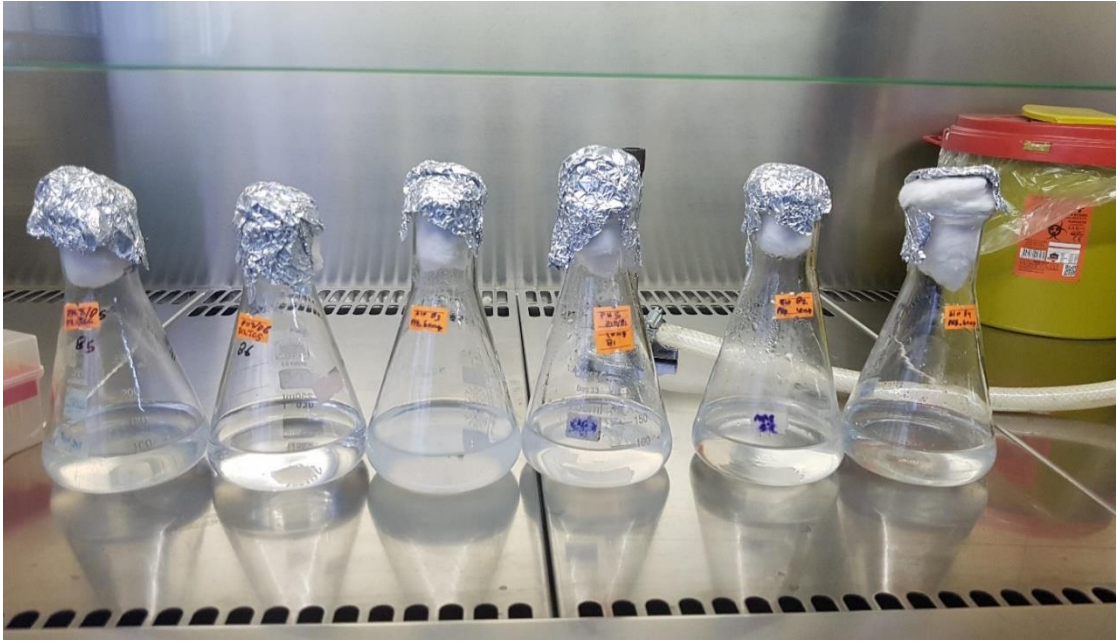
Biyokütle ağırlığı 4.-9. günlerde periyodik olarak izlendi, bu günlerde besiyer ortamı ve küfleri ayırmak için filtre kağıdı kullanıldı ve süzüldü. Küflerin kuru ağırlığı 90 °C'de 12 saat boyunca sabit bir ağırlıkta tutulduktan sonra ölçüldü (Tian *et al.* 2018).



Şekil 9. Biyokütle ağırlığı ölçümü için hazırlanan besiyeri.

Optimal sıcaklık belirlenmesi

Sıcaklığın küf izolatının büyüme ve bozunma potansiyeli üzerindeki etkisini araştırmak için, 250 mL'lik erlenmeyer şişelerindeki 100 mL MSM ortamı 10 mg/L TCC ile zenginleştirildi, MSM ortamına küf izolatı ekildi. 25-30-37°C' sıcaklıklarda karanlık ve çalkalamalı ortam koşullarında (150 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen süpernatantta Lakkaz ve manganez peroksidaz enzim aktivitesine bakıldı, ardından küflerin biyokütle ağırlığı ölçüldü.



Şekil 10. Farklı sıcaklıklarda inkübasyon için hazırlanan örnekler

Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi

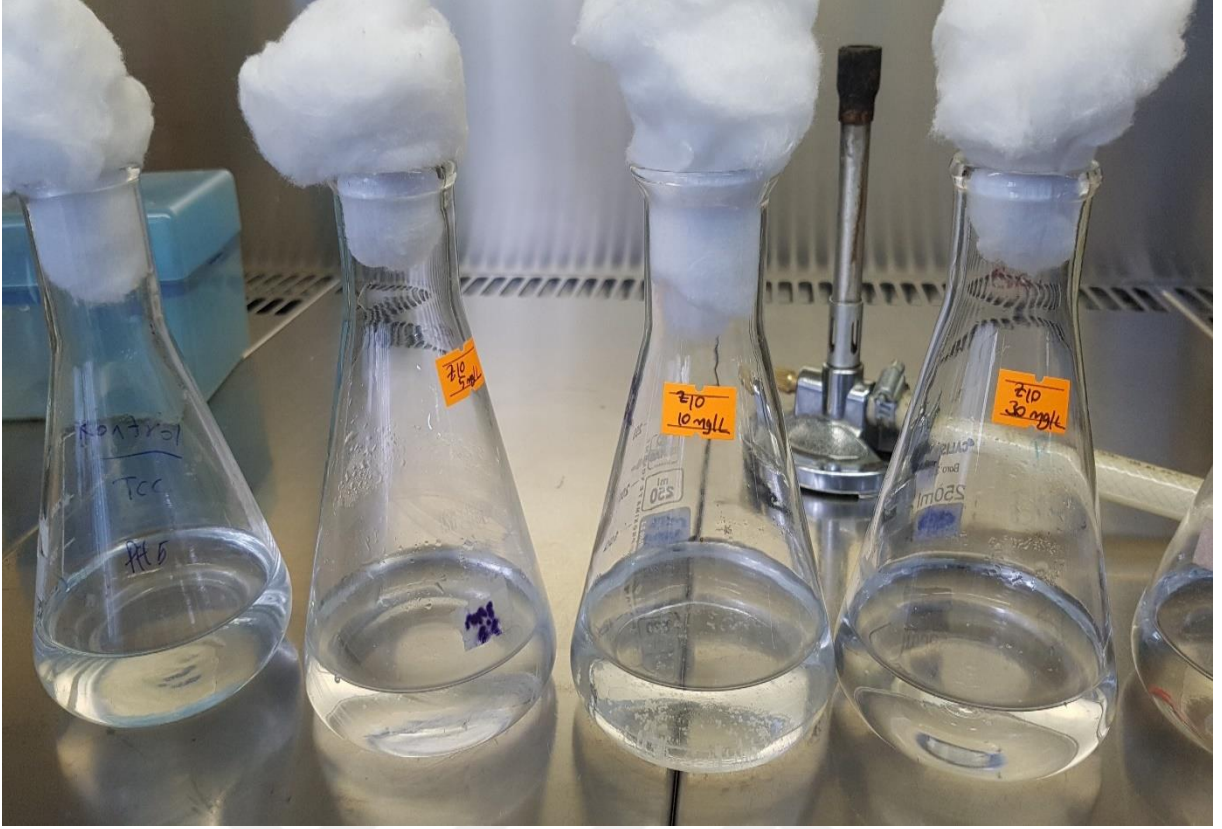
pH konsantrasyonlarının küf izolatin büyüme ve bozunma potansiyeli üzerindeki etkisini analiz etmek için, 250 mL'lik erlenmayer şişelerindeki 100 mL MSM ortamı, TCC (10 mg/L) ile zenginleştirildi, MSM ortamına küf izolatu inoküle edildi (PDA petrilerinde büyüyen miselden 1x1 cm ölçülerinde bir parça kesilerek alındı ve MSM ortamına ekildi). Hazırlanan örnekler aynı anda farklı pH'lara (4-5-6-7) ile ayarlandı, 30 °C'de karanlık ve çalkalamalı koşullarda (150 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen süpernatantta lakkaz ve manganez peroksidaz enzim aktivitesi bakıldı, ardından küflerin biyokütle ağırlığı ölçüldü.



Şekil 11. TCC varlığında farklı pH 4-5-6-7 konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler

Optimal triklokarban konsantrasyonunun belirlenmesi

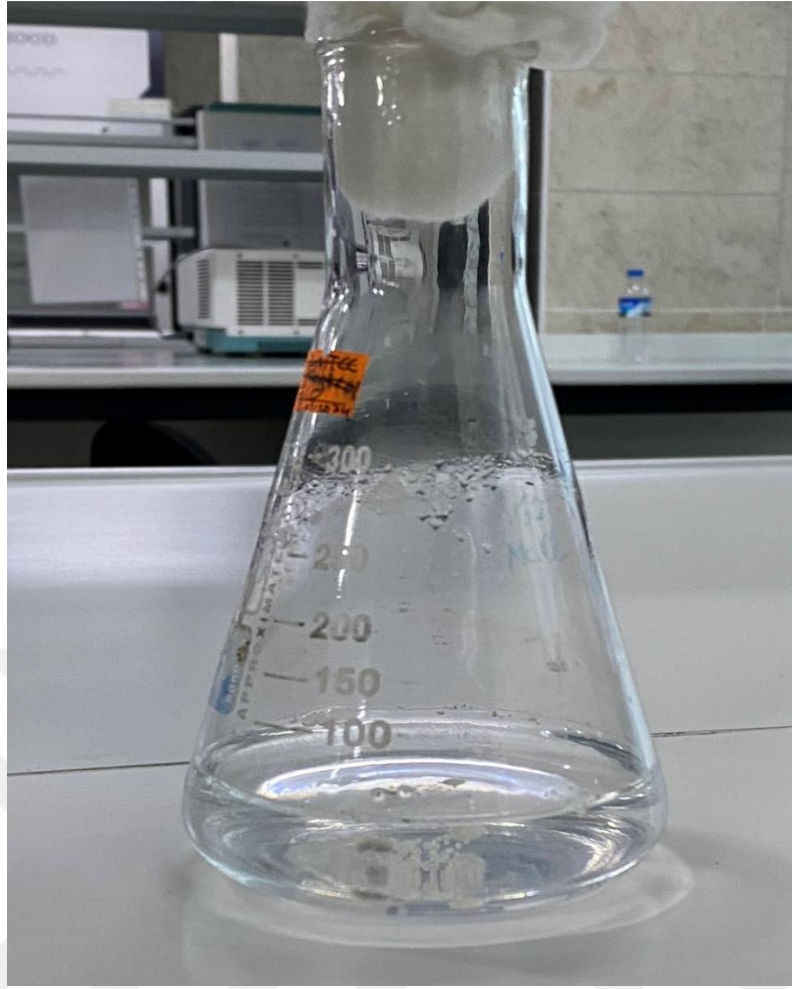
TCC konsantrasyonlarının küf izolatin büyüme ve bozunma potansiyeli üzerindeki etkisini analiz etmek için, 250 mL'lik erlenmayer şişelerindeki 100 mL MSM ortamı farklı TCC konsantrasyonlarda (5-10-30 mg/L) ayarlandı. MSM ortamına küf izolatu ekildi, 30°C'de karanlık ve çalkalamalı koşullarda (150 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen süpernatantta lakkaz ve manganez peroksidaz enzim aktivitesine bakıldı, ardından küflerin biyokütle ağırlığı ölçüldü.



Şekil 12. Farklı TCC konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler

Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

İnkübasyon süresinin küf izolatın büyüme ve bozunma potansiyeli üzerindeki etkisini analiz etmek için, 250 mL'lik erlenmayer şişesindeki 100 mL MSM ortamı 10 mg/L TCC ile zenginleştirildi, MSM ortamına küf izolatı ekildi. 30°C'de karanlık ve çalkalamalı koşullarında (150 rpm) inkübe edildi. 3, 4, 5, 6 ve 7. günlük inkübasyon süreleri ardından elde edilen süpernatantlarda, HPLC ile degradasyon yüzdesi belirlendi, lakkaz ve manganez peroksidaz enzim aktivitesi periyodik olarak izlendi ve küflerin biyokütle ağırlığı ölçüldü.



Şekil 13. Farklı inkübasyon sürelerinde ölçülmek için hazırlanan numune

Analitik yöntemler

Triklokarban'ın degradasyonu

Örnekler düzenli aralıklarla toplandı ve 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlendi. Kültürde kalan TCC eşit hacimde etil asetat ile ekstrakte edildi ve organik fazlar karıştırıldı. Ardından, susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra, organik fazlar 100 mL'lik düz tabanlı bir şişede döner buharlaştırıcı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Konsantre TCC kalıntıları 2 mL aseton içinde çözüldü. Numuneler HPLC ile analiz edildi (Yun H. *et al.* 2017b; Li *et al.* 2022). Tüm numuneler HPLC ile C18 kolonlu (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül boyutu). Mobil faz: su ve asetonitril (40:60) idi. HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) gerçekleştirildi. Triklokarban biyodegradasyon yüzdesi alttaki denklemi kullanılarak hesaplandı (Kor-Bicakci *et al.* 2020).

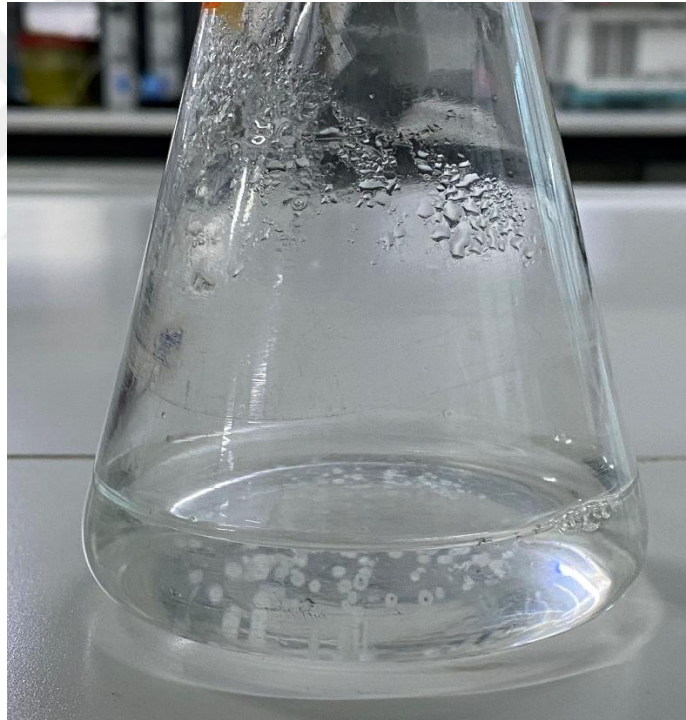
$$\text{Degradasyon yüzdesi} = \left(\frac{C_0 - C_1}{C_0} \right) \times 100$$

C₀; başlangıç triklokarban konsantrasyonudur (mg/L),

C1; nihai triklokarban konsantrasyonudur (mg/L).

Metabolitlerin tanımlanması

Seçilen ZA10 suşu; belirlenen optimal koşullarda hazırlanmış 100 mL'lik MSM besiyeri içerisinde geliştirildi. Küf kültürü örnekleri (100 mL) düzenli aralıklarla toplandı ve 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlendi. Kültür süpernatantı 1 M H₂SO₄ kullanılarak pH 2.0'a ayarlandı, numuneler etil asetat (1:1, v/v) ile 150 rpm'de 6 saat süreyle ekstrakte edildi. Toplanan organik tabaka susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu. Kalıntılar metanol (HPLC Sınıfı) içinde çözüldü ve daha sonra 50°C'de 1 saat inkübe edilerek BSTFA (20 µl) ile türevlendirildi. Numunelerde parçalanmış toksik madde tayini ve dönüşüm ürünleri Gaz kromatografisi (GC)-kütle spektrometresi (MS) ile analiz edildi. (Mulla *et al.* 2016). GC-MS analizi (GCMS-QP2010 Ultra), Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) gerçekleştirildi.



Şekil 14. GC-MS ve HPLC analizi için hazırlanan numune



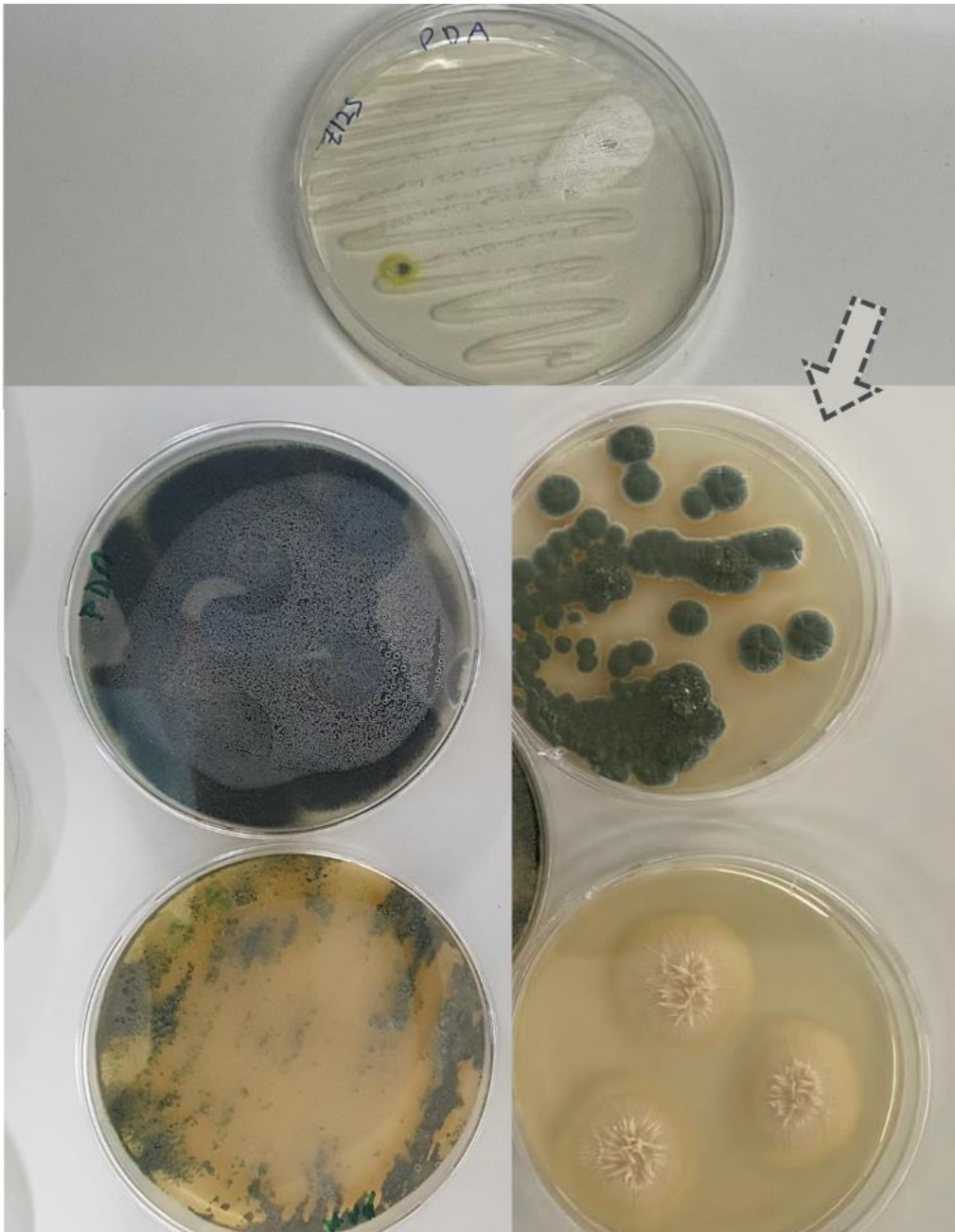
Şekil 15. GC-MS analizi için ekstraksiyon işlemi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

TCC parçalayan küflerin izolasyonu ve tanılanması

TCC parçalayan küflerin izolasyonu

Erzurum ilindeki belediye atıksu arıtma tesisinden aktif çamur numunesi alınarak hazırlanan zenginleştirme kültürlerinden, TCC'yi bozabilecek potansiyel mikroorganizmalar izole edildi. Bu basamakta tek karbon kaynağı olarak TCC sağlandı ve seçici bir zenginleştirme tekniği sürdürüldü. MSM besiyeri prosedürleri kullanılarak, zenginleştirme kültürü tekniği boyunca aktif çamur numunelerinden 5 farklı küf suşu izole edildi (şekil 16).



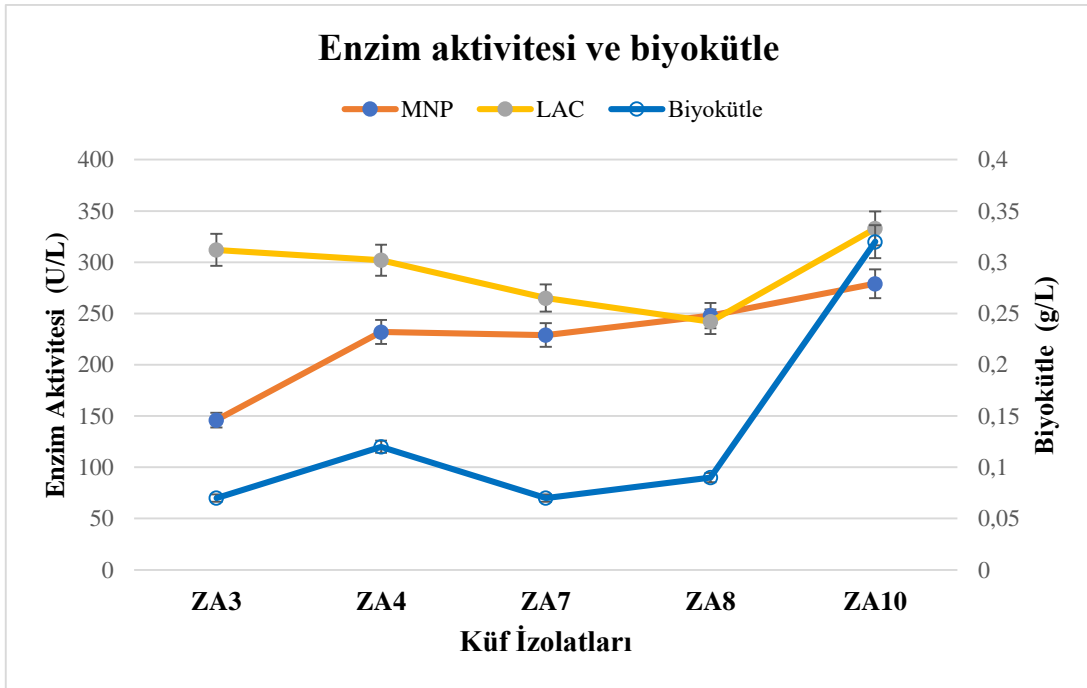
Şekil 16. İzole edilen mikroorganizmalar (Seçilen suş ok ile gösterilmektedir)



Şekil 17. PDB içerisinde geliştirilen küf izolatları

TCC parçalayan izolatların degradasyon yüzdesi

MSM besiyeri ortamında inkübe edilen 5 farklı izolatın, TCC degradasyon yeteneklerine bakıldı. Enzim aktivitesine, biyokütle ağırlığına ve TCC degradasyon yüzdesi sonuçlarına göre en iyi bozunma gösteren ZA10 suşu, 10 mg/L konsantrasyonundaki TCC'yi tolere edebildi.



Şekil 18. İzolatların enzim aktivite ve biyokütle ölçüm sonuçları.

MSM besiyeri ortamında inkübe edilen 5 izolatın TCC degradasyon yüzdesi HPLC analizi ile belirlendi.

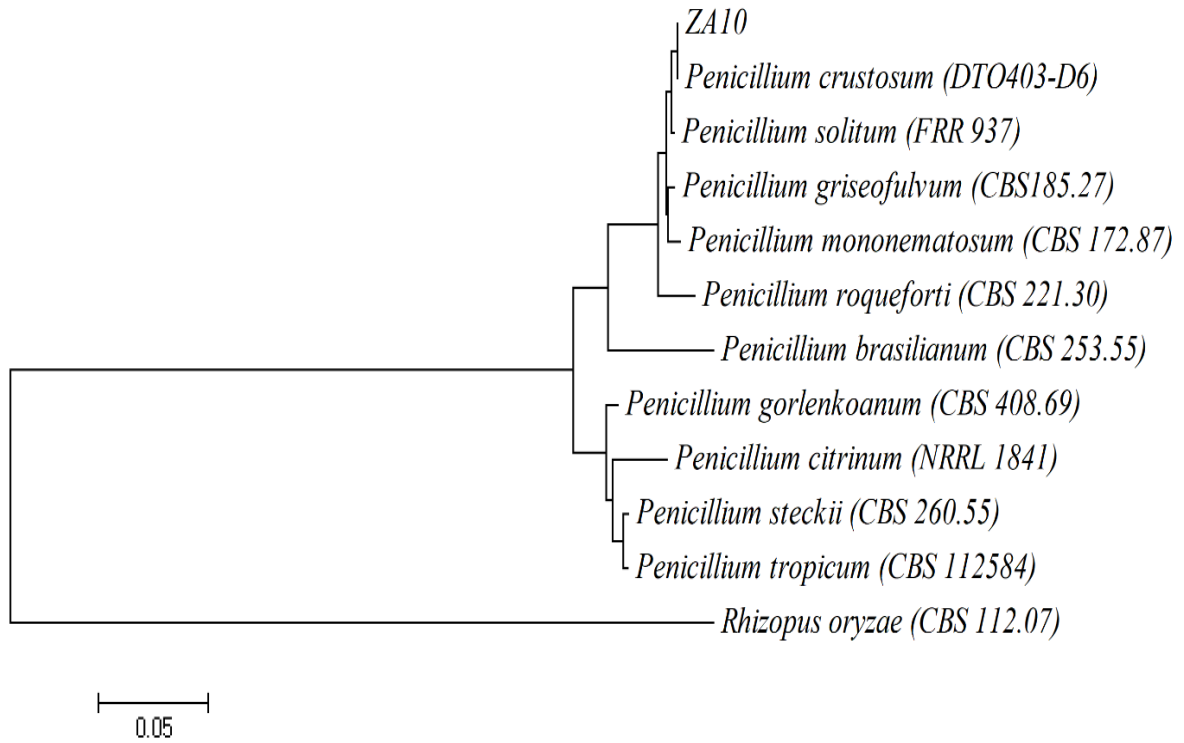
SUŞ	DEGRADASYON YÜZDESİ
ZA10	%44
ZA4	%39
ZA8	%26
ZA3	%13
ZA7	%2

Tablo 9. İzolatların TCC degradasyon yüzdesi.

Elde edilen degradasyon sonuçlarına göre en çok bozunma gösteren suş **ZA10** suşu olarak belirlendi ve bu izolat çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere seçildi.

Sekans analiz sonuçları

Macrogen firması tarafından analiz edilen 18S rRNA sekans verileri sonucu NCBI'dan elde edilen benzerliğe göre ZA10 kodlu izolatımızın *Penicillium crustosum* türüne ait olduğu belirlendi. Daha sonra elde edilen izolatın, NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi (Şekil 19).



Şekil 19. ZA10 kodlu izolatin, 18S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining filogenetik ağacı

Rhizopus oryzae dış grup olarak kullanılmıştır.

Seçilen ZA10 Küf İzolatı

MSM ortamında en yüksek degradasyon yüzdesi ile, ZA10 suşu sonraki çalışmalar için seçildi.

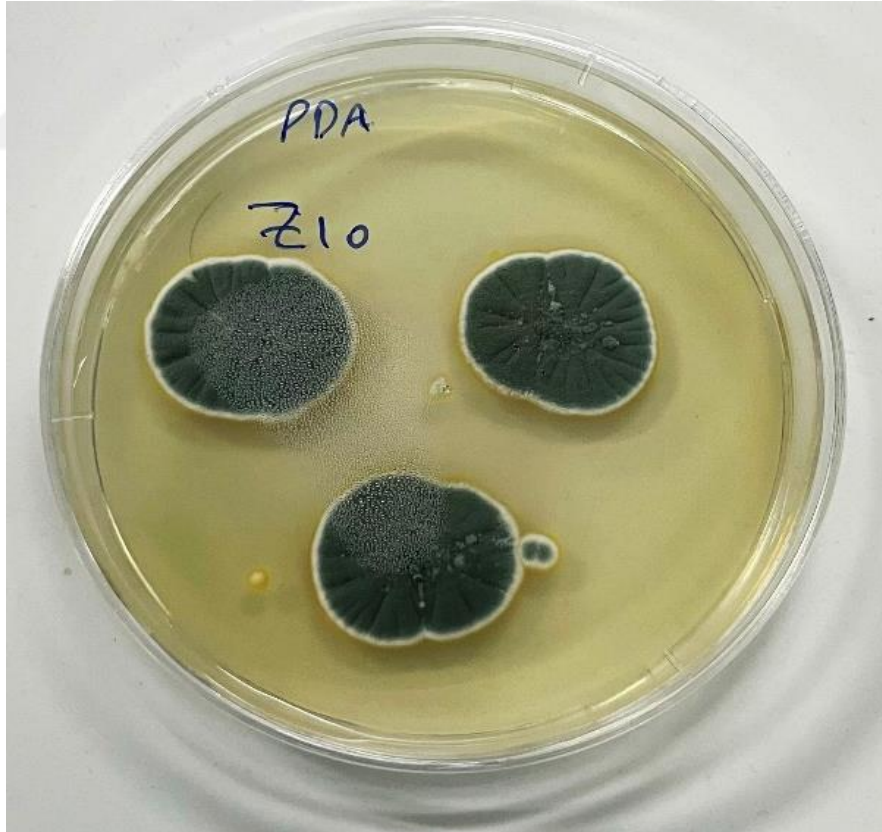
ZA10, PDA besiyeri üzerinde 30°C'de 8 gün boyunca büyütüldü.



Şekil 20. ZA10 *Penicillium crustosum* 4.gün



Şekil 21. ZA10 *Penicillium crustosum* 6.gün



Şekil 22. ZA10 *Penicillium crustosum* 8.gün



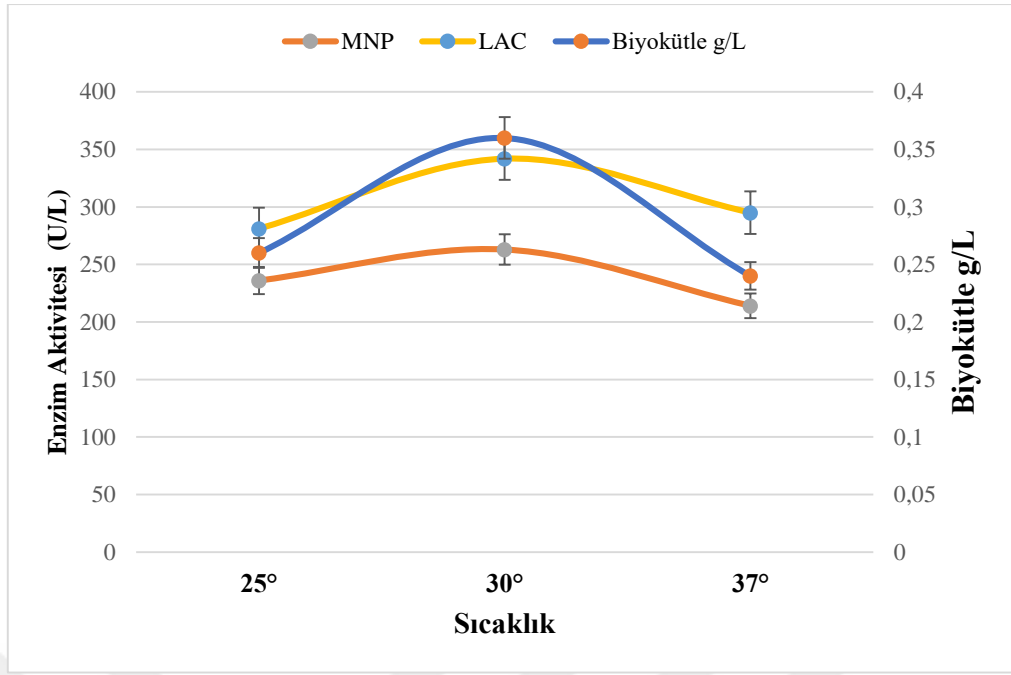
Şekil 23. PDA+ABTS üzreinde ZA10 izolatının lakkaz enzimi salgıladığını gözlemlemek (renk değişimi).

Optimal koşullar ve triklokarban degradasyonu

Seçilen ZA10 izolatının TCC parçalama verimini arttırmak için çeşitli ortam koşullarının (sıcaklık, pH, TCC konsantrasyonu, inkübasyon süresi) optimizasyonu gerçekleştirildi. TCC degradasyon deneyleri 250 ml'lik erlenmayerlerde hazırlanan 100ml'lik numunelerde MnP ve LAC enzim aktiviteleri ve biyokütle ağırlığı ölçülerek belirlendi.

Optimal sıcaklık belirlenmesi

ZA10 izolatı ile TCC degradasyonunda optimal sıcaklığı belirlemek için 25-30-37°C' ortam koşulları denendi. Bu ortam koşullarındaki inkübasyonun ardından elde edilen süpernatant için yapılan enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı ölçümü sonuçlarına göre en iyi verimin elde edildiği sıcaklık 30°C olarak belirlendi.

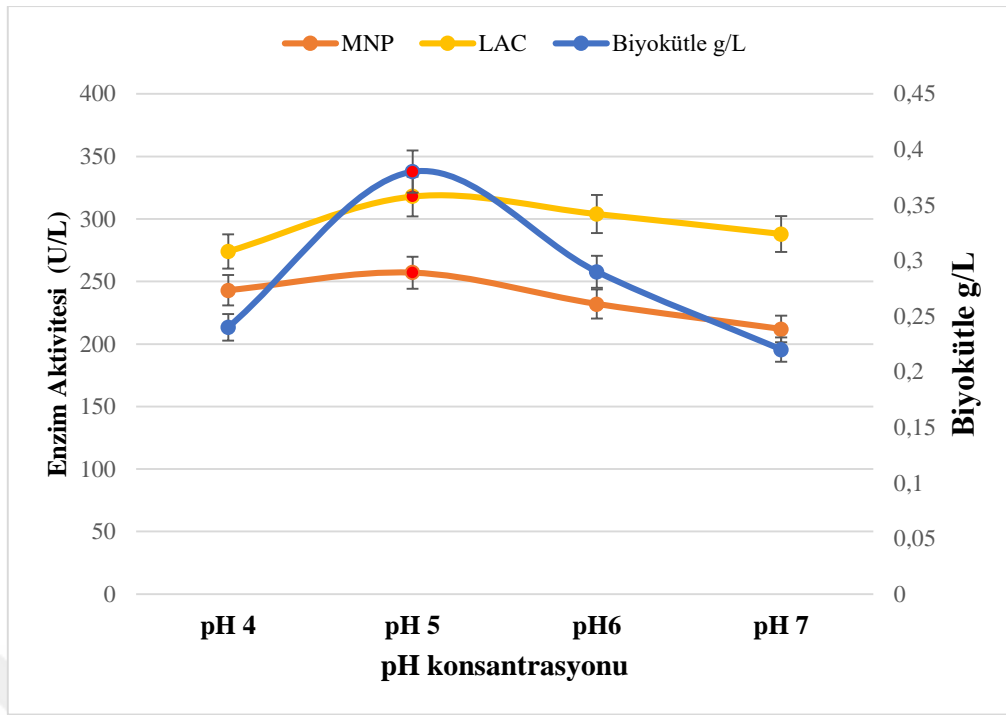


Kültür Koşulları; TCC konsantrasyonu: 10 mg/L, İnkübasyon süresi: 9gün,
Çalkalama hızı: 150 rpm

Şekil 24. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu.

Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi

ZA10 izolatu ile TCC degradasyonunda optimal pH konsantrasyonu belirlemek için pH 4, 5, 6 ve 7 denendi. Bu ortam koşullarındaki inkübasyonun ardından elde edilen süpernatant için yapılan enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı ölçümü sonuçlarına göre en iyi verimin elde edildiği pH 5 olarak belirlendi.

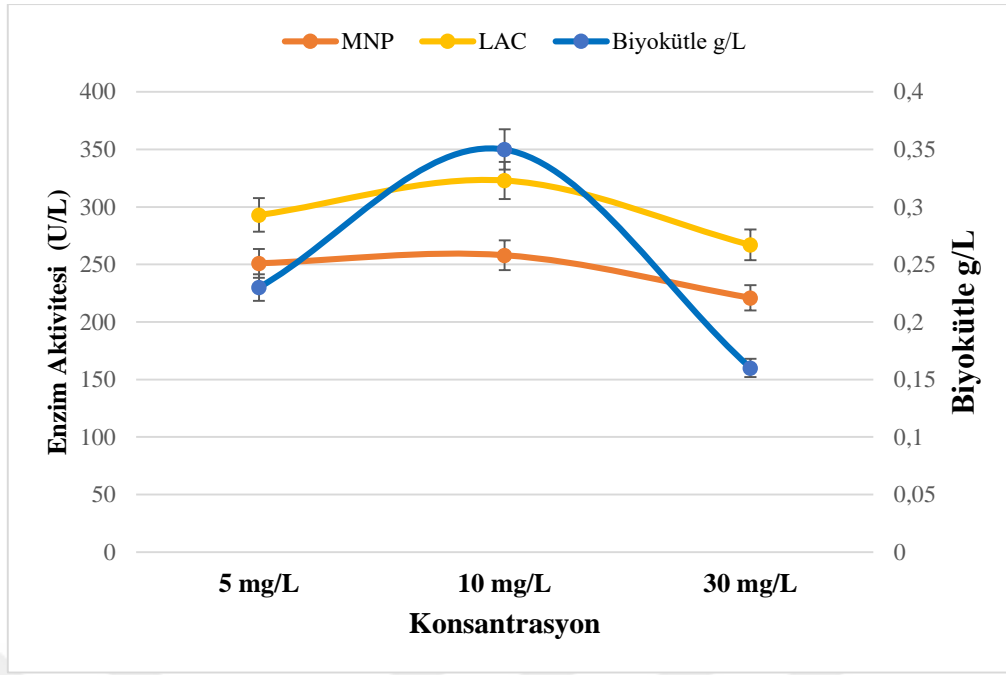


Kültür Koşulları; TCC konsantrasyonu: 10 mg/L, İnkübasyon süresi: 9gün,
Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 30°C.

Şekil 25. Farklı pH konsantrasyonunda enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu

Optimal triklokarban konsantrasyonunun belirlenmesi

ZA10 izolatu ile TCC degradasyonunda optimal TCC konsantrasyonunu belirlemek için farklı TCC konsantrasyonları (5-10-30 mg/L) denendi. Yapılan enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucunda en iyi verimin elde edildiği TCC konsantrasyonunun TCC =10 mg/L olduğu belirlendi.

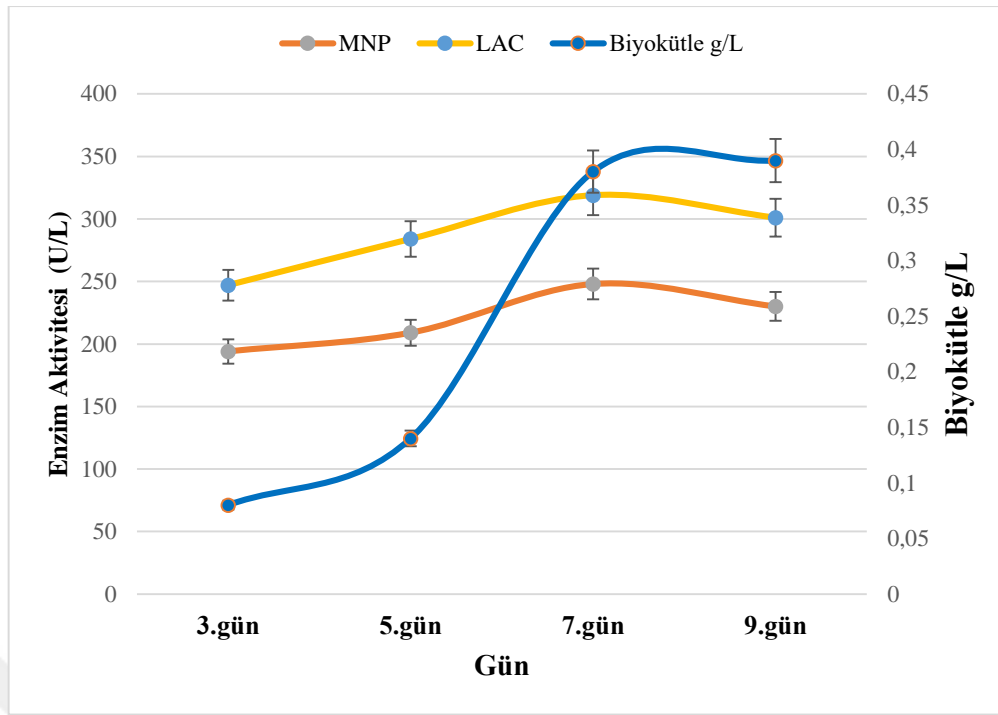


Kültür Koşulları; TCC konsantrasyonu: 5-10-30 mg/L, İnkübasyon süresi: 9 gün, Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 30°C, pH:5

Şekil 26. Farklı TCC konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve biyokütle ağırlığı sonucu.

Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

ZA10 izolatu ile TCC degradasyonunda optimal inkübasyon süresini belirlemek için 3, 5, 7 ve 9. günlerde enzim aktivitesi ve biyokütle ölçümleri alındı ve degradasyon yüzdesini HPLC ile ölçümleri olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre en iyi verimin elde edildiği inkübasyon süresinin 7. gün olduğu belirlendi.

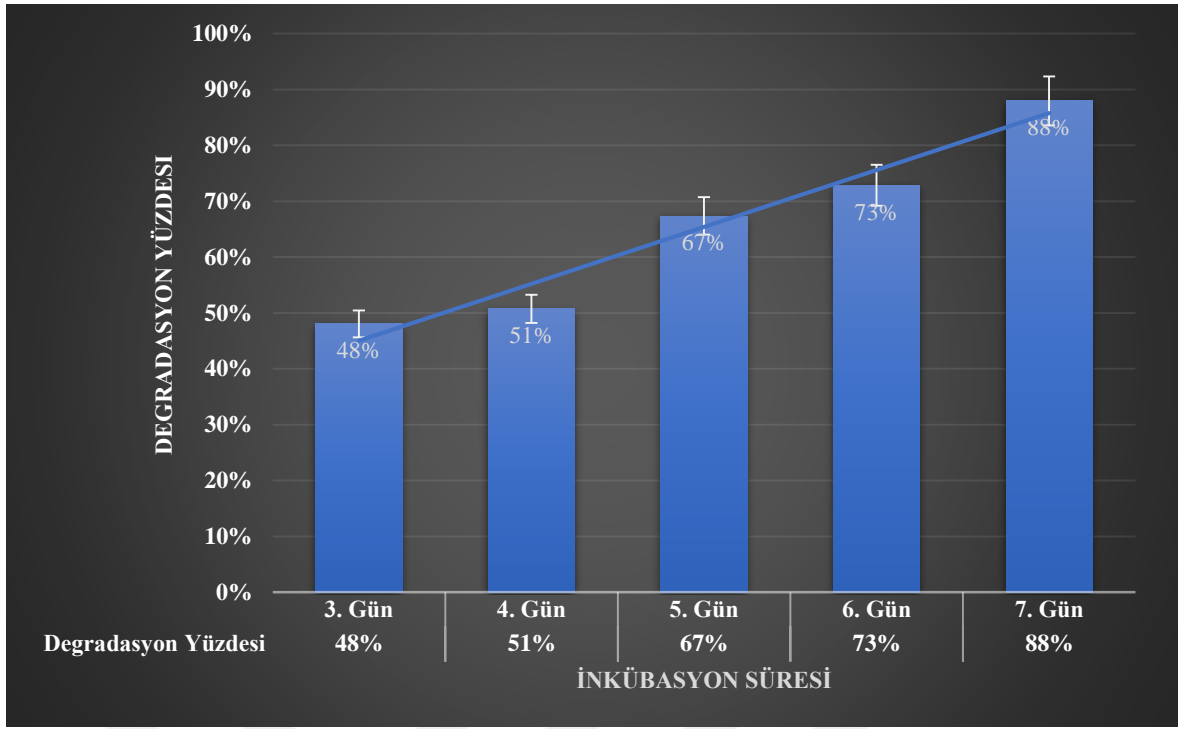


KÜLTÜR KOŞULLARI; TCC konsantrasyonu: 10 mg/L, Çalkalama hızı: 150 rpm, Sıcaklık: 30°C, pH:5

Şekil 27. Farklı inkübasyon süresinde enzim aktivitesi ve biyokütle sonucu.

Farklı inkübasyon sürelerinde HPLC ile degradasyon yüzdesi belirlenmesi tablo 10'da gösterildi.

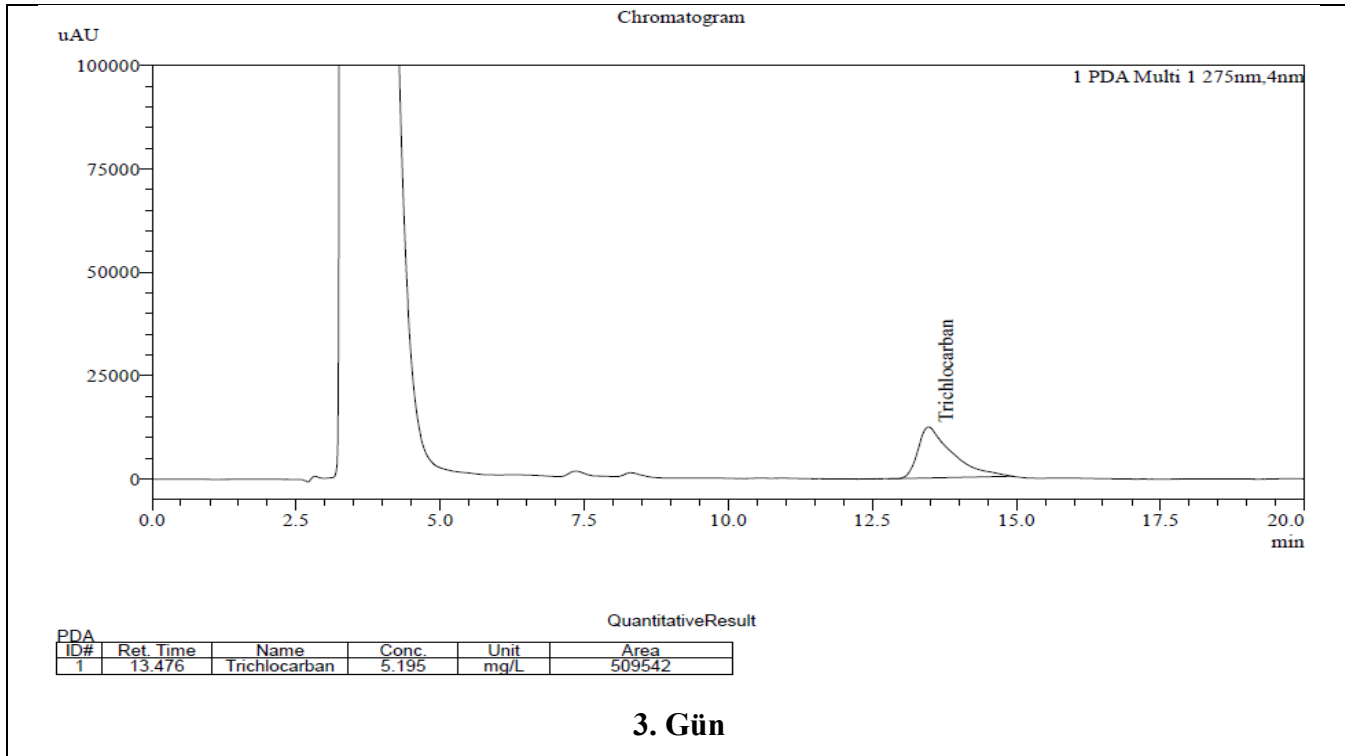
Tablo 10. Farklı İnkübasyon süresinde HPLC ile belirlenen degradasyon yüzdesi.

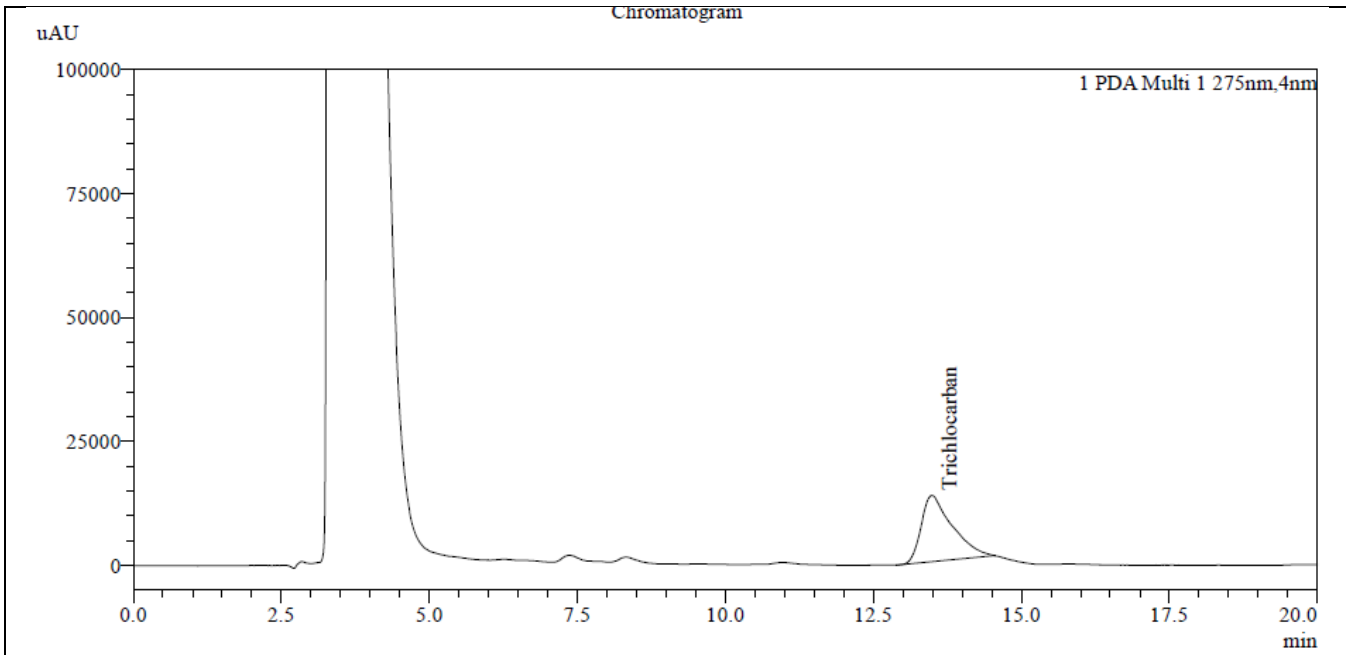


KÜLTÜR KOŞULLARI; TCC konsantrasyonu: 10 mg/L, Çalkalama hızı: 150 rpm, Sıcaklık: 30°C, pH:5.

Elde edilen HPLC kromatogramı tablo 11’da gösterildi.

Tablo 11. Farklı inkübasyon sürelerinde HPLC ile belirlenen degradasyon sonucu.

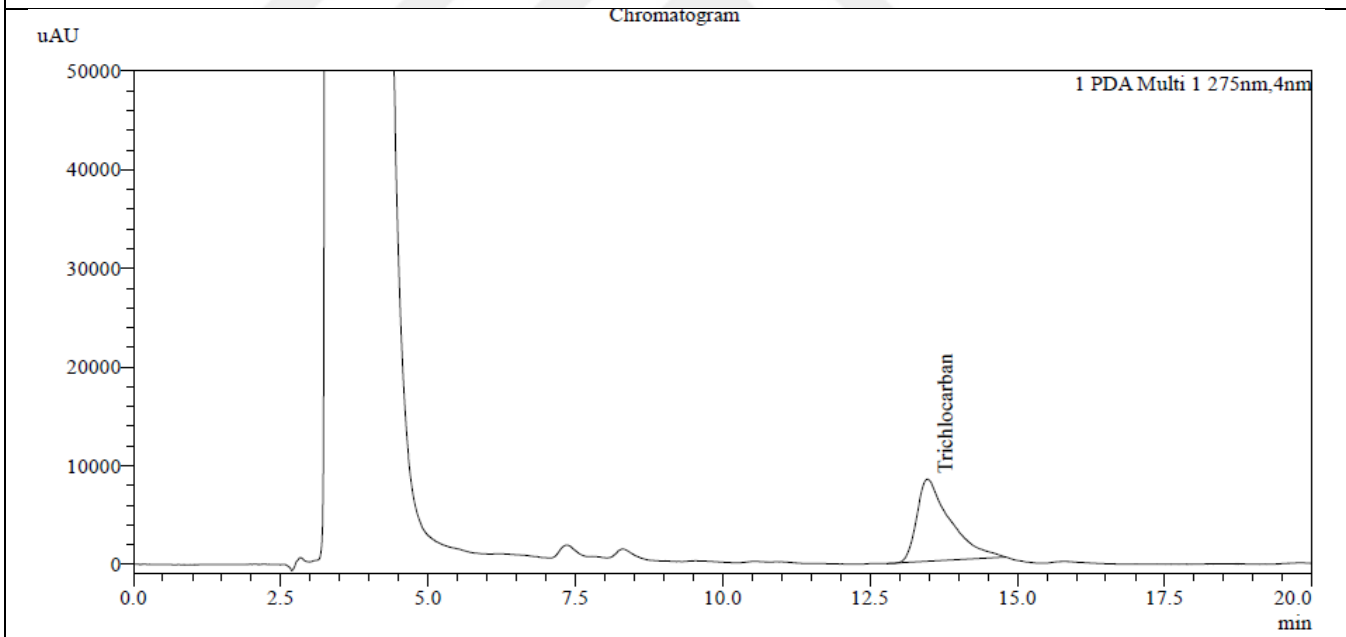




QuantitativeResult

PDA					
ID#	Ret. Time	Name	Conc.	Unit	Area
1	13.490	Trichloroethane	4.926	mg/L	484080

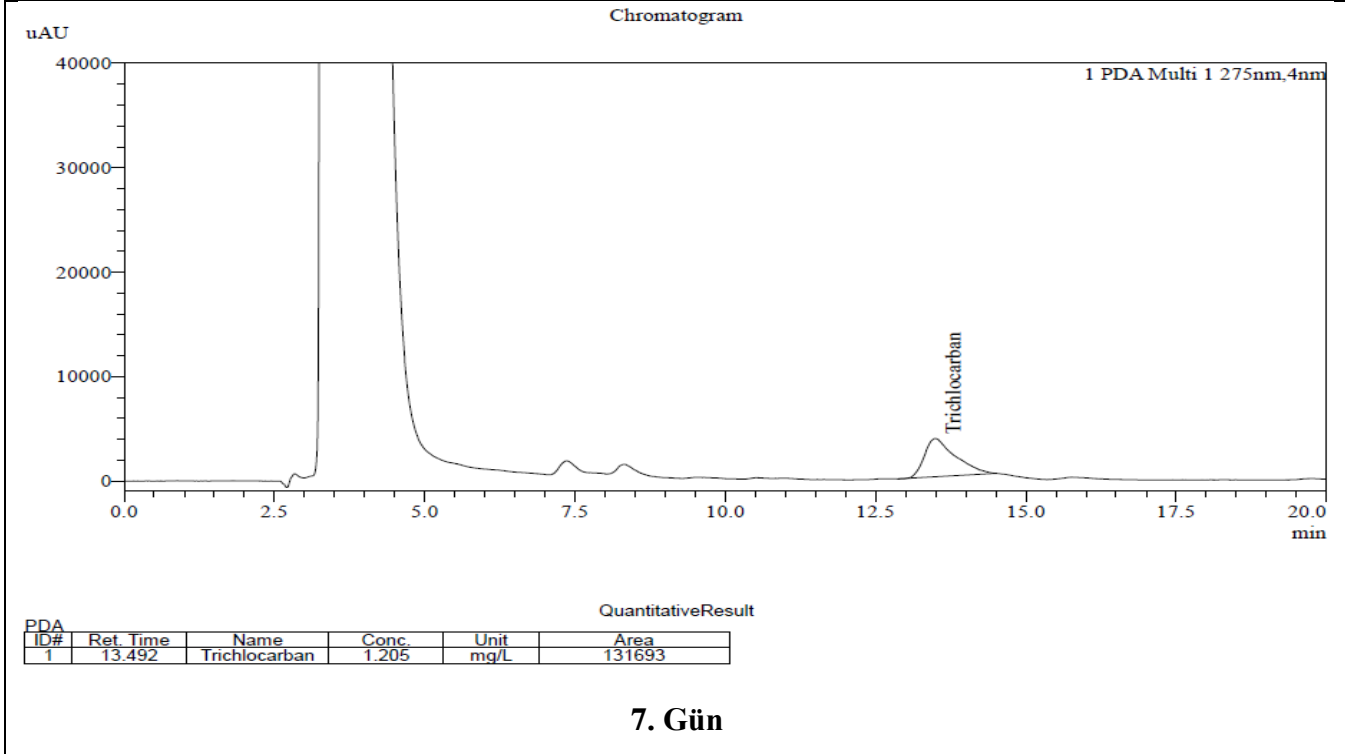
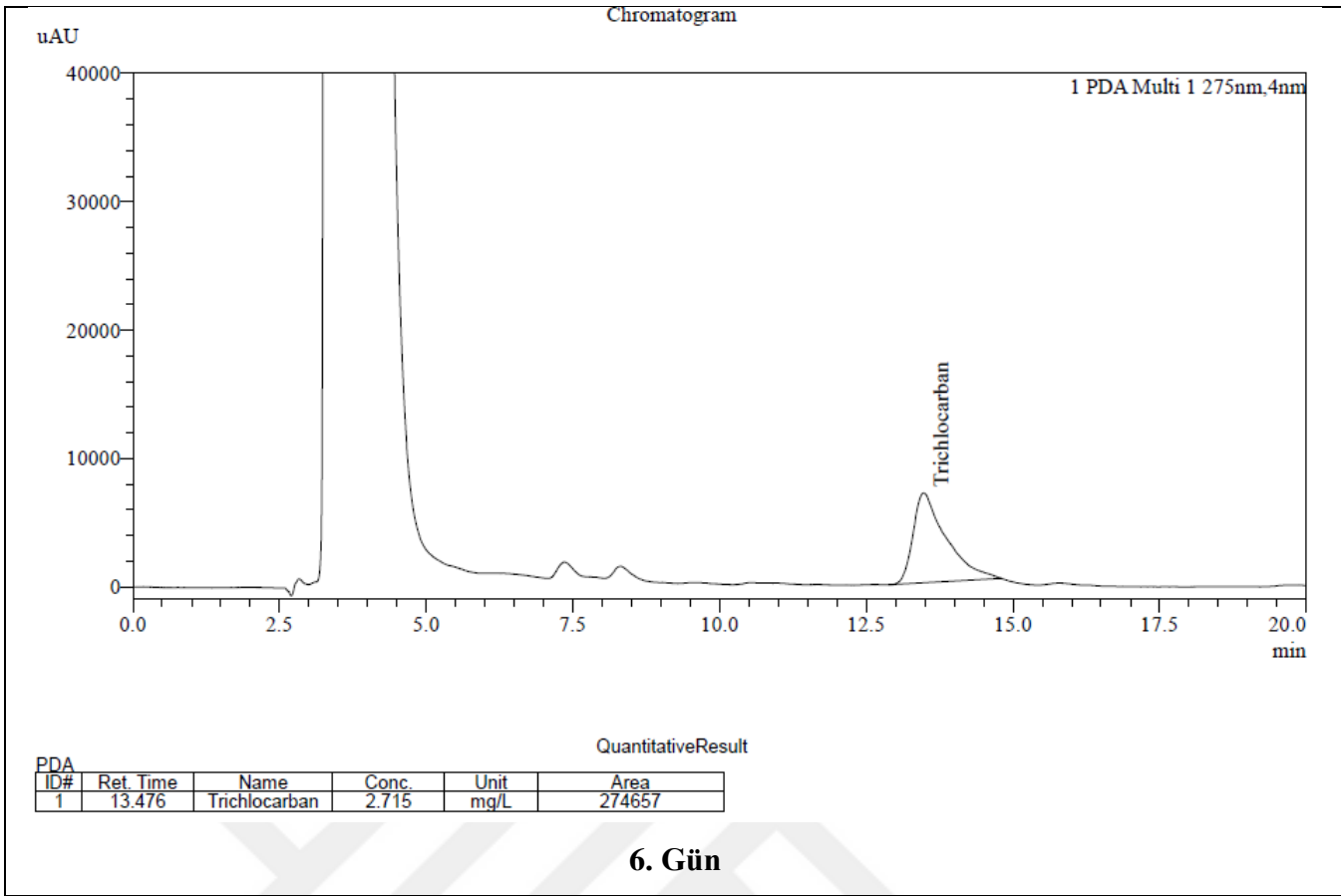
4. Gün



QuantitativeResult

PDA					
ID#	Ret. Time	Name	Conc.	Unit	Area
1	13.479	Trichloroethane	3.263	mg/L	326594

5. Gün

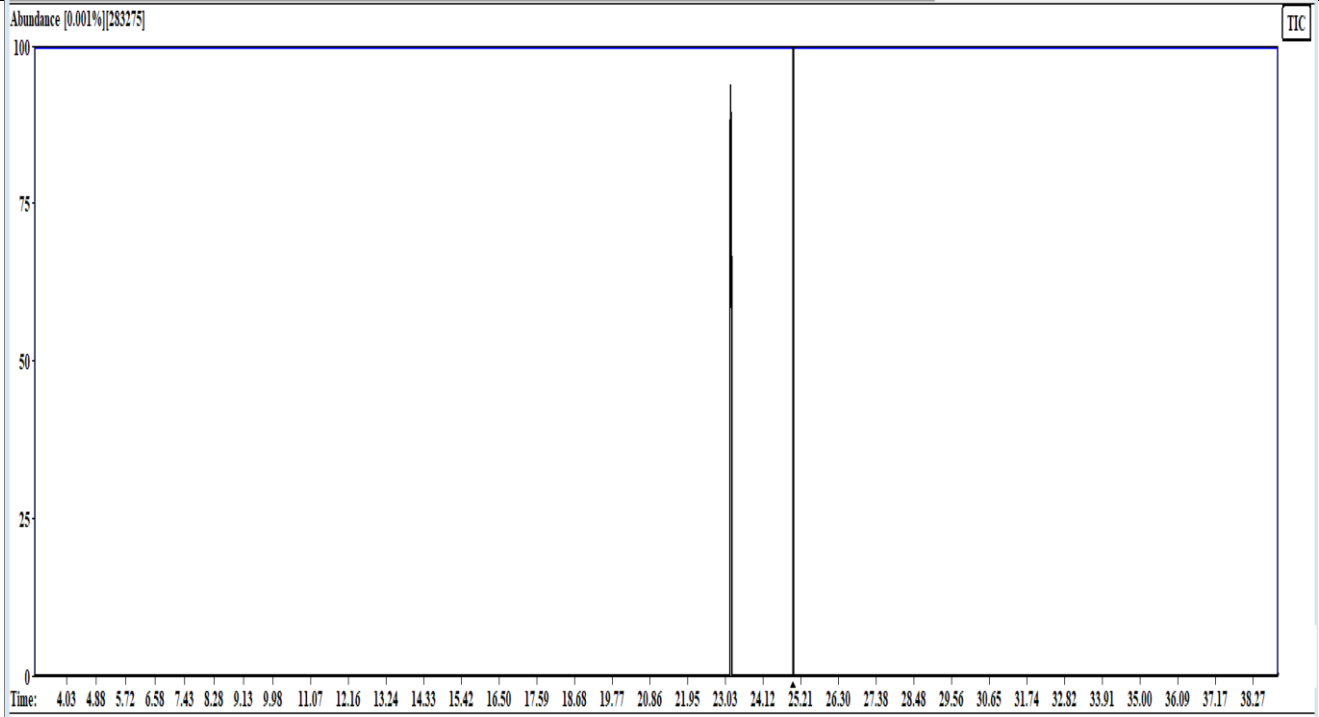


Elde edilen sonuçlara göre en iyi verimin elde edildiği inkübasyon süresinin 7. gün olduğu belirlendi.

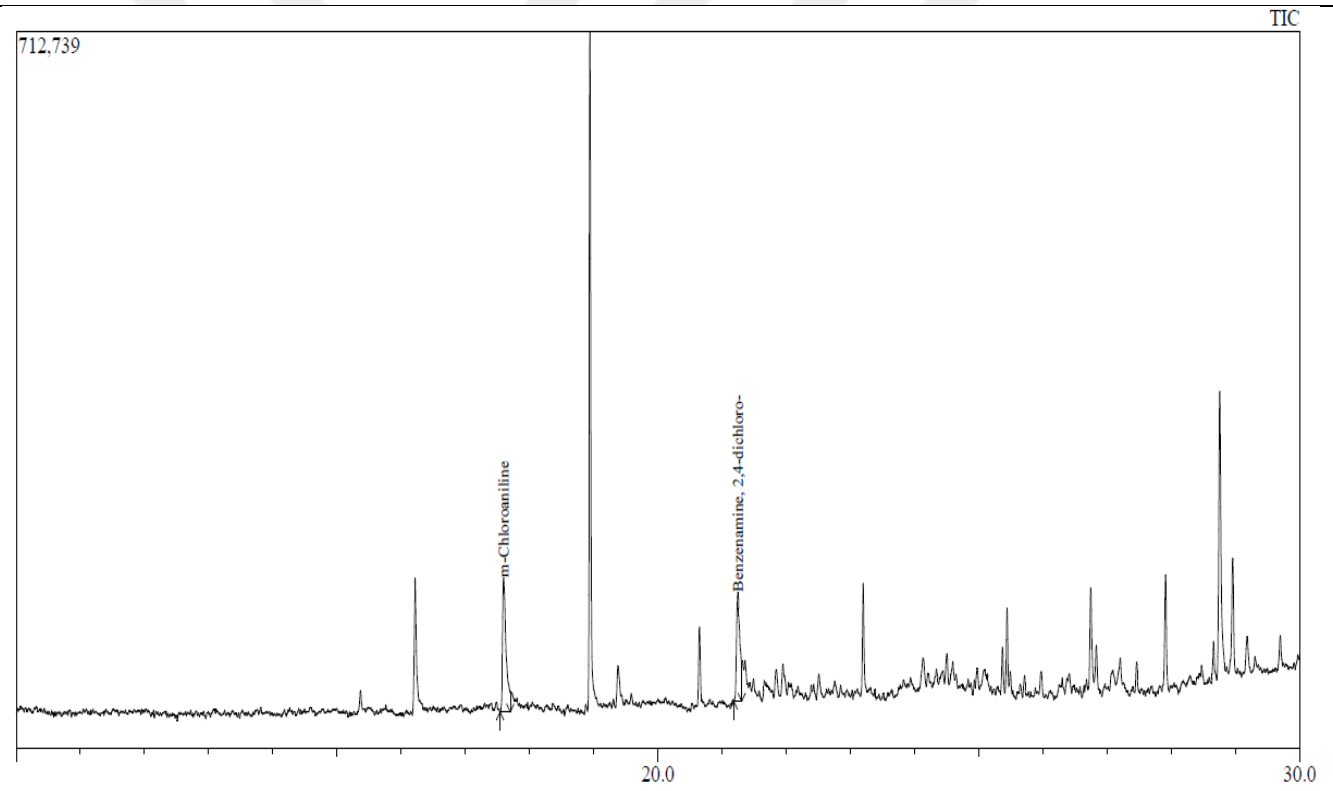
Optimal parametreler ile hazırlanan örneğin GC-MS ile analizi

Belirlenen tüm optimal parametreleri ayarlayarak biyolojik bozunmayı en iyi şekilde gerçekleştirebilen ZA10 kodlu izolat ile hazırlanan numunelerdeki TCC parçalanma dönüşüm ürünleri GC-MS ile analiz edildi. Belirlenen optimal parametreler aşağıdaki gibidir; TCC konsantrasyonu 10mg/L, sıcaklık 30°C, pH:5, inkübasyon süresi: 7 Gün, çalkalama hızı: 150 rpm, karanlık koşullar altında. GC-MS ile triklokarban standart ve bileşiğin kütle spektrumları şekil 28’da gösterildi.

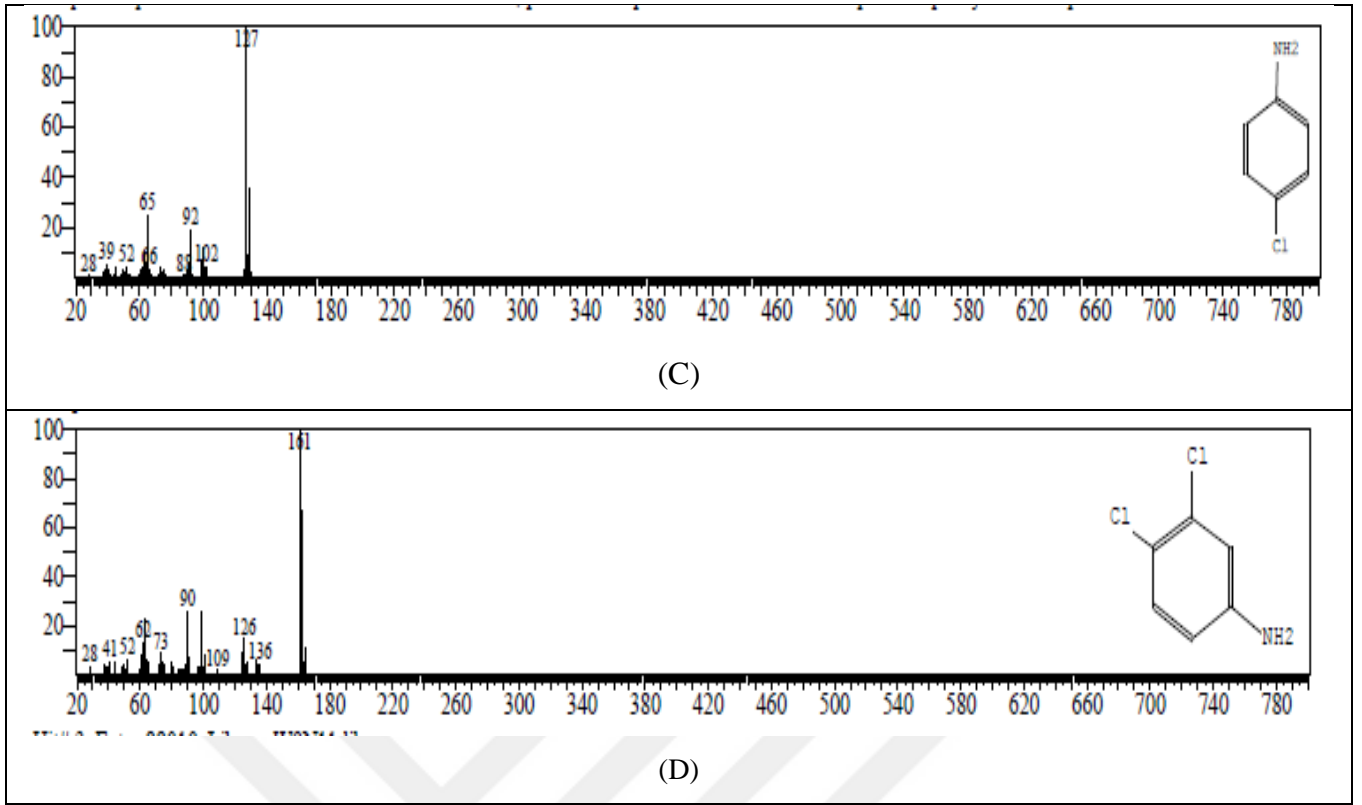




(A)



(B)

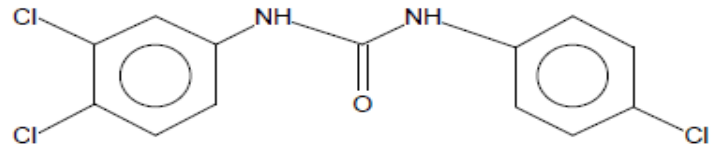


A) GC-MS triklokarban standart. B) GC tutma süreleri sırasıyla 17.599 ve 21.247 dakika idi. bileşiğin kütle spektrumları, sırasıyla 4-kloroanilin ve 3,4-dikloroanilin türevleri gibi gerçek bileşiklerle aynıydı. C) 4-kloroanilin kütle spektrumu. D) 3,4-dikloroanilin kütle spektrumu.

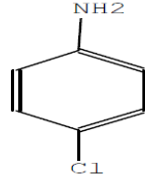
Belirlenen tüm **optimal parametreler**: TCC konsantrasyonu 10mg/L, sıcaklık 30°C, pH:5, inkübasyon süresi: 7 Gün, çalkalama hızı: 150 rpm, karanlık koşullar altında.

Şekil 28. TCC'nin ve dönüşüm ürünlerinin 4-kloroanilin (4CA) ve 3,4-dikloroanilinin (3,4-DCA) GC-MS tanımlaması.

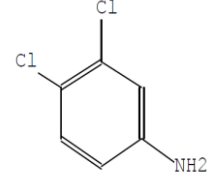
Triklokarbanın, *Penicillium crustosum* ZA10 tarafından degradasyonu sonucunda triklokarban 3,4-dikloroanilin ve 4-kloroaniline dönüşmüş ve 3,4-dikloroanilin de klorür iyonlarının salınmasıyla 4-kloroaniline dönüşmüştür (Şekil 29). Benzer bir yol daha önce yapılan çalışmalarda da önerilmiştir (Miller *et al.* 2010; Mulla *et al.* 2016; Li *et al.* 2022)



Triklorokarbon (TCC)



4-kloroanilin



3,4-dikloroanilin

Şekil 29. TCC'nin degradasyon ürünleri.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinin geniş çaplı kullanımı, bu maddelerin özellikle atıksu atıkları ve biyokatılarda birikimine ve arıtım işlemlerinin ardından dahi yüksek oranlarda tespit edilebilmelerine yol açmıştır. Bu tür bileşiklerden biri de daha çok antimikrobiyal özelliği ile ön plana çıkan ve günümüzde tekstil, kozmetik, sağlık sektörü başta olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılan triklokarban (3,4,4'-triklorokarbonilid, TCC)'dir. Atık su deşarjı yoluyla, TCC sürekli olarak yüzey sularına salınır. Çevredeki önemli TCC kaynakları, konut veya konut dışı kaynaklardan gelen atık suların kanalizasyona atılmasıdır. Bu bileşik atık su arıtma tesislerine taşınır ve daha sonra atık su, tarım arazilerinde sulama için kullanıldığı alıcı akışlara gider. Atık su arıtma tesislerindeki işleminden sonra elde edilen çamur, çeşitli amaçlarla araziye uygulanabilir veya depolama alanlarında yok edilebilir (Amigun Taiwo et al. 2022). Atıksu arıtma tesislerinde TCC'nin sık kullanımı ve yeterli arıtılmaması, çeşitli ortamlarda birikmesine, sedimentlerde ve biyokatılarda TCC konsantrasyonlarının mg/kg seviyelerine kadar birikmesine neden olmuştur (Yun H. et al. 2017b). Yapılan bazı çalışmalarda triklokarbanın canlılarla yeniden maruziyetinin çeşitli sağlık problemlerine yol açabileceği bildirilmiştir (Armstrong et al. 2017; Yun H. et al. 2020; Li et al. 2022).

TCC'nin farklı çevresel matrislerdeki kaderi hala tam olarak anlaşılammış olmasından dolayı, çevreye yeniden karışmasını önlemek ve yayılmasını kontrol altına almak için etkili önlemlerin alınması gerekmektedir.

Biyodegradasyon, mikrobiyal toplulukların metaller, organik ve inorganik maddeler gibi atıksu çamur içeriklerinin/bileşenlerinin yapısını parçalamak veya değiştirmek için çok önemli roller oynadığı doğal bir çürüme veya bozunma sürecidir. Atıksu bileşenlerinin biyolojik olarak parçalanması biyolojik ayrışmayı (katıların çökeltme özelliği), biyokatı birikimini, filtrelenebilirliği ve susuzlaştırılabilirliği önemli ölçüde artırır (Mannan et al. 2005). Dolayısıyla TCC'nin ve metabolitlerinin giderilmesi için biyodegradasyon işlemi etkili ve ekonomik bir yoldur. TCC'yi parçalayabilen çeşitli mikroorganizmaların izolasyonu, biyoremediasyon uygulamalarının ana temelini oluşturmaktadır (Yun H. et al. 2017 b). Kimyasal ve fiziksel tekniklerle karşılaştırıldığında, TCC'nin mikrobiyolojik degradasyonu ve dönüşümü, nispeten yüksek verimlilik ve çevre dostu özellikler dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir (Li et al. 2022). Bununla birlikte, TCC'nin dirençli ve antimikrobiyal özellikleri göz önüne alındığında, TCC'yi etkili bir şekilde bozan mikrobiyal türler üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır (Halden and Paull 2005).

Çalışmamız, Erzurum ili atıksu arıtma tesislerinden izole edilen ve TCC'yi degrade etme yeteneğine sahip olduğu tespit edilen ZA10 kodlu *Penicillium crustosum*'un izolasyonuna ilişkin ilk rapordur. Çalışmada, sıvı ortamda seçilen izolat tarafından bozunan TCC konsantrasyonu 10 mg/L idi, böyle bir konsantrasyon önceki çalışmalara göre yüksektir. *Penicillium crustosum* ZA10 küf suşunun MSM ortamında büyümesini ve bileşimini etkileyen pH, sıcaklık, TCC konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi çeşitli çevresel faktörler optimize edildikten sonra degradasyon yüzdesi %88'e kadar arttırılmıştır. Elde edilen degradasyon yüzdesi önceki çalışmalara göre yüksektir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda TCC'yi degrade ettiği tespit edilen bakteri suşları arasında yer alan *Sphingomonas* sp. YL-JM2C suşu, 4 mg/L TCC konsantrasyonunda MSM ortamında 5 günde TCC'nin %35'ini degrade etmiştir (Mulla *et al.* 2016). *Rhodococcus rhodochrous* BX2 adlı bakteri suşunun ise, 5 günde TCC'yi yüksek verimlilikle parçalayabildiği (%76,8) ve mineralize edebildiği gösterilmiştir (Li *et al.* 2022). Tarım toprağından izole edilen *Pseudomonas fluorescens* MC46, 9,46 mg/L TCC konsantrasyonunda 6 günde TCC'nin %67'sini dönüştürebilmiştir (Taweetanawanit *et al.* 2019). *Ochrobactrum* sp. MC22, MC22 suşu MSM ortamında 1,3 mg/L TCC konsantrasyonunda 6 günde TCC'nin %78'ini degrade etmiştir (Sipahutar and Vangnai 2017). Daha önce yapılan çalışmalara göre bozunma yolu, TCC'nin 3,4-dikloroanilin (3,4-DCA) ve 4-kloroanilin olduğunu gösterilmiş (Mulla *et al.* 2016; Sipahutar and Vangnai 2017; Yun H. *et al.* 2017b; Li *et al.* 2022).

Şimdiye kadar, TCC'nin iki amid bağının hidrolizi veya halojenizleştirme yoluyla biyolojik olarak dönüştürüldüğü bildirilirken, halojenizleştirme genellikle anoksik ortamlarda tespit edilemeyen bir oranda gerçekleşmektedir (Venkatesan *et al.* 2012). TCC'nin aerobik hidrolizinin nispeten hızlı olduğu rapor edilmiştir (Mulla *et al.* 2016; Yun H. *et al.* 2017b). Atık su arıtma çamuru için, genellikle besin maddesi ve karbon açısından zengin bir materyal olmasına rağmen, bu substratların fonksiyonel mikroorganizmalar için yeterli olup olmadığı veya gerçekten mevcut olup olmadığı belirsizdir. Ayrıca, AAT'lerin çoğunda aerobik ve anaerobik süreçlerin her ikisi de yer almaktadır (Yun H. *et al.* 2017a), eklenen fonksiyonel mikroorganizmaların oksijen sınırlamasına veya diğer elektron alıcı koşullarına uyum sağlayıp sağlamayacağını doğrulanması gerekir.

Sonuç olarak bu çalışmada, belediye atıksu arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesinden triklokarbanı degrade etme yeteneğine sahip olduğu gösterilen yeni, yerel bir izolat elde edildi ve mevcut izolatu *Penicillium crustosum* ZA10 türüne ait bir suş olduğu tespit edildi. İzole edilen *Penicillium crustosum* ZA10 suşunun MSM besiyerinde pH=5'te, 7 günlük inkübasyon ile ve 30°C sıcaklıkta, 10 mg/L TCC'yi %88 oranında degrade edebildiği belirlendi. Ayrıca,

Penicillium crustosum ZA10 küf suşu tarafından üretilen manganez peroksidaz ve lakkaz enzimlerinin TCC'nin biyolojik bozunmasına eş zamanlı olarak katıldığı gösterildi. TCC'nin ZA10 küfö ile biyodegradasyonu sonucu ortaya çıkan iki ara metabolit (3,4-dikloroanilin ve 4-kloroanilin) GC/MS ile belirlendi. Bu çalışma, *Penicillium crustosum* ZA10 suşunun atık sudaki triklokarbanın bozunması için etkili bir seçenek olabileceğini gösterdi. Böylece, dünyada önemli kirlilik sorunlarından biri haline gelen PPCP ajanı triklokarbanın mikrobiyal degradasyon yöntemi ile ortadan kaldırılmasında kullanılabilecek yeni bir mikroorganizma keşfedildi, bu mikroorganizma ile yeni bir uygulama geliştirme konusunda ilk adım atılarak, mevcut uygulama ile yapılacak diğer çalışmalara zemin hazırlandı. Sonraki çalışmalarda; diğer toksik organik kirleticilerin varlığında ve karışık mikrobiyal koşullarda degradasyon veriminin nasıl etkileneceğine yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Kaynaklar

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, &, &, M. 2017. The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 038-046.
- Al-Baldawi, Abdulwahab, I., Mohammed, A. A., Mutar, Z. H., Abdullah, S. R S., Jasim, S. S, & Almansoor, A. F. 2021. Application of phytotechnology in alleviating pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater: Source, impacts, treatment, mechanisms, fate, and SWOT analysis. *Journal of Cleaner Production*, 128584.
- Amigun Taiwo, A., Mustapha, S., Oladejo, J., T., Amoo, F., . . . & Elabor, R. (2022). Occurrence, effects, detection, and photodegradation of triclosan and triclocarban in the environment: A review. . *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-19.
- Arifin, S. N., Mohamed, R., Al-Gheethi, A., Lai, W., C., &, . . . G. 2023. Heterogeneous photocatalysis of triclocarban and triclosan in greywater: a systematic and bibliometric review analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 779-797.
- Armstrong, D. L., Rice, C. P., Ramirez, M., & Torrents, & A. 2017. Influence of thermal hydrolysis-anaerobic digestion treatment of wastewater solids on concentrations of triclosan, triclocarban, and their transformation products in biosolids. . *Chemosphere*, 171, 609-616.
- Balakrishnan, P., & Mohan, S. 2021. Treatment of triclosan through enhanced microbial biodegradation. . *Journal of Hazardous Materials*, , 420, 126430.
- Baltierra-Trejo, E., Márquez-Benavides, L., Sánchez-Yáñez, J., & M. 2015. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of microbiological methods*, , 119, 126-131.
- Bi, R., Z., C., J., Y., W., S., L., P., R., Liu, W. 2019. Giving waterbodies the treatment they need: a critical review of the application of constructed floating wetlands. . *Journal of environmental management*, 484-498.
- Brose, D. A., Kumar, K., Liao, A., Hundal, L. S., Tian, G., Cox, A., W. 2019. A reduction in triclosan and triclocarban in water resource recovery facilities' influent, effluent, and biosolids following the US Food and Drug Administration's 2013 proposed rulemaking on antibacterial products. *Water environment research*, , 715-721.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, &, & R.. 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environmental Science & Technology*, 1241-1248.
- Caracciolo, A. B., Topp, E., &, Grenni, & P.2015. Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25-36.
- Cha, J., & Cupples, A. M. 2009. Detection of the antimicrobials triclocarban and triclosan in agricultural soils following land application of municipal biosolids. *Water research*, 2522-2530.
- Chen, J., Meng, X. Z., Bergman, A., &, Halden, R., & U.2019. Nationwide reconnaissance of five parabens, triclosan, triclocarban and its transformation products in sewage sludge from China. *Journal of hazardous materials*, 502-510.
- Chopra, S., & Kumar, D. 2018. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as emerging environmental pollutants: toxicity and risk assessment. *Advances in animal biotechnology and its applications*, , 337-353.

- Cizmas, L., Sharma, K., V., Gray, C., M., McDonald, & (), T. J. 2015. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental chemistry letters*, 381-394.
- Costa, F., Lago, A., Rocha, V., Barros, O., Costa, L., Vipotnik, Z., T. 2019. A review on biological processes for pharmaceuticals wastes abatement—a growing threat to modern society. . *Environmental science & technology*, 7185-7202.
- Costa, N. O., Forcato, S., Cavichioli, A. M., Pereira, M. R., Gerardin, &, & C., D. C. 2020. In utero and lactational exposure to triclocarban: Age-associated changes in reproductive parameters of male rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115077.
- da Silva Rodrigues, D. A., da Cunha, C. C., Freitas, M. G., de Barros, A. L., Neves, P. B., Pereira, A. R., . . . F., R. J. 2020. Biodegradation of sulfamethoxazole by microalgae-bacteria consortium in wastewater treatment plant effluents. . *Science of the Total Environment*, 141441..
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives*, 907-938.
- de Jongh, C. M., Kooij, P. J., de Voogt, P., ter Laak, T., L., & . 2012. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. *Science of the Total Environment*, 70-77.
- Dey, S., Bano, F., &, alik, & A. 2019. Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination-a global discharge inventory. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*, 1-26,.
- Ellis., J. 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut*, 184-189,.
- Grasso, G., Zane, D., Dragone, &, R. 2019. Microbial nanotechnology: challenges and prospects for green biocatalytic synthesis of nanoscale materials for sensoristic and biomedical applications. *Nanomaterials*, , 10(1), 11.
- Halden, R. U., & Paull, D. H. 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in US water resources. *Environmental science & technology*, 1420-1426.
- Halden, R., U., Lindeman, A. E., Aiello, A. E., Andrews, D., & Blum, A. (2017). The Florence statement on triclosan and triclocarban. *Environmental health perspectives*, 125(6), 064501.
- Iacopetta, D., Catalano, A., Ceramella, J., Saturnino, C., Salvagno, L., Ielo, I., S., M. 2021. The different facets of triclocarban: A review. *Molecules*, 2811.
- Jousset, A. 2012. Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environmental microbiology*, 1830-1843.
- Khan, M., Fung, C., S., Kumar, A., Lo, I., & M. 2019. Magnetically separable BiOBr/Fe₃O₄@ SiO₂ for visible-light-driven photocatalytic degradation of ibuprofen: mechanistic investigation and prototype development. *Journal of hazardous materials*, 365, 73.
- Kor-Bicakci, G., Abbott, T., Ubay-Cokgor, E., &, Eskicioglu, & C. 2020. Occurrence and fate of antimicrobial triclocarban and its transformation products in municipal sludge during advanced anaerobic digestion using microwave pretreatment. *Science of The Total Environment*, 135862.
- Kumar, A., M., K., He, J., Lo, & I. M., . 2020. Recent developments and challenges in practical application of visible–light–driven TiO₂–based heterojunctions for PPCP degradation: a critical review. *Water research*, 170, 115356.

- Lehutso, R. F., Daso, A. P., & Okonkwo, J., O., & . 2017. Occurrence and environmental levels of triclosan and triclocarban in selected wastewater treatment plants in Gauteng Province, South Africa. *Emerging Contaminants*, 107-114.
- Leung, H. W., Minh, T. B., Murphy, M. B., Lam, J. C., So, M. K., Martin, M., & ... & Richardson, B. J. 2012. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment international*, 1-9.
- Li, C., Sun, Y., Sun, G., Zang, H., Sun, S., Zhao, X., . . . Li, D. 2022. An amidase and a novel phenol hydroxylase catalyze the degradation of the antibacterial agent triclocarban by *Rhodococcus rhodochrous*. *Journal of Hazardous Materials*, 128444.
- Li, Y., Zhang, S., Zhang, W., X., . . . Wang, P. 2019. Life cycle assessment of advanced wastewater treatment processes: Involving 126 pharmaceuticals and personal care products in life cycle inventory. . *Journal of environmental management*, 442-450.
- Liu, J. L., & Wong, M. H. 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environment international*, 208-224.
- Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., Torrents, A, 2013. Fate of triclocarban, triclosan and methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water research*, 4519-4527.
- Mallak, A. M., Lakzian, A., Khodaverdi, E., Haghnia, G. H., & Mahmoudi, S. 2020. Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on triclosan biodegradation and activity of laccase and manganese peroxidase enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104.
- Mannan, S., Fakhru'l-Razi, A., Alam, &, M., & Z.. 2005. Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. *Water Research*, 2935-2943.
- Miller, T. R., Colquhoun, D. R., & Halden, R. U. 2010. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *Journal of hazardous materials*, 766-772.
- Mompelat, S., Bot, L., B., Thomas, & O.2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. . *Environment international*, 803-814.
- Mulla, S. I., Hu, A. W., Sun, Q. H., Wang, H., Yu, &, & , C. P. 2016. Degradation of triclocarban by a triclosan-degrading *Sphingomonas* sp. strain YL-JM2C. *Chemosphere*, 292-296.
- Narayanan, M. E.-S., Pugazhendhi, A., Natarajan, D., Kandasamy, G., ., Kandasamy, & S. 2022. Current status of microbes involved in the degradation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) pollutants in the aquatic ecosystem. *Environmental Pollution*, 118922.
- Pycke, B. F., Roll, I. B., Brownawell, B. J., Kinney, C. A., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., . . . U., R. 2014. Transformation products and human metabolites of triclocarban and triclosan in sewage sludge across the United States. . *Environmental science & technology*, 7881-7890.
- Rahman, F., M., Yanful, K., E., Jasim, & Y., S. 2009. Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: implications for the drinking water industry and global environmental health. *Journal of water and health*, 224-243.
- Reed, H., E., Martiny, &, J, B, & . 2007. Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS microbiology ecology*, 161-170.
- Ren, B., Shi, X., Jin, X., Wang, X. C., Jin, & P. 2021. Comprehensive evaluation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in urban sewers: Degradation, intermediate products and environmental risk. . *Chemical Engineering Journal*, 127024.

- Richardson, B. J., Lam, K., P., Martin, & M. 2005. Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Marine pollution bulletin*, 913-920.
- Roberts, J., Kumar, A., Du, J., Hepplewhite, C., Ellis, D. J., Christy, A. G., . . . G. 2016. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. . *Science of the total environment*, 1625-1637.
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., Bandala, &, E, & , R. 2017. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 361-380.
- Saxena, G., Kishor, R., Bharagava, R., & N. 2020. Application of microbial enzymes in degradation and detoxification of organic and inorganic pollutants. Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety. *Industrial Waste and Its Management*, , 41-51.
- Shen, J. Y., Chang, M. S., H., S., & Wu, G., & J. 2012. Simultaneous determination of triclosan, triclocarban, and transformation products of triclocarban in aqueous samples using solid-phase micro-extraction-HPLC-MS/MS. . *Journal of separation science*, 2544-2552.
- Shetty, A., & Gupta, G. 2019. Design Methodologies for Eco-Friendly Pharmaceutical Waste Management - A Review. *Springer International Publishing* , 586-595,.
- Silambarasan, S., & Vangnai, A. S. 2016. Biodegradation of 4-nitroaniline by plant-growth promoting *Acinetobacter* sp. AVLB2 and toxicological analysis of its biodegradation metabolites. *Journal of hazardous materials*, 302, 426-436.
- Sipahutar, M. K., & Vangnai, A. S. 2017. Role of plant growth-promoting *Ochrobactrum* sp. MC22 on triclocarban degradation and toxicity mitigation to legume plants. . *Journal of hazardous materials*, , 329, 38-48.
- Souchier, M., Benali-Raclot, D., Benanou, D., Boireau, V., Gomez, E., Casellas, C., . . . S. 2015. Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry. . *Science of the Total Environment*, 199-205.
- Sutar, R., Motghare, V., Kollur, S.C., Parikh, Y., & Asolekar., S. 2019. Significance of addressing persistence of pathogens and micropollutants to enhance reuse of treated sewages using constructed wetlands *Advances in Waste Management*,. *Springer Singapore*, 355-367,.
- Taweetanawanit, P., Ratpukdi, T., & Siripattanakul, -Ratpukdi, & , S. 2019. Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46. . *Bioresource technology*, 113-119.
- Thelusmond, J. R., Kawka, E., Strathmann, T. J., Cupples, A., & M. 2018. Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. . *Science of the Total Environment*, 1393-1410.
- Tian, H., Ma, J., Y., Li, Y., W., & Wang, J. W. 2018. Efficient degradation of triclosan by an endophytic fungus *Penicillium oxalicum* B4. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 8963-8975.
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., . . . M. 2013. Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp. . *Journal of environmental quality*, 173-178.

- Venkatesan, A. K., Pycke, B. F., B., B., L., Lee, K. E., . . . U. 2012. Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants. *Journal of hazardous materials*,, 229, 29-35.
- Vimalkumar, K., Seethappan, S., & Pugazhendhi, & , A. 2019. Fate of Triclocarban (TCC) in aquatic and terrestrial systems and human exposure. *Chemosphere*, 201-209.
- Vithanage, M., Rajapaksha, A. U., Tang, X., Thiele-Bruhn, S., Kim, K. H., Lee, S. E., & & Ok, Y. S. 2014. Sorption and transport of sulfamethazine in agricultural soils amended with invasive-plant-derived biochar. . *Journal of environmental management*, , 95-103.
- Wang, H., Yun, H., Ma, X., Li, M., Qi, M., Wang, L., . . . & Wang, A. 2022. Bioelectrochemical catabolism of triclocarban through the cascade acclimation of triclocarban-hydrolyzing and chloroanilines-oxidizing microbial communities. *Environmental Research*, 112880.
- Wang, J., & Wang, S. 2016. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review. . *Journal of environmental management*, , 182, 620-640.
- Xu, J. W. 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*, 1299-1305.
- Xu, J., Chen, W., Wu, L., Green, R., Chang, & , A. C. 2009. Leachability of some emerging contaminants in reclaimed municipal wastewater-irrigated turf grass fields. . *Environmental Toxicology and Chemistry An International Journal*, , 1842-1850.
- Yang, Y., Ok, S., Y., Kim, H., K., Kwon, E. E., . . . F., Y. 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 303-320.
- Ye, X., Wong, L. Y., Dwivedi, P., Zhou, X., Jia, T., Calafat, &., . . . M. 2016. Urinary concentrations of the antibacterial agent triclocarban in United States residents: 2013–2014 National Health and Nutrition Examination Survey. . *Environmental science & technology*, 13548-13554.
- Yu, Y., Liu, Y., & Wu, L. 2013. Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 4261-4267.
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Li, X., . . . A. 2020. Fate, risk and removal of triclocarban: A critical review. *Journal of hazardous materials*,, 121944.
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Li, Z., Qi, G., Wang, &., & A. 2017a. Enhanced biotransformation of triclocarban by *Ochrobactrum* sp. TCC-1 under anoxic nitrate respiration conditions. *Current microbiology*, 491-498.
- Yun, H., Liang, B., Qiu, J., Zhang, L., Zhao, . . . and Wang, A. 2017b. Functional characterization of a novel amidase involved in biotransformation of triclocarban and its dehalogenated congeners in *Ochrobactrum* sp. TCC-2. *Environmental Science & Technology*,, 51(1), 291-300.
- Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., & , & Jiang, L. 2020. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. . *Chemical Engineering Journal*,, 125657.
- Zhao, J. L., Zhang, Q. Q., Chen, F., Wang, L., Ying, G. G., Liu, Y. S., Q. 2013. Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: implications for controlling of urban domestic sewage discharge. . *Water research*, , 395-405.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Ziya ALJOUJA
Adres:	Atatürk Üniversitesi
Eğitim	
Lisans:	Kırıkkale üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Arapça:	Pek iyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
MICROBIAL DEGRADATION of TRICLOCARBAN BY <i>Penicillium</i> sp. strain ZA10. (2023) SELCUK 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLIED SCIENCES.	