

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ATIKSU ARITIMI İÇİN ADAPTE AŞI KÜLTÜRÜNÜN
KURU KARIŞIM OLARAK ÜRETİMİ, RAF
ÖMRÜNÜN, BİYOPARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN
SAPTANMASI, VERİMİ EN İYİ OLAN ÜRÜNLERİN
ARITIM SİSTEMİNDE DENENMESİ**

Didem EROĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 01.06.2018

Bornova-İZMİR

2018

Didem EROĞLU tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Atıksu arıtımı için adapte aşı kültürünün kuru karışım olarak üretimi, raf ömrünün, biyoparçalama etkinliğinin saptanması verimi en iyi olan ürünlerin arıtım sisteminde denenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.06.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR

Raportör Üye : Prof.Dr. İsamail KARABOZ

Üye : Prof.Dr. Ataç UZEL

Üye : Prof.Dr. H.Halil BIYIK

Üye : Doç.Dr. Nur Ceyhan GÜVENSEN

The image shows four handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in a cursive, stylized manner. The first signature is the largest and most prominent, followed by three smaller ones below it.

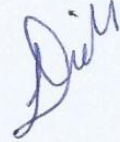
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Atıksu Arıtımı İçin Adapte Aşı Kültürünün Kuru Karışım Olarak Üretimi, Raf Ömrünün, Biyoparçalama Etkinliğinin Saptanması, Verimi En İyi Olan Ürünlerin Arıtım Sisteminde Denenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

01.06.2018

Didem EROĞLU



ÖZET**ATIKSU ARITIMI İÇİN ADAPTE AŞI KÜLTÜRÜNÜN KURU KARIŞIM OLARAK ÜRETİMİ, RAF ÖMRÜNÜN, BİYOPARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN SAPTANMASI, VERİMİ EN İYİ OLAN ÜRÜNLERİN ARITIM SİSTEMİNDE DENENMESİ**

EROĞLU, Didem

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Haziran 2018, 183 sayfa

Sanayinin gelişmesi ile birlikte artan çevresel sorunlar için çözüm yollarına ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle petrokimya sanayisi sonucu oluşan atıkların çevre üzerindeki olumsuz etkisi sucul yaşamdaki organizmaları ve insan sağlığını tehlikeye atmaktadır. Sanayi atıklarının tam olarak veya hiç arıtılmadan ekosisteme salınması, ekosistem üyeleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Atıkların çoğunlukla ksenobiyotik (zor parçalanabilir) yapıda olması ve canlılar üzerinde toksik etki göstermesinden dolayı giderilmesi ve arıtılması gerekmektedir. Bu doktora tez çalışmasında; petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan; tereftalik asit (TA), paratoluik asit (p-tol) ve 4-karboksibenzaldehit (4-cba) kimyasallarını mikrobiyolojik yollarla giderilmesini sağlayan bakterilerle aşı kültürü oluşturulmuştur. 16 organizmadan oluşan aşı kültürü, uygun koruyucularla liyofilize edilerek saklanmış ve yıllık raf ömrü sonunda sürekli karışım tank reaktörü'nde (SKTR) olgunlaştırılan aktif çamur sisteminde denenmiştir. Seçili mikroorganizmaların reaktörde qPCR ile takibi yapılmış ve DGGE ile de mikrobiyal yapı incelenmiştir. TA (40 mg/L), p-tol (40 mg/L) ve 4-cba (30 mg/L) kimyasallarının biyoparçalama oranları belirlenmiş ve %100 giderim 24 saat içerisinde gerçekleşmiştir. Moleküler çalışmalarla *Aeromonas sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Raoultella planticola* ve *Comamonas testosteroni* türlerinin baskın olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Liyofilizasyon, aktif çamur sistemi, petrokimya endüstrisi, DGGE, Real-time PCR.



ABSTRACT**COMPATIBLE MIXTURE LIQUID CULTURE PRODUCT AS DRY MIXTURE FOR WASTEWATER TREATMENT, DETERMINATION OF SHELF LIFE, BIODEGRADATION ACTIVITY AND TRY TO THE MOST YIELD IN WASTEWATER**

EROĞLU, Didem

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

June 2018, 183 pages

With the development of the industry, solutions for increasing environmental problems are needed. Particularly the petrochemical industry has a negative impact on the environment of the resulting wastes, which puts the organisms in aquatic life and human health at risk. The release of industrial wastes into the ecosystem without full or no purification results in adverse effects on ecosystem members. Since wastes are mostly xenobiotic (difficulty degradable) and do not show toxic effects on living organisms, they need to be remedied and treated. In this doctoral thesis; the petrochemical industry is located in wastewaters; Consortium were cultivated with bacteria that allow the removal of terephthalic acid (TA), paratoluic acid (p-tol) and 4-carboxybenzaldehyde (4-cba) chemicals by routes of microbiological. The bacterial consortium was consisted of 16 organisms. It has been lyophilized with appropriate preservatives and tested at the end of the annual shelf life in an activated sludge system cured in a continuous stirred tank reactor (CSTR) of consortium. Selected microorganisms were followed by qPCR and microbiota by DGGE. Biodegradation rates of TA (40 mg/L), p-tol (40 mg/L) and 4-cba (30 mg/L) chemicals were determined and 100% removal was achieved. Molecular studies have shown that *Aeromonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Raoultella planticola* and *Comamonas testosteroni* species dominated.

Keywords: Lyophilization, activated sludge system, petrochemical industry, DGGE, Real-time PCR



TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki başta danışmanım Prof. Dr. Güven Özdemir olmak üzere tüm hocalarıma, çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan 0-22 laboratuvar çalışanlarına, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline, bulunduğum yere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli anne ve babama, canım kardeşim Dinçer'e, varlığını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen müstakbel eşim Basri Aksu'ya teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Bilim İnsanları Destekleme Programları (BİDEB), Yurt içi Sanayiye Yönelik Doktora Burs Programı'na (2211-D) maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim. SANTEZ programı kapsamında 0719-2014 (112D044 TÜBİTAK) no'lu projeye tüm mali desteği sağlayan T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na ve PETKİM Petrokimya Holding A.Ş.'ye, Ege Üniversitesi İdari Mali İşler Daire Başkanlığı Bilimsel Teknik ve Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne (BAP Proje No:2016 FEN-008) finansal desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	..vii
ABSTRACT	..viii
TEŞEKKÜR	..xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	..xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	..xxix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	..xxxiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Petrokimya Endüstrisi Kirliliği.....	3
2.1.1 PTA atık suyu	5
2.1.2 Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH)	8
2.2 Bakteriler Aracılığıyla Kimyasalların Biyoparçalanması.....	8
2.2.1 PTA ve PAH biyoparçalamasında iş gören mikroorganizmalar.....	9
2.3 Mikroorganizmaları Saklama Yöntemleri	11
2.4 Liyofilizasyon	12
2.4.1 Koruyucular	15
2.4.2 Liyofilizasyon işlem basamakları	18

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.3 Liyofilizasyon sonrası saklama koşulları.....	20
2.4.4 Rehidrasyon	21
2.5 Aktif Çamur Sistemi.....	22
2.5.1 Askıda katı madde (AKM)	24
2.5.2 Hidrolik alıkonma süresi (HRT).....	24
2.5.3 Çamur hacim indeksi (ÇHI)	24
2.6 Aktif Çamur Sisteminde Göreceli Üstünlük Diyagramı.....	25
2.7 Kültür Bağımsız Tekniklerle Mikrobiyal Yapının Belirlenmesi	26
2.7.1 Mikrobiyal yapının belirlenmesinde DGGE.....	27
2.7.2 Real-time PCR (RT-PCR) ile kantitatif belirleme.....	31
2.8 Atık Su Toksisitesinin Belirlenmesi	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Materyal.....	39
3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar	39
3.1.2 Mikroorganizmaların üretiminde, sayımında ve biyoparçalama etkinliğini belirlemede kullanılan besiyerleri ve içerikleri	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.3 Liyofilizasyonda kullanılacak koruyucuların hazırlanması.....	42
3.1.4 Liyofilizasyon sonrası rehidrasyon çözeltisi	43
3.1.5 DGGE için poliakrilamid jelin hazırlanmasında kullanacak tampon ve kimyasallar.....	44
3.1.6 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	45
3.2 Yöntem	48
3.2.1 Mikroorganizmaların büyüme eğrisinin oluşturulması	48
3.2.2 Mikroorganizmaların fermentörde üretimi	48
3.2.3 Biyoparçalama etkinliği belirlenen kimyasalların hazırlanması.....	49
3.2.4 Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi.....	49
3.2.5 Liyofilizasyon tekniği, saklama koşulları ve rehidrasyon sıvısı ön denemeleri	50
3.2.6 Liyofilizasyon vial içeriklerinin hazırlanması	51
3.2.7 Liyofilizasyon koşullarının belirlenmesi	54
3.2.8 Liyofilizasyon sonrası viallerin saklama koşulları	55
3.2.9 Liyofilize izolatin reaktivasyonu	56
3.2.10 Ürünlerin Aktif Çamur Sisteminde Denenmesi için SKTR reaktörün kurulumu.....	58
3.2.11 En iyi ürünlerin reaktörde denenmesi.....	60

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.12 İlgili kimyasalların reaktöre eklenmesi	60
3.2.13 Biyoparçalama aktivitesi sonucu kalan son ürünün ekotoksikolojik değerlendirilmesi	60
3.2.14 Genomik DNA izolasyonu	62
3.2.15 DNA saflık kontrolü ve miktar ölçümü	63
3.2.16 Genomik DNA'ların elektroforez ile belirlenmesi	64
3.2.17 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	65
3.2.18 DGGE ile mikrobiyota takibi.....	66
3.2.19 Real-time PCR ile kalitatif ve kantitatif belirleme	68
4. BULGULAR.....	77
4.1 Mikroorganizmaların Petri Görüntüleri	77
4.2 Mikroorganizmaların Büyüme Eğrisi Sonuçları.....	77
4.3 Liyofilizasyon Öncesi - Sonrası Viallerin Ağırlıkları	78
4.4 Liyofilizasyon Tekniği, Saklama Koşulları ve Rehidrasyon Sıvısı Ön Denemeleri Sonucu.....	80
4.5 Liyofilizasyonda Kullanılacak Aşı Kültürünün Liyofilizasyon Öncesi ve Sonrası Canlılık Sayım Sonuçları	83
4.6 Liyofilizasyonda Kullanılan Aşı Kültürünün Liyofilizasyon Öncesi ve Sonrası Biyoparçalama Etkinliği Sonuçları.....	88

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.7 Reaktör Denemesi Biyoparçalama Aktivitesi Sonuçları	114
4.8 Nanodrop ve Agaroze Jel Sonuçları	119
4.9 Microtox Sonuçları	122
4.10 DGGE Görüntüsü ve Sekans Sonuçları	123
4.11 Real-time PCR Sonuçları	130
5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	140
KAYNAKLAR DİZİNİ	156
ÖZGEÇMİŞ	184



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Petrol kazaları sonucu oluşan görüntüler.	3
2.2 Saf Tereftalik asit oluşumu.....	6
2.3 Paraksilen oksidasyonu sonucu TA ve PTA oluşum reaksiyonu	6
2.4 Paraksilen oksidasyonu oluşan ürünler.	7
2.5 Liyofilizasyon işlem basamakları.....	18
2.6 Liyofilizasyon işlem basamakları.....	20
2.7 Konvansiyonel aktif çamur sistemi	22
2.8 Göreceli üstünlük diyagramı	25
2.9 DGGE jeli temsili görüntüsü.....	28
2.10 DGGE aşamaları.....	29
2.11 SYBR Green boyasının çift iplikli DNA'ya bağlanması	32
2.12 TaqMan prob sistemi.....	34
2.13 <i>Alivibrio fischeri</i> 'de quorum sensing mekanizması ve biyoluminesans	36
2.14 <i>Alivibrio fischeri</i> 'nin biyoluminesans fizyolojik mekanizması.....	37
3.1 Aşı kültürünün fermentörde üretimi	39
3.2 Liyofilizasyon viallerinin liyofilizatör içindeki yerleşimi	54
3.3 Liyofilize haldeki ürünler	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 Liyofilize ürün aktivasyonu, canlılığının ve biyoparçalama etkinliği için izlenecek adımlar	58
3.5 Çalışmada kullanılan reaktör prototipi	59
3.6 Microtox M500 cihazı	61
3.7 DGGE sistemi	67
3.8 Tez çalışmasında kullanılan Real-time PCR cihazı	75
4.1 16 izolatın PCA ortamındaki görüntüsü	77
4.2 İzolatların büyüme eğrisi grafikleri	78
4.3 Koruyucu olarak %5 trehaloz içeren viallerin liyofilizasyon sonrası görünümü	81
4.4 Koruyucu olarak sükroz+ yeast içeren viallerin liyofilizasyon sonrası görünümü	81
4.5 Koruyucu olarak skim milk kullanıldığında farklı rehidrasyon sıvılarına bağlı olarak değişen canlılık sayım sonuçları	82
4.6 Koruyucu olarak skim milk kullanıldığında farklı saklama sıcaklığına göre değişen canlılık sayım sonuçları	82
4.7 Skim milk, sükroz ve skim milk + sükroz içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 Trehaloz, skim milk + trehaloz ve sükroz + trehaloz içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları.....	84
4.9 Sodyum glutamat, skim milk + sodyum glutamat ve sükroz + sodyum glutamat içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları.....	85
4.10 Maltodekstrin, skim milk + maltodekstrin ve sükroz + maltodekstrin içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları.....	85
4.11 PVA, skim milk + PVA ve sükroz + PVA içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları.....	86
4.12 Yeast, skim milk + yeast ve sükroz + yeast içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları.....	87
4.13 TA kimyasalına ait standart eğri grafiği	88
4.14 p-tol kimyasalına ait standart eğri grafiği	88
4.15 4-cba kimyasalına ait standart eğri grafiği.....	89
4.16 Mikroorganizma karışımının liyofilizasyon öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu	89
4.17 6. ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vialer ait biyoparçalama sonucu ...	90
4.18 6. ay raf ömrüne ait, sükroz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	91
4.19 6. ay raf ömrüne ait skim milk + sükroz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	92
4.20 6. ay raf ömrüne ait trehaloz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 6. ay raf ömrüne ait skim milk + trehaloz içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	93
4.22 6. ay raf ömrüne ait süktroz + trehaloz içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	94
4.23 6. ay raf ömrüne ait sodyum glutamat içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	95
4.24 6. ay raf ömrüne ait skim milk + sodyum glutamat içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu.....	96
4.25 6. ay raf ömrüne ait süktroz + sodyum glutamat içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu.....	96
4.26 6.ay raf ömrüne ait maltodekstrin içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	97
4.27 6.ay raf ömrüne ait skim milk + maltodekstrin içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	98
4.28 6. ay raf ömrüne ait süktroz + maltodekstrin içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	99
4.29 6. ay raf ömrüne ait skim milk + PVA içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	99
4.30 6. ay raf ömrüne ait süktroz + PVA içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu yeast içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	100
4.31 6. ay raf ömrüne ait yeast içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu yeast içeren vialer ait biyoparçalamaya sonucu	101

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.32 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + yeast içeren vial ait biyoparçalama sonucu	101
4.33 6. ay raf ömrüne ait süktroz + yeast içeren vial ait biyoparçalama sonucu yeast içeren vial ait biyoparçalama sonucu	102
4.34 18. ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vial ait biyoparçalama sonucu	103
4.35 18. ay raf ömrüne ait, süktroz içeren vial ait biyoparçalama sonucu	104
4.36 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + süktroz içeren vial ait biyoparçalama sonucu	104
4.37 18. ay raf ömrüne ait, trehaloz içeren vial ait biyoparçalama sonucu...	105
4.38 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + trehaloz içeren vial ait biyoparçalama sonucu	106
4.39 18. ay raf ömrüne ait, süktroz+ trehaloz içeren vial ait biyoparçalama sonucu	106
4.40 18. ay raf ömrüne ait, sodyum glutamat içeren vial ait biyoparçalama sonucu	107
4.41 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + sodyum glutamat içeren vial ait biyoparçalama sonucu.....	107
4.42 18. ay raf ömrüne ait, süktroz + sodyum glutamat içeren vial ait biyoparçalama sonucu.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.43 18. ay raf ömrüne ait, maltodekstrin ve maltodekstrin + sükroz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	108
4.44 18. ay raf ömrüne ait, maltodekstrin+ skim milk içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	109
4.45 18. ay raf ömrüne ait, yeast + skim milk içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	109
4.46 24. ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	110
4.47 24. ay raf ömrüne ait, sükroz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	111
4.48 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + sükroz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	111
4.49 18. ay raf ömrüne ait, skim milk+ trehaloz içeren vialer ait biyoparçalama sonucu	112
4.50 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + sodyum glutamat içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	112
4.51 18. ay raf ömrüne ait, sükroz + sodyum glutamat içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	113
4.52 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + maltodekstrin içeren vialer ait biyoparçalama sonucu.....	113
4.53 12. ay koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürünün 40 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların SKTR’de biyoparçalama etkinliği sonucu	114

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.54 12. ay koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat kullanılan liyofilize ürünün 40 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların SKTR reaktördeki biyoparçalama etkinliği sonucu	115
4.55 12. ay koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden 100 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu.....	116
4.56 12. ay koruyucu olarak skim milk+ sodyum glutamat kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden 100 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu.....	116
4.57 12. ay koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden yaklaşık 400 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu	117
4.58 12. ay koruyucu olarak skim milk+ sodyum glutamat kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden yaklaşık 400 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu.....	118
4.59 Kontrol reaktörüne ait biyoparçalama sonuçları.....	119
4.60 Universal primerleriyle (11F-1492R) çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	121
4.61 338F-805R primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.	121
4.62 Pozitif kontrol olarak sodyum azidin microtox sonucu	122
4.63 Reaktör çıkış örneklerinin toksisite kontrolünde Microtox sonucu.....	122
4.64 Reaktör örneklerinin DGGE görüntüsü	123

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.65 DGGE sonuçlarına ait filogenetik ağaç	126
4.66 Farklı koruyucularla yapılan liyofilize ürünlerin 1.yıl sonunda bakteriyel yapısına ait DGGE görüntüsü	127
4.67 DGGE görüntüsüne ait filogenetik ağaç	129
4.68 <i>Pseudomonas</i> sp.'e ait qPCR'da oluşturulan standart grafik.....	130
4.69 <i>Acinetobacter</i> sp. 'e ait qPCR'da oluşturulan standart grafik	130
4.70 <i>Micrococcus luteus</i> 'a ait qPCR'da oluşturulan standart grafik	131
4.71 Total bakteri primerine ait qPCR'da oluşturulan standart grafik	131
4.72 <i>Comamonas testosteroni</i> 'ye ait qPCR'da oluşturulan standart grafik.....ait qPCR'da oluşturulan standart grafik.....	131
4.73 <i>Arthrobacter</i> sp.'e ait qPCR'da oluşturulan standart grafik	131
4.74 <i>Aeromonas</i> sp. ait qPCR'da oluşturulan standart grafik.....	131
4.75 <i>Chryseobacterium</i> sp.'ye ait qPCR'da oluşturulan standart grafik	132
4.76 <i>Raoultella planticola</i> 'ya ait qPCR'da oluşturulan standart grafik.....	132
4.77 <i>Pseudomonas fluorescens</i> TaqMan probu kullanılarak qPCR'da oluşturulan standart grafik	132
4.78 Fermentör ve liyofilizasyon vialinde kullanılan optik yoğunluğu (OD) ayarlanmış sıvıdan alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi.....	133

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.79 Liyofilize ürün olarak skim milk'in kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi..	134
4.80 Liyofilize ürün olarak skim milk + sodyum glutamat'ın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi.....	136
4.81 Kör reaktörüne ait sonuçlar.....	137
4.82 24.ay vial içeriklerinin nutrient ortamında üremesinin ardından yapılan Real-time PCR sonuçları	138
4.83 Biyoparçalama süresi ile canlılık sayımı ilişkisi.....	139



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Dünyada meydana gelen büyük petrol kirlilikleri	4
2.2 PTA biyoparçalaması ile ilgili yapılan çalışmalar	10
2.3 PAH biyoparçalaması ile ilgili yapılan çalışmalar	11
2.4 Liyofilizasyon çalışmasında kullanılan koruyucular	17
2.5 Farklı rehidrasyon sıvılarının kullanıldığı çalışmalar	21
2.6 Aktif çamur bakterileri	23
3.1 Çalışmada kullanılan izolatlara ait izolat kodu ve aksesyon numaraları	39
3.2 Plate Count Agar içeriği.	41
3.3 Nutrient Broth İçeriği... ..	42
3.4 Bushnell Haas Broth içeriği.....	42
3.5 Koruyucuların stok konsantrasyonları ve sterilizasyon koşulları.....	43
3.6 Phosphate Buffer Saline (PBS) Tampon Solüsyonu..	43
3.7 50X TAE içeriği	44
3.8 %40 AB stok kimyasalı bileşenleri.....	44
3.9 %0 denatüran içeriği.....	45
3.10 %40-60 denatüran içerikleri	45

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.11 Liyofilizasyon vial içerikleri	52
3.12 Liyofilizasyon viallerine ait kodlamalar.....	53
3.13 Liyofilizasyon koşulları.....	55
3.14 Yapay atık su içeriği.....	59
3.15 Reaktörde çalışılan kimyasal ve miktarları	60
3.16 PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları.....	65
3.17 Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri	66
3.18 Real-time PCR'da kullanılacak primer setleri ve dizileri.....	69
3.19 Real-time PCR'da SYBR Green Ampliqon kiti ile yapılan primerlere ait PCR protokolü	70
3.20 TaqMan probu ile gerçekleştirilen PCR protokolü.....	73
3.21 SYBR Green için kullanılan kite ait PCR bileşenleri ve miktarları	73
3.22 TaqMan probu için kullanılan kite ait PCR bileşenleri ve miktarları	74
4.1 Vial içeriğine göre liyofilizasyon öncesi- sonrası ortalama ağırlıkları ve ağırlık kaybının yaklaşık yüzdesi	79
4.2 Freeze-drying ve liquid-drying teknikleri ile liyofilize örneklerin 1 aylık raf ömrüne ait canlılık sonuçları	80
4.3 DNA izolasyonları sonucu 16 izolatın nanodrop sonuçları.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

4.4	Reaktör örneklerinden yapılan DNA izolasyonları sonucu nanodrop sonuçları.....	120
4.5	DGGE örnekleri.....	124
4.6	DGGE bantlarına ait organizmalar ve benzerlik oranları	125
4.7	DGGE bantlarına ait organizma isimleri ve benzerlik oranları	128



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİKısaltmalar

PTA	Saflaştırılmış tereftalik asit
TA	Tereftalik asit
4-cba	4 karboksibenzaldehit
p-tol	Paratoluik asit
PAH	Poliaromatik hidrokarbonlar
PBS	Fosfat Tamponu
DMT	Dimetil tereftalat
qPCR	Real-time PCR
DGGE	Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi
SKTR	Sürekli Karıştırılmalı Tank Reaktör
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
PCA	Plate Count Agar
BA	Benzoik asit
PET	Polietilen tereftalat
DMSO	Dimetilsülfoksit
PVC	Polivinil klorür



1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaşamın devamı için gerekli en temel doğal kaynaklardan biri su'dur. Nüfusun artmasıyla birlikte su ihtiyacı da artmakta, hatta dünya üzerinde bir çok yerde su kıtlığı yaşanmaktadır (Ingaramo et al., 2009; Yadav and Garg, 2011; Gibson et al., 2012; Garg and Prasad, 2017). Kurak bölgelerde, insanlar içme suyu için güvenli su kaynağı bulamamaktadır (Garcia et al., 2013; Maretto et al., 2014; Garg and Prasad, 2017). Canlıların yaşamının kalitesiyle, suyun kalitesinin doğru orantılı olması sebebiyle çevre bilincine sahip insanlara düşen görev de mevcut suyu korumak ve su kaynaklarının kirlenmesine engel olmaktır.

Artan kentleşme ve sanayileşme, artık suyun kendi kendini temizleyememesi sonucunda çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Mohan et al., 2008). Enerji ve yakıt endüstrisinde kullanılan petrol ve petrol türevi ürünlerin atık sulara karışması çevre kirliliğine sebep olan en önemli etmenler arasındadır. Çevreye verdiği zararın yanı sıra insan sağlığı açısından düşünüldüğünde, petrol ve türevi bileşiklerin hemen hepsinin başta karsinogenik ve mutajenik özelliğe sahip olmasının yanında birçok fizyolojik ve metabolik rahatsızlığa neden oldukları bilinmektedir (Pinyakong et al., 2003; Matsumata et al., 2008; Peng et al., 2008). Günlük hayatta kullanılan bazı boya, plastik, yapıştırıcı gibi ürünlerin ise yine petrokimya endüstrisi ürünleri olduğu düşünülürse sağlık açısından tehdit altında olduğumuz yadsınamaz bir gerçektir. Özellikle saflaştırılmış tereftalik asit (PTA) endüstrisine ait atık su, belirli konsantrasyonlarda canlılara zararlı olmaktadır. Bu nedenle, bu tarz toksik bileşiklerin doğadan uzaklaştırılmasında gerekli çalışmaların yapılması ve önlemlerin alınması gerekliliği gün geçtikçe artmaktadır (Garg et al., 2014).

Mikroorganizmaların çeşitli çevresel kirleticilerle kontamine olmuş yerlerdeki kirleticileri parçalayabildiği uzun zamandır bilinmektedir. Organik kirleticilerin çevre için daha zararsız metabolitlere dönüştürülmesi veya karbondioksit ve suya kadar parçalanması "biyoparçalama" olarak adlandırılmaktadır (Alexander, 1999; Seo et al., 2009; Das ve Chandran, 2011). Fiziksel veya kimyasal arıtmaya göre birçok avantajı olmasından dolayı, günümüzde kirlenmiş alanların temizlenmesinde mikroorganizmaların kullanılmasıyla ilgili çalışmalar gitgide artmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde de biyolojik arıtmada iş gören mikroorganizmalar, çeşitli saklama yöntemleriyle paketlenmiş olarak satın alınmakta ve belirli aralıklarla aktif çamur sistemine eklenmektedir. Bu ihtiyaç doğrultusunda elde edilen bakterilerin raf ömrünün uzatılması ve belirli raf ömrü sonunda da biyoparçalama etkinliğini koruması gerekmektedir.

Tez çalışmasında tereftalik asit (TA), paratoluik asit (p-tol) ve 4 karboksibenzaldehit (4-cba) kimyasallarını parçalama yeteneğine sahip organizmalar ile birlikte poliaromatik hidrokarbonları (PAH) parçalama yeteneğine sahip organizmaları içeren aşî kültürü kullanılmıştır. Aşî kültürünün, raf ömrünün uzatılması amacıyla uygun koruyucularla liyofilize edilerek saklanması, 1.3.6.9.12.15.18. ve 24. ay sonunda canlılıklarının belirlenmesi ve raf ömrü sonunda p-tol, 4-cba ve TA kimyasallarını biyoparçalama etkinliği çalışılmıştır.

Tez çalışmasında, sürekli karışimli tank reaktörüne (SKTR), PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. atık su arıtım tesisinden alınan aktif çamur içindeki yerli mikrobiyal yapıya ilave olarak liyofilize bakteriyel karışım eklenerek belirli aralıklarla örnek alınması, “Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)” yardımı ile mikrobiyal yapının izlenmesi gerçekleştirilmesi, ve mikroorganizmaların, “Real-time PCR” (qPCR) ile aktif çamur sisteminde takibinin yapılması ve gerçek sistemde hedef kimyasalların Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile biyoparçalama etkinliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Petrokimya Endüstrisi Kirliliği

Petrokimya endüstrisi, sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG), gaz yağı, benzen, dizel, plastik, lastik ve elyaf gibi birçok maddeyi üreten; büyük ölçekli, sermaye ve teknolojinin yoğun olarak kullanıldığı bir sektördür. Büyük çapta üretimin sonucunda tahmin edilemez ölçüde atık meydana gelmekte ve arıtımı düzgün bir şekilde gerçekleşmezse malesef bu atıklar doğaya salınmaktadır.

Petrol taşınımı, salınımı veya birçok sebepten oluşan kirlilik çevreye ve insan sağlığına önemli ölçüde zarar vermektedir. Bu kontaminasyonların ana kaynağı petrokimya endüstrileri, petrol fabrikaları, yağ tesisleri, akaryakıt dağıtım ve depolama birimleri gibi yerlerdir. 2010 yılında Meksika Körfezi'ndeki Deepwater Horizon petrol platformundaki patlama sonucu büyük ölçüde petrol denize yayılmıştır. Petrol sızıntısı ABD'nin son dönemde gördüğü en büyük çevre felaketi olarak yüzlerce balığı, kuşu ve diğer canlıların yaşamsal faaliyetlerine etki etmiştir. Yaşanan petrol sızıntılarının çevre üzerinde oluşturduğu etki sadece hayvanların yaşam alanlarını değil, insanlar için büyük önem taşıyan ekosistemin de zarar görmesine neden olmuştur (Ceyhan ve Esmeray, 2012; Schaum et al., 2010). Şekil 2.1'de Petrol kazaları sonucu oluşan görüntüler verilmiştir.



Şekil 2.1 Petrol kazaları sonucu oluşan görüntüler (The big pictures

http://www.boston.com/bigpicture/2010/05/disaster_unfolds_slowly_in_the.html)

Kazaların özellikle Avrupa kıtasında yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak dünyada petrol kirliliği mücadelede anlayışını değiştiren kaza Amerika’da meydana gelen Exxon Valdez tanker kazasıdır. Türkiye’den iIndependenta tanker kazası büyük petrol kirliliği kazası olarak kayıtlara girmiştir. Çizelge 2.1’de dünyada meydana gelen büyük petrol kirlilikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Dünyada meydana gelen büyük petrol kirlilikleri
(<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>)

Tanker Adı	Yıl	Petrol dökülen yer	Ton
Atlantic Empress	1979	Batı Hint Adaları,	287 000
ABT Summer	1991	Angola açıkları	260 000
Castillo de Bellver	1983	Güney Afrika	252 000
Amoco Cadiz	1978	Fransa	223 000
Haven	1991	Genona, İtalya	144 000
Odyssey	1988	Kanada	132 000
Torrey Canyon	1967	Birleşik krallık	119 000
Urquiola	1976	İspanya	100 000
Hawaiian patriot	1977	Honolulu açıkları	95 000
Independenta	1979	İstanbul Boğazı, Türkiye	94 000
Jacob Maersk	1975	Portekiz	88 000

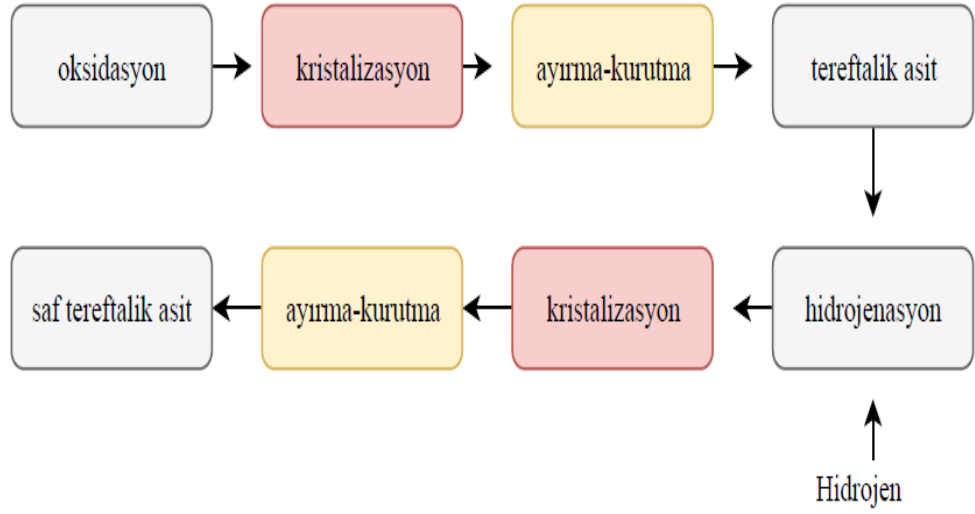
Braer	1993	Birleşik krallık	85 000
Aegean sea	1992	İspanya	74 000
Sea empress	1996	Milford Haeven	72 000
Khark 5	1989	Morocco	70 000
Nova	1985	İran	70 000
Katina	1992	Mozambique	67 000
Prestige	2002	İspanya	63 000
Exxon Valdez	1989	Alaska ,ABD	37 000
Hebei spirit	2007	Güney Kore	11 000

2.1.1. PTA Atık suyu

Tereftalik asit (TA), sentetik ürünlerin yapımında kullanılan saflaştırılmış tereftalik asit (PTA) ve dimetil tereftalat (DMT) en önemli başlangıç materyalidir. PTA ve DMT, dünya çapında en çok üretilen 50 kimyasalın arasında yer almaktadır. PTA sıklıkla, polietilen tereftalat (PET) şişelerinin imalatında kullanılmaktadır. Diğer uygulamalar arasında tekstil lifleri ve fotoğraf ve ambalaj alanlarında kullanılan filmler vardır (Kleerebezem et al., 2005).

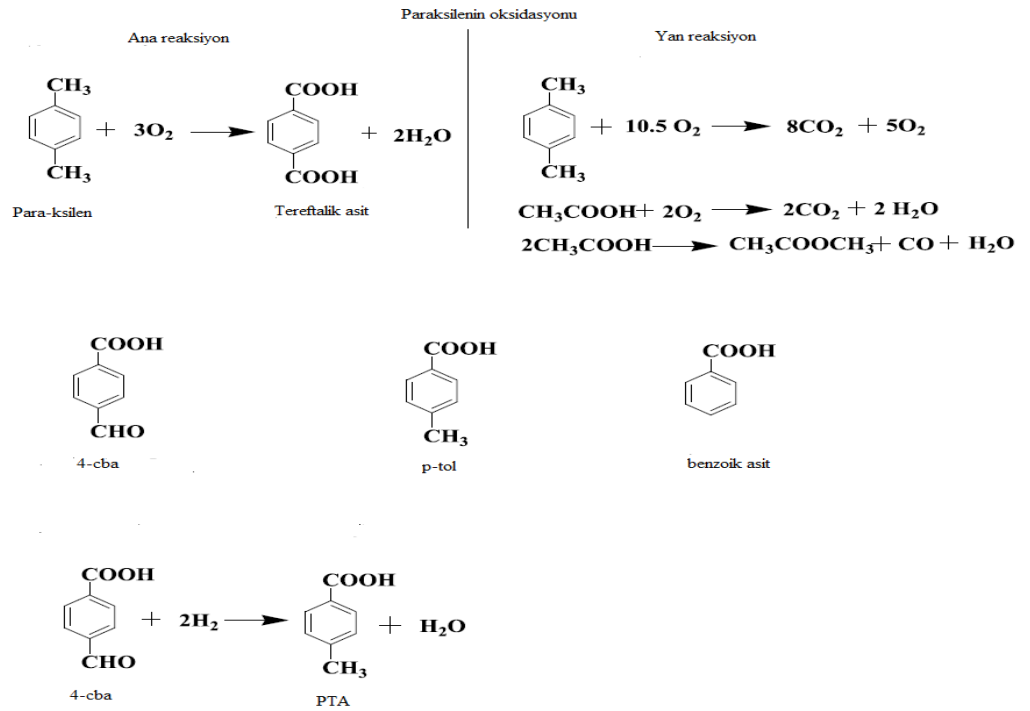
PTA üretimi p-ksilenin oksidasyonu sonucu gerçekleşir. Kobalt asetat asetik asit ortamında sodyum bromür (NaBr) ya da hidrojen bromür (HBr) ile desteklenerek katalizör olarak kullanılır. Elde edilen TA, hidrojenasyon işlemi sonrası PTA üretilir. Paraksilen oksidasyonu sonucu oluşan TA ve PTA oluşumu şekil 2.2' de gösterilmiştir. (Petkim, 2016; Wende et al., 2013; Verma et al., 2011; Garg and Prasad, 2017).

Paraksilen
Asetik asit
Katalizör: Hava



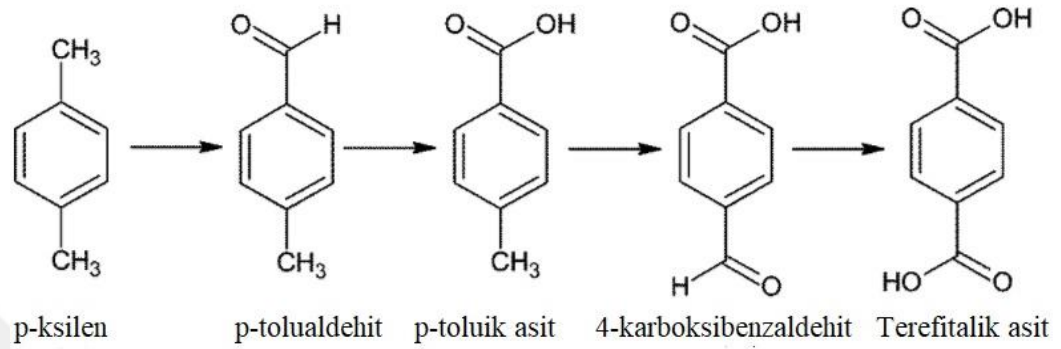
Şekil 2.2 Saf Tereftalik asit oluşumu (Wende et al., 2013)

Şekil 2.3’de paraksilenin TA oluşumu kimyasal formülü, p-tol, 4-cba kimyasal formülleri ve 4-cba’dan PTA oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Paraksilen oksidasyonu sonucu TA ve PTA oluşum reaksiyonu (Garg and Prasad, 2017; Verma et al.,2011)

TA, p-ksilenin yükseltgenmesinden elde edilir. Şekil 2.4’de p-ksilenin oksidasyonu sonucunda oluşan TA ve ara metabolitler gösterilmiştir (Raghavendrchar and Ramachandran, 1992; Tomas et al., 2013). Bu üretim sırasında 4-formilbenzoik asit ve p-toluik asit yan ürün olarak elde edilir (Macarie et al., 1992).



Şekil 2.4 Paraksilen oksidasyonu oluşan ürünler (Zuo et al., 2010)

p-toluik asit, PTA atıksularının başlıca kirleticilerindendir. Anaerobik biyoreaktörlerde parçalanabilmekte ve birçok çalışma günümüzde yapılmaktadır.

PTA atık sularında bulunan kimyasallar, konsantrasyon olarak azalan sırayla; tereftalik asit (TA) , asetik asit (AA), benzoik asit (BA) ve p-toluik asit’tir (p-tol). Aynı zamanda trimetilik asit, orto ve izoftalik asit ve 4- karboksibenzaldehit gibi benzen türevleri de PTA atık sularında yer almaktadır (Cheng et al., 1997; Kleerebezem et al., 1997; Razo et al., 2006).

Tereftalik asit bu kimyasallar arasında, arıtımı en çok çalışılan kimyasaldır. Ftalik asit izomeri olan TA’nın bu kadar çalışılmasının sebebi, dünyada en çok üretilen 50 kimyasal arasına olmasıdır (Weber, 1984). TA kimyasalının su, hava gibi çevrelerde bulunması ve bunun sonucu olarak insan sağlığı üzerine etkileri araştırılmıştır (Teil et al., 2006). TA, canlılar üzerinde akut-kronik toksik, böbrek yetmezliği, endokrin sistemi ve üreme sistemi fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu ve kanserojen olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Dai et al., 2005). Bu gibi olumsuz etkilerinden dolayı TA kimyasalının çevresel sistemden uzaklaştırılması kaçınılmazdır.

2.1.2. Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH)

PAH'lar; iki ya da daha fazla benzen halkasına sahip aromatik kimyasallardır (Cheung and Kinkle, 2001). İki ve üç halkalı yapılar düşük molekülü, üçten fazla halkalı ise yüksek molekülü PAH olarak sınıflandırılmaktadır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA-United States Enviromental Protection Agency) tarafından aralarında piren, asenaftan, floren ve floranten'inde bulunduğu 16 adet PAH öncelikli olarak belirlenmiştir. PAH'lar dayanıklı kimyasallar olup doğada uzun yıllar kalmaktadır. Bazılarının toksik olmasına bağlı olarak; teratojenik, mutajenik ve karsinojenik olarak tanımlandıklarından dolayı aromatik bileşikler çevresel sorun teşkil etmektedirler (U.S. EPA,2002; Pierra vd., 2006;Doyle et al., 2008; Singh et al., 2015).

PAH'larla kontamine olmuş çevreleri iyileştirmek için biyolojik arıtım tercih edilmektedir. Kirleticilerin giderimi, arıtım verimi ve ekonomik olması açısından biyolojik arıtımın başarılı olduğu görülmüştür. Fiziksel kimyasal veya diğer tekniklerin maliyeti, biyolojik arıtmadan pahalıdır ve çevreye zararlı olma ihtimali mevcuttur (Wilson and Jones, 1993).

2.2. Bakteriler Aracılığıyla Kimyasalların Biyoparçalanması

Biyoparçalama, yerli veya yerli olmayan mikroorganizmalar kullanılarak zararlı kimyasalların tamamen parçalanması ya da farklı ürünlere dönüştürmesi olarak tanımlanmaktadır. Biyoparçalama sonucu kimyasal, karbondioksit (CO_2), inorganik tuzlar, mikrobiyal biyomas gibi başlangıçtaki kimyasaldan daha az zararlı kimyasallara dönüşebilmektedir. Ortamda bulunan besin, oksijen, pH, kirletici konsantrasyonu, kimyasalın parçalanabilirliği gibi birçok etken biyoparçalamanın duyarlılığına etki etmektedir (Boopathy, 2000; Margesin et al., 2001; Brassington et al., 2007; Gargouri et al., 2014).

Yerli mikrobiyal yapıya ait mikroorganizmalar ile biyoparçalama; petrol veya diğer hidrokarbonlarla kirlenmiş çevreyi temizlemede ilk sırada tercih edilen yöntemdir. Biyolojik arıtım veya biyoremediyasyon; fiziksel veya kimyasal arıtmaya göre ucuz ve tercih edilen bir uygulamadır (Juhasz et al.,2000).

Biyoparçalama, aerobik veya anaerobik olarak gerçekleştirilmektedir. Yerli flora ve kimyasala bağlı olarak yapılan birçok aerobik ve anaerobik çalışma mevcuttur (Fajardo et al., 1997; Boshui et al., 2012).

Rhodococcus sp., *Acinetobacter* sp., ve *Pseudomonas* sp. karışık kültürleri kullanılarak floren, fenentran ve piren karışımını 1000 mg/L oranında içeren ortamlar kullanılarak biyoparçalama etkinliği ölçülmüştür. 30 gün sonunda floren %96, fenantren %97, piren ise %20 oranında parçalanmıştır (Yu et al., 2005).

Biyoparçalamayla ilgili başarılı ve güncel örnek; Kyoto Teknoloji Enstitüsünden bir grup araştırmacı küresel plastik kirliliğine engel olmak amacıyla, plastiği parçalayabilen mikroorganizmaları çalışmışlardır. Araştırmacılar PET kirliliğinin olduğu atık sularından elde ettikleri mikroorganizmaların PET üzerinde parçalayıcı etki gösterip göstermediğini araştırmışlardır. PET üzerinde parçalayıcı etki gösteren mikroorganizma; “*Ideonella sakaiensis*” adını verdikleri bakteriyi bulmuşlardır. Bu organizma PET’i temel enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Daha önce sadece birkaç mantar türünde PET’i parçalama özelliği görülmüş, fakat bu çalışmaya kadar, bu özellikte herhangi bir mikroorganizma elde edilmemiştir. Üstelik *I. sakaiensis* PET’i daha önce biyoparçalama etkinliği bilinen mantar türlerinden çok daha etkin şekilde parçalamaktadır. *I. sakaiensis*’in PET’i farklı iki enzim kullanarak parçaladığını ortaya çıkarmışlardır. PETaz adını verdikleri enzim PET’i parçalayarak ara ürün olan MHET’e (mono(2-hidroksietil) terefalik asit) dönüşmüştür. MHETaz olarak adlandırdıkları bir diğer enzimse MHET’i parçalayıp PET’in monomerleri olan tereftalik asite ve etilen glikole dönüşmüştür. (Yoshida et al., 2016). Yıllarca varlığını sürdüren en büyük çevresel kirliliklerden biri olan plastiğin biyoparçalama yolu ile yok edilebileceği bu tarz araştırmalara yön vermiş ve araştırmacıları, çevremize iyi bakmanın yollarını araştırmaya sevk etmiştir.

2.2.1. PTA ve PAH biyoparçalasında iş gören mikroorganizmalar

Kirlenmiş çevrelerde bulunan yerli mikroorganizmalar, şüphesiz ortam sıcaklığı, pH, fizikokimyasal şartlar ve besin koşullarına adapte olmuştur. Yerli mikroorganizmalar ile hidrokarbon parçalama yeteneğine sahip kontamine

çevrelere yapılan uygulama (biyoaugmentasyon) geniş oranda çalışılmaktadır (Semple et al., 2007).

PTA kimyasalları biyoparçalamasında iş gören çeşitli mikroorganizmalar mevcuttur. PTA kimyasalları arasında biyoparçalama etkinliği en çok çalışılan kimyasal TA'dır. Bu çalışmalardan bazıları çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 PTA biyoparçalaması ile ilgili yapılan çalışmalar

Mikroorganizmalar	Biyoparçalama etkinliği çalışılan kimyasallar	Referanslar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PP4	TA	Vamsee-Krishna et al., 2006
<i>Comamonas testosteroni</i> YZW-D	TA	Wang et al., 1995
<i>Arthrobacter</i> sp.	TA	Zhang et al., 2013
<i>Comamonas testosteroni</i> T-2	p-tol	Locher et al., 1991
<i>Pseudomonas putida</i>	p-tol	Schwartz and Bar, 1995
<i>Pseudomonas</i> sp.	TA	Aksu, 2018
<i>Bacillus</i> sp.	TA	Karegoudar and Pujar, 1985

Tereftalik asitle ilgili yapılan biyoparçalama çalışmasında aerobik ile anaerobik ortamlarda çalışma yapılmıştır. Aerobik organizmalar; tereftalik asiti, tereftalat 1,2 dioksijenazlar ile dihidroksi- 3,5 sikloheksidin- 1,4 dikarboksilik asite dönüştürmekte ve sonrasında protokatekuata dönüştürüp yol izine devam etmektedir. Tereftalik asitin anaerobik organizmalar tarafından parçalanma yol izinde ise TA, benzoik asite dönüşür ve 4 hidroksibenzoata dönüşüp yine protokatekuata dönüşmektedir (Liang et al., 2008).

Petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan diğer zararlı kimyasallar ise PAH'lardır. Günümüze dek birçok çalışmada PAH kimyasallarının farklı bakterilerle parçalanması çalışılmıştır. PAH biyoparçalama yeteneğine sahip farklı

mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas* türleri, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Burkholderia* gibi farklı bakterilerin olduğu gözlenmiş ve yapılan çalışmalardan bazıları Çizelge 2.3’de gösterilmiştir (Seu et al.,2009).

Çizelge 2.3 PAH biyoparçalaması ile ilgili yapılan çalışmalar

Mikroorganizmalar	Biyoparçalama etkinliği çalışılan kimyasallar	Referanslar
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Floranten	Weissenfels et al., 1990
<i>Acidovorax delafieldii</i> P4-1	Fenantren	Samanta et al., 1999
<i>Arthrobacter sulphureus</i> RKJ4		
<i>Burkholderia cepacia</i> BU3	Fenantren, Naftalen, Piren	Kim et al., 2003
<i>Mycobacterium</i> sp JS14	Floranten	Lee et al., 2007
<i>Pseudomonas vesicularis</i> OUS82	Floren	Weissenfels et al., 1990
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Piren	Kazunga and Aitken, 2000
<i>Pseudomonas saccharophila</i>		

2.3. Mikroorganizmaları Saklama Yöntemleri

1799 yılında Dr. Carro çiçek aşısını ipliklere emdirerek 1 yıl saklamış ve bu süre sonunda aşının etkinliğini koruduğunu görmüştür. Bu uzun süre saklama yöntemlerinin başlangıcı olarak bilinmektedir (Halkman ve Doğan, 2000). Kültürleri korumanın temel prensibi canlılığını ve etkinliğini kaybetmeden mikroorganizmayı saf halde ve uzun süre canlı tutmaktır, Birçok saklama yöntemi mevcuttur. Bunlardan bazıları;

- ✓ Kurutma
- ✓ Dondurma
- ✓ Sıvı içinde saklama

- ✓ Mikroenkapsülasyon
- ✓ Liyofilizasyon'dur.

Mikroorganizmaları saklamada en uygun yönteme karar verirken, uzun süre saklanabilir, taşınımı kolay ve ucuz olması önemlidir (Melin et al., 2007). Mikroorganizmaları, sıvı karışım halinde saklama yöntemine göre kuru karışım olarak saklanması paketleme, taşıma ve depolanması yönünden birçok avantajı vardır.

Mikroorganizmaların kuru karışım olarak saklanması, freeze-drying, vakum drying, fluidized bed drying ve spray drying gibi yöntemleri içerir. Freeze-drying yöntemi bakteri, maya ve sporlu fungusların saklanması en sık kullanılan ve başarılı olan bir yöntemdir (Larena et al., 2003; Tang and Pikal, 2004; Zhan et al., 2011). Özellikle laktik asit bakterileri starter kültürü saklanmasında freeze-drying yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (Kearney et al., 1990)..

2.4. Liyofilizasyon

Organik maddelerden vakumla birlikte suyun uzaklaştırılması sürecini tanımlayan liyofilizasyon, kültürlerin uzun dönem canlılığını koruması için en çok tercih edilen metottur. Liyofilizasyon ile belirli basınç altında, dondurulmuş haldeki solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması ile biyolojik maddeler ve gıdalar, bozulma meydana gelmeden uzun süre saklanabilmektedir (Nireesha et al., 2012).

Mikroorganizmaların canlılığını yıllarca korumak için, kültür koleksiyonları liyofilizasyon yöntemiyle saklanmaktadır. Kültür koleksiyonları dışında; biyolojik olmayan ürünler; enzimler, hormonlar, antibiyotikler, vitaminler, kan ürünleri, antikorlar, inaktif aşılar, ayrıca cerrahi veya tıbbi amaçla kullanılan vücut dokuları, canlı organizmalar (yeniden sulandırıldıklarında büyüme ve çoğalması istenen hücreler, örneğin bakteriler, mantarlar ve canlı viral aşılar) araştırmalarda kullanılacak dokular ve hatta sudan zarar görmüş kitaplar, teksirler, arkeolojik numunelerin korunması ya da müzede sergilenecek bitki veya hayvan numuneleri liyofilize edilerek saklanabilmektedir (Rightsel and Grieff, 1967; Rudge, 1984; Ergün, 2015).

Kurutma teknolojisinin geniş çaplı kullanımı, mikroorganizmaların kurutulmasında farklı yöntemlerin gelişmesini sağlamıştır. Birçok faktörün liyofilizasyona etkisi incelenmiştir. Liyofilizasyon tekniğinde bakteriyal hücrelerin geri kazanımında birçok unsur önem arz etmektedir. Bunlar; gelişme faktörleri, kullanılan koruyucu, başlangıç hücre konsantrasyonu, dondurma aşamasındaki dondurma sıcaklığı, rehidrasyon sıvısı ve rehidrasyon koşullarıdır (Sinha et al. 1982; Font de Valdez et al., 1983; Bozoglu et al., 1987; Sanders et al., 1999; Palmfeldt and Hahn-Hagerdal 2000).

Liyofilizasyon öncesi dondurma aşamasındaki düşük sıcaklık, freeze-drying sürecinde çok önemli bir faktördür. Eğer sıcaklık azalması yavaş ise hücre içindeki su, ozmos ile hücre dışına çıkmaktadır. Bu durumda hücre dışında buz kristallari oluşumuna sebep olmaktadır. Bu buz formu hücre dışındaki su olarak ortadan kalktığında koruyucuların konsantrasyonu artmakta ve ozmotik dengesizlik oluşturmaktadır. Tam tersi, dondurma aşamasında, sıcaklık değişimi hızlı bir şekilde olursa hücre içinde buz kristallari oluşmakta ve bu durumda hücre içinde kalan buz kristalleri hücreye öldürücü etki yapmaktadır. Bu nedenle dondurma aşamasındaki seçilecek sıcaklık ve düşüş zamanı çok önemlidir. Ayrıca optimum dondurma sıcaklığında bir genustan bir diğerine farklılık göstermektedir (Champagne et al., 1991; Sanders et al., 1999).

Liyofilizasyonda dondurma aşamasından sonra süblimasyon ile su buharını alarak kurutma işlemi mevcuttur. **Freeze-drying** yönteminde dondurma işlemi önceden yapılmakta fakat **liquid-drying** tekniğinde ise doğrudan vakum altında tutarak materyalin donması da sağlanmaktadır. Liquid-drying, donma işleminden zarar gören mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Fakat bu teknikte materyal direk sıvı halden vakumla suyu çekilirken daha fazla zarar gördüğü de belirlenmiştir.

Freeze-drying, endüstriyel ve bilimsel araştırmalarda bakterilerin saklanması için çoğunlukla kullanılan yöntemdir. Uygun saklama koşullarının olması, kuru halde az hacim ile taşımada avantaj sağlaması gibi birçok parametre mevcuttur (Souzo, 1992). Uzun süre saklayabilmek için kullanılan bu yöntemde dondurma ve

kurutma aşamaları hücrelere zarar vermektedir (Tsvetkov, 1983). Freeze-drying'in hücreye verdiği zarar tüm mikroorganizmalarda aynı etkiyi göstermemektedir.

Freeze-drying için önemli kriterler aşağıda verilmiştir (Bozoğlu et al., 1987; Costa et al., 2000; Palmfeldt et al., 2003).

- ✓ Gram negatif/ pozitif olması
- ✓ Bakterilerin büyüme fazı
- ✓ Koruyucu çeşidi
- ✓ Dondurma oranı
- ✓ Freeze-drying parametreleri
- ✓ Rehidrasyon sıvıları
- ✓ Başlangıç hücre konsantrasyonu

Gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilere kıyasla dondurma- kurutma aşamasındaki zararlı etkilerden daha az etkilenmiş ve canlılıkları daha yüksek olmuştur (Miyamoto-Shinohara et al., 2000).

Liyofilizasyonla, uzun dönem canlılığı korumak için 10^8 'den daha fazla hücre süspansiyonu içermesi gerekmektedir (Miyamoto-Shinohara et al., 2000; Costa et al., 2000; Morgan et al., 2006).

Bakterilerin büyüme fazları arasında bakteri türüne göre farklılık göstermektedir. Ama genellikle eksponensiyel faz yerine stasyoner faz tercih edilir. Büyümesinin stasyoner fazında olan bakteriler ile freeze-drying yapıldığı zaman daha fazla canlılık elde edilmiştir (Potts, 1994).

Freeze-drying yönteminde kullanılan koruyucular, freeze-drying zararından önler. Saklanma koşullarını stabilizasyonunu sağlar ve rehidrasyonu kolaylaştırır. Yaygın olarak kullanılan koruyucular arasında; indirgeyici olmayan disakkaritler; şekerler, alkoller, polisakkaritler, aminoasitler, proteinler ve skim milk gibi kompleks bileşikler vardır (Font de Valdez et al., 1983).

Başlangıç hücre konsantrasyonunun arttırılmasıyla, freeze-drying'te canlı kalan hücre sayısında artmıştır. Minimum başlangıç konsantrasyonunda 10^7 olarak belirlenmiştir (Simione and Brown, 1991).

2.4.1. Koruyucular

Biyolojik dokuları ve hücreleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyan maddeler kriyoprotektan (koruyucu) olarak adlandırılır. Freeze-drying yönteminde; liyofilizasyon süreci boyunca hücrelerin korunması, saklanması ve tekrar canlandırılması aşamasında koruyucular çok büyük önem arz etmektedir. Çeşitli polyoller, polisakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler, aminoasitler, protein hidrolizatları, proteinler, mineraller, organik asit tuzları ve vitamin kompleks ortamları mikroorganizmaları koruma yeteneğinin araştırılması için çalışılmıştır. Bununla birlikte tüm bu koruyucular iyi bir koruyucu olmamakla birlikte aynı zamanda mikroorganizmanın türüne bağlı olarakta koruyuculuğu değişmektedir (Berny and Hennebert, 1991; Palmfeldt et al., 2003; Martos et al., 2007; Zhan et al., 2011).

Yağsız skim milk, trehaloz, dekstran, polietilen glikol, süktroz, glukoz gibi çeşitli koruyucular freeze-drying çalışmalarında kullanılmıştır (Hubalek, 2003). Bu koruyucular genel anlamda internal ve eksternal koruyucular olarak 2'ye ayrılmaktadır.

İnternal kryoprotektanlar: İnternal koruyucular etkilerini, hücre zarından içeriye girerek göstermektedir. Hücre sitoplazmasından geçebilme özelliğine sahiptirler. Koruyucu etkileri; donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Holt, 2000). Dimetilsülfoksit (DMSO), etilen glikol, formamide gliserol internal kryoprotektanlar arasındadır. Gliserol hücreler için DMSO'dan daha az toksik olmasına rağmen çalışmalarda daha çok DMSO tercih edilmektedir. Çünkü DMSO, gliserole göre hücre içine daha hızlı diffüze olabildiğinden daha yüksek koruyucu özelliğe sahiptir (Anchordoguy et al., 1991; Rinkes et al., 1992; Bucak ve Tekin, 2007).

Bakterilerin saklanması için kullanılan internal kriyoprotektanlar arasında gliserol, genellikle diğer koruyucularla birlikte kullanıldığı gibi tek başına kullanıldığı nadir çalışmalarda mevcuttur. *Pseudomonas fluorescens* BTP1 ile yapılan bir liyofilizasyon çalışmasında koruyucu olarak gliserol ve maltodekstrin kullanılmış ve +4°C’de saklanan bakteri, 7 ay sonunda %2’lik gliserol kullanıldığında canlılığında, 1 logluk bir azalma gözlenmiştir (Jean-Noel et al., 2012).

Eksternal kriyoprotektanlar: Eksternal kriyoprotektanlar, sıvı ve katyonlara karşı geçirgenliğini artırarak hücre membranlarını ozmotik strese karşı dayanıklı hale getirirler. Ayrıca, hücrede donma/çözünme sırasında gelişen lipid peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Hücre içi kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluşturan glukoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz sıklıkla kullanılan sakkaritlerin arasında sayılabilir (An et al., 2000; Cabria et al., 2001; Alçay, 2015).

Sakkaritler ve polisakkaritler

Glukoz: Mikroorganizmaların saklanması için glukozun farklı konsantrasyonları kullanılmaktadır. *Pantoea agglomerans* ile yapılan çalışmada freeze-drying yönteminde koruyucu olarak farklı şekerler kullanılmıştır. Glukoz %5 olacak şekilde kullanılmış ve %50 canlılık kaybı olduğu belirlenmiştir. Yine bakterilerle yapılan diğer çalışmalarda da glukoz konsantrasyonu genellikle %5 olacak şekilde kullanılmıştır (Costa et al., 2000; Zhan et al., 2011).

Ksiloz: *Trypanosoma brucei* saklanması için %5-10 olacak şekilde kullanılmıştır (Hubalek, 2003; Polge and Soltys, 1960).

Sükroz: Mikroorganizmaların saklanması için sıklıkla kullanılmakla birlikte sükroz konsantrasyonu için genellikle %10 tercih edilmiştir. Freeze-drying tekniğinde canlılığın korunmasında yüksek koruma sağlayan disakkaritler arasında yer almaktadır (Costa et al., 2000).

Laktoz: Özellikle starter kültürlerin saklanması için tercih edilmektedir (Carvalho et al., 2004).

Maltoz: Özellikle laktik asit bakterileriyle yapılan çalışmada maltoz koruyucu olarak kullanılmaktadır. *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*

ile yapılan çalışmada liyofilizasyonda koruma ortamı olarak maltoz kullanılmıştır ve sırasıyla %90, %81 canlılık sağlamıştır (De Giulio et al., 2005).

Trehaloz: En iyi koruyucular arasında olmakla birlikte dezavantajı, oldukça maliyetli olmasıdır. Ticari ürün liyofilizasyonunda bu nedenle çok fazla tercih edilmemektedir. Trehaloz iyi bir protein stabilizatörüdür bu nedenle enzimlerin aktivitesinin iyi bir şekilde korunmasını sağlamaktadır (Carpenter et al., 1993).

Disakkarit koruyucular arasında bulunan sükroz ve trehaloz; hücre membranı ve protein etkileşimini sağlamaktadır. Daha önceki freeze-drying çalışmalarında bakteriler için en uygun koruyucunun sakkaritler olduğu belirtilmiştir. Özellikle disakkaritler dehidrasyon sonrasında hücre membranındaki su ile yer değiştirip hücreyi korumaktadırlar (Clegg, 1986). Disakkarit koruyucular, proteinlerin polar gruplarıyla bağlı hidrojen bağlarıyla protein katlanmasını önlemektedir (Carpenter et al., 1990). Çizelge 2.4’de farklı bakteriler ve farklı koruyucular ile yapılan liyofilizasyon çalışmaları gösterilmiştir.

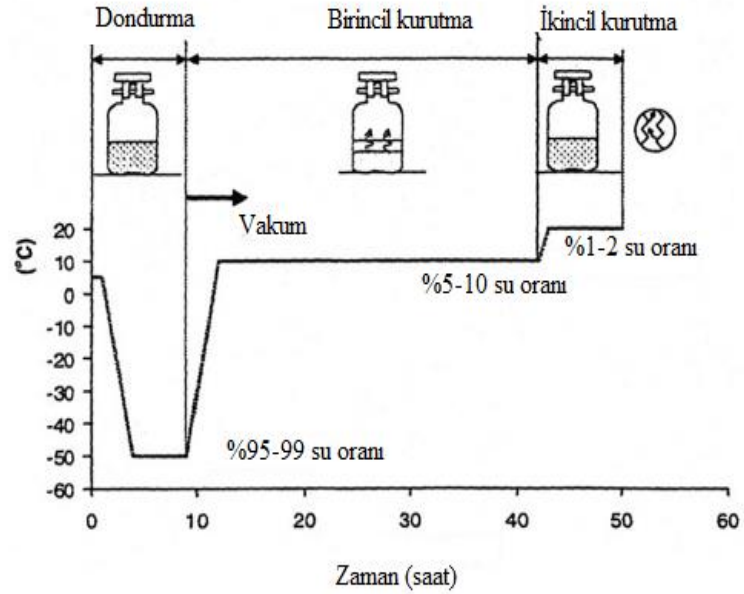
Çizelge 2.4 Liyofilizasyon çalışmasında kullanılan koruyucular

Bakteri adı	Kullanılan koruyucular ve oranları	Referans
<i>Bacillus cereus</i> AR156, <i>Burkholderia vietnamiensis</i> B418 <i>Pantoea agglomerans</i> 2Re40	Sükroz (%5)-Trehaloz (%4) Selülobioz (%5)-Glukoz (%5) Fruktoz (%5)-D-galaktoz (%5) Yağsız skim milk (%5)-Pepton (%2) Çözünür nişasta (%1)-Karmeloz sodyum Sorbitol (%2)-Gliserin L-glutamik asit-Su	Zhan et al., 2011
<i>Pantoea agglomerans</i> CPA-2	Trehaloz (%5)-Sükroz (%10) Laktoz (%7)-Glikoz (%5) Fruktoz (%5)-Yağsız skim milk (%10) Dekstran (0.33M)-Sodyum glutamat (1M) Sistin (0.04M)-Su- Fosfat tamponu Polietilen glikol (0.05M)-Gliserol (5 M)	Costa et al., 2000
<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Oenococcus oeni</i> H-2	Sakkaroz (%10)-Laktoz (%10) Trehaloz (%10)-Maltoz (%10) Glukoz (%10)-Fruktoz (%10) Sodyum glutamat-Maya özütü Sorbitol-Mannitol MGY ortamı-Fosfat tamponu	Zhao and Zhang, 2005
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Skim milk +sorbitol Skim milk +monosodyum glutamat	Carvalho et al., 2003
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Laktoz-Sükroz-Trehaloz Glutamat-Skim milk Sükroz + glutamat Skim milk +trehaloz +Askorbik asit	Palmfeldt et al., 2003

<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Skim milk (%10) Sodyum glutamat (%1)	Miyamoto-Shinohara et al., 2006
<i>Lactococcus lactis</i>	Fruktoz-Glukoz Sükroz (%5-%10-%15) Sorbitol-Laktoz-Maltoz Maltodekstrin-Mannitol Su-NaCl (%0,9) NaH ₂ PO ₄ mannitol (%5) +sükroz (%10)	Berner and Viernstein, 2006
<i>Pseudomonas Fluorescens</i> BTP1	Gliserol (%2) Maltodekstrin (%5)	Jean-Noel et al., 2012
<i>Escherichia coli</i> DH5a <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-1	Trehaloz Sükroz	Leslie et al., 1995
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Sükroz (%1-%5-%10) Trehaloz (%1-%5-%10) Sorbitol (%1-%5) PBS	Siaterlis et al., 2009

2.4.2. Liyofilizasyon işlem basamakları

Liyofilizasyon işlemi 3 aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar sırasıyla dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma basamakları olup şekil 2.5’de gösterilmiştir. (Kumar et al., 2011; Patel and Pikal, 2013; Ergün, 2015).



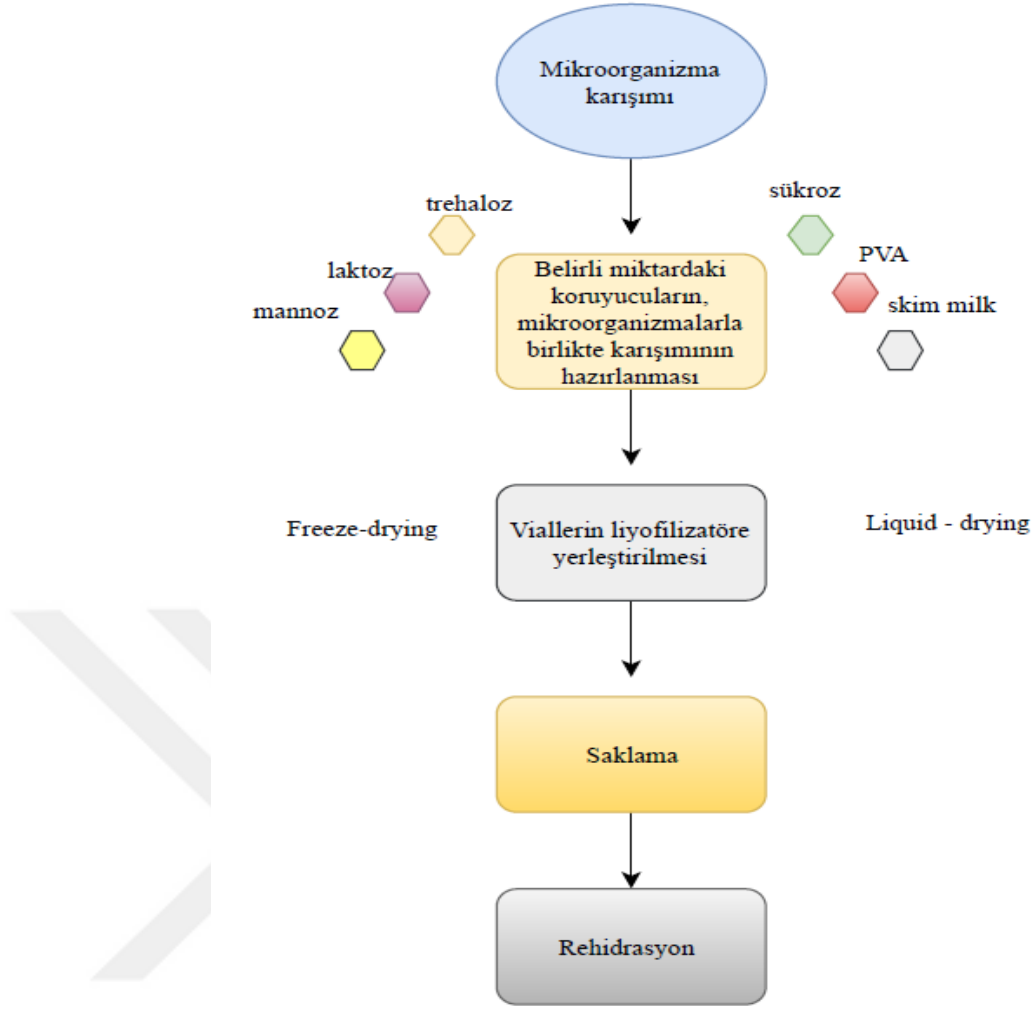
Şekil 2.5 Liyofilizasyon işlem basamakları (Kumar et al., 2011; Ergün, 2015)

Liyofilizasyon ile saklamada ilk ve en önemli adım dondurma aşamasıdır. Liyofilize ürünün tipine göre sıcaklık ve süreye karar verilmesi gerekmektedir. Bu aşamada; liyofilize edilecek ürünün köpüklenmesinin ve büzüşmesinin engellenmesi, maddenin görünüşünün ve çözünürlüğünün muhafaza edilmesi, maddenin hayati önem taşıyan özelliklerin korunması ve ısıya bağımlı reaksiyonların en aza indirgenmesi açısından en kritik adımdır. Ayrıca, liyofilizasyon cihazının önceden soğutulması, ürünün kalitesini arttırılmasına katkı sağlamaktadır.

Birincil kurutma aşamasında liyofilize edilecek ürün formülasyonu tamamen donma noktasına ulaştığı anda, liyofilizasyon cihazı birincil kurutma basamağına geçmektedir. Bu basamakta liyofilize edilecek ürüne zarar vermeden bağıl nem uzaklaştırılmalıdır. Liyofilizasyon sistemlerinde daha iyi kurutulmuş ürün elde etmek için sıcaklık ve basınç parametrelerine dikkat edilmelidir. Düşük vakum uygulanmakta ve sıcaklık azaldıkça yüksek enerjideki moleküller uzaklaşmaktadır.

İkincil kurutma aşamasında ise birincil kurutma sonrası liyofilize ürünün dayanıklılığını ve ömrünü arttırmak amacıyla üründeki bağıl nemin en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu aşamada vakum en yüksek seviyeye çıkarılmaktadır. Bu sayede eğer kristalleşmiş ve maddeye tutunup kalan su molekülleri varsa üründen tamamen uzaklaşmaktadır (Kasper and Friess, 2011; Ergün, 2015).

Mikroorganizma karışımının liyofilize olma süreci şekil 2.6'da gösterilmiştir (Morgan et al., 2006).



Şekil 2.6 Liyofilizasyon işlem basamakları (Kumar et al., 2011; Ergün, 2015)

2.4.3. Liyofilizasyon sonrası saklama koşulları

Jean-Noel ve ark. 2012 yılında yaptığı bir çalışmada, liyofilize ürünü saklama koşulları için farklı sıcaklık denemeleri yapmışlardır. Bakteriler ile yapılan çalışmalarda oda sıcaklığından ziyade $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklama büyük oranda canlılık kaybına engel olmuştur. *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan bu çalışmada liyofilizasyon öncesi $4,0 \cdot 10^9$ kob/mL olan canlı sayımı 7 ay sonra 4°C 'de saklanan ürünlerde $2,0 \cdot 10^8$ ve 20°C saklanan ürünlerde ise $3,5 \cdot 10^7$ 'ye düştüğü belirlenmiştir. Laktik asit bakterileriyle yapılan diğer liyofilizasyon çalışmasında ise, bakteriler $+4^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ ve $+53^{\circ}\text{C}$ 'de vakum altında saklanmıştır. Canlılık kaybının en az $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, en fazla $+53^{\circ}\text{C}$ 'de olduğu belirlenmiştir (Yao et al., 2008).

2.4.4. Rehidrasyon

Liyofilizasyonda, mikroorganizmaların canlandırılma aşaması olan rehidrasyon; koruyucu seçimi kadar önemli bir basamaktır. Özellikle mikroorganizmalar uygun olmayan rehidrasyon sıvısı kullanılarak canlandırılırsa liyofilizasyona bağlı oluşan zararlar ortadan kalkmayabilmektedir. Uygun rehidrasyon sıvısı seçilirse maksimum düzeyde canlılık gözlenmektedir (Carvalho et al., 2004). Rehidrasyon sıvısının molaritesi ve rehidrasyon koşulları liyofilizasyon sonrası canlılığı etkilemektedir (Ray et al. 1971; Font de Valdez et al. 1983).

Çizelge 2.5’de gösterildiği gibi liyofilize ürünü canlandırmak için kullanılan farklı rehidrasyon sıvıları mevcuttur.

Çizelge 2.5 Farklı rehidrasyon sıvılarının kullanıldığı çalışmalar

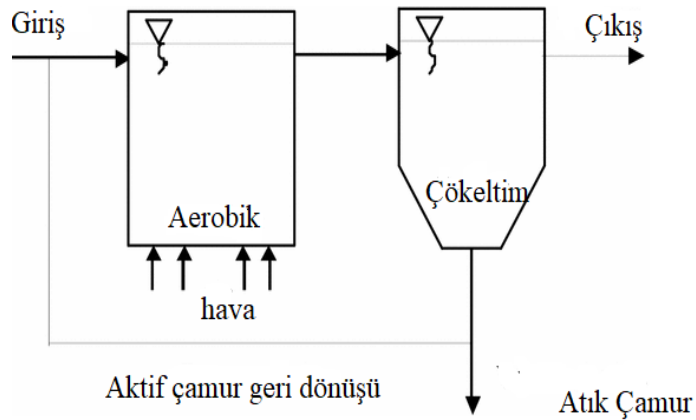
Bakteri adı	Kullanılan rehidrasyon sıvıları ve oranları	Referans
<i>Bacillus cereus</i> AR156, <i>Burkholderia vietnamiensis</i> B418 <i>Pantoea agglomerans</i> 2Re40	Skim milk (%10-%5-%1) Pepton(%10-%5-%1) Pepton (%5-%1) Sükroz (%10-%5-%1) Su -Fosfat tamponu	Zhan et al., 2011
<i>Pantoea agglomerans</i> CPA-2	Skim milk (%10) -Sükroz (%10) Sodyum glutamat (%5) Pepton (%5)-Su Fosfat tamponu PTM (pepton, tripton, meat ekstratı)	Costa et al., 2000
<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Oenococcus oeni</i> H-2	Sakkaroz (%10)-Laktoz (%10) Trehaloz (%10) -Maltoz (%10) Sodyum glutamat Fosfat tamponu	Zhao and Zhang, 2005
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Steril su	Carvalho et al., 2003
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NaCl içeren su	Palmfeldt et al., 2003
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	NaCl içeren su	Miyamoto-Shinohara et al., 2006
<i>Lactococcus lactis</i>	NaCl içeren su	Berner and Viernstein, 2006
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BTP1	Peptonlu su	Jean-Noel et al., 2012
<i>Escherichia coli</i> DH5a <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-1	Fosfat Buffer	Leslie et al., 1995

2.5. Aktif Çamur Sistemi

Aktif çamur sistemi, atık sulara yer alan çökelemeyen maddeleri mikroorganizmalar yardımıyla çökebilen maddelere dönüştürme işlemidir. Atık su arıtım tesislerinde mikroorganizmaların büyümesi, havalandırma havuzunda meydana gelmekte ve son çökeltme havuzunda çökeltilerek sistemden ayrılmaktadır. Çökelen mikroorganizma karışımına “Aktif çamur” denilmektedir.

Bu işlem evsel atıksuların ikincil biyolojik arıtımı olarak dünya çapında kabul görmektedir. Atık sulara bulunan organik maddenin CO_2 ve H_2O , NH_4 'e oksidasyonunun sağlandığı ve yeni hücre biyokütlesinin oluşturulduğu arıtım, aerobik arıttır. Gerekli olan hava, diffüzör ya da mekanik havalandırma yoluyla sağlanmaktadır. Mikrobiyal hücreler arıtma tankına yerleşmeye olanak sağlayan flok yapılarını oluşturmaktadırlar (Bitton, 2005).

Aktif çamur sisteminde; çökeltim ve havalandırma tankı olmak üzere 2 ana bölüm mevcuttur. Organik maddelerin aerobik oksidasyonu havalandırma tankında gerçekleşmekte ve başlangıç bu bölmede olmaktadır. Düzgün bir arıtımın gerçekleşmesi için 1500-2500 mg/L askıda katı madde içermesi beklenmektedir. Çökeltim tankında ise havalandırma tankındaki oksidasyon fazı esnasında oluşan mikrobiyal flok (çamur) yapısının çökeltimi için kullanılır. Bu çökeltimin bir kısmı havalandırma tankına geri gönderilir, geri kalan kısmı ise uygun bir F/M (besin / mikroorganizma) oranını korumak için tank sisteminden dışarıya atılır (Bitton, 2005). Konvansiyonel aktif çamur sistemi şekil 2.7’de gösterilmiştir (Weijers, 2000).



Şekil 2.7 Konvansiyonel aktif çamur sistemi (Weijers, 2000’den uyarlanmıştır)

Aktif çamur sistemi, genellikle bakteri, protozoon, alg, metazoon, virüs gibi birçok farklı biyolojik komüniteyi barındırmaktadır. Bu karmaşık ekosistemde toplam mikrobiyal popülasyonun % 95'ini bakteriler oluşturmaktadır (Jenkins et al., 1993).

Aktif çamur ve biyofilm proseslerinde kullanılan bakteriler, istenmeyen zararlı kimyasal, kontaminant, organik maddeleri ve besin maddelerini atık sudan etkili bir şekilde temizlemektedirler (Horan, 1990; Lin et al., 2009).

İstenmeyen kimyasalların arıtılmasından sorumlu olan başlıca bakteri grupları arasında α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, ϵ -Proteobacteria ve Bacteroidetes grubu bulunmaktadır (Low et al., 2000). Bakterilerin aktif çamur sisteminde tanılanması kültürel metotlarla sınırlıdır. Bu nedenle moleküler tabanlı yöntemlerle de aktif çamur sistemi bakterileri tanılanmaktadır Atık su aktif çamurunda bulunan kültür tabanlı ve moleküler tabanlı çalışmalarla elde edilen bakterilerden bazıları çizelge 2.6'de gösterilmiştir (Bitton, 2005).

Çizelge 2.6 Aktif çamur bakterileri

Kültürel yöntemlerle elde edilen bakteriler	Moleküler çalışmalarla elde edilen bakteriler
<i>Comamonas</i>	<i>Sphingomonas</i> spp
<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Arcobacter</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>Comamonas</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
<i>Flavobacterium</i>	– <i>Acidovorax</i>
<i>Cytophaga</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Sphaerotilus natans</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Leptothrix discophora</i>
<i>Coryneform</i>	-Birçok <i>Pseudomonas</i> grubu.
<i>Arthrobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>

2.5.1. Askıda katı madde (AKM)

Aktif çamur sistemindeki askıdaki organik (mikroorganizma dahil) ve mineral katıların toplam miktarını ifade eder. Çökebilen ve çökemeyen tüm maddeler askıda katı maddeyi ifade eder. AKM reaktörden belirli bir hacimde alınan aktif çamur örneğinin membran filtrasyonu ile 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilmesinden sonra filtre üzerinde kalan çamurun 105°C’de 1 saat süre ile kurutulması ile elde edilen mg/L cinsinden verilen çamur kuru ağırlığıdır. Bu uygulamada kullanılan membran filtrenin önceden 1 saat süre ile 105°C’de kurutularak darası alınır daha sonra membran filtrasyonu gerçekleştirilir. Uygulama sonrasında aradaki fark çıkarılarak AKM hesaplaması, aşağıdaki formülle yapılmaktadır. Tüm değerler mg/L cinsinden olmalıdır (Özdemir ve Eltem, 2000).

$$AKM = \text{Toplam katı madde} - \text{Filtre edilebilen katı madde}$$

$$AKM = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Numune hacmi (ml)}}$$

A: Filtre edilebilen katı madde (mg) + filtre kağıdı (mg)

B: Filtre kağıdının ağırlığı (mg)

2.5.2. Hidrolik alıkonma süresi (HRT)

HRT aktif çamur işlemindeki havalandırma tankına giren sıvının (çözünmüş haldeki bileşik) tank içinde geçirdiği sürenin ortalamasıdır.

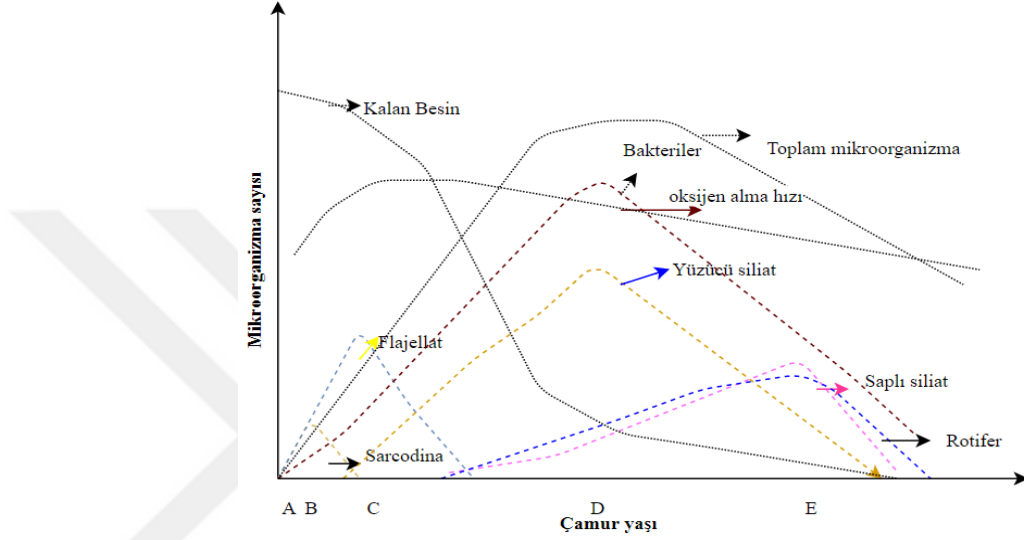
2.5.3. Çamur hacim indeksi (ÇHİ)

Çamur hacmi, reaktör içinden alınan aktif çamur örneğinin statik koşulda 30 dakikada çökebildiği hacmi (ml/ml) temsil etmektedir. Çamur hacim indeksi ise; çamur hacminin 1000 katsayısı ile çarpılarak AKM değerine bölünmesi ile hesaplanan ml/g cinsinden değerdir.

$$\text{Çamur Hacim İndeksi} = \frac{\text{ÇH} \times 1000}{AKM}$$

2.6. Aktif Çamur Sisteminde Göreceli Üstünlük Diyagramı

Aktif çamur sistemini köpük, pH, besin, oksijen gibi birçok faktör etkilemektedir. İdeal koşullarda (20°C, pH 6,5-8,5, çözünmüş oksijen maksimum değeri, 2 mg/L, yeterli besin ve toksik madde olmaması koşulu) gerçekleşen reaktör sistemi takibinde rehber olması adına diyagram oluşturulmuştur. Şekil 2.8’de göreceli üstünlük diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Göreceli üstünlük diyagramı (Özdemir ve Eltem, 2000)’den uyarlanmıştır.

Göreceli üstünlük diyagramında A’da E ye kadar ilerleyen çamur yaşına göre reaktör mikroorganizma içeriği gösterilmektedir.

A kısmında atık su tanka eklenmekte ve havalandırma başlamaktadır. Mikroorganizmalar bu aşamada birbirine üstünlük göstermemekte fakat sistemde bulunmaktadır.

B kısmında Protozoanın, Sarcodina grubu baskın halde görülmektedir fakat besin olduğu zaman sadece reaktör sisteminde bulunmaktadır.

C kısmında Protozoanın Flagellatlar grubu en baskın halde görülmektedir. Besini hızla tüketmektedirler.

D kısmında ise yüzücü siliat ve bakteriler maksimum sayılarına ulaşmışlardır. Protozoon’ları tükettikleri için az bir besinle yaşamlarını sürdürmektedir. Aktif çamur uygulamalarının başlandığı kritik nokta bu aşamadır.

E kısmında besin artık kalmamıştır ve aktif çamur yaşanır. Saplı siliat ve rotiferler baskın olduğu gözlenmiştir (Özdemir ve Eltem, 2000).

2.7. Kültür Bağımsız Tekniklerle Mikrobiyal Yapının Belirlenmesi

Mikrobiyal komünite yapısının ve dinamiklerinin çalışılması için tek bir yöntem yerine farklı yöntemlerin kombinasyonu daha fazla sonuç verebilmektedir. Bu yöntemler kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (Gallego Blanco, 2012).

Kültür bağımlı teknikler farklı çevrelerin mikrobiyoloji çalışmalarında ilk kullanılan tekniktir. Gerekli fizyolojik koşulların sağlanarak yerli mikrobiyal yapının kültürel yöntemle izolasyonu ve ürün olarak eldesi kültürel yöntemi vazgeçilmez kılmıştır. Fakat bu teknikle sınırlı mikroorganizmalar kültüre edileceğinden kapsamlı bilgi edinmemizi sağlayamamaktadır (Guan et al., 2014; Ron and Rosenberg, 2014; Liu et al., 2016).

Mikrobiyal ekoloji çalışmalarında moleküler metotların kullanılmaya başlanmasıyla birlikte mikrobiyal komünitelerin karakterizasyonu güvenilir bir şekilde yapılmaya başlanmıştır. Deniz, toprak, su, okyanus, sediment ve sıcak su kaynakları gibi farklı çevrelerin mikrobiyal komünite yapısının değerlendirilmesinde moleküler teknikler etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Yang et al., 2016; Bian et al., 2014; Liu et al., 2015; Li et al., 2016).

16S rRNA gen sekans analizlerini içeren moleküler tekniklerden DGGE, RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi), reverse örnek genom problama, oligonükleotit matriks array hibridizasyon metotları gibi yöntemler petrol rezervlerinin mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Van Elsas et al., 1998; Kasai et al., 2001; Guan et al., 2013; Li et al., 2013; Tong et al., 2013; Gieg et al., 2014; Ron and Rosenberg, 2014; Li et al., 2015; Yang et al., 2016; Varjani and Upasani., 2017).

PCR dayalı yaklaşımlardan DGGE yönteminde; sucül ve karasal sistemlerin mikrobiyal yapısının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiş ve mikrobiyal yapı belirlenmiştir (Schafer and Muyzer, 2001; Li et al., 2012).

2.7.1. Mikrobiyal yapının belirlenmesinde DGGE

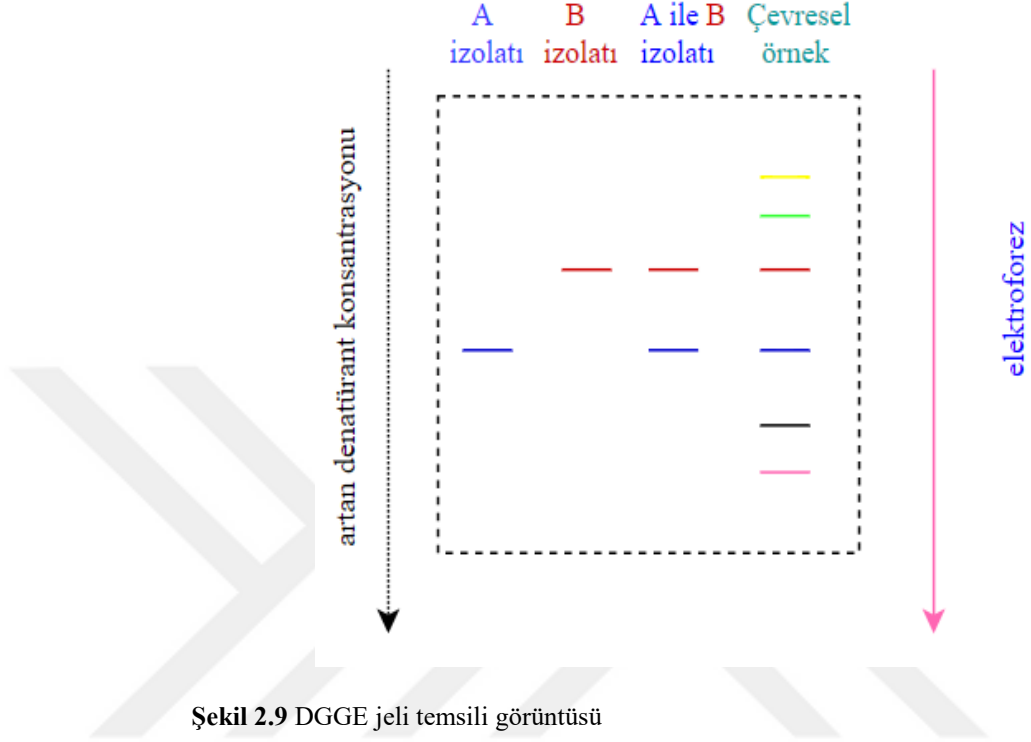
Kültür bağımsız tekniklerden biri olan DGGE yöntemi, DNA moleküllerini dizi içeriklerine göre ayırmayı sağlayan, ilk kez 1993 yılında Muyzer ve ekibi tarafından, mikrobiyal ekolojide kullanılan moleküler parmak izi yöntemidir (Muyzer et al.,1993).

DGGE; gastrointestinal sistemdeki baskın *Lactobacillus* türleri, doğal habitatlardaki baskın organizmalar, patojenik *Listeria* türleri, gıda ürünlerinin mikrobiyal yapısı gibi farklı örnek kaynaklarından mikrobiyal yapı belirlenmesinde kullanılabilen bir yöntemdir (Omar and Ampe, 2000; Walter et al., 2000; Fasoli et al., 2003; Karabey vd., 2018).

DGGE'ye yüklenecek PCR ürünüde kullanılan primerin 5'- uçlarında GC içeriği yüksek olan 40 bazlık bir bölge bulunmaktadır. **GC clamp** olarak isimlendirilen bu bölge, DGGE sırasında DNA fragmentlerin bir noktada tutuklanmalarını sağlamaktadır (Boon et al., 2002; Karabey vd, 2018). DNA dizisindeki nükleotid farklılığı, iki ipliğin birbirinden ayrılma sıcaklığı olan 'Erime Sıcaklığı-Melting Temperature (T_m)' farklılığına neden olmaktadır. DNA daki 1 baz değişikliği bile erime sıcaklığını 1°C veya daha fazla değiştirmekte veya zincirlerin ayrılması için gerekli denaturant konsantrasyonunu değiştirmektedir. Bu özelliğinden yararlanarak iki farklı DNA arasındaki tek baz çiftinin farklılığı belirlenebilmektedir. PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri poliakrilamid jelde artan denaturant (formamid-üre) konsantrasyonuna doğru yürütülmektedir. DGGE jelinin dip kısmı yüksek konsantrasyonda denaturant içerirken, üst kısımlar seyreltilerek düşük konsantrasyonlu denaturant içermektedir. Farklı DNA fragmentleri içerdikleri diziye bağlı olarak değişen konsantrasyonda denatüre edici ajanlar (formamid ve üre) ile karşılaştıklarında ayrılmaya başlar ve belli bir noktada GC clamp'ler sayesinde jelde sabitlenirler (Muyzer and Smalla, 1998).

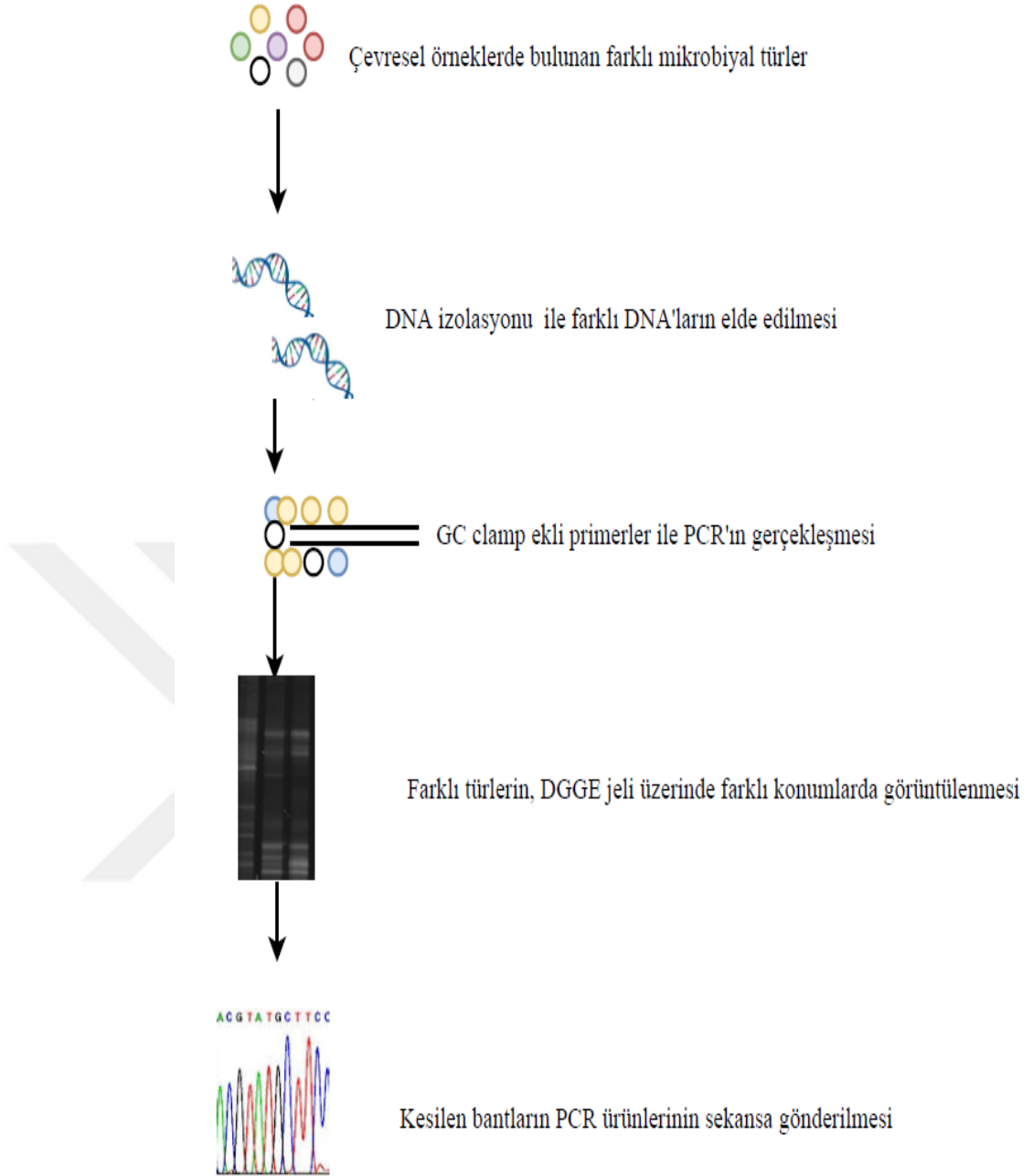
Tür farklılıkları, DGGE tekniği ile Guanin (G) ve Sitozin (C) içeriğine göre tespit edilmektedir. DGGE, Aynı baz uzunluğuna sahip PCR ürünleri agaroz jel üzerinde aynı yerde konumlanmalarına rağmen, DGGE için kullanılan poliakrilamid jelde farklı yerde konumlanmaktadır. Bunun sebebi de denatüre madde olarak kullanılan formamit ve üre karışımı, poliakrilamid jellerdeki yarı erimiş, çift sarmallı DNA moleküllerinin elektroforetik hareketine bağlı olarak

jelde konumlanmaktadır. Poliakrilamid jel üzerinden kesilen her banttın yapılan sekans analizi sonucunda mikrobiyal yapı belirlenmektedir (Özkaya ve Demir, 2011). Şekil 2.9’da DGGE jeli üzerinde konumlanan farklı ve benzer bantlar temsili şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.9 DGGE jeli temsili görüntüsü

DGGE yönteminde çevresel örneklerin DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra konvansiyonel PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilmektedir. Genellikle iki aşamalı PCR tercih edilmektedir. Öncelikle daha geniş baz uzunluğuna sahip primlerle dış bölge çoğaltılmaktadır. Daha sonrasında, 1.PCR’den elde edilen ürün, forward primerinin 5’ ucunda GC clamp içeren primerle çoğaltılmaktadır (Boon et al., 2002; Karabey vd, 2018). Şekil 2.10’da DGGE aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.10 DGGE aşamaları

PCR ürünleri jele yüklendikten sonra sabit sıcaklık ve voltajda belirli süre yürütülmektedir. DGGE jeline;

- Etidyum-Bromid
- Gümüş Boyama
- SYBR Green 1

- Gel-Green gibi boyalarla muamele edilerek DNA bantları görünür hale getirilmektedir (Varma and Podila, 2005).

Poliakrilamid jelde farklı yerde konumlanan DNA bantları steril aparatlar yardımıyla kesilerek DNA dizi analizine gönderilir. Böylece değişik çevrelere ait olan mikrobiyal komunitenin profillenmesi gerçekleştirilir. DGGE kullanım alanları

- Saflaştırma,
- Komünite analizi
- Saflık kontrolü,
- Molekül ağırlığı saptama,
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama,
- Enzim izozimlerinin saptanması,
- İmmünolojik ve moleküler biyolojik analizler.

DGGE yönteminin avantajları arasında;

- yüksek belirleme oranı ve duyarlılık,
- PCR fragmentleri jelden geri alınarak sekanslama reaksiyonlarında kullanılabilir,
- Kolay uygulanabilirlik,
- Karışık kültürden komünite analizine olanak vermesi

Dezavantajları ise,

- 30-40 bazlık GC clamp içeren primerlerin pahalı olması,
- GC içeriği yüksek DNA örneklerin analizinin DGGE ile kolay olmamasıdır.

DGGE; hidrokarbonla kirlenmiş alanların bakterilerle temizlenmesiyle ilgili yapılan çalışmalarda özellikle atık su, deniz ve toprak mikrobiyotasının belirlenmesine önemli katkılar sağlamıştır (Hamamura et al., 2006). Atık su arıtım tesislerindeki aktif çamur sisteminde yer alan mikrobiyal yapı oldukça karmaşıktır. Araştırmacılar, yıllardır aktif çamur sisteminde yer alan mikrobiyal yapıyı belirlemek için çalışmışlardır. Fakat atık su içeriği köpürme gibi farklı durumlar da gözlemlendiğinde bakterilerin elde edilmesi, kültürasyonu oldukça zor olmaktadır ve

daha kapsamlı bir değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Amann et al., 1997; Blackall et al., 1998). Kimyasalların parçalanmasında yer alan aktif çamur sistemindeki mikrobiyal komünite yapısının analizi, birbirleri ve bulunduğu çevre ile olan etkileşimlerini belirlemek, kimyasalların parçalanma süreci açısından çok önemlidir. Bu nedenle kültür bağımsız yöntemlerden olan DGGE, ilgili çevreye ait mikrobiyal yapıyı belirlemesi açısından çok önemli bir yöntemdir.

2.7.2. Real-time PCR (qPCR) ile kantitatif belirleme

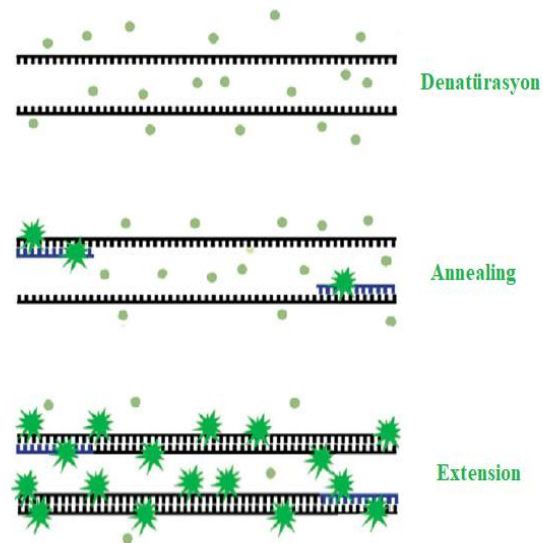
1984 yılında Kary Mullis tarafından polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfi, moleküler araştırmalar için devrim olarak kabul edilmiştir. qPCR; örnekteki DNA sayısının belirlenmesi, ekspresyon profillerinin tespit ve ölçümü, patojen saptanması ve kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin eş zamanlı takibini sağlayan qPCR, son yıllarda çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Real-time PCR’da oluşan her eğrinin ilk eksponansiyel faza geçtiği andaki döngü sayısı “*ct*-threshold cycle (döngü eşik değeri)” olarak adlandırılmaktadır. Hedef kalıbın başlangıç miktarıyla bağlantılı olarak *ct* değeri değişmektedir. Örnekler arasındaki başlangıç sayılarındaki farklılık *ct* değerleri karşılaştırılarak belirlenmektedir ve ürün miktarı döngü sayısı ile hesaplanan *ct* değeri ile ters orantılı olmaktadır. Aynı zamanda; konsantrasyonu bilinen standartların başlangıçtaki kopya sayılarının logaritmasına karşı belirlenen *ct* değerlerinin çizilmesiyle standart grafikler oluşturulmaktadır. Miktarı bilinmeyen örneğin de standartlar aracılığıyla miktarı belirlenebilmektedir.

Real-time PCR sisteminde; kalıp DNA dizisi için özgül olmayan ve özgül olan belirleme sistemleri mevcuttur. Özgül olmayan belirleme sisteminde en sık kullanılan SYBR Green yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boyasıyla yapılan en pratik ve en çok kullanılan metottur. PCR için hazırlanacak reaksiyon karışımında enzim, dNTP, çift zincirli kalıp DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Primerler DNA’ya bağlanıp uzama başladığında SYBR Green boyası da çift zincirli DNA’nın arasına girmekte ve floresan yayılımı başlamaktadır. Başlangıçta sinyal zayıftır fakat ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artmakta ve bu artış “Real-time” cihazının monitöründen eş zamanlı olarak izlenebilmektedir (Kubista et al., 2006).

Bu yöntemin dezavantajı ise herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda da boya bağlanacağından floresan ışımaya yapabilir ve yanlış pozitif sonuç verebilmektedir. Bu bağlanma aynı zamanda primer dimeri de olup yanlış pozitif sonuç vermektedir. Fakat yanlış pozitif sonuç veren bu durumun kontrolü, DNA'ların erime eğrisi analizi (T_m) ile yapılmaktadır. T_m analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlamakta, çift zincirli DNA birbirinden ayrıldığında, floresan boya serbest kalmakta ve okunan floresan miktarı da düşmektedir. Her bir DNA'nın belirli bir T_m derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Günel, 2007).

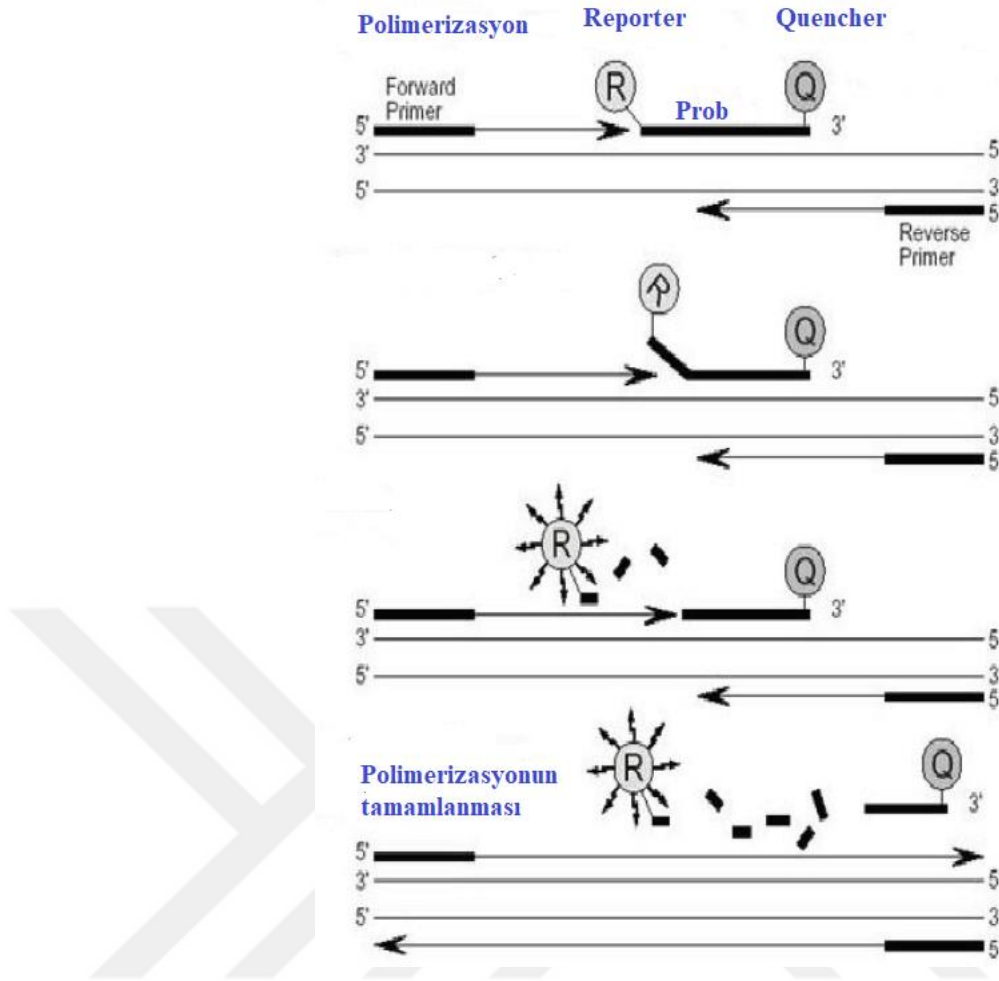
SYBR Green duyarlılığı yüksek olmasına rağmen, prop sistemleri kadar spesifik değildir. Sadece erime analizi (T_m) ile örneğin guanin ve sitozin içeriğine, uzunluğuna bağlı olarak farklı ürünlerin belirlenmesini sağlamaktadır. (Espy et al., 2006). Şekil 2.11'de SYBR Green yönteminde gerçekleşen adımlar gösterilmektedir. BEBO, YO-PRO-1, LC Green ve SYTO-9 gibi sınırlı sayıda boya alternatif olarak Real-time PCR'da özgül olmayan belirleme sistemlerinde kullanılabilir (Gudnason et al., 2007).



Şekil 2.11 SYBR Green boyasının çift iplikli DNA'ya bağlanması (Fraga et al., 2014)

Özgül olan belirleme sistemlerinde ise sıklıkla kullanılan 3 adet ışıma yapabilen işaretli prob vardır. Bu floresan prob teknoloji problemleri kullanılarak daha duyarlı ve spesifik belirleme yapılmaktadır. Fakat daha pahalı olması sebebiyle SYBR Green'e göre daha az tercih edilmektedir. Bunlar "TaqMan probu (hidroliz probu), moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. Bu belirleme yöntemlerinin hepsi iki farklı boya molekülünün arasındaki ışık enerjisi transferine dayanmakta ve floresan rezonans enerji transferi olarak adlandırılmaktadır (Wittwer et al., 1997; Günel, 2007).

TaqMan probu, 5' ucundan bir "reporter" florofor, 3' ucundan ise "quencher" diye adlandırılan bir grupta işaretlenmiş, Taq polimeraz tarafından hidrolize edilerek ışıma yapan, dizisi çoğaltılan DNA bölgesine komplementer bir DNA parçası olarak tanımlanmaktadır. Prob ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece reporter florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki quencher florokrom madde tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlamaktadır. Böylece reporter serbest hale geçer ve sinyal oluşmaktadır. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenmektedir. Işıma; probun DNA'ya bağlanmasıyla değil, probun kırılarak ayrılmasını sağlayan 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile oluşmaktadır. Bu nedenle bu tür problemlere "hidroliz problemleri" adı verilmektedir (Espy et al., 2006). Şekil 2.12'de TaqMan prob sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2.12. TaqMan prob sistemi (<http://www.e-oligos.com/eoweb/products/eo-TaqMan.asp>)

Real-time PCR'in birçok avantajı mevcuttur. Bunlar;

- ✓ PCR amplifikasyonu oldukça hızlı gerçekleşmektedir, zaman açısından oldukça pratiktir.
- ✓ Kapalı sistem olduğu için amplifikasyon sonrası kontaminasyonlar engellenmiş olur.
- ✓ Erime eğrisi analizleri ile yakın olan türler bile birbirinden ayrılmaktadır. (Smith et al., 2004).

2.8. Atık Su Toksisitesinin Belirlenmesi

Sanayi atıkları veya insan faaliyetleri sonucu oluşan toksik bileşiklerin karıştığı atık sular, çevreyi ve içerisinde yaşayan organizmaları, çok düşük konsantrasyonlarda olsalar bile etkilemektedir. Ekotoksosite testleri, çevrenin kimyasallarla, karşı karşıya kaldığı riskleri anlamaya ve ekosistemin temizlenmesinin etkinliği ve verimliliği hakkında bilgi sağlamaya yardımcı olmaktadır.

Atık suların arıtılabilirliği kadar, arıtım sonucu kalan son ürün de önemlidir. Bu nedenle mikroorganizmalarla parçaladığı düşünülen kimyasalların farklı toksik kimyasala dönüştüyse de belirlenmesi önem arz etmektedir. Kalan kimyasalların yanında, aktif çamur sisteminde kullanılan mikroorganizmalarında süreç sonucunda toksisite kontrolünün yapılması, biyolojik arıtım etkinliğinin belirlenmesi, atıkların test canlılarına toksik etkisi varsa ortaya konması gibi birçok amaç için atık sudaki toksisitenin belirlenmesi gerekmektedir (Meriç, 2002).

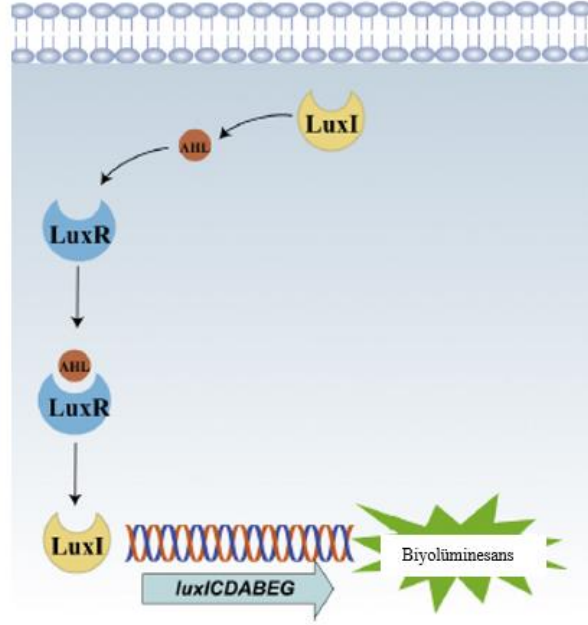
Ekotoksisitenin belirlenmesinde amaç, kimyasalların biyolojik organizmalar üzerinde oluşturduğu etkiden yola çıkarak herhangi bir zararlı etkiyi olabildiğince verimli ve etkin biçimde gidermektir. Toksisite belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (Romero et al., 2007). Bunlar;

- ❖ Biyoluminesans yöntemler
- ❖ Respirometrik yöntemler
- ❖ Nitrifikasyon /denitrifikasyon inhibisyon testleri
- ❖ Moleküler tabanlı analizler ve biyosensörler'dir.

Aerobik atık su arıtım tesisinde bu yöntemler arasından en çok kullanılan yöntem respirometrik ve biyoluminesans yöntemlerdir. Bu yöntemler, hızlı sonuç verip, tesiste herhangi bir toksisite durumu varsa kısa sürede müdahale etme imkanı vermektedir (Tzoris and Hall, 2006).

Biyoluminesans mekanizmasında bakteri tek başına ışık verememekte, ancak belirli sayıya ulaştığında hücreler arası iletişim ile quorum sensing adı verilen olay ile ışık verebilmektedir. *Alivibrio fischeri*'de Lux I geni tarafından kodlanan protein tarafından sinyal molekülü açıl homoserin lakton (AHL) üretmektedir. Gram negatif bakteriler tarafından salgılanan bu sinyal molekül birikmeye başladığında

lux R aktivatör proteinine bağlanır ve transkripsiyon başlar ve biyolüminesans adını verdiğimiz ışıma başlar. Şekil 2.13’de biyolüminesans olayının gerçekleşmesi gösterilmiştir.



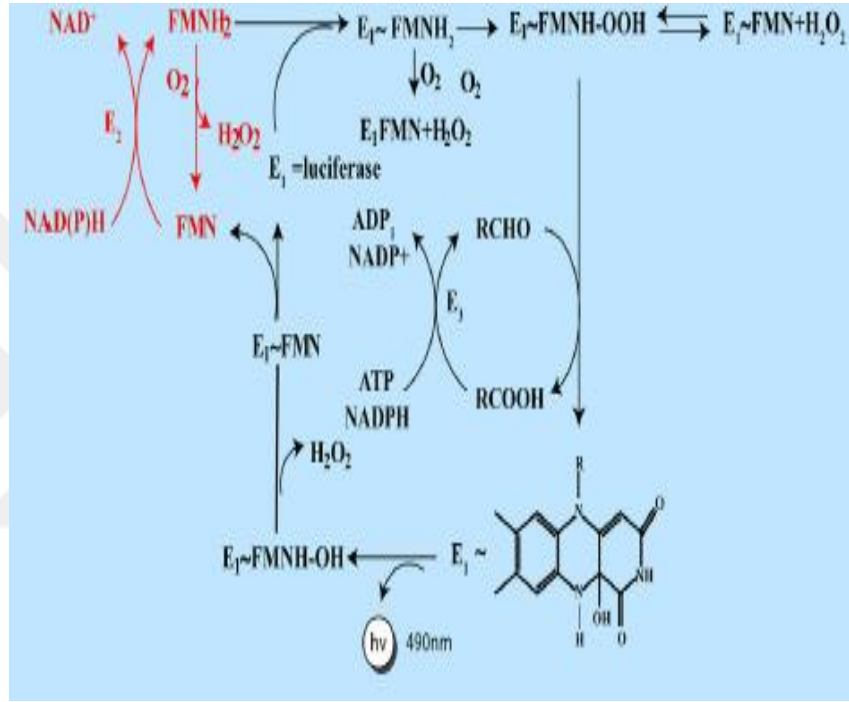
Şekil 2.13 *Alivibrio fischeri*’de quorum sensing mekanizması ve biyolüminesans (Wang et al., 2016)

Biyolüminesans yöntemi toksisite belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testin hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve küçük hacimlerde çalışılabilir olması çeşitli avantajlarındandır. Patojenik olmayan bir lüminesans bakterinin toksik kimyasallara maruz edilmesiyle birlikte bakteriden yayılan ışığın azalmasının ölçümüne dayanmaktadır (Ren and Frymier, 2003).

Alivibrio fischeri’nin kullanıldığı biyoluminesans inhibisyonu testinde akut toksisitenin belirlenmesi için Toxalert, Microtox, Lumistox ve Biotox gibi test kitleri kullanılmaktadır (Jennings et al., 2001). Biotox, Microtox kitlerinde bakteri, Algaltoxkit ticari kitlerinde mikroalgler ve Daphtoxkit kitinde ise kabuklu organizmalara dayalı ticari kitler kullanılmaktadır. Fakat bunlar arasından en yaygın kullanıma sahip olan ise Microtox test kitidir.

Microtox testinde lüminesans veren denizel bir bakteri olan, *A. fischeri* kullanılmaktadır. Bu test Avrupa’da (DIN EN -ISO 11348 standardı) en yaygın olarak kullanılan toksisite yöntemidir. Microtox yöntemi; çok hızlı, uygun maliyetli ve en yaygın kullanılan toksisite belirleme yöntemidir (Immich et al., 2009).

A. fischeri'nin biyoluminesans reaksiyonunda, indirgenmiş flavin mononükleotidi (FMNH₂) anahtar rol oynamaktadır. Flavin redüktaz enzimi varlığında, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H) ile FMN, FMNH₂'ye indirgenmektedir. İndirgenmiş FMNH₂ moleküler O₂, aldehit ve lusiferaz enzimi varlığında FMN'ye okside olur ve H₂O oluşur. Bu reaksiyon sırasında dalga boyu 490 nm olan mavi-yeşil ışık yayılmaktadır (Parvez et al., 2006; Wang et al., 2016). Şekil 2.14'de *A. fischeri*'nin biyoluminesansa ait fizyolojik mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.14 *Alivibrio fischeri*'nin biyoluminesans fizyolojik mekanizması (Wang et al., 2016)
(FMN: Flavin mononükleotid, E1: lüsiferaz enzimi, FMNH₂: İndirgenmiş Flavin mononükleotid F2: FMN redüktaz E3: uzun zincirli aldehit redüktazı)

Microtox yönteminde, test edilecek örneğe bakteri maruz bırakılmaktadır. Sonuç, örnek toksik ise; bakterinin metabolik olaylarındaki inhibisyonu sonucu verdiği ışımda azalma şeklinde görülmektedir. Çok fazla kimyasal kontaminasyonu olan göl, nehir veya atık su toksisitesinin belirlenmesinde bakteriler çok kullanışlı olmayabilmektedir. Bu nedenle enzimler bu durumlar için daha çok tercih edilmektedir. Peroksidaz enzimi bu gibi durumlarda tercih edilmiştir (Servos, 1999).

Biyoluminesans toksisite testlerinde, bakterinin ticari kiti olan “Microtox® Reagent”ın hassasiyeti, pozitif kontrol olarak kullanılacak toksik madde sayesinde

kolayca tespit edilebilmektedir. Bu test kitinde kullanılan *A. fischeri* bakterisinin canlılığından emin olabilmek ve operatörün pipetleme hassasiyetini değerlendirmek için de, referans toksik madde kullanılmaktadır. Test validasyonu için kullanılan pozitif kontroller toksik maddeyi belirli bir referans noktası olarak almaktadır. Taşıyıcı solventler gibi kullanılan negatif kontroller de bakterinin doz-cevap ilişkisini belirleme ve testin hatalı okumalarını minimize etmek için tercih edilmektedir. Microtox® akut toksisite testinde kullanılan hem negatif hem de pozitif kontroller, bakteriler tarafından ışık yayılımındaki doğal değişikliklerin izlenmesinde önem arz etmektedir (Blaise ve Ferard, 2005; Sönmez ve Sivri, 2016).



3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada, PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. atık su arıtım tesisinden alınan aktif çamur örneklerinden izole edilmiş ve TA, 4-cba, p-tol ve PAH kimyasallarını parçalama yeteneğine sahip izolatlar kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bu organizmalar SANTEZ 00639-2010-2 ve SANTEZ 0719-2014 (112D044 TÜBİTAK) no'lu proje kapsamında elde edilmiştir (Saygılı, 2012; Eroğlu, 2013; Tunç, 2014; Çay, 2017). Organizmalara ait izolat kodları, biyoparçalaması çalışılan kimyasal ve Genbank'tan alınan aksesyon numaraları çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan izolatlarla ait izolat kodu ve aksesyon numaraları

Kimyasal	İzolat Kodu	Organizma ismi	Aksesyon Numaraları
TA	T1	<i>Pseudomonas</i> sp.	JX480627
	T4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	JX480628
	TK	<i>Arthrobacter nicotinae</i>	JX029141
	R1	<i>Pseudomonas putida</i>	Alınacak
p-tol	PT4	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	Alınacak
	PT7	<i>Pseudomonas putida</i>	KJ735915.1
	T5	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	Alınacak
4-cba	3A2	<i>Comamonas testosteroni</i>	Alınacak
	C6	<i>Pseudomonas putida</i>	Alınacak
	C9	<i>Chryseobacterium indolegenes</i>	Alınacak
ANT (Antrasen)	ANT2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Alınacak
FLO (Floren)	ÇB	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	JQ922111
	218	<i>Acinetobacter</i> sp.	JQ029141

	AS	<i>Micrococcus luteus</i>	Alınacak
PYR (Piren)	P6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Alınacak
Floranten	FT 5	<i>Raoultella planticola</i>	Alınacak

Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi farklı tez çalışmalarından elde edilen 16 izolat arasında PAH kimyasallarını parçalayan bakterilerde mevcuttur. PAH ve diğer kimyasalları parçalayan bakterilerin TA, 4-cba ve p-tol kimyasallarını parçalama yeteneği yüksek lisans tez çalışmasında çalışılmıştır (Çay, 2017). Yapılan tez çalışması sonucunda bu 3 kimyasala karşı biyoparçalama etkinlikleri;

- 3a2 kodlu *Comamonas testosteroni*, sadece 4-cba ve TA
- AS kodlu *Micrococcus luteus*, sadece 4-cba
- P6 kodlu *Aeromonas hydrophila*, sadece 4-cba
- Ant2 kodlu *Pseudomonas fluorescens*, sadece 4-cba
- 218 kodlu *Acinetobacter* sp. sadece 4-cba
- R1 ve C6 kodlu *Pseudomonas putida*, 4-cba ve TA nı
- FT5 kodlu *Raultella planticola*, 4-cba ve TA
- C9 kodlu *Chryseobacterium indolegenes*, 4-cba ve TA
- T1 kodlu *Pseudomonas* sp, 4-cba ve TA
- TK kodlu *Arthrobacter nicotinae*, 4-cba ve TA
- PT4 kodlu *Pseudomonas alkylphenolica*, 4-cba ve TA

Bu izolatlar yaklaşık 16 saat içerisinde ilgili kimyasalları parçalama etkinliği göstermiştir, diğer bakteriler ise farklı kimyasallara karşı parçalama yeteneği göstermemiştir. Örneğin T4 kodlu *Chryseobacterium* sp. TA kimyasalı biyoparçalama çalışmasından elde edilmiş fakat 4-cba ve p-tol giderimine etkisi olmamıştır. (Çay, 2017).

Yapılan çeşitli tez çalışmaları sonucunda elde edilen 16 bakteri, birlikte çoğaltılarak TA, 4-cba ve p-tol kimyasalları gideriminde doktora tez çalışmasında kullanılmıştır.

3.1.2. Mikroorganizmaların üretiminde, sayımında ve biyoparçalama etkinliğini belirlemede kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Tez çalışmasında kullanılan TA, p-tol ve 4-cba kimyasallarını parçalama etkinliği bilinen mikroorganizma izolatlarının; saflık kontrolü ve raf ömrü çalışmalarında canlılıklarının belirlenmesi için kullanılan Plate Count Agar (PCA) kullanılmıştır. Liyofilize edilecek 16 organizmaya ait mikrobiyal karışımı fermentörde üretmeden önce -80°C’de %16 gliserolde saklanan organizmalardan 50µL PCA ortamına eklenmiş ve her seferinde özeyi yakarak çizgi plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. PCA besiyerine ait içerik çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Plate Count Agar içeriği

Bileşen	Miktarı g/L
Kazeinden Elde Edilen Pepton	5,0
Yeast Extract	2,5
D(+) Glukoz	1,0
Agar-agar	14,0

Ticari olarak hazırlanmış PCA’nın (*Merck 1.05463*) 4,5 gramı, 200 mL distile suda karıştırılarak tamamen çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Otoklavda 121°C’de 1,0 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra, yaklaşık 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra petri kaplarına dökülmüştür.

16 izolatın saflık kontrolü PCA ortamında kontrol edilmiştir. Daha sonra liyofilizasyonda kullanılacak 16 izolatın fermentörde üretimi gerçekleştirilmiştir. Nutrient Broth ortamı (*Merck 1.05443*), fermentörde bakterilerin büyümesi için gerekli besiyeri olarak ve belirli raf ömrü süresinde biyoparçalama etkinliğinin değerlendirilmesinde gerekli mikroorganizma yoğunluğunun ayarlanmasında kullanılmıştır. Liyofilize ürünün rehidrasyon sıvısıyla canlandırılmasından sonra her vial için ayrı olarak 25 ml’lik erlenlerde hazırlanan Nutrient Broth ortamı 1,0 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Çizelge 3.3’ de Nutrient Broth ortamının içeriği gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Nutrient Broth İçeriği

Bileşen	Miktarı g/L
Etten Elde Edilen Pepton	5,0
Meat Extract	3,0

Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında TA, p-tol ve 4-cba kimyasallarının biyoparçalama etkinliğinin belirlenmesi için, birçok literatür kaynağının taranması sonucunda karbon kaynağı içermeyen, Bushnell Haas Petroleum Broth (*Sigma-Aldrich-B5051*) kullanılmıştır (Singh and Lin, 2008; Dzulkapli et al., 2009; Hamza et al., 2012). Ticari olarak temin edilen Bushnell Haas Broth hazır besiyerinden 0,16 g tartılarak 250 mL'lik erlenlerde 50 mL distile su içinde çözülmüştür. 1,0 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Bushnell Haas Broth besiyerine ait içerik çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Bushnell Haas Broth içeriği

Bileşen	Miktarı g/L
Magnezyum Sülfat	0,20
Kalsiyum Klorit	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00
Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorit	0,05

3.1.3. Liyofilizasyonda kullanılacak koruyucuların hazırlanması

Literatür araştırmaları sonucunda bakterilerin saklanması için kullanılan en temel koruyucular seçilmiştir. Seçilen koruyuculara ilave olarak steril distile su kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca aşı kültürünün fermentörde üretimi sonucunda elde edilen nutrient broth içeren ortam sıvısı da mikroorganizma içeriği santrifüj ile uzaklaştırılarak diğer koruyucularla aynı hacimde olacak şekilde viallere eklenmiş, koruyucu olarak çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan su ve nutrient broth dışındaki diğer koruyucular, distile suda çözülerek, kullanılacak stok konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Çizelge 3.5’de kullanılan koruyucular ve hazırlanışları gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Koruyucuların stok konsantrasyonları ve sterilizasyon koşulları

Koruyucu adı	Hazırlanan stok konsantrasyonları	Liyofilizasyon vialindeki son konsantrasyon	Sterilizasyon koşulu
<u>Skim milk</u>	%20 ve %40	%10	105°C’de 5 dakika
<u>Sükroz</u>	%20 ve %40	%10	121°C’de 15 dakika
<u>Trehaloz</u>	%10 ve %20	%5	121°C’de 15 dakika
<u>Maltodekstrin</u>	%10 ve %20	%5	121°C’de 15 dakika
<u>Yeast ortamı:</u>	%10 ve %20	%5	121°C’de 15 dakika
<u>Polivinil alkol</u>	%10 ve %20	%5	121°C’de 15 dakika
<u>Sodyum glutamat</u>	%5 ve %10	%2,5	121°C’de 15 dakika

3.1.4. Liyofilizasyon sonrası rehidrasyon çözeltisi

+4°C’de liyofilize halde saklanan, belirli raf ömrünü tamamlayan (1.ay; 3.ay; 6.ay; 9.ay; 12.ay; 15.ay; 18.ay; 24.ay) vial içeriğindeki organizmaların canlandırılması için rehidrasyon sıvısı olarak PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu) kullanılmıştır. Her vial için ayrı olarak 20 mL’lik erlenlerde hazırlanan PBS solüsyonu 1,0 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Çizelge 3.6’ da PBS solüsyonunun içeriği gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)

Bileşen	Miktarı g/L
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,72
KH ₂ PO ₄	0,24

3.1.5. DGGE için poliakrilamid jelin hazırlanmasında kullanılacak tampon ve kimyasallar

DGGE için gerekli PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrolünün sağlanmasında, 1X TAE (Tris Asetat-EDTA), DGGE için gerekli stok kimyasalların hazırlanmasında 50X TAE ve DGGE’de jelin yürütülmesinde kullanılmak üzere 1X TAE tampon olarak kullanılmıştır. Bu nedenle 50X TAE stok olarak hazırlanmış ve 1X TAE için ultra saf su ile 50 kat seyreltilmiştir. 50X TAE içeriği son hacim 400 mL olacak şekilde hazırlanmış Çizelge 3.7’de gösterilmiştir (BioRad, “D-Code Universal Mutation Detection System” kullanım kılavuzu).

Çizelge 3.7 50X TAE içeriği

Bileşen	Miktarı (son hacim 400 mL)
Trizma	96,8 g
Glasiyal asetik asit	22,84 mL
0,5M EDTA	40 mL

DGGE için gerekli poliakrilamid jelin hazırlanmasında gerekli olan %40 AB (Akrilamid-Bisakrilamid) stok kimyasalı hazırlanmıştır. %40 AB’nin hazırlanmasına ilişkin kimyasallar çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Akrilamid ve bis akrilamid ultra saf su ile 100 mL’ye tamamlanarak spatül yardımıyla yavaş yavaş karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır (BioRad, “D-Code Universal Mutation Detection System” kullanım kılavuzu).

Çizelge 3.8 %40 AB stok kimyasalı bileşenleri

Bileşen	Miktarı (son hacim 100 mL)
Akrilamid	38,93 g
Bis akrilamid	1,07 g

DGGE için gerekli poliakrilamid jelin hazırlanmasında konsantrasyonu %0 olan denaturant hazırlanmaktadır. Çizelge 3.9’da %0 denaturant içeriği gösterilmiştir (BioRad, “D-Code Universal Mutation Detection System” kullanım kılavuzu).

Çizelge 3.9 %0 denaturant içeriği

% 0 denaturant	
%40 AB	20 mL
50 X TAE	2 mL

Çizelge 3.10’da tez çalışmasında kullanılan %40-60 denaturant içeriği gösterilmiştir (BioRad, “D-Code Universal Mutation Detection System” kullanım kılavuzu).

Çizelge 3.10 %40-60 denaturant içerikleri

	%40 Son hacim 100 mL	%60 Son hacim 100 mL
Üre	16 mL	24 mL
Formamid	16,8 g	25,2 g
% 0 denaturant	22 mL	22mL

%40 ve %60’lık denaturantlar ayrı ayrı hazırlandıktan sonra degaz işlemi yapılmaktadır. 15 dakikalık degaz işleminden sonra hazırlanan stok kimyasallar, +4°C’de 6 ay boyunca saklanabilmektedir.

3.1.6. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

DNA/RNA Steril Kabini (Biosan): Moleküler biyolojik çalışmalar esnasında kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılmıştır.

Hassas Terazı (Denver Instrument): Tüm ortam bileşenleri ve kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

Otoklav (Hirayama Hiclave-HV 50L): Hazırlanan taze ortamların ve kullanılmış organizma içeren besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılmıştır.

Steril Kabin (Nüve MN120): Ekim işlemlerinde kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır.

Gradient Thermal Cycler (Techne FE-FCT Plus/02): Genomik ve plazmid DNA'ların çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Sürekli Karışıklı Tank Reaktörü: Aktif çamur oluşturulmasında, olgunlaştırılmasında ve hedef kimyasal maddelerin biyoparçalanmasında kullanılmıştır.

İnkübatör (Memmert): Katı besiyerlerindeki organizmaların 27°C'de büyütülmesinde kullanılmıştır.

Çalkalayıcı (New Brunswick Scientific Innova 4340): Sıvı ortamdaki mikroorganizmaların 25°C'de farklı 150 rpm'de büyütülmesinde kullanılmıştır.

Spektrofotometre (Hettich-Carry 300 Bio): Mikroorganizmaların lizofilizasyon öncesi konsantrasyonunu belirlemede kullanılmıştır.

HPLC (Agilent 1100 Series) : Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların biyoparçalama yeteneğindeki organizmaların parçalama etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Mikroskop (Olympus cx21): Reaktörde oluşturulan aktif çamur floklarının izlenmesinde kullanılmıştır.

Mobil Oksijen Ölçer (WTW Oxi 3205): Aktif çamur sisteminin yerinde çözünmüş oksijen analizi için kullanılmıştır.

pH metre (Hanna HI2211): Kullanılacak besiyerlerinin uygun pH'ya getirilmesinde ve aktif çamur sisteminin pH kontrolünde kullanılmıştır.

Vortex (VWR): DNA izolasyonu aşamasında ve liyofilizasyon işleminde vial içeriği hazırlanmasında kullanılmıştır.

Mikropipetler (Eppendorf): 10 µL, 100 µL ve 1000 µL pipetler tüm düşük hacimdeki aktarım işlemlerinde ve moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.

Santrifüj (Hettich): DNA izolasyonunda ve HPLC analizinde örnek sisteme verilmeden önce kullanılmıştır.

Elektroforez Tankları (OWL OW-A1, OW-B1A, OW-B2): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.

Elektroforez Güç Kaynağı (OWL OW-EC300XL2): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.

Jel Görüntüleme sistemi (UVP Biospectrum 800): Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.

Nanodrop Spektrofotometre Sistemi (Thermo Nanodrop 2000c): DNA/RNA miktar tayini ve saflık ölçümünde kullanılmıştır.

Liyofilizatör (Labconco): Mikroorganizmaların liyofilizasyonunda kullanılmıştır.

Denatüre Gradient Jel Elektroforezi (DGGE-BioRad D-Code Universal Mutation Detection System, USA): Liyofilizasyon viallerinin ve reaktör örneklerinin, komünite yapısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Dikey Derin Dondurucu (WiseCryo WUF-500): Tüm genomik materyallerin, moleküler biyolojik analizlerde kullanılacak kitlerin ve oluşturulan aktif çamurun saklanması için kullanılmıştır.

Toksisite Ölçüm Cihazı (Microtox M 500): Biyoparçalama ürünlerinin toksik olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır.

Real-time PCR Cihazı (Roche LightCycler® 96 System): Aktif çamur sisteminde yer alan mikrobiyal yapının takibi yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların büyüme eğrisinin oluşturulması

Tez çalışmasında kullanılacak olan mikrobiyal karışımın yüksek hacimde üretilmesinden önce, büyüme eğrileri grafikleri çıkartılmıştır. Mikroorganizmanın en etkin olduğu logaritmik faz dönemlerinin belirlenmesi, liyofilizasyon başlangıcı için önemlidir. Bu amaçla yapılan çalışmada, belirlenen 16 organizmanın Nutrient Broth ortamlarında 16 saatlik kültürleri elde edilerek bu aktif kültürlerden 540 nm'de 0,45-0,5 OD olan aşı solüsyonları hazırlanmıştır. 500 mL'lik erlenlerde 100 mL steril Nutrient Broth ve organizmaların etkinlik gösterdiği kimyasalları ayrı ayrı içeren ortamlarına %10 mikroorganizma aşılama yapılarak 30°C 150 rpm'de çalkalamalı olarak inkübasyona kaldırılmıştır. Bir saat aralıklarla örnekler alınarak büyümenin ifadesi olan bulanıklık spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir.

3.2.2. Mikroorganizmaların fermentörde üretimi

16 izolat, 5 litrelik reaktör (Sartorius Stedim Biostat A) (Şekil 3.1) içerisinde 3L Nutrient Broth besiyerine %10 aşılama yapılmıştır. Her izolat için aşılama yapılan erlenden dökme plaka yöntemiyle canlılık sayımı belirlenmiş ve son konsantrasyonu yaklaşık 10^7 - 10^8 kob/mL aralığında olduğu belirlenmiştir. Yapılan büyüme eğrisi sonuçları doğrultusunda 27-30°C'de 150-250 rpm'de aerobik olarak çoğaltım gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Aşı kültürünün fermentörde üretimi

3.2.3. Biyoparçalama etkinliği belirlenen kimyasalların hazırlanması

Tez çalışmasında; 16 izolattan oluşan liyofilize ürünün TA, p-tol ve 4-cba kimyasallarının biyoparçalama etkinliği çalışılmıştır. Bu kimyasalların belirli konsantrasyonlardan sonra sudaki çözünürlükleri düşüktür. Çözücü olarak ultra saf su kullanılmıştır. Öncelikle NaOH ile daha sonra HCl ile pH 7,5-8 aralığında kimyasalların ultra saf suda çözünmesi sağlanmıştır (Kim et al., 2012). Daha sonrasında 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek çalışmada kullanılmıştır. Raf ömrü süresine göre canlandırılan viallerden yapılan erlen denemesinde, her bir kimyasal için farklı şişelerde 2000 mg/L stok hazırlanarak son konsantrasyonu 40 mg/L TA, 40 mg/L p-tol ve 30 mg/L 4-cba olacak şekilde eklenmiştir. Reaktör de kullanılan kimyasallar için 20000 mg/L olacak şekilde stok konsantrasyon hazırlanmıştır. Stok olarak hazırladığımız kimyasallar +4°C de 3 ay boyunca saklanarak kullanılmıştır.

3.2.4. Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi

Mikroorganizmaların sadece ilgili kimyasalları karbon kaynağı olarak kullanması ve zaman içerisinde tüketmesi beklenmiştir. Bu nedenle liyofilizasyon sonrası ürünlerin erlen denemesinde karbon kaynağı içermeyen besiyeri (Bushnell Haas Broth) kullanılmıştır. Erlenler H₂SO₄ solüsyonundan geçirilerek cam yüzeyinde bulunabilecek organik maddelerden arındırılmışlardır. Hazırlanan tüm

erlenler hidrokarbonlar eklenmeden önce otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış steril Bushnell Haas Broth ortamlarına 0,22 µm'lik filtreden geçirilen 40 mg/L TA, 40 mg/L p-tol ve 30 mg/L 4-cba kimyasalları eklenmiştir. Daha sonra % 5 oranında (2,5 mL) 540 nm'de 0,45-0,50 OD olacak şekilde yoğunluğu ayarlanan bakteri süspansiyonları eklenerek çalkalamalı inkübatörde 150 rpm, 30°C 'de saklanmıştır. Erlenlerin tamamı karanlık ortamda inkübe edilerek fotooksidasyon ihtimali de engellenmiştir.

Analiz için belirlenen saatlerde her bir erlenden steril mikrosantrifüj tüplerine 1'er mL örnekler alınmıştır. 3000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmişler, santrifüj sonrası ependorfların süpernatant kısmı alınarak HPLC sistemine verilmiştir. Böylelikle HPLC kolonunun tıkanması önlenmiştir.

Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi için HPLC (Agilent 1100 Serisi) analizlerinde PTA grubu (TA, p-tol ve 4-cba) için %70-30 (su/asetonitril +%0,1 Formik asit) sisteminde 1 µL enjeksiyon, 1 mL akış hızı ve 25°C kolon sıcaklığında yürütülmüştür. Analiz kolonu olarak Agilent Zorbax Eclipse PAH Column kullanılmıştır (Pillai et al., 2009). Her bir kimyasalın alıkonma süreleri belirlenmiştir. TA kimyasalı 1,6 dakikada, p-tol kimyasalı 6,1 dakikada ve 4-cba kimyasalı ise 2,4 dakikada pik vermiştir.

Yapılan çalışmada mikroorganizmaların biyoparçalama verimliliğinin kıyaslanması için standart eğriler oluşturulmuştur. Ayrıca izolatların biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla örnek alınması esnasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskine karşılık, kontrol erlenleri hazırlanmıştır. Kimyasal konsantrasyonu aynı olacak şekilde mikroorganizma içermeyen kontrol erlenlerinden de belirli aralıklarla örnek alınmıştır.

3.2.5. Liyofilizasyon tekniği, saklama koşulları ve rehidrasyon sıvısı ön denemeleri

Tez çalışmasında kullanılacak olan liyofilizasyon tekniğine, saklama koşullarına ve rehidrasyon sıvısına karar vermek amacıyla her parametre için ön denemeler yapılmıştır.

Liyofilizasyon tekniğinin belirlenmesi amacıyla, çalışılacak koruyucuları ve mikroorganizma konsorsiyumunu içeren liyofilizasyon vialleri freeze-drying ve liquid-drying tekniği ile liyofilize edilerek karşılaştırılmıştır.

Liyofilizasyon tekniği belirlenmesinin ardından, saklama koşullarının belirlenmesi amacıyla, mikroorganizma konsorsiyumu ve koruyucu olarak skim milk içeren vialler liyofilize edilmiştir. +4°C ve oda sıcaklığında (yaklaşık +27°C) ürünler 1 ay saklanmıştır.

Liyofilize ürünlerin canlandırılması aşamasında kullanılacak rehidrasyon sıvısının belirlenmesi amacıyla, +4°C'de saklanan 1 aylık raf ömrü sonunda, koruyucu olarak skim milk içeren liyofize ürünler; su, PBS, sükroz ve skim milk ile rehidre edilerek canlılık sayıları karşılaştırılmıştır. 1 ay sonundaki canlılık kayıplarına göre liyofilizasyon sonrası uygun rehidrasyon sıvısı belirlenmiştir.

Tüm bu denemeler ışığında uygun liyofilizasyon metodu, uygun saklama sıcaklığı ve uygun rehidrasyon sıvısı belirlenmiş ve asıl deneme setlerinin kurulması gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemelerde sıcaklık ve rehidrasyon sıvısı denemesi sadece skim milk içeren koruyucu için yapılmıştır.

3.2.6. Liyofilizasyon vial içeriklerinin hazırlanması

Liyofilizasyonda kullanılmak üzere nutrient broth, skim milk, sükroz, trehaloz, maltodekstrin, polivinil alkol, yeast ortamı ve sodyum glutamat koruyucu olarak kullanılmıştır. Koruyucunun liyofilizasyon sürecine etkisini incelemek için koruyucu içermeyen sadece su içeren organizma karışımı dahil olmak üzere toplam 20 farklı içerik çalışılmıştır. Toplam 4 mL vial içeriği hazırlanmıştır ve 2 mL'si bakteri karışımı olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan viallere ait içerikler çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11 Liyofilizasyon vial içerikleri

Vial numarası	Mikroorganizma içeren viallere eklenen koruyucular	
1	Nutrient broth ortamı (2 mL)	2 mL aşı kültürü+2 mL nutrient broth
2	Skim milk (%10)	2 mL aşı kültürü+2 mL skim milk (% 20)
3	Sükroz (%10)	2 mL aşı kültürü+2 mL sükroz (%20)
4	Skim milk (%10) + Sükroz(%10)	2 mL aşı kültürü+1 mL skim milk (%40) + 1 mL sükroz (%40)
5	Trehaloz (%5)	2 mL aşı kültürü+2 mL sükroz (%10)
6	Skim milk (%10)+ Trehaloz (%5)	2 mL aşı kültürü +1 mL skim milk (%20) + 1 mL trehaloz (%20)
7	Sükroz(%10) + Trehaloz (%5)	2 mL aşı kültürü +1 mL sükroz (%40) + 1 mL trehaloz (%20)
8	Sodyum glutamat (%2.5)	2 mL aşı kültürü + 2 mL sodyum glutamat (%5)
9	Skim milk (%10) + Sodyum glutamat (%2.5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL skim milk (%40) + 1 mL sodyum glutamat (%10)
10	Sükroz (%10) + Sodyum glutamat (%2.5)	2 mL aşı kültürü + 1 ml sükroz (%40) + 1 mL sodyum glutamat (%5)
11	Maltodekstrin (%5)	2 mL aşı kültürü + 2 mL maltodekstrin (%10)
12	Skim milk (%10)+ Maltodekstrin (%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL skim milk (%40)+ 1 mL maltodekstrin (%20)
13	Sükroz (%10)+ Maltodekstrin (%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL sükroz (%40)+ 1 mL maltodekstrin (%20)
14	PVA (%5)	2 mL aşı kültürü + 2 mL PVA (%10)
15	Skim milk (%10) + PVA (%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL skim milk (%40) + 1 mL PVA (%20)
16	Sükroz(%10) + PVA (%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL sükroz (%40) + 1 mL PVA (%20)
17	Yeast ortamı (%5)	2 mL aşı kültürü + 2 mL yeast ortamı (%10)
18	Skim milk (%10) + Yeast ortamı(%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL skim milk (%20) + 1 mL yeast ortamı (%20)
19	Sükroz (%10)+ Yeast(%5)	2 mL aşı kültürü + 1 mL sükroz (%40) + 1 mL yeast ortamı (%20)
20	Su	2 mL aşı kültürü + 2 mL steril ultra saf su

24 ay'a kadar belirli zaman aralıklarında açılacak, liyofilizatöre yerleştirilecek ürün gruplarına ait vial kodlamaları ve içerikleri çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12 Liyofilizasyon viallerine ait kodlamalar

		AY							
		1	3	6	9	12	15	18	24
Vial numaraları	İçerik								
	Nutrient broth ortamı	1	21	41	61	81	101	121	141
	Skim milk	2	22	42	62	82	102	122	142
	Sükroz	3	23	43	63	83	103	123	143
	Sükroz+Skim milk	4	24	44	64	84	104	124	144
	Trehaloz	5	25	45	65	85	105	125	145
	Skim milk + Trehaloz	6	26	46	66	86	106	126	146
	Sükroz+ Trehaloz	7	27	47	67	87	107	127	147
	Sodyum glutamat	8	28	48	68	88	108	128	148
	Skim milk + Sodyum glutamat	9	29	49	69	89	109	129	149
	Sükroz + Sodyum glutamat	10	30	50	70	90	110	130	150
	Maltodekstrin	11	31	51	71	91	111	131	151
	Skim milk +Maltodekstrin	12	32	52	72	92	112	132	152
	Sükroz + Maltodekstrin	13	33	53	73	93	113	133	153
	PVA	14	34	54	74	94	114	134	154
	Skim milk + PVA	15	35	55	75	95	115	135	155
	Sükroz + PVA	16	36	56	76	96	116	136	156
	Yeast ortamı	17	37	57	77	97	117	137	157
	Skim milk + Yeast ortamı	18	38	58	78	98	118	138	158
	Sükroz + Yeast	19	39	59	79	99	119	139	159
	Su	20	40	60	80	100	120	140	160

3.2.7. Liyofilizasyon koşullarının belirlenmesi

Liyofilizasyon işlemi esnasında koruyucuların ve mikroorganizmaların daha iyi liyofilize olması ve liyofilizasyon sonrasında daha iyi saklama koşullarını sağlaması amacıyla uygun vialler ve septumları tedarik edilmiştir.

İlk olarak viallerin septumları kapatılarak boş ağırlıkları kaydedilmiştir. Koruyucuların viallere eklenmesini takiben organizmalar eklenmiş ve septumları tamamen kapatılan vialler tekrar tartıldıktan sonra freeze-drying tekniği için -80°C 'ye kaldırılmıştır.

-80°C 'de 24 saat bekleyen vialler, septum yarıkları açık olacak şekilde, önceden ayarlanmış -40°C 'deki liyofilizatöre yerleştirilmiştir. Vialler liyofilizatöre Şekil 3.2' de olduğu gibi septumları yarı açık olacak şekilde yerleştirildikten sonra cihazın kapağı işlem sonuna kadar kapalı kalmıştır.



Şekil 3.2 Liyofilizasyon viallerinin liyofilizatör içindeki yerleşimi

Yapılan ön denemeler ve literatür taraması sonucunda liyofilizasyon koşulları belirlenmiş olup Çizelge 3.13'de gösterilmiştir (Palmfeldt et al., 2003).

Çizelge 3.13 Liyofilizasyon koşulları

<u>Liyofilizatör</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	<u>Artış</u>	<u>Vakum</u>
Adım 1	-40°C	33 Saat	1 °C/dk	0.1 mBar
Adım 2	-20°C	8 Saat	1 °C/dk	0.1 mBar
Adım 3	-20°C 20°C	6.5 Saat	0.1° C/dk	0.1 mBar
Adım 4	20°C	0.5 saat	1° C/dk	0.1 mBar

Primer kurutma: Örnekler liyofilizatöre yerleştirildikten sonra 33 saat boyunca -40°C’de 0.1 mBar vakum altında sublimasyon işlemine bırakılmıştır. 1. adım sonunda liyofilizatör sıcaklığı dakika da 1°C artarak 20 dakikanın sonunda sıcaklık -20°C’ye ulaşmıştır. 8 saat aynı vakum değerinde -20°C’de sublimasyon işlemine devam edilmiştir. Kristalize haldeki buzların organizma hücrelerine zarar vermeden, katı halden doğrudan gaz haline geçtiği bu işlemler sonrasında ilk kurutma işlemi tamamlanmıştır. (Jennings, TA., 1997)

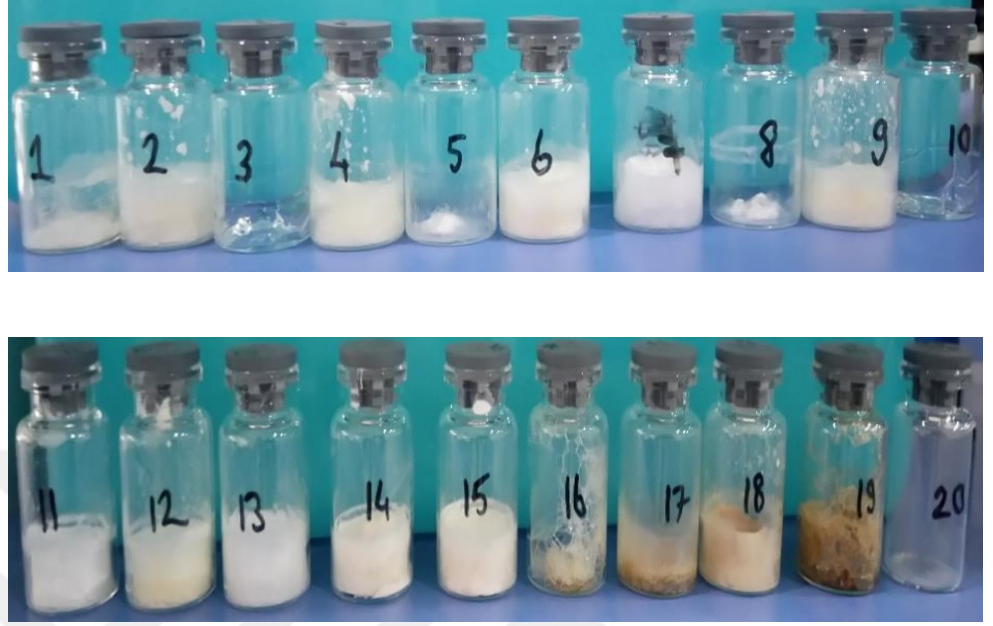
Sekonder kurutma: İlk kurutma işlemini takiben cihaz sıcaklığını, -20°C’den dakikada 0.1°C artırarak 400 dakika sonunda +20°C’ye getirmiştir. Sıcaklık değişimi sırasında vakum değeri sabit kalmıştır. 4. adım olarak, +20°C’de 1 saat süreyle aynı vakum değerinde kalan viallerin, son kurutma işlemini takiben septumları vakum altında kapatılmış, liyofilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.8. Liyofilizasyon sonrası viallerin saklama koşulları

Vial septumları vakum altında kapatılan örnekler liyofilizatörden alınarak, her vialin ağırlığı tartılarak kaydedilmiştir.

Septumlar liyofilizatörde vakum altında hava girişi engellenecek şekilde kapatılmasına ek olarak septumlar parafilm ile kaplanmıştır. Vialler 1.-3.-6.-9.-12.-15.-18.ve 24. aylarda raf ömrü denemesi yapılacak şekilde gruplandırılmış ve ön denemeler sonucunda daha iyi sonuç veren +4°C’de kapalı kutu içerisinde

saklanmıştır. Belirli aylarda açılacak ürün gruplarına ait liyofilize ürünler Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Liyofilize haldeki ürünler (1- Nutrient broth ortamı 2- Skim milk 3-Sükroz 4- Skim milk + Sükroz 5-Trehaloz 6-Skim milk + Trehaloz 7-Sükroz+ Trehaloz 8-Sodyum glutamat 9-Skim milk + Sodyum glutamat 10-Sükroz+ Sodyum glutamat 11- Maltodekstrin 12- Skim milk + Maltodekstrin 13-Sükroz + Maltodekstrin 14- PVA 15- Skim milk + PVA 16- Sükroz + PVA 17- Yeast ortamı 18- Skim milk + Yeast ortamı 19- Sükroz + Yeast 20- Su)

3.2.9. Liyofilize izolatin reaktivasyonu

Belirlenmiş aylarda yapılacak canlılık sayımı ve biyoparçalama aktivitesinin değerlendirilmesi için raf ömrü süresi dolmuş olan vialler, ön denemeler sonucunda diğer rehidrasyon sıvılarına göre daha iyi sonuç vermiş olan PBS rehidrasyon sıvısıyla canlandırılmıştır.

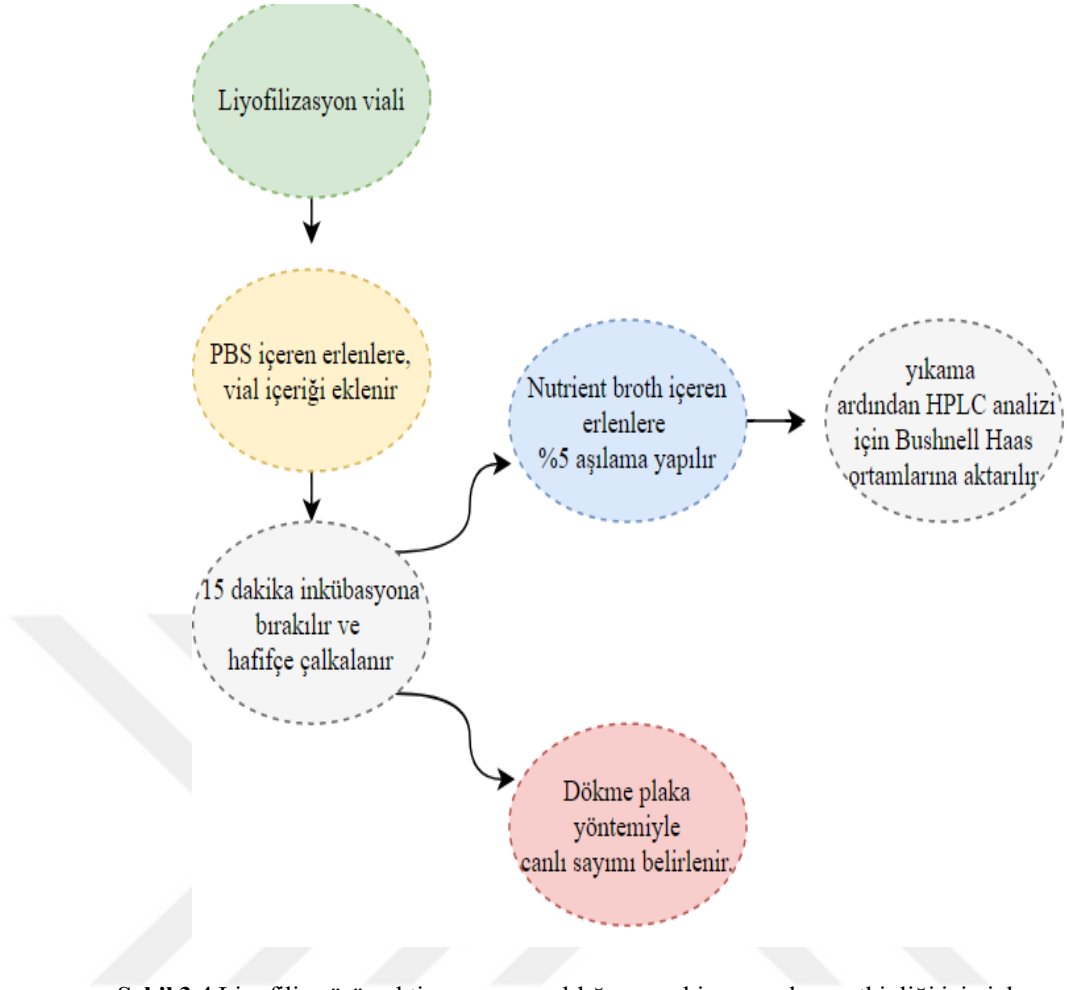
Liyofilize ürün, +4°C’den çıkartılıp, vial içeriğinin tamamı 20 mL’lik PBS erlenlerine eklenerek hafifçe karıştırılıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile koruyucunun homojen dağılması ve mikroorganizmanın aktivasyonu sağlanmıştır. 15 dakika sonunda viallerden 1 mL seyreltme tüpüne alınarak gerekli seyreltmeler yapılarak, petrilere 45°C’ye kadar soğutulmuş PCA besiyeri dökülmüştür.

27°C’de 2 gün süre ile inkübe edildikten sonra koloniler sayılarak seyreltme faktörü ile çarpılıp liyofilizasyon öncesi 1 mL’de bulunan toplam canlı sayısı belirlenmiştir. Liyofilizasyon öncesi vial içeriğinde bulunan 2 mL organizma, mililitresindeki sayıyı bulmak için hesaplanarak sonuç verilmiştir.

Liyofilizasyon öncesi canlılık sayısı ile liyofilizasyon sonrası canlılık sayısı arasındaki fark ile liyofilizasyonun etkisi belirlenmiştir. Kullanılan farklı koruyucu ortamların ve iki farklı liyofilizasyon tekniğinin liyofilizasyon esnasında liyofilizasyon stresine karşı ve liyofilizasyon sonrası canlılığını koruma etkisi bu iki sayım arasındaki farklılık olarak düşünülmüştür.

Biyoparçalama analizi için; PBS ile canlandırılan liyofilize ürün içeren viallerden 1,25 mL alınarak, 25 mL nutrient broth içeren erlenlere aktarılmıştır. 30°C’de, çalkalamalı inkübatörde nutrient ortamında yaklaşık 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gerçekleşen erlenlerdeki ortam falkon tüplerine aktararak 3000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Nutrient ortamından gelecek herhangi bir karbon kaynağı kalmaması için süpernatant uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS içeren steril su ilave edilerek santrifüjlenmiştir. Yıkama sonucu kalan bakteri karışımı spektrofotometre ile 540 nm’de 0,45- 0,5 OD olacak şekilde yoğunluğu ayarlanarak biyoparçalama analizine başlanmıştır. Ayrıca bazı aylara ait nutrient içeriklerinden 1 mL alınıp DNA izolasyonu gerçekleştirmek üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

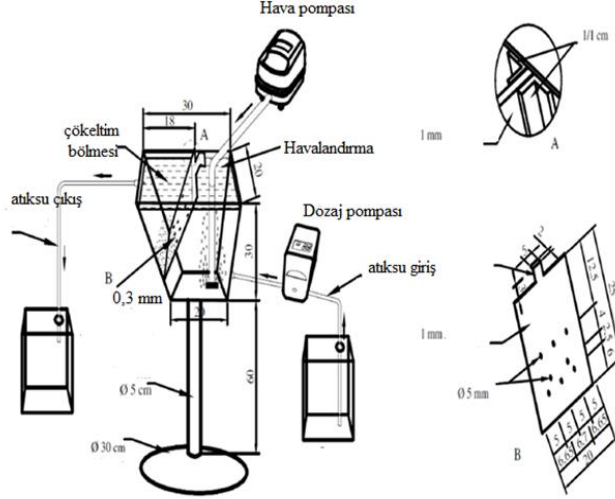
Belirlenmiş aylar sonunda liyofilize ürünün canlılık sayım sonuçlarının ve biyoparçalama aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan adımlar şekil 3.4’te gösterilmiştir.



Şekil 3.4 Liyofilize ürün aktivasyonu, canlılığının ve biyoparçalama etkinliği için izlenecek adımlar

3.2.10. Ürünlerin aktif çamur sisteminde denenmesi için SKTR reaktörün kurulumu

Gerçek şartları temsil etmesi açısından laboratuvar ölçekli reaktör olarak, yaklaşık 3 litre çökeltim bölmesi ile 7 litre havalandırma bölgesi olan 10 litre'lik sürekli karışımli tank reaktör (SKTR) modeli seçilmiştir. İki ünite arası 45 derecelik bir açı yapacak şekilde bir plaka ile ayrılmıştır. Bu plaka üzerinde çamurun geri dönüşümü için delikler mevcuttur. Petrokimya endüstrisi atık su beslemesi tabandan olup havalandırma pompası ve ona bağlı difüzörler yardımı ile havalandırma da tabandan yapılmıştır. Bekleme süresi boyunca reaktörden çıkış suları ise üstten alınmıştır. Sistem yapılandırması Şekil 3.5'te verilmiştir (Sponza ve Gök, 2012).



Şekil 3.5 Çalışmada kullanılan reaktör prototipi (Sponza ve Gök, 2012).

PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. atık giderme ünitesi, biyolojik havuzundan (bahar-yaz dönemi) alınan aktif çamur, öncül çamur olarak kullanılmıştır. Çamurun sürekli beslemesi 1500 mg/L glukoz içeren ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) teorik olarak yaklaşık 1500 mg/L olan yapay atık su (çizelge 3.14) ile sağlanmıştır. Hidrolik alıkonma süresi (HRT), ortalama 48 saat olarak belirlenmiştir. HRT sonunda tank içi ve tank çıkış suyundan örnekler alınarak pH, çözülmüş oksijen (DO), askıda katı madde (MLSS), çamur hacim (ml/L) ölçümleri ile mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Çamur hacmi (ÇH), askıda katı madde (AKM) ölçümleri, çözülmüş oksijen (ÇOI), pH değerleri ve günlük mikroskop altında flok oluşum süreci izlenmiştir. Çamur olgunlaştırılması yaklaşık 60 gün devam edilmiştir.

Çizelge 3.14. Yapay atık su içeriği

Kimyasallar	g(L)
Glukoz	1,5
Pepton	0,6
Üre	0,1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,0836
KH_2PO_4	0,0136
NaCl	0,03
KCl	0,014
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01854
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,00262
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0166

3.2.11. En iyi ürünlerin reaktörde denenmesi

12 ay raf ömrü sonunda biyoparçalama aktivitesi ve canlılığı en iyi olan 2 ürün seçilmiştir. Çamur olgunlaştıktan sonra, 10 litrelik reaktör tankının %5'i olacak şekilde 600 mL Nutrient Broth ortamında üreyen liyofilize aşı kültürü eklenir. 2 ürün için 2 ayrı reaktör kullanılmıştır. Ayrıca 1 reaktörde kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.12. İlgili kimyasalların reaktöre eklenmesi

Reaktördeki son hacmi, 40 mg/L TA, 30 mg/L 4-cba ve 40 mg/L p-tol olacak şekilde kimyasallar eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında reaktörden örnek alınarak HPLC ile kimyasal tüketimi takip edilmiştir. Kimyasalın tükendiği andan itibaren toplam konsantrasyon 1200 mg/L'lere kadar yükseltilmiş ve yine aynı şekilde belirli aralıklarla örnek alınarak HPLC ile biyoparçalama aktivitelerine bakılmıştır. Çizelge 3.15'te reaktör ile çalışılan toplam kimyasal konsantrasyonları gösterilmiştir.

Çizelge 3.15 Reaktörde çalışılan kimyasal ve miktarları

	Kimyasal konsantrasyonu (mg/L)			
	TA	p-tol	4-cba	Toplam
1.deneme	40	40	30	110
2.deneme	100	100	100	300
3.deneme	400	400	400	1200

3.2.13 Biyoparçalama aktivitesi sonucu kalan son ürünün ekotoksikolojik değerlendirilmesi

Liyofilizasyon sonrası raf ömrü denemelerinde kullanılan ürünler ve reaktör denemesindeki atık su örneğinin ilgili kimyasalların parçalanmasının ardından kalan son ürünün toksik olup olmadığı “*Microtox Modern Water Model 500 Analyzer*” toksisite ölçüm cihazı ile belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Microtox M500 cihazı

Microtox Modern Water Model 500 Analyzer cihaz prensibinde uygun görülen protokole göre ölçümler yapılmıştır. Denemeler %2 NaCl canlandırma çözeltisi içinde cihazın çalışma prensibine göre 15°C’de, 490 nm’de gerçekleştirilmiştir. Toksisite düzeyi lüminesans özellikteki *Alivibrio fischeri*’nin test maddesi ile karşılaştığında yaydığı floresan ışık şiddetinin azalma veya artmasına bağlı olarak belirlenmektedir. Sonuçlar bakterinin test maddesi ile muamele edildiği andan itibaren 5. dakika ve 15. dakikadaki yaydığı floresan ışık şiddetinin % 50’sinin kaybolduğu (EC₅₀) konsantrasyon olarak ifade edilmektedir.

Her çalışma için 2,5 ml örnek kullanılmıştır. Örnekler beklemeden analize alınmıştır ve %81,9 Basic metodu kullanılarak 15 ve 30 dakikalık toksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Toksisite çalışmalarında negatif kontrol olarak her bir analiz içerisinde kimyasal içermeyen su kullanılmış, pozitif kontrol olarak ise ayrı bir analiz olarak toksik olduğunu bilinen sodyum azid (NaN₃) kullanılmıştır. Sodyum azidin pozitif kontrol olarak kullanıldığı Microtox sonucu gösterilmiştir. Kullanılan çözeltiler ve yapılan işlemin doğruluğu pozitif kontrolle doğrulanmıştır. Toksik olup olmadığı değerlendirilecek ürünün Microtox cihazında yapılan işlem basamakları şu şekildedir.

- ✓ *Alivibrio fischeri* içeren organizma solüsyonu hazırlanır ve *reagent well*'e konur.
- ✓ F3 kuyucuğuna 1500 µL *diluent* sıvısından eklenir
- ✓ A1 sırası boyunca A5'e kadar ve C1 sırası boyunca C4'e kadar 1000 µL *diluent* eklenir.
- ✓ C5 kuyucuğuna 250 µL *osmotik adjusting solüsyonu* eklenir.
- ✓ Test numunesinden 2500 µL C5 kuyucuğuna eklenir ve homojen hale gelmesi için hafifçe karıştırılır.
- ✓ C5'ten C1'e ve A5'ten A2'ye kadar 1000 µL örnek C5'ten aktarılacak sırayla aktarım yapılır. En son A2 kuyucuğundan 1000 µL örnek alınarak dışarı dökülür.
- ✓ F3 kuyucuğuna 150 µL *Alivibrio fischeri* eklenir.
- ✓ F3 kuyucuğundan 100 µL B1'den B5'e ve D1'den D5'e kadar eklenir.
- ✓ B1 okuma kuyucuğuna eklenir ve set tuşuna basılarak okumaya başlanır.
- ✓ B1'den B5'e ve D1'den D5'e kadar tüpler okutulur.
- ✓ Okuma bittikten sonra A1'den B1'e, A2'den B2'e, A3'den B3'e, A4'den B4'e, A5'den B5'e, C1'den D1'e, C2'den D2'e, C3'den D3'e, C4'den D4'e, C5'den D5'e 900 µL eklenir.
- ✓ Örnekler okuma kuyucuğuna yerleştirilir start tuşuna basılarak okumaya başlanır. 5 dakika sonra tekrar okuma yapılır ve test sonlandırılır.

3.2.14. Genomik DNA izolasyonu

Tez çalışmasında kullanılan izolatların, reaktör örneklerinin ve liyofilizasyon vial içeriğinin izolasyonunda; ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ izolasyon kiti (ZymoD6005) kullanılmıştır. DNA izolasyonları yapılırken aşağıda belirtilen kit kullanım adımları takip edilmiştir.

DNA izolasyon aşamaları şu şekildedir;

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

- 2- Bashing Bead™ Lysis tüpü vorteks yardımıyla maksimum hızda 5 dakika boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.
- 3- Daha sonra 10.000x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- 4- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400 µL, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo – Spin IV spin filtreye aktarılmış ve bir mikrosantrifüj yardımıyla 7.000x g'de 1 dakika boyunca çöktürülmüştür.
- 5- Toplama tüpündeki biriken filtrat üzerine 1200 µL Fungal/bakteriyal bağlanma tamponu ilave edilmiştir.
- 6- Bu aşamadan elde edilen karışımdan 800 µL alınarak yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- 7- 6. basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır.
- 8- 200 µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000x g'de 1 dakika çöktürülmüştür.
- 9- 500 µL Fungal/bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo – Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000x g'de 1 dakika çöktürülmüştür.
- 10- Zymo – Spin IIC kolonu 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 50 µL DNA toplama tamponu doğrudan kolon içerisine ilave edilmiştir. Daha sonra tampon 10.000x g'de 30 saniye çöktürülmüştür. Çöktürme sonrası mikrosantrifüj tüpleri içerisinde DNA elde edilmiştir.

3.2.15. DNA saflık kontrolü ve miktar ölçümü

İzolasyon sonucu elde edilen DNA miktarı ve saflık kontrolü için Nanodrop (Thermo Scientific 2000c) ile ölçümler yapılmıştır. Bu amaçla izolasyonu yapılan DNA örneğinden 1,5 µL cihaza yerleştirilerek 260 ve 280 nm dalga boylarında floresan absorbans ölçümleri yapılarak A260/A280 oranı belirlenmiş ve ng/µL cinsinden miktarı ölçülmüştür. PCR için uygun kalitede DNA'lara ait A260/A280 değerleri 1,80 civarında olması ile doğrulanmıştır.

3.2.16. Genomik DNA'ların elektroforez ile belirlenmesi

DNA miktar ölçümü ve saflık kontrolünden sonra agaroz jelde de kontrolünü sağlamak daha güvenilir bir yöntemdir. Agaroz jelin hazırlığında, 100 mL 1X TAE ve 1,0 g agaroz tartılarak temiz bir erlen içerisine konulmuştur. Mikrodalga fırında agaroz, tampon içerisinde tamamen çözülüp şeffaf bir hal alıncaya kadar kaynatılmıştır. Agaroz jel, 70-80°C'ye kadar soğutularak içerisine belirtilen % 2,5 oranında GelRed (Biotium®) ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Elektroforez küvetine uygun bir tarak yerleştirilerek, agaroz jel içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yaklaşık 1-2 mm kalınlıkta dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika kadar bekletilerek iyice donması sağlanmıştır. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jel yüzeyinin üzerini 1-2 mm kadar kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edilmiş ve ardından tarak çıkarılmıştır. Agaroz jelin kuyucuklarına, 2 µL DNA solüsyonu, 1 µL yükleme boya solüsyonu ve 3 µL su ile karışımı hazırlanarak toplam 6 µL örnek yüklenmiştir.

DNA boyutlandırmasını yapabilmek adına belirteç olarak 1,0 kb'lık DNA Ladder (Nanohelix) kullanılmıştır. Genomik DNA ve belirteç DNA yükleme boyasıyla birlikte ayrı ayrı kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır.

Elektroforez işlemi bir güç kaynağı vasıtasıyla 80 voltta yaklaşık 1 saat yürütülmüş ve süre sonunda elektroforez sonlandırılmıştır. Jel dikkatlice küvetten alınarak UVP Biospectrum görüntüleme cihazı kullanılarak jel üzerindeki bantlar görüntülenmiş ve bant boyutları belirteç DNA bantları ile karşılaştırılarak fikir edinilmiştir. Elektroforez sonucunda jelde yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen genomik DNA'ların tam ve doğru elde edildiğini göstermektedir. Elde edilen genomik DNA daha sonra PCR analizleri için kullanılmak üzere -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.17. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

DGGE yönteminde kullanılmak üzere, DNA'ların in vitro koşullarda sentetik olarak çoğaltılması gerekmektedir. Reaktör veya liyofilize ürünlerden elde edilen total genomik DNA örnekleri öncelikli olarak bakteriler için korunmuş bölge olan 16S rRNA kodlayan DNA bölgelerini hedef alan 11F-1492R primer setleri ile çoğaltılmıştır. HelixAmp™ HyperSense-Taq polymerase (Nanohelix, South Korea) kiti kullanılmıştır. Başlangıç denatürasyon için 95°C'de 2 dk. 1 döngü; amplifikasyon için 35 döngü boyunca denatürasyon 95°C 'de 20 s., 48°C'de 40 s. , 72°C'de 90 s. . ve uzama safhası için 1 döngü boyunca 72°C'de 5 dakika olarak belirlenmiştir. Çoğaltılan bu bölgenin içinde kalan daha kısa ve özgün bölge iç primerler olarak adlandırılan 338F-805R primer setleri ile çoğaltılmıştır. 338F primeri ardışık G-C bazlarından oluşan GC kelepçe oligonükleotidi bağlanarak kullanılmıştır. İç bölge için kullanılan PCR protokolü, başlangıç denatürasyon için 95°C'de 2 dk. 1 döngü; amplifikasyon için 35 döngü boyunca denatürasyon 95°C 'de 20 s., 57°C'de 40 s., 72°C'de 30 s. ve uzama safhası için 1 döngü boyunca 72°C'de 5 dakika olarak belirlenmiştir. Amplifikasyon için PCR tüpüne eklenecek PCR bileşenleri ve reaksiyon basamakları uygulanırken kit içeriğindeki kullanma kılavuzuna bağlı kalınmıştır. Kit protokolü Çizelge 3.16'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.16 PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları

Bileşen	Miktarı
Kalıp DNA	5,0 µL
10X Taq Buffer	5,0 µL
dNTP	1,0 µL
Primer – F	1,0 µL
Primer – R	1,0 µL
5X Tune Up Buffer	10,0 µL
Taq Polimeraz	1,25 unit
Su	Su 50 µL'ye tamamlanır

DGGE çalışmasında kullanılan iç ve dış primer setleri ve nükleotid dizileri çizelge 3.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17 Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri

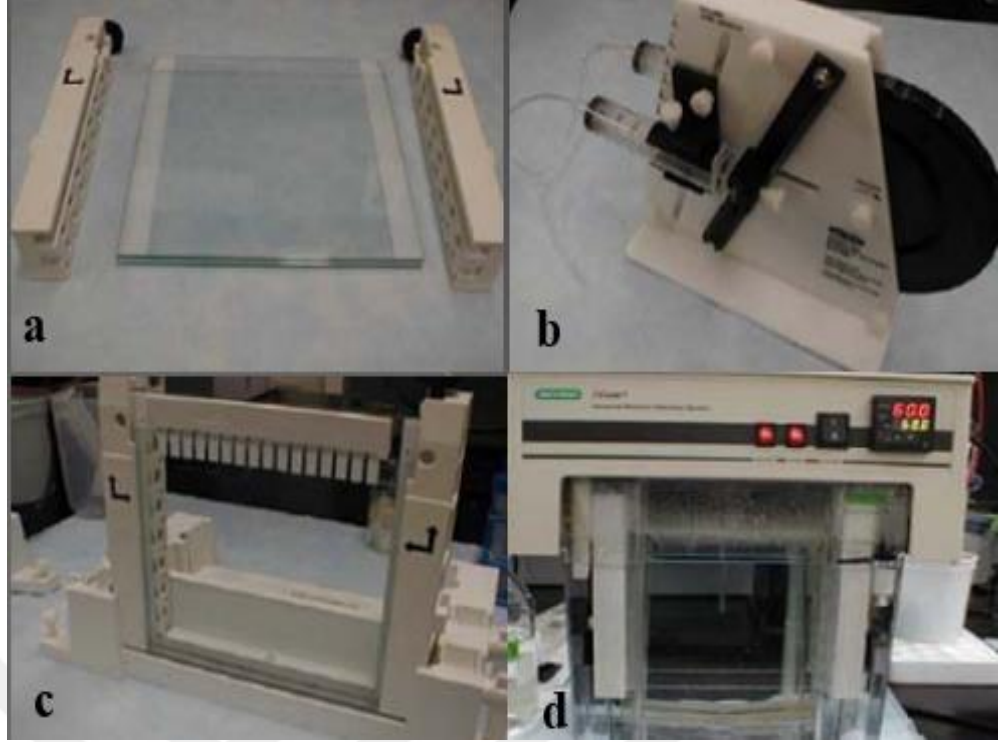
Primer	Nükleotid Dizisi
Bakteri (Dış Bölge)	5'- GTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
11F- 1492R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'
Bakteri (İç Bölge)	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGG
338 F-GC	GGCACGGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAG-3'
805 R	5'- GACTACCAGGGTATCTAATCC – 3'

Çoğaltma işleminden sonra, PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi ve nanodrop ölçümleri yapılmıştır.

3.2.18. DGGE ile mikrobiyota takibi

DGGE (BioRad DCode Universal Mutation Detection System, USA) analizlerinde öncelikli olarak iç bölge primerleri ile elde edilen PCR ürünleri %40-60 denaturant içeren %8'lik poliakrilamid jel kullanılarak yürütülmüştür. Bu sayede genel olarak tüm bantların jeldeki konumları belirlenerek bir sonraki aşamada hazırlanacak olan jel gradiyenti belirlenmiştir. Bantların birbirinden ayrılabilmesi için uygun olan jelin % 40-60 üre-formamid konsantrasyonlarında hazırlanması gerektiği görülmüştür. % 40-60 üre-formamid konsantrasyonlarında hazırlanan poliakrilamid jel uygun koşullarda dökülerek dondurulmuş ve bir gece buzdolabında bekletilerek jelin gerekli hali alması sağlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri jele yüklenerek 1X TAE tamponu ile doldurulan ve ısısı 60°C'ye ayarlanmış olan tampon çözelti içerisinde 16 saat boyunca 85 volt güç uygulanarak yürütülmüştür.

DGGE için gerekli olan poliakrilamid jel içeriği hazırlandıktan sonra gerekli hazırlıklar şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 DGGE sistemi

Şekil 3.7’de camlar alkol ile iyice temizlendikten sonra iki cam arasına spacer yerleştirilerek tank sistemine yerleştirilir. Daha sonra poliakrilamid jeli yüklemek için şekil b de görüldüğü gibi arka kısımdaki şırıngaya (uzun hortum) yüksek denaturant, ön şırıngaya ise (kısa hortum) düşük konsantrasyon eklenecektir. 15 mL eklenecek bu denaturantlara amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletilendiamin (TEMED) jelin katılaşmasını sağlayacaktır. APS taze hazırlanması gereken bir kimyasaldır. 1 mL ultra saf suya 0,1 g APS tartılır ve hafifçe vorteksle kolayca çözülmemektedir. 15 mL lik hacim için 135 μ L APS ve 13,5 μ L TEMED eklenir. Hızlı bir şekilde şırınga yardımıyla yavaş yavaş iki cam arasına jel dökülür. Şekil c’de görüldüğü gibi örneklerin yüklenmesi için tarak donmadan önce takılır. Jelin 3 saat oda sıcaklığı veya +4°C de jelin donmasının ardından örnekler jel sistemine yüklenir.

Elektroforezi takiben poliakrilamid jel 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde Gel-Green (Biotium) boyası kullanılarak karanlık koşulda 100 rpm’de 15 dakika boyunca post jel boyaması yapılmıştır. Boyama süresi sonunda jel alınarak görüntüleme sistemi ile bantların görüntülenmesi sağlanmıştır. Yüklenen her bir kuyucuğun yürüdüğü hat boyunca en keskin, yoğun ve farklı yerlerde konumlanan bantlar UV ışığı altında steril bistüri ile kesilerek steril mikrosantrifüj tüpleri

içerisinde bulunan 40 µL ultra saf suya konulmuş ve bir gece 4°C'de bekletilerek jel içinde bulunan oligonükleotidlerin suya geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra jelden kazanılan bant içeren sudan 5,0 µL'si kullanılarak GC clamp içermeyen 338F-805R primer seti ile reamplifikasyon reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Reamplifikasyondan elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde tekrar yürütülerek bantlar doğrulandıktan sonra örneklerdeki mikrobiyal komüniteyi belirlemek amacıyla DNA dizi analizine gönderilmiştir.

Dizi analiz sonuçları DNA Baser V5 ve Mega 7 programları kullanılarak ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Dizi temizlemeleri yapıldıktan sonra NCBI veri tabanında BLAST edilen dizilerden dominant türler tespit edilmiştir. DNA dizi analizleri sonucu, dominant mikrobiyotanın filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları oluşturmak için öncelikli olarak ClustalW ile diziler hizalanmıştır. Daha sonra Tamura-Nei modeline dayalı olan maximum likelihood ile bootstrap metodu kullanılarak 1000 tekrarı olacak şekilde filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3.2.19. Real-time PCR ile kalitatif ve kantitatif belirleme

Aktif çamur aklimasyonu sonucu TA, 4-cba ve p-tol kimyasallarının ve 16 izolat karışımının eklenmesinin ardından, HPLC verileri ışığında kimyasalın eklendiği an ve bitişinde olmak üzere SKTR'den aktif çamur örneği alınarak genomik DNA izolasyonları yapılmıştır.

Reaktörden alınan DNA örnekleri dışında, liyofilizasyon ürünleri içinde Real-time PCR'da bakteri içeriği hakkında bilgi edinmek için örnek alınmıştır. 24 ay raf ömrüne sahip liyofilize ürün içeriğindeki DNA sayılarını tespit etmek için, liyofilize vial, PBS ile canlandırıldıktan sonra %5 olacak şekilde nutrient ortamına aşılama yapılmıştır. Nutrient ortamında büyüme gösteren erlenlerden 1mL örnek alınarak bölüm, 3.2.14'te belirtildiği gibi DNA izolasyonları yapılmıştır.

Tüm örneklerle ait DNA izolasyonları gerçekleştirildikten sonra genomik DNA saflıkları nanodrop ile belirlendikten sonra, daha önceden belirtilen primer setleri kullanılarak reaktörde var olan izolatların saptanması gerçekleştirilmiştir. Reaktör içindeki aşı kültürlerinin biyoparçalama esnasında eş zamanlı olarak takibinin yapılabilmesi için Real-time PCR cihazı, Light Cycler 96 System (Roche,

Germany) kullanılmıştır. Bu bağlamda, öncelikle izolatların sistemde saptanabilmesi için bazı izolatlara özgü primer setleri tasarlanmıştır. Ancak spesifik mikroorganizmalar olduğundan dolayı hepsi için cihazda çalışmaya uygun primer seti veya primer/prob setlerine ulaşılammıştır. İzolatlardan *Acinetobacter* sp., *P. fluorescens*, *R. planticola*, *Aeromonas* sp., *P. putida* ve total bakteri için çalışılan primer ve primer/prob setleri literatür kaynaklı olarak sentezletirilmiştir. Diğer izolatlar için primer setleri tez çalışmasında yer aldığı, SANTEZ 0719-2014 (112D044 TÜBİTAK) proje kapsamında tarafımızca tasarlanarak sentezletilmiştir. Bunun için 13 izolattan pratikte çalışılması mümkün olan 9'u için primer ve primer/prob sistemleri kullanılmıştır. 1 izolat için primer/prob sistemi, geri kalan 8 izolat ve total bakteri için ise sadece primer setleri kullanılmıştır (Çizelge 3.18).

Primer tasarımı için öncelikle her bir mikroorganizma için özel olabilecek gen bölgeleri <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.ebi.ac.uk/ena> ve <http://www.uniprot.org> veri tabanı kullanılarak araştırılmıştır. Saptanan gen bölgelerine uygun primer setleri ise <http://primer3.ut.ee> ve <http://www.oligoarchitect.com> programları kullanılarak tasarlanmıştır.

Çizelge 3.18 Real-time PCR'da kullanılacak primer setleri ve dizileri

Hedef Mikroorganizma	Primer/Prob	Dizi (5'> 3')	Referans
<i>Acinetobacter</i> sp.	ALK-F	GCGTAATCCAACCTGATGAAGAA	Phrommani ch et al., 2009
	ALK-R	ACCAAGCAAAATTTTGTCAATAAATG	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PF60	FAM-CCAGTGCCTTCTTCAACGGT-BHQ2	Saha et al., 2012
	Pf-cpn-F	CTGACACCAAGGCTATCG	
	Pf-cpn-R	GCCTTCTACAACCGACAG	
<i>Raoultella planticola</i>	HdcF	TCAATTAATAACTGCGGTGACTG	Bjornsdottir -Butler et al., 2011
	HdcR	CCATTGGTCACATACCCCA	

<i>Chryseobacterium</i> sp.	F5	TTTGGGTTTTCGGATTCAGAG	SANTEZ
	R5	GAAGGAAGGTCTATTTCTAAACCGAT	
<i>Comamonas testosteroni</i>	F	ATGGTTTGGTGCTCGTCGAAAGAGAA	0719-2014 (112D044)
	R	CATTAGAGTGCTCAACTGAATGTAGC	
<i>Micrococcus luteus</i>	F	GAAGTCGCGGAGGTGATG	TÜBİTAK)
	R	TCGTGGAGTGGCTGAACC	
<i>Aeromonas</i> sp.	GyrB-F	GAAGGCCAAGTCGGCCGCCAG	Robertson et al., 2014
	GyrB-R	ATCTTGGCATCGCCCGGGTTTTC	
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	glyA- F	ATACCGTCCTCGGGCTGAACC	SANTEZ 0719-2014 (112D044) TÜBİTAK)
	glyA-R	CTTCTTCGCAATCTCCGCATC	
<i>Pseudomonas putida</i>	Hfq-F	AAAGGTCCCGGTATCCATTTAC	Moreno et al., 2015
	Hfq-R	TGACGGTGTTCTTCAGCAATA	
Total bakteri	F	GTG STG CAY GGY TGT CGT CA	Maeda et al., 2003
	R	ACG TCR TCC MCA CCT TCC TC	

Real-time PCR’da kullanılmak üzere seçilen primerlere ait koşullar çizelge 3.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.19 Real-time PCR’da SYBR Green Ampliqon kiti ile yapılan primerlere ait PCR protokolü

Hedef mikroorganizma	Real-time PCR Protokolü		Döngü Sayısı
<i>Acinetobacter</i> sp.	Ön inkübasyon	95°C’de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C’de 10 sn 53°C’de 10 sn 72°C’de 7 sn	45
	Melting	95°C’de 10 sn 65°C’de 60 sn	1

		97°C'de 1 sn	
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Chryseobacterium sp.</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 55°C'de 10 sn 72°C'de 8 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Comamonas testosteroni</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 55°C'de 10 sn 72°C'de 7 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Micrococcus luteus</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 53°C'de 10 sn 72°C'de 15 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Aeromonas sp.</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 65°C'de 10 sn 72°C'de 8 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1

<i>Arthrobacter</i> sp.	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 58°C'de 10 sn 72°C'de 17 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Pseudomonas putida</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 53°C'de 10 sn 72°C'de 5 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
<i>Raoultella planticola</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 53°C'de 10 sn 72°C'de 6 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1
Total bakteri	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 60°C'de 10 sn 72°C'de 6 sn	45
	Melting	95°C'de 10 sn 65°C'de 60 sn 97°C'de 1 sn	1
	Cooling	37°C'de 30 sn	1

Pseudomonas fluorescens organizması Real-time PCR’da TaqMan probu ile belirlenmiştir. Çizelge 3.20’de PCR primer ve proba ait PCR protokolü gösterilmiştir.

Çizelge 3.20 TaqMan probu ile gerçekleştirilen PCR protokolü

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ön inkübasyon	95°C’de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C’de 10 sn	45
		50°C’de 15 sn	
		72°C’de 1 sn	
	Cooling	37°C’de 30 sn	1

Tasarlanan primerler ile cihazda belirlenebilme durumlarına bağlı olarak her izolat için standart eğriler oluşturulmuştur. *Pseudomonas fluorescens* haricinde diğer izolatlar için; kalitatif ve kantitatif analizlerde SYBR® Green I boyası kullanılmıştır. SYBR Green yöntemi için “Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green” kit kullanılmıştır. Çizelge 3.21’de tez çalışmasında kullanılan SYBR Green yöntemindeki PCR bileşen ve miktarı gösterilmiştir.

Çizelge 3.21 SYBR Green için kullanılan kite ait PCR bileşenleri ve miktarları

SYBR GREEN I	
F primer	0,8 µL (10 mM)
R primer	0,8 µL (10 mM)
Master mix	10 µL
Su	5,4 µL
Örnek (DNA)	3 µL
Toplam hacim	20 µL

Pseudomonas fluorescens için sentezlettirilen TaqMan probu için Real-time çalışmalarında “FastStart Essential DNA Probes Master” (Roche) kiti kullanılmıştır. Çizelge 3.22’de kit bileşenleri ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 3.22 TaqMan probu için kullanılan kite ait PCR bileşenleri ve miktarları

TaqMan probu	
F primer	1 µL (10 mM)
R primer	1 µL (10 mM)
Prob	1 µL (10mM)
Master mix	10 µL
Su	4 µL
Örnek (DNA)	3 µL
Toplam hacim	20 µL

Primer setlerin bakterilerle kontrolü sağlandıktan sonra her iki yöntemlede çoğaltılan PCR ürünleri temizleme kiti vasıtasıyla saflaştırılmıştır (Nucleospin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel). Saflaştırılan PCR ürünlerinin 260/280 nm dalga boyu ölçümleri ile miktar analizleri yapılmış ve saflıkları kontrol edilmiştir (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Daha sonra her bir ürün için optik yoğunluk değerleri baz alınarak molekül DNA hesaplaması yapılmıştır. Bunun için aşağıdaki denklem kullanılmıştır. Denklemde DNA'yı oluşturan nükleotidlerin (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin) her birinin ortalama molekül ağırlığı 330'dur. Bu nedenle formülde çift iplikli DNA için 660 alınmaktadır.

$$DNA \text{ kopya sayısı} = \frac{g \times (6,022.10^{23})}{uzunluk \times 660}$$

Molekül miktarları hesaplanan DNA ürünlerinin bir seri ardışık seyreltmeler (10^8 'den 10^2 'ye kadar) yapılarak Real-time PCR'da standart eğri oluşturma işlemine geçilmiştir. Standart eğri oluşturulması bilinmeyen örnek içerisinde var olan hedef DNA molekülünün miktar hesabı için önemli bir basamaktır. Bu yüzden seyreltmeler hassas şekilde yapılmıştır. Her bir izolat için kullanılan primer seti veya primer/prob seti ile seyreltilen ilgili ürünler Real-time PCR'da çalışılmıştır. Reaksiyon sonunda sisteme verilen DNA molekül miktarlarına karşılık gelen Ct

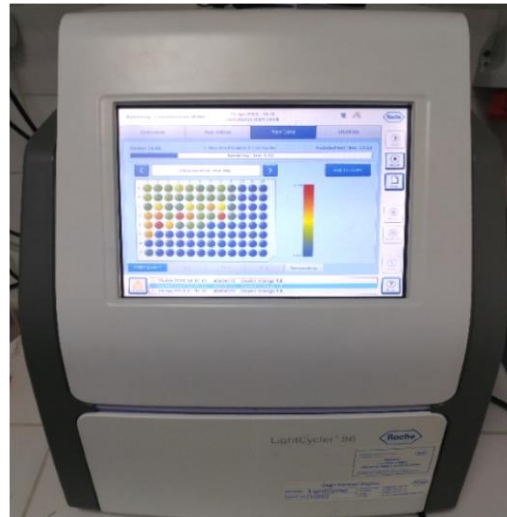
(eşik değeri) değerleri ile slope (eğim) ve intercept değerleri dikkate alınarak standart eğriler oluşturulmuştur

PCR reaksiyonu devam ettiği esnada oluşan ürünlerin log-linear fazdaki artış sonucu elde edilen veriler ile oluşturulan standart grafiği PCR verim hesaplamasında kullanılmaktadır. Verim hesabı yapılırken aşağıdaki formül kullanılmakta ve % değeri olarak verim gösterilebilmektedir.

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

İdeal PCR verimi % 90 -100 arasında olması gerekmektedir. %100 PCR veriminin elde edilebilmesi için, standart eğri grafiği sonucu oluşan slope (eğim) değerinin -3,32 olması gerekmektedir. -3,32 değerine yaklaşan grafik eğimi ile PCR verimi 1 değerine yaklaşmakta ve buna bağlı olarak %100 verim elde edilmektedir (Vural, 2015).

Roche LightCycler® 96 System ile yapılan standartlardan sonra örnekler standartla birlikte PCR'a koyulmuştur. PCR'da eş zamanlı floresans miktarı ve Ct değerleri görülebilmektedir. Şekil 3.8'de tez çalışmasında kullanılan qPCR gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Tez çalışmasında kullanılan Real-time PCR cihazı

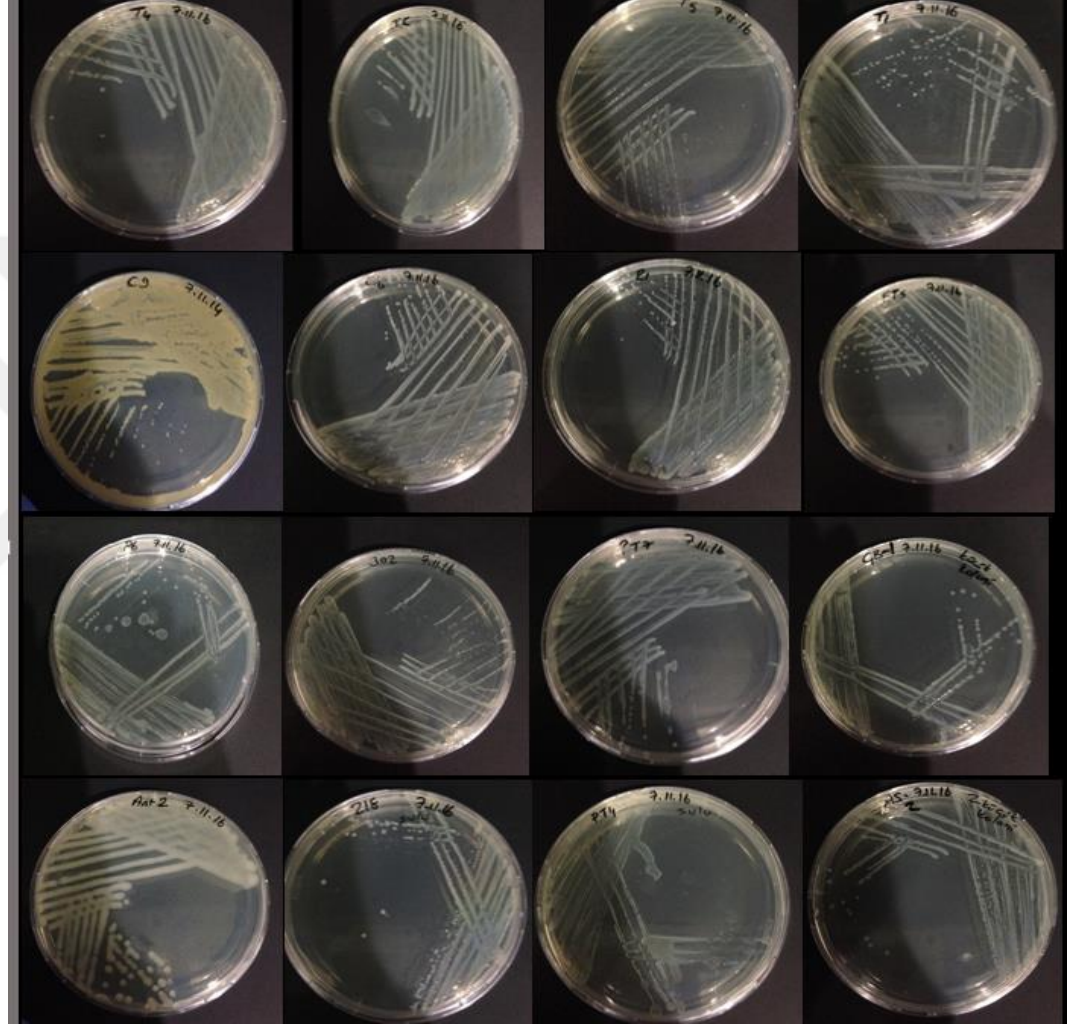
PCR sonlandıktan sonra kendi yazılımı ile uygun konsantrasyondaki standart referans alınarak örneklerdeki miktar analizi belirlenir. Sonuçlar mililitresindeki DNA kopya sayısını ifade etmelidir. Bu nedenle reaktörden alınan örneklerin hacmi, DNA izolasyonunda kullanılan miktarı ve PCR bileşenine eklenilen kalıp DNA miktarı hesaplamalarda göz önünde bulundurulur.



4. BULGULAR

4.1. Mikroorganizmaların Petri Görüntüsü

Liyofillize edilecek 16 organizmaya ait mikrobiyal karışımı fermentörde üretmeden önce, her bir mikroorganizma için PCA ortamında saflıkları kontrol edilmiştir. 16 bakterinin PCA ortamındaki görüntüsü şekil 4.1’de gösterilmiştir.

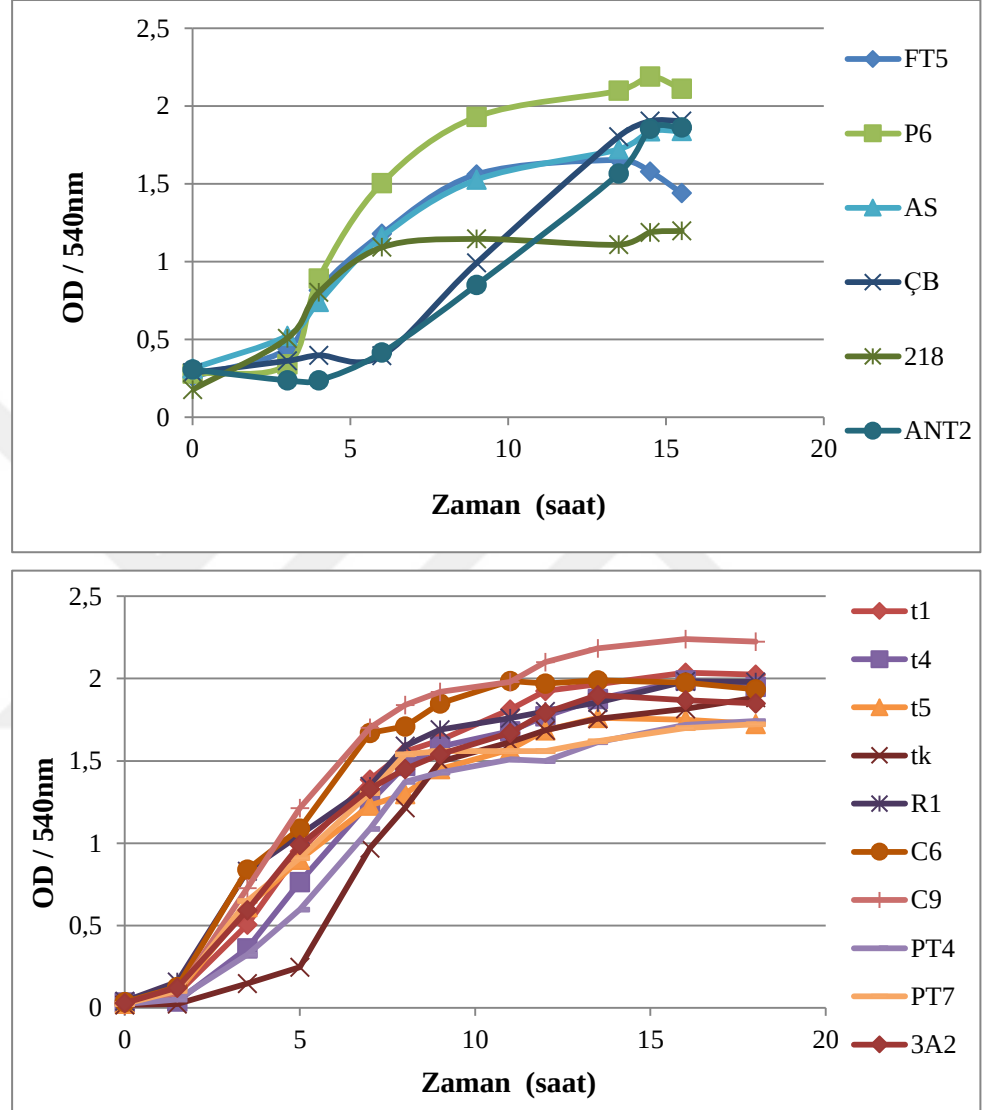


Şekil 4.1 16 izolatın PCA ortamındaki görüntüsü

4.2. Mikroorganizmaların Büyüme Eğrisi Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılan 16 izolatın liyofilizatöre ekleneceği büyümede en etkin olduğu logaritmik fazı belirlemek amacıyla yöntemler kısmında belirtildiği şekilde spektrofotometrik ölçümlerle ve dökme plaka yöntemiyle büyümenin sayısal sonuçları belirlenmiştir. Mikroorganizmaların büyüme eğrisi grafikleri

Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda organizmanın Nutrient Broth ortamına aşılama sonrası yaklaşık 11. saat organizmaların en etkin olduğu zaman olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2 İzolatların büyüme eğrisi grafikleri

4.3. Liyofilizasyon Öncesi - Sonrası Viallerin Ağırlıkları

Liyofilizasyon öncesi septumları kapalı şekilde ağırlıkları alınan boş viallerin, içerikleri eklendikten sonra ve liyofilizasyon sonrası da vial ağırlıkları alınarak içeriklerin net ağırlıkları bulunmuştur. Darası alınmış vial içeriği başlangıçta yaklaşık 4,0 g olup liyofilizasyon sonrası ağırlıkları çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Vial içeriğine göre liyofilizasyon öncesi- sonrası ortalama ağırlıkları ve ağırlık kaybının yaklaşık yüzdesi

İçerik	Liyofilizasyon öncesi (g)	Liyofilizasyon sonrası Freeze-drying (g)	Liyofilizasyon sonrası ağırlık kaybının yaklaşık yüzdesi (%)
Nutrient broth	3,9514	0,3456	93
Skim milk	3,7991	0,4753	88
Sükroz	4,2457	0,5736	87
Skim milk Sükroz	3,8665	0,6681	83
Trehaloz	4,0704	0,4892	88
Skim milk+ Trehaloz	4,1357	0,4823	89
Sükroz+ Trehaloz	3,9916	0,5104	89
Na glutamat	3,9983	0,3728	91
Skim milk+ Na glutamat	3,9745	0,4945	88
Sükroz+ Na glutamat	4,1985	0,5731	86
Maltodekstrin	4,1165	0,411	89
Skim milk+Maltodekstrin	3,8606	0,5187	87
Sükroz+Maltodekstrin	4,0433	0,5171	89
PVA	3,9858	0,6591	83
Skim milk + PVA	3,8716	0,405	90
Sükroz+ PVA	3,8028	0,5586	85
Yeast	4,0094	0,4458	89
Skim milk + Yeast	4,0099	0,4541	89
Sükroz+Yeast	4,0956	0,4593	89
su	4,0961	0,0500	99

4.4. Liyofilizasyon Tekniği, Saklama Koşulları ve Rehidrasyon Sıvısı Ön Denemeleri Sonucu

4,1.10⁸ başlangıç sayısına sahip organizma karışımının farklı koruyucularla yapılan liquid-drying ve freeze-drying canlılık sonuçları 1 ay raf ömrü ardından karşılaştırılmıştır. Deneme sonucunda freeze-drying tekniği canlılık sonuçları bakımından liquid-drying tekniğine göre daha iyi sonuç vermiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca şekil 4.3 ve 4.4’de görüldüğü gibi liyofilizasyon sonrası liyofilize ürün elde etme aćısından da daha başarılı sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Freeze-drying ve liquid-drying teknikleri ile liyofilize örneklerin 1 aylık raf ömrüne ait canlılık sonuçları

<u>Koruyucular</u>	<u>Freeze-Drying</u>	<u>Liquid-Drying</u>
Nutrient broth	1,0.10 ⁶	5,0.10 ⁵
Skim milk (%10)	5,6.10 ⁷	1,0.10 ⁷
Sükroz (%10)	8,5.10 ⁶	8,0.10 ⁵
Skim milk (%10) + Sükroz (%10)	1,8.10 ⁸	7,0.10 ⁷
Trehaloz (%5)	3,0.10 ⁷	1,0.10 ⁷
Skim milk (%10) + Trehaloz (%5)	1,0.10 ⁸	9,0.10 ⁷
Sükroz (%10) + Trehaloz (%5)	1,6.10 ⁷	3,0.10 ⁵
Na glutamat (%2.5)	1,0.10 ⁷	1,0.10 ⁷
Skim milk(%10) + Na glutamat (%2.5)	1,1.10 ⁸	6,8.10 ⁷
Sükroz(%10) + Na glutamat (%2.5)	1,5.10 ⁷	1,5.10 ⁷
Maltodekstrin (%5)	1,0.10 ⁷	1,0.10 ⁷
Skim milk (%10)+ Maltodekstrin (%5)	7,0.10 ⁷	4,0.10 ⁷
Sükroz (%10)+ Maltodekstrin (%5)	3,0.10 ⁷	7,8.10 ⁶
PVA (%5)	5,0.10 ⁴	1,0.10 ³
Skim milk (%10) + PVA(%5)	5,0.10 ⁵	1,0.10 ⁵
Sükroz (%10) + PVA (%5)	3,0.10 ⁵	1,2.10 ⁴
Yeast(%5)	3,0.10 ⁶	3,0.10 ⁶
Skim milk(%10) + Yeast(%5)	4,0.10 ⁷	8,0.10 ⁷
Sükroz (%10)+ Yeast (%5)	1,2.10 ⁷	2,5.10 ⁷
su	0	0



Şekil 4.3 Koruyucu olarak %5 trehaloz içeren viallerin liyofilizasyon sonrası görünümü

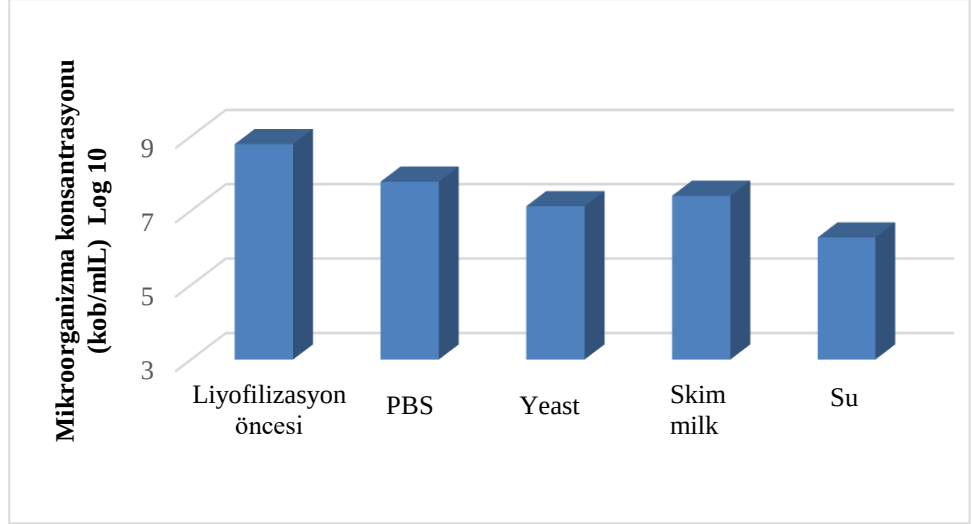
Trehaloz içeren viallerin liquid-drying tekniğiyle liyofilize edilmesinde örnek sıvı halde kalmış ve başarılı sonuç elde edilememiştir.



Şekil 4.4 Koruyucu olarak sükroz+ yeast içeren viallerin liyofilizasyon sonrası görünümü

Sükroz ve yeast içeren örneklerin freeze ve liquid-drying örneklerinde başarılı sonuç elde edilememiştir. Özellikle liquid-drying tekniğinde örnek tamamen sıvı kalmıştır, ürün içeriğinin de dışarıya taşıdığı gözlenmiştir.

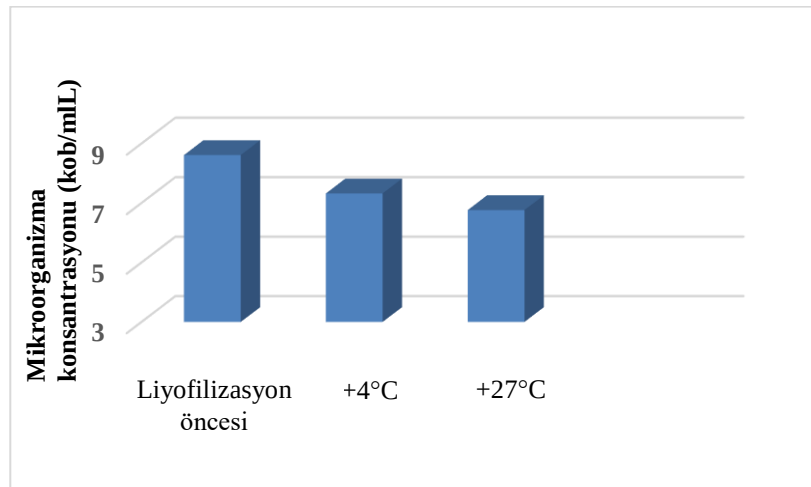
Ön denemelerde çalışılan diğer parametre ise rehidrasyon sıvısıdır. Skim milk içeren vial 1.ay sonunda 4 farklı rehidrasyon sıvısı ile canlandırılmış ve canlılık sonuçları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.5'te farklı rehidrasyon sıvılarının canlılık sayılarına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Koruyucu olarak skim milk kullanıldığında farklı rehidrasyon sıvılarına bağlı olarak değişen canlılık sayım sonuçları

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi rehidrasyon sıvılarının canlılık sonuçlarında en yüksek sonuç PBS rehidrasyon sıvısı olarak kullanıldığında görülmüştür. Çok önemli bir fark görülmemiştir ama ilerleyen raf ömrü sürelerinde bu fark daha da artabilecektir. Bu nedenle tez çalışmasında rehidrasyon sıvısı olarak PBS kullanılmıştır.

Koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürün saklama sıcaklığının belirlenmesi için +4°C ve +27°C’de saklanmıştır. 1 ay saklama koşulları sonucunda değişen canlılık sayım sonuçları şekil 4.6’da gösterilmiştir.



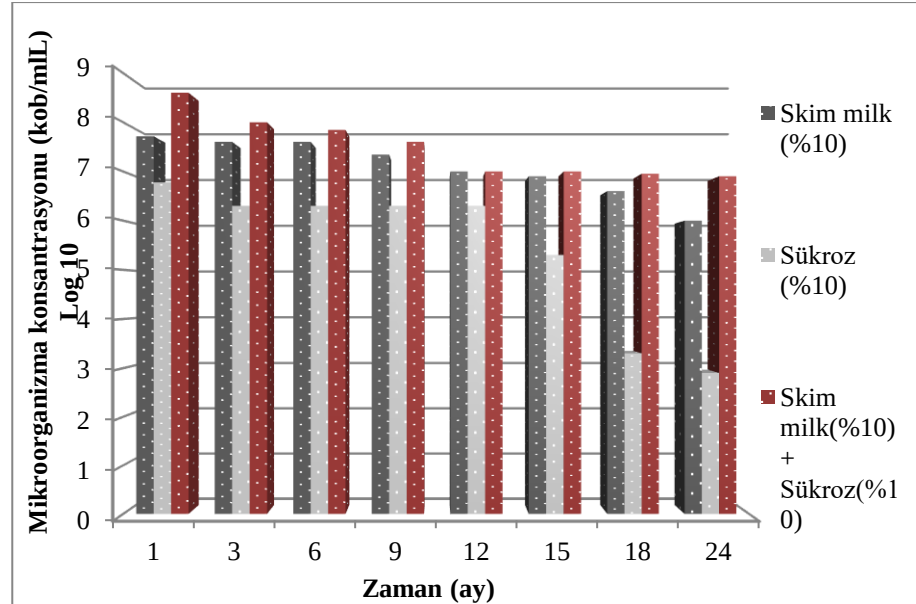
Şekil 4.6. Koruyucu olarak skim milk kullanıldığında farklı saklama sıcaklığına göre değişen canlılık sayım sonuçları

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürün saklama sıcaklığı denemesinde 1 ay sonunda yaklaşık 1 log’luk bir farktan dolayı +4°C’de daha başarılı sonuç elde edilmiş ve tez çalışması boyunca tüm liyofilize ürünler +4°C’de 24 ay’a kadar saklanmıştır.

Ön denemelerin sonucunda liyofilizasyonda freeze-drying tekniği, rehidrasyon sıvısı olarak PBS ve liyofilize ürünlerin saklama koşulları olarak +4°C’ye karar verilmiştir.

4.5. Liyofilizasyonda Kullanılacak Aşı Kültürünün Liyofilizasyon Öncesi ve Sonrası Canlılık Sayım Sonuçları

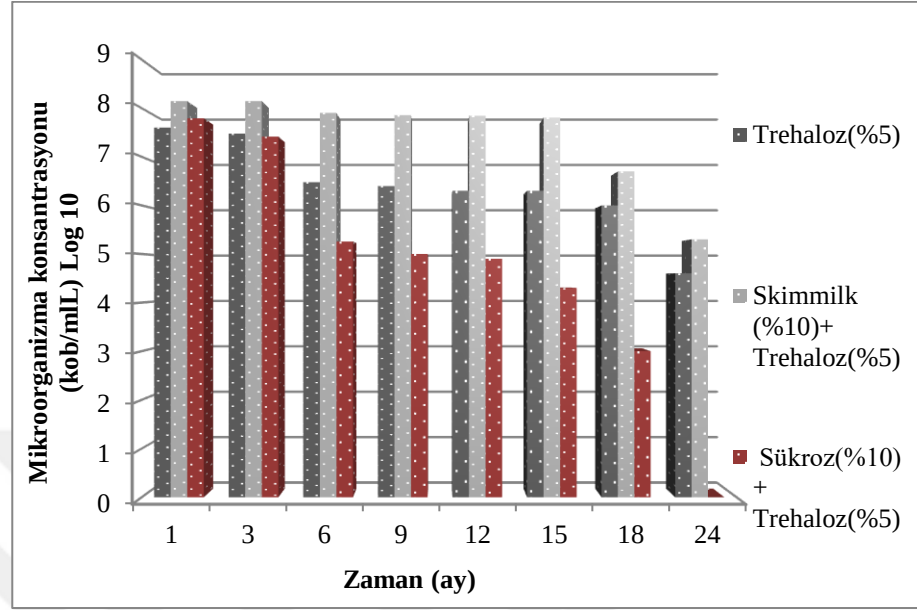
Mikroorganizmaların liyofilizasyon öncesi dökme plaka yöntemiyle canlılık sayımı yapılmış ve başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu $6,2 \cdot 10^8$ kob/mL olarak belirlenmiştir. 20 farklı içerikte bakterilerin aynı OD değerleri ile liyofilize edilmiştir. 20 farklı içerikle hazırlanan vialler arasından su içeren viallerde 1. ay sonunda üreme gerçekleşmemiştir. Nutrient içeren viallerde ise 1. ayda yaklaşık 3 log’luk bir azalma görülmüş ve diğer aylarda ise üreme gerçekleşmemiştir. Üreme gerçekleşen vialler arasından liyofilizasyon sonrası 1-3-6-9-12-15-18-24. ay raf ömrüne sahip ürünlerin canlılık sonuçları şekil 4.7; 4.8; 4.9; 4.10; 4.11; 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Skim milk, sükroz ve skim milk + sükroz içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

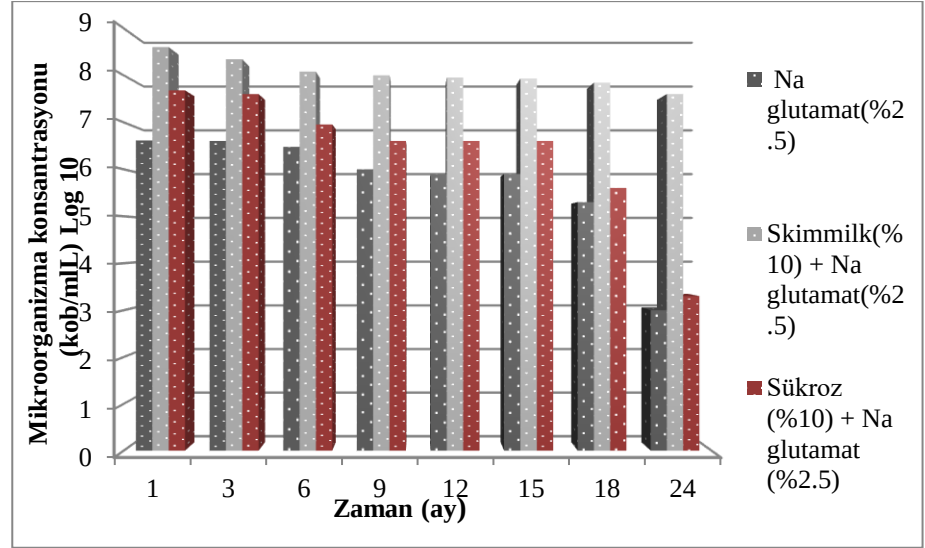
Şekil 4.7’de görüldüğü gibi skim milk, sükroz, skim milk + sükroz koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay’a kadar olan canlılık sayım

sonuçlarında, 24 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) süktroz koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Skim milk + süktroz birlikte koruyucu olarak kullanıldığında ise en az canlılık kaybı (yaklaşık 2 log) olduğu görülmüştür.



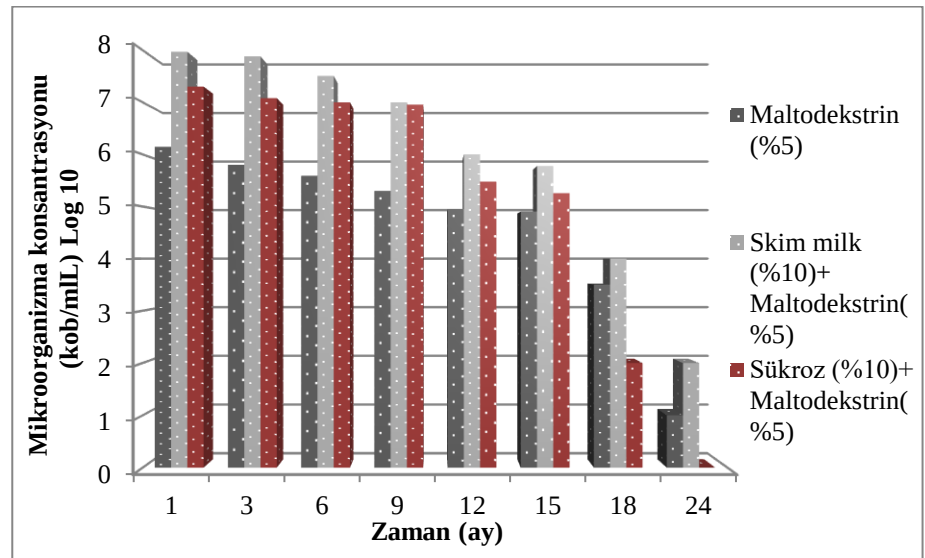
Şekil 4.8 Trehaloz, skim milk + trehaloz ve süktroz + trehaloz içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi trehaloz, trehaloz+skim milk, süktroz+trehaloz koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay’a kadar olan canlılık sayım sonuçlarında, 24 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) süktroz+trehaloz içeriğinde olmuştur. 24 ay sonunda süktroz+ trehaloz’un koruyucu olarak kullanıldığı ürün’de canlılık görülmemiştir. Bu koruyucu 18. ay 10^3 mertebesinde olduğu görülmüştür. 24 ay sonunda en az canlılık kaybı (yaklaşık 3 log), skim milk + trehaloz içeriğinde olduğu gözlenmiştir. Bu liyofilize ürün içeriğinde 1 yıl sonra canlılık sayımlarında hemen hemen 1 logluk düşüş bile gerçekleşmemiştir.



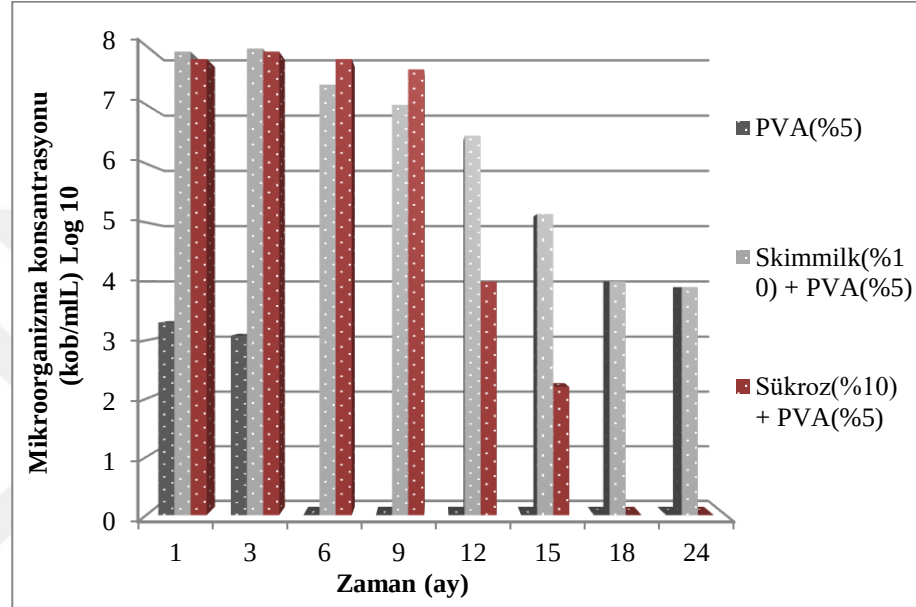
Şekil 4.9 Sodyum glutamat, skim milk + sodyum glutamat ve sükroz + sodyum glutamat içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

Şekil 4.9’da görüldüğü gibi sodyum glutamat, skim milk+ sodyum glutamat ve trehaloz+ sodyum glutamat koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay’a kadar olan canlılık sayım sonuçlarında, 24 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) sodyum glutamat koruyucu olarak kullanıldığında olmuştur. Sükroz+ sodyum glutamat içeren üründe de benzer canlılık kaybı gözlenmiştir. Fakat sodyum glutamat + skim milk beraber kullanıldığında en iyi canlılık sonucu gözlenmiştir. Bu ürün, tez çalışmasında kullanılan koruyucular arasında canlılığı en yüksek düzeyde koruyan koruyucu grubudur.



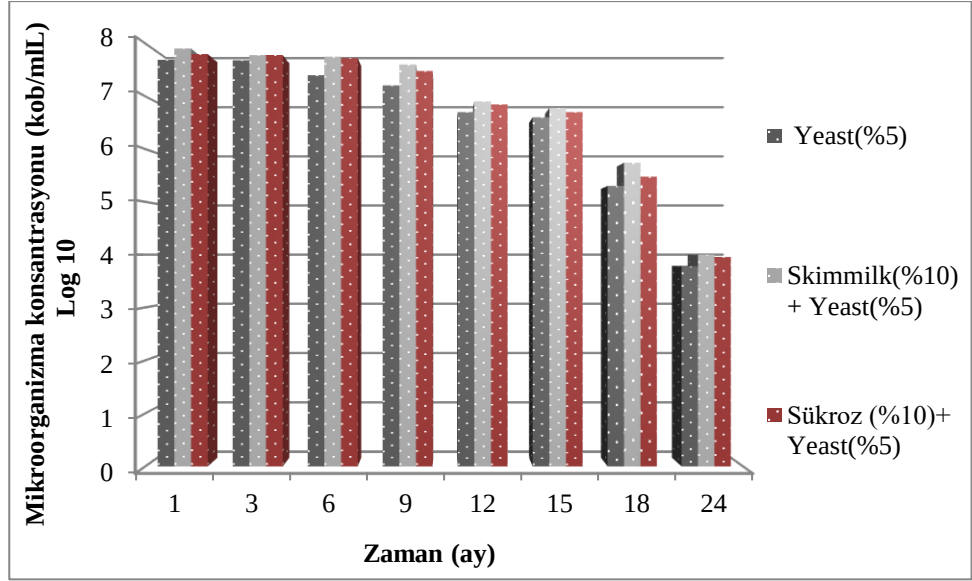
Şekil 4.10 Maltodekstrin, skim milk + maltodekstrin ve sükroz + maltodekstrin içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi maltodekstrin, skim milk+ maltodekstrin ve süktroz+ maltodekstrin koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay'a kadar olan canlılık sayım sonuçlarında, 24 ay sonunda canlılığı sona eren ürün süktroz +maltodekstrin olmuştur. 18. ay canlılık kaybı ise yaklaşık 6 log'dur. Skim milk + maltodekstrin içeren ürün diğerlerine göre canlılığını daha iyi korumuştur fakat genel olarak maltodekstrin 2 yıl'a varan raf ömrü çalışmalarında çok uygun bir koruyucu olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.11 PVA, skim milk + PVA ve süktroz + PVA içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi PVA, skim milk+ PVA ve süktroz+ PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay'a kadar olan canlılık sayım sonuçlarında 24 ay sonunda canlılığını sadece skim milk + PVA koruyucularını içeren vial korumuştur. Sadece PVA koruyucu olarak kullanıldığında ise 1.ay'dan itibaren yüksek oranda canlılık azalmış ve 6. ay raf ömrüne sahip viallerdeki bakteriler canlılığını yitirmişlerdir. PVA, bakteri saklama çalışmalarında iyi bir koruyucu olmadığı belirlenmiştir.



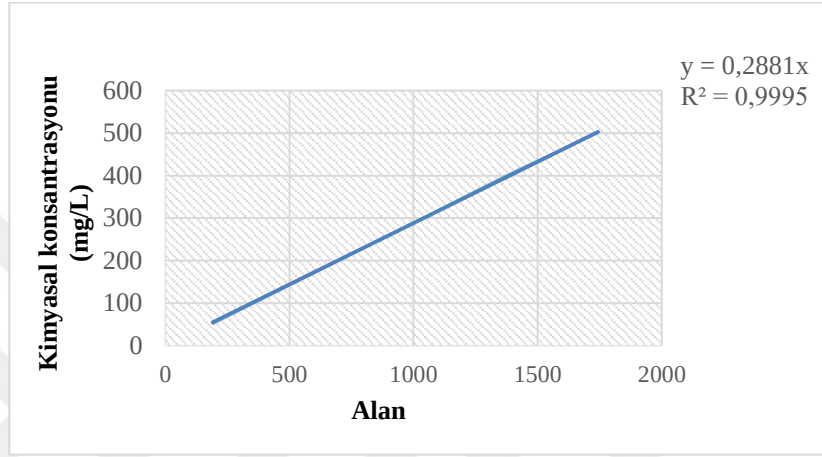
Şekil 4.12 Yeast, skim milk + yeast ve sükroz + yeast içeren ürün gruplarının canlılık sonuçları

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi yeast, yeast + skim milk ve yeast + sükroz koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla 24 ay’a kadar olan canlılık sayım sonuçlarında skim milk ve sükrozun sadece yeast içeren vial göre belirli bir avantajının olmadığı görülmüştür. Her 3 üründe 12 ay sonunda yaklaşık 1 log, 24 ay sonunda yaklaşık 4 log’luk bir azalış göstermiştir.

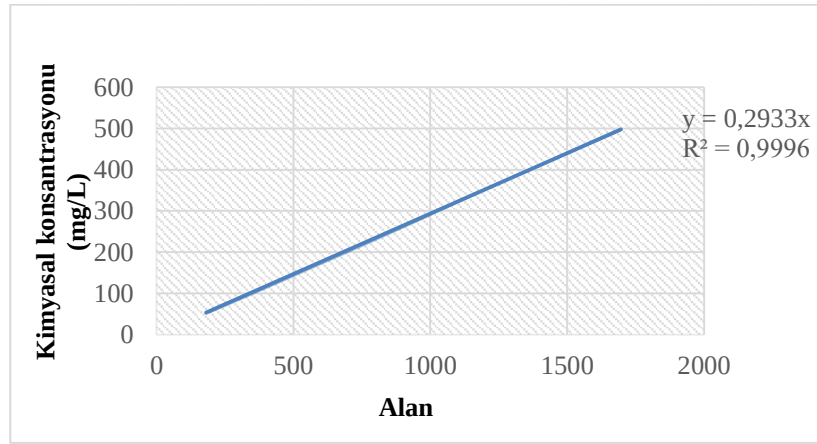
Tez çalışmasında canlılık sayımları sonuçlarına baktığımızda su ve nutrient içeren organizmalarda üreme gerçekleşmemiştir. Bu nedenle liyofilizasyon ile koruyucu olmadan bakteriler canlılığını 1 ay sürede bile koruyamamıştır. Aynı zamanda bakterilerin ortamı olarak nutrient broth kullanıldığında ise yine canlılığını korumada bir başarı göstermemiştir. Bu nedenle bakterileri liyofilizasyon tekniği ile uzun dönem saklamada mutlaka koruyucu ile saklamak gerekmektedir. Koruyucular arasından skim milk + sodyum glutamat içeren vial en başarılı sonucu vermiştir. Genel anlamda skim milk, sodyum glutamat ve trehaloz bu çalışmadaki en iyi koruyucular olmuştur. Aynı zamanda her bir koruyucunun skim milk ile birlikte kombinasyonu, liyofilizasyonun etkilerinden bakteriyi çok daha iyi koruduğu görülmüştür.

4.6. Liyofilizasyonda Kullanılan Aşı Kültürünün Liyofilizasyon Öncesi ve Sonrası Biyoparçalama Etkinliği Sonuçları

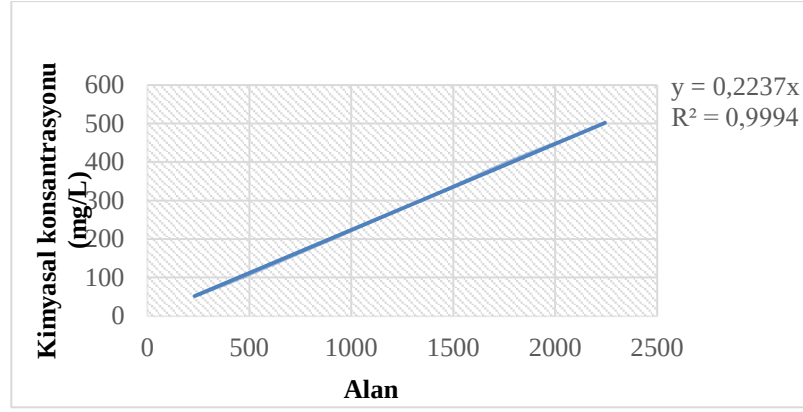
Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesinde HPLC analizlerinin yapılabilmesi için öncelikle TA, p-tol ve 4-cba kimyasallarına ait standart eğri grafikleri oluşturulmuştur. Standart eğri grafikleri şekil 4.13, 4.14 ve 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 TA kimyasalına ait standart eğri grafiği

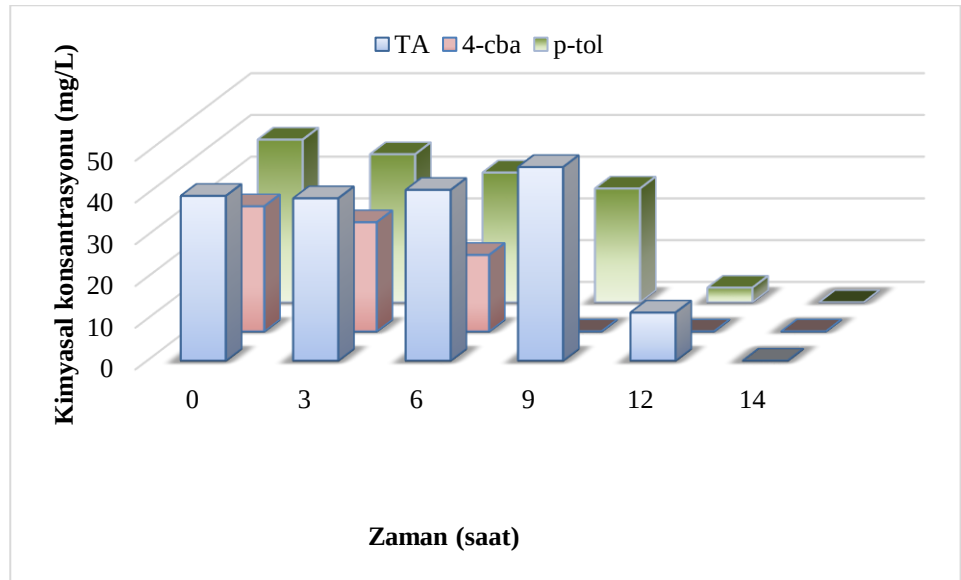


Şekil 4.14 p-tol kimyasalına ait standart eğri grafiği



Şekil 4.15 4-cba kimyasalına ait standart eğri grafiği

Liyofilizasyon öncesi mikroorganizmaların biyoparçalama aktivitesi şekil 4.8’de gösterilmiştir. Başlangıç konsantrasyonu 40 mg/L TA, 40 mg/L p-tol ve 30 mg/L 4-cba içeren erlenlerde mikroorganizma karışımı, yaklaşık 14 saat içerisinde kimyasalları parçalamıştır. Kontrol erleni denemesi, kimyasalların mikroorganizmalara bağlı olmayan değişimlerini ve kontaminasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Tüm biyoparçalama etkinliği belirlenecek çalışmalarda kullanılan mikroorganizma içermeyen kontrol erleninde kimyasal değişimi 24 saat boyunca olmamıştır.

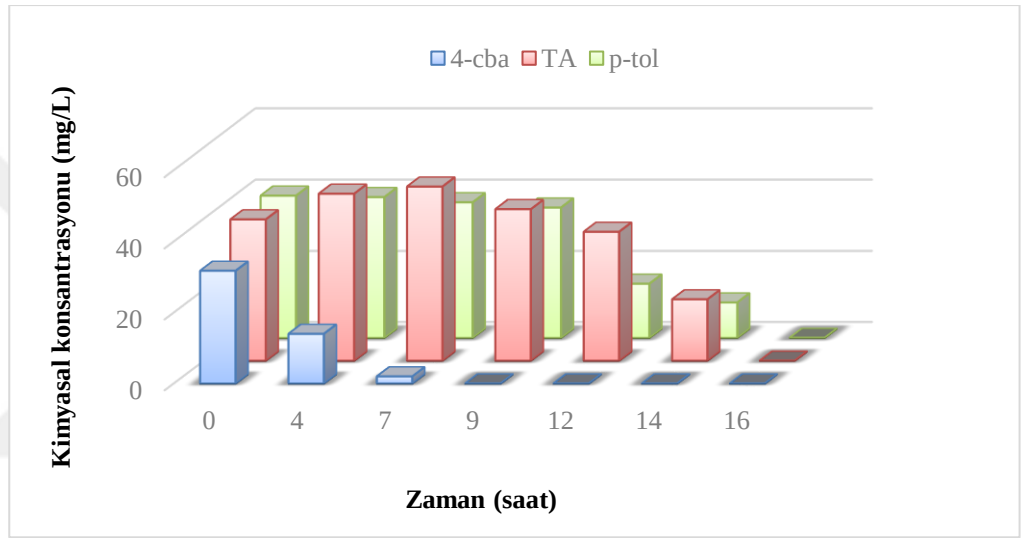


Şekil 4.16 Mikroorganizma karışımının liyofilizasyon öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi 30 mg/L 4-cba kimyasalı yaklaşık 7-8 saat içerisinde parçalanmıştır. 40 mg/L TA kimyasalı ise 13-14 saat içerisinde tükenmiştir. Literatür özeti kısmında bahsedildiği gibi 4-cba kimyasalı parçalanınca

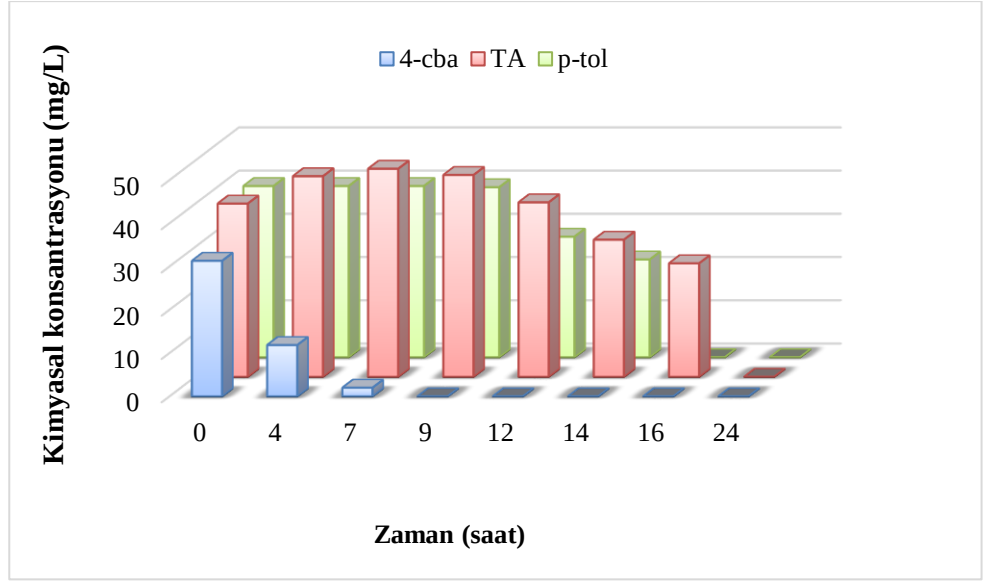
TA'ya dönüşmektedir. Bu nedenle 4-cba kimyasalı tükendikçe TA kimyasalının konsantrasyonun arttığı gözlemlenmektedir. 40 mg/L p-tol kimyasalı ise 13-14 saat içerisinde tükendiği gözlenmiştir. Liyofilizasyon öncesi biyoparçalama sonuçlarına göre bakterilerimiz ilgili kimyasalı 14 saat içerisinde tamamen tüketmiştir.

Bu sonuçlar ışığında liyofilizasyon sonrası liyofilize ürünlerin raf ömrüne bağlı olarak biyoparçalama aktivitesinin değişip değişmediği incelenmiştir. 1. 3. ve 6. ay viallerindeki biyoparçalama etkinliklerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle parçalama etkinliği **sonuçları 6. ay'a kadar olan** sonuçlar şekil 4.17'den 4.32'ye kadar gösterilmiştir.



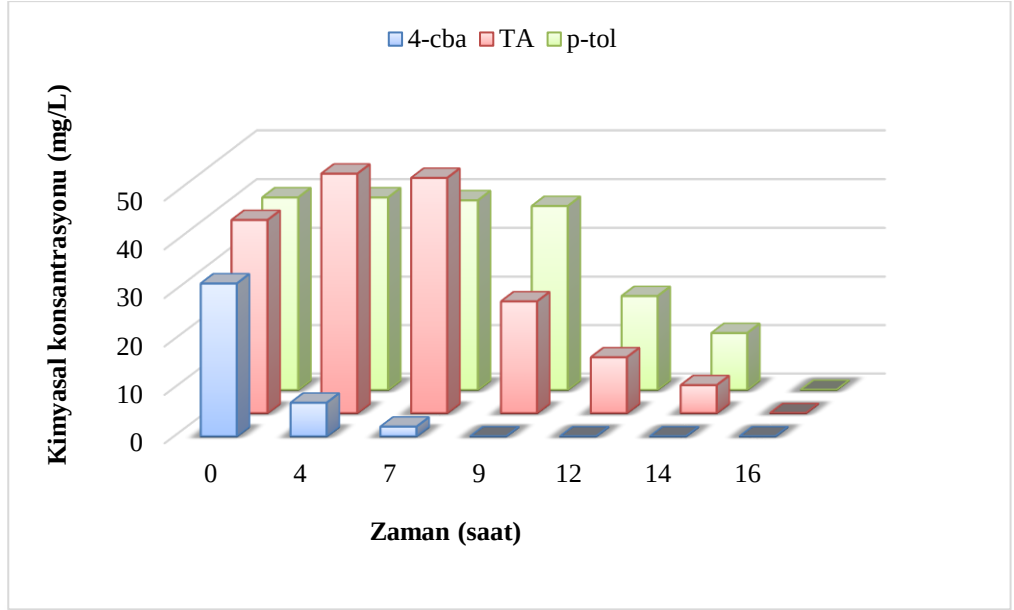
Şekil 4.17 6.ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat skim milk içeren ürün grubunda 14. saatte 15 mg/L civarında olduğu ve 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. p-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat skim milk içeren ürün grubunda 14. saatte 10 mg/L civarında olduğu ve 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



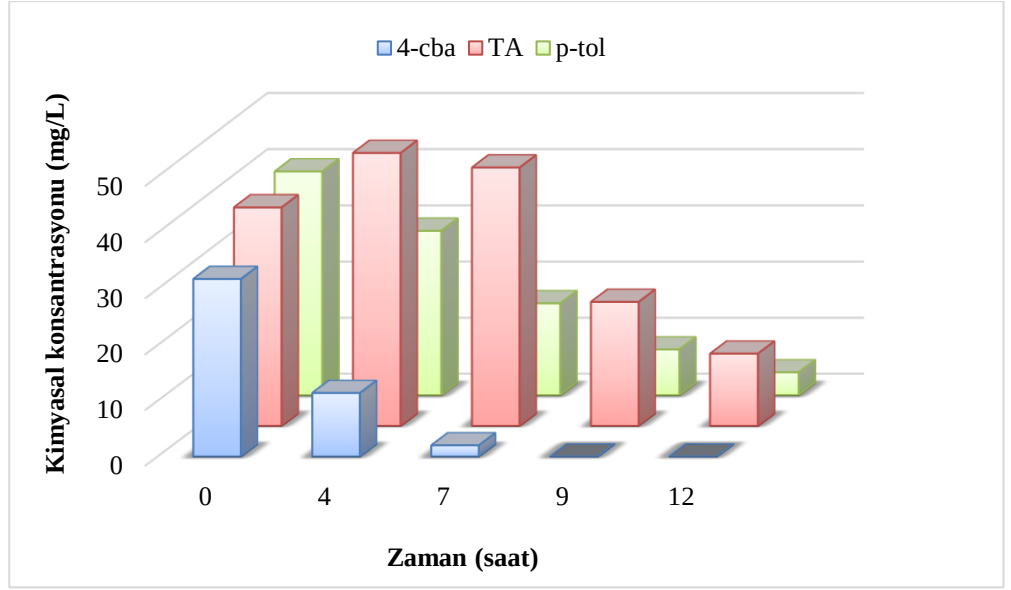
Şekil 4.18 6.ay raf ömrüne ait, süktroz içeren vialer için biyoparçalamaya sonuc

Şekil 4.18'e bakıldığında koruyucu olarak süktroz kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalamaya etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası, süktroz içeren ürün grubunda 14. saatte 32 mg/L civarında olduğu, 16. saatte 25 mg/L civarında olduğu ve 24. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 10 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. Koruyucu olarak süktrozun kullanılması da bakterileri liyofilizasyonun etkilerinden koruyamadığını göstermiştir. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası süktroz içeren ürün grubunda 14. saatte 22 mg/L civarında olduğu ve 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



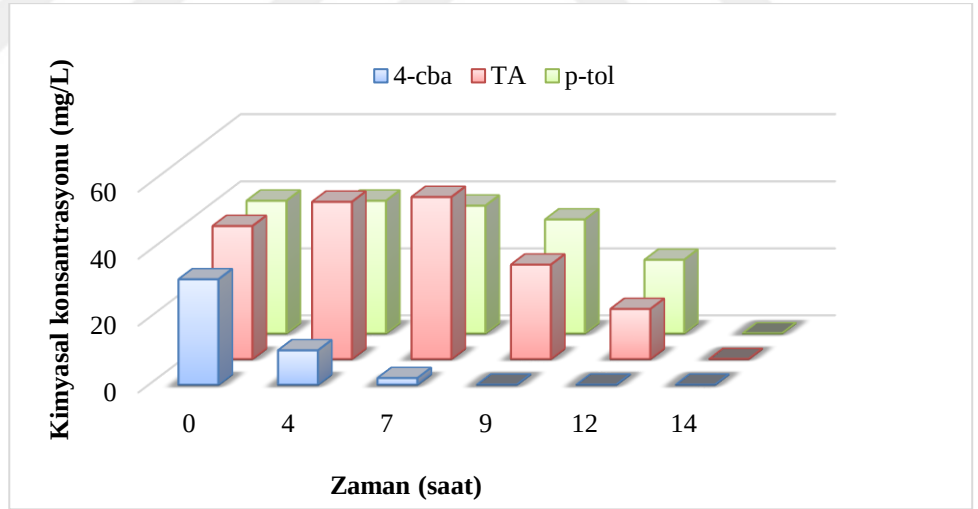
Şekil 4.19 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + süktroz içeren vialer için biyoparçalamaya sonucu

Şekil 4.19’da koruyucu olarak skim milk + süktroz kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalamaya etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası, skim milk + süktroz içeren ürün grubunda 14. saatte 5 mg/L civarında olduğu, 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L’den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası skim milk + süktroz içeren ürün grubunda 14. saatte 11 mg/L civarında olduğu ve 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



Şekil 4.20 6.ay raf ömrüne ait, trehaloz içeren vialer için biyoparçalamaya sonuc

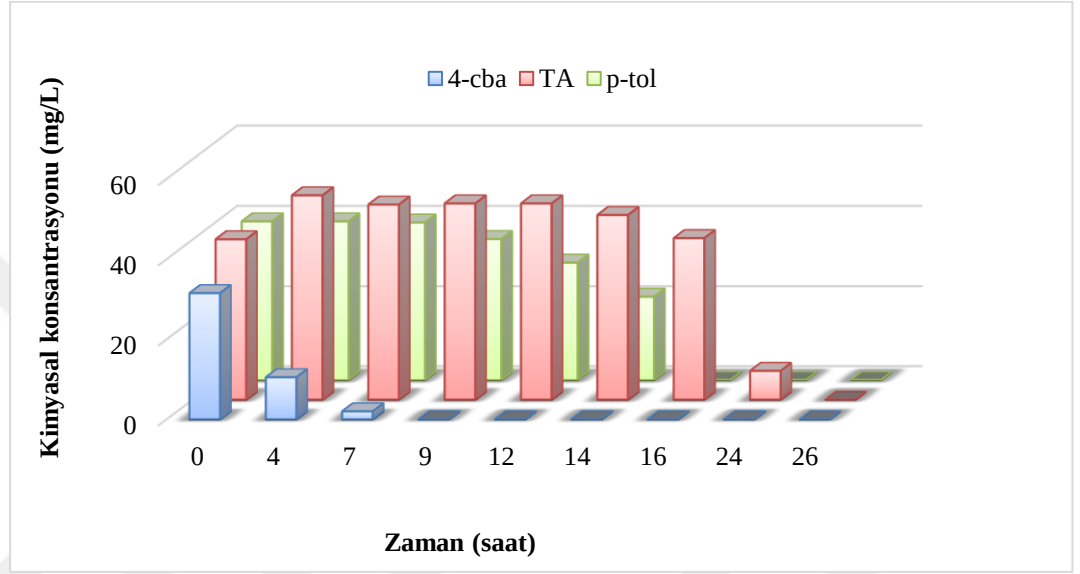
Koruyucu olarak trehaloz kullanılan raf ömrü denemesinde 4-cba, TA ve p-tol kimyasallarının liyofilizasyon öncesi ve sonrasında biyoparçalamaya aktivitesine hemen hemen hiç etkisi olmadığı görülmüştür. Bu da trehaloz'un koruyuculuğunun çok iyi olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.21 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + trehaloz içeren vialer için biyoparçalamaya sonuc

Koruyucu olarak skim milk + trehaloz kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalamaya etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası, skim milk + trehaloz içeren ürün grubunda 12. saatte 12 mg/L civarında olduğu, 14. saatte tamamen tükendiği

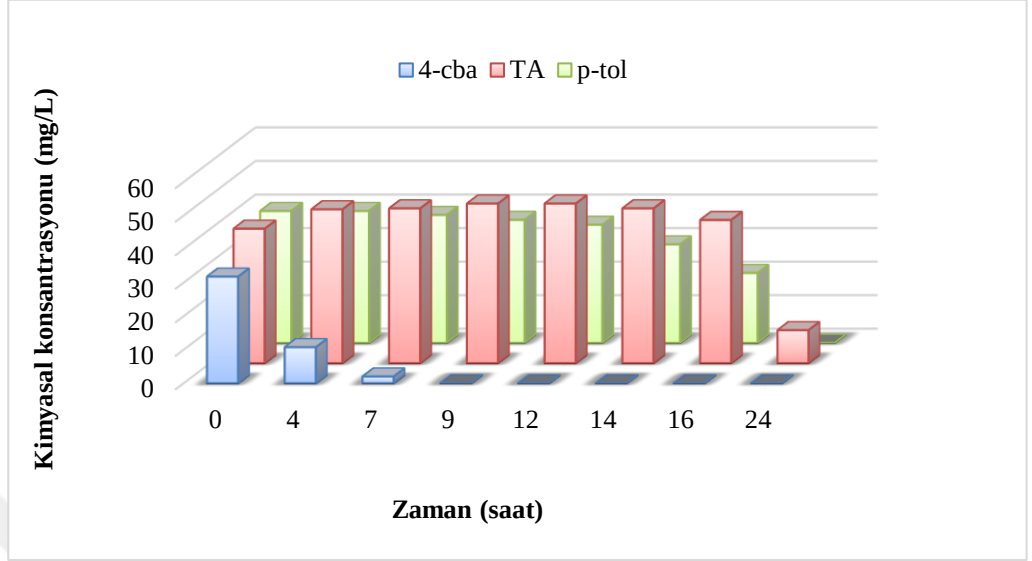
görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere çok az etki etmiş ve aynı saat sonunda kimyasalın tükendiği görülmüştür. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası skim milk + trehaloz içeren ürün grubunda 12. saatte 21 mg/L civarında olduğu ve 14. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere çok az etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



Şekil 4.22 6.ay raf ömrüne ait, sükroz + trehaloz içeren viale ait biyoparçalama sonucu

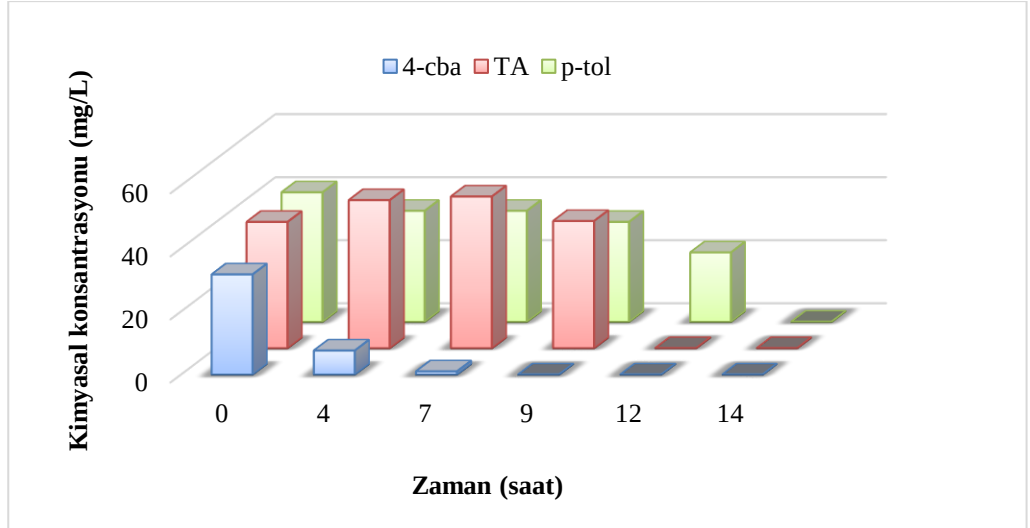
Koruyucu olarak sükroz + trehaloz kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası, sükroz + trehaloz içeren ürün grubunda 14. saatte 4-cba kimyasalının tükenip TA oluşturmasından dolayı 45 mg/L civarında olduğu, 16. saatte 40 mg /L olduğu ve 24 saat sonunda bile 7 mg/L olarak kaldığı görülmüştür. 26. saat sonunda tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere oldukça fazla etki etmiş ve 12 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. Ayrıca koruyucu olarak sükroz ile birlikte kullanılan trehalozun liyofilizasyonun zararlı etkisinden çok iyi korumadığı görülmemiştir. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası sükroz + trehaloz içeren ürün grubunda 14. saatte 20 mg/L civarında olduğu

ve 16. saatte tamamen tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



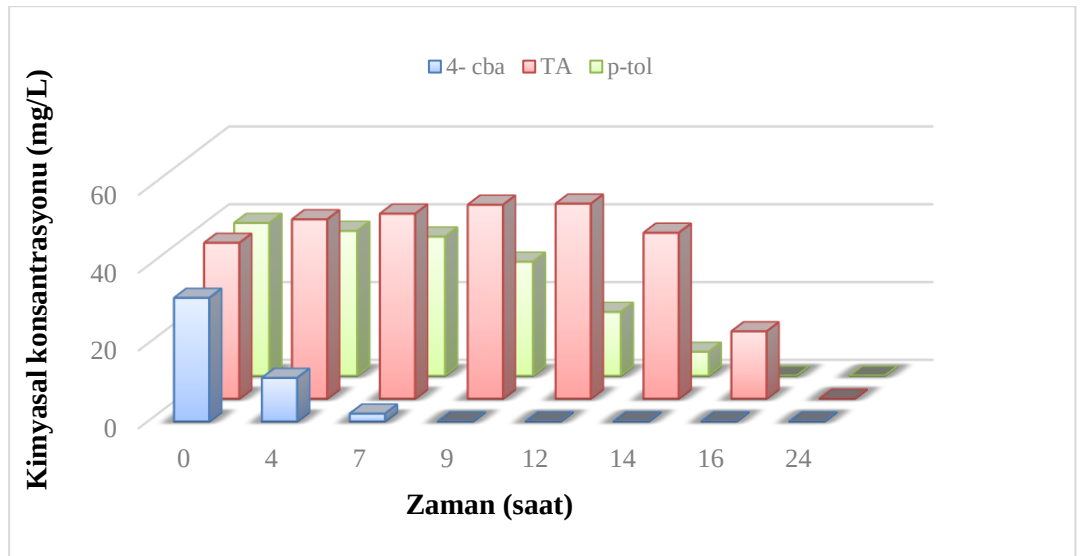
Şekil 4.23 6.ay raf ömrüne ait, sodyum glutamat içeren vialer için biyoparçalamaya sonucu

Koruyucu olarak sodyum glutamat kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalamaya etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası, sodyum glutamat içeren ürün grubunda 16. saatte 4-cba kimyasalının tükenip TA oluşurmasından dolayı 41 mg/L civarında olduğu, 26. saat sonunda tükettiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 10 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası sodyum glutamat içeren ürün grubunda 16. saatte 20 mg/L olduğu görülmüş ve 24. saatte tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 10 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



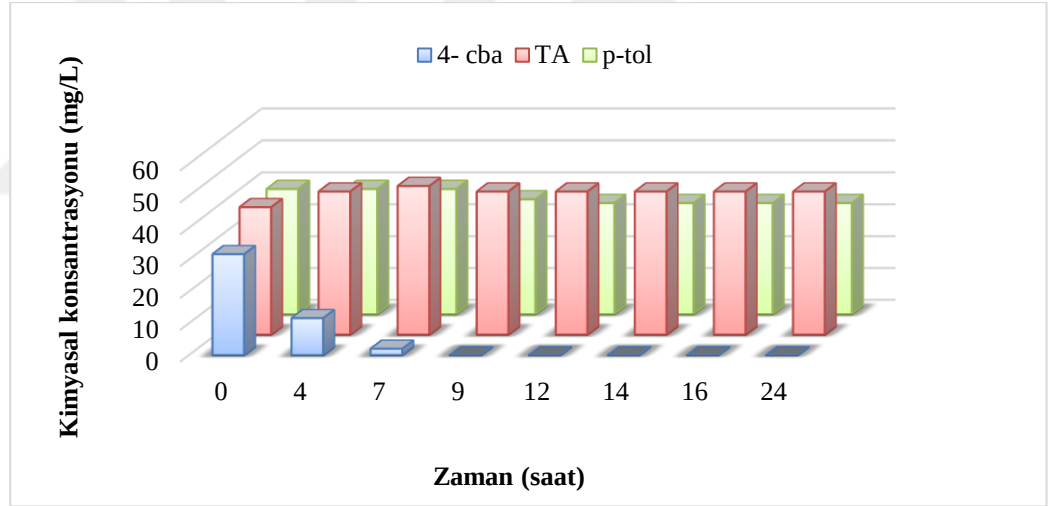
Şekil 4.24 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + sodyum glutamat içeren vialer için biyoparçalamaya sonucunu

Koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba ve TA kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası sodyum glutamat içeren ürün grubunda 12. saatte 20 mg/L olduğu görülmüş ve 14. saatte tükendiği görülmüştür. Canlılık bakımından da en iyi sonucu veren koruyucu olan skim milk + sodyum glutamat biyoparçalama aktivitesinin de korunmasını sağlamıştır. Her 3 kimyasal içinde başarılı sonuç elde edilmiştir.



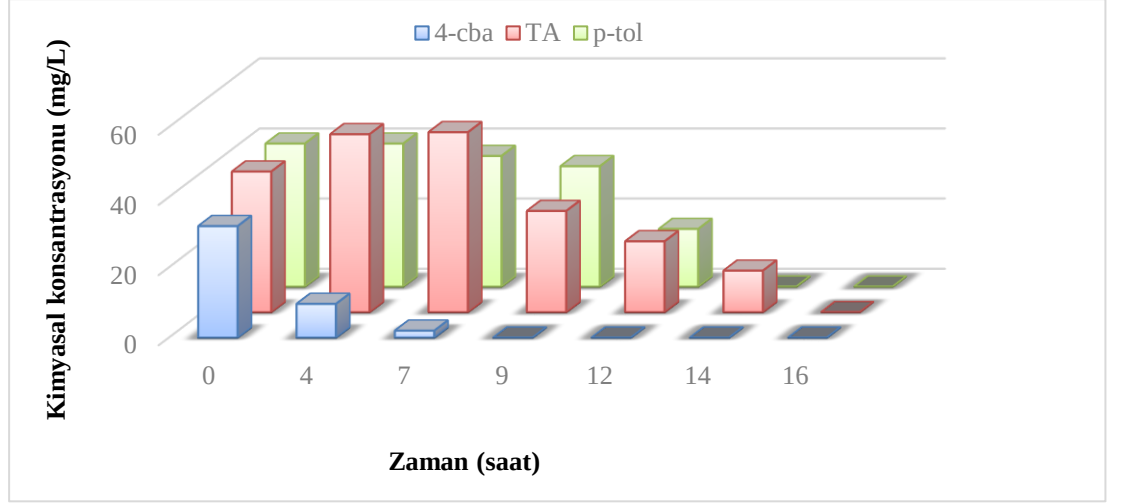
Şekil 4.25 6.ay raf ömrüne ait, sükröz + sodyum glutamat içeren vialer için biyoparçalamaya sonucunu

Koruyucu olarak sükroz+sodyum glutamat kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası sükroz + sodyum glutamat içeren ürün grubunda 16. saatte 15 mg/L civarında olduğu, 24. saat sonunda tükettiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere zarar vermiş ve koruyucu olarak kullanılan sükroz+ sodyum glutamat yeteri kadar koruyamamıştır, 10 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 14. saatte yaklaşık 5 mg/L olduğu ve 16. saatte tükendiği belirlenmiştir. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.



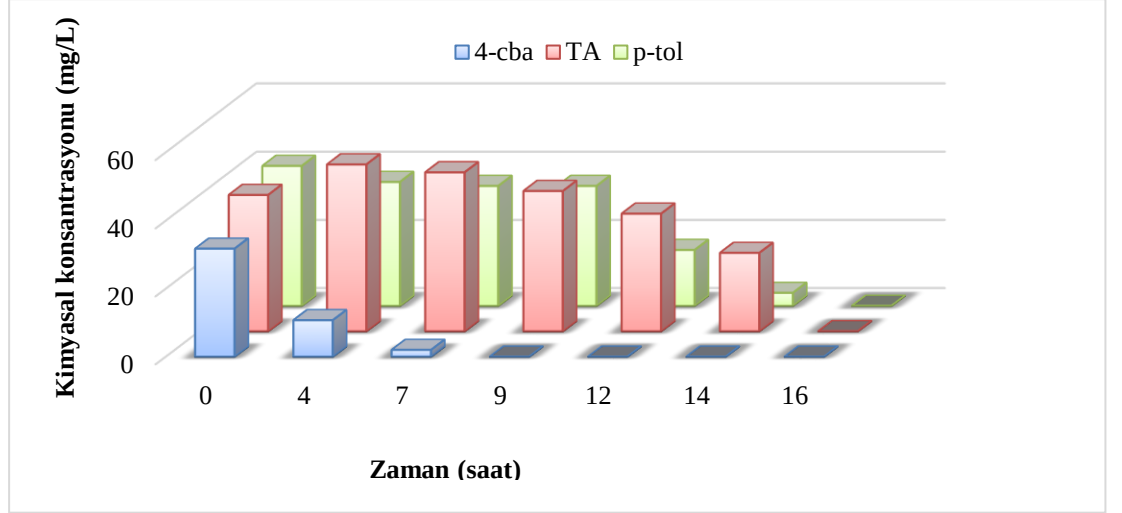
Şekil 4.26 6.ay raf ömrüne ait, maltodekstrin içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Koruyucu olarak maltodekstrin kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA ve p-tol kimyasalı ise 24 saat boyunca biyoparçalama gerçekleşmemiştir. Sonuç olarak maltodekstrin liyofilizasyon ve saklama boyunca mikroorganizmaları koruyamadığı belirlenmiştir.



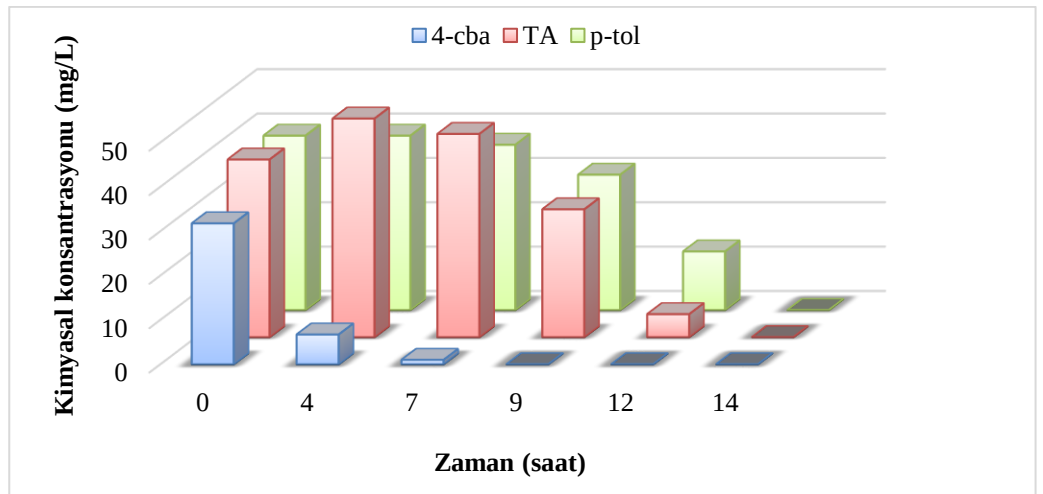
Şekil 4.27 6.ay raf ömrüne ait, skim milk+ maltodekstrin içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Koruyucu olarak skim milk+maltodekstrin kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası skim milk + maltodekstrin içeren ürün grubunda 14. saatte 11 mg/L civarında olduğu, 16. saat sonunda tükendiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere zarar vermiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 12. saatte yaklaşık 15 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Bu nedenle koruyucu olarak maltodekstrin skim milk ile beraber kullanıldığında liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmemiştir.



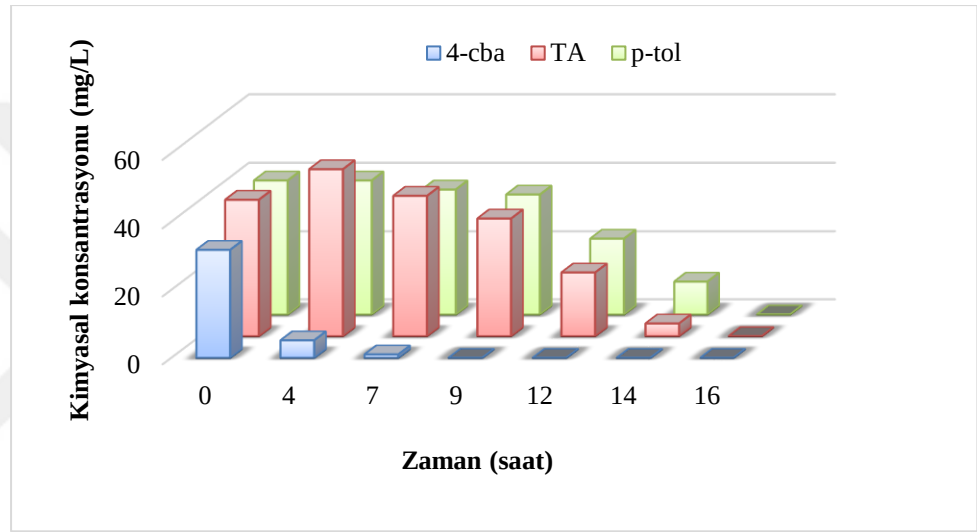
Şekil 4.28 6.ay raf ömrüne ait, sükröz + maltodekstrin içeren vialer için biyoparçalamaya sonucu

Koruyucu olarak sükröz + maltodekstrin kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalamaya etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası sükröz + maltodekstrin içeren ürün grubunda 14. saatte 22 mg/L civarında olduğu, 16. saat sonunda tükettiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere zarar vermiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 14. saatte yaklaşık 4 mg/L olduğu ve 16. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrası ürün, 2 saat daha geç parçalanmıştır.



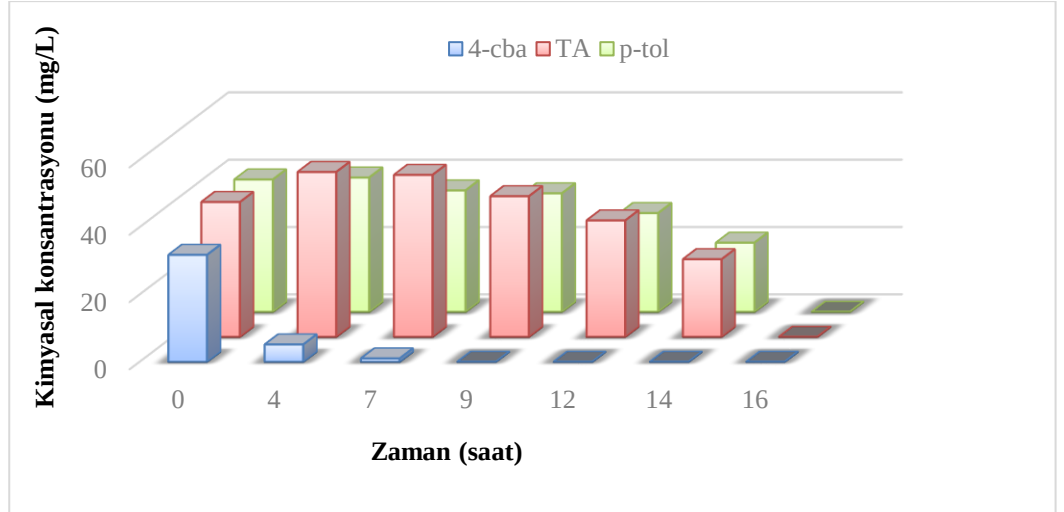
Şekil 4.29 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + PVA içeren vialer için biyoparçalamaya sonucu

Koruyucu olarak skim milk + PVA kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası süktroz+sodyum glutamat içeren ürün grubunda 12. saatte 5 mg/L civarında olduğu, 14. saat sonunda tükettiği görülmüştür. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 12. saatte yaklaşık 11 mg/L olduğu ve 14. Saatte tükendiği belirlenmiştir.



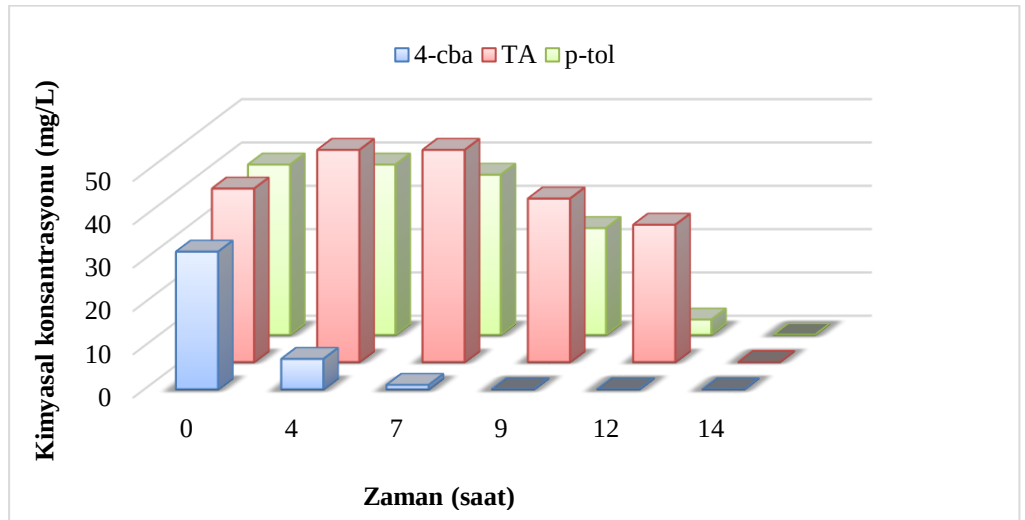
Şekil 4.30 6.ay raf ömrüne ait, süktroz + PVA içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Koruyucu olarak süktroz+PVA kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası süktroz + sodyum glutamat içeren ürün grubunda 14. saatte 4 mg/L civarında olduğu, 16. saat sonunda tükettiği görülmüştür. 2 saat daha biyoparçalama geç olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 14. saatte yaklaşık 9 mg/L olduğu ve 16. saatte tükendiği belirlenmiştir. Biyoparçalama 2 saat daha geç olmuştur.



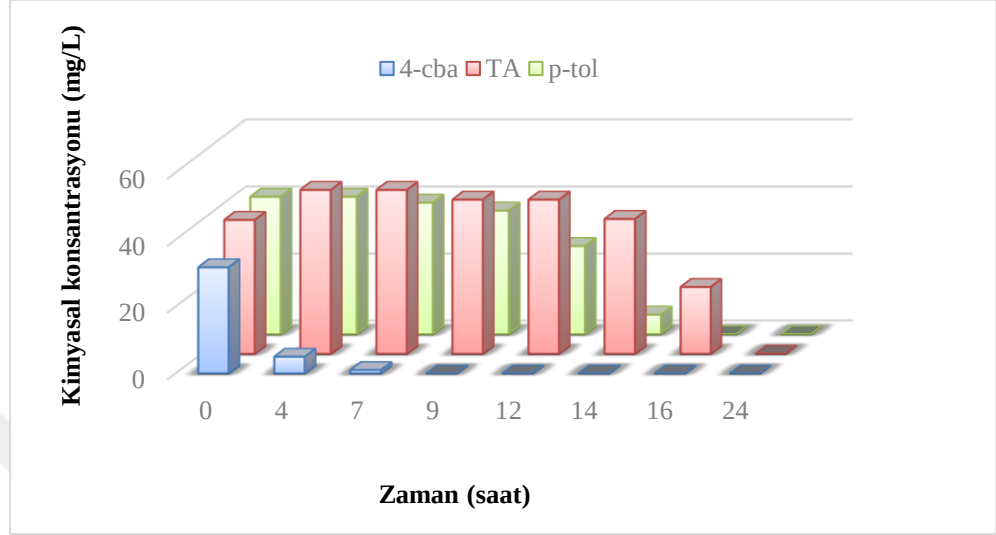
Şekil 4.31 6.ay raf ömrüne ait, yeast içeren vial e ait biyoparçalama sonucu

Koruyucu olarak yeast kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası yeast içeren ürün grubunda 14. saatte 4 mg/L civarında olduğu, 16. saat sonunda tükettiği görülmüştür. 2 saat daha biyoparçalama geç olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 5 mg/L'den az olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise 14. saatte yaklaşık 9 mg/L olduğu ve 16. saatte tükendiği belirlenmiştir. Biyoparçalama 2 saat daha geç olmuştur. Benzer sonuçlar şekil 4.27'de yeast +skim milk içeriğinde gösterilmiştir.



Şekil 4.32 6.ay raf ömrüne ait, skim milk + yeast içeren vial e ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.32’de görüldüğü gibi biyoparçalama sonuçlarında sadece yeast içeren biyoparçalama sonuçlarına göre daha başarılı olmuştur. Tüm kimyasallar 14 saatte tükenmiştir.



Şekil 4.33 6.ay raf ömrüne ait, sükröz + yeast içeren vialer için biyoparçalama sonucu

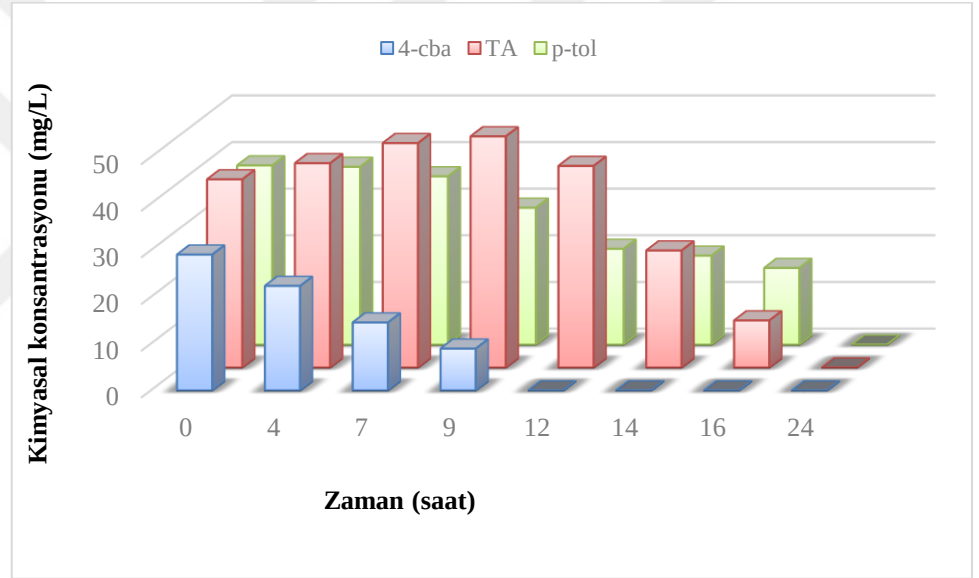
Koruyucu olarak yeast + sükröz kullanılan raf ömrü denemesinde; 4-cba kimyasalı liyofilizasyon öncesi ve sonrası biyoparçalama etkinlikleri karşılaştırıldığında, liyofilizasyonun hemen hemen bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. TA kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 12. saatte 10 mg/L olduğu ve 14. saatte tükendiği belirlenmiştir. Fakat liyofilizasyon sonrası yeast + sükröz içeren ürün grubunda 16. saatte 20 mg/L civarında olduğu, 24. saat sonunda tükettiği görülmüştür. Bu nedenle liyofilizasyon, TA kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 10 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur. P-tol kimyasalı için ise liyofilizasyon öncesi 14. saatte 5 mg/L’den az olduğu ve 16. saatte tükendiği belirlenmiştir. Bu nedenle liyofilizasyon, p-tol kimyasalını parçalayan bakterilere etki etmiş ve 2 saat daha geç parçalamalarına sebep olmuştur.

Tüm biyoparçalama belirleme çalışmalarında, mikroorganizma içermeyen kontrol erleni kullanılmıştır. Her 3 kimyasal için; kontrol erleni biyoparçalama aktivitesi 24 saat içinde değişmeden kalmıştır.

İlk 6 ay’a ait biyoparçalama sonuçlarına baktığımızda; 4-cba kimyasalı (30 mg/L) yaklaşık 7 saatte tükenmiştir. TA kimyasalı (40 mg/L) için ise biyoparçalama 12-24 saat arasında gerçekleşmiştir. P-tol (40 mg/L) kimyasalı için ise

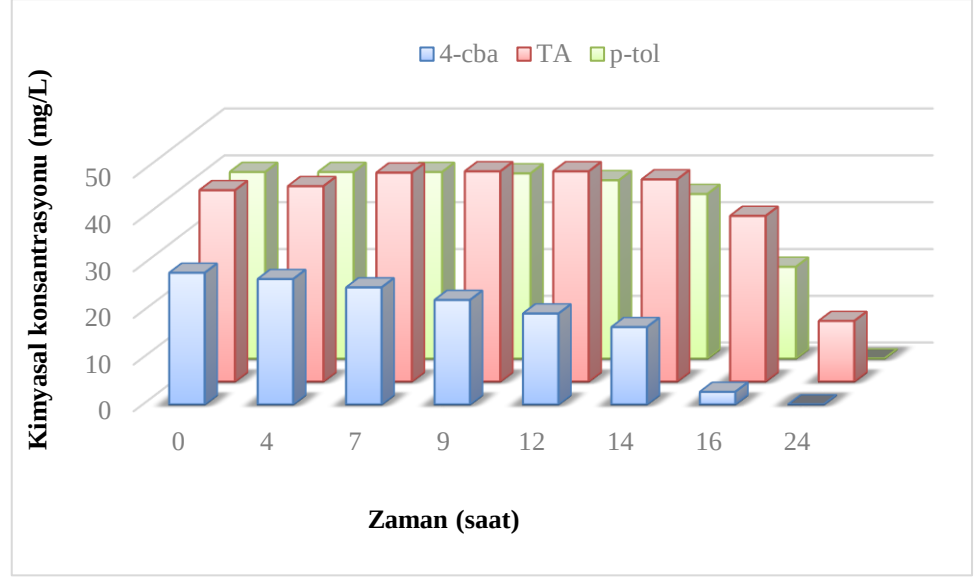
biyoparçalama 14-24 saat içerisinde gerçekleşmiştir. Her 3 kimyasalı biyoparçalama aktivitesi açısından incelersek en iyi sonucu trehaloz, skim milk + sodyum glutamat ve diğer skim milk içeren koruyucuların en iyi sonucu verdiği gözlemlenmiştir. Tek başına skim milk kullanmaktansa diğer koruyucu ile birlikte kullanılması hem canlılık hem de biyoparçalama aktivitesinde daha iyi bir sonuç vermiştir. Maliyet açısından değerlendirdiğimizde trehaloz daha pahalı koruyucudur, bu nedenle canlılık sayımı ve biyoparçalama aktivitesini birlikte değerlendirirsek skim milk veya sodyum glutamat+skim milk en kullanışlı üründür.

12. 15. ve 18. aylarda gerçekleşen biyoparçalama etkinliği çalışmalarında aylar arasında çok büyük farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle **raf ömrü 18. ay'a** kadar olan biyoparçalama etkinlikleri şekil 4.29.'den 4.40'a kadar gösterilmiştir.



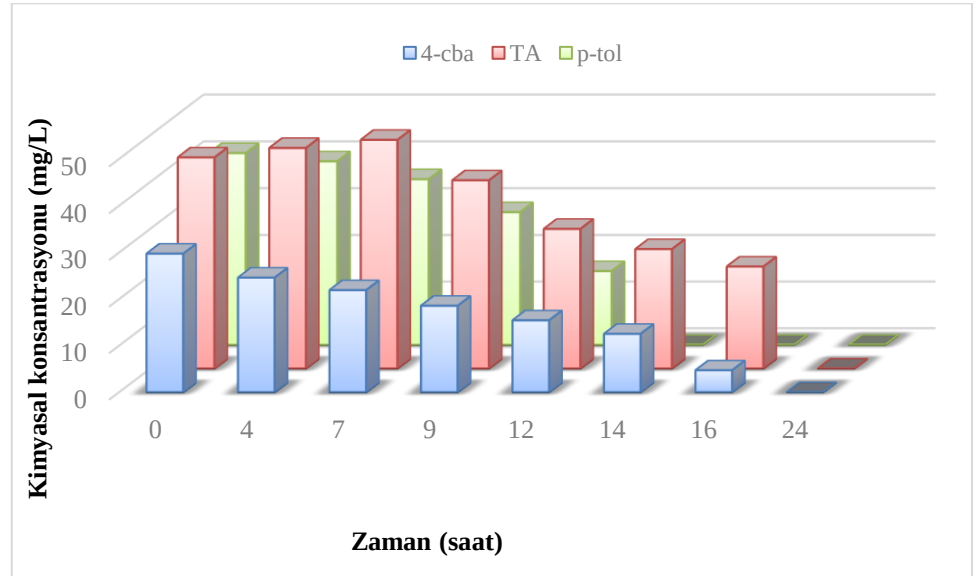
Şekil 4.34 18. ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Şekil 4.31'de görüldüğü gibi 12 saat içerisinde 4-cba kimyasalı tükenmektedir. TA ve p-tol kimyasalları ise 16 saat içinde hala tükenmemiştir. 16. saat biyoparçalama sonucunda; TA kimyasalı, yaklaşık 12 mg/L, p-tol ise 20 mg/L olarak gözükmemektedir. 24 saat sonunda her 3 kimyasalda başarılı şekilde tükenmiştir. Skim milk'in koruyucu olarak kullanıldığı 6. ay biyoparçalama sonuçlarıyla kıyaslandığında 4-cba kimyasalı 2 saat daha fazla sürede parçalama gerçekleştirmiştir. TA ve p-tol kimyasalları 6.ay'da 16 saat içerisinde kimyasalları parçalamışken 18. ay sonunda 24 saat içerisinde gerçekleşmiştir. Raf ömrüne bağlı olarak canlılık azalmasıyla birlikte, biyoparçalama'da değişmiştir.



Şekil 4.35 18. ay raf ömrüne ait, süktroz içeren vialle ait biyoparçalama sonucu

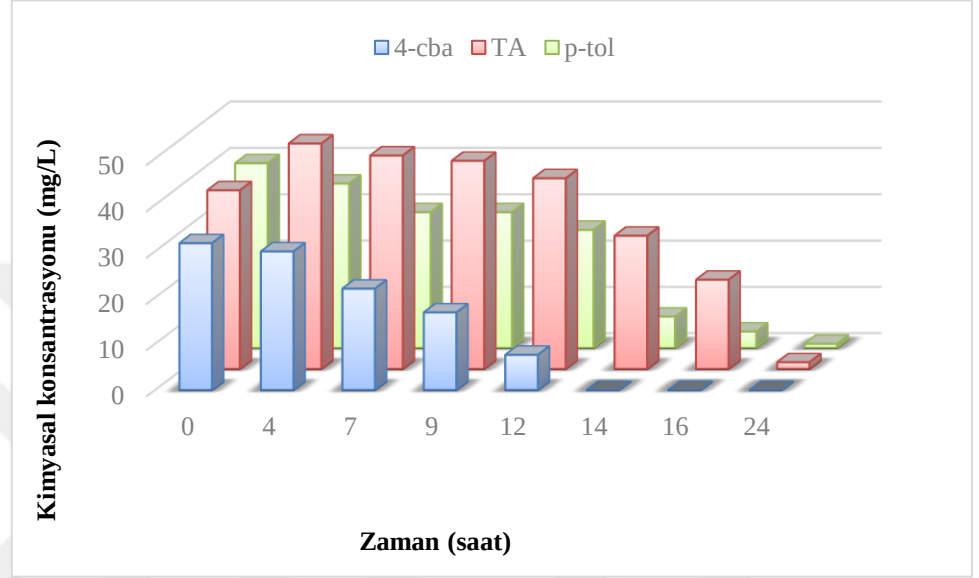
Şekil 4.35'te görüldüğü gibi 16 saat içerisinde bile hala 4-cba kimyasalı tükenmemiştir. 24 saat sonunda TA dışında diğerleri tükenmiştir. Süktroz'un koruyucu olarak kullanıldığı 6. ay biyoparçalama sonuçlarıyla kıyaslandığında 4-cba 6. ay'da 9 saat içerisinde tükenmişti, 18. ay sonuçlarında parçalama süresi yaklaşık 8 saat artmıştır. TA ve p-tol kimyasalları biyoparçalama süresi de 6.ay sonuçlarına göre uzamıştır. Raf ömrüne bağlı olarak canlılık azalmasıyla birlikte, ilgili kimyasalları parçalayan bakteriler azalmış ve biyoparçalama da değişmiştir.



Şekil 4.36 18. ay raf ömrüne ait, skim milk+ süktroz içeren vialle ait biyoparçalama sonucu

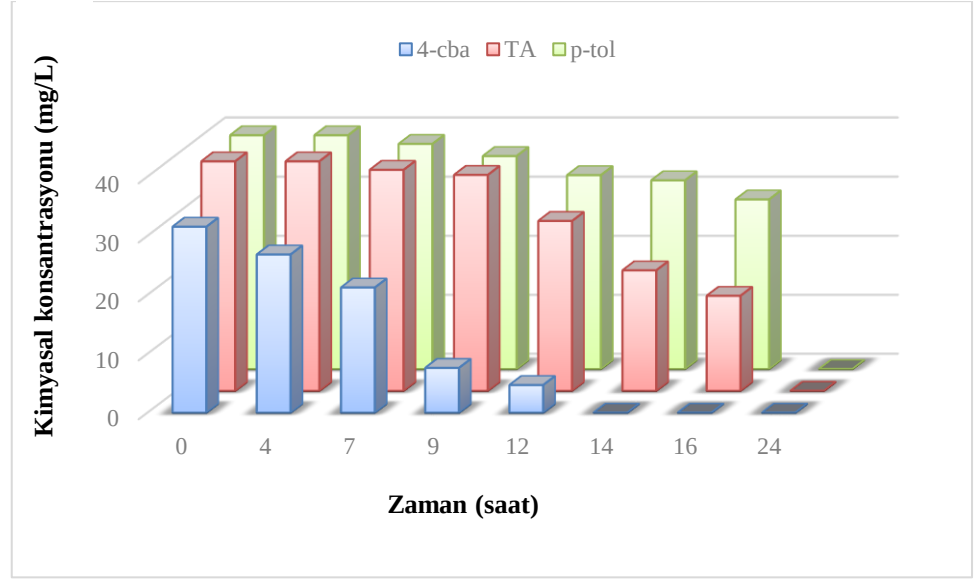
Şekil 4.36'da görüldüğü gibi 16 saat içerisinde bile hala 4-cba kimyasalı tükenmemiştir. 24 saat sonunda her 3 kimyasalda tükenmiştir. Skim milk +

sükroz'un koruyucu olarak kullanıldığı 6. ay biyoparçalama sonuçlarıyla kıyaslandığında 4-cba 6. ay'da 9 saat içerisinde tükenmişti, 18. ay sonuçlarında parçalama süresi yaklaşık 8 saat artmıştır. TA ve p-tol kimyasalları biyoparçalama süresi de 6.ay sonuçlarına göre uzamıştır. Raf ömrüne bağlı olarak canlılık azalmasıyla birlikte, ilgili kimyasalları parçalayan bakteriler azalmış ve biyoparçalama da değişmiştir.



Şekil 4.37 18. ay raf ömrüne ait, trehaloz içeren vialer için biyoparçalama sonucu

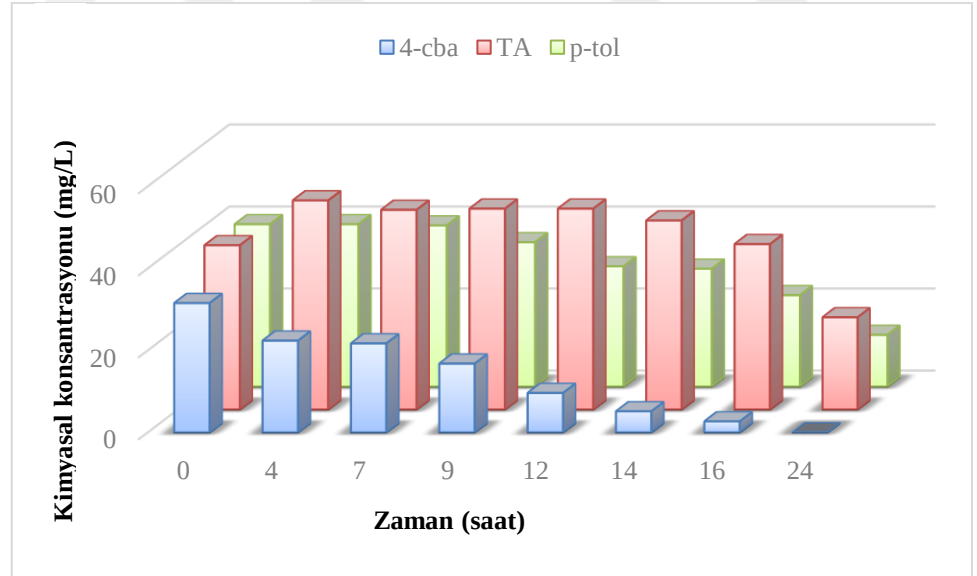
Şekil 4.37’de görüldüğü gibi 14 saat içerisinde 4-cba azalmış fakat 24 saat içerisinde az miktarda bile olsa hala TA ve p-tol kimyasalları parçalanmamıştır. Trehaloz içeren vialin 6. ay sonuçlarına göre biyoparçalama süresi çok fazla uzamıştır. Trehaloz canlılık sayımı ve 6. ay biyoparçalama aktivitesi sonuçlarına göre başarılı bir koruyucu olmasına rağmen 18. ay raf ömrü denemesinde en iyi koruyucular arasına girmemektedir.



Şekil 4.38 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + trehaloz içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

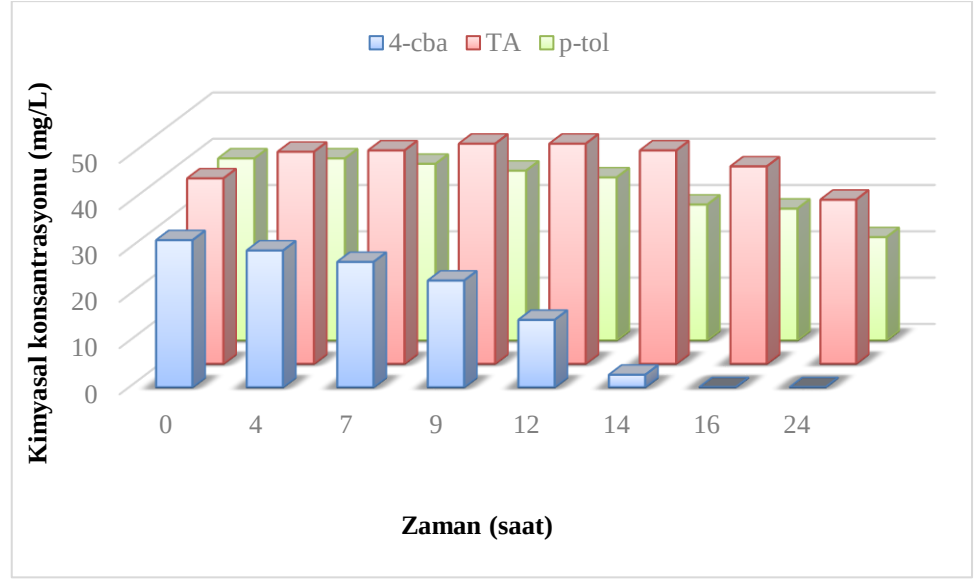
Şekil 4.38’de görüldüğü gibi 24 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir.

6. ay biyoparçalama sürelerine bakıldığında 18. ay’da bu süre uzamıştır. Koruyucu olarak trehaloz içeren vial sonuçlarına göre skim milk +trehaloz içeren vial çok daha hızlı sürede biyoparçalamayı gerçekleştirmiştir.



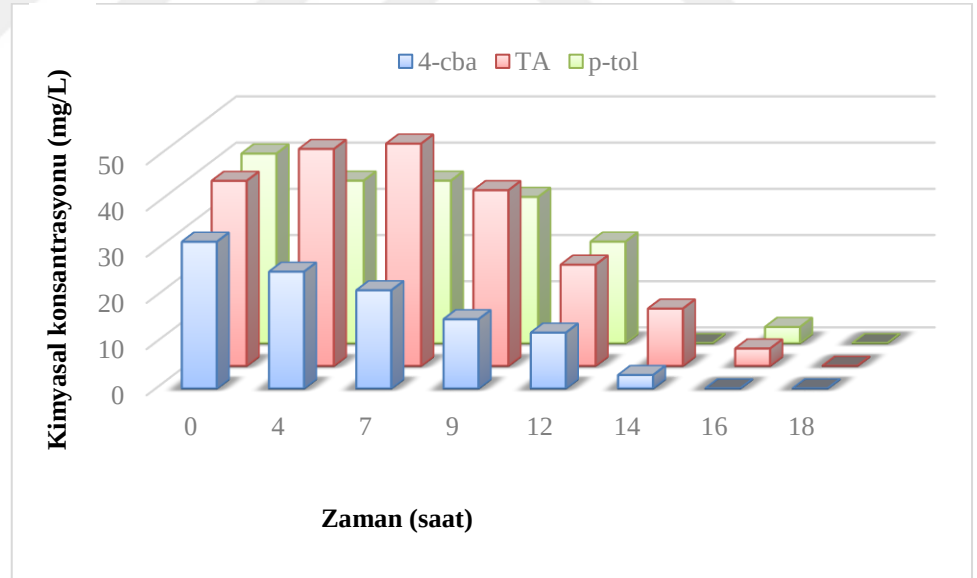
Şekil 4.39 18. ay raf ömrüne ait, sükröz + trehaloz içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.39’da görüldüğü gibi sükröz+ trehaloz içeren vial’e ait biyoparçalama sonuçlarında 4-cba kimyasalı 24 saat içerisinde tükenmiştir. TA ve p-tol kimyasalı ise 24 saatte bile hale mevcuttur. Bu nedenle sükröz +trehaloz tercih edilmemelidir.



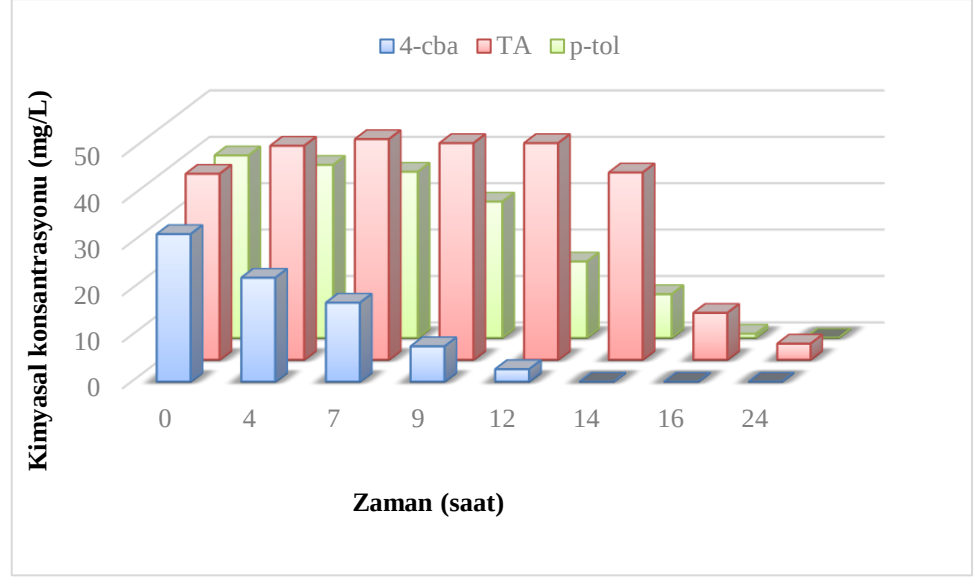
Şekil 4.40 18. ay raf ömrüne ait, sodyum glutamat içeren vial'e ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.40'ta görüldüğü gibi sodyum glutamat içeren vial'e ait biyoparçalama sonuçlarında 4-cba kimyasalı 16 saat içerisinde tükenmiştir. TA ve p-tol kimyasalı ise 24 saatte bile hale mevcuttur. Bu nedenle sadece sodyum glutamat içeren koruyucu tercih edilmemelidir.



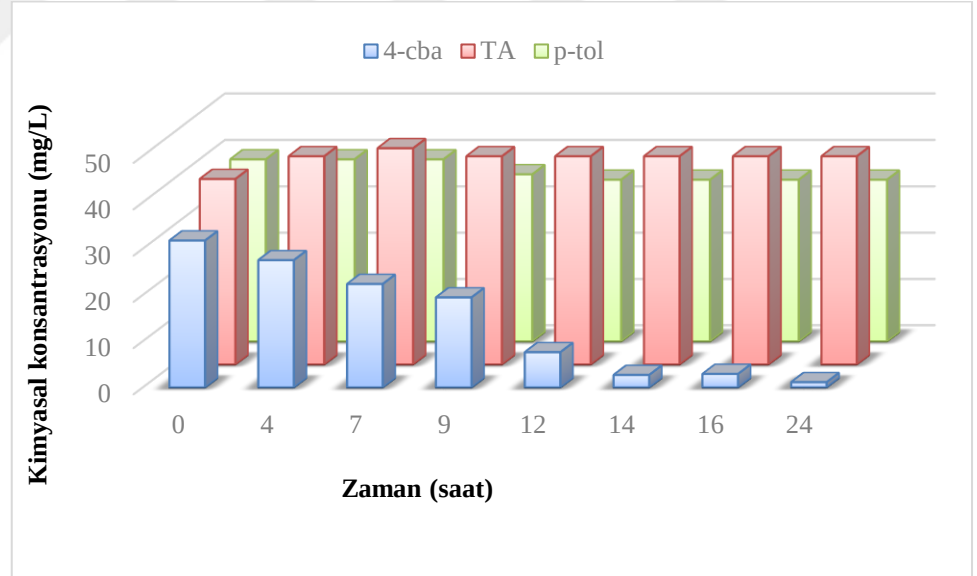
Şekil 4.41 18. ay raf ömrüne ait, skim milk + sodyum glutamat içeren vial'e ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.41'de görüldüğü gibi 24 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir. Canlılık bakımından tez çalışmasında kullanılan koruyucular arasında en iyi sonucu veren ürün olan bu vial'e ait biyoparçalamanın 18. ay'da devam etmesi, bu ürünün kullanılabilirliğini göstermiştir.



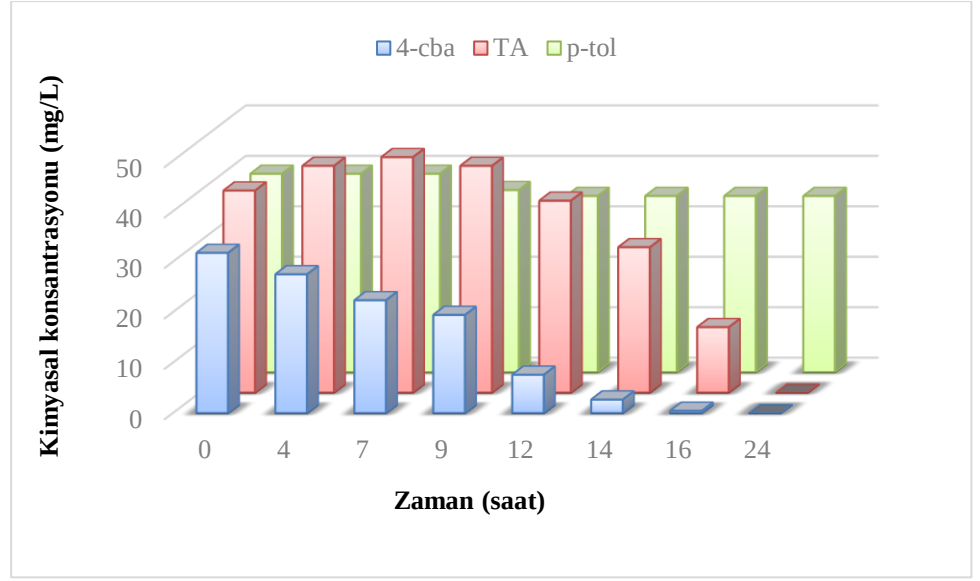
Şekil 4.42 18. ay raf ömrüne ait, sükröz + sodyum glutamat içeren vialle ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.42’de görüldüğü gibi koruyucu olarak sükröz + sodyum glutamat içeren vial 24 saat sonunda p-tol ve 4-cba kimyasallarını parçalamıştır. Fakat TA kimyasalı 24 saatte bile yaklaşık 5 mg/L civarında kalmıştır.



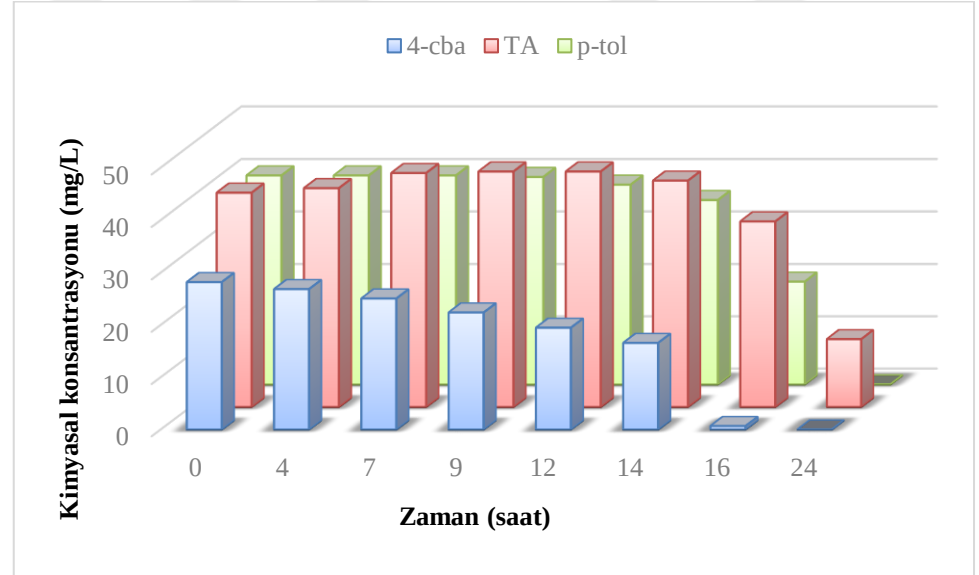
Şekil 4.43 18. ay raf ömrüne ait, maltodekstrin ve maltodekstrin + sükröz viallerine ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.43’te görüldüğü gibi koruyucu olarak maltodekstrin ve maltodekstrin + sükröz kullanılan vialler, 24 saatte 4-cba kimyasalını çok az miktar kalsa da tüketmiştir fakat diğer kimyasalların biyoparçalama etkinliği sona ermiştir.



Şekil 4.44 18. ay raf ömrüne ait, maltodekstrin + skim milk viallerine ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.44'te görüldüğü gibi maltodekstrin + skim milk içeren vialin biyoparçalama sonuçlarına bakıldığında 24 saat içerisinde p-tol hariç diğer kimyasal tükenmiştir.



Şekil 4.45 18. ay raf ömrüne ait, yeast + skim milk viallerine ait biyoparçalama sonucu

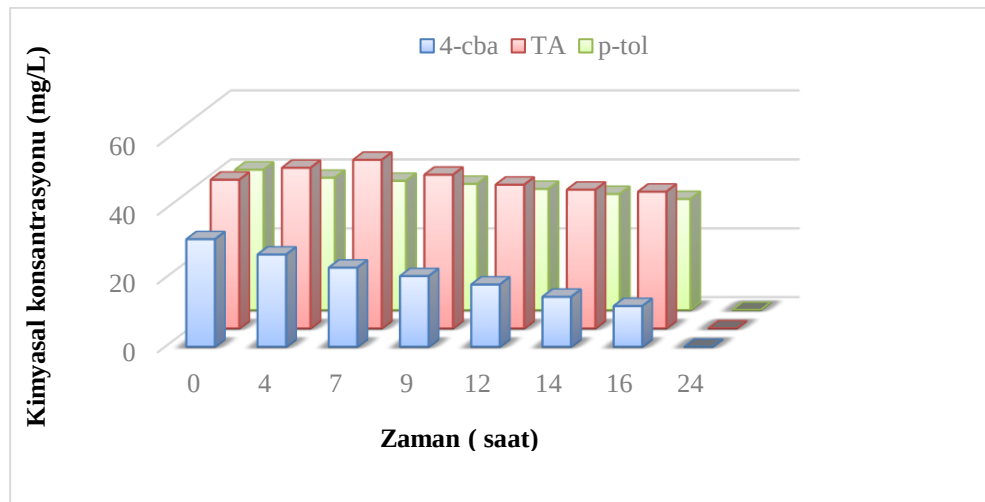
Şekil 4.45'te görüldüğü gibi yeast+skim milk içeren vialin biyoparçalama sonuçlarına bakıldığında 24 saat içerisinde TA hariç diğer kimyasal tükenmiştir. Yeast ve yeast + süktroz içeriğine sahip vialler'de 4-cba ve p-tol biyoparçalaması

aynı şekilde gerçekleşmiş fakat TA kimyasalı biyoparçalama yeteneği sona ermiştir.

24. ay raf ömrüne sahip viallerin biyoparçalama aktivitesine bakıldığında birçok ürün grubunda canlılığın azalmasıyla parçalama etkinliği de azalmış hatta 3 kimyasal için, 24 saat içerisinde parçalama gerçekleşmemiştir. 24 ay sonunda biyoparçalama aktivitesi sona eren ürün gruplarının içerdiği koruyucular şu şekildedir.

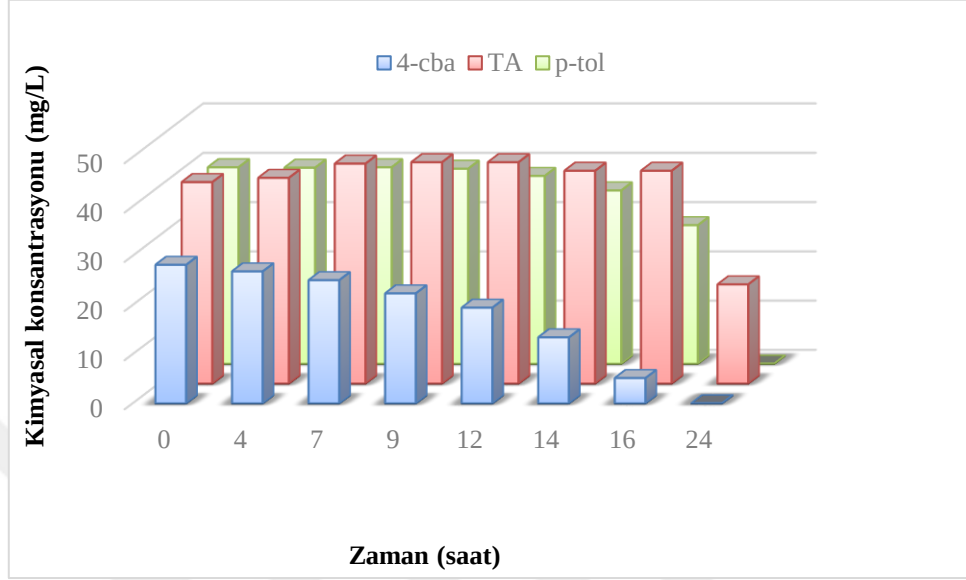
- ✓ Trehaloz
- ✓ Sükroz + trehaloz
- ✓ Sodyum glutamat
- ✓ Maltodekstrin
- ✓ Sükroz + maltodekstrin
- ✓ PVA
- ✓ Skim milk + PVA
- ✓ Sükroz + PVA
- ✓ Yeast
- ✓ Skim milk + yeast
- ✓ Sükroz + yeast

Bu ürünler dışında kalan biyoparçalama etkinliği devam eden veya azalan ürün grupları şekil 4.46'dan 4.52'ye kadar gösterilmiştir.



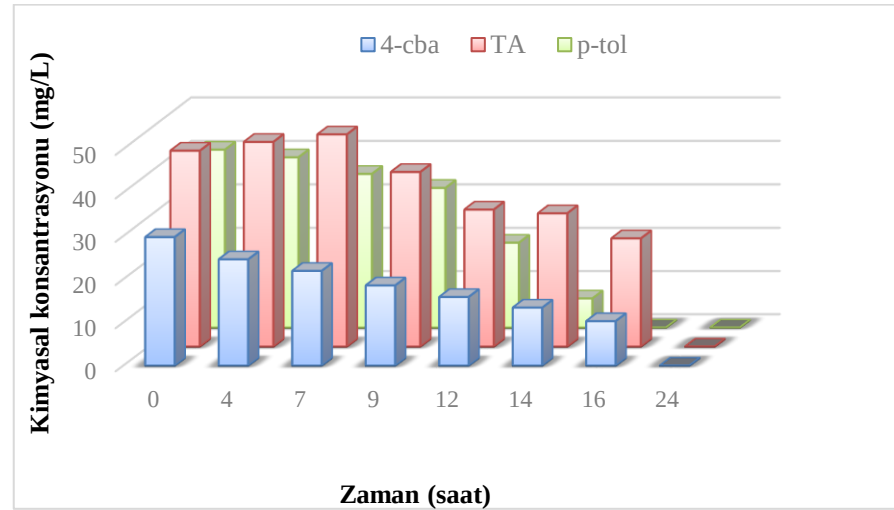
Şekil 4.46 24. ay raf ömrüne ait, skim milk içeren vialer için biyoparçalama sonucu

Şekil 4.46’da görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk içeren vial 24 saat sonunda 3 kimyasalıda tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara göre biyoparçalama süresi uzamıştır.



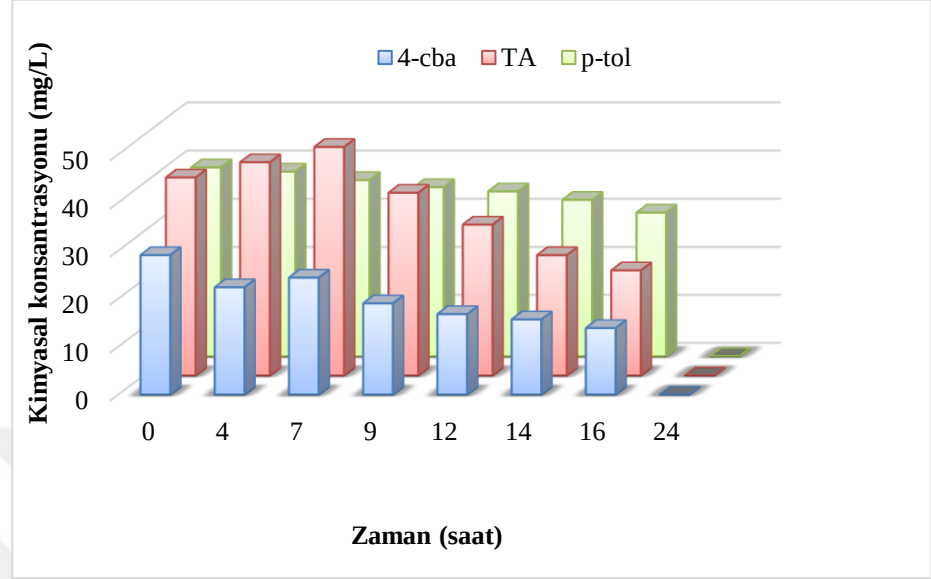
Şekil 4.47 24. ay raf ömrüne ait, süktroz içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.47’de görüldüğü gibi koruyucu olarak süktroz içeren vial 24 saat sonunda TA hariç diğer kimyasalları tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara göre biyoparçalama süresi uzamıştır.



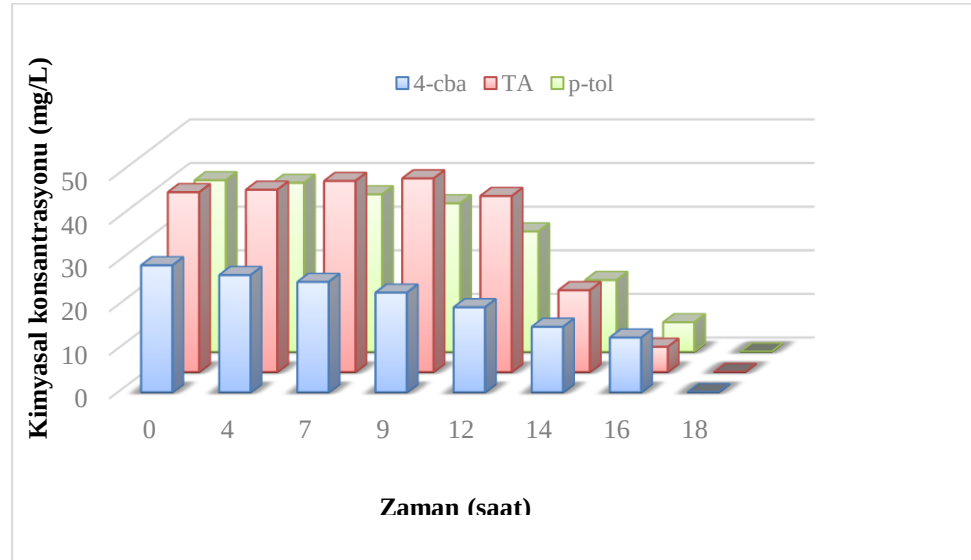
Şekil 4.48 24. ay raf ömrüne ait, skim milk + süktroz içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.48’de görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk + süktroz içeren vial 24 saat sonunda 3 kimyasalıda tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara göre biyoparçalama süresi uzamıştır.



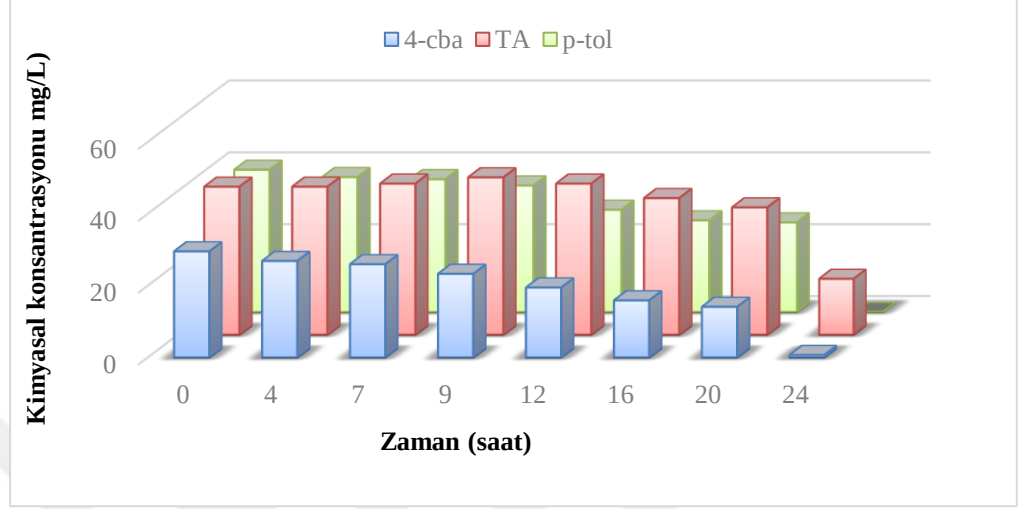
Şekil 4.49 24. ay raf ömrüne ait, skim milk + trehaloz içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.49’da görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk+ trehaloz içeren vial 24 saat sonunda 3 kimyasalıda tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara göre biyoparçalama süresi uzamıştır.



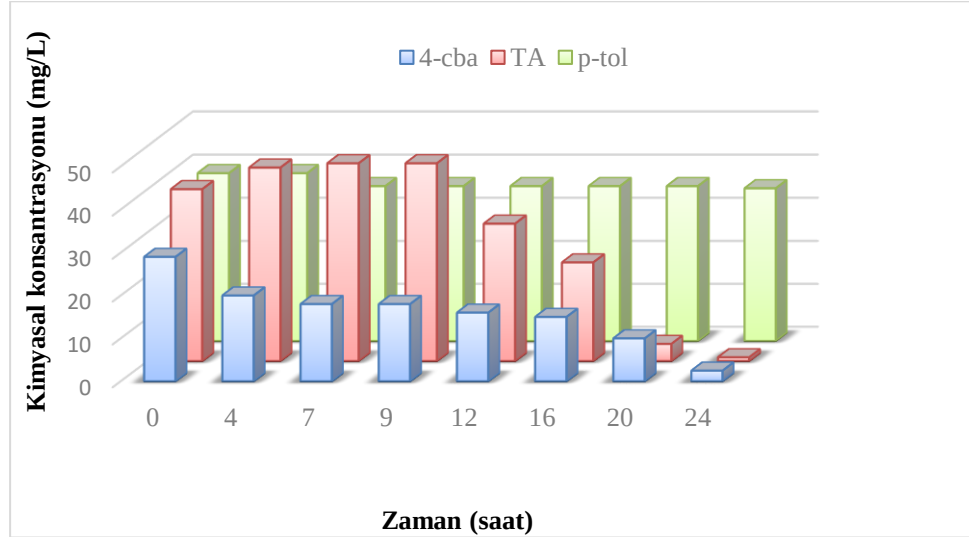
Şekil 4.50 24. ay raf ömrüne ait, skim milk + sodyum glutamat içeren vialde ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.50’de görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat içeren vial 18 saat sonunda 3 kimyasalıda tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara göre biyoparçalama süresi uzamıştır ama diğer ürünlerle kıyaslandığında oldukça başarılıdır.



Şekil 4.51 24. ay raf ömrüne ait, sükröz + sodyum glutamat içeren vial ait biyoparçalama sonucu

Şekil 4.48’de görüldüğü gibi koruyucu olarak sükröz + sodyum glutamat içeren vial 24 saat sonunda, TA hariç 2 kimyasalıda tüketmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara oranlar biyoparçalama süresi uzamıştır.



Şekil 4.52 24. ay raf ömrüne ait, skim milk + maltodekstrin içeren vial ait biyoparçalama sonucu

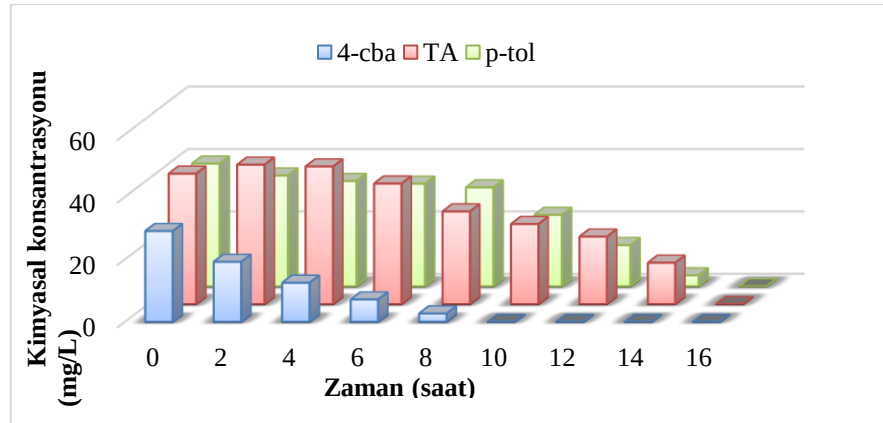
Şekil 4.52’de görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk içeren vial 24 saat sonunda p-tol kimyasalı başlangıçtaki miktarıyla kalmıştır, p-tol parçalayan

bakteriler zarar görmüştür. TA ve 4-cba kimyasalları biyoparçalanması 24 saatte çok az bir miktar ile devam etmiştir. 24 ay raf ömrü sonunda diğer aylara oranlar biyoparçalama süresi uzamıştır.

4.7. Reaktör Denemesi Biyoparçalama Aktivitesi Sonuçları

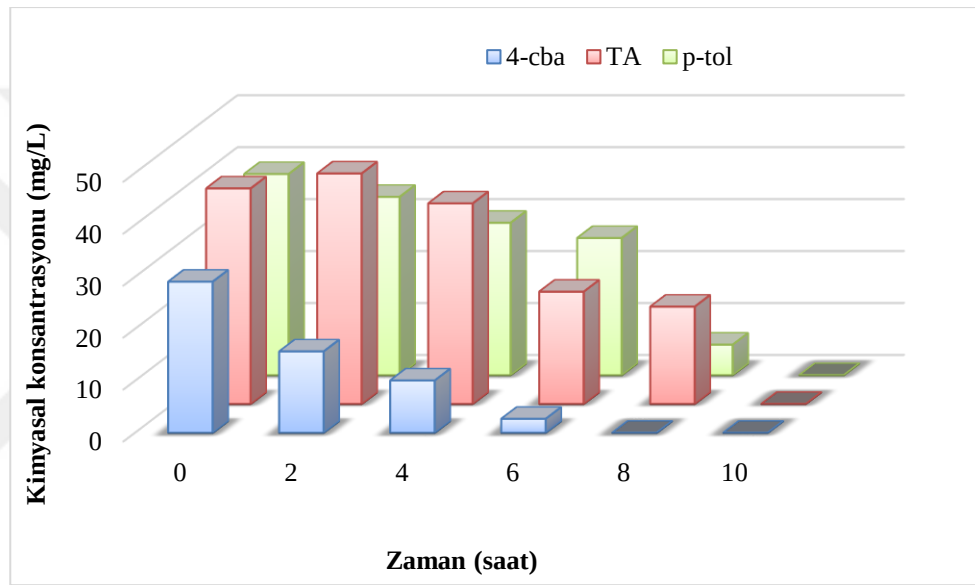
Sürekli Karışimli Tank Reaktörün'de (SKTR) çamur olgunlaşma işlemi yaklaşık 50 gün sürmüştür. SKTR'nin hidrolik alıkonma süresi (HRT) 48 saat olarak belirlenmiştir. Günlük olarak pH, çözülmüş oksijen (DO) ve askıda katı madde (MLSS) değerleri ölçülmüştür. 1M HCl ve 1N NaOH tamponları kullanılarak ortalama pH 7,3-7,5 civarında sabit tutulmuştur. Yapay atık su içeren besin tankı sürekli olarak temiz tutulup kontaminasyon engellenmiştir. Çamur olgunlaşması gerçekleştiği andan itibaren pH 7,3-7,5; DO: 2,5 mg/L; MLSS: 1900 mg/L civarında sabitlendiği görülmüştür.

Her HRT dolduğu zaman bir 1340 mg/L yapay atık su ve başlangıçta 40 mg /L TA, 40 mg/L p-tol ve 30 mg/L 4-cba referans hidrokarbonları içeren stok kimyasallar SKTR'ye eklenmiştir. Her HRT sonunda daha yüksek kimyasal konsantrasyonuna geçilmiştir. Her kimyasal eklendiğinde ve 2 saat aralıklarla HPLC için örnekler alınmıştır. Real-time PCR analizleri için ise başlangıç ve bitiş olmak üzere 2 adet örnek alınmıştır. HPLC ile biyoparçalama etkinliği belirlenmesinde %70-30 asetonitril-su mobil fazı kullanılarak giderim oranları belirlenmiştir. Alıkonma süreleri TA, 4-cba ve p-tol kimyasalları için sırasıyla 1,6; 2,4 ve 6,0 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.53 12. ay koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürünün 40 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların SKTR'de biyoparçalama etkinliği sonucu

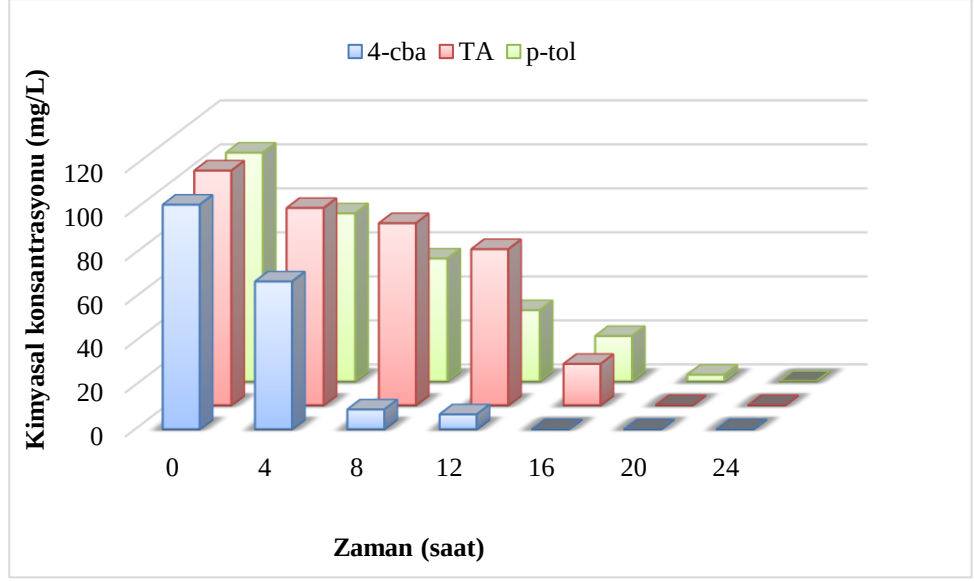
Skim milk içeren ürüne ait reaktör denemesinde 12. ay raf ömrüne sahip ürünlerin biyoparçalama aktivitesi reaktör içerisinde de fazla bir değişiklik göstermemiştir. Başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 40 mg /L TA ve 40 mg/L p-tol, 30 mg/L 4-cba olarak reaktöre eklenmiştir. 16 saat sonunda her 3 kimyasalda tükenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan izolatlara ilave olarak atık su içerisinde kendi yerel mikrobiyal yapısının etkisi olduğu düşünülürse biyoparçalamaya olumsuz etki gözlenmemiştir. Liyofilize ürün, yapay atık su içeren reaktörde biyoparçalama aktivitesi ve canlılığını sürdürmeye devam etmiştir.



Şekil 4.54 12. ay koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat kullanılan liyofilize ürünün 40 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların SKTR reaktördeki biyoparçalama etkinliği sonucu

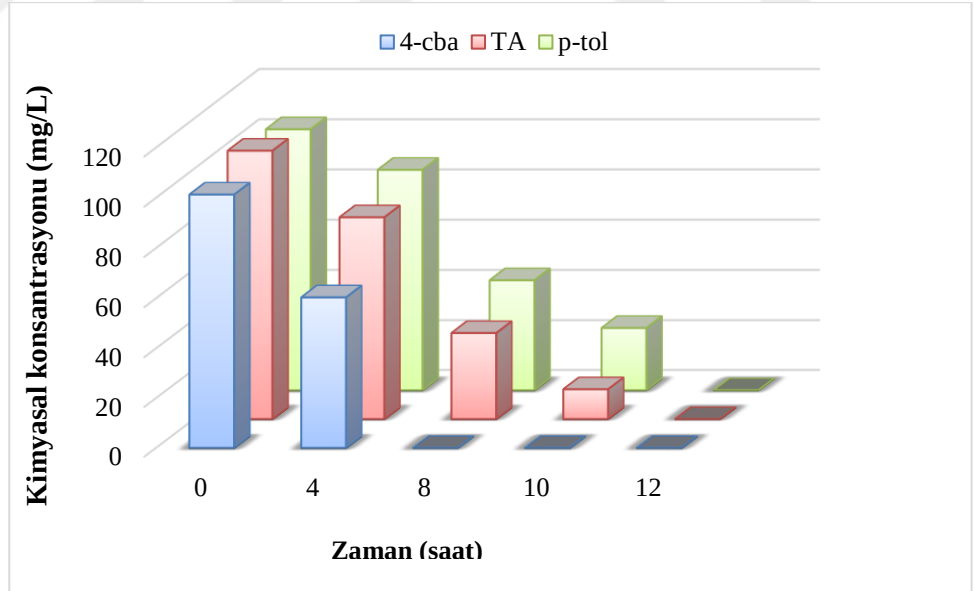
Şekil 4.54’de görüldüğü gibi 12 ay biyoparçalama aktivitesi ve canlılık sonuçları bakımından en iyi olan ürün olan skim milk + sodyum glutamat içeriği SKTR’de 24 saat boyunca takip edilmiştir. Denemede 12. ay raf ömrüne sahip ürünlerin biyoparçalama aktivitesi reaktör içerisinde hızlı bir şekilde biyoparçalama gerçekleştirmiştir. Başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 40 mg/L TA ve p-tol, 30 mg/L 4-cba olarak reaktöre eklenmiştir. 10 saat sonunda her 3 kimyasalda tükenmiştir. Liyofilize ürün, yapay atık su içeren reaktörde biyoparçalama aktivitesi ve canlılığını sürdürmeye devam etmiştir.

Reaktörde kullanılan ürünlerin ardından aynı mikrobiyal yapı devam etmek üzere kimyasal konsantrasyonu arttırılmıştır.



Şekil 4.55 12. ay koruyucu olarak **skim milk** kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden 100 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu

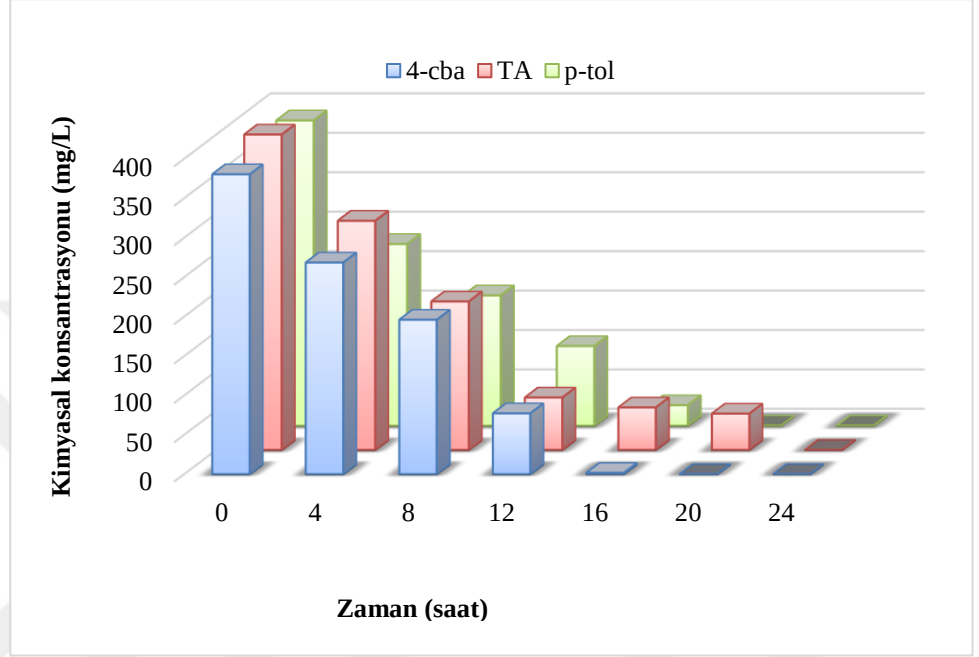
Şekil 4.55’te görüldüğü gibi her 3 kimyasalın konsantrasyonu 100 mg/L’ye çıkmış olmasına rağmen koruyucu olarak skim milk kullanılan liyofilize ürün denemesinde, biyoparçalama aktivitesinde 20 saat sonunda çok az miktarda p-tol kimyasalı kalmış diğerleri 20 saat içerisinde tükenmiştir.



Şekil 4.56 12. ay koruyucu olarak **skim milk+ sodyum glutamat** kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden 100 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu

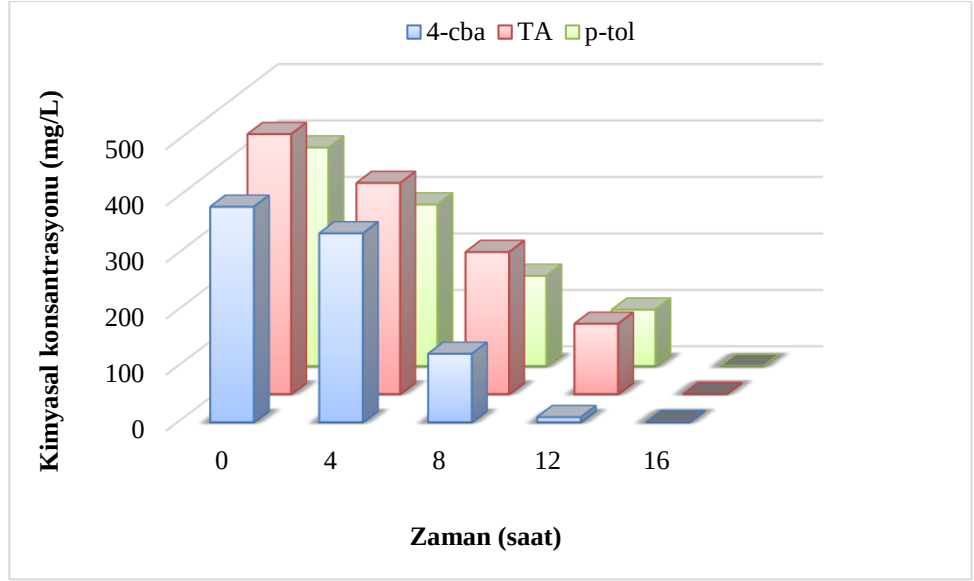
Şekil 4.56’da görüldüğü gibi her 3 kimyasalın konsantrasyonu 100 mg/L’ye çıkmış olmasına rağmen koruyucu olarak skim milk ve sodyum glutamatın kullanıldığı liyofilize ürün denemesinde, 12 saatte 3 kimyasalda tükenmiştir.

Her iki ürün denemesinde 2-4 saatlik gecikme kimyasal konsantrasyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.57 12. ay koruyucu olarak **skim milk** kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden yaklaşık 400 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu

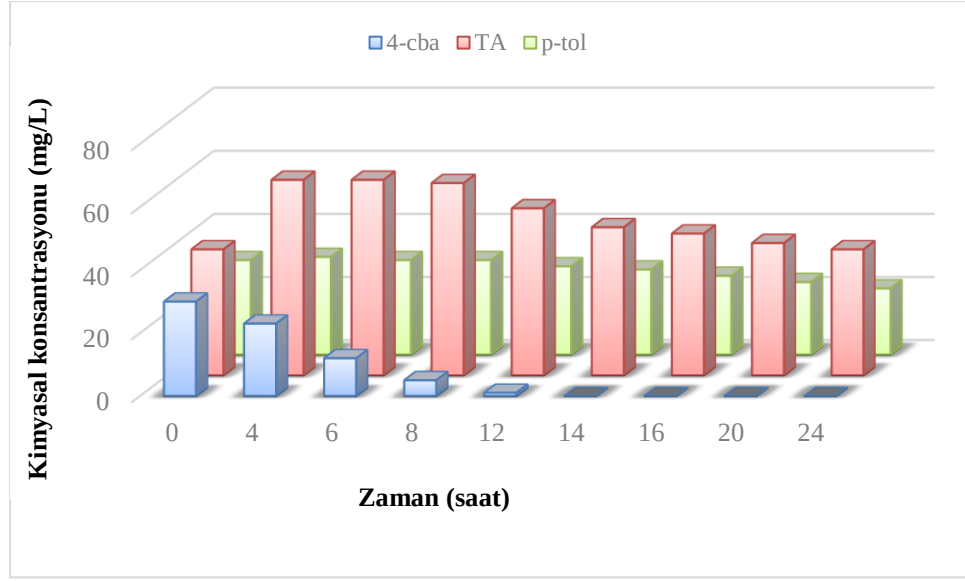
Yaklaşık 400 mg/L her 3 kimyasaldan içeren reaktörde, sadece koruyucu olarak skim milk bulunduğu parçalama aktivitesi 24 saat içerisinde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.58 12. ay koruyucu olarak **skim milk+ sodyum glutamat** kullanılan liyofilize ürünün SKTR’de her birinden yaklaşık 400 mg /L TA, 4-cba ve p-tol içeren kimyasalların biyoparçalama etkinliği sonucu

Yaklaşık 400 mg/L ilgili kimyasalları içeren reaktör denemesinde skim milk içeren ürün, 16 saat içerisinde tüm kimyasalları parçalamıştır. Artan konsantrasyona rağmen parçalama süresi azalmıştır. Bu durum mikroorganizmaların kimyasala karşı adaptasyon sağlayıp daha hızlı bir şekilde kimyasalı parçaladığını söyleyebiliriz. Koruyucu olarak skim milk kullanıldığında daha geç parçalama olmuştur. Sodyum glutamat ve skim milk beraber koruyucu olarak kullanıldığında yüksek konsantrasyondaki TA, 4-cba ve p-tol kimyasalını daha hızlı bir şekilde parçalamıştır. Bu durumda liyofilizasyondan korunan bakterilerin parçalama etkinliğindeki başarısını bize göstermiştir. Artan konsantrasyonla birlikte biyoparçalama süresi azalmıştır. Real-time PCR sonuçlarına baktığımız zamanda artan konsantrasyonla izolatların sayısının çoğunlukla arttığı görülmekte ve bu durumda biyoparçalama süresinin azalmasını desteklemektedir.

Çalışmalar süresince liyofilize ürün eklenmeyen yerli flora ile çalışılan kontrol reaktöründe 14 saat içerisinde 4-cba kimyasalı tükenmiştir (Şekil 4.59). Diğer kimyasallar ise 24 saatte dahi varlığını sürdürmüştür. Bu sebeple yerli mikroorganizmaya ilave olarak tez çalışmasında kullanılan liyofilize organizmaların biyoparçalamayı hızlandırdığı görülmüştür.



Şekil 4.59 Kontrol reaktörüne ait biyoparçalama sonuçları

4.8. Nanodrop ve Agaroz Jel Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılan 16 izolata ait qPCR analizlerini gerçekleştirmek üzere DNA izolasyonları ve sonrasında nanodrop ölçümleri yapılmıştır. Çizelge 4.3'te nanodrop sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 DNA izolasyonları sonucu 16 izolatın nanodrop sonuçları

Örnek kodu	Nükleik Asit Konsantrasyonu ng/μL	260/280
PT7	42,5	1,84
P6	311,4	1,89
T5	346,1	1,89
218	212	1,86
PT4	329,9	1,89
TK	314,8	1,86
C9	232,4	1,81
FT5	515,5	1,85
ÇB	91,1	1,91
ANT2	130,7	1,82
AS	98,1	1,86
3A2	620,3	1,84
T1	273	1,88
R1	475,6	1,87
T4	810,3	1,84
C6	678,4	1,8

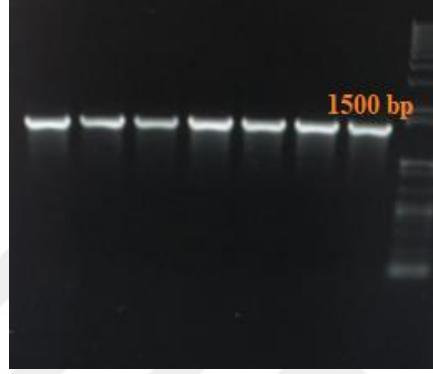
Skim milk ve skim milk + sodyum glutamat içeren ürünler liyofilizasyon sonrası canlılık ve biyoparçalama aktivitesi açısından en iyi ürünler arasındadır. Bu 2 ürün reaktörde 40 mg/L, 100 mg/L ve 400mg/L olmak üzere artan konsantrasyonlarda 2 farklı reaktörde çalışılmıştır. Reaktördeki kimyasal giderimi boyunca belirli aşamalarda DNA izolasyonu için örnek alınmış ve DGGE ve Real-time PCR analizlerinde kullanılmıştır. Alınan reaktör, örnek içeriği ve nanodrop sonuçları çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Reaktör örneklerinden yapılan DNA izolasyonları sonucu nanodrop sonuçları

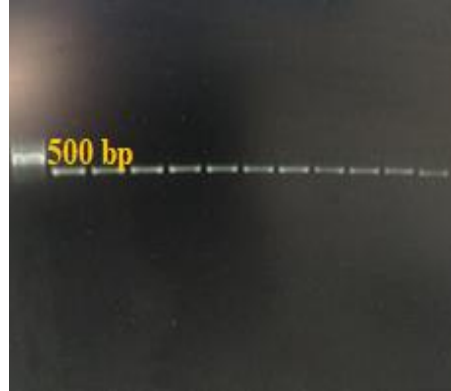
Örnek kodu	Nükleik Asit Konsantrasyonu ng/μL	260/280
<i>Skim milk</i> içeren 1 yıl raf ömrüne sahip vial	17,9	1,87
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat içeren 1 yıl raf ömrüne sahip vial	24,1	1,77
<i>Skim milk</i> - Reaktöre liyofilize ürünü eklemeyen önce	9,1	2,06
<i>Skim milk</i> -Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra	8,3	1,65
<i>Skim milk</i> -Reaktöre kimyasal eklenince (40 mg/L)	8	1,6
<i>Skim milk</i> - Reaktörde kimyasal giderimi ortası	8,5	1,77
<i>Skim milk</i> - Reaktörde kimyasalın tükendiği an	6,8	1,66
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat Reaktöre mikroorganizma eklenmeden önce	7,3	1,56
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat Reaktöre mikroorganizma eklendikten sonra	14,5	1,68
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat Reaktöre kimyasal eklenince	8,4	1,66
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat Reaktörde kimyasal giderimi ortası	11,3	1,7
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat Reaktörde kimyasalın tükendiği an	10,1	1,63
<i>Skim milk</i> -Reaktörde kimyasalın tükendiği an (100 mg/L)	6,3	2,17
<i>Skim milk</i> + sodyum glutamat -Reaktörde kimyasalın tükendiği an (100 mg/L)	5,5	1,85
<i>Skim milk</i> -Reaktöre kimyasalın eklendiği an (400 mg/L)	9,7	1,62
<i>Skim milk</i> +sodyum glutamat -Reaktöre kimyasalın eklendiği an (400 mg/L)	9,7	1,58

-Skim milk	16,9	1,7
Reaktörde kimyasalın tükendiği an (400 mg/L)		
-Skim milk + sodyum glutamat	27,6	1,76
Reaktörde kimyasalın tükendiği an (400 mg/L)		

Çalışmada DNA izolasyonlarından sonra gerçekleşen konvansiyonel PCR ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki kontrolü şekil 4.60 ve 4.61’de gösterilmiştir.



Şekil 4.60 Universal primerle (11F-1492R) çoğaltılan DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

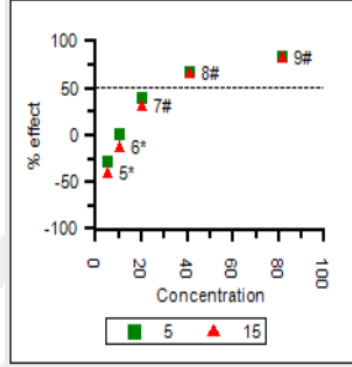


Şekil 4.61 338F-805R ile çoğaltılan DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

Şekil 4.60 ve 4.61’de, agaroz jel elektroforezi sonucunda ladder ile kontrolü yapılmış ve tek bir bant gözlenmesi ile PCR ürünlerinin sorunsuz bir şekilde çoğaldığı görülmektedir.

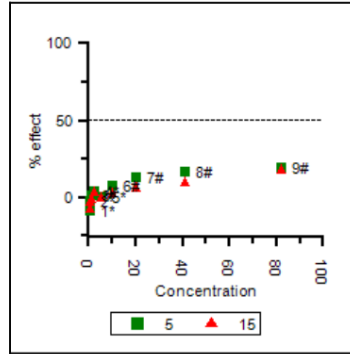
4.9. Microtox sonuçları

Çalışmada pozitif kontrol olarak sodyum azid kullanılmıştır. Sodyum azid toksik bir kimyasal olup bakterinin sitokrom enzimlerine zarar vererek ışık oluşumunda olması gereken oksijeni inhibe etmektedir. Microtox cihazı ile sodyum azid kullanılmış ve 5 ile 15 dakikalık maruziyet sonucu ışık inhibisyon değerleri Şekil 4.62’de gösterilmiştir.



Şekil 4.62 Pozitif kontrol olarak sodyum azidin Microtox sonucu

Pozitif kontrol denemisinde görüldüğü gibi ışık inhibisyon etkisi EC50 değeri üzerindedir. CSTR reaktörde çalışılan biyoparçalama sonucu çıkış örneğinden yapılan Microtox sonuçları şekil 4.63’de gösterilmiştir.



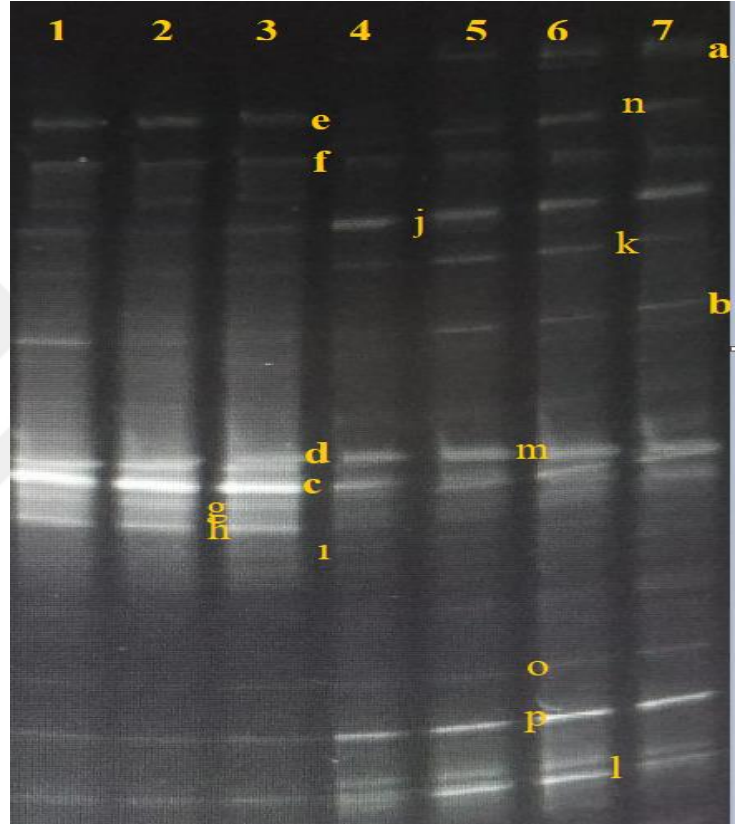
Şekil 4.63 Reaktör çıkış örneklerinin toksisite kontrolünde Microtox sonucu

Reaktör çıkış örneklerinden alınan tüm örnekler için Microtox analizinde toksisite saptanmamıştır. 5 ve 15 dakikalık maruziyet sonucunda EC50 değeri aşılmamıştır.

4.10. DGGE Görüntüsü ve Sekans Sonuçları

Reaktörden alınan örneklerin ve 1 yıl raf ömürlü vial içeriklerinin mikrobiyal içeriğinin belirlenmesinde 16S rDNA dizileri Mega 7 programı kullanılarak hizalanmış ve gerekli baz dizileri temizlenmiştir. “Neighbor-joining” metoduyla türlerin filogenetik ağacı yapılandırılmıştır. Filogenetik ağaç yapılandırmasında Bootstrap testi (1000 tekrarlı) kullanılmıştır.

Şekil 4.64’de reaktör örneklerden yapılan DGGE jel görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 4.64 Reaktör örneklerinin DGGE görüntüsü

DGGE jel görüntüsünde, 1 yıl raf ömrüne sahip koruyucu olarak skim milk içeren örnekler 1,2,3 numaralı örnekler olup diğerleri koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat’ın kullanıldığı vialerdir. Her iki örnekte de vial içeriği PBS ile canlandırılıp nutrient broth ortamında çoğaltılan içerikte nutrient ortamından reaktöre aktarım yapılmıştır. Örnek içerikleri çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 DGGE örnekleri

DGGE örnek sırası	Örnek Adı
1	Koruyucu olarak skim milk içeren liyofilize ürünün SKTR'ye eklendiği an giriş suyu örneği
2	Koruyucu olarak skim milk içeren liyofilize ürünün SKTR'de kimyasal giderimin %50'sinin gerçekleştiği reaktör örneği
3	Koruyucu olarak skim milk içeren liyofilize ürünün SKTR'de kimyasalı parçaladığı an çıkış suyu örneği
4	Koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat içeren liyofilize ürünün SKTR'ye eklendiği an giriş suyu örneği
5	Koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat içeren liyofilize ürünün SKTR'de kimyasal giderimin %50'sinin gerçekleştiği reaktör örneği
6	Koruyucu olarak skim milk içeren liyofilize ürünün SKTR'de kimyasal giderimin %80'nin gerçekleştiği reaktör örneği
7	Koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamat içeren liyofilize ürünün SKTR'de kimyasalı parçaladığı an çıkış suyu örneği

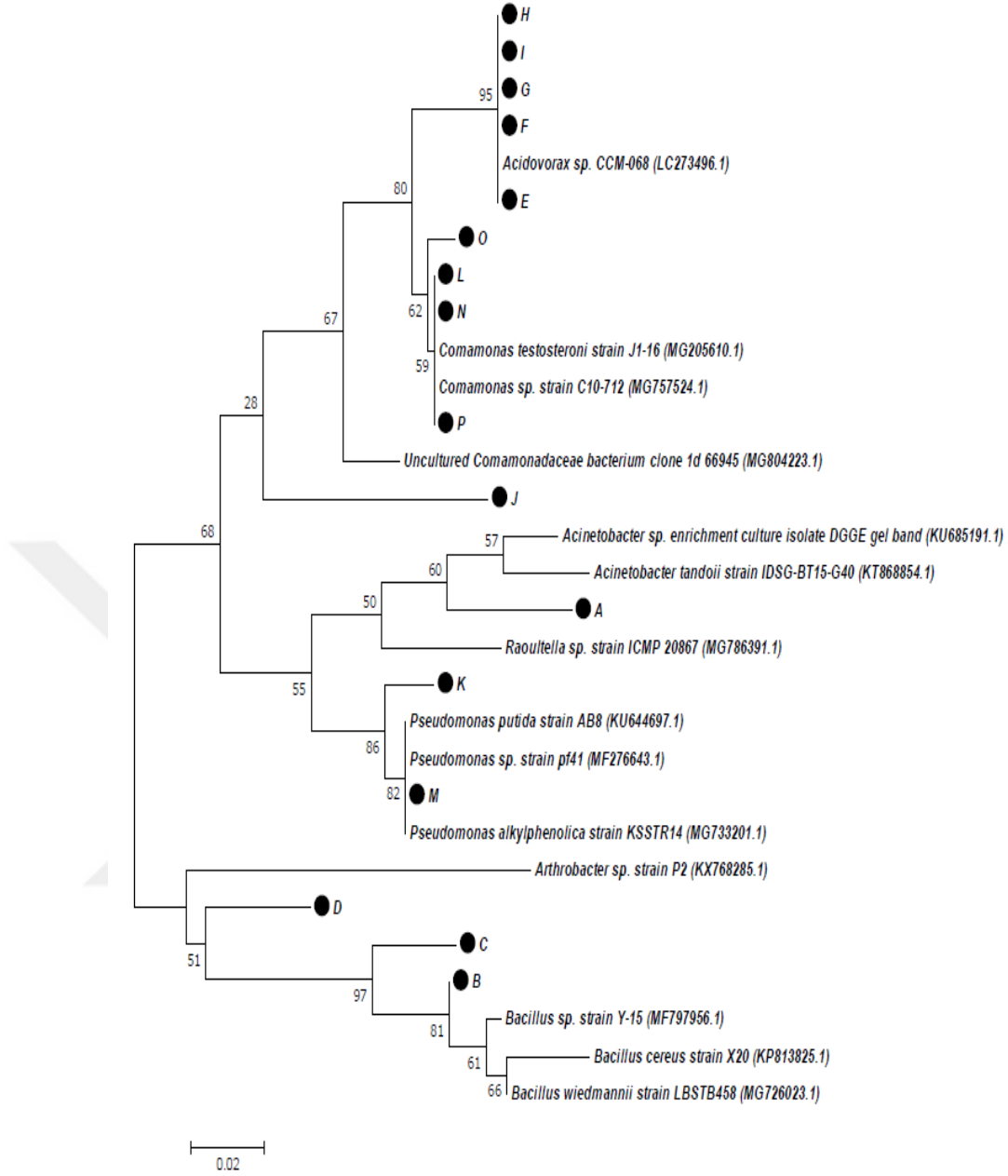
Koruyucu içeriklerinde çok fazla farklılık olmamakla birlikte skim milk ile birlikte sodyum glutamat içeren örnekte bant sayısı ve yoğunluğu daha fazladır. Sadece koruyucu olarak skim milk içeren ürünlerde “c” bandı yüksek yoğunluktadır. “c” bandının DNA dizi analizi sonucunda Uncultured *Bacillus* olarak belirlenmiştir. Liyofilize ürün içeriğimizde bu organizma olmadığı için reaktör ortamında aktif çamur olarak kullanılan petrokimya endüstrisinden gelen atık su içeriğinde olduğu düşünülmektedir. “a” bandı ise sadece skim milk + sodyum glutamat'ın koruyucu olarak kullanıldığı liyofilize üründe mevcuttur, biyoparçalama devam ettikçe daha da yoğun bir bant olarak gözükmemektedir. “a” bandının dizi analiz sonucu %94 benzerlikle, *Acinetobacter tandoni* olarak

belirlenmiştir. Kullandığımız aşı kültüründe de bu *Acinetobacter* sp. mevcuttur. Liyofilize ürün içeriğinde bulunan yoğun olarak görülen “p” bandı *Comamonas testosteroni* DGGE ‘de her aşamada görülmüştür. Özellikle skim milk+ sodyum glutamat içeren üründe ise daha yoğun bir bant olarak görülmüştür.

Bant profillerine ait benzerlik oranları ve dizilerden oluşan filogenetik ağaç çizelge 4.6 ve şekil 4.65’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 DGGE bantlarına ait organizmalar ve benzerlik oranları

Bant no	Genbank numarası	Aksesiyon	Organizma ismi	Genbank % Benzerlik Oranı
a	KT868854.1		<i>Acinetobacter tandonii</i>	94
b	JN975087.1		<i>Bacillus</i> sp.	99
c	KF100819.1		<i>Uncultured Bacillus</i> sp.	99
d	JN680065.1		Uncultured bacterium	99
e	LC273496.1		<i>Acidovorax</i> sp.	100
f	LC273496.1		<i>Acidovorax</i> sp.	100
g	LC273496.1		<i>Acidovorax</i> sp.	100
h	LC273496.1		<i>Acidovorax</i> sp.	100
ı	LC273496.1		<i>Acidovorax</i> sp.	100
j	JF809155.1		<i>Uncultured bacterium</i>	88
k	MF979809.1		<i>Pseudomonas putida</i>	91
l	MH064250.1		<i>Comamonas testosteroni</i>	99
m	MG733201.1		<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99
n	MH064250.1		<i>Comamonas testosteroni</i>	100
o	MH064250.1		<i>Comamonas testosteroni</i>	99
p	MH064250.1		<i>Comamonas testosteroni</i>	99

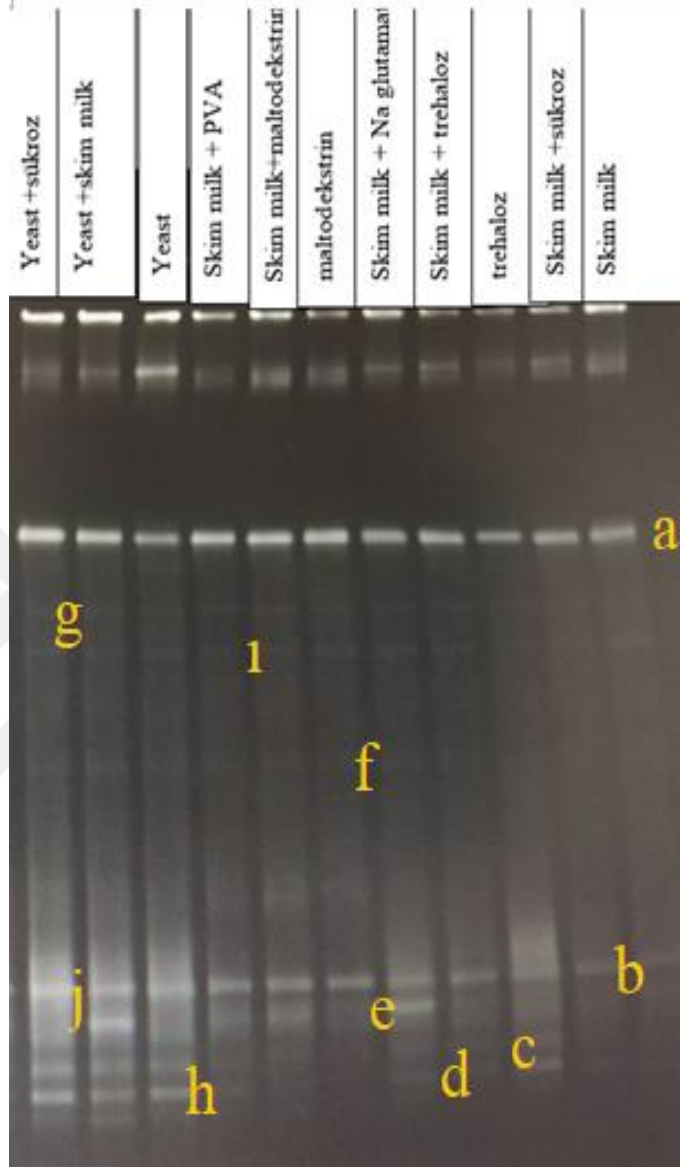


Şekil 4.65 DGGE sonuçlarına ait filogenetik ağaç

Filogenetik ağaç sonuçları ve benzerlik oranlarına bakıldığında reaktörden elde edilen bant profillerinin tez çalışmasında kullanılan organizmalardan oluştuğunu onun dışında *Acidovorax* ve *Bacillus* türlerinin de reaktörde var olduğu görülmektedir.

Reaktördeki biyoparçalama sürecindeki organizmaların takibi dışında, farklı koruyuculardan oluşan ve liyofilize edilen ürünler de 1 yıl raf ömrü ardından içerdiği mikrobiyota DGGE ile görüntülenmiştir (Şekil 4.66). 1 yıl raf ömrü sonunda liyofilize ürünler PBS ile canlandırılmış ve daha sonra nutrient broth

ortamına aktarılmıştır. İnkübasyon sonunda canlılık gösteren viallerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DGGE için uygun primerler çoğaltılıp poliakrilamid jele yüklenmiştir.

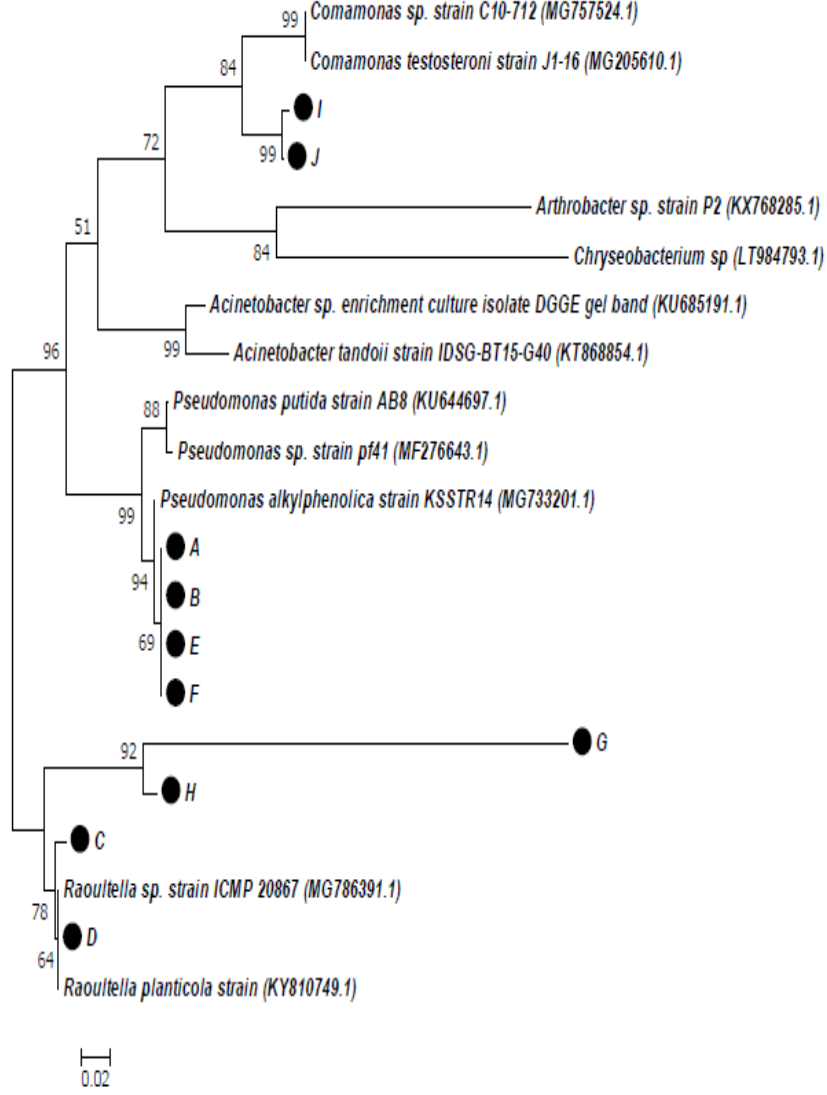


Şekil 4.66 Farklı koruyucularla yapılan liyofilize ürünlerin 1.yıl sonunda bakteriyal yapısına ait DGGE görüntüsü

Dizi analiz sonuçlarına göre benzerlik oranları çizelge 4.7’de, DGGE görüntüsü bant sonuçlarından oluşturulan filogenetik ağaç şekil 4.67’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 DGGE bantlarına ait organizma isimleri ve benzerlik oranları

Bant no	Genbank Aksesiyon No	Organizma ismi	Genbank % Benzerlik Oranı
a	MG733201.1	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99
b	MG733201.1	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99
c	CP026047.1	<i>Raoultella planticola</i> strain FDAARGOS_64	99
d	CP026047.1	<i>Raoultella planticola</i> strain FDAARGOS_64	99
e	MG733201.1	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99
f	MG733201.1	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99
g	KY810749.1	<i>Raoultella planticola</i> strain SO4-R37	94
h	KY810749.1	<i>Raoultella planticola</i> strain SO4-R37	94
i	KM187464.1	<i>Comamonadaceae bacterium</i> HP3U	100
j	KM187464.1	<i>Comamonadaceae bacterium</i> HP3U	100

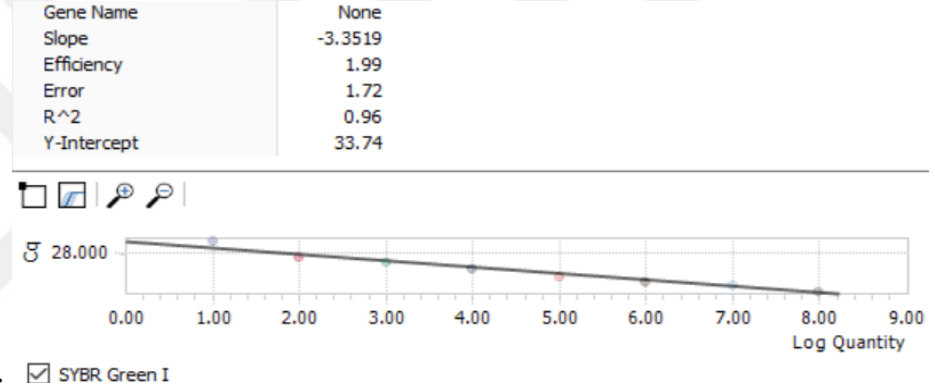


Şekil 4.67 DGGE görüntüsüne ait filogenetik ağaç

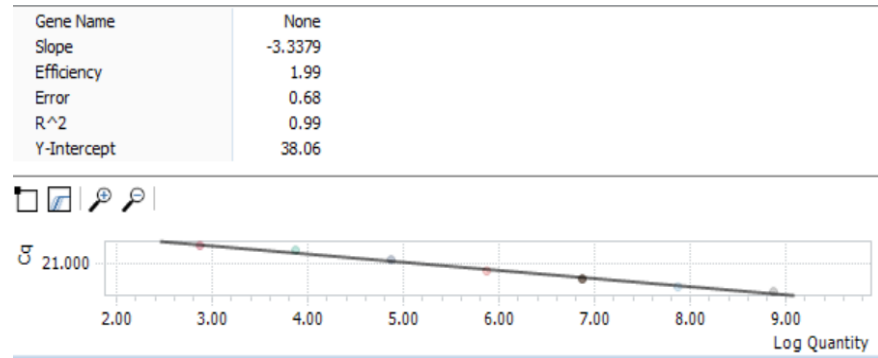
Dizi analiz sonuçlarına göre maltodekstrin ve sadece skim milk içeren ürün gruplarında farklı diziler diğerlerine kıyasla daha az olduğu görülmüştür. 1 yıl sonundaki bakteriyal kayıplar düşünüldüğünde canlılığın azalması ve biyoparçalama etkisindeki gerileyişin sebebi bakterilerin varlığının azalması olarak düşünülmüştür.

4.11 Real-time Sonuçları

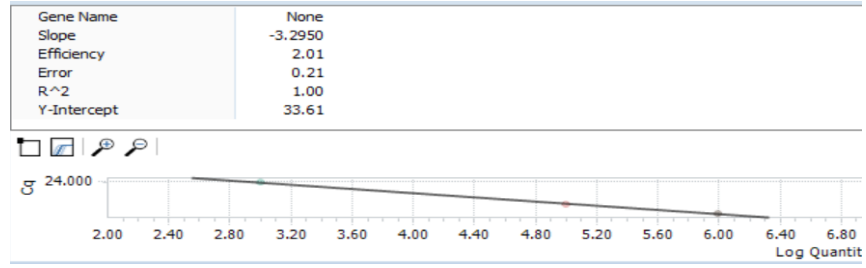
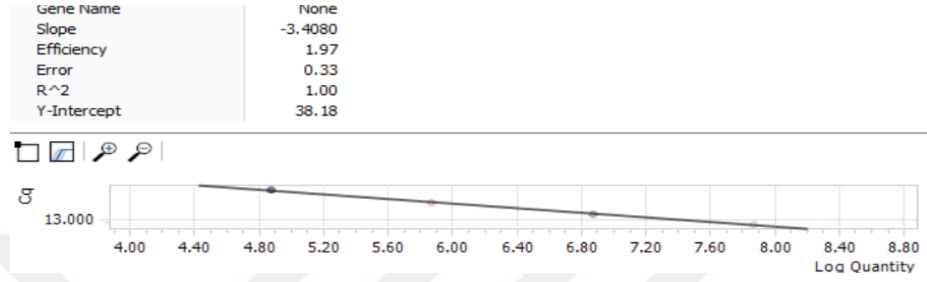
Real-time PCR’da SYBR Green yöntemi ile *P. putida*, *Chryseobacterium* sp., *M.luteus*, *C. testosteroni*, *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *R.planticola* ve total bakteri primerleriyle uygun PCR koşullarında analiz gerçekleştirilmiştir. TaqMan probu ile *P.fluorescens* uygun PCR koşullarında çalışılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri PCR temizleme kiti vasıtasıyla temizlenmiştir. Her bir bakteri için uygun seyreltmeler hazırlanarak qPCR’da oluşturulan standart grafikler şekil 4.68; 4.69; 4.70; 4.71; 4.72; 4.73; 4.74; 4.75; 4.76; 4.77’de gösterilmiştir.



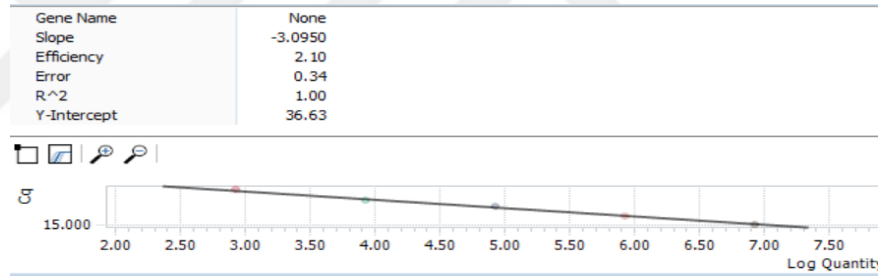
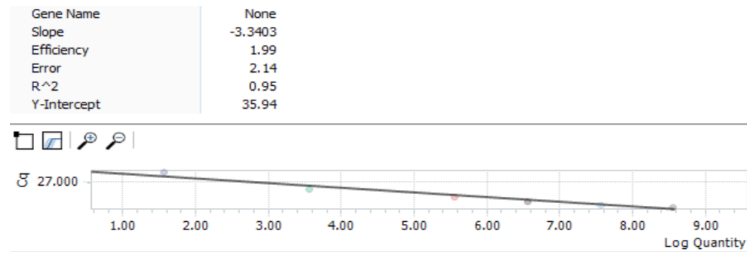
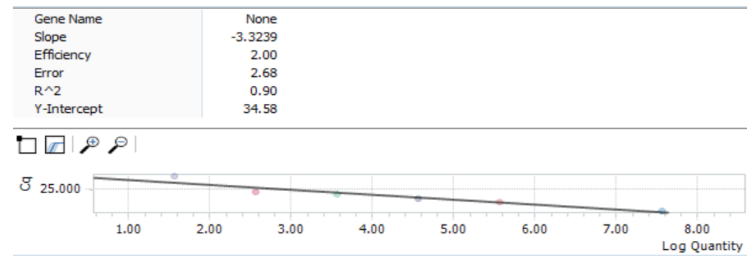
Şekil 4.68 *Pseudomonas* sp.’e ait qPCR’da oluşturulan standart grafik

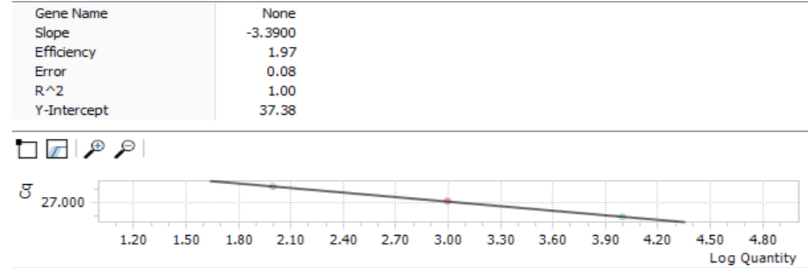


Şekil 4.69 *Acinetobacter* sp.’e ait qPCR’da oluşturulan standart grafik

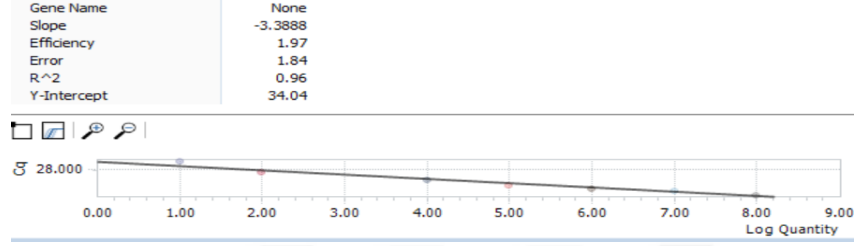
Şekil 4.70 *Micrococcus luteus*'a ait qPCR'da oluşturulan standart grafik

Şekil 4.71 Total bakteri primerine ait qPCR'da oluşturulan standart grafik

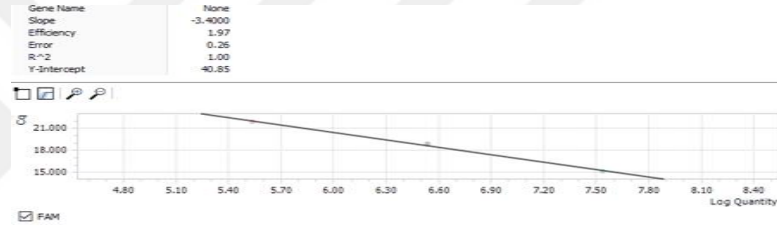
Şekil 4.72 *Comamonas testosteroni* primerine ait qPCR'da oluşturulan standart grafikŞekil 4.73 *Arthrobacter* sp. primerine ait qPCR'da oluşturulan standart grafikŞekil 4.74 *Aeromonas* sp. primerine ait qPCR'da oluşturulan standart grafik



Şekil 4.75 *Chryseobacterium* sp. primerine ait qPCR’da oluşturulan standart grafik



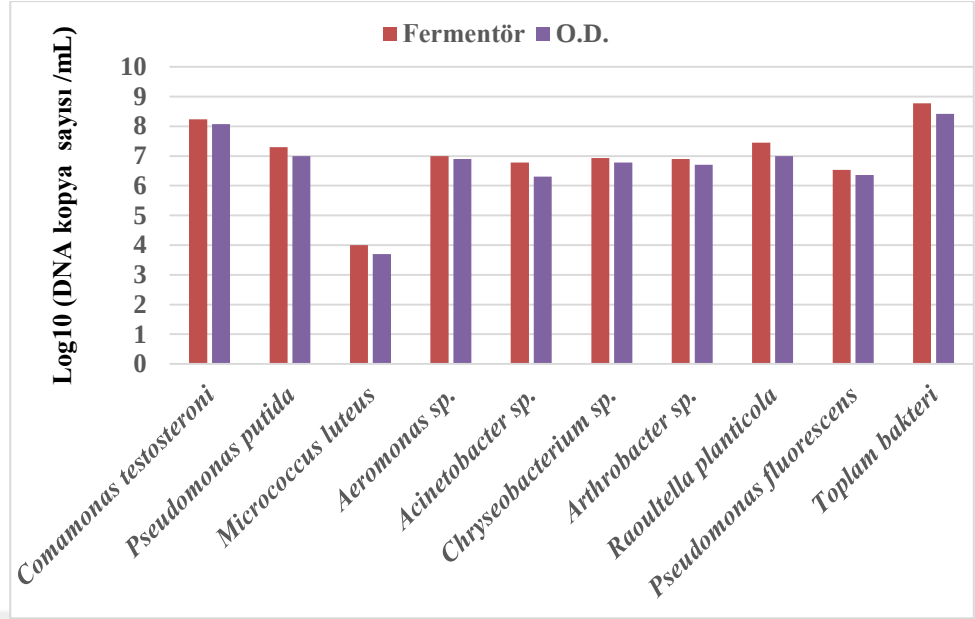
Şekil 4.76 *Raoultella planticola* primerine ait qPCR’da oluşturulan standart grafik



Şekil 4.77 *Pseudomonas fluorescens* TaqMan probe kullanılarak qPCR’da oluşturulan standart grafik

Her çalışmada daha önce standart eğri grafiği oluşturulan ilgili standart DNA’dan 10^6 mertebesinde örnek konularak bilinmeyen örnekteki DNA molekül miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar gerekli kat sayılar ile çarpılarak DNA molekülü/g aktif çamur veya DNA molekülü/mL olacak şekilde hesaplanmıştır.

Şekil 4.78’de liyofilizasyon süreci başlangıcında organizmaların birlikte büyüdüğü fermentör örneğinden ve daha sonra optik yoğunluğu ayarlanmış OD sıvısından alınan DNA örneği ile yapılan Real-time PCR ile sonuçları gösterilmiştir.

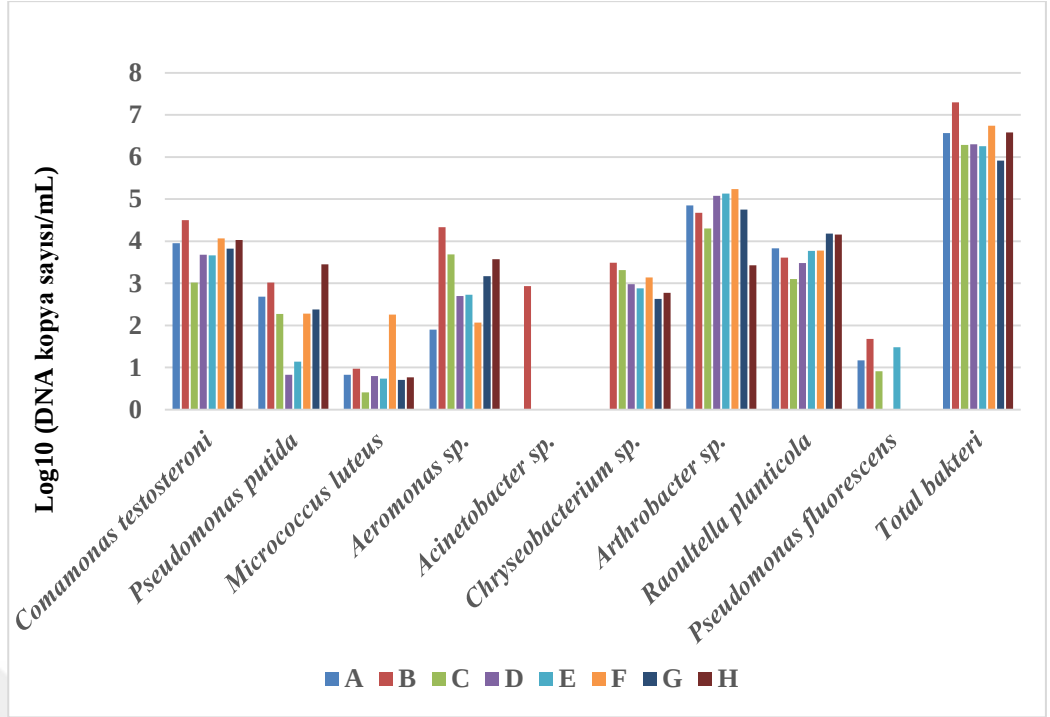


Şekil 4.78 Fermentör ve liyofilizasyon vialinde kullanılan optik yoğunluğu (OD) ayarlanmış sıvıdan alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

Liyofilize ürün içerisine eklenen 16 organizma karışımında; başlangıçta yaklaşık 0,5 OD ile hazırlanan her bir bakterinin fermentörde birlikte üretimi esnasında, sayıları değişmesi mümkündür. Bu nedenle fermentör örneği ve fermentörden alınan sıvı ile hazırlanan OD sıvısından DNA örneği alınmıştır. Bu sonuçlar, liyofilizasyon viali içerisine eklenen gerçek sayıları temsil etmektedir. *M.luteus* dışında diğer bakteriler yaklaşık 10^7 mertebesindedir.

Liyofilizasyon başlangıcında yaptığımız kültürel yöntemle başlangıç sayımız tutarlıdır. Liyofilizasyon sonrası ürün içeriğinde ve reaktörden alınan DNA örneklerinin sonuçlarının kıyaslanmasında bu sonuçlar bakteriyel kayıpların belirlenmesinde bize ışık tutacaktır.

Reaktörde çalışılan “skim milk” liyofilize ürünün biyoparçalamayı takiben bakteriyel izolatların sayıları şekil 4.79’da gösterilmiştir. Şekilde yer alan yatay eksen deki A,B,C,D,E,F,G,H reaktörden alınan farklı zamanları temsil etmekte ve şeklin altında açıklaması yer almaktadır.



Şekil 4.79 Liyofilize ürün olarak **skim milk**'in kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize ürünü eklemeyen önce, **B:** Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, **C:** Reaktöre kimyasal eklenince (TA ve p-tol, 40 mg/L, 4-cba 30 mg/L), **D:** Reaktörde kimyasal giderimi ortası, **E:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (40 mg/L) aynı zamanda 100 mg/L başlangıcı **F:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (100 mg/L) **G:** Reaktöre kimyasalın eklendiği an (400 mg/L) **H:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (400 mg/L)

Şekil 4.79'da görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk'in kullanıldığı liyofilize ürünün çalışıldığı reaktörde; 16 izolat reaktöre eklenmeden önce ve eklendikten sonra total bakteri sayısında yaklaşık 1 logluk artış olmuştur. Hemen hemen çalışılan tüm bakterilerde liyofilize ürün reaktöre eklendiğinde artış göstermiştir.

40 mg/L TA ve p-tol, 30 mg/L 4-cba kimyasal reaktöre eklendiğinde tüm organizma sayıları düşmüştür. Mikroorganizmalar kimyasalla karşı karşıya kaldığında bir miktar zarar görmüştür. Kimyasala ve ortama adapte olan bakteriler parçalama sürecinin ortasında (HPLC ile eş zamanlı takip sonucu karar verilir) bazı bakterilerin sayısı artmıştır. Kimyasal tükendiğinde ise çok az bir artış olmuştur. 3 kimyasaldan da 100 mg/L eklenip kimyasal tükendiği andaki örneklerdeki sayılar artmıştır. Ortama iyice adapte olan bakteriler karbon kaynağı olarak artan kimyasal konsantrasyonu ile birlikte parçalama sürecinin sonunda sayıları artmıştır. Her 3

kimyasaldan 400 mg/L reaktöre eklenen denemede ise eklendiği anda bakterilerin sayısında kayıp olmuş fakat kimyasal tükendiği anda tekrar artış sağlanmıştır.

Acinetobacter sp. sadece reaktöre ürün eklendikten sonra görülmüş fakat daha sonra tekrar saptanamamıştır. Ortamda bulunan diğer bakteriler ve kimyasal bakteriye zarar verdiği düşünülmektedir.

Aeromonas sp. reaktörde daha az bulunmasına rağmen liyofilize ürünü ekledikten sonra sayısında 2 log'dan daha fazla artış gözlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlara artırıldıkça varlığını sürdürmüştür.

P.fluorescens ise diğer bakterilere göre ortamda daha az sayıda bulunmuştur. Liyofilize ürün eklendikten sonra ortamda artış sağlamış fakat kimyasal konsantrasyonu 400 mg/L'ye ulaştığı anda saptanamamıştır.

Çalışılan primerler arasından *R.planticola* ve *Arthrobacter* sp. diğer bakterilere göre, reaktörde daha baskın halde varlığını sürdürmüşlerdir.

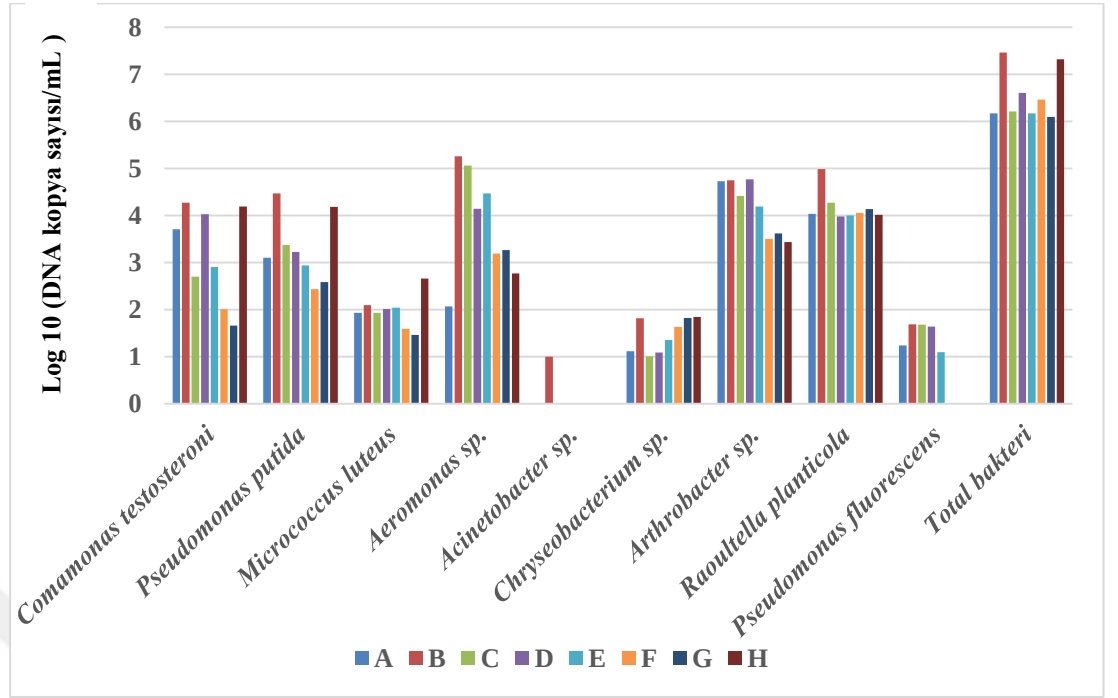
Total bakteri sayısı ise liyofilize ürün eklendiğinde yaklaşık 1 log artış göstermiş kimyasal eklendiği anlarda miktarı düşse de, biyoparçalama sonunda tekrar miktarları artmıştır. Biyoparçalama sürecinde reaktördeki total bakteri varlığı 10^6 - 10^7 civarında varlığını sürdürmüştür.

P. putida ve *M. luteus* her kimyasaldan 100 mg/L içeren reaktör denemesinin sonunda yaklaşık iki kat artış göstermiştir.

Acinetobacter sp. ve *Chryseobacterium* sp. bakterileri petrokimya endüstrisi atık sularından olgunlaştırılan aktif çamurda görülmeyip bizim liyofilize ürünümüz sayesinde ortamda görülmüştür.

Çalışılan bakteriler arasında *M. luteus* 10^1 DNA kopya sayısı/mL seviyesinde reaktörde varlığını sürdürmüştür. Sadece liyofilizasyonun verdiği zarar veya reaktör içerisindeki rekabette başarısız olması olarak düşünülemez. Çünkü şekil 4.78'de görüldüğü gibi liyofilizasyon başlangıcında bu bakteriye ait sayılar zaten düşüktür.

Reaktörde yer almayıp, liyofilize ürün eklendikten sonra varlığını sürdüren *Chryseobacterium* sp. yaklaşık 10^3 seviyesinde reaktörden alınan her zaman dilimindeki örneklerde görülmüştür.



Şekil 4.80 Liyofilize ürün olarak **skim milk + sodyum glutamat**'ın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log 10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize ürünü eklemeyen önce, **B:** Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, **C:** Reaktöre kimyasal eklenince (TA ve p-tol ,40 mg/L, 4-cba 30 mg/L), **D:** Reaktörde kimyasal giderimi ortası, **E:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (40 mg/L) aynı zamanda 100 mg/L başlangıcı **F:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (100 mg/L) **G:** Reaktöre kimyasalın eklendiği an (400 mg/L) **H:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (400 mg/L)

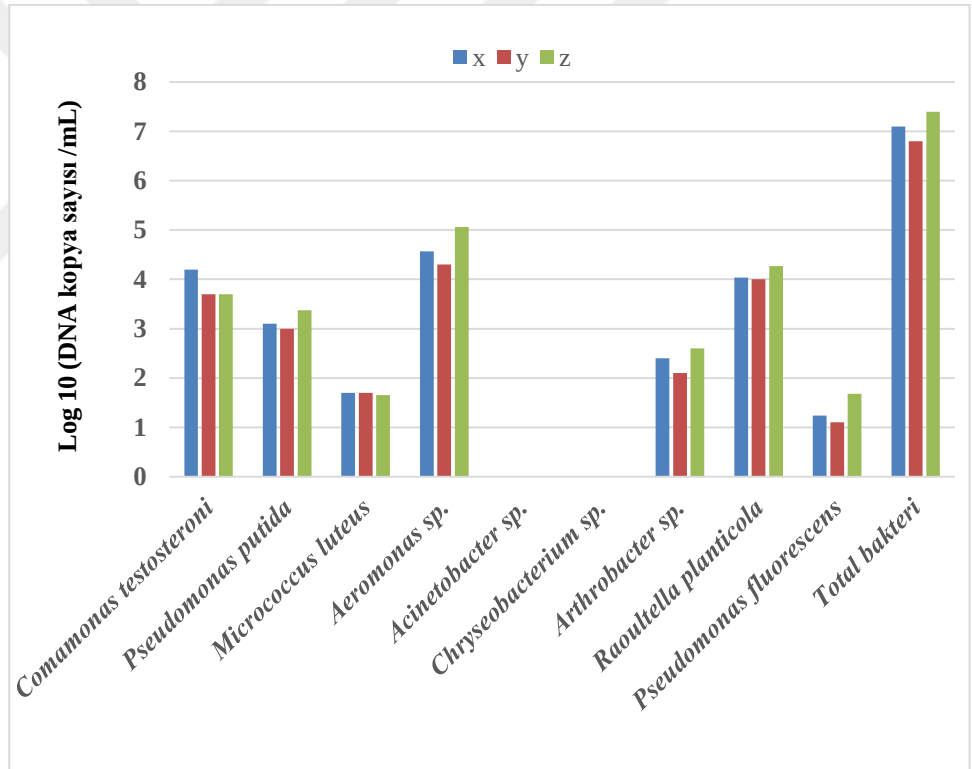
Şekil 4.80'de görüldüğü gibi koruyucu olarak skim milk+sodyum glutamat'ın kullanıldığı liyofilize ürünün çalışıldığı reaktörde; 16 izolat reaktöre eklenmeden önce ve eklendikten sonra yaklaşık 1 log'luk artış olmuştur. Hatta *P.putida* sayısı ve beraberinde total bakteri sayısı 1 logdan fazla artış göstermiştir. Özellikle *Aeromonas sp.* 10^2 mertebesinde reaktörde bulunurken, liyofilize ürün eklendikten sonra 10^5 seviyelerine kadar sayısı artmıştır.

40 mg/L TA ve p-tol, 30 mg/L 4-cba kimyasal eklendiğinde organizma sayıları düşmüştür. En çok azalan *C.testosteroni* olmuştur. Total bakteri sayısında birçok bakterinin azalmasıyla birlikte bu aşamada düşmüştür. Kimyasala ve ortama adapte olan bakteriler parçalama sürecinin ortasında (HPLC ile eş zamanlı takip sonucu karar verilir) özellikle *C.testosteroni* sayısı artmıştır. Kimyasal tükendiğinde ise bakteri sayılarında çok az bir azalma görülmüştür. 3 kimyasaldan da 100 mg/L eklenip kimyasal tükendiği andaki örneklerdeki sayılar azalmıştır. Her

3 kimyasaldan 400 mg/L reaktöre eklenen denemede ise eklendiği anda bakterilerin sayısında kayıp olmuş fakat kimyasal tükendiği anda *P. putida* ve *C. testosteroni* sayılarında 2 log'luk artış olmuştur. Total bakteri sayısı aynı oranda artmamıştır. Bunun sebebi diğer bakterilerin kimyasala karşı adaptasyon sağlayamayıp ölmesinden kaynaklanmıştır.

Her iki liyofilize ürün denemesinde de *Acinetobacter* sp. sadece B noktasında saptanmıştır. Reaktörde olmayıp liyofilize ürünle birlikte reaktörde gözlenmiş fakat varlığını sürdürememiştir. Ayrıca *P. fluorescens* sayıca az olarak her 2 ürün denemesinde gözlenmiştir.

Liyofilizasyon sonrası liyofilize ürünün reaktör çalışmasında mikroorganizma içermeyen kontrol erleni kullanılmıştır. Reaktörden alınan örneklerle ait DNA sayıları şekil 4.81'de gösterilmiştir.

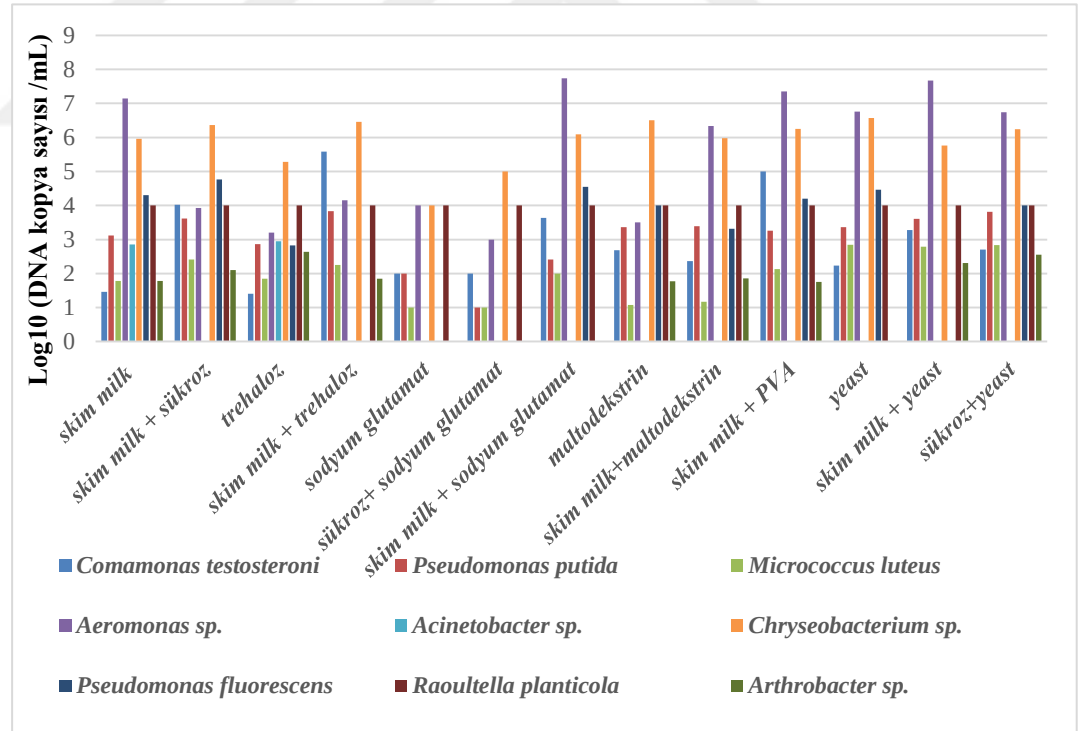


Şekil 4.81 Kör reaktörüne ait sonuçlar (x: reaktöre kimyasal eklenmeden önce, y: reaktöre kimyasal eklendikten sonra (TA ve p-tol, 40 mg/L, 4-cba 30 mg/L), z: reaktöre kimyasal eklendikten 24 saat sonra)

Reaktördeki kontrol denemesinde *Chryseobacterium* sp. ve *Acinetobacter* sp. organizmalarına rastlanmamıştır. Diğer organizmalarda en fazla 10^4 - 10^5 arasında

C. testosteroni, *Aeromonas* sp. ve *R.planticola* olmuştur. 24 saat içerisinde 4-cba dışında diğer kimyasallarda bir parçalama meydana gelmemiştir. Bu nedenle bakterilerin az olması, ilgili 16 organizmanın sayıca az olmasıyla ilişkilendirilebilmektedir.

Reaktör dışında 24 ay raf ömrüne sahip viallerdende Real-time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Fakat bu analizde liyofilize vial içerikleri PBS ile canlandırıldıktan sonra nutrient broth ortamına aktarılmış ve üreme gerçekleşen erlenlerden örnek alınmıştır. Bu bağlamda kantitatif sonuçlar sadece başlangıç miktarını az çok tahmin etmemizi sağlamaktadır. Kalitatif olarak sonuçları değerlendirmek daha doğru olacaktır. 24. ay liyofilizasyon viallerine ait sonuçlar çizelge 4.8’de gösterilmiştir. 24 ay sonunda canlılık göstermeyen; nutrient broth, su, trehaloz+sükroz, sükroz+maltodekstrin, PVA, PVA+sükroz içerikleridir. Şekil 4.82’de nutrient ortamında büyütülmüş vial içeriklerine ait Real-time PCR sonuçları gösterilmiştir.



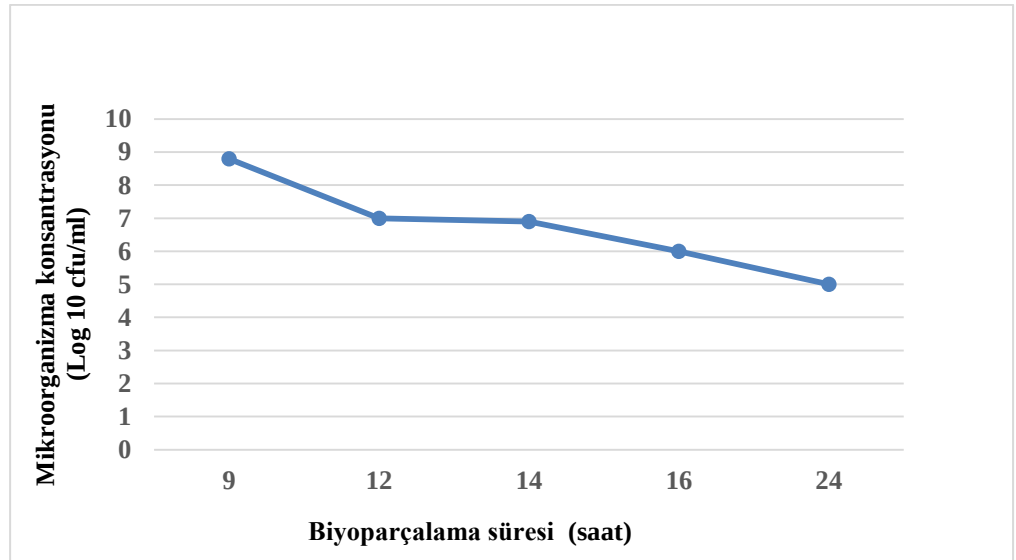
Şekil 4.82 24.ay vial içeriklerinin nutrient ortamında üremesinin ardından yapılan Real-time PCR sonuçları

Real-time analiz sonuçlarında *Acinetobacter* sp. sadece skim milk, skim milk + sodyum glutamat içeren koruyucu grubunda görülmüştür. *P.fluorescens* trehaloz+ skim milk ve skim milk + yeast içeriğinde rastlanmamıştır.

Nutrient ortamında üreyen organizmalar arasında yüzdesel dağılıma bakıldığında *Aeromonas* sp. ve *Chryseobacterium* sp.'nin baskın olduğu görülmüştür. Skim milk içeren ürün grubunda *Aeromonas* sp. görülürken trehaloz gruplarında *Chryseobacterium* sp. daha yüksek oranda görülmüştür. Skim milk + sodyum glutamat içeriğinde ise *Aeromonas* sp. sayıca diğer bakterilere oranla baskın görülmektedir.

Arthrobacter sp. organizması ise sodyum glutamat, skim milk sodyum glutamat, sükroz +sodyum glutamat ve yeast içeren viallerde saptanmamıştır. Sayıca en az görülen bakteri sayısı *M. luteus*. ve *Arthrobacter* sp. olmuştur. *M. luteus* şekil 4.76'da görülen başlangıç sayılarının az olmasından ötürü az sayıda olmasını açıklamaktadır. *Arthrobacter* sp.'nin ise liyofilizasyon sürecinden zarar gördüğü düşünülmektedir.

Aynı zamanda tez çalışmasında raf ömrü denemeleri sonucunda, canlılık sayımı azaldıkça biyoparçalama süreside uzamıştır (Şekil 4.83).



Şekil 4.83 Biyoparçalama süresi ile canlılık sayımı ilişkisi

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Artan sanayileşme, petrokimya endüstrisi atıkları, petrol kazaları gibi çevre kirliliğine sebep olan etmenler, yaşam kalitemizi etkilemektedir. İnsan sağlığını koruma amacı başta olmak üzere, atık sulara karışan kimyasalların başarılı bir şekilde arıtımı gerekmektedir. Kimyasalların daha pratik, ekonomik ve sorunsuz bir şekilde bakteriler aracılığıyla gerçekleştirdiği biyolojik arıtım, günümüzde oldukça popülerdir.

Ülkemizde kimyasalların bakterilerle arıtılması amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Fakat birçok şirket, bakterilerle arıtımın sağlanması için yurt dışından liyofilize bakteriler satın almakta ve belirli kullanımdan sonra bakteriler, öldürücü genler içermesinden dolayı sistemde bir süre sonra bulunmamaktadır. Bu durumda sürekli dışarıdan liyofilize bakteriler satın alınmaktadır. Fakat ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalarla bakterileri liyofilize halde üretebilir, atık su sistemlerinde kullanılmasını sağlayabiliriz. Bu amaçla, tez çalışmasında petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan TA, 4-cba ve p-tol kimyasallarını parçalama yeteneği daha önce yapılan çalışmalar sonucu bilinen izolatlardan oluşan aşısı kültürü, liyofilize edilerek, belirli raf ömrü sonunda canlılığını koruması ve biyoparçalama etkinliğine devam etmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması sonucunda liyofilize bakteriler, uygun koruyucular ile birlikte 24 ay boyunca saklanabilmekte ve biyoparçalama etkinliğine devam etmektedir. Aynı zamanda 12 ay sonunda, canlılık ve biyoparçalama aktivitesi bakımından en iyi ürünler arasından “skim milk” ve “skim milk+sodyum glutamat”ın koruyucu olarak kullanıldığı liyofilize ürün, SKTR’de biyoparçalama etkinliğine bakılmış ve artan konsantrasyonlarda dahi 24 saat içerisinde kimyasal giderimi gerçekleşmiştir.

Karışık kültür kullanılarak yapılan biyoparçalama çalışmaları saf kültür çalışmalarından çok daha fazla verimli sonuç elde edilmiştir (Ghazali at el., 2004; Oteyza at el., 2005). Rambeloarisoa ve ark. (1984) ham petrolü parçalayabilen altı farklı cinse ait toplam sekiz türden oluşan karışık kültür tanımlamışlardır. Bu karışık bakteri kültürü, ancak bütün türler var olduğu zaman parçalama etkinliği göstermiştir. Kültürden üç tür çıkarıldığı zaman parçalama etkinliğinde önemsenecek derecede düşme gözlemlenmiştir. Buna benzer çalışmalar

doğrultusunda tez çalışmasında, petrokimya endüstrisi atık sularından elde edilen bakterilerin birlikte bir konsorsiyum oluşturarak karışım halde liyofilize ürün elde edilmesi amaçlanmıştır.

Mikroorganizmaları saklamak için klasik yöntemlerde spesifik ortamlarda bakteri gelişmekte ve belirli aralıklarda taze besiyerine aktarımı yapılması gerekmektedir. Bu yöntemin dezavantajı, kontaminasyon riskinin olması ve çok kısa sürelerde pasajlamanın yapılması gerekliliğidir. -196°C sıvı nitrojen ile saklama, bakterileri saklamada en uygun yöntemlerden biridir fakat maliyetin oldukça yüksek olması farklı yöntemlere yöneltmiştir (Badea and Sandulescu, 2001).

Bakterilerin uzun süre saklanması en sık kullanılan yöntem; paketleme imkanı, taşıma kolaylığı, ve ekonomik olması gibi birçok faktör açısından avantaja sahip olan liyofilizasyon tekniğidir. Bu yöntem, aynı zamanda stok kültürlerin saklanması ve korunması için dünya genelinde kullanılmaktadır.

Liyofilizasyon, dondurulmuş hücresel materyalin, süblimasyon döngüsüyle ortamdaki suyun uzaklaştırılıp kurutulması esasına dayanmaktadır. Fakat bu teknikte, liyofilizasyon sonrası bakterilerin canlılığını sürdürebilmesi için dikkat edilmesi gereken birçok parametre mevcuttur. Bunlar arasında bakteri türü, liyofilizasyon tekniği, koruyucu seçimi, liyofilizasyon koşulları, liyofilizasyon sonrası saklama koşulları, rehidrasyon sıvısı gibi karar verilmesi gereken birçok faktör vardır.

Bakterilerle yapılan liyofilizasyon çalışmalarında, liyofilize edilecek bakteriyi içeren vialler, -40°C 'deki liyofilizatöre yerleştirmeden önce; **freeze-drying** yönteminde -80°C yaklaşık 1 gün bekletilmekte, **liquid-drying** tekniğinde ise ön dondurma aşaması olmaksızın cihaza yerleştirilmektedir. Her iki teknikte de bakteriler soğuk şokuna ve liyofilizatör cihazında vakuma maruz kalmaktadırlar. Soğuk ve vakum ile hücrelerde membran ve ozmotik değişiklikler olmaktadır. Bu değişiklikler hücrelerin yaşamını ve fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle liyofilize edilecek bakterilerle birlikte kullanılacak olan

koruyucuların ve rehidrasyon sıvılarının seçimleri bu olumsuz etkileri azaltmakta, sağ kalımı arttırmaktadır.

Tez çalışmasında ön bir deneme gerçekleştirilerek, çalışılacak tüm koruyucuları içeren vialler ile freeze-drying ve liquid-drying teknikleri karşılaştırılmıştır. İki teknik ve farklı koruyucular kullanılarak 16 mikroorganizmayı içeren aşı kültürünün liyofilizasyon sonrası 1 aylık raf ömrü sonunda canlılığındaki değişim karşılaştırılmış ve freeze-drying yönteminin daha başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu sonucun ardından 24 ay'a kadar raf ömrü çalışılacak bakterilerin freeze-drying yöntemi ile liyofilizasyonu gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Liyofilizasyonda diğer karar verilmesi gereken durumda liyofilize ürünlerin saklama sıcaklığıdır. Bununla ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur. Tez çalışmasında da sadece koruyucu olarak skim milk içeren vial +4°C ve +27°C'de saklanmıştır. Liyofilize ürünlerin +4°C'de saklanması yaklaşık 1 log'luk daha yüksek canlılık göstermiş ve bu sonucun ardından 24 ay'a kadar raf ömrü çalışılacak bakterilerin +4°C saklanması tercih edilmiştir.

Ön denemede son olarak rehidrasyon sıvısı çalışılmıştır. Koruyucu olarak skim milk içeren liyofilize ürün su, PBS, skim milk ve sükröz rehidrasyon sıvıları olarak kullanıldığında en iyi sonucu PBS vermiştir. Bu sonucun ardından 24 ay'a kadar raf ömrü çalışılacak liyofilize bakterilerin rehidrasyon sıvısı olarak PBS ile canlandırılmasına karar verilmiştir.

Liyofilizasyondaki başarıya etki edecek diğer faktörde her bir bakteriye göre farklılık gösteren uygun büyüme evreleridir. Liyofilize edilecek bakteri için optimum büyüme evresi, birçok çalışmada farklı bakteriler üzerine çalışılmış ve farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. Stasyonier fazda liyofilize edilen *Lactobacillus rhamnosus* ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında %31-50 arasında canlılık gözlemlenirken, erken log fazında canlılığın %14'e düştüğü görülmüştür. Başlangıç olarak lag fazı seçildiğinde ise sadece %2 si canlı kalmıştır. (Corcoran et al., 2004). *Sinorhizobium* ve *Bradyrhizobium* organizması ile yapılan liyofilizasyon

çalışmasında lag fazında çalışılmış ve daha iyi sonuç elde edilmiştir. (Boumahdi et al., 1999). Tez çalışmasında log fazı sonu seçilmiştir.

Liyofilizasyon metodunda, ön dondurma, birincil ve ikincil kurutma olmak üzere 3 aşama mevcuttur. Ön dondurma aşamasında dondurulmuş ve katılaşmış materyalle başlanmaktadır. Primer kurutma aşamasında, ortamdaki buz sublimasyonla uzaklaştırılır. Sekonder kurutmada geri kalan su tamamen uzaklaştırılır (Enache and Dumitru, 2007). Primer kurutma, dondurulmuş örneklerden suyun süblimasyonla uzaklaştırılmasını içermektedir. Sekonder kurutma aşamasında ise örnek tamamen kurumakta ve kalan nem yaklaşık % 2-3 aralığında olup iyi bir kurutma olduğuna emin olunmaktadır (Naddafi, 2004; Coman and Radvan, 2009). Tez çalışmasında, liyofilizasyon aşaması birincil ve ikincil kurutma olacak şekilde optimize edilmiş yaklaşık 48 saatlik bir döngüsel çevrimle liyofilizasyon aşaması tamamlanmıştır.

Freeze-drying tekniğinde, liyofilizasyon öncesi vialler, içeriklerinin eklenmesinin ardından -80°C 'de 24 saat bekletilerek tüm içeriğin donması sağlanmıştır. Tüm içeriğin dondurulmasının, hücrelerde soğuk şokundan dolayı canlılık kaybına neden olmasının yanında sublimasyonu kolaylaştırması sebebiyle vakum kaynaklı canlılık kaybını azaltarak daha başarılı bir canlılık sayım sonucu elde edilmiştir. Primer kurutma 2 aşamada, toplamda 41 saat 20 dakika sonunda tamamlanmıştır. -40°C 'de 33 saat boyunca liyofilizasyonun primer kurutma 1. aşaması tamamlanmıştır. İlk aşamada sıcaklığı mümkün olan en düşük seviyede tutarak 0,1 mBar vakum altında 33 saat süresince maksimum süblimasyon sağlanmıştır. 2. aşamada ise sıcaklık dakikada 1°C artırılarak 20 dakika sonunda -40°C 'den -20°C 'ye çıkartılmış vakum değeri sabit tutularak, sekonder kurutma aşaması öncesi kalan donmuş materyalin süblimasyonu sağlanmıştır. Sekonder kurutma aşamasında ise 0,1 mBar vakum altında sıcaklık -20°C değerinden dakikada $0,1^{\circ}\text{C}$ artırılarak 20°C 'ye çıkarılmıştır. Sıcaklık yükselme değerinin dakika $0,1^{\circ}\text{C}$ olması mikroorganizmaların ani sıcaklık değişiminden olumsuz etkilenmesini engellemiş ayrıca süblimasyonu gerçekleşmeyen donmuş materyaller yavaş bir şekilde eritilerek 0,1 mBar vakum altında en kısa sürede uzaklaşmasını sağlamıştır. Organizmanın liyofilizasyon sonrası maruz kalacağı oda sıcaklığı nedeniyle şoka girmesini engellemek amacıyla, kurutma işlemine sıcaklık değeri

20°C'ye ulaşıktan sonra, 1 saat boyunca yine 0,1 mBar vakum altında devam edilmiştir. Liyofilizasyon aşamalarının tamamlanmasının ardından vial septumları 0,1 mBar vakum altında otomatik şekilde kapatılmıştır. Liyofilizasyon işleminin kapalı bir sistem olan liyofilizatörde yapılması, hata ihtimalini azaltmış ve kontaminasyon riskini azaltmıştır. Ayrıca son aşama olan septumların kapatılma işleminin de liyofilizatör cihazı içinde vakum altında yapılması, basınç değişiklikleri kaynaklı organizmanın zarar görmesini engellemiş, vial içinde havasız bir ortam yaratılması uzun süreçte sağ kalımı artırmıştır.

Liyofilizasyonun başarısı için diğer kritik nokta ise başlangıç hücre konsantrasyonudur. Liyofilizasyon sonrası canlılığın artması başlangıç miktarının artmasıyla orantılı çalışmalar mevcuttur (Bozoğlu et al., 1987; Costa et al., 2000; Speakmen et al., 1974). Minimum başlangıç konsantrasyonu ise 10^7 olarak belirlenmiştir (Simione and Brown, 1991). Yapılan literatür çalışmaları sonucunda tez çalışmasında 16 izolata ait bakteri karışımının başlangıç konsantrasyonu $6,2 \cdot 10^8$ kob/mL olarak dökme plaka yöntemi ile belirlenmiştir.

Liyofilizasyonun başarısını etkileyen önemli parametrelerden biri de koruyucu konsantrasyonudur. *Pantoea agglomerans* CPA-2 ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında trehaloz, sükroz, skim milk, laktoz, glukoz gibi farklı koruyucular kullanılmıştır. Çalışmada son konsantrasyonları, trehaloz %5, skim milk %10 ve sükroz %10 olacak şekilde kullanılmıştır. *P.agglomerans* organizmasıyla yapılan çalışmada; disakkaritler monosakkaritlere oranla %30 daha fazla canlılık sağlamışlardır. Disakkaritlerden trehaloz (%80) ve sükroz (%75) çalışmada canlılığı en iyi koruyan koruyucu olup liyofilize ürünleri canlandırmada rehidrasyon sıvısı olarak PBS kullanılmıştır. (Costa et al; 2000). Koruyucu olarak şeker kullanılan çoğu liyofilizasyon çalışmasında, şeker konsantrasyonunun %5-%10 arasında olmasının ve koruyucuya ilave olarak protein bileşenlerinin ilavesinin, stabiliteyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Ferry, 1995). Tez çalışmasında kullanılan koruyucu oranları literatürler ışığında seçilmiştir. Son konsantrasyonları; skim milk ve sükroz için %10, trehaloz, maltodekstrin, yeast, PVA için %5, sodyum glutamat için %2,5 olacak şekilde kullanılmıştır.

Lactococcus lactis mikroorganizmasının saklanması ile ilgili freeze-drying ve freeze-thawing (dondurup çözme) metotları farklı koruyucular kullanılarak karşılaştırılmıştır. Koruyucu olarak fruktoz, glukoz, sükroz, sorbitol, laktoz, maltoz, maltodekstrin, mannitol, MRS broth, skim milk ve bu koruyucuların çeşitli kombinasyonları kullanılmıştır. Tüm koruyucularda ve kombinasyonlarında freeze-thawing metodu freeze-drying'e göre mikroorganizma sağ kalımında başarılı olmuştur. Liyofilizasyon da en iyi sonucu koruyucu olarak %10 skim milk ve %10 sükroz karışımı (%62) vermiştir. (Berner and Viernstein, 2006). Tez çalışmamızda liyofilizasyon sonrası ürünlerin net ağırlıklarında yaklaşık %88'lik bir azalma görülmüştür. Freeze-thawing metodunun uygulandığı ürünlerin çözülmemesi için soğuk olarak taşınmasındaki fazla maliyeti göz önünde bulundurulduğunda, liyofilize ürünlerin taşınma kolaylığı ve ucuzluğu tez çalışmasında liyofilizasyonun bir diğer tercih sebebi olmuştur.

Biyolojik örneklerin kurutulmasında trehaloz ve sakkaroz gibi disakkaritler “membran koruyucu” olarak hücrelerin liyofilizasyondan etkilenmesini önlemektedir. Bu disakkarit koruyucular; membranları oluşturan makromoleküllere polar zincirlerle bağlı olan suyun yerini almaktadırlar. Su molekülü ile yer değiştirip makromoleküllere bağlanmakta ve liyofilizasyonda suyun uzaklaştırılması esnasında proteinlerin tersiyer yapısının korunmasında hidrojen bağları oluşturarak protein denatürasyonunu önlemektedirler (Rudolph and Crowe, 1985; Leslie et al., 1995).

Koruyucu olarak kullanılan şekerler arasındaki farklılıklar, suda bağlanma kapasitesi, hücre içi ve hücre dışında kristalize olmasının önlenmesiyle ilişkilidir. Trehalozun kristalize olmaya eğilimi sükroz ve laktoza göre daha azdır, fakat trehalozun maliyeti endüstriyel kullanıma uygun değildir. Bu sebeple sükroz ekonomik açıdan daha ucuz bir şekerdir ve koruyucu olarak kullanılması tercih edilmektedir. (Baumann and Reinbold 1964; Burke 1986; Aguilera and Karel 1997).

En sık tercih edilen koruyuculardan skim milk; gözenekli bir yapı oluşturduğu için kolay rehidre olmaktadır. Ayrıca skim milk içerisinde yer alan proteinlerin

hücrelerin etrafını sararak mikroorganizmaları dış etkenlerden gelecek zarara karşı koruduğu düşünülmektedir (Abadias, 2001).

Çalışmada, bakterilerle birlikte saklanacak en iyi koruyucuyu seçmek için her raf ömrü denemesi için 20 farklı içerik çalışılmıştır. Nutrient broth ortamı, skim milk, sükroz, skim milk + sükroz, trehaloz, skim milk + trehaloz, sükroz+ trehaloz, sodyum glutamat, skim milk, sodyum glutamat, sükroz+ sodyum glutamat, maltodekstrin, skim milk + maltodekstrin, sükroz + maltodekstrin, PVA +skim milk + PVA+sükroz, PVA, yeast ortamı, skim milk + yeast ortamı, sükroz + yeast ortamı ve deneme olarak su kullanılmıştır.

Her koruyucu için aynı bakteri karışımı bulunmasına rağmen liyofilize ürünler; farklı canlılık sayımı, farklı biyoparçalama etkinliği göstermişlerdir. Bu çalışmalar doğrultusunda en iyi canlılık ve biyoparçalama etkinliğine sahip koruyucu seçilecektir. Liyofilize ürünlerin belirli raf ömründen sonra canlılık kayıplarına bakıldığında; su, nutrient broth, PVA, maltodekstrinin koruyucu olarak kullanıldığı liyofilize ürünler hem canlılık açısından hem de biyoparçalama aktivitesi açısından başarılı olmamıştır. PVA koruyucu olarak kullanıldığında ise 1.ay'dan itibaren yüksek oranda canlılık azalmış ve 6. ay raf ömrüne sahip viallerdeki bakteriler canlılığını yitirmişlerdir. PVA içeriği özellikle sükroz ile birleştğinde liyofilizasyon sonrasında taşıma gözlenmiş ve fiziksel durum açısından da uygun koruyucu olmadığına karar verilmiştir. Su ve nutrient broth içeriği ise 1. ay sonunda dahi canlılık göstermemiştir. Bu durumda bakterilerin liyofilizasyon sonrası canlılığını koruması için uygun koruyucu seçiminin önemli olduğu görülmüştür. Koruyucular tek başına eklenmesinden ziyade skim milk ile birlikte kullanıldığında daha yüksek canlılık elde edilmiştir. Canlılık ve biyoparçalama aktivitesi bakımından en iyi ürünler arasında skim milk, sodyum glutamat+ skim milk, trehaloz ve trehaloz+ skim milk içerikleri olmuştur. Skim milk içeriği 24 ay sonunda yaklaşık 2 log, skim milk + sodyum glutamat içeriği ise yaklaşık 1 logluk canlılık kaybı ile liyofilizasyon sonrası en iyi ürünler arasında yer almıştır. Biyoparçalama sonuçlarına bakıldığında da yine en kısa sürede kimyasalları parçalayan skim milk, skim milk + sodyum glutamat olmuştur.

Tez çalışması sonuçlarına bakıldığında, daha önce yapılan çalışmalarla desteklendiği görülmektedir. *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 ve *Pantoea agglomerans* türleri ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında koruyucu olarak, sükroz (%5), trehaloz (%4), selülobioz (%5), glikoz (%5), fruktoz (%5), D-galaktoz (%5), skim milk (%5), pepton (%2), çözünür nişasta (%1), karmeloz sodyum sorbitol (%2), gliserin, L-glutamik asit, su kullanılmıştır. *Bacillus cereus* AR156 için en iyi koruyucu %5 sükroz, *Burkholderia vietnamiensis* B418 için %5 sellobioz ve *Pantoea agglomerans* 2RE40 için %5 D-galaktoz en iyi sonucu vermiştir (Zhan et al., 2011). *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecalis* ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında sorbitol, sodyum glutamat, skim milk ve kombinasyonları kullanılmıştır. Liyofilizasyon sonrası yapılan canlılık sayım sonuçlarına göre tek başına skim milk, skim milk + sorbitol ve skim mik + sodyum glutamat koruyucularına oranla daha fazla canlılıkta azalma görülmüştür. Bakterilerin bazılarında skim milk + sodyum glutamat daha iyi sonuç verirken bazılarında skim mik + sorbitol iyi sonuç vermiştir. Fakat her iki koruyucu arasında önemli farklılık görülmemiştir. (Carvalho et al., 2003). Sodyum glutamat'ın amino gruplarıyla mikroorganizma proteinlerinin karboksil grupları arasındaki reaksiyonlar ile protein yapıları stabilizasyonu sağlanmaktadır. Sodyum glutamatın nem tutma yeteneği ile ayrıca liyofilizasyonda korumayı sağlamaktadır (Font de Valdez et al., 1985).

Tez çalışmasının sonucunda biyoparçalama aktivitesinde uygun koruyucu seçildiğinde uzun raf ömrüne sahip liyofilize ürün başarı ile elde edilmiştir. Atık suların temizlenmesinde ticari ürün olarak kullanılabilmesi bakımından önemli sonuçlar elde etmemizi sağlamıştır.

Tez çalışmasında başarılı ürünler arasından skim milk ve skim milk + sodyum glutamat SKTR kullanılarak kimyasalların giderimleri çalışılmıştır. SKTR ile yapılan çalışma sonuçlarına bakılacak olursa, bu tez çalışmasında da kullanılan aynı SKTR ile yaptıkları çalışmada, sürfaktanın PAH kimyasallarını parçalama etkisi çalışılmıştır. SKTR içerisinde başlangıç PAH konsantrasyonu 65,36 ng/mL (0,06536 mg/L)'dir. 25 gün içinde çıkış suyu verilerine göre asenaften, fluoren,

antrasen, fluoranten ve piren için giderim yüzdeleri sırası ile %80, %59, %78, %69, ve %60 olarak verilmiştir (Sponza ve Gök, 2012).

SKTR ile yapılan bir diğer çalışmada ise *Aeromonas punctata*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus* sp. ve *Achromobacter* sp. gibi farklı mikroorganizmalar kullanılmıştır. Yaklaşık 8 ay içerisinde toplam petrol hidrokarbon konsantrasyonunun 320 mg/L'den 8 mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir (Gargouri et al., 2011).

Yerli mikrobiyotaya ilave olarak bakteri ilave edilerek yapılan çalışmalara bakıldığında bir çalışmada; *Agrobacterium* sp, *Bacillus* sp, *Enterobacter cloacae*, *Gordonia*, *P. stutzeri*, *P. putida* sentetik ve kentsel atık suların degradasyonunda kullanılmıştır. Organik maddeyi önemli ölçüde degrades etmiştir. Biyoaugmentasyonla toplam organik karbonun parçalanmasında %10-15 artış göstermiştir (Chen et al., 2009).

Tez çalışmasında da petrokimya endüstrisi atık sularındaki yerli mikrobiyotaya ilave olarak, *Pseudomonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *A.nicotinae*, *P.alkylphenolia*, *P.putida*, *C.testosteroni*, *C.indolegenes*, *P.fluorescens*, *A.protophormiae*, *Acinetobacter* sp., *M. luteus*, *A. hydrophila*, *R.planticola*'dan oluşan izolatlar SKTR reaktörde kullanılmıştır. Başlangıçta 40 mg/L TA ve p-tol, 30 mg/L 4-cba içeren reaktörde kimyasal giderimi skim milk içeren liyofilize üründe 12 saatte, skim milk+sodyum glutamat içeren üründe ise 10 saatte gerçekleşmiştir. SKTR reaktörde kimyasal tükenmesinin ardından sırayla 100 mg/L ve 400 mg/L kimyasal eklenmiştir. 100 mg/L'ye yükseltile kimyasal denemesinde skim milk içeren liyofilize üründe 20 saatte hemen hemen 3 kimyasalda tükenmiştir. Skim milk + sodyum glutamat içeren üründe ise 10 saat gibi kısa sürede kimyasal yükseltilmesine rağmen daha başarılı parçalama gerçekleşmiştir. 400 mg/L kimyasal denemesinde ise skim milk içeren liyofilize ürün 24 saatte tükenmiştir, skim milk +sodyum glutamat içeren ürün ise 16 saatte kimyasal tüketimini gerçekleştirmiştir. Koruyucu olarak skim milk + sodyum glutamatın kullanılması hem canlılık sayımında daha yüksek canlılık sağlamış hem de reaktörde biyoparçalama çalışmalarında başarılı olduğunu göstermiştir. Kimyasal konsantrasyonu artması ise skim milk içeren üründe sürenin uzamasına sebep olsa

da skim milk+sodyum glutamat içeren liyofilize ürün de parçalama süresine neredeyse hiç etki etmemiştir. Biyoparçalama etkinliğindeki bu başarılı sonucu Real-time PCR sonuçları ve DGGE sonuçlarında desteklediğini görüyoruz. Reaktör örneklerinden yapılan DGGE görüntüsünde skim milk +sodyum glutamat içeren koruyucu skim milk içeriği ile kıyaslandığında *C. testosteroni*, *P. alkylphenolica*, *P.putida* organizmalarına sırasıyla %99, %99 ve % 91 benzerlik gösteren izolatlar daha yoğun bant şeklinde görülmüştür. Ayrıca yapılan Real-time PCR analizinde skim milk+sodyum glutamat lyofilize ürünün denendiği reaktörde total bakteri sayısı daha fazladır. Her iki liyofilize ürün için artan konsantrasyonla birlikte bakteri sayıları da başlangıçta kimyasaldan zarar görsede bir süre sonra daha yüksek sayılara ulaşmıştır. Bu durum yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında biyoparçalamanın hızlı gerçekleşmesini açıklamaktadır.

Atık suların arıtılması kadar, arıtım sonucu oluşan ürünün toksik olup olmadığının da belirlenmesi gerekmektedir. Microtox M500 cihazı ile toksisite analizleri gerçekleştirilmiştir. Reaktörde arıtım gerçekleştikten sonra çıkış suyu örneğinden alınan örneklerle toksisite kontrolü yapılmıştır. Çıkış suyu örneklerinde toksisiteye rastlanmamıştır. Tüm sonuçlar EC50 değerinin altında, toksik seviyede değildir.

Microtox analizi toksisite belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem olmasına rağmen; testte kullanılan *A. fischeri* atık suda bulunan diğer toksik kimyasallara karşı duyarlı olabilmekte ve yanlış sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle bazı çalışmalarda biyoluminesans özelliği bulunan yerli bakterilerin kullanılması toksisite belirlenmesinde tercih edilmiştir. Aktif çamurdan izole edilen organizmalar, atık sudaki zehirli toksik kimyasallara karşı daha dirençli ve toksik madde varlığında daha doğru cevap verebilmektedir. Bu nedenle yapılan bir çalışmada *A.fischeri*'nin luxCDABE operonunu taşıyan genetiği değiştirilmiş *Pseudomonas* türü (Shk1) lüminesans bakteriyi kullanarak ağır metal toksisitesi çalışılmıştır (Ren and Frymier, 2003). Fakat tez çalışmasında biyoparçalama esnasında ilgili kimyasallar tükenirken ortaya çıkan herhangi bir farklı kimyasal piki gözlenmemiştir.

Tez çalışmasında da reaktör ve vial içeriğindeki mikrobiyal yapının belirlenmesinde DGGE yöntemi kullanılmıştır. DGGE yöntemini çevresel örnekler üzerinde ilk kez kullanan ve DGGE çalışmalarına ışık tutan kişi Gerard Muyzer'dir (Muyzer and Smalla, 1998). Çevresel örneklerde yapılan DGGE analizinde çok sayıda örneğin tek jel üzerinde çalışılarak mikrobiyal çeşitlilik analizinin yapılması ve baskın türlerin belirlenmesi gerçekleştirilmektedir. DGGE analizinde farklı koşul veya çevrelerdeki mikrobiyal çeşitliliğin karşılaştırılması hızlı bir şekilde sağlanmaktadır. Jel üzerinde gözlemlenen bantların kalınlıkları DNA miktarı hakkında bilgi vermektedir. Bu yöntemin tek baz değişimlerine bile hassas olması mikrobiyal çeşitliliğin net bir şekilde ortaya konmasına neden olmaktadır. Ayrıca jeldeki bantların kesilerek dizi analizinin yapılmasına imkan vermesi DGGE yönteminin önemli avantajlarından biridir. Fakat, DGGE yönteminde jel üzerinde görünen bir bant her zaman bir DNA dizisini vermemektedir. Jel görüntülenirken kullanılan UV ışığının etkisi veya bistüri ile bant kesimi esnasında zarar gören DNA'nın dizilenmesinde doğru sonuca ulaşamayabilmektedir. Jeldeki bantların ışıması kısa sürede kaybolduğundan baskın olmayan türlerin kaybıda maalesef mümkün olmamaktadır.

Atık sularda yapılan biyoparçalama çalışmalarında mikrobiyal yapı belirlenmesi veya takibi için DGGE kullanılmaktadır. Gargouri ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada hidrokarbon giderimi yerli mikrobiyotaya ve yerli mikrobiyotaya ilaveten eklenen mikrobiyal konsorsiyum ile başarılı şekilde giderim sağlanmıştır. DGGE ile mikrobiyal yapı belirlendiğinde ise *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* gruplarına ait bakterilerin dominant olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada görülen DGGE bant profili sonuçlarına bakıldığında jel üzerinde farklı konumlanmış olmalarına rağmen, sekans sonuçlarında aynı organizmaya yüksek benzerlik gösteren bantlar olduğu görülmüştür. Yapılan literatür çalışmaları ışığında birçok DGGE çalışmasında bu durumun olduğu görülmüştür. Farklı yerlerde konumlanmasına rağmen aynı sekans sonucunu veren bantların sebebinin 3 durumdan kaynaklanabileceği açıklanmıştır. Bunlardan birincisi, primer seçimi ve bağlandığı bölgeden kaynaklanan durumlarda görülmektedir. Tez çalışmasında kullanılan 338F-805R genel bakteri primerleri blast analizinde, birçok bakteriye farklı bağlanmalar yapıldığı görülmüştür. İkinci durum ise heterodupleks DNA'dan

kaynaklanabilmektedir. Üçüncüsü ise; PCR koşulları, verimi olduğu belirlenmiştir. PCR’da kullanılan enzim, annealing sıcaklığı gibi birçok faktörde PCR ürünün tek bant olarak gözükmemesine neden olabilmektedir (Neilson et al., 2004; Hansen et al., 1998; Lueders and Friedrich, 2003; Salles et al., 2002).

Daha önce yapılan bir çalışmada çevresel örneklerden elde edilen naftalen parçalayan mikroorganizmalar Real-time PCR analizi gerçekleştirilmiş ve filogenetik ilişkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak γ ve β - Proteobacteria’ ya ait 3 grup altında ayrılmışlardır (Nyyssönen et al., 2006)

Tez çalışmasında Real-time PCR ile *P. putida*, *Chryseobacterium* sp., *M.luteus*, *C. testosteroni*, *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *R. planticola*, *P.fluorescens* ve total bakteri primerleriyle çalışılmıştır. *P. fluorescens* için TaqMan probu ile hidroliz yöntemi ile çalışılmış diğerleri için ise SYBR Green yöntemi kullanılmıştır. 16 izolat içerisinde yer alan *Pseudomonas alkylphenolica* ve *Pseudomonas* sp.’ye ait primerler spesifiklik sağlamadığı için kullanılmamıştır

Tez çalışmasında yapılan reaktörden alınan örneklerin DGGE ile yürütülmesinin ardından kesilen bant örneklerine ait sekans sonuçlarında *Bacillus* sp., Uncultured *Bacillus*, *C.testosteroni*, *P. alkylphenolica*, Uncultured *Bacterium*, *Acidovorax* sp., *P.putida* ve *Acinetobacter tandoni* türlerine benzerliği görülmüştür. *Acinetobacter tandoni* sadece bir örnekte rastlanmıştır. Liyofilize ürünler arasından skim milk + sodyum glutamat içeriğinde ise *C. testosteroni* daha yoğun bir bant olarak tüm örneklerde görülmüştür. Ayrıca reaktör örneklerinde bizim bakterilerimiz dışında *Bacillus* sp. ve *Acidovorax* sp. çok yoğun bant şeklinde görülmüştür. Bu durum daha ileriki çalışmalarda bu bakterileride konsorsiyuma ilave edebilecek olmamız konusunda bize ön bilgi vermektedir. Bu bakterilerin de PTA kimyasallarını biyoparçalama aktivitesine sahip olmaları yüksek ihtimalde olduğu düşünülmektedir.

Reaktörden alınan örneklerle ilave olarak; liyofilize ürünün 1 yıl sonundaki canlandırmadan sonra alınan DNA örneklerinden yapılan DGGE analizinde; özellikle *P. alkylphenolica*, *R. planticola* baskın olarak görülmüştür. Ürünler arasında çok büyük bir farklılığa rastlanmamıştır. 6.ay raf ömrü sonunda TA ve p-

tol kimyasallarını 24 saat içerisinde parçalayamayan maltodekstrin içeriği DGGE analizinde de çok silik ve az sayıda bantlarla bu durumu açıklamıştır. Maltoekstrin içeriğine ait yapılan 24. ay liyofilize ürünlerinin Real-time sonuçlarına bakıldığında bakteri sayılarının diğer koruyuculara göre daha az olduğu, diğerlerine göre daha baskın olan bakterinin *Chryseobacterium* sp. olduğu belirlenmiştir. Biyoparçalama etkinliğine bakıldığında maltodekstrin olarak kullanılan koruyucunun liyofilizasyonda bakterilerin korunmasında uygun olmadığı belirlenmiştir.

Liyofilizasyon aşamasında geçmeden bakterilerin birlikte büyütüldüğü fermentörden ve fermentörden alınan sıvı ile hazırlanan OD sıvısından DNA örneği alınmıştır. Real-time PCR ile oluşturulan standart eğriler ışığında, çalışılan bakteri primerleriyle sayıları belirlenmiştir. *M. luteus* dışında diğer bakteriler yaklaşık 10^7 mertebesinde bulunmuştur. 1 yıllık raf ömrü sonunda liyofilize ürünlerden koruyucu olarak skim milk içeren reaktörün çalışıldığı denemede, belirli zaman aralığında alınan DNA örneklerinde *Acinetobacter* ve *Chryseobacterium* sp. reaktörde olgunlaşan aktif çamur örneğinde bulunmayıp, bizim eklediğimiz liyofilize ürün içeriğindeki bakteriler sayesinde görülmüştür. *C. testosteroni* skim milk'in ve skim milk+sodyum glutamat'ın çalıştığı 2 farklı reaktörde de yüksek oranda saptanmış ve DGGE ile de varlığı desteklenmiştir. Skim milk+ sodyum glutamat içeren ürün de hemen hemen her bakteri yaklaşık 1 log gibi daha yüksek oranda görülmüştür. Bu durumda reaktör içerisinde gerçekleşen biyoparçalamanın daha hızlı olmasının sebebi olarak düşünülmektedir. Her 2 ürün grubunda da *Micrococcus luteus*'un reaktörde görülen düşük miktarı sebebi liyofilizasyonun etkisi olarak yorumlanamamaktadır. Sebebi fermentör örneğinden ve OD sıvından yapılan Real-time PCR sonuçlarına göre başlangıç miktarının az olmasıdır.

Reaktörden alınan örnekler içinde bizim çalıştığımız bakteriler dışında çok yüksek oranda diğer bakteriler bulunmaktadır. DGGE çalışmaları ışığında *Acidovorax* sp., *Bacillus* sp. diğer *Pseudomonas* türleri gibi petrokimya atık sularında bulunan diğer bakterilerin varlığı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bir kısımda liyofilize ürün içerisinde bulunan ama primeri çalışmadığı için saptanamadığı halde, DGGE ile varlığı belirlenen *P. alkylphenolica*, *Pseudomonas* sp. olduğu düşünülmektedir.

Biyocoğaltım yapılan SKTR ile kontrol SKTR çıkış suyu biyoparçalama sonuçlarında kimyasalların giderimi açısından kontrol SKTR'ye göre 24 saat içinde kimyasalları parçaladığı görülmektedir. Bu nedenle liyofilize ürünün; SKTR içindeki TA, 4-cba ve p-tol kimyasalları gideriminde başarı sağladığı belirlenmiştir. Kontrol reaktörü ile yapılan biyoparçalama analizinde 4-cba kimyasalı giderimi gerçekleşmiş fakat TA ve p-tol kimyasallarının giderimi 24 saat içerisinde gerçekleşmemiştir. Bu sonuçlar ile Real-time PCR sonuçları karşılaştırıldığında liyofilize ürünümüzde yer alan bakterilerin çoğunu görmemize rağmen sayı olarak genel olarak yaklaşık 1 log daha azdır. Liyofilize ürün içerisinde yer alan *Chryseobacterium* sp. ve *Acinetobacter* sp. kontrol reaktöründe saptanmamıştır. Bu bakterilerin olmaması da biyoparçalamanın gerçekleşmemesini açıklamaktadır.

Toksik kirleticilerin ortamdaki varlığı mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini yavaşlatabilmekte ve biyokütleinin artışı azaltabilmektedir. Doğal olmayan mikroorganizma türlerinin kullanılmasıyla yapılan biyoyileştirme (biyocoğaltım) işlemlerinde, mikroorganizmalar kirli su ve toprak gibi tamamen adapte olmadıkları ortamda bulunan doğal inhibitörler tarafından etkilenmektedirler (Gallego Blanco, 2012). Reaktörde bizim eklediğimiz organizmalar arasında yer alan *Acinetobacter* sp. reaktör içerisinde varlığını sürdürememiştir. Gram negatif bakteri olup, biyoparçalama çalışmalarında da kullanılan bu bakteri, TA, p-tol ve 4-cba kimyasalının etkisinden dolayı reaktördeki varlığını sürdüremediği düşünülmektedir.

Gram-negatif bakterilerin yüksek düzeyde geçirgen olmayan dış membranı sayesinde hidrokarbonlara Gram-pozitif bakterilere göre daha dirençli olduğu bilinmektedir (Harrop et al., 1989; Vermue et al.,1993).

Literatür çalışmalarına bakıldığında freeze-drying yöntemi ile bakterilerin saklanması hareketsiz bakteriler daha yüksek canlılık gösterdiği görülmüştür (Miyamoto-Shinohara et al., 2008). Tez çalışmada da yüksek canlılık gösteren *Chryseobacterium* sp. varlığı hareketsiz bakteri olmasıyla açıklanabilir.

Freeze- drying yönteminde suyun uzaklaştırılması esnasında canlılığın korunması için; hücre dışı polisakkaritler uzun süreli sağkalım için dezavantajlıdır. Gram-pozitif bakterilere kıyasla, Gram negatif bakterilerin daha düşük sağkalım oranları; Gram-negatiflerin daha ince peptidoglikan tabakasına ve hücre duvarındaki lipopolisakkaritleriyle ilişkilidir. Gram-negatif bakterilerde 5-10 nm kalınlığı arasında ince bir peptidoglikan tabakası mevcuttur fakat Gram-pozitif bakterilerde ise 20-80 nm kalınlığı arasında değişen peptidoglikan tabakası vardır (Alberts et al., 1994; Beveridge, 1999; Cooper, 2000; Gupta, 2002; Lodish et al., 2000; Salton and Kim, 1996; Pembrey et al., 1999). Yapılan liyofilizasyon çalışmasında, farklı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler kullanılarak freeze-drying sonrası canlılıklarına bakılmıştır. Gram negatif bakterilerde canlılık korunumu % 8 ile %87.7 arasında iken, Gram-pozitif bakterilerde bu oran % 58.5 ile % 96.7 arasında olduğu görülmüştür (Miyamoto-Shinohara et al., 2008). Gram-negatif türler arasındada su tutma kapasitesinden dolayı lipopolisakkaritlere ilaveten hücre dışı polisakkaritler mevcutsa daha az canlılık sağlanmaktadır.

Tez çalışmasında petrokimya endüstrisinden elde edilen bakteriler kimyasalları parçalama yeteneği daha çok olan Gram-negatif türlerin baskın durumdadır. Çalışmada kullanılan Gram-negatif türler; *Pseudomonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alkylphenolica*, *Comamonas testosteroni*, *Chryseobacterium indolegenes*, *Pseudomonas fluorescens* *Acinetobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Raoultella planticola*'dır. Gram pozitif türler ise; *Arthrobacter protophormiae*, *Micrococcus luteus* *Arthrobacter nicotinae*'dir. Reaktörden alınan örneklerde skim milk ve skim milk+sodyum glutamat'ın liyofilize ürünün eklendiği 2 ayrı reaktörde *Arthrobacter* sp. sayıları birçok bakteriye göre daha yüksek çıkmıştır. *Micrococcus luteus* ise sayıca diğer bakterilere göre daha azdır fakat bunun sebebi başlangıç sayısının düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Comamonas testosteroni organizmasıyla yapılan özellikle tereftalik asit biyoparçalama çalışmaları mevcuttur (Wang et al., 1995; Kang et al., 2003). Tez çalışmasında da DGGE sonuçlarına ve reaktörden alınan örneklerdeki bakteri sayısına bakacak olursak *Comamonas testosteroni* sayıca baskın olarak görülmüştür.

Yapılan tez çalışmasında yerli floraya eklenen liyofilize mikrobiyal konsorsiyum PTA'da bulunan baskın kimyasallardan olan TA, 4-cba ve p-tol kimyasallarını parçalamıştır. İleride buna benzer yapılacak çalışmalarda her bakteri ayrı şekilde fermentörde üretilerek belirli oranda çalışılırsa her organizmadan aynı miktarda başlangıç sayısı sağlanabilir. 4-cba kimyasalına göre daha uzun sürede parçalanan TA ve p-tol kimyasalları için bu kimyasalları parçalayan bakteriler daha fazla miktarda eklenebilir. Daha kısa sürede veya daha yüksek kimyasal konsantrasyonunda daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

Tez çalışması sonucunda, özellikle PTA atık suyu bulunan arıtım tesislerinde liyofilize halde biyoparçalama gerçekleşen, hatta 2 yıl boyunca +4°C'de saklanabilecek özel bakteri konsorsiyumu hazırlanmıştır. Ülkemizde daha önceki yıllarda yurt dışından satın alınan bakteriler yerine bu bakterilerin kullanılıyor ve kullanılacak olması ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması yanında bilimsel çalışmalarda başarı elde etmemizi sağlamıştır. Ülkemizde çeşitli arıtım tesislerinde kullanılmak amacıyla yurt dışından sürekli ve alternatifsiz bakteri satın alınması yerine kendi üretimimiz olan bakteriler ülke içindeki arıtım sistemlerinde kullanılabilecek olması da ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abadias M., Benabarre A., Teixidó N., Usall J. and Viñas I.**, 2001, Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*, *Int. J. Food Microbiol.* 65 173–182.
- Aguilera, J.M. and Karel, M.**, 1997, Preservation of biological materials under desiccation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 287±309pp.
- Aksu, B.**, 2018, Liyofilizasyonun *Pseudomonas* sp. organizmasının canlılığına ve Tereftalik Asit Kimyasalını Biyoparçalama Aktivitesi Üzerine Etkisi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Warson, J. D.**, 1994, Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., *Garland Publishing, New York*, 1294 pp. +23, 44 p.
- Alexander, M.**, 1999, Biodegradation and Bioremediation. 2nd Ed, Academic Press: San Diego, USA, pp. 325-327.
- Alçay,S.**, 2015, Hücre içine girebilen bazı kriyoprotektanlarla dondurulan koç spermasının in vitro embriyonik gelişim üzerine etkisi, *Uludağ Üniversitesi Doktora Tezi*.
- Amann, R., Glockner, F.O. and Neef, A.**, 1997, Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 191–200.
- An, T.Z., Iwakiri, M., Edashige K. and Takashi M.**, 2000, Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 237-249.
- Anchordoguy, T.J., Cechini, C.A, Crowee, J.H. and Crowee L.M.**, 1991, Insights into the cryoprotective mechanism of dimethylsulfoxide for phospholipid bilayer. *Cryobiology*; 28: 467-73.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Badea, M.E. and Sandulescu, D.,** 2001, Biotehnologii vegetale (in Romanian), Fundația Biotech, București, , 130-134;
- Baumann, D.P. and Reinbold, G.W.,** 1964, Preservation of lactic cultures. *Journal of Dairy Science* 47, 674.
- Berner, D. and Viernstein, H.,** 2006, Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Sci Pharm.*;74(3):137-149. doi:10.3797/scipharm..74.137.
- Berny, J.F. and Hennebert, G.L.,** 1991, Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia* 83, 805–815.
- Beveridge, T.J.,** 1999, Structure of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, 181, 4725–4733
- Bian, X.Y., Mbdinga, S.M., Yang, S.Z., Gu, J.D., Ye, R.Q. and Mu, B.Z.,** 2014, Synthesis of anaerobic degradation biomarkers alkyl-, aryl- and cyclohexylsulfamic acids and their mass spectral characteristics. *Eur. J. Mass Spectrom.* (Chichester) 20 (4), 287e297.
- BioRad,** “D-Code Universal Mutation Detection System” kullanım kılavuzu, katalog no: 1709080-1709104.
- Bitton, G.,** 2005, Wastewater microbiology 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 746p.
- Bjornsdottir-Butler, K., Jones, J.L., Benner, Jr. R.A. and Burkhardt, W.,** 2011, Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method. *Food Microbiology* 28:1284-1292.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blackall, L.L., Burrell, P.C., Gwilliam, H., Bradford, D., Bond, P.L. and Hugenholtz, P.**, 1998, The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. *Water Sci. Technol.* 37, 451–454.
- Blaise, C. and Férard, J.F.**, 2005, Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, *Springer*, Netherlands.
- Boopathy, R.**, 2000, Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technol* 74:63–67.
- Boon, N., Windt, W., Verstraete, W. and Top, E. M.**, 2002, Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 101–112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00911.x>
- Boshui, C.B., Nan, Z., Jiang, W., Jiu, W. and Jianhua, F.**, 2012, Biodegradation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas aeruginosa*. *China Petro Proc Petrochem Technol* ,14: 66-70.
- Boumahdi M., Mary P. and Hornez J.P.**, 1999, Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. *Journal of Applied Microbiology* 87: 611– 619.
- Bozoglu, T.F., Ozilgen, M. and Bakir, U.**, 1987, Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. *Enzyme Microb Technol* 9, 531–537
- Brassington, K.J., Hough, R.L., Paton, G.I., Semple, K.T., Risdon, G.C., Crossley, J., Hay, I., Askari, K. and Pollard, S.J.T.**, 2007, Weathered hydrocarbon wastes: a risk management primer. *Crit Rev Environ SciTechnol* 37:199–232.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bucak, M.N. and Tekin, N.,** 2007, Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54, 67-72.
- Burke, M.J.,** 1986, The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* ed. Leopold, A.C. Ithaca: *Cornell University Press*. 358±363pp.
- Cabria E., Anel L. and Herraiez M.P.,** 2001, Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52, 623-635.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P.,**2003, Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria, *EDP Sciences*, DOI: 10.1051/laite: 83,203–210
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P.,** 2004, Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 14, 835–847.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P.,** 2004, Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Biotechnology Progress*.20:248–254.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H. and Arakawa, T.,** 1990, Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried states. *J Dairy Sci* 73,3627–3636.
- Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., and Arakawa, T.,** 1993, Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch.Biochem. Biophys.* 303, 456–464.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ceyhan, N. ve Esmeray, E.**, 2012, Petrol Kirliliği ve Biyo-remediasyon, Derleme
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y.**, 1991, The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can Inst Sci Technol J* 24, 118–128.
- Chen, Y., Lin, C.J., Jones, G., Fu, S. and Zhan, H.**, 2009, Enhancing biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3): 948–53pp.
- Cheng, S.S., Ho, C.Y. and Wu, J.H.**, 1997, Pilot study of UASB process treating PTA manufacturing wastewater. *Water Science and Technology* 36, 73e82.
- Cheung, P.Y. and Kinkle, B.K.**, 2001, Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2222-2229.
- Clegg, J.S.**, 1986, The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents. The water replacement hypothesis. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* ed. Leopold, A.C. pp. 169–187. *Ithaca: Cornell University Press*.
- Coman, G. and Radvan, M.**, 2009, Preliminary Studies Regarding The Behaviour Of Selected *Streptomyces* Strains As Xylanases Producers Preserved By Lyophilization. *Scientific Study & Research* .Vol. X (4),1582-540x
- Cooper, G. M.** , 2000, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed., *Sinauer Associates, Inc., Sunderland*, 689 pp.
- Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C.**, 2004, Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J.Appl. Microbiol.* 96:1024–1039.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N. and Vinas, I.,** 2000, Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CP-2 subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* 89, 793–800.
- Çay, H.,** 2017, Atık su arıtımı için adapte aşıl kültürünün sıvı karışım olarak üretilmesi, raf ömrünün ve biyoparçalama etkinliğinin saptanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Dai, G., Cui, L., Song, L., Gong, N., Chen, J., Zhao, R., Wang, S., Chang, H.C. and Wang, X.,** 2005. Terephthalic acid occupational exposure and its effect on organ functions in fiber workers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 2009-214.
- Das, N. and Chandran, P.,** 2011, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International* Volume, 13 doi:10.4061/2011/941810eme, 5 (1): 95-101.
- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. P. and Nazzaro, F.,** 2005, Use of Alginate and Cryo-protective Sugars to Improve the Viability of Lactic Acid Bacteria After Freezing and Freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol: 21, No: 5. 739-746.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M. and Clipson, N.,** 2008, Microbial PAH degradation. *Advances in Applied Microbiology* , 65(10): 27-66p.
- Dzulkapli, N.F., Talib, S.A., Ramasamy, K. and Chun-Yang, Y.,** 2009, Identification of Bacterial Strains Capable of Degrading Malaysian Petroleum Sludge. *Conference on Scientific & Social Researchs (CSSR 08'09)*
- Enache, M. and Dumitru, I.,** 2007, Biodiversitatea: de la concepte fundamentale la aplicații biotehnologice (in Romanian), Editura Academiei Române, București, 33-52.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ergün, Z.**, 2015, Biyolojik maddelerin kurutularak saklanması: Liyofilizasyon, *Etlik Vet Microbiol Derg*, Cilt 26, Sayı 1,35-40.
- Eroğlu, D.**, 2013, Petrokimya Tesisinden İzole Edilen Bazı Mikroorganizmaların Tereftalik Asit ve 1,2 Dikloroetan Biyoparçalanma Etkinliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisan Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L. and Rosenblatt, J. E.**, 2006, Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing, *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165-256p
- Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio, F. and Torriani S.**, 2003, Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol.*;82(1):59-70. doi:10.1016/S0168-1605(02)00259-3.
- Fajardo, C., Guyot, J.P., Macarie, H. and Monroy, O.**, 1997, Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatic by products. *Water Science and Technology* 36 (6-7), 83-90.
- Ferry, R.M.**, 1995, The freeze-drying of bacteria and viruses; *Methods in Molecular Biology* 38, No.2
- Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G.**, 1983, Comparative study of the efficacy of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* 20, 560±566.
- Font de Valdéz G., de Giori G., de Ruiz Holgado A.P., Oliver G.**, 1985 Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 413-415.
- Gallego Blanco, S.**, 2012, Biodegradation of PAHs: analysis and stimulation of degrading bacterial populations, *PhD Thesis*, Universitat de Barcelona, 171p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Garcia, V., Pongrácz, E., Phillips, P.S. and Keiski, R.L.,** 2013. From waste treatment to resource efficiency in the chemical industry: recovery of organic solvents from waters containing electrolytes by pervaporation. *J. Cleaner Prod.* 39, 146–153.
- Garg, K.K., Prasad, B. and Srivastava, V.C.,** 2014. Comparative study of industrial and laboratory prepared purified terephthalic acid (PTA) wastewater with electro-coagulation process. *Sep. Purif. Technol.* 128, 80–88.
- Garg, K.K. and Prasad, B.,**2017, Treatment of toxic pollutants of purified terephthalic acid waste water: A review. *Environmental Technology & Innovation* 8, 191–217
- Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F. and Sayadi, S.,** 2011, Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents, *Journal of Hazardous Materials*, 189:427–434pp.
- Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F. and Sayadi, S.,** 2014, Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by bacterial consortium isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J Chem Technol Biotechnol.*;89(7):978-987. doi:10.1002/jctb.4188.
- Ghazali, M.F., Zaliha, N.R., Abdul, R.N., Salleh, A.B. and Basri, M.,** 2004,Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium.*International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 61-67p.
- Gibson, J., Droppo, I.G., Farnood, R.R., Mahendran, B., Seto, P. and Liss, S.N.,** 2012, Hydrodynamic treatment of wastewater effluent flocs for improved disinfection.*Water Environ. Res.* 84 (5), 387–395.
- Gieg, L.M., Fowler, S.J. and Berdugo-Clavijo, C.,** 2014. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 21e29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D.D., and Wolff, A.,** 2007, Comparison of Multiple DNA Dyes For Real-Time PCR: Effects of Dye Concentration and Sequence Composition on DNA Amplification and Melting Temperature, *Nucleic acids Research*, 35.
- Guan, J., Xia, L.P., Wang, L.Y., Liu, J.F., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2013. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and *dsrAB* genes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 76, 58e66.
- Guan, J., Zhang, B.L., Mbadinga, S.M., Liu, J.F., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2014. Functional genes (*dsr*) approach reveals similar sulphidogenic prokaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1871e1881.
- Gupta, R.S.,** 2002, Phylogeny of bacteria: Are we now close to understanding it? *ASM News*, 68, 284–291.
- Günel, T.,** 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* , 27.
- Halkman, A.K. ve Doğan, H.B.,** 2000, Kültür Koruma, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını*. Sim Matbaası, Ankara 522 s 08. Bölüm.
- Hamamura, N., Olsen, S.H., Ward, D.M. and Inskeep, W.P,** 2006, Microbial population Dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6316–6324.
- Hamza, U.D., Mohammed, I. A. and Sale, A.,** 2012, Potentials of Bacterial Isolates in Bioremediation of Petroleum Refinery Wastewater. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*, 1(3):131-138p.ed disinfection. *Water Environ. Res.* 84 (5), 387–395.
- Hansen, M.C., Tolker Nielsen, T., Givskov, M. and Molin, S.,** 1998, Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol*; 26:141–149.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harrop, A.J., Hocknull, M.D. and Lilly, M.D.,** 1989, Biotransformations in organic solvents: a difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biotechnol. Lett.* 11, 807-810.
- Holt, W.V.,** 2000, Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62:3-22.
- Horan, N.J.,** 1990, Biological wastewater treatment systems *Wiley*, Chichester.
- Hubalek, Z.,** 2003, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205–229.
- Immich, A.P.S., Ulson de Souza, A.A. and Ulson de Souza de Arruda Guelli, S.M.,** 2009, Removal of remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna* // *Journal of Hazardous Materials*.- 2-3P.1580-1585.
- Ingaramo, A., Heluane, H., Colombo, M. and Cesca, M.,** 2009, Water and wastewater eco-efficiency indicators for the sugar cane industry. *J. Cleaner Prod.* 17 (4),487–495
- ITOPF,** The International Tanker Owners Pollution Federation Limited, <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/> (Erişim tarihi: 24 Mart 2018)
- Jean-Noel, M., Céline, P., Frédéric, W., Jacqueline, D. and Philippe, T.,** 2012, Impact of Protective Compounds on the Viability, Physiological State and Lipid Degradation of FreezeDried *Pseudomonas Fluorescens* BTP1 during Storage. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. ISSN 0973-2691 Volume 8, Number 1 pp. 17-26
- Jenkins, D., Richard, M.G. and Daigger, G.T.,** 1993, Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming (2nd ed.), Lewis Publishers, Michigan.
- Jennings, TA.,** 1997, Effect of formulation on lyophilization. *Asian journal of pharmaceutical science*, 54-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jennings, V.L.K., Rayner-Brandes, M. and Bird, D.J.**, 2001, Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems, *Water Research*, 35:1,3448-3456.
- Juhasz, A.L., Britz, M.L. and Stanley, G.A.**, 2000, Evaluation of a creosote-based medium for the growth and preparation of a PAH-degrading bacterial community for bioaugmentation. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*, 24:277–284.
- Kang, D.J. Hong, Y.P. and Lee, J.H.**, 2003, PCR Detection of Terephthalic Acid Degrading *Comamonas testosteroni* in Soil, *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(2):177-181
- Karabey, B., Eroglu, D., Vural, C., ve Ozdemir, G.**, 2018, İzmir Tulum Determination of the microbial flora in traditional I cheeses by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3003-z>.
- Karegoudar, T.B. and Pujar, B.G.**, 1985, Degradation of terephthalic acid by a *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.*;30:217–220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01015.x>
- Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K. and Harayama, S.**, 2001. Molecular detection of marine bacterial pollution on beaches contaminated by Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* 3 (4), 246e255.
- Kasper, J.C. and Friess, W.**, 2011, The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 78(2), 248-63.
- Kazunga, C. and Aitken, M.D.**, 2000, Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1917-1922

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kearney, L., Upton, M. and McLaughlin, A.,** 1990, Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads incorporating cryoprotectants. *Appl Environ Microbiol* 56, 3112–3116.
- Kim, T.J., Lee, E.Y., Kim, Y.J., Cho, K.S. and Ryu, H.W.,** 2003, Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 19, 411-417.
- Kim, J.Y., Woo, S.H., Lee, M.W. and Park, J.M.,** 2012, Sequential treatment of PTA wastewater in a two-stage UASB process: Focusing on p-toluic acid degradation and microbial distribution. *Wat. Res.* 46, 2805–2814.
- Kleerebezem, R., Beckers, J., Pol, L.W.H. and Lettinga, G.,** 2005, High rate treatment of terephthalic acid production wastewater in a two-stage anaerobic bioreactor.
- Kleerebezem, R., Mortier, J., Pol, L.W.H. and Lettinga, G.,** 1997, Anaerobic pre-treatment of petrochemical effluents: terephthalic acid wastewater. *Water Science and Technology* 36, 237-248.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K.,** 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med*; 27:95-125.
- Kumar, G.P., Prashanth, N. and Kumari, B.C.,** 2011, Fundamentals and Applications of Lyophilization. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research.* 2(4), 157-169.
- Larena, I., De Cal, A., Linan, M. and Melgarejo, P.,** 2003, Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelfstable biological product against brown rot disease. *J Appl Microbiol* 94, 508–514.) 237-248.
- Lee, S.E., Seo, J.S., Keum, Y.S., Lee, K.J. and Li, Q.X.,** 2007, Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14. *Proteomics*, 7, 2059-2069.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M.,** 1995, Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol.*;61(10):3592-3597.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J.,** 2000, Molecular Cell Biology, 4th ed., W. H. *Freeman and Co.*, New York, 1084 pp. +17, 36 p.
- Lueders T and Friedrich MW.,** 2003, Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:320–326.
- Li, C.Y., Zhang, D., Li, X.X., Mbadinga, S.M., Yang, S.Z., Liu, J.F., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2016, A biofilm properties and its correlation with high-molecular-weight polyacrylamide degradation in a water injection pipeline of Daqing oilfield. *J. Hazard. Mater* 304, 388e399.
- Li, H., Wang, X.L., Mu, B.Z., Gu, J.D., Liu, Y.D., Lin, K.F., Lu, S.G., Lu, Q., Li, B.Z., Li, Y.Y. and Du, X.M.,** 2013. Molecular detection, quantification and distribution of alkane degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 76, 49e57.
- Li, H., Zhang, Q., Wang, X.L., Ma, X.Y., Lin, K.F., Liu, Y.D., Gu, J.D., Lu, S.G., Shi, L., Lu, Q. and Shen, T.T.,** 2012, Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. *Bioresour. Technol.* 124, 129e136.
- Liang, D.W., Zhang, T., Fang, H. H. P. and He, J.,** 2008, Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80:183-198p
- Lin, S., Wang, Y., Lin, J., Wang, X. and Gong, H.,** 2009, Dominant bacteria correlated with elimination of sludge in an innovative reactor. *Prog Nat Sci.*;19(12):1765-1771. doi:10.1016/j.pnsc.2009.07.008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, J.F., Mbadinga, S.M., Sun, X.B., Yang, G.C., Yang, S.Z., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2016, Microbial communities responsible for fixation of CO₂ revealed by using mcrA, cbbM, cbbL, fthfs, fefH-hydrogenase genes as molecular biomarkers in petroleum reservoirs of different temperatures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 114,164-175.
- Liu, J.F., Sun, X.B., Yang, G.C., Mbadinga, S.M., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2015, Analysis of microbial communities in the oil reservoir subjected to CO₂-flooding by using functional genes as molecular biomarkers for microbial CO₂ sequestration. *Front. Microbiol.* 6,1-15
- Locher, H.H., Malli, C., Hooper, S.W., Vorherr, T., Leisinger, T. and Cook, A.M.,** 1991, Degradation of p-toluic acid (p-toluenecarboxylic acid) and p-toluenesulphonic acid via oxygenation of the methyl sidechain is initiated by the same set of enzymes in *Comamonas testosteroni* T-2. *J Gen Microbiol.*;137(9):2201-2208. doi:10.1099/00221287-137-9-2201.
- Low, E.W., Chase, H.A. and Milner, M.G.,** 2000, Uncoupling of metabolism to reduce biomass production in the activated sludge process *Water Res*, 12 (34), pp. 3204-3212
- Macarie, H., Noyola, A. and Guyot, J.P.,** 1992, Anaerobic treatment petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. *Water Science and Technology* 25, 223-235.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. and Takashiba, S.,** 2003, Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 39:81-86.
- Maretto, M., Blanchi, F., Vignola, R., Canepari, S., Baric, M., Iazzoni, R. and Papini, M.P.,** 2014, Microporous and mesoporous materials for the treatment of wastewater produced by petrochemical activities. *J. Cleaner Prod.* 77, 22–34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martos, G.I., Minahk, C.J., Valdez, G.F. and Morero, R.,** 2007, Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol* 45, 282–288.
- Margesin, R. and Schinner, F.,** 2001, Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:650–663p.
- Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M. and Ema, M.,** 2008, Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul Toxicol Pharmacol* 50:37–49.
- Melin, P., Hakansson, S. and Schnurer, J.,** 2007, Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 1008–1016.
- Meriç, S.,** 2002, Evsel Atıksularda Daphnia Magna İle Zehirlilik İzleme, *Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi*, Cilt 12, Sayı 1, s: 7-16.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S. and Komatsu, Y.,** 2000, Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41, 251–255.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T. and Nakahara, T.,** 2006, Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*; 52(1):27-32. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.09.002.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T. and Nakahara T.,** 2008, “Survival of Freeze-Dried Bacteria.” *The Journal of General and Applied Microbiology* 54 (1):9–24. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>.
- Mohan, S.V., Mohanakrishna, G., Ramanaiah, S.V. and Sarma, P.N.,** 2008, Simultaneous bio-hydrogen production and wastewater treatment in biofilm configured anaerobic periodic discontinuous batch reactor using distillery wastewater. *Int. J. Hydrog. Energy* 33 (2), 550–558

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V. and Rojo, F.,** 2015, The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs *Environmental Microbiology*. 17(1): 105–118.
- Morgan, C.A, Herman, N., White, P.A. and Vesey G.,** 2006, Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Methods* 66: 183–193.
- Muyzer, G., Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.,** 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695–700.
- Muyzer, G. and Smalla, K.,** 1998, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1):127-141. doi:10.1023/A:1000669317571.
- Naddafi, N., Moosavi, G.H. and Mesdaghinia, A.R.,** 2004, Evaluation of lyophilization effects on operational parameters and characteristics of activated sludge, *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.*, , 1 (1), 20-25;
- Neilson, J. W., Jordan, F. L. and Maier, R. M.** 2014, Analysis of Artifacts Suggests DGGE Should Not Be Used For Quantitative Diversity Analysis, *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.021>.Analysis
- Nireesha, G.R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N.,Niranjan Babu, M. and Lavakumar, V.,** 2013, Lyophilization/Freeze-drying - An Review. *Int J Nov Trends Pharma Sci*.87-98.
- Nyyssönen, M., Piskonen, R. and Itavaara, M.,** 2006, A targeted real time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment, *Microbial Ecology*, 52: 533–543pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Omar, N.B. and Ampe, F.**, 2000, Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3664– 3673.
- Oteyza De, T.G., Grimalt, J.O., Liros, M. and Esteve, I.**, 2005, Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. *Science of The Total Environment*, 357(1–3), 12-24p.
- Özdemir, G. ve Eltem, R.**, 2000, Su ve Atık Suların Mikrobiyolojik İncelenmesi ve Arıtım Uygulamaları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:167.
- Özkaya, B. and Demir, A.**, 2011, Microbial Community Analysis with PCR-DGGE Sequencing Based Molecular Methods In Municipal Solid Waste Management, *Journal of Engineering and Natural Science*, 219-227.
- Palmfeldt, J. and Hahn-Hagerdal, B.**, 2000, Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Int J Food Microbiol* 55, 235–238.
- Palmfeldt, J., Radstrom, P. and Hahn-Hagerdal, B.**, 2003, Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chloroaphis*. *Cryobiology* 47, 21–29.
- Parvez, S., Venkataraman, C. and Mukherji, S.**, 2006, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International*, 32:2, 256-268.
- Patel, S.M. and Pikal, M.J.**, 2013, Lyophilization process design space. *J Pharm Sci.* 102(11):3883-7.
- Pembrey, R. S., Marshall, K. C., and Schneider, R. P.**, 1999, Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties ? *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2877–2894.
- Peng, R-H., Xiong, A-S., Xue, Y., Fu, X-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y-S. and Yao, Q-H.**, 2008, Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:927-955pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- PETKİM**, 2016, Sektörel Atık Havuzları, Erişim Tarihi: 12.01.2018 url: http://www.csb.gov.tr/db/cygm/editordosya/Petrokimya_Kilavuzu.pdf
- Phrommanich S., Suanjit S., Upatham S., Grams SV., Kruatrachue M, Pokethitiyook P., Korge G. and Hofmann A.** 2009, Quantitative detection of the oil – degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR.
- Pierre, B., Sabahudin, H., Keith, B.M. and John, H.T.L.,** 2006, Analysis of the 16 environmental protection agency priority polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography-oxidized diamond film electrodes, *Journal of Chromatography A*, 1103, 248-256.
- Pillai, K.C., Kwon, T.O. and Moon, I.S.,** 2009, Degradation of wastewater from terephthalic acid manufacturing process by ozonation catalyzed with Fe², H₂O₂ and UV light: Direct versus indirect ozonation reactions. *Appl Catal B Environ.* ;91(1-2):319-328. doi:10.1016/j.apcatb.2009.05.040
- Pinyakong, O., Habe, H. and Omori, T.,** 2003, The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 4.
- Polge, C. and Soltys, M.A.,** 1960, Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes, in: A.S. Parkes, A.U. Smith (Eds.), *Recent Research in Freezing and Drying*, Blackwell, Oxford, pp. 87–100.
- Potts, M.,** 1994, Desiccation tolerance of prokaryotes, *Microbiol.Rev.* 58, 755–805.
- Raghavendrchar, P. and Ramachandran, S.,** 1992, Liquid-phase catalytic oxidation of p-xylene *Ind. Eng. Chem. Res.* 31, 453, DOI: 10.1021/ie00002a001
- Rambeloarisoa, E., Rontani, J.F., Giusti, G., Duvnjak, Z. and Bertand, J.C.,** 1984, Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Marine Biology* 83-89:69-81

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ray, B., Jezeski, J.J. and Busta, F.F.,** 1971, Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Applied Microbiology* 22, 184±189.
- Razo, E., Macarie, H. and Morier, F.,** 2006, Application of biological treatment systems for chemical and petrochemical wastewaters. In: C ervantes, F.J., Pavlostathis, S.G., van Haandel, A.C. (Eds.), *Advanced Biological Treatment Processes for IndustrialWastewaters*. IWA Publishing, London, UK, ISBN 1843391147, pp. 267e297.
- Ren S., and Frymier P.D.,** 2003. Kinetics of the toxicity of metals to luminescent bacteria, *Advances in Environmental Research*, 7:2, 537-547
- Ren, S., and Frymier, P.D.,** 2003, The use of a genetically engineered *Pseudomonas* species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant in wastewater treatment plant influent // *Water Environment Research*. - 75 P.21-29.
- Rightsel, W.A. and Grieff, D.,** 1967, Freezing and freezedrying of viruses. *Cryobiology*. 3, 423–431.
- Rinkes, I.H., Toner, M., Ezzel, R.M., Tompkins, R.G. and Yarmush, M.L.,** 1992, Effect of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology* 29 (4): 443-53.
- Robertson, B.K., Harden, C., Selvaraju, S.B., Pradhan, S. and Yadav, J.S.,** 2014, Molecular Detection, Quantification, and Toxigenicity Profiling of *Aeromonas* spp. in Source- and Drinking-Water *The Open Microbiology Journal*. 8: 32-39.
- Romero, A., Santos, A., Tojo, J. and Rogriguez, A.,** 2007, Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids // *Journal of Hazardous Materials*.p..268-273.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E.,** 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Curr.Opin. Biotechnol.* 27, 191e194.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rudge, R.H.**, 1984, Maintenance of bacteria by freeze-drying, in Maintenance of Microorganisms. *Academic Press*, London. 23–35.
- Rudolph, AS. and Crowe, J.H.**, 1985, Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22, 367-377.
- Saha, R., Bestervelt, L.L. and Donofrio, R.S.**, 2012, Development and Validation of a Real-Time TaqMan Assay for the Detection and Enumeration of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 Used as a Challenge Organism in Testing of Food Equipments. *Journal of Food Science* 77(2): 150-155.
- Salles, J.F., de Souza, F.A., van Elsas, J.D.**, 2002, Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*; 68:1595–1603. [PubMed:11916673]
- Salton, M.R.J. and Kim, K.S.**, 1996, Structure. In Medical Microbiology, 4th ed., ed. by Baron, S., *University of Texas Medical Branch, Galveston*, pp. 37–52.
- Samanta, S.K., Chakraborti, A.K. and Jain, R.K.**, 1999, Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 98-107.
- Sanders, J.M., Venema, J. and Kok, J.**, 1999, Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 23, 483–501.
- Saygılı, B.**, 2012, Asenaften ve Floren Biyoparçalama Kapasitesindeki Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Parçalama Etkinliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisan Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Schafer, H. and Muyzer, G.**, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods Microbiol.* 30, 425-468.
- Schaum, J., Cohen, M., Perry, S., Artz, R., Draxler, R., Frithsen, J. B., Heist, D., Lorber, M. and Phillips, L.**, 2010, Screening level assessment of risks due to dioxin emissions from burning oil from the BP Deepwater Horizon Gulf of Mexico spill. 15;44(24):9383-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schwartz, A. and Bar, R.**, 1995, Cyclodextrin-Enhanced Degradation of Toluene and p -Toluic Acid by *Pseudomonas putida* Downloaded from <http://aem.asm.org/> on November 12,61(7):2727-2731.
- Simple, K.T., Doick, K.J., Wick, L.Y. and Harms, H.**, 2007, Microbial interactions with organic contaminants in soils: definitions, processes and measurement. *Environ Pollut* 150:166–176.
- Seo, J., Keum, Y. and, Li, Q.**, 2009, Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6: 278- 309p.
- Servos, M.R.**, 1999, Review of the aquatic toxicity,estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates, *Water Quality Research Journal of Canada*. 34,P.123-177.
- Siaterlis, A., Deepika, G. and Charalampopoulos, D.**, 2009, Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze-drying. *Lett Appl Microbiol.*;48(3):295-301. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02529.x.
- Simione, P. and Brown, E.M.**, 1991, ATCC Preservation Methods:Freezing and Freeze-Drying, second ed., Rockville, Maryland,
- Singh, C. and Lin, J.**, 2008, Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*.7 (12): 927-1932p.9:1-19pp. ,*FEMS Microbiology Reviews*, 32:927-9
- Singh, R., Karandikar, R. and Phale, P.S.**, 2015, Microbial degradation ofaromatic compounds and pesticides: challenges and solutions, 67-95,Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste, Chandra, R. (Ed.), *CRC Press, Taylor and Francis Group*, New York, 423p.
- Sinha, R.N., Shukla, A.K., Madan L. and Ranganathan, B.**, 1982, Rehydration of freeze-dried cultures of lactic *streptococci*. *J Food Sci* 47, 668–669.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smith, T.F., Uhl, J.R., Espy, M.J., Sloan, L.M., Vetter, E.A., Jones, M.F., Rosenblatt, J. E. and Cockerill, F.R.,** 2004, Development, Implementation and Trend Analysis of Real-time PCR Tests for the Clinical Microbiology Laboratory, *Clinical Microbiology Newsletter*, 26, 145-153p.
- Souzo, H.,** 1992, Freeze-drying of Microorganisms, *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 2, Academic Press, New York,
- Sönmez, V.Z. ve Sivri, N.,** 2016, Akut Toksikite Testi Hassasiyetinin Belirlenmesinde Referans Toksik Madde Olarak Formaldehit Kullanımı, *Journal of Anatolian Environmental&Animal Sciences* Year: 1, No: 3, (96-99)
- Speckman, C.A., Sandine, W.E. and Elliker, P.R.,** 1974, Lyophilized lactic-acid starter culture concentrates preparation and use in inoculation of vat milk for cheddar and cottage cheese, *J. Dairy Sci.* 57 165–173.
- Sponza, D.T. and Gök, O.,** 2010, Effect of rhamnolipid on the aerobic removal polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater, *Bioresource Technology*, 101:914–924pp
- Sponza, D.T. and Gök, O.,** 2012, Aerobic biodegradation and inhibition kinetics of poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) in a petrochemical industry wastewater in the presence of biosurfactants, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87:658–672pp.5
- Tang, X.L. and Pikal, M.J.,** 2004, Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceut Res* 21, 191–200.5pp.
- Teil, M.J., Blanchard, M. and Chevreuil, M.,** 2006, Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Sci. Tot. Environ.*, 354, 212-223.
- The Big Pictures,** 2012.
- http://www.boston.com/bigpicture/2010/05/disaster_unfolds_slowly_in_the.html
- (Erişim Tarihi: 11 Ocak2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tomas, R.A., Bordado, J.C. and Gomes, J.F.,** 2013, p-Xylene Oxidation to Terephthalic Acid: A Literature Review Oriented toward Process Optimization and Development. *Chemical Reviews*. Vol. 113, nr. 10, p. 7421-7469.
- Tong, K., Zhang, Y., Liu, G., Ye, Z. and Chu, P.K.,** 2013. Treatment of heavy oil wastewater by a conventional activated sludge process coupled with an immobilized biological filter. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, 65e71
- Tsvetkov, T. and Brankova, R.,** 1983, Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants, *Cryobiology* 20 , 318–323.
- Tunç, E.,** 2014, Petrokimya Endüstrisi Atık Sularında Bulunan P-toluik Asit ve 4-karboksibenzaldehit Biyoparçalama Etkinliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisan Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tzoris, A. and Hall, E.A.H.,** 2006, Rapid detection of toxicity in wastewater, Recent development with manometric respirometry // *Analytica Chimica Acta.* - 573-574 P.147-157.
- U.S. Environmental Protection Agency,** 2002, Integrated risk information system (IRIS). Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC.
- Vamsee-Krishna, C., Mohan, Y. and Phale, P.S.,** 2006, Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp PPD and *Acinetobacter lwoffii* ISP4. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1263–1269
- Van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Rosado, A.S. and Smalla, K.,** 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Methods* 32, 133e154

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Varma, A. and Podila, G.K.**, 2005, Biotechnological Applications of Microbes IK, *Microbiology Series, IK International*, pp. Section: Molecular approaches to study the microbial community structure. s.310-340.
- Varjani, S.J. and Upasani, V.N.**, 2017, A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad.*;120:71-83. doi:10.1016/j.ibiod.2017.02.006.
- Verma, S., Prasad, B. and Mishra, I.M.**, 2011, Thermochemical treatment (Thermolysis) of petrochemical wastewater: COD removal mechanism and floc formation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50 (9), 5352–5359.
- Vermue, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R. and Tramper, J.**, 1993, Toxicity of homologous series of organic solvents for the Gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and Gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 747-758.
- Vural, C.**, 2015, Petrokimya Endüstrisi Atıksularının Biyolojik Arıtımında Kullanılmak Amacıyla Aşı Kültürü Elde Edilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. and Alassatova, T.**, 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 297– 303.
- Wang, T., Liu, Y., Wang, D., Lin, Z., An, Q., Yin, C. and Liu, Y.**, 2016, The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 310, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.061>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, Y.Z., Zhou, Y.M. and Zysta, G.J.**, 1995, Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. *Environ Health Perspect* 103:9–12.
- Weber, D.**, 1984. Basic chemicals output returns to growth. *Chem. Eng. News*. Vol 62, (19), 8-10.
- Weijers, S.**, 2000, Modelling, Identification and Control of Activated Sludge Plants for Nitrogen Removal," Technische Universiteit Eindhoven, The Netherlands.
- Weissenfels, W.D.; Beyer, M. and Klein, J.**, 1990, Degradation of phenanthrene, fluorene, and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 479-484.
- Wende, L., Xuecheng, K., Lijun, L., Ruikui, Y., Chun, Z. and Wangsheng, W.**, 2013, Milliontons PTA Technology Package China, China National Petroleum Corporation, Science & Technology Management Department. Erişimtarihi:12.01.2018
URL:<http://www.cnpc.com.cn/cnpc/lhpt/201407/8980b96f5b5d457197640bdb306aaa7c/files/db9f9b652f334a16bef087e0a2fa963f.pdf>
- Wilson, S.C. and Jones, K.C.**, 1993, Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Environmental Pollution*, 81:229-249pp.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G. and Moss, A.A.**, 1997, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22:130–8.
- Yadav, B.R. and Garg, A.**, 2011, Treatment of pulp and paper mill effluent using physico-chemical processes. *IPPTA* 23 (2), 155–160.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, G.C., Zhou, L., Mbadinga, S.M., You, J., Yang, H.Z., Liu, J.F., Yang, S.Z., Gu, J.D. and Mu, B.Z.,** 2016. Activation of CO₂-reducing methanogenesis in oil reservoir after addition of nutrient. *J. Biosci. Bioeng.* 122 (6), 740e747.
- Yao, A.A., Bera, F., Franz, C., Holzapfel, W. and Thonart, P.,**2008, Survival Rate Analysis of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria Using the Arrhenius and z-Value Models. *J. Food Prot.* 71, 431–434.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y. and Oda, K.,** 2016, “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate”, *Science, Cilt* 351, Sayı 6278, s. 1196-1199,
- Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y.,** 2005, Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 51 : 1071-1077p.
- Zhan, Y, Xu, Q, Yang, M.M, Yang, H.T, Liu, H.X, Wang, Y.P. and Guo, J.H.,** 2011, Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Lett Appl Microbiol.* 54(1):10-7. doi: 10.1111/j.1472-765x.
- Zhang, Y.M, Sun, Y.Q, Wang, Z.J and Zhang, J.,** 2013, Degradation of terephthalic acid by a newly isolated strain of *Arthrobacter* sp.0574. *S Afr J Sci.* 109(7/8), <http://dx.doi.org/10.1590/sajs.2013/20120019>.
- Zhao, G. and Zhang, G.,** 2005, Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol.*;99(2):333-338. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zuo, X., Fenghui, N., Kirk, S., Bala, S. and Daryle, H.B., 2010, "Liquid Phase Oxidation of P-xylene to Terephthalic Acid at Medium-high Temperatures: Multiple Benefits of CO₂-expanded Liquids". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 12 (2): 260–67. doi:10.1039/B920262E.



ÖZGEÇMİŞ

Didem Eroğlu, 20 Ekim 1987 yılında İzmir’de dünyaya gelmiştir. 2000 yılında İzmir Özkanlar ilköğretim Okulundan 2004 yılında İzmir Cem Bakioğlu Lisesinden, 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda lisansüstü eğitime başlamıştır. 2014 yılı Şubat ayında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitime başlamıştır. 2015 yılı Ekim ayında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır.

Halen Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde araştırma görevlisi ünvanı ile çalışmakta ve Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda akademik çalışmalarını sürdürmektedir.