



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ATIKSU ARITIMI İÇİN ADAPTE AŞI
KÜLTÜRÜNÜN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILAR
KULLANILARAK KURU KARIŞIM OLARAK
ÜRETİMİ VE ÜRÜN VERİMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Tayyibe ALPAY UYANIKER

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ATIKSU ARITIMI İÇİN ADAPTE AŞI
KÜLTÜRÜNÜN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILAR
KULLANILARAK KURU KARIŞIM OLARAK
ÜRETİMİ VE ÜRÜN VERİMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tayyibe ALPAY UYANIKER

Danışman : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Doktora Programı

İzmir
2020

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 Çeşitli Taşıyıcılar Kullanılarak Kuru Karışım Olarak Üretimi ve Ürün Verimlerinin Belirlenmesi**” 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.

28/12/2020

Tayyibe ALPAY UYANIKER

ÖZET**ATIKSU ARITIMI İÇİN ADAPTE AŞI KÜLTÜRÜNÜN ÇEŞİTLİ
TAŞIYICILAR KULLANILARAK KURU KARIŞIM OLARAK ÜRETİMİ VE
ÜRÜN VERİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tayyibe ALPAY UYANIKER

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Aralık 2020, 248 sayfa

Atık su arıtma sistemi üzerindeki talepler ve ihtiyaçlar inorganik azot ve fosforun uzaklaştırılması, organik karbonun yıkımı, patojen giderimi, parçalanması zor ksenobiyotik bileşimlerinin parçalanması konusunda yıldan yıla önemli ölçüde artmıştır. Etkili bir ksenobiyotik uzaklaştırma kapasitesine sahip bir mikrobiyal topluluğun oluşturulması genellikle, bileşiğe mevcut bir çamurun yavaş ya da az uyumu ile bozulmaktadır. Bu duruma N-, P- ve C- uzaklaştırılmasında bozulma ile çamur çökme problemleride eşlik etmektedir. Biyoaugmentasyon yani bakteri ya da genetik bilgilerin eklenmesi ile yeni metabolik işlevlerin oluşturulması; topluluk içerisinde, bu sorunların üstesinden gelmek için olası bir yöntemdir. Bu çalışma ile petrokimya endüstrisi atık sularında bulunan p-toluik asit (p-TOL), 4-karboksibenzaldehit (4-CBA) ve tereftalik asit (TFA) parçalama kapasitesinde olan adapte, oldukça etkili ve performansı yüksek aşı kültürü oluşturulup, reaktör sistemlerinde uygun ve ekonomik substratlar varlığında çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan bakteri kültürlerinin, parçalama ve canlılık aktivitesi en uygun olacak şekilde liyofilizasyon ve farklı saklama koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Saklama koşulları +4°C ve +27°C olarak karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda liyofilizasyon sonrası vakumsuz saklama denemeleride yapılmıştır.

Bu aşı kültürü karışımı belirli taşıyıcılar ile en uygun koşullarda liyofilize edilmiştir. Taşıyıcı olarak, lignoselülozik doğal nişasta bileşenlerinden olmayan bitki materyalleri *Medicago sativa*, *Glycine max* ve *Helianthus annuus* kullanılmıştır. Taşıyıcılar farklı koruyucu maddeler ile eşleştirilip farklı kuru karışım ürün içerikleri oluşturulmuştur.

Elde edilen ürünün 18 ay boyunca biyoparçalama ve canlılık aktivitesi belirlenmiştir. En iyi ürünler sürekli karışimli tank reaktörü'nde (CSTR) aktif çamur sisteminde denenmiştir. CSTR ölçeğinde, toplam kimyasal konsantrasyonları en yüksek 1200 mg/L olacak şekilde TFA, p-TOL ve 4-CBA degradasyonu değerlendirilmiştir. Ürün içerisinde seçili mikroorganizmaların CSTR reaktörde Real-Time PCR ile takibi yapılmıştır. Moleküler sonuçlar *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* ve *Raoutella*'nın en iyi ürün reaktöründe baskın cinsler olduğunu gösterdi. +4°C “yonca” içeriği, tez çalışmasında kullanılan içerikler arasında canlılığını en yüksek düzeyde koruyan grubudur. +4°C'deki en iyi HPLC sonuçlarına baktığımızda TFA (40 mg/L), p-TOL (40 mg/L) ve 4-CBA (30 mg/L)'nın %100 giderimi 4-7 saat içerisinde “yonca”, “ayçiçeği küspesi+skimmilk” ve “soya küspesi” ürün içeriklerinde gerçekleşmiştir. +27°C'de ise en iyi grup “yonca+silika” olmuştur. Ayrıca ekotoksikolojik değerlendirmeler Mikrotoks (Modern Water M500) toksisite ölçüm cihazı verilerine dayanarak yapılmıştır. Biyoparçalanma aktivitesi sonucu oluşan metabolitlerin ekotoksikolojik sonuçları değerlendirildiğinde EC50 eşik değerinin altında kaldığı, toksik olmadığı saptanmıştır. Bu sayede ticarileştirilebilecek, raf ömrü uzun aşı kültürleri elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Biyoaugmentasyon, biyoparçalanma, atık su arıtımı, liyofilizasyon, taşıyıcı kullanarak kurutma, petrokimya endüstrisi.

ABSTRACT**PRODUCING THE MIXED CULTURE ADAPTED FOR THE
WASTEWATER TREATMENT AS A DRY MIXTURE USING VARIOUS
CARRIERS AND DETERMINATING THEIR PRODUCT EFFICIENCY**

ALPAY UYANIKER, Tayyibe

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

December 2020, 248 pages

The demands and needs on the wastewater treatment system have increased significantly over the years in the subjects of removal of inorganic nitrogen and phosphorus, reduction of organic carbon, pathogen removal, breakdown of difficult-to-break xenobiotic compounds. The formation of a microbial community which is capable of effective xenobiotic removal is often impaired by slow or poor adaptation of a slurry present to the compound. This situation is accompanied by impaired removal of N-, P- and C- and sludge settling problems. Within the community, bioaugmentation which means creating new metabolic functions by adding bacteria or genetic information; is a possible method for dealing with these problems. With this study, an adapted, highly effective and high performance inoculation of culture with the degradation capacity of p-toluic acid (p-TOL), 4-carboxybenzaldehyde (4-CBA) and terephthalic acid (TPA) which are found in petrochemical industry wastewater was created, and thereafter in the reactor systems reproduction was carried out in the presence of economic substrates. It is aimed to determine the lyophilization and different storage conditions of the replicated bacterial cultures so that the lysis and viability activity will be optimal. Storage conditions are compared as +4°C and +27°C. At the same time, non-vacuum storage trials were conducted after lyophilization. This reproduced mixed culture is lyophilized with specific carriers under optimal conditions. As carriers, plant materials *Medicago sativa*, *Glycine max* and *Helianthus annuus*, which are not lignocellulosic natural starch components, were used. Carriers were matched with different preservatives and different dry mix product contents were

created. Biodegradation and viability activity of the obtained product was determined for 18 months. The best products have been tested in an activated sludge system in a continuous mixing tank reactor (CSTR). On the CSTR scale, TPA, p-TOL and 4-CBA degradation were evaluated with total chemical concentrations of the highest 1200 mg/L. The selected microorganisms in the product were monitored by real-time PCR in the CSTR. Molecular results showed that *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* and *Raoutella* were the dominant strains in the top product reactor. The content of +4°C “clover” is the group that preserves its vitality at the highest level among the contents used in the thesis study. When we look at the best HPLC results at +4°C, 100% removal of TPA (40 mg / L), p-TOL (40 mg / L) and 4-CBA (30 mg / L) within 4-7 hours, “clover”, “sunflower meal + skimmilk” and “soybean meal” product contents. At +27°C, the best group was "clover + silica" content. In addition, ecotoxicological evaluations were made on the basis of Microtox (Modern Water M500) toxicity measurement device data. When the ecotoxicological results of the metabolites which are formed as a result of biodegradation activity, were evaluated, it was found that they were below the EC50 threshold level and were not toxic. In this way, inoculation cultures with long shelf life that can be commercialized were obtained.

Keywords: Bioaugmentation, biodegradation, wastewater treatment, lyophilization, drying using carriers, petrochemical industry.

ÖNSÖZ

Biyoaugmentasyon, saf bakteri kültürleri yerine karışık konsorsiyum kullanılarak yapılır. Bunun nedeni, hidrokarbon karışımına yönelik bozunma işlemlerinin ardışık aşamalarında farklı bakteri türlerinin yer almasıdır. Doğal bakterilerle biyoaugmentasyon avantajlıdır, bunun nedeni her bakteri topluluğunun yaşadığı ortama özel olarak adapte olmasıdır. Bakteriler doğal ortamlarına benzer koşullarda tutulduğunda kirleticileri en hızlı şekilde tüketirler. Doğal bakterilerle, kirletici maddelerin mikrobiyal uzaklaştırma süreci, daha fazla besleyici veya fiziksel ve kimyasal değişiklik gerekmeden, doğal mikroorganizmalar biyoremediasyon sistemine dahil edilir edilmez başlayabilir.

Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR ile birlikte hocamın daha önce konuyla ilgili gerçekleştirmiş olduğu çalışmaların çıktılarını değerlendirerek mikrobiyal metabolizmayı geliştirmek ve verimli, uygun maliyetli, çevre dostu bir teknik ile ürün elde edebilmek üzere yola çıktık. Daha önceki yıllarda, Petkim Petrokimya Holding A.Ş. biyolojik arıtma tesislerinde gerçekleştirilen çalışmalardan olumlu sonuçlar alınması ve bu ürünlerin sanayide kullanılması üzerine, derinlemesine çalışmaya başladık. Bu tip yararlı bakteriler ülkemizde bulunan çeşitli tesislerde zaman zaman kullanılmaktadır. Ancak bu tip ticari bakterilerin kullanılması sınırlıdır. Ticari olarak geliştirilen bu bakterilerin hidrokarbon parçalama özellikleri bir süre sonra yok olduğundan birkaç çoğaltımdan sonra organizma etkinliğini ve aktivitesini kaybetmektedir. Bu yüzden sanayi kuruluşları devamlı olarak bu bakterileri satın almak zorunda bırakılmakta ve bunun sonucunda ülkemiz ekonomisi açısından ciddi maddi kayıplara neden olmaktadır. Prosesin ekonomik boyutu düşünüldüğünde bakteri popülasyonunun öz kaynaklarımızca geliştirilerek sanayi kuruluşlarına sunulması gerekliliği çarpıcı bir şekilde ortaya çıktı.

Bu tip çözümleri üretebilecek bilgi birikiminin ülkemizde olmadığı kanaatine her zaman olup, çözüm ithal teknolojilerde aranmaktadır. Ülkemiz sınırları içerisinde kendi ürünümüzü kendimiz üretebileceğimiz kanısı ile çalışmalara başladık. Bu

noktada kendimize inancımız ve güvenimiz hem bilimsel hem de kişisel anlamda tamdı.

Toz halde raf ömrü yüksek kararlı bir halde kullanılabilecek hazır bir materyal elde ettik. Ülkemiz adına oldukça yararlı ekonomik ve ticari faydalar getireceği beklentisindeyim. Çalışmamın her aşamasında heyecan duydum. Danışman hocamın destekleri ile gerçekleştirdiğim bu çalışma konusu ile ‘Doktor’ ünvanını alıyor olmak benim için büyük bir mutluluk ve gurur kaynağı olacaktır.

İzmir, 28/12/2020

Tayyibe ALPAY UYANIKER

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Petrokimya Endüstrisi Atık Suları	4
2.1.1 PTA Atık Suları	5
2.2. Petrol Rafinerileri ve Petrokimya Tesisleri (PRPP) Atık Su Kalite ve Deşarj Yönergeleri	7
2.3. Petrol Hidrokarbonları	8
2.4. Petrol Sızıntıları	11
2.5. Petrol Sızıntısı Sonrası Oluşan Etkiler	13
2.6. Toplam Petrol Hidrokarbonlarının Toksisitesi	15
2.6.1. TPH'lerin Kara ve Deniz Canlıları Üzerindeki Toksisitesi	15
2.6.2. TPH'lerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksisitesi.....	16
2.7. Petrol Hidrokarbonları Kirleticilerinin Giderilmesi	19
2.8. Petrol Hidrokarbonlarının Biyodegradasyonu.....	20
2.9. Ftalat İzomerleri Biyodegradasyonu.....	22
2.9.1. Ftalat İzomerlerinin Aerobik Biyodegradasyonu	23
2.9.2. Ftalat İzomerlerinin Anaerobik Biyodegradasyonu.....	25
2.9.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Biyodegradasyonu	27
2.10. Biyoaugmentasyon Yaklaşımları.....	29
2.9.1. Biyoaugmentasyon	29
2.9.1.1. Biyoaugmentasyon için Suş Seçimi.....	29
2.9.1.2. Biyoaugmentasyonun Başarısızlıkları ve İyileştirme Teknikleri	31
2.9.1.3. Biyoaugmentasyon İzleme Teknikleri.....	33
2.9.2. Biyostimülasyon	36

2.9.3. Fitoremediasyon.....	37
2.9.4. Kompostlama Teknolojisi	37
2.10. Aktif Çamur Sistemi	38
2.10.1. Aktif Çamur Sisteminde Mikrobiyal Populasyon	41
2.10.2. Askıda Katı Madde (AKM)	44
2.10.3. Hidrolik Alıkonma Süresi (HRT)	44
2.10.4. Çamur Hacim İndeksi (ÇHİ).....	44
2.10.5. Çamur Yaşı	44
2.11. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR	46
2.12. Mikroorganizmaları Saklama Stratejileri.....	48
2.12.1. Pasajlama	49
2.12.2. Kültürlerin Mineral Yağ ile Kaplanması	49
2.12.3. Dondurarak Saklama.....	50
2.12.4. Liyofilizasyon	51
2.12.4.1. Liyofilizasyon Basamakları	52
2.12.4.2. Liyofilizasyonda Koruyucu Kullanımı	54
2.12.4.3. Liyofilizasyon Sonrası Saklama ve Yeniden Canlandırma.....	55
2.13. Mikrobiyal Aşı Kültürü için Taşıyıcılar.....	55
2.14. Kontamine ve İyileştirilmiş Alanlarda Toksisiteyi Değerlendirmek için Bioassay Kullanımı	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	60
3.1. Gereç	60
3.1.1. Mikroorganizmalar.....	60
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar.....	61
3.1.2.1. Mikrobiyal Ortamlar	61
3.1.2.2. Kullanılan Kimyasallar	65
3.1.2.3. Taşıyıcı Materyal	66
3.1.2.4. Koruyucu Materyal	67
3.1.2.5. Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline - PBS) (1X, pH 7.4) ...	67
3.1.2.6. Sentetik Atık su İçeriği	68
3.1.2.7. Nükleik Asitlerin Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar.....	69

3.1.2.8. DNA İzolasyon Kiti.....	70
3.1.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kiti	70
3.1.2.10. Toksisite Analiz Komponentleri.....	70
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	70
3.2. Yöntem	74
3.2.1. Mikrobiyal Suşların İzolasyonu.....	74
3.2.2. Biyoparçalama Etkinlik Çalışmaları.....	75
3.2.3. Kromatografi Yöntemleri	76
3.2.3.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Metodu.....	76
3.2.3.2. Gaz kromatografisi (GC) Metodu.....	77
3.2.3.3. Standart Eğri Oluşturulması	78
3.2.3.4. Hidrokarbonların Ekstraksiyonu.....	83
3.2.4. Biyoparçalama Etkinliğine Göre Seçilen Mikroorganizmaların Tanılanması..	83
3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması.....	83
3.2.5.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	83
3.2.5.2. DNA Miktar Ölçümü ve Saflık Kontrolü	85
3.2.5.3. Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi ile Görüntülenmesi	85
3.2.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR)	86
3.2.5.5. PCR Ürünlerinin Dizi Analizleri	88
3.2.6. Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması.....	89
3.2.7. Biyoreaktör Koşullarının Belirlenmesi ve Mikroorganizmaların Üretimi	89
3.2.8. Karışım Ürünün Liyofilizasyon Yöntemi ile Kurutulması.....	90
3.2.8.1. Liyofilizasyon Koşulları	90
3.2.8.2. Liyofilizasyon Sonrası Viallerin Saklama Koşulları	92
3.2.8.3. Liyofilize Kuru Karışım Ürünlerin Reaktivasyonu	92
3.2.9. Taşıyıcı Ön Denemeleri.....	94
3.2.10. Kuru Karışım Hazırlama.....	96
3.2.11. Raf Ömrü Çalışmaları.....	99
3.2.11.1. Ürünün Mikroorganizma Canlılığının Belirlenmesi.....	100
3.2.11.2. Ürünün Biyoparçalama Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	100

3.2.11.3. Ürünün Biyoparçalama Aktivitesi Sonucu Ortaya Çıkan Metabolitlerin Ekotoksikolojik Değerlendirilmesi	101
3.2.12. Etkinliği En İyi Ürünlerin Petrokimya Endüstrisi Atık Suyunda Denenmesi	103
3.2.12.1. Reaktörlerin kurulumu ve stabilizasyonu, aktif çamur olgunlaştırma	103
3.2.12.2. CSTR içinde biyoaugmentasyon uygulaması	106
3.2.12.3. Hedef kimyasalların tank reaktör içerisine eklenmesi	107
3.2.12.4. Tank reaktör çıkış sularının ekotoksikolojik değerlendirilmesi.....	108
3.2.12.5. Liyofilize katı karışımın Real Time PCR ile takibi yapılarak organizmaların varlığının kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi.....	108
4. BULGULAR.....	120
4.1. İzolatların Eldesi ve Tanılanması.....	120
4.2. Mikroorganizmaların Moleküler Karakterizasyonu.....	122
4.3. Büyüme Eğrisi Sonuçları	125
4.4. Karışım Ürünün Liyofilizasyon Yöntemi ile Kurutulması Öncesi - Sonrası Viallerin Ağırlıkları.....	127
4.5. Taşıyıcı-Koruyucu Ön Denemeleri Sonuçları.....	129
4.6. Raf Ömrü Çalışmaları Sonuçları.....	131
4.6.1. Raf Ömrü Çalışmaları Sonrasında Ürünün Canlılık Sayım Sonuçları.....	131
4.6.2. Raf Ömrü Çalışmaları Sonrasında Ürünün Biyoparçalama Aktivite Sonuçları	139
4.7. Mikrotox Sonuçları	177
4.8. Etkinliği En İyi Ürünlerin Petrokimya Endüstrisi Atık Suyu Deneme Sonuçları	180
4.8.1. CSTR İçinde Ürünlerin Biyoparçalama Aktivitesi Sonuçları.....	181
4.8.2. Real Time PCR Sonuçları	191
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	198
6. ÖNERİLER.....	216
KAYNAKLAR	217
TEŞEKKÜR.....	245
ÖZGEÇMİŞ	246

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 p-Ksilen oksidasyonu sonucu PTA ve TFA oluşum reaksiyonu.....	6
Şekil 2.2 p-Ksilen oksidasyonu sonucunda oluşan bileşikler.....	6
Şekil 2.3 Petrol hidrokarbonları grupları.....	11
Şekil 2.4 İlk on global petrol sızıntısı.....	13
Şekil 2.5 Suda meydana gelen petrol sızıntısının etkileri.....	14
Şekil 2.6 TPH'lerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri.....	18
Şekil 2.7 Ftalat izomerlerinin aerobik biyodegradasyon mekanizması	24
Şekil 2.8 Anaerobik FA degradasyonunda rol oynayan genler, enzimler ve metabolitler	26
Şekil 2.9 Acinetobacter sp. AGAT-W suşu Tarafından asenaften degradasyonu için önerilen yol	28
Şekil 2.10 Aktif çamur sistemi.	39
Şekil 2.11 Göreceli üstünlük diyagramı	45
Şekil 2.12 q-PCR için tespit kimyasalları.....	47
Şekil 2.13 Liyofilizasyon işlem basamakları.....	53
Şekil 2.14 Liyofilizasyon süreci	54
Şekil 3.1 HPLC cihazında oluşturulan PTA grubu kimyasalların standart eğri grafikleri	80
Şekil 3.2 HPLC cihazında oluşturulan PAH grubu kimyasalların standart eğri grafikleri	81
Şekil 3.3 GC cihazında oluşturulan PAH grubu kimyasalların standart eğri grafikleri	82
Şekil 3.4 Aşı kültürü üretiminde kullanılan biyoreaktör sistemi.....	90

Şekil 3.5 Biyoparçalama etkinliği analizi öncesi izlenecek adımlar.....	93
Şekil 3.6 Öğütücü ve elek sistemleri; yonca öğütülürken görüntüsü.....	94
Şekil 3.7 Kuru karışım için öğütülmüş taşıyıcılardan sırasıyla; soya, ayçiçeği küspesi (yüksek proteinli), ayçiçeği küspesi (düşük proteinli), zeolit	96
Şekil 3.8 Microtox Modern Water M500 Cihazı	101
Şekil 3.9 Reaktörün Şematik Gösterimi.....	104
Şekil 3.10 CSTR sistemi genel görünüşü.....	106
Şekil 3.11 Tez çalışmasında kullanılan Real-time PCR cihazı.....	119
Şekil 4.1 PCA’da petri görüntüleri	121
Şekil 4.2 PCA’da petri görüntüleri	121
Şekil 4.3 Genomik DNA izolasyon agaroz jel sonuçları	122
Şekil 4.4 Mikroorganizmaların büyüme eğrisi grafikleri.....	126
Şekil 4.5 Farklı içeriğe sahip bir grup vialin liyofilizasyon sonrası görünümü	129
Şekil 4.6 Öğütülmüş soya, ayçiçeği ve yoncanın stereomikroskop görüntüsü	130
Şekil 4.7 Koruyucu ön deneme 1.ay ve 2.ay canlılık sonuçları	131
Şekil 4.8 Yonca içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları.....	132
Şekil 4.9 Ayçiçeği içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları.....	133
Şekil 4.10 Soya içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları	134
Şekil 4.11 Taşıyıcısız kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları	134
Şekil 4.12 Vakumsuz kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları	135
Şekil 4.13 Yonca içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları.....	136
Şekil 4.14 Ayçiçeği içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları.....	136
Şekil 4.15 Soya içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları	137

Şekil 4.16 Taşıyıcısız kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları.....	138
Şekil 4.17 Vakumsuz kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları.....	138
Şekil 4.18 Adapte aşı kültürünün +4°C liyofilizasyon işlemi öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu.....	140
Şekil 4.19 Adapte aşı kültürünün +27°C liyofilizasyon işlemi öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu.....	140
Şekil 4.20 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği	143
Şekil 4.21 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği	143
Şekil 4.22 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği.....	144
Şekil 4.23 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği.....	144
Şekil 4.24 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği.....	145
Şekil 4.25 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği	145
Şekil 4.26 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği	146
Şekil 4.27 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği	146
Şekil 4.28 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği.....	147

Şekil 4.29 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	148
Şekil 4.30 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	148
Şekil 4.31 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	149
Şekil 4.32 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	149
Şekil 4.33 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	150
Şekil 4.34 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	150
Şekil 4.35 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	151
Şekil 4.36 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	151
Şekil 4.37 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği	152
Şekil 4.38 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	153
Şekil 4.39 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	153
Şekil 4.40 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	154
Şekil 4.41 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	155

Şekil 4.42 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği.....	156
Şekil 4.43 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	156
Şekil 4.44 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	157
Şekil 4.45 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği	158
Şekil 4.46 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikalı (c)'ye ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği.....	158
Şekil 4.47 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	160
Şekil 4.48 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	160
Şekil 4.49 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği.....	162
Şekil 4.50 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği.....	162
Şekil 4.51 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği.....	164
Şekil 4.52 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	164
Şekil 4.53 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	165
Şekil 4.54 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	166

Şekil 4.55 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ye ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği	166
Şekil 4.56 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	168
Şekil 4.57 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	168
Şekil 4.58 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	170
Şekil 4.59 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	170
Şekil 4.60 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	172
Şekil 4.61 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	172
Şekil 4.62 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	174
Şekil 4.63 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	174
Şekil 4.64 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikalı (c)'ye ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği	175
Şekil 4.65 Mikrotoks cihazı ile referans mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen toksisite analiz sonuçları	179
Şekil 4.66 Pozitif kontrol olarak sodyum azid (NaN ₃) analiz sonucu.....	179
Şekil 4.67 Mikrotoks, 18.ay sonuçları	180
Şekil 4.68 Tank reaktör çıkış örnekleri toksisite analiz sonucu.....	180

Şekil 4.69 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	181
Şekil 4.70 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	182
Şekil 4.71 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	182
Şekil 4.72 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	183
Şekil 4.73 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	183
Şekil 4.74 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	184
Şekil 4.75 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	184
Şekil 4.76 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	185
Şekil 4.77 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	185
Şekil 4.78 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	186
Şekil 4.79 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	186
Şekil 4.80 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	187
Şekil 4.81 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği	187

Şekil 4.82 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği.....	188
Şekil 4.83 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği.....	188
Şekil 4.84 Kontrol tank reaktörüne ait biyoparçalama etkinliği sonuçları	191
Şekil 4.85 <i>Acinetobacter sp.</i> ve <i>P.fluorescens</i> izolatına ait standart eğri grafikleri .	192
Şekil 4.86 <i>R.planticola</i> ve <i>C.testosteroni</i> ve izolatlarına ait standart eğri grafikleri.	192
Şekil 4.87 <i>Chryseobacterium sp.</i> ve <i>M.luteus</i> izolatlarına ait standart eğri grafikleri	193
Şekil 4.88 <i>P.putida</i> izolatı ve total bakteriye ait standart eğri grafikleri	193
Şekil 4.89 <i>Aeromonas sp.</i> ve <i>A.nicotianae</i> izolatlarına ait standart eğri grafikleri..	193
Şekil 4.90 Liyofilize ürün olarak yonca’nın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi.....	194
Şekil 4.91 Liyofilize ürün olarak soya’nın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi.....	195
Şekil 4.92 Liyofilize ürün olarak ayçiçeği+skim milk’in kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi	196
Şekil 4.93 Kontrol reaktöründen alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi	197

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 PRPP atık sularında yaygın olarak ölçülen su kalite parametrelerinin listesi ve WBG atık deşarj kılavuzları.....	7
Tablo 2.2 Petrol Sanayii (Hidrokarbon Üretim Tesisleri)	8
Tablo 2.3 Petrol Sanayii (Petrol Rafinerileri ve Benzerleri)	9
Tablo 2.4 Petrol Sanayii (Petrol Dolum Tesisleri ve Benzerleri)	9
Tablo 2.5 Kirlетici petrol hidrokarbonlarını parçalayan mikroorganizmalar	22
Tablo 2.6 Biyoaugmentasyon başarısızlıklarının nedenleri ve olası iyileştirme teknikleri	32
Tablo 2.7 Bioaugmentasyon İzleme Teknikleri.....	34
Tablo 2.8 Aktif çamur mikroorganizma grupları	42
Tablo 2.9 Standart aktif çamurdaki bakterilerin aerobik heterotrofik dağılımı.....	43
Tablo 3.1 Organizmalar ve organizmalara ait izolat kodları	60
Tablo 3.2 Bushnell Haas Broth içeriğı	62
Tablo 3.3 Bushnell Haas Agar içeriğı.....	62
Tablo 3.4 Plate Count Agar içeriğı	63
Tablo 3.5 Nutrient Broth ve Nutrient Agar içeriğı	64
Tablo 3.6 Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	65
Tablo 3.7 Taşıyıcılar ve miktarları	66
Tablo 3.8 Koruyucuların son konsantrasyonları ve sterilizasyon koşulları.....	67
Tablo 3.9 PBS Solüsyonu.....	68
Tablo 3.10 Sentetik atık su içeriğı	68
Tablo 3.11 50X TAE içeriğı	69
Tablo 3.12 HPLC Protokolleri.....	77

Tablo 3.13 GC Protokolleri.....	78
Tablo 3.14 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Primerler Setleri.....	86
Tablo 3.15 Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü.....	87
Tablo 3.16 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaksiyon Basamakları.....	87
Tablo 3.17 Liyofilizasyon işlem basamakları	91
Tablo 3.18 Raf Ömrü Çalışmaları için Hazırlanan Vial İçerikleri.....	97
Tablo 3.19 Taşıyıcısız Hazırlanan Vial İçerikleri	98
Tablo 3.20 Viallere Ait Kodlamalar	99
Tablo 3.21 Tank reaktörde çalışılan kimyasal konsantrasyonları.....	107
Tablo 3.22 Real-time PCR analizlerinde kullanılan primer setleri	109
Tablo 3.23 Real-time PCR’da SYBR Green Ampliqon kiti ile yapılan primerlere ait PCR protokolü.....	111
Tablo 3.24 TaqMan probu ile gerçekleştirilen PCR protokolü	114
Tablo 3.25 SYBR Green için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları	115
Tablo 3.26 TaqMan probu için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.....	115
Tablo 3.27 Ligasyon işlemi için hazırlanan standart reaksiyon karışım içeriği.....	116
Tablo 4.1 HPLC sonuçlarına göre izolatların etkinlik gösterdiği kimyasallar	120
Tablo 4.2 Tanılanan strainlerin genus ve tür düzeyindeki isimleri.....	123
Tablo 4.3 Seçilen strainlerin genus ve tür düzeyindeki isimleri	125
Tablo 4.4 +4°C’de saklanacak boş vial ve liyofilizasyon öncesi - sonrası ölçülen vial ağırlıkları.....	127
Tablo 4.5 +27°C’de saklanacak boş vial ve liyofilizasyon öncesi - sonrası ölçülen vial ağırlıkları.....	128
Tablo 4.6 Yonca, soya, ayçiçeği (düşük ve yüksek proteinli) ve zeolite ait ön deneme sonuçları	130

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
WWTP	Atık su arıtma tesisi
MEOR	Mikrobiyal olarak geliştirilmiş petrol geri kazanımı
BOİ5	Biyolojik oksijen ihtiyacı standartlaştırılmış deneyi
q-PCR	Real-Time PCR - Kantitatif PCR
MGE	Mobil genetik element
HTS	Yüksek verimli sıralama
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PTA	Saflaştırılmış tereftalik asit



1. GİRİŞ

Günümüzde geleneksel aktif çamur sistemleri hala yaygın olarak atıksu arıtım tesislerinde kullanılmaktadır ve onlar genellikle atıksuyun kolay parçalanabilir bileşikleri için iş gören sistemlerdir. Ancak rekalsitrant bileşiklerin bu sistemlere aniden girişi veya giriş suyunda onların oranının artması sistemi başarısızlığa uğratmaktadır. Bu sistem düşüklüğü başlıca bu rekalsitrant bileşikleri parçalama kabiliyetindeki bakteri popülasyonundaki azalmadan ya da uygun işlevdeki mikroorganizma eksikliğinden dolayıdır. Birçok endüstriyel atık, mikroorganizmalara yabancı olan ve mikroorganizmalarca parçalanmaya dirençli olan insan yapımı kimyasalları içerebilir.

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

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

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

Biyoaugmentasyon, istenmeyen bileşiklerle kontamine olmuş tehlikeli atık bölgelerinde yerli - yabancı veya genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar ile bu bileşiklerin uzaklaştırılmasını hızlandıran bir prosestir (Limbergen et al. 1998).

Bu prosesin avantajları;

- BOİ5 ve KOİ uzaklaştırılmasını hızlandırılması
- Gres, Oil, Yağ, ve spesifik bileşikler uzaklaştırılması
- Artan nitrifikasyon
- Filamentöz şişmenin kontrolü
- Soğuk havalarda performans artırılması
- Sistemin arıtım kapasitesinin artırılması
- Azalan çamur üretimi
- Kontamine olmuş suların biyoremediasyonu şeklinde belirtilebilir.

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

En fazla doğaya karışan ve parçalanması sorun olan bileşikler; uçucu aromatikler; alkanlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlardır. Uçucu aromatiklerin çevrede kalma süreleri kısa olduğu için özellikle alkanlar ve polisiklik aromatiklerin biyoaugmentasyonu ile ilgili olarak dünya da pek çok başarılı çalışmalar yapılmıştır.

2003 yılında yapılan bir çalışmada, 3 kloroanilin şok yüklemeye karşın aktif çamur bünyesinde bulunan mevcut mikrobiyal yapıyı korumak amacıyla bir araç olarak

bioaugmentasyon prosesini çalışmışlardır. Denemelerinde nitrifikasyon, karbon uzaklaştırılması gibi fonksiyonlardaki değişiklikleri çamurdaki mikrobiyal kommunité yapısı ile ilişkili olarak incelemişler ve bu amaçla yapısal incelemeleri Floresan Yerde hibridizasyon (Fluorescent In Situ Hybridization - FISH), Eş zamanlı (Real time) PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroföresi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE) cihazlarını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar, bakteri inokulasyonu yapılan tesiste şok yükleme yapıldığı zamanlarda organizmalar tarafından 3 kloroanilin mineralizasyonunun yapıldığını ve hızlı bir nitrifikasyon dönüşümü olduğunu saptamışlardır (Boon et al. 2003).

(Ma et al. 2009), geliştirdikleri bir bakteri karışımını uygulayarak çeşitli hidrokarbon içeren Petrokimya atıksuyu biyoaugmentasyonunu gerçekleştirmiş ve uygulama yaptıkları aktif çamur tesisinde 20 gün sonra %84,2; biyoaugmentasyon uygulanmamış aktif çamur tesisinde ise %74,4 oranında KOİ uzaklaştırımı gerçekleştiğini saptamışlardır.

Birçok şirket tarafından farklı özellikteki bakteriler kullanım alanlarına göre satılmaktadır. Bu ürünler, farklı karakterdeki atıkları veya parçalanması zor bileşikleri parçalayan bakterileri içermektedirler.

Yapılan tez çalışmasında; Saflaştırılmış Tereftalik asit (Purified Terephthalic acid - PTA) atık suyu ana bileşenlerini ve polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH'lar) biyoparçalama yeteneğinde ki yeni organizmaların izolasyonu ve moleküler tanımlanması, daha sonra bu izolatların Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) tereftalik asit, p-toluik asit ve 4-karboksibenzaldehit biyoparçalama aktivitelerinin belirlenmesi, en iyi biyoparçalama etkinliği gösteren izolatlar ile karışım elde edilip, raf ömrünün uzatılması amacıyla uygun koruyucularla liyofilize edilerek kurutulması, kuru ürünün +4°C ve +27°C 'de 18 aya kadar raf ömrü çalışmaları, bu çalışmaların sonucunda biyoparçalanma, canlılık aktivitelerinin belirlenmesi ve en iyi ürünün Sürekli Karıştırılmalı Tank Reaktör (Continuous stirred tank reactor - CSTR) içerisinde aktif çamur sisteminde denenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, mikroorganizmaların, q-PCR ile aktif çamur sisteminde takibinin yapılması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Petrokimya Endüstrisi Atık Suları

Petrol ve diğer enerji kaynaklarına olan ihtiyaç, nüfus artışı ve dünya çapındaki ekonomik gelişme ile artmaktadır. 2035 yılına kadar küresel enerji talebinin mevcut seviyeden %37 artması bekleniyor (Outlook 2012) ve bu enerji talebinin büyük bir kısmı petrol ürünlerine dayanmaktadır. Petrol endüstrisi kabaca dört sektöre ayrılabilir: 1) araştırma, geliştirme ve üretim; 2) hidrokarbon işleme (rafineriler ve petrokimya fabrikaları); 3) depolama, nakliye ve dağıtım; ve 4) perakende veya pazarlama (Jafarinejad 2016). Bu dört sektör aynı zamanda yukarı akış (upstream), orta akış (midstream) ve aşağı akış (downstream) süreçleri olarak da bilinir (Macini and Mesini 2008).

Dünya çapında petrol rafinerileri ve petrokimya tesisleri (Petroleum refinery and petrochemical plants - PRPPs) ham petrolü kullanarak 2500'den fazla farklı türde değerli ürün üretmektedir (Mariano and La Rovere 2017). 2005 yılında 84,7 milyon varil (mbpd) iken, 2015 yılında dünya genelinde günde yaklaşık 95 mbpd petrol tüketildi (Macini and Mesini 2008). Gerekli su miktarı ve üretilen atık su, tesisin büyüklüğüne, kullanılan ham petrol türüne, üretilen ürünlere ve operasyonun karmaşıklığına bağlıdır (Alva-Argáez et al. 2007). PRPP'ye verilen suyun, nihai ürüne katılmadığı için %80 - %90'ının atık su olarak çıktığı tahmin edilmektedir (Coelho et al. 2006). Coelho et al.'e göre (EcA 2010), petrol rafinerisi prosesleri, işlenen ham petrol hacminin yaklaşık 0,4-1,6 katı atık su üretir.

Atık sular, PRPP'de farklı proses ve operasyonlarda üretilir. Bazı atık sular, doğrudan buharın kondense olmasıyla veya prosesin içindeki çeşitli ekipmanlarda kullanımı sonrası üretilir. Diğerleri ise soğutma kulesi boşaltma prosesinde, pompa ve kompresörlerin soğutmalarında ortaya çıkmaktadır. Kimyasal çözücüler, ham petrol ile kontamine olmuş ve utilite alanlarda toplanan yüzeyden akan yağmur suları, PRPP'nin diğer önemli çevre kirleticileri arasındadır. Büyük çaptaki PRPP'ler de önemli miktarda sıhhi atık su üretiyor. Bu çeşitli atık su türleri bazı durumlarda birleştirilebilir ve arıtma işlemleri sırasında da ayrılabilir (Jafarinejad 2017).

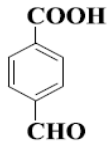
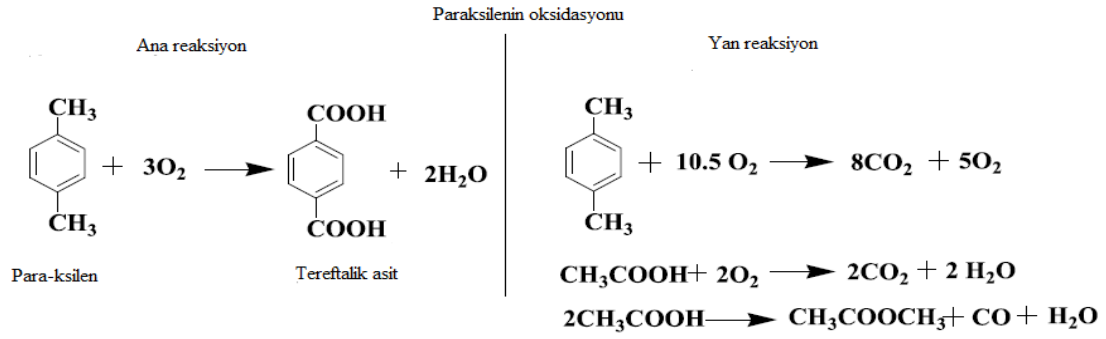
PRPP'den gelen atık suyu yönetmek için etkili atık su arıtma ve yeniden kullanım teknolojilerinin çok önemli olduğu açıktır (Jafarinejad and Jiang 2019). Bu tür teknolojiler petrol endüstrileri için faydalıdır: 1) suyun geri dönüşümü ile ek su kaynağı sağlamak, 2) ham petrol geri kazanımının iyileştirilmesi ve 3) çevreye olan etkinin azaltılması ve iyileştirilmesi. Geri dönüşüm, yeniden kullanım ve azaltma (3R) stratejisi, gelecekteki PRPP WWTP'lerin tasarımı ve işletimi için temel bir prensip olarak dahil edilmelidir (Jafarinejad and Jiang 2019).

2.1.1 PTA Atık Suları

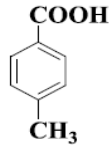
Saflaştırılmış tereftalik asit (PTA), tekstil lifleri, filmler ve gıda saklama ambalaj maddeleri gibi hayatımızda birçok değerli uygulamalara sahip olan polietilen tereftalat (PET) üretimi için en önemli petrokimya hammaddelerinden biridir (Razo-Flores et al. 2006).

Ülkemizde PTA üretimi PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. tarafından gerçekleştirilmektedir. 1987 yılında işletmeye alınan tesisin başlangıç kapasitesi 70.000 ton/yıl'dır. 2015 yılında fabrikanın kapasitesi yıllık 105.000 ton/yıl'a ulaşmıştır. Ülkemizde PTA; Polyester elyafı (dacron, terilen, perilen, trevira gibi ipliklerin imalinde), polyester film ve polyester reçine yapımında kullanılmaktadır. p-Ksilen oksidasyonu sonucu TFA ve PTA oluşumu gerçekleşir. Şekil 2.1'de gösterilmiştir. ((Verma et al. 2011;Garg et al. 2017); **PETROKİMYA**, Sektörel Atık Kılavuzları, 2016) Şekil 2.2.'de p-Ksilenin oksijen ile tereftalik aside yükseltgenmesinde oluşan bileşikler gösterilmiştir.

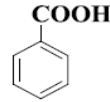
Üretim sonrasında çoğunluğu tereftalik asit, para-toluik asit, benzoat, asetat ve 4-karboksibenzaldehit'dan oluşan yüksek konsantrasyonlarda organik yan ürünler içeren atık su üretilmektedir (Kleerebezem et al. 1999;Razo-Flores et al. 2006;Tomás et al. 2013). Fitalat esterleri; toprak sediment veya yüzey suları gibi çeşitli ortamlarda, anoksik, anaerobik veya aerobik şartlarda biyolojik olarak parçalanabilmektedir (Liang et al. 2007).



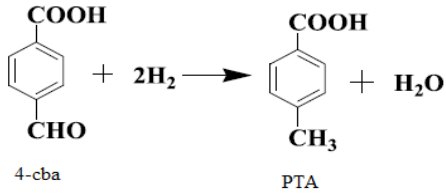
4-cba



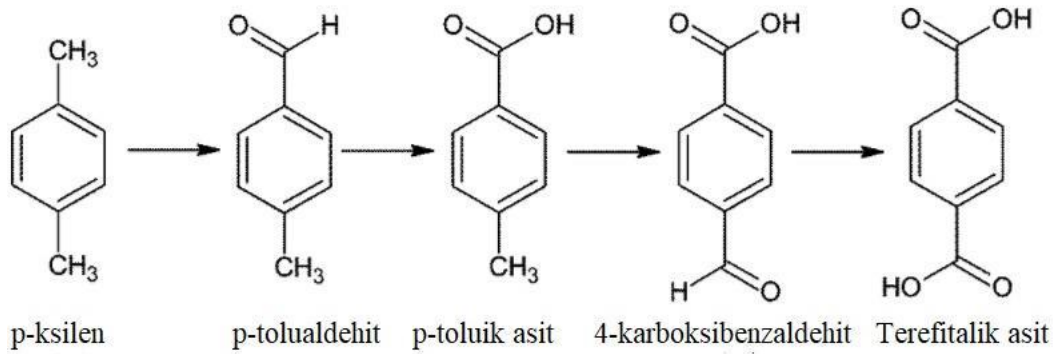
p-tol



benzoik asit



Şekil 2.1 p-Ksilen oksidasyonu sonucu PTA ve TFA oluşum reaksiyonu



Şekil 2.2 p-Ksilen oksidasyonu sonucunda oluşan bileşikler

2.2 Petrol Rafinerileri ve Petrokimya Tesisleri (PRPP) Atık Su Kalite ve Deşarj Yönergeleri

PRPP atık suyu ile ilişkili uzun bir organik ve inorganik kirletici listesi vardır. Yağ ve gres (Y&G), toplam hidrokarbon içeriği (THC), toplam petrol hidrokarbon (TPH) indeksi, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ), çözünmüş BOİ (ÇBOİ), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), çözünmüş kimyasal oksijen ihtiyacı (ÇKOİ), toplam organik karbon (TOK), amonyağın içerdiği nitrojen, toplam nitrojen, toplam askıda katı madde (AKM), toplam çözünmüş katı (TDS) ve toplam metaller gibi su kalite parametreleri genellikle su kalitesini karakterize etmek için toplu ölçümler olarak kullanılır (Orszulik 2008). Siyanür, fenol, benzen, toluen, etilbenzen ve ksilen (BTEX) gibi belirli organikler, Cd, Ni, Hg, Pb ve vanadyum gibi özel metaller ve florürler, fosfatlar, sülfürler, klorürler ve diğer mikro kirleticiler gibi inorganikler bazı çalışmalarda ölçülmüştür (El-Naas et al. 2014). Genel fiziksel parametreler (pH (asitler, alkaliler), sertlik, bulanıklık, ısı, tat ve koku üreticiler) bazı durumlarda su kalitesi göstergeleri olarak kullanılır (Nacheva 2011). PRPP'den elde edilen literatür taraması ve izleme verileri, PRPP atık sularının kalitesinin, PRPP'de kullanılan proseslere ve ham petrolün özelliklerine bağlı olduğunu ve ayrıca tesisten tesise önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir (Schultz 2007). Tablo 2.1, tipik PRPP atık su kalite parametrelerinin aralığını ve Dünya Bankası Grubu (WBG) tarafından sağlanan atık su deşarj kılavuzlarını özetlemektedir (Schneider et al. 2011).

Tablo 2.1 PRPP atık sularında yaygın olarak ölçülen su kalite parametrelerinin listesi ve WBG atık deşarj kılavuzları

	Tipik PRPP Atık suyu	WBG Kılavuzları
	mg/L	mg/L
Y&G	12.5 – 20223	10
BOİ	90 – 685	30
KOİ	300 – 600	125
AKM	28.9 – 950	30
Fenol	0.2 – 200	0.2
pH	6.7 - 10.8	6 – 9
Bulanıklık	10.5 - 159.4 (NTU)	
BTEX	1 -100	
Benzen		0.05
Benzo (a) piren		0.05
Toplam siyanür		1
Serbest siyanür		0.1
Ağır metaller	0.01 – 100	

Toplam krom		0.5
Hekzavalent krom		0.05
Bakır		0.5
Demir		3
Kurşun		0.1
Nikel		0.5
Cıva		0.03
Arsenik		0.1
Vanadyum		1
Toplam N		10
Toplam P		2
Sülfür		0.2
Sıcaklık		<3

T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Su Kontrolü Kirliliği Yönetmeliği'nde endüstriler üretim tiplerine göre gruplandırılarak sektörler oluşturulmuştur. Petrol Sanayii atık sularının alıcı ortama deşarj standartları Tablo 2.2, 2.3, 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.2 Petrol Sanayii (Hidrokarbon Üretim Tesisleri)

Parametre	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
KOİ	(mg/L)	300	250
AKM	(mg/L)	200	100
Y&G	(mg/L)	20	10
HİDROKARBONLAR	(mg/L)	15	10
Amonyum Azotu (HN4-N)	(mg/L)	20	10
Sodyum (Na)	(mg/L)	250	200
Serbest Klor (Cl)	(mg/L)	0.3	-
Sülfat (SO₄)	(mg/L)	2000	1700
Demir	(mg/L)	10	8
Fenoller	(mg/L)	2	1
Toplam Siyanür (CN-)	(mg/L)	1	0.5
Sülfür (S⁻²)	(mg/L)	2	1
Cıva (Hg)	(mg/L)	-	0.05
Kadmiyum (Cd)	(mg/L)	0.15	0.10
Çinko (Zn)	(mg/L)	1	0.5
Kurşun (Pb)	(mg/L)	1	0.5
Krom (Cr⁺⁶)	(mg/L)	0.5	0.2
Bakır (Cu)	(mg/L)	1	0.5
Balık Biyodeneyi (ZSF)	-	6	4
pH	-	6-9	6-9
(Ek satır:RG-24/4/2011 27914) Renk	(Pt-Co)	280	260

Tablo 2.3 Petrol Sanayii (Petrol Rafinerileri ve Benzerleri)

Parametre	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
AKM	(mg/L)	120	60
Y&G	(mg/L)	20	10
HİDROKARBONLAR	(mg/L)	15	10
Amonyum Azotu (NH ₄ -N)	(mg/L)	40	20
Sülfür (S ⁻²)	(mg/L)	2	1
Fenol	(mg/L)	2	1
Krom (Cr ⁺⁶)	(mg/L)	0.2	0.1
Toplam Siyanür (CN ⁻)	(mg/L)	2	1
pH	-	6-9	6-9

Tablo 2.4 Petrol Sanayii (Petrol Dolum Tesisleri ve Benzerleri)

Parametre	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
KOİ	(mg/L)	400	200
AKM	(mg/L)	60	30
Y&G	(mg/L)	40	20
HİDROKARBONLAR	(mg/L)	6	8
Fenol	(mg/L)	2	1
Toplam Siyanür (CN ⁻)	(mg/L)	0.5	0.2
Sülfür (S ⁻²)	(mg/L)	2	1
pH		6-9	6-9

2.3 Petrol Hidrokarbonları

"Petrol", doğal gaz, kondensat ya da ham petrolden oluşan bir hidrokarbon karışımı olarak tanımlanabilir. Ham petrol, neredeyse tüm petrol ürünleri için ana kaynak malzemedir. Ham petrol farklı sıcaklık ve basıncıdaki distilasyon işlemlerinden geçirilerek çeşitli fraksiyonlar oluşturulur ve bu fraksiyonlarda farklı petrol ürünlerine dönüştürülür. Dolayısıyla petrol ürününün cinsi, üründe kullanılan ham petrolün kaynama noktasının doğrudan bir sonucudur. Örneğin, daha düşük damıtma sıcaklıklarına sahip daha hafif ham petrol fraksiyonları dizel, jet yakıtları ve hafif ısıtıcı yağları için kullanılır. Ağır fuel oiler, damıtma işleminden elde edilen kalıntılardan oluşur ve en yüksek damıtma sıcaklıklarına sahip en ağır fraksiyonlardan oluşur. Damıtma sıcaklığı, aynı zamanda işlevsel olarak yakıtın uçuculuğunu da tanımlar, benzinler oldukça uçucu ve artık yakıtlar az uçucudur (Blaisdell and Smallwood 1993). Damıtma işlemine ek olarak, ayrı ayrı petrol ürünlerinin yapısı, ürüne istenen özellikleri vermek için gerçekleştirilen rafineri işlemlerine de bağlıdır.

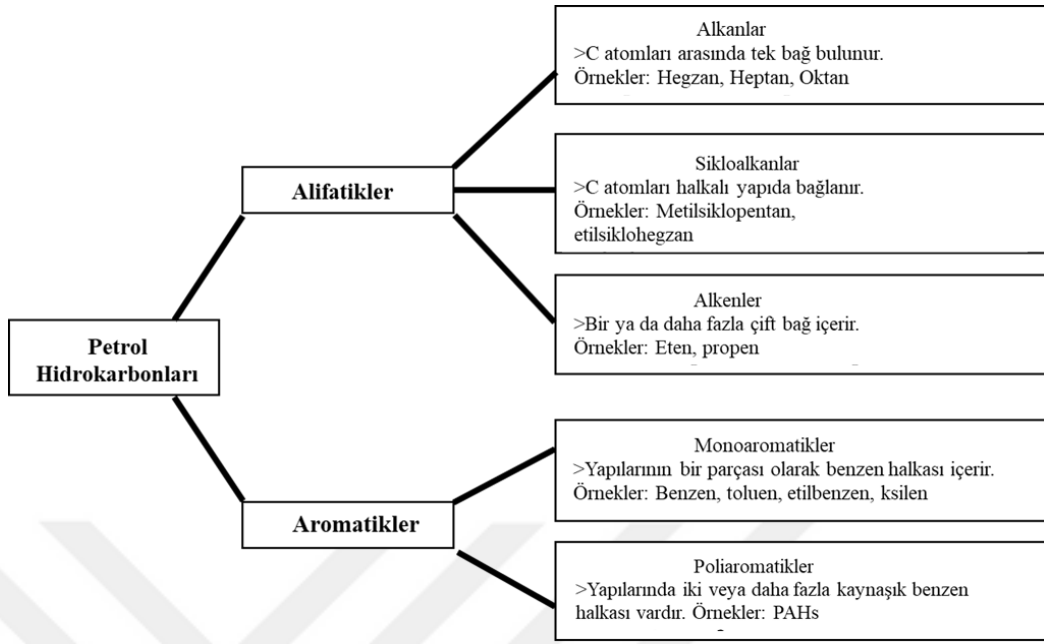
Petrol Hidrokarbonları (PH), neredeyse tamamen C ve H elementlerinden oluşan petrol bileşikleridir. Bunlar ayrı oluşumlar değildir, aksine hidrokarbonların moleküler ağırlığı ile geniş bir aralıkta bir sürekliliği temsil ederler. Benzin, dizel yakıt ve ilgili ürünler yüzlerce ve bazen binlerce farklı PH içerir (Speight 2011). PH'ler aşağıdaki gibi dört ana yapısal gruba ayrılabilir (Şekil 2.3) (Losikov and Traktovenko 1967):

(a) Alkanlar (veya parafinler): Doymuş hidrokarbonlardır, yani her karbon atomu bileşik oluşturmak için diğer karbon ve hidrojen atomlarıyla 4 tekli bağ oluşturur. Bu hidrokarbonlar ayrıca alifatiktir, yani karbon atomları düz veya dallanmış zincir şeklinde birleşir. Bu gruptaki bileşiklere örnek hekzan, heptan, oktan ve dekandır.

(b) Sikloalkanlar (veya naftalenler): Bu gruptaki hidrokarbonlar, halka şeklinde yapılarıdır ve doymuş hidrokarbonlardır. Metilsiklopentan ve etilsiklo-p-hekzan, bu gruptaki hidrokarbon örnekleridir.

(c) Alkenler (veya olefinler): Bu gruptaki hidrokarbonlar doymamıştır, yani en az iki karbon atomu birden fazla kovalent bağ ile birbirine bağlanmıştır. Bu gruba örnek eten ve propendir.

(d) Arenler (veya aromatikler): Bu gruptaki tüm bileşikler en az bir benzen halkası içerir. Benzen, toluen, etilbenzen ve ksilen (BTEx) bileşikleri bu gruba girer. Bu grupta üç veya daha fazla kapalı halka içeren bileşikler, polinükleer veya PAH'lar olarak adlandırılır. Fenantren ve piren bu gruptaki örneklerdir.



Şekil 2.3 Petrol hidrokarbonları grupları

2.4 Petrol Sızıntıları

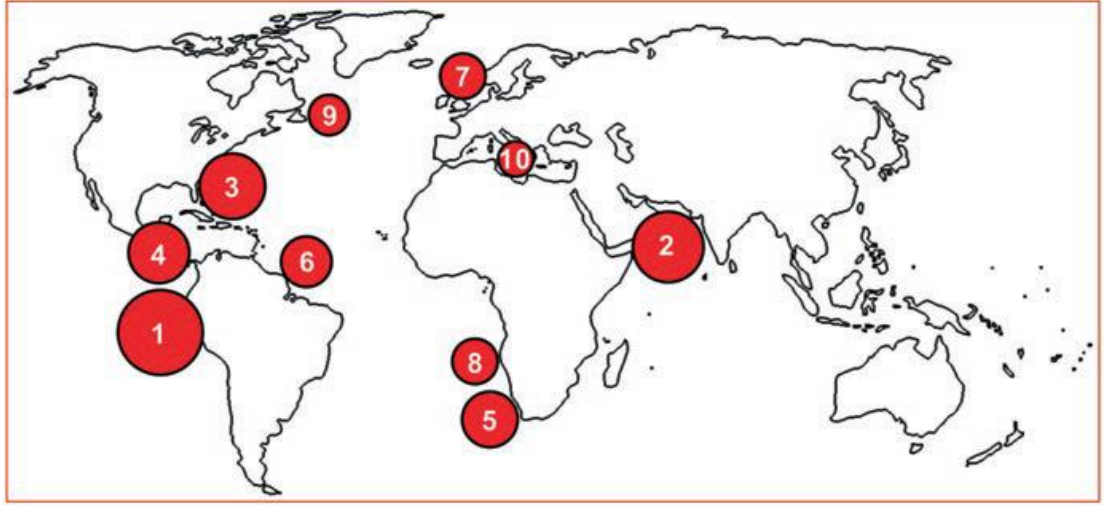
Petrol kirliliği, petrolün veya rafine edilmiş ürünlerinin herhangi bir şekilde dökülmesinden kaynaklanır. En büyük dökülmeler tipik olarak, petrol veya depolardaki yakıtın kullanılmayan bir tankerden veya bir sondaj platformundan okyanusa, bir mavnaya veya gemiden bir iç su yoluna veya bir kuyu patlaması veya kırık boru hattından karaya veya tatlı suya boşaltılmasını içerir. Ek olarak, bazı büyük ölçekli petrol sızıntıları kasıtlı savaş eylemlerinden kaynaklanmıştır. Harap olmuş süper tankerler veya kuyu platformlarıyla ilişkili büyük çaplı sızıntılar haklı olarak sızıntı konusunun en ilgi çeken yanıdır. Bunlar ortalama olarak, yaklaşık 170.000 ton/yıl petrol sızıntısıdır. Bununla birlikte, nispeten küçük ancak sık sık gerçekleşen deşarjlar şehirlerden akan sularla, petrol rafinerileriyle, "normal" tanker deşarjları ve diğer kıyı atık suları ile ilişkilidir ve bu deşarjlar sık olduğu için, büyük miktarda petrol sızıntısına neden oldukları gibi birçok kıyı kenti ve limanlar için tipik olan hidrokarbonlar kontaminasyonlarından ve kirliliklerinden sorumludurlar. 1970 yılından bu yana, 99 ülkede yaklaşık 700 olay kaydedilmiştir, en çok duyurulanlar Exxon Valdez (1989), Erika (1999), Prestige (2002), Hebei Spirit (2007), Event Horizon (2010) ve Rena (2011)'dir. İstatistikler büyük dökülmelerin sayısında düşüş eğilimi gösterse de (> 700 Mt), yıllık kaza sayısı sabit kalmaktadır (yılda yaklaşık 20-25) (Burgherr 2007; Chen et

al. 2018). Denizde gerçekleşen ve felakete yol açan en büyük petrol sızıntıları "süper tankerleri" (500 bin ton veya daha fazla kapasiteye sahip) içeren aşağıdaki kazaları içerir (Şekil 2.4) (Mariano and La Rovere 2017):

- 1967, Güney İngiltere’de Torrey Canyon süpertankerinden 117 bin ton petrol sızıntısı
- 1973, Macellan Boğazı’da Metula süpertankerinden 53 bin tonluk sızıntı
- 1978, İngiliz Kanalı’nda Amoco Cadiz süpertankerinden 230 bin tonluk sızıntı
- 1989, Alaska’nın güneyinde Exxon Valdez tankerinden 36 bin tonluk sızıntı
- 1993, İskoçya’nın Shetland Adası’nda Braer tankerinden 84 bin tonluk sızıntı
- 1996, Galler’de Sea Empress tankerinden 72 bin tonluk sızıntı
- 1999, Biskay Körfezi’nde Erika tankerinden 20 bin tonluk sızıntı
- 2002, Atlantik’te Fransa ve İspanya arasında Prestige tankerinden 63 bin tonluk sızıntı
- 2003, Pakistan’da Tasman Spirit tankerinden 30 bin tonluk sızıntı
- 2009, Avustralya’nın kuzeyinde Montera tankerinden 30 bin tonluk sızıntı

Açık deniz platformlarında petrol keşfetmek amacıyla yapılan sondajlar nedeniyle bazı büyük sızıntılar olabiliyor:

- 1979, IXTOC–I keşif kuyusunun patlamasıyla Meksika Körfezi’nde gerçekleşen 500 bin tonluk sızıntı
- 1977, Norveç’in Kuzey Denizi bölgesinde Ekofisk platformunun patlaması nedeniyle 30 bin tonluk sızıntı
- 2010, Louisiana Körfezi kıyısındaki Deepwater Horizon’da yaklaşık 1.500 m su derinliğinde sondaj yapılan bir keşif kuyusunda gerçekleşen patlama 669 bin ton petrol sızıntısına neden oldu ve milyarlarca dolarlık ekonomik zarar meydana getirdi.



Şekil 2.4 İlk on global petrol sızıntısı: (1) Ecuadorian Amazon (1972–93*) – 714**; (2) Gulf War (1991) – 7.6; (3) Deepwater Horizon (2010) – 5.0; (4) Ixtoc I (1979) – 4.4; (5) Castillo de Bellver (1983) – 2.5; (6) Atlantic Express (1979) – 2.1; (7) Amoco Cadiz (1978) – 1.6; (8) ABT Summer (1991) – 1.6; (9) Odyssey (1998) – 1.3; and (10) MT Haven (1991) – 1.0 (Clifton 2014).

***Yıl(lar); **Değerler milyon barel cinsindendir.**

2.5 Petrol Sızıntısı Sonrası Oluşan Etkiler

Petrol ve rafine ürünleri çevreye kontamine olduktan sonra çeşitli doğal süreçleri etkilemektedir. Kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak, farklı hidrokarbon fraksiyonları seçici olarak buharlaşacak, yüzeye yayılacak, suda çözünecek, kalıcı birikintiler olarak varlığını sürdürecektir veya mikroorganizmalar ve güneş ultraviyole radyasyonu tarafından parçalanacaktır (Baker et al. 1990) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Suda meydana gelen petrol sızıntısının etkileri (Clark and MacLeod 1977).

Buharlaştırma Sulu veya karasal ortamda kalan döküntü miktarının azaltılmasında uçucuların buharlaşması önemlidir. Buharlaştırma sayesinde denize dökülen benzinin neredeyse %100'ü, ham petrolün %30-50'si ve bunker yakıtının %10'u dağılır. Başka bir deyişle, nispeten daha hafif ve uçucu hidrokarbon fraksiyonları, geride daha ağır kalıntılar bırakarak seçici olarak buharlaşır. Buharlaştırma oranları, ılık sıcaklıklar ve şiddetli rüzgarlarla artar (Afshar-Mohajer et al. 2018).

Yayılma, bir petrol tabakasının su veya kara yüzeyi üzerindeki hareketini ifade eder. Yayılma, su üzerinde son derece geniş alanlarda meydana gelebilir, ancak toprağın yüksek emme kapasitesi nedeniyle karada çok daha sınırlıdır. Suya yayılma derecesi, dökülen malzemenin viskozitesinden ve rüzgar hızı, su türbülansı ve akıntıları gibi çevresel faktörlerden veya yüzeydeki buzunun varlığından etkilenebilir. Dalgasız deniz suyunun üzerine 1 m³ petrol dökülmesi, 100 dakika sonra 100 m çapında 0.1 mm kalınlığında kaygan bir tabaka oluşturmaktadır. Sakin denizde 0,3 µm veya daha az kalınlıkta bir petrol tabakası bile gözle parlak olarak görülebilir. Ek olarak, sudaki bir tabaka, akıntılar ve rüzgar tarafından hareket ettirilir ve sonunda bir kıyıyı petrol ile yıkayabilir.

Çözünme, bir yağ tabakasının altındaki suyun kirlenmesine neden olur. Daha hafif hidrokarbonlar, suda daha ağır olanlara göre daha fazla çözünür iken, aromatikler alkanlardan çok daha fazla çözünürdür. Denize petrol dökülmesinden sonra, kaygan tabakanın birkaç metre altında bulunan sudaki hidrokarbon konsantrasyonu 4-5 ppm

(g/m³) olabilir, bu da normal olarak ortamdaki deniz suyunda oluşan 1 ppb'den (mg/m³) binlerce kat daha fazladır.

Kalıntılar dökülen petrolün hafif fraksiyonları buharlaştıktan veya çözündükten sonra ortamda kalmaya devam eder. Denizde, artık malzemeler çırpılmış çikolatalı tatlıya benzeyen “mousse” olarak da bilinen jelatinimsi, yağlı su emülsiyonu oluşturur. Açık denizlere dökülen petrol genellikle mousse benzeri bir halde kıyı şeritlerine akar ve havanın da yardımıyla bu tabaka kayalarda uzun süre kalıcı katranlı bir tortuya dönüşür. Bu mousse benzeri tabaka, nihayetinde sahildeki parçacıklarla birleşerek, kalın, yapışkan katran benzeri bir yapıya dönüşür, sonrasında ya gittikçe karaya gömülür ya da bir fırtına sırasında parçalanarak tekrar denize karışır. Kıyıya vurmeyen tabaka, sonunda "katran topları" olarak bilinen yarı katı, yüzen asfalt kalıntılarına dönüşür (Mishra and Kumar 2015).

Bozunma, dökülen materyallerin mikroorganizmalar tarafından ve güneş ultraviyole radyasyonu ile foto-oksidasyon yoluyla yavaş yavaş ayrışmasını ifade eder. Birçok bakteri, mantar ve mikroorganizma türü hidrokarbonları enerji kaynağı olarak kullanabilir. Biyolojik bozunma hızı, ortam sıcaklığına, oksijen konsantrasyonuna ve nitrojen ve fosfor gibi temel besin maddelerinin mevcudiyetine bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Genel olarak, daha hafif hidrokarbonlar biyolojik ve inorganik oksidasyonlarla nispeten kolay bir şekilde ayrışırken, daha ağır fraksiyonlar bozunmaya direnir ve çevrede oldukça kalıcı olabilir.

2.6 Toplam Petrol Hidrokarbonlarının Toksisitesi

2.6.1 TPH'lerin Kara ve Deniz Canlıları Üzerindeki Toksisitesi

Ham petrolün dizel, benzin, yağlama yağları şeklindeki distilatlarından kaynaklanan TPH'ler, doğaları gereği yüksek derecede toksik, mutajenik ve kanserojenlerdir ve global ölçekte gözler bu yöne çevrilmiştir (Kuppusamy et al. 2017). PH'lerin toksisitesi artan moleküler ağırlığı ile yükselir. Düşük moleküler ağırlıklı sıklık alkanlar, suda yaşayan organizmalar için, aynı moleküler ağırlıktaki alifatik ve aromatik hidrokarbonlardan daha toksiktir. Karasal bir ortamda aromatik hidrokarbonlar, alifatik bileşiklerden daha toksiktir. Poliaromatik hidrokarbonlar

(PAH'lar) dışındaki daha düşük aromatik bileşikler bile toksiktir. Önemli olarak, bir organizmadaki PH'lerin toksisitesi, biyoyararlanımı ile doğru orantılıdır. Hidrofilik PH'ler, hidrofobik ve/veya bağlı PH'lerden daha fazla biyoyararlanıma sahiptir (Khan et al. 2018). Biyoyararlanımı olan kirleticiler, oldukça erişilebilirdir ve bir organizma tarafından adsorbe ya da absorbe edilir, bu da organizmalardaki belirli bölgelerle veya reseptörlerle etkileşime girerek ölümcül olmayan etkilere de neden olabilir ve ölümcül etkilere de neden olabilir. Toksisite gelişimi sırasında, PH'ler genellikle hücre zarını bozar ve zar akışkanlığı, bütünlüğü ve işleyişinde dalgalanmalara ve organizmanın işleyişinde sorunlara neden olur. Su sisteminde, biyoyararlanımı olmayan veya hidrofobik PH'ler, parçacıklar ve çöktürler üzerine adsorbe edildiklerinde birkaç bentik organizma (örneğin omurgasızlar, balıklar, birikmiş balık yumurtaları, vb.) için biyoyararlanımlı bir hale gelir (DeLeo et al. 2016). Süspansiyon halindeki yağ damlacıklarını veya yağa bağlı partikülleri yutan bazı suda yaşayan omurgasızlar (örn. midye, istiridye, yengeç vb.) PH'lara karşı oldukça hassastır. İnsanlar, petrol bileşiklerine soluma, yutma ve deri teması yoluyla maruz kaldıklarında potansiyel sağlık bozukluklarından muzdariptir (Ansari and Ingole 2002). Bir popülasyonda ölüme neden olmayan bir etkiye ölümcül olmayan etki denir ve bu etkiler genellikle lezyonların gelişimini, gelişimsel kusurları, moleküler işlevlerdeki değişiklikleri ve beslenme ve üremedeki davranışsal değişiklikleri içerir. Petrol dökülmelerine kısa süreli maruz kalma nedeniyle su ortamında ölümcül etkiler meydana gelir ve burada hücre zarlarına ve sinir dokularına bölünerek merkezi sinir sistemini bozarlar. PH'lerin neden olduğu ölüm genel olarak narkoz olarak adlandırılır. Sonuç olarak, PH'ların çevrede birikmesi ve kalıcılığı hem karasal hem de sucul ekosistemlerde zararlı etkilere neden olabilir (Ramadass et al. 2018).

2.6.2 TPH'lerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksisitesi

PH'lerin insan vücuduna girişi ve yerleşimi için ana yollar, ortam havasını ve iç mekan havasını solumaktan, PH'lerle kontamine yiyeceklerden, sigaralardan, açık ateş yerlerinden duman solumaktan, vb. tüm bunlar insan sağlığı üzerinde çok çeşitli potansiyel etkilere neden olur. (Şekil 2.6) (Solomon and Janssen 2010). Petrol ve petrol ürünlerine doğrudan veya dolaylı olarak maruz kalmak, insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden olur. Doğrudan maruz kalma, kontamine olmuş havayı solumayı

(gaz olarak yayılan uçucu fraksiyonlar) ve ciltle doğrudan teması (kontamine olmuş alanlarda bulunmak) içerir. Dolaylı maruziyet ise, kirli suda banyo yapmak ve kontamine yiyecekleri yemekten kaynaklanmaktadır (Palinkas et al. 1993).

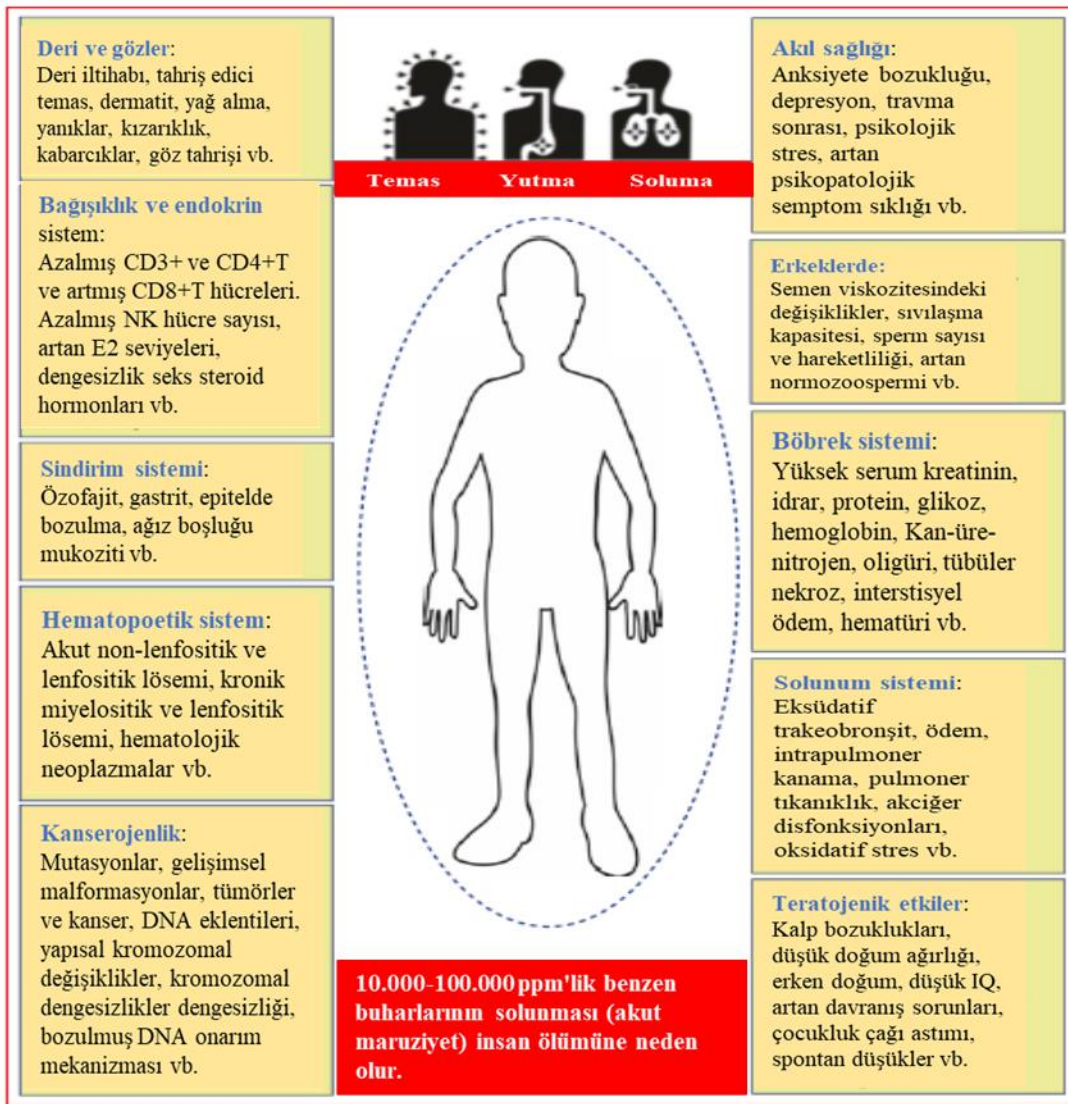
İnsan sağlığı, TPH kirlenmesinden kötü bir şekilde etkilenir ve bu etkiler genellikle petrolün döküldüğü yere (kara, nehir ve okyanus) bağlıdır. Yağ maruziyeti üzerine insan sağlığını etkileyen diğer faktörler, maruz kalmanın türü ve kapsamını içerir. Petrol sızıntısı alanındaki temizlik çalışanları daha büyük risk altındadır. Sağlık bozuklukları arasında cilt ve göz tahrişi, nefes alma ve nörolojik sorunlar ve stres yer alır (Campbell et al. 1993).

TPH'lerin zihinsel sağlık üzerinde güçlü bir etkisi vardır ve fizyolojik etkilere neden olurlar ve ayrıca potansiyel olarak genetik sistemleri, bağışıklık ve endokrin sistemleri için toksiktirler. İnsanlarda TPH'lerin uzun vadeli etkileri henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, bazı semptomlar maruziyet sonrası birkaç yıl devam edebilir. Bu nedenle, TPH'lere maruz kalan bireylerde sağlığın korunması ciddi bir endişe konusudur. Sağlık riski değerlendirmeleri, maruz kalma anında veya maruziyetten sonraki uzun süreler boyunca var olan potansiyel zararlı etkilerin tespit edilmesinde çok büyük etkiye sahiptir (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

Şu an itibarıyla, ham petrol sızıntılarının çoğu teknolojik felaketlerden kaynaklanmaktadır. Akdeniz, Avrupa, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika vb. dahil olmak üzere yüksek nüfus yoğunluğuna sahip birçok coğrafi bölgede rapor edilmiştir. Birçok araştırma, dünyanın bu bölgelerinden epidemiyolojik bilgi sağlamaya odaklanmıştır (Linnet et al. 2015). Petrol ürünlerine veya TPH'lere maruz kalma ile ilişkili olumsuz sağlık bozuklukları arasında hematopoietik, hepatik, renal ve pulmoner anormallikler, bilişsel işlevlerdeki değişiklikler, psikolojik sorunlar, üreme ve solunum sistemlerinde hasar, kanser ve çeşitli genel sağlık sorunları yer alır.

Ayrı ayrı fraksiyonların toksisitesi de belirli bir dereceye kadar tespit edilmiştir. En iyi örnek, hem ham petrolde hem de benzinde bulunan ve insanlarda lösemiye neden olan bir ajan olarak tanımlanan benzendir. Bu hidrokarbon ayrıca insanlarda beyaz kan hücrelerini azaltma, bağışıklık sistemini bastırma ve enfeksiyonlara karşı artan

duyarlılığa yol açma aktivitesiyle bilinir. Çalışmalar ayrıca benzene maruz kalma (ppb seviyesinde bile) ile erken yaşta (5-15 yaş) benzene maruz kalan kişilerde görülen terminal lösemi, Hodgkin lenfoma ve kan ve bağışıklık bozuklukları arasındaki bağlantıyı da belirlemiştir. Bu nedenle, TPH'lerin çevresel etkileri, toksisiteleri ve insanlarda çeşitli hastalıklara sebep olmaları nedeniyle çoğunlukla olumsuzdur. Exxon Valdez sızıntı sahasında petrole maruz kalan kişilerde sırasıyla 3.6, 2.9 ve 2.1 kat anksiyete bozukluğu, travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon gelişmiştir. Petrol sahalarına veya sızıntı sahalarına yakın yaşayan kadınlarda gebelikte doğal düşük riski yaklaşık 2,5 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 2.6) (Palinkas et al. 1993).



Şekil 2.6 TPH'lerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri

2.7 Petrol Hidrokarbonları Kirleticilerinin Giderilmesi

Zamanla petrol dökülmelerinin arıtılması için çeşitli iyileştirme teknikleri geliştirilmiştir. İyileştirme teknikleri şu şekilde sınıflandırılabilir: fiziksel, kimyasal, termal ve biyolojik. Bununla birlikte, geleneksel mühendislik temelli fiziko-kimyasal dekontaminasyon yöntemlerinin çoğu, toprak yıkama, kimyasal inaktivasyon (petrol gibi sulu olmayan kirleticileri mineralleştirmek için kimyasal oksidan olarak potasyum permanganat veya hidrojen peroksit kullanımı) ve yakma gibi ex-situ arıtma yapılan kontamine malzemelerin kazı ve taşınmasının maliyeti nedeniyle pahalıdır (Chaudhry et al. 2005; Farhadian et al. 2008).

Aynı amaç için kullanılan diğer fiziko-kimyasal teknikler dispersiyon, seyreltme, tutunma, uçuculuk ve abiyotik dönüşümlerdir (Chandra et al. 2013). Bu geleneksel fiziko-kimyasal işlemlerin artan maliyetleri ve sınırlı etkinliği, özellikle bitkilerin ve mikroorganizmaların biyolojik iyileştirme yeteneklerine dayanan uygulamalar için alternatif teknolojilerin geliştirilmesini teşvik etmiştir (Singh and Jain 2003). Kirletici maddelerin biyolojik yollarla temizlenmesi için yeşil teknolojiler, petrolle kirlenmiş alanların biyoremediasyonu için kullanılmaktadır (Rahman et al. 2003). Biyoremediasyon canlı organizmaların kirleticileri parçalamak veya detoksifiye etmek için uygulanması olarak tanımlanabilir (Ron and Rosenberg 2014; Varjani and Upasani 2016). Bu teknoloji verimli, ekonomik, çok yönlü ve çevreye duyarlı bir tekniktir (Farhadian et al. 2008).

Biyoremediasyon, mikroorganizmaların çevreyi olumsuz etkilemeden zararlı organik kirleticileri CO₂, CH₄, H₂O ve biyokütle gibi zararsız bileşiklere ayrıştırdığı, indirdiği veya azalttığı yenilikçi bir tekniktir (Ron and Rosenberg 2014). Biyodegradasyon, oleofilik mikropların hidrokarbon kirleticilerini çevreden uzaklaştırmak amacıyla kullanıldığı biyoremediasyon için birincil mekanizmalardan biridir (Varjani and Upasani 2016). Hidrokarbonlar, doğal ve enerji açısından zengin bileşiklerdir ve çeşitli hidrokarbon bozundurucu/kullanıcı organizmalar da doğada bulunmaktadır. Doğal mikroorganizmaların hafifletici/azaltıcı araç olarak ayrı ayrı kullanımı, kirletici bozunma oranını artırmak için canlı organizmaların katalitik yetenekleri ile sağlanır ve ayrıca MEOR için kullanılabilir (Varjani and Upasani 2016).

2.8 Petrol Hidrokarbonlarının Biyodegradasyonu

Bazı mikroorganizmalar alifatikleri bozucu yeteneklere sahiptir, bazıları monoaromatikleri veya poliaromatikleri degradasyona uğrattırken bazıları da reçineleri bozabilir. Petrol hidrokarbon kirleticileri parçalayan mikroorganizmalar ve bunlar tarafından bozulan hidrokarbon türleri Tablo 2.5'te listelenmiştir. *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Corynebacterium*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Stenotrophomaonas*, ve *Ochrobactrum* hidrokarbon ayrıştırıcılar olarak rapor edilmektedir (Widdel and Rabus 2001).

Aspergillus, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Graphium*, *Amorphoteca* türlerinin mantarları ve *Candida*, *Yarrowia* ve *Pichia* türlerinin mayaları petrol hidrokarbon kirleticilerinin bozunmasında hayati bir rol oynamaktadır (Boonchan et al. 2000).

Yakimov vd. (Yakimov et al. 2007), hidrokarbonoklastik bakteri cinsleri *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Oleispira*, *Cycloclasticus*, ve *Thalassolituus*'un petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş alanlardan evrimleştiğini bildirmişlerdir. Bu doğal bakteriler, kirlilikten önce düşük veya tespit edilemeyen seviyelerde mevcutken petrolle kirlenmiş alanlarda ise baskın olduğu görülmektedir. *Alcanivorax* suşları, n-alkanlar ve dallanmış alkanlar üzerinde büyürken, karbon kaynağı olarak herhangi bir şeker veya amino asit üzerinde büyüyemezler. *Cycloclasticus* suşları aromatik hidrokarbonlar, fenantren, naftalen ve antrasende büyürken, *Oleispira* suşları alifatik hidrokarbonlar, alkanoatlar ve alkanollerde büyür (Harayama et al. 2004). Doğal mikrobiyal komünite tam metabolik potansiyelini anlamak için biyolojik bozunmayı çok alanlı bir komünite ışığında değerlendirmek çok önemlidir (Widdel and Rabus 2001).

Bir kirleticinin biyolojik olarak parçalanması, farklı bir dizi enzimlerin kullanıldığı aşama içerir (Abbasian et al. 2015). Hidrokarbonlar, ayrı ayrı mikroorganizma suşları veya aynı veya farklı cinse ait mikrobiyal suşların konsorsiyumları tarafından seçici olarak metabolize edilebilir. Bununla birlikte,

konsorsiyumun, hidrokarbonların tam çeşitlerini metabolize etme veya degradasyona uğratma konusunda tekli kültürlerden daha fazla potansiyeli olduğu kanıtlanmıştır (Deziel et al. 1996). Mikroorganizmalar tarafından PAH'lara kıyasla biyolojik bozunma için n-alkanların tercih edildiği bildirilmiştir. Bunun nedeni, bakteriyel ayrışmaya maruz kalan petrol hidrokarbon (karbon ve enerji kaynağı) bileşiklerinin mevcudiyeti, kirletici hidrokarbonla ayrıştırıcılarının kirli ortama adaptasyonu ve çeşitli biyolojik bozunma yollarına katkıda bulunan enzimlerin varlığı olabilir (Thamer et al. 2013).

Mikroorganizmaların çoğunda biyolojik bozunma enzimleri plazmitler üzerinde kodlanır. *Acinetobacter* sp. parçalayıcı enzimlerin mevcudiyeti açısından istisnaidir ve bu türlerde plazmitler kromozom üzerinde bulunur. Whyte vd. (Whyte et al. 1998), hidrokarbon bozunmasında Q15 plazmidinin rolünü ileri sürmüştür. AlkA, alkB, alkM, LadA, theA, nahA-M, assA1 ve assA2 genlerinin varlığıyla TOL, Q15, NAH7, OCT, pND160 ve pND140 gibi çeşitli plazmitler petrol hidrokarbon kirleticilerinin yıkımına dahil olurlar (Abbasian et al. 2015; Diallo et al. 2019).

Ham petrolün daha basit bileşikleri, çok çeşitli bakteriler tarafından parçalanabilir, ancak karmaşık bileşikleri (PAH'lar, reçineler ve asfaltenler gibi) bozma yeteneği çok az türde bulunur. Bir bakteriyel sp. gıda kaynağı olarak tercih edilen birkaç hidrokarbonun kullanımında uzmanlaşmıştır ve konsorsiyumda sinerjik etki sağlarlar (Zanaroli et al. 2010; Diallo et al. 2020). Petrol hidrokarbonlarının bozunmasına özel enzim sistemi aracılık edebilir. İlk atak genellikle çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir: (a) mikrobiyal hücrelerin substratlara bağlanması ve (b) biyo yüzey aktif maddeler/biyoemülgatör, biyopolimerler, çözücüler, gazlar ve asitlerin üretimi. Ham petrol, her biri belirli bir molekül grubunu parçalayabilen birkaç doğal mikroorganizma tarafından bozulabilen basit ve karmaşık hidrokarbonların bir karışımıdır (Zanaroli et al. 2010).

Tablo 2.5 Kirletici petrol hidrokarbonlarını parçalayan mikroorganizmalar

Petrol hidrokarbon bileşiği	Mikroorganizma adı	Referanslar
Alifatikler	<i>Acinetobacter sp.</i>	(Diallo et al. 2020)
	<i>Alcanivorax sp.</i>	(Harayama et al. 2004)
	<i>Azoarcus sp.</i>	(Widdel and Rabus 2001)
	<i>Marinobacter sp.</i>	(Yakimov et al. 2007)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	(Mittal and Singh 2009)
Monoaromatikler	<i>Bacillus sp.</i>	(Janbandhu and Fulekar 2011)
	<i>Halomonas sp.</i>	(Widdel and Rabus 2001)
	<i>Rhodococcus sp.</i>	(Leahy and Colwell 1990)
	<i>Sphingobacterium sp.</i>	(Janbandhu and Fulekar 2011)
Poliaromatikler	<i>Achromobacter insolitus</i>	(Janbandhu and Fulekar 2011)
	<i>Cycloclasticus sp.</i>	(Harayama et al. 2004)
	<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	(Salleh et al. 2003)
Reçineler	<i>Vibrionaceae</i> aile üyeleri	(Leahy and Colwell 1990)
	<i>Enterobacteriaceae</i> aile üyeleri	(Leahy and Colwell 1990)
	<i>Moraxella sp.</i>	(Chandra et al. 2013)

2.9 Ftalat İzomerleri Biyodegradasyonu

Ftalik asit (FA), izoftalik asit (IFA) ve TFA çevreyle ilgili ksenobiyotik esterleri, yılda bir milyon tonluk ölçekte üretilir ve ağırlıklı olarak plastik polimerler veya plastikleştiriciler olarak kullanılır. Mikroorganizmalar tarafından gerçekleşen degradasyon, çevreden atılmalarının en etkili yolu olarak kabul edilir ve oksik ve

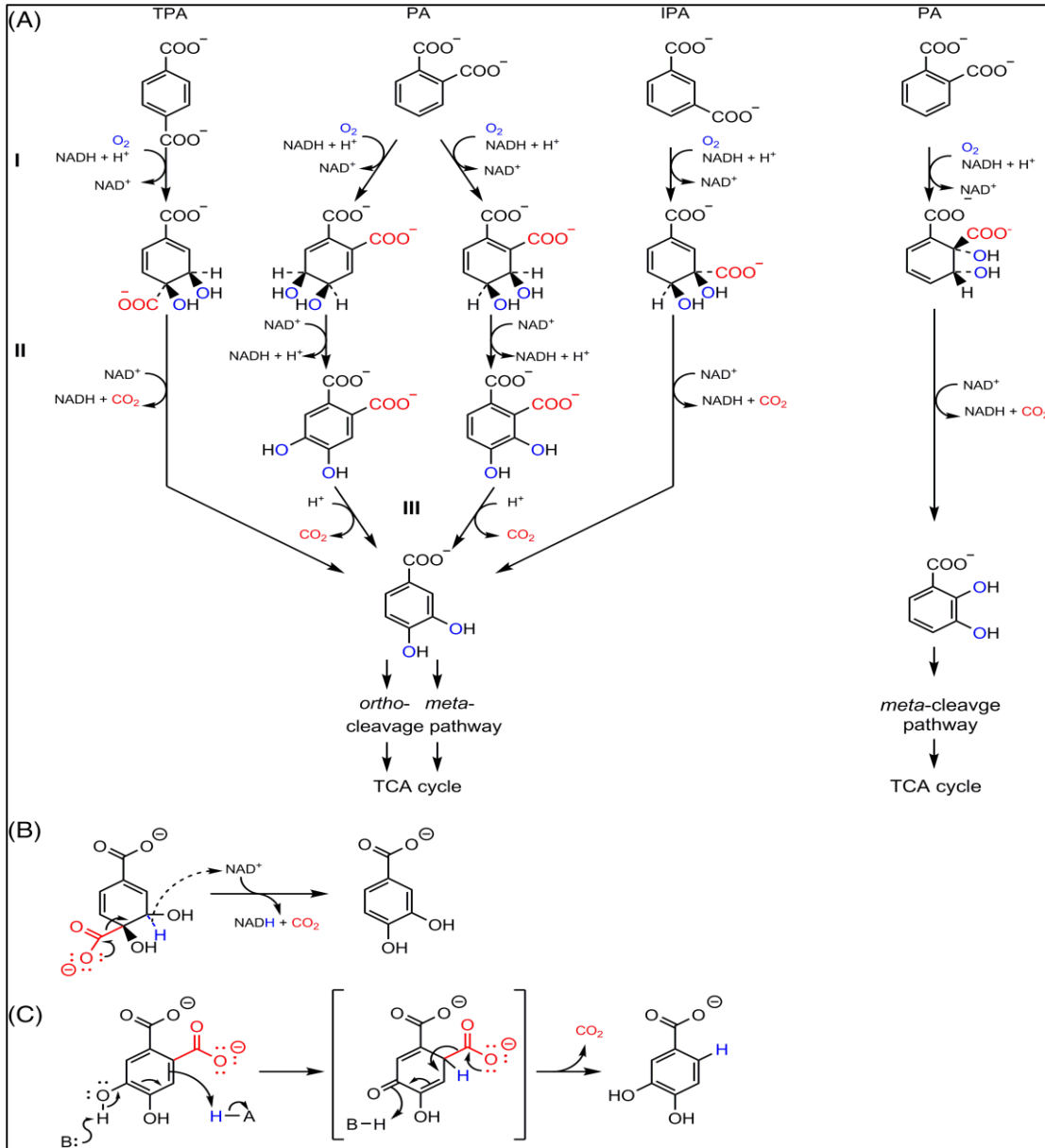
anoksik koşullar altında karşılık gelen FA izomerleri ve alkollerine hidroliz yoluyla ilerler. FA, IFA ve TFA'nın ileri seviye degradasyonu, temelde anaerobik ve aerobik mikroorganizmalar arasında farklılık gösterir.

2.9.1 Ftalat İzomerlerinin Aerobik Biyodegradasyonu

FA, IFA ve TFA'nın aerobik biyodegradasyonu neredeyse 60 yıldan beri incelenmiştir (Ribbons and Evans 1960) ve bu arada çok sayıda gram-pozitif ve gram-negatif bakteri gösterilmiştir. (bazı mantarlarda olduğu gibi). Hemen hemen tüm aerobik mikroorganizmalarda, üç ftalat izomeri, aromatik bileşiklerin aerobik degradasyonda merkez ortam olan protokateküat (3,4-dihidroksibenzoat) 'a dönüştürölür (Şekil 2.7).

FA'nın aerobik mikroorganizmalarda protokatekata dönüşümü üç adımı içerir: (i) dioksijenasyon ile cis-dihidroksi-dihidro-FA'ya (ii) dehidrojenasyon ile dihidroksi-FA'ya ve (iii) dekarboksilasyon ile protokateküat'a dönüşüm. Bunun tersine, TFA'dan protokatekat oluşumu ve büyük olasılıkla IFA, dekarboksilasyona direk olarak adım (ii) 'de ulaşıldığından sadece iki adım sağlar. Bu nedenle, üç ftalik asit izomerinin zorunlu dekarboksilasyonu, özel dekarboksilazları (FA) veya hidrit transferi sırasında bir proton yerine CO₂'yi ayıran cis-dihidrodiol dehidrojenazları (IFA, TFA) ile gerçekleştirilir.

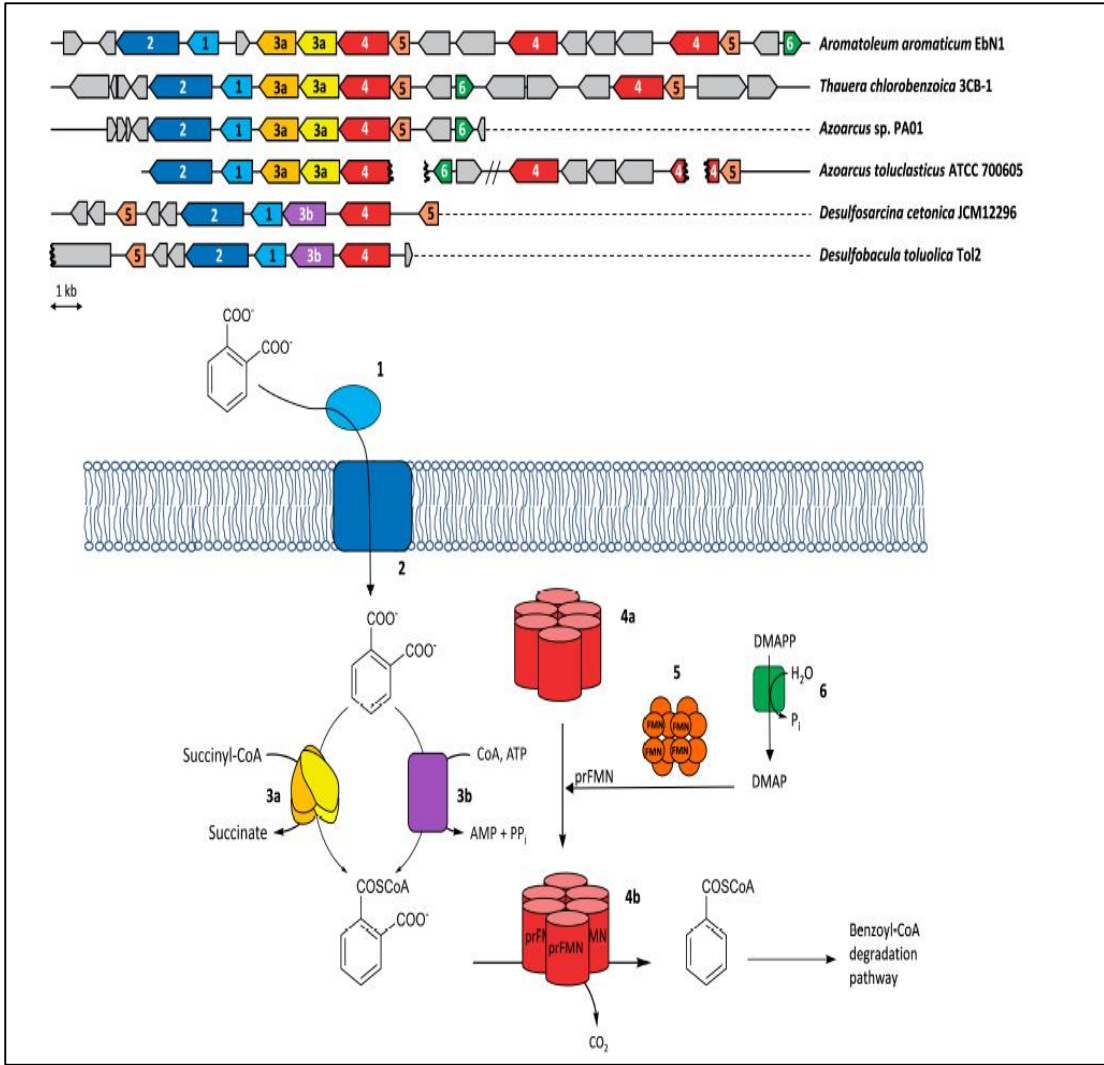
Oluşan protokateküat, sonunda dioksijenazlar tarafından bölölür ve orto veya meta-bölölme yolları yoluyla merkezi ara maddelere dönüştürölür (Dagley 1971). Bu kanonik FA izomer degradasyon yollarının başka bir çeşidi, son zamanlarda *Pseudomonas* sp. PTH10 suşunun ftalat-2,3-dioksijenaz ve dekarboksile edici 2,3-dihidro-cis-2,3-dihidroksi-FA dehidrojenaz içeren FA ile birlikte büyümesi sırasında tanımlanmıştır (Kasai et al. 2019). Oluşan cis-2,3-dihidroksibenzoat ara maddesinin halka sistemi daha sonra 3,4-dioksijenaz tarafından doğrudan bölölür.



Şekil 2.7 Ftalat izomerlerinin aerobik biyodegradasyon mekanizması: A) Ftalik asitlerin aerobik bozunması. Sol üç panel: merkezdeki protokatekütat ara oluşumu vasıtasıyla TFA, FA ve IFA'nın (soldan sağa) bozulma yolları; sağ panel: 2,3-hidroksibenzoat meta-parçalanma yoluyla FA'nın degradasyonu. Dahil olan enzimler, (I) iki bileşenli Rieske non-heme demir dioksijenazlar, (II) dekarboksile edici veya dekarboksile edici olmayan cis- (di)hidrodiol dehidrojenazlar ve (III) dihidroksi-FA dekarboksilazlardır. B) (II) kısımdaki dekarboksilasyon mekanizması. C) (III) kısımdaki dekarboksilasyon mekanizması (Boll et al. 2020).

2.9.2 Ftalat İzomerlerinin Anaerobik Biyodegradasyonu

Halka hidroksile edici ve halka ayırıcı dioksijenazlar için substrat olarak dioksijen kullanımı, anaerobik ftalat biyodegradasyonu için bir seçenek değildir. Anaerobik bakterilerde, üç FA izomeri dahil çoğu monosiklik aromatik bileşik, merkezi ara benzoil-CoA'ya dönüştürülür (Boll et al. 2020) (Şekil 2.8). İstisnalar, yalnızca aromatik karakteri önemli ölçüde zayıflatan en az iki meta-konumlu hidroksil işlevi içeren aromatiklerdir (Philipp and Schink 2012). Benzoil-CoA, fakültatif anaeroblarda bulunan ATP'ye bağımlı 1.sınıf benzoil-CoA redüktazlar (BCR'ler) tarafından sikloheksa-1, -5-dien-1-karboksil-CoA'ya dearomatize edilir (Tiedt et al. 2018) veya katı anaeroblarda meydana gelen ATP'den bağımsız 2.sınıf BCR'ler tarafından dearomatize edilir (Weinert et al. 2015;Huwiler et al. 2019). Asetil-CoA birimlerine ve CO₂'ye ileri degradasyon, benzoil-CoA degradasyon yolunda, bir hidrolitik halka ayrılma adımı dahil olmak üzere bir dizi modifiye β-oksidasyon benzeri reaksiyonla ilerler (Carmona et al. 2009;Boll et al. 2020).

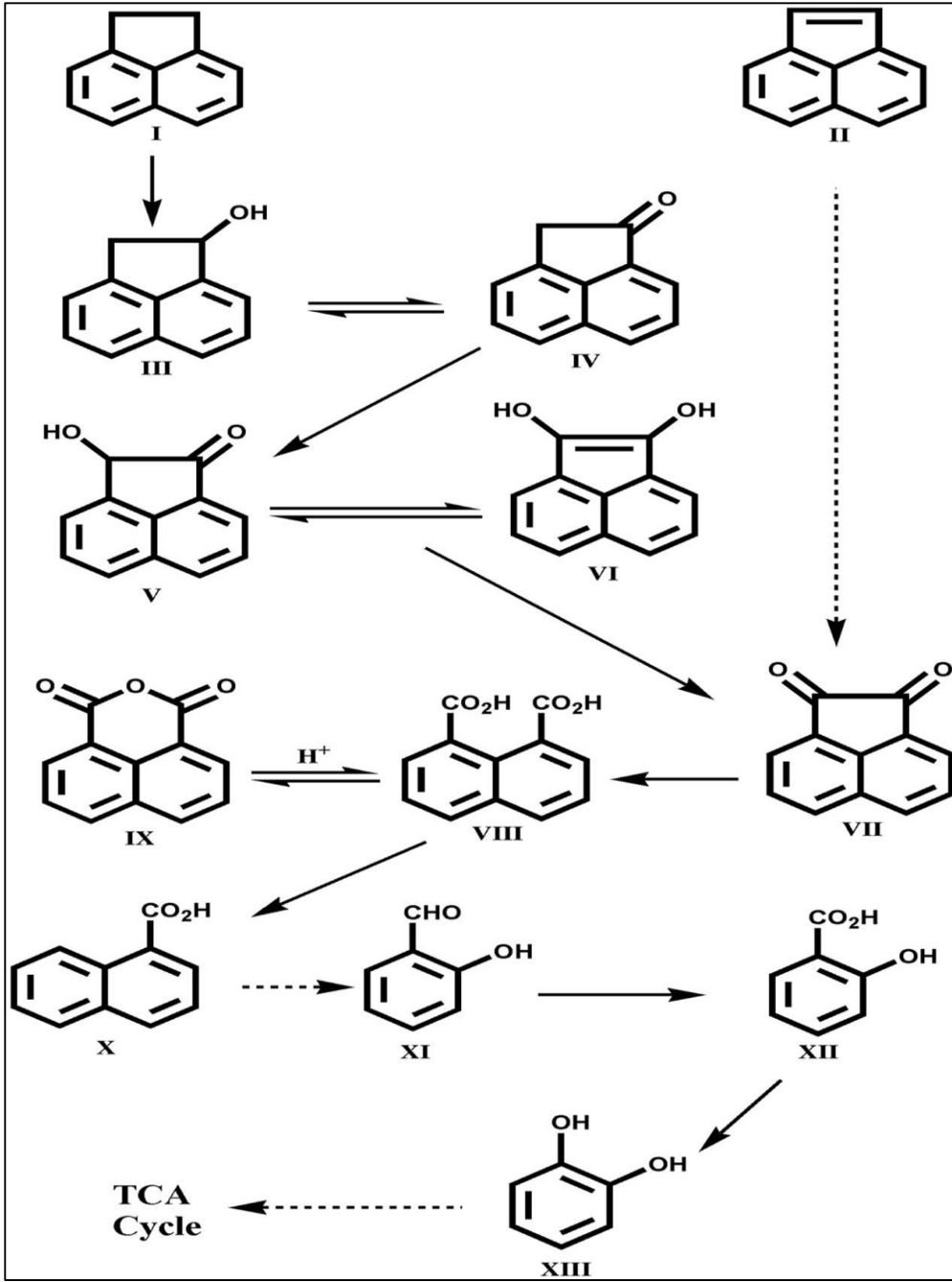


Şekil 2.8 Anaerobik FA degradasyonunda rol oynayan genler, enzimler ve metabolitler. Kodlayıcı yapısal genler, gen ürünleri ile aynı renkte tasvir edilmiştir. Ayrı ayrı bileşenlerin multimerizasyon durumu, saflaştırılmış veya yakından ilişkili proteinlere göre gösterilir. Üst panel: iki nitrat ve bir sülfat indirgeyen bakteride fthalatla indüklenen gen kümeleri; alt panel: fthalat alımı ve merkezi ara oluşum benzoil-CoA'ya dönüşümü. 1, periplazmik bağlayıcı protein; 2, TRAP taşıyıcısı; 3a, süksinil-CoA'nın heterodimerik SptAB alt birimleri: fthalat CoA transferaz; 3b bilinmeyen multimerizasyon durumuna sahip fthalat-CoA ligaz; 4, heksamerik UbiD benzeri PCD; 4a, inaktif PCD apo-formu; 4b, prFMN kofaktörlü aktif PCD; 5, preniltransferaz oluşturan prFMN'nin dodekamerik UbiX benzeri alt birimi (daha iyi gösterim için FMN kofaktörü yalnızca dört alt birim için gösterilmiştir); 6, Nudix benzeri hidrolaz, varsayılan olarak DMAPP'den DMAP sentezine dahil oldu (Boll et al. 2020).

2.9.3 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Biyodegradasyonu

PAH'ları bozan çeşitli bakteriler bulunmuştur ve bu bakteriler naftalin ve fenantrenin degradasyonu çalışmalarına çok fazla konu olmuştur (Cerniglia 1993;Mallick et al. 2011). Oksijen varlığına veya yokluğuna bağlı olarak PAH'ları degradasyona uğratmak için iki ana strateji vardır. Aromatiklerin aerobik katabolizmasında, oksijen sadece son elektron alıcısı değil, aynı zamanda aromatik halkanın hidroksilasyonu ve oksijenolitik halka bölünmesi için bir yardımcı substrattır. Buna karşılık, aromatik bileşiklerin anaerobik katabolizması, aromatik halkaya saldırmak için, öncelikle indirgeyici reaksiyonlara dayanan tamamen farklı bir strateji kullanır (Carmona et al. 2009). Aromatik bileşiklerin aerobik katabolizması son birkaç on yıl boyunca incelenirken, aromatik bileşiklerin anaerobik bozunması, daha derin bir anlayış bekleyen daha yakın zamanda keşfedilen bir mikrobiyal kapasitedir. Bununla birlikte, nitrat, sülfat veya demir iyonları gibi alternatif son elektron alıcılarının kullanıldığı anaeroblar tarafından gerçekleştirilen biyodegradasyonun olduğu birçok doğal habitatta ve kontamine alanlarda (örneğin, akiferler, suda yaşayan tortular ve batık topraklar) anoksik koşullar hakimdir (Foght 2008).

Esasen bakteriler, oksijenazlı metabolizma yoluyla (monooksijenaz veya dioksijenaz enzimlerini içeren) PAH'ların parçalanması için aerobik koşulları tercih ederler. Genellikle, PAH'ların aerobik bakteriyel degradasyonunun ilk adımı, bir dehidrojenazın etkisiyle bir diol ara ürününe tekrar aromatize edilen bir cis-dihidrodiol oluşumu ile bir aromatik halkanın dioksijenaz yoluyla gerçekleşen hidroksilasyonudur. Bu diol ara bileşikleri daha sonra intradiol veya ekstradiol halka ayırıcı dioksijenazlar tarafından bir orto-ayırma veya meta-ayırma yolu vasıtasıyla ayrıştırılabilirler ve sonuçta TCA halkalı ara maddelere dönüştürülen katekoller gibi ara maddelerin oluşumuna yol açar (Şekil 2.9) (Evans et al. 1965;Mallick et al. 2011). Dioksijenaz, genellikle redüktaz, ferredoksin ve terminal oksijenaz alt birimlerinden oluşan çok bileşenli bir enzimdir. Bakteriler ayrıca trans-dihidrodiollerin üretimi ile (Moody et al. 2004) veya anaerobik koşullar altında, örneğin nitrat azaltıcı koşullar altında sitokrom P450-aracılı yollarla PAH'ı da degradasyona uğratabilir (Foght 2008;Carmona et al. 2009).



Şekil 2.9 *Acinetobacter* sp. AGAT-W suşu Tarafından asenaften degradasyonu için önerilen yol. Kimyasal tanımlamalar: (I) asenaften; (II) asenaftenilen; (III) 1-asenaftenol; (IV) 1-asenaftenon; (V) 1-hidroksi-2-ketoasenaften; (VI) 1,2-dihidroksiasenaftenilen; (VII) asenaftenkinon; (VIII) naftalen-1,8-dikarboksilik asit; (IX) 1,8-naftalik anhidrit; (X) 1-naftoik asit; (XI) salisilaldehit; (XII) salisilik asit; (XIII) katekol (Ghosal et al. 2013).

2.10 Biyoaugmentasyon Yaklaşımları

Petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş toprakların biyoremediasyonu hem yerinde (biyostimülasyon, biyoaugmentasyon, kompostlama ve bitki ıslahı) hem de yerinde olmayan (biyoreaktörler) yöntemlerle gerçekleşir (Kuppusamy et al. 2016). Yerinde yöntemlerde, biyodegradasyon yapan organizmalar değişken hava koşullarından büyük oranda etkilenirler (Kuppusamy et al. 2016). Biyoreaktörlerin kullanılması ise topraktaki PAH'ların biyodegradasyon sürecinde sıcaklık ve basıncın kontrolünü daha iyi sağlamaktadır (Gan et al. 2009).

2.9.1 Biyoaugmentasyon

Biyolojik arıtma popülasyonlarını güçlendirmek için mikroorganizmalar eklenir, böylece kirlenici yükü daha az tehlikeli bileşiklere dönüştürülerek etkileri azaltılır (Castiglione et al. 2016). Biyoaugmentasyonu gerçekleştiren en yaygın seçenekler (El Fantroussi and Agathos 2005); saf bir bakteri suşunun eklenmesi, önceden uyarlanmış bir konsorsiyum eklenmesi, genetik olarak tasarlanmış bakterilerin eklenmesi veya biyosistemde mevcut olan mikroorganizmalara konjugasyon yoluyla biyodegradasyon genlerinin aktarılmasıdır. Konjugasyonun avantajı donör suş/ suşların canlı kalması veya büyümesine bağlı olmaması avantajdır.

2.9.1.1 Biyoaugmentasyon için Suş Seçimi

Biyoaugmentasyon başarısı için uygun suşun seçimi esastır. Seçilen suşlar dahil edildikleri arıtma prosesindeki; sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen, besin bulunabilirliği, toksisite ve mikrobiyal basınç gibi çevresel koşullara dayabilmelidirler (Bitton 2010). İyileştirme sürecindeki koşullar anlaşılmadan, biyoaugmentasyon yapılırsa aşının canlı kalması mikrobiyal popülasyonla rekabet nedeniyle başarısız olabilir (Stephenson and Stephenson 1992; More et al. 2010). Yerli popülasyondan bir suşun seçimi ve izolasyonu kademeli olarak tercih edilen bir yöntem haline geldi çünkü bu suş seçilen ortamda hayatta kalmaya zaten adapte olacağından başarı olasılığını artırmaktadır. (Ueno et al. 2007). Bu yaklaşım, bir arıtma sürecinde tür mevcut ancak sayısı yeterli değilse uygulanabilir. Alternatif bir bölgeden bir suşun seçilmesi, bir bileşiğin hali hazırda mevcut olan türler tarafından parçalanamadığı durumlarda tek seçenek olabilir ama çevresel koşullar aşılana suşun hayatta kalmasına uygun değilse başarı sınırlı

olabilir (Thompson et al. 2005). Biyoaugmentasyon, uygun bir konsorsiyum oluşturmak için tek bir suşun veya suşların kombinasyonunu içerebilir (Khehra et al. 2005). Belirli bir bileşiği indirgeme yeteneği ya da daha karmaşık bir parçalama yolundaki rolü nedeniyle tek bir suş seçilebilir. Doğal bir komüniteyi kopyalamak, bir katabolik yolu geliştirmek veya çoğaltmak için aynı atıksu içinde çok sayıda aşama ya da bir dizi hedef kirletici maddenin ayrıştırılması için bir çok suş kullanılabilir (Thompson et al. 2005).

Genetik manipülasyon, kirletici bileşikler azaltıcı doğal bir suşun bulunmadığı durumlarda parçalama için fırsat sağlar (Stroo et al. 2013). Mikroorganizmalar, parçalama genlerini ifade etmek ya da hayatta kalma kabiliyetini arttırmak için genetik olarak tasarlanabilirler (Nüsslein et al. 1992). Teknikler, çok sayıda parçalanma aşaması veya ksenobiyotik bileşikler parçalamak için gerekli olan kirletici maddelerin arıtılmasına yardımcı olacak mikroorganizmaların tasarlanmasına olanak sağlar. Bu tür bileşikler için parçalanma yolları sınırlıdır ve bu tür bir parçalamayı sağlayacak doğal türler mevcut olmayabilir (Stroo et al. 2013). Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar, göl sularında (Awong et al. 1990), yeraltı suyu akifer mikrokozmoslarında araştırılmıştır (Jain et al. 1987). Nublein ve arkadaşları (1992) genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların canlı kalabilmelerinin yanı sıra genetik bilgilerini koruyabildiklerini ve kirletici maddeleri parçalayabildiklerini doğruladılar. Genetik adaptasyonlar çok sayıda parçalama aşaması gerektiren kirletici maddelerin parçalanmasına yardımcı olacak mikroorganizma tasarımlara izin verebilir. Mikroorganizmaların genetik modifikasyonuna ek olarak, katabolik MGE'lerin kullanıldığı gen bioaugmentasyonu, uygulanabilirlik açısından bioaugmentasyonda vurgulanmıştır. MGE'ler, bir organizmadan diğerine aktarılabilen DNA ya da RNA parçalarından oluşur (Stroo et al. 2013).

Genetik mühendisliğinin bioaugmentasyonun geleceğini iyileştirebileceği sayısız yol olmasına rağmen, araştırmalar ağırlıklı olarak laboratuvara dayalıdır ve genetik olarak tasarlanmış mikroorganizmaların kontrolsüz yayılmasının hem çevre hem de insan sağlığı üzerindeki riskleri çevreleyen endişelerden kaynaklanan yasal kısıtlamalar nedeniyle bu alandaki başarı tam olarak değerlendirilememektedir

(Limbergen et al. 1998). Bu tür riskleri azaltmak için ‘intihar element’ ve immobilizasyon teknikleri dikkate alınmıştır (Liu et al. 2008). İntihar teknikleri, parçalanacak kirleticinin çevresel bir sinyalle bastırılmasıdır. Sinyal mevcut olmadığında intihar elementi etkinleştirilir. Bu tekniğin, tasarlanmış hücre yayılmasını önlemede başarılı olduğu görülmüştür (Torres et al. 2004). Mevzuat genellikle riski azaltmak için moleküler genetiğin nasıl kullanılacağını göz ardı eder, sonuçta gelecekteki araştırmalar düzenlemeleri hem takip etmeli hem bilgilendirmelidir (Davison 2005).

Ticari inokulantlar artık yaygındır. Bu tür ürünler, hücre yapıları, hücre yoğunluğu, tavsiye edilen dozaj oranları ve diğer katkı maddelerinin eklenmesi açısından büyük farklılıklar gösterir, örneğin stabilizatörler ve besinler. Uygun bir ürün seçerken bu faktörlerin her birinin dikkate alınması gerekir (Stroo et al. 2013). Ticari bir inokulant kullanımı, acil bir iyileştirme sorununa kısa vadeli bir çözüm sunabilir; ancak başarı oranları değişebilir çünkü bu tür aşılar tipik olarak kararlı koşullar altında üretilir ve test edilir. Bu tür koşullar, birçok endüstriyel atıksuyla ilgili gerçek bir senaryo yansıtmaz dolayısıyla inokülün canlı kalma özelliğini azaltır (Stephenson and Stephenson 1992).

2.9.1.2 Biyoaugmentasyonun Başarısızlıkları ve İyileştirme Teknikleri

Biyoaugmentasyon ile ilgili başarılı raporları, başarısız biyoaugmentasyon girişimleri ile ilişkilendirilmiştir. Herhangi bir uygulamanın başarısının temeli, inoküle edilen bakterilerin canlı kalma ve gelişme yeteneğidir. Mikroorganizma büyüme oranının washout oranından daha düşük olması dahil olmak üzere biyoaugmentasyonun başarısızlığına neden olan birçok faktör (Tablo 2.6) belirtilmiştir (Boon et al. 2003), yetersiz inokulum boyutu (Ramadan et al. 1990), yetersiz substrat, protozoalar tarafından avlanma (Goldstein et al. 1985; Bouchez et al. 2000; Boon et al. 2003), aşılana bakteriler ve yerli bakteriler arasındaki rekabet (Stephenson and Stephenson 1992; More et al. 2010), diğer inhibe edici maddelerin varlığı (Tyagi et al. 2011), alternatif substratların varlığı (Chitra et al. 1995), alıştırma süresi, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerde aşırılıklar (Tyagi et al. 2011) bu faktörlerdendir. Biyoaugmentasyon işleminin başarısızlıklarının anlaşılması uygulamanın ilerlemesini

sağlamak için önemlidir. Biyoaugmentasyondaki başarısızlığın temelinde, inokulumun konakçı ortama yetersiz adaptasyonu yatmaktadır. Chong ve arkadaşları (Chong et al. 1997), petrol türevli atıksuların arıtılması için tasarlanan karışık kültürlerin, sistemde çoğalmadıklarını pH şok koşullarının arıtmaya hiçbir fayda sağlamadığını ve sürekli yüksek olan pH koşullarının başarısızlığa neden olduğunu bildirdiler. Başarısızlık, inoküle edilen popülasyonun büyüme geriliği veya ölümün bir sonucu olarak biyokütlenin washout'u ile bağlantılıydı. Yetersiz taşıyıcı sistemi ve şiddetli hava kabarcıkları da dahil olmak üzere, kötü reaktör koşullarının bir sonucu olarak biyokütlenin yıkanması da Park ve arkadaşları (Park et al. 2008) tarafından siyanürlü atık suların arıtılması sırasında rapor edilmiştir. Ek olarak, Songzhe ve arkadaşları (Songzhe et al. 2009), inoküle edilen bakterilerin yerli bakterilerle etkileşime girmesi nedeniyle yeterli biyofilm oluşturamadıklarını ve biyokütlenin yıkanmasına ve biyoaugmentasyonun başarısız olmasına neden olduklarını bildirmişlerdir. Yetersiz adaptasyon olasılığı endüstriyel atıksularda artar ve bu, iyileştirme koşullarını ve adaptasyon tekniklerini anlamamanın gerekliliğini vurgular.

Tablo 2.6 Biyoaugmentasyon başarısızlıklarının nedenleri ve olası iyileştirme teknikleri

Problem	Problemin İyileştirilmesi	Referans
Predasyon (Protozoanın aşırı büyümesi)	-Yüksek başlangıç dozları -Otlatmaya karşı koruma -Isının iyileştirilmesi	(Ramadan et al. 1990; Songzhe et al. 2009)
Yerli ve inoküle edilen bakteriler arasında besinler için rekabet	Besin takviyesi (Biyostimülasyon)	(Ramadan et al. 1990)
Yetersiz inokülasyon	-Tekrarlanan inokülasyonlar -Sürekli inokülasyon	(Boon et al. 2003)
Zayıf biyofilm oluşumu	İmmobilizasyon/ kapsülleme	(Quan et al. 2004)

Yıkama	-Yüksek başlangıç dozları -İmmobilizasyon/ kapsülleme	(Stormo and Crawford 1992;Quan et al. 2004)
Toksinler nedeniyle inoküle edilen bakterilerin azalması	-Olumsuz çevre koşullarından koruma -İklimlendirme periyoduna izin verme -Otokton biyoaugmentasyon kullanımı	(Stephenson and Stephenson 1992;Ueno et al. 2007;Songzhe et al. 2009)
Alternatif substrat bulundurma	Ekolojik arka planın detaylı anlaşılması	(Songzhe et al. 2009)
Ekosistem dengesini bozan aşırı inokülasyon	Doz oranın dikkatli değerlendirilmesi	(Bouchez et al. 2000)
Açlık dönemleri	Sistemin daha uzun süre canlı kalmasını sağlayacak yüksek doz oranı	(Martín-Hernández et al. 2012)

2.9.1.3 Biyoaugmentasyon İzleme Teknikleri

Hedef kirleticinin biyodegradasyon kinetiğini güçlendirmenin yanı sıra, başarılı bir biyoaugmentasyon stratejisi için moleküler tekniklerin kullanılması gerekir (eklenen mikroorganizmaların aktivitelerinin veya canlılıklarının izlenmesi). Son birkaç yılda augmentasyon farklı tekniklerle izlenir. Bu teknikler; PCR - DGGE (Guo et al. 2009), PCR-Gradyan Jel Elektroforezi (TGGE) (Fouratt et al. 2003), T-RFLP (Tsutsui et al. 2010), Ribozomal İntergenik Boşluk Analizi (RISA) (Qu et al. 2009), Karşılatırmalı PCR ve Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR) (Muttray et al. 2001), Kantitatif PCR ve DGGE (Watanabe et al. 2002), Kantitatif PCR and RT-PCR (Morris et al. 2014), FISH (Patureau et al. 2001), Yeşil Floresan Proteini (gpf-gen işareti) gibi

işaretleyici genlerin kullanımıdır (Yu et al. 2010). Bu teknikler hakkında daha detaylı bilgi Tablo 2.7’de verilmiştir.

Çevresel çalışmalarda mikroarray uygulama potansiyelleri bile rapor edilmiştir ve bu tür numunelerde özgüllük, duyarlılık ve miktar tayini ile ilişkili çeşitli zorluklar vurgulanmıştır (Zhou and Thompson 2002). Bununla birlikte, HTS’nin yeni yollar açması çevresel mikrobiyolojide devrim niteliği taşıyor (Logares et al. 2012). HTS, ekolojik süreçler ve mikrobiyal topluluk işleyişi hakkında yeni bir bakış açısı sağlayacaktır. Metagenomik analizlerle birlikte tek hücre dizileme uygulamaları yakın zamanda gözden geçirilmiştir (Lasken 2012). Yeni güçlü biyoinformatik araçlar, anonim prokaryotik genomlarda genom montajını ve gen tahminini iyileştiriyor, veri analizi çalışmalarındaki engelleri aşıyor görünmektedir.

Tablo 2.7 Bioaugmentasyon İzleme Teknikleri

İyileştirme Süreci	Tür/Konsorsiyum/ Plazmid/ genler	İzleme teknikleri	Kirleticilerin uzaklaştırılması/ Aktivitenin belirlenmesi	Referans
Düşük sıcaklıkta tam ölçekli WWT (SBR,oksidasyon yolu, anoksik-oksik aktif çamur-A/O)	Özel konsorsiyumlar; <i>Proterobacteria</i> , <i>Bacterioides</i> , <i>Nitrospirales</i> , <i>Cyanobacteria</i> Flokülant bakteri <i>Bacillus sp.</i> F2 <i>Bacillus sp.</i> F6	PCR-DGGE	Organikler. Atıksu Kalitesi: COD ($\leq 660 \text{ mg L}^{-1}$), NH_4^+-N ($\leq 8 \text{ mg L}^{-1}$)	(Guo et al. 2010)
Laboratuvar ölçekli SBR’ler	Ticari ürün, NBP	PCR–TGGE	Organikler (sentetik atık su), amonyak giderimi	(Fouratt et al. 2003)

Laboratuvar ölçekli aktif çamur reaktörleri	Plazmid pJP4 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Pseudomonas putida</i> (donor) (yerli transkonjugantlar)	T-RFLP	Organikler, (KOİ giderimi %84-86)	(Tsutsui et al. 2010)
Laboratuvar ölçekli anaerobik reaktörler	Metil koenzim M redüktazın α altbirimini kodlayan mcrA geni ve transkriptler	Kantitatif PCR and RT-PCR	Metanojen dinamikler, mcrA gen kopyasını metan aksına bağlar	(Morris et al. 2014)
Laboratuvar ölçekli membran biyoreaktör (MBR)	<i>Sphingomonas xenophaga</i> QYY	RISA	Sentetik atıksudaki bromoamin asit (boya), KOİ giderimi %30-50, renk giderme oranı (süpernatant ve membran atığı) %80-90	(Qu et al. 2009)
Laboratuvar ölçekli kemostat	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> BKME-9	Karşılaştırmalı PCR ve RT-PCR	Dihidroabietik asit (DHa), iki kat daha hızlı degradasyon oranı	(Muttray et al. 2001)
Aktif çamur arıtma sistemi	Çok bileşenli fenol hidroksilaz mPH, PhcKLMNP ve transkripsiyonel düzenleyiciler, PhcR, ve PhcT (<i>phcTRKLMNP</i>)	Karşılaştırmalı Kantitatif PCR	Fenol, ortalama fenol oksijenleme aktivitesi $15.3 \pm 0.8 \text{ U g}^{-1}$	(Watanabe et al. 2002)
SBR anaerobik-aerobik	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i> (serbest hücreler, farklı inokülasyon seviyeleri/ sürekli tedarik/ aljinat boncuklarda immobilize	FISH	Azot'un uzaklaştırılması (%33-43); veya Azot-oksitler ($10.2\text{--}13.8 \text{ mg L}^{-1}$), eş zamanlı fosfat konsantrasyonu ($0\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$), amonyak yok.	(Patureau et al. 2001)

Pilot ölçekli, sürekli havalandırılmalı reaktörler, biofilm oluşumu için aktif karbon	Aktif çamur nitrifikasyonu (pilot tesis)	FISH	%100'e yakın TAN oksidasyonu, kararlı koşullarda maksimum nitrifikasyon kapasitesi $1.3 \text{ gN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (sentetik atık su)	(Bartrolí et al. 2011)
Laboratuvar ölçekli SCAS reaktörleri	<i>Comamonas testosterone I2gfp</i> (kromozomal olarak işaretli)	Otofloresans, PCR–DGGE	3-Kloranilin (3-CA) (sentetik atık su) başlangıçta tamamen, sonraki işlemlerde %50 giderilir.	(Boon et al. 2003)
Laboratuvar ölçekli SBR	<i>Pseudomonas putida</i> ONBA-17gfp	Otofloresans, PCR– DGGE	o-Nitrobenzaldehit (ONBA) tam degradasyonu ve %96.28 KOİ (sentetik atık su)	(Yu et al. 2010)
WWT: Atık su arıtma SBR: Sıralı kesikli reaktör; SCAS: Yarı sürekli aktif çamur; TAN: Toplam amonyak azotu.				

2.9.2 Biyostimülasyon

Besin içermeyen arıtma sahalarında, arıtma sürecini hızlandırmak için en iyi seçenek olarak biyostimülasyon (besinlerin eklenmesi) uygulanmıştır (Kuppusamy et al. 2016). Taylor ve Jones (Taylor and Jones 2001) hem laboratuvar hem de tarla ölçeğinde kömür katranı içeren topraklara tek başına besin ilavesinin PAH biyodegradasyonunda önemli ölçüde başarısız olduğunu gösterdiler. Bununla birlikte, 55 gün sonra inorganik besinlerle birlikte biyodizel (düşük fitotoksisite ile biyodegradasyon kolayca gerçekleşmiştir) eklenmesi, sadece besinle muamele edilmiş örneklerle göre bir dizi PAH bileşeninde ki degradasyonu arttırmıştır. Biyodizel işlemlerle PAH degradasyonuna ki artış, katran çözünürlüğü ve dispersiyonuna bağlanmıştır, böylelikle PAH biyoyararlanımını ve yerli biyodegrederler tarafından alımı artmıştır.

2.9.3 Fitoremediasyon

Fitoremediasyon, potansiyel olarak saha ölçeğinde hidrokarbon kontaminasyonunu ele alan bitki destekli biyoremediasyondur (Petruzzelli et al. 2016). Bitkiler tarafından hidrokarbon biyodegradasyonunun arttırması araştırılmıştır çünkü bitkilerin toprakta kirletici maddeleri biriktirebildikleri, ayırabildikleri, kimyasal olarak dönüştürebildiği; kirleticinin biyoyararlanımını arttırmak için yüzey aktif madde görevi gören enzimler salgıladıkları, toprağın besin durumunu iyileştirdikleri, toprak mikroçevresi ile sinerjik olarak etkileşime girerek rizosferik mikroorganizmaların ksenobiyotik degradasyon yeteneklerinin geliştirdikleri bilimektedir (Roy et al. 2005). Genellikle derin ve geniş kök yüzey alanlarına sahip ve daha az bakım gerektiren yüksek adaptasyonlu bitkiler tercih edilir (Alagić et al. 2016). Meng ve arkadaşları (Meng et al. 2011) bazı çok türlü karışımların (çavdar otu, beyaz yonca -*Trifolium repens*- ve kereviz -*Apium graveolens*-), petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş toprakların monokültürler üzerinde fitoremediasyonunu kolaylaştırdığı öne sürmüşlerdir.

Fitoremediasyonu iyileştirmenin bir başka yolu, genellikle bitkilerdeki çevresel stresi hafifletme ve bunu yaparken ideal koşulların altında bitkinin hayatta kalmasını artırma yeteneğine sahip bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (PGPR) kullanılmasıdır (de Boer and Wagelmans 2016).

PGPR, bitki kök gelişimini uyarır ve kök büyümesini artırır. Ayrıca, nitrojen fiksasyon mekanizması, sideroforların sentezi, fitohormon üretimi ve minerallerin PGPR ile çözündürülmesi, toprak verimliliğini ve fitoremediasyon gelişimini artırır. Huang ve arkadaşları (Huang et al. 2004), PGPR'nin (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* ve *Azospirillum brasilense*) bitki büyümesini hızlandığını ve özellikle aşırı derecede kirlenmiş topraklardaki köklerde, PAH'ların bitkiler üzerindeki toksik etkilerini azalttığını doğrulamışlardır.

2.9.4 Kompostlama Teknolojisi

Kompostlama teknolojisi, kirlenmiş toprakların arıtılması için kullanılan ex-situ teknoloji olarak sınıflandırılır. Son yıllarda çeşitli organik kirletici maddelerin

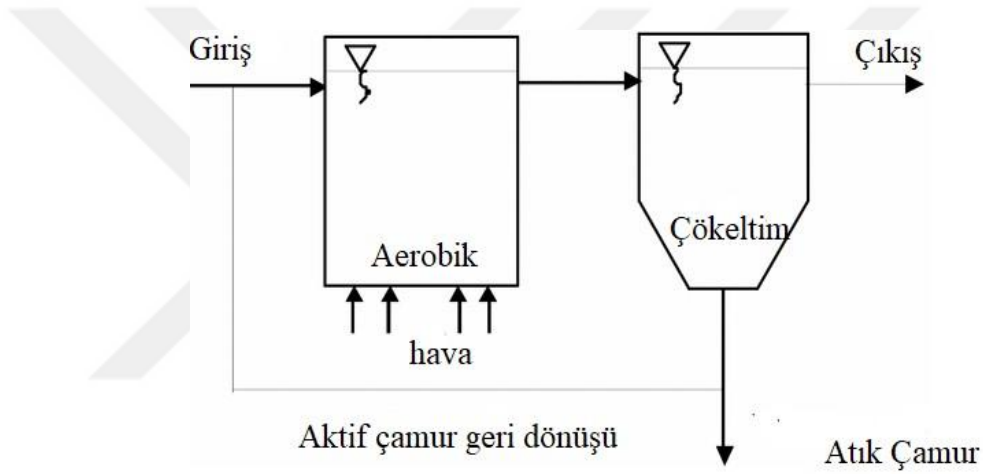
degradasyonunda yüksek etkinlikleri kanıtlandığı için, bu yöntem daha fazla ilgi görmüştür (Antizar-Ladislao et al. 2004). Yöntem kirlenmiş toprağa kompost veya organik yardımcı substratların eklenmesine dayanır ve yardımcı substrat, karışım içindeki çeşitli mikrobiyal popülasyonların etkisine bağlı olarak olgunlaşırken hedef kirlenici degrades olur (Guerin 2000)

Kompostlama, organik atıkları stabilize etmek için temelde oksijen, optimal nem içeriği ve gözeneklilik gerektiren aerobik bir süreç olarak tanımlanır ve ortak kontrol değişkenleri sıcaklık, oksijen ve nemdir (Bolta et al. 2003). Kompostlama biyoremediasyonu, kompostlama teknolojisinin atık ve kirlenici maddelerin arıtılmalarında kullanılan bir uygulamadır. Herhangi bir kompostlama işlemi sırasında makul bir süre içinde optimum sonuçları elde etmek için proses kontrol parametrelerinin optimum değerler dahilinde ayarlanması gerekir ve proses iki ana aşamada gerçekleşir. İlk aşama; sıcaklığın istikrarlı bir artışla mezofilik aralıklardan (25-45 °C) termofilik aralığa (45 °C'den fazla) ulaşırken mikrobiyal aktivite ile karakterize edilen ayrışma/aktif aşamadır. Bu aşamada etkili mikrobiyal aktivite için aerobik koşulları sürdürmede yüksek oranda havalandırma gereklidir. İkinci aşama, daha düşük sıcaklıkta gerçekleşen ve besin havuzu tükendiğinde mikrobiyal aktivitenin nispeten düştüğü kütleme aşamasıdır (Antizar-Ladislao et al. 2004).

2.10 Aktif Çamur Sistemi

Aktif çamur sistemi, bu yüzyılın başında ilk kez İngiltere'de başlayan ve atık sularda bulunan ve çökelmeyen organik maddelerin ikincil biyolojik arıtım ile mikroorganizmalarca çökelebilen maddelerle dönüştürülmesi işlemine dayanan bir sistemdir. Aerobik arıtımın olduğu bu sistem organik maddelerin O_2 ve H_2O , NH_4 'e oksidasyonu ile gerçekleşir ve yeni bir hücre biyokütlesi oluşur. Atık su arıtım sisteminde mikroorganizmalar havalandırma havuzunda büyütülürken, son çökeltme havuzunda çökelti olarak sistemden uzaklaştırılırlar. Mikroorganizmalardan oluşan bu çökeltiye 'Aktif Çamur' denir. Sistem için gereken hava, mekanik havalandırma ya da diffüzörlerle sağlanır ve mikrobiyal yapılar arıtma tankı içerisinde flok yapılarını oluşturur (Bitton 2005).

Havalandırma ve çökeltim tankı aktif çamur sisteminin temelini oluşturur. Havalandırma tankı, organik maddelerin aerobik oksidasyonun gerçekleştiği yerdir ve arıtımın düzgün olabilmesi için karışımında bulunması gereken askıda katı madde miktarı yaklaşık olarak 1500-2500 mg/L' dir. Burada havalandırma mekanik olarak gerçekleşir. Havalandırma tankında oluşan mikrobiyal floğun çökeltimi ise çökeltim tankında gerçekleşir. Oluşan çökeltinin bir kısmı besin / mikroorganizma oranını korumak için tank sisteminden dışarıya atılırken bir kısmı havalandırma tankına geri gönderilir (Bitton 2005). Şekil 2.10'da aktif çamur sistemi gösterilmiştir (Weijers 2000).



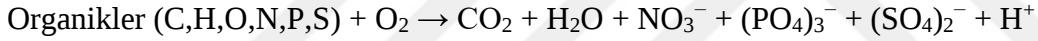
Şekil 2.10 Aktif çamur sistemi (Weijers 2000).

Aktif çamur, mikroorganizmaların matrisleri, cansız organik maddeler ve inorganik malzemelerden oluşan biyolojik sıvıları içerir. Mikroorganizmalar arasında bakteriler, funguslar, protozoa ve ayrıca rotiferler, böcek larvaları ve solucanlar gibi daha yüksek hayvan formları bulunur. Aktif çamur prosesi, biyolojik sıvıların sürekli olarak temasa geçmek ve oksijen varlığında organik maddeleri oksitlemek için sirküle edildiği bir sistem olarak tanımlanabilir. Sürekli ve başarılı biyolojik oksidasyon için sistemde "aktif" bir biyolojik form kütlelerinin muhafaza edilmesi, prosesin neden "aktif çamur" arıtması olarak belirlendiğini açıklar.

Aktif çamur arıtmasının amaçları iki yönlüdür: (a) organik maddelerin mümkün olan en kısa sürede mümkün olan maksimum seviyede uzaklaştırılmasını sağlamak ve

(b) iyi bir çökelme karakteristiğine sahip flokülant biyolojik sıvılar üretmek. Her ikisi de ikincil verimlilik kalitesini kontrol etmek için gereklidir. Ekonomik bakış açısından, her iki hedefin de karşılanması arzu edilir, çünkü küçük havalandırma tankları ve son durultucular kullanılabilir. Ancak iki hedef uyumlu değildir. Organik maddelerin hızlı bir şekilde uzaklaştırılmasında çok etkili olan biyolojik floklar, normalde zayıf bir şekilde çökelen floklardır veya tersi de geçerlidir. Bu konudaki takas, çeşitli aktif çamur proseslerinin performansında kendini gösterir. Tasarım mühendisleri ve fabrika operatörleri, bir tesisin uygun tasarımı ve işletimi için bu iki hedefin uyumsuzluğunun tamamen farkında olmalıdır, böylece belirli spesifik arıtma işlemleri yapılabilir ve arıtma performansının optimizasyonu akılcıca planlanabilir (Makinen et al. 1993).

Aktif çamur proseslerinin kapasitesini ve sınırlamalarını bilmek önemlidir. Havalandırma tankında biyolojik olarak parçalanabilen organikler, inorganiklere dönüştürülür. Organiklerin tam oksidasyonu şu şekilde ifade edilebilir:



Yukarıdaki denklem, sonsuz bir havalandırma süresini ve tam oksidasyonu gerçekleştirmek için *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter* dahil olmak üzere bol miktarda mikroorganizmanın mevcut olduğunu varsayar. Ekonomik kısıtlamalar, uzun bir havalandırma işlemi için bile tam oksidasyon için yeterli zamana izin vermez. Mevcut operasyon şemasıyla havalandırma tankında daha az rekabetçi organizmaların (örneğin, *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter*) sabit bir popülasyonunu korumak da mümkün değildir. En belirgin şekilde, proseste nitrifikasyon eksikliği görülür ve sonuç olarak çıkış suyunda önemli miktarda amonyak azotu bulunur. Tipik bir aktif çamur arıtma işlemi aşağıdaki gibi gösterilebilir;

- Amonyak nitrojeni 12 mg/L, N olarak
- Fosfat 10 mg/L $(\text{PO}_4)_3^-$ olarak
- Nitrat 0.1 mg/L, N olarak
- Nitrit 0.01 mg/L, N olarak
- BOİ 20mg/L
- Askıda katılar 30 mg/L

Çıkış suyunda yüksek nitrojen ve fosfat kalıntıları dışında, arıtma tesisi operatörleri 20 mg/L'lik bir BOİ ve 30 mg/L'lik askıda katı maddelerden veya bu seviyelere yakın miktarlardan memnundur.

Temmuz 1977'de, Federal Su Kirliliği Kontrol Yasasında yapılan 1972 değişikliklerinin yetkisi altında ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından kamuya ait ikincil arıtma tesisleri için yayınlanan yürürlükteki çıkış suyunun kılavuzlarında, maksimum aylık ortalama çıkış suyu BOİ'si ve askıda katı madde gereksinimleri sırasıyla 30 mg/L ve 45 mg/L olarak belirtilir. Ayrıca, sonuçta çıkış suyunda alıcı suya oksijen talebi uygulayabilecek olan refrakter organiklerin varlığı da göz ardı edilmemelidir. Sıfır kirlilik deşarjı hedefine ulaşmak için çıkış suyunun cilalanması amacıyla üçüncül arıtma proseslerine ihtiyaç duyulacaktır (Goldstein et al. 1985;Limbergen et al. 1998;Boon et al. 2003;Razo-Flores et al. 2006;Ma et al. 2009).

2.10.1 Aktif Çamur Sisteminde Mikrobiyal Populasyon

Aktif çamur sisteminde mikrobiyal popülasyonun %95' ini bakteriler oluşturmakla birlikte alg, protozoon, metazoon, virüs gibi birçok farklı biyolojik komüniteyi birlikte bulundurmaktadır (Jenkins D. 1993). Atık suyun biyolojik oksidasyonunda hem sentez hem de oksidasyon meydana gelir. Prosesin yürütülmesinde birçok aktif çamur mikroorganizması grubu yer alır. Önemli gruplar Tablo 2.8'de açıklanmıştır.

Uygun şekilde çalıştırılan bir aktif çamur sisteminde, önemli mikroorganizma gruplarının çoğunu içeren biyolojik floklar üretilir. Metazoa ve hızlı hareket eden protozoa, biyolojik flokların bir parçası değildir çünkü onlardan kopabilirler. Bununla birlikte, metazoa ve protozoa sürekli olarak biyolojik atıklar üzerinde beslenirler ve sonuç olarak yüksek düzeyde stabilize edilmiş atık sularda birlikte bulunurlar. Aktif çamur prosesinin ekosistemi karmaşık olsa da, bazı genel biyolojik oksidasyon prensipleri uygulanabilir (Verma et al. 2011;Garg et al. 2017).

Tablo 2.8 Aktif çamur mikroorganizma grupları

Grup	Alt grup	Genel karakteristik	Tanımlanmış organizmalar
Bakteri	1. Zoogloea-formları	Çeşitli türlerden bir büyüme, sporsuz oluşum, hareketli ve kapsüllenmiş çubuklar, nitrifikasyonsuz, karbonhidratları hızla okside eder ve jelatin, kazein ve peptondan amonyak üretir, iyi organize edilmiş lifler üretir	<i>B. subtilis</i> : aerobik spor oluşturuucu, g ⁺ , nitrifikasyonsuz <i>Alcaligenes</i> : g ⁻ çubuklar, proteolitik <i>Chromobacterium</i> : g ⁻ çubuklar, proteolitik (Flavobacterium) <i>Pseudomonas</i> : g ⁻ çubuklar, tercihen karbonhidratlar <i>Achromobacterium</i> : g ⁻ çubuklar <i>Spirillum</i> : spiral ya da floklaşmayan eğimli çubuklar
	2. Filament öz	Zayıf çökelme özelliklerine sahip gevşek yüzeyli oluşum	<i>Sphaerotilus natans</i> : (leptothrix, cladothrix) <i>Bacillus mycoides</i> <i>Crenothrix Beggiatoa</i>
	3. Diğerleri	Belirli bir konu için üretilmiş veya tartışmalı işlevsel önem	Nitrifikasyon bakterileri: <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i> Bağırsak grubu: <i>B. coli</i> , <i>B. aerogenes</i> . biraz proteolitik etki ve karbonhidratlarda az etki
Fungi		Anormal durumlar dışında nadiren bol, ipliksi	<i>Geotrichoides paludosus</i> <i>Pullularia pullulans</i> <i>Phoma Oospora</i> (<i>Geotrichum</i>) <i>Sporotrichum Fusarium</i> : filamentli değil, iyi yumru oluşumu
Protozoa		Bakterilerde beslenir, ancak aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda çözünür organikler de kullanır	Siliyat: serbest yüzme (<i>Paramecium</i>), saplı (<i>Vorticella opercularia</i>) <i>Suctoria</i> : erken kirpikli, serbest yüzme aşaması ve yetişkin saplı aşama: bakteri ve protozoa ile beslenir
		Daha iyi organik uzaklaştırma sağlamak için bakteri popülasyonunu kontrol eder	Flagellata (Mastigophora): Flagellatlı, sadece yetersiz havalandırılmış ortamda bulunur
Metazoa		Aktif çamurda sıklıkla bulunan canlılığın daha yüksek formları; Bazen ekolojik sistemde bir faktör olarak kabul edilecek kadar bol hale gelebilirler. Bakteriler, protozoa ve alglerle beslenir	Rotifer: çok hücreli, bir uçta iki grup tüyün dönme hareketi. Aerobik Nematod: aerobik solucanlar, diğer organizmalar tarafından kolayca parçalanmayan katı organikleri metabolize edebilir

Aktif çamur ve biyofilm sistemlerinde kullanılan bakteriler sayesinde zararlı kimyasalar, kontaminant maddeler ve istenmeyen besin maddeleri etkili bir şekilde atık sudan uzaklaştırılırlar (Horan 1989; Lin et al. 2009). Flok kütlesinin artması oksijen difüzyonunu kısıtladığından aktif aerobik bakteri sayısı azalması ile anoksik zonlar meydana gelir. Oksijen seviyesi 4 mg/L'yi geçtiğinde bu zonlar kaybolur (Li and Bishop 2004; Bitton 2005). Standart bir aktif çamurda toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 10^8 kob/mg olarak bilinir.

Aktif çamur sistemlerinde en çok bulunan bakteriler Gram negatif bakteriler olmakla birlikte yüzlerce bakteri türü gelişebilmektedir ve bu bakterilerin kültürel metotlarla tanılandırılması sınırlıdır. Bu nedenle moleküler tabanlı teknikler ile tanılama da yapılmaktadır. Tablo 2.9'da kültür tabanlı tanılama ile elde edilen bakteriler gösterilmiştir. (Bitton 2005).

Tablo 2.9 Standart aktif çamurdaki bakterilerin aerobik heterotrofik dağılımı

Cins yada Grup	% Toplam İzolat
<i>Pseudomonas-Comamonas</i>	50.0
<i>Alcaligenes</i>	5.8
<i>Pseudomonas (floresan grup)</i>	1.9
<i>Paracoccus</i>	11.5
Unidentified (gram-negatif basiller)	1.9
<i>Aeromonas</i>	1.9
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	13.5
<i>Bacillus</i>	1.9
<i>Micrococcus</i>	1.9
<i>Coryneform</i>	5.8
<i>Arthrobacter</i>	1.9
<i>Aureobacterium-Microbacterium</i>	1.9

2.10.2 Askıda Katı Madde (AKM)

Aktif çamur sisteminde, havalandırma tankı içerisinde bulunan sıvı karışım içerisinde çökebilen ve çökemeyen; organik ve inorganik katıların tamamına askıda katı madde denir. Askıda katı madde, reaktörden belirli bir hacimde alınan aktif çamur örneğinin 0,45 µm por çaplı membran filtreden membrane filtrasyon yolu ile geçirilmesinden sonra filtre üzerinde kalan çamurun 103°C sıcaklıkta 1 saat kurutulmasından elde edilen mg/L cinsinden verilen çamur kuru ağırlığıdır. Tüm değerler mg/L cinsinden olmalıdır (Özdemir and Eltem 2001).

2.10.3 Hidrolik Alıkonma Süresi (HRT)

Hidrolik alıkonma süresi, aktif çamur işlemindeki havalandırma tankına giren sıvının tank içinde geçirdiği sürenin ortalamasıdır. Havalandırma havuzunda alıkonma süresi değişiklik gösterebilir.

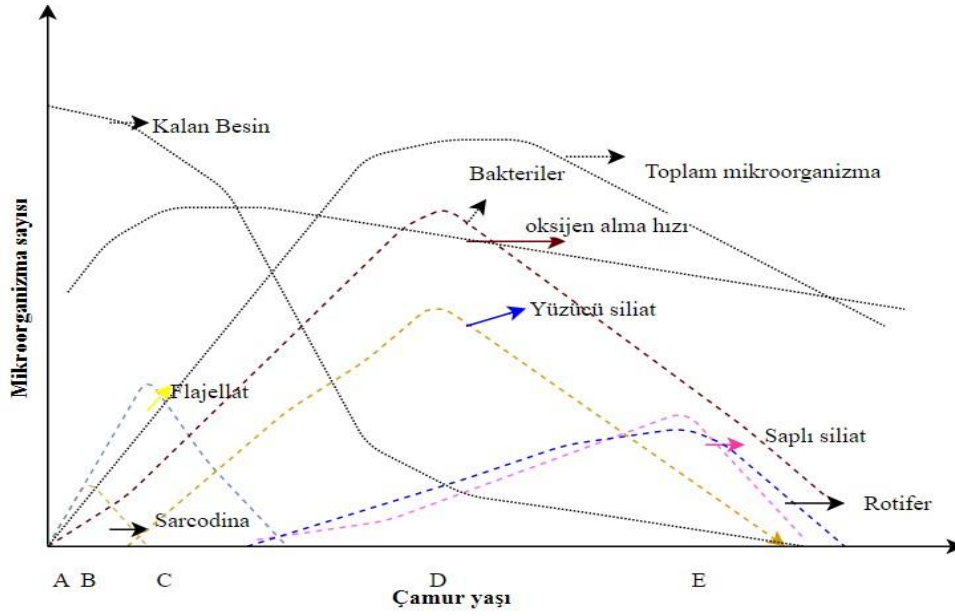
2.10.4 Çamur Hacim İndeksi (ÇHİ)

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

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

2.10.5 Çamur Yaşı

Reaktör içinde bulunan mevcut aktif çamurun kalitesini belirleyen çamur yaşıdır ve mikroorganizmaların sistemde kaldığı ortalama süredir. HRT saatlerle ifade edilirken, çamur yaşı günlerle ifade edilir. Sistemdeki çamurun yaşı sürekli kontrol edilmelidir. Şekil 2.11’de göreceli üstünlük diyagramı ile çamur yaşına göre reaktör mikroorganizma içeriği gösterilmektedir.



Şekil 2.11 Göreceli üstünlük diyagramı (Özdemir ve Eltem, 2000)'den uyarlanmıştır (Özdemir and Eltem 2001).

- A. kısmında atık su tanka eklenmekte ve havalandırma başlamaktadır. Mikroorganizmalar bu aşamada birbirine üstünlük göstermeden sistemde birlikte bulunmaktadır.
- B. kısmında Protozoanlardan olan Sarcodina'nın sadece besin varlığında baskın halde görülmektedir
- C. kısmında Protozoanlardan olan Flagellatlar'ın en baskın halde görülmektedir. Burada 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 yaşlanır. Saplı siliat ve rotiferler baskın olduğu gözlenmiştir (Özdemir and Eltem 2001).

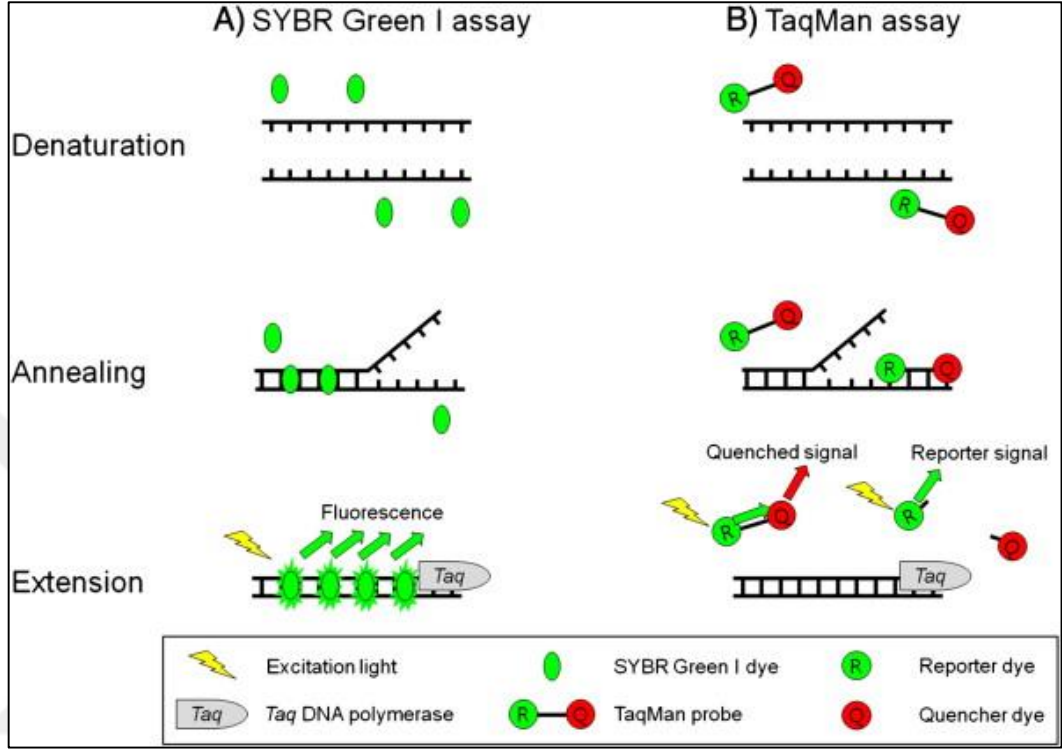
Aktif çamur sistemini etkileyen pek çok parametre vardır. Köpük oluşumu, sıcaklık, besin, oksijen ve pH en önemli parametrelerdir. 20°C, pH 6,5 - 8,5, 2 mg/L çözülmüş oksijen maksimum değeri, yeterli besin ve toksik madde olmaması koşulu aktif çamur sistemi için ideal koşullardır.

2.11 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

Atık su mikrobiyal topluluklarını keşfetmek için kullanılan moleküler teknikler dört kategoriye ayrılabilir: klon kitaplığı, moleküler parmak izi, hibridizasyon ve kantitatif gerçek zamanlı PCR. Çevresel çalışmalarda, q-PCR ilk olarak zararlı mikroorganizmaların tespitinde kullanılmıştır (Bowers et al. 2000; Kuhnert et al. 2000; Lin et al. 2000). Son zamanlarda ise, daha uygun fiyatlı ve erişilebilirliği kolay olduğu için atık sularda uygulanması kapsamlı olarak incelenmiştir (Zhang and Fang 2006). Q-PCR'ın kantifikasyon uygulamaları, hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında çeşitli atıksu arıtma proseslerindeki sabit ve askıya alınmış mikrobiyal topluluklar hakkında daha derinlemesine bilgi edinmemize yardımcı olmuştur (Parameswaran et al. 2009; Saikaly et al. 2010; Lee et al. 2011).

PCR, nükleik asitlerin saptanmasında devrim yaratsada amplikonun yalnızca son konsantrasyonu ölçülebildiğinden kantitatif analizlerde uygulanması tavsiye edilmez. PCR sırasında hedef sekans üssel olarak amplifiye edilir; ancak gerçekte PCR'nin bazı doğal sınırlamaları nedeniyle son konsantrasyon şablon DNA'nın başlangıç konsantrasyonu ile orantılı değildir (Zhang and Fang 2006). Geleneksel PCR'ın aksine q-PCR, DNA amplifikasyonunun ilerlemesini eş zamanlı olarak izleyebilir ve üssel amplifikasyon aşamasını görselleştirebilir (Heid et al. 1996). Hedef sekansların mutlak nicelendirilmesinin anahtarı olan bu eş zamanlı izleme, amplikonlar biriktikçe yayılan floresanın sürekli olarak ölçülmesiyle elde edilir. Spesifik olmayan DNA bağlayıcı boyalar, hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, ışıklı problemler, moleküler işaretleyiciler, sunrise primerleri ve scorpion primerleri dahil olmak üzere çeşitli floresan molekülleri içeren tespit kimyasallarıdır (Kim et al. 2013). Her tespit yönteminin benzersiz özellikleri olmasına rağmen, tüm yöntemlerde, floresans sinyalinin seviyesi, hedef amplikonların kümülatif miktarını yansıtır. Çeşitli tespit

kimyasalları arasında; SYBR Green I ve TaqMan testleri (Şekil 2.12), mevcut çevresel mikrobiyal ekoloji çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir.



Şekil 2.12 q-PCR için tespit kimyasalları: (A) SYBR Green I testi ve (B) TaqMan testi (Kim et al. 2013).

Mikrobiyal topluluk analizinin bir aracı olarak q-PCR, atık su arıtma proseslerini incelemek için giderek daha da popüler hale gelen bir yöntemdir. Belirli genlere (primer-problar) özel oligonükleotidleri kullanan q-PCR, hedef genlerin mutlak niceliğini sağlar, böylece hedef genleri taşıyan hedef mikroorganizmaların popülasyonunu seçici olarak tahmin eder. Biyolojik proseslerde bu bilgi, mikrobiyal topluluk dinamiklerini izlemek, süreç performansını teşhis etmek, önemli mikrobiyal oyuncuları belirlemek ve kinetiği değerlendirmek için çok önemlidir. q-PCR, hedef gen kopyalarının sayılmasında en doğru yöntemlerden biridir. Teorik olarak herhangi bir hedef sekans seçilerek q-PCR ile tespit edilebilmesine rağmen, analizin spesifikliği ve hassasiyeti büyük ölçüde primer ve prob spesifikliğinden etkilenir. Bu nedenle, güvenilir bir analiz için, özellikle karışık kültür toplulukları (atık su arıtma

sistemlerindeki mikrobiyal topluluklar) üzerinde yapılan çalışmalarda, uygun şekilde tasarlanmış ve doğrulanmış primerlerin ve problemlerin kullanılması çok önemlidir. Oligonükleotid özgüllüğü, potansiyel olarak hatalı analize yol açan sınırlı dizi bilgisi, dizi dejenerasyonları, dizi veri işleme hataları ve yanlış tasarım dahil olmak üzere birçok faktör tarafından tehlikeye düşebilir.

Atık su ekoloji çalışmalarında q-PCR'in uygulanması, mikroskobik düzeyde atık su arıtım sistemleri anlayışımızı genişletmiştir ve gelecekte daha iyi proses kontrolü ve tasarımı için umut vericidir. Ancak, q-PCR uygulanırken dikkate alınması gereken sınırlamalar vardır. Yakın gelecekte pek mümkün olmasada bir mikrobiyal topluluğun gerçek yapısını ve dinamiklerini keşfetmek için bu sınırlamaların üstesinden gelinmelidir. Mükemmel olmasada q-PCR, mikrobiyal ekoloji çalışmalarını başka hiçbir teknik karşılaştırılabilir performans sağlamaz. Basitçe söylemek gerekirse, bu araştırma alanında tek gözlü olmak kör olmaktan daha iyidir. Yazarlar, q-PCR'in atıksu arıtma prosesleri gibi karmaşık mikrobiyal sistemlerin kantitatif araştırması için tercih edilen mevcut yöntem olduğuna inanmaktadır çünkü bu yöntem benzersiz bir hedef özgüllüğü sergilemektedir ve doğası gereği kesinlikle kantitatifdir. Bununla birlikte q-PCR analizleri, yöntemin sınırlamaları anlaşılabilir dikkatlice tasarlanmalı, yürütülmeli ve doğrulanmalıdır (Kim et al. 2013).

2.12 Mikroorganizmaları Saklama Stratejileri

Mikroorganizmalar endüstriyel alanda ve birçok araştırma programlarında kullanılmaktadırlar ve genetik, morfolojik ve fizyolojik yapıları değişikliğe uğramadan korunmalıdırlar. Mikroorganizmaları etkinliklerini kaybetmeden uzun süre ve saf olarak canlı tutmak için birçok saklama stratejisi vardır. En çok kullanılan yöntemler pasajlama (Winters and Winn 2010), kültürlerin mineral yağ ile kaplanması (Nakasone et al. 2004), dondurarak saklama (Gorman and Adley 2004; Smith D et al. 2008), sıvı içerisinde saklama ve liyofilizasyondur (Berner and Viernstein 2006; Morgan et al. 2006). Saklama stratejisini belirlemede yöntemin ucuz olması, saklama süresinin uzunluğu ve kolay taşınabilir olması oldukça önemlidir (Melin et al. 2007).

2.12.1 Pasajlama

Pasajlama, laboratuvarlarda ve endüstriyel alanda kullanılan en eski yöntemdir. Pasajlamada, tek bir koloni kullanılması istenmeyen seçim olasılığını ve doğal gerilemeyi arttıracığından hücre materyali koloninin büyük miktarından alınmalıdır (Uzunova-Doneva and Donev 2005).

Pasajlamada agar bileşiklerinin doğru seçilmesi kültür özelliklerinin korunmasını sağladığından en önemli noktadır. Suşların bazıları doğru besiyerinde 3-5°C’de 30 gün yaşarken bazıları birkaç yıl yaşar. Sıcaklığın 5°C’nin üzerindeki olması, hücre canlılığının kaybedilmesine neden olur (Ruban 1989). Bu yöntemle saklama süresi; mayalar için 1-3 ay arası, bazı bakteriler için 5-12 ay, mantarlar ise 5 yıldan fazladır.

2.12.2 Kültürlerin Mineral Yağ ile Kaplanması

Kültürleri korumanın bir diğer yolu olan mineral yağ ile kaplamadır (Lastra et al. 2002). Steril ve toksik olmayan bir mineral yağ ile sıvı veya katı besiyerinin kaplanması esasına dayanır. A. Limier tarafından ilk kez 1914’de *Neisseria gonorrhoeae*’ı saklamak için kullanılmıştır. Bu yöntemle 1921 yılında M. Michelle su içerisinde gonokok, meninokok ve pnömokokları saklamıştır (Krasilnikov 1967). Mineral yağ kullanımı ile mikroorganizmaların gelişimi ve metabolizmasını azaltan oksijen erişimini engellenir ve donma koşullarında hücre kurumasının önlenir. Parafin ve vazelin yaygın olarak kullanılan mineral yağlardır.

Bazı araştırmalara göre, pasajlama yapılmaksızın sadece vazelin kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların 1-12 ay saklandığı görülmüştür. Bu yöntemle, *Bacillus* için saklama süresi 8-12 yıl, *Azotobacter* ve *Mycobacterium* için 7-10 yıldır. Mayalar ile yapılan çalışmalarda ise bu yolla saklamanın 1 ile 7 yıl arasında değiştiği belirlenmiştir (*Candida*, *Endomycetes*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ve *Pichia*) (Arkadieva 1985).

2.12.3 Dondurarak Saklama

Dondurarak saklama kriyojenik sıcaklıklarda biyolojik materyallerin saklanmasıdır ve çoğunlukla -196 °C’de sıvı azot ya da -80 °C kuru buz içerisinde saklanmasını ifade eder. Düşük sıcaklık ile hücre su hareketi yavaşlar, protein ve DNA denatürasyondan ve hasardan korunur. Fizyolojik ve biyokimyasal hücre aktiviteleri durdurulmasıyla hücreler uzun süre saklanır. Uzun süreli korumalarda koruma için tavsiye edilen sıcaklık -80 °C ‘dir. -196 °C’de DNA mutasyonlarının şansı neredeyse sıfır olduğundan ideal sıcaklık olarak kabul edilir (Prakash et al. 2013).

Bazı araştırmalara göre, kriyojenik sıcaklıklarda mikroorganizmaların % 10-15 gliserol veya % 5-10 DMSO ile korunmasını tavsiye edilir (Crespo et al. 2000;Gorman and Adley 2004;Cody et al. 2008). Mikroorganizmaların çoğu dondurarak saklama yönteminde yaşanabilirlik ve genotipik bütünlük açısından iyi sonuçlar verir (Nagai et al. 2005;Stielow et al. 2012).

DMSO (%5) ve Gliserol (%10-15) hücreye penetre olma kapasitesi yüksek olan maddelerdir ve hücreyi suyun donma noktasını düşürerek korurlar. Hücre içinde buz kristali ve hidrojen bağı oluşumunu ve önler (Fuller 2004;Chian and Quinn 2010). Gliserol fizyolojik sıcaklıklarda, iyi şekilde çalışırken düşük sıcaklıklarda hücre içine iyi penetre olamadığından daha düşük bir koruma sağlar. DMSO, gliserolden daha iyi penetre olma kapasitesine sahip olmasına karşın %5’den daha yüksek konsantrasyonlardaki kullanımı toksik etkiye neden olduğundan korumayı sınırlandırır (Prakash et al. 2013). Gliserol ve DMSO dışında kriyoprezervasyon için kullanılan başka bileşikler de (polivinilpirolidon, dekstran) vardır, ancak ortak kullanımda değildirler. İdeal bir kriyoprotektan; suda yüksek oranda çözülmeli, hücre içine penetre olmalı, toksitesi düşük olmalı, reaktif olmamalı ve yüksek konsantrasyonlarda çökmemelidir (Prakash et al. 2013).

Kriyoprezervasyon sırasında hücrelerin korunması ve yeniden canlandırılması için soğutma ve çözülme hızı önemli bir noktadır. Hücre canlılığı için -1 ile -5 °C’de kontrollü bir soğutma ve 37°C su banyosunda hızlı bir çözünme olması gerektiği raporlanmıştır (Smith D et al. 2008). Hücre büyüklüğü, su geçirgenliği ve bir hücre duvarının varlığı da hücrelerin soğutmaya verdiği tepkisi için önemlidir (Dumont et al.

2004). Dondurarak saklamada, kontrollü bir soğutma hızı, depo edilme sıcaklığı ve doğru kriyoprotektan seçimi mikroorganizmaların kriyoprezervasyonu için önemli bileşenlerdir (Morgan et al. 2006; Smith et al. 2008).

2.12.4 Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, basınç altında vakumla dondurulmuş organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini kapsayan uzun süreli bir koruma yöntemidir (Nireesha et al. 2013). Mikrobiyal Kaynak Merkezinde (MRC) düşük bakım maliyeti ve liyofilize kültürlerin taşıma kolaylığı nedeniyle tercih edilen bir yöntemidir. Vakumla kurutma, hücrelerde strese neden olur (Morgan et al. 2006; Smith et al. 2008). İyi bir geri kazanım için 1×10^8 hücre/mL veya daha fazla olan bir süspansiyon gerekmektedir (Palmfeldt et al. 2003). Liyofilizasyon teknikleri iyi kurulmuş olsa da bazı mikroorganizmalar için liyoprotektanların ve süspansiyon ortamının optimize edilmelidir (Gómez Zavaglia et al. 2003; Siaterlis et al. 2009).

Liyofilizasyonda, dondurma basamağından sonra su buharının süblimleşmeyle uzaklaştırıldığı freeze-drying ya da materyalin doğrudan vakum altında tutularak kurutulduğu liquid-drying işlemi yapılır. Liyofilizasyondan önce yapılan dondurma aşamasında sıcaklığın düşük olması, freeze-drying sürecinin en önemli faktörüdür. Bu aşamada sıcaklık azalması yavaş olursa ozmostan dolayı hücre içindeki su hücre dışına çıkar ve hücre dışında buz kristalleri oluşmasına neden olur ve ozmotik denge bozulur. Sıcaklık değişiminin hızlı olması ise buz kristallerinin hücre içinde oluşmasına neden olur ve bu durum hücreye öldürücü bir etki yaratır. Bu yüzden dondurma sırasında seçilecek sıcaklık ve düşüş zamanı en kritik noktadır (Champagne et al. 1991; Sanders et al. 1999). Liquid-drying, donma sırasında zarar gören mikroorganizmalarda tercih edilirken hücreden suyun direk çekilmesinin hücreye daha çok zarar verdiği görülmüştür.

Endüstriyel ve bilimsel çalışmalarda bakterilerin saklanması freeze-drying en sık kullanılan yöntemdir ve saklama koşullarının uygunluğu, kuru olmasından dolayı az hacime sahip olması gibi avantajları vardır (Otero et al. 2007). Freeze-drying, mikroorganizmaların stasyonere fazında yapıldığında eksponensiyel faza göre canlılık daha fazla olmaktadır (Potts 1994).

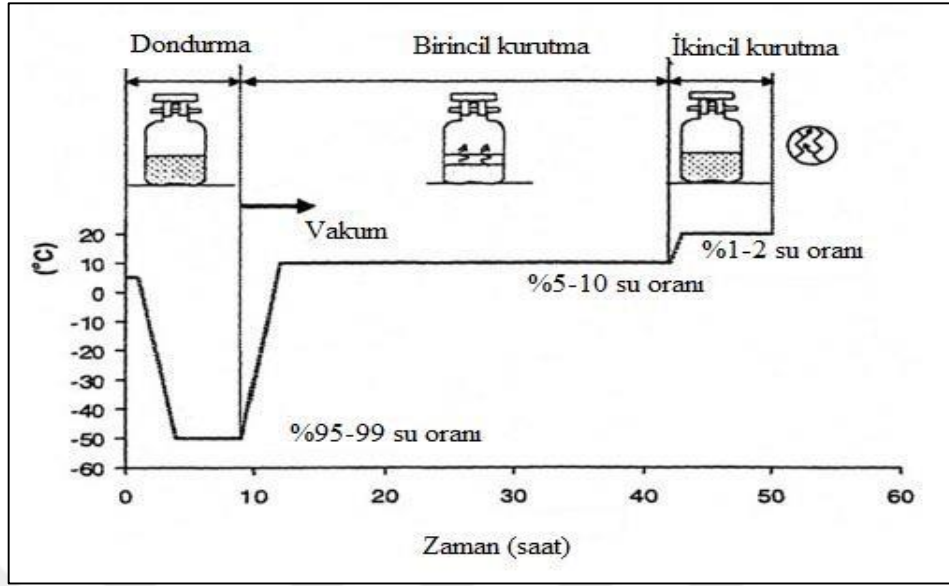
Freeze-drying sırasında hücrenin zarar görmesini önlemek için koruyucu maddeler kullanılmaktadır. Alkol, polisakkarit, protein ve skim milk gibi kompleks bileşikler kullanılan koruyuculardandır. Bu bileşikler rehidrasyonu kolaylaştırır ve saklama koşullarının stabilizasyonun sağlar (de Valdez et al. 1983).

Hücre canlılığının yüksek olması ve daha uzun süre saklanabilmesi için kültürlerin sabit fazlı ve kullanılan viallerin borosilikatlı , liyofilize edilen hücre nem oranının %1-2 olması ve +4°C’de ışık görmeyen bir ortamda saklanması tavsiye edilir (Morgan et al. 2006; Smith et al. 2008).

Liyofilizasyon, birçok bakteri, maya ve fungus sporlarının korunmasında çok iyi sonuçlar verirken; bazı bakterileri (*Helicobacter pylori*, *Aquaspirillum serpens*, *Clostridium botulinum*), bazı maya türlerini (*Sporobolomyces*, *Dekkera*, *Lipomyces*, *Brettanomyces*, , *Bulleera*, *Leucosporidium*) ve fungusların vejatatif yapılarını korumada yetersizdir (Smith et al. 2008).

2.12.4.1 Liyofilizasyon Basamakları

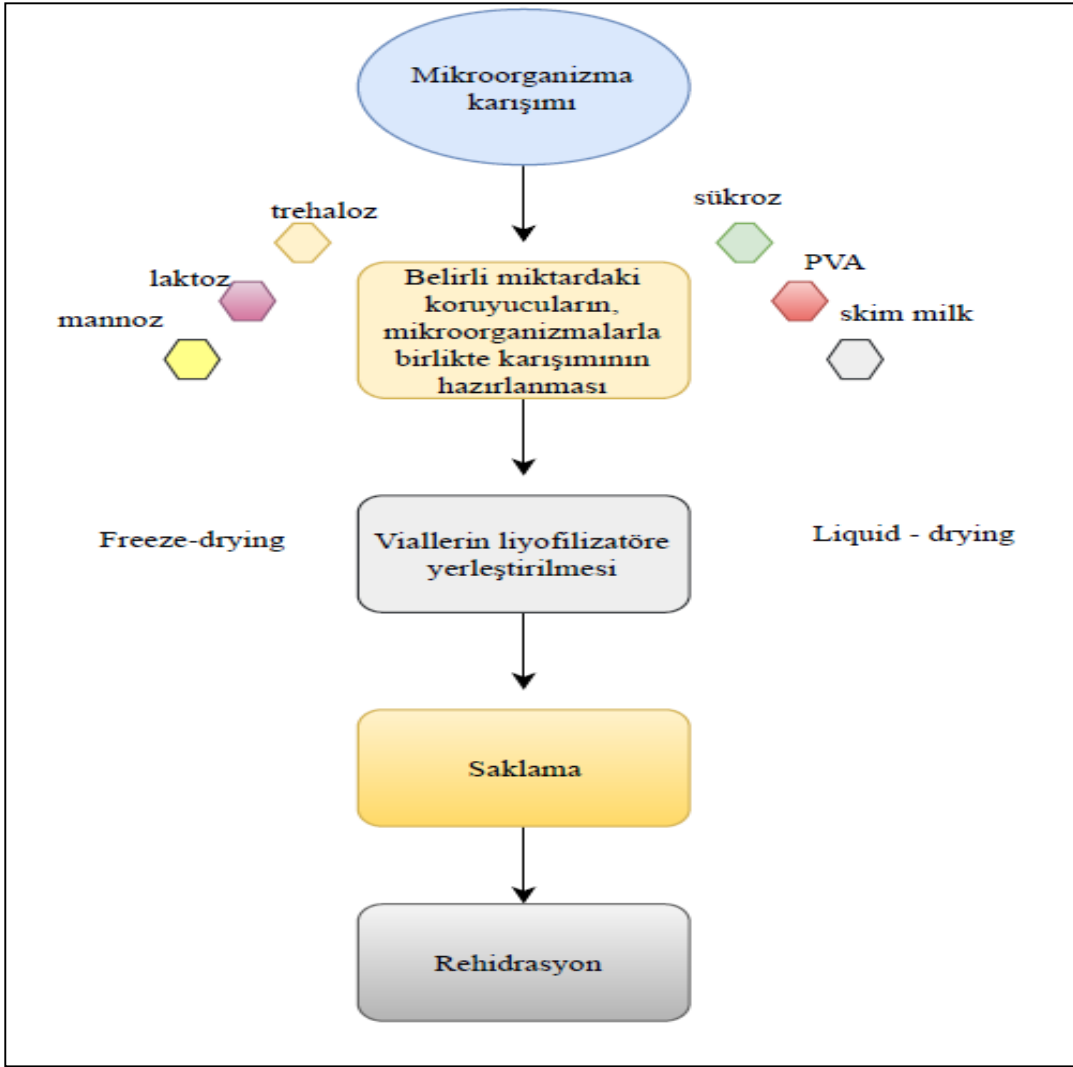
Liyofilizasyon üç adımda gerçekleşir: (1) suyu buza dönüştürme olan dondurma, (2) buzı süblimleştiren birincil kurutma ve (3) donmamış suyun uzaklaştırıldığı ikincil kurutma (Kumar et al. 2011). Şekil 2.13’de liyofilizasyon işlem basamakları gösterilmiştir.



Şekil 2.13 Liyofilizasyon işlem basamakları (Kumar et al. 2011;Ergün 2015).

Liyofilizasyonun kritik adımı dondurma basamağıdır ve mikro yapıyı genellikle donma işlemi ile kurutulmuş ürünün mikro yapısını temsil eder. Ürünün tamamen katılaşması için düşük bir sıcaklıkta donması gerekir (Rey et al. 2004). Ürünün donmasından sonra Birincil Kurutma basamağı gerçekleşir. Süblimasyon yolu ile buz kurutulur. Sıcaklık ve basınç dondurarak kurutma sisteminde dikkatle kontrol edilmesi gereken iki parametredir. Moleküler yüksek basınçtan düşük basınca göç ederler. Dondurarak kurutma sisteminde çevre basıncını azaltmak için vakum pompası kullanılır.

İkincil kurutma, dondurarak kurutma ile buzun süblimleşmesi tamamlandıktan sonra gerçekleşir. İkincil kurutmada ürün sıcaklığı ortam sıcaklığından fazla ama ürünün hassasiyeti ile de uyumlu olmalı (McDonnell et al. 2010). Bağlı nem en aza indirilerek liyofilize ürünün dayanıklılığını ve süresini artırılır. Şekil 2.14'de liyofilizasyon süreci gösterilmiştir (Kasper and Friess 2011;Ergün 2015).



Şekil 2.14 Liyofilizasyon süreci (Kasper and Friess 2011; Ergün 2015).

2.12.4.2 Liyofilizasyonda Koruyucu Kullanımı

Kriyoprotektan olarak isimlendirilen ve liyofilizasyon süreçleri boyunca hücrenin korunması, saklanması ve yeniden canlandırılması için koruyucular son derece önemlidirler (Berny and Hennebert 1991; Martos et al. 2007; Zhan et al. 2012).

Freeze-drying tekniğinde kullanılan koruyucular mikroorganizmaları büyümeleri sırasında, dondurma sırasında veya kurutma öncesinde kullanılır. Glukoz, laktöz, sükroz, yağsız süt tozları, trehaloz, polietilen glikol gibi maddeler en çok kullanılan koruyuculardandır (Hubálek 2003).

Hücre zarından içeriye girerek etkilerini gösteren koruyuculara internal kriyoprotektanlar denir. Dondurma sırasında hücre sitoplazmasından geçen internal kriyoprotektanlar; elektrolit yoğunluğunu azaltırlar, dehidrasyonu düzenleyerek protein yapılarını korurlar ve düşük sıcaklığın neden olduğu ozmotik büzüşmeyi azaltırlar (Holt 2000). Etilen glikol, dimetilsülfoksit, gliserol internal kriyoprotektanlar arasındadır. Toksik olmasına rağmen en çok tercih edilen internal kriyoprotektan, hücre içine hızla yayılmasından dolayı yüksek koruyuculuk sağlayan dimetilsülfoksittir (Anchordoguy et al. 1991; Borel Rinkes et al. 1992). Sıvı ve katyon geçirgenliğini arttırıp hücre zarının ozmotik şoka dayanıklılığını güçlendiren koruyuculara ise eksternal kriyoprotektanlar denir. Glukoz, sükroz, trehaloz en çok kullanılan ve hücre içi kristalleşmeyi önleyen eksternal kriyoprotektanlardır.

2.12.4.3 Liyofilizasyon Sonrası Saklama ve Yeniden Canlandırma

Ürünlerin liyofilizasyon sonrası saklanmasında farklı sıcaklık koşulları denenmiştir ve +4°C’de saklamanın oda sıcaklığında saklamaya göre daha iyi sonuç verdiği ve canlılığın çok azalmadığı görülmüştür (Mputu Kanyinda et al. 2012). Liyofilizasyon sırasında seçilen koruyucu ve liyofilizasyon basamakları kadar mikroorganizmaların liyofilizasyon sonrası yeniden canlandırılması ve buna uygun rehidrasyon sıvısı seçilmesi de son derece önemlidir (Champagne et al. 1991).

2.13 Mikrobiyal Aşı Kültürü için Taşıyıcılar

Hidrokarbonu parçalayan mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda bilimsel literatür bol miktarda bulunur, ancak bunlardan sadece birkaçı ticari pazara ulaşmıştır. Birçok ticari biyo-aşılayıcı, yetersiz ve/veya düşük kaliteli formülasyon nedeniyle, taşıyıcıların zayıf uyumluluğu ve stabilitesi dahil olmak üzere laboratuvar deneylerinde gösterilen, etkinlik ile saha koşulları altında çalışmaz (Stephens and Rask 2000; Arora and Mishra 2016). İnokülant formülasyonunun ana rolleri şunlardır: (i) hücrelerin depolama sırasında yaşayabilirliklerinin hızlı bir şekilde azalmasını önlemek için uzun bir süre boyunca fiziksel veya kimyasal koruma ile kombine edilmiş mikrobiyal suş veya suşlar için daha uygun bir mikro ortam sağlamak, (ii) daha iyi adapte edilmiş doğal toprak mikroflorası ile suşların rekabetini desteklemek ve (iii) toprağa girdikten sonra mikro

faunanın tahribatına bağılı kayıpları azaltmak. Tüm bu işlevler, toprak mikrobiyomu ile etkileşime girebilecek ve kirleticileri parçalayacak güvenilir bir canlı hücre kaynağı sağlamayı amaçlamaktadır (Vassilev et al. 2020).

Taşıyıcı olarak sıvı veya katı malzemeler kullanılarak farklı mikrobiyal formülasyonlar geliştirilmiştir. Sıvı inokülanlar, hücre süspansiyon viskozitesini, stabilitesini ve dispersiyon kapasitesini artıran su, yağ veya polimerlerle (yani katkı maddeleri) modifiye edilen mikrobiyal kültürlerdir (Catroux et al. 2001; Malusà et al. 2016). Bu tür ürünlerle ilgili sorun, mikrobiyal popülasyonun ve metabolik aktivitesinin, hücre süspansiyonlarının toprağa verilmesinden sonra hızla azalmasıdır, özellikle uygun katkı maddeleri içermiyorlarsa.

Katı formülasyonlar, katı, granül veya toz formlarda hazırlanan ve partikül boyutlarına veya uygulama modlarına göre sınıflandırılan inorganik veya organik taşıyıcılara dayanmaktadır (Adholeya and Das 2012; Stamenković et al. 2018). En önemli katı formülasyonlar, turba, kompost, tarım endüstrisi atıkları, vermikülit, perlit, kaya fosfat, kalsiyum sülfat ve polisakkaritler gibi taşıyıcılara dayanmaktadır (Singh et al. 2016). Son yıllarda katı formülasyon teknolojileri alanında, polisakkaritle hareketsizleştirilmiş inokülanlara (Malusà et al. 2016), tarımsal endüstriyel atıklar kullanılarak katı-hal fermantasyonu (solid-state fermentation - SSF) koşulları altında üretilen aşılayıcılara verilen önem kadar önem verilmektedir (Vassilev and de Oliveira Mendes 2018).

Bu nedenle, biyofarmülasyonda uygun bir taşıyıcı zorunludur. Bir taşıyıcı, canlı mikroorganizmayı endüstriyel fermentörden rizosfere transfer etmek için kullanılan bir dağıtım aracıdır. Kaliteli bir inokülan mutlaka mükemmel bir taşıyıcı malzemeden yapılmalıdır. Bir taşıyıcı için gerekli olan en önemli karakteristik özellik, doğru zamanda doğru fizyolojik koşulda doğru sayıda canlı hücre taşıyabilme kapasitesidir (Singh et al. 2016). Mikrobiyal inokülanlar için üstün kaliteli bir taşıyıcı malzemenin diğer özellikleri şunları içerir:

- Doğada toksik değildir (Ili Bazilah et al. 2011)
- Biyolojik olarak kolayca bozunur ve kirletici değildir (Smith 1992)

- Bakterilerin büyümesini ve hayatta kalmasını destekler (Smith 1992)
- Besin takviyesine uygundur (Smith 1992)
- Karıştırma, kütleme ve paketleme işlemlerinde kullanılabilir (Smith 1992)
- Uygun maliyetli (Mishra and Dadhich 2010)
- Yeterli miktarlarda mevcut olmalıdır (İli Bazilah et al. 2011)
- Neredeyse steril veya otoklavlama veya gama ışını gibi diğer yöntemlerle sterilize edilmesi kolay olmalıdır (Singh et al. 2016).

Katı formülasyon, inokulumun katı bir taşıyıcıya uygun oranda karıştırıldığı bir preparattır. Taşıyıcı, mikropları laboratuvarından karaya taşımak için kullanılan inert bir malzemedir (Sahu and Brahmaaprakash 2016). Katı taşıyıcı malzemeler, organik kirleticilerin biyolojik bozunmasını artırmada daha iyi bir şekilde kanıtlandıkları için daha avantajlı olabilir. (Bashan 1998) taşıyıcıları dört temel kategoriye ayırmıştır:

1. Topraklar: turba, kömür, killer ve inorganik toprak
2. Atık bitki malzemeleri: kompostlar, çiftlik gübresi, soya fasulyesi küspesi, soya fasulyesi ve yer fıstığı yağı, buğday kepeği, pres çamuru (şeker endüstrisinden bir yan ürün, tarımsal atık malzeme, kullanılmış mantar kompostu ve bitki artıkları)
3. İnert malzemeler: vermikülit, perlit, zemin kaya fosfatı, kalsiyum sülfat, poliakrilamid jeller ve aljinat çakıllar

Düz liyofilize mikrobiyal kültürler ve yağda kurutulmuş bakteriler: bu preparatlar daha sonra katı bir taşıyıcıya dahil edilebilir veya bu şekilde kullanılabilir.

2.14 Kontamine ve İyileştirilmiş Alanlarda Toksisiteyi Değerlendirmek için Bioassay Kullanımı

Petrolle ilgili bileşiklerin tehlike değerlendirmesi, su veya tortu özütleri üzerinde yürütülen bir dizi ilgili in-vitro/in-vivo bioassaylere dayanmalıdır. Bu, saha örnekleri veya laboratuvarında gerçekleşen maruziyet deneyleri analiz edilerek, nispeten ucuz ve kolay bir şekilde hızlıca gerçekleştirilebilir. Petrolle ilişkili özel hidrokarbonların toksisite profilinin tanımlanmasına olanak sağlamak için çoklu biyoassay seçilebilir. In-vitro biyoanalizler, akut toksisitenin bakteriyel testlerini (örneğin Microtox®,

Aliivibrio fischeri analizi), genotoksisiteyi (örneğin Umu testi, Ames testi) ve dioksin reseptör aktivasyonunu (DR-CALUX) ölçmek için raportör gen analizlerini içerir. In-vitro biyoassaylere ek olarak, ölümcül veya ölümcül olmayan biyolojik sonlanma noktalı standart in-vivo laboratuvar toksisite testleri (yani algler, kabuklular, deniz kestaneleri, yumuşakçalar, balıklar) gerçekleştirilebilir (Martínez-Gómez et al. 2010).

Kontamine alanların karakterizasyonu ve iyileştirme tekniklerinin değerlendirilmesi genellikle topraktaki veya diğer kontamine ortamlardaki (tortu, yarı katı atık, vb.) kirletici konsantrasyonunun belirlenmesini içerir. Bununla birlikte, birkaç on yıl boyunca, bu tür bir karakterizasyon için biyoassaylerin de dahil edilmesi daha çekicidir ve bazı durumlarda gerçekten gerekli hale gelmiştir. Temel olarak, bu iki faktörden kaynaklanmaktadır. İlk olarak, toprak kirleticilerinin biyolojik olarak parçalanması veya kimyasal dönüşümünde, kirletici bileşikler genellikle tamamen mineralize edilmez, ancak diğer ara maddeler üretilir. Genellikle metabolitlerin tamamı bilinir değildir ve toksisiteyi bilinmemektedir. İkinci olarak, biyoremediasyon/kimyasal işlemlerin yanı sıra birçok aşındırma işlemi, ana bileşiğin konsantrasyonunu büyük ölçüde azaltmayabilir, ancak biyoyararlanımı, halk sağlığına ve çevreye yalnızca minimum risk oluşturacak şekilde yeterince düşük seviyelere düşürebilir. Bu nedenle, bir alanı veya işlenmiş materyali yeterli şekilde karakterize etmek için, kimyasal tayinlere ek olarak biyoassaylere ihtiyaç vardır (Domínguez-Rodríguez et al. 2020).

Topraktaki kirletici maddelerin toksisitesinin, kirletici konsantrasyonuna ek olarak çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebileceği gösterilmiştir. Petrol hidrokarbonları ile ilgili olarak, ayrışma, biyoyararlanım ve toprak konsantrasyonu toksisite açısından önemlidir (Matejczyk et al. 2011; Khan et al. 2013). Petrol hidrokarbonlarının hem doğal olarak hem de iyileştirme süreçlerinde ayrışması, genellikle toprak organik maddesine veya toprağın killi bileşenlerine tutunarak, toprak ve toprak benzeri atıklardaki kirleticilerin toksisitesini ve sızabilirliğini büyük ölçüde azaltır (Steliga et al. 2012). Örneğin, bir çalışmada, petrol sondaj kesintilerinin iyileştirilmesi, hidrokarbon konsantrasyonunda yalnızca yaklaşık %10'luk bir düşüşle sonuçlanmış, ancak genel toksisite beş kattan fazla azalmıştır (Domínguez-Rodríguez et al. 2020). Organik bileşiklerin biyoremediasyonu toksisiteyi azaltma eğiliminde

olmasına rağmen, eksik bir iyileştirme aslında daha toksik koşullar üretebilir. Bu, sulak alanda bulunan ham petrolle kirlenmiş turbalı toprağın kısmi biyoremediasyonunda gözlemlendi. Hidrokarbon konsantrasyonu %60 azalırken, toksisite arka plan seviyeleri üç kat artmıştır (Adams et al. 2011). Bakterilerin sadece yağı değil, aynı zamanda turbalı toprağın bir kısmını da bozduğu, böylece daha önce turbada emilen yağı serbest bıraktığı ve onu daha biyoyararlanımlı ve daha toksik hale getirdiği düşünülüyordu. Ayrıca, epoksitler, dioller, aldehitler vb. gibi bazı hidrokarbon biyodegradasyon ara maddeleri, oksitlenmemiş başlangıç kirleticilerinden daha toksiktir (Brock et al. 2018). (Pradhan et al. 1997) ayrıca katranlı üretilmiş gaz fabrika atıklarıyla kirlenmiş toprağın kısmi arıtımında (kimyasal oksidasyon/biyoremediasyon ile) daha fazla toksik koşullar gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu gibi durumlarda, iyileştirmenin başarısını yalnızca kirletici konsantrasyonuna dayalı olarak değil, aynı zamanda toksisiteye göre değerlendirmek çok önemlidir. Daha potansiyelli toksik bileşiklere göre, örneğin patlayıcıların degradasyonunda, genellikle bazı böcek ilaçlarının ve klorlu organiklerin, daha toksik metabolit üretme ihtimalleri ya da sadece kısmi detoksifikasyona ulaşabilmeleri, toprak benzeri atıkların ve arıtılmış toprağın toksisitesinin değerlendirilmesine önemli derecede vurgu yapmaktadır (Domínguez-Rodríguez et al. 2020).

Kirlenmiş ve iyileştirilmiş toprak ve toprak benzeri malzemelerdeki toksisiteyi değerlendirmek için kullanılan en yaygın bioassaylerden ikisi, bir biyoluminesan deniz bakterisi olan *Aliivibrio fischeri* kullanan Mikrotoks biyoanalizi ve *Eisenia foetida* kullanan solucan biyoanalizidir (Pradhan et al. 1997; Salanitro et al. 1997; Adams et al. 2011; Steliga et al. 2012). Mikrotoks biyoanalizi ilk olarak kirli su ve atık su için geliştirilmiştir, ancak daha sonra doğrudan temas testinde tortular ve toprak için değiştirilmiştir (Domínguez-Rodríguez et al. 2020).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada elde edilen tüm izolatlar, Petkim Petrokimya Holding A.Ş. tesislerinin Atık Arıtma ve Bertaraf Ünitesi biyolojik arıtım havalandırma havuzlarından alınan aktif çamur örneklerinden izole edilmiştir. TFA, 4-CBA, p-TOL ve PAH kimyasallarını parçalama yeteneğine sahip izolatlar kullanılmıştır. Çalışmada SANTEZ 00639-2010-2 no'lu proje kapsamında daha önceden identifiye edilmiş etkinliği iyi olan organizmalar da ayrıca kullanılmıştır. Organizmalar ve organizmalara ait izolat kodları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Organizmalar ve organizmalara ait izolat kodları

T1	<i>Pseudomonas</i> sp.	3A2	<i>Comamonas testosteroni</i>
T4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	3ABBK	<i>Comamonas testosteroni</i>
T5	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	2B	<i>Comamonas testosteroni</i>
TK	<i>Arthrobacter nicotinae</i>	12TKK	<i>Comamonas testosteroni</i>
C6	<i>Pseudomonas putida</i>	FLR1	<i>Pseudomonas</i> sp.
C8	<i>Comamonas testosteroni</i>	FT5	<i>Raoultella planticola</i>
C9	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	FT7	<i>Raoultella planticola</i>
PT4	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	ANT2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

PT7	<i>Pseudomonas putida</i>	ANT8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PT8	<i>Comamonas testosteroni</i>	218	<i>Acinetobacter</i> sp.
PT9	<i>Comamonas testosteroni</i>	ÇB	<i>Arthrobacter protophormiae</i>
R1	<i>Pseudomonas putida</i>	SD	<i>Arthrobacter protophormiae</i>
H1	<i>Comamonas testosteroni</i>	SE	<i>Arthrobacter</i> sp.
H2	<i>Comamonas testosteroni</i>	AS	<i>Micrococcus luteus</i>
3A1	<i>Comamonas testosteroni</i>	P5	<i>Aeromonas</i> sp.
P6	<i>Aeromonas hydrophila</i>		

3.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

3.1.2.1 Mikrobiyal Ortamlar

3.1.2.1.1 Bushnell Haas Broth

Hidrokarbon kullanabilen bakterilerin tespiti ve kültüvasyonu için kullanılan bir ortamdır. Bushnell Haas Petroleum Broth (*Sigma-Aldrich-B5051*) literatür kaynaklarının taranması sonucunda çalışmada kullanılmak üzere belirlenmiştir (Singh and Lin 2008;Dzulkapli et al. 2009;Hamza et al. 2012).

Bushnell Haas Broth hazır besiyerinden 0,16 g tartılarak 250 mL'lik erlenlerde üzerine 50 mL distile su ilave edilerek çözülmüştür. 1,0 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika boyunca otoklav ile sterilizasyonu sağlanmıştır.

Bushnell Haas Broth besiyeri içeriği Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Bushnell Haas Broth içeriği

Bileşen	Miktarı (g/L)
Magnezyum Sülfat	0,2
Kalsiyum Klorit	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00
Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorit	0,05

3.1.2.1.2 Bushnell Haas Agar

Bushnell Haas Petroleum Agar'dan (Tablo 3.3) 0,64 g tartılarak 250 mL'lik besiyeri şişelerinde 200 mL distile su ile çözünerek, otoklav cihazında sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon sonrasında besiyeri şişesi 65°C'de saklanmıştır.

TFA, 4-CBA, p-TOL ve PAH kimyasallarını parçalayan mikroorganizmaların seçilmesini sağlamıştır.

Tablo 3.3 Bushnell Haas Agar içeriği

Bileşen	Miktarı (g/L)
Magnezyum Sülfat	0,2
Kalsiyum Klorit	0,02
Monopotasyum Fosfat	1,00

Dipotasyum Fosfat	1,00
Amonyum Nitrat	1,00
Ferrik Klorit	0,05
Agar	20

3.1.2.1.3 Plate Count Agar

Numunenin "toplam" veya canlı bakteri büyümesini değerlendirmek veya izlemek için yaygın olarak kullanılan genel büyüme ortamıdır. Plate Count Agar (PCA) seçici bir ortam değildir.

İzolasyon aşamasında organizmaların morfolojik farklılıklarını ve çeşitliliklerini, saflık kontrolü ve raf ömrü çalışmalarında canlılıklarını belirlemek amacıyla, PCA (Tablo 3.4) kullanılmıştır. PCA'nın (*Merck 1.05463*) 4,5 g, 250 mL'lik besiyeri şişelerinde 200 mL distile su ile çözülmüştür. Otoklavda 121°C'de 1,0 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra, yaklaşık 45 °C'ye kadar soğutulup petri kaplarına dökülmüştür.

Tablo 3.4 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

3.1.2.1.4 Nutrient Broth ve Nutrient Agar

Nutrient Broth ortamı (*Merck 1.05443*), fermentörde bakterileri büyümesi için gerekli besiyeri olarak ve belirli raf ömrü süresinde biyoparçalama etkinliğinin değerlendirilmesinde gerekli mikroorganizma yoğunluğunun ayarlanmasında kullanılmıştır.

Liyofilize ürünün rehidrasyon sıvısıyla canlandırılması aşamasından sonra kullanılmak üzere, her vial için ayrı olarak 100 mL'lik erlenlerde hazırlanan 20 mL'lik Nutrient Broth ortamı 1,0 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Tablo 3.5' de Nutrient Broth ortamının içeriği gösterilmiştir.

Petrilerde saflık kontrolleri yapılmış mikroorganizmalar yatık Nutrient Agar ortamına çekilmiştir. Daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.5 Nutrient Broth ve Nutrient Agar içeriği

Bileşen	Miktarı g/L
Nutrient Broth	
Etten Elde Edilen Pepton	5,0
Meat Extract	3,0
Nutrient Agar	
Etten Elde Edilen Pepton	5,0
Meat Extract	3,0
Agar-agar	14,0

3.1.2.1.5 LB Broth ve LB Agar

LB (Luria-Bertoni) ortamının formülasyonları *Escherichia coli*'nin kültüre edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazmid DNA'nın hazırlanması ve rekombinant suşların büyümesi için moleküler mikrobiyoloji uygulamalarında bir standart haline gelmiştir.

3.1.2.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kullanılan Kimyasal	Kullanım Amacı
Tereftalik asit (<i>Sigma Aldrich- 185361</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
P-toluik asit (<i>Sigma Aldrich- T36803</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
4-karboksibenzaldehit (<i>Sigma Aldrich- 124915</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
Antrasen (<i>Sigma Aldrich- 3885</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
Fluoren (<i>Sigma Aldrich- 128333</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
Piren (<i>Sigma Aldrich- 185515</i>)	Biyoparçalama Denemeleri
Hidroklorik Asit (HCl)	pH Değeri Ayarlanması
Sodyum Hidroksit (NaOH)	pH Değeri Ayarlanması
Asetonitril (<i>Sigma Aldrich- 270717</i>)	HPLC Analizleri
Formik Asit	HPLC Analizleri
n-Hekzan (<i>Sigma Aldrich- 32293</i>)	Hidrokarbon Ekstraksiyonu

GliserolMikroorganizma
Stoklarının Hazırlanması**3.1.2.3 Taşıyıcı Materyal**

Önceden yapılmış çalışmalar incelendiğinde görülmüştür ki taşıyıcı olarak, bakteri kolonilerinin hayatta kalması ve daha sonra muamele edilecek ortam içinde büyümesine izin veren, biyolojik olarak parçalanabilir bileşimler tarif edilmiştir. Aerobik mikroorganizmalar için bir dereceye kadar destekleyici besin sağlayan, gözenekli mekanik bir yapıya sahip, lignoselülozik doğal nişasta bileşenlerinden olmayan bitki materyalleri çalışmada kullanılmıştır.

Geliştirilmek istenen ürünün kullanılabilirlik seviyesini yükseltmek amacıyla elde edilmesi en kolay ve ucuz olan taşıyıcılar seçilmiştir. Tablo 3.7’de kullanılan taşıyıcılar gösterilmiştir.

Tablo 3.7 Taşıyıcılar ve miktarları

Taşıyıcı adı	Bilimsel adı	Ürün kompozisyonu içerisindeki miktarı
Yonca Bitkisi	<i>Medicago sativa</i>	%40
Soya Küspesi	<i>Glycine max</i>	%60
Ayçiçeği Küspesi	<i>Helianthus annuus</i>	%50
Zeolit		%70

3.1.2.4 Koruyucu Materyal

Literatür taramaları neticesinde mikrobiyal hücrenin korunması, saklanması ve tekrar canlandırılmasında kullanılan en temel koruyucular seçilmiştir. Ayrıca koruyucu olarak, fermentör üretimi ile elde edilen aşı kültürünün santrifüj ile mikroorganizma içeriği uzaklaştırılarak elde edilen kendi kültür sıvısı da çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan skim milk ve polivinil alkol, distile suda çözülerek kullanılacak stok konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Liyofilizasyon öncesi silika ekleme işleminin, silikanın özelliğini kaybettirmesinden dolayı içeriklerde bulunan tüm silikalar, liyofilizasyon programı tamamlandıktan sonra septumlar açılarak viallere eklenmiş olup vakum altında vialler yeniden kapatılmıştır.

Tablo 3.8’de kullanılan koruyucular ve hazırlanışları gösterilmiştir.

Tablo 3.8 Koruyucuların son konsantrasyonları ve sterilizasyon koşulları

Korucuyu adı	Hazırlanan stok konsantrasyonları	Liyofilizasyon vialindeki son konsantrasyonlar	Sterilizasyon koşulu
Skim milk	%40	%10	105°C’de 5 dakika
Polivinil alkol (PVA)	%20	%5	121°C’de 15 dakika
Silika (Sigma Aldrich-)	Ana Stok	%5	121°C’de 15 dakika

3.1.2.5 Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline - PBS) (1X, pH 7.4)

Liyofilize halde saklanan, belirli raf ömrünü tamamlamış vial içeriğindeki organizmaların canlandırılması için rehidrasyon sıvısı olarak fosfat tampon solüsyonu

kullanılmıştır. Ayrıca biyoparçalama etkinliğinin ölçülmesinde inokülasyon öncesi izolatlar PBS solüsyonunda yıkanmıştır.

Her vial için ayrı olarak 50 mL'lik erlenlerde 20 mL hazırlanan PBS solüsyonu 1,0 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Tablo 3.9'da PBS solüsyonunun içeriği gösterilmiştir.

Tablo 3.9 PBS Solüsyonu

Bileşen	Miktarı (g/L)	Son Konsantrasyon
NaCl	8,0	137 mM
KCl	0,2	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,24	1,8 mM
Distile Su	1000 mL	

3.1.2.6 Sentetik Atık su İçeriği

Tank reaktör içerisindeki çamur, sürekli olarak 1500 mg/L glukoz içeren, içeriği Tablo 3.10'da verilen sentetik atık su ile beslenmiştir.

40x stok konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmış sentetik atık suyun 121°C 'de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Çeşme suyu ile seyreltilerek istenilen konsantrasyon ayarlandıktan sonra reaktörlere aktarılmıştır.

Tablo 3.10 Sentetik atık su içeriği

Bileşik	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,00262

NaCl	0,03
Na₂HPO₄12H₂O	0,0836
FeCl₃6H₂O	0,0166
KH₂PO₄	0,0136
CaCl₂2H₂O	0,01854
KCl	0,014
Üre	0,1
Pepton	0,6
Glukoz	1,5

3.1.2.7 Nükleik Asitlerin Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar

İzole edilen genomik DNA'lar agaroz jel elektroforez sisteminde, Agaroz (Merck- 9012-36-6) - Tris Asetik Asit (TAE) tamponu kullanılarak %1'lik jelde görüntülenmiştir. Stok olarak 50X TAE (Tablo 3.11) hazırlanmış, optimum çalışma için pH 8'e ayarlanmış, 50 kat seyreltilip 1X TAE tampon olarak kullanılmıştır. DNA'ların agaroz jelde görünebilmeleri için GelRed (Biotium®) floresan tabanlı nükleik asit boyası kullanılmıştır.

Tablo 3.11 50X TAE içeriği

Bileşen	Miktarı
Tris Base	242 g
Glasiyal Asetik Asit	57,1 mL

0,5M EDTA	100 mL
dH₂O	1000 mL

3.1.2.8 DNA İzolasyon Kiti

Genomik DNA'nın ekstraksiyonu, ZR Fungal/Bakteriyel DNA MiniPrep™ izolasyon kiti (*ZymoD6005*) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.2.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kiti

HelixAmp™ HyperSense-Taq Polymerase (*Nanohelix South Korea*) kiti kullanılmıştır.

3.1.2.10 Toksisite Analiz Komponentleri

Modern Water; Acute Reagent (*Aliivibrio fischeri*), Reconstitution Solüsyonu, Ozmotik Adjusting Solüsyonu ve Diluent ticari olarak temin edilmiştir.

Reagent vial içinde liyofilize haldedir, -20°C ile -25°C aralığında saklanmıştır. Çalışmadan hemen önce, Reconstitution ile muamele edilip, 3 saat içinde kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama Hiclave - HV-50 L): Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanlarının (cam malzemeler, besiyerleri, atık malzemeler) sterilizasyonu için kullanılmıştır.

Hassas Terazî (Denver Instrument) : Kullanılan besiyeri bileşenlerinin ve kimyasalların hassas şekilde tartımı amacıyla kullanılmıştır.

Vorteks (VWR): Tüplerdeki bileşenlerin karışımının sağlanması amacıyla kullanılmıştır.

pH Metre (WTW Inolab): Kullanılan kimyasaların uygun pH'ya getirilmesinde, besiyeri ortamları ve tamponların asit-baz dengelerinin sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

Portatif pH Ölçer (WTW pH 3110): Aktif çamur sisteminin pH analizi için kullanılmıştır.

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

Manyetik Karıştırıcı (Chiltern - MS21S): Isıtmalı manyetik karıştırıcı, hazırlanan bazı çözeltilerin homojen hale getirilmesi için kullanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj (Hettich): Tüm çöktürme işlemlerinde kullanılmıştır.

Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich 120): Mikrosantrifüj tüpü kullanılan çöktürme işlemlerinde, HPLC analizleri ve DNA izolasyonu sırasında farklı aşamalarda kullanılmıştır.

Inkübator (Memmert - IPP400): Statik koşullarda yapılan inkübasyonlarda 30°C'de kullanılmıştır.

Çalkalayıcı ve Soğutmalı Inkübator (New Brunswick Scientific Innova 4340, Biosan Inkübator ES – 20): Sıvı ortam inkübasyonları için kullanılmıştır.

Fırın Etüv: AKM ölçümlerinde kurutma amaçlı kullanılmıştır.

Spektrofotometre (Hettich-Carry 300 Bio): Mikroorganizmaların optik yoğunluk değerlerinin belirlenmesi ve başlangıç konsantrasyonlarının ayarlanması amacıyla kullanılmıştır.

McFarland Densitometre (Biosan - Den 1B): Hücre konsantrasyonlarını ölçmek için kullanılmıştır.

Termoreaktör ve Spektrofotometre (WTW CR2200, WTW Photolab S12): Cihazlar KOİ analizlerinde kullanılmıştır.

Nanodrop Spektrofotometre Sistemi (Thermo Nanodrop 2000c): DNA miktar ve saflık ölçümlerinde kullanılmıştır.

Elektroforez Ekipmanları ve Güç Kaynağı (OWL OW-A1 -- OW-B1A -- OW-B2, OWL OW-EC300XL2): Moleküler biyolojinin temel ve başlıca tekniği olan jel elektroforezi analizlerinde kullanılmıştır.

Jel Görüntüleme Sistemi (UVP Biospectrum 800): PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra, jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

Toksisite Ölçüm Cihazı (Modernwater® Microtox M500): Biyoparçalama sonrasında oluşan ortam bileşenlerin toksik olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır.

Mikroskop (Olympus CX21): Gram boyanmış organizmaların mikroskopik morfolojisinin ve aktif çamur floklarının izlenmesinde kullanılmıştır.

Stereomikroskop (Motic SMZ161B) : Taşıyıcıların öğütme sonrası boyut farklılıklarını gözlemek için kullanılmıştır.

Mikropipetler (Eppendorf): 10 µL, 100 µL ve 1000 µL pipetler küçük hacimlerdeki aktarım işlemlerinde kullanılmıştır.

Steril Kabin (Nüve MN120): Yapılan ekim işlemleri kontaminasyonu önlemek amacıyla steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

PCR Kabini (Biosan): Moleküler biyoloji çalışmaları kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Liyofilizatör (LABCONCO FreeZone Console Freeze Dry Systems with Stoppering Tray Dryers): Mikroorganizmaların liyofilizasyonunda kullanılmıştır.

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

HPLC (Agilent 1100 Series): Mikroorganizmaların biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesinde, kimyasal maddelerin miktarlarındaki değişimin izlenmesi için kullanılmıştır.

Gaz Kromatografisi (GC) (6890N Agilent Technologies Network GC System): Biyoparçalama çalışmaları sonrasında PAH'ların belirlenmesinde kullanılmıştır.

Real-time PCR (Roche LightCycler® 96 System): Aktif çamur sisteminde yer alan mikroorganizmaların DNA moleküllerinin kalitatif ve kantitatif takibi yapılmıştır.

Thermal Cycler-Gradient (Techne-TC Plus): Cihaz, genomik ve plazmid DNA'ların çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Kuru Blok Isıtıcı (Stuart ST-SBH130D) : Moleküler mikrobiyoloji analizlerinde kullanılmıştır.

Biyoreaktör (Sartorius Stedim Biostat® A): Aşı kültürünün biyoreaktörde üretimi gerçekleştirilmiştir.

Sürekli karışimli Tank Reaktörü (CSTR): Aktif çamur oluşturulmasında, olgunlaştırılmasında ve hedef kimyasal maddelerin biyoparçalama denemelerinde kullanılmıştır.

Dozaj Pompası (Emec Srl./İtalya VMS V CO) : Reaktörlere besin iletiminde kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1. Mikrobiyal Suşların İzolasyonu

Petkim Petrokimya Holding A.Ş. tesislerinin Atık Arıtma ve Bertaraf Ünitesi, biyolojik arıtım havalandırma havuzlarından aktif çamur temin edilerek; özellikle PTA bileşenlerini biyoparçalama yeteneğinde ki organizmaların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İstenilen karboksilik asitleri parçalama yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların seçilmesi için modifiye edilmiş bir tarama yöntemi kullanılmıştır (Liu et al. 2010).

Karbon kaynağı çözeltileri (TFA, 4-CBA, p-TOL - Tablo 3.5) bu amaç için ayrı olarak hazırlandı. Bu reaktiflerin suda çözünürlüğü zayıf olduğundan, tamamen çözünbilmeleri için toplam hidrojen iyon molaritesine eşdeğer miktarda NaOH ilave edilmiştir. Çözücü olarak ultra saf su kullanılmıştır. Tam karışım sağlandıktan sonra 1N HCl kullanılarak çalışma pH'ına 7.0'ye ayarlanmıştır (Kim et al. 2012). Hazırlanan 2000 mg/L'lik stok çözeltileri 0,22 µm'lik steril şırınga filtresinden geçirilerek, istenmeyen biyobozunumu önlemek için daima 4°C'de muhafaza edilmiştir. Filtreleme işlemi sonrasında genel besiyerine ekimleri yapıp, üremenin kontrolü sağlanmıştır.

Tek karbon kaynağı olarak 100 mg/L (ppm) ve 200 mg/L referans kimyasalları (TFA, p-TOL ve 4-CBA) içeren 50ml Bushnell Haas Broth ortamlarına aktif çamur örneğinden %5 oranında ilave edilmiştir. Erlenler 27-30°C'de aerobik olarak bir orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince besiyeri ortamlarında oluşan bulanıklık gözlemlenerek, herhangi bir kontaminasyon olup olmadığının kontrolü kör erleni oluşturularak takip edilmiştir. 7 gün sonunda steril taze ortamlara pasajlamalar yapılmıştır. 2.pasajlama tamamlandıktan sonra erlenlerden %0,1 yeast extract ve referans kimyasalları içeren Bushnell Haas Agar petrilerine karışık mikrobiyal popülasyondan saf koloniler elde etmek amacıyla çizgi ekim yapılarak inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerin morfolojileri ve gram reaksiyonlarının belirlenebilmesi amacıyla PCA genel besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilerek, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlemlenmiş

olup, saf olduğu emin olunan ve değişiklik gösteren koloniler tekrar çizgi ekim yöntemi ile PCA ortamlarına inoküle edilmiştir.

2.pasajlama tamamlandığında çizgi ekimler yapılırken eş zamanlı olarak erlenlerden 3.pasajlama için kimyasal konsantrasyonu arttırılmış erlenlere ekimler yapılmıştır. Yüksek kimyasal konsantrasyonuna dayanıklı mikroorganizmaların seçilmesi amacıyla, 400 ppm kimyasal konsantrasyonuna kadar bu işlem devam ettirilmiştir. Öncelikle aynı konsantrasyona sonrasında yüksek konsantrasyona geçilerek 6 pasajlama tamamlanmış, bu şekilde mevcut koşullarda üreyebilmiş mikroorganizmaların hedef kimyasallara adaptasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

Petrilerde saf görülen mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirildikten sonra mikroorganizmalar kodlanıp yatık Nutrient Agar ortamına çekilmiştir. Daha sonraki analizler için +4°C’de muhafaza edilmiştir. Bunun yanında seçilen bu izolatlar, Nutrient Broth besiyerinde kültürlenerek bakteri süspansiyonları şeklinde, içerisinde son konsantrasyon %16 gliserol olacak şekilde -80°C’lik derin dondurucuda 2 mL’lik steril vidalı cryo tüpler içerisinde saklanmıştır.

3.2.2. Biyoparçalama Etkinlik Çalışmaları

Mikroorganizmaların biyoparçalama kabiliyetlerini belirlemek için, 50 ml Nutrient Broth ortamlarına her bir mikroorganizma için ayrı ayrı aşılama yapılarak 30°C’de 24 saat boyunca 150 rpm çalkalamalı inkübatörde çoğalmaları sağlanmıştır. İnkübasyonun sonunda, erlenlerden steril mikrosantrifüj tüplerine 1 ml alınarak 5000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında süpernatant atılıp, kalan pelletlerin üzerine 1 ml steril PBS tampon çözeltisi eklenerek yeniden santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak 1 ml steril distile su ile süspanse hale getirilmiştir.

Hücre süspansiyonlarının erlenlere aktarılacak mikroorganizma miktarları optik yoğunluk (Optical density - OD) bazında optimize edilmiştir. Bu amaçla, spektrofotometre vasıtasıyla 540 nm dalga boyunda ölçüm yapıp, yoğunluklarının 0,3 - 0,5 OD olması sağlanmıştır. Biyoparçalanma analizinde kullanılacak bu

mikroorganizma süspansiyonlarının karşılık geldiği mikrobiyal yükün belirlenmesi için; OD'si ayarlanmış süspansiyonlar 10^{-9} 'a kadar seyreltilerek PCA ortamına dökme plaka yöntemi ile ekimleri gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda 0,3 - 0,5 OD değerinin yaklaşık olarak 10^7 kob/ml olduğu belirlenmiştir.

Hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanması, 50ml Bushnell Haas Broth ortamı içeren 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Erlenler hazırlanan H_2SO_4 solüsyonundan geçirilerek cam yüzeyinde bulunabilecek organik maddelerden arındırılmışlardır. Tek karbon kaynağı olarak referans kimyasal çözeltilerin ayrı ayrı 100 ppm ilave edildiği ortamlar içerisine %5 oranında OD'si ayarlanmış organizma aşılması yapılarak $30^\circ C$ 'de 150 rpm çalkalamalı olarak inkübasyona kaldırılmıştır. Raf ömrü denenen ürünlerin biyoparçalama denemelerinde ortam içerisine eklenen kimyasal konsantrasyonları 40 mg/L TFA, 40 mg/L p-TOL ve 30 mg/L 4-CBA olacak şekilde eklenmiştir. Erlenlerin tamamı karanlık ortamda inkübe edilerek fotooksidasyon ihtimali de engellenmiştir. Deneysel yöntemin doğrulanması amacıyla, aşılama işlemi gerçekleştirilmemiş kontrol erlenleri kör olarak çalışma süresince değerlendirilmiştir. Belirli aralıklarla örnek alınıp, biyoparçalanma süresinin belirlenmesi için eş zamanlı olarak enstrümental analiz yöntemlerinden kromatografik yöntemler (Bkz.3.2.3) gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Kromatografi Yöntemleri

Bu tez çalışmasında 2 ayrı kromatografi yöntemi (HPLC, GC) kullanılmıştır.

3.2.3.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Metodu

Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesi için HPLC (Agilent 1100 Serisi) analizlerinde PTA grubu; TFA, p-TOL ve 4-CBA için %70-30 Su: Asetonitril (ACN) + %0,1 Formik asit (FA) sisteminde 1µl enjeksiyon, 1ml akış hızı ve $25^\circ C$ kolon sıcaklığında yürütülmüştür. PAH grubu; Fluoren (FLO), Antrasen (ANT) ve Piren (PYR) içinse; %50-50 ACN - Su mobil fazında 0-13 dakikada %50-100 gradient oluşturularak 1µl enjeksiyon, 1ml akış hızı ve $25^\circ C$ kolon sıcaklığında yürütülmüştür.

Tüm kimyasallar için Agilent Zorbax Eclipse PAH Column kullanılmıştır (Chandrasekara Pillai et al. 2009). Metot oluşturulurken kimyasalların yapılarına göre mobil fazlar oluşturularak diyot array dedektörü (DAD) vasıtasıyla en iyi pikleri verdikleri dalga boyu ve bu piklerin süreleri saptanmıştır. Tablo 3.12’de kimyasallara ait tespit edilen farklı dalga boyları ve alıkonma süreleri verilmiştir.

Tablo 3.12 HPLC Protokolleri

Hidrokarbon	Dalga Boyu (nm)	Alıkonma Süresi (dakika)
TFA	240	1,6
p-TOL	240	6,1
4-CBA	254	2,4
FLO	254	7,1
ANT	254	9,1
PYR	240	10,9

3.2.3.2 Gaz kromatografisi (GC) Metodu

PAH analizleri çalışma başlangıcında HPLC cihazı ile yapılmış olup, sonrasında GC (6890N Agilent) cihazı ile analize geçilmiştir. PAH’ların analizi, Flame Ionization Detektörü (FID) ve HP-5 kolonu (30m x 0.320 mm, 0.25µm film, Agilent, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Koşullar; enjektör sıcaklığı 280°C, dedektör sıcaklığı 300°C, taşıyıcı gaz, helyum (1 ml / dakika); Hava akışı 300 mL/dakika, Hidrojen akışı 30 ml/dakika şeklinde çalışılmıştır. 1µl numune enjekte edilmiştir.

Fırın sıcaklığı programı aşağıdaki gibidir;

Kolon başlangıç sıcaklığı olan 100°C’de 2 dakika bekledikten sonra, son sıcaklık noktası olan 280 °C’ye 8 °C /dakika artışlarla ulaşılır ve 280 °C’de 5 dakika bekletilir (30 dakika).

Tablo 3.13’de kimyasallara ait tespit edilen farklı dalga boyları ve alıkonma süreleri verilmiştir.

Tablo 3.13 GC Protokolleri

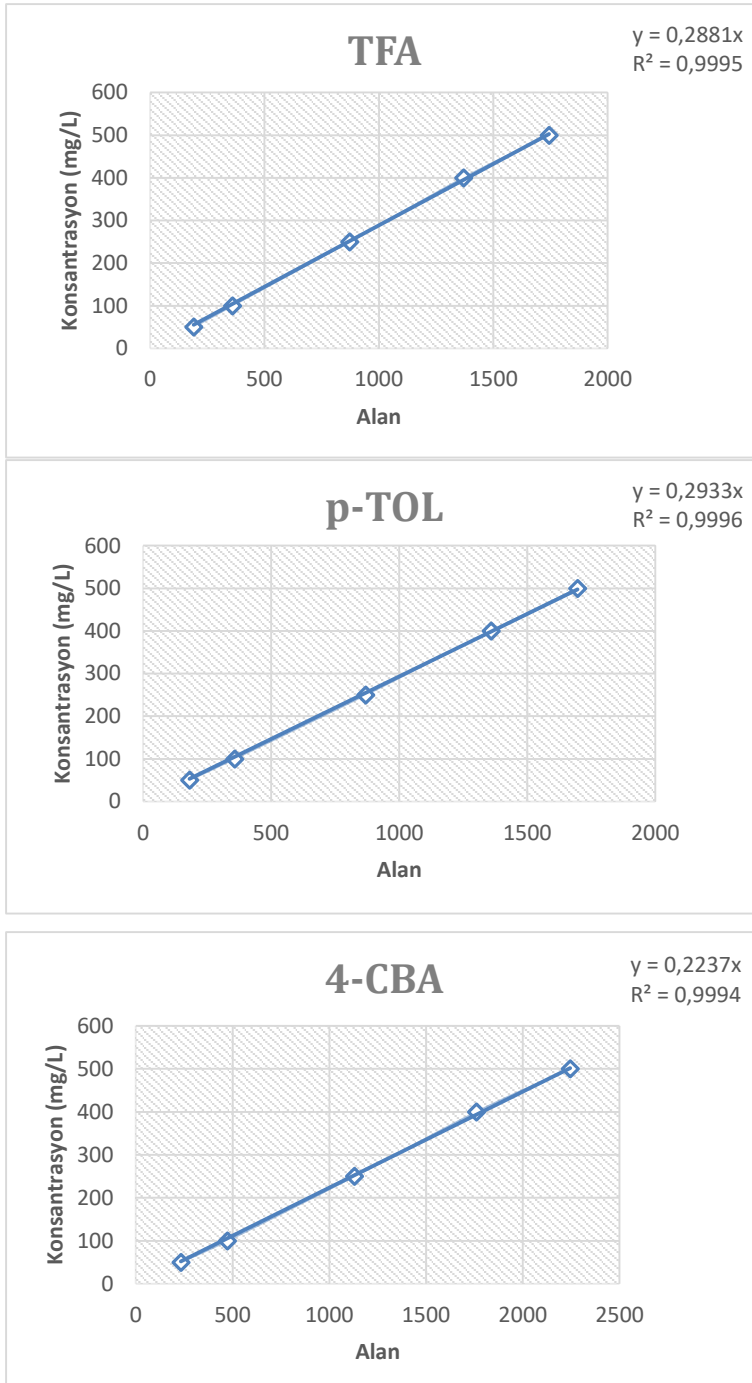
Hidrokarbon	Dalga	Boy	Alıkonma	Süresi
	(nm)		(dakika)	
FLO	240		13,1	
ANT	254		15,9	
PYR	240		19,8	

3.2.3.3 Standart Eğri Oluşturulması

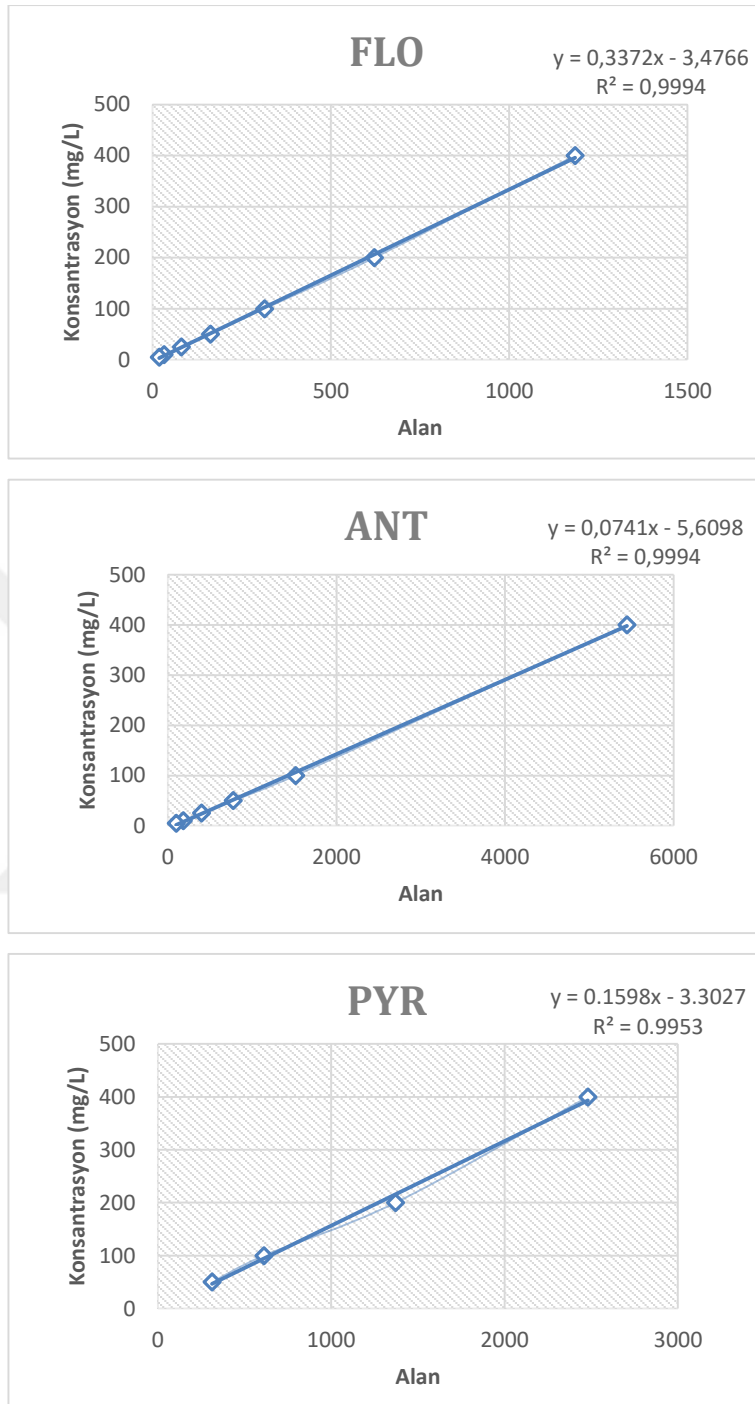
Biyoparçalama etkinliklerinin belirlenmesinde HPLC ve GC analizleri ile kimyasal maddelerin doğru olarak ölçülebilmesi için, standart eğri grafikleri oluşturulmuştur. Standart eğrilerden elde edilen sabit katsayılar, bilinmeyen örnekteki kimyasal madde konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

Elde edilen standart eğri grafikleri aşağıda görülmektedir. (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3)

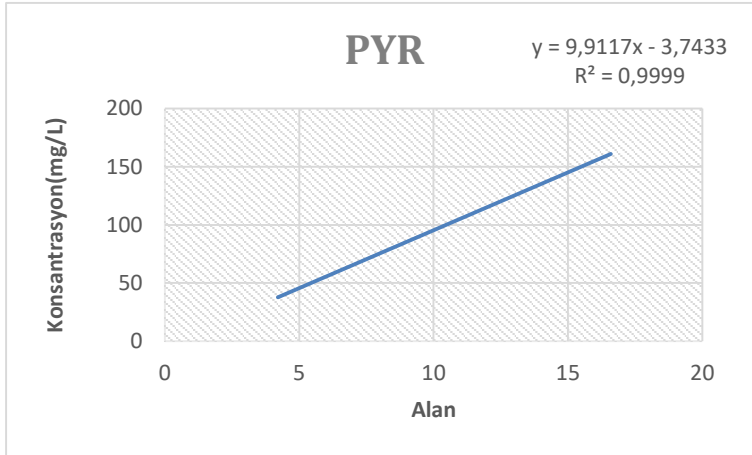
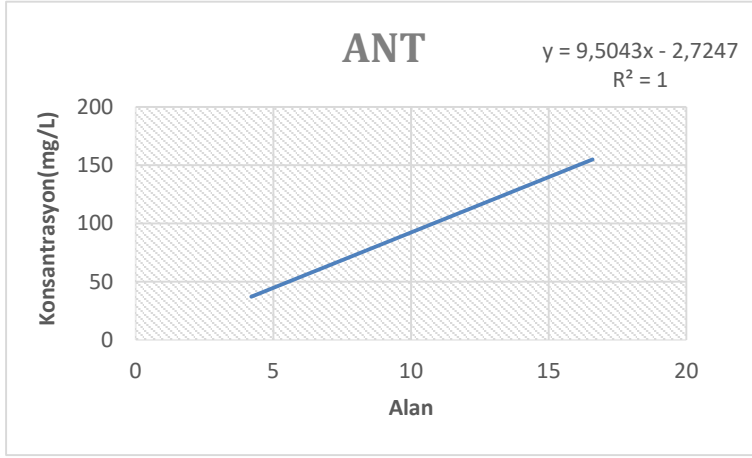
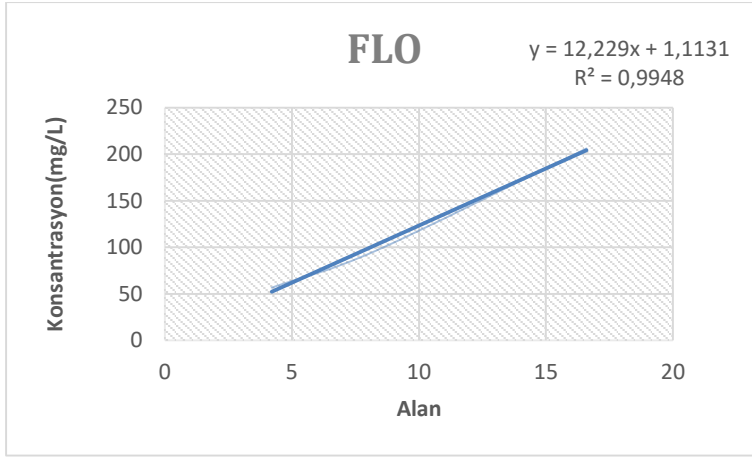




Şekil 3.1 HPLC cihazında oluşturulan PTA grubu kimyasalların standart eğri grafikleri



Şekil 3.2 HPLC cihazında oluşturulan PAH grubu kimyasalların standart eğri grafikleri



Şekil 3.3 GC cihazında oluşturulan PAH grubu kimyasalların standart eğri grafikleri

3.2.3.4 Hidrokarbonların Ekstraksiyonu

Belirli aralıklarla HPLC için alınan örnekler TFA grubu için 10000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek ependorfların süpernatant kısmı viallere alınıp, HPLC sistemine verilmiştir.

PAH grubu ekstraksiyon işlemi için ise, kimyasalların sudaki çözünürlük katsayılarının düşük olması nedeni ile ara çözgen fazı ile sulu ortamdan ekstraksiyon yapılmıştır. Her bir erlenden steril mikrosantrifüj tüplerine 500 µl örnek alınmıştır. Alınan örnekler üzerine 1 ml n-hekzan (1:2 (v/v) örnek : hekzan) eklenerek 5 dk boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan susuz üst faz dikkatli bir şekilde alınarak viallere aktarılıp sisteme verilmiştir.

Poliaromatik hidrokarbonlar suda çözünmedikleri için besiyerlerine eklenmeden önce uygun çözgen DMSO ile çözülmüştür. Deneme süresince besiyerlerine kontrollü olarak aseton ilave edilmiştir (Saygılı 2012). Böylece hidrokarbonların kristalize olmaları önlenmiştir.

3.2.4. Biyoparçalama Etkinliğine Göre Seçilen Mikroorganizmaların Tanılanması

PCA ortamına çizgi ekim yöntemiyle, seçilen izolatların ekimi yapılmıştır. 30°C'de 24 saat inkübasyon tamamlandığında kültürel özellikler (koloni rengi, koloni şekli, koku, koloni pigmentasyonu) ve morfolojik özellikler (hücre çeperi gram reaksiyonları, hücrelerin morfolojik yapıları ve boyutları) bakımından incelenmiştir. Gram boyama işlemleri için boya solüsyonları (*Merck-111885*) ticari olarak temin edilmiştir.

3.2.5. Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması

3.2.5.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu

Tez çalışmasında kültürel, morfolojik ve analitik yöntemler sonucunda seçilmiş izolatların ve biyoreaktör içerisinde alınan örneklerin moleküler tanılaması için DNA izolasyonları yapılmıştır. Genomik DNA'nın ekstraksiyonu, DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Takip edilmiş kit kullanım adımları şu şekildedir;

1. 50-100 mg fungal/bakteriyal hücre içeren süspansiyon 200µl PBS tamponu içinde yeniden süspanse edilerek BashingBead™ Lysis tüpüne aktarılır ve üzerine 750µl Lysis Solution eklenir.
2. BashingBead™ Lysis tüpü maksimum hızda vorteks ile 5dakika boyunca karıştırılır.
3. Daha sonra 10000xg'de 1 dakika santrifüjlenir (Hettich 120).
4. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400µl, Collection Tube'e oturtulan Zymo-Spin IV filtreye aktarılmış, ardından 7000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Collection Tube içerisinde biriken filtrat üzerine 1200µl fungal/bakteriyal bağlama tamponu eklenmiştir.
6. Bu aşamada elde edilen karışımdan 800µl alınarak yeni bir Collection Tube oturtulmuş, Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
7. "6" nolu basamaktaki işlemler tekrar yapılmıştır.
8. 200µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni Collection Tube'a oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
9. 500µl fungal/ bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10000 xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
10. Zymo-Spin IIC kolonu 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 50µl DNA elüsyon tamponu doğrudan kolon içerisinde orta kısımdaki matrise ilave edilmiştir. Sonra 10000xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası mikrosantrifüj tüpü içerisinde saf DNA elde edilmiştir.

3.2.5.2 DNA Miktar Ölçümü ve Saflık Kontrolü

Nükleik asit ekstraksiyonundan sonra, DNA'nın miktarı ve saflığı Nanodrop cihazı ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla 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. A260 / A280 değeri 1.80'e yakın DNA'lar saf olarak kabul edilmiştir (Zimmerman 2003). Yapılacak analizlerde kullanılmak üzere -20 ° C'de saklanmıştır.

3.2.5.3 Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi

Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

Agaroz jel hazırlanması ve elektroforez için izlenilen basamaklar şu şekildedir;

1. 100 mL 1x tris asetat EDTA tamponu (1xTAE) ve 1,0 g agaroz tartılarak temiz bir erlen içerisine eklenmiş ve agaroz süspansiyonu tamamen çözülüp berraklaşınca kadar mikrodalga fırınında kaynatılmıştır.

2. Agaroz jel solüsyonu, 60-70°C'ye kadar soğutularak içerisine % 0.002 GelRed (Biotium®) ilave edilmiştir.

3. Elektroforez küvetine taraklar uygun şekilde yerleştirilerek, agaroz jel içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde, yaklaşık 1 mm kalınlıkta dökülüp katılaşması için oda sıcaklığında 45 dakika kadar bekletilmiştir.

4. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jelin yüzeyinin üzerini 1-2 mm kadar kaplayacak 1xTAE ilave edilmiş, taraklar çıkarılmıştır.

5. 2 µL DNA örneği, 1µL yükleme boyası (6X konsantrasyon) ve 3µl su ile karışımı hazırlanarak 6 µL örnek kuyucuklara yüklenmiştir.

6. Genomik DNA'ların boyutlandırmasını yapabilmek için belirteç olarak ayrı bir kuyucuğa 1,0 kb'lık DNA ladder (Nanohelix) yüklenmiştir.

7. Elektroforetik göç, 90V'da yaklaşık 45 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

8. Jel küvetten dikkatlice alınarak, DNA parçaları multispektral görüntüleme sistemi kullanılarak ultraviyole (UV) ışığı altında görüntülenmiş ve bant boyutları belirteç DNA bantları ile karşılaştırılmıştır.

Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen genomik DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermektedir (Ausubel and Baatout 1996).

3.2.5.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR)

PCR, küçük, karmaşık bir örnekten büyük miktarlarda spesifik DNA parçası veren bir in vitro replikasyon tekniğidir. PCR tekniği, amplifiye edilecek parçayı çevreleyen iki primerden (forward - reverse) DNA'nın enzimatik sentezine dayanır. Hedef DNA parçası, DNA'ya bağımlı bir enzim termostabil DNA polimeraz kullanılarak katlanarak çoğaltılır. İzolatların moleküler tanılaması için yeterli miktarda DNA elde edebilmek amacıyla PCR gerçekleştirilmiştir.

DNA'nın denatürasyonu (94-95 °C'de), primerlerin hibridizasyonu (45-60 °C'de) ve tamamlayıcı ipliğin termostabil DNA polimeraz (68-72) yoluyla sentezi döngülerini tekrarlamak için, otomatik termal döngü (Thermal Cycler) cihazı kullanılmıştır. 16S rRNA genleri, 27F ve 1522R universal primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır (Tablo 3.14).

Tablo 3.14 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Primerler Setleri

Hedef Gen	Primerler	Nükleotid Dizileri	Ürün Boyutu (bp)
16S rRNA	27F (Forward)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	1495
	1522R (Reverse)	5'-AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3'	

DNA amplifikasyonu, HyperSense-Taq Polimeraz kiti kullanılarak yapılmıştır. Amplifikasyon için PCR bileşenleri (Tablo 3.15) ve reaksiyon basamakları (Tablo 3.16), kullanım kılavuzu tarafından önerilen şekilde hazırlanıp uygulanmıştır.

Tablo 3.15 Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü

Bileşenler	Miktarı
Kalıp DNA	5 µl
10X HyperSense-Taq Buffer	5 µl
dNTP	1 µl
Primer – F (10 µM)	1 µl
Primer – R (10 µM)	1 µl
5x Tune Up Buffer	10 µl
HyperSense-Taq Polimeraz	1,25 unit
PCR Grade Su	50 µl'tamamlanır

Tablo 3.16 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaksiyon Basamakları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk denatürasyon	1	2 dk	95°C

Denatürasyon		20 sn	95°C
Annealing	30	40 sn	56°C
Elongasyon		70sn	72°C
Son Uzama	1	5 dk	72°C
Soğutma	Sınırsız		4°C

Reaksiyon sonunda elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez analizleri daha önceki bölümde (Bkz. 3.2.5.3) bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Saf olduklarından emin olunduktan sonra DNA dizi analizine göndermek için – 20°C’de saklanmıştır.

3.2.5.5 PCR Ürünlerinin Dizi Analizleri

Çoğaltılan dizilerin dizi analizi MedSanTek Lab. Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti. tarafından yapılmıştır. Herbir izolat için belirlenen sekans dizileri DNA Baser Sequence Assembler yazılımı ile düzenlendikten sonra NCBI gen bankasının BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) platformu kullanılarak kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve % benzerlik oranlarına göre tanılanmıştır. Mega 7 programıyla referans diziler indirilmiş ve tanılanan diziler ile hizalanmıştır. Daha sonra Neighbor-Joining ve Maximum Likelihood metodu kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Aynı zamanda belirlenen sekanslar ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere Genbank’a eklenerek aksesyon numaraları alınmıştır.

3.2.6 Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması

Ürün raf ömürlerinin belirlenmesinde kullanılacak olan mikrobiyal karışımın, yüksek hacimde üretilmesi öncesinde büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Mikroorganizmaların en etkin oldukları logaritmik faz dönemlerinin belirlenmesi, toz hale getirilecek ürün karışımının etkinliği için de önemli olup, yüksek hacimde biyoreaktörde üretim esnasında kültürasyon süresini belirlemektedir.

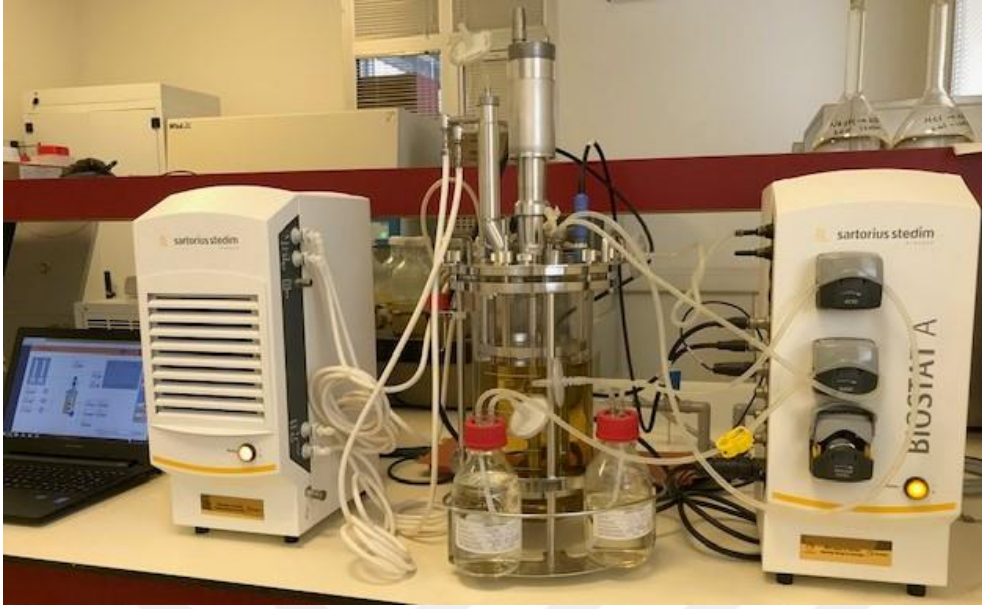
Öncelikle, belirlenen 16 organizmanın 500 mL'lik erlen içerisinde hazırlanan 100 mL steril Nutrient Broth ortamlarında 18 saatlik kültürleri elde edilerek bu aktif kültürlerin her birinden 540 nm'de 0,3 - 0,5 OD olan aşı solüsyonları hazırlanmıştır.

Sonrasında yine 500 mL'lik erlenlerde 100 mL steril Nutrient Broth ortamına %10 oranında hazırlanan aşı solüsyonu ilavesi yapılarak 30°C'de 150 rpm çalkalamalı olarak inkübasyona kaldırılmıştır. Bir saat aralıklarla örnekler alınıp, büyümenin ifadesi olan bulanıklık spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenirken eş zamanlı olarak dökme plaka yöntemiyle büyümenin sayısal sonuçları belirlenmiştir.

3.2.7 Biyoreaktör Koşullarının Belirlenmesi ve Mikroorganizmaların Üretimi

Çalışmada kullanılacak 16 bakteri izolatının 5 L'lik biyoreaktör (Sartorius Stedim Biostat® A) (Şekil 3.4) içerisinde 3 L Nutrient Broth besiyerine %10 aşılama (her izolat için yaklaşık 10^7 - 10^8 kob/mL) yapılarak, 30°C'de 150 – 300 rpm'de büyüme eğrisi sonuçlarına göre yaklaşık 5-6 saat aerobik olarak çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu hücreler bekletilmeden kuru karışım ürün hazırlama çalışmalarında kullanılmıştır.

Biyoreaktöre aşılama yapılan OD'si ayarlanmış her izolatın üretim esnasında dökme plaka yöntemiyle ekimleri yapılarak, canlılıkları belirlenip son konsantrasyon aralığı kontrol edilmiştir. Ayrıca üretim sonrasında çoğaltılan mikroorganizmaların liyofilizasyon öncesi canlılık sayımları yapılmıştır. Liyofilizasyon öncesinde 1 ml'deki toplam canlı mikroorganizma sayısı belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Aşı kültürü üretiminde kullanılan biyoreaktör sistemi

3.2.8 Karışım Ürünün Liyofilizasyon Yöntemi ile Kurutulması

Elde edilecek kuru karışım ürünlerin yapısının herhangi bir kayba uğramadan depolanması ve taşınmasının düşük maliyetli olması, tez çalışmasının asıl hedefi düşünüldüğünde önem arz etmektedir. Bu sebeple liyofilize formülasyon oluşturulması tercih edilmiştir.

Yapılan literatür taraması ile mikroorganizmaların liyofilize edilmesinde mikroorganizmalara göre farklı yöntemlerin kullanıldığı görülmüştür (Tan and Mustapha 2014). Freeze-drying ve Liquid-drying tekniğinin seçimi için, çalışma grubumuz ile birlikte, T1 kod'lu *Pseudomonas* sp.'nin her iki teknik ile liyofilizasyonu gerçekleştirilip, karşılaştırılmıştır (Aksu 2018). Liyofilizasyonda Freeze-drying yöntemi, tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.8.1 Liyofilizasyon Koşulları

Liyofilizasyon esnasında işlemin en iyi şekilde gerçekleşebilmesi ve sonrasında daha iyi saklama koşullarının sağlanması için, en uygun vialler ve septumları tedarik

edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce, her bir vialin septumları kapatılarak numaralandırılıp boş ağırlıkları kaydedilmiştir.

Kurutulacak ürünler içerisine eklenip tartımları alındıktan sonra septumları yarı açık bırakılan vialler, Freeze-drying tekniği için -80°C ' ye kaldırılıp 24 saat bekletilmiştir. Liyofilizatörün, step programlaması önceden yapılarak -40°C 'ye ulaşması, 24 saat bekletilme süresi dolmadan önce sağlanmıştır. Süre tamamlandığında örnekler liyofilizatöre yerleştirilmiştir. İşlem sonuna kadar cihazın kapağı kapalı kalmıştır.

Sıcaklığın kademeli olarak (Palmfeldt et al. 2003). -40°C 'den $+20^{\circ}\text{C}$ 'ye yükseltildiği, liyofilizasyon koşullarında uygulanacak olan en uygun koşullar belirlenmiş olup Tablo.3.17'de gösterilmiştir.

Tablo 3.17 Liyofilizasyon işlem basamakları

Liyofilizatör	Sıcaklık	Zaman	Artış	Vakum
Adım1	-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

Birincil kurutma işlemi sırasında liyofilizatöre yerleştirilen örnekler 33 saat boyunca -40°C 'de 0.1 mBar vakum altında sublimasyon işlemine bırakılmıştır. 1. adım tamamlandığında liyofilizatör sıcaklığı dakika da 1°C artarak 20 dakikanın sonunda sıcaklık -20°C 'ye ulaşmıştır. 2. adımda, 8 saat boyunca -20°C 'de sublimasyon işlemine devam edilmiştir.

İlk kurutma işlemini takiben ikincil kurutmada, cihaz sıcaklığını -20°C 'den dakika da 0.1°C artırarak 6.5 saat sonunda $+20^{\circ}\text{C}$ 'ye getirmiştir. Sıcaklık değişimi

sırasında vakum değeri sabit kalmıştır. 4. adım olarak, +20°C’de 1 saat süreyle aynı vakum değerinde kalan viallerin, septumları vakum altında kapatılmış, liyofilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

İkincil kurutmada, tipik olarak oldukça gözenekli bir yapının içerisindeki su, numunenin sıcaklığı kademeli olarak artırıldıkça camdan desorbe edilir. Nihai ürün, yüksek yüzey alanına sahip kuru, kolayca sulandırılan bir formdadır (Nireesha et al. 2013).

3.2.8.2 Liyofilizasyon Sonrası Viallerin Saklama Koşulları

Septumları vakum altında kapatılan vialler liyofilizatörden alındıktan sonra, her vialin ağırlığının tartımı yapıp kaydedilmiştir. Hava girişi ihtimalini tamamen ortadan kaldırmak amacıyla septumların üzerine her birinin vidalı kapakları takılmıştır.

Raf ömrü dolduğunda, belirlenen tarihlerde açılacak olan vialler, yapılan kodlamalara göre uygun şekilde saydam olmayan kutular içerisine konularak +4 °C ve +27 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.8.3 Liyofilize Kuru Karışım Ürünlerin Reaktivasyonu

Rehidrasyon sıvısı seçimi için, çalışma grubumuz ile birlikte; farklı rehidrasyon sıvılarının (su, PBS, skim milk ve süktroz) canlılık sayılarına etkisi denenmiştir (Eroğlu 2018). En iyi sonucu PBS vermiştir. Sonuçlar doğrultusunda raf ömrü süresi dolan vialler, PBS rehidrasyon sıvısıyla canlandırılmıştır. Tüm vial içeriğinin temsil edilmesi için özellikle çalışılıp, rehidrasyon yöntemi oluşturulmuştur.

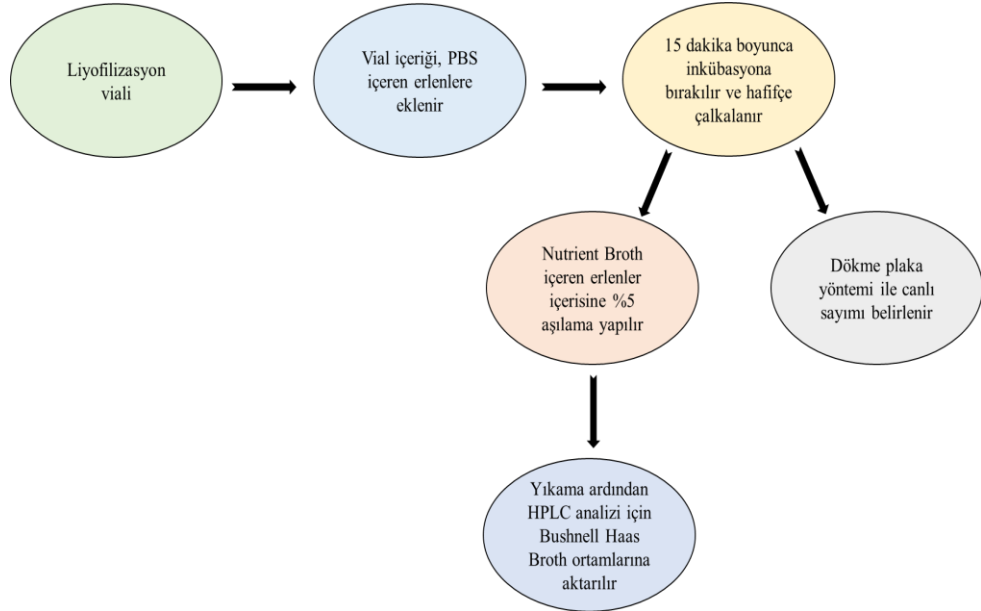
Liyofilize kuru ürün vial içeriğinin tamamı, 20 mL PBS içeren 50 mL’lik erlen içerisine tamamen boşaltılmıştır. Hafifçe karıştırılıp, yaklaşık 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS içerisinde taşıyıcı ve koruyucu materyallerin homojen dağılması ve mikroorganizma içeriğinin aktivasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir örnek erleninden 1’er mL seyreltme tüplerine alınarak her biri için gerekli seyreltmeler yapıp, 1’er mL steril petrilere aktarılmış, üzerine 40-45°C’ye kadar soğutulmuş PCA besiyeri dökülmüştür.

30°C’de 2 gün süre ile inkübasyon sonrasında koloniler sayılarak seyreltme faktörü ile çarpılıp liyofilizasyon sonrası taşıyıcılı örnekler için 1 g’da, taşıyıcısız örnekler için ise 1 mL’de bulunan toplam canlı sayısı belirlenmiştir.

Eş zamanlı olarak biyoparçalama analizi için, 15 dakikalık inkübasyon sonunda PBS+ürün içeriğinden 1mL alınıp, 20 mL Nutrient Broth içeren 100 mL’lik erlenlere eklenerek, yaklaşık 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında HPLC analizlerine geçilmiştir (Bkz. 3.2.11.2).

Liyofilizasyon öncesi ve sonrası toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı arasındaki fark ile her ürün için kayıp oranları belirlenmiştir. Liyofilizasyon öncesi toplam canlı sayısı ile liyofilizasyon sonrası toplam canlı sayısı arasındaki bu fark liyofilizasyon etkisi tespitidir.

Belirlenmiş raf ömrü süresi sonunda liyofilize ürünün aktivasyonu, canlılığının belirlenmesi ve biyoparçalama etkinliği analizi öncesi izlenecek adımlar Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Biyoparçalama etkinliği analizi öncesi izlenecek adımlar

3.2.9 Taşıyıcı Ön Denemeleri

Yapılan patent taramaları sonucunda taşıyıcı madde olarak literatürde halihazırda kullanılmakta olan talk, diatome, kaolin, zeolit, parafin, skim milk, silika, talaş tozu vb.'nin yanısıra sulu bir ortamda absorbe ve desorbe kabiliyetine sahip olan lifli, odunsu-selüloz tipi ve gözenekli mekanik bir yapıya sahip nişasta bileşenlerinden olmayan bitki materyalleri kullanıldığı görülmüştür. Yonca, pancar hamuru, acı bakla, soya fasulyesi, süpürge darısı, fasulye, kenevir, keten artıkları gibi baklagilleri kapsayan bu gruptan, ilk olarak, elde edilmesi en kolay ve ucuz olan kuru yonca seçilmiştir (Lebesgue et al. 2008). İzmir çevresinde bulunan bir köyden temin edilmiştir.

Kuru yonca balyası İzmir çevresinde bulunan bir köyden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılabilecek boyutları elde etmek için özel olarak tasarlanan bir öğütücü cihazı ve uygun boyutlu gözeneklere sahip elekler kullanılmıştır. Öğütülmüş yoncalar sırayla 500 μ m ve 300 μ m boyutunda ki eleklerden (Şekil 3.6) geçirilerek son boyutları <300 μ m olacak şekilde ayarlanmıştır (Lebesgue et al. 2007; Lebesgue et al. 2008).



Şekil 3.6 Öğütücü ve elek sistemleri; yonca öğütülürken görüntüsü

Öğütülmüş yonca ile mikroorganizmaların homojen karışıp karışmadığını belirlemek için ön deneme yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak 540 nm'de 0,3-0,5 OD olacak şekilde ayarlanmış ve dökme plaka sonuçlarına göre yaklaşık 5×10^8 kob/mL

yoğunlukta C6 (*Pseudomonas putida*) mikroorganizmasını içeren kültür sıvısı ile %2,5 - %5 - %10 - %20 - %40 - %50 ve %70 oranlarında olacak şekilde öğütülmüş yonca ile karıştırılarak deneme gerçekleştirilmiştir. Homojen dağılım sağlanması amacıyla karıştırma işlemi metal levha tepsilerde gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan karışımlar - 80°C'de 24 saat dondurulduktan sonra, daha önceden belirlenmiş olan koşullarda liyofilize edilmiştir (Bkz. Tablo 3.17).

Liyofilizasyon sonrasında elde edilen kuru karışımlardan örnekler alınıp, 3 paralelli seri dilüsyonları yapılarak dökme plaka yöntemi ile PCA ortamlarına ekimleri yapılmıştır. 30°C 24 saat inkübasyon sonunda sayılan petri sonuçlarına göre mikroorganizma yonca karışımı homojen şekilde karışmakta ve liyofilizasyon işlemi mikroorganizma sayısında herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır. Farklı oranlarda eklenen taşıyıcıların bulunduğu karışımlarda canlılıklar karşılaştırılıp, en iyi sayının gözlemlendiği oran ile asıl denemeye geçilmiştir.

Yonca'dan sonra taşıyıcı olarak soya küspesi, ayçiçeği küspesi (düşük proteinli ve yüksek proteinli) seçilmiştir (Lebesgue et al. 2008). İzmir'de ki bir yağ üretim fabrikasından temin edilmiştir.

Ayrıca yüksek su tutma kapasitesine sahip olan ve gözenekli yapısı ile mikrobiyal tutunmaya olanak sağlayan zeolit taşıyıcı olarak denenmiştir (Anandan and Yoon 2003). Çalışma için, Manisa Gördes'te bulunan Rota Madencilik San. ve Tic. A.Ş'den klinoptilolit tipi zeolit temin edilmiştir.

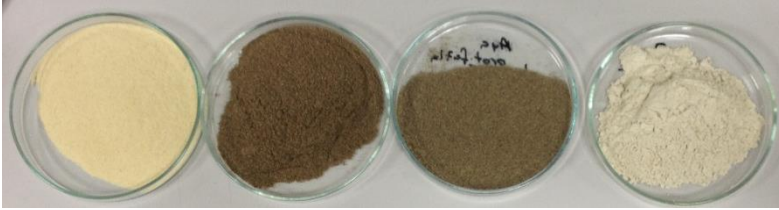
Kuru yonca bitkisine uygulanmış olan öğütme işlemleri, soya küspesi ve ayçiçeği küspeleri için de yapılmıştır. Ön denemeler, işlem adımları ve koşullar aynı olacak şekilde sonrasında seçilen taşıyıcılar için de yapılmıştır. Belirlenmiş olan liyofilizasyon koşulunda ön denemeler tamamlanarak en iyi taşıyıcılar seçilmiştir. Seçilen taşıyıcıların morfolojileri stereomikroskop ile görüntülenmiştir.

Ayrıca yonca taşıyıcı olarak kullanılarak koruyucular (gliserol, skim milk ve silika) için ön deneme kurulmuştur. $3,1 \times 10^7$ kob/mL yoğunlukta organizma ile

başlanılarak, liyofilizasyon sonrasında 2 ay'lık raf ömrü canlılık aktivitelerine bakılmıştır.

3.2.10 Kuru Karışım Hazırlama

Çalışmada seçilen 16 izolatu içeren aşı kültürlerinin +4°C ve +27°C'de saklanması için, gerekli mikroorganizma üretimi tamamlandıktan sonra raf ömrü çalışmalarına geçilmiştir. Koruyucu olarak skim milk (%10), polivinilalkol (PVA) (%5) ve liyofilizasyon sonrası viallere eklenen silika (%5) kullanılmıştır. Taşıyıcı olarak ön denemeler sonucunda kuru yonca, ayçiçeği küspesi (düşük proteinli) ve soya küspesi seçilmiştir. (Şekil 3.7) Farklı içeriklerde karışım hazırlanarak mikroorganizmaların saklanması işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 Kuru karışım için öğütülmüş taşıyıcılardan sırasıyla; soya, ayçiçeği küspesi (yüksek proteinli), ayçiçeği küspesi (düşük proteinli), zeolit

Biyoreaktör içerisinde karışık olarak üretilen mikroorganizmalar, başlangıç OD'si 540 nm'de 0,97 - 0,98 olacak şekilde ayarlanmış ve 16 mikroorganizma Tablo 3.17'de belirtilen oranlarda taşıyıcılarla metal levha tepsilerde karıştırılarak daha önceden boş halde ağırlıkları kaydedilmiş olan viallere belirlenen miktardaki koruyucular ile birlikte koyulmuştur. Taşıyıcı ile mikroorganizmalar, taşıyıcı yüzdesi (w/w) esas olacak şekilde yoğurularak karıştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan içerikler Tablo 3.18'de gösterilmiştir. Tablo 3.18'de gösterilen vial numaraları raf ömrü sürelerini belirtmektedir. Örneğin Vial 1; 1.hafta, Vial 2; 1.ay örneğini temsil etmekte olup tamamen aynı içeriğe sahiptir.

Tablo 3.18 Raf Ömrü Çalışmaları için Hazırlanan Vial İçerikleri

İçerik	Vial Numarası	İçerik Miktarları
Yonca	1-10	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,6mL Ortam sıvısı
Yonca+Silika	11-20	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,6mL Ortam sıvısı + 0,1 g Silika
Yonca+Skim Milk	21-30	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,5mL Skim Milk (%40) + 0,1mL Ortam Sıvısı
Yonca + PVA	31-40	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,5mL PVA (%20) + 0,1 mL Ortam Sıvısı
Ayçiçeği Küspesi	41-50	1,4g (Ayçiçeği Küspesi + Organizma) + 0,6mL Ortam sıvısı
Ayçiçeği Küspesi +Silika	51-60	1,4g (Ayçiçeği Küspesi + Organizma) + 0,6mL Ortam sıvısı + 0,1 g Silika
Ayçiçeği Küspesi +Skim Milk	61-70	1,4g (Ayçiçeği Küspesi + Organizma) + 0,5mL Skim Milk (%40) + 0,1mL Ortam Sıvısı
Ayçiçeği Küspesi +PVA	71-80	1,4g (Ayçiçeği Küspesi + Organizma) + 0,5mL PVA (%20) + 0,1mL Ortam Sıvısı
Soya Küspesi	81-90	1,4g (Soya Küspesi + Organizma) + 0,6mL Ortam Sıvısı
Soya Küspesi+Silika	91-100	1,4g (Soya Küspesi + Organizma) + 0,6mL Ortam Sıvısı + 0,1 g Silika
Soya Küspesi+Skim Milk	101-110	1,4g (Soya Küspesi + Organizma) +0,5mL Skim Milk (%40) + 0,1mL Ortam Sıvısı
Soya Küspesi+PVA	111-120	1,4g (Soya Küspesi + Organizma) + 0,5 mL PVA (%20) + 0,1 mL Ortam Sıvısı
Taşıyıcılı Vakumsuz+Silikasız	161-170	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,6mL Ortam Sıvısı
Taşıyıcılı Vakumsuz+Silikalı	171-180	1,4g (Yonca + Organizma) + 0,6mL Ortam Sıvısı + 0,1 g silika

Aynı zamanda, taşıyıcı içermeyen mikroorganizma deneme seti (Tablo 3.19) kurulmuştur. Belirlenen raf ömrü süresince, taşıyıcı içeren ürün gruplarının bu deneme ürünleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Vial numaraları raf ömrü sürelerini belirtmektedir.

Tablo 3.19 Taşıyıcısız Hazırlanan Vial İçerikleri

İçerik	Vial Numarası	İçerik Miktarları
Organizma	121-130	1,2 mL Organizma + 2,8 mL Ortam Sıvısı
Organizma+Silika	131-140	1,2 mL Organizma + 2,8 mL Ortam Sıvısı + 0,2 g Silika
Taşıyıcısız	141-150	1,2 mL Organizma + 2,8 mL Ortam Sıvısı
Vakumsuz+Silikasız		
Taşıyıcısız	151-160	1,2 mL Organizma + 2,8 mL Ortam Sıvısı + 0,2 g Silika
Vakumsuz+Silikalı		

+4°C ve +27°C için aynı içerikler olacak şekilde farklı dönemlerde deneme kurulmuştur. +4°C ve +27°C’de 180’er vial olmak üzere, toplamda 360 vial hazırlanmıştır. Tüm içeriklerden tank reaktör denemesi için,1.hafta ve 1-3-6-9-12-15-18.ay olmak üzere 8 set hazırlanmıştır. Çalışmada istenmeyen durumların meydana gelmesi durumunda kullanılabilecek (vial kırılması ya da hava alması, kontaminasyon vs.) ilave 2 set yedek ürün grubu oluşturulmuştur. -80°C’ye kaldırılan ürünler 24 saat bekledikten sonra -40°C’deki liyofilizatöre yerleştirilmiştir.

Liyofilize ürünlerin vakumsuz olarak saklanması canlılık ve biyoparçalama etkinliği üzerine etkisinin incelenmesi için Tablo 3.17 ve 3.18’ de belirtilen 161-171-181-191 numaralı deneme setlerinin, septumları açılıp vakum boşaltıldıktan sonra el ile kapatılarak diğer viallerle aynı şartlarda saklanması sağlanmıştır. Ürünün saklanması ve taşınması esnasında alternatif yolların belirlenmesi hedeflenmiştir.

18 ay’a kadar belirli zaman aralıklarında açılacak olan hazırlanan ürün gruplarına ait vial kodlamaları Tablo 3.20’da gösterilmiştir.

Tablo 3.20 Viallere Ait Kodlamalar

	İçerik	Hafta	Ay						
		1	1	3	6	9	12	15	18
Vial Numaraları	Yonca	1	2	3	4	5	6	7	8
	Yonca+Silika	11	12	13	14	15	16	17	18
	Yonca+Skim Milk	21	22	23	24	25	26	27	28
	Yonca+PVA	31	32	33	34	35	36	37	38
	Ayçiçeği Küspesi	41	42	43	44	45	46	47	48
	Ayçiçeği Küspesi+Silika	51	52	53	54	55	56	57	58
	Ayçiçeği Küspesi+Skim Milk	61	62	63	64	65	66	67	68
	Ayçiçeği Küspesi+PVA	71	72	73	74	75	76	77	78
	Soya Küspesi	81	82	83	84	85	86	87	88
	Soya Küspesi +Silika	91	92	93	94	95	96	97	98
	Soya Küspesi +Skim Milk	101	102	103	104	105	106	107	108
	Soya Küspesi +PVA	111	112	113	114	115	116	117	118
	Organizma	121	122	123	124	125	126	127	128
	Organizma+Silika	131	132	133	134	135	136	137	138
	Taşıyıcısız Vakumsuz+Silikasız	141	142	143	144	145	146	147	148
	Taşıyıcısız Vakumsuz+Silikalı	151	152	153	154	155	156	157	158
	Taşıyıcılı Vakumsuz+Silikasız	161	162	163	164	165	166	167	168
	Taşıyıcılı Vakumsuz+Silikalı	171	172	173	174	175	176	177	178

3.2.11 Raf Ömrü Çalışmaları

18. ay'a kadar ürün içeriğinin canlılık kontrolleri, biyoparçalama kapasiteleri ve hidrokarbonları parçalaması sonucu çıkan metabolitlerin toksik olup olmadığına ilişkin olarak ekotoksikolojik değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.11.1 Ürünün Mikroorganizma Canlılığının Belirlenmesi

4°C ve 27 °C saklama koşullarında olan ürünlerin; liyofilizasyon öncesi, 1. hafta ve 1., 3., 6., 9., 12., 15., 18. ay olmak üzere canlılık sayımları her bir içerik için gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş kuru karışım vial içerisindeki ürünlerin reaktivasyon işlemleri ve dökme plaka yöntemiyle ekimleri (Bkz. 3.2.8.3) gerçekleştirilmiştir.

Tüm hesaplamalar seyreltme faktörleri ve kuru ağırlık miktarları göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Elde edilen veriler taşıyıcılı örnekler için 1 g, taşıyıcısız örnekler için ise 1 mL'de ki sonuçlardır.

3.2.11.2 Ürünün Biyoparçalama Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Canlılık sayımlarıyla eş zamanlı olarak biyoparçalama analizleri gerçekleştirilmiştir. Raf ömrü süresi çalışmaları sonrasında ürünün biyoparçalama etkinliği ilk önce +4°C raf ömrü 1 hafta ve 1 ay olan vialler için gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca 3., 6., 9., 12., 15., 18. ay olmak üzere tüm içerikler için gerçekleştirilmiştir. +27 °C'de saklanan ürün vialleri içinde aynı işlemler sırasıyla yapılmıştır.

Biyoparçalama aktiviteleri denemesinde; 250ml'lik erlenlerde 50ml Bushnell Haas Broth ortamına karbon kaynağı olarak PTA grubu için 40 mg/L TA, 40 mg/L p-TOL, 30mg/L 4-CBA olacak şekilde eklenmiştir. PAH grubu için yine aynı hacimde ortamlara 20mg/L ANT, 20 mg/L PYR ve 20mg/L FLO olacak şekilde eklenmiştir.

Tüm deney ortamlarına %0,5 oranında yeast extract eklenmiştir. Kullanılacak tüm hücre süspansiyonları 540 nm'de optik yoğunlukları 0,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Biyoparçalama analizinde kullanılacak mikroorganizma süspansiyonlarının optik yoğunluklarına karşılık gelen mikrobiyal yükün belirlenmesi için; 0,4 OD olarak ayarlanan süspansiyonların seri dilüsyonları hazırlanarak dökme plaka yöntemi ile PCA ortamlarına ekimleri yapılmıştır. Alınan sonuçlara göre

denemelerde kullanılan organizmaların $3,5 \times 10^8$ kob/ml olduğu belirlenmiştir. Erlenlere %5 oranında organizma aşılması yapılarak 30°C'de 150 rpm çalkalamalı olarak karanlık ortamda inkübasyona kaldırılmıştır. Örnek alınması esnasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskine karşılık, deneme süresince kontrol erlenleri kullanılmıştır. Belirli aralıklarla örnekler alınarak kromatografi analizlerine geçilmiştir (Bkz. 3.2.3).

3.2.11.3 Ürünün Biyoparçalama Aktivitesi Sonucu Ortaya Çıkan Metabolitlerin Ekotoksikolojik Değerlendirilmesi

Ürünün hidrokarbonları parçalaması sonucu çıkan metabolitlerin toksik olup olmadığına ilişkin olarak ekotoksikolojik değerlendirmeler Mikrotoks toksisite ölçüm cihazı verilerine dayanarak yapılmıştır. (Şekil 3.8) Çalışma prensibinde, toksisite duyarlılığı geniş lüminesan bir bakteri olan *Aliivibrio fischeri* test edilecek örneğe maruz bırakılır, örneğimiz toksik ise sonuç; bakterinin metabolik olaylarındaki inhibisyonu sonucu verdiği ışımda azalma şeklinde görülür.



Şekil 3.8 Microtox Modern Water M500 Cihazı

Toksisite testlerinin yapılması sırasında üretici firma tarafından belirlenen protokole göre ölçümler yapılmıştır. %81,9 Basic Metodu kullanılmıştır. Denemeler %2 NaCl canlandırma çözeltisi içinde cihazın çalışma prensibine göre öngörülen ortam sıcaklığı olan 15°C’de, 490 nm’de gerçekleştirilmiştir. Örnekler için önerilen pH, 6.0 – 8.0 aralığındadır. Çalışılan numuneler aralık değerine girmektedir, pH ayarlaması yapılmamıştır.

Toksisite düzeyi lüminesans özellikteki *Aliivibrio fischeri*’nin test maddesi ile karşılaştığında yaydığı fluoresan ışık şiddetinin azalma veya artmasına bağlı olarak belirlenmektedir. Sonuçlar, bakterinin test maddesi ile muamele edildiği andan itibaren 5. dakika ve 15. dakika ile örnek türüne göre 30. dakikadaki yaydığı fluoresan ışık şiddetinin %50’sinin kaybolduğu (EC50) konsantrasyon olarak ifade edilmektedir (Gottlieb et al., 2003). EC50 eşik değerinin aşıldığı durum toksisiteyi göstermektedir.

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. Çalışmada her numune için 2,5 mL örnek kullanılmıştır. İz miktarda kalıntılar test için güvenilir olmadığından, tek kullanımlık **ölçüm küvetleri** ile çalışılmıştır.

Modernwater® Microtox test sisteminde işlem basamakları şu şekildedir;

1. *Aliivibrio fischeri* (**Reagent**-Liyofilize halde) içeren organizma süspansiyonu, **Reconstitution solüsyonu** ile hazırlanır ve *reagent well*’e konur.
2. F3 kuyucuğuna 1500 µL **Diluent** eklenir.
3. A1 sırası boyunca A5’e kadar ve C1 sırası boyunca C4’e kadar 1000 µL **Diluent** eklenir.
4. C5 kuyucuğuna 250 µL **Ozmotik Adjusting Solüsyonu** eklenir.
5. Test numunesinden 2500 µL C5 kuyucuğuna eklenir ve homojen hale gelmesi için hafifçe karıştırılır.

6. $C5 \rightarrow C4$, $C4 \rightarrow C3$, $C3 \rightarrow C2$, $C2 \rightarrow C1$, $C1 \rightarrow A5$, $A5 \rightarrow A4$, $A4 \rightarrow A3$, $A3 \rightarrow A2$ kuyucuklarına 1000 μL örnek $C5$ 'ten aktarılarak sırayla aktarım yapılır. $A2$ kuyucuğundan alınan son 1000 μL hacimdeki örnek dışarı dökülür.
7. $F3$ kuyucuğuna 150 μL *Aliivibrio fischeri* eklenir.
8. $F3$ kuyucuğundan $B1$ 'den $B5$ 'e ve $D1$ 'den $D5$ 'e kadar 100 μL eklenir.
9. $B1$ okuma kuyucuğuna yerleştirilir ve set tuşuna basılarak okumaya başlanılır.
10. Daha sonraki adım ise Mikrotoks sekmesinde start tuşuna basılır.
11. $B1$ 'den $B5$ 'e ve $D1$ 'den $D5$ 'e kadar tüpler okutulur.
12. Okuma bittikten sonra $A1 \rightarrow B1$, $A2 \rightarrow B2$, $A3 \rightarrow B3$, $A4 \rightarrow B4$, $A5 \rightarrow B5$, $C1 \rightarrow D1$, $C2 \rightarrow D2$, $C3 \rightarrow D3$, $C4 \rightarrow D4$, $C5 \rightarrow D5$ 900 μL eklenir.
13. Sonrasında örnekler okuma kuyucuğuna yerleştirilir start tuşuna basılarak 5 dakika bekledikten sonra, okuma yapılır. 15.Dakika veya 30.dakika'da (numuneye göre) tekrar okumalar yapılır ve test sonlandırılır.

3.2.12 Etkinliği En İyi Ürünlerin Petrokimya Endüstrisi Atık Suyunda Denenmesi

Mikrobiyolojik açıdan, baskın mikroorganizma türü atık suyun özelliklerine, çevresel koşullara, süreç tasarımı ve sürecin işletilme biçimine bağlıdır. Bir aktif çamur sürecinin başarısı, organik maddeyi tüketen, birlikte yumaklaşan, geri çevrim için konsantre çamur oluşturacak şekilde çökelen ve berrak bir çıkış suyu sağlayan biyolojik topluluğun, arıtımı istenen atık suya adaptasyonuna bağlıdır. Bu amaçla, elde edilen liyofilize bakterilerin aşılandıktan sonra arıtım sisteminde varlıklarının devam edip etmediğinin bilinmesi ve aynı süreçte biyoparçalama aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanarak çalışmalar yapılmıştır.

3.2.12.1 Reaktörlerin kurulumu ve stabilizasyonu, aktif çamur olgunlaştırma

Gerçek şartları temsil etmesi açısından laboratuvar ölçekli reaktör olarak, yaklaşık 7 L havalandırma ünitesi ile 3 L çökeltim tankı olan 10 L'lik CSTR modeli

Hidrokarbon parçalama etkinliği her bir taşıyıcı içerisinde en iyi olan ürünün, laboratuvar ölçekli tank reaktörde denenmesi için, Petkim Petrokimya Holding A.Ş. tesislerinin Atık Arıtma ve Bertaraf Ünitesi biyolojik arıtım havalandırma havuzlarından belirli bir dönemde (bahar-yaz) alınan aktif çamur, olgunlaştırma için öncül çamur olarak kullanılarak reaktörlerin kurulumu (4 adet) gerçekleştirilmiştir.

Çamurun sürekli olarak beslenmesi 1500 mg/L glukoz içeren ve KOİ teorik olarak yaklaşık 1500 mg/L olan sentetik atık su ile sağlanmıştır. Tank reaktörünün HRT'si, ortalama 48 saat olarak belirlenmiştir. ÇHİ, AKM ölçümleri, çözülmüş oksijen (ÇOİ), pH değerleri analiz edilmiştir.

1L'lik dereceli silindirde 30 dakika statik olarak bekletilerek çökelen çamur hacmi (ml/L) kaydedilmiştir (APHA 2017).

AKM analizleri aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır (APHA 2017).

1- 0,45 µm por çaplı filtre kağıdı saf su ile yıkanarak 103 - 105°C' de 1 saat kurutulur, darası alınır.

2-Belirlenen miktarda ki örnek membran filtrasyon düzeneğine alınır ve vakum altında filtre kağıdından geçirilir.

3-Filtre kağıdı yeniden 103 - 105°C' de sabit tartıma gelinceye kadar kurutularak aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$\text{AKM (mg/L)} : \frac{(A-B) \times 1000}{\text{Numune Hacmi (mL)}}$$

A: Filtre + kuru madde ağırlığı (mg)

B: Filtre ağırlığı (mg)

Mikroskop gözlemleri yapılarak mikrobiyal değişimler ve flok oluşum süreci, çamurun çökebilirliği gibi parametreler sürekli izlenmiştir. Reaktörde seyreden çözünmüş oksijen ve pH değerleri her gün ölçülerek, ÇOI 2mg/L'ye ve pH 7.0-7.5 aralığına sabitlenmiştir. AKM miktarları 2500 mg/L değerini geçtiği zamanlarda çökeltim tankından çamur atılarak aktif çamurun stabilizasyonu sağlanmıştır.

Tank reaktörüne giriş ve çıkış sularının KOİ (mg/L) ölçümleri Spectroquant® COD Cell Test Kiti (Merck- 114895 (15-300mg/L) ve 114555 (500-10000 mg/L)) ile gerçekleştirilmiştir. Analizler kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 2 ml hacminde örnek test tüpüne alınmıştır. Potasyum dikromat örnek ile tepkimeye girdiğinden dolayı test tüpünün yüzeyi oldukça ısınmaktadır. Hazırlanan örnekler önceden 148°C'ye kadar ısıtılmış olan termoreaktör içerisinde 120 dakika boyunca bekletilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda test tüpleri oda sıcaklığına gelinceye dek en az 30 dakika soğuması beklenip, spektrofotometre ile ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bunlara ek olarak çamur yaşı hesaplanmıştır ve aktif çamur numunesi alınan işletmede geçerli olan 4-5 gün çamur yaşında denemeye geçilmiştir. Besleme giriş-

çıkış boruları, hava girişleri ve difüzörler sürekli kontrol altında tutularak, gerekli görüldüğünde temizlenmiş ya da değiştirilmiştir. Çamur olgunlaştırılmasına yaklaşık 60 gün devam edilmiştir. Sonrasında etkinliği en iyi olan ürünün reaktörde denenmesi aşamasına geçilmiştir.

3.2.12.2 CSTR içinde biyoaugmentasyon uygulaması

Hazırlanan ürün gruplarından her bir taşıyıcı grubu kendi içerisinde ayrı değerlendirilmiş, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve 27°C 'de 12 ay boyunca hem canlılığın hem de biyoparçalanma etkinliğinin diğerlerine göre en iyi olduğu belirlenen gruplar biyoaugmentasyon için seçilmiştir. En iyi 3 adet ürün grubu ve 1 adet denemenin kontrolünü sağlamak için olmak üzere, 4 adet CSTR kurulup kullanılmıştır. Kontrol reaktörüne herhangi bir ürün ilavesi olmamıştır. (Şekil 3.10)



Şekil 3.10 CSTR sistemi genel görünüşü

Öncelikle liyofilize kuru karışım ürünlerin reaktivasyonu ve canlandırılması belirlenmiş protokol ile sağlanmıştır. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan liyofilize ürünlerin, 10 litrelik tank reaktör hacminin, organizmaların aklımasyonu için ilk önce %5'i (500 mL), 4 gün

sonrasında %1'i (100 mL) olacak şekilde ön çoğaltımı yapıp ürün reaktöre ilave edilmiştir. Ön çoğaltım, 500 mL'lik erlen içerisinde 100 mL Nutrient Broth olacak şekilde, içerisine %5 aşılama yapılarak gerçekleştirilmiştir. 30°C'de 150 rpm çalkalamalı olarak inkübasyona kaldırılmıştır. Çoğaltılan ürünün reaktöre ilave işlemi gerçekleşmeden önce, aktarılacak hacim miktarı kadar tank içeriği uzaklaştırılmıştır.

3.2.12.3 Hedef kimyasalların tank reaktör içerisine eklenmesi

Reaktörlere yapılan ikinci aşılama üzerinden 24 saat geçtikten sonra, ürünlerin biyoparçalanma etkinliklerinde kullanılan kimyasal konsantrasyonu ile aynı olacak şekilde (40 mg/L TFA (33,3 mL), 40 mg/L p-TOL (33,3 mL), 30 mg/L 4-CBA (25 mL)) reaktörlerde deneme kurulmuştur. Çalışma için hazırlanan 12000 mg/L'lik stok çözeltileri 0,22 µm'lik steril şırınga filtresinden geçirilerek, istenmeyen biyobozunumu önlemek için daima 4°C'de muhafaza edilmiştir. Stok kimyasaldan çalışma için gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

Belirli zaman aralıklarında reaktörlerden örnek alınarak 24 saat boyunca kimyasal giderimleri HPLC ile takip edilmiştir. Kimyasalın tükendiği andan itibaren toplam konsantrasyon 1200 mg/L'lere kadar yükseltilmiş ve yine aynı şekilde belirli aralıklarla örnek alınarak biyoparçalama aktivitelerine bakılmıştır. Deneme de KOİ yükünün değişmemesi için sentetik atık su içeriğindeki glikoz, eklenen hedef kimyasal konsantrasyonuna göre azaltılmıştır. Reaktörlere aynı zaman ve miktarda belirlenen oranlarda hidrokarbon eklemesi yapılmıştır.

Tablo 3.21'de tank reaktör içerisinde kurulan denemelerde çalışılan toplam kimyasal konsantrasyonları gösterilmiştir.

Tablo 3.21 Tank reaktörde çalışılan kimyasal konsantrasyonları

	Kimyasal konsantrasyonu (mg/L)			
	TFA	p-TOL	4-CBA	Toplam
1.deneme	40	40	30	110

2.deneme	50	50	50	150
3.deneme	100	100	100	300
4.deneme	200	200	200	600
5.deneme	400	400	400	1200

3.2.12.4 Tank reaktör çıkış sularının ekotoksikolojik değerlendirilmesi

CSTR içinde biyoaugmentasyon uygulanıp, atık suya verilen ilgili kimyasalların parçalanmasının ardından çıkış suyunda kalan son ürünlerin ekotoksikolojik değerlendirmeleri Mikrotoks toksisite ölçüm cihazı verilerine dayanarak yapılmıştır (Bkz. 3.2.11.3).

3.2.12.5. Liyofilize katı karışımın Real Time PCR ile takibi yapılarak organizmaların varlığının kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi

Aktif çamur aklımasyonu sonucu CSTR içerisine eklenen katı karışım ürünlerinin biyoparçalama esnasında eş zamanlı olarak mikrobiyal kompozisyonları incelenmiştir. Canlandırılmış liyofilize kuru karışım ürünleri eklemeyen önce, mikroorganizma eklenip aklımasyonunun ardından ve HPLC verileri ışığında kimyasalların bitişinde olmak üzere CSTR'den aktif çamur örneği alınarak genomik DNA izolasyonları yapılmıştır.

Reaktör sisteminde belirlenen izolatların takibini gerçekleştirmek için Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler® 96 System) kullanılmıştır. Bu bağlamda öncelikle cihazda çalışılması uygun olabilecek primer/prob tasarımları literatür tabanlı olarak araştırılmıştır. Spesifik mikroorganizmalar olmalarından dolayı, hepsi için cihazda çalışmaya uygun primer seti veya primer/prob setlerine ulaşamamıştır. İzolatlardan, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas sp.*, *Raoultella planticola*, *Acinetobacter sp.* ve total bakteri için çalışılan primer ve primer/prob setleri literatür kaynaklı olarak sentezletilmiştir. Diğer izolatlar için primer setleri, tez çalışmasında

içinde yer aldığı SANTEZ (0719.STZ.2014) (TUBİTAK-112D044) projesi kapsamında tarafımızca tasarlanarak sentezletilmiştir.

Ürün içerisinde bulunan farklı 13 izolattan pratikte çalışılması mümkün olan 9'u için primer ve primer/prob sistemleri kullanılmıştır. 9 izolatın 7'si ve total bakteri için primer setleri, 2 izolat için ise primer/prob sistemi kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan primerler Tablo 3.22 'de gösterilmiştir.

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

Tablo 3.22 Real-time PCR analizlerinde kullanılan primer setleri

Hedef Mikrorganizma	Primer/Prob	Dizi (5'--> 3')	Referans
<i>Acinetobacter sp.</i>	ALK-F	GCGTAATCCAACCTGATGAAGAA	(Phrommannich 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>	Rp1	TexasRed- ACTGCAACTACTTATTAAACTCCTTTG ATT-BHQ2	(Bjornsdottir-Butler et al. 2011)
	HdcF	TCAATTAATAACTGCGGTGACTG	
	HdcR	CCATTGGTCACATACCCCCA	

<i>Chryseobacterium</i> sp.	16sF	ATTGCCCGAAGGAAGGTC	SAN-TEZ (0719.STZ.2 014) (TUBİTAK- 112D044)
	16sR	GAGCGAACAGGATTAGATACCC	
<i>Comamonas testosteroni</i>	F	ATGGTTTGGTGCTCGTCGAAAG AGAA	
	R	CATTAGAGTGCTCAACTGAATGTAGC	
<i>Micrococcus</i> sp.	F	GAAGTCGCGGAGGTGATG	
	R	TCGTGGAGTGGCTGAACC	
<i>Aeromonas</i> sp.	GyrB-F	GAAGGCCAAGTCGGCCGCCAG	(Robertson et al. 2014)
	GyrB-R	ATCTTGGCATCGCCCGGGTTTTC	
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	glyA- F	ATACCGTCCTCGGGCTGAACC	SAN-TEZ (0719.STZ.2 014) (TUBİTAK- 112D044)
	glyA-R	CTTCTTCGCAATCTCCGCATC	
<i>Pseudomonas putida</i>	Hfq-F	AAAGGTCCCGGTATCCATTAC	(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	

Sentezletilen primer setleri ile primer/prob setlerinin uygunluğunun belirlenmesi ve Real-Time PCR cihazında denenmesi için her bir izolattan elde edilen saf genomik DNA örnekleri kullanılmıştır. Her bir izolat PCA ortamlarına çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekilerek 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon

sonunda üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak genomik DNA izolasyonları 3.2.5.1’de belirtildiği gibi yapılmıştır. Her bir setin PCR protokolleri, primer ve problemlerin Tm dereceleri ile teorikte çoğaltılacak olan bölge uzunluklarına göre belirlenmiştir. Protokolleri belirlenen setler Real-Time PCR cihazında denenerek hem setlerin sistemde iş görme durumları hem de protokol doğrulaması gerçekleştirilmiştir.

Real-time PCR’da kullanılmak üzere seçilen primer setleri ile primer/prob setlerine ait koşullar Tablo 3.23’de ve Tablo 3.24’de gösterilmiştir.

Tablo 3.23 Real-time PCR’da SYBR Green Ampliqon kiti ile yapılan primerlere ait PCR protokolü

Hedef mikroorganizma	Real-time PCR Protokolü		Döngü Sayısı
<i>Acinetobacter sp.</i>	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 97°C’de 1 sn	1
	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
	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1

<i>Aeromonas sp.</i>	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 sp.</i>	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

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

Tablo 3.24 TaqMan probu ile gerçekleştirilen PCR protokolü

Hedef mikroorganizma	Real-time PCR Protokolü		Döngü Sayısı
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ön inkübasyon	95°C'de 600 sn	1
	Amplifikasyon	95°C'de 10 sn 50°C'de 10 sn 72°C'de 1 sn	45
	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 58°C'de 10 sn 72°C'de 1 sn	45
	Cooling	37°C'de 30 sn	1

Pseudomonas fluorescens ve *Raoultella planticola* haricinde diğer izolatlar için, kalitatif ve kantitatif analizler SYBR® Green I teknolojisi “Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green” kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışılan primer setlerinin reaksiyon sonunda Tm (erime eğrisi) analizleri ile kontrolleri yapılmıştır. Tablo 3.25’de SYBR Green teknolojisinde kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları gösterilmiştir.

Tablo 3.25 SYBR Green için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

SYBR GREEN I	
Primer – F (10µM)	0,8 µL
Primer – R (10µM)	0,8 µL
Master mix	10 µL
PCR Grade Su	5,9 µL
Örnek (Kalıp DNA)	2,5 µL
Toplam Hacim	20 µL

Pseudomonas fluorescens ve *Raoultella planticola* izolatları için ise farklı dalga boylarında salınım ve soğurma yapan özel boyalarla (FAM-BHQ2 ve TexasRed-BHQ2) işaretli hidroliz problemleri kullanılmıştır. “FastStart Essential DNA Probes Master” (Roche) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.26’da kit bileşenleri ve miktarları gösterilmiştir.

Tablo 3.26 TaqMan probu için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

TaqMan probu	
Primer – F (10µM)	1 µL
Primer – R (10µM)	1 µL
Prob	1 µL
Master mix	10 µL
PCR Grade Su	4,5 µL
Örnek (Kalıp DNA)	2,5 µL

Toplam Hacim	20 µL
---------------------	-------

Ayrıca reaktör içindeki toplam bakteri miktarının belirlenmesi ve izolatlar dışındaki diğer mikroorganizmaların miktarlarının gözlenmesi için tüm bakterileri saptayabilecek total bakteri primer seti kullanılmıştır. Total bakteri belirlenmesi için SYBR® Green I teknolojisi kullanılmıştır.

Bilinmeyen örnek içerisinde var olan hedef DNA molekülünün miktar hesabının (kantitatif analiz) yapılabilmesi için, önemli bir basamak olan standart eğrilerin oluşturulması çalışılacak her bir izolat için yapılmıştır. Standart eğri hazırlanmasında daha doğru sonuçlar elde edebilmek için pGEM®-T Easy Vector System II (Promega, ABD) klonlama kiti kullanılarak hedef gen bölgeleri *Escherichiae coli*'de çoğaltılmıştır. Ligasyon basamağı kit içeriğine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle aşağıda ki formül kullanılarak insert DNA miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Insert DNA miktarı (ng)} = \frac{\text{Vektör ağırlığı (ng)} \times \text{Insert DNA uzunluğu (kb)}}{\text{Vektör uzunluğu (kb)}} \times \frac{3}{1}$$

Hesaplama sonrasında elde edilen insert DNA miktarı standart reaksiyon karışımında Tablo 3.27'de x µl olarak belirtilmiş olup, klonlanması hedeflenen gen bölgesi için değişiklik göstermektedir. Hesaplamalarda kullanılan kit protokolüne uygun olarak, vektör uzunluğu 3 kb ve vektör ağırlığı 50 ng olarak alınmıştır. Formülde belirtilen 3:1 oranı, reaksiyona eklenen vektör miktarının insert DNA miktarına oranını belirtmektedir.

Tablo 3.27 Ligasyon işlemi için hazırlanan standart reaksiyon karışım içeriği

	Standart	Pozitif	Negatif
	Reaksiyon	Reaksiyon	Reaksiyon
Ligasyon	5 µl	5 µl	5 µl
Tamponu			

Vektör (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR DNA	x µl	-	-
Kontrol DNA	-	2 µl	-
DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
Nükleaz Free Su	-	1 µl	3 µl
Toplam Hacim	10 µl	10 µl	10 µl

Maksimum transformant sayısına ulaşmak için hazırlanan reaksiyon karışımları +4°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda transformasyon işlemi için aşağıda ki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

- Ligasyon reaksiyonlarını içeren tüpler, içeriğin dip kısımda toplanması için santrifüjlenir.
- Daha sonra, her bir ligasyon reaksiyonundan 2 µL alınarak, buz üzerinde bulunan 1,5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılır. Kompetent hücrelerin transformasyon etkinliğinin ölçülmesi için diğer tüplere 0,1 ng kesilmemiş plazmid ilave edilerek buz üzerine alınır.
- Donmuş JM109 yüksek etkinlik kompetent hücrelerinin tüpleri, buz banyosunda çözülene kadar bekletilir (yaklaşık 5 dakika). Hücreler hafifçe karıştırılır. Kompetent hücreler oldukça kırılgan olduğu için aşırı pipetleme yapılmamalıdır.
- Dikkatli bir şekilde, 2 µL’lik ligasyon reaksiyonlarına 50 µL, transformasyon verimini ölçmek için hazırlanan tüplere 100 µL hücre aktarılır, yavaşça karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 20 dakika inkübasyona bırakılır.
- 42°C’deki su banyosunda hücreler yaklaşık 45-50 saniye ısı şokuna maruz bırakılır, bu esnada tüpler çalkalanmaz. İşlem sonrası, tüpler hızlıca tekrar buz üzerine alınır ve 2 dakika bekletilir.
- Ligasyon reaksiyonlarını içeren tüplere 950 µL, kesilmemiş plazmid ile transforme olmuş hücreleri içeren tüplere 900 µL oda sıcaklığındaki SOC medium ilave edilir. Tüpler, 1,5 saat boyunca 37°C’de ve 150 rpm’de çalkalanarak inkübe edilir.
- Transformasyon kültürlerinden 100 µL alınarak, daha önceden hazırlanmış Amfisilin/IPTG/X-Gal içeren LB agar (2adet) ortamlarına yayma plaka yöntemi ile inoküle edilir. Transformasyon kontrolü için, ekim sırasında SOC medium ile 1’e 10 oranında dilüsyon önerilir. Eğer yüksek sayıda koloni oluşumu isteniyorsa, hücreler

1000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet oluşumu sağlanır. 200 µL SOC medium içerisinde süspanse edilerek, petrilere bunlardan 100 µL inoküle edilir.

- Petriler 37°C'de 16-24 saat inkübe edilir.

Mavi-beyaz koloni seçimine göre, insert DNA içerdiği düşünülen beyaz koloniler, amfisilin içeren 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de çalkalamalı olarak 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Hedef bölgeleri içeren plazmid DNA'ları, plazmid ekstraksiyon kiti (Roche, Germany) kullanılarak elde edilip, nanodrop ile saflık kontrolleri yapıp miktarları belirlenmiştir. Uygun DNA seyreltmeleri hazırlanarak standart eğri grafiğinin oluşturulması için öncelikle başlangıç plazmid DNA kopya sayısı aşağıda ki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

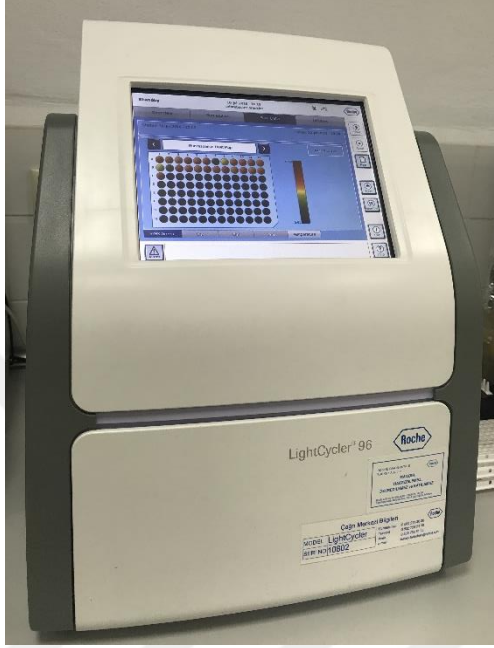
$$DNA \text{ kopya sayısı} = \frac{DNA \text{ kütlesi (g)} \times Avagadro \text{ sayısı (mol)}}{Bazların ortalama moleküler ağırlığı \left(\frac{g}{mol}\right) \times Template \text{ uzunluğu}}$$

Daha sonra bir seri dilüsyon yapılarak, maksimum 10^8 - minimum 10^2 kopya DNA içeren seyreltmeler hazırlanmıştır. Tablo 3.25'de ve Tablo 3.26'da belirtilen PCR bileşenleri ile karıştırılarak analizin yapılacağı kuyucuk sisemlerine (plate) aktarılmıştır. Reaksiyon tamamlandığında, sisteme verilen DNA molekül miktarlarına karşılık gelen Ct (eşik değeri) değerleri ile slope (eğim) ve intercept değerleri dikkate alınarak standart eğriler oluşturulmuştur.

PCR verimi standart eğrinin eğimi ile doğru orantılıdır. Buna göre -3.332'lik bir eğim %100'lük bir verime karşılık gelir. İdeal PCR verimi % 90 -100 arasında olması gerekmektedir. Çoğaltılan bölgenin (amplicon) uzunluğu, sekonder yapılar ve primer kalitesi gibi faktörler PCR verimini etkileyebilir. Verim hesabı yapılırken aşağıdaki formül kullanılmakta ve % değeri olarak verim gösterilmektedir.

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

PCR verimleri hesaplanmıştır. Standartlar oluşturulduktan sonra örnekler standartla birlikte çalışılmıştır. şekil 3.11’de tez çalışmasında kullanılan Real Time PCR cihazı gösterilmiştir.



şekil 3.11 Tez çalışmasında kullanılan Real-time PCR cihazı

4 BULGULAR

4.1. İzolatların Eldesi ve Tanılanması

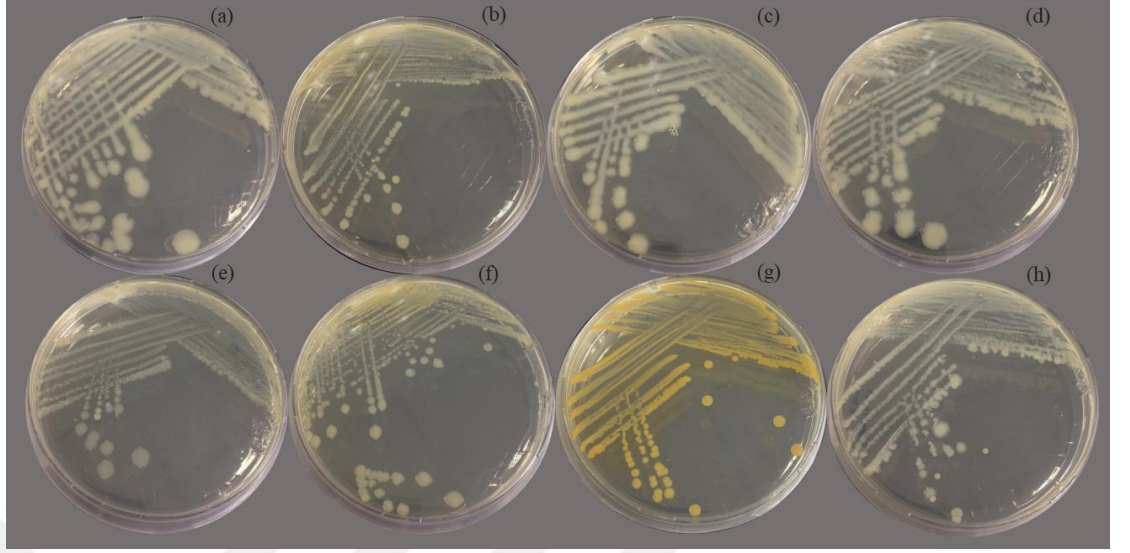
Tek karbon ve enerji kaynağı olarak TFA, p-TOL ve 4-CBA kullanabilen bakteriler izole edilip saflaştırılmıştır. Petrilerde saflaştırılan mikroorganizmalardan koloni morfolojilerine göre farklı olduğu belirlenen organizmalar seçilmiştir. Böylece, makroskopik çalışma sonrasında 20 farklı koloninin izolasyonu gerçekleştirilip, çalışmanın devamı için en aktif 8 organizma seçilmiştir.

Elde edilen 8 yeni izolatın HPLC ile biyoparçalama etkinlikleri belirlenmiştir. SANTEZ 00639-2010-2 no'lu proje kapsamında daha önceden identifiye edilmiş olanlar ile beraber toplam 16 organizmanın, en iyi etkinlik gösterdiği kimyasallar Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Çalışmaya eski ve yeni izolatlar olmak üzere toplamda 16 organizma ile devam edilmiştir.

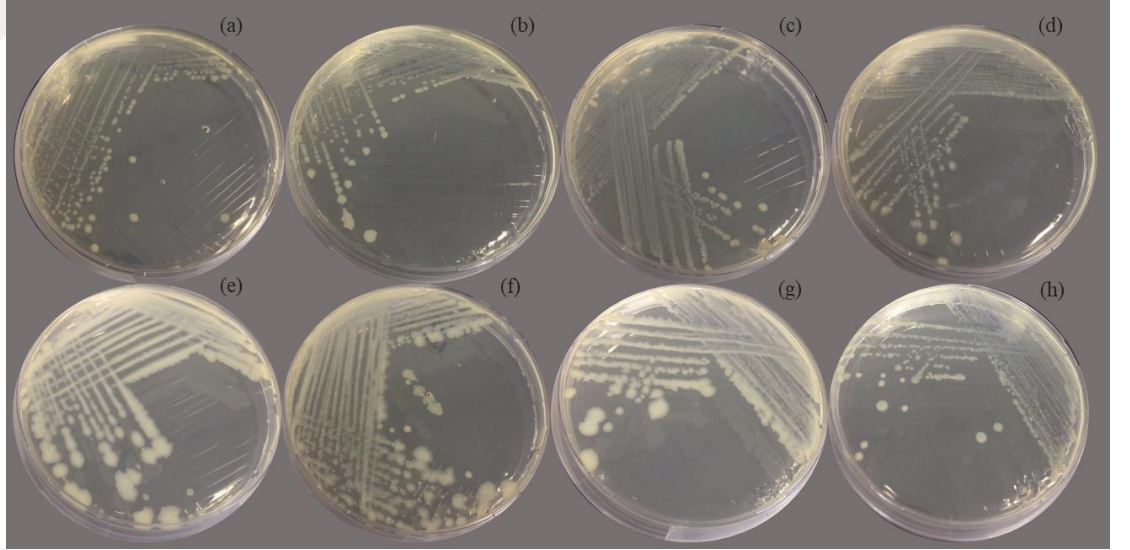
Tablo 4.1 HPLC sonuçlarına göre izolatların etkinlik gösterdiği kimyasallar

TFA	p-Tol	4-CBA	ANT	FLO	PYR
T1	PT4	3A2	ANT2	ÇB	FT5
T4	PT7	C6		218	P6
TK	T5	C9		AS	
R1					

16 saf izolatın petri görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Gram boyama işlemleri sonrasında gram reaksiyonları TK, ÇB, AS için pozitif olarak sonuçlanmıştır. Diğer 13 izolat gram negatiftir.



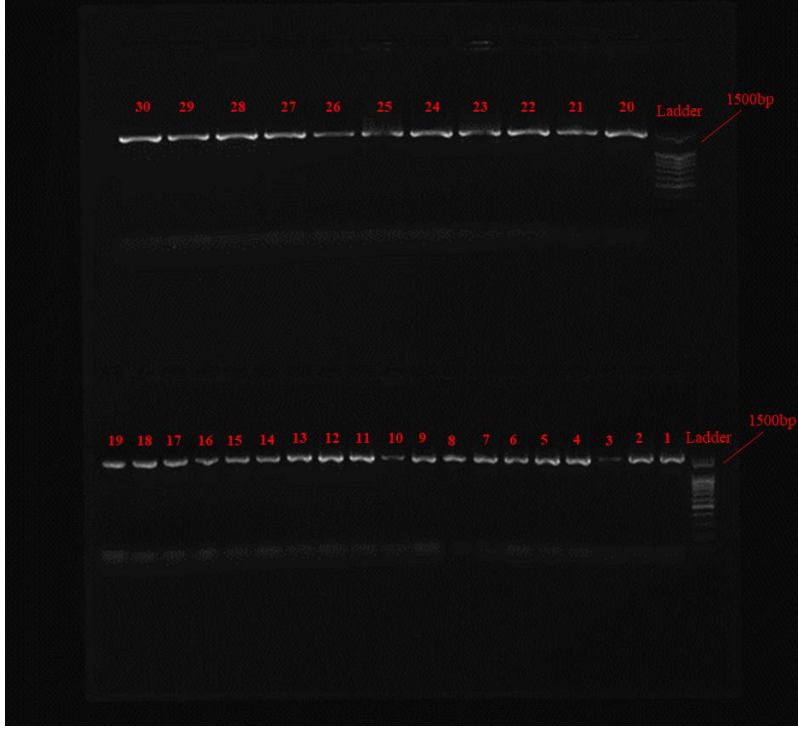
Şekil 4.1 PCA'da petri görüntüleri a) ÇB izolatu, b) TK izolatu, c) T4 izolatu, d) FT5 izolatu, e) P6 izolatu, f) PT7 izolatu, g) C9 izolatu, h) 3a2 izolatu



Şekil 4.2 PCA'da petri görüntüleri a) PT4 izolatu, b) C6 izolatu, c) R1 izolatu, d) T1 izolatu, e) Ant2 izolatu, f) 218 izolatu, g) AS izolatu, h) T5 izolatu

4.2. Mikroorganizmaların Moleküler Karakterizasyonu

Elde edilen ve saf olduğu belirlenen genomik DNA' ların universal primerler kullanılarak çoğaltımları gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin, %1'lik agaroz jelde doğrulamaları yapılmıştır (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Genomik DNA izolasyon agaroz jel sonuçları

Bant numaraları ve izolat kodları; 1: T1, 2: T4, 3: T5, 4: TK, 5: C6, 6: C8, 7: C9, 8: PT4, 9: PT7, 10: PT8, 11: PT9, 12: R1, 13: 3A2, 14: 3ABBK, 15: 2B, 16: 12TTK, 17: FLR1, 18: FT5, 19: FT7, 20: ANT2, 21: ANT8, 22: 218, 23: ÇB, 24: SD, 25: SE, 26: AS, 27: H1, 28: H2, 29: 3A1, 30: P6

Daha önceki SANTEZ projesinden elde edilen bakteri izolatları ile birlikte, 31 örneğe ait sekans sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Tanılanan strainlerin genus ve tür düzeyindeki isimleri

İzolat Kodu	Organizma İsmi	Benzerlik Oranı (%)	Aksesyon Numarası
T1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	JX480627
T4	<i>Chryseobacterium sp.</i>	99	JX480628
T5	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	99	MW248704
TK	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	100	JX480630
C6	<i>Pseudomonas putida</i>	100	MW248692
C8	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248691
C9	<i>Chryseobacterium indolegenes</i>	100	MW248707
PT4	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	99	MW248738
PT7	<i>Pseudomonas putida</i>	100	MW248705
PT8	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248693
PT9	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248694
R1	<i>Pseudomonas putida</i>	100	MW248695
3A2	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MT127003
3ABBK	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248708
2B	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248696

12TKK	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248697
FLR1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	Alınacak
FT5	<i>Raoultella planticola</i>	100	MW248698
FT7	<i>Raoultella planticola</i>	100	Alınacak
ANT2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	MW248699
ANT8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	Alınacak
218	<i>Acinetobacter sp.</i>	100	JX029141
ÇB	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	100	JQ922111
SD	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	100	Alınacak
SE	<i>Arthrobacter sp.</i>	100	JX073088
AS	<i>Micrococcus luteus</i>	100	MW248700
H1	<i>Comamonas testosteroni</i>	99	MW248701
H2	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248702
3A1	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	MW248706
P6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	MW248703
P5	<i>Aeromonas sp.</i>	100	Alınacak

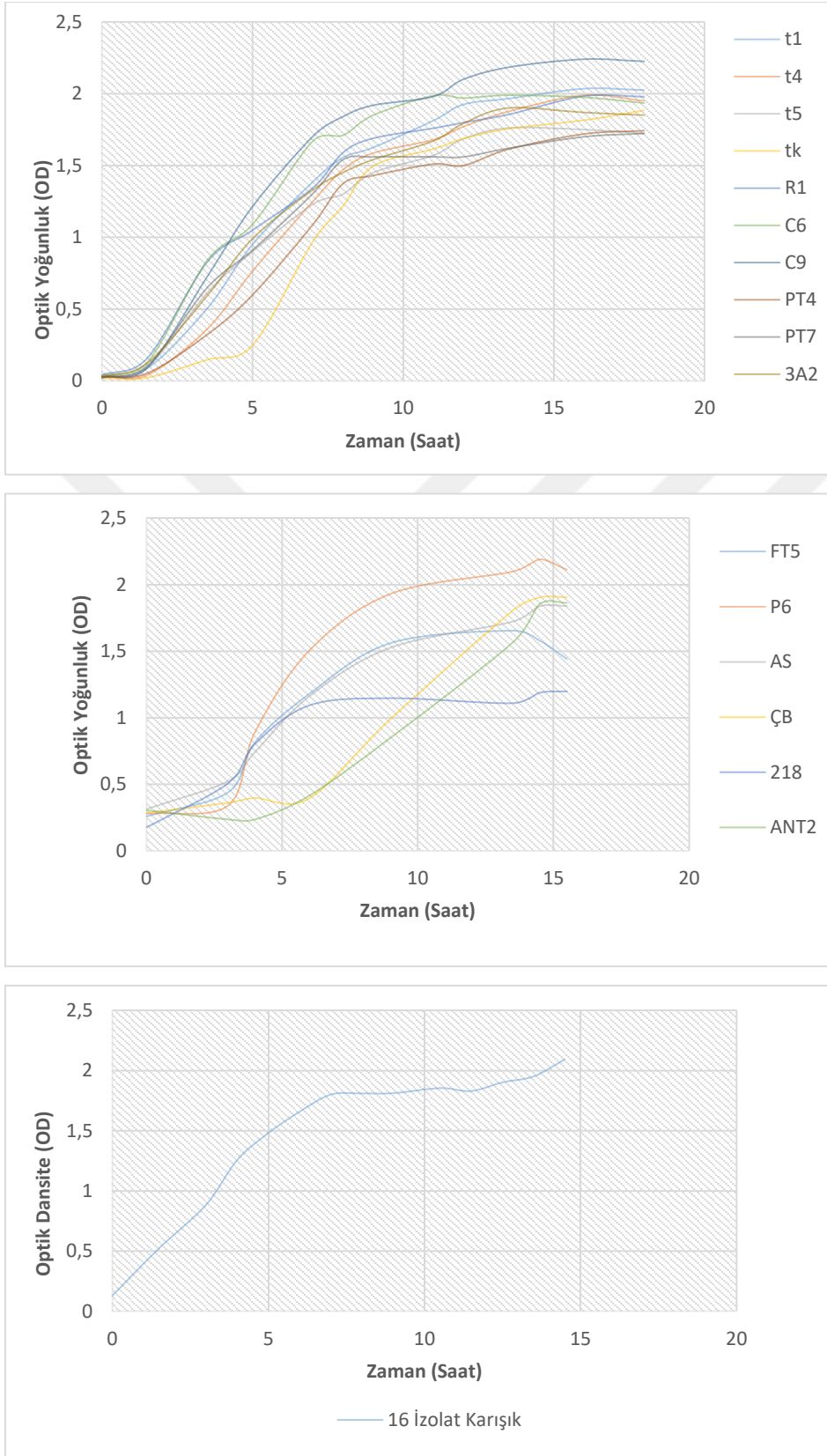
Kuru karışım içeriğinde kullanılmak üzere seçilmiş olan, 16 izolatın genus ve tür düzeyindeki isimleri ayrıca Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Seçilen strainlerin genus ve tür düzeyindeki isimleri

T1	<i>Pseudomonas</i> sp.	3A2	<i>Comamonas testosteroni</i>
T4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	FT5	<i>Raoultella planticola</i>
T5	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	ANT2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
TK	<i>Arthrobacter nicotinae</i>	218	<i>Acinetobacter</i> sp.
C6	<i>Pseudomonas putida</i>	ÇB	<i>Arthrobacter protophormiae</i>
C9	<i>Chryseobacterium indolegenes</i>	AS	<i>Micrococcus luteus</i>
PT4	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	P6	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PT7	<i>Pseudomonas putida</i>	R1	<i>Pseudomonas putida</i>

4.3. Büyüme Eğrisi Sonuçları

Kuru karışım içeriğinde bulunan 16 izolatın büyümede en etkin olduğu logaritmik fazı belirlemek amacıyla yöntemler (Bkz.3.2.6) kısmında belirtildiği şekilde spektrofotometrik ölçüm, eş zamanlı olarak dökme plaka yöntemiyle bulanıklık ve büyümenin sayısal sonuçları belirlenmiştir. Grafikselsel olarak temsil edilen bakteri büyüme eğrileri Şekil 4.4’de gösterilmiştir. 16 izolat karışık olarak oluşturulan büyüme eğrisinde 4.saat, 7.saat ve 10. saat sayım sonuçları sırasıyla, $1,2 \times 10^8$ kob/ml, $3,5 \times 10^8$ kob/ml ve $3,5 \times 10^8$ kob/ml olarak belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda biyoreaktörde yapılacak üretim kültüvasyon süresi 5-6 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Mikroorganizmaların büyüme eğrisi grafikleri.

4.4. Karışım Ürünün Liyofilizasyon Yöntemi ile Kurutulması Öncesi - Sonrası Viallerin Ağırlıkları

Viallerin işlemler öncesi boş ağırlıkları, liyofilizasyon öncesi ve sonrası ağırlıkları Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’de belirtilmiştir. 1 set (örneğin; içerik yonca) içerisinde bulunan 10 aynı içerikli vialin değerleri birbirine çok çok yakındır, ortalamanın görülebilmesi için her setten 2 vial değeri toplamda 40 vial değeri tabloda verilmiştir.

Bu veriler ile liyofilizasyon sonrası elde edilen ürünün kuru ağırlığı hesaplanarak, 1 gramında bulunan mikroorganizma sayısı belirlenmiştir. Ortalama olarak liyofilizasyon işlemi sonrası taşıyıcılı örneklerde %60, taşıyıcı içermeyen mikroorganizma deneme setlerinde %90 ve üzeri ağırlık kaybı olmuştur.

Tablo 4.4 +4°C’de saklanacak boş vial ve liyofilizasyon öncesi - sonrası ölçülen vial ağırlıkları

Vial Numarası	Vial İçeriği	Boş vial Ağırlıkları (g)	Liyofilizasyon Öncesi (g)	Liyofilizasyon Sonrası (g)	Kalan Kuru Madde (g)
1	Yonca	10,6584	12,6551	11,4462	0,7878
2		10,6334	12,6392	11,4290	0,7956
11	Yonca+Silika	10,6388	12,6576	11,5313	0,8925
12		10,5972	12,5761	11,4887	0,8915
21	Yonca+Skim Milk	10,5987	12,6212	11,5765	0,9778
22		10,6133	12,6349	11,5848	0,9715
31	Yonca+PVA	10,7152	12,7257	11,6353	0,9201
32		10,6005	12,6395	11,5314	0,9309
41	Ayçiçeği Küspesi	10,6203	12,5987	11,4153	0,7950
42		10,7437	12,7394	11,5454	0,8017
51	Ayçiçeği Küspesi+Silika	10,6011	12,6141	11,5272	0,9261
52		10,7431	12,8073	11,6894	0,9463
61	Ayçiçeği Küspesi+Skim Milk	10,6882	12,6856	11,6192	0,9310
62		10,6561	12,6603	11,5688	0,9127
71	Ayçiçeği Küspesi+PVA	10,6709	12,7138	11,5894	0,9185
72		10,6829	12,7841	11,6259	0,9430
81	Soya Küspesi	10,8236	12,8625	11,4928	0,6692
82		10,6771	12,6810	11,3212	0,6441
91	Soya Küspesi +Silika	10,6102	12,6513	11,3774	0,7672
92		10,5968	12,6360	11,3530	0,7562
101	Soya Küspesi +Skim Milk	10,7029	12,7277	11,5405	0,8376
102		10,5940	12,6055	11,4256	0,8316
111	Soya Küspesi +PVA	10,7568	12,7885	11,5625	0,8057

112		10,7522	12,8170	11,5662	0,8140
121	Organizma	10,6596	14,7778	10,7699	0,1103
122		10,6594	14,7171	10,7694	0,1100
131	Organizma+Silika	10,6862	14,7456	10,8790	0,1928
132		10,7192	14,7410	10,9117	0,1925
141	Taşıyıcısız	10,6661	14,5855	10,7790	0,1129
142	Vakumsuz+Silikasız	10,6051	14,5744	10,7161	0,1110
151	Taşıyıcısız	10,6478	14,6149	10,7467	0,0989
152	Vakumsuz+Silikalı	10,6532	14,6394	10,7660	0,1128
161	Taşıyıcılı	9,2537	11,2782	10,1342	0,8805
162	Vakumsuz+Silikasız	9,1280	11,1999	10,0420	0,9140
171	Taşıyıcılı	9,2244	11,2594	10,1242	0,8998
172	Vakumsuz+Silikalı	9,1883	11,2366	10,1098	0,9215

Tablo 4.5 +27°C’de saklanacak boş vial ve liyofilizasyon öncesi - sonrası ölçülen vial ağırlıkları

Vial Numarası	Vial İçeriği	Boş vial Ağırlıkları (g)	Liyofilizasyon Öncesi (g)	Liyofilizasyon Sonrası (g)	Kalan Kuru Madde (g)
1	Yonca	9,3120	11,3167	10,0252	0,7132
2		9,3201	11,3465	10,0430	0,7229
11	Yonca+Silika	9,3015	11,3050	10,0117	0,7102
12		9,2525	11,3175	9,9888	0,7363
21	Yonca+Skim Milk	9,3025	11,3568	10,1604	0,8579
22		9,3481	11,3416	10,1600	0,8119
31	Yonca+PVA	9,3057	11,3128	10,0973	0,7916
32		9,2962	11,3385	10,0923	0,7961
41	Ayçiçeği Küspesi	9,4734	11,5042	10,2441	0,7707
42		9,4343	11,4223	10,4532	1,0189
51	Ayçiçeği Küspesi+Silika	9,3948	11,3954	10,0958	0,7010
52		9,3432	11,3393	10,0200	0,6768
61	Ayçiçeği Küspesi+Skim Milk	9,2494	11,2776	10,2021	0,9527
62		9,2696	11,3619	10,1456	0,8760
71	Ayçiçeği Küspesi+PVA	9,2795	11,2775	10,0980	0,8185
72		9,3108	11,3274	10,0921	0,7813
81	Soya Küspesi	9,3329	11,3443	9,9858	0,6529
82		9,3162	11,3508	9,9900	0,6738
91	Soya Küspesi +Silika	9,4194	11,4536	10,0478	0,6284
92		9,3486	11,3574	10,0224	0,6738
101	Soya Küspesi +Skim Milk	9,3401	11,3519	10,1052	0,7651
102		9,3387	11,3486	10,1043	0,7656
111	Soya Küspesi +PVA	9,3946	11,3903	10,0911	0,6965
112		9,2897	11,3773	10,0877	0,7980
121	Organizma	9,2468	13,1405	9,3601	0,1133

122		9,2482	13,1569	9,3604	0,1122
131	Organizma+Silika	9,2564	13,2598	9,2604	0,0040
132		9,2591	13,2327	9,2887	0,0296
141	Taşıyıcısız	9,3713	13,2867	9,4845	0,1132
142	Vakumsuz+Silikasız	9,5350	13,6543	9,6499	0,1149
151	Taşıyıcısız	9,2159	13,6543	9,3249	0,1090
152	Vakumsuz+Silikalı	9,3022	13,2342	9,4209	0,1187
161	Taşıyıcılı	9,2441	11,2676	10,0010	0,7569
162	Vakumsuz+Silikasız	9,3004	11,2603	10,0210	0,7206
171	Taşıyıcılı	9,3061	11,3148	10,0534	0,7473
172	Vakumsuz+Silikalı	9,3515	11,3707	10,0500	0,6985

Liyofilizasyon sonrası farklı içeriklerden bir grup vial görünümü Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı içeriğe sahip bir grup vialin liyofilizasyon sonrası görünümü

4.5 Taşıyıcı-Koruyucu Ön Denemeleri Sonuçları

5,0 x 10⁸ kob/ml başlangıç sayısına sahip mikroorganizma içeren kültür sıvısı ve taşıyıcı karışımlarının freeze-drying canlılık sonuçları karşılaştırılmıştır. Zeolit ön denemeler sonucunda bakteri liyofilizasyonu için uygun bir taşıyıcı olmadığı görülmüştür. Ön denemeler sonucunda raf ömrü çalışmaları için taşıyıcı olarak yonca,

ayçiçeği (düşük proteinli) ve soya seçilmiştir. Tablo 4.6’da yonca, soya, ayçiçeği (düşük ve yüksek proteinli) ve zeolite ait liyofilizasyon sonrası seçilen içerik miktarlarında canlılık sayımları gösterilmiştir. Seçilen taşıyıcıların öğütüldükten sonraki morfolojileri Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

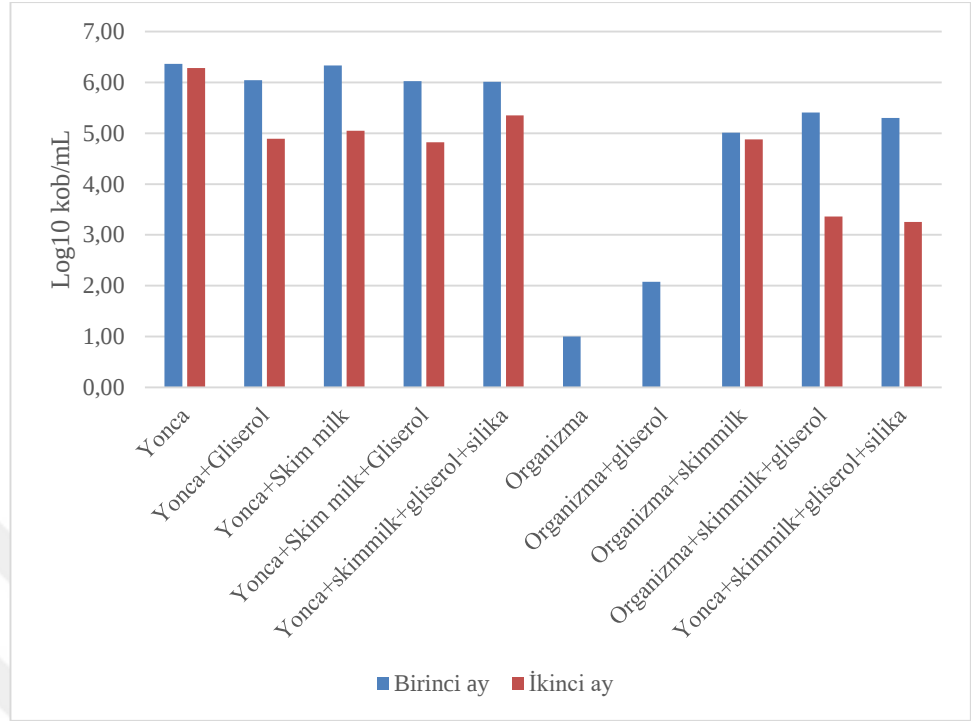
Tablo 4.6 Yonca, soya, ayçiçeği (düşük ve yüksek proteinli) ve zeolite ait ön deneme sonuçları

	Başlangıç (kob/ml)	Liyofilizasyon sonrası (kob/ml)		
Yonca (%40)	5,0 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
Ayçiçeği (Düşük Proteinli) (%50)		3,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷
Ayçiçeği (Yüksek Proteinli) (%50)		4,0 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶
Soya (%60)		2,7 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶
Zeolit (%40)		4,4 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁴



Şekil 4.6 Öğütülmüş soya, ayçiçeği ve yoncanın stereomikroskop görüntüsü a) Soya, b) Ayçiçeği, c) Yonca

Kullanılacak koruyucu içeriğinin ön denemeleri sonrasında, canlılık sayım sonuçlarına göre silika ve skim milk, gliserol ile karşılaştırıldığında daha yüksek koruyuculuğa sahip olmuştur. Yapılan ön deneme sonucunda silika ve skim milk çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Liyofilizasyon sonrası raf ömrü canlılık sonuçları Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



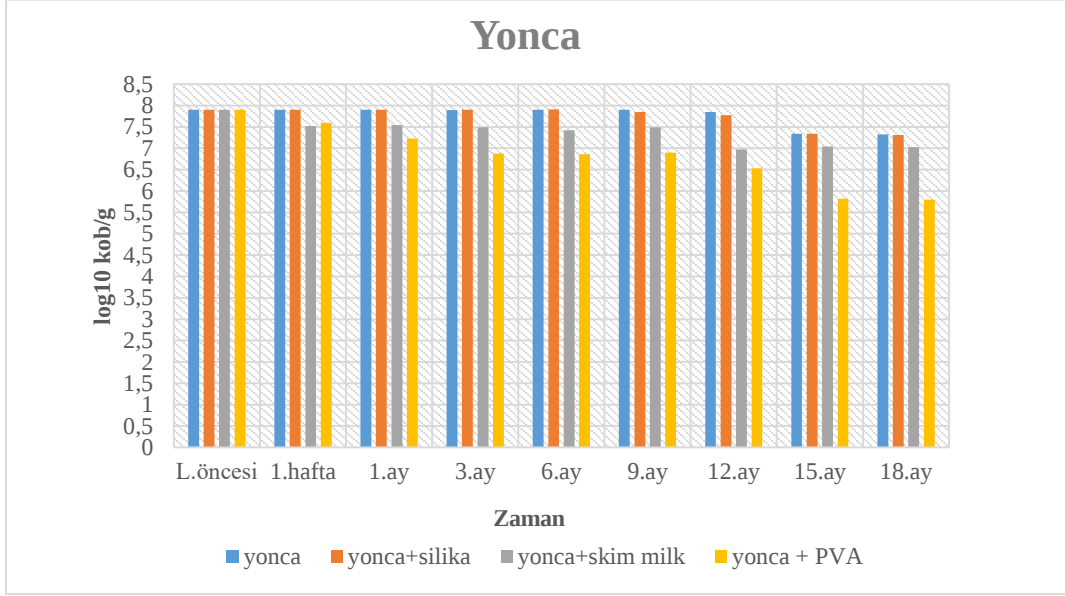
Şekil 4.7 Koruyucu ön deneme 1.ay ve 2.ay canlılık sonuçları

4.6 Raf Ömrü Çalışmaları Sonuçları

4.6.1 Raf Ömrü Çalışmaları Sonrasında Ürünün Canlılık Sayım Sonuçları

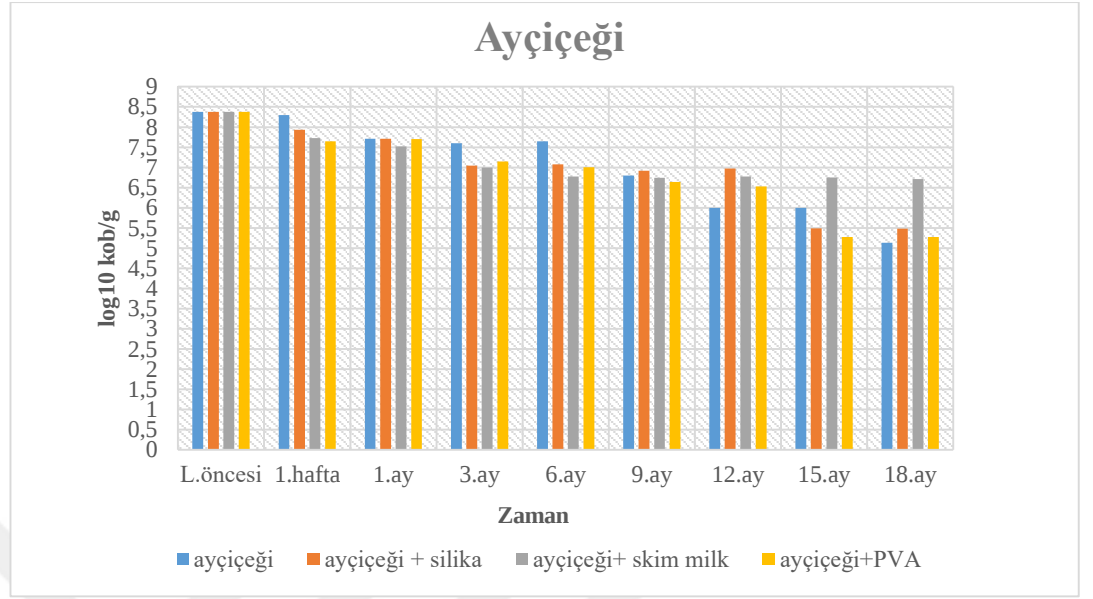
Mikroorganizmaların her bir grup için liyofilizasyon öncesi canlılık sayımı yapılmış ve başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu belirlenmiştir. +4 °C ve +27 °C saklama koşullarına sahip viallerin 18.ay'a kadar canlılık sayım sonuçları belirlenmiştir. +4 °C ve +27 °C 18 ay sonunda canlılık sayımlarına bakıldığında canlılık sayımı en iyi ürünün “yonca” ve “yonca+silika” içeriği olduğu belirlenmiştir. 27°C’de saklanan viallerin canlılık sayımlarında vial içeriklerinden; organizma, organizma+silika’da 1.ay ve sonrasında üreme gerçekleşmemiştir. 27°C’de vakumsuz olarak kurulan ve saklanan viallerden ise taşıyıcısız vakumsuz silikalı, taşıyıcısız vakumsuz silikasız’da 1.hafta ve sonrasında üreme gerçekleşmemiştir. +4 °C ‘de taşıyıcılı vakumsuz grupların sayısının hemen düşmediği gözlemlenmiştir.

Farklı içeriklere ve raf ömrüne sahip ürünlerin +4°C’de ve +27°C’de liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası 1-3-6-9-12-15-18. ay canlılık sonuçları şekil 4.8; 4.9; 4.10; 4.11; 4.12; 4.13; 4.14; 4.15; 4.16; 4.17’de gösterilmiştir. Tüm hesaplamalar seyreltme faktörleri ve kuru ağırlık miktarları göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Elde edilen veriler taşıyıcılı örnekler için 1 g, taşıyıcısız örnekler için ise 1 mL’de ki sonuçlardır.



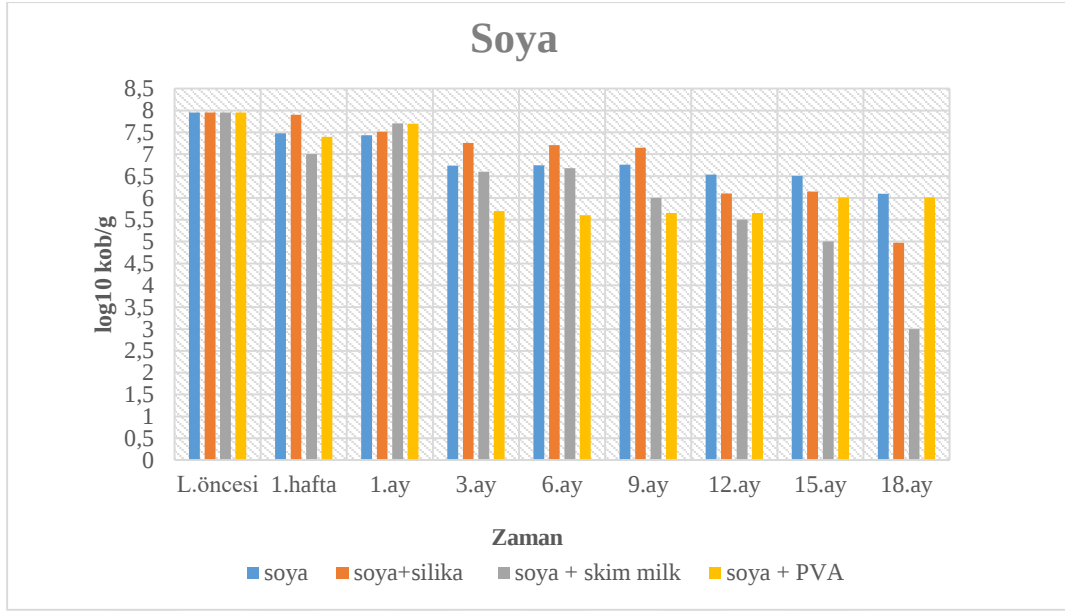
Şekil 4.8 Yonca içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi yonca taşıyıcı olarak silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 2 log) PVA koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Koruyucu içermeyen yonca içeriğinde en az canlılık kaybı (1 log’dan az) olduğu görülmüştür. +4°C yonca içeriği, tez çalışmasında kullanılan içerikler arasında canlılığını en yüksek düzeyde koruyan grubudur.



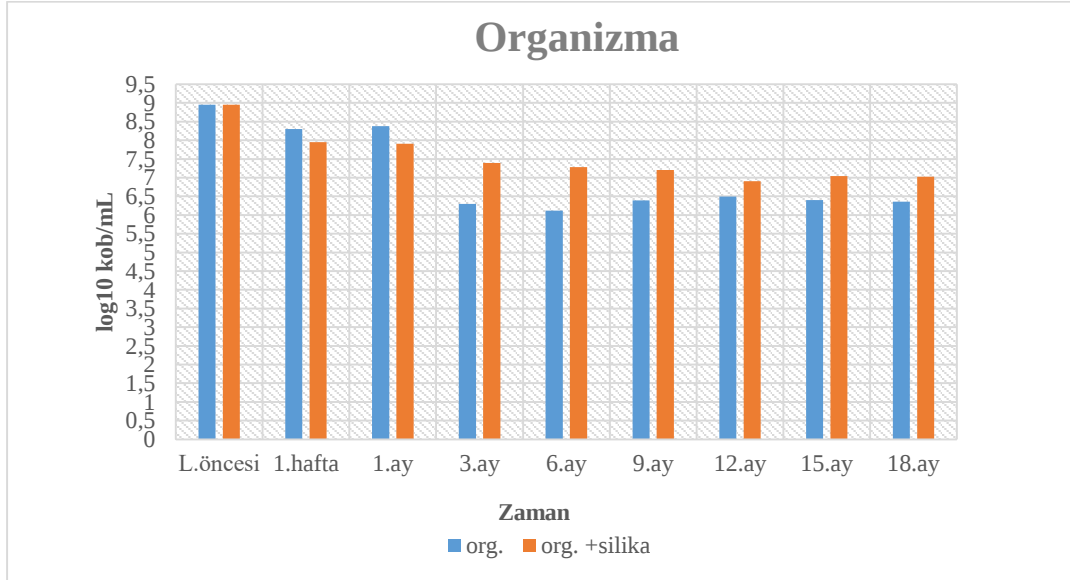
Şekil 4.9 Ayçiçeği içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları

Şekil 4.9’da görüldüğü gibi ayçiçeği taşıyıcı olarak ve silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 3 log) PVA koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Koruyucu içermeyen ayçiçeği içeriğinde benzer canlılık kaybı gözlenmiştir. 18 ay sonunda en az canlılık kaybı (2 log’dan az), ayçiçeği+skim milk içeriğinde olduğu gözlenmiştir.



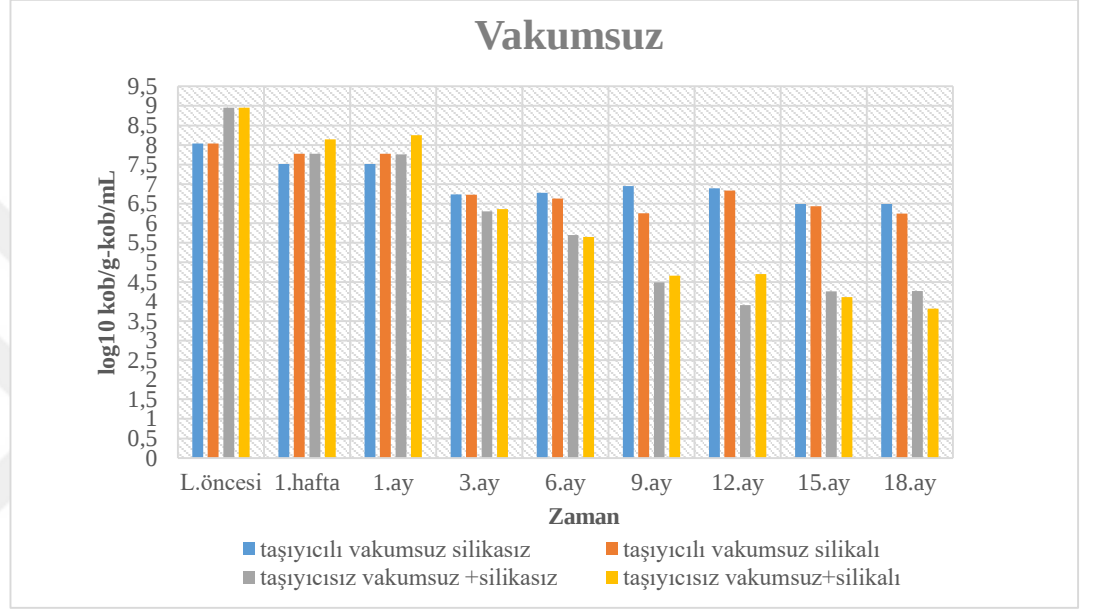
Şekil 4.10 Soya içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi soya taşıyıcı olarak silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) skim milk koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Koruyucu içermeyen soya içeriğinde en az canlılık kaybı (yaklaşık 2 log) olduğu görülmüştür.



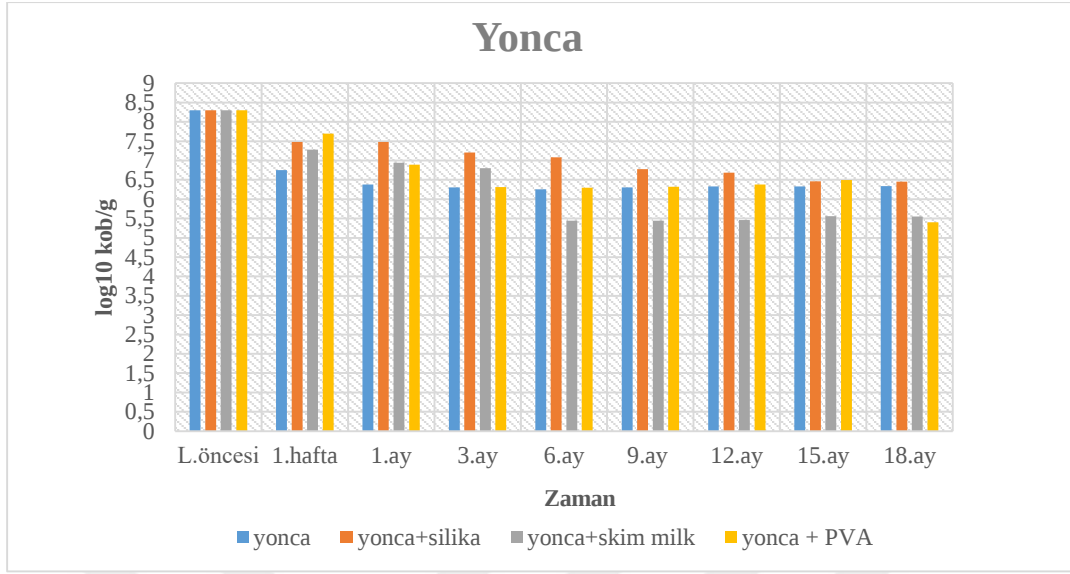
Şekil 4.11 Taşıyıcısız kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi taşıyıcısız olarak oluşturulan kuru karışımda belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 3 log) koruyucu içermeyen sadece organizma grubunda olmuştur. Taşıyıcısız kuru karışım grubuna ait içeriklerden en iyi canlılık sayımı sonucunu organizma+silika (yaklaşık 2 log) vermiştir.



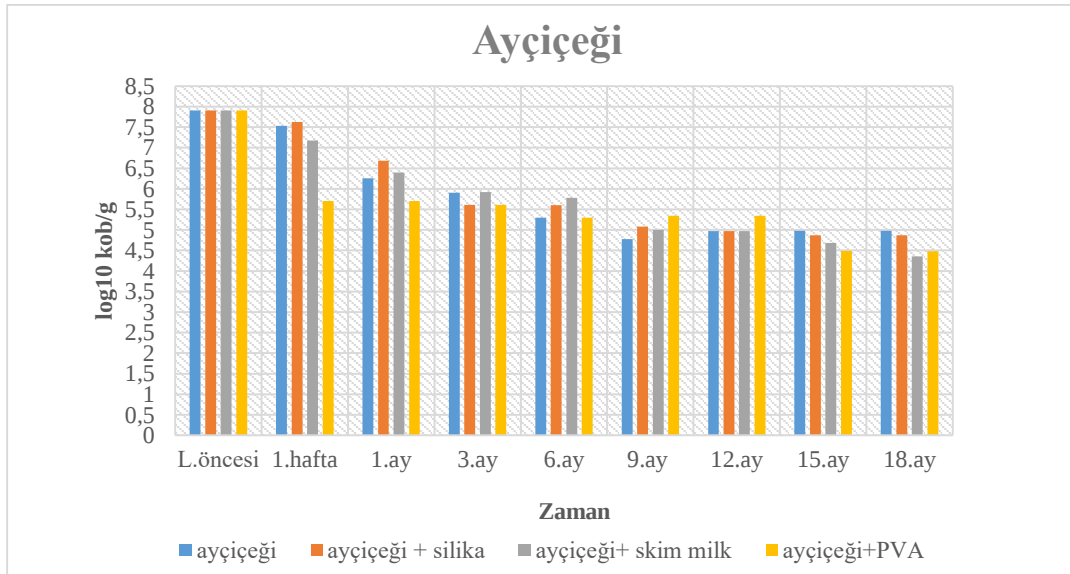
Şekil 4.12 Vakumsuz kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +4°C canlılık sonuçları

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi vakumsuz olarak oluşturulan kuru karışımda taşıyıcı içeren grupların taşıyıcı içermeyen gruplara göre canlılık sayıları yüksektir. 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) taşıyıcısız vakumsuz silikalı ürün grubu olmuştur. Vakumsuz kuru karışım grubuna ait içeriklerden en iyi canlılık sayımı sonucunu taşıyıcılı vakumsuz silikasız (yaklaşık 2 log) vermiştir. Vakumsuz olarak saklanan vial içeriklerinde, silika koruyucu olarak kullanıldığında canlılık sonuçlarında avantaj sağlamadığı görülmüştür.



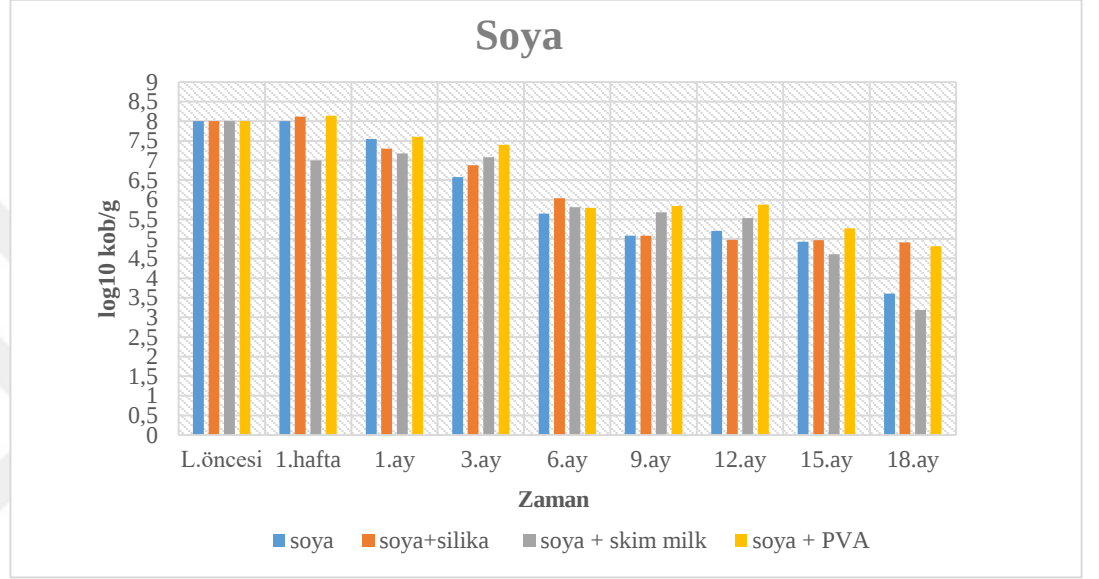
Şekil 4.13 Yonca içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi yonca taşıyıcı olarak silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 3 log) PVA koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Silika koruyucu olarak kullanıldığında ise en az canlılık kaybı (yaklaşık 2 log) olduğu görülmüştür. Koruyucu içermeyen yonca içeriğinde de benzer canlılık kaybı gözlenmiştir.



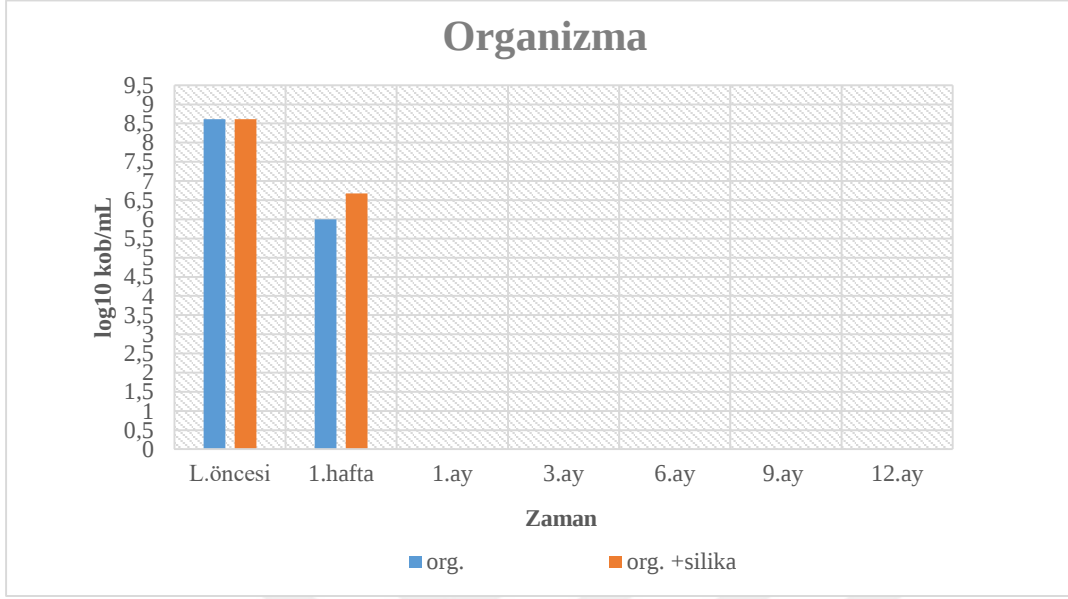
Şekil 4.14 Ayçiçeği içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi ayçiçeği taşıyıcı olarak ve silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 4 log) skim milk koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Koruyucu içermeyen ayçiçeği içeriğinde en az canlılık kaybı (yaklaşık 3 log) olduğu görülmüştür.



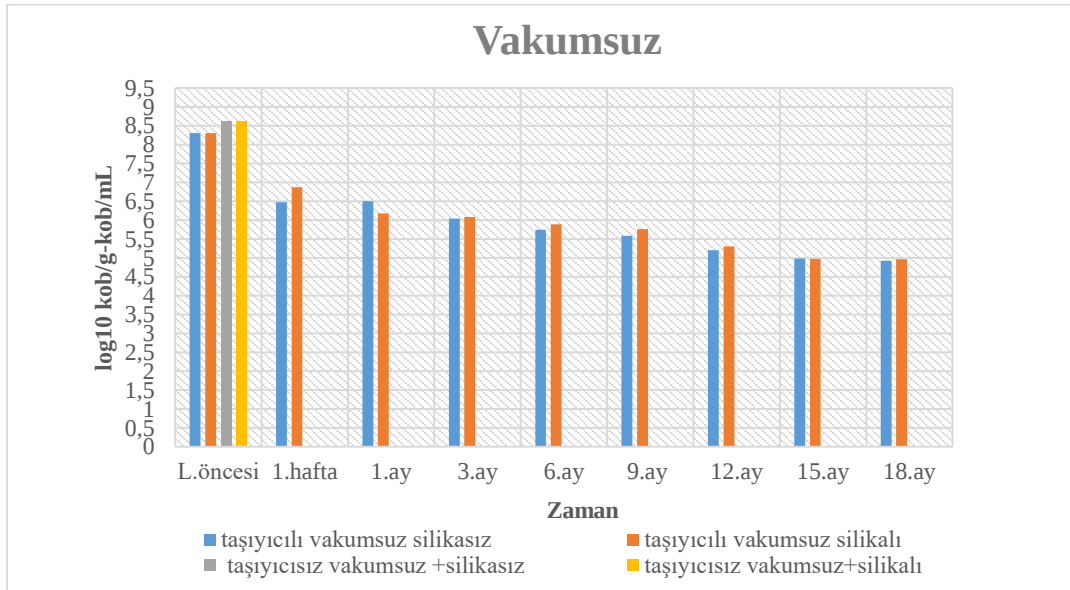
Şekil 4.15 Soya içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları

Şekil 4.15’te görüldüğü gibi soya taşıyıcı olarak silika, skim milk, PVA koruyucu olarak kullanıldığında; belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında, 18 ay sonunda en fazla canlılık kaybı (yaklaşık 5 log) skim milk koruyucu olarak kullanıldığında görülmüştür. Silika koruyucu olarak kullanıldığında ise en az canlılık kaybı (yaklaşık 3 log) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.16 Taşıyıcısız kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi taşıyıcısız olarak oluşturulan kuru karışımında belirli aralıklarla yapılmış olan canlılık sayım sonuçlarında; organizma+silika ve organizma içeriklerinde 1.ay ve sonrasında üreme gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.17 Vakumsuz kuru karışım içeriğine ait ürün gruplarının +27°C canlılık sonuçları

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi vakumsuz olarak oluşturulan kuru karışımında taşıyıcı içeren grupların 18.ay sonuna kadar canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür.

Taşıyıcı içermeyen gruplarda ise 1.hafta ve sonrasında üreme gerçekleşmemiştir. Vakumsuz kuru karışım grubuna ait içeriklerin canlılık sayımı sonucuna bakıldığında silikalı ve silikasız içerikte benzer canlılık kaybı (yaklaşık 4 log) görülmüştür.

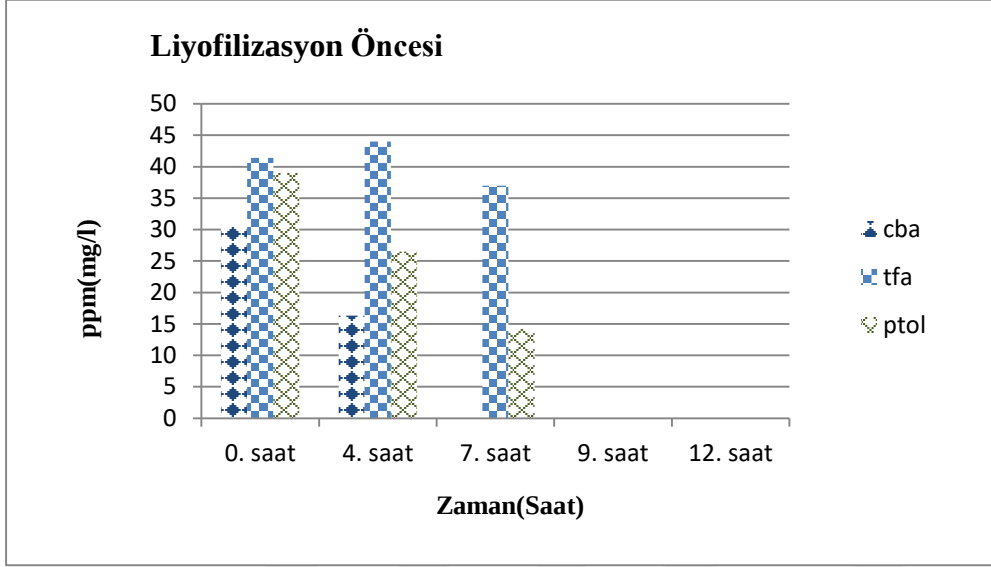
Tez çalışmasında canlılık sonuçlarına baktığımızda taşıyıcı olarak “yonca” diğer taşıyıcılar ayçiçeği ve soyaya göre canlılık oranlarına bakıldığında en iyi sonucu vermiştir. Taşıyıcı+organizma içeren koruyucu içermeyen gruplardan ayçiçeği en fazla canlılık kaybına sahip grup olmuştur. Tüm gruplar geneline bakıldığında etkinliği en iyi olan koruyucu olarak silika, en az olan koruyucu olarak PVA gözlemlenmiştir. +4°C ve +27°C saklama koşullarında 18 ay sonunda, +4°C saklanan viallerde bulunan ürün grupları canlılık sayısı bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Taşıyıcı “yonca” grubunda en iyi sonuç veren gruplar yonca ve yonca+silika olmuştur. Taşıyıcı “ayçiçeği” grubunda en iyi sonuç veren gruplar ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+silika olmuştur. Taşıyıcı “soya” grubunda en iyi sonuç veren gruplar soya ve soya+PVA olmuştur. Canlılık sayım sonuçlarında her koruyucunun farklı taşıyıcılar ile birlikteyken daha iyi iş görebildiği gözlemlenmiştir. Taşıyıcı içermeyen sadece organizma ve koruyucu içeren vial gruplarında, silika avantaj sağlamıştır. Vakumsuz gruplarda taşıyıcı olarak kullanılan yoncanın canlılık üzerine olan etkisine bakıldığında, ürünü çok iyi koruduğu gözlemlenmiştir.

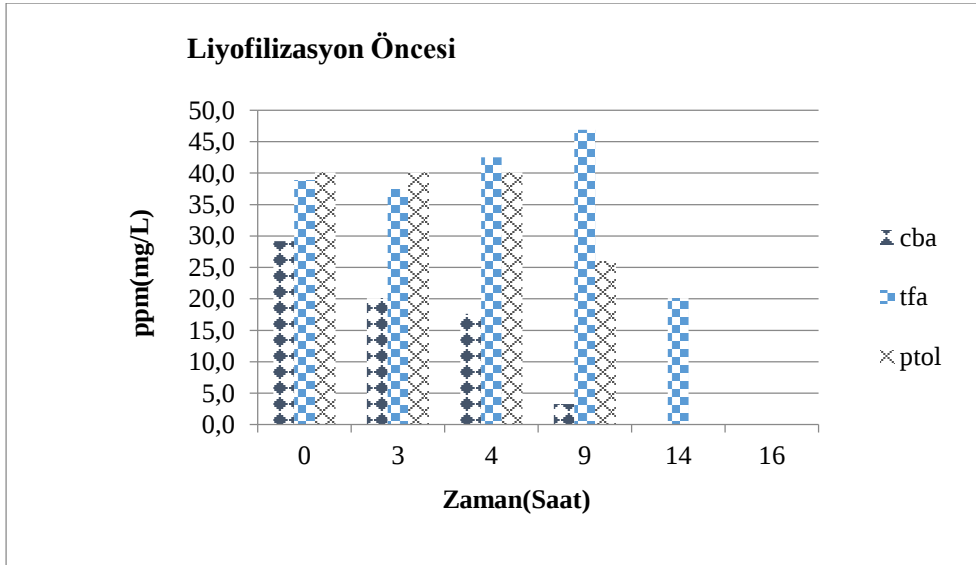
4.6.2 Raf Ömrü Çalışmaları Sonrasında Ürünün Biyoparçalama Aktivite Sonuçları

Liyofilizasyon işlemi öncesi mikroorganizma karışımının biyoparçalama etkinliği belirlenmiştir. Fermentörde üretilen taze kültür karışımı ile yapılan, 40 mg/L TA, 40 mg/L p-TOL, 30 mg/L 4-CBA hidrokarbonlarının parçalanma durumlarının +4°C ve +27°C saklama koşulları üretimleri için HPLC analizleri sonucunda elde edilen verileri Şekil 4.18 ve 4.19’da yer almaktadır. Sırasıyla 7-9 saat 14-16 saat içerisinde kimyasalların her biri tükenmiştir. Tüm biyoparçalama çalışmalarında; tüm viallerle eş zamanlı örnek alınarak takibi yapılan kontrol (kör) erlenleri denemesi

yapılmıştır. Kontaminasyon olup olmadığını, kimyasalların mikroorganizmalara bağlı olmayan değişimlerini belirlemek amacıyla kontrol erleni kullanılmıştır. Kontrol erlenlerinde tüm çalışma setlerinde kimyasal değişim 24 saat süresince olmamıştır.



Şekil 4.18 Adapte aşı kültürünün +4°C liyofilizasyon işlemi öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu



Şekil 4.19 Adapte aşı kültürünün +27°C liyofilizasyon işlemi öncesi biyoparçalama etkinliği sonucu

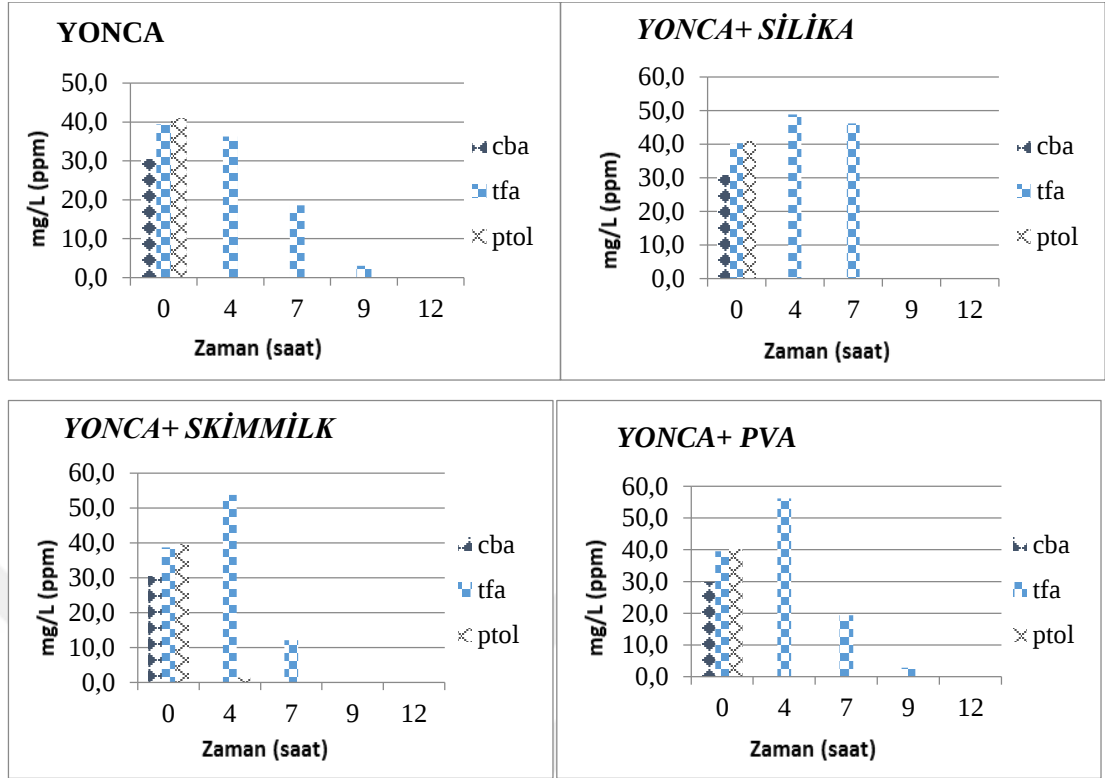
HPLC etkinliği sonuçlarına göre TFA ve p-TOL kimyasallarının yaklaşık 7-8 saat içerisinde tükendiği gözlemlenmiştir. 4-CBA kimyasalı ise 4-5 saat içerisinde tükenmiştir. 4-CBA kimyasalı parçalanınca TFA'ya dönüşmektedir. (Bkz. 2.1.1) Bu nedenle 4-CBA kimyasalı tükendikçe, TFA kimyasal konsantrasyonunda artış gözlemlenmektedir.

Raf ömrü çalışmaları bitmiş ürünlerin tereftalik asit ve diğer hidrokarbonları parçalama etkinliği gözlemlenerek, aktivite değişimi gözlemlenmiştir. Biyoparçalanma etkinliğinin kontrolü için liyofilizasyondan 1 hafta sonra liyofilize ürün gruplarının her birinin aktivitesine bakılmıştır. 1.hafta ile 1. ay ve 12.,15.ay ile 18.ay viallerindeki etkinliklerde önemli bir farklılık gözlenmediği için sonuçlar 1.,3.,6.,9.,18.ay olmak üzere tüm içerikler için paylaşılmıştır. Parçalama etkinliği sonuçları Şekil 4.20'den 4.62'ye kadar gösterilmiştir.

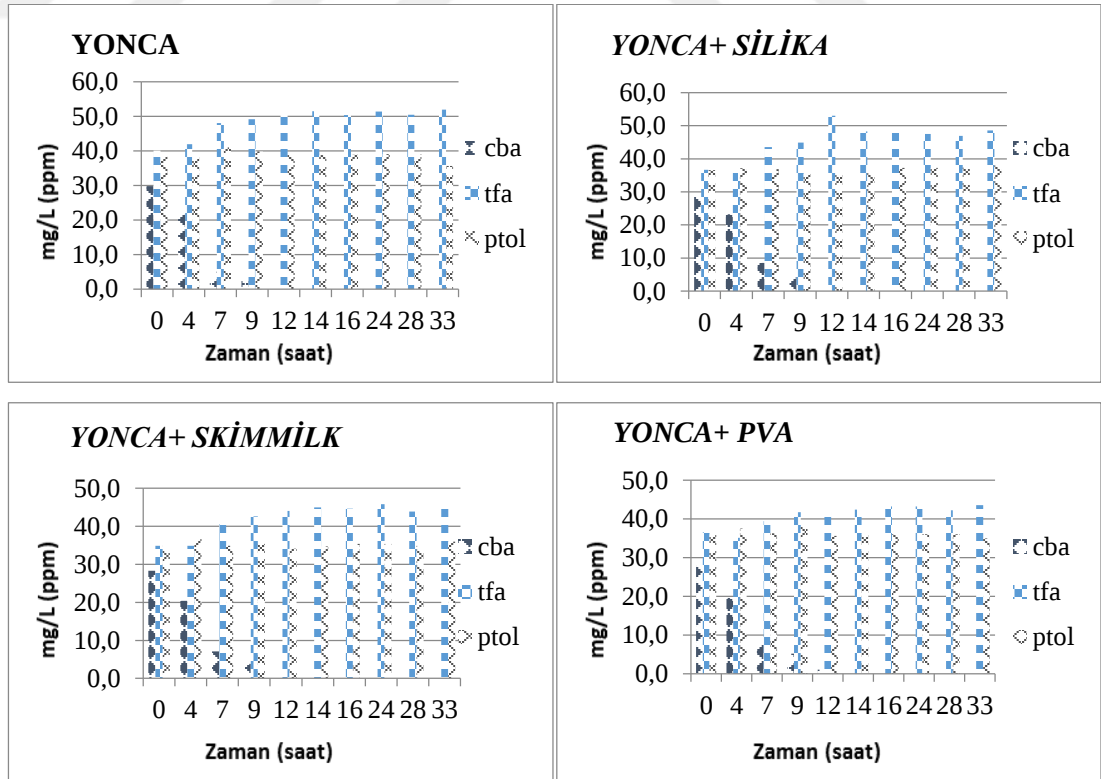
Raf ömrü süresi dolan vialler için 1. ve 3.ay çalışmalarına başlandığında, farklı bir rehidrasyon yöntemi seçilmiştir. Şöyle ki, viallerin içerisine rehidrasyon aşamasında, taşıyıcı gruplar için 4 mL, taşıyıcı içermeyen gruplar 2 mL olmak üzere PBS eklenip içerisinden 1 mL alınıp dökme plaka ile canlı sayımı yapılmıştır. Her bir ürünün -1'lik seyreltme petrisinden alınan mikroorganizmaların 540 nm'de 0,3-0,5 olacak şekilde OD'si ayarlanıp biyoparçalama analizlerine geçilmiştir. Sonuçlara bakıldığında tüm vial içeriğine ulaşamadığı düşünölmüştür, emin olmak için farklı bir yöntem üzerine ön denemeler yapılıp geliştirilmiştir. Değiştirilen rehidrasyon yöntemi (Bkz.3.2.8.3) ile yapılan canlandırma yönteminin etkisi, canlı sayımlarında ve özellikle 6.ay ve sonrasında biyoparçalama sonuçlarına yansımış, anlamlı veriler elde edilmiştir. Yöntem değiştirildikten sonra biyoparçalamanın daha kısa sürede gerçekleşmesi, tüm vial içeriğinin temsil edildiğinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

PTA grubu (TFA, p-TOL ve 4-CBA) haricinde ilave olarak PTA+PAH ve PAH parçalanma çalışmaları tez içerisinde sürdürölmüştür. PAH'ların yüksek hidrofobik karakterde olmasından dolayı su fazında homojen şekilde dağılım göstermediği, ayrıca molekül yapılarının PTA grubuna göre daha kararlı olmasından dolayı mikroorganizmalar tarafından parçalanma işlemi uzun sürmektedir. Anlamlı sonuç

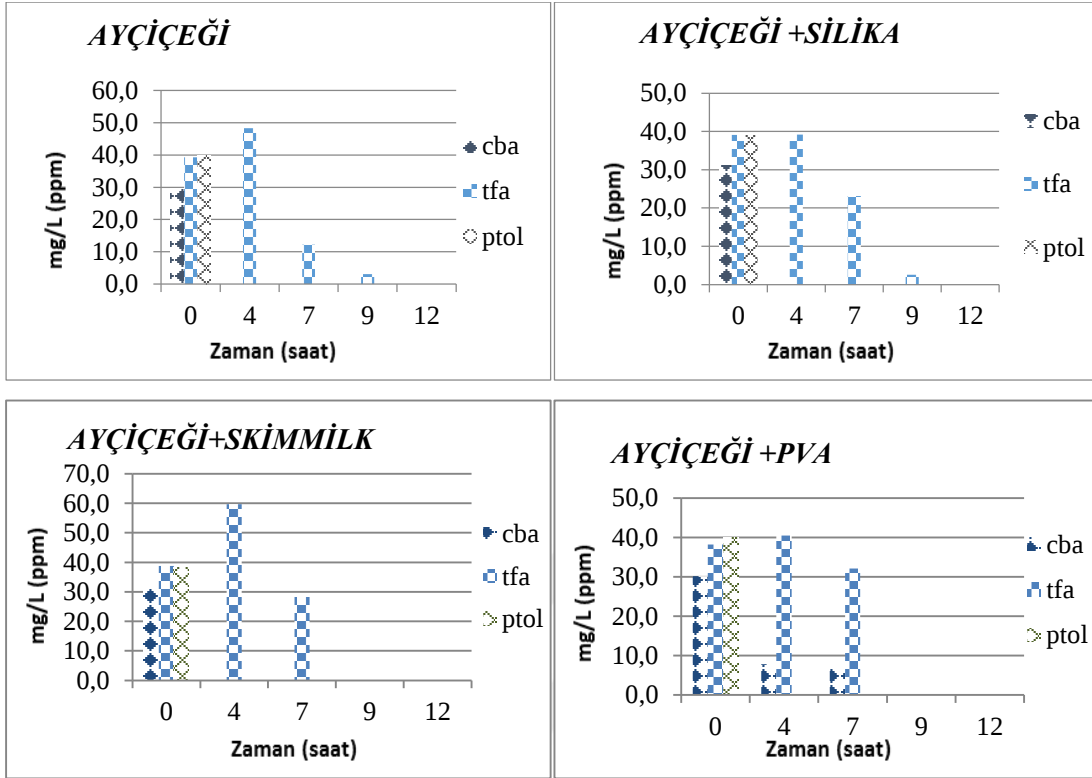
elde edebilmek için, örnekler 0.gün 7.gün ve 14.gün olarak analiz edilmiştir. HPLC analizlerinden, GC cihazı ile PAH analizlerine geçilmiştir. Metod oluşturulmuş olup, farklı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Deneme aşamasında sıkıntısız olan yöntem, asıl çalışmada sıkıntı yaratmıştır. Şöyle ki, poliaromatik hidrokarbonların, metotta kullanılan farklı ekstraksiyon aşamalarında düşük (20 mg/L) konsantrasyonlarda çalışıldığı için, dengeli bir şekilde geri kazanım sağlanamamıştır. Dolayısıyla tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Ve ayrıca Petkim Petrokimya Holding A.Ş.'nin atık su içeriğinde şirket tarafından yapılan analizler sonucunda PAH'lar bulunmadığı için bu grup çalışmalarına devam edilmemiş olup, özellikle asıl kirletici olan sıkıntı yaratan PTA grubu olduğundan, bundan sonraki çalışmalar bu grup hidrokarbonlar ile devam ettirilmiştir.



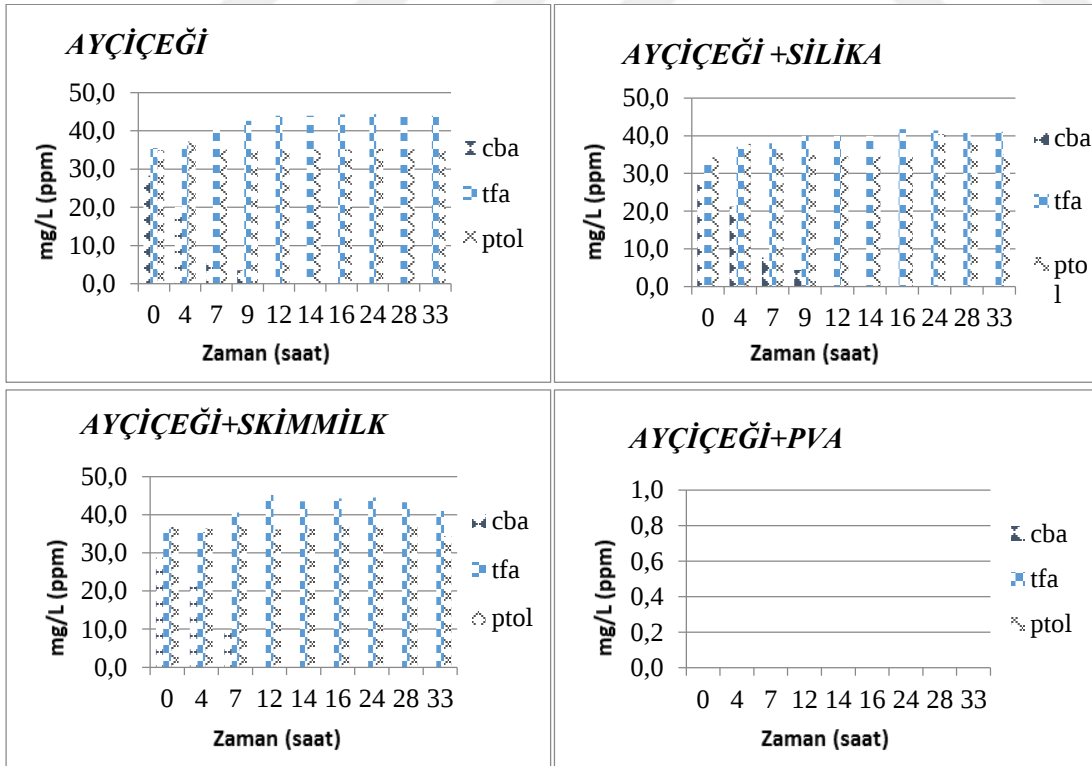
Şekil 4.20 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



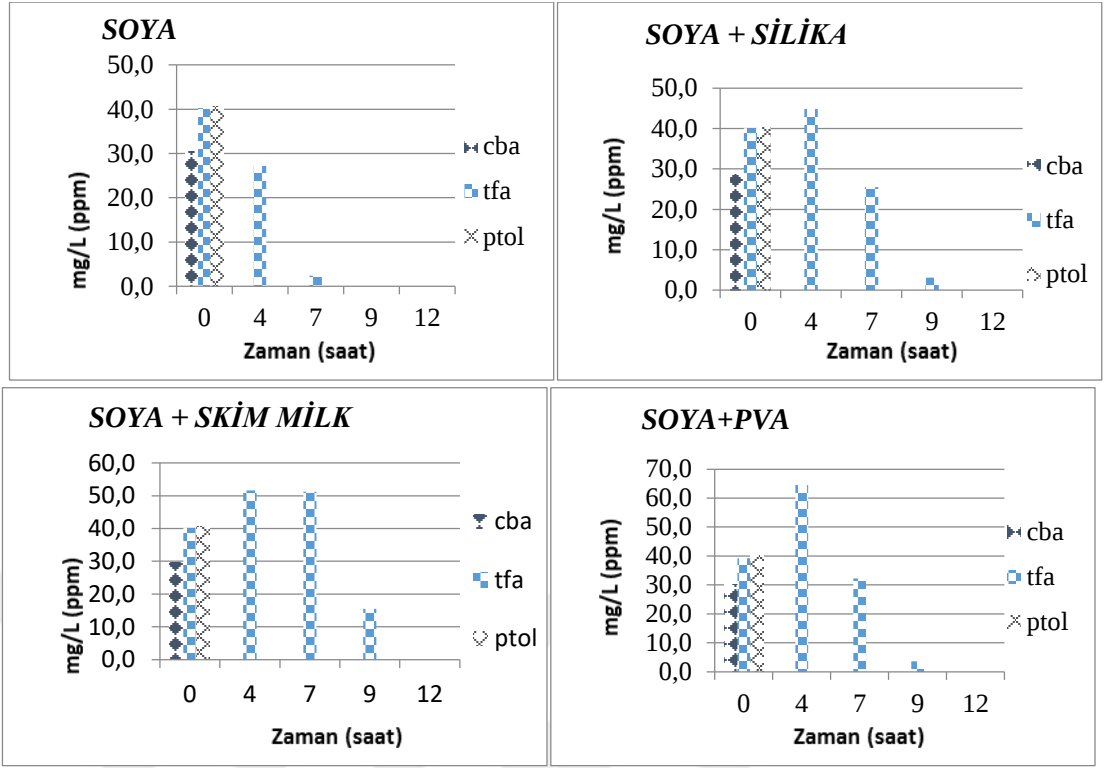
Şekil 4.21 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



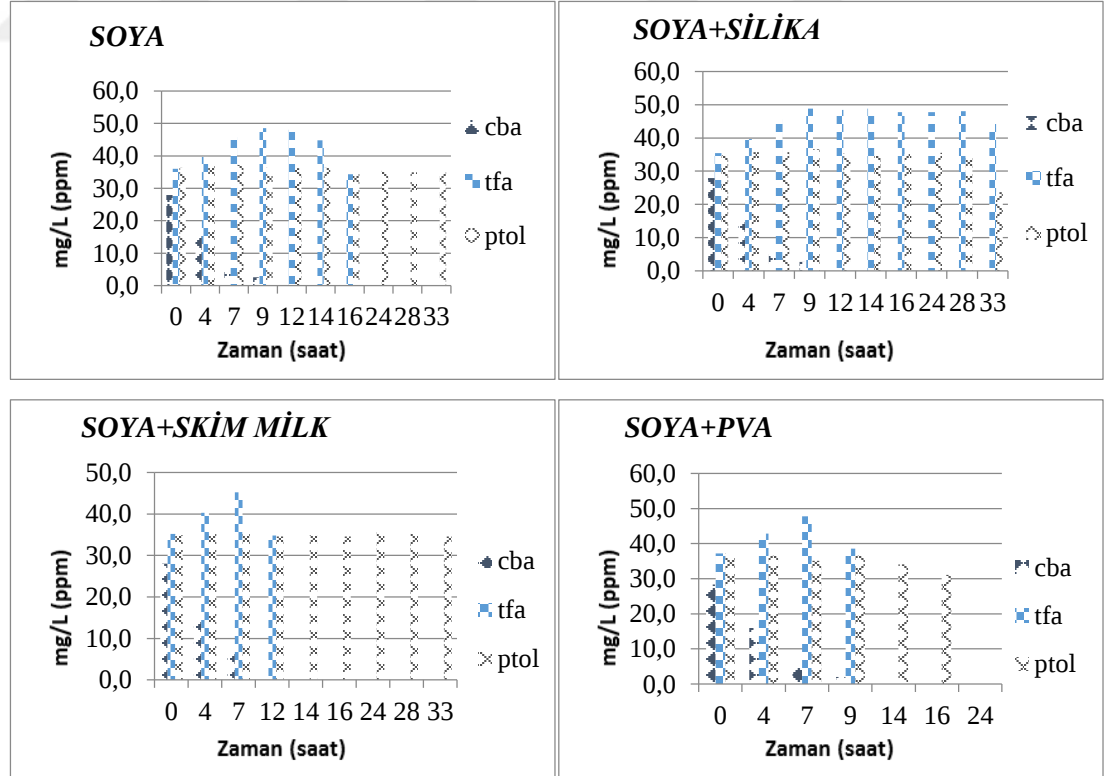
Şekil 4.22 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



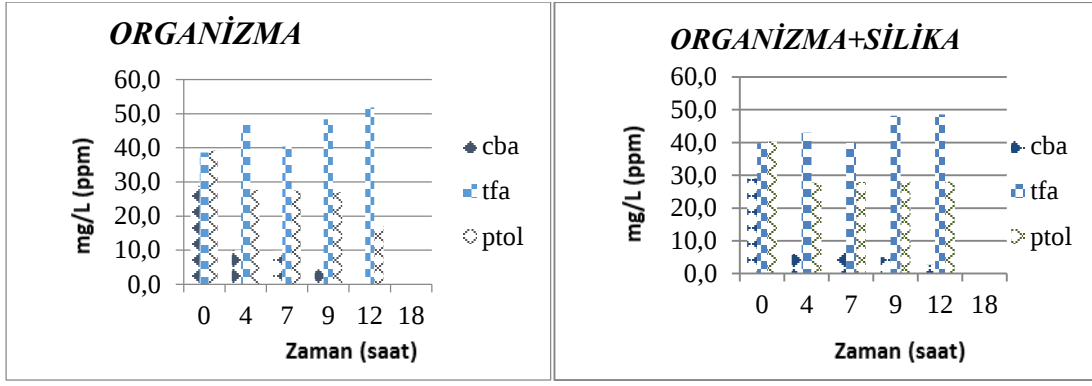
Şekil 4.23 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



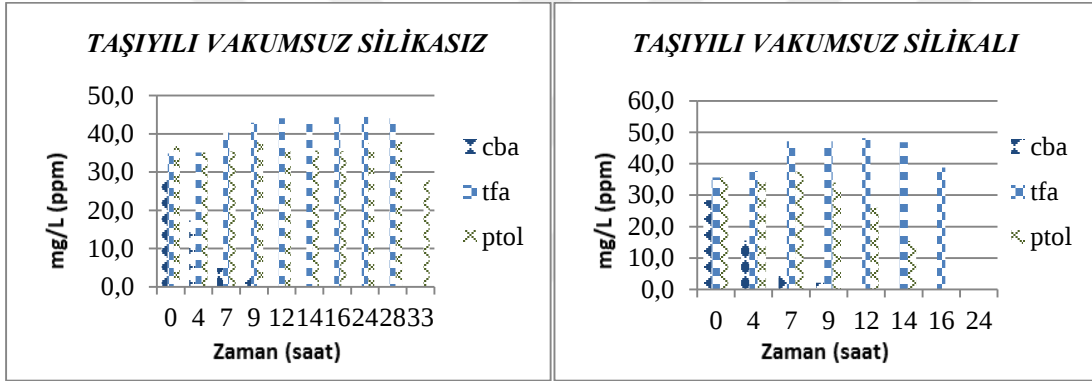
Şekil 4.24 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



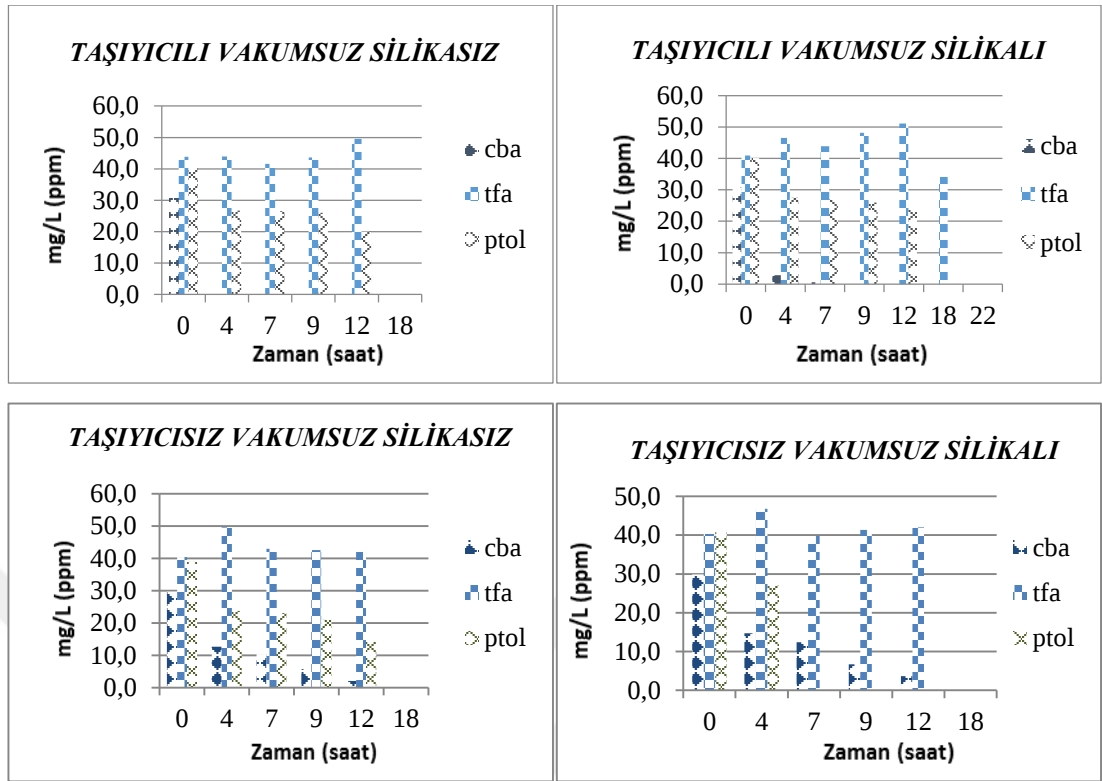
Şekil 4.25 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.26 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği

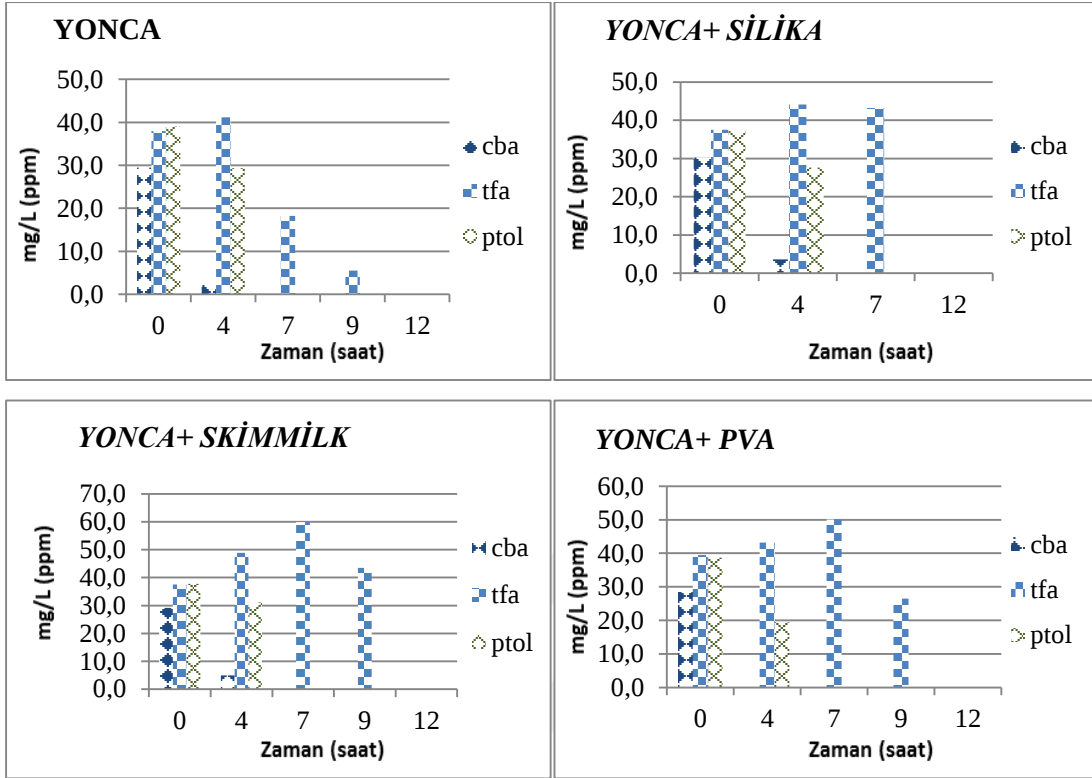


Şekil 4.27 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 1.ay biyoparçalama etkinliği

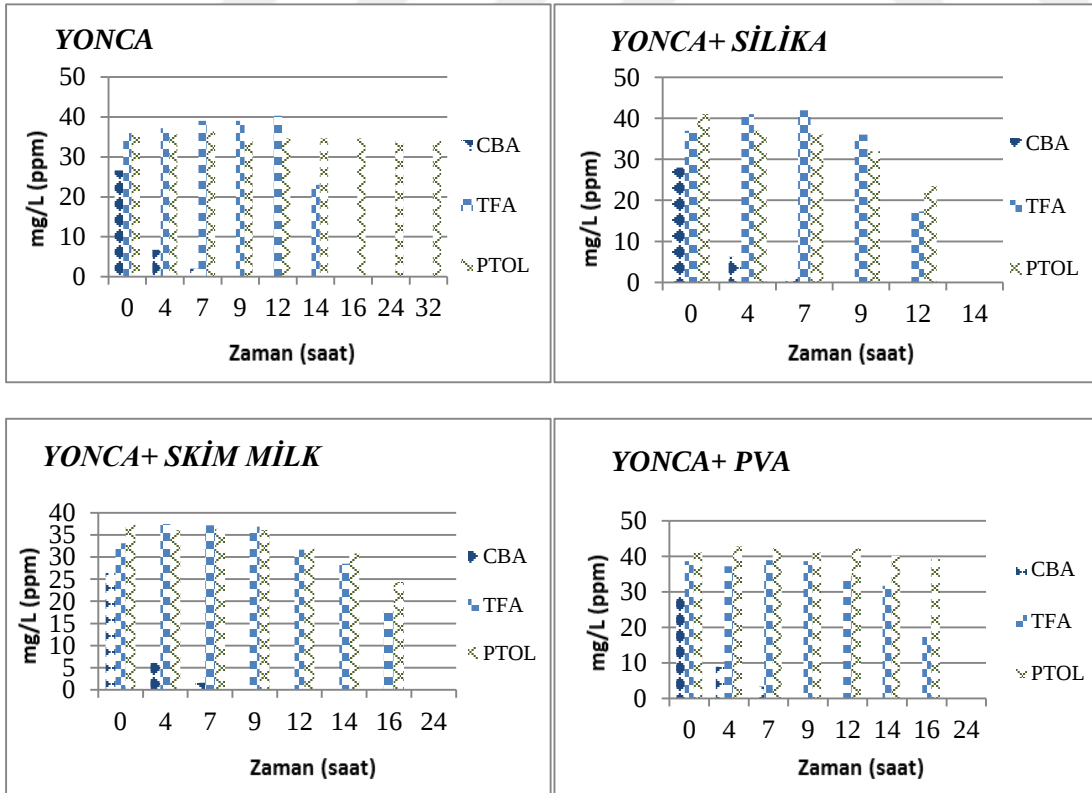


Şekil 4.28 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ya ait +4°C 1.ay biyoparçalama etkinliği

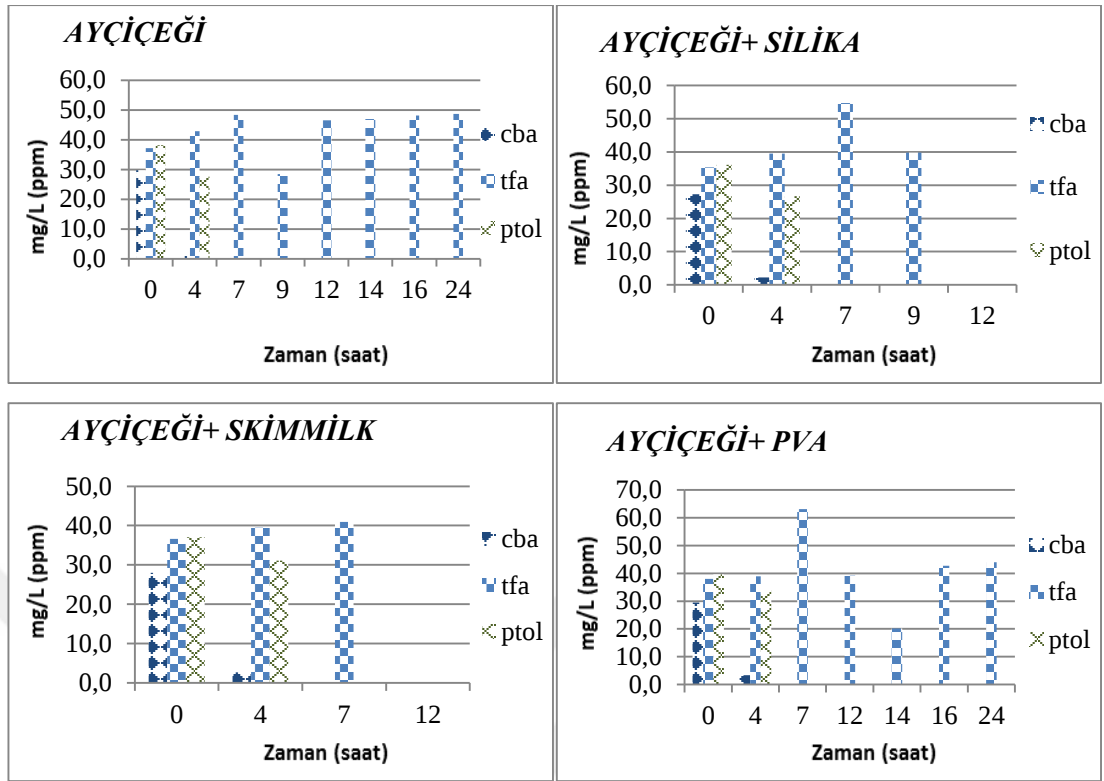
Şekil 4.20'den Şekil 4.28'e kadar görüldüğü gibi 1.ay +4°C'de saklanan viallerden taşıyıcı yonca (Şekil 4.20), diğer taşıyıcı ayçiçeği ve soya içeren örnekler göre daha yüksek biyoparçalama etkinliğine sahiptir. Vakumsuz saklanan örneklerde biyoparçalama aktivitesinde ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir. Biyoparçalama aktivitesinin +27°C'de azaldığı, hatta kaybedildiğini söyleyebiliriz. Vakumsuz saklanan örneklerde biyoparçalama aktivitesinde ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir.



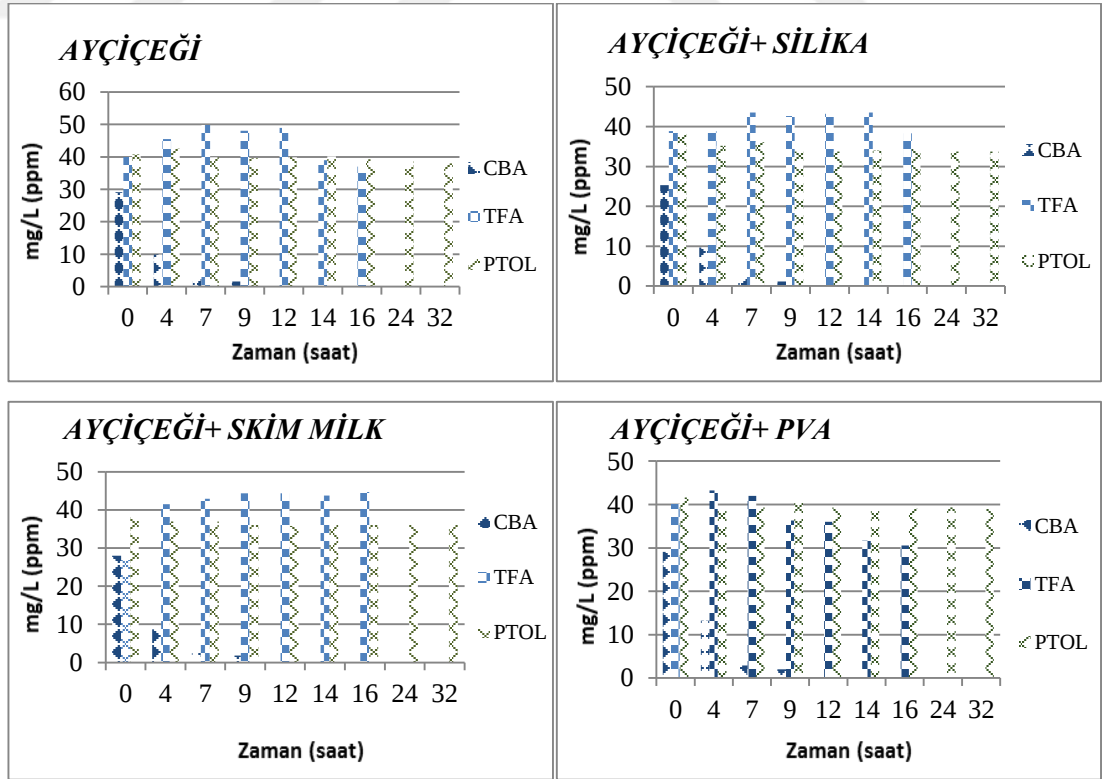
Şekil 4.29 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



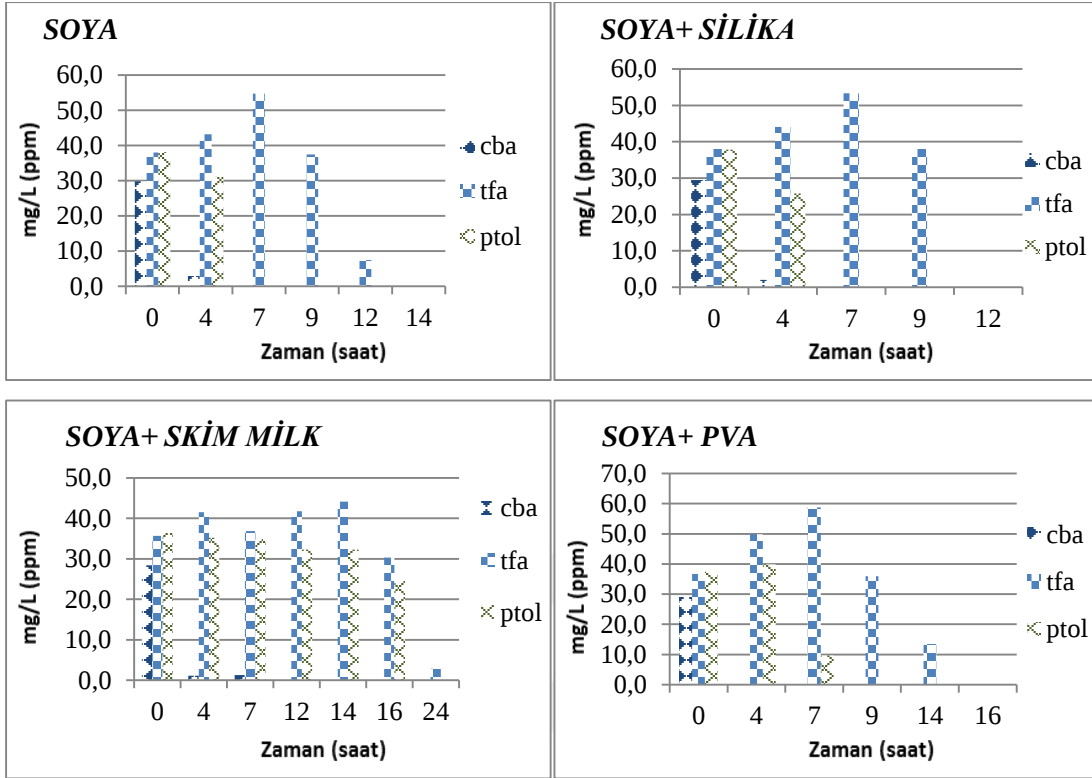
Şekil 4.30 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



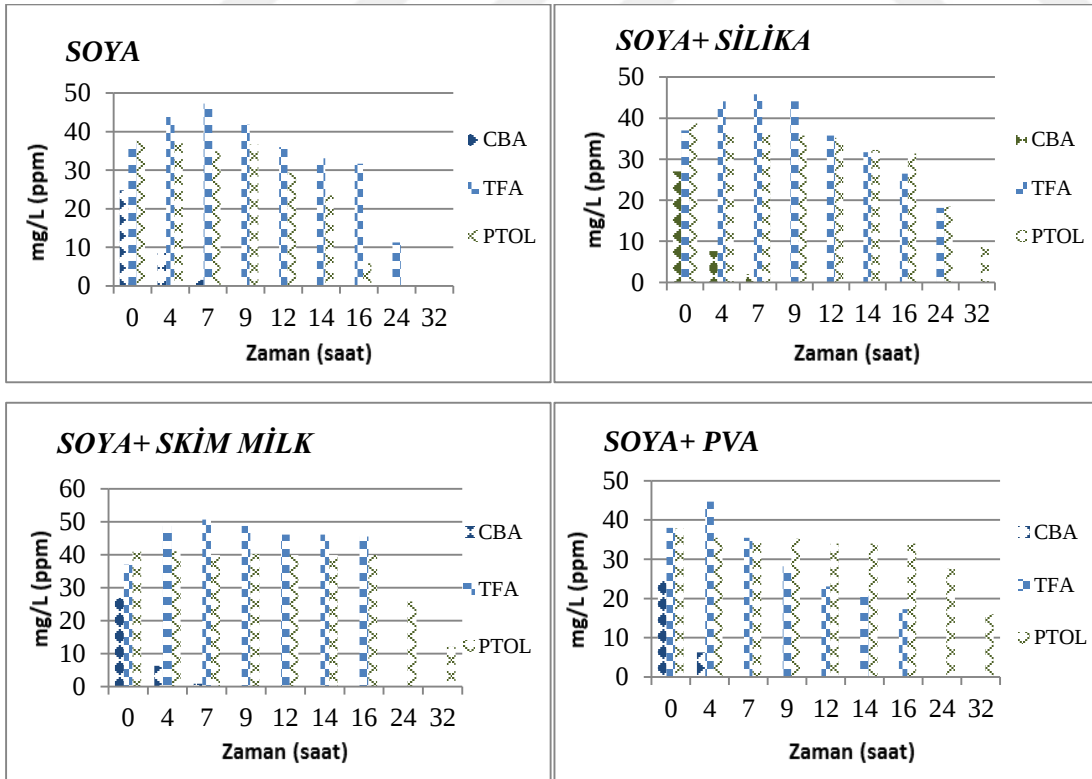
Şekil 4.31 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



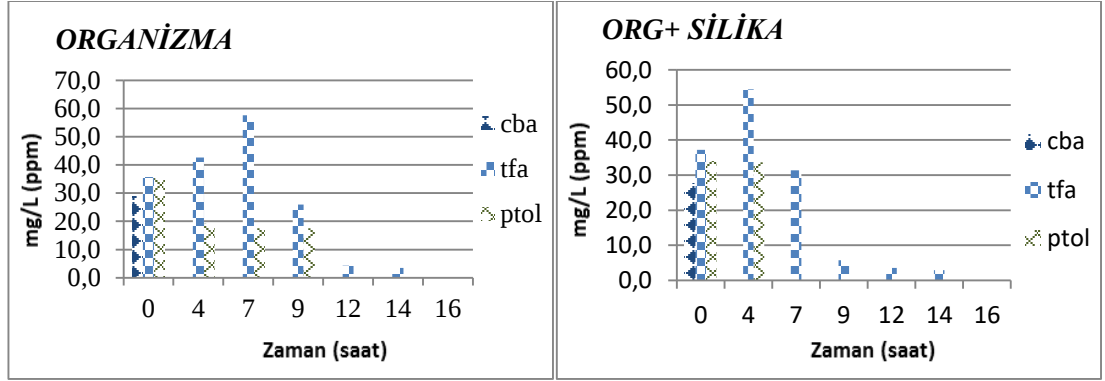
Şekil 4.32 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



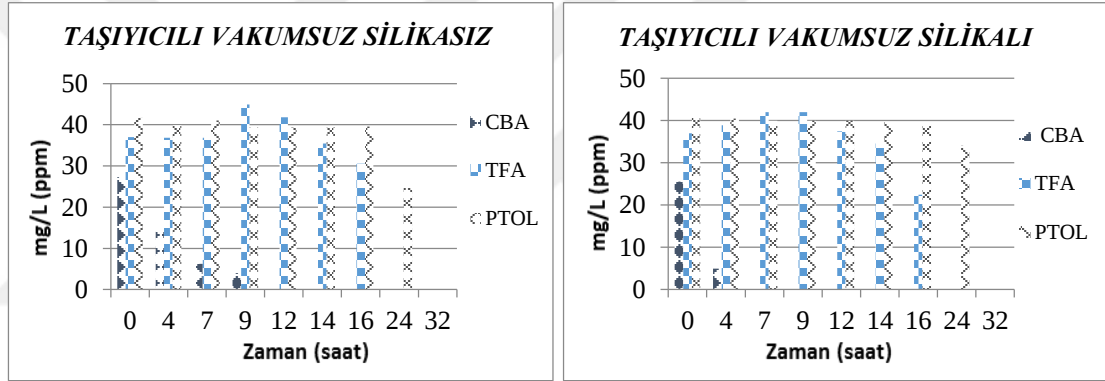
Şekil 4.33 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



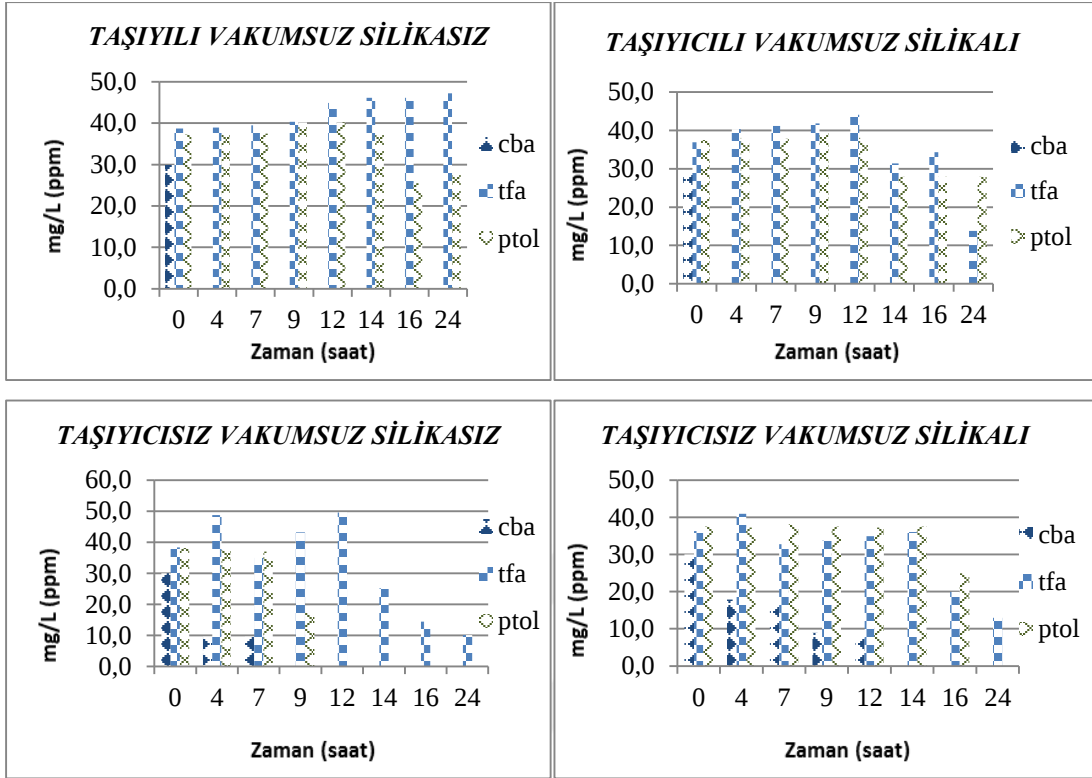
Şekil 4.34 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.35 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği

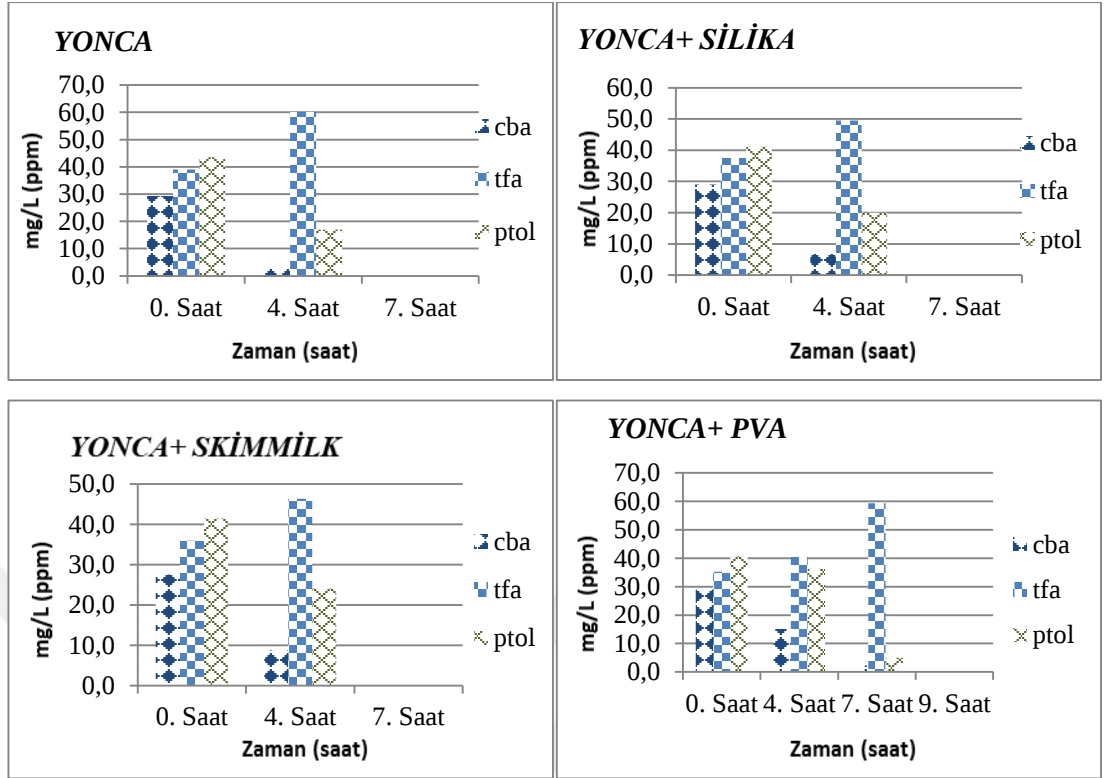


Şekil 4.36 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 3.ay biyoparçalama etkinliği

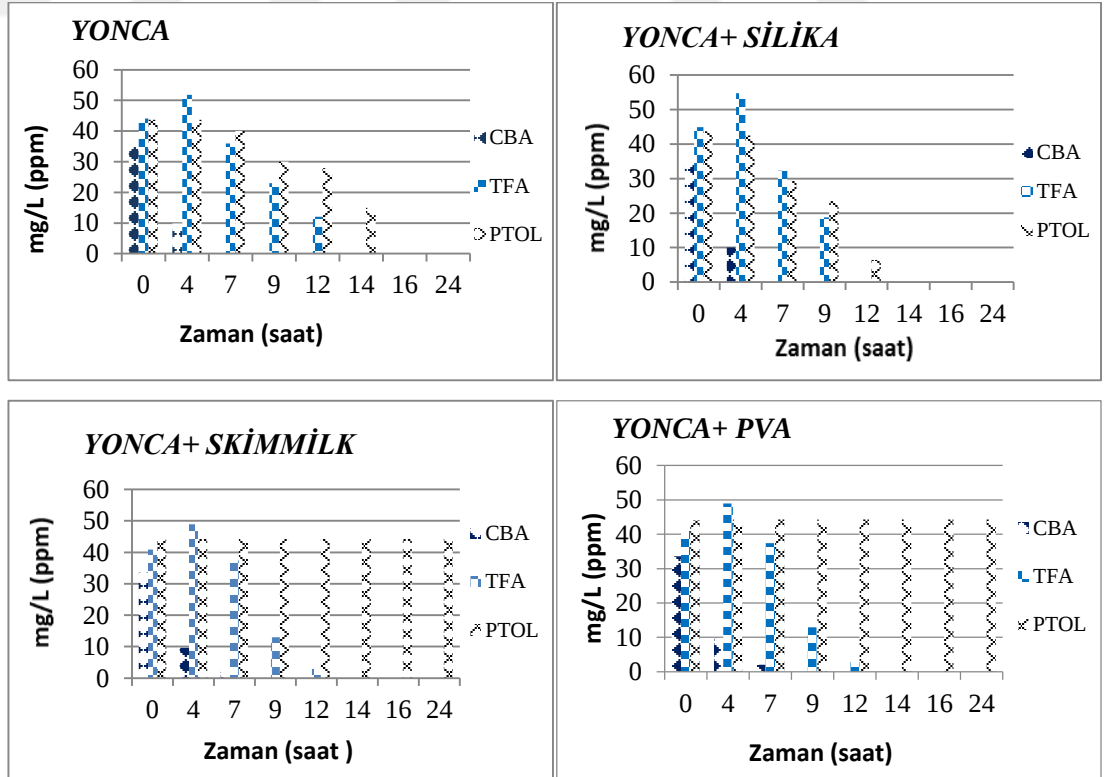


Şekil 4.37 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ya ait +4°C 3.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.29'dan şekil 4.37'ye kadar görüldüğü gibi 3. ay +4°C'de saklanan viallerden taşıyıcı yonca (Şekil 4.29), diğer taşıyıcı ayçiçeği ve soya içeren örneklerle göre daha yüksek biyoparçalama etkinliğine sahiptir. Vakumsuz saklanan örneklerde biyoparçalama aktivitesinde ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir. Biyoparçalama aktivitesinin +27°C'de azaldığı, hatta kaybedildiğini söyleyebiliriz. Vakumsuz saklanan örneklerde biyoparçalama aktivitesinde ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir. 1. ay sonuçlarıyla benzer sonuçlar elde edilmiştir.



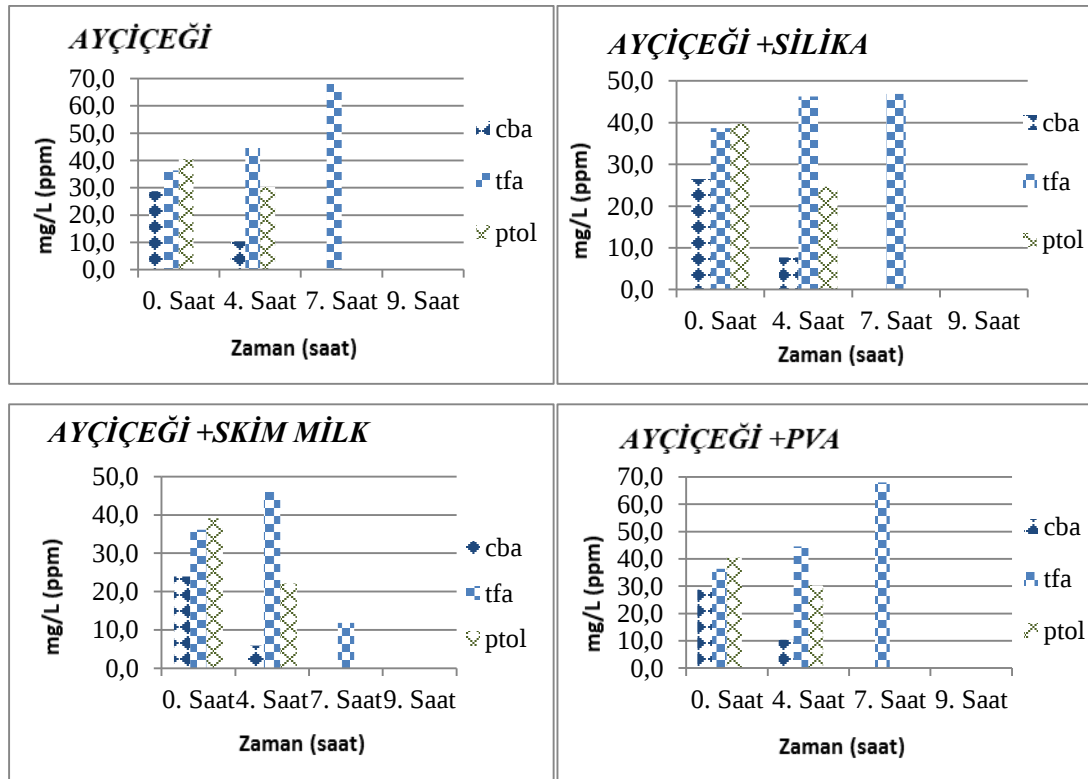
Şekil 4.38 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği



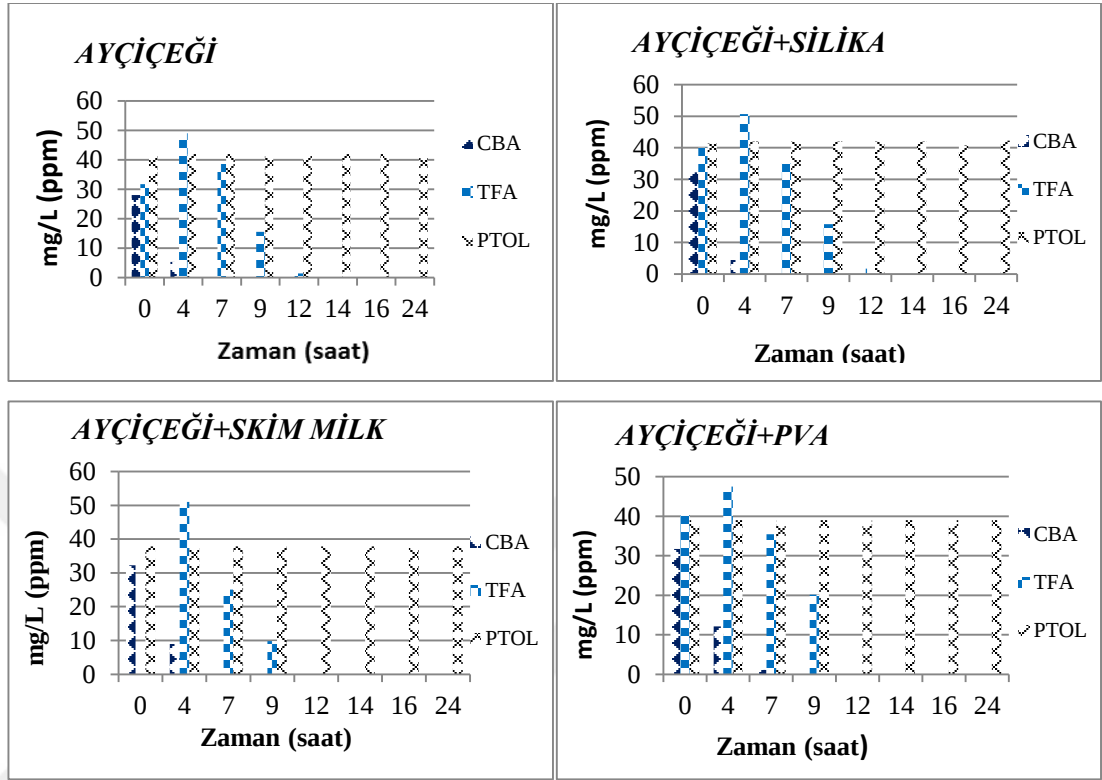
Şekil 4.39 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.38 ve 4.39'da görüldüğü gibi +4°C'de saklanan yonca, yonca+silika ve yonca+skim milk içeren viallerde 4-CBA, TFA ve p-TOL 4-7 saat; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA 7 saat, TFA ve p-TOL 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. +27°C'de saklanan yonca içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, TFA 12-14 saat, p-TOL 16 saat içerisinde; yonca+silika içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, TFA 9-12 saat, p-TOL 14 saat içerisinde; yonca+skim milk içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, TFA 12-14 saat içerisinde; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA 7-9 saat, TFA 12-14 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. +27°C'de saklanan yonca+skim milk ve yonca+PVA viallerinde tüm kimyasallar tükenmemiş olup 24 saat sonunda 44 mg/L p-TOL kalmıştır.

6. ay +4°C'de yoncanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; yonca, yonca+silika, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur. +27°C'de en iyi gruptan başlanıldığında biyoparçalama etkinliği sırasıyla; yonca+silika, yonca, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur.



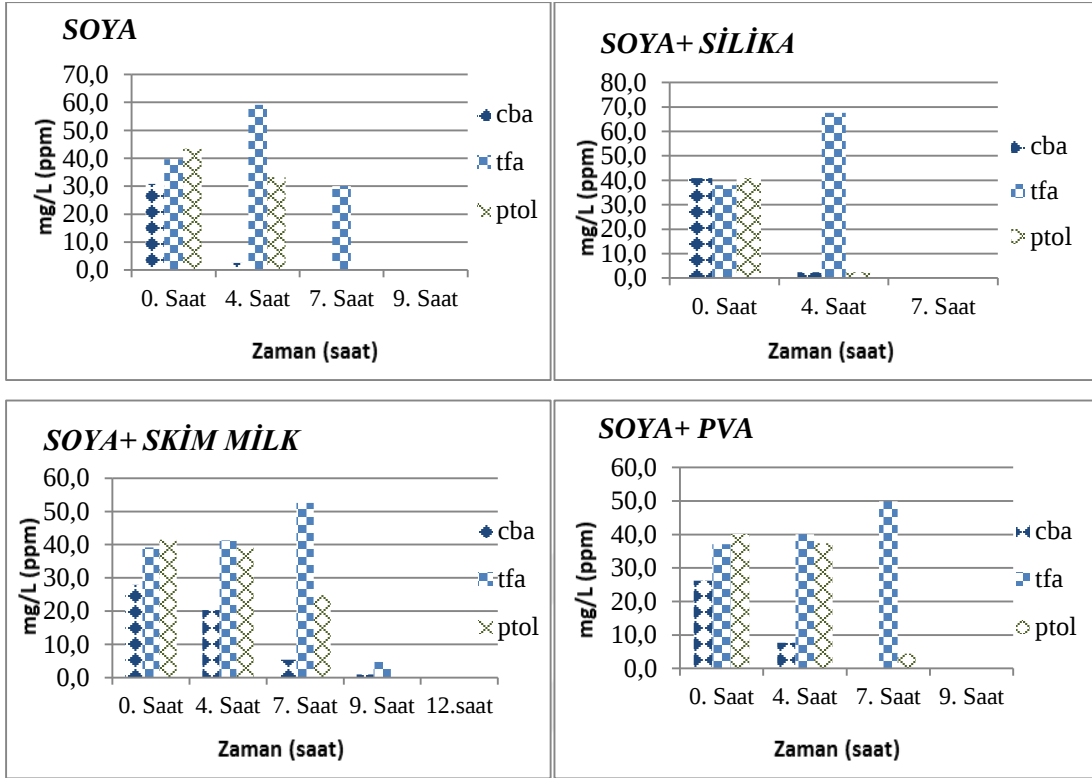
Şekil 4.40 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği



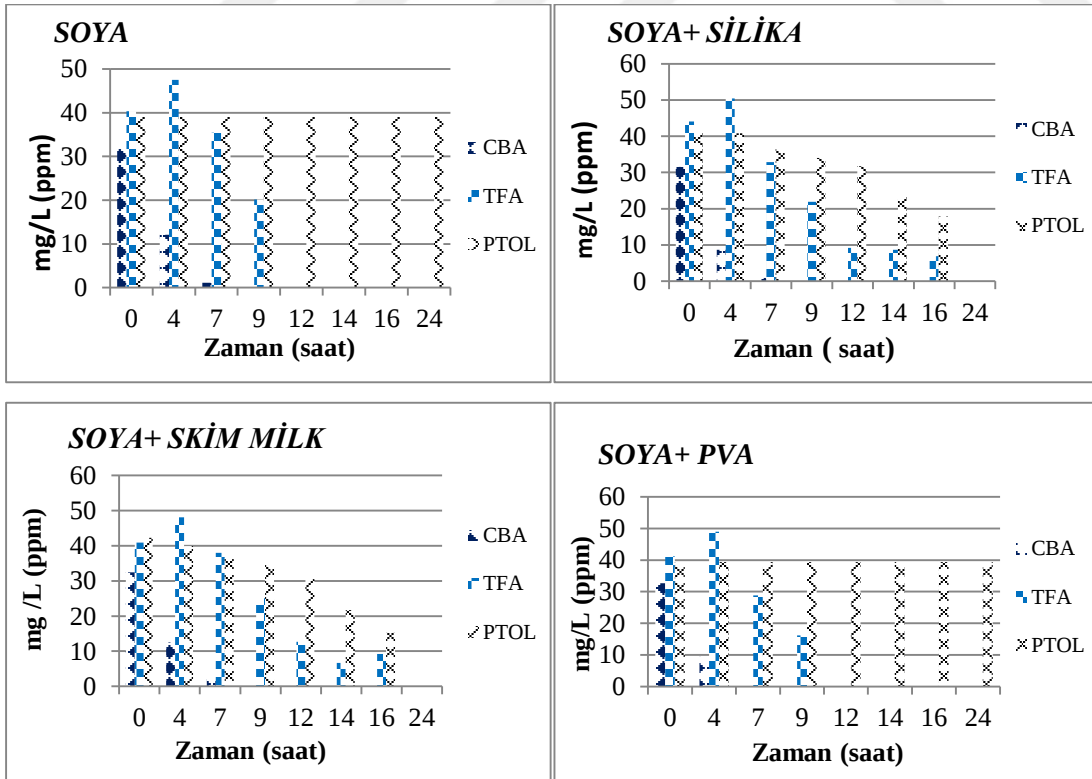
Şekil 4.41 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.40 ve 4.41'ta görüldüğü gibi +4°C'de saklanan ayçiçeği, ayçiçeği+silika ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+PVA içeren viallerde 4-CBA, TFA ve p-TOL 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. +27°C'de saklanan ayçiçeği, ayçiçeği+silika ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+PVA içeren viallerde 4-CBA ve TFA 9-12 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. p-TOL ise tamamen tükenmemiş olup 24 saat sonunda 37-41 mg/L olarak kalmıştır.

6. ay +4°C'de ayçiçeğinin taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; ayçiçeği+skim milk, ayçiçeği+silika, ayçiçeği+PVA ve ayçiçeği olmuştur. +27°C'deki grupların biyoparçalama etkinlikleri benzer olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.42 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

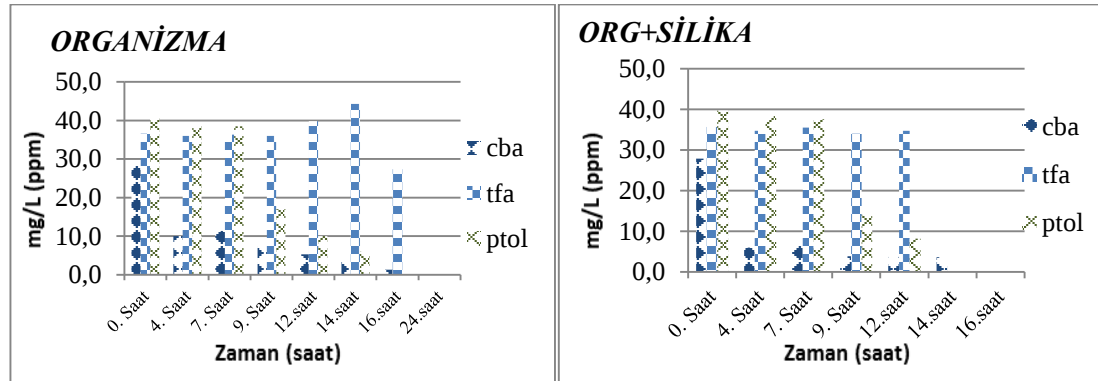


Şekil 4.43 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.42 ve 4.43'te görüldüğü gibi +4°C'de saklanan soya içeren viallerde 4-CBA 4 saat içerisinde 2,5 mg/L değerine düşerek neredeyse tamamen, p-TOL 4-7 saat içerisinde ve TFA 9-12 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Soya+skim milk içeren vialde 4-CBA 9 saat içerisinde 1 mg/L değerine düşerek neredeyse tamamen, p-TOL 7-9 saat, TFA 9-12 saat; soya+silika içeren vialde 4-CBA ve p-TOL 4 saat içerisinde 2 mg/L değerine düşerek neredeyse tamamen, TFA 7-9 saat; soya+PVA içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, p-TOL ve TFA 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir.

+27°C'de saklanan soya ve soya+PVA içeren viallerde 4-CBA 4-7 saat, TFA 9-12 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. p-TOL ise bu iki grupta 24 saat sonunda tükenmemiştir. Soya+silika ve soya+skim milk içeren viallerde 4-CBA 4-7 saat, TFA ve p-TOL 16-24 saat içerisinde tükenmiştir.

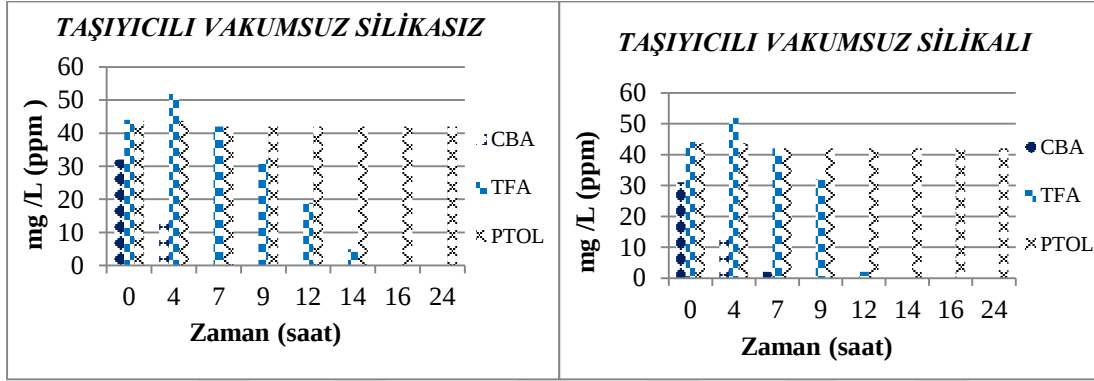
6. ay +4°C'de soyanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; soya, soya+silika, soya+PVA ve soya+skim milk olmuştur. +27°C'deki biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında en iyi grup soya+silika ve soya skim milk olmuştur.



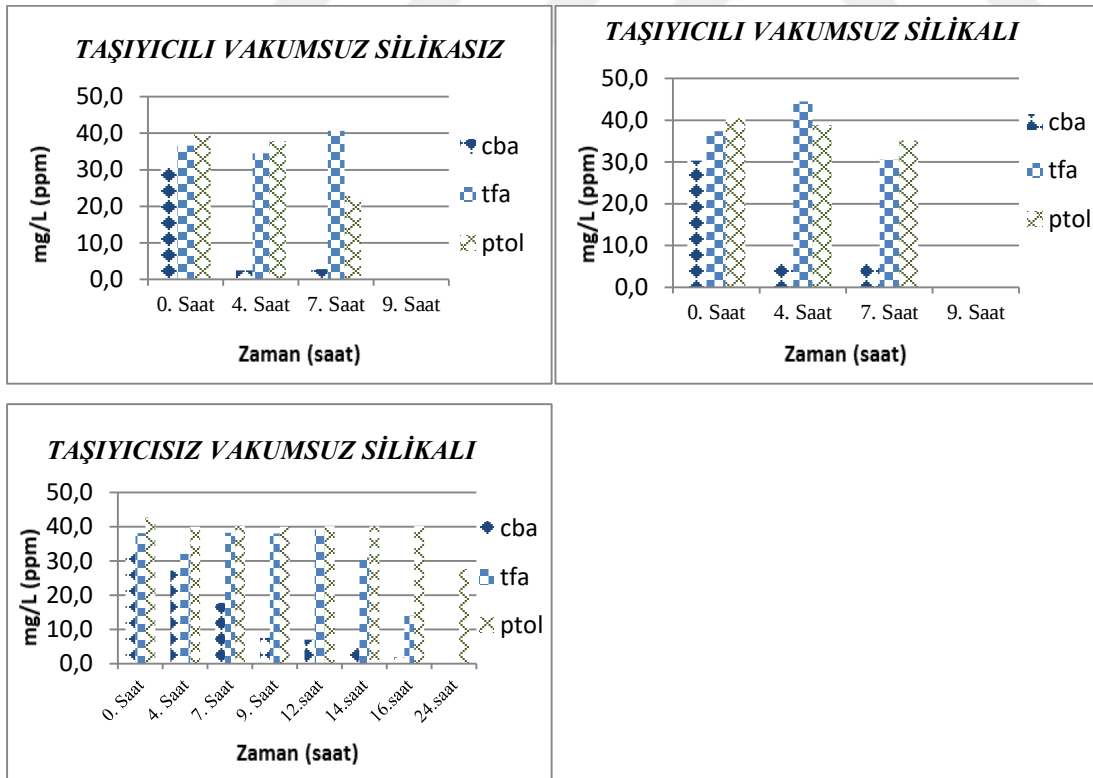
Şekil 4.44 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.44'te görüldüğü gibi +4°C'de saklanan viallerden organizma+silika ürün içeriğinde 14-16 saat, sadece organizma ürün içeriğinde 16-24 saat içerisinde tüm

kimyasallar tükenmiştir. +27°C’de saklanan taşıyıcı içermeyen organizma ve organizma silika içerikli viallerde Nutrient Broth ortamında üreme olmadığı için HPLC analizi yapılamamıştır.



Şekil 4.45 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)’ye ait +27°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

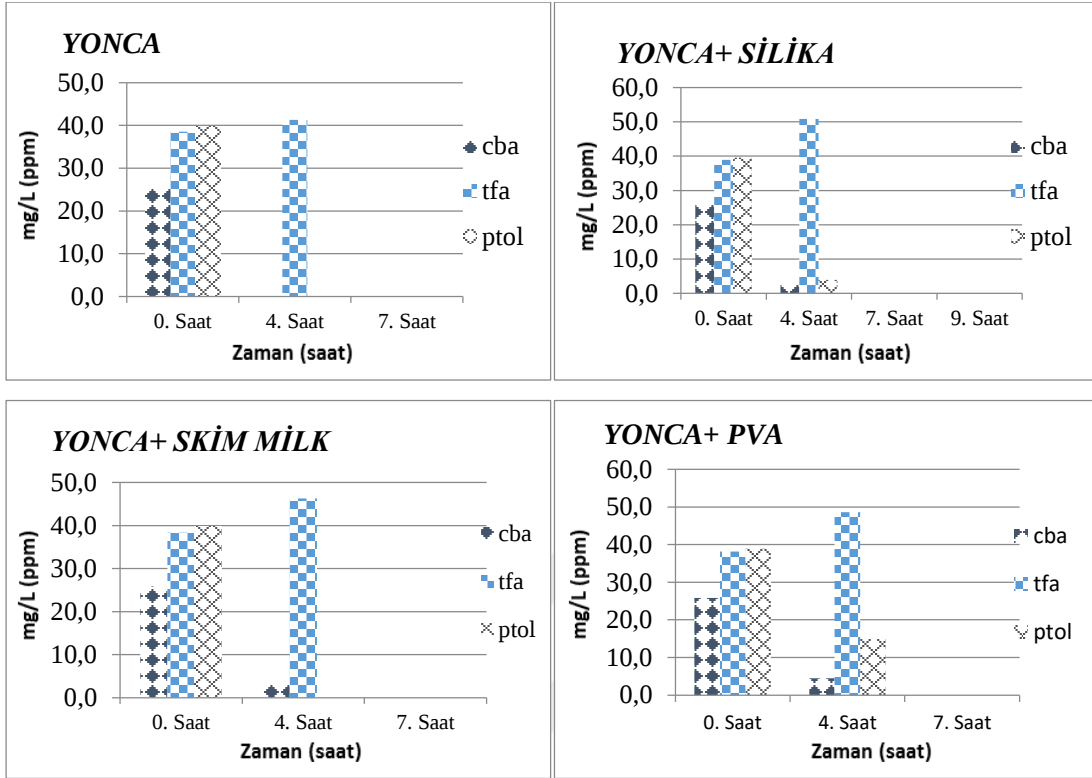


Şekil 4.46 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikalı (c)’ye ait +4°C 6.ay biyoparçalama etkinliği

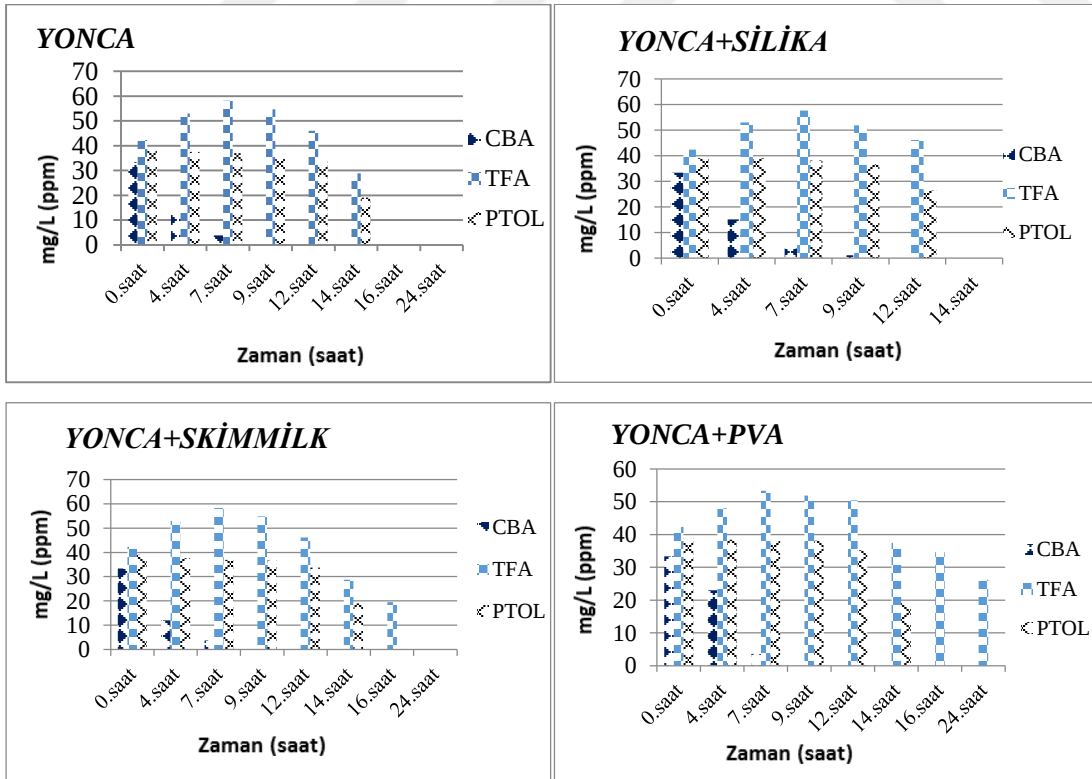
Şekil 4.45 ve 4.46’de görüldüğü gibi vakumsuz olarak saklanan gruplarda +4°C’de ve +27°C’de taşıyıcılı gruplar taşıyıcı içermeyen gruplara göre daha iyi sonuç vermiştir. +27°C’de taşıyıcısız gruplarda ve +4°C’de taşıyıcısız+vakumsuz+silikasız ürün içeriğinde canlılık olmadığı için biyoparçalama analizleri gerçekleştirilememiştir.

+4°C’de taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız ve taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı ürün içeriğinde 7-9 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir. +27°C’de taşıyıcılı gruplarda 4-CBA ve TFA giderim süreleri uzamış, p-TOL ise 24 saat sonunda tükenmemiştir.





Şekil 4.47 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

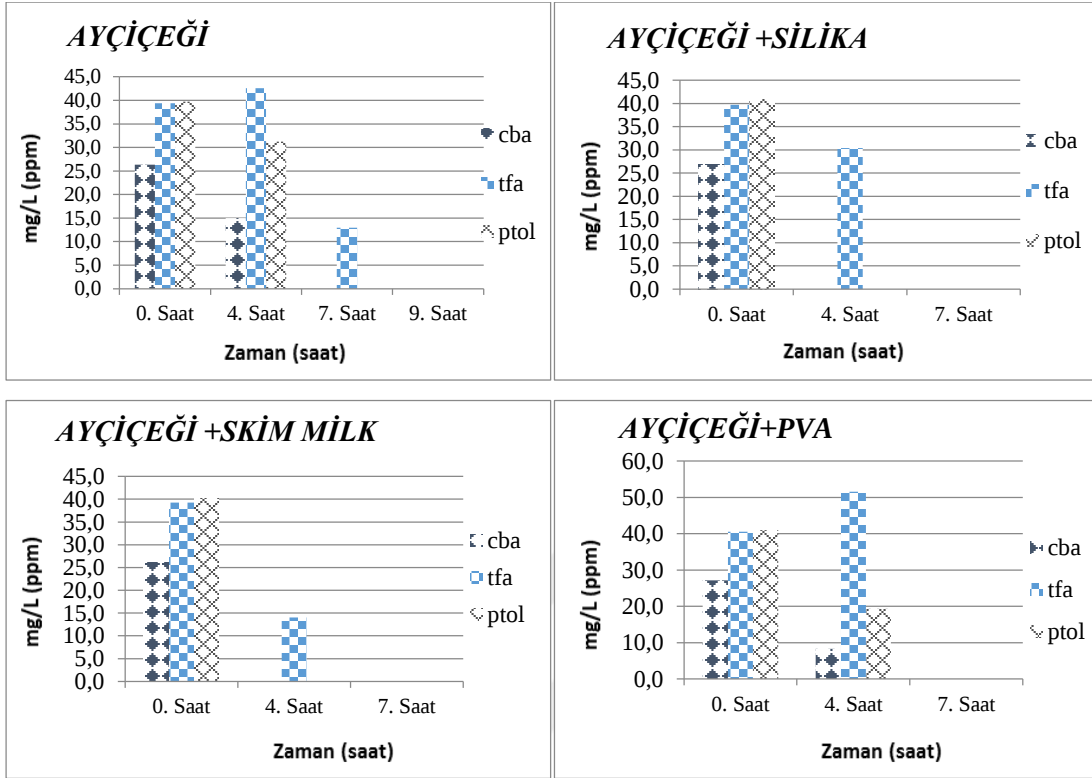


Şekil 4.48 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

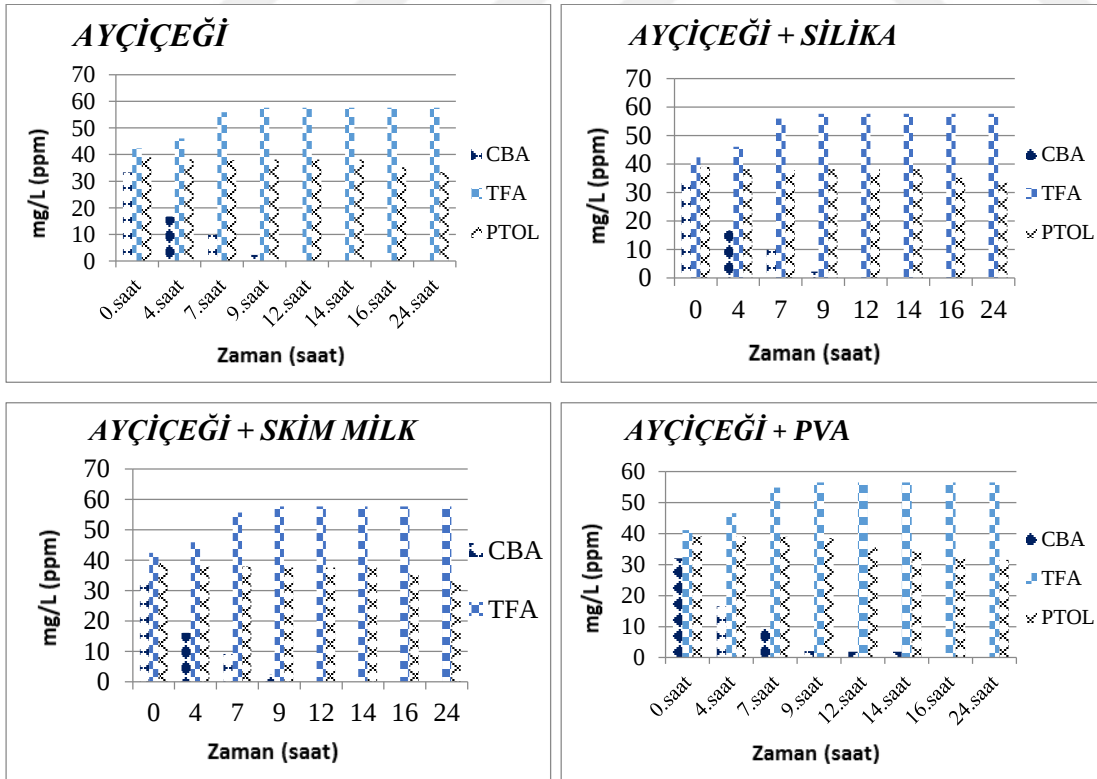
Şekil 4.47 ve 4.48’de görüldüğü gibi +4°C’de saklanan yonca içeren vialde 4-CBA ve p-TOL 4 saat içerisinde, TFA ise 4-7 saat içerisinde; yonca+silika içeren vialde 4-CBA, TA ve p-TOL 4-7 saat içerisinde; yonca+skim milk içeren vialde 4-CBA ve TFA 4-7 saat içerisinde, p-TOL 4 saat içerisinde; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA, TFA ve p-TOL 4-7 saat içerisinde tamamen tükenmiştir.

+27°C’de saklanan yonca içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, TFA ve p-TOL 14-16 saat içerisinde; yonca+silika içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, TFA ve p-TOL 12-14 saat içerisinde; yonca+skim milk içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, p-TOL 14-16 saat, TA 16-24 saat içerisinde; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, p-TOL 14-16 saat içerisinde tamamen tükenmiş olup, TFA ise 24 saat sonunda 26 mg/L kalmıştır.

9. ay +4°C’de yoncanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; yonca, yonca+silika, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur. +27°C’de en iyi gruptan başlanıldığında biyoparçalama etkinliği sırasıyla; yonca+silika, yonca, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur. Sıralamalar, 6.ay sonuçlarıyla benzerdir.



Şekil 4.49 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

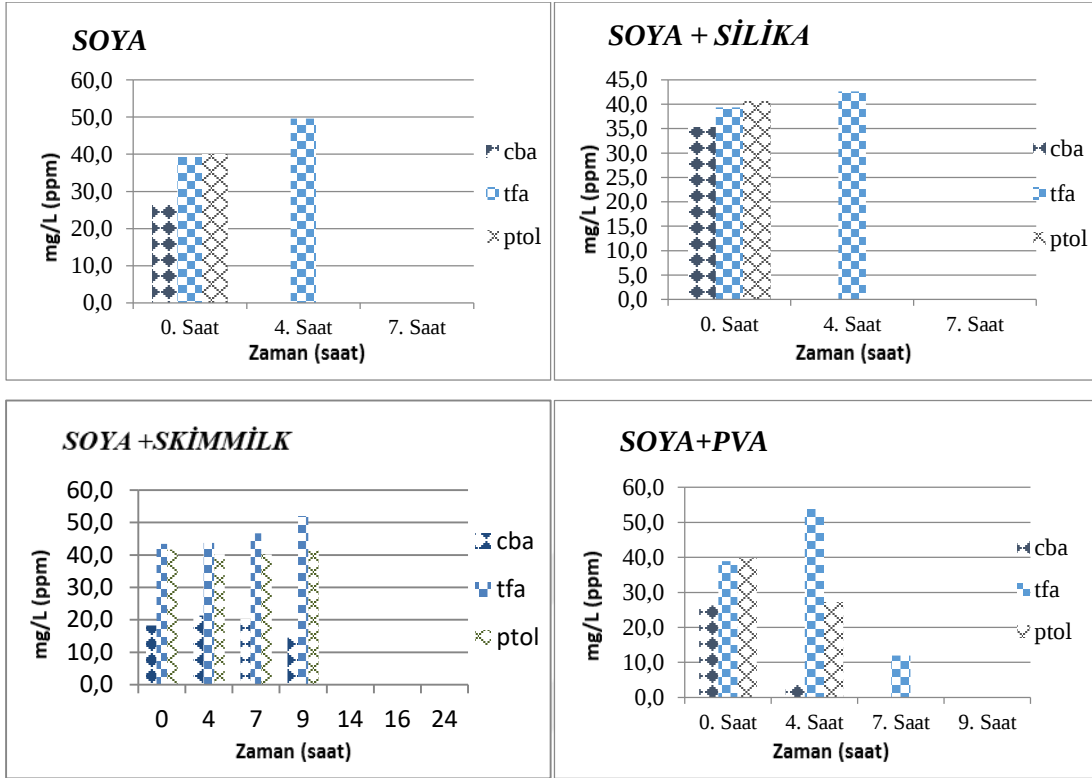


Şekil 4.50 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

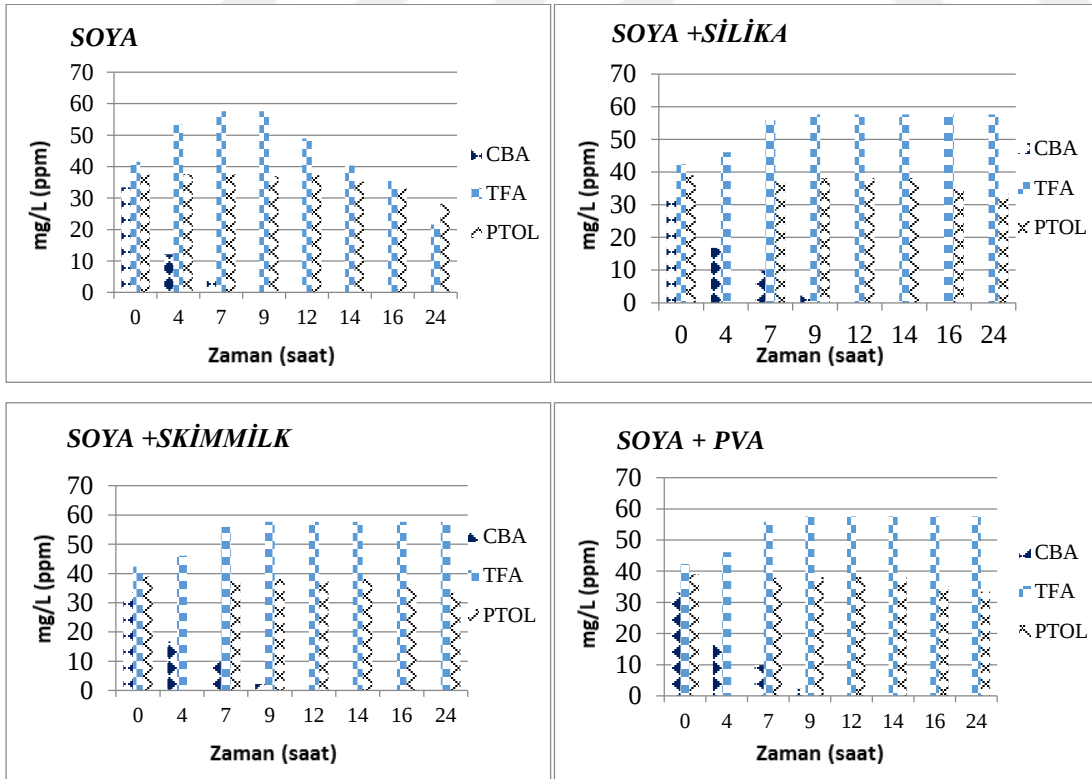
Şekil 4.49 ve 4.50’de görüldüğü gibi +4°C’de saklanan, ayçiçeği+silika ve ayçiçeği+skim milk içeren viallerde 4-CBA ve p-TOL 0-4 saat, TFA 4-7 saat ; ayçiçeği+PVA içeren vialde 4-CBA, p-TOL ve TFA 4-7 saat; ayçiçeği içeren vialde 4-CBA ve p-TOL 4-7 saat, TFA 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir.

+27°C’de saklanan ayçiçeği, ayçiçeği+silika ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+PVA içeren viallerde 4-CBA 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. TFA ve p-TOL ise tamamen tükenmemiş olup 24 saat sonunda kalmıştır. +27°C 6. ay sonuçlarına göre TA kimyasalı biyoparçalama süresi uzamıştır.

9. ay +4°C’de ayçiçeğinin taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; ayçiçeği+skim milk, ayçiçeği+silika, ayçiçeği+PVA ve ayçiçeği olmuştur. Bir önceki ay ile benzerdir. +27°C’de saklanan grupların biyoparçalama etkinlikleri benzer olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.51 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

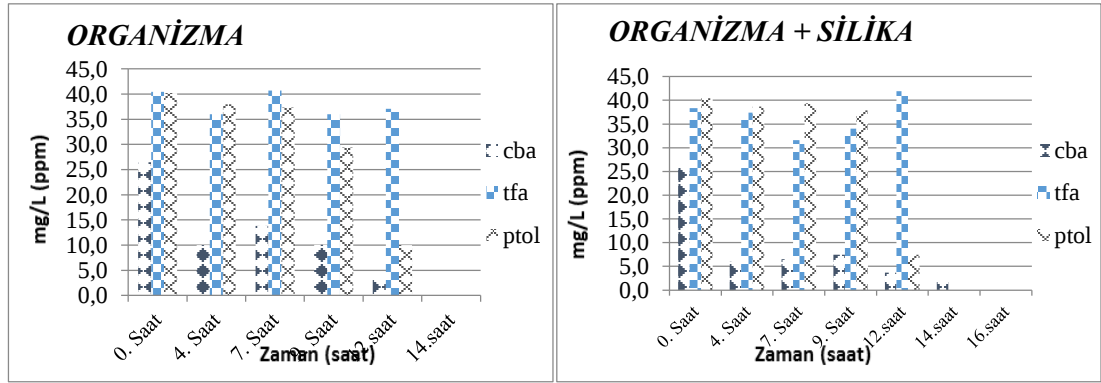


Şekil 4.52 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.51 ve 4.52’de görüldüğü gibi +4°C’de saklanan soya ve soya+silika içeren viallerde 4-CBA ve p-TOL 0-4 saat, TFA 4-7 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Soya+PVA içeren vialde 4-CBA ve p-TOL 4-7 saat, TFA 7-9 saat içerisinde; soya+skim milk içeren vialde 4-CBA, p-TOL ve TFA 9-14 saat içerisinde tamamen tükenmiştir.

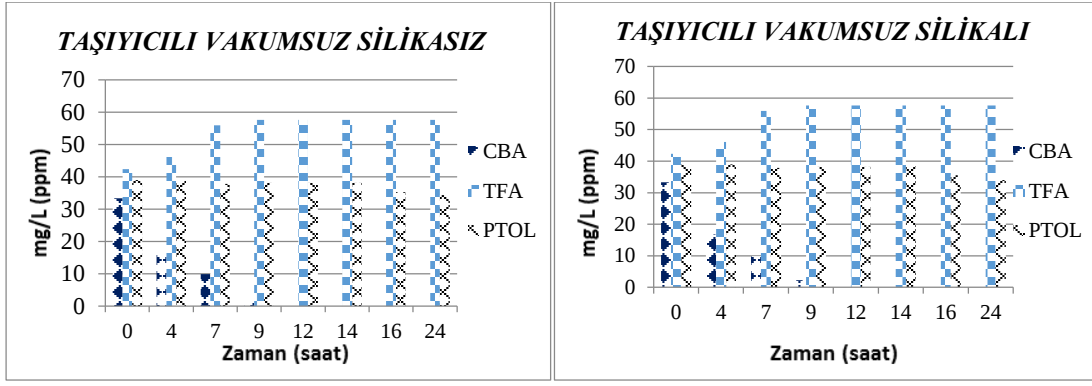
+27°C’de saklanan soya, soya+silika soya+skim milk ve soya+PVA içeren viallerde 4-CBA 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Tüm gruplarda, TFA ve p-TOL ise tamamen tükenmemiş olup 24 saat sonunda kalmıştır. +27°C 6. ay sonuçlarına göre p-TOL kimyasalı biyoparçalama süresi soya skim milk ve soya silika içeren vial içeriklerinde, TFA kimyasalı biyoparçalama süresi ise tüm vial içeriklerinde uzamıştır.

9. ay +4°C’de soyanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; soya, soya+silika, soya+PVA ve soya+skim milk olmuştur. +4°C’deki bu sonuç 6.ay ile benzerdir. +27°C’deki biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında en iyi grup soya olmuştur.

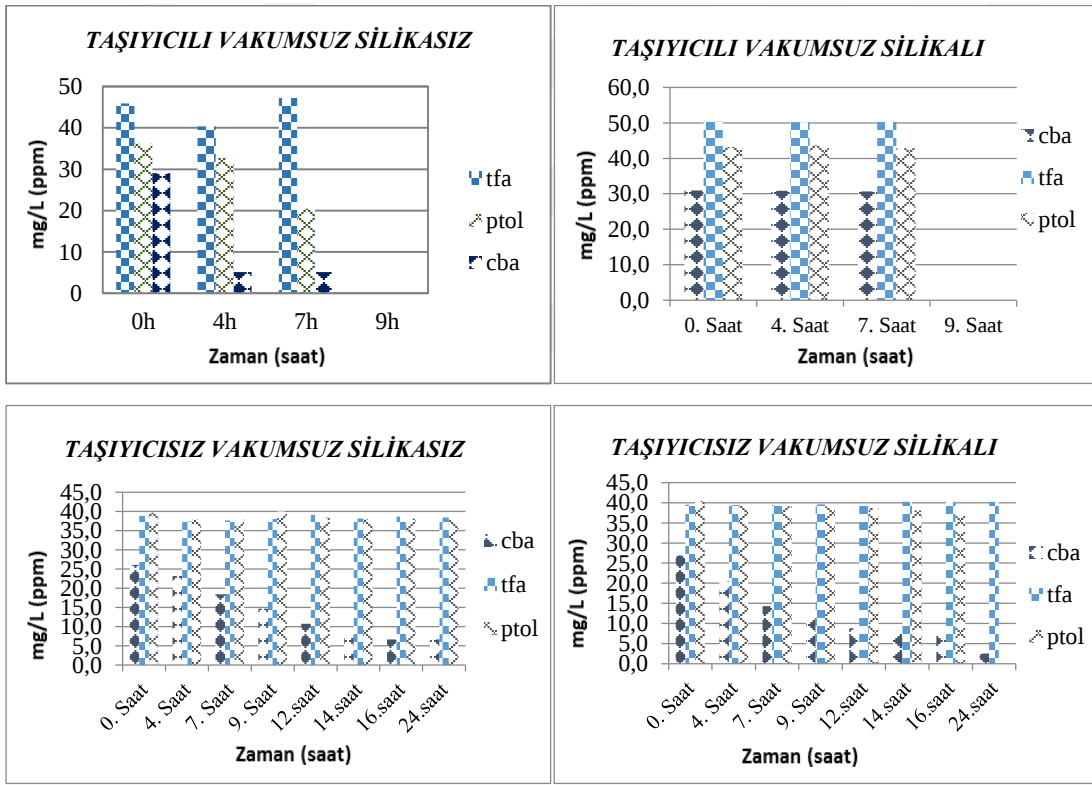


Şekil 4.53 Organizma (a), Organizma+silika (b)’ye ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.53’te görüldüğü gibi +4°C’de saklanan viallerden sadece organizma ürün içeriğinde 12-14 saat, organizma+silika ürün içeriğinde 14-16 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir.



Şekil 4.54 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

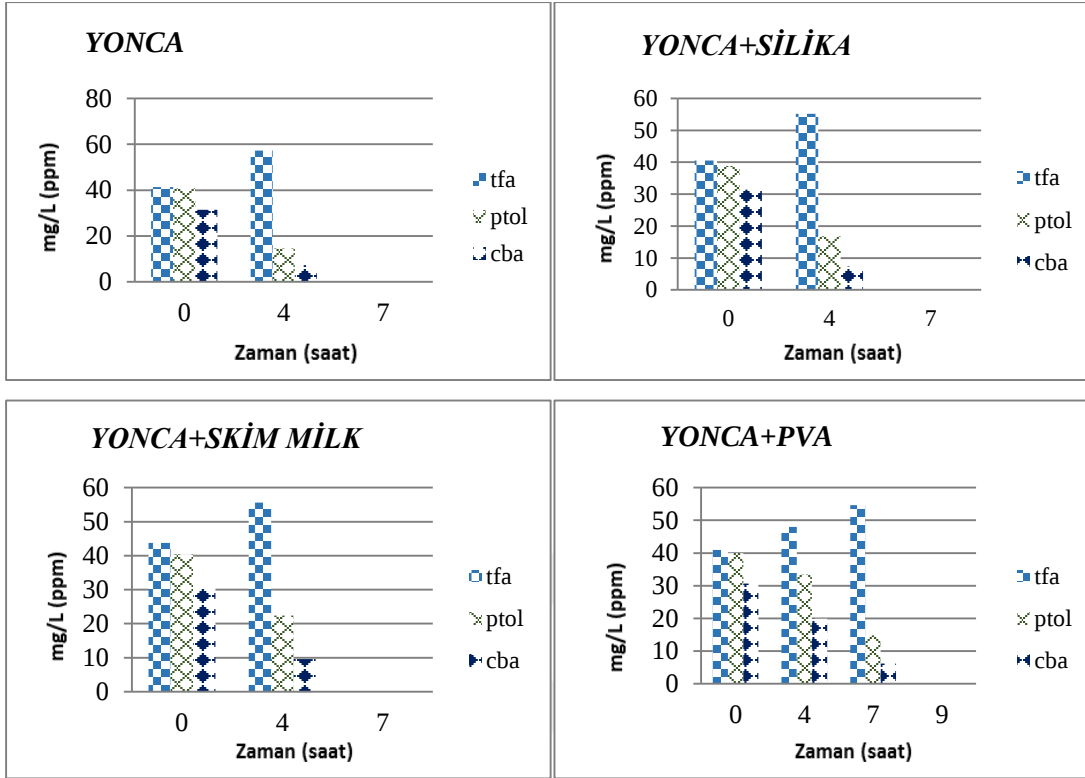


Şekil 4.55 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikasız (c), Taşıyıcısız+vakumsuz+silikalı (d) 'ye ait +4°C 9.ay biyoparçalama etkinliği

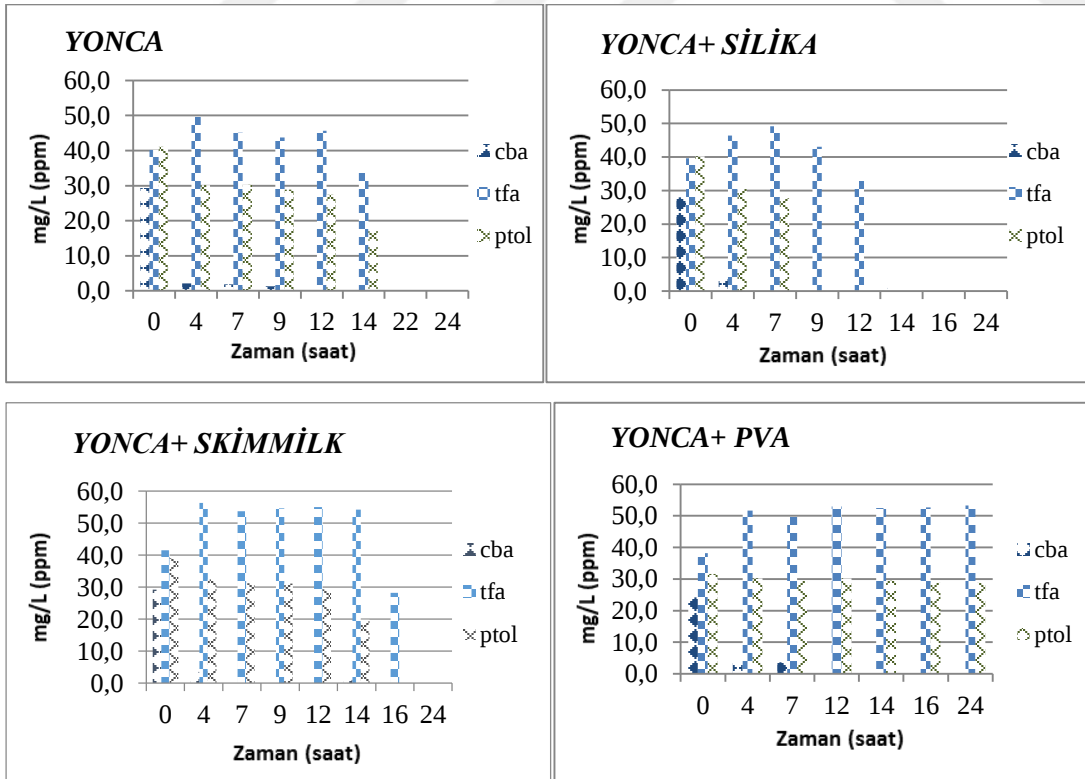
Şekil 4.54'te ve 4.55'te görüldüğü gibi vakumsuz olarak saklanan gruplarda +4°C'de ve +27°C'de taşıyıcılı gruplar taşıyıcı içermeyen gruplara göre daha iyi sonuç vermiştir. +4°C'de taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız ve taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı ürün içeriğinde 7-9 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir. +27°C'de taşıyıcılı

gruylarda 6.ay sonuçlarında 4-CBA ve TFA giderim süreleri uzamış, p-TOL ise 24 saat sonunda tkenmemişti. 9. ay sonuçlarına bakıldığında bu gruylarda p-TOL ve TFA 24 saat sonunda tükenmemiştir.





Şekil 4.56 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği



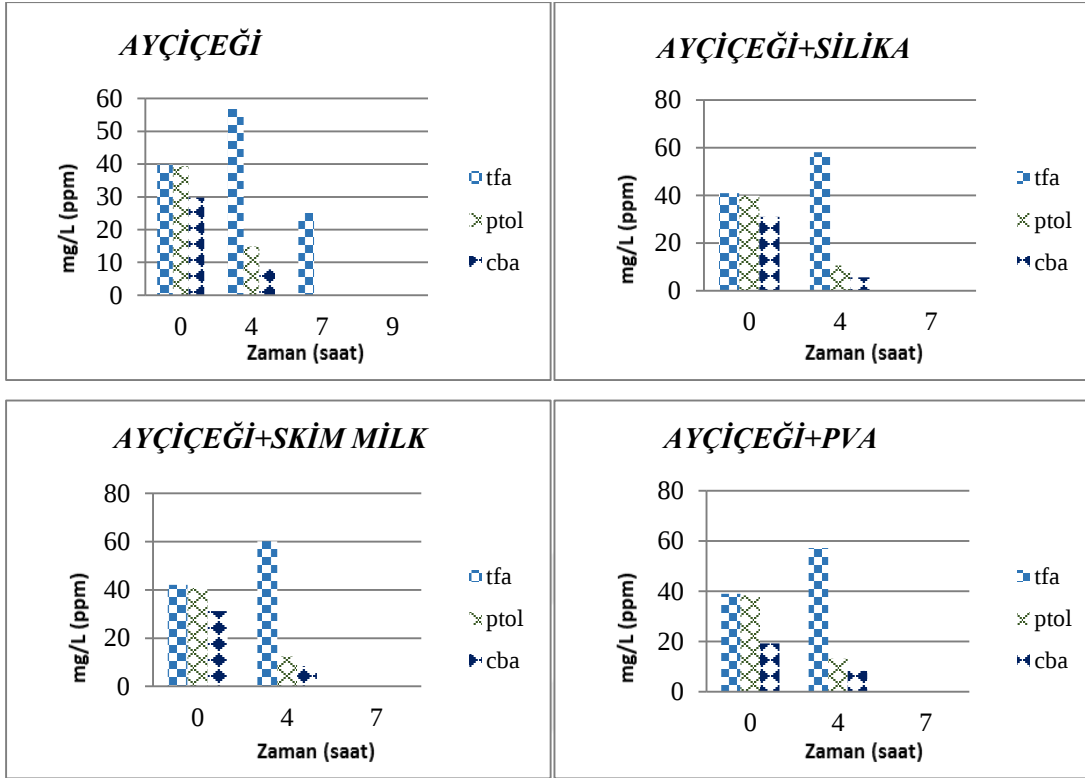
Şekil 4.57 Yonca (a), yonca+silika (b), yonca+skim milk (c) ve yonca+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.56 ve 4.57’de görüldüğü gibi +4°C’de saklanan yonca, yonca+silika, yonca+skim milk içeren viallerde 4-CBA, TFA ve p-TOL 4-7 saat içerisinde; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA, TFA ve p-TOL 7-9 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Yonca, yonca+silika, yonca+skim milk içerikleri için p-TOL kimyasalı biyoparçalama süresi uzamıştır. Yonca+PVA için 9.,12. Ve 15.ay’larda tüm kimyasalların bittiği 4-7 saat olan süre, uzamıştır.

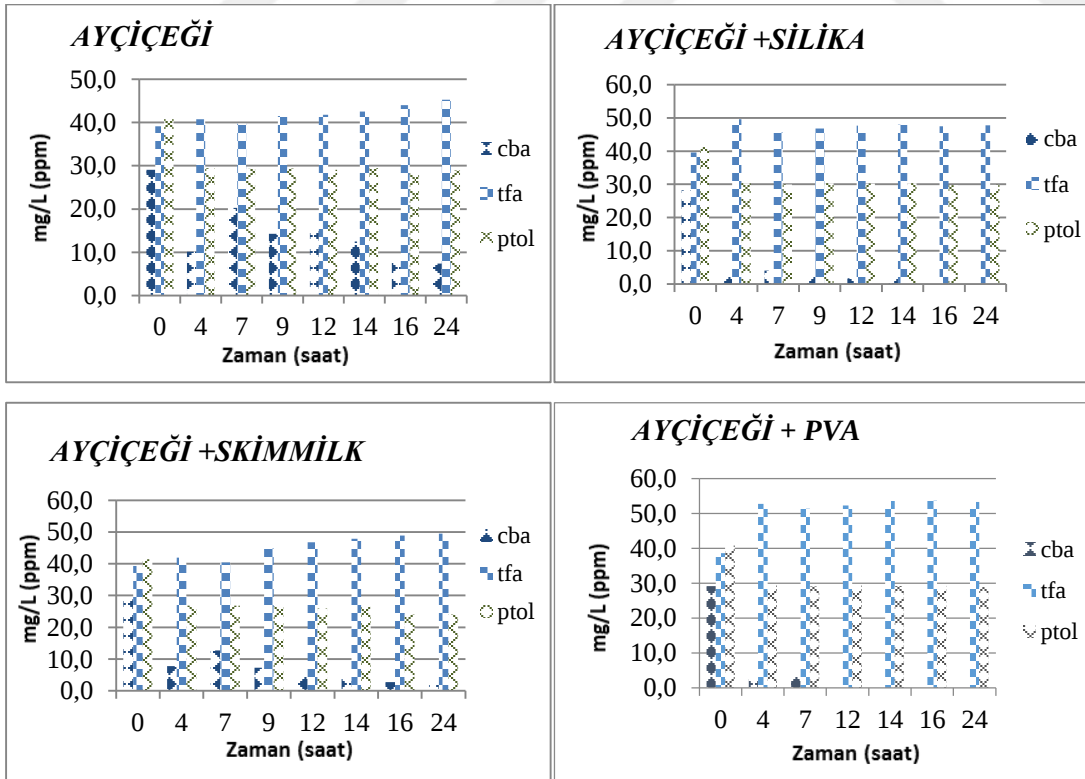
+27°C’de saklanan yonca içeren vialde 4-CBA 4-7 saat içerisinde, TFA ve p-TOL ise 14-16 saat içerisinde; yonca+silika içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, p-TOL 7-9 saat, TFA 12-14 saat içerisinde; yonca+skim milk içeren vialde 4-CBA 4-7 saat, p-TOL 14-16 saat, ve TFA 16-24 saat içerisinde; yonca+PVA içeren vialde 4-CBA 4-7 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Yonca+PVA içeren vialde TFA ve p-TOL 24 saat sonunda tükenmemiştir. +27°C 9.,12. ve 15. ay sonuçlarına göre p-TOL kimyasalı biyoparçalama süresi uzamıştır.

18. ay +4°C’de yoncanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; yonca, yonca+silika, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur. İlk aylardan 18.ay’a kadar sıralama aynı olmuştur. +27°C’de en iyi gruptan başlanıldığında biyoparçalama etkinliği sırasıyla; yonca+silika, yonca, yonca+skim milk ve yonca+PVA olmuştur, 9.,12. ve 15.ay sonuçlarıyla benzerdir.

Taşıyıcı olarak yonca olan ürün içeriğinde, birlikte kullanıldığında en etkili biyoparçalama sonucu elde edilen koruyucu, silika olmuştur.



Şekil 4.58 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği



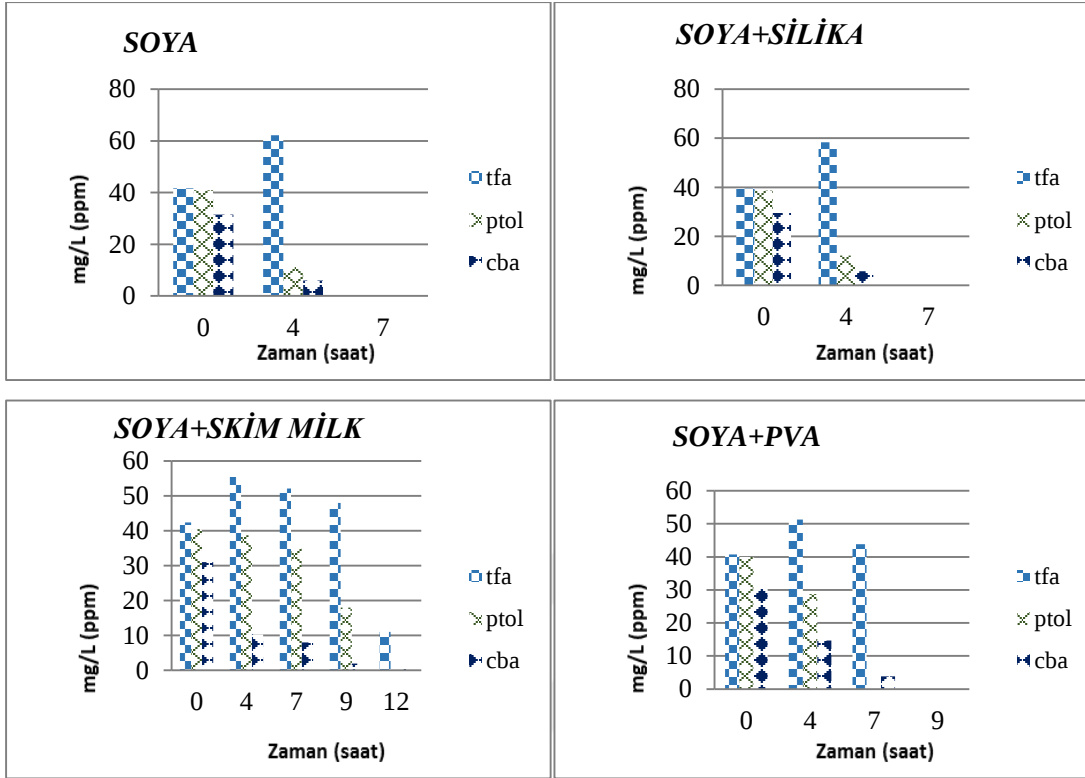
Şekil 4.59 Ayçiçeği (a), Ayçiçeği+silika (b), Ayçiçeği+skim milk (c) ve Ayçiçeği+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.58 ve 4.59'da görüldüğü gibi +4°C'de saklanan, ayçiçeği+silika, ayçiçeği+PVA ve ayçiçeği+skim milk içeren viallerde 4-CBA, p-TOL ve TFA 4-7 saat içerisinde tükenmiştir. 9.,12. Ve 15.ay sonuçlarına bakıldığında ayçiçeği+silika, ayçiçeği+PVA viallerinde 4-CBA, p-TOL kimyasallarının biyoparçalanma süreleri uzamıştır.

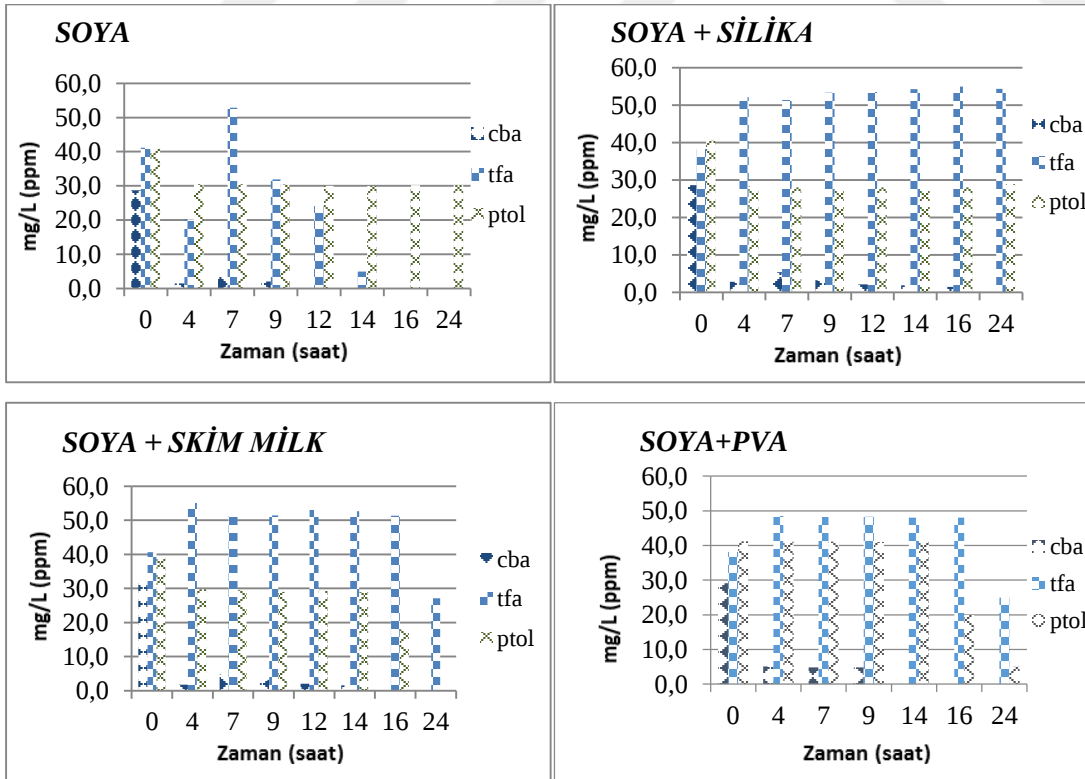
+27°C'de saklanan ayçiçeği, ayçiçeği+silika ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+PVA içeren viallerde 9.,12. Ve 15.ay sonuçlarına bakıldığında 7-9 saat içerisinde tamamen tükenen 4-CBA kimyasalı 12-14 ve 24 saat'lere varan sürelerde tükenmiştir. TFA ve p-TOL ise tamamen tükenmemiş olup 24 saat sonunda kalmıştır.

18. ay +4°C'de ayçiçeğinin taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; ayçiçeği+skim milk, ayçiçeği+silika, ayçiçeği+PVA ve ayçiçeği olmuştur. 9.,12. ve 15. ay ile sonuçlar benzerdir. +27°C'de 9.ay ve sonrasında p-TOL ve TFA kimyasallarının 24 saatte tükenmediği görülmüştür.

Taşıyıcı olarak ayçiçeği olan ürün içeriğinde, birlikte kullanıldığında en etkili biyoparçalama sonucu elde edilen koruyucu, skim milk olmuştur.



Şekil 4.60 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği



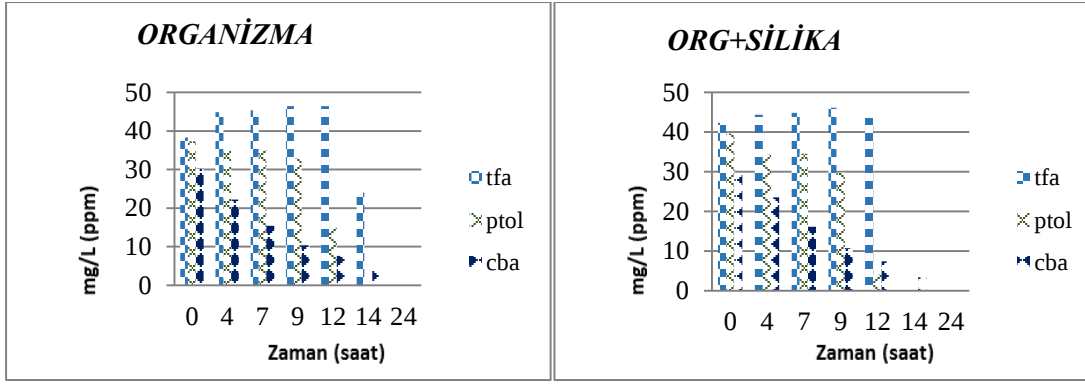
Şekil 4.61 Soya (a), Soya+silika (b), Soya+skim milk (c) ve Soya+PVA (d)'ya ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.60 ve 4.61’de görüldüğü gibi +4°C’de saklanan soya ve soya+silika içeren viallerde 4-CBA, p-TOL ve TFA 4-7 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. Soya ve soya+silika içeriklerinin 9.,12. ve 15. ay sonuçları ile kıyaslandığında 4-CBA ve p-TOL kimyasalları biyoparçalama süreleri bu ay uzamıştır. Soya+PVA içeren vialde 4-CBA ve p-TOL 4-7 saat, TFA 7-9 saat içerisinde; soya+skim milk içeren vialde 4-CBA, p-TOL ve TFA 9-14 saat içerisinde tamamen tükenmiştir.

+27°C’de saklanan soya, soya+silika soya+skim milk ve soya+PVA içeren viallerde 4-CBA 9-12 saat içerisinde tamamen tükenmiştir. 9.ay ve sonrasındaki sonuçlara göre 4-CBA kimyasalının parçalanma süresi uzamıştır. Tüm gruplarda TFA ve p-TOL ise tamamen tükenmemiş olup 24 saat sonunda tükenmeden kalmıştır. Bu durum, 9.ay’dan itibaren değişmemiştir. +27°C 9. ay ve sonraki ayların sonuçlarına göre p-TOL kimyasalı biyoparçalama süresi soya skim milk ve soya silika içeren vial içeriklerinde, TFA kimyasalı biyoparçalama süresi ise tüm vial içeriklerinde uzamıştır.

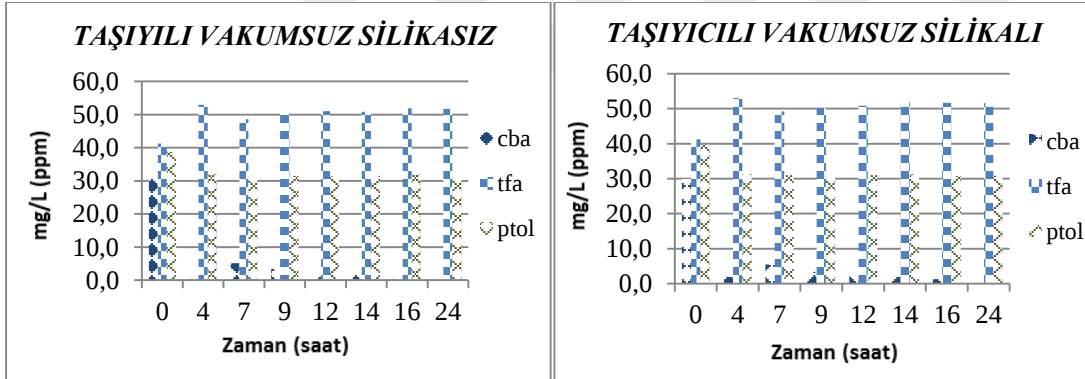
18. ay +4°C’de soyanın taşıyıcı olduğu en iyi gruptan başlayarak biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında, sıralama; soya, soya+silika, soya+PVA ve soya+skim milk olmuştur. +4°C’deki bu sonuç tüm aylarda süreklilik sağlamıştır. +27°C’deki biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında en iyi grup soya olmuştur.

Taşıyıcı olarak soya olan ürün içeriğinde, birlikte kullanıldığında en etkili biyoparçalama sonucu elde edilen koruyucu, silika olmuştur.

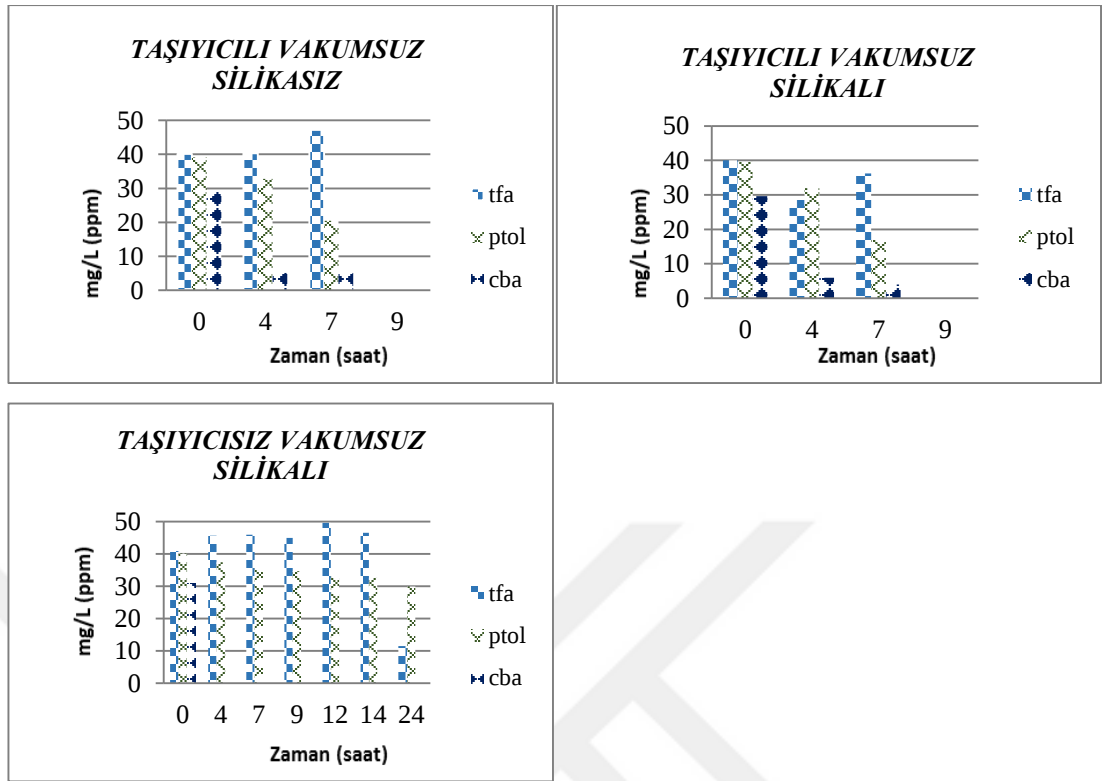


Şekil 4.62 Organizma (a), Organizma+silika (b)'ye ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.62'de görüldüğü gibi +4°C'de saklanan viallerden sadece organizma ürün içeriğinde 14-24 saat, organizma+silika ürün içeriğinde 14-24 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir.



Şekil 4.63 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b)'ye ait +27°C 18.ay biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.64 Taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız (a), Taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı (b), Taşıyıcısız+vakumsuz + silikalı (c)'ye ait +4°C 18.ay biyoparçalama etkinliği

Şekil 4.63'te ve 4.64'te görüldüğü gibi vakumsuz olarak saklanan gruplarda +4°C'de ve +27°C'de taşıyıcılı gruplar taşıyıcı içermeyen gruplara göre daha iyi sonuç vermiştir. +4°C'de taşıyıcılı+vakumsuz+silikasız ve taşıyıcılı+vakumsuz+silikalı ürün içeriğinde 7-9 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenmiştir. +27°C'de taşıyıcılı gruplarda 6.ay sonuçlarında 4-CBA ve TFA giderim süreleri uzamış, p-TOL ise 24 saat sonunda tükenmemiştir. 9.,12.,15. Ve 18. ay sonuçlarına bakıldığında bu gruplarda p-TOL ve TFA 24 saat sonunda tükenmemiştir.

Tez çalışmasında +4°C'deki biyoparçalama sonuçlarına baktığımızda ve taşıyıcıların her birini kendi içlerinde ki ürün içerikleriyle kıyaslandığımızda taşıyıcı olarak "yonca", "ayçiçeği+skimmilk" ve "soya" biyoparçalama oranlarında 4-7 saat ile en iyi sonuçları vermiştir. +27°C'deki biyoparçalama etkinliklerine bakıldığında en iyi grup "yonca+silika" olmuştur. +27°C saklama koşullarındaki ürünlerin yonca, yonca+silika ve yonca+skim milk harici diğer taşıyıcılı grupların degradasyonları 24

saat sonunda tamamen tükenmemiştir. En etkili biyoparçalama sonucu elde edilen koruyucu olarak “silika” yonca ve soya gruplarında, “skim milk” ise ayçiçeği grubunda gözlemlenmiştir.

Taşıyıcı+organizma içeren koruyucu içermeyen gruplardan ayçiçeği biyoparçalama etkinliği en fazla düşen grup olmuştur. Tüm gruplar geneline bakıldığında etkinliği en iyi olan koruyucu silikadır. +4°C ve +27°C saklama koşullarında 18 ay sonunda, +4°C saklanan viallerde bulunan ürün grupları +27°C’ye göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Taşıyıcı “yonca” grubunda en iyi sonuç veren gruplar yonca ve yonca+silika olmuştur. Taşıyıcı “ayçiçeği” grubunda en iyi sonuç veren gruplar ayçiçeği+skim milk ve ayçiçeği+silika olmuştur. Taşıyıcı “soya” grubunda en iyi sonuç veren gruplar soya ve soya+silika olmuştur. Canlılık sayım sonuçları gibi biyoparçalama sonuçlarında da her koruyucunun farklı taşıyıcılar ile birlikteken daha iyi iş görebildiği gözlemlenmiştir. Taşıyıcı içermeyen sadece organizma ve koruyucu içeren vial gruplarında, silika avantaj sağlamıştır, ama 14-24 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenebilmiştir. Taşıyıcı gruplar ile kıyaslandığında sadece organizma ve organizma+silika grubunun p-TOL ve 4-CBA giderimleri çok yavaşlamıştır. Vakumsuz gruplarda taşıyıcı olarak kullanılan yoncanın biyoparçalama etkinliği üzerine olan etkisine bakıldığında, taşıyıcısız gruba göre çok iyi olmuştur. Vakumsuz grup biyoparçama etkinlik süresi 1-2 saat uzamıştır.

+27 °C saklama koşullarına sahip viallerin +4°C ‘de saklanan viallere göre daha düşük canlı sayımı göstermesi ve biyoparçalama süresinin uzun olmasında saklama koşullarından kaynakladığını göstermektedir. İzolatların +27°C saklama koşullarında biyoparçalama aktivitesinin yavaşlamasının yanısıra p-TOL kimyasalı parçalama etkinliğinin azalmasının görülmesi, ürün içerisindeki p-TOL parçalayan mikroorganizmaların canlılığını kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.7. Mikrotoks Sonuçları

İzolatlar tarafından parçalanması istenen hidrokarbonların denemelerde kullanılan konsantrasyonlarına karşı test mikroorganizmasında inhibisyona sebep olan herhangi bir durum gözlenmemesinden dolayı, belirlenen konsantrasyonlardaki seçili hidrokarbonların toksik etkisi saptanamamıştır. Test örneklerinin toksik özelliğinin bulunmadığı, kontrol amaçlı kullanılan NaN_3 verileri ile doğrulanmıştır.

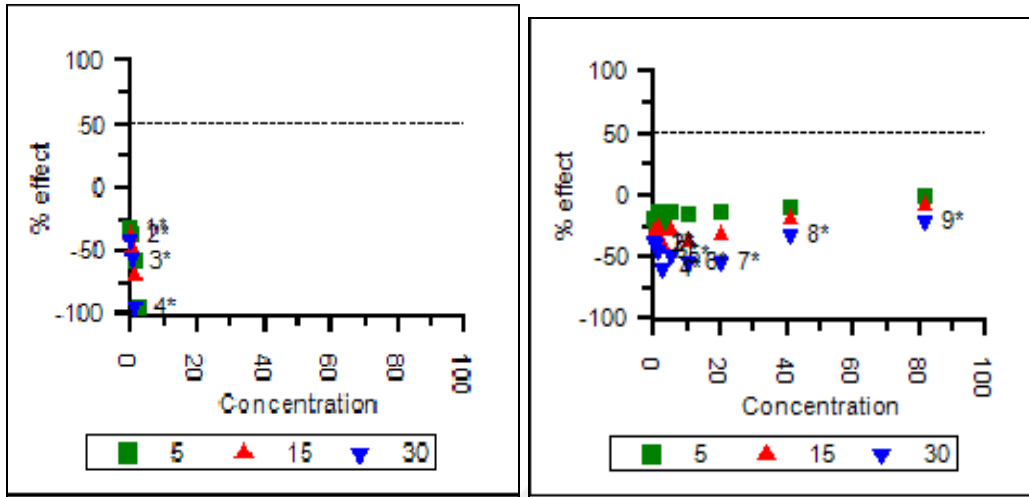
Şekil 4.65 ve Şekil 4.66’da her bir kimyasal grubu (PAH, PTA) için hem parçalanma öncesi (kör) hem de parçalanma sonrası toksisite analizleri yapılmıştır. EC_{50} kriterine göre sonuçlar değerlendirildiğinde verilerin hem kör hem de parçalanma sonrası örneklerde, hidrokarbonların toksik olarak nitelendirilebilmesi için aşması gerekli olan EC_{50} eşik değerini aşmadığı saptanmıştır.

Raf ömrü denemeleri süresince biyoparçalama analizleri sonrasında tüm ürün gruplarının ekotoksikolojik değerlendirilmesi yapılmıştır. Seçili hidrokarbonların toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Şekil 4.67’de, $+4^{\circ}\text{C}$ ve $+27^{\circ}\text{C}$ 18.ay biyoparçalama aktivitesi sonucu metabolitlerin ekotoksikolojik değerlendirilme sonuçları verilmiştir.

CSTR çalışması sonrasında, çalışılan 4 reaktörün çıkış suyu örneğinden yapılan mikrotoks sonucu ise Şekil 4.68’de gösterilmiştir. 5 ve 15 dakikalık maruziyet sonucunda EC_{50} değeri aşılmamıştır.

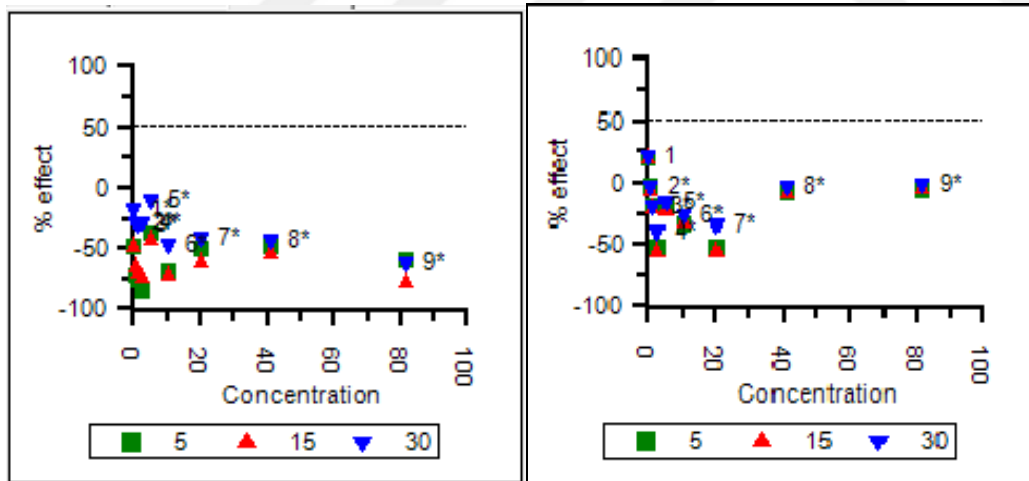
PAH kör

PAH (parçalama sonrası)



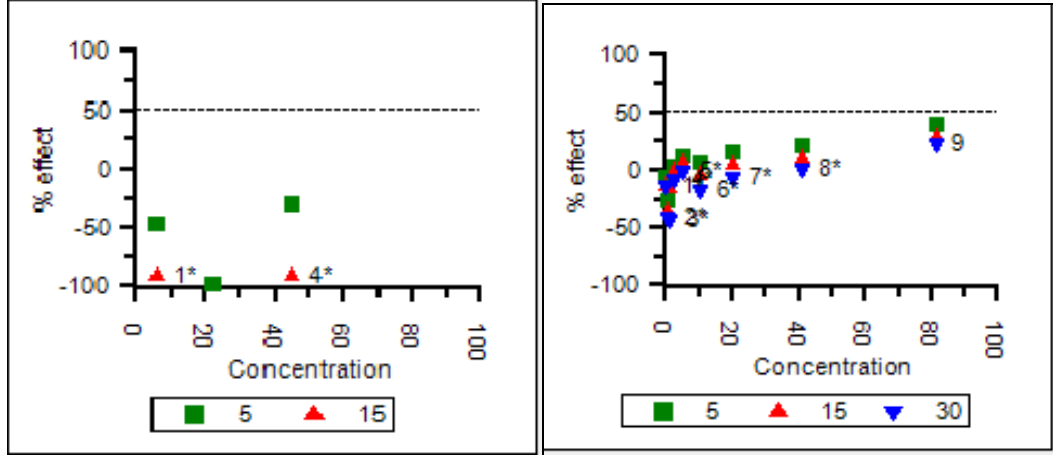
PTA kör

PTA (parçalama sonrası)



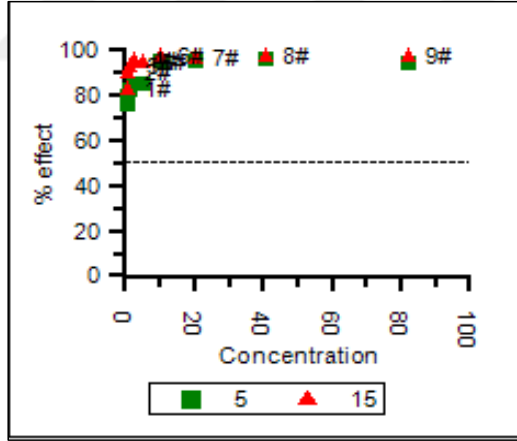
PAH-PTA kör

PAH-PTA (parçalanma sonrası)

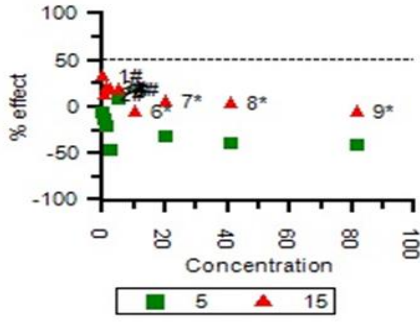


Şekil 4.65 Mikrotoks cihazı ile referans mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen toksisite analiz sonuçları

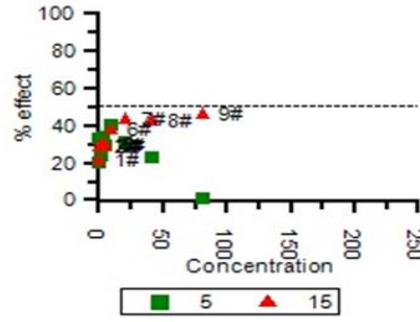
Pozitif kontrol



Şekil 4.66 Pozitif kontrol olarak sodyum azid (NaN_3) analiz sonucu

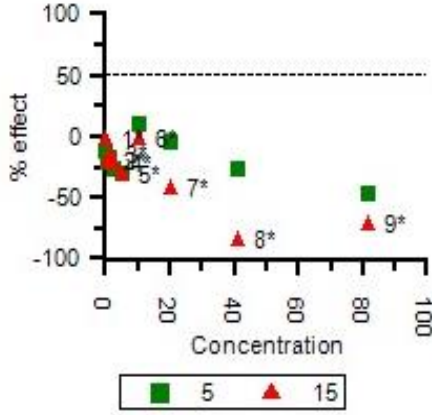


+ 4°C PTA grubu



27 °C PTA grubu

Şekil 4.67 Mikrotoks, 18.ay sonuçları



Şekil 4.68 Tank reaktör çıkış örnekleri toksisite analiz sonucu

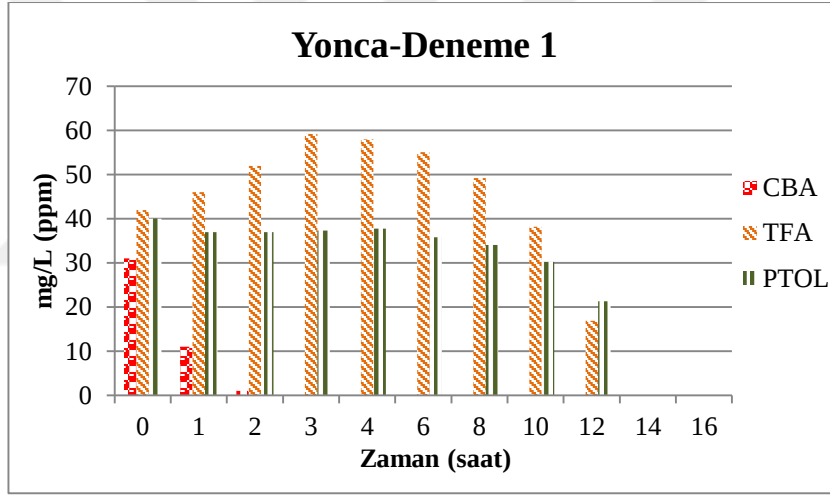
4.8 Etkinliği En İyi Ürünlerin Petrokimya Endüstrisi Atık Suyu Deneme Sonuçları

Hazırlanan ürün gruplarından her bir taşıyıcı grubu kendi içerisinde ayrı değerlendirilmiş, +4°C'de 12 ay boyunca hem canlılığın hem de biyoparçalanma etkinliğinin diğerlerine göre en iyi olduğu belirlenen 'yonca', 'soya' ve 'ayçiçeği+skim milk' grupları biyoaugmentasyon için seçilmiştir.

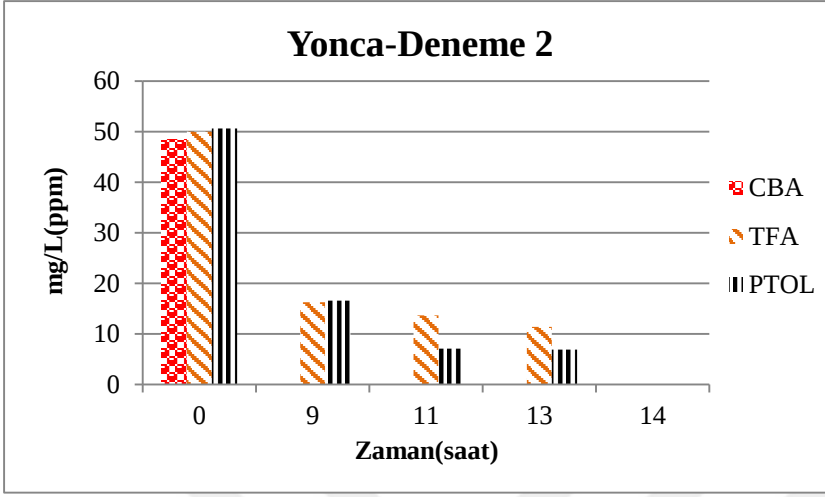
Liyofilize bakterilerin aşılandıktan sonra arıtım sisteminde varlıklarının devam edip etmediğinin bilinmesi ve aynı süreçte biyoparçalama aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanarak çalışmalar yapılmıştır.

4.8.1 CSTR İçinde Ürünlerin Biyoparçalama Aktivitesi Sonuçları

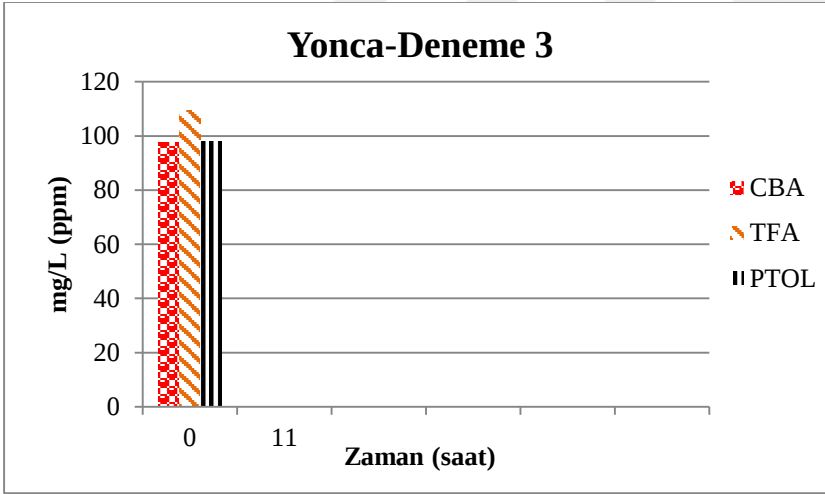
Çamur olgunlaştırılmasına yaklaşık 60 gün devam edilmiştir. Sonrasında etkinliği en iyi olan ürünün reaktör denenmesi aşaması gerçekleştirilmiştir. Tank reaktör içerisinde seçilen ürünler için kurulan (Bkz.Tablo 3.21) deneme sonuçları ve kör reaktörünün biyoparçalama etkinlikleri Şekil 4.69'dan Şekil 4.84'e kadar gösterilmiştir.



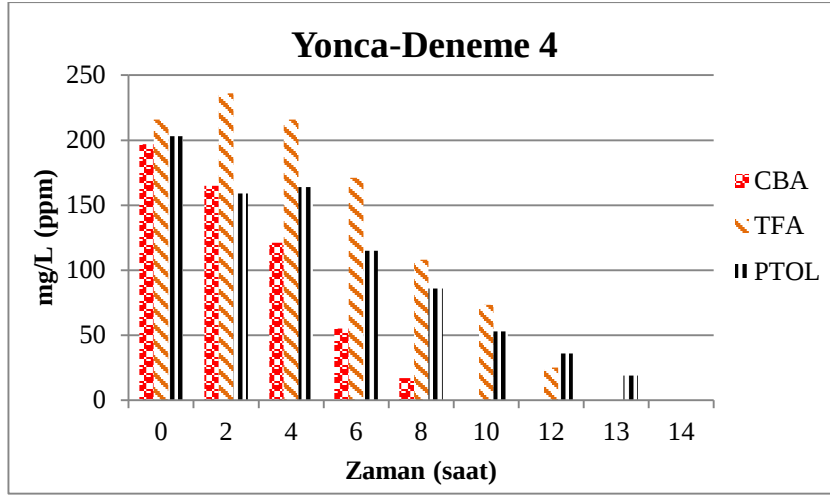
Şekil 4.69 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



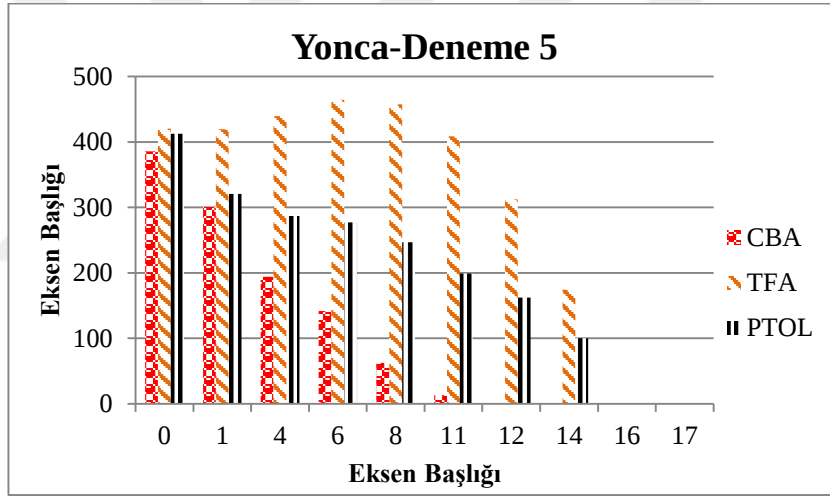
Şekil 4.70 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.71 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

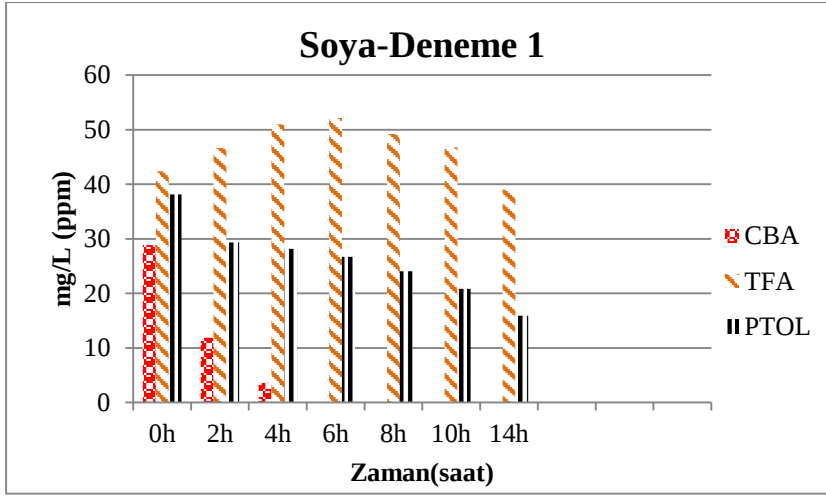


Şekil 4.72 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

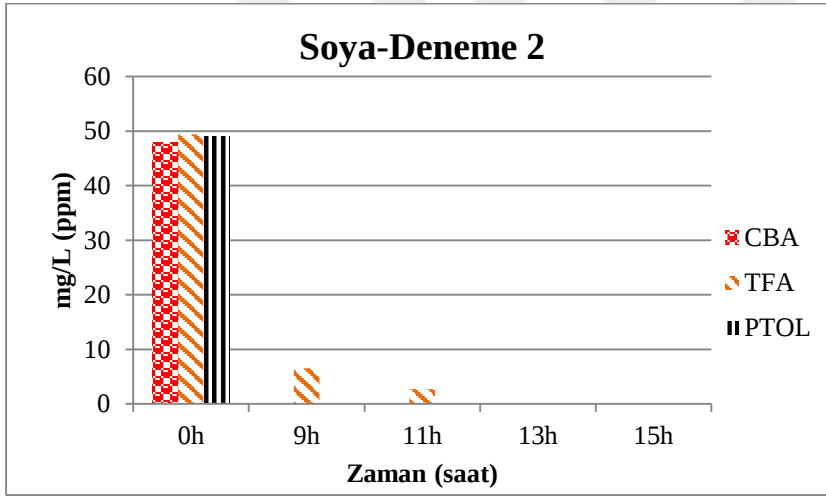


Şekil 4.73 Taşıyıcı olarak yonca içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

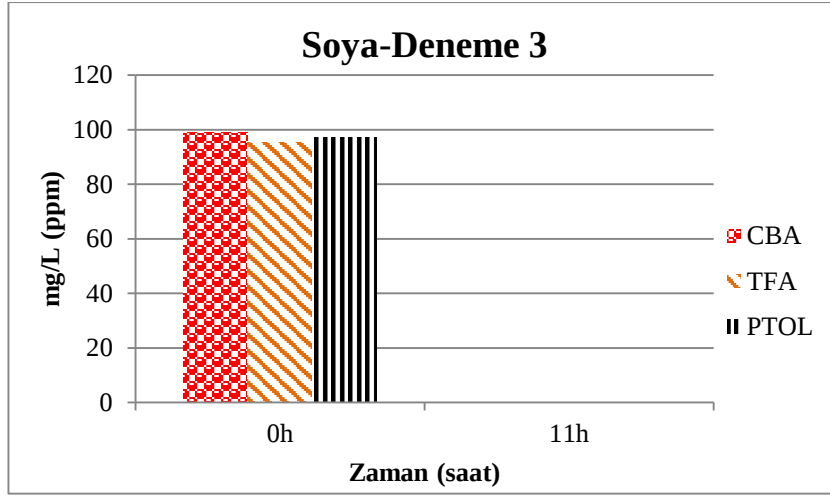
Yonca içeriğine sahip ürünün kullanıldığı reaktör denemelerinde 12. ay raf ömrüne sahip ürünlerin biyoparçalama aktivitesine bakıldığında, 1. denemede kimyasalların tamamen tükenmesi 12-14 saat içerisinde gerçekleşmiştir, reaktör içerisindeki kimyasal konsantrasyonu arttıkça kimyasalların giderim süresi 14-16 saat aralığına uzamıştır.



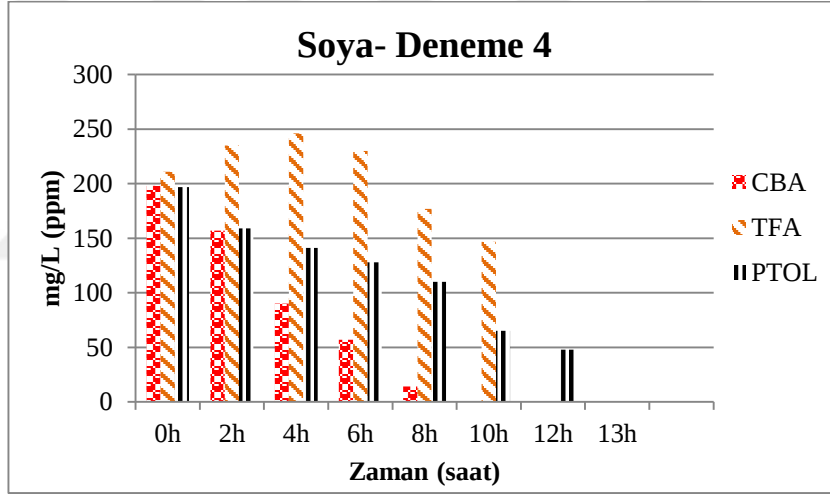
Şekil 4.74 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



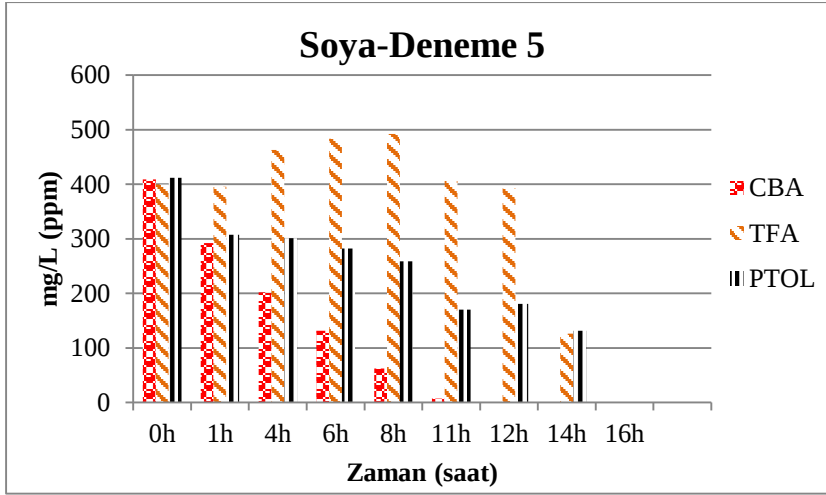
Şekil 4.75 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.76 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

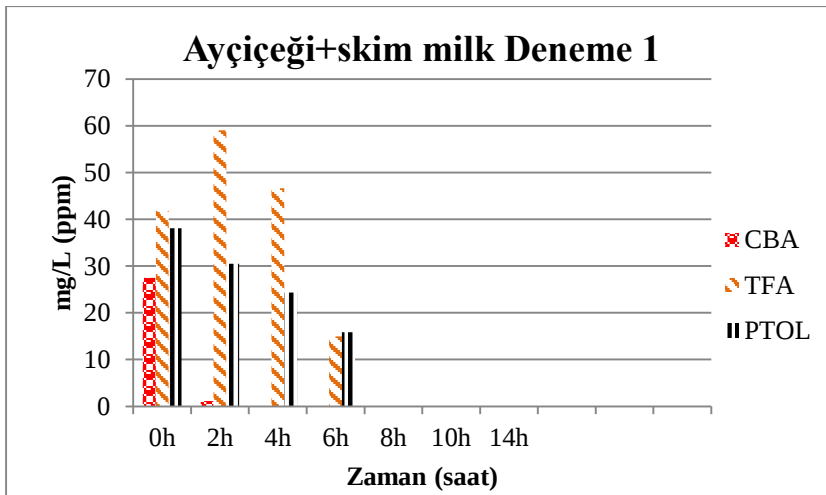


Şekil 4.77 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

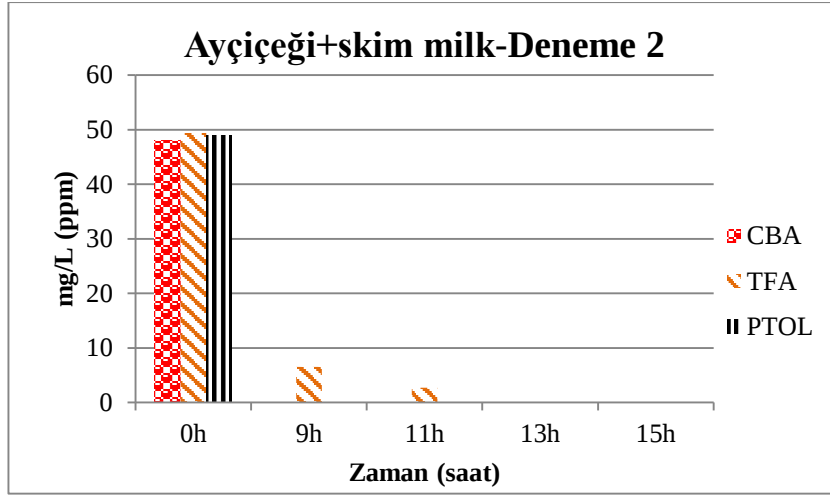


Şekil 4.78 Taşıyıcı olarak soya içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

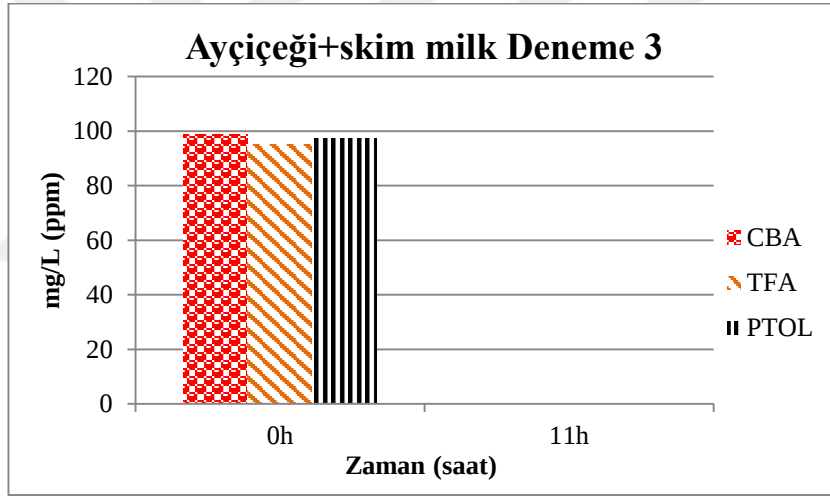
Soya içeriğine sahip ürünün kullanıldığı reaktör denemelerinde 12. ay raf ömrüne sahip ürünlerin biyoparçalama aktivitesine bakıldığında, 1. denemede kimyasalların tamamen tükenmesi 14-16 saat içerisinde gerçekleşmiştir, reaktör içerisindeki kimyasal konsantrasyonu arttıkça kimyasalların giderim süresi aynı kalmıştır.



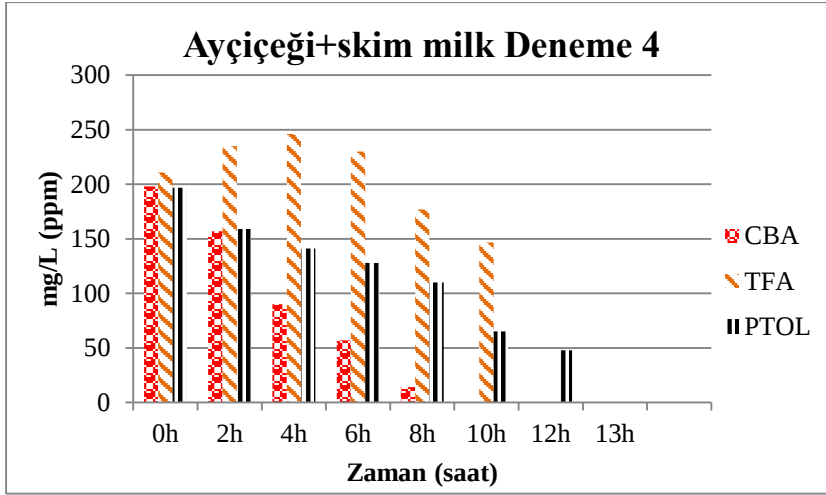
Şekil 4.79 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 110 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



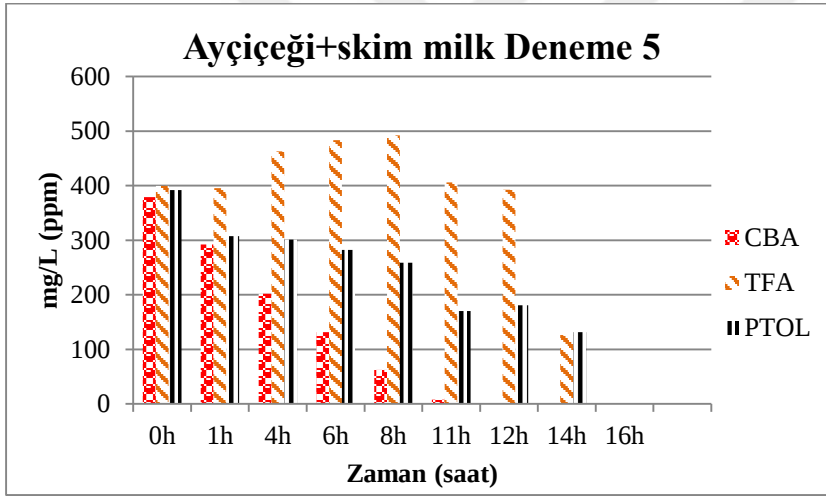
Şekil 4.80 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 150 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.81 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 300 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



Şekil 4.82 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 600 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği



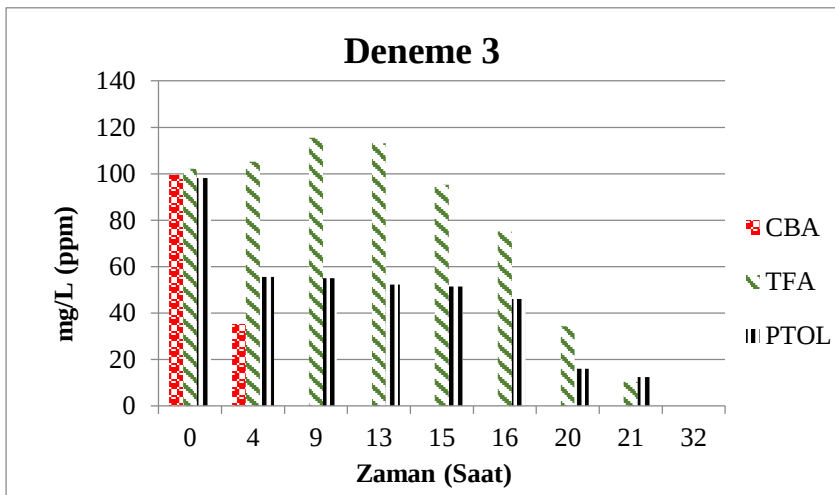
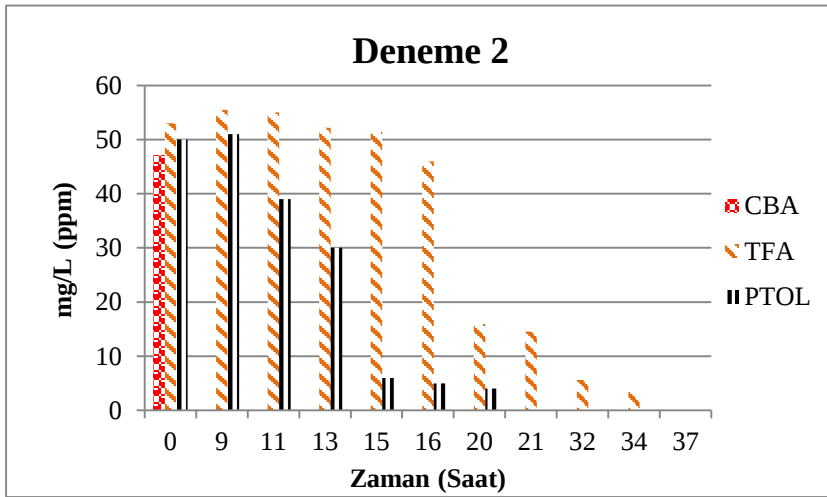
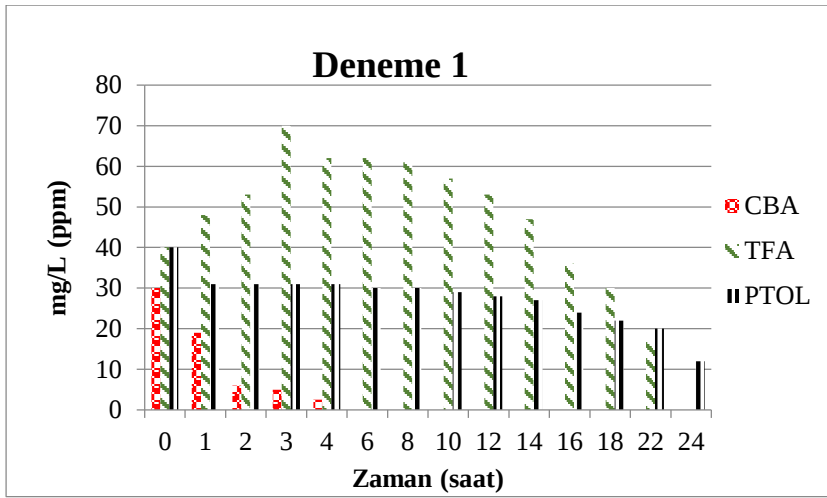
Şekil 4.83 Taşıyıcı olarak ayçiçeği+skim milk içeren liyofilize ürünün, toplam 1200 mg/L kimyasal konsantrasyonda CSTR’de biyoparçalama etkinliği

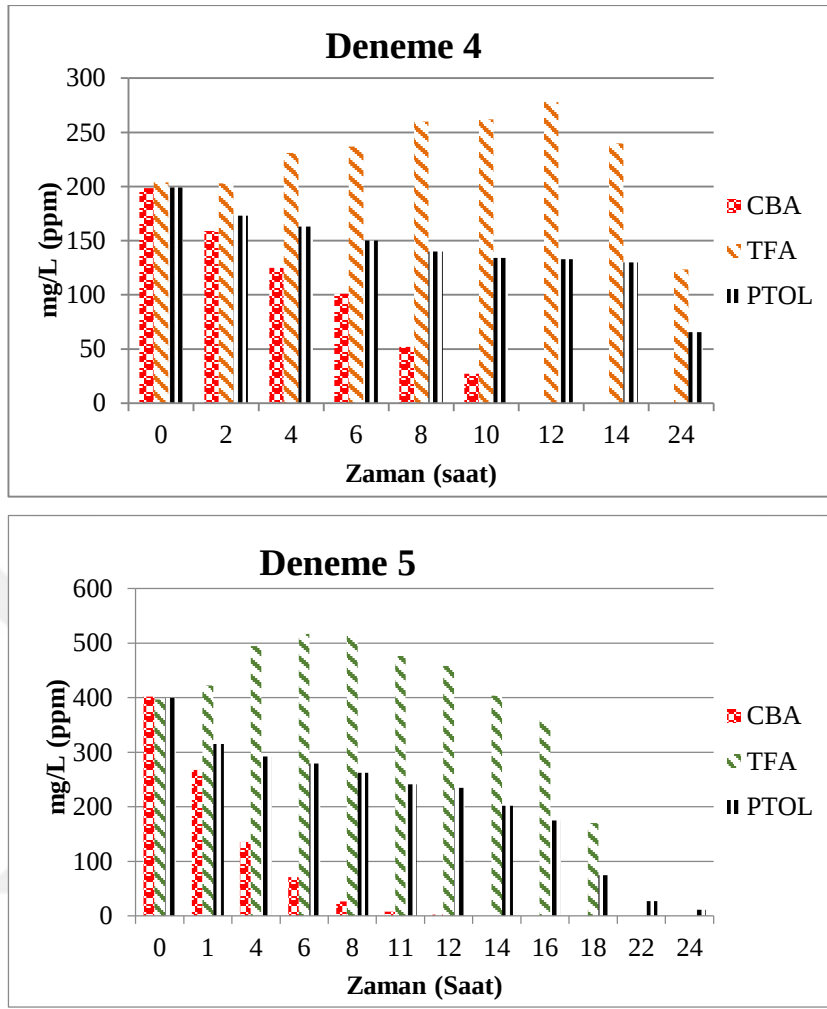
Ayçiçeği+skim milk içeriğine sahip ürünün kullanıldığı reaktör denemelerinde 12. ay raf ömrüne sahip ürünlerin biyoparçalama aktivitesine bakıldığında, 1. denemede kimyasalların tamamen tükenmesi 6-8 saat içerisinde gerçekleşmiştir, reaktör içerisindeki kimyasal konsantrasyonu arttıkça kimyasalların giderim süresi 14-16 saat aralığına uzamıştır.

Tez çalışmasında CSTR içerisinde, atık suda bulunan yerel mikrobiyal yapının etkisi olduğunu düşündüğümüzde ilave olarak kullanılan ürünlerin içeriğinde ki

izolatların biyoparçalamaya olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir. Liyofilize kuru ürünler, sentetik atık su ile beslenen reaktörlerde biyoparçalama aktivitesini ve canlılığını sürdürmeye devam etmiştir. Bazı gruplarda konsantrasyon artarken, parçalama süresi kısalmıştır. Mikroorganizmaların kimyasallara karşı güçlü bir adaptasyon sağlayıp daha hızlı bir şekilde kimyasalları parçaladığını söyleyerek bu durumu açıklayabiliriz. Real time PCR sonuçlarına bakacak olursak kimyasalların ilk arttığı konsantrasyonlarda izolatların sayısının çoğunlukla arttığı görülmektedir, bu durum biyoparçalama süresinin kısalmasını desteklemektedir. Yonca ürün içeriği yüksek konsantrasyondaki TFA, p-TOL ve 4-CBA kimyasalını en iyi şekilde parçalayan gruptur. Bu durum 12 ay raf ömrü bulunan üründe bulunan izolatların CSTR ölçeğinde biyoparçalama etkinliğindeki başarıyı bize göstermiştir.

Çalışmalar süresince liyofilize ürünün ilave edilmediği yerli flora ile çalışılan kontrol reaktöründe denemeler süresince 3 kimyasalın 24 saatte dahi varlığını sürdürmüş olduğu görülmüştür. (Şekil 4.84). Yerli mikroorganizmaya ilave olarak tez çalışmasında kullanılan liyofilize organizmaların biyoparçalama süresini azalttığı görülmüştür.



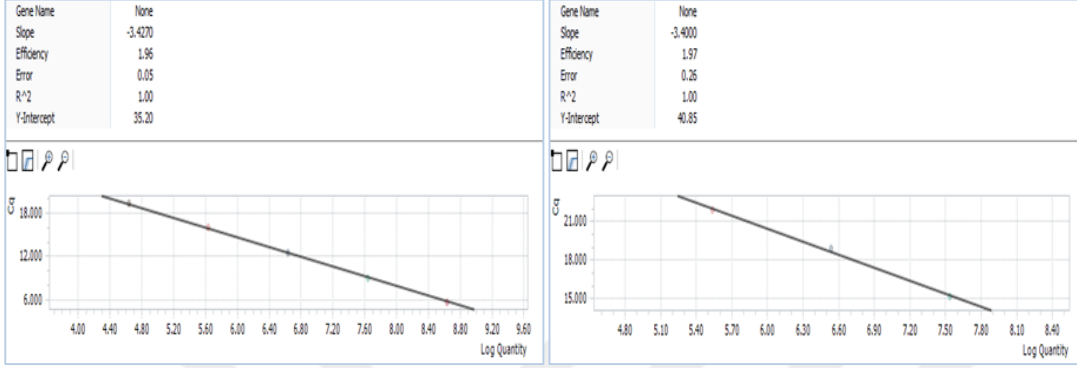


Şekil 4.84 Kontrol tank reaktörüne ait biyoparçalama etkinliği sonuçları

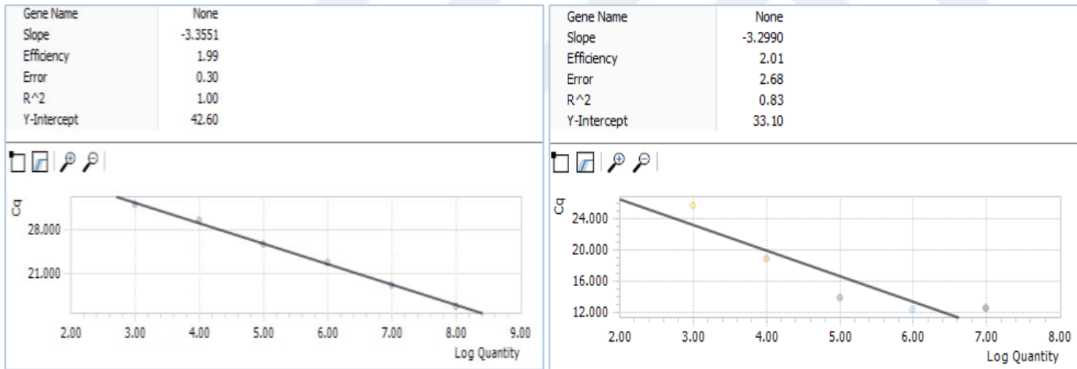
4.8.2 Real Time PCR Sonuçları

Biyoparçalama süresi boyunca reaktör sisteminden elde edilen toplam aktif çamur DNA'ları kullanılarak *P.putida*, *Chryseobacterium* sp., *M.luteus*, *C.testosteroni*, *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *A.nicotianae*, *Arthrobacter* sp., *R.planticola*, *P.fluorescens* ve total bakteri primerleriyle uygun PCR koşullarında analiz gerçekleştirilmiştir. İzolatların ve total bakterilerin moleküler biyolojik olarak takibi sağlanmıştır.

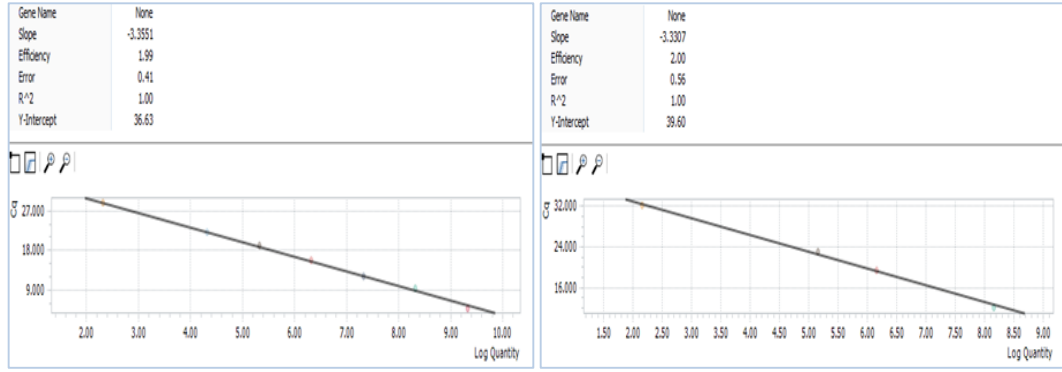
Her bir bakteri için maksimum 10^8 - minimum 10^2 kopya DNA içeren uygun seyreltmeler hazırlanarak q-PCR’da oluşturulan standart grafikler Şekil 4.85; 4.86; 4.87; 4.88; 4.89’da gösterilmiştir.



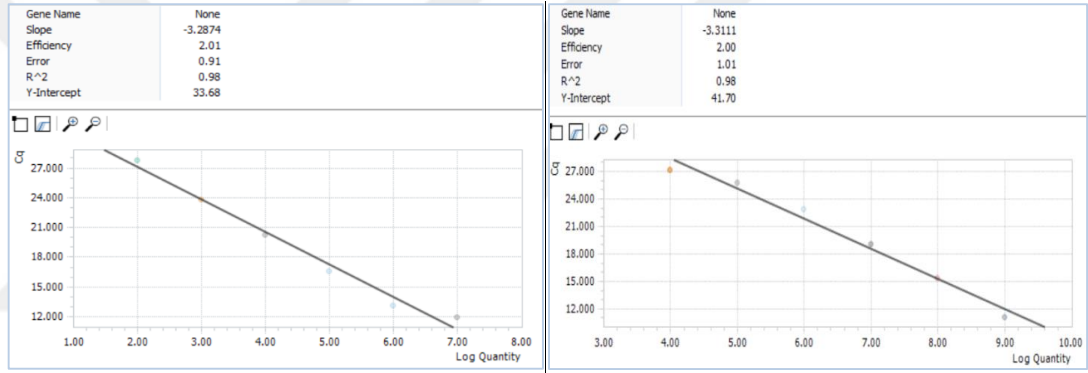
Şekil 4.85 *Acinetobacter sp.* ve *P. fluorescens* izolatına ait standart eğri grafikleri



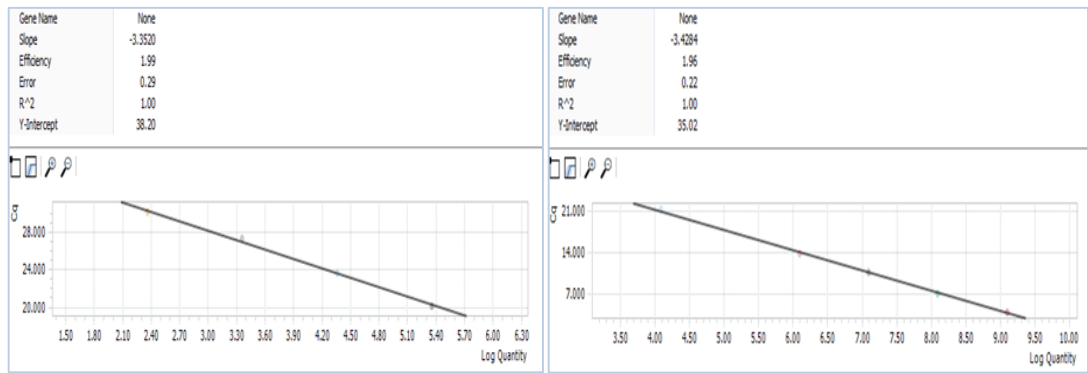
Şekil 4.86 *R. planticola* ve *C. testosteroni* izolatlarına ait standart eğri grafikleri.



Şekil 4.87 *Chryseobacterium* sp. ve *M. luteus* izolatlarına ait standart eğri grafikleri



Şekil 4.88 *P. putida* izolatu ve total bakteriye ait standart eğri grafikleri

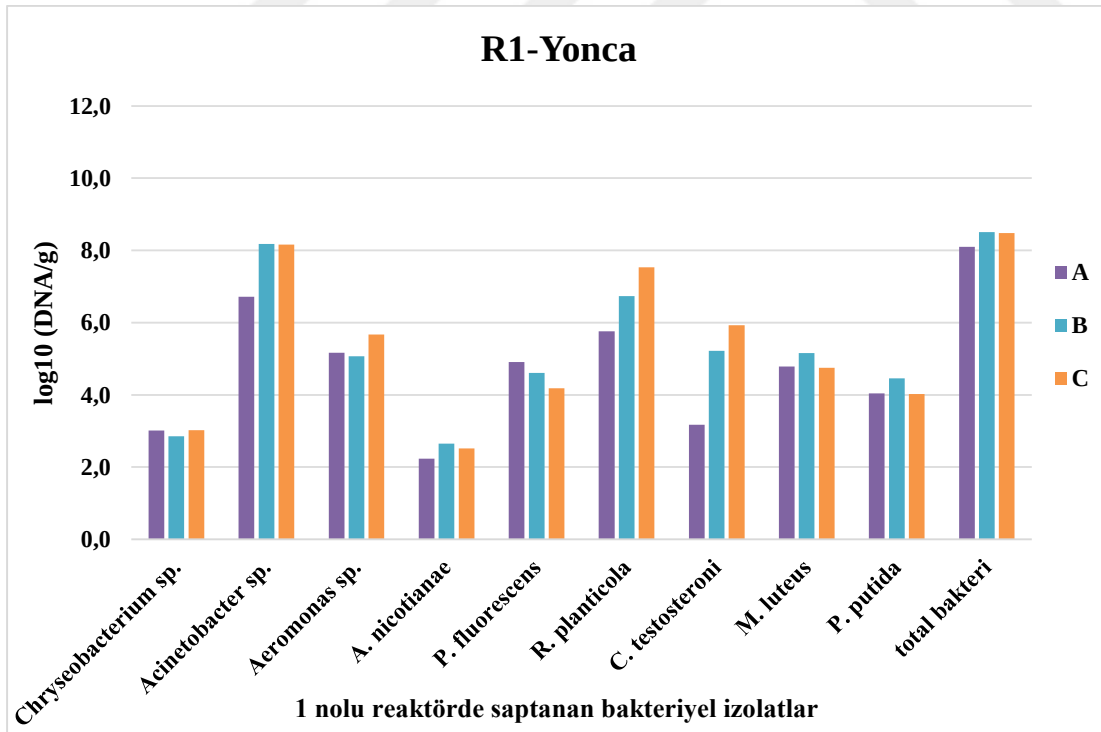


Şekil 4.89 *Aeromonas* sp. ve *A. nicotianae* izolatlarına ait standart eğri grafikleri

Sistemdeki izolatlar ile toplam bakterilerin takibi için 4 reaktörde aynı miktarda ve belirlenen oranlarda hidrokarbon eklemesi yapılmıştır. Mikrobiyolojik takibin HPLC ile biyoparçalanma durumlarıyla eş zamanlı olabilmesi için belirlenen aralıklarla örnek alınarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Her çalışmada daha önce standart eğri grafiği oluşturulan ilgili standart DNA'dan 10^5 mertebesinde örnek konularak bilinmeyen örnekteki DNA molekül miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar gerekli kat sayılar ile çarpılarak DNA molekülü/g aktif çamur olacak şekilde hesaplanmıştır. Hesaplanan DNA molekülleri logaritmik olarak aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.90; 4.91; 4.92; 4.93).

Reaktörde çalışılan “yonca” liyofilize ürünün biyoparçalama öncesi ve sonrasında bakteriyel izolatların sayıları Şekil 4.90’da gösterilmiştir. Şekilde yer alan gösterge A,B,C reaktörden alınan farklı zamanları temsil etmektedir, şeklin altında açıklaması yer almaktadır.

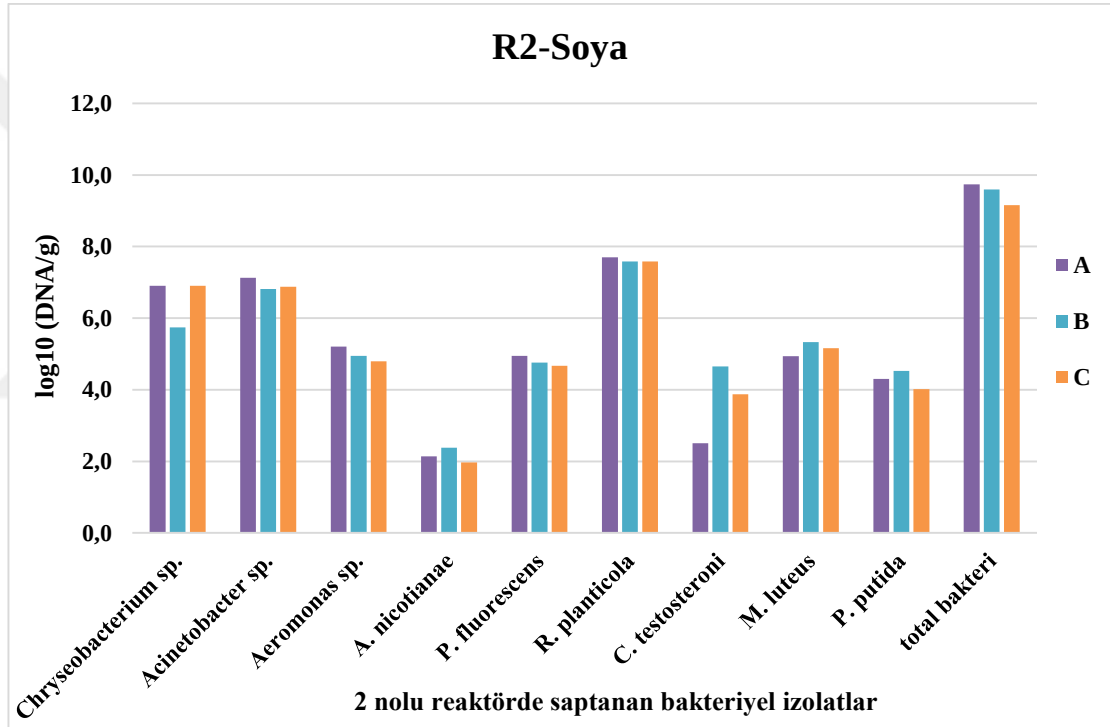


Şekil 4.90 Liyofilize ürün olarak yonca'nın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize kuru karışım ürünü eklemeyen önce, B: Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, C: Reaktörde kimyasalın tükendiği an (1200 mg/L)

Sonuçlar *Acinetobacter*, *Raoutella* ve *Comamonas*'ın reaktörde kimyasalın tükendiği an en çok bulunan kuru karışım eklenmeden önce ile kıyaslandığında artış sağlamış cinsler olduğunu göstermiştir.

Reaktörde çalışılan “soya” liyofilize ürünün biyoparçalama öncesi ve sonrasında bakteriyel izolatların sayıları Şekil 4.91’de gösterilmiştir.

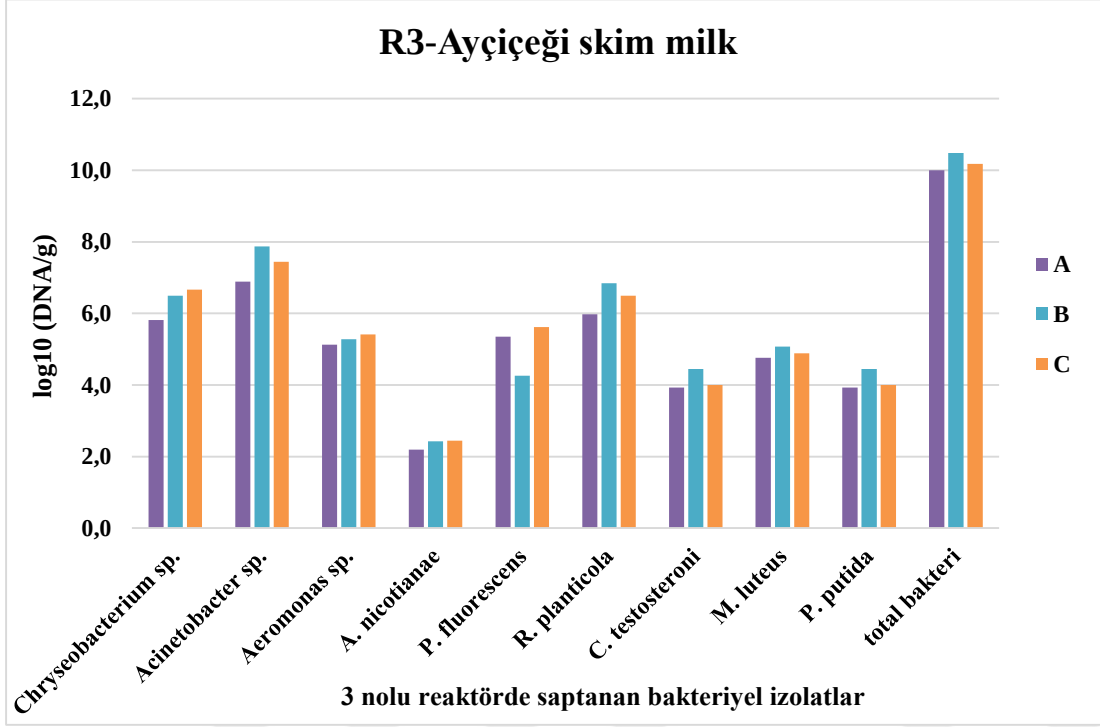


Şekil 4.91 Liyofilize ürün olarak soya'nın kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize kuru karışım ürünü eklemeyen önce, B: Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, C: Reaktörde kimyasalın tükendiği an (1200 mg/L)

Sonuçlar *Comamonas*, *Micrococcus* ve *Chryseobacterium*'un reaktörde kimyasalın tükendiği an en çok bulunan kuru karışım eklenmeden önce ile kıyaslandığında artış sağlamış cinsler olduğunu göstermiştir.

Reaktörde çalışılan “ayçiçeği+skim milk” liyofilize ürünün biyoparçalama öncesi ve sonrasında bakteriyel izolatların sayıları Şekil 4.92’de gösterilmiştir.

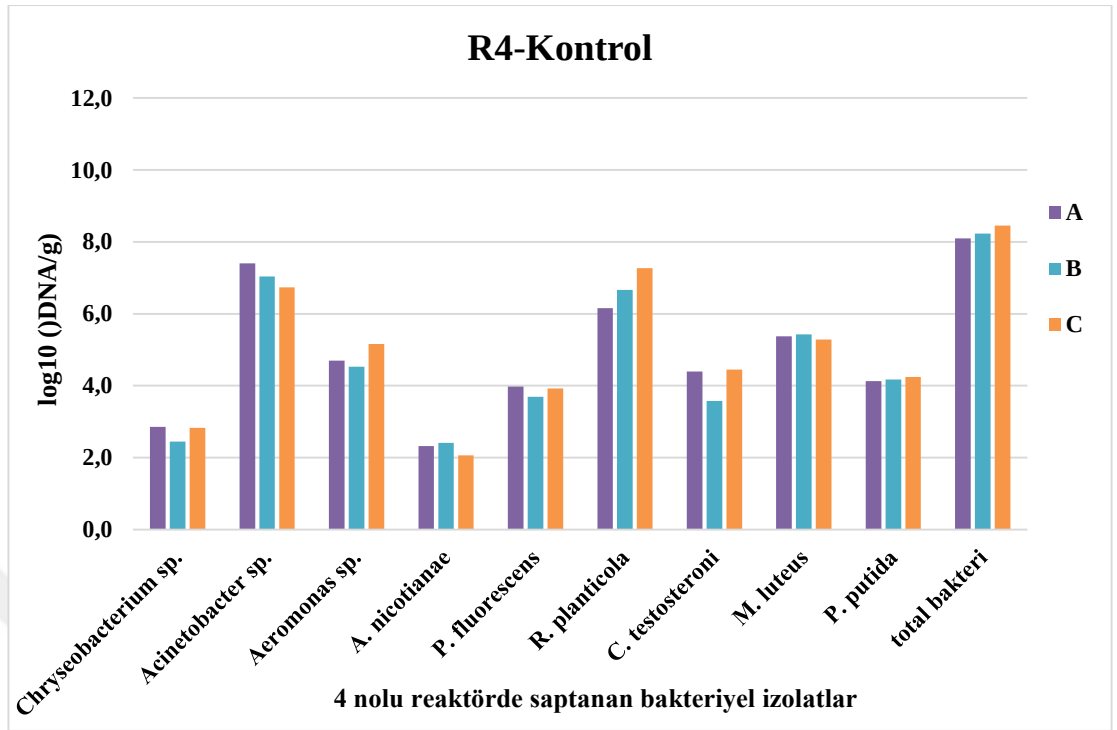


Şekil 4.92 Liyofilize ürün olarak ayçiçeği+skim milk’in kullanıldığı reaktörden alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize kuru karışım ürünü eklemeyen önce, **B:** Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, **C:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (1200 mg/L)

Sonuçlar *Chryseobacterium*, *Acinetobacter* ve *Aeromonas*’ın reaktörde kimyasalın tükendiği an en çok bulunan kuru karışım eklenmeden önce ile kıyaslandığında artış sağlamış cinsler olduğunu göstermiştir.

Kontrol reaktör, bakteriyel izolatların sayıları Şekil 4.93’te gösterilmiştir.



Şekil 4.93 Kontrol reaktöründen alınan DNA örneklerindeki bakteriyel izolat sayılarının log10 tabanında gösterimi

A: Reaktöre liyofilize kuru karışım ürünü eklemeyen önce, **B:** Reaktöre liyofilize ürün eklendikten sonra, **C:** Reaktörde kimyasalın tükendiği an (1200 mg/L)

Her üç reaktör mikrobiyal flora üyeleri açısından incelendiğinde; logaritmik açıdan total bakteri sayılarında bir azalmanın olmadığı söylenebilir. Yonca ve soya grubunda *Comamonas testosteroni* 'nin sırasıyla 2 log ve 1 log, ayçiçeği skim milk grubunda *Chryseobacterium sp.* 'nin 1 log artış gösterdiği görülmüştür. Sayıca en az görülen bakteri sayısı *A.nicotianae* olmuştur. Başlangıç sayısı düşük olduğu için liyofilizasyon sürecinden zarar gördüğü düşünülmektedir. *P.Putida* izolatının her üç reaktörde başlangıç değerlerine göre anlamlı bir değişim sergilemediği gözlenmiştir.

5 TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hızla artan kentleşme ve hızlı sanayileşme, artık suyun kendi kendini temizleyememesi sonucunda çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Venkata Mohan et al. 2008). Ksenobiyotikler olarak adlandırılan yabancı bileşikler çevresel sistemlere çok fazla deşarj edilmektedir. Kentsel atıksularda (evsel, endüstriyel, ticari kuruluşlar, hastaneler, okullar, üniversiteler ve şehir yağmur suları) ksenobiyotik özellikte birçok organik bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler alifatik, polisiklik ve klorinlenmiş aromatik hidrokarbonlar, fenoller, fitalatlar, eterler, terpenler, fosfat esterleri, aldehidler, steroller, asitler ve onların esterleri gibi farklı kategorilerde toplanırlar (Bitton 2005). Çoğu rekalsitrant hidrokarbonlar toksik ve kanserojendir, besin zincirine girebilir ve biyolojik dokularda birikebilirler (Perelo 2010). Günlük hayatta kullanılan birçok ürünün petrokimya endüstrisi ürünleri olduğu düşünülürse sağlık açısından tehdit altında olduğu yadsınamaz bir gerçektir.

Endüstriyel atık sular, normal evsel atık sular ile karşılaştırıldığında göreceli olarak daha yüksek konsantrasyonlarda rekalsitrant bileşikleri içermektedir. Mikroorganizmaların biyojeokimyasal döngülerde roller üstlenerek, tüm doğal organik bileşikler parçalayabildikleri düşünülmektedir. Doğal ya da antropojenik olarak üretilen substratları çoğunlukla H_2O , CO_2 ya da CH_4 'e dönüştürürler (Bitton 2005).

Hidrokarbonlar, çevre kirliliğinden sorumlu ana kirleticilerden kabul edilmektedirler. Aerobik degradasyon, birçok ksenebiotik hidrokarbonu ortadan kaldırmak için yaygın olarak kullanılan uygun maliyetli bir süreçtir. Biyodegradasyon, bioaugmentasyon ve biyostimülasyon ile gerçekleşen bir prosestir. Bioaugmentasyon, zenginleştirilmiş bir mikrobiyal konsorsiyumun kontamine sahaya inokülasyonu; biyostimülasyon ise topraktaki besin maddelerinin inoküle edilmesiyle yerli mikroorganizmaların uyarılması işlemidir. Bununla birlikte, her tekniğin etkinliği, kontamine bölgenin fiziko – kimyasal özelliklerine, kontaminasyon süresine ve yerli mikrobiyal popülasyona bağlıdır. Bento ve arkadaşları (Bento et al. 2005), dizel yağ ile kirlenmiş toprakta bioaugmentasyon, biyostimülasyon ve doğal atenüasyon ili ilgili karşılaştırmalı bir çalışma yürütmüşlerdir. En yüksek degradasyon oranının (%75) bioaugmentasyon ile olduğunu ve bunu doğal atenüasyonun takip ettiğini

göstermişlerdir. Karşılaştırmalı bir çalışmada, tortu numuneleri yapay olarak üç farklı yoğunlukta ham petrol (3, 30 ve 60 g /kg toprak) ile kontamine edilmiştir. Sırasıyla 3g, 30g ve 60 g ham petrolün ortama biyodegradasyonu; bioaugmentasyon için %73.89, %73.76 ve %58.31, biyostimülasyon için %52.11, %58.36 ve %43.02 olmuştur. (Mohajeri et al. 2017). Bununla birlikte, petrol hidrokarbonlarının karmaşık kompozisyonları nedeniyle hiçbir mikroorganizma tüm fraksiyonları tek başına etkili bir şekilde degrede edemez. Bu nedenle bioaugmentasyon işlemleri; arıtma işlemi sırasında kendilerine uygulanan sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen, besin bulunabilirliği, toksisite ve mikrobiyal basınç gibi etkenleri içeren çevresel koşullar altında dayanıklılığını sürdüren, karışık mikroorganizma kültürleri kullanılarak gerçekleştirilen bir arıtma sürecidir (Diallo et al. 2020).

Bu çalışmada, petrokimya endüstrisi atık sularından elde edilen bakterilerin bir konsorsiyum oluşturarak, karışık kültür şeklinde oluşturulacak toz ürün içeriğinde kullanılması amaçlanmıştır. 16 aerobik bakteri suşu moleküler yöntemlerle karakterize edilmiştir. Filogenetik analizler, izolatların *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Arthrobacter*, *Raoultella*, *Micrococcus* ve *Aeromonas* cinslerine ait olduğunu göstermiştir. Bu mikroorganizmalar petrokimyasal atık sulardan en çok izole edilen mikroorganizmalar arasındadır. Hidrokarbon degradasyonlarında etkili oldukları ve ortamda her yere dağıldıkları daha önce ki çalışmalarda bildirilmiştir (Wentzel et al. 2007; Chebbi et al. 2017). *Acinetobacter* spp. M-1 suşu C13 ile C14 arasındaki alkanları tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır (Sakai et al. 1994). Bir diğer çalışmada, ağır metal toleranslı ve hidrokarbon parçalayıcı 16 bakteri izole ve karakterize edilmiştir. Bunlardan 12 suş, *Acinetobacter* cinsine aittir (Méndez et al. 2017). *Pseudomonas* suşları, aromatik hidrokarbonların (monoaromatik ve poliaromatik) degrede edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh and Tiwary 2017). Koshlaf ve arkadaşları (Koshlaf et al. 2019), PAH ile kontamine olan topraklardaki mikrobiyal popülasyonun biyostimülasyon üzerindeki etkisini değerlendirdi. Sonuçlar, *Pseudomonas* cinsinin diğer bakteri topluluklarına kıyasla artan bollukla en büyük değişikliği gösteren cins olduğunu gösterdi. *Pseudomonas* spp. MTS-1 suşu'nun, diğer izole mikroorganizmalara göre yüksek molekül ağırlıklı PAH' larda daha yüksek parçalama oranının olduğu ve asidik, alkali ortamlara karşı yüksek

tolerans gösterdiği kaydedilmiştir (Kuppusamy et al. 2016;Kuppusamy et al. 2017). Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların biyolojik olarak parçalanmasını bakteri konsorsiyumu açısından değerlendirdiğimizde: *Pseudomonas sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Arthrobacter nicotinae* ve R1 kod'lu *Pseudomonas putida*'nın TFA'da; PT4 ve T5 kod'lu *Pseudomonas alkylphenolia* ve PT7 kod'lu *Pseudomonas putida*'nın p-TOL'de; *Comamonas testosteroni*, C6 kod'lu *Pseudomonas putida* ve *Chryseobacterium indolegenes* 4-CBA'da; *Pseudomonas fluorescens* ANT'de; *Arthrobacter protophormiae*, *Acinetobacter sp.* ve *Micrococcus luteus* FLO'de; *Raoultella planticola* ve *Aeromonas hydrophila* PYR'de daha yüksek parçalama oranlarına sahip olduğunu söylebiliriz.

KOİ değeri çok yüksek olan bir petrokimya PTA fabrikasının saflaştırılmış tereftalik asit üretimi prosesinde büyük miktarlarda atık su üretilir. 1 ton TFA üretimi sırasında, 5–20 g/L'lik çok yüksek KOİ değerine sahip yaklaşık 3–4 m³ atık su üretildiği tahmin edilmektedir. PTA atık su üretiminin farklı bölümleri fırçalama, temizleme ve yıkama, katalitik geri kazanım ve asitli suyu damıtmaktır. Diğer bölümlere göre en büyük miktarda atık su fırçalama bölümünde oluşmaktadır (Garg and Prasad 2017). Üretim sürecinde PTA atık suyunun sıcaklığı 45°C civarında kalmakta ve bazen 90°C'nin üzerine çıkabilmektedir (Li et al. 2014).

Tereftalik asit (TFA), benzoik asit (BA) ve p-toulük asit (p-TOL), saflaştırılmış tereftalik asit üretimi sırasında oluşan atık suyun başlıca aromatik bileşikleridir. Konsantrasyon sırasına göre bunlar TFA> BA> p-TOL'dür (Garg and Prasad 2017). Diğer bileşikler, yani ftalik asit (FA), 1,2-benzen dikarboksilik asit, etilbenzen, p-toluil alkol, benzaldehit, p-asetoksi, izofatalik asit, trimellitik (1,2,4-benzen-tri-karboksilik asit), p-metil benzen asetat, asetofenon, metil asetat, kobalt asetat, manganaz asetat, hidro-bromür ve o-toluik asit (2-metil benzoik asit) çok düşük bir konsantrasyonda bulunur (Zhang et al. 2010;Garg and Prasad 2016).

Ftalatlar olarak da adlandırılan ftalat esterler, plastik polimerlerin esnekliğini, uzayabilirliğini ve işlenebilirliğini plastikleştirici olarak davranarak artırmak (Graham 1973) veya parfüm sabitleyiciler, yağlayıcılar, yapıştırıcılar, hava sıyırma ve emniyet camı yapmaya yardımcı olmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aftring et al.

1981). Yapı malzemeleri, giyim, kozmetik, tıbbi cihazlar, takma dişler, çocuk oyuncakları, temizlik malzemeleri ve böcek ilaçları dahil olmak üzere pek çok tüketici ürünü, bu kimyasallar ailesinin belirli üyelerini içerir (Schettler 2006). Yaygın kullanımları nedeniyle, ftalatlar çevrede en fazla bulunan endüstriyel kirleticilerden biri haline gelmiştir. Ftalatlar, üretim ve işletme sırasında endüstriyel atık su yoluyla çevreye girebilir (Latini 2005). Ftalat içeren tüketici ürünleri, doğrudan temas ve kullanım yoluyla, dolaylı olarak diğer ürünlere sızma yoluyla veya genel çevre kirliliği yoluyla insan maruziyetine neden olabilir (Schettler 2006). Ftalatlar, hayvanlarda erkek, dişi ve yavruların üreme sistemlerini olumsuz etkiler, hipospadias, kriptorşidizm, azalmış testosteron üretimi, azalan sperm sayısı ve sperm DNA hasarı gibi sorunlara neden olabilir (Lovekamp-Swan and Davis 2003; Lottrup et al. 2006). Uteronun ftalat maruziyetinin daha kısa gebelik süresi ile ilişkili olduğu belgelenmiştir (Latini et al. 2006).

Doğal ekosistemlerde, kanalizasyonda ve laboratuvar kültürlerinde ftalat esterlerinin biyodegradasyonu çok sayıda rapor edilmiştir ve bakteriler, ftalat biyodegradasyonda ana unsurlar olarak kabul edilmektedir (Keyser et al. 1976). Pek çok mikroorganizma, ftalatı aerobik olarak bozma yetenekleri nedeniyle çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir (Chang and Zylstra 1998). Genellikle ftalat parçalayan bakteriler, Gram negatif bakteriler *Burkholderia* (Chang and Zylstra 1998), *Comamonas* (Schläfli et al. 1994), *Delftia* (Shigematsu et al. 2003), *Pseudomonas* (Nomura et al. 1992), ve Gram pozitif bakteriler *Arthrobacter* (Eaton 2001), *Terrabacter* (Habe et al. 2003), *Mycobacterium* (Stingley et al. 2004). Örneğin, Wang ve ark. New Jersey'deki Passaic Nehri çökeltilerinden dokuz adet ftalat parçalayan bakteri suşu izole etmişlerdir. Bunların *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas* ve *Arthrobacter* cinslerine ait oldukları gözlemlenmiştir. Aynı yerden izole edilmiş olsalar bile, büyüme için tek karbon ve enerji kaynağı olarak ftalat, izoftalat ve/veya tereftalatı kullanma konusunda farklı yeteneklere sahip oldukları görülmüştür (Wang et al. 1995).

İzoftalat ve tereftalat bozunmasından sorumlu genler, *Comamonas testosteroni* YZW-D'den klonlanmış ve sekanslanmıştır (Wang et al. 1995). İzoftalat degradatif gen kümesi (iphA2CBA1R), bir dioksijenaz oksijenaz, taşıma proteini, dehidrojenaz, dioksijenaz redüktaz ve bir düzenleyici protein için genleri kodlar. İzoftalat dioksijenaz

oksijenaz ve dioksijenaz redüktaz izoftalatı, cis-izoftalat dihidrodol'e daha sonra da cis-izoftalat dehidrodol dehidrojenaz ile protokateküata dönüştürür (Wang et al. 1995). İlginç bir şekilde, *C. testosteroni* YZW-D'deki tereftalat gen operonunun (tphRCA2A3BA1), iph genlerine komşu olduğu bulunmuştur. YZW-D'deki tereftalat degradatif gen operonu, düzenleyici bir protein, taşıyıcı proteini, dioksijenaz oksijenaz büyük alt birimi, dioksijenaz oksijenaz küçük alt birimi, dehidrojenaz ve redüktaz için genleri kodlar (Wang et al. 1995).

4-metil benzoate olarak da bilinen para-Toluik asit (p-TOL), PTA üretimi sırasında yaygın olarak üretilir. Atık sudaki p-TOL miktarı, PTA üretiminden sonra üretilen toplam KOİ'nin yaklaşık %30' udur (Noyola et al. 2000). Ayrıca p-TOL, antikorozyf katkı maddeleri, renklendiriciler, boya maddeleri, boya ham maddeleri olarak kullanılmaktadır (Maki and Takeda 2000). Bununla birlikte p-TOL, tehlikeli ve toksik yapısı nedeniyle insanlar için çok zararlıdır. USEPA tarafından tehlikeli atık madde olarak kabul edilir ve öncelikli kirleticiler listesinde kategorize edilmiştir (Shirota et al. 2008). p-TOL'un toksik ve kanserojenik etkileri göz önüne alındığında, kirli alanlardan güvenli bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamak için çevre dostu, uygun maliyetli ve verimli tekniklerin oluşturulması gerekmektedir. Mikrobiyal degradasyon, hidrokarbonların kirlenmiş ekosistemlerden uzaklaştırılması için önemli bir yaklaşımı temsil eder. Bu bağlamda biyoremediasyon, p-TOL'un uzaklaştırılması için önerilen bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Önceki çalışmalar, bakteriyel kültür ortamının optimizasyonunun biyodegradasyon sürecini güçlendirdiğini göstermiştir (Fan et al. 2004). Kültür ortamında ki farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının varlığı biyodegradasyon sürecinde önemli bir rol oynar (Varjani and Upasani 2016; Varjani and Upasani 2019).

Bacillus, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* p-TOL bozucu olarak rapor edilen bakteri suşlarıdır (Phale et al. 2007). Bu mikroorganizmalar, aromatik bileşikler Rieske non-hem demir dioksijenaz da denilen halka hidroksile edici dioksijenaz (RHDs) enzimleriyle aerobik olarak degrade ederler. RHD'ler α_n/β_n olmak üzere iki alt birimden oluşurlar ve Rieske-tip Fe_2S_2 merkezi içerirler. Aromatik bileşiklerin ilk oksidasyonunun aktif bölgesinde

mononükleer demir yer alır (Verma et al. 2019). Toluat 1,2-dioksijenaz (TADO) ve benzoate dioksijenaz (BADO), farklı türde benzoatların 1,2- dihidroksilasyonunu katalize eden toluat dioksijenazlardır. TADO, BADO' ya kıyasla daha geniş bir benzoat yelpazesini dönüştürür. TADO ve BADO'nun α/β alt birimlrri sırasıyla *xylXY* ve *benAB* genleri tarafından kodlanır (Ge et al. 2002; Ge and Eltis 2003).

Ancak Junker ve arkadaşları (Junker et al. 1997), iki *Comamonas* suşu (PSB-4 and T-2) tarafından p-TOL'ün degradasyonuna aracılık edilen başka bir yol tarif ettiler. Bu suşlar, sırasıyla *tsaMBCD* genleri tarafından kodlanan bir monooksijenaz (TsaMB) ve iki dehidrojenaz enzimi (TsaC ve TsaD) aracılığıyla üç aşamalı bir işlemle p-TOL'ü tereftalik aside indirger (Junker et al. 1997). Çeşitli çalışmalar, aromatik hidrokarbonların çeşitli mikroorganizmalar tarafından degradasyonundan sorumlu olan farklı enzimleri ve farklı yolları ele almıştır. Bunlar, *Alcaligenes eutrophus* B9'dan Benzoat-1,2- dioksijenaz, *Pseudomonas putida* mt-2'den toluat-12-dioksijenaz, *Pseudomonas* sp. suş NCIB 9816'dan naftalen 1,2-dioksijenaz, *Acinetobacter* sp. suş ADP1'den antranilat 1,2-dioksijenazdır (Verma et al. 2019). Birçok çalışma, aromatik hidrokarbonların degradasyonunda hidrokarbonların RHD genlerinin etkisini bildirmiştir (Zhao et al. 2015). Schlaflı ve arkadaşları (1994), *C. testosteroni* T-2'nin TPADO enzimleri aracılığıyla tereftalatı 1,2-dihidroksi-3,5-sikloheksadien 1,4-dikarboksilik aside indirgeme kabiliyetini bildirmiştir.

PAH'lar, ham petrol bileşenleri arasında en önemli ikinci hidrokarbon ailesidir. Ek olarak, oldukça toksik ve kanserojen bileşiklerdir. Bu nedenle, PAH'ların mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanmaları geniş çapta araştırılmıştır (Abdel-Shafy and Mansour 2016). Bakteriler, poliaromatik hidrokarbon halkası hidroksile edici dioksijenaz genleri (PAH-RHD) tarafından kodlanan halka hidroksile edici dioksijenaz enzimlerini kullanarak PAH'ları aerobik olarak parçalar (Song et al. 2015). PAH-RHD genleri, farklı bakteri taksonları arasında geniş bir şekilde dağılmıştır. Bununla birlikte, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin enzimatik dioksijenaz sistemleri, filogenetik olarak uzak genler tarafından kodlanır (Cébron et al. 2008). Daha önce PCR kullanılarak tanımlanan bazı PAH-RHD genleri

arasında *nahAc*, *phnAc*, *nagAc*, *ndoB*, *bphAc*, *narA* and *nidA* bulunur (Chikere and Fenibo 2018).

ABD Çevre Koruma Ajansı, biyoremediasyon ajanlarını “deşarjın etkilerini hafifletmek için biyodegradasyon oranını önemli ölçüde arttıran mikrobiyolojik kültürler, enzim katkı maddeleri veya besin katkı maddeleri” olarak tanılamıştır (Nichols 2001). Biyoremediasyon ajanları ayrıca, petrol sızıntısı biyoremediasyonuna yönelik iki ana yaklaşıma dayalı olarak biyoaugmentasyon ajanları ve biyostimülasyon ajanları olarak sınıflandırılır. 1990’ların başlarında çok sayıda biyoremediasyon ürünü önerilmiş ve tanıtılmıştır (Hoff 1993). O zamandan beri biyoremediasyon ajanları üreten şirketler artmıştır, USEPA veri tabanında listelenen 42’den fazla şirket mevcuttur (U.S.EPA 2002).

Biyoarıtım sektörü ülkemizde son yıllarda oldukça hızlı bir şekilde gelişme gösteren ve gelişmeye devam eden bir sektördür. Pazar, hem müşteri potansiyeli hem de ürün varyasyonu olarak sürekli kendini yenileyerek yüksek bir potansiyele ve büyük hedeflere sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışmada, stabilize bakteri kültürlerinin geliştirilmesi ve ülkemizde üretilebilir hale getirilmesi başlıca hedef olmuştur.

Türkiye, su ve atıksu alanında büyük pazarlardan biridir. Türkiye’nin çevresel yatırımlarının 2024 yılına kadar 70.5 milyar avroyu aşması (Küresel Etki Danışmanlığı (Global Impact Consulting - GIC), 2018), bunun %58’inin atık su rehabilitasyon projeleri için harcanacağı öngörülmektedir (Türkiye için AB Entegre Çevre Yaklaşım Stratejisi, Çevre ve Orman Bakanlığı, Türkiye, 2020). Bunun başlıca nedeni, kullanılan suyun %20’sinin kritik sınırı aşan biyolojik, kimyasal ve fiziksel kirlilik içermesidir. 70.5 milyar avroluk yatırıma, özel sektörün 18 milyar Euro katkıda bulunması ve yatırımın geri kalan kısmının ise hükümet tarafından karşılanması bekleniyor (Solak 2015). Ürünler ve hizmetler de dahil olmak üzere Türkiye’deki genel çevre teknolojileri pazarı 2016 yılında 7.3 milyar ABD doları değerindedir.

Pazara hakimiyetini yüksek oranda kabul ettirmiş Japon Sanko Sangyo Co. Ltd. firmasının ülkemiz temsilcisi olan Ankara merkezli EGEM Doğal ve Biyoteknoloji Tarım ürünleri üretim pazarlama Tic. Ltd. Şti. , aldığı temsilcilik ve haklarla SAION-

EM (Etkin mikroorganizmalar) teknolojisinin mikroorganizma kültürlerini ithal edip, Ankara’da çoğaltımını gerçekleştirerek Türkiye pazarına sunmaktadır. Bu firmayı yine Japon EMRO (EM Research Organization, Inc) firmasının Türkiye üreticisi ve distribütörü olan EM Agriton Doğal Ürünler Mikroorganizma Üretim Pazarlama ve Tic. Ltd. Şti. firması takip etmektedir. Bunların arkasından yerli üreticiler geliyor ancak yerli üreticilerin ürün çeşitliliği ve ürün içeriğindeki mikroorganizma sayıları daha az olup, mikroorganizmaların işleme hızları konusunda yavaş olabileceği kullanıcılar tarafından düşünülmektedir. Bu üreticilere BioOrient, NG Biyoteknoloji, Microlife, Özra Organik, Aquamatch örnek verilebilir. Ayrıca Fransız Greentech biyoteknoloji firması içerisinde kurulan Biovitis şirketinin, işletmeye özel ürün üretimi Türkiye’de Phonus firması ile devam etmektedir.

Ülkemizdeki biyoremediasyon ajanlarına olan ihtiyaca göre, petrokimya endüstrisi atık sularında TFA, 4-CBA ve p-TOL gibi petrol hidrokarbonlarını verimli şekilde parçalayabilen bakteri suşlarının izole edilmesi amaçlanmıştır. Bakteri koruma yöntemleri çevre dostu ürünler kullanılarak uygulanmıştır. Tez çalışması sonucunda uygun taşıyıcı ve koruyucu ajanlar ile liyofilize edilen bakteriler, biyolojik bozundurma aktivitesi ve canlılığını kaybetmeden +4 °C ve +27 °C’de 18 ay muhafaza edilebilmektedir.

Stok kültürlerin saklanması ve korunması için dünya genelinde liyofilizasyon tekniği kullanılmaktadır. Liyofilizasyon tekniğinin uygulanma öncesi ve sonrası liyofilizasyon tekniği, liyofilizasyon koşulları, bakteri türü, koruyucu seçimi, liyofilizasyon sonrası saklama koşulları ve rehidrasyon sıvısı gibi karar verilmesi gereken birçok faktör söz konusudur.

18 ay’a kadar raf ömrü çalışılacak izolatların freeze-drying yöntemi ile liyofilizasyonunun gerçekleştirilmesine ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Sıcaklığın kademeli olarak (Palmfeldt et al. 2003). -40°C’den +20°C’ye yükseltildiği, liyofilizasyon koşullarında uygulanacak en uygun koşullar birincil ve ikincil kurutma olacak şekilde optimize edilerek yaklaşık 48 saatlik bir döngüsel çevrim ile liyofilizasyon aşaması tamamlanmıştır. Liyofilizasyondaki başarıya etki edeceğini söyleyebileceğimiz bir faktörde her bir bakteriye göre optimum büyüme evresinin

farklılık göstermesidir. *Lactobacillus rhamnosus* ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında stasyonier fazda liyofilize edildiğinde canlılığın %31-50 arasında olduğu, erken log fazında canlılığın %14'e düştüğü görülmüştür. Lag fazı seçildiğinde ise sadece %2'si canlı kalmıştır (Tršić-Milanović et al. 2001). Bu çalışmada, kuru karışım içeriğinde bulunan 16 izolatin büyümede en etkin olduğu logaritmik fazı belirlenmiş, log fazı sonu seçilerek liyofilizasyona geçilmiştir.

Mikrobiyal formülasyonun kabul edilebilir olması için ortama dağılımın kolay, üretiminin ucuz ve raf ömrünün uzun olması gerekir (Melin et al. 2007). Sıvı formüle edilmiş bir ürün kuru toz formülasyonla karşılaştırıldığında paketleme, nakliye ve depolama açısından avantajlıdır. Mikroorganizmaların kurutulması, dondurarak kurutma, akışkan yataklı kurutma, vakumlu kurutma ve püskürtmeli kurutma gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Dondurarak kurutma bakteri, mayaları ve mantarları sporlaştırmanın en uygun ve başarılı yöntemidir (Larena et al. 2003). Dondurarak kurutmanın; biyo-kontrol ajanların depolanması sırasında kontaminasyon ve istilaya karşı koruma, uzun süre canlı kalma kabiliyeti, suş dağılımının kolaylığı ve suda rehidrasyon ile kolayca yeniden oluşturulabilme gibi avantajları vardır (Tang and Pikal 2004). İyi bir dondurarak kurutmada koruyucu ajan, dondurma işlemi sırasında hücrelere donmaya karşı koruma ve depolamada stabiliteyi ve rehidrasyon kolaylığını geliştirmek için iyi bir matris sağlamalıdır. Koruyucu kabiliyetlerini test etmek için vitamin kompleksleri, polisakkaritler, amino asitler, disakkaritler, polioller, monosakkaritler ve proteinler dahil olmak üzere çeşitli maddeler araştırılmıştır (Berny and Hennebert 1991; Martos et al. 2007). Bu koruyucu maddelerin sağladığı koruma büyük ölçüde mikroorganizma türlerine bağlı olarak değişebildiği görülmüştür (Palmfeldt et al. 2003). Taşıyıcının su içeriği çok düşük olduğunda, mikroorganizmalar hayatta kalmakta güçlük çekerler. Aksine, taşıyıcının su içeriği çok yüksek olduğunda, ortaya çıkan taşıyıcı, kendisini idare etmeyi zorlaştıran, bozulmuş bir fiziksel güç sergiler. Biyolojik olarak parçalanabilir taşıyıcı, buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır kalıntısı tozu, su sümbülü tozu, azola tozu veya bunların karışımından seçilmiştir (KUMAR et al. 2012). Buluşa göre, çevresel biyoişlem için toz halinde biyolojik olarak parçalanabilir ürün içeriğinde sulu bir ortamı emme ve desorbe etme kapasitesine sahip, doğal lignoselülozik bileşenlerden türetilmiş lifli bir organik destek içerir

(Lebesgue et al. 2008). Başka bir buluşta laboratuvar ölçekli çalışmalarda elde edilen mikroorganizmalar arıtım için sıvı halde doğal ortamına verildiğinde verim düşmekte bu nedenle de taşıyıcı yardımıyla atık suya verilmesi amaçlanmıştır. Uygun taşıyıcı, bakteriye büyümesi için gerekli besini sağlamalı, bakteri aktivasyonunu koruyabilmeli, uzun süre bakteriyi saklayabilmeli ve taşıyıcının oksijen geçirgenliği olmalıdır. Fibröz bitki materyali olarak; gözenekliliği ve besin takviyesi olarak avantajından dolayı Yonca, keten, kenevir, bakla kullanılmıştır. Doğal taşıyıcı olarak kullanılan nonfibröz bitkiler ise nişasta, patates, pirinç, mısır, manyok, buğday, bezelye, yulaf, şerbetçiotu, tapyoka olmuştur. Sentetik bağlayıcı ajan olarakta polivinil alkol kullanılmıştır. (Lebesgue et al. 2007). Diğer bir buluşta, partikül at inorganik tuzu içeren bir taşıyıcının büyük bir kısmının küçük bir oranda bir silika jel adsorbantı ile karıştırılmasıyla taşıyıcı oluşturulmuştur (Sudoma 1987). Bu tez çalışmasında, koruyucu olarak skim milk, gliserol, silika ve polivinil alkol (PVA); zeolit, lifli organik madde olarak taşıyıcı yonca (*Medicago sativa*), soya (*Glycine max*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus*) kullanılmıştır.

Yonca protein konsantrasyonunun kimyasal bileşimini dondurarak araştırdı. Sonuçlara göre yoncada protein 522 g/kg, lipid 134 g/kg ve şeker 21 g/kg'dır. Türlerle göre ayçiçekleri %16.92 ile %37.34 arasında ham protein ve %28.8 ile %44.3 yağ içerir (Ologunde et al. 2008). Soya yaklaşık %40 protein, %30 karbonhidrat ve %20 yağ içerir (Kalman 2014) (Liu 2012).

Sonuçlara bakıldığında, bakteri konsorsiyumunun lifli organik taşıyıcı olarak yonca ve taşıyıcı+koruyucu olarak yonca+silika varlığında daha iyi korunduğunu göstermiştir. +4 °C ve +27 °C 18 ay sonunda canlılık sayımlarına bakıldığında canlılık sayımı en iyi ürünün “yonca” ve “yonca+silika” içeriği olduğu belirlenmiştir. Taşıyıcı+organizma içeren koruyucu içermeyen gruplardan ayçiçeği en fazla canlılık kaybına sahip grup olmuştur. Vakumsuz gruplarda taşıyıcı olarak kullanılan yoncanın canlılık üzerine olan etkisine bakıldığında, ürünü çok iyi koruduğu gözlemlenmiştir. PBS kullanılarak yapılan rehidrasyondan sonra, TA, 4-CBA ve p-TOL +4 °C ve +27 °C'de sırasıyla 4-7 saat ve 12-14 saat sonra tamamen degradasyona uğramıştır. +27 °C'de ayçiçeği ve soya varlığında konsorsiyumun degradasyon kabiliyeti azalmıştır. Bununla birlikte, yonca ve soya varlığında hidrokarbonların degradasyonunun +4 °C

'de aynı olduğuna dikkat etmek gerekir. Taşıyıcı+organizma içeren koruyucu içermeyen gruplardan ayçiçeği biyoparçalama etkinliği en fazla düşen grup olmuştur. Vakumsuz gruplarda taşıyıcı olarak kullanılan yoncanın biyoparçalama etkinliği üzerine olan etkisine bakıldığında, taşıyıcısız gruba göre çok iyi olmuştur. Vakumsuz grup biyoparçalama etkinlik süresi 1-2 saat uzamıştır. Bu sonuçlar bize gösteriyor ki, yonca ve soyada bulunan proteinler ve karbonhidratlar gibi koruyucu ajanların varlığı son durumu etkilenmektedir.

Koruyucu maddeler, mikroorganizmanın büyümesi sırasında veya dondurma veya kurutmadan önce eklenebilir. Koruyucunun türü büyük ölçüde mikroorganizmaya bağlıdır; ancak birçok türle iyi sonuçlar veren sadece birkaç tane mikroorganizma var. Bunlar arasında skim milk katıları, serum, trehaloz, gliserol, betain, adonitol, sukroz, glikoz, laktoz ve dekstran ve polietilen glikol gibi polimerler bulunur (Hubálek 2003). 20 yıldan fazla bir süre önce, trehaloz ve sukroz gibi şekerlerin, bu makromoleküler yapılar içindeki polar kalıntıların etrafındaki suyu değiştirerek, membranların ve proteinlerin stabilizasyonuna bağlı olarak çok sayıda organizmada gelişmiş kuruma toleransı sergilediği bildirilmiştir (Rudolph and Crowe 1985). Bu iki disakkarit, su yokluğunda üçüncül protein yapısının korunmasına yardımcı olan hidrojen bağlarının oluşumuyla protein denatürasyonunu önleyerek kurutma sırasında izole edilmiş proteinlerin yapısını ve işlevini korur (Leslie et al. 1995). Şekerler, tohumlar ve polen gibi birçok biyolojik dokuda bulunur, aslında tohumlar %10-20 arasında sukroz ve oligosakarit içerir. Bu şeker karışımlarının kristalleşmeyi engellediği ve bu nedenle tohumların olumsuz koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Buitink et al. 2000). Birçok çalışma, trehalozun bir kriyoprotektan olarak kullanılmasının, mikroorganizmaların sukrozdan daha yüksek düzeylerde hayatta kalmasını sağladığını ileri sürmektedir (Leslie et al. 1995; Gómez Zavaglia et al. 2003; Streeter 2003).

Şekerlerin kristal oluşumunu etkileyen ana bileşenler olduğuna inanılsa da, polipeptitlerin şekerlerin kristal özelliklerini önemli ölçüde değiştirebildiği de gösterilmiştir (Buitink et al. 2000). Bu nedenle, en etkili kurutma koruyucu ajanların, proteinler ve şekerlerin bir karışımı olduğu görülmektedir. Abadias et al. (2001),

örneğin skimmilk ve karbonhidrat şekerlerinin bir karışımı kullanıldığında *Candida sake* hücre geri kazanımlarının %45-85 arasında değiştiğini göstermiştir. Benzer şekilde Desmond et al. (2002), %10 sulandırılmış skimmilke %10 akasya sakızı eklendiğinde *Lactobacillus paracasei*'nin hayatta kalma oranının 1000 katına kadar önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Ortaya çıkabilecek diğer bir konu da koruyucu ajanların gerekli saklama sıcaklığı ile uyumluluğudur. Tez sonuçlarına benzer şekilde, (Teixeira et al. 1995) askorbik asit ve monosodyum glutamatın 4 °C'de saklandığında *Lactobacillus delbrueckii*'ye önemli koruma sağladığını, ancak 20 °C'de zararlı bir etkide bulunduğu gözlemlenmiştir. (Mputu Kanyinda et al. 2012), liyofilize ürünün saklama koşulları için farklı sıcaklıklarda denemeler gerçekleştirmişlerdir. *Pseudomonas fluorescens* ile yaptıkları çalışmada liyofilizasyon öncesi $4,0 \cdot 10^9$ kob/mL olan canlılık sayımının 7 ay raf ömrü sonrasında 4°C'de saklanan ürünlerde $2,0 \cdot 10^8$, 20°C'de saklanan ürünlerde ise $3,5 \cdot 10^7$ 'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ayçiçeği mevcudiyetinde raf ömrü süresince bakteri canlılığının korunmasında 3 log'luk bir azalma kaydedilirken, ayçiçeği+skimmilk karışımı olan üründe yaklaşık 1 log'luk bir azalma gözlemlenmiştir. Bu nedenle, skim milkte koruyucu ajanların (proteinler ve karbonhidrat) varlığı, bakterilerin daha iyi korunmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Kuru karışım ürünler, +4 °C ve +27 °C'de 18 ay süreyle muhafaza edilmiştir. Ürünlerin ticarileştirilme potansiyelleri düşünüldüğünde saklama koşullarının maliyet oluşturmaması planlanarak saklama sıcaklığı olarak +27 °C'de seçilerek denenmiştir. +4°C ve +27°C saklama koşullarında 18 ay sonunda, +4°C saklanan viallerde bulunan ürün grupları +27°C'ye göre daha iyi sonuçlar vermiştir. +27 °C saklama koşullarına sahip viallerin +4°C 'de saklanan viallere göre daha düşük canlı sayımı göstermesi ve biyoparçalama süresinin uzun olmasında saklama koşullarından kaynaklandığını göstermektedir. İzolatların +27°C saklama koşullarında biyoparçalama aktivitesinin yavaşlamasının yanı sıra p-TOL kimyasalı parçalama etkinliğinin azalmasının görülmesi, ürün içerisindeki p-TOL parçalayan mikroorganizmaların canlılığını kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Dondurularak kurutulmuş mikroorganizmaların rehidrasyonu, kurutulduktan sonra hücrelerin yeniden canlanması için son kritik adımdır. Koruyucu ortamda olduğu

gibi, bir dizi olası rehidrasyon ortamı vardır ve tümü farklı sonuçlar gösterir. Costa ve ark. (Costa et al. 2000) *Pantoea agglomerans* hücrelerini canlandırmak için yedi farklı tipte rehidrasyon ortamı test etmiştir. %10 yağ içermeyen skim milk ve PTM ortamı (%1,5 pepton, %1 tripton ve %0,5 et özütü) ve hem de %10 sakaroz çözeltisi gibi kompleks ortamların tampon fosfat, sodyum glutamat ve su gibi ortamlardan önemli ölçüde daha yüksek hücre geri kazanımı sağladığı bulunmuştur. Kriyoprezervasyon için kullanılan aynı rehidrasyon solüsyonunun canlılığı arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir. Örneğin, Abadias ve ark. (ABADIAS et al. 2001) hem koruyucu olarak hem de rehidrasyon ortamı olarak, *Candida sake* hücrelerini dondurarak kurutmak için %10 skim milk kullanılmasını önermektedir. Aynı rehidrasyon sıvısı Ray ve ark. (Ray et al. 1971) tarafından kullanılıp önerildiğine göre, bu formülasyon yeni bir kavram değildir. Ray ve arkadaşları, dondurularak kurutulmuş hücrelere yüksek bir ozmotik basınç sağlayan bir rehidrasyon sıvısı kullanmanın rehidrasyon sürecini bir derece kontrol altına almayı sağladığını buldular. Koruyucu ajanlarla yapılan rehidrasyon bakteri hücrelerinin canlılığını artırsa da konsorsiyumun büyümesinde skim milk, PBS, sakkaroz ile yapılan rehidrasyonlar arasında bir fark gözlenmemiştir (Eroğlu 2018). Bu nedenle, rehidrasyon sıvısı olarak, oda sıcaklığında 1x PBS kullanılarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Ray et al. (1971), rehidrasyon sıcaklığının dondurarak kurutmadan sonra hücre geri kazanımını da etkileyebileceğini bildirdi. 15°C - 25 °C'de rehidrasyon, hücre geri kazanımının daha düşük, ancak büyümenin daha hızlı olduğu 35°C ve 45° C'ye kıyasla en yüksek sayıda geri kazanılan hücre ürettiğini buldular.

Dondurarak kurutmadan sonra hayatta kalma, hücrenin hızlı dondurma ve hızlı kurutmanın etkilerine direnme yeteneğini yansıtır. Hayatta kalmadaki farklılıklar, mikroorganizmaların hücre duvarı ve hücre zarındaki yapısal farklılıkları yansıtmalıdır. Kuruma, depolama sırasında hayatta kalmak için önemli olduğundan, hücre dışı polisakkaritlerin veya teikoik asitlerin varlığı, uzun süre hayatta kalma için dezavantajlıdır. Dondurularak kurutulmuş Gram-negatif bakterilerin Gram-pozitif bakterilere kıyasla daha düşük hayatta kalma oranları, daha ince peptidoglikan tabakasına ve eski türlerde hücre duvarındaki lipopolisakkaritlerin varlığına bağlanabilir. Depolama sırasında dondurularak kurutulmuş mikroorganizmaların hayatta kalması, yıllık hayatta kalma logaritmasındaki azalma ile ifade edilir

(Miyamoto-Shinohara et al. 2008). Gram-negatif cinslerin dondurularak kurutulduktan sonra hayatta kalma oranlarının %8,0 ile %87,7 arasında değiştiğini, Gram-pozitif cinslerin ise %58,5 ile %96,7 arasında değiştiğini bildirdi. Gram negatif bakteriler, iç ve dış plazma membranları arasında yaklaşık 5 ila 10 nm kalınlığında bir peptidoglikan katmanına sahipken, Gram pozitif bakterilerde bu katmanın kalınlığı yaklaşık 20 ila 80 nm'dir (Parker et al. 1995;van der Wal et al. 1997). Gram-pozitif bakterilerinkinden daha ince bir peptidoglikan tabakasına sahip olan Gram-negatif bakterilerin hücre duvarları, kuruma ve rehidrasyon süreçleri sırasında çok daha büyük bir kırılma eğilimine sahiptir (Pembrey et al. 1999). Polisakkaritlere ve teikoik asitlere benzer şekilde, lipopolisakkaritler, en dışta hidrofilik polisakkarit zincirleri ile Gram negatif bakterilerin dış zarında nispeten zayıf bağlarla tutulur. Lipopolisakkaritlerin en dıştaki polisakkarit bölgesi, dondurarak kurutma işlemi sırasında su moleküllerinin uzaklaştırılmasına engel olabilir. Gram negatif bakterilerin çoğunun yüzeylerinde lipopolisakkaritler bulunur; bu lipopolisakkaritler, depolama viallerindeki su moleküllerini yakalayabilir ve uzun süreli depolama sırasında hayatta kalma oranlarında bir azalmaya neden olabilir. Lipopolisakkaritlere ek olarak hücre dışı polisakkaritlere sahip Gram-negatif türler daha da fazla su molekülü tutacak ve hayatta kalma oranları, hücre duvarında sadece lipopolisakkaritlere sahip türlerden daha düşük olacaktır. *Rhizobium etli* (Carlson et al. 1995), *Neisseria gonorrhoeae* (Kristiansen et al. 1998) ve *Helicobacter pylori*'nin (Merckx-Jacques et al. 2004) bazı suşlarının lipopolisakkaritleri sentezleme yeteneğini kaybettiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada tüm vial içerikleri liyofilizasyon ile kurutulularak aynı koşullar altında saklanmıştır. Ortalama olarak liyofilizasyon işlemi sonrası taşıyıcılı örneklerde %60, taşıyıcı içermeyen mikroorganizma deneme setlerinde %90 ve üzeri ağırlık kaybı olmuştur. Raf ömrü süresince hayatta kalma ve biyodegradasyon oranları, sadece lifli organik taşıyıcı ve taşıyıcı+koruyucu ajanlara göre değişiklik göstermiştir. Taşıyıcı grupları da kendi aralarında kıyaslandığında farklı oranlar görülmektedir. Saklama sırasında dondurularak kurutulmuş bakterilerin hayatta kalmasını iyileştirmek için üç çözüm önerilebilir; 1) vial içeriğinde bulunan su moleküllerinin sayısını azaltmak, 2) su moleküllerinin aktivitesini azaltmak ve 3) bakteri hücrelerinin su moleküllerini yakalamasını önlemek.

Bir vialdeki su moleküllerinin sayısını azaltmak için bakteriler kuru koşullarda hazırlanmalı ve tamamen dondurularak kurutulmalıdır. Vialler, kullanılan vakum pompasının kapasitesine ve cam viallerin gücüne bağlı olarak mümkün olduğunca yüksek vakum altında kapatılmalıdır. Bu hipotezler, çalışmamızda gözlemlediğimiz silika varlığında bakteri hücrelerinin en düşük şekilde azalmasını açıklamaktadır. En etkili biyoparçalama sonucu elde edilen koruyucu olarak “silika” yonca ve soya gruplarında, “skim milk” ise ayçiçeği grubunda gözlemlenmiştir. Tüm gruplar geneline bakıldığında çalışmada etkinliği en iyi olan koruyucu silikadır. Silika, bakteri hücrelerini suya ve neme karşı korur. Son aşama olan septumların kapatılma işleminin liyofilizatör cihazı içerisinde vakum altında yapılması, basınç değişiklikleri kaynaklı organizmanın zarar görmesini engellemiş ve kontaminasyon riskini azaltmıştır. Viallerin içinde havasız bir ortam yaratılması uzun raf ömrü süresince sağ kalımı artırmıştır. Bu çalışmada konsorsiyumdaki bakteri suşlarının %80'i gram negatif bakterilerden oluşsa bile, 18 ay sonra yonca ve soya varlığında büyümede düşük şekilde bir azalma (sadece yaklaşık 1 log) kaydedilmiştir. Gram reaksiyonları *Arthrobacter protophormiae*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter nicotinae* için pozitif olarak sonuçlanmıştır. Diğer 13 izolat gram negatiftir. *A.nicotianae* sayıca bakıldığında diğer bakterilere göre daha azdır, bu durumu başlangıç sayısının düşük olması şeklinde açıklayabiliriz.

Önceki çalışmalar (Breeuwer and Abee 2000) kültüre edilebilirliğin canlılığı tam olarak tanımlamak için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, DNA hasarı, membran bütünlüğü, esteraz aktivitesi veya proteolitik aktivite gibi diğer teknolojik parametreleri aynı anda ölçerek dondurulmuş ve dondurularak kurutulmuş suşların depolanması sırasında fizyolojik durumdaki değişiklikleri değerlendirmek ilginç olabilir (Fonseca et al. 2000). Konsorsiyum raf ömrü süresince korunarak, TFA, 4-CBA ve p-TOL'un degradasyonu etkilenmeyip gerçekleşmiştir. En yüksek degradasyonu verimi, “yonca”, “soya” ve “ayçiçeği+ skim milk” ile korunumunda gözlenmiştir. Taşıyıcı içermeyen sadece organizma ve koruyucu içeren vial gruplarında, silika avantaj sağlamıştır, ama 14-24 saat içerisinde tüm kimyasallar tükenebilmiştir. Taşıyıcı gruplar ile kıyaslandığında sadece organizma ve organizma+silika grubunun p-TOL ve 4-CBA giderimleri çok yavaşlamıştır.

CSTR ölçeğinde, her taşıyıcının canlılığı ve biyodegradasyon verimi en iyi ürünün en yüksek miktar 1200 mg/L olacak şekilde TFA, 4-CBA ve p-TOL degradasyonu değerlendirilmiştir. Liyofilize kuru ürünler, sentetik atık su ile beslenen reaktörlerde biyoparçalama aktivitesini ve canlılığını sürdürmeye devam etmiştir. Sonuçlara göre, 12. ay raf ömrüne sahip ‘yonca’, ‘soya’ ve ‘ayçiçeği+skim milk’ içeriğinin reaktör denemelerinde biyoparçalama aktivitesine bakıldığında, 1200 mg/L kimyasalların tamamen tükenmesi 14-16 saat içerisinde gerçekleşmiştir. Bu durum 12 ay raf ömrü bulunan üründe bulunan izolatların CSTR ölçeğinde biyoparçalama etkinliğindeki başarıyı bize göstermiştir. Reaktör çalışmaları ile gerçekleşen hidrokarbon biyodegradasyonu, erlen ölçeğindeki biyodegradasyon çalışmalarından yaklaşık 2 kat daha uzun sürmüştür. Erlen ölçeğine kıyasla CSTR ölçeğindeki azalma, erlen ölçeğindeki çalkalamalı inkübatörde bulunan hafif karıştırmanın aksine, overhead karıştırıcılar ve pervaneler tarafından sağlanan sıcaklık, oksijenasyon ve karıştırma sistemine bağlanabilir. Hidrokarbon biyodegradasyonunun yavaş çözünme hızlarında engellendiği bilindiğinden karıştırma işleminin, hidrokarbonların çözünme oranını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Jegatheesan et al. 2016). (Viñas et al. 2005) tarafından yapılan bir çalışma, daha iyi çalkalama ve karıştırma ile degradasyonun verim oranlarında önemli artış olduğunu gösterdi. CSTR’nin sıcaklık ve oksijenasyon optimizasyonu gibi dezavantajları olsa bile, bu petrol hidrokarbonlarının biyolojik olarak parçalanmasını incelemek için reaktör büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bir CSTR, bir veya daha fazla karıştırıcıyı (pervaneleri) destekleyen ve motorla çalıştırılan merkezi bir shafta sahip silindirik bir kaptan oluşur. Karıştırıcılı tank biyoreaktörleri, sulu ortamda büyüyen kültürler için ağırlıklı olarak kullanılan tasarımdır. Karıştırıcıları mükemmel mekanik karıştırma özelliklerinin yanında ana gaz dağıtma araçlarıdır ve yüksek kütle aktarım hızı değerlerini sağlarlar (Alpay et al. 2020). Literatür bilgileri anlamlandırıldığında kullandığımız reaktörlerimizin bazı mekanik parçalarının en uygun koşulları sağlamada yetersiz kaldığını, erlen çalışmalarımızda ortam koşullarının optimizasyonunun en iyi şekilde sağlanabildiğini söyleyebiliriz. Ölçek büyütme çalışmalarında bahsedilen birçok etken devreye girmiş ve süre uzamıştır.

CSTR’ın avantajları, büyüyen hücrelere verimli gaz aktarımı, içeriğin iyi karıştırılması ve esnek çalışma koşullarının yanı sıra biyoreaktörlerin ticari olarak

kullanılabilirliğini içerir. Karıştırılmalı tank biyoreaktörünün ana dezavantajı, enerji gerektiren mekanik çalkalamadır ve karıştırma, mikrobiyal hücreler üzerinde kayma gerilmesine neden olabilir. (Gargouri et al. 2011) hidrokarbonca zengin endüstriyel atık suların arıtılmasında sürekli karıştırıcılı tank biyoreaktörünün kullanımını değerlendirmiştir ve ortama alıştırılmış bir mikrobiyal konsorsiyum kullanarak başarılı bir biyoremediasyon elde etmiştir. TPH kalıntısı 320 mg/L 'den 8 mg/L'ye düştüğü gözlemlenmiştir. (Bi 2005) *P. putida* ile etanol, toluen ve benzil alkolün biyoremediasyonu için sürekli karıştırıcılı tank reaktör uyguladı. Başka bir örnekte, ortama alıştırılan bir yerli mikrobiyal konsorsiyum kullanılarak bir petrol rafineri sahasında hidrokarbonca zengin atık suyu arıtmak için sürekli karıştırıcılı bir tank biyoreaktör uygulanmıştır. Biyoaugmentasyon reaktörünün performansı, KOİ talebi oranlarının %95'e ve artık TPH konsantrasyonunun %97,5'e düşürülmesi ile gösterilmiştir (Kuyukina et al. 2020). Çalışmamızda, bu bakterilerin doğal habitatları olan mevcut atıksu arıtma sisteminden izole edilmesinin vermiş olduğu bir avantaj ile, verildikleri sisteme adaptasyonları yurtdışından ithal edilenlere göre daha kolay ve hızlı olacağı düşünülmektedir. Kurulan her reaktörden hidrokarbonların biyodegradasyonu %99'a ulaştığında örnek alınıp DNA izolasyonları yapılmıştır. Her üç reaktör mikrobiyal flora üyeleri açısından incelendiğinde; logaritmik açıdan total bakteri sayılarında bir azalmanın olmadığı söylenebilir. Sonuçlar *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas* ve *Raoutella*'nın üç reaktörde en çok bulunan cinsler olduğunu gösterdi. Bu organizmalar büyük ölçüde petrokimyasal atık su arıtma tesislerinden izole edilmektedir. Yonca ve soya grubunda *Comamonas testosteroni* 'nin sırasıyla 2 log ve 1 log, ayçiçeği skim milk grubunda *Chryseobacterium* sp.'nin 1 log artış gösterdiği görülmüştür. Sayıca en az görülen bakteri sayısı *A.nicotianae* olmuştur. Başlangıç sayısı düşük olduğu için liyofilizasyon sürecinden zarar gördüğü düşünülmektedir. *P.Putida* izolatının her üç reaktörde başlangıç değerlerine göre anlamlı bir değişim sergilemediği gözlenmiştir.

Real Time PCR ile izolatların takip edilebilmesi, gerçek aktif çamur sisteminde uygulama alanı bulacak olan mikrobiyal karışımların formülasyonlarında kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bu sayede endüstriyel biyolojik arıtım tesisi aktif çamur

sistemlerinde belirli hidrokarbonların giderimi için hangi mikroorganizmaların seçileceğine karar verilebilecektir.

PTA kimyasallarını parçalayan ve uzun raf ömrüne sahip liyofilize ürünlerimizin, PTA'yı parçalaması sonucunda açığa çıkan atık suda toksik bir kimyasal olmadığı Mikrotoks analizi sonucunda belirlenmiştir. Bu da çalışmanın çevre dostu bir proje olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmasının çıktıları ihtiyacı karşılayacak niteliktedir. Petrokimya Endüstrisi atıksularında bulunan hidrokarbonları parçalayabilen bakterilerden oluşan katı ürün hazırlanmış olup, bu ürünlerin belli aralıklarla çoğaltılarak, sisteme uygulanma çalışmaları devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi, Üniversite-Sanayi işbirliği çerçevesinde üniversitedeki bilgi ve deneysel bilgi birikiminin ürün temelinde sanayiye aktararak ekonomiye ve topluma değer katılmasını sağlamıştır.

Tez çalışmasında, özellikle PTA atık suyu bulunan arıtım tesislerinde kullanılmak üzere liyofilize halde, 18 ay boyunca +4°C'de saklanabilecek özel bakteri konsorsiyumu hazırlanmıştır. Patent başvurusu tamamlanmıştır. Ülkemizde daha önceki yıllarda yurt dışından satın alınan bakteri ürünlerinin yerine bu izolatların kullanılıyor ve kullanılacak olması ülkemiz ekonomisine katkı sağlamasının yanında, bilimsel çalışmalarda başarı elde etmemizi sağlamıştır. Çeşitli arıtım tesislerinde kullanılmak amacıyla yurt dışından sürekli ve alternatifsiz bakteri satın alınması yerine, kendi üretimimiz olan bakteriler ülke içindeki arıtım sistemlerinde kullanılabilecektir.

6 ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar doğrultusunda projenin teknoloji doğrulaması aşamasında olduğunu söyleyebiliriz. Belirli bir teknoloji olgunluk seviyesi (TRL), ürünün denendiği konusunda somut veriler sunulabilmeli ve metodolojinin oluşmuş, gerçek ortamda uygulamasının yapılmış olduğu gösterilebilmelidir. TRL seviyesinin arttırılmasıyla birlikte ürünün değer zinciri operasyonları tamamlanmış olacaktır. Geliştirilmiş olan özel bakteri kültürünün gerçek ölçekte uygulanılabilir şekle dönüştürülmesi amacıyla prototip üretimi gerçekleştirilip, etkinliği araştırılmalıdır. Raf ömrü uzun ve katma değeri yüksek ürüne dönüştürülebilmesi için gerekli ölçeklendirme çalışmaları yapılması da çalışma sonrasında önem arz etmektedir.

PAH'ların yüksek hidrofobik karakterde olmasından dolayı su fazında homojen şekilde dağılım göstermediği, çalışmada HPLC ve GC analizlerinde erlen içeriğinden alınan numunelerin tam olarak içeriği yansıtmadığı düşünülürse, daha tutarlı sonuçlar elde etmek için kullanılan erlen içeriğinin tamamen ekstraksiyon aşamasından geçirilmesi laboratuvar deneylerinin o doğrultuda planlanması sonuçların doğruluğunu arttırıp zaman kazandıracaktır.

Operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) mikrobiyal topluluğun gerçek yapısını ortaya çıkarmak için güçlü potansiyel sağlar. Elde edilen farklı kuru ürün içerikleri için, OTU analizi ile operasyonel tanım yapılması, ürün içeriğindeki tüm izolatların tür düzeyinde isimlendirilmesi ile ilave veriler sağlayıp, çalışmayı daha da güçlendirecektir.

KAYNAKLAR

- Abadias M, Teixidó N, Usall J, Benabarre A, et al. (2001). Viability, Efficacy, and Storage Stability of Freeze-Dried Biocontrol Agent *Candida sake* Using Different Protective and Rehydration Media. *Journal of Food Protection* **64**(6): 856-861.
- Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M and Naidu R (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **176**(3): 670-699.
- Abdel-Shafy HI and Mansour MSM (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* **25**(1): 107-123.
- Adams RH, Kanga-Leyva K, Guzmán-Osorio FJ and Escalante-Espinosa E (2011). Comparison of moisture management methods for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *African Journal of Biotechnology* **10**(3): 394-404.
- Adholeya A and Das M (2012). Biofertilizers: Potential for Crop Improvement under Stressed Conditions. *Improving Crop Productivity in Sustainable Agriculture*. N. Tuteja, Gill SS and Tuteja R, <https://doi.org/10.1002/9783527665334.ch9>: 183-200.
- Afshar-Mohajer N, Li C, Rule AM, Katz J, et al. (2018). A laboratory study of particulate and gaseous emissions from crude oil and crude oil-dispersant contaminated seawater due to breaking waves. *Atmospheric Environment* **179**: 177-186.
- Aftring RP, Chalker BE and Taylor BF (1981). Degradation of phthalic acids by denitrifying, mixed cultures of bacteria. *J Applied environmental microbiology* **41**(5): 1177-1183.
- Aksu B (2018). Liyofilizasyonun *Pseudomonas* sp. organizmasının canlılığına ve Tereftalik Asit Kimyasalını Biyoparçalama Aktivitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi
- Alagić SČ, Jovanović VPS, Mitić VD, Cvetković JS, et al. (2016). Bioaccumulation of HMW PAHs in the roots of wild blackberry from the Bor region (Serbia): Phytoremediation and biomonitoring aspects. *Science of The Total Environment* **562**: 561-570.
- Alpay T, Karabey B, Azbar N and Ozdemir G (2020). Purified terephthalic acid wastewater treatment using modified two-stage UASB bioreactor systems. *Current Microbiology*: 1-8.

- Alva-Argáez A, Kokossis AC and Smith R (2007). The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. *Chemical Engineering Journal* **128**(1): 33-46.
- Anandan S and Yoon M (2003). Photocatalytic activities of the nano-sized TiO₂-supported Y-zeolites. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **4**(1): 5-18.
- Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH and Crowe LM (1991). Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* **28**(5): 467-473.
- Ansari ZA and Ingole B (2002). Effect of an oil spill from MV Sea Transporter on intertidal meiofauna at Goa, India. *Marine Pollution Bulletin* **44**(5): 396-402.
- Antizar-Ladislao B, Lopez-Real JM and Beck AJ (2004). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **34**(3): 249-289.
- APHA (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC, American Public Health Association.
- Arkadieva ZA, and M. N. Pimenova. (1985). Storage of acetic acid bacteria. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* **21** (5): 645-648.
- Arora NK and Mishra J (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology* **107**: 405-407.
- Ausubel FM and Baatout S (1996). Short protocols in molecular biology (3rd edn). *Trends in Genetics* **12**(8): 325-325.
- Awong J, Bitton G and Chaudhry GR (1990). Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(4): 977-983.
- Baker JM, Clark R, Kingston P and Jenkins R (1990). Natural recovery of cold water marine environments after an oil spill, Institute of Offshore Engineering Heriot-Watt University.

- Bartrolí A, Carrera J and Pérez J (2011). Bioaugmentation as a tool for improving the start-up and stability of a pilot-scale partial nitrification biofilm airlift reactor. *Bioresource Technology* **102**(6): 4370-4375.
- Bashan Y (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* **16**(4): 729-770.
- Bento FM, Camargo FA, Okeke BC and Frankenberger WTJBt (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **96**(9): 1049-1055.
- 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**: 137-149.
- Berny JF and Hennebert GL (1991). Viability and Stability of Yeast Cells and Filamentous Fungus Spores during Freeze-Drying: Effects of Protectants and Cooling Rates. *Mycologia* **83**(6): 805-815.
- Bi Y (2005). Bioremediation of volatile organic compounds in a continuous stirred tank bioreactor, CiteSeer.
- Bitton G (2005). Wastewater microbiology, John Wiley & Sons.
- Bitton G (2010). Wastewater microbiology. John Wiley & Sons, (Ed. 4).
- Bjornsdottir-Butler K, Jones JL, Benner R and Burkhardt W (2011). Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food Microbiology* **28**(3): 356-363.
- Blaisdell RA and Smallwood ME (1993). Evaluation of the total petroleum hydrocarbon standard for cleanup of petroleum contaminated sites, AIR FORCE INST OF TECH WRIGHT-PATTERSON AFB OH SCHOOL OF ENGINEERING.
- Boll M, Geiger R, Junghare M and Schink B (2020). Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environmental microbiology reports* **12**(1): 3-15.
- Bolta SV, Mihelic R, Lobnik F and Lestan D (2003). Microbial Community Structure During Composting With and Without Mass Inocula. *Compost Science & Utilization* **11**(1): 6-15.
- Boon N, Top EM, Verstraete W and Siciliano SD (2003). Bioaugmentation as a Tool To Protect the Structure and Function of an Activated-Sludge Microbial Community against a 3-Chloroaniline Shock Load. **69**(3): 1511-1520.

- Boonchan S, Britz ML and Stanley GA (2000). Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(3): 1007-1019.
- Borel Rinkes IHM, Toner M, Ezzell RM, Tompkins RG, et al. (1992). Effects of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology* **29**(4): 443-453.
- Bouchez T, Patureau D, Dabert P, Juretschko S, et al. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* **2**(2): 179-190.
- Bowers HA, Tengs T, Glasgow HB, Burkholder JM, et al. (2000). Development of Real-Time PCR Assays for Rapid Detection of *Pfiesteria piscicida* and Related Dinoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11): 4641-4648.
- Breeuwer P and Abee T (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International journal of food microbiology* **55**(1-3): 193-200.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM and Parker J (2018). *biology of microorganisms*. . Upper Saddle River (NJ), Prentice-Hall.
- Buitink J, Hemminga MA and Hoekstra FA (2000). Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiology* **122**(4): 1217-1224.
- Burgherr P (2007). In-depth analysis of accidental oil spills from tankers in the context of global spill trends from all sources. *Journal of hazardous materials* **140**(1-2): 245-256.
- Campbell D, Cox D, Crum J, Foster K, et al. (1993). Initial effects of the grounding of the tanker Braer on health in Shetland. The Shetland Health Study Group. *British Medical Journal* **307**(6914): 1251-1255.
- Carlson RW, Reuhs B, Chen TB, Bhat UR, et al. (1995). Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. *The Journal of biological chemistry* **270**(20): 11783-11788.
- Carmona M, Zamarro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, et al. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology Molecular Biology Reviews* **73**(1): 71-133.

- Castiglione MR, Giorgetti L, Becarelli S, Siracusa G, et al. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environmental Science Pollution Research* **23**(8): 7930-7941.
- Catroux G, Hartmann A and Revellin C (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil* **230**(1): 21-30.
- Cébron A, Norini M-P, Beguiristain T and Leyval C (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* **73**(2): 148-159.
- Cerniglia CE (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology* **4**(3): 331-338.
- Champagne CP, Gardner N, Brochu E and Beaulieu Y (1991). The Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. A Review1. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **24**(3): 118-128.
- Chandra S, Sharma R, Singh K and Sharma A (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology* **63**(2): 417-431.
- Chandrasekara Pillai K, Kwon TO and Moon IS (2009). Degradation of wastewater from terephthalic acid manufacturing process by ozonation catalyzed with Fe²⁺, H₂O₂ and UV light: Direct versus indirect ozonation reactions. *Applied Catalysis B: Environmental* **91**(1): 319-328.
- Chang H-K and Zylstra GJ (1998). Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J Journal of Bacteriology* **180**(24): 6529-6537.
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta SK and Joner E (2005). Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment (15 pp). *Environmental Science and Pollution Research* **12**(1): 34-48.
- Chebbi A, Hentati D, Zaghdien H, Baccar N, et al. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **122**: 128-140.

- Chen J, Zhang W, Li S, Zhang F, et al. (2018). Identifying critical factors of oil spill in the tanker shipping industry worldwide. *Journal of Cleaner Production* **180**: 1-10.
- Chian R-C and Quinn P (2010). *Fertility Cryopreservation*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Chikere CB and Fenibo EO (2018). Distribution of PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes in bacteria isolated from two illegal oil refining sites in the Niger Delta, Nigeria. *Scientific African* **1**: e00003.
- Chitra S, Sekaran G, Padmavathi S and Chandrakasan G (1995). REMOVAL OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM WASTEWATER USING MUTANT STRAIN OF *PSEUDOMONAS PICTORUM*. *The Journal of General and Applied Microbiology* **41**(3): 229-237.
- Chong N-M, Pai S-L and Chen C-H (1997). Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings. *Bioresource Technology* **59**(2): 235-240.
- Clark R and MacLeod W (1977). Inputs, transport mechanisms, and observed concentrations of petroleum in the marine environment. *Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms* **1**: 91-223.
- Clifton A (2014). *Oil Spills: Environmental Issues, Prevention and Ecological Impacts*, Nova Science Publishers, Incorporated.
- Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, et al. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods* **75**(1): 135-138.
- Coelho A, Castro AV, Dezotti M and Sant'Anna Jr G (2006). Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *Journal of hazardous materials* **137**(1): 178-184.
- Costa E, Usall J, Teixidó N, Garcia N, et al. (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. **89**(5): 793-800.
- Crespo MJ, Abarca ML and Cabañes FJ (2000). Evaluation of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(10): 3872-3875.

- Dagley S (1971). Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Advances in microbial physiology*, Elsevier. **6**: 1-46.
- Davison J (2005). Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **32**(11): 639-650.
- de Boer J and Wagelmans M (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil – Practical Options for Remediation. *Clean Soil Air Water* **44**(6): 648-653.
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP and Oliver G (1983). Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* **20**(5): 560-566.
- DeLeo DM, Ruiz-Ramos DV, Baums IB and Cordes EE (2016). Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **129**: 137-147.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F, et al. (1996). Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(6): 1908-1912.
- Diallo MM, Vural C, Cay H and Ozdemir G (2020). Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **n/a**(n/a).
- Diallo MM, Vural C, Şahar U and Ozdemir G (2019). Kurstakin molecules facilitate diesel oil assimilation by *Acinetobacter haemolyticus* strain 2SA through overexpression of alkane hydroxylase genes. *Journal of Environmental Technology*, 10.1080/09593330.2019.1689301: 1-15.
- Domínguez-Rodríguez VI, Adams RH, Sánchez-Madrigal F, Pascual-Chablé JdlS, et al. (2020). Soil contact bioassay for rapid determination of acute toxicity with *Eisenia foetida*. *Heliyon* **6**(1): e03131.
- Dumont F, Marechal P-A and Gervais P (2004). Cell Size and Water Permeability as Determining Factors for Cell Viability after Freezing at Different Cooling Rates. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(1): 268-272.
- Dzulkapli NF, Abdul-Talib S, Kalavathy R and Yin C-Y (2009). Identification of bacterial strains capable of degrading Malaysian petroleum sludge. . In:

- Conference of Scientific and Social Science Research (CSSR '08 '09). Melaka, Malaysia, <http://ir.uitm.edu.my/id/eprint/12820>.
- Eaton RW (2001). Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter* keyseri 12B. *J Journal of Bacteriology* **183**(12): 3689-3703.
- EcA I (2010). Petroleum refining water/wastewater use and management. Operations Best Practice Series, London, UK.
- El-Naas MH, Alhaija MA and Al-Zuhair S (2014). Evaluation of a three-step process for the treatment of petroleum refinery wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2**(1): 56-62.
- El Fantroussi S and Agathos SN (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* **8**(3): 268-275.
- Ergün Z (2015). Biyolojik maddelerin kurutularak saklanması: liyofilizasyon. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* **26**(1): 35-40.
- Eroğlu D (2018). Atıksu arıtımı için adapte aşılı kültürünün kuru karışım olarak üretimi, raf ömrünün, biyoparçalama etkinliğinin saptanması, verimi en iyi olan ürünlerin arıtım sisteminde denenmesi Doktora Tezi, Ege Üniversitesi
- Evans W, Fernley H and Griffiths E (1965). Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochemical Journal* **95**(3): 819-831.
- Fan Y, Wang Y, Qian P-Y and Gu J-D (2004). Optimization of phthalic acid batch biodegradation and the use of modified Richards model for modelling degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **53**(1): 57-63.
- Farhadian M, Vachelard C, Duchez D and Larroche C (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* **99**(13): 5296-5308.
- Foght J (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of molecular microbiology biotechnology* **15**(2-3): 93-120.
- Fonseca F, Béal C and Corrieu G (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* **67**(1): 83-90.

- Fouratt MA, Rhodes JS, Smithers CM, Love NG, et al. (2003). Application of temperature gradient gel electrophoresis to the characterization of a nitrifying bioaugmentation product. *FEMS Microbiology Ecology* **43**(2): 277-286.
- Fuller BJ (2004). Cryoprotectants : The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* **25**: 375-388.
- Gan S, Lau EV and Ng HK (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* **172**(2): 532-549.
- Garg KK and Prasad B (2016). Development of Box Behnken design for treatment of terephthalic acid wastewater by electrocoagulation process: Optimization of process and analysis of sludge. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **4**(1): 178-190.
- Garg KK and Prasad B (2017). Treatment of toxic pollutants of purified terephthalic acid waste water: A review. *Environmental Technology & Innovation* **8**: 191-217.
- Garg KK, Prasad BJET and Innovation (2017). Treatment of toxic pollutants of purified terephthalic acid waste water: A review. **8**: 191-217.
- Gargouri B, Karray F, Mhiri N, Aloui F, et al. (2011). Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials* **189**(1-2): 427-434.
- Ghosal D, Dutta A, Chakraborty J, Basu S, et al. (2013). Characterization of the metabolic pathway involved in assimilation of acenaphthene in *Acinetobacter* sp. strain AGAT-W. *Research in Microbiology* **164**(2): 155-163.
- Goldstein RM, Mallory LM and Alexander M (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(4): 977-983.
- Goldstein RM, Mallory LM and Alexander M (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. **50**(4): 977-983.
- Gómez Zavaglia A, Tymczyszyn E, De Antoni G and Aníbal Disalvo E (2003). Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology* **95**(6): 1315-1320.
- Gorman R and Adley CC (2004). An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. **38**(4): 306-310.

- Graham P (1973). Phthalate ester plasticizers--why and how they are used. *J Environmental health perspectives* **3**: 3-12.
- Guerin TF (2000). The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research* **7**(1): 19-26.
- Guo J, Ma F, Chang C-C, Cui D, et al. (2009). Start-up of a two-stage bioaugmented anoxic–oxic (A/O) biofilm process treating petrochemical wastewater under different DO concentrations. *Bioresource Technology* **100**(14): 3483-3488.
- Guo J, Wang J, Cui D, Wang L, et al. (2010). Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresource Technology* **101**(17): 6622-6629.
- Habe H, Miyakoshi M, Chung J, Kasuga K, et al. (2003). Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Applied microbiology biotechnology* **61**(1): 44-54.
- Hamza UD, Mohammed IA and Sale A (2012). POTENTIALS OF BACTERIAL ISOLATES IN BIOREMEDIATION OF PETROLEUM REFINERY WASTEWATER. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation* **1**(3): 131-138.
- Harayama S, Kasai Y and Hara A (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in biotechnology* **15**(3): 205-214.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. . *Genome research* **6**(10): 986-994.
- Hoff RZ (1993). Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin* **26**(9): 476-481.
- Holt WV (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**(1): 3-22.
- Horan NJ (1989). *Biological wastewater treatment systems: theory and operation*. Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.

- Huang X-D, El-Alawi Y, Penrose DM, Glick BR, et al. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution* **130**(3): 465-476.
- Hubálek Z (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**(3): 205-229.
- Huwiler SG, Löffler C, Anselmann SE, Stärk H-J, et al. (2019). One-megadalton metalloenzyme complex in *Geobacter metallireducens* involved in benzene ring reduction beyond the biological redox window. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**(6): 2259-2264.
- Ili Bazilah AB, Sariah M, Zainal Abidin MA and Yasmeeen S (2011). Effect of carrier and temperature on the viability of *Burkholderia* sp. (UPMB3) and *Pseudomonas* sp. (UPMP3) during storage. *International Journal of Agriculture and Biology* **13**(2): 198-202.
- Jafarinejad S (2016). *Petroleum waste treatment and pollution control*, Butterworth-Heinemann.
- Jafarinejad S (2017). Cost estimation and economical evaluation of three configurations of activated sludge process for a wastewater treatment plant (WWTP) using simulation. *Applied Water Science* **7**(5): 2513-2521.
- Jafarinejad S and Jiang SC (2019). Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **7**(5): 103326.
- Jain RK, Sayler GS, Wilson JT, Houston L, et al. (1987). Maintenance and stability of introduced genotypes in groundwater aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(5): 996-1002.
- Janbandhu A and Fulekar MH (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of hazardous materials* **187**(1-3): 333-340.
- Jegatheesan V, Pramanik BK, Chen J, Navaratna D, et al. (2016). Treatment of textile wastewater with membrane bioreactor: a critical review. *Bioresource technology* **204**: 202-212.
- Jenkins D. RMGaDG (1993). *Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, Lewis Publishers.

- Junker F, Kiewitz R and Cook AM (1997). Characterization of the p-toluenesulfonate operon *tsaMBCD* and *tsaR* in *Comamonas testosteroni* T-2. *Journal of Bacteriology* **179**(3): 919-927.
- Kalman DS (2014). Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. *J Foods* **3**(3): 394-402.
- Kasai D, Iwasaki T, Nagai K, Araki N, et al. (2019). 2, 3-Dihydroxybenzoate meta-Cleavage Pathway is Involved in o-Phthalate Utilization in *Pseudomonas* sp. strain PTH10. *Scientific reports* **9**(1): 1-11.
- Kasper JC and Friess W (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **78**(2): 248-263.
- Keyser P, Pujar BG, Eaton RW and Ribbons DW (1976). Biodegradation of the phthalates and their esters by bacteria. *J Environmental Health Perspectives* **18**: 159-166.
- Khan MAI, Biswas B, Smith E, Naidu R, et al. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil-a review. *Chemosphere* **212**: 755-767.
- Khan MI, Cheema SA, Tang X, Hashmi MZ, et al. (2013). A Battery of Bioassays for the Evaluation of Phenanthrene Biototoxicity in Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **65**(1): 47-55.
- Khehra MS, Saini HS, Sharma DK, Chadha BS, et al. (2005). Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. *Water Research* **39**(20): 5135-5141.
- Kim J, Lim J and Lee C (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* **31**(8): 1358-1373.
- Kim JY, Woo SH, Lee MW and Park JM (2012). Sequential treatment of PTA wastewater in a two-stage UASB process: Focusing on p-toluate degradation and microbial distribution. *Water Research* **46**(8): 2805-2814.

- Kleerebezem R, Pol LWH, Lettinga GJA and Microbiology E (1999). Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. **65**(3): 1152-1160.
- Koshlaf E, Shahsavari E, Haleyur N, Mark Osborn A, et al. (2019). Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. *Geoderma* **338**: 216-225.
- Krasilnikov NA (1967). Preservation methods for culture collection microorganisms. Moskva: Nauka (in Russian). **151**
- Kristiansen B, rn E, Tveten Y and Jenkins A (1998). Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*? A population based study. *BMJ* **317**(7159): 621.
- Kuhnert P, Boerlin P and Frey J (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* **24**(1): 107-117.
- Kumar G, Prashanth N and Kumari B (2011). Fundamentals and applications of lyophilization. *J Adv Pharmaceut Res* **2**: 157-169.
- KUMAR M, SINGH M, TIWARI A, TULI D, et al. (2012). Bio-augmentation composition and use thereof for improving efficiency of effluent treatment in hydrocarbon processing plant.
- Kuppusamy S, Palanisami T, Megharaj M, Venkateswarlu K, et al. (2016). Ex-Situ Remediation Technologies for Environmental Pollutants: A Critical Perspective. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 236. de Voogt P. Cham, Springer International Publishing, 10.1007/978-3-319-20013-2_2: 117-192.
- Kuppusamy S, Palanisami T, Megharaj M, Venkateswarlu K, et al. (2016). In-Situ Remediation Approaches for the Management of Contaminated Sites: A Comprehensive Overview. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 236. de Voogt P. Cham, Springer International Publishing, 10.1007/978-3-319-20013-2_1: 1-115.
- Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, Lee YB, et al. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere* **168**: 944-968.

- Kuyukina MS, Krivoruchko AV and Ivshina IB (2020). Advanced Bioreactor Treatments of Hydrocarbon-Containing Wastewater. *Applied Sciences* **10**(3): 831.
- Larena I, De Cal A, Liñán M and Melgarejo P (2003). Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. **94**(3): 508-514.
- Lasken RS (2012). Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nature Reviews Microbiology* **10**(9): 631-640.
- Lastra CCL, Hajek AE and Humber RA (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* **80**(10): 1126-1130.
- Latini G (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *J Clinica Chimica Acta* **361**(1-2): 20-29.
- Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, et al. (2006). In utero exposure to phthalates and fetal development. *J Current medicinal chemistry* **13**(21): 2527-2534.
- Leahy JG and Colwell RR (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Molecular Biology Reviews* **54**(3): 305-315.
- Lebesgue Y, Du Pontavice A and Jumentier M (2007). Product for environmental biotreatment. France, <https://patents.google.com/patent/EP1769073A1/en?q=EP1769073+A1>.
- Lebesgue Y, Du Pontavice A and Jumentier M (2008). Environmental biotreatment product. France, <https://patents.google.com/patent/EP1976984A1/en?q=EP1976984A1>.
- Lee I-S, Parameswaran P and Rittmann BE (2011). Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresource Technology* **102**(22): 10266-10272.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, et al. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(10): 3592-3597.
- Li B and Bishop PL (2004). Micro-profiles of activated sludge floc determined using microelectrodes. *Water Research* **38**(5): 1248-1258.

- Li X-k, Ma K-l, Meng L-w, Zhang J, et al. (2014). Performance and microbial community profiles in an anaerobic reactor treating with simulated PTA wastewater: From mesophilic to thermophilic temperature. *Water Research* **61**: 57-66.
- Liang D-W, Zhang T and Fang HHP (2007). Anaerobic degradation of dimethyl phthalate in wastewater in a UASB reactor. *Water Research* **41**(13): 2879-2884.
- Limbergen HV, Top EM and Verstraete W (1998). Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**(1): 16-23.
- Lin M-H, Chen T-C, Kuo T-t, Tseng C-C, et al. (2000). Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**(11): 4121-4125.
- Lin S, Wang Y, Lin J, Wang X, et al. (2009). Dominant bacteria correlated with elimination of sludge in an innovative reactor. *Progress in Natural Science* **19**(12): 1765-1771.
- Linnet MS, Yin S-N, Gilbert ES, Dores GM, et al. (2015). A retrospective cohort study of cause-specific mortality and incidence of hematopoietic malignancies in Chinese benzene-exposed workers. *International Journal of Cancer* **137**(9): 2184-2197.
- Liu C, Huang X and Wang H (2008). Start-up of a membrane bioreactor bioaugmented with genetically engineered microorganism for enhanced treatment of atrazine containing wastewater. *Desalination* **231**(1): 12-19.
- Liu H, Yang C, Tian Y, Lin G, et al. (2010). Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP. *Marine Pollution Bulletin* **60**(11): 2056-2061.
- Liu K (2012). *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*, Springer.
- Logares R, Haverkamp THA, Kumar S, Lanzén A, et al. (2012). Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: Synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of Microbiological Methods* **91**(1): 106-113.
- Losikov B and Traktovenko I (1967). Additives to diesel fuels. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils* **3**(1): 71-74.
- Lottrup G, Andersson AM, Leffers H, Mortensen G, et al. (2006). Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *J International journal of andrology* **29**(1): 172-180.
- Lovekamp-Swan T and Davis BJ (2003). Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *J Environmental health perspectives* **111**(2): 139-145.

- Ma F, Guo J-b, Zhao L-j, Chang C-c, et al. (2009). Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresource Technology* **100**(2): 597-602.
- Macini P and Mesini E (2008). The Petroleum Upstream Industry: Hydrocarbons Exploration and Production, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, et al. (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **39**(1): 81-86.
- Makinen PM, Theno TJ, Ferguson JF, Ongerth JE, et al. (1993). Chlorophenol toxicity removal and monitoring in aerobic treatment: recovery from process upsets. *Environmental Science & Technology* **27**(7): 1434-1439.
- Mallick S, Chakraborty J and Dutta TK (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Critical reviews in microbiology* **37**(1): 64-90.
- Malusà, F. P and L. C (2016). Efficacy of Biofertilizers: Challenges to Improve Crop Production. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Singh D., Singh H. and R. P. New Delhi., Springer, https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_2.
- Mariano J and La Rovere E (2017). Environmental impacts of the oil industry, LAP LAMBERT Academic Publishing.
- Martín-Hernández M, Suárez-Ojeda ME and Carrera J (2012). Bioaugmentation for treating transient or continuous p-nitrophenol shock loads in an aerobic sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* **123**: 150-156.
- Martínez-Gómez C, Vethaak AD, Hylland K, Burgeot T, et al. (2010). A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *ICES Journal of Marine Science* **67**(6): 1105-1118.
- Martos GI, Minahk CJ, Font de Valdez G and Morero R (2007). Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* **45**(3): 282-288.

- Matejczyk M, Płaza GA, Nałęcz-Jawecki G, Ulfig K, et al. (2011). Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere* **82**(7): 1017-1023.
- McDonnell DP, Detke HC, Bergstrom RF, Kothare P, et al. (2010). Post-injection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia treated with olanzapine long-acting injection, II: investigations of mechanism. *BMC Psychiatry* **10**(1): 45.
- Melin P, Håkansson S and Schnürer J (2007). Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(5): 1008-1016.
- Méndez V, Fuentes S, Morgante V, Hernández M, et al. (2017). Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **17**(4): 1074-1087.
- Meng L, Qiao M and Arp HPH (2011). Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *Journal of Soils and Sediments* **11**(3): 482-490.
- Mishra AK and Kumar GS (2015). Weathering of oil spill: modeling and analysis. *Aquatic Procedia* **4**: 435-442.
- Mishra B and Dadhich S (2010). Methodology of nitrogen biofertilizer production. *J. Adv. Dev. Res.* **1**: 3-6.
- Mittal A and Singh P (2009). Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian Journal of Experimental Biology*, <http://hdl.handle.net/123456789/5981>.
- Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T and Nakahara T (2008). Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of general applied microbiology* **54**(1): 9-24.
- Mohajeri L, Zahed MA, Abdul Aziz H, Hasnain Isa M, et al. (2017). Assessment of Bioaugmentation and Biostimulation Efficiencies for Petroleum Contaminated Sediments. *J Environmental Energy* **1**(1): 89-98.
- Moody JD, Freeman JP, Fu PP and Cerniglia CE (2004). Degradation of benzo [a] pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Environmental microbiology reports* **70**(1): 340-345.
- More TT, Yan S, Tyagi RD and Surampalli RY (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology* **101**(20): 7691-7700.

- Moreno R, Hernández-Arranz S, La Rosa R, Yuste L, et al. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. **17**(1): 105-118.
- Morgan CA, Herman N, White PA and Vesey G (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods* **66**(2): 183-193.
- Morris R, Schauer-Gimenez A, Bhattad U, Kearney C, et al. (2014). Methyl coenzyme M reductase (mcrA) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H₂/CO₂-enriched anaerobic biomass. **7**(1): 77-84.
- Mputu Kanyinda J-N, Pierart C, Weekers F, Destain J, et al. (2012). Impact of protecting compounds on the viability, physiological state and lipid degradation of freeze-dried *Pseudomonas Fluorescens* btp1 during storage. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry* **8**: 17+.
- Muttray AF, Yu Z and Mohn WW (2001). Population dynamics and metabolic activity of *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 within pulp mill wastewater microbial communities assayed by competitive PCR and RT-PCR. *FEMS Microbiology Ecology* **38**(1): 21-31.
- Nacheva PM (2011). Water management in the petroleum refining industry. *Water conservation*. InTech: 105-128.
- Nagai T, Tomioka K, Takeuchi K, Iida M, et al. (2005). Evaluation of Preservation Techniques of Microorganism Resources in the MAFF Genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* **39**(1): 19-27.
- Nakasone KK, Peterson SW and Jong S-C (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods*. . Amsterdam : Elsevier Academic Press **2004**: 37-47.
- Nichols WJ (2001). THE U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: NATIONAL OIL AND HAZARDOUS SUBSTANCES POLLUTION CONTINGENCY PLAN, SUBPART J PRODUCT SCHEDULE (40 CFR 300.900). *International Oil Spill Conference Proceedings* **2001**(2): 1479-1483.

- Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, et al. (2013). Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences* **3**(4): 87-98.
- Nomura Y, Nakagawa M, Ogawa N, Harashima S, et al. (1992). Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *Journal of fermentation and bioengineering* **74**(6): 333-344.
- Nüsslein K, Maris D, Timmis K and Dwyer DF (1992). Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(10): 3380-3386.
- Ologunde M, Adelani A and Liasu M (2008). Chemical compositions of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) hybrids planted in different natural locations in Northern Nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* **2**(3): 229-234.
- Orszulik ST (2008). *Environmental technology in the oil industry*, Springer.
- Otero MC, Espeche MC and Nader-Macías ME (2007). Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry* **42**(10): 1406-1411.
- Outlook BE (2012). *energy outlook 2030*, BP Publishers: London.
- Özdemir G and Eltem R (2001). *Su ve Atık Suların Mikrobiyolojik İncelenmesi ve Arıtım Uygulamaları*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar.
- Palinkas LA, Petterson JS, Russell J and Downs MA (1993). Community patterns of psychiatric disorders after the Exxon Valdez oil spill. *The American Journal of Psychiatry* **150**(10): 1517-1523.
- Palmfeldt J, Rådström P and Hahn-Hägerdal B (2003). Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* **47**(1): 21-29.
- Parameswaran P, Torres CI, Lee H-S, Krajmalnik-Brown R, et al. (2009). Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and Non-ARB in a biofilm anode: electron balances. **103**(3): 513-523.
- Park D, Lee DS, Kim YM and Park JM (2008). Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology* **99**(6): 2092-2096.

- Parker TS, Levine DM, Chang JC, Laxer J, et al. (1995). Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity* **63**(1): 253-258.
- Patureau D, Helloin E, Rustrian E, Bouchez T, et al. (2001). Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. *Water Research* **35**(1): 189-197.
- Pembrey RS, Marshall KC and Schneider RP (1999). Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7): 2877-2894.
- Perelo LW (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* **177**(1): 81-89.
- Petruzzelli G, Pedron F, Rosellini I, Grifoni M, et al. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heavy Metal Contaminated Sites: Phytoremediation as a Strategy for Addressing the Complexity of Pollution. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 4. Ansari AA, Gill SS, Gill R, Lanza GR and Newman L. Cham, Springer International Publishing, 10.1007/978-3-319-41811-7_5: 61-90.
- Philipp B and Schink B (2012). Different strategies in anaerobic biodegradation of aromatic compounds: nitrate reducers versus strict anaerobes. *Environmental microbiology reports* **4**(5): 469-478.
- Phrommanich S, Suanjit S, Upatham S, Grams SV, et al. (2009). Quantitative detection of the oil-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. *Microbiological Research* **164**(4): 486-492.
- Potts M (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* **58**(4): 755-805.
- Pradhan SP, Paterek JR, Liu BY, Conrad JR, et al. (1997). Pilot-scale bioremediation of PAH-contaminated soils. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63**(1): 759-773.
- Prakash O, Nimonkar Y and Shouche YS (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters* **339**(1): 1-9.

- Qu Y-Y, Zhou J-T, Wang J, Xing L-L, et al. (2009). Population dynamics in bioaugmented membrane bioreactor for treatment of bromoamine acid wastewater. *Bioresource Technology* **100**(1): 244-248.
- Quan X, Shi H, Liu H, Lv P, et al. (2004). Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Research* **38**(1): 245-253.
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, et al. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* **90**(2): 159-168.
- Ramadan MA, el-Tayeb OM and Alexander M (1990). Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(5): 1392-1396.
- Ramadas K, Megharaj M, Venkateswarlu K and Naidu R (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of The Total Environment* **636**: 968-974.
- Ray B, Jezeski JJ and Busta FF (1971). Effect of Rehydration on Recovery, Repair, and Growth of Injured Freeze-Dried *Salmonella anatum*. *Applied Microbiology* **22**(2): 184-189.
- Razo-Flores E, Macarie H and Morier F (2006). Application of biological treatment systems for chemical and petrochemical wastewater.
- Rey S, Xialoin T and Michael J (2004). Study of optimization of the freeze dried product: practical advice pharmaceutical research. *Eur. J. Pharm*: 78-94.
- Ribbons D and Evans W (1960). Oxidative metabolism of phthalic acid by soil pseudomonads. *Biochemical Journal* **76**(2): 310-318.
- Robertson BK, Harden C, Selvaraju SB, Pradhan S, et al. (2014). Molecular Detection, Quantification, and Toxigenicity Profiling of *Aeromonas* spp. in Source- and Drinking-Water. *The open microbiology journal* **8**: 32-39.
- Ron EZ and Rosenberg E (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology* **27**: 191-194.
- Roy S, Labelle S, Mehta P, Mihoc A, et al. (2005). Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. *Plant and Soil* **272**(1): 277-290.

- Ruban EL (1989). Storage of Microbial Cultures. . *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **25**(3): 291-301.
- Rudolph AS and Crowe JH (1985). Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**(4): 367-377.
- Saha R, Donofrio RS, Goeres DM and Bagley ST (2012). Rapid detection of rRNA group I pseudomonads in contaminated metalworking fluids and biofilm formation by fluorescent in situ hybridization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**(3): 799-808.
- Sahu and Brahma Prakash (2016). Formulations of Biofertilizers – Approaches and Advances. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. D. S, H. S and R. P. New Delhi, Springer, 10.1007/978-81-322-2644-4_12: 179-198.
- Saikaly PE, Hicks K, Barlaz MA and de los Reyes Iii FL (2010). Transport Behavior of Surrogate Biological Warfare Agents in a Simulated Landfill: Effect of Leachate Recirculation and Water Infiltration. *Environmental Science & Technology* **44**(22): 8622-8628.
- Sakai Y, Maeng HJ, Tani Y and Kato N (1994). Use of Long-chain n-Alkanes (C₁₃-C₄) by an Isolate, *Acinetobacter* sp. M-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**(11): 2128-2130.
- Salanitro JP, Dorn PB, Huesemann MH, Moore KO, et al. (1997). Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. *Environmental Science & Technology* **31**(6): 1769-1776.
- Salleh AB, Ghazali FM, Rahman RNZA and Basri M (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology* <http://hdl.handle.net/123456789/11330>.
- Sanders JW, Venema G and Kok J (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* **23**(4): 483-501.
- Saygılı B (2012). Asenaften ve Floren Biyoparçalama Kapasitesindeki Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Parçalama Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisan Tezi, Ege Üniversitesi
- Schettler T (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *J International journal of andrology* **29**(1): 134-139.

- Schläfli HR, Weiss MA, Leisinger T and Cook AM (1994). Terephthalate 1, 2-dioxygenase system from *Comamonas testosteroni* T-2: purification and some properties of the oxygenase component. *Journal of bacteriology* **176**(21): 6644-6652.
- Schneider J, Vargo C, Campbell D and Hall R (2011). An analysis of reported sustainability-related efforts in the petroleum refining industry. *Journal of Corporate Citizenship*, (44): 69-84.
- Schultz T (2007). Wastewater treatment for the petroleum industry, selecting the right oil/water separation technology, technology & trends, specialist article. *P&A Select Oil & Gas*.
- Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Morimura S, et al. (2003). Purification and gene cloning of the oxygenase component of the terephthalate 1, 2-dioxygenase system from *Delftia tsuruhatensis* strain T7. *FEMS microbiology letters* **220**(2): 255-260.
- 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. **48**(3): 295-301.
- Singh, Dhananjaya Pratap, Harikesh Bahadur Singh and Prabha R (2016). *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*. . New Delhi, Springer.
- 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): 1927-1932.
- Singh OV and Jain RK (2003). Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(2): 128-135.
- Singh P and Tiwary BN (2017). Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **10**: 20-29.
- Smith D, J R and E S (2008). The ex situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. , *Biotechnology, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of UNESCO, EOLSS Publisher, Oxford, UK.
- Smith RS (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology* **38**(6): 485-492.
- Solak O (2015). Türkiye'deki Katı Atık Deponi Alanlarında Oluşan Gazın Çevresel ve Ekonomik Açından İncelenmesi. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi

- Solomon GM and Janssen S (2010). Health Effects of the Gulf Oil Spill. *JAMA* **304**(10): 1118-1119.
- Song M, Luo C, Jiang L, Zhang D, et al. (2015). Identification of Benzo[a]pyrene-Metabolizing Bacteria in Forest Soils by Using DNA-Based Stable-Isotope Probing. *Applied and Environmental Microbiology* **81**(21): 7368-7376.
- Songzhe F, Fan H, Liu S, Liu Y, et al. (2009). A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability. *Journal of Environmental Sciences* **21**(8): 1153-1161.
- Speight J (2011). Production, properties and environmental impact of hydrocarbon fuel conversion. *Advances in Clean Hydrocarbon Fuel Processing*, Elsevier: 54-82.
- Sponza DT and Gok O (2012). Aerobic biodegradation and inhibition kinetics of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a petrochemical industry wastewater in the presence of biosurfactants. **87**(5): 658-672.
- Stamenković S, Beškoski V, Karabegović I, Lazić M, et al. (2018). Microbial fertilizers: a comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research* **16**(1): e09R01.
- Steliga T, Jakubowicz P and Kapusta P (2012). Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* **125**: 1-10.
- Stephens JHG and Rask HM (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* **65**(2): 249-258.
- Stephenson D and Stephenson T (1992). Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnology Advances* **10**(4): 549-559.
- Stielow JB, Vaas LAI, Göker M, Hoffmann P, et al. (2012). Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. *Mycologia* **104**(1): 324-330.
- Stingley RL, Brezna B, Khan AA and Cerniglia CE (2004). Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J Microbiology* **150**(11): 3749-3761.
- Stormo KE and Crawford RL (1992). Preparation of Encapsulated Microbial Cells for Environmental Applications. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(2): 727-730.

- Streeter JG (2003). Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **95**(3): 484-491.
- Stroo HF, Major DW, Steffan RJ, Koenigsberg SS, et al. (2013). Bioaugmentation with *Dehalococcoides*: a Decision Guide. Bioaugmentation for Groundwater Remediation. Stroo HF, Leeson A and Ward CH. New York, NY, Springer New York, 10.1007/978-1-4614-4115-1_4: 117-140.
- Sudoma L (1987). Stabilization of dried bacteria extended in particulate carriers. USA.
- Tan GH and Mustapha NA (2014). comparative analysis of preservation of functional food cultures by freeze-drying, liquid-drying and freezing methods. Direct Research Journal of Agriculture and Food Science **2**(2): 13-18.
- Tang X and Pikal MJ (2004). Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. Pharmaceutical Research **21**(2): 191-200.
- Taylor LT and Jones DM (2001). Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. Chemosphere **44**(5): 1131-1136.
- Teixeira P, Castro H and Kirby R (1995). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **78**(4): 456-462.
- Thamer M, Al-Kubaisi AR, Zahraw Z, Abdullah HA, et al. (2013). Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq. Natural Science **Vol.05No.07**: 9.
- Thompson IP, Van Der Gast CJ, Ciric L and Singer AC (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. Environmental Microbiology **7**(7): 909-915.
- Tiedt O, Fuchs J, Eisenreich W and Boll M (2018). A catalytically versatile benzoyl-CoA reductase, key enzyme in the degradation of methyl-and halobenzoates in denitrifying bacteria. Journal of Biological Chemistry **293**(26): 10264-10274.
- Tomás RrA, Bordado JoC and Gomes JoFJCR (2013). p-Xylene oxidation to terephthalic acid: a literature review oriented toward process optimization and development. **113**(10): 7421-7469.
- Torres B, García JL and Diaz E (2004). Plasmids as Tools for Containment. Plasmid Biology, American Society of Microbiology, doi:<https://doi.org/10.1128/9781555817732.ch29>.

- Tršić-Milanović N, Kodžić A, Baras J and Dimitrijević-Branković S (2001). The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. *Journal of the Serbian Chemical Society* **66**(7): 435-441.
- Tsutsui H, Anami Y, Matsuda M, Inoue D, et al. (2010). Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* to bacteria in activated sludge developed under different sludge retention times. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**(6): 684-689.
- Tyagi M, da Fonseca MMR and de Carvalho CCCR (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* **22**(2): 231-241.
- U.S.EPA (2002). Spill NCP Product Schedule. <http://www.epa.gov/oilspill>.
- Ueno A, Ito Y, Yumoto I and Okuyama H (2007). Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(12): 1739-1745.
- Uzunova-Doneva T and Donev T (2005). Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of culture collections* **4**(1): 17-28.
- van der Wal A, Norde W, Zehnder AJB and Lyklema J (1997). Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **9**(1): 81-100.
- Varjani S and Upasani VN (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management* **245**: 358-366.
- Varjani SJ and Upasani VN (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology* **222**: 195-201.
- Varjani SJ and Upasani VN (2016). Core Flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology* **220**: 175-182.

- Vassilev N and de Oliveira Mendes G (2018). Chapter 19 - Solid-State Fermentation and Plant-Beneficial Microorganisms. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Pandey A, Larroche C and Soccol CR, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00019-0>: 435-450.
- Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia Del Moral LF, et al. (2020). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers in plant science* **11**: 270-270.
- Venkata Mohan S, Mohanakrishna G, Ramanaiah SV and Sarma PN (2008). Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment in biofilm configured anaerobic periodic discontinuous batch reactor using distillery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy* **33**(2): 550-558.
- Verma S, Prasad B and Mishra IM (2011). Thermochemical Treatment (Thermolysis) of Petrochemical Wastewater: COD Removal Mechanism and Floc Formation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **50**(9): 5352-5359.
- Viñas M, Sabaté J, Espuny MJ and Solanas AM (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied environmental microbiology* **71**(11): 7008-7018.
- Wang YZ, Zhou Y and Zylstra GJ (1995). Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. *J Environmental health perspectives* **103**(suppl 5): 9-12.
- Watanabe K, Teramoto M and Harayama S (2002). Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. *Environmental Microbiology* **4**(10): 577-583.
- Weijers S (2000). Modeling, identification and control of activated sludge plants for nitrogen removal, Eindhoven: Eindhoven University of Technology.
- Weinert T, Huwiler SG, Kung JW, Weidenweber S, et al. (2015). Structural basis of enzymatic benzene ring reduction. *Nature chemical biology* **11**(8): 586-591.
- Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar H-K, Zotchev SB, et al. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(6): 1209-1221.
- Whyte LG, Hawari J, Zhou E, Bourbonnière L, et al. (1998). Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic

- Rhodococcus* sp. Applied and Environmental Microbiology **64**(7): 2578-2584.
- Widdel F and Rabus R (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current opinion in biotechnology **12**(3): 259-276.
- Winters RD and Winn WC (2010). A Simple, Effective Method for Bacterial Culture Storage: A Brief Technical Report. jbv **40**(2): 99-101.
- Yakimov MM, Timmis KN and Golyshin PN (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. Current Opinion in Biotechnology **18**(3): 257-266.
- Yu F-B, Ali SW, Guan L-B, Li S-P, et al. (2010). Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. Journal of Hazardous Materials **176**(1): 20-26.
- Zanaroli G, Di Toro S, Todaro D, Varese GC, et al. (2010). Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. Microbial Cell Factories **9**(1): 10.
- Zhan Y, Xu Q, Yang MM, Yang HT, et al. (2012). Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. Letters in Applied Microbiology **54**(1): 10-17.
- Zhang T and Fang HHP (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Applied Microbiology and Biotechnology **70**(3): 281-289.
- Zhang Z, Ma L, Zhang X-X, Li W, et al. (2010). Genomic expression profiles in liver of mice exposed to purified terephthalic acid manufacturing wastewater. Journal of Hazardous Materials **181**(1): 1121-1126.
- Zhou J and Thompson DK (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. Current Opinion in Biotechnology **13**(3): 204-207.
- Zimmerman J (2003). From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology: Dale, Jeremy W., and von Schantz, Malcolm. **31**(3): 217-217.

TEŞEKKÜR

Değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunuyorum. Bilgi birikimi ve tecrübeleriniz ile, yol gösterici olup katkılar sağladığınız ve araştırmamın yürütülmesinde desteklediğiniz için teşekkür ederim. Tez izleme komitesi üyeleri hocalarım, Prof. Dr. İsmail KARABOZ ve Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN'e tavsiyelerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince katkıları yadsınamaz derecede büyük olan, manevi desteklerini de esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Hürsel ÇAY, Didem & Basri AKSU, Burçin KARABEY, Ezgi PAÇA, Bike PASHAYEVA ve Mamadou Malick DIALLO'ya teşekkür ederim.

SANTEZ proje ekibinde birlikte çalıştığımız Ayhan EZDEŞİR ve Caner VURAL'a katkılarından dolayı teşekkür ederim. 0-22 Lab, 147 Lab ve EgeMikal çalışanlarına destekleri için teşekkür ederim.

Varlığını ve desteğini hep hissettiğim sevgili yol arkadaşım Ufuk UYANIKER'e teşekkür ederim. Destekleriyle bana her zaman güç veren, koşulsuz sevgiyi daima hissettiren Annem, Babam ve canım kardeşim Ceren'e teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) '2211-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Doktora Burs Programı' ile maddi destek sağlayan Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'e teşekkür ederim. SANTEZ-00719 STZ 2014 (112D044 TÜBİTAK) hibe kapsamında T.C. Bilim ve Teknoloji Bakanlığı'na ve proje ortağı PETKİM Petrokimya Holding A.Ş.'ye teşekkür ederim. Ege Üniversitesi İdari Mali İşler Daire Başkanlığı Bilimsel Teknik ve Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne (BAP Proje No: FDK-2018-20014) finansal desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İzmir, 28/12/2020

Tayyibe ALPAY UYANIKER

ÖZGEÇMİŞ

Tayyibe ALPAY UYANIKER, 2010 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan mezun olmuştur. 2012 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitime başlamıştır. Aynı Anabilim Dalı'nda 2014 yılında Doktora eğitime başlamıştır.

