

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DETERJAN İLE KİRLETİLMİŞ YÜZEY SULARINDA YÜKSEK  
DEGRADASYON YETENEĞİNE SAHİP İZOLATLARIN ARAŞTIRILMASI

HÜSEYİN ULUSOY

MAYIS 2015

Biyoloji Anabilim Dalında Hüseyin ULUSOY tarafından hazırlanan DETERJAN İLE KİRLENMİŞ YÜZEY SULARINDA YÜKSEK DEGRADASYON GÖSTEREN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sema ÇETİN

\_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE

\_\_\_\_\_

Üye (Eş danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN

\_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN

\_\_\_\_\_

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ümit YIRTICI

\_\_\_\_\_

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

(Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### DETERJAN İLE KİRLENMİŞ YÜZEY SULARINDA YÜKSEK DEGRADASYON YETENEĞİNE SAHİP İZOLATLARIN ARAŞTIRILMASI

ULUSOY, Hüseyin

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2015, 104 sayfa

Biyolojik olarak parçalanabilen deterjanlar, atık işleme tesislerinde veya nehir ve akarsularda yeterli zaman verildiğinde degrade olurlar. Ancak ham su kaynaklarının çoğunun zaman zaman deterjanlar veya deterjanların kısmi parçalanmış yan ürünleri tarafından kirletildiği yapılan birçok çalışma ile saptanmıştır. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ev ve endüstride en yaygın kullanılan deterjanlardan bir tanesidir. Kullanımından sonra büyük miktarlarda yüzey sularına atılmaktadır. Bu durumda suların doğal dengesini bozarak, suda yaşayan canlıları ve onlarla beslenen insanların sağlığını tehdit etmektedir. Bu tez ile Kırıkkale-Kızılırmak'ın deterjan kirliliği bakımından değerlendirilmesi, deterjan ile kirlenmiş yüzey sularında degradasyon yapma yeteneğine sahip olan bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, deterjan degradasyon yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar sonrası deterjan kirliliği tespit edilmiş olan bölgelerden Erdemli Mah.- Sarımsalı Mevkii, Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Baraj Girişi ve Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı Mevkii bölgelerinden su örnekleri alınmış, bu su örneklerinden SDS degradasyonu yapan bakteriler izole edilmiş, bu bakterilerde SDS degradasyonundan sorumlu *sdsA* geni araştırılmış, 16S rDNA sekans analizi kullanılarak bu bakteriler tanımlanmış ve SDS degradasyon yetenekleri belirlenmiştir. Daha sonra ise SDS degradasyonundan sorumlu *sdsA* geni tarafından kodlanan alkil sülfataz enzim aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda 2.8 U/mg alkil sülfataz enzim aktivitesine sahip *Pseudomonas fluorescens* SDS3 ve

SDS6, *Pseudomonas baetica* SDS8 suşları ile, 1.90 U/mg alkil sülfataz enzim aktivitesine sahip *Pseudomonas fluorescens* SDS6 izolatları belirlenmiştir. % 70 ile % 80 arasında SDS degradasyonu gösteren iki *Pseudomonas fluorescens* SDS3&SDS6 ile bir *Pseudomonas baetica* SDS8 izolatları elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar ile yüzey sularında bulunan deterjanların uzaklaştırma çalışmalarında kullanılmak için potansiyel oluşturdukları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sodyum dodesil sülfat, *sdsA*, alkil sülfataz, biyoremidasyon, yüzey suları, deterjan kirliliği.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ISOLATES WITH HIGH DEGRADATION ABILITIES IN DETERGENT CONTAMINATED SURFACE WATERS

ULUSOY, Hüseyin

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent İÇGEN

May 2015, 104 Pages

Detergents, especially biodegradable ones, are degraded in wastewater treatment plants or in streams when sufficient time is given. However, many studies have still revealed that most of the surface waters are contaminated with detergents or their side products. Among all detergents, sodium dodecyl sulfate (SDS) is highly common in household and industry. After its use, most of the SDS discharged into streams and endangers aquatic environment and human life. Therefore, this thesis study aimed at the assessment of Kırıkkale-Kızılırmak interms of detergent pollution. Four locations, namely, Erdemli Mah.-Sarımusalı Mevkii, Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Baraj Girişi, Kızılırmak İl Çıkışı revealed to be contaminated with detergents were used to selectively isolate SDS degrading bacteria. After selection and identification the bacteria were further analysed for their SDS degradation ability, *sdsA* gene and alkyl sulfatase enzyme activity. The studies revealed three bacterial isolates including two *Pseudomonas fluorescens* SDS3&SDS12-1 and one *Pseudomonas baetica* SDS8 with 2.8 U/mg alkyl sulfatase enzyme activity. The isolates SDS3, SDS12-1 and SDS8 displayed % 70-80 SDS degradation ability. The study pointed out these isolates as potential isolates for removal of detergents from contaminated surface waters.

**Keywords:** Sodium dodecyl sulfate, *sdsA*, alkyl sulfatase, bioremediation, surface waters, detergent pollution.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezçalışmalarımnda bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez danışmanım Prof. Dr. Aysun ERGENE ve eş tez danışmanım sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN hocalarıma en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren çalışmalarım boyunca her an beraber olduğumuz, tüm maneviyatı ile yanımda olan Dr. Fadime YILMAZ, Salih Batuhan SALIK, Lale GÖKSU, ve ODTÜ Çevre Mühendisliğı Bölümü İcgen Team çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve hayatım boyunca her an yanımda olan ve beni sonsuz sevgileriyle kucaklayan bütün aile fertlerime başta babam, Feridun ULUSOY'a, annem Müşerrref ULUSOY ve kardeşim Naile Nur ULUSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Literatür Özetleri .....	1
1.1.1. Çevre Kirliliği .....	1
1.1.2. Su Kirliliği.....	2
1.1.3. Deterjan Kirliliği ve Etkileri .....	2
1.1.4. Deterjanlar .....	5
1.1.5. Deterjanların Sınıflandırılması.....	10
1.1.6. Atıksu Arıtma Yöntemleri.....	12
1.1.7. Deterjan Degrade Eden Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Teknikler.....	16
1.1.8. PZR için Primer Tasarımı .....	22
1.2. Çalışmanın Amacı .....	24
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	25
2.1 Materyal.....	25
2.1.1 Kullanılan Besiyerleri.....	25
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar .....	26
2.1.3.DNA İzolasyonunu Kitinde Kullanılan Kimyasallar .....	27
2.1.4. Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler .....	28
2.1.5. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar .....	28

2.1.6. Native-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	28
2.1.7. Native-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	29
2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12) .....	30
2.1.9. Dengeleyici Jelin Bileşimi (% 4) .....	30
2.1.10. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması .....	30
2.2. Yöntem .....	31
2.2.1. Çalışma Alanı ve Su Örneklerinin Toplanması.....	31
2.2.2. Su Öneklerinde MBAS Yöntemiyle Deterjan Analizi .....	33
2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu .....	33
2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen SDS Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	34
2.2.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi .....	34
2.2.6. Bakterilerin Deterjan Sanayi Atık Suyundaki Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi .....	34
2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı (CFU).....	35
2.2.8. SDS Degradasyon Oranlarının Belirlenmesi.....	35
2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini.....	35
2.2.10. PZR ve Optimizasyonu .....	36
2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması.....	36
2.2.12. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizlerin Yapılması .....	37
2.2.13. Primer Tasarımları ve <i>sdsA</i> Gen Analizlerinin Yapılması.....	37
2.2.14. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi.....	38
2.2.15. Alkil Sülfataz Proteini Eksraksiyonu .....	38
2.2.16. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
2.2.17. Alkil Sülfataz Enziminin Native-PAGE Protein Analizi .....	39
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>41</b>



3.1. Kırıkkale-Kızılırmak Suyu Deterjan Analizleri .....	41
3.2. Deterjan Kirliliği Gösteren Sulardan SDS Degrade Eden Bakterilerin İzole Edilmesi.....	42
3.3. Bakterilerin Laboratuvar Besi Ortamında ve Deterjan Sanayisi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	42
3.3.1. Deterjan Sanayi Atık Suyunda Kendiliğinden SDS Degradasyonu.....	43
3.3.2. SDS3 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi .....	43
3.3.2. SDS6 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi .....	45
3.3.3. SDS8 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi .....	47
3.3.4. SDS12-1 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi .	49
3.4. SDS3 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	51
3.4.1. SDS3 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması .....	52
3.5. SDS6 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	55
3.5.1. SDS6 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması .....	56
3.6. SDS8 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması.....	59
3.6.1. SDS8 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması .....	60
3.7. SDS12-1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi .....	62
3.7.1. SDS12-1 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması.....	63
3.8. <i>sdsA</i> Gen Analizlerinin Yapılması.....	65
3.8.1. <i>sdsA</i> Geni Primer Tasarım .....	65
3.8.2. Tasarlanan Primer ile <i>sdsA</i> Geni Analizi.....	74
3.9. SDS Degrade Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri .....	80
3.9.1. Alkil Sülfataz Protein Profillerinin Belirlenmesi .....	80
3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografi Analizlerinin Yapılması .....	81
3.10. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	82
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>86</b>

<b>KAYNAKLAR</b> .....	93
------------------------	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Deterjanla kirlenmiş bir yüzey suyu .....	4
1.2. Fiziksel arıtma sisteminin şematize edilmesi.....	13
1.3. Kimyasal arıtma sisteminin şematize edilmesi .....	14
1.4. Bakterilerin 16S rDNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu .....	20
1.5. PZR siklusunun aşamaları.....	21
2.1. Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık suyu örnekleri.....	26
2.2. Kızılırmak .....	31
2.3. Su örneği alınan istasyonların Google Earth görüntüsü.....	32
3.1. Kırıkkale-Kızılırmak suyu deterjan analizi .....	41
3.2. Deterjan sanayisi atık suyunun kendiliğinden olan SDS degradasyonu .....	43
3.3. SDS3 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi .....	44
3.4. SDS3 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı .....	45
3.5. SDS6 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi .....	46
3.6. SDS6 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı.....	47
3.7. SDS8 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı, CFU standart eğrisi .....	48
3.8. SDS8 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı .....	49
3.9. SDS12-1 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı ve CFU standart eğrisi .....	50
3.10. SDS12-1 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS	

degradasyon oranı, steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı .....	51
3.11.Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS3 kodlu suşa ait PZR ürünleri .....	51
3.12.Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında SDS3 suşuna ait PZR ürünleri .....	52
3.13.SDS3 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	53
3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS6 kodlu suşa ait PZR ürünleri .....	55
3.15. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında SDS6 suşuna ait PZR ürünleri .....	56
3.16.SDS6 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	57
3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS8 kodlu suşa ait PZR ürünleri .....	59
3.18. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında SDS8 suşuna ait PZR ürünleri .....	59
3.19.SDS8 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	60
3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS12-1 kodlu suşa ait PZR ürünleri	62
3.21. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında SDS12-1 suşuna ait PZR ürünleri .....	62
3.22.SDS12-1 kodlu suşa ait neighbourjoining metoduyla oluşturulan dendogram..	63
3.23. Farklı iki primer kullanılarak yapılan <i>sdsA</i> geni analizi 1977 bp ve 672 bp ..	65
3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması.....	66
3.25. Primer tasarımında kullanılan aşamalar ekran görüntüsü .....	71
3.26. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. fluorescens</i> SDS3 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	74
3.27. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. fluorescens</i> SDS3 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	75
3.28. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. fluorescens</i> SDS6 kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	76
3.29. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. fluorescens</i> SDS6 suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	76
3.30. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. baetica</i> SDS8kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	77
3.31. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. baetica</i> SDS8suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	78
3.32. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında <i>P. fluorescens</i> SDS12-1kodlu suşa ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	79
3.33. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. fluorescens</i> SDS12-1suşuna ait <i>sdsA</i> PZR ürünleri.....	79

3.34. SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz proteini lokasyonunun belirlenmesi.....	80
3.35. Alkil sülfataz proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	81
3.36. SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimlerinin aktif ve inaktif formları.....	82
3.37.SDS degrade eden suşların değişen pH ve sıcaklıklardaki enzim aktivitesi.....	83
3.38. Ekstrakt haldeki alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	84

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Yüzey aktif maddeleri uygulama alanları.....	9
1.2. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar.....	18
2.1.Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri.....	28
2.2.Native-PAGE stok solüsyonlarının hazırlanması.....	29
2.3. Native-PAGE çalışma solüsyonlarının hazırlanması.....	29
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	30
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	30
2.6. Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları.....	32
3.1. SDS degrade eden bakterilerin için belirlenen MTK değerleri.....	42
3.2. SDS3 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	54
3.3. SDS6 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	58
3.4. SDS8 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	61
3.5. SDS12-1 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	67
3.6. Kullanılan primerler ve özellikleri.....	73
3.7. Çalışmada elde edilen SDS degrade eden bakteriler ve özellikleri.....	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

N	Azot
P	Fosfor
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
C	Karbon
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Pirofosfat
Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	Tripolifosfat
Na(PO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Metafosfat
Na <sub>4</sub> SiO <sub>4</sub>	Ortasilikat
NaSiO <sub>3</sub>	Metasilikat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Karbonat

### KISALTMALAR DİZİNİ

SDS	Sodyum dodesil sülfat
LAS	Linear alkil benzen sülfonat
ABS	Alkil benzen sülfat
LAB	Linear alkil benzen
DBS	Dodesil benzen sülfonat
SLS	Sodyum lauril eter sülfonat
MBAS	Metilen mavisi aktif maddeleri
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
SI	Similarity index

# 1. GİRİŞ

Su sıkıntısını yaşadığı birçok ülkede, evsel ve endüstriyel atıklardan kaynaklanan yüzey suları kirlilik olaylarının önemi daha da artmaktadır. Su kirliliği yaratan kirleticiler arasında deterjanlar da yer almaktadır[1]. Deterjan, genel temizleme işlerinde kullanılan ve içerisinde esas temizleyici olarak anyonik yüzey aktif maddeler ve temizleme işlemine yardımcı diğer maddeler bulunan toz, granül, yumuşak kıvamlı veya sıvı haldeki karışımlara denir. Genellikle evlerde temizleme işlerinde, deri, kâğıt, tekstil, kozmetik ve lastik endüstrilerinde, fotoğrafçılıkta, çamaşırhanelerde, süt ve meşrubat fabrikalarında şise yıkama işlerinde kullanılır [2]. Deterjanların boşaltıldıkları alıcı sulara etkileri, köpük oluşturma, biyolojik ayrışma sonucu oksijen tüketimi, sudakicanlılar üzerine olumsuz etkileri, ötrofikasyon ve içme sularına etkileri şeklinde özetlenebilir [3].

## 1.1.Literatür Özetleri

### 1.1.1. Çevre Kirliliği

Çevre, en genel anlamıyla, bir canlının yaşam ortamı olarak tanımlanmaktadır. Ekolojik anlamda, bireyle ilişkili canlı-cansız her şeyi kapsayan bir terimdir [3]. Bu tanım doğal ve yapay çevreyi içermektedir. Çevre sorunları, yaşamla ilgili gereksinimlerin karşılanmasını güçleştiren veya olanaksızlaştıran engellere ilişkin sorunlardır. Bu engellere çevre kirliliği denilmektedir [4].

Çevre kirliliği; su, hava, toprak ve ses kirliliği olmak üzere dört başlık altında ele alınabilir. Bu dört temel unsurdan sadece su kirliliğine sebebiyet veren deterjanların mikroorganizmalar üzerine etkisi üzerinde araştırma yapılmıştır [5].



### **1.1.2. Su Kirliliği**

Su kirliliği; kullanılacak bir su kaynağının, doğal yapısının herhangi bir olumsuz fiziksel veya kimyasal etmene bağlı olarak bozulmasıdır. Kirlilik; besin zincirine katılan ve çevresel değişikliklere duyarlı birçok organizmayı olumsuz yönde etkilemektedir [6].

Hızlı kentleşme, sanayi atıklarının kimyasal olarak arıtılmadan su sistemlerine verilmesi, tarım alanlarında yaygın ve aşırı miktarda pestisit kullanımı su kaynaklarının kirlenmesine neden olmuştur. Bu durum öncelikle tatlı su ekosistemlerinin ve dolaylı olarak da kirletilmiş suyu kullanan tarım alanları başta olmak üzere diğer ekosistemlerin bozulması sonucunu gündeme getirmiştir. Su ekosistemlerinde özellikle de tatlı su kaynaklarında, deterjan miktarlarının yüksek olması gerek sucul organizmaların gerekse de insanların hayatlarını olumsuz yönde etkileyerek potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Endüstriyel veya kentsel atık sularıyla kirlenmiş akarsu ve göllerin tarımsal amaçla kullanılması sonucunda, topraklarda önemli düzeyde iz element ve deterjan birikimi olduğu bilinmektedir. Canlı sisteme giren deterjanlar, besin zinciri ile bir organizmadan diğerine taşınarak canlı sistemlerde yüksek konsantrasyonlara ulaşmakta ve zararlarını yıllarca sürdürebilmektedir [7].

### **1.1.3. Deterjan Kirliliği ve Etkileri**

Deterjanlardan çok dallı yan zincirleri içermelerinden, ayrışmaya uğramadıklarından arıtma tesislerinde giderilmemekte ve tüm su ortamlarında belirmektedir. Düz zincirli deterjanlar organizmalar tarafından metabolize edilerek daha küçük parçalara ayrışabilmektedir. Çevre kirliliği dikkate alındığında deterjanların parçalanabilir türlerinin kullanılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır [8].

Deniz suyunda deterjan oranının  $0.1 \text{ g/m}^3$ 'den fazla olması hallerinde organizmalara toksik etkiler yapacağı belirtilmektedir. Deterjan atık suyu alıcı sularda ötrofikasyona sebep olur. Alg artışı görülür. Bu daha çok N ve P zenginleşmesine bağlıdır. Oksijen eksikliği bulanıklık, tabanda aşırı birikme, kokuşma ve canlı türünde azalma ve

ortamın kullanılmaz hale gelmesi görülür. Alg gelişmesine sebep deterjanlardaki fosfor bileşikleridir. Bu fosfor düzeyi ile ortaya çıkar. Buna göre 0.1 mg/L fosfor veya 0.1 g/m<sup>2</sup>-yıl fosfor yükü ötrofikasyon için sınır değerlerdir. Bu su kalitesi ölçütü olarak kabul edilir. Deterjandan kaynaklanan fosfor miktarı % 15-20 arasındadır. Bu sebepten ABD tributilfosfat kullanımını yasakladı. Fosfat değerini düşürmede en önemli husus arıtmada fosfatın arıtılması, deşarj yükünün % 90 azaltılmasını ve böylece 1 mg/L sınır değere ulaşır [8].

Deterjanlar çevreye, köpük oluşturma oksijen alış verişini engelleme, biyolojik parçalanma sonucu oksijen tüketme, deniz canlılarına etkisi ile zararlıdır. Deterjanlar çok kuvvetli balık zehirleridir. Balıkların solunum yolları ile tuz dengesini bozarlar. Solungaç hücrelerinde incelleme, büyüme ve kanama meydana gelir. Balıkların kronik olarak az dozlarda maruz kalmaları bile onların ölümüne neden olur. Suda devamlı fakat az miktardaki deterjan balıkta metabolizmayı bozup kuluçka süresinin gerilemesine neden olur. Gıda zinciri ile insana geçerek zararlı olur [2].

Deterjanlı sularda balık, boğulma belirtisi gösterir. 3 ppm'lik bir deterjan konsantrasyonunun 12 haftada alabalıkların % 50'sini öldürdüğü bildirilmiştir. Ortamdaki oksijen azalması zehir etkisini arttırmakta, suyun sertliği ve yumuşaklığı ise zehir etkisini ortam koşullarına göre azaltmakta veya arttırmaktadır. Sert sularda zehir etkisinin genellikle daha fazla olduğu bildirilmiştir [3].

Lineer Alkilbenzen Sülfonat (LAS), 5 ppm konsantrasyonda da balık solungaçları tahriş eder ve birkaç saatte ölüm görülebilmektedir. LAS'ın ekotoksikolojik etkisi deniz yüzeyini örtmesi oksijen alış verişini azaltmasıdır. Deniz canlılarına etkisi üzerinde pek çok yayın yapılmıştır. LAS, su içinde organizmalarda olduğu kadar denizde sedimentte yığılması sorunları taşır. LAS ile yapılan çalışmada solungaçlarda toplandığı organlarda absorbe olduğu ve balığın bütün vücudunda görüldüğü tespit edilmiştir. Deterjan içindeki LAS'ın bu çevre kirliliğinde etkisi yukarıda belirtilmiştir. Bu sebepten birçok ülke içme suyu içinde deterjan miktarına sınır getirmiştir. Deterjanlar konusunda Dünya Sağlık Teşkilatı'nın önerdiği limitlere göre içme suyunda bulunabilecek anyonik deterjanlar 0.2 mg/L'yi geçmemelidir. Yine aynı

kuruluşun 1984 yılında yayınladığı “İçme Suyu Kalitesi için Ana Hatlar” adlı yayında deterjanlar için sınır değeri verilmemekte, ancak içme suyunda köpük, tat ve koku meydana getirmeyecek seviyede olması gerektiği belirtilmektedir [9].



**Şekil 1.1.**Deterjanla kirlenmiş bir yüzey suyu [25]

Deterjanlar canlılara içme suyu ile ayrıca deterjanla kirlenmiş su ile yıkanan meyve ve bitkiler ve çalkalanmadan kullanılan kaplarla geçebilir. Evlerde yıkanan kaplar sonradan çalkalandığı zaman suya 0.2-1 ppm yüzey aktif madde verir. Prensipte küçük çocuklarda görülen kazasal yutmalarda evde kullanılan deterjanlar kesin olarak tehlikeli bir faktör olup, bu gibi kazalar sonucu zehirlenmelere çok dikkat etmek gerekir. Deterjanlar deri altı iltihapları yapıp, deri üstünü tahrip etmektedir. Tekstil sanayiinde kullanılan ve içinde yüzey aktif maddeler içeren deterjanlar insanlarda dermatit oluşturmaktadır [10].

Organizmanın tolere ettiği konsantrasyonlar katyonikler için % 0.5 anyonikler ve nonyonikler için % 20 dir. Katyonikler ciddi tahriş meydana getirir. Bu halde temas ettiği yeri süratle bol su ile yıkamak gereklidir. Anyonik deterjanlar gözde anestezi yaparlar.Korneada hassasiyeti arttırırlar ve gözyaşına sebep olurlar. Göz yaşı akıtma sınırı konsantrasyonu, dokuda zarar meydana getirme sınırında değildir. Göz yaşı arttırmada yüksek konsantrasyon kimyasal yanmaya ve korneal epiteliumda kayıplar

meydana gelir. Surfektanların özellikle ekotoksikolojik etkileri üzerine çok çalışma yapıldı [11].

LAS'ın toksisitesi üzerinde durulma sebebi tabak, bardak vb. gibi eşyaların temizlenmesi gayesi ile kullanılma esnasında bu kaplarda iyi durulmama sonucu bakiye olarak kalması sonucu bu kaplarda yeme ve içmeden insanın bu maddeyi almasıdır. Bu arada diş macunlarının yapısına girmesi sonucu ağızda bakiye olarak kalması ve buradan absorbe olmasıdır. İnsan için bir diğer konu bu yüzey aktif maddenin şampuanların yapısında temel madde olması ve saça, göze zararlı etkileri olmasıdır. Keza denize atıklarla bulaşması sonucu deniz yüzeyinde toplanması ve denizin oksijen alış verişini engellemesidir. Ayrıca deniz canlılarında birikmesi ve toksik etki göstermesidir [12,13].

Deterjanlar denizel çevrede köpük oluşturması ile görünümü beyazlar biyolojik parçalanması ile oksijeni tüketirler. İnsanın yemek pişirilen kaplar, tabak, bardak ve içtiği sudan aldığı anyonik surfaktan miktarı, 0.5 mg/L anyonik surfaktan içeren bir suyu insanın günde 2 litre su içmesi hesabı ile aldığı surfaktan miktarı 1mg/gün, meyve-sebzeden 0.3-2.5 mg/gün ve total olarak 1-10 mg/gün anyonik surfaktan aldığı saptandı. Aradan geçen yıllar sonra bugün kullanılma oranı 10-50 kat artan surfaktanların insana geçme olasılığı bu belirtilen rakamların çok üstündedir [14].

#### **1.1.4.Deterjanlar**

Deterjan, petrol türevlerinden elde edilen, temizleme, arıtma özelliği bulunan, toz, sıvı veya krem durumunda olabilen kimyasal madde, arıticılardır. Deterjanın, kelime anlamı kir sökücü olup sabun dışındaki temizleyicilerin tümünü kapsar. Yüzey aktif özelliği nedeniyle temizleme işlerinde kullanılan, içinde yardımcı kimyasal maddeler de bulunduran karışımlara deterjan denilmektedir [15]. Deterjanlar kompleks ve sentetik yapıli maddelerdir. Sabun ve deterjanların kimyasal yapısı çok farklı olduğundan temizleme işlevindeki etkileri de farklıdır. Sabun asidik ve sert sularda etkili değildir (Sert sudaki  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  ile  $(C_{17}H_{35}COO)_2$  oluşur ve çöker) bir çökelti oluşturur. Buna karşılık deterjanlar bu tip sularda etkilidir. Yüzey aktif madde

(sürfaktan) ismi sabun, deterjan, emülsiyon oluşturan maddeler, ıslatıcı maddeler için kullanılan genel bir isimdir [16, 17].

Deterjanlar, her biri temizlemede ayrı bir görev yapan, pek çok maddenin çok kompleks bir karışımıdır. Yüzey aktif maddeler veya sürfaktanlarla ilgili modern kavram, sabunları, deterjanları, emülsifiyanları, ıslatıcı maddeleri ve girme (penetrasyon) maddelerini kapsamaktadır. Bütün bunlar, birbirleriyle temasta olan iki faz arasındaki yüzey tabakasının özelliklerini değiştirerek, aktifliklerini sürdürürler. Yüzey aktif maddelerin pek çoğu, molekülün bir ucunda suyu çeken (hidrofilik) ve diğer ucunda suyu iten (hidrofobik) bir grup bulundururlar. Deterjanlar, kirleri uzaklaştırmada etkin olan bu özelliklere, fazlasıyla sahiptirler [18].

Deterjanlar, deniz, göl, nehir ve içme sularını kirletme açısından önem taşırlar. Deterjanlar kompleks bir yapıya sahiptirler. Değişik madde içeriği yanında surfaktanlar, temizleme özelliği dolayısı ile ön plana çıkar [19].

Surfaktanlar yüzey aktif özelliğe sahip maddelerdir. Yüzey aktif madde yüzey gerilimini düşürme özelliğine sahiptirler. Suyun molekülleri arasında kohezyon kuvvetleri vardır. Bu kuvvetler arasındaki girift elektrik kuvvetlerinden oluşur. Su yüzeyindeki molekül kuvvetle sıvı içine doğru çekilir ve bu moleküller su yüzeyinde birbirine yaklaşarak bir film oluştururlar. Bu film içeriye ve dışarıya karşı büyük bir dirence sahiptir. Buna “yüzey gerilim” denir. Linear Alkil Benzen Sülfonat (LAS) ve yağ alkolü sülfat, suda veya sulu bir çözeltide çözündükleri zaman yüzey gerilimini etkileyen (çoğunlukla azaltan) herhangi bir bileşiktir. Bu iki sıvı arasındaki yüzeylerarası gerilimi de etkiler. Sabun ve deterjanların surfaktanları, aynı şekilde yüzey gerilimini azaltarak, yıkama işleminin temizleme ve köpük oluşturma görevini yerini getirirler. Deterjanlar, kirleri uzaklaştırma özelliklerine fazlasıyla sahiptirler [20].

Aksine suyun gerilimi yüksek olduğundan yabancı madde su yüzeyinde yayılmaz ve toplu halde (örneğin yağ/su içinde) damla halinde kalır veya mono moleküler bir tabaka halinde su yüzeyinde yayılır. Surfaktanlar ise yüzey gerilimi düşürmesi ile bu maddenin su ile karışmasını, su içine çekilmesini, yüzeyden içeriye doğru çekilmesini sağlar. Bu şekilde yağın herhangi bir materyalden temizlenmesi

sağlanmış olur. Bu sabunların temizleme mekanizmasını gösterir. Deterjan yapısında fosfatlar (pirofosfat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), tripolifosfat ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), metafosfat  $\text{Na}(\text{PO}_3)_4$ ) içerir. Ençok tripoli fosfat kullanılır. Fosfatların hidrolizi sonucu orto fosfat (inorganik) oluşur ve kalsiyum ile reaksiyon sonucu doğar ve kalsiyum, magnezyum böylece tutulur ve köpüğün oluşumunu engelleyici etkisi ortadan kalkar. Burada pH önemlidir [21].

Deterjanın yapısında kalsiyum bloke edici maddeler dışında dispersiyon yapıcı, peptize ediciler, süspansiyon yapıcılar sodyum perborat (oksijenlenerek ağarlatıcı rolü vardır), silikatlar (ortosilikat ( $\text{Na}_4\text{SiO}_4$ ), meta silikat ( $\text{NaSiO}_3$ ), sequester ajanlar (EDTA), nitrilo asetik asit (ağır metalle şelat teşkil ederler) ve alkali (karbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) vardır. Silikatlar kirin asılı kalmasını sağlar ayrıca alüminyum ve çeliğin korozyonunu engeller [21].

Deterjanlar içerdiği yüzey aktif madde surfaktan dolayısı ile yağı emülsiyeye eder ve içindeki askıda tutucular (süspansiyon yardımcıları) ile katı maddeleri süspansiyon halinde çözelti içinde tutar ve su ile bu kütle temizlenir dışarı atılır [19].

Zeolit 4 A maddesi, çoğunlukla bir deterjan katkı maddesi olan ve çevre kirliliğine yol açtığı düşünülen sodyum tripolifosfata (STPP) alternatif olarak düşünülen bir kimyasal maddedir. Metal alüminyum üretiminde ara safha ürünü olarak üretilen çözültiden sentetik zeolit elde edilebilir. Sularda aşırı yosunlaşmaya yol açarak çevre kirliliği yarattığı gerekçesiyle İsviçre deterjanlarda STPP kullanımını yasaklarken, bazı ülkeler de sınırlı kullanımını öngördü. Ancak İsviçre, deterjanlarda STPP kullanımının yasaklanmasıyla zeolitli deterjan atıklarının zamanla çökerek kanalizasyon sistemlerinde tıkanıklıklara yol açtığını saptamıştır. Bilimsel araştırmalarda, sulardaki fosfatın azaltımının, sadece deterjanlarda kullanılan STPP'nin kısıtlanması veya yasaklanmasıyla sağlanamayacağı tespit edilmiştir.

#### **1.1.4.1. Deterjanların Özellikleri**

Deterjanların genel özellikleri aşağıdaki gibidir; Surfaktanların absorpsiyonu ve film

teşkil etmesi; surfaktanlar iç faza absorbe olmadan yüzeye tutunurlar. Burada sorpsiyondan bahsedilir ve surfaktanların yüzeyde sorpsiyon sisteminden bahsedilir. Yüzeye zayıf kuvvetle tutunur. Surfaktanlar tekstil materyaline absorbe olur. Sabunlar sellülos materyale absorbe olur. Asidik sabun ( $\text{RCOONa}$ ,  $\text{RCOOH}$ ) büyük miktarda absorbe olur. Yüksek pH ise absorpsiyonu yavaşlatır. Anyonik surfaktanlar katyoniklere göre daha az absorbe olurlar [22]. Köpük teşkil etme ve ıslatma; köpük uygulamada önemi büyüktür. Köpüğün teşekkül hızı, hacmi ve stabilitesi surfaktan için önemlidir. Stabilitesi, parçalayıcı ajanlara, ısıya ve köpük giderici kimyasallara bağlıdır [19]. Emülsiyon yapma ve dağıtma özelliği; emülsiyonlar su/yağ veya yağ/su tipi olarak bilinen iki fazlı sistemlerdir. Bu sistemde 1.de su, 2.de yağ iç fazı teşkil eder. Bu sistemin mekanik karıştırma ile elde edilmesi dışında sebatlılığı arayan üçüncü bir fazın girmesini sağlar. Bu üçüncü faza emülgatörler denir ve bu yaptığı işe emülsiyon yapma kabiliyeti denir. Surfaktanlar burada emülgatör rolü oynarlar ve yağ yüzeyini bir film şeklinde örterek onu su içine alır ve yıkamada yağı gidermede rol oynar. Dağıtıcı etki keri teşkil eden parçacıkların su içinde asılı kalmasını sağlamaz. Süspansiyon denilen bu şekil iki fazlı sistemlerdendir. Maddenin parçacığın suda asılı kalmasında değişik maddeler rol oynar [19].

#### **1.1.4.2. Sentetik Deterajanlar**

Genel temizlik, çamaşır, bulaşık gibi temizleme işlerinde kullanılan ve içerisinde esas temizleyici olarak değişik tipteki yüzey aktif maddeleri ihtiva eden veya etmeyen ve temizleme işlemine yardımcı diğer maddeler bulunduran toz, granül, yumuşak kıvamlı veya sıvı karışımlardır [23].

#### **1.1.4.3. Deterjanların Yapısındaki Yardımcı Katkı Maddeleri**

Yardımcı katkı maddeleri olarak köpük ayarlayıcılar, yumuşatıcı görevindeki yüzey aktif maddelerin yanında enzimler, antidepozitanlar, optik parlaticılar, boyar maddeler ve dolgu maddeleri kullanılmaktadır. Parfümler, boya ve dolgu maddeleri deterjanlarda halkın beğenisini ve ilgisini kazanmak için kullanılan maddelerdir [24].

Enzimler; çamaşır üstündeki insan vücudundan kaynaklanan kirlerdeki ester ve peptit bağlarını koparıp temizleme işlemini yaparlar [25].

Optik parlaticı; en yaygın kullanılanı stibilen türevleridir. 19. yüzyıl ortalarından itibaren kullanılan çivit de optik parlaticı görevini görmektedir. Bu maddeler çamaşırların beyaz ve parlak görünmesini sağlamak amacıyla kullanılırken görünmeyen ultraviyole ışığı, görülebilen mavi ışığa çevirmektedir. Buda mükemmel beyazlık görünümü verir [26].

Yüzey aktif maddeler, kimya endüstrisinin önemli ürünlerinden biridir ve temizleyiciler yanında çok değişik alanlarda kullanılmaktadır. Yüzey aktif madde olarak bu kadar çok sayıda kimyasal madde üretilmekle birlikte, bu maddeleri, anyonik, katyonik, amfoterik, ana başlıkları altında 4 grupta toplamak mümkündür. Batıda 1987 yılı itibariyle üretilen yüzey aktif maddenin % 62'sini anyonik, % 29'unu nonyonik, % 9'unu katyonik ve % 0.5'ini amfoterik maddeler oluşturmuştur. Bu dağılım 1982 yılından bu yana fazla değişiklikler göstermemiştir. Ancak katyonik yüzey aktif maddelerin üretim ve tüketim hızlarının, anyoniklerin daha fazla gerçekleştiği söylenmektedir. Hangi gruptan olursa olsun, yüzey aktif maddelerde ortak özellikler bulunması gerekmektedir (Çizelge 1.1) [27].

### **Çizelge1.1. Yüzey aktif maddelerin uygulama alanları [27]**

<b>Yüzey Aktif Maddelerin Uygulama Alanları</b>	
Tüketim ürünleri	Tekstil ve iplikler
Deterjanlar	Kimyasal endüstri
Bulaşık yıkama malzemeleri	Boyalar, vernikler
Özel ürünler	Seluloz ve kağıt
Endüstriyel uygulama	Deri ve kürkler
Yiyecekler	Fotoğraf endüstrisi
İlaçlar	Metal işleri
Bitki Koruma ve zehir kontrol	Galveniz tekniği
Ziraat	Yapıştırıcılar
Madencilik ve flotasyon	Demir yolu inşaatı ve yapım malzemeleri
Petrol kimyası	Yangın söndürme



## **1.1.5. Deterjanların Sınıflandırılması**

### **1.1.5.1. Anyonik Deterjanlar**

Bunlar sulu çözeltide anyon şeklinde iyon veren maddelerdir. Evlerde kullanılan deterjanlar bu gruba girerler.

Anyonik deterjanlar; doğal deri yağını gidererek deride tahriş, kızarıklık ve populer dermatitis yaparlar. Hassas insanların derisinde deride açılma ve kanama yapar. Ağız yolu ile alınmasında mide barsak bozuklukları, diyare, kusma yapar [20].

#### **1.1.5.1.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

SDS organik bir bileşik olup, anyonik yüzey aktif madde olarak pek çok temizlik ve hijyen ürünlerinde kullanılır. İçeriğindeki tuza 12 kuyruklu sülfat grubuyla bağlanır ve ampifirik özellik verir. Daha ucuz temizlik ürünleri elde etmek için hindistan cevizi ve palmye yağı yaygın olarak kullanılır. Birçok ev temizlik ürünlerinde kullanılan yaygın bir bileşiktir. SDS'in ticari örnekleri genelde diğer alkil sülfat ana bileşeni olan dodesil sülfat karışımıdır. Su ile kolay muamele edildiği için ticari formu genelde toz halde satılır. Kullanılan en yaygın deterjan türü olan SDS son derece etkili bir yüzey aktif maddesidir. Yağlı leke ve atıklarda çok etkilidir. Motor yağı arındırma, zemin temizleyiciler ve araba yıkama sabunları gibi endüstriyel ürünlerde yüksek konsantrasyonlardabulunur [28]. SDS ayrıca laboratuarda, DNA ekstraksiyonu sırasında hücreleri lizis etmek için ve proteinlerin çözülmesi için protein elektroforezinde kullanılır [29].

#### **1.1.5.1.2. Linear Alkil benzen Sülfonat (LAS)**

1965 yılının ortalarında deterjan endüstrileri alkil benzen sülfonat (ABS) üretiminden, biyolojik olarak ayrışabilen LAS üretimine dönüşmeyi gerçekleştirmişlerdir. LAS, düz zincirli gruba sahip yapıda bir alkil aril sülfonattır.

ABS ise dallanmış zincirli alkil grubu, benzen halkası ve sülfonattan oluşmaktadır. Lineer alkilatı elde etmek üzere düz zincirli alkil grubu benzenle kondense olur ve daha sonra alkilat LAS elde etmek üzere sülfonatlanır. LAS'ın yüzey ve yeraltı sularında ortalama olarak parçalama süresi 2-20 gündür. Suda kolay parçalanabilir son bir ürün linear alkil benzen sulfonat (LAS)'tır. Bugün en çok kullanılan anyonik deterjan LAS'ın linear dizide karbon sayısı  $C_9 - C_{19}$  arasında değişir. Alkil gurubu dalsızdır. Buna benzen, halkası Friedel – Craft reaksiyonu ile eklenir. Bu linear alkil benzen (LAB) olarak tanımlanır. Bu yapıdaki benzen halkası farklı karbona bağlıdır.[30].

Alkil Aril Sülfonatlara ait; Dodosil Benzen Sodyum Sülfonat ve Larik Alkol türevi; Sodyum Lauril Eter Sülfat; bu grup deterjanların çoğu sülfat veya sülfonatların alkali tuzlarıdır. Kullanım alanları çok geniş olup, total deterjan üretiminin büyük bir bölümünü oluştururlar. Deneylerde bu gruba ait dodosil benzen sülfonat (DBS) ve sodyum lauril eter sülfonat (SLS) kullanılmıştır [31].

#### **1.1.5.2. Nanyonik Deterjanlar**

Sulu çözeltilerde iyon veremeyen maddeler olup endüstride az kullanılmakla beraber renk açma özellikleri nedeni ile anyoniklerin yerini alma eğilimini göstermektedirler. Oksietilenli alkil arillere ait, alkil fenol poli etoksilat bu gruba ait nonyonik deterjanlardır. Sulu çözeltilerde vermeyen eriyebilirlik, molekül içindeki etilen oksidin yağ alkollerini ile veya alkil fenollerle birleşmesi sonucu oluşan hidrofil gruplara bağlıdır. Kullanım alanları kısıtlıdır. Bu linear dizide karbon sayısı  $C_9 - C_{19}$  arasında değişir. Alkil gurubu dalsızdır. Buna benzen, halkası Friedel – Craft reaksiyonu ile eklenir. Bu linear alkil benzen (LAB) olarak tanımlanır. Bu yapıdaki benzen halkası farklı karbona bağlıdır [27].

Nanyonik deterjanlar deride hafif tahriş yaparlar. Ağız yolu ile 20 g alınması herhangi bir semptom meydana getirmez. Zamanla nonyonik deterjanların ortaya çıkmasıyla, deterjanlara olan talep büyük oranda artmıştır. Son yıllarda akarsulardaki deterjan kirliliği ve evsel atıkların ıslah bölgeleri konusunda verilen ilanlar, düz zincirli alkil aril sülfonatların biyolojik bozunmalarının geliştirilmesi için öncülük

etmektedir[20].

### **1.1.5.3. Katyonik deterjanlar**

Bu grup deterjanlar sulu çözültide katyon şeklinde iyon veren maddelerdir. Genellikle ecza sanayinde kullanım alanlarında çok özelleşmişlerdir. Çoğu dörtlü klorür veya bronidli amonyum bileşiklerdir. Katyonik deterjanlar küçük bir kimyasal grup tarafından temsil edilmektedirler. Kullanım alanlarında çok özelleşmişlerdir ve denize ulaşan deterjan miktarı içerisinde yaklaşık %1 oranında bulunurlar [32]. Katyonik deterjanlar antiseptik özellikleri vardır. Deride bakteriyi parçalar, cerrahide kullanılır. Öldürücü doz 1-3 g'dır. Konsantre çözelti absorbe olur ve hücre fonksiyonuna müdahale eder. Isıya dayanıksızdırlar, parçalanırlar. Katyonik deterjanlar, anyonik deterjanlardan daha zehirlidir [20].

### **1.1.6. Atıksu Arıtma Yöntemleri**

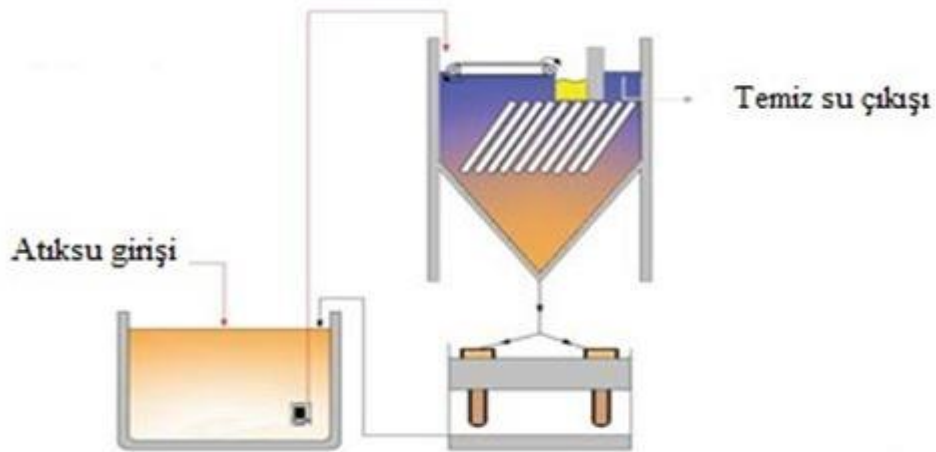
Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer kullanımlar sonucunda kirlenmiş veya özellikleri kısmen veya tamamen değişmiş sular ile maden ocakları ve cevher hazırlama tesislerinden kaynaklanan sular ve yapılaşmış kaplamalı ve kaplamasız şehir bölgelerinden cadde, otopark ve benzeri alanlardan yağışların yüzey veya yüzeyaltı akışa dönüşmesi sonucunda gelen sulara atıksu denir [33].

Suların çeşitli kullanımlar sonucunda atıksu haline dönüşerek yitirdikleri fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerinin bir kısmını veya tamamını tekrar kazandırabilmek ve/veya boşaldıkları alıcı ortamın doğal fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerini değiştirmeyecek hale getirebilmek için uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma işlemlerinin birini veya birkaçına atıksu arıtma denir. Atıksuyun niteliğine göre kullanılacak arıtma prosesleri de farklılık göstermektedir. Atıksu içerisinde bulunan çözünmüş organik maddelerin bakteriyolojik faaliyetler sonucu giderilmesi için biyolojik arıtma tesisi, atıksu içerisinde çözünmüş veya askıda bulunan ve gravitasyonla çökelmeyen maddelerin

çökeltiyerek sudan uzaklaştırılması için kimyasal arıtma tesisi, suyun içerisinde bulunan ve kendiliğinden çökebilen katı maddelerin atıksudan uzaklaştırılması için fiziksel arıtma tesisi tercih edilmelidir. Bu prosesler ayrı ayrı kullanılabilirdi gibi birbirini ardına gelecek şekilde de kurulabilir [34, 35].

### 1.1.6.1. Fiziksel Arıtma

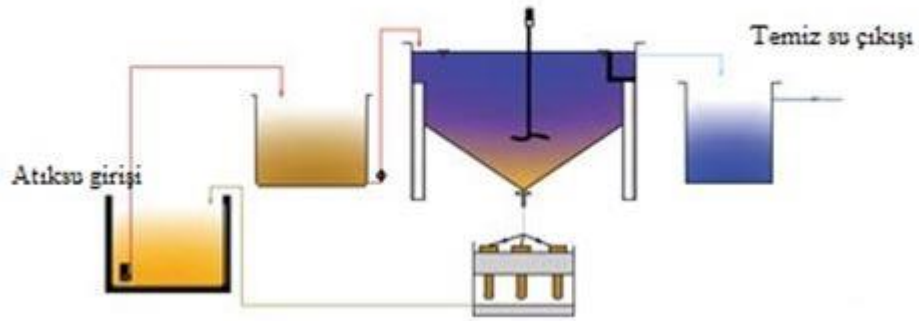
Fiziksel arıtma atıksu içerisinde bulunan yüzer maddeler ile kendiliğinden çökebilen katı maddelerin giderilmesi amacıyla yapılır. Bu amaçla kullanılan ekipmanlar; ızgara ve elekler, kum ve yağ tutuculardır. Bu yöntemde flotasyon (yüzdürme) adı verilir. En çok kullanılan yöntemdir. Genel olarak biyolojik veya kimyasal arıtma tesislerinin başında da fiziksel arıtma tesisleri kullanılır. Bu şekilde atıksu içerisinde bulunan kirleticilerin bir kısmının giderilmesi mümkün olacaktır. Kimyasal veya biyolojik arıtma tesislerinin başında kurulan fiziksel arıtma tesisleri, hem ana arıtma sistemine gelecek kirlilik yükünü azaltacak, ana arıtma içerisindeki boru, vana vb. ekipmanların zarar görmesini engelleyecek aynı zamanda ana arıtma tesisinin işletme maliyetini düşürecektir. [14].



Şekil 1.2. Fiziksel arıtma sisteminin şematize edilmesi [14]

### 1.1.6.2. Kimyasal Arıtma

Suda çözülmüş halde ve askıda bulunan katı maddelerin çökmesini ve bu şekilde sudan uzaklaştırılmasını sağlayan kimyasal arıtma tesislerinde, uygun pH aralığında atıksuya kimyasal maddeler ilave edilmektedir. Kimyasal arıtma proseslerinde çökeltme işlemini sağlayan bu kimyasal maddeler koagülant madde adıyla anılır. Kimyasal arıtma prosesinin üniteleri, atıksuyun uygun pH aralığına getirildiği nötralizasyon bölümü, atıksuya çökeltimi sağlayacak kimyasal maddelerin ilave edildiği koagülasyon bölümü ve koagülant ilave edilmiş atıksuyun uygun hızda karıştırılması ile flokların oluşmasını ve çökeltimi sağlayan flokülasyon bölümüdür [18].



Şekil 1.3. Kimyasal arıtma sisteminin şematize edilmesi [18]

### 1.1.6.3. Biyolojik Arıtma

Son yıllarda geleneksel arıtma yöntemlerine alternatif ve etkin bir yöntem olarak biyolojik arıtma yöntemleri çalışılmıştır. Bu yöntemler hedef kirletici ileri yüksek emilim ya da uzaklaştırması, çevre dostu olması, düşük işletme maliyeti ve mükemmel performans göstermesi gibi çeşitli sebeplerden dolayı geleneksel yöntemlere göre daha çok avantaja sahiptir [36].

### 1.1.6.3.1. Degradasyon

Aşırı deterjan kullanımından kaynaklanan atıksu sorunu yıllar geçtikçe baskın hale gelmiştir. Bilindiği gibi deterjanlar su hayatında zararlı etkiye sahiptir. Deterjan ve fosfat kirliliğinin önlenmesi için biyolojik parçalanabilirliği fazla olan yüzey aktif maddeler kullanılmalıdır. Biyolojik arıtmada, deterjan ve dolayısıyla fosfatın mikroorganizmalar tarafından parçalanması şeklinde uygulanabilir. Birçok mikroorganizma türünün deterjanları karbon kaynağı olarak kullanabildikleri dikkate alınır, deterjan miktarları azaltılabilecektir. Böylece hem deterjan miktarları kaynağında kontrol edilerek, alıcı sularda canlılar için toksik etkiler azalacak, hem de deterjan kaynaklı fosfatlar da biyolojik arıtım tesislerinde önemli ölçüde tutulabilecektir. Diğer bir yöntem de, kimyasal arıtmanın biyolojik arıtma ile birlikte kullanılmasıdır [2].

Bazı mikroorganizmalar deterjan kirliliği sulara adapte olmuşlardır. Bu mikroorganizmaların deterjanları karbon ve kükürt kaynağı olarak kullandıkları bildirilmektedir [37, 38]. Deterjan ve şampuanların bulunduğu nehir suyu örneklerinde doğal mikrobiyal komünitedeki hücre sayısındaki artışın, metabolik işlemler için tek karbon ve enerji kaynağı olarak yüzey aktif maddelerin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir. Deterjan ve şampuanlardaki sodyum tripolifosfat gibi maddeler mikrobiyal gelişme için besin kaynağı olarak da kullanılabilirler [37, 39]. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus majdoratus*, *Klebsiella liquefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus albus*, *Proteus*, *Klebsiella oxytoca* ve *Brevibacterium* gibi izole edilen bakterilerin deterjan degrade edebildikleri Metilen Mavisi Aktif Maddeleri (MBAS) analizi ile belirlenmiştir [40].

*Bacillus cereus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* gibi bazı bakteriler karbon kaynağı olarak SDS'i kullanabilirler [41]. Yapılan çalışmalarda izolatların SDS'i % 80 oranında degrade ettiği görülmüştür [42].

### **1.1.7. Deterjan Degrade Eden Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Teknikler**

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rDNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile moleküler mikrobiyal ekoloji olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan (16S rDNA parçalarının kopyalanması gibi) yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [43].

#### **1.1.7.1. Geleneksel Teknikler**

Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler, mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili geniş bilgi vermektedir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da ex-situ tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir [44].

Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı (Bakteri ve arkeler) oldukça azdır ve bakteriyel çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [44, 45]. Bununla birlikte, mikroorganizma çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda arıtma sistemlerinde hem arıtma verimini değerlendirmek hem de mikroorganizma gruplarındaki değişimi izleyebilmek için moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır [46].

#### **1.1.7.2. Moleküler Teknikler**

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rDNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir (Çizelge 1.2) [43].

RNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rDNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [47].



**Çizelge1.2.** Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar [47]

Teknik	Avantajları	Kısıtlamaları	Kullanım Örnekleri
Çoğaltılmış rRNA kesim analizi	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) saptamaları Sayısal değildir.	Aktif çamurda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi
Denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE)	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. rRNA gen dizilimi heterojenliğinin kullanımı	DNA ekstraksiyonu ve PZR saptamaları Sayısal değildir Kısa hedef dizilemelerinden dolayı özgünlük sorunu	Mikrobiyal komünite kompozisyonu Populasyon değişimi
Uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (t-RFLP)	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve PZR saptamaları	Selüloz fabrikası atıksuyunda mikrobiyal komünite kompozisyonu
Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon (FISH)	Sayısal Kültür edilemeyenleri de içeren mikrobiyal hücrelerin doğrudan görsel olarak ayırt edilmesi	İnaktif hücreler tespit edilemeyebilir.	Evsel atık suyunda bakteriyel komünite kompozisyonu mikrobiyal komünite yapısının yerinde analizi

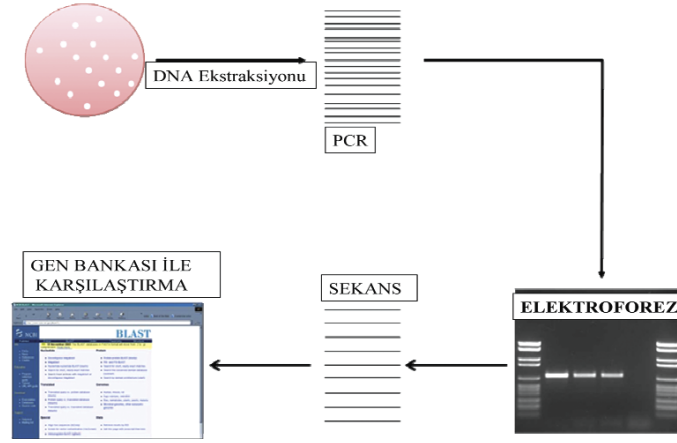
### 1.1.7.2.1. 16S rDNA Dizi Analizi

Ribozomal RNA'lar, mükemmel evrimsel kronometreler olmalarını sağlayan çeşitli özelliklere sahiptirler. Ribozomal RNA'lar oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotit dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri; 5S, 16S ve 23S olan 3 çeşit ribozomal RNA molekülü vardır [48]. Son yıllarda bakterilerin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda hedef olarak seçilen önemli gen bölgelerinden biri 16S rDNA genidir. 16S rDNA gen dizisi, tüm canlılarda yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir. Genomda bu rDNA bölgesi hem bakteriye özgü çok iyi saklanmış dizileri içermekte, hem de türe göre değişken olan dizileri barındırmaktadır. Bu değişken diziler genellikle araştırmacılar tarafından heterojen fenotipe sahip veya konvensiyonel bakteriyolojik testlerle kültürü zor olan bakterilerin PZR ile tanısı için primer bölgelerinin tasarlanmasında kullanılmaktadır [48]. Bu değişken dizilerin PZR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün

olabilmektedir. 16S rDNA'yı kodlayan gen dizisinin özellikle bakteriler arasındaki akrabalık ilişkilerinin çıkarılmasında kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu evrensel molekülün taşıdığı nükleotit dizileri, filogenetik gruplar arasında gösterdiği benzerliklere göre, evrimsel yakınlığın yorumlanmasında etkin rol oynamaktadır. Günümüzde bilinmeyen bir bakterinin cins hatta tür seviyesine kadar tanımlanabilmesi 16S rDNA geni yardımıyla mümkün olabilmektedir [48].

16S rDNA dizisi bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi açıklamada kullanılan güçlü bir araçtır. rDNA'ların filogenetik bir araç olarak kullanımına 1970'lerde Illinois Üniversitesi'nden Carl Woese öncülük etmiştir ve bu yöntem günümüzde tüm biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır [49]. Sayılan avantajlarının yanı sıra bu metodun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntem zaman alıcı ve emek gerektirir. DNA ekstraksiyonu esnasında sert ve katı örneklerle çalışırken problem yaratabilir. Tüm mikroorganizmaların belirlenebilmesi için taranması gereken klon sayısı büyük olmalıdır. Son olarak dakantitatif bir sonuç vermez [50].

Sekans analizi, etken DNA'sının belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [51]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [52] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert [53] ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [51].



**Şekil 1.4.** Bakterilerin 16S rDNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu [53]

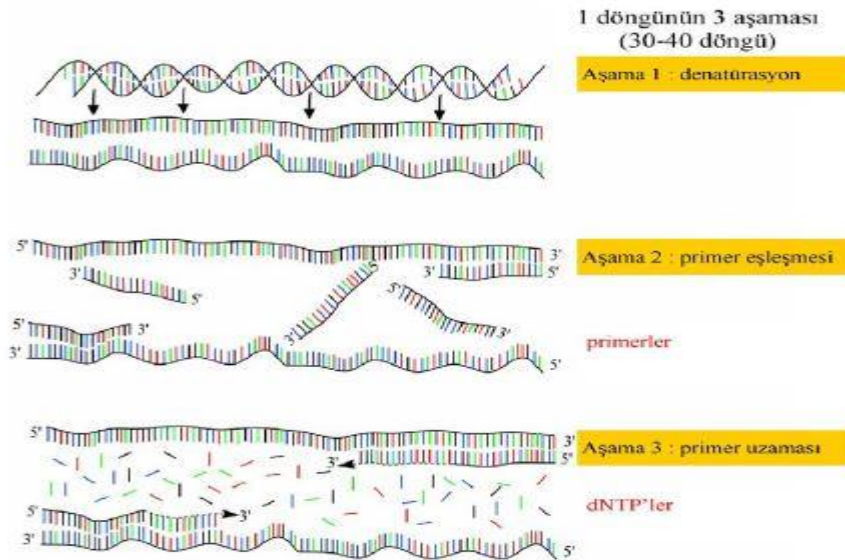
#### 1.1.7.2.1.1. 16S rDNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rDNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir [54].

Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rDNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [54]. 16S rDNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Buna rağmen nispeten pahalı olabilir, hassas çalışma gerekir ve sekanslamada türler arası yüksek benzerlik çıkabilir [56].

### 1.1.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Belirli bir nükleik asit dizisinin in vitro şartlarda, enzimatik olarak çoğaltılması işlemi olan PZR ilk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. Moleküler yöntemlerden en geniş kullanım alanına sahip olan bu yöntem tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma yöntemidir. Özgül primerler kullanılarak hedef DNA'nın çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR için, belirlenen nükleik asit kısmının her bir zincirinin 3' ucuna tutunacak ve 5' yönünde uzayacak iki kısa nükleotid dizisi (primer), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi, yeni zincirlerin yapısında yer alacak oligonükleotidler ve reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solüsyonlara ihtiyaç vardır [57]. PZR siklusunun aşamaları Şekil 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1.5. PZR siklusunun aşamaları [57]

PZR ile bir hedef DNA arçasının milyonlar asının çoğaltımı mümkün olmaktadır. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid rimer kullanılarak, bu iki rimer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PZR'nin en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile

çalışmaya olanak sağlamasıdır [58].

### 1.1.8. PZR için Primer Tasarımı

Başarılı bir PCR için en kritik parametre primerlerin tasarımıdır. Tüm koşulların uygun olduğu bir durumda, sadece zayıf tasarlanmış bir primer PCR reaksiyonunun çalışmamasına neden olabilir. Primer sekansı ürünün gen üzerindeki pozisyonu ve uzunluğu, erime sıcaklığı ve PCR verimi dahil birçok parametreyi etkiler. Zayıf tasarlanmış bir primer, ürün oluşumunu bastırarak rakip olabilen primer-dimer oluşumu ve/veya özel olmayan amplifikasyon sonucu çok az veya hiç ürün üretilmemesine sebep olabilir. PCR primerleri tasarlanırken çeşitli parametrelere dikkat edilmelidir [59].

En kritikleri:

- Primer uzunluğu,
- Erime sıcaklığı ( $T_m$ ),
- Hassasiyet,
- Tamamlayıcı primer sekansları,
- G/C miktarı ve poliprimidin (T,C) ve polipurin (A,G) uzamaları,
- 3' uç sekansıdır (zinciri).

Primer uzunluğu: PCR hassasiyeti, bağlanma sıcaklığı ve bağlanma süresi primer uzunluğuna bağlı olduğundan bu parametre başarılı bir PCR için çok önemlidir. Genel olarak bağlanma sıcaklığı uygun olduğunda 18 ile 24 bazlık oligonükleotidler belli bir sekansa özel olarak bağlanırlar. Primer uzunluğu aynı zamanda bağlanma verimi ile de doğru orantılıdır. Uygulama özellikle gerekmedikçe, primerler çok kısa olmalıdır. Hedef en az 50°C'lik bağlanma sıcaklığına sahip bir primer tasarlamaktır.

Erime sıcaklığı ( $T_m$ ): Hedef bölge yönlü PCR reaksiyonu için iki primer kullanıldığı unutulmamalıdır. Her iki oligonükleotid primer de benzer erime sıcaklığına sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Eğer primerler  $T_m$  nedeni ile yanlış bağlanırsa, amplifikasyon daha az verimli olacaktır. Düşük sıcaklıkta  $T_m$ 'ye sahip primerler

yüksek sıcaklıkta, yüksek sıcaklıkta  $T_m$ 'ye sahip primer yüksek sıcaklıkta çalışmayacaktır.

Primer hassasiyeti; primerin hassasiyeti, primer uzunluğuna bağlıdır. 24 bazlık özgün oligo sekansları, 15 bazlık oligo sekanslarından daha hassastır. Primerler kısmi olarak çoğaltılacak hedef DNA içinde özgün bir sekans taşıyacak biçimde tasarlanmalıdır. Tekrarlanan sekanslar içeren primer ile genomik DNA çoğaltılması bulanıklık ile sonuçlandırılacaktır. Ancak aynı primeri genomik kütüphaneden tek bir klon çoğaltıldığında net, tek bir bant verebilir. Genel olarak 55-72°C arasındaki erime sıcaklığı en iyi sonucu verir.

Tamamlayıcı primer sekansları: Primerler 3 bazdan daha fazla iç primer homolojisine sahip olmayacak şekilde dizayn edilmelidir. Primerin homolog sekansları sebebiyle kendi üzerine katlanarak çift zincir oluşturması görülebilir. Buda primerin hedef DNA'ya bağlanmasını etkileyecektir. Diğer bir tehlike primerler arası homolojidir. İki primerin orta bölümündeki kısmi homoloji hibridizasyonu engelleyebilir. Bu da elde etmek istenen ürünle yarışılacağı için istenilen ürünün oluşmasını engelleyecektir.

G/C miktarı ve poliprimidin (T,C) ve Polipürin (A,G) Uzamaları: Primerlerin baz kompozisyonu % 45 ile % 55 arası GC taşıyacak şekilde olmalıdır. Primer sekansı özel olmayan bağlantıları arttıracak poli G ve poli C uzamaları olmayacak şekilde seçilmelidir. Primer-hedef kompleksinde gevşemeye yol açacak poli A ve poli T uzantılarından da kaçınılmalıdır. Bu amplifikasyonun verimini düşürebilir. Poliprimidin (T, C) ve polipürin (A, G) uzantılarından da kaçınılmalıdır. İdeal olarak bir primer % 50 GC içerik taşıyan ve yaklaşık 20 bp uzunluğunda nükleotidlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı erime sıcaklığı  $T_m$ 'yi 56-62°C'lik aralıkta tutar.

3' uç sekansı (zinciri): 3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı kontrol için çok önemlidir. Bu bölgede yer alan primer homolojilerinin yaratacağı sorunların yanı sıra diğer bir değişken primerlerin 3' ucuna G ve C bazlarının eklenmesidir. Bu GC kıskacı G/C nükleotidlerinin daha kuvvetli hidrojen bağlarla bağlanması nedeni ile 3'

ucuna sonuna doğru bağlanmayı garanti eder. Bu aynı zamanda primer-hedef kompleksinde gevşemelere bağlı olarak reaksiyon hızının yavaşlamasının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon verimini artırır.

## 1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı:

- 1- Kırıkkale-Kızılırmak'ın deterjan kirliliği açısından değerlendirilmesi,
- 2- Deterjan kirliliği gösteren bölgelerden deterjan degrade eden bakterilerin izole edilmesi ve moleküler teknikler kullanarak tanımlanması,
- 3- İzole edilen bakterilerin deterjan degrade etme yeteneklerinin enzim (alkil sülfataz) ve gen (*sdsA*) düzeyinde belirlenmesi,
- 4- Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, deterjan kirliliği gösteren yüzey sularının biyoremediasyonda etkin olarak kullanılacak izolatların belirlenmesidir.

## 2.MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1 Mineral Salt Medium (MSM) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması ve büyüme eğrilerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. MSM agar besiyeri;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.5 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.5 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.5 g),  $\text{NaCl}$  (0.5 g),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.14 g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.15 g), agardan (10 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce  $121^\circ\text{C}$ 'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

##### 2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin DNA izolasyonu ve protein izolasyonu deneylerinde kullanılmıştır. Nutrient broth besiyeri; pepton (5 g), et özütünden (3 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce  $121^\circ\text{C}$ 'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

##### 2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Koloni oluşturan birim sayımında kullanılmıştır. Plate count agar besiyeri; tripton (5 g), maya özütü (2.5 g), glukoz (1 g) ve agardan (12 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda  $121^\circ\text{C}$ 'de 1 atm basınçta steril edilmiştir.



#### **2.1.1.4. Deterjan Sanayi Atık Su Örneklerinin Toplanması**

Deterjan sanayisine ait olan atık su örneği Ankara İvedik organize sanayi bölgesindeki deterjan üretimi yapan sanayi kuruluşundan temin edilmiştir(Şekil 2.1). Alınan atık suyun sterilasyonu için 0.2 µm'luk filtre (Milipore, Almanya) ile steril edilmiştir.



**Şekil 2.1.**Çalışmada kullanılan deterjan sanayi atık suyu örnekleri

#### **2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar**

##### **2.1.2.1. Deterjan Stok Çözeltisinin Hazırlanışı**

###### **2.1.2.1.1. SDS Çözeltisinin Hazırlanışı**

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür. 0.2 µm'luk filtre (Milipore, Almanya) ile steril edilmiştir.

###### **2.1.2.1.2. Deterjan Standart Çözeltisinin Hazırlanışı**

Alınan su örneklerinde deterjan miktarının tayini için; sırasıyla 2, 4, 8 ve 10 mg SDS tartılarak 1000 mL distile suda çözülmüştür.

#### **2.1.2.2. NaCl Çözeltisi (5 M, 100 mL)**

29.2 g NaCl tartılarak, 100 mL distile su ile çözülmüştür.

#### **2.1.2.3. Metilen Mavisi Stok Çözeltisinin Hazırlanışı (5 mL)**

0.025 g metilen mavisi tartılarak 5 mL distile suda çözülmüştür.

#### **2.1.2.4. % 70'lik Etanol (100 mL)**

30 mL distile su ile 70 mL % 100'luk etanol ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### **2.1.2.5. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL)**

8.47 g Tris-HCl tartılarak 50 mL distile suda çözülmüştür ve pH 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

#### **2.1.2.6. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama**

242 g Tris, 37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O tartılarak 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

#### **2.1.3. DNA İzolasyonunu Kitinde Kullanılan Kimyasallar**

İzolasyonda Bacterial Genomic Miniprep DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

#### 2.1.4. Suşların Tanımlanmasında Kullanılan Primerler

İzolatların 16S rDNA gen dizisini PZR yöntemi ile çoğaltarak dizi analizini yapmak amacı ile kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.**Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	T <sub>m</sub> (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyal, düz	48	[59]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	[59]

F, forward; R, reverse

#### 2.1.5. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

##### 2.1.5.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1000 mL)

6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8.7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak 1000'er mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 7.0'ye ayarlanmıştır.

##### 2.1.5.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülerek pH 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

#### 2.1.6. Native-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Native-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı Çizelge 2.2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Native-PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı

<b>Stok solüsyonları</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Tris-HCl, 2 M	24.2 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 8.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Tris-HCl, 1 M	12.1 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 6.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Gliserol (% 50)	50 mL %100'lük gliserol alınıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Bromfenol mavisi (% 1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılarak, 10 mL saf su içinde çözülmüştür.

### 2.1.7. Native-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

Native-PAGE çalışma solüsyonları ve hazırlanışı Çizelge 2.3'de verilmiştir. Native-PAGE için kullanılan bütün stok solüsyonlar ve çözeltiler +4°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 2.3.** Native-PAGE çalışma solüsyonlarının hazırlanışı

<b>Çalışma solüsyonları</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Solüsyon A % 30 akrilamid % 0,8, bisakrilamid (100 mL)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülmüştür.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH=8.8) 75 mL, 25 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 50 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
Amonyum persülfat % 10'lük (5 mL)	0.5 g amonyum persülfat tartılıp saf su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır.
Elektroforez tamponu (1L)	3 g Tris (25µM), 14.4 g glisin (192 mM) tartılarak saf su ile 1 L tamamlanmıştır.
Örnek tamponu (5x) 10 mL	0.6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 mL % 50 gliserol; 0.5 mL 2-merkaptoetanol, % 1 Bromfenol mavisi 1 mL; 2.9 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.

### 2.1.8. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12)

Ayırıcı jelin hazırlanması Çizelge 2.4'te verilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Ayırıcı jelin hazırlanması

Ayırıcı jel solüsyonları	Miktarları
Solüsyon A (Stok)	7.8 mL
Solüsyon B (Stok)	6 mL
Saf su	10.08 mL
Amonyum persülfat	79.2 µL
TEMED	15.6 µL

### 2.1.9. Dengeleyici Jelin Bileşimi (% 4)

Dengeleyici jelin hazırlanması Çizelge 2.5'te verilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Dengeleyici jelin hazırlanması

Dengeleyici jel solüsyonları	Miktarları
Solüsyon A (Stok)	1.13 mL
Solüsyon C (Stok)	2 mL
Saf su	4.67 mL
Amonyum persülfat	27 µL
TEMED	7.5 µL

### 2.1.10. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

% 0.1 Commassie Brilliant Blue boya tartılarak, % 12'lik glasiyal asetik asit ve %50'lik metanol ile karıştırılarak çözülmüştür.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı ve Su Örneklerinin Toplanması

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [61]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m<sup>3</sup>/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18.4 m<sup>3</sup>/sn ve en çok 1.673 m<sup>3</sup>/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.2). Nehir üzerinde 12 önemli baraj vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [62].



Şekil 2.2. Kızılırmak [62]

**Çizelge 2.6.** Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları

BölgeNo	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı	39° 23' 53,41"K, 33° 25' 18,44"D, 775 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98"K, 33° 24' 56,99"D, 819,5 m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60"K, 33° 23' 25,53"D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39 "K, 33° 24' 00,99"D, 801 m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39° 32' 26,97"K, 33° 23' 59,54"D, 760 m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02"K, 33° 24' 38,51"D, 750,5 m
7	Sulubük - Kıybağı Mevkii	39° 37' 04,85"K, 33° 26' 11,19"D, 771 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39' 42,39"K, 33° 27' 13,46"D, 766,5 m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62"K, 33° 28' 59,95"D, 741 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08"K, 33° 27' 42,27"D, 718,5 m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92"K, 33° 28' 07,85"D, 706,5 m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25"K, 33° 25' 04,24"D, 699,5 m



**Şekil 2.3.** Su örneği alınan istasyonların Google Earth görüntüsü

### 2.2.2. Su Öneklerinde MBAS Yöntemiyle Deterjan Analizi

Bu tez kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2014 yılı boyunca üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinde SDS konsantrasyonları araştırılmıştır. Alınan su örneklerindeki SDS miktarının belirlenmesi amacıyla Metilen Mavisi Aktif Maddeleri (MBAS) anyonik deterjan tayin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem metilen mavisinin anyonik yüzey aktif maddelerle reaksiyonu sonucu oluşan mavi renkli tuzun kloroformda çözülmesiyle spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır [63]. Metilen mavisini % 0.5 oranında distile suda çözülerek bir stok boya çözeltisi hazırlanacak ve fotokimyasal bozulmayı en aza indirmek için kahverengi bir şişede muhafaza edilmiştir. Metilen mavisini stok boya çözeltisi, 0.7 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.2) ile 100 kat seyreltilmiştir. Temiz cam tüplere 0.5 mL seyreltilmiş boya çözeltisi, 1 mL örnek ve 3 mL kloroform eklenerek 7 saniye vortekslenmiştir. Ardından tüpler 3 dakika boyunca 2000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan iki fazın karışmaması için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1 mL kloroform fazından kuartz ya da cam küvete alarak 652 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Su örneklerindeki SDS konsantrasyonu standart SDS ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar mg/L olarak verilmiştir. Alınan su örneklerinde bölgelere göre ortalama sıcaklık ve pH ölçümleri alınmıştır.

### 2.2.3. SDS Degrade Eden Bakterilerin İzolasyonu

SDS degrade eden bakterilerin seçimi için karbon kaynağı olarak 1.5 mM sodyum dodesil sülfat ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 g/L,  $\text{NaCl}$  0.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.14 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 g/L içeren MSM sıvı besiyeri (pH 7.1.) kullanılmıştır. 12 farklı bölgeden alınan su örnekleri % 5 oranında besiyerine inoküle edilip ve ekim sonrası erlenler 30°C 150 rpm'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra sıvı kültürden 1.5 mM SDS içeren ve % 2 agar ile hazırlanmış olan basal salt medium ortamlarına ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyeler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiştir. Seçici ortamdan izole edilen farklı koloniler saflaştırma için aynı ortamda tekrar kültüre edilmiştir [64]. Katı besiyerinde



büyütülen saf suşların koloni morfolojisi ve gram özellikleri belirlenmiştir.

#### **2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen SDS Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi**

SDSdegrade eden suşların MTK değerleri, petrielerde koloni görülme-yene kadar mineral salt medium agar plağında her gün 1 g/L artan konsantrasyonda SDS eklenerek saptanmıştır. Başlangıç konsantrasyonu, literatür bilgilerine göre belirlenmiştir. Son konsantrasyonda büyüyen kültür, çizgi metoduyla petriye ekilerek daha yüksek konsantrasyona aktarılarak MTK değerleri bulunmuştur.

#### **2.2.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

İzole edilen suşların iki gecelik taze kültür örnekleri 1 g/L SDS içeren 100 mL'lik MSM sıvı besiyerleri çalkalamalı etüvde 30°C'de inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede dalga boyu 600 nm'ye ayarlanarak her 6 saatte bir ölçümleri alınmıştır. Elde edilen optik density (OD) değerleri ile üreme eğrileri oluşturulmuştur.

#### **2.2.6. Bakterilerin Deterjan Sanayi Atık Suyundaki Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

İzole edilen her bir suş için deterjan sanayi atık su örnekleri (100 mL) steril edilerek ve steril edilmeden üç tekrarlı olacak şekilde ekim yapılarak 30°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. 6 saat aralıklarla alınan örnekler 600 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri ile üreme eğrileri çıkarılmıştır.

### **2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı(CFU)**

Her bir suş için gecelik kültürlerden 100 µL alınarak 1 g/L SDS içeren MSM sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 6 saatte bir 1 mL örnek alınıp seyreltme yapılarak plate count agarlara ekilmiştir. 1-2 gün inkübasyon sonrası koloni oluşumu gözlemlenmiş ve sayılmıştır [65].

### **2.2.8. SDS Degradasyon Oranlarının Belirlenmesi**

Her bir suş için gecelik kültürlerden 100 µL alınarak SDS içeren MSM sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 6 saatte bir 1 mL örnek alınıp Metilen Mavisi Aktif Maddeleri (MBAS) anyonik deterjan tayin yöntemi kullanılarak SDS degradasyon miktarı belirlenmiştir.

### **2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini**

İzole edilen SDS degrade eden bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Bacterial Genomic Miniprep DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak yapılmıştır. 15 mL'lik kültür 1.35 G'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 180 µL Lyse T eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 20 µL RNAaz A eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekledikten sonra 20 µL proteinaz K eklenerek 30 dakika 55°C'de bekletilmiştir. Örnekler alınıp 200 µL Lizis Solusyon C koyup karıştırılmıştır, % 95 lik etanol ekleyip vortekslenmiştir. Yeni tüplere alınarak 1 dakika 7 G'de santrifüj edilmiştir. Örnek üzerine 500 µL yıkama solusyonu 1 eklenmiş ve karıştırılıp 1 dakika 7 G'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar yeni tüpe alınıp 500 µL yıkama solusyonu eklenir 3 dakika 15.G santrifüj edilmiştir. Son olarak 200 µL Elution Solution eklenmiş 5 dakika bekletilip 15.G 1dk santrifüj edilmiştir ve -20°C'de saklanmıştır [66].

### 2.2.10. PZR ve Optimizasyonu

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'[61] ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'[62] kullanılmıştır. Primerlerin Tm özellikleri ve literatür verileri baz alınarak bir PZR programı belirlenmiş ve bu program kullanılarak PZR reaksiyonun genomik DNA, MgCl<sub>2</sub> miktarı ve farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimizasyon yapılmıştır. Optimum PZR reaksiyon içeriği ve programları aşağıdaki gibidir. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S forward primer (20 pmol), 5 µL 16S reverse primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10x Taq Buffer, 61.5 µL saf su, 0.5 µL (2.5 U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp pipetaj yapılmıştır. Tüplerin thermal cycler da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekildedir. 5 dk 95°C de ön ısıtma, 95°C'de 30 sn 30 döngü denatürasyon, 30 sn 55°C'de primerlerin bağlanması, 2 dk 72°C'de uzama ve 10 dk 72°C'de zincir sentezinin gerçekleştirilmesi şeklindedir. Suşların 16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 100 bp Plus DNA Ladder marker olarak kullanılmıştır. PZR ürünleri jelde görüntüledikten sonra sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır [67].

### 2.2.11. PZR Amplikonlarının Saflaştırılması

PZR ürünleri GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, ABD) ile saflaştırılmıştır. Eppendorf tüplerin içinde bulunan PZR ürünlerinin üzerine 1:1' lik bir hacimde Binding Buffer eklenmiştir. İyice karıştırılıp çözümü rengini kontrol edilmiştir. Sarı renk DNA bağlayıcı için optimum pH'ı göstermektedir. Çözeltinin rengi turuncu ya da mor olursa, 10 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2) çözeltisi ilave edilmelidir. Karışımın rengi tekrar sarıya dönecektir. Karışım filtreli tüpe alınıp 1 dakika 1.25 G'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtrelerin tam ortasına 700 µL Wash Buffer konulmuştur. Tekrardan 1 dakika 1.25 G' de santrifüj edilmiştir. PZR

ürünleri filtre üzerinde tutulmuştur. Altta toplanan sıvı dökülüp tekrardan 1.25 G' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon filtresinin alt kısmına steril eppendorf yerleştirilmiş ve üzerine 50 µL Elution Buffer ilave edilmiştir. 1dakika 1.25 G'de santrifüj edilmiştir. Kolon filtresi atılmış ve saflaştırılan PZR ürünleri eppendorfta toplanmıştır.

### **2.2.12. 16S rDNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analizlerin Yapılması**

İzole edilen bakterilerin PZR ürünlerinin sekans analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center of Biotechnology Information'ın internet sayfasındaki BLAST programı kullanılarak NCBI GenBank veritabanında yayımlanan sekanslarla karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz için PZR, 16S rDNA sekansları gen bankasından seçilen ilk 15 tür ile oluşturulmuştur. Bakterilerin filogenetik ağaçların oluşturulmasında 16S rDNA sekansları, Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) istatistik analiz programında Clustal W seçeneği kullanılarak türlere ait baz dizileri hizalanmıştır [68]. NJ metodu ile soy ağaçları çizilmiştir ve oluşturulan soy ağaçları ile izolatların birbirleriyle yakınlık dereceleri ortaya konulmuştur.

### **2.2.13. Primer Tasarımları ve *sdsA* Gen Analizlerinin Yapılması**

#### **2.2.13.1 *sdsA* Geni Primer Tasarımlarının Yapılması**

*sdsA* geninin kodladığı alkil sülfataz proteinleri National Center of Biotechnology Information (NCBI)' da tespit edilmiştir. Farklı *Pseudomonas* türlerine ait 6 alkil sülfataz dizisi seçilip Clustal W aracılığıyla hizalanarak dizilerin ortak bölgeleri belirlenmiştir ve Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) programı ile primer tasarımı yapılmıştır.

### **2.2.13.2 *sdsA* Gen Analizlerinin Yapılması**

Suşlarda *sdsA* geni analizi yapmak için Shahbazi ve arkadaşları [63], Chatuverdi ve Kumar [70] arkadaşlarının belirlediği primer dizileri kullanılmıştır. Ayrıca NCBI' da belirlenen dizilerin ortak bölgesi Vector NTI Express primer tasarım programı aracılığıyla primerler elde edilmiştir. Bu primerler arasından primer tasarım kuralları göz önünde bulundurularak en uygun primer seçimi yapılmıştır. Chatuverdi ve Kumar [71] 'ın yaptığı PZR koşulları uygulanarak *sdsA* gen bölgesi çoğaltılmıştır. PZR sonucunda elde edilen DNA'ların boyutları 100 ve 50 bp'lik marker ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

### **2.2.14. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi**

% 1'lik agaroz jel 50 mL 1x TBE tamponu ile çözüldükten sonra 5 µL Olerup SSP GelRed Dropper Bottle boya eklenerek hazırlanmıştır. Her bir örnekten 6 µL alınarak 2 µL 6X Orange Loading Dye ile boyanmıştır. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder yüklenmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu eklenmiştir. 80 V/cm<sup>2</sup> voltaj ve 40mA amper uygulanarak yaklaşık 45 dakikada yürütme işlemi tamamlanmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, ABD) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

### **2.2.15. Alkil Sülfataz Proteinini Eksraksiyonu**

İzole edilen SDS degrade eden bakterilerin total protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları [72] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Bakteriler 50 mL NB besiyerinde 24 saat 30°C' de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası besiyeri, santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 5 mL distile su eklenerek 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır, üst kısım atılmıştır. Pellet üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dk 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2 G' de 2 dk

santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım temiz tüplere alınmıştır. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tampon ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dk bekletilip -20°C'de saklanmıştır.

### **2.2.16. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Alkil sülfataz enzim aktivitesi için kullanılacak hücre ekstraktlarının protein konsantrasyonu Qubit Fluorometre cihazı (Invitrogen, ABD) ile ölçülmüştür. Alkil sülfataz enzim aktivitesinde ilk olarak optimum pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir. Yaklaşık 0.36 mg/mL protein ihtiva eden 50 µL hücre ekstraktı üzerine 450 µL 50 mM Tris-HCl ve 500 µL 100 mM SDS ilave edilip belli pH ve sıcaklık aralıklarında 48 saat inkübe edilerek, MBAS deneyi ile enzim aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık aralığı belirlenmiştir. Daha sonra alkil sülfataz enzimi için belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşulları doğrultusunda alkil sülfataz enzimi için optimum enzim konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre yaklaşık 0.36 mg/mL protein ihtiva eden 50 µL hücre ekstraktı üzerine belli konsantrasyonlar da SDS ve 450 µL 50 mM Tris-HCl ilave edilip 48 saat inkübe edilmiştir. Ortamda kalan SDS konsantrasyonu MBAS deneyi ile ölçülmüştür.

### **2.2.17. Alkil Sülfataz Enziminin Native-PAGE Protein Analizi**

#### **2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

16.7 mL % 30'luk akrilamid/bis akrilamid, 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 µL %10'luk amonyum persülfat (APS), birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin) ilave edilerek, 1 mm aralığına sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı bütanol ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir [73].

### **2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması**

3.4 mL % 30'luk akrilamid/bis akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 µL %10'luk APS birbiri ile iyici karıştırıldıktan sonra 20 µL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki bütanol distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve 80 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 1 saat yürütülmüştür [73].

### **2.2.17.3. Native-PAGE Jellerinin Boyanması**

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller tespitleme çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisinde ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk aralıklarla yıkanarak [74], fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

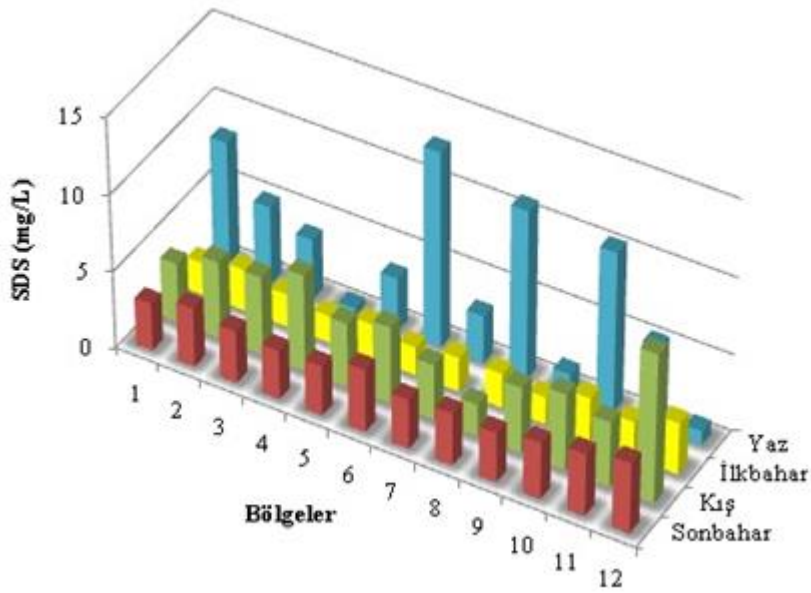
### **2.2.17.4. Zimografi Analizlerinin Yapılması**

Protein izolasyonu sonucu elde edilen hücre ekstratlarının aktif ve inaktif form lokasyonunu belirlemek için NATIVE PAGE jel elektroforezinde yürütülmüştür. Hazırlanan 20 mM SDS üzerine 1 M Tris-HCl ilave edildikten sonra oluşan solüsyon elektroforez işlemi tamamlanan jeller üzerine ilave edilip, 30°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda jel üzerine 1 damla alkol damalatılarak bantların belirginleşmesi gözlemlenmiştir [70]

### 3.ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Kırıkkale-Kızılırmak Suyu Deterjan Analizleri

Kırıkkale-Kızılırmak'tan 2014 yılında mevsimsel periyotlarla alınan su örneklerinin deterjan kirliliği analiz sonuçlarına göre nehrin çevresindeki yerleşim bölgeleri dikkate alınarak deterjan konsantrasyonunun tüm istasyonlar için Dünya Sağlık Örgütü teşkilatı tarafından belirlenen 1.5 mg/L'nin üzerinde olduğu ve nehrin ortalama deterjan miktarı ise 4.07 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu istasyonlardan Erdemli Mahallesi-Sarımusalı Mevkii, Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Baraj Girişi ve Kırıkkale İl Sınırı Çıkışı bölgeleri bu tez kapsamında ele alınmıştır. Alınan su örneklerinden elde edilen ortalama pH ilkbahar-yaz aylarında 7.6, sıcaklık değeri 25, sonbahar-kış aylarında ise ortalama pH 7.6 sıcaklık ise 7°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1.Kırıkkale-Kızılırmak suyu deterjan analizi



### 3.2. Deterjan Kirliliği Gösteren Sulardan SDS Degrade Eden Bakterilerin İzole Edilmesi

Alınan su örneklerinden belirli konsantrasyonda SDS içeren MSM katı besiyerine ekimler yapılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Erdemli Mahallesi-Sarımusalı Mevkii, Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Baraj Girişi ve Kırıkkale İl Sınırı Çıkışı bölgelerinden SDS degrade eden 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlar SDS3 SDS6, SDS8 ve SDS12-1 olarak kodlanmıştır ve MTK değerleri sırasıyla 60, 70, 65 ve 15 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** SDS degrade eden bakteriler için belirlenen MTK değerleri

Bölge/suş	SDS (g/L)																
	0.5	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
3/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8/8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12/12-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

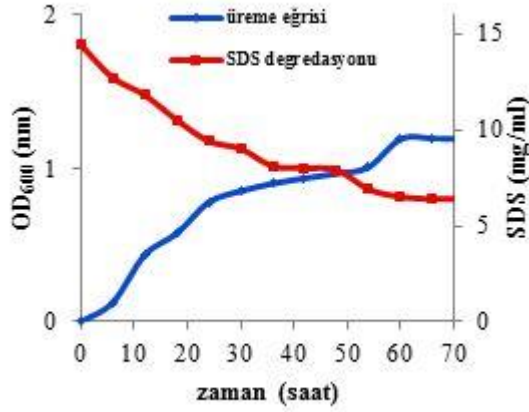
+, üreme var; -, üreme yok

### 3.3. Bakterilerin Laboratuvar Besi Ortamında ve Deterjan Sanayisi Atık Sularında SDS Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzole edilmiş olan suşlar laboratuvar besi ortamında ve deterjan sanayisi atık suyunda üreme koşulları ve degradasyon oranları belirlenmiştir.

### 3.3.1.Deterjan Sanayi Atık Suyunda Kendiliğinden SDS Degradasyonu

Deterjan sanayisi atık suyu degradasyonunda.atık suda bulunan mikroorganizmalar 66 saat sonunda ortamdaki SDS’i 14.4 mg/L’den 6.4 mg/L’ye düşürerek %56 oranında degradasyon gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.2).

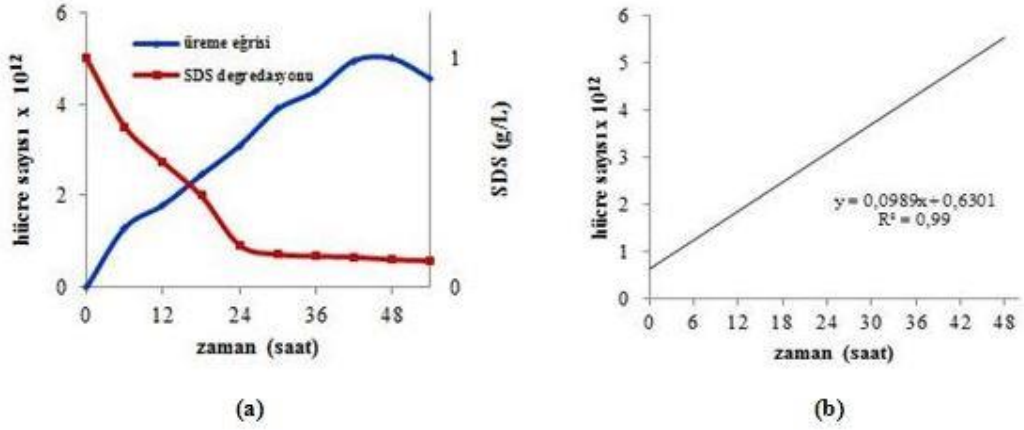


Şekil 3.2.Deterjan sanayisi atık suyunun kendiliğinden olan SDS degradasyonu

### 3.3.2. SDS3 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

#### 3.3.2.1. SDS3 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS3 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda  $5 \times 10^{12}$  bakteri sayısı ile,ortamda ki SDS'i 1 g/L den 0.121 g/L 'ye düşürerek % 88.4 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).

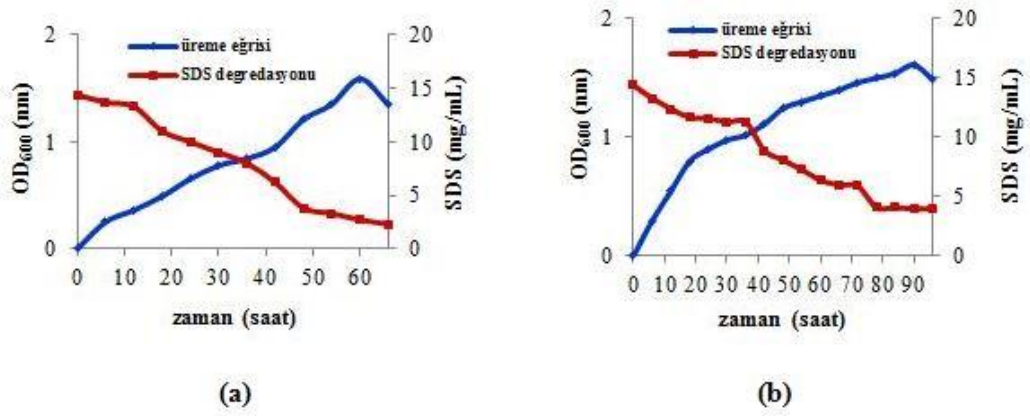


**Şekil 3.3.** SDS3 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

### 3.3.2.2.SDS3 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS3 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 60 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 2.3 mg/L'ye düşürerek % 84 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.4).

SDS3 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 90 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 4 mg/L'ye düşürerek % 70 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.4).

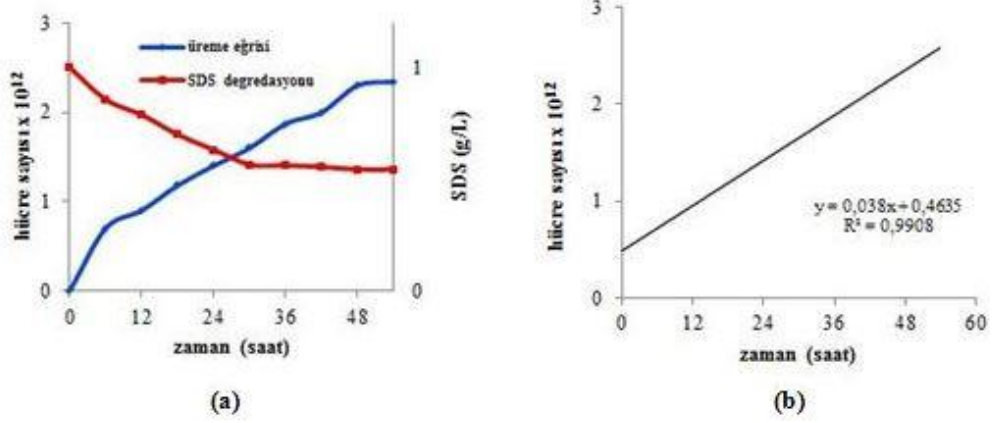


**Şekil 3.4.** SDS3 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

### 3.3.2. SDS6 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

#### 3.3.2.1. SDS6 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS6 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda  $2.3 \times 10^{12}$  bakteri, ortamda ki SDS'i 1 g/L den 0,544 g/L'ye kadar düşürerek % 46 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).

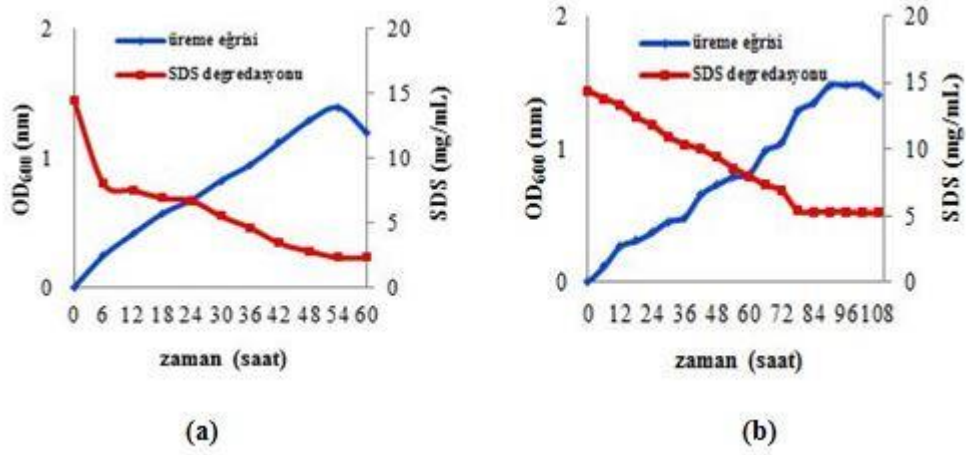


**Şekil 3.5.** SDS6 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

### 3.3.2.2. SDS6 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS6 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 54 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 2.3 mg/L'ye düşürerek % 84 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.6).

SDS6 suşunun steril deterjan sanayi atık su ortamında 102 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.3 mg/L'den 5.2 mg/L'ye düşürerek % 63 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).

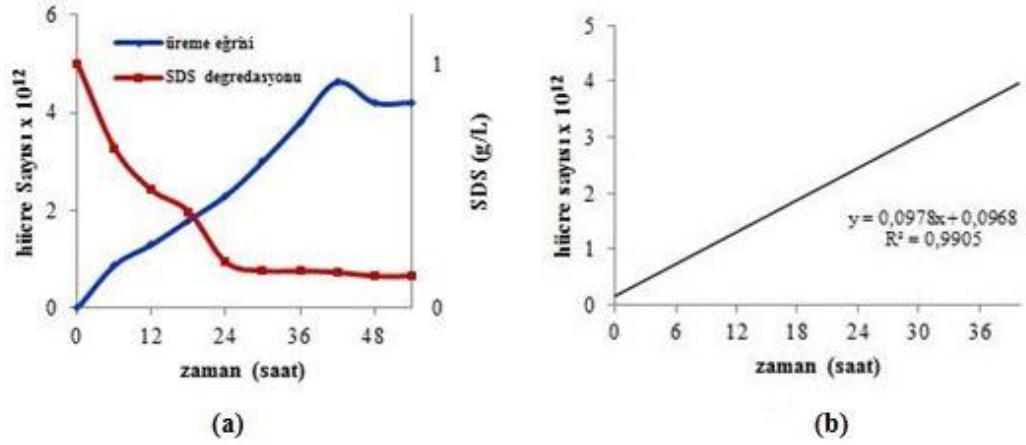


**Şekil 3.6.** SDS6 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

### 3.3.3. SDS8 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

#### 3.3.3.1. SDS8Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS8 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 48 saat sonunda  $4.2 \times 10^{12}$  bakteri, ortamda ki SDS'i 1 g/L'den 0.132 g/L'ye düşürerek, % 86.88 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).

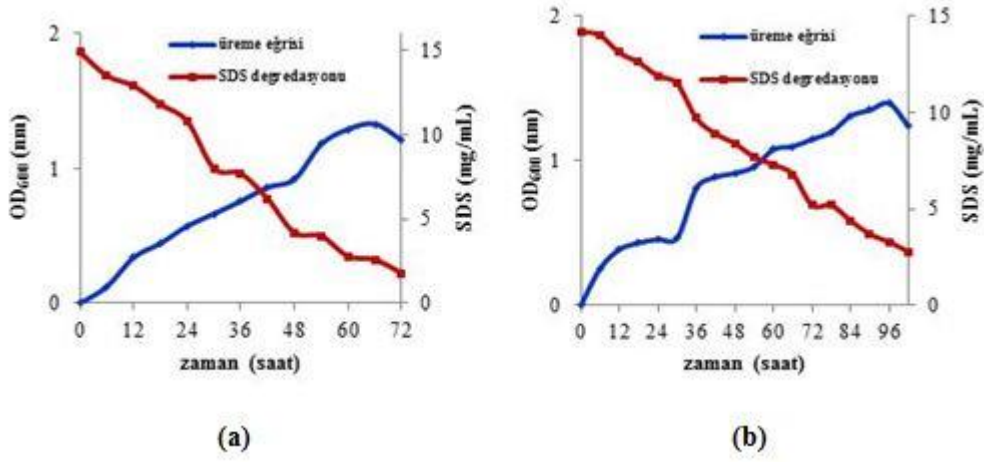


**Şekil 3.7.** SDS8 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) CFU standart eğrisi (b)

### 3.3.3.2. SDS8 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS8 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 66 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.9 mg/L'den 1.8 mg/L'ye düşürerek, % 88 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.8).

SDS8 suşunun steril olan deterjan sanayi atık su ortamında 96 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.2 mg/L'den 2.8 mg/L'ye düşürerek, % 80 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).



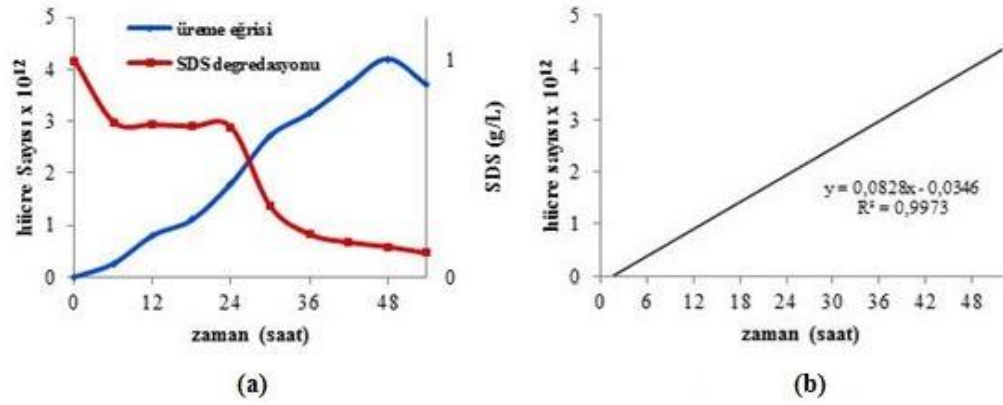
**Şekil 3.8.** SDS8 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

### 3.3.4. SDS12-1 Kodlu Suşun SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

#### 3.3.4.1. SDS12-1 Kodlu Suşun Laboratuvar Besi Ortamında SDS Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS12-1 suşunun 1 g/L SDS içeren MSM ortamında 42 saat sonunda  $4.2 \times 10^{12}$  bakteri, ortamdaki SDS'i 1 g/L den 0,11 g/L'ye düşürerek, %88.4 oranında degrade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.9).



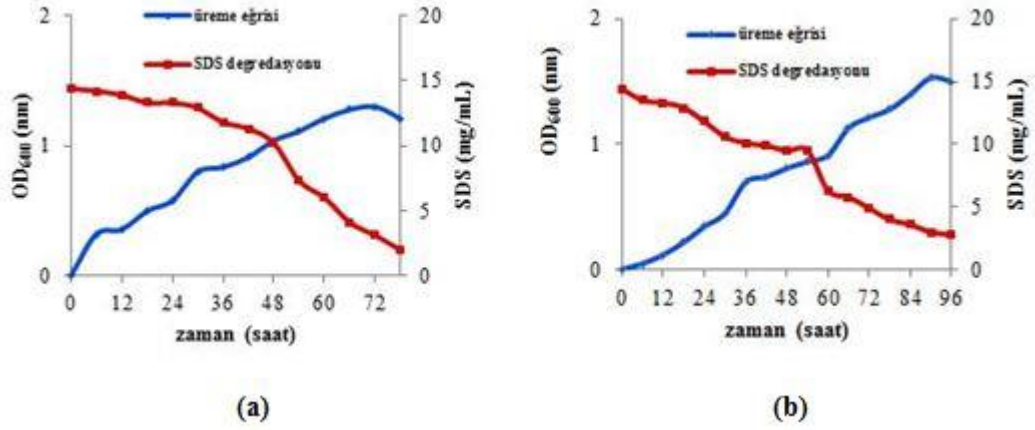


**Şekil 3.9.** SDS12-1 kodlu suşun 1 g/L SDS içeren MSM ortamındaki SDS degradasyon oranı (a) ve CFU standart eğrisi (b)

### 3.3.4.2. SDS12-1 Kodlu Suşun Deterjan Sanayi Atık Sularında Degradasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

SDS degrade eden SDS12-1 suşunun steril olmayan deterjan sanayi atık su ortamında 78 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.4 mg/L'den 2.1 mg/L'ye düşürerek, % 85 oranında degrade ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.10).

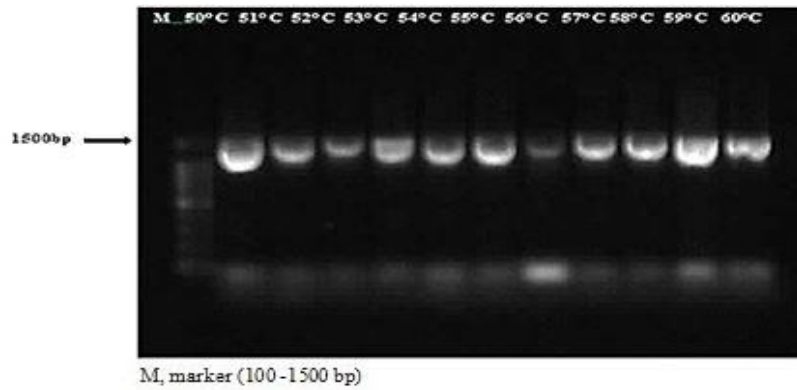
SDS12-1 suşunun steril deterjan sanayi atık su ortamında 90 saat sonunda ortamdaki SDS'i 14.3 mg/L'den 3.1 mg/L'ye düşürerek, % 80 oranında degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** SDS12-1 kodlu suşun; steril edilmeyen deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (a), steril olan deterjan sanayi atık suyundaki SDS degradasyon oranı (b)

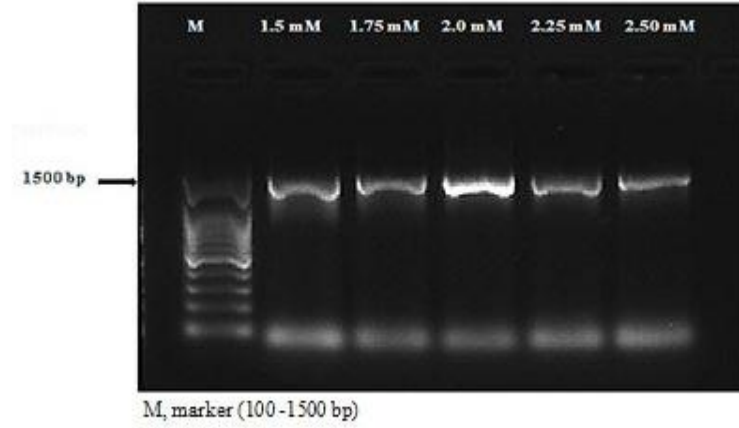
### 3.4. SDS3 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.11'de SDS3 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 59°C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.11.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS3 kodlu suşa ait PZRürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. SDS3 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir (Şekil 3.12).



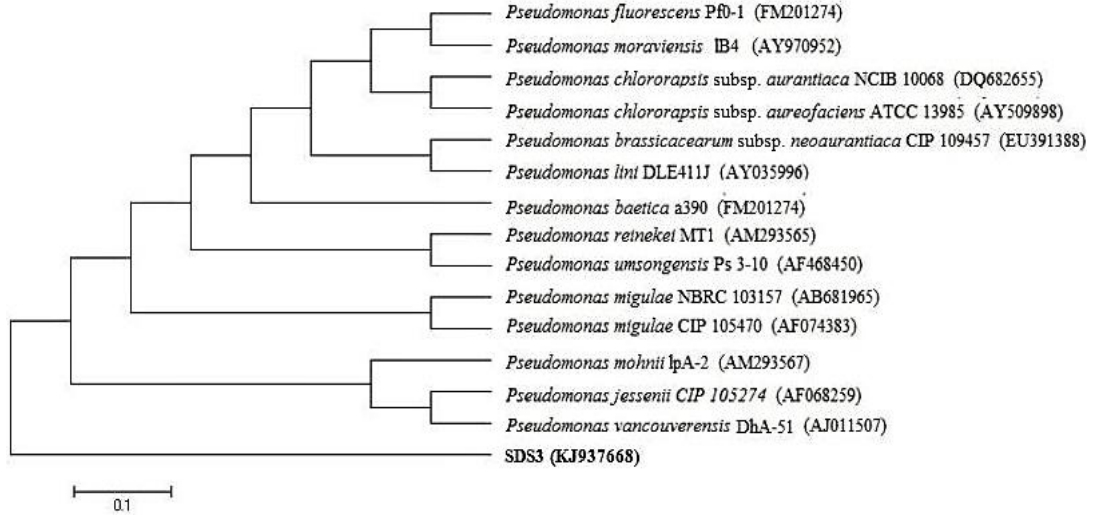
Şekil 3.12. Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında SDS3 suşuna ait PZR ürünleri

#### 3.4.1. SDS3 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS3 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.2). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS3 kodlu suş % 99 oranında *Pseudomonas fluorescens* (accession number KJ937668) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.13). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS3 kodlu suş

evrimsel açıdan *Pseudomonas fluorescens* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



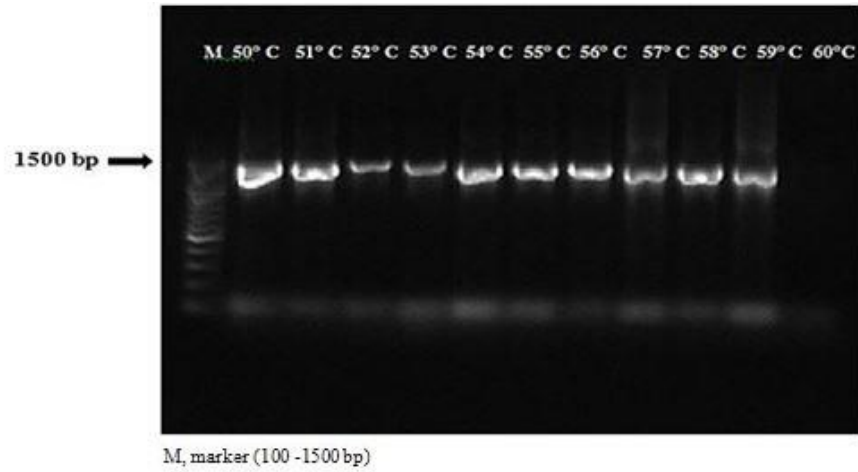
Şekil 3.13. SDS3 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

**Çizelge 3.2.** SDS3 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 SDS3															
2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	0.979														
3 <i>Pseudomonas baetica</i> a390	0.967	0.007													
4 <i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	0.961	0.008	0.001												
5 <i>Pseudomonas chlororapis</i> subsp. <i>aurantica</i> NCIB	0.979	0.003	0.007	0.005											
6 <i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4	0.973	0.004	0.003	0.004	0.004										
7 <i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	0.967	0.009	0.003	0.001	0.007	0.005									
8 <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	0.980	0.007	0.007	0.005	0.004	0.008	0.004								
9 <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	0.957	0.009	0.003	0.001	0.007	0.005	0.003	0.007							
10 <i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps3-10	0.961	0.008	0.001	0.000	0.005	0.004	0.001	0.005	0.001						
11 <i>Pseudomonas vancoverensis</i> DhA-51	0.957	0.009	0.003	0.001	0.007	0.005	0.003	0.007	0.000	0.001					
12 <i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470	0.967	0.009	0.003	0.001	0.007	0.005	0.000	0.004	0.003	0.001	0.003				
13 <i>Pseudomonas chlororapis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> ATCC	0.979	0.003	0.007	0.005	0.000	0.004	0.007	0.004	0.007	0.005	0.007	0.007			
14 <i>Pseudomonas mohnii</i> lpA-2	0.962	0.011	0.004	0.003	0.008	0.007	0.001	0.005	0.001	0.003	0.001	0.001	0.008		
15 <i>Pseudomonas lini</i> DLE411J	0.977	0.007	0.005	0.004	0.004	0.008	0.004	0.003	0.005	0.004	0.005	0.004	0.004	0.005	-

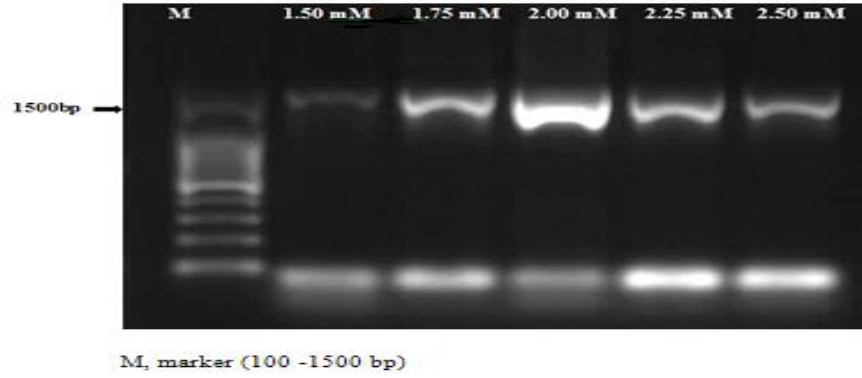
### 3.5. SDS6 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

16S rDNA bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.14'te SDS6 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 56°C olduğu belirlenmiştir



**Şekil 3.14.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS6 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 3.15'te SDS6 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir.

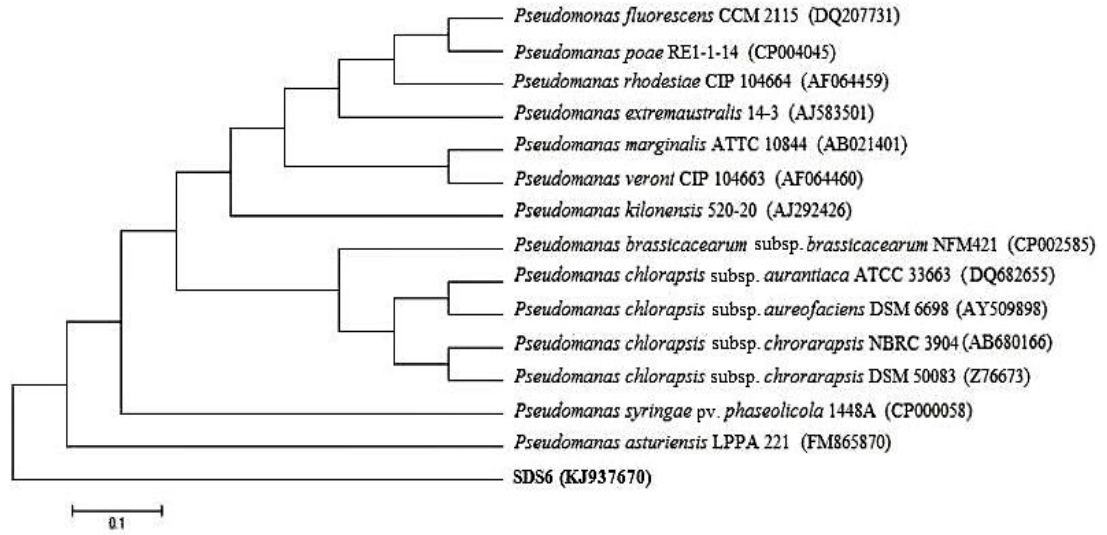


**Şekil 3.15.** Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında SDS6 suşuna ait PZR ürünleri

### 3.5.1. SDS6 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS6 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS6 kodlu suş % 99 oranında *Pseudomonas fluorescens* (accession number KJ937670) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.16). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS6 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas fluorescens* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.16.** SDS6 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

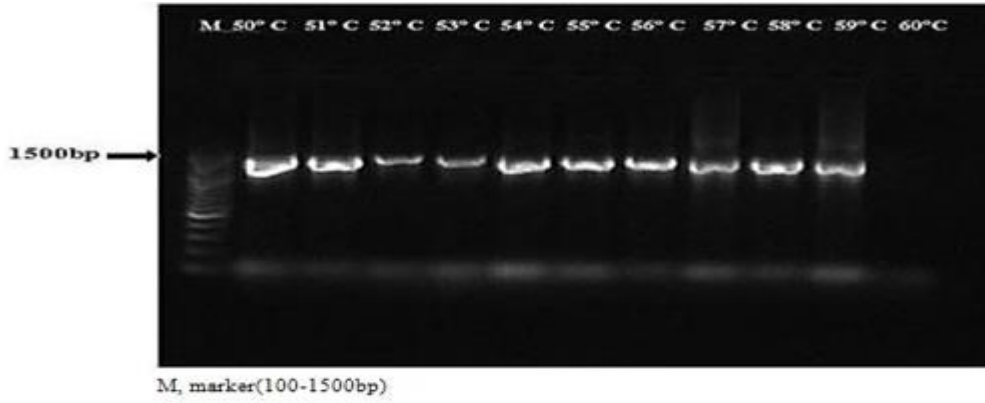


**Çizelge 3.3.** SDS6 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerler

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Pseudomanas asturiensis</i> LPPA 221															
2 <i>Pseudomanas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i>	0.021														
3 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> ATCC 33663	0.019	0.005													
4 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> DSM 6698	0.023	0.010	0.006												
5 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>chlororapsis</i> NBRC	0.018	0.003	0.003	0.008											
6 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>chlororapsis</i> DSM 50083	0.018	0.003	0.003	0.008	0.000										
7 <i>Pseudomanas extremaustralis</i> 14-3	0.026	0.010	0.013	0.018	0.012	0.012									
8 <i>Pseudomanas fluorescens</i> CCM 2115	0.026	0.010	0.014	0.019	0.012	0.012	0.003								
9 <i>Pseudomanas kilonensis</i> 520-20	0.019	0.005	0.009	0.014	0.006	0.006	0.009	0.009							
10 <i>Pseudomanas marginalis</i> ATCC 10844	0.023	0.009	0.010	0.015	0.010	0.010	0.004	0.006	0.008						
11 <i>Pseudomanas poae</i> RE1-1-14	0.026	0.015	0.016	0.019	0.017	0.017	0.006	0.005	0.014	0.009					
12 <i>Pseudomanas rhodesiae</i> CIP 104664	0.026	0.010	0.012	0.017	0.012	0.012	0.001	0.003	0.009	0.005	0.005				
13 <i>Pseudomanas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	0.014	0.008	0.005	0.012	0.005	0.005	0.013	0.013	0.006	0.010	0.017	0.013			
14 <i>Pseudomanas veroni</i> CIP 104663	0.025	0.008	0.010	0.015	0.009	0.009	0.004	0.006	0.008	0.003	0.010	0.005	0.012		
15 SDS6	1.059	1.049	1.049	1.059	1.054	1.054	1.041	1.052	1.030	1.029	1.047	1.046	1.036	1.033	-

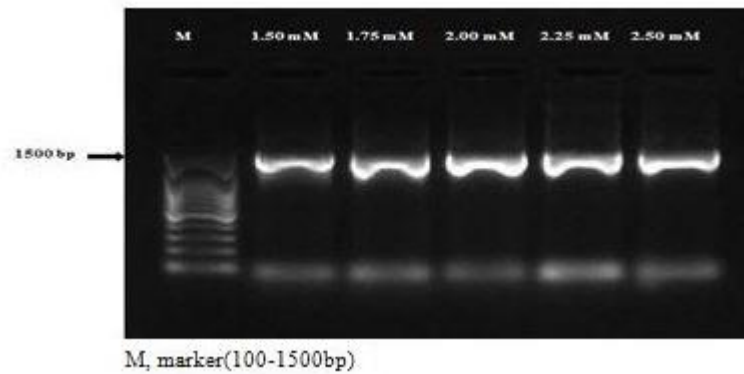
### 3.6. SDS8 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizinin Yapılması

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.17'de SDS8 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 56°C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.17.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS8 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 3.18'de SDS8 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 2mM belirtilmiştir

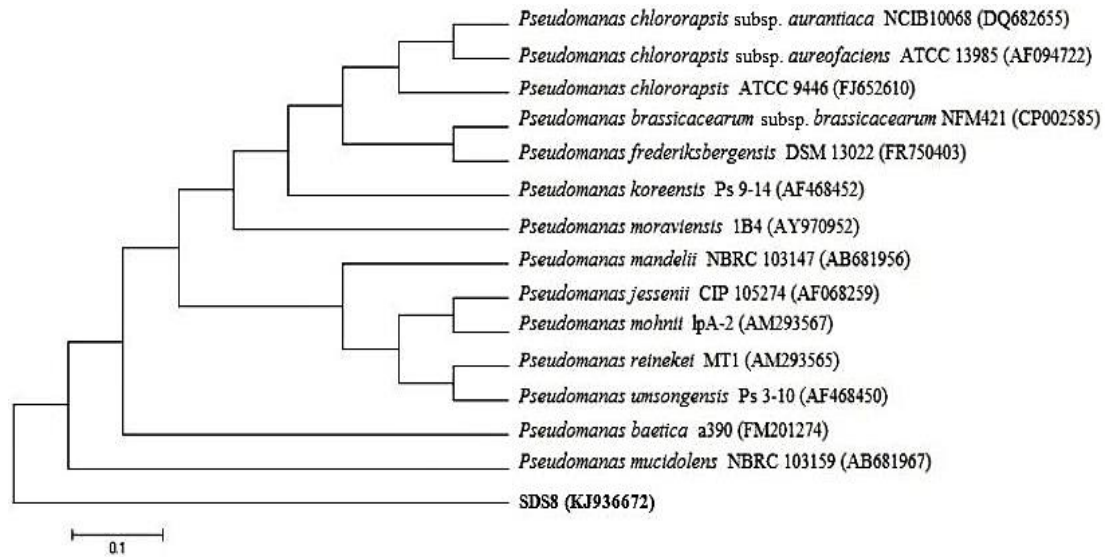


**Şekil 3.18.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında SDS8 suşuna ait PZR ürünleri

### 3.6.1. SDS8 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS8 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS8 kodlu suş % 99 oranında *Pseudomonas baetica* (accession number KJ937672) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.19). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS8 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas baetica* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



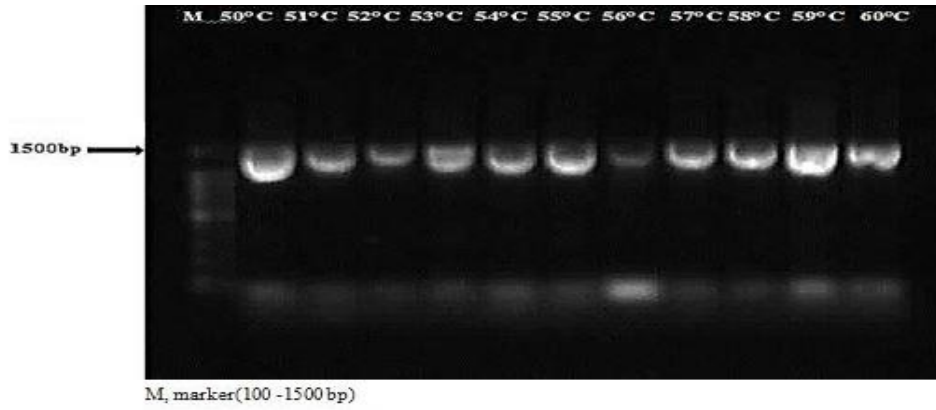
Şekil 3.19. SDS8 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

**Çizelge 3.4.** SDS8 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 SDS8															
2 <i>Pseudomanas baetica</i> a390	1.046														
3 <i>Pseudomanas fluorescens</i> Pf0-1	1.059	0.06													
4 <i>Pseudomanas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i>	1.072	0.08	0.008												
5 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> DSM	1.082	0.015	0.011	0.013											
6 <i>Pseudomanas chlororapsis</i> subsp. <i>chlororapsis</i> DSM	1.077	0.09	0.005	0.003	0.010										
7 <i>Pseudomanas protegens</i> Pf-5	1.060	0.06	0.008	0.013	0.017	0.010									
8 <i>Pseudomanas kilonensis</i> 520-20	1.052	0.05	0.011	0.005	0.017	0.006	0.009								
9 <i>Pseudomanas protogens</i> CHA0	1.060	0.06	0.008	0.013	0.017	0.010	0.000	0.009							
10 <i>Pseudomanas veronii</i> CIP 104663	1.062	0.09	0.013	0.008	0.013	0.009	0.015	0.008	0.015						
11 <i>Pseudomanas rhodesiae</i> CIP 104664	1.075	0.09	0.014	0.010	0.014	0.011	0.010	0.009	0.010	0.005					
12 <i>Pseudomanas mucidolens</i> IAM 12406	1.062	0.09	0.014	0.013	0.017	0.014	0.010	0.011	0.010	0.008	0.003				
13 <i>Pseudomanas synxantha</i> IAM 12356	1.075	0.011	0.017	0.011	0.016	0.013	0.013	0.010	0.013	0.005	0.003	0.005			
14 <i>Pseudomanas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	1.059	0.06	0.008	0.008	0.014	0.005	0.008	0.006	0.008	0.011	0.013	0.015	0.014		
15 <i>Pseudomanas sponiphila</i> DSM 9751	1.048	0.008	0.009	0.014	0.018	0.011	0.006	0.010	0.006	0.017	0.017	0.017	0.019	0.009	-

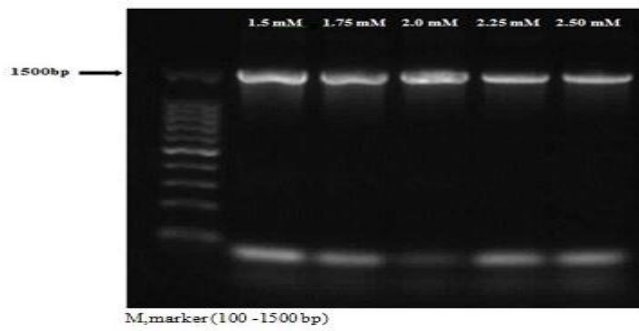
### 3.7. SDS12-1 Kodlu Suşun 16S rDNA Sekans Analizi

16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.19'da SDS12-1 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.20.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında SDS12-1 kodlu suşa ait PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 3.21'de SDS12-1 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 2 mM belirtilmiştir.

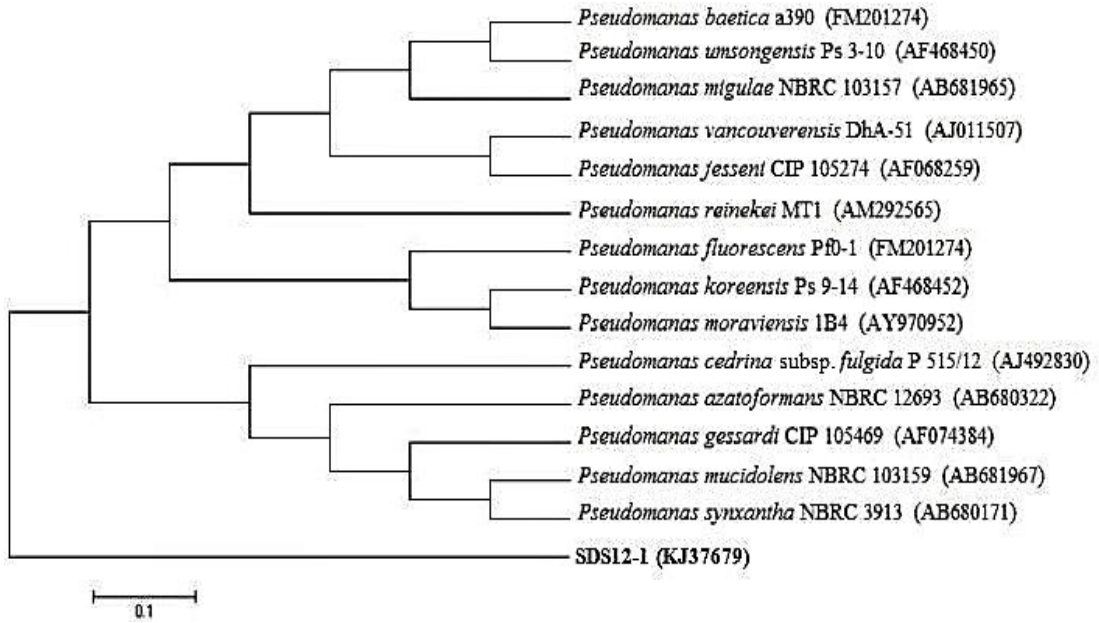


**Şekil 3.21.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında SDS12-1 suşuna ait PZR ürünleri

### 3.7.1. SDS12-1 Kodlu Suşun Filogenetik Analizi ve Tanımlanması

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 6 programına veri olarak yüklenerek SDS12-1 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. (Çizelge 3.5.). Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre SDS12-1 kodlu suş % 95 oranında *Pseudomonas fluorescens* (accession number KJ937679) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16S rDNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 6 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joiningtree oluşturulmuştur (Şekil 3.22). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre SDS12-1 kodlu suş evrimsel açıdan *Pseudomonas fluorescens* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



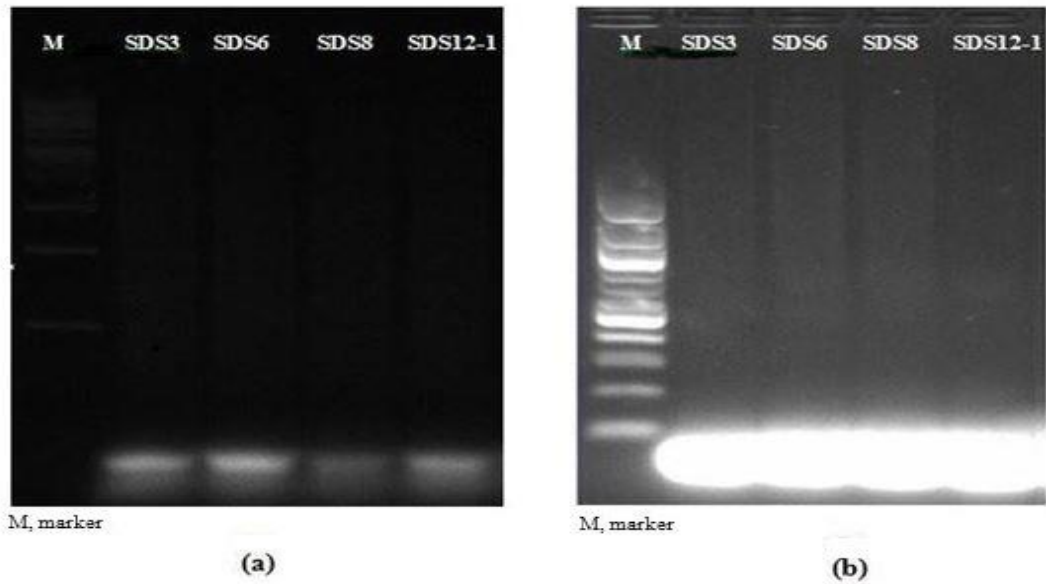
Şekil 3.22. SDS12-1 kodlu suşa ait neighbourjoining metoduyla oluşturulan dendrogram

**Çizelge 3.5.** SDS12-1 kodlu suş için 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

	Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	SDS12-1															
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	1.114														
3	<i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	1.086	0.007													
4	<i>Pseudomonas mucidolens</i> NBRC 103159	1.092	0.013	0.008												
5	<i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC 3913	1.092	0.013	0.008	0.000											
6	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	1.095	0.003	0.003	0.012	0.012										
7	<i>Pseudomonas Vancouverensis</i> DhA-51	1.092	0.008	0.002	0.010	0.010	0.005									
8	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP 105469	1.099	0.013	0.010	0.002	0.002	0.013	0.012								
9	<i>Pseudomonas azotoformans</i> NBRC 12693	1.102	0.018	0.013	0.005	0.005	0.017	0.015	0.007							
10	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274	1.083	0.010	0.003	0.012	0.012	0.007	0.002	0.013	0.017						
11	<i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4	1.088	0.008	0.008	0.017	0.017	0.005	0.010	0.018	0.022	0.012					
12	<i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157	1.086	0.010	0.003	0.012	0.012	0.007	0.005	0.013	0.017	0.003	0.012				
13	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> P 515/12	1.063	0.018	0.013	0.012	0.012	0.017	0.015	0.013	0.013	0.017	0.022	0.017			
14	<i>Pseudomonas baetica</i> a390	1.086	0.010	0.003	0.012	0.012	0.007	0.005	0.013	0.017	0.003	0.012	0.000	0.017		
15	<i>Pseudomonas sumsongensis</i> Ps 3-10	1.086	0.010	0.003	0.012	0.012	0.007	0.005	0.013	0.017	0.003	0.012	0.000	0.017	0.000	-

### 3.8. *sdsA* Gen Analizlerinin Yapılması

Shahbazi ve arkadaşları [69], Chatuverdi ve Kumar [70] *sdsA* geni için kullandıkları primerler SDS degrade eden suşlar için *sdsA* geninin varlığını belirleyememiştir. SDS degrade eden 4 suş için; F 5'-GAC GGC CAT ATG AGC CGT CTG CTT GCA CTC CTG-3'R 5' -GCG CAG ATC TGC CTT CGG ACT TCG CCG CCG GCG T-3' (1977 bp) [70], F 5' – GTC TAC ACC CAC TTC CAC CCG G- 3' R 5'-GTG GCG GCA GCT TGA CCT TGA CCT TCT C- 3' (672 bp) [69] (Şekil 3.23) Primer çiftleri kullanılmış olup, primerlerin çalışmadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 3.23.** Farklı iki primer kullanılarak yapılan *sdsA* geni analizi 1977 bp (a) ve 672 bp (b)

#### 3.8.1. *sdsA* Geni Primer Tasarım

NCBI' da belirlenen *sdsA* geninin kodladığı alkil sülfatazların hizalanması sonucunda 311 bp uzunluğunda ortak alkil sülfataz gen bölgesi elde edilmiştir (Şekil 2.4). Elde edilen ortak alkil sülfataz gen bölgesinden Vector NTI Express (Lifetechnologies, ABD) primer tasarım yazılımı ile Şekil 3.24'te gösterildiği üzere basamak basamak pirimer tasarlanmıştır.



*P.aeruginosa* PAO1 ATGAG-----CCGTCT-G----CTTGC-----ACTC-CTGG 25  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 ATGTC-----CCGTTCA----TTCGC-----GCCAGCCAG 27  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase*-----  
*P.stutzeri* ATGAA-----CCTGCCCT----ATCGCT-----GGATGCTAACCCAG 32  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ATGAAATTGAATGCCCTATCG---ACCGCAACGCATGGGAGCCGGTCAT 46  
*Legionellafallonii*Alkyl ATGACA---AATCCATATCAGCGCATCGC-----GTTATATTC 35

*P.aeruginosa* PAO1 CGC-----TCGCCCCGCTG-----CTCGCC-GGCG 49  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CGCCGCACAC-----TGCTCGCCACCCTG-----ATCGCC-GCCA 61  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase*-----TG-----ATCGA--GGCG 11  
*P.stutzeri* CACC-----TTGTTGCTACTCAGTGCATGCAGCGAC-GGC- 66  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CTCACAGTCAAATTATGGAAATTCAGCACTTCGTTCTG-CTTGCC-GCAT 94  
*Legionellafallonii*Alkyl TTCT-----CTTATGCTTCA-----TCGATTAGT 61  
\*

*P.aeruginosa* PAO1 CCGCCGA--AACCACCGC-----GCC-----CAAACCGCCC 78  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CCCTCGCCAGCCGCTGCTGGCTGCAGAGAGCCTGGACAGCAAACCGGCC 111  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* CC--CG--AGGGCTG----- 23  
*P.stutzeri* CCTGCGCCAGTCACAGC-----GCC-----GCCACGC 94  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CCATCAT--AGTATCTGGT-----CAAAGCTGGGCTGCAGAAACAGCT 135  
*Legionellafallonii*Alkyl TTGCTGCAGATAATTAG-----GCGGATTTAAGAGCCGACT 99  
\*

*P.aeruginosa* PAO1 AGTGCCTTCA---CCGTG--AGGCCAGCGCGGGTCAAGCG----G 118  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 AGCGCCATCA---CCGCCGAAAGAACGCCGAAGTGCTGAAG-----A 151  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* -----ATCA---TCGTG-----ACACCGCGAGTCGGTG-----G 51  
*P.stutzeri* CACGCACGCAA--GCTGCC-----AGGCCGAGTGGCGCAGAGGTATG 136  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AA-GCCTGCAACGGATGCGACCAAAGCCGCTAACGATGCTTTGCTCAAAG 184  
*Legionellafallonii*Alkyl GA-ACTGACA---CAGCAAAAAATGCGCAATGGCCCAATC----- 137  
\*\* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 AATTGCCCTTCGCGCACCAGCGCGACTTCGAGCGCGCCGACCAGCGGCTG 168  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 ACCTGCCCTTCGCGCACCAGCGAGGAGTTCGAGGCCGCCAAACCGGGCTG 201  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* ACCAGTCGCGCAAGGTCCTCGCCGAGTTC-----CGCAA--G 86  
*P.stutzeri* ACCTGAGCCATGTGCA--GGCCCTAGCCAGGCACGC-----CGCGCCTA 180  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AGCTGCCATTTGACGACAAGACCTCCTTCGACTTAGCGCACAAAGGCTTT 234  
*Legionellafallonii*Alkyl - ACTTCCTTTTGTCTCAACAAGATTTGCTGACGCAACAAGGGGATTT 186  
\* \*

*P.aeruginosa* PAO1 ATC-CGGCGCCGGAGCGGTTACTCATCCGCAACCC---CGACGGCAGCG 214  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 ATCGCGCCGTTTC--AGCGG--GCAGATCAAGAACGC---CGAGGGCCAGG 244  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* ATC-----AGCG----- 93  
*P.stutzeri* ATTGCCACGCCTC-AGGGC---CAGGTGCGCGATGC---CGAAGGCGAAG 223  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ATTGTCCCTGCCTGCAGA-ACCGATCAAAGGCGA---AAAGGGCAATA 280  
*Legionellafallonii*Alkyl ATAGCGACCAATGAAGGACA-AGTGATTAATAAACGAACGAAGATCGGG 235  
\*\* \*

*P.aeruginosa* PAO1 TCGCCTGGCAGCTCGGTGGCTACGACTTCCTCCTCGACGGCAA-GCCTCG 263  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TGGTGTGGGACATGGGCGGTACCGATTCTCAACGACAGGACGCGC- 293  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* -----ACAAGCCATC-----AAGGCC--- 110  
*P.stutzeri* TGATCTGGGACTTCGATAGCTTTGCGTTTATCC---AAGGTGAGGCC- 269  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA TGATCTGGGACCAAGCAAATATGGCTTTATTAAGAAGGTGAAGCCGG 330  
*Legionellafallonii*Alkyl TGATATGGGATCTCAATCTTATCAATTCATTAAGGCGA-AAAGCCTCC 284  
\* \*\* \*\*

*P.aeruginosa* PAO1 C--GACAGCA-TCAATCCCAGCCTGCAACGCCAGGCCCTGCTCAATCTCA 310  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 C--GACACGG-TCAACCCAGCCTGTGGCACCAGGCCAGCTGAACAACA 340  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* -----ATCG-TCTACACCACT-----CCA--CCCGG---ACCACA 141  
*P.stutzeri* C--ACTACCG-TCAACCCAGCCTGTGGCGCAAGCGCTGCTGAATAACC 316  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CCGGACACGA-CCAACCAAGCTTGTGGCGCAATCTCAACTAATCAATA 379  
*Legionellafallonii*Alkyl T---GCATCAATTAATCCCAGCTTATGGCGTCAAGCAAGACTTAATATGA 331  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 AGTACGGCTGTGTCGAGGT--TGCCGAGGGTATCTACCAGGTGCGCGGCT 358  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TCGCCGGCTGTTCGAGGTCATGCCGAAGCT--CTACCAGGTGCGCGGCC 388  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* TCAACGGCGTG---AAGGC-----CT 159  
*P.stutzeri* AGGTTGGGCTGTTCAAAGT--CAGCGACAAAATCTATCAGCTACGGCGCT 364  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA TTCTGGCCTGTTGAAGT--CACCAGCGCATTTACCAAGTCCGCAACT 427  
*Legionellafallonii*Alkyl ATAATGGCCTGTACAAGGT--CACTGATAGGATTTATCAAATTCGTGGTT 379  
\*\* \*\* \*

*P.aeruginosa* PAO1 TCGACCTGGCCAACATCACCTTCATCCGCGCGAC-AGCGGCTGGATCGT 407  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TCGATCCGGCGAACATGACCATCATCGAAGGCGAC-AGCGGTCTGGTGCT 437  
*Pseudomonassp.alkylsulfatase* TCG--TCAGCGAAGAGCA-----GGTGAAGAGCGCGGAGGTGCG 196  
*P.stutzeri* TCGACCTAGCCAACATGACGCTGATCGAAGGCGAC-AGCGGCTGGATTGT 413  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ATGACTTGTGCAACATGACCATCGTCAAGGCAAA-GATGGCATCACCCAT 476  
*Legionellafallonii*Alkyl TTGATTTATCAAATATGGATATTTATCGAAGGTAAT-ACAGGTTAATAT 428  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 GGTGACACCCCTGACCACCCCGCCACCGCCAGGGCGGCTACGAACTGG 457  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CATCGATACCCCTGACCACCGCGAAACCGCCCGCGCCCTCGACTGT 487

### Şekil 3.24. Çalışmada elde edilen alkil sülfataz sekanslarının hizalanması

(\*); Ortak sekanslar

*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase CATCTACGCCAGGAAACC-----CTGCTGG-----ACAACGTCG 231  
*P. stutzeri* CATCGACCCGCTAACCCAGCCGGGAAACCAGCCGCTTCGCTATGGACTTCG 463  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ATTTCGACCCACTGATTTTCAACAAGAAACAGCGAAGGCAGCGCTCGACCTGT 526  
*Legionellafallonii* Alkyl TGTAGATCCATTAATTAGTGCAGAAACTGCCAAAGCAGGTTTGGATTTAT 478  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 TCAGCCCGGAGCTGGGCGA-GAGGCCGATCCGTACGGTATCTACAGCCA 506  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 ATTTCCA-GCACCAGCCGAAAGCCGATCGTCGCGGTGGTCTACAGCCA 536  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase TCACCCA-AGGCTCGCTGGTGGGCGGATCCTCACCATGCGCTCGGGCTA 280  
*P. stutzeri* TTGCACAACATCTGGGCTC-ACGCCGCTGAGCGCGATGATCTTACAGCCA 512  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AC-TACAAACATCGGCCGAAAAAACCTGTGGTGCAGTCACTACACACA 575  
*Legionellafallonii* Alkyl AC-TTTAAACACCCGACTAAAAAGTCGGTTGTTGCAGTGAATTTATACGCA 527  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CGCCCAGCCGATCACTTTGGAGGCGTGCGCCGCTTGGTAGAGCCACAGC 556  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CAGCCATATCGACCACTTCGGCGGCGCGCGGCATCATCGA--CGAGGC 584  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase CA-----GCTTCGGCTTGCGC-----TCTCCGA--CGAGA 310  
*P. stutzeri* CAGCCATGTCGATCACTTTGGCGGTGCTCTCGCGGTGATCGA--CGCCGA 560  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CAGCCACGTTGACCACTACGGCGGCGTGCGCCGCTTGTGCGA--TGAGGC 623  
*Legionellafallonii* Alkyl CAGTCATGTGGATCACTATGGCGGGTTAAAGGTATAGTCAA--TGAAGA 575  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 AGGT-CGCCAG----CGGCGCGGTGCAGATCATCGCTCCGGCCGGCTTCA 601  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CGA--CGTCAAGGC-CGGCAAGGTGAAGGTCTTCGCGCCGTCGGCTTCA 631  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase CAAG-CG-----CGACA--TGAACGCCG--GCCTCGGCCGCT--- 343  
*P. stutzeri* AGA--CGCCAAGGTGCGTCA-GCTACCGGTGATTGCCCGGCTGGGTTTA 607  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AGA--TGTTAAGGC-CGGCAAGGTAAAGATCTACGCCCGTTAGGTTTCC 670  
*Legionellafallonii* Alkyl TGATGTGACGAAG---GGTAAAGTAAAAATTTATGCCCGAAGGGATTT 622  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 TGGAGGCGCGATCAAGGAGAACGTCCTGGCCGGCAACGCCATGATGCGC 651  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TGGAGCATGCCGTCAGCGAGAACATCCTCGCCGCGACCCGATGGCCCT 681  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase -----GGCCACGAGGGCGCTCCACCTTCATCGCC---CCAC 379  
*P. stutzeri* TGGAAAGGCCACCAGCGAAAACCTGATGATGGGCATCGCCATGGCCCG 657  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA TTTGAGCAGCCGTCGGCCGAGAACGTTATGGCAGGTACTGCCATGAGCCCG 720  
*Legionellafallonii* Alkyl TAGAAGAGCCGTAAGTGAGAACGTTTATGCGGGTATGCGATGAGTCGT 672  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CGCGCCACCTACCAGTACGGCACGCAACTGCCCAAGGGCCGCGAGGGGCA 701  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CGCGGCCAGTACCAGATGGCGTCATGTTGCCGCGGAGCGCAGCGCCA 731  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase CG--ACACCTTCC---GCGACA-----GCC----- 399  
*P. stutzeri* CGTGCCACCTTTCATGATACGGCAAGCGCTACCGCGCAGCGCCGAGGGCT 707  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CGGGCCAGCTATATGTACGGTAACCTGCTGCCCGCAGACGCCAAGGGCA 770  
*Legionellafallonii* Alkyl CGTTCGTTTTATATGTATGGCACTTTTCTACCCCGCGGAGAAAGGGCCA 722  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GGTGACGA-TGGCCATCGGCAAGGGATTGGCGCGCGG-ACCCTGA-GC- 747  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 GGTGACAGCGCGCC-TGTTCAAGACCAGCGCACCAATGCCACCAATACG 780  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase --TCGACA-----CCACCAT----- 412  
*P. stutzeri* GGTAGACAACGGCC-TGGGCAAGCGGTTGCCTTCGGGCACATGGGCATT 756  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ATTAGGCGCTGCTC-TGGGTACCACCATCGCGCAGG---TACAGTAAAG 816  
*Legionellafallonii* Alkyl AGTCGATGCCGGAT-TAGGTAAGACTACTTCAACGGG---TACAGTCACT 768  
\* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CTGCTGGCGCCGACCCGCTGATCGAAGGCGAGGGCGAGGACTTGGTGT 797  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CTGGTCGCACCGAACGTCGTCGATCGAGAAGCCCTACGAGCGCCACACCGT 830  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase -----CGCCGGC-----TTAG----- 425  
*P. stutzeri* CTGC--CGCCACCCAACTGATCGACGCGCGCAACAGACGCTGGACGT 803  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CTGATTCACCAACCGACATCATCAAGAAGCCGTTGAAACCCAGTAAAT 866  
*Legionellafallonii* Alkyl CTTATTCCGCAACAGATGAAATCAAGCAACTGGAGAAATAAAAAATAT 818  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GGACGGCGTGCCTTACCTTCCAGAACACGCCGGGACCGAGTCCGCGG 847  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CGACGGCTCGAGCTGGAGTTCCAGCTCACCTGGGCAGCGAAGCGCAT 880  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase -----GTGAGTTC---CTCCA---CGTGCC---CAGCGAGCGCGCG 459  
*P. stutzeri* GGATGGAGTGCCTTCTCTTACAACTACCCGAGAGTGAAGCCCGG 853  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CGACGGTCTCACTACGAGTTCATGTATGCGCCTGGCAGTGAAGCCCGG 916  
*Legionellafallonii* Alkyl TGATGGAATCGATATAGTATTTCAAATGGCACCTCATACTGAGCGCGCAG 868  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CGGAGATGAACATCTGGCTGCCGCGGAGAAAGCCCTGCTGATGGCCGAG 897  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CGGACATGAACATCTACCTGCCGCGAGTTCAAGGCTTCAACCCGCGCAT 930  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase ACGAAATCGTCTCTACCTGCCGGAACAACCGCTGCTCATCAGCGCGGAG 509  
*P. stutzeri* CGGAAATGACCTTACGCTGCCGCGAGCTGAACGCCCTTGGCGCGCGGAG 903  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CGGAGATGCTCTACTACATCAAGGAGAAAGCCCTTAAAGCTGCAGAA 966

*Legionellafallonii* Alkyl CAGAAATGTTAATGTATTTCCCGCAATTCAAAGCATTATGTGCGCGGAA 918  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 A--ACGTG--GTCGGTACCCTGCACAACCTGTACACCTGCGCGCGCGG 943  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 A--ACGCGCGCGCGCG--ATGCACAACCTGCTACCCCGCGCGCGCGG 976  
*Pseudomonas* sp. alkylsulfatase GTGACCCAGGGCCCG-ACCCTGCCCAACGTCACACCTGCGCGCGCACCA 558

**Sekil 3.24. (Devam)**

*P. stutzeri* CT-ACTCT---CGCAAACCTGCACAACCTGTACACCCTACGCGGGCCCA 949  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA G--ACTCC--ACGCATACGCTGCACAATACCTACTCGCTTCGTGGCGCCA 1012  
*Legionellafallonii*Alkyl G--ATGCA--ACGCATACCTTACATAATCTTTATACTTTGCGCGGTGCC 964  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 AGGTACGTGATGCGCTGGGCTGGAGCAAGTACATCAAC-CAGGCGTGCA 992  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 AAGTGCAGCGACCCAGGCTGGGCGGGCTACATCGACGCCAGC-CTGGA 1025  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase AGTCCGCGACCCGGTGGTGTGGGTGGCGAGCCTGGAC--AAGC--TGCC 604  
*P. stutzeri* AGGTACGCGATGCCTTGCAGTGGGCCAATACATCGACGCCAGC--CGCG 997  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AGATCCGTGACCCACTCGCTTGGTCGAAGTACCTCAACG-AAGCACTGAA 1061  
*Legionellafallonii*Alkyl AAGTAAGGATGCTGCTTCTTGG-TGGAAAACGTTAAATGAAACCATAGA 1013  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 TCGTTTCGGCAGCGAGGCCAGGTGATGTTTCGCGGTGCACAACCTGGCCG 1042  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 AAAATACGGCGACCCGACCGAGCTGTGATCCAGCAGCACAACCTGGCCGG 1075  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GGCCTTC-----CAGGCCGACGTGATGGTGGCCGCTGCACGGCCAGCCGG 648  
*P. stutzeri* CGCAAGCCGCTGGC--GCCGAGGTGCTGTCAACCAGCACCACCTGGCCAG 1045  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ACTCTGGGGTGTAGACGTTCAAGTGTATGATGCCATGCACCACCTGGCCGG 1111  
*Legionellafallonii*Alkyl ATTATTTGGTGATAAGACCGAGGTTGATTTGCGCAACATCATGGCCCA 1063  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GCTG-GGGCAACGCGGAGAT-CGTCGAGGTGC-TGG-AGAAGCAGCGCGA 1088  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TCTG-GGGCGGGCACAAGGTGCGT--ACCTACCTCG-CCGACCAGCGCGA 1121  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase TGAGCGGGCGG-GAGAAGGT-GGAGGAGGTGCTGCGCATGACC--CGCGA 694  
*P. stutzeri* TGTGGGGGCG-GACAACATCCA--GACCTTCTCTCA-CCACCAGCGTGA 1091  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA TGTG-GGGCAACAAGAAGTGCAGCGAGCAGTTATCG-CTA--CAACGCGA 1157  
*Legionellafallonii*Alkyl TGTG-GGATAACAAGCGCT-TGTGGAGTTTC-TCG-AGAGTCAGCGTGA 1109  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CCTGTACGGCTACCTGCACGACAGACCCTGCACCTGGCCAACCGAGGGG 1138  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 CATGTACGCCTTCTCAACAACCGCGCGCTGAACCTGATGAACAAGGGCC 1171  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CGCCATCGCCTACATCCACGACAGACCCGTCGCGTGGATGAACAAGGGCC 744  
*P. stutzeri* TGCCATCCGCTACCTGCACGATCAAACCTGTTCCGCTGATGAATGCCGGCC 1141  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CATGTACCGCTACATCAATGATGAAACCCTTCGCTAGCGAACAAGGGTT 1207  
*Legionellafallonii*Alkyl TTTATATAAGTTTATCCATGATCAAGCATTACGTATGCTCAACCAAGG 1159  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 TGACCATCGGCCAGGTGCACAACCGCC-TGCGCCTGCCGCCAGC---CT 1184  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 TGACCCTCCACGAGAT-CGCGCGAGAAGTGAGCAAGCTGCCTGGCGAGCT 1220  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase TGACCCCGACGAGCT---GGTGGAGAAGTCAAGCTGCC-GCCACG 789  
*P. stutzeri* TCACCCGCGCGGAGAT-CGCGGAGCAACTGCACCTGCCGCCAGC---CT 1187  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ACACCATGACCGAAAT---CGCGGAGCAGGTGAAACTGCCAAGAAAAT 1253  
*Legionellafallonii*Alkyl TTGTGATGACTGAGAT---TGGCAACATGATGCAATTACCACCGGAGCT 1205  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 CGACCAG----GAATGGTACGACCGCGGCTACCACGGCTCG--GTCAGCC 1228  
*Pseudomonas* sp. DSM 6611 GGACCCG----AAGTGGTACCTGCGCAGCTACTACGGCGCGCTGTCGACC 1266  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase TGCGCCGGCTACACGCCCTACCTGCGCGAGTACTACGGCACC--GTGAAGC 837  
*P. stutzeri* CGACCCG----ATCTGAACGTGCACGACTACTACGGAAACCC--TCAAGC 1231  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA TG-CTACA---AAATTCTCAACCGCGGTTACTACGGCTCAC--TGAATC 1297  
*Legionellafallonii*Alkyl TG-CCAAT---AAGTGGTATAACCGTGATTATTATGGTTCC--GTAAGCC 1249  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 A--TAACGC--ACGG--GCCGTGCTGAACCGCTACCTGGGCTACTACGAC 1272  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 AACTTGCGC--GCGG--TC--TACC--AGCGCTACCTGGGCTTCTACGAC 1308  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase A--CAGCGT--GCGGCAGATCTACC--AGGGCTACCTGGGCTGGTTCAG 881  
*P. stutzeri* A--CAACGT--GCGCGGCATCTATC--AGTTCTACCTAGGCTGGTTCAGC 1275  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA A--CAACGTCAAAGCCACTTATGTT---CTGTATCTTGGCTGGTTCATT 1341  
*Legionellafallonii*Alkyl A--TGATGCTAAGGC--GGTGTATC--AACGTTATTTGGGTTGGTATGAT 1293  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GGCAACCCGGCGACCTCGACCCGCTCAGCCCGGAGGAC-TCGGCGGGCC 1321  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GGCAATCCGGGCAACCTCGACCCGTTCCCGCGGTCGAGGGCCGGCAAGC- 1357  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GGCGACCCGGTGGACCTCGACCCCATCCCGCGGGCGGAGAAGGCCAGGC- 930  
*P. stutzeri* GGCAACCCGGGCAACCTCGACCCACTGCGCGCGGTGGCCGCCGCC-GCCA 1324  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA GGCAACCCCGCCACATTTGGGAGCTGCCACCTGCAGACAAGGCTAAGC- 1390  
*Legionellafallonii*Alkyl TCTAACCCAGCGCATCTTGACCCGATTATGCCCGTAGAATCGAGCAAAA- 1342  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GCTACGTGGAATACATGGGCGGCGCCGAGCGCC-TGTTGG-AGCAAGCGC 1369  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GCTACGTGAGGCCATGGGCGGCGCGA-CGCCGTGCTCA-AGCAGATGC 1405  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GCCTGATCGCCCTCATGGGCGGTCGCGA-CAAGGTGCTGATGGCGGCCG- 978  
*P. stutzeri* AGTACGTGGCCCTGGCGGCGGCGGTGAGCCGC-TGCTGGCAGCCGCCGA 1373  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA GTTACGTTGAAATGATGGGTGGTGTGTA-CGCTGTGCTGAAAAAGCCAA 1439  
*Legionellafallonii*Alkyl AATATGTTGAGTACATGGGGGAGCTGA-TGCAGTACTGAAAAAGCCAC 1391  
\* \* \* \* \*

*P. aeruginosa* PAO1 GGGC-GTCGTACCCAGGGCGAATACCGTTGGTGGTGGAGGTGGTCAA 1418  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GCGCCGCCAT-CGACAAGGGCGACTACCGCTGGGCGGTGCAACTGGGCAA 1454  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GCGATGCC-TACCTGAAGGGCGACTGGCAATGGGCGGCCGAACTGTCCGG 1027  
*P. stutzeri* GCAA-GCC-TATGCCAGGGCGATTACCGCTGGGCGCGGAGCTGGGCAA 1421

**Şekil 3.24. (Devam)**

*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA  
*Legionellafallonii*Alkyl GGA--GTATTACGACAAAGGTGATTCCGCTGGGTAGCCGAGGTAGTCAA 1487  
AGAA-GCA-TACAACAAAGGGGAGTATCGGTGGTTGCTGAGGTGATGAA 1439  
\* \* \*\* \* \* \*\*\*\* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 CAGGCTGGTCTTCGCCGAGCCGGATAATCGGGCCGCGCGAGCTGCAGG 1468  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 CCACCTGGTCTTCGCCGACCCGGCAACAAGGACGCCCGCCCTGCAGG 1504  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CTACGCCATCCGCGTCGACCACGACGACAAACTCGCCCGCATCAAGG 1077  
*P.stutzeri* ACATCTGCTCTATGCCGATCCGGACAACCAGGGCCCGCGCATCTGCAGG 1471  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CCATGTGGTCTTTGCTGAACCGAACAATCAAGCGGCAAAAAATATGCAAG 1537  
*Legionellafallonii*Alkyl TCATGTGGTATTCCGCCGATCCTAATAAATAAAAAAGCACCGATTTGGAGG 1489  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 CCGACGCCCTGGGCAACTCGGCTAC--CAGGCGGAG--AACGCCGGCTG 1514  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 CCGACGCCATGGAACAGCTCGGTTAC--CAGACCGAG--AACGCCCTCTG 1550  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CCCGACGCTTCGCCGCTGGGCTACGCCAG--CATG--AACATCAACTG 1123  
*P.stutzeri* CACGACGCTTCGACCACTGGGCTAT--CAGGCGGAGTCGGGGCC--CTG 1517  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA CCGACGCCGCTGGAACAGCTGGGTTAT--CAAGCTGAG--AGCGGGTATG 1583  
*Legionellafallonii*Alkyl CTGATGCTTTTGAGCAGTTAGGTTAT--CAAAGTAA--AATCCAACATG 1535  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 GCGCAACAGCTACCTCAGCGCCGCTACGAACTGCGCCACGGGCTAC--C 1562  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GCGCAACATGTACATGACCGGGGCAATGGAAGTGCAGCCAGGTGTGC--C 1598  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GCGCAACTGGTACCTGATGAGTGCCATGGAGCTGG--AAGCAAGC--T 1168  
*P.stutzeri* GCGCAACTTCTACCTGAGTGGCACCTATGAGCTGCGCCACGGCTGC--C 1565  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA GCGCAACTTCTACCTCAGGTCGCGAGGAACTTCGCAATGGCGTGCAC 1633  
*Legionellafallonii*Alkyl GCGTAATGAATATTTAATGGGGGCAATTTGAATTGAGAAATGGGGTGC-- 1582  
\*\*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 G---CGCGACCAGCCGACGATG-AAGGCGGCGAGCCCGATGCC--TGGC 1607  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GACATATGACT--CCCGCGGC--AAGTCCGA-----GATGGGC-CGC- 1635  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase GGAGGGGACGTTGGCGCTGGAA-ATGTCCCGC---CGGGTGCAGCCGGC 1213  
*P.stutzeri* GGAAGAGGTTTCTACTCCGGTA-ATGATGCTC-----GATATGCTCAA 1608  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AACTTCCGACAC-CCGATACCGCAAGTCTT-----GACACCGTCAA- 1673  
*Legionellafallonii* Alkyl ---CTAAGATTCTCAGTTCATTTAGTTCCTTCTTCGATACTATTTCG- 1628  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 GCGGATGGACACCGGCTGCTGTTTCGACTATCTCGCGC---TGCGCTG 1653  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 -CGCGTACTCCGATATGTTCTTCGACC-TGCTGGCGA---TCCGCTG 1680  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CTCTCTCTCCCGGACATGCTGAAGAACC-TGCCGCGCGCATCTCTCTG 1262  
*P.stutzeri* CACACCGTCCCGAGCGC-TTCTTGAGC-TGATGGCCA---CCAAGCTC 1653  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA GCGGATGGACTTGGATTGTTCTTCGACT-TCCTGGCCA---TGCGTTTG 1719  
*Legionellafallonii*Alkyl CGCTATGCCATGGAATGTATCTCGATTATTTAGGAA----TGCGTTTG 1674  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 GA-CGCC--GGCGCTGCG-GAGGGCAAGGCGCTGAGCATCAACCTGCGCC 1699  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 GA-CACC--GATAAGGCC-GTCGGCCACGACATGACCCTCAAC-TGGGTG 1725  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CA-GAACTGGGTGACGCGCATCGACCCGGAGAAGAGCGGCGACGTCGAAC 1311  
*P.stutzeri* AA-TGGCACGGCG--GCA-GCCGACAGCGCGCTGCGTATCAACCTCAACT 1699  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA AAAGGCGCTGATGTTGC----CGACAAGCAGCATCACTCTCAACCTTGACT 1765  
*Legionellafallonii*Alkyl GA-TGGCCAAAAGCGCA---AGGTAAGAAAATGAGTATCAATTTAAGCC 1720  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 TGCCG-GACATCGGTGAGAACTACCTGCTG-GAACTGAAGAA--CTCGCA 1745  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 TTGGAAGACCTCAAGCAGGACATCGCCCTG-ACCTGCGCAA--CG-GCG 1771  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase T-----GGCCCTGGGCTTCGCCTTCC-CCG-ACATCGACGAAAGCCTGGAC 1354  
*P.stutzeri* T-CACCGACAGCGGCGCGCTATCACTTGTGGATCGAGAACCGCGTG-- 1746  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA T-TACCGATCTCAACAGAAAGTACACGCTCGAGATGGTAAACGGTGTG-- 1812  
*Legionellafallonii*Alkyl T-CACGATAAAAAATCAACAATACGCGATT-AAATGCAAAA--TTCAGT 1766  
\* \* \* \* \*

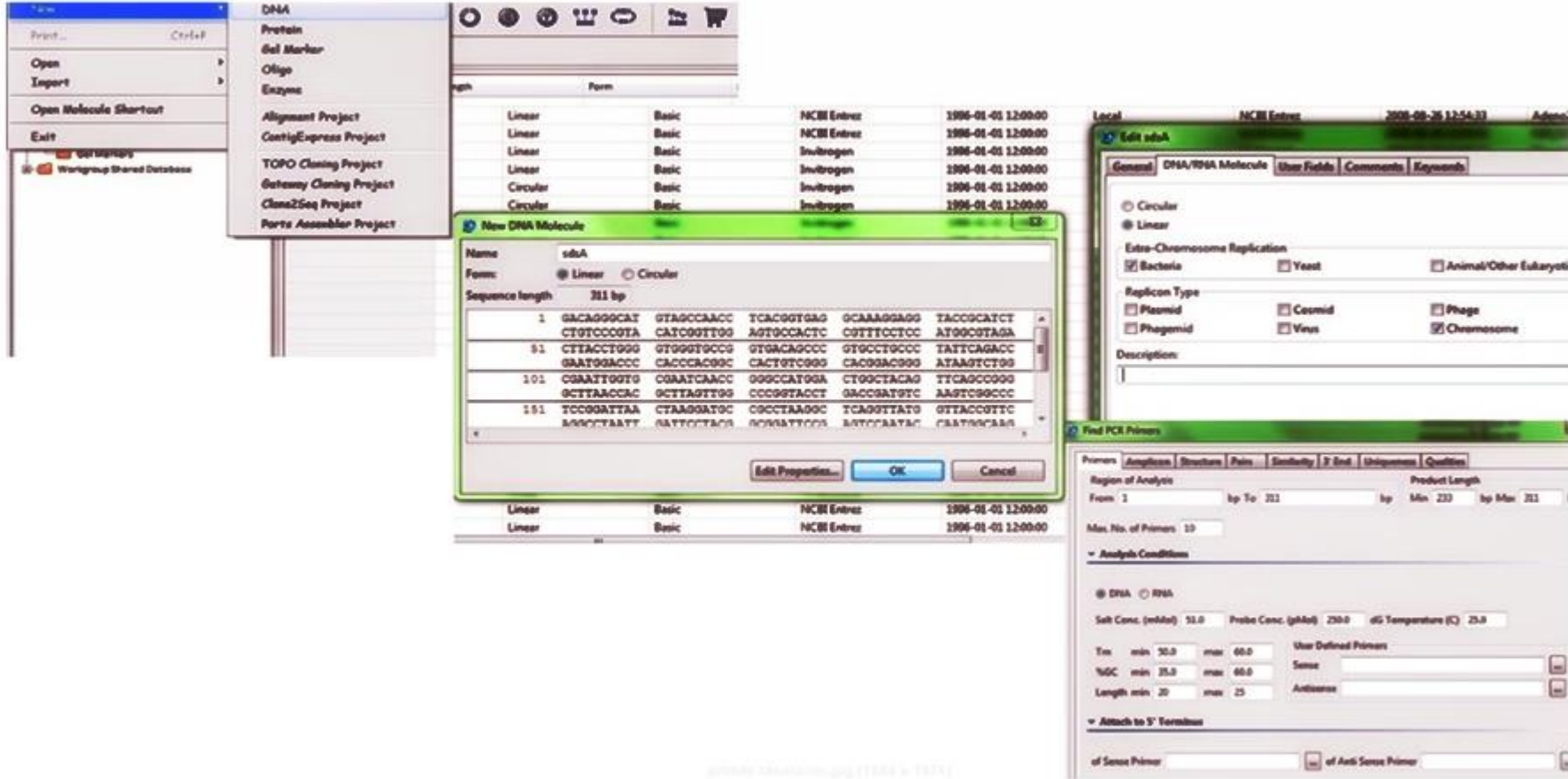
*P.aeruginosa* PAO1 CCTGAACAACCTGCGC-GGCGTG---CAG---AGCGAGGACGCCGGCA 1787  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 TGCTGAC--CCAGCGC-GTCG-G---CAGCCTCAACCCGAAGGCCGACGT 1814  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CCTGGAGGTGCGCCGC-GGCGTGGCCAGCTCAAGTCCGG-CATTGACCC 1402  
*P.stutzeri* -CTGCAT--CACC GC-CGTATG---AATGAAGGCGAAGTCGCGGAGGC 1787  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA -CTCAAC-CACACCGAAGGCATG---CAA---GCTAAGACGCGGACGC 1853  
*Legionellafallonii*Alkyl ACTG-ATTTATACCGGAATAAAA---AAATTGGAT---AATGCGGATGT 1808  
\* \*\* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 GACCGTGAGCATCGACCGGCC-GATC-TCAACCGCT---GCTGCTCAA 1832  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 CACCGTGAA-GCTGACCAAGCC-CACCCTCGACCAGATC--GCCGCGCGC 1860  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase CGCCGTG-----CCCTGCGCTGACCTCGACAAGC---GCTACTCTG 1443  
*P.stutzeri* CGACG-----CCA-GCCTCAACCTGAGTAAGGACT-TCTTCTTGC 1825  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA GACCGTCAC--CTTAACGCGTGAAACCCTTAATAACGT---GATGCTAAA 1898  
*Legionellafallonii*Alkyl TAGTGTTC--TTTACCGGAAATGTATTAGATGCCATTAATCTGCGTGA 1856  
\* \* \* \* \*

*P.aeruginosa* PAO1 AGAGG-----TATCG-GCG-GTA-----CGCC-TGGTCTTCGAGGGCA- 1867  
*Pseudomonas* sp. DSM 66114 AAGC-----TCG-ACCTGCC-----CACCGCATCAAGCAGGGCAC 1895  
*Pseudomonassp.*alkylsulfatase ACACCGTCATCAGCG-GCGAGAA-----CAGCCTGCTCAA-GGGAGCC 1485  
*P.stutzeri* AGATA-----ATCA-GTGGCAAGCCGCGCCCGCAGCCCTGCTCAGTCT 1868  
*Pseudomonas* sp. S9 PSdsA ACAG-----ACCACGCTAAAA-----GATGCGGAAAGCTCAGGCGA 1934  
*Legionellafallonii*Alkyl G-----ACTACTCTGGAT-----GATGAGTTAAAGAAAGGTAC 1889  
\*

**Sekil 3.24. (Devam)**





Şekil 3.25. Primer tasarımı için kullanılan aşamaların ekran görüntüsü

Programın araçlar çubuğundan DNA seçeneği seçilmiştir (a). Tasarlanacak genin ismi ve 311 bp uzunluğundaki ortak alkil sülfataz gen bölgesi yazılmıştır. Canlı türüne göre DNA'nın halkasal ya da doğrusal formuna dikkat ederek seçim yapılmıştır (Şekil 3.25).

'Primer design/Find/PCR primers Inside Selection' seçeneği seçilerek PZR ürünü uzunluğunun 233-311 bp arasında, GC oranının % 35-60 arasında, forward ve reverse uzunluğunun ise 20-25 baz dizisi uzunluğu arasında olması istenmiştir. Eğer tasarlanacak primer oldukça spesifik bir gen ise yapılması muhtemel bütün hassas ayarlar bu basamakta gerçekleşmiştir (Şekil 3.25).

Ortak alkil sülfataz gen bölgesinden, istenilen PZR ürünü doğrultusunda forward ve reverse'lerin lokalizasyonları belirlenerek 10 tane primer tasarlanmıştır (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** Kullanılan primerler ve özellikleri

	<b>Primer (5'-3')</b>	<b>Ürün uzunluğu (bp)</b>	<b>Uzunluk (bp)</b>	<b>Tm (°C)</b>
1.	F AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R CCAATGCGCGTACCATCTCG	284	24 20	63.6 58.7
2.	F AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R TCGTTCCAATGCGCGTACCA	289	24 20	63.6 59.6
3.	F AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R CCCTCGTTCCAATGCGCGTA	292	24 20	63.6 60.5
4.	F AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R ACCCTCGTTCCAATGCGCGT	293	24 20	63.6 61.2
5.	F AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT R TCCCGACCCTCGTTCCAATG	298	24 20	63.6 59.3
6.	F GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R CCAATGCGCGTACCATCTCG	282	22 20	59.8 58.7
7.	F GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R TCCAATGCGCGTACCATCTC	283	22 20	59.8 55.9
8.	F GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R TTCCAATGCGCGTACCATCT	284	22 20	59.8 55.9
9.	F GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R GTTCCAATGCGCGTACCATC	285	22 20	59.8 55.5
10.	F GGCATGTAGCCAACCTCACGGT R CGTTCCAATGCGCGTACCAT	286	22 20	59.8 58.2

F, forward; R, reverse

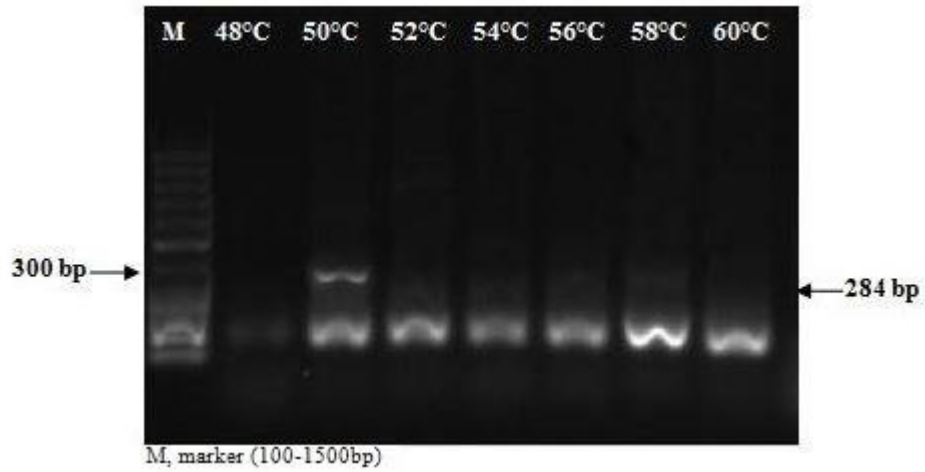
Belirlenen primerler arasından primer tasarım kriterleri dikkate alınarak en uygun olan Forward primer 5'-AGGGCATGTAGCCAACCTCACGGT-3' Reverse primer 5'-CCAATGCGCGTACCATCTCG-3' 284 bp uzunluğundaki primer çifti seçilerek *sdsA* gen analizi için kullanılmıştır.



### 3.8.2. Tasarlanan Primer ile *sdsA* Geni Analizi

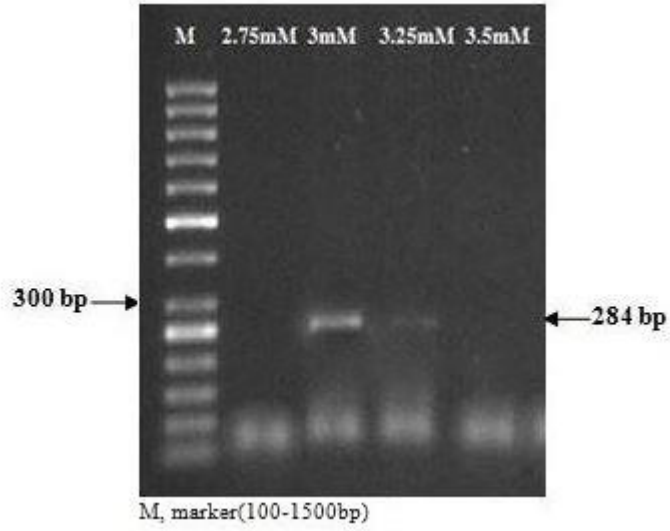
#### 3.8.2.1. *P. fluorescens* SDS3 Suşu *sdsA* Geni Analizi

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR' de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.26'da *P. fluorescens* SDS3 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.26.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. fluorescens* SDS3 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

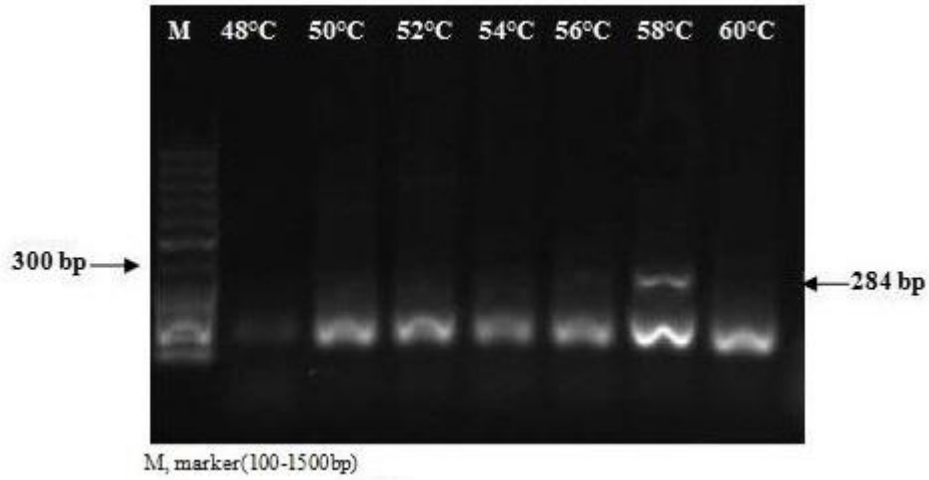
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.27'de *P. fluorescens* SDS3 suşuna ait farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 3 mM olarak belirtilmiştir.



**Şekil 3.27.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında *P. fluorescens* SDS3 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

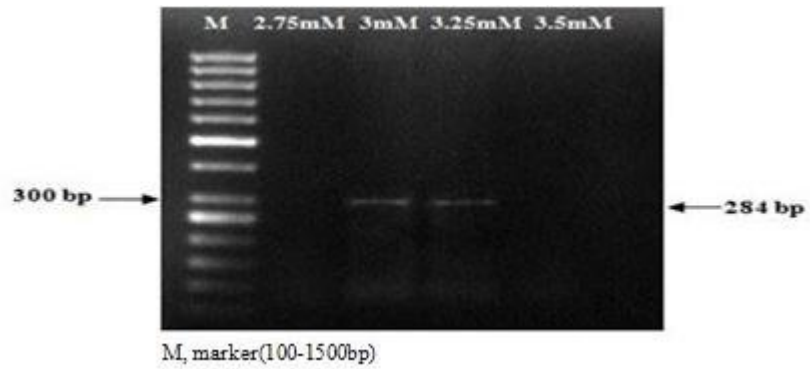
### **3.8.2.2.P. fluorescens SDS6 Suşu *sdsA* Geni PZR Optimizasyonu**

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.28'de *P. fluorescens* SDS6 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın  $58^{\circ}C$  olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.28.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. fluorescens* SDS6 kodlu suşu ait *sdsA* PZR ürünleri

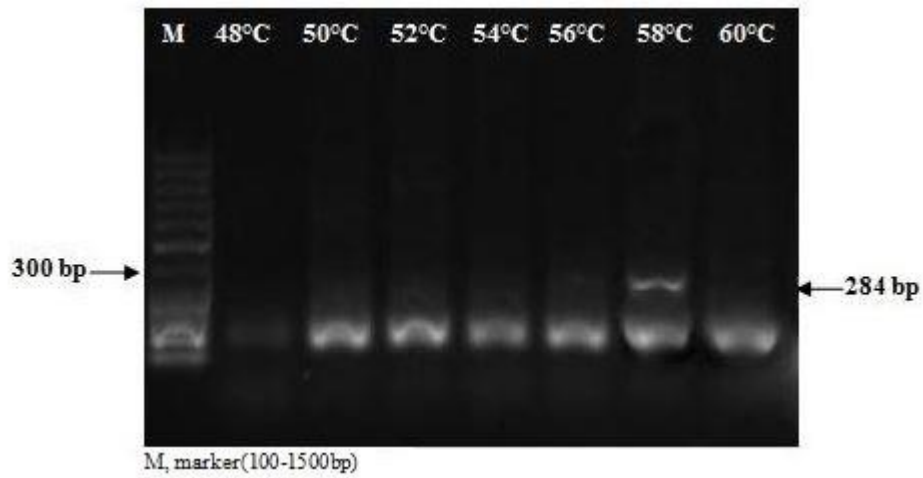
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.29'da *P. fluorescens* SDS6 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.



**Şekil 3.29.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında *P. fluorescens* SDS6 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

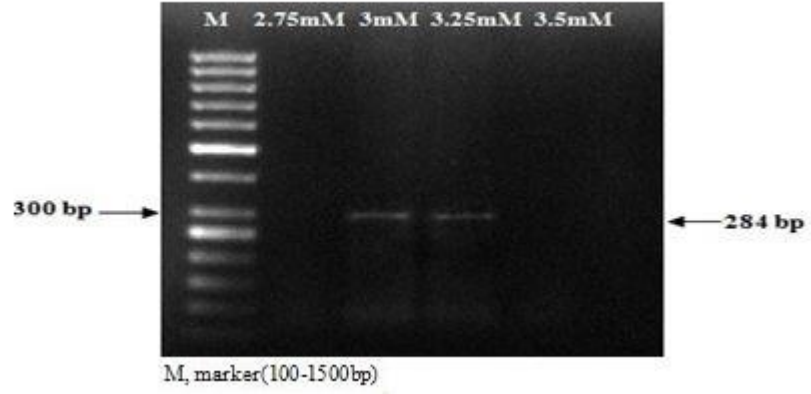
### 3.8.2.3. *P. baetica* SDS8 Suşu *sdsA* Geni PZR Optimizasyonu

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.30'da *P. baetica* SDS12-1 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.30.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. baetica* SDS8 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

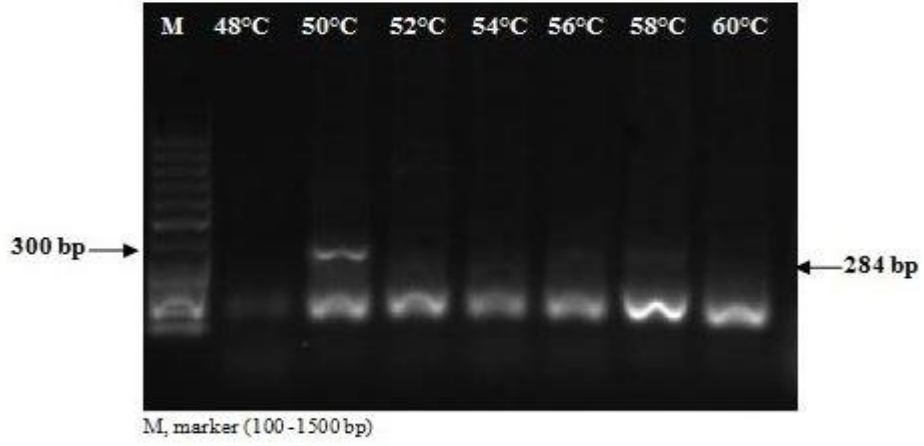
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.31'de *P. baetica* SDS8 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.



**Şekil 3.31.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında *P. baetica* SDS8 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

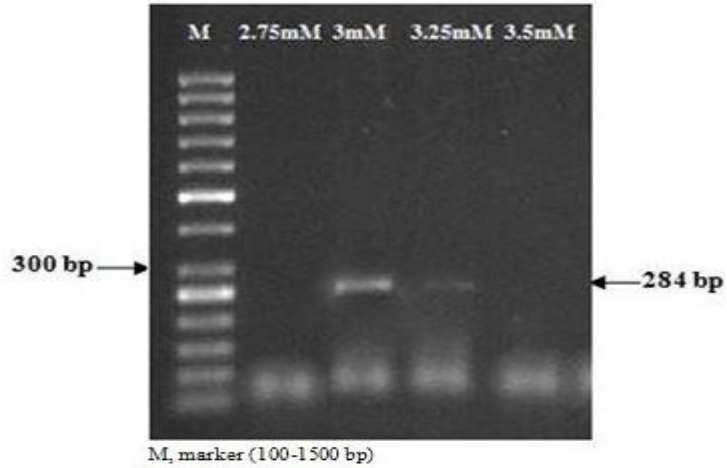
#### **3.8.2.4. *P. fluorescens* SDS12-1 Suşu *sdsA* Geni PZR Optimizasyonu**

Ortak alkil sülfataz bölgesinden tasarlanan *sdsA* gen bölgeleri PZR' da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 284 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.32.'de *P. fluorescens* SDS12-1 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın  $50^{\circ}C$  olduğu belirtilmiştir.



**Şekil 3.32.** Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında *P. fluorescens* SDS12-1 kodlu suşa ait *sdsA* PZR ürünleri

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmanın giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.33'te *P. fluorescens* SDS12-1 suşuna ait farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri gösterilmiştir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu  $MgCl_2$  konsantrasyonu olan 3 mM belirtilmiştir.

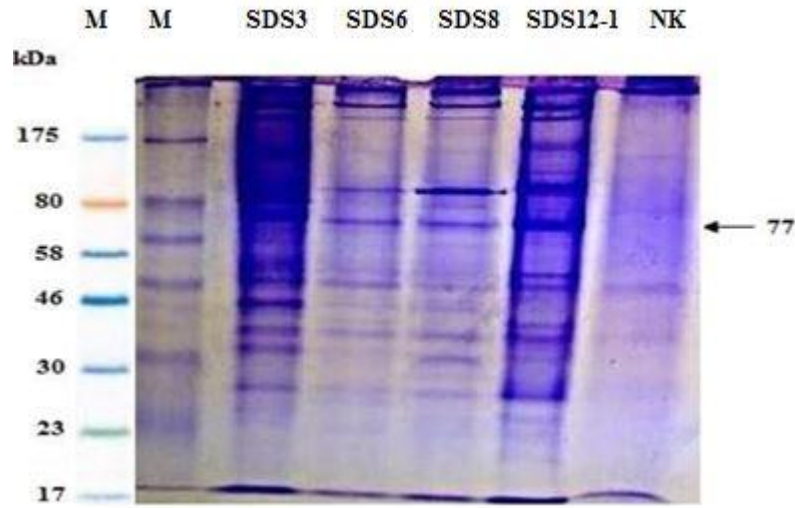


**Şekil 3.33.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında *P. fluorescens* SDS12-1 suşuna ait *sdsA* PZR ürünleri

### 3.9. SDS Degrade Suşların Alkil Sülfataz Enzimi Protein Profillerinin Belirlenmesi ve Zimografi Analizleri

#### 3.9.1. Alkil Sülfataz Protein Profillerinin Belirlenmesi

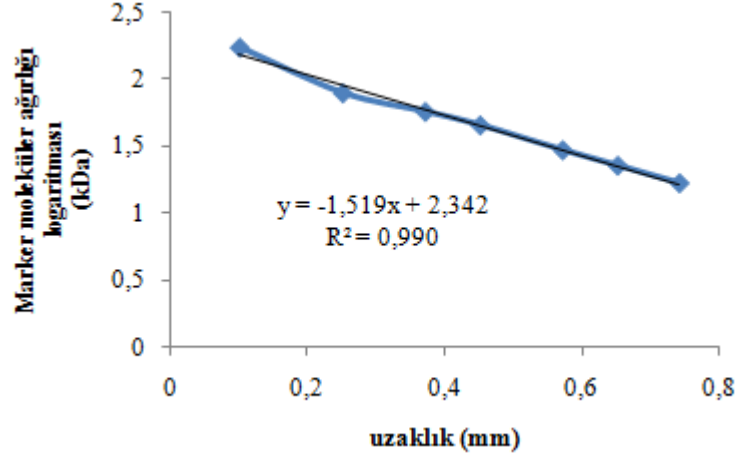
*P. fluorescens* SDS3, *P. Fluorescens* SDS6, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 suşlarının SDS içeren ortamda alkil sülfataz enzimi protein profilleri incelenmiştir (Şekil 3.34). 77 kDa ağırlığında olan alkil sülfataz proteininin lokasyonunu belirlemek için jelin protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisine göre çizilmiştir.



NK, negatif kontrol (*S. aureus*);

M, ColorPlus Prestained Protein Marker

**Şekil 3.34.** SDS degrade eden bakterilerin alkil sülfataz proteini lokasyonunun belirlenmesi

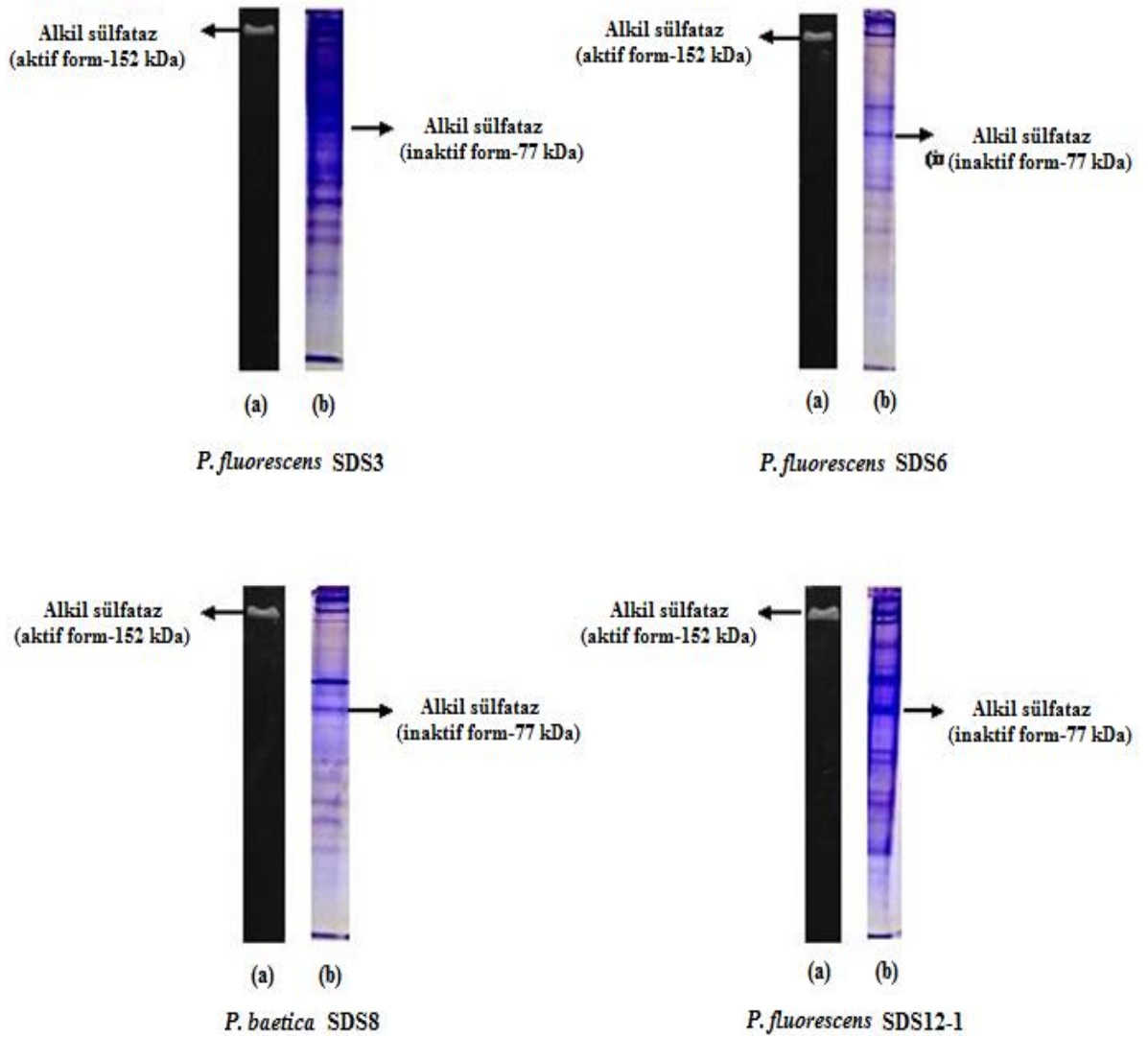


**Şekil 3.35.** Alkil sülfataz proteini moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### 3.9.2. Alkil Sülfataz Enzimi Zimografi Analizlerinin Yapılması

SDS degrade eden suşların, molekül ağırlığı bilinmeyen zimografik protein bantlarının molekül ağırlıkları alkil sülfataz enzimi protein profilinde çizilen standart eğri ile belirlenmiş 152 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Bu durum 152 kDa'ki protein bantlarının aktif formda, 77 kDa ağırlığındaki protein bantlarının ise inaktif formda olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.36).



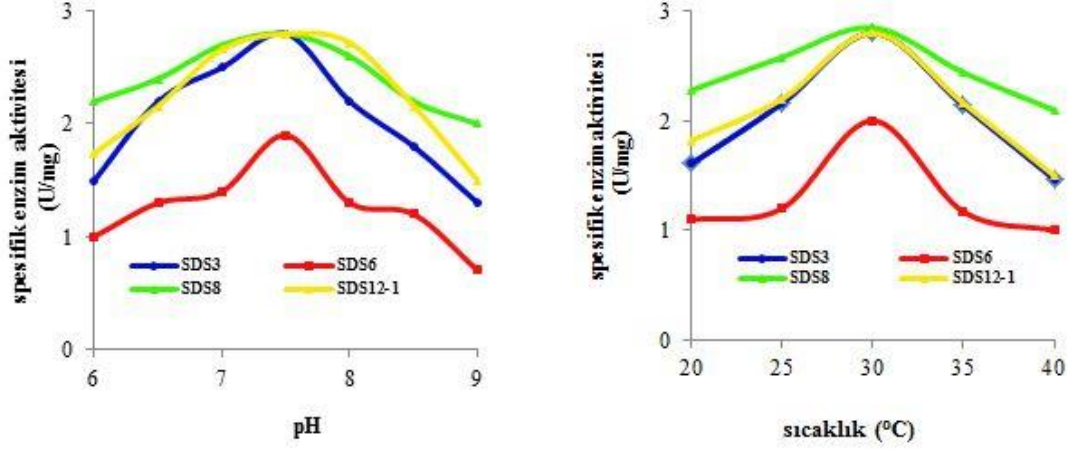


**Şekil 3.36.** SDS degrade eden suşların alkil sülfataz enzimlerinin aktif (a) ve inaktif formları (b)

### 3.10. Alkil Sülfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SDS degrade eden suşlarının alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ilk olarak farklı pH ve sıcaklık aralıklarına ve spesifik enzim aktivitelere (U/mg) bakılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda suşların optimum pH 7.5 ve optimum sıcaklık 30°C sıcaklığında ve spesifik enzim aktivitelere ise SDS3 kodlu suş olan *P. fluorescens* 2.80 U/mg, SDS6 kodlu suş olan *P. fluorescens* 1.90 U/mg, SDS8

kodlu olan suş *P. baetica* 2.80 U/mg ve SDS12-1 kodlu olan suş *P. fluorescens* 2.80 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. SDS degrade eden suşların değişen pH ve sıcaklıklardaki enzim aktivitesi

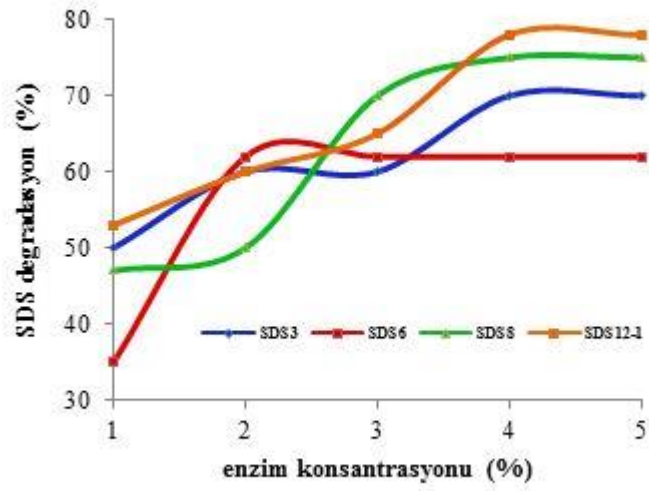
Alkil sülfataz enzim aktivitesi için belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşullarında, ekstrakt haldeki alkil sülfataz enziminin % SDS degradasyon oranı belirlenmiştir. Buna göre % 1 (0.36 mg/mL), 2, 3, 4 ve 5 enzim konsantrasyonları kullanılmıştır (Şekil 3.35).

*P. fluorescens* SDS3 kodlu suşun 1.44 mg/mL (% 4) alkil sülfataz enzimmiktarında 20 mg/mL SDS'i 4.9 mg/mL'ye düşürerek % 75 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

*P. fluorescens* SDS6 kodlu suşun 1.1 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzimmiktarında 20 mg/mL SDS'i 7.5 mg/mL'ye düşürerek % 62 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

*P. baetica* SDS8 kodlu suşun 1.44 mg/mL (% 4) alkil sülfataz enzimmiktarında 20 mg/mL SDS'i 5.1 mg/mL'ye düşürerek % 75 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).

*P.fluorescens* SDS12-1 kodlu suşun 1.1 mg/mL (% 3) alkil sülfataz enzim miktarında 20 mg/mL SDS'i 5.1 mg/mL'ye düşürerek % 75 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.38).



**Şekil 3.38.** Ekstrakt haldeki alkil sülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi

**Çizelge 3.7.** Çalışmada elde edilen SDS degrade eden bakteriler ve özellikleri

Suş kodu	İzole edilen bölge koordinatı	16S rRNA sekansı (% Homoloji)	EMBL Giriş Numarası	Maksimum SDS tolarasyonu (g/L)	SDS degradasyonu			sdsA geni analizi	Alkil sülfataz Native-PAGE analizi	Alkil sülfataz enzim aktivitesi (U/mg)
					Deterjan sanayi atık suyundaki					
					Saf kültür ortamında (%/saat)	Steril olmayan (%/saat)	Steril olan (%/saat)			
<b>SDS3</b>	39°26'03.30''K, 33°24'08.43''D, 781 m	<i>Pseudomonas fluores</i> % 99	KJ937668	60	88 / 48	84 / 60	70 / 90	+	+	2.80
<b>SDS6</b>	39°34'34.39''K, 33°26'11.61''D, 763 m	<i>Pseudomonas fluores</i> % 99	KJ937670	65	46 / 48	84 / 54	63 / 102	+	+	1.90
<b>SDS8</b>	39°48'53.04''K, 33°28'55.46''D, 852 m	<i>Pseudomonas baetica</i> %99	KJ937672	65	88 / 48	88 / 66	80 / 96	+	+	2.80
<b>SDS12-1</b>	39°57'22.99''K, 33°25'04.35''D, 679 m	<i>Pseudomonas fluores</i> % 95	KJ937679	15	88 / 42	86 / 77	80 / 90	+	+	2.80

EMBL, European Molecular Biology Laboratory; +, var; -, yok

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan araştırmalar sonucunda akarsu ve yüzey sularındaki deterjan kirliliğinin son yıllarda arttığı görülmüştür. Su kaynaklarının sınırlı olduğu günümüzde, su kirliliğinin kontrol edilmesi ve önlenmesi son derece önem kazanmıştır. Bu sebeple evsel ve sanayi kaynaklı atık deterjanların biyolojik olarak parçalanmasına yönelik çalışmalar özellikle gelişmiş ülkelerin daha fazla önemseydiği bir konudur. Bu çalışmanın hedefinde anyonik deterjanla kirlenmiş yüzey sularda bulunan yüksek degradasyon yeteneği gösteren izolatların araştırılması, tanımlanması, anyonik deterjan degradasyonu çalışmalarında kullanılabilme potansiyellerinin öbelirlenmesidir. Bu anlamda nedenle de benzer konulardaki çalışmalara ve literatüre özgün katkıda bulunacağı düşünölmektedir.

Kırıkkale-Kızılırmak'ta 2013-2014 yılları arasında mevsimsel periyotlarla alınan su örneklerinin MBAS yöntemi ile yapılan deterjan analiz sonuçlarına göre en yüksek değerler yaz ayında Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii ve Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkiibölgelerinde 12.7 ve 10.4 mg/L olarak ölçölmüştür. En düşük değerler ise ilkbahar ayında Akkoşan Merkez Mevkii, Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi bölgelerinde 1.77 ve 1.78 mg/mL olarak ölçölmüştür. Deterjanlar konusunda Dünya Sağlık Teskilatı'nın (WHO) önerdiği limitlere göre içme suyunda bulunabilecek anyonik deterjanlar 0.2 mg/L'yi geçmemelidir. Avrupa Birliğinde uygulanan su kalitesi kriterlerinde, metilen mavisi aktif maddelerin tavsiye edilen değeri 0.3 mg/L olarak kabul edilmistir. 4 Eylül 1988 tarih ve 19919 sayılı Resmi Gazetede belirtilen yüzeysel sulardaki anyonik yüzey aktif madde konsantrasyonlarına göre 1. sınıf (yüksek kalite) 0.5 mg/L, 2. sınıf (az kirletilmiş) 1 mg/L, 3. sınıf (kirletilmiş) 1.5 mg/L ve 4. sınıf (çok kirletilmiş) > 1.5 mg/L olduğu belirlenmiştir [2]. Başaran (2004) yapmış olduğu tez çalışmasında Yuvarlak Çay'da deterjan konsantrasyonunu 0.12 mg/L, Küçük Menderes Nehri'nde 0-0.93 mg/L, Bakırçay'da 0.01-0.29 mg/L olarak belirlenmiştir [79]. Minareci ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada Gediz Nehir sisteminde anyonik yüzey aktif madde kirliliğinin incelendiği bir araştırmada, deterjan konsantrasyonlarının bazı istasyonlarda su kalite kriterlerinin üstünde

(0.023-4.48 mg/L) 4. dereceden yani çok kirlenmiş su sınıfında olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyonların su bitkileri ve balıklar için toksik etki sınırlarına ulaştığı belirtilmiştir [3].

Yapılan literatür çalışmalarında Kırıkkale-Kızılırmak'tan elde edilen sonuçlara göre ırmağın 4. Dereceden anyonik yüzey aktif maddelerle çok kirletilmiş yüzey suları olduğu tespit edilmiş olup Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Birliği su kalitesi kriterlerine göre standart değerlerin oldukça üzerinde olduğu dikkat çekmektedir.

Erdemli Mahallesi-Sarımsalı Mevkii, Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Barajı Girişi ve Kızılırmak Kırıkkale İl Çıkışı bölgelerinden SDS degrade eden 4 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlara sırasıyla SDS3, SDS6, SDS8 ve SDS12-1 olarak adlandırılmış, aralarında SDS degradasyon yeteneği en yüksek olan suş SDS3 ve MTK değeri 60 g/L olarak belirlenmiştir. İzole edilen diğer SDS degrade edensuşların MTK değerleri sırayla 70, 65 ve 15 g/L olarak belirlenmiştir.

M.Y. Shukor ve arkadaşları [42] otomobil yıkama atık suyundan izole ettikleri *Klebsiella oxytoca* suşu için 1-10 g/L arasında SDS konsantrasyonu denenmiş ve elde edilen MTK değeri 2 g/L olduğu gözlemlenmiştir. B. Jovicic ve arkadaşları [80] izole ettikleri *Pseudomonas* ATCC19151 suşun tek karbon katnağı olarak SDS'i kullanmasıyla ilgili yapılan çalışmada 1.5-3 g/L arasında SDS konsantrasyonu denenmiş ve MTK değerinin 1.5 g/L olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak yapılan deneysel çalışmaların sonucunda ırmaktan izole edilen SDS3, SDS6, SDS8 ve SDS12-1 suşlarının MTK değerleri kıyaslandığında anyonik deterjanın biyolojik giderimi çalışmalarında özgün suşlar olabilecekleri tespit edilmiştir.

Yapılan 16S rDNA sekans analizleri sonucu SDS3 kodlu suş %99 homoloji ile *Pseudomonas fluorescens*, SDS6 kodlu suş %99 homoloji ile *Pseudomonas fluorescens*, SDS8 kodlu suş %99 homoloji ile *Pseudomonas baetia*, SDS12-1 kodlu suş %95 homoloji ile *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır.

Mikroorganizmaların tanımlanmasında korunmuş ya da değişken olan bölgeler, PZR ile DNA amplifikasyonuna yönelik primer için hedef olarak kullanılabilir. SDS'i karbon kaynağı olarak kullanıp degrade eden *Pseudomonas*, *Acenitobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* ve *Bacillus* gibi birçok bakteri 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır [81]. Bazı mikroorganizmalar deterjan kirliliği olan sulara adapte olmuşlardır. Bu mikroorganizmaların deterjanları karbon ve kükürt kaynağı olarak kullandıkları bildirilmektedir [81, 82]. Deterjan ve şampuanların bulunduğu alıcı sulardaki örneklerinde doğal mikrobiyal komünitedeki hücre sayısındaki artışın, metabolik işlemlerin tek karbon ve enerji kaynağı olarak yüzey aktif maddelerin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir. [81, 82]. Buna göre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus majdoratus*, *Klebsiella liquefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus albus*, *Proteus* sp., *Klebsiella oxytoca* ve *Brevibacterium* gibi deterjan degrade edebilen bakteriler 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır.

Moleküler teknikler kullanarak tanımlanan bu suşların anyonikdeterjan üretimi yapan endüstri atığında ve laboratuvar koşullarında üreme eğrileri ve degradasyon oranlarını kıyaslayacak olursak izole edilen dört suş için;

1 g/L SDS içeren MSM ortamında degradasyon yeteneği en yüksek suş SDS'i 1 g/L'den 0.11 g/L'ye kadar düşürerek % 88.4 oranında degradasyon yapan *P.fluorescens* SDS12-1 olarak belirlenmiştir. 1 g/L SDS içeren MSM ortamında degradasyon yeteneği en düşük suş ise SDS'i 1 g/L'den 0,544 g/L'ye kadar düşürerek % 45.6 oranında degradasyon yapan *P.fluorescens* SDS6 olarak tespit edilmiştir.

Steril olmayan atık su ortamında degradasyon yeteneği en yüksek suş SDS'i 14.49 mg/L'den 1.8 mg/L'ye kadar düşürerek % 88 oranında degradasyon yapan *P. baetica* SDS8 olarak belirlenmiştir. Steril olmayan atık suda degradasyon yeteneği en düşük suş ise SDS'i 14.3 mg/L'den 2.3 mg/L'ye kadar düşürerek % 84 oranında degradasyon yapan *P.fluorescens* SDS3 olarak tespit edilmiştir.

Steril atık su ortamında degradasyon yeteneği en yüksek suş SDS' i 14.4 mg/L'den 2.8 mg/L'ye kadar düşürerek % 80 oranında degradasyon yapan *P. fluorescens* SDS12-1 olarak belirlenmiştir. Steril atık suda degradasyon yeteneği en düşük suş ise SDS'i 14.3 mg/L'den 5.2 mg/L'ye kadar düşürerek % 63 oranında degradasyon yapan *P. fluorescens* SDS6 olarak tespit edilmiştir.

Literatürde SDS degradasyonu ile yapılan çalışmalara bakıldığında Payne ve Faysal [42] SDS'in *Pseudomonas* ile biyodegradasyonu üzerine ilk detaylı çalışmayı yapmışlardır. Hosseini ve arkadaşları [83] aktif çamurdan iki bakteri izole edip, SDS'i karbon kaynağı olarak kullanabildiklerini belirlemişlerdir. Biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi sonucu *Acinetobacter johnsoni* ve *Pseudomonas beteli* olarak tanımlanan bu suşların on günlük süre sonunda sırasıyla % 96.4 ve % 97.2 oranında SDS'idegrade edebildikleri tespit edilmiştir. SDS'in moleküler yapısı, bir hidrokarbon zinciri (C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>), bu zincire bağlı bir benzen halkası ve bir sülfat grubundan oluşmaktadır [84]. Singh ve arkadaşları [85] gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus cereus* tarafından SDS'in karbon kaynağı olarak kullanıldığını ve diğer deterjanların da degradasyonunda bu bakterinin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Pantoea agglomerans*'ın da SDS'i degrade edebildikleri bildirilmiştir [85]. Chaturvedi ve Kumar [41] Hindistan'ın Veranasi şehrinde bulunan deterjan ile kontamine olmuş göletlerden SDS degrade eden *P. aeruginosa* SDS1 ve SDS3, *P. stutzeri* K2, *P. alcaligenes* JN2 ve *P. putida* SP3 suşlarını izole etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak sadece SDS içeren minimal ortamda zenginleştirme tekniği kullanarak seçilen bu izolatlardan sadece *P. alcaligenes* ve *P. mendocina* izolatlarının SDS'i verimli olarak degrade edebildikleri saptanmıştır. *Pseudomonas* ATCC19151 suşunun, tek karbon kaynağı olarak SDS'i kullanarak büyüme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. SDS'in biyodegradasyonu üzerine moleküler çalışmalar ilk kez Davison ve arkadaşları [86] tarafından yapılmıştır.

Çakır ve Kıvanç [35] yaptıkları bir çalışmada, SLES (Sodyum Lauril Eter Sülfat) ve NI (Nonyonik: Dehydol LS 7) yüzey aktif maddelerinin *P. putida* (NRRL-B 13) tarafından biyolojik parçalanmasını, 33 gün süreyle 28°C'de çalkalamalı ortamda



incelemiş ve SLES ve NI parçalanma oranlarını sırasıyla % 61 ve % 53; durgun ortamda ise % 51 ve % 44 olarak belirlemişlerdir. Shukor ve arkadaşları [42] Malezya'da SDS ile kontamine olmuş su örneklerinden *Klebsiella oxytoca* suşunu izole etmişlerdir. Bu izolatın 4 günlük inkübasyonundan sonra 2.0 g/L SDS'i yaklaşık olarak % 80 oranında, 10 günlük inkübasyonda ise % 100 oranında degrade edebildiği belirlenmiştir.

Anyonik deterjan endüstrisi atık suyu ve laboratuvar ortamlarında gerçekleşen biyolojik giderim çalışmalarına göre % 70 ile % 80 arasında SDS degradasyonu gösteren iki *Pseudomonas fluorescens* SDS3&SDS6 ile bir *Pseudomonas baetica* SDS8 izolatları elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar ile yüzey sularında bulunan deterjanların uzaklaştırma çalışmalarında kullanılmak için potansiyel oluşturdukları belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında SDS degrade eden *P. fluorescens* SDS3, *P. fluorescens* SDS6, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 bakterilerinin total protein profilleri incelenmiştir. Bu suşlar NATIVE PAGE jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, oluşan jel SDS içeren solüsyonda bekletilerek alkil sülfataz enziminin SDS'i substrat olarak kullanmasıyla oluşan beyaz bantlarından aktif formu 152 kDa ağırlığında, inaktif formda 77 kDa ağırlığındaki olduğu belirlenmiştir.

*P. fluorescens* SDS3, *P. fluorescens* SDS6, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 suşlarına, SDS'i degrade edebilme yeteneği veren alkil sülfataz proteininin enzim aktivitesi incelenmiştir. Bu suşlar için optimum pH ve sıcaklıkta spesifik enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu değerler belirlenmiştir. *P. fluorescens* SDS3, *P. fluorescens* SDS6, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 suşlarının uygun optimum koşulları pH 7.5 ve sıcaklık 30°C'de olarak tespit edilmiştir. Bu dört suş içerisinde spesifik enzim aktiviteleri *P. fluorescens* SDS3 2.80(U/mg), *P. baetica* SDS8 2.80 (U/mg), *P. fluorescens* SDS12-1 2.80 (U/mg), *P. fluorescens* SDS6 1.90 (U/mg) olarak belirlenmiştir.

Alkil sülfataz enziminin optimum pH ve sıcaklıkta, belirli enzim

konsantrasyonlarında reaksiyon hızı ve ekstrakt haldeki enzimin SDS degradasyonu incelenmiştir.

Yapılan enzim konsantrasyon çalışmasında *P. fluorescens* SDS3 suşunun % 4 enzim konsantrasyonunda ekstrakt haldeki enzimin en yüksek SDS degradasyonu oranı % 75 ve bu suşun MSM ortamındaki SDS degradasyonu % 88 olarak belirlenmiştir.

Ambily ve arkadaşları (2011) alkil sülfataz enzim aktivitesini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada izole ettikleri SDS direçli *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10311 suşunun optimum pH, sıcaklık aralığını belirleyerek bu koşullarda ekstrakt haldeki spesifik enzim konsantrasyonunu ve SDS degradasyonunu belirtmişlerdir. Belirlenen optimum pH 7.5 ve sıcaklık 30°C'de % 4 enzim konsantrasyonunda durağan faza geçmiştir ve spesifik enzim aktivitesi 3.04 U/mg olduğu tespit edilmiş olup, Ekstrakt haldeki enzimin SDS degradasyonu % 75 olduğu belirtilmiştir. Besi ortamında SDS degradasyonunun ise % 96 olduğu gözlenmiştir [88].

Shahbazi ve arkadaşlarının [73] araba yıkama atık suyundan izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa*'nın spesifik enzim aktivitesinin 24.3 U/mg olduğu belirlenmiş olup SDS degradasyonu için uygun bir izolat olduğu görüşüne varmışlardır.

Alkil sülfataz enzimleri, alkil sülfat esterlerin degradasyonunu başlatır ve ester bağının hidrolizini katalizleyip inorganik sülfatın serbest kalmasını sağlar. Endüstriyel bileşiklerin biyolojik olarak parçalanmasında *Pseudomonas* ailesine ait türler çok iyi olarak bilinmektedir. Ayrıca, bu izolatlar alkil sülfataz enzim aktivitesi ile SDS'i enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler [89].

Alkil sülfataz enzimi (*sdsA*) ve alkil sülfatazregülatör genleri kodlayan *LysR* ailesi (*sdsB*) bu suştan klonlanmış ve gen dizisi belirlenmiştir. *sdsA* gen homologları *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. putida* KT2440 suşlarında tespit edilmiştir. Ancak bu türlerde bu genin ekspresyonunun düzenlenmesi henüz bilinmemektedir [86]. SDS'in parçalanmasına bağlı olarak alkil sülfataz aktivitesi, *P. mendocina* PM2 suşunda

yüksek, *P. alcaligenes* JN2 suşunda düşük gözlenmiştir. Bu izolatlarda bulunan alkil sülfataz enzimi ilk kez tespit edilmiştir. Alkil sülfat ester metabolizmasına sahip bakteriler genellikle alkil sülfatazları çoklu üretme yeteneğine sahiptir. *Pseudomonas* C12B suşunun beş, *Pseudomonas putida* FLA suşunun altı ve *Pseudomonas* DESI suşunun ise dört enzim üretebildiği belirtilmiştir [88-90].

SDS biyodegradasyonundan sorumlu olan gen alkil sülfataz enzimini kodlayan *sdsA*'dır. Literatürde Chaturvedi ve Kumar [63], Shahbazi ve arkadaşlarının [62] yapmış oldukları çalışmalarda deterjan degrade eden bakteriler için bulunan primerler, bu çalışmada izole edilen *P. fluorescens* SDS3, *P. fluorescens* SDS8, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 suşları için PZR yöntemi ile *sdsA* geninin tespit edilmeye çalışılmış olup herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

Tasarlanan primer 284 bp uzunluğunda olup SDS degrade eden *P. fluorescens* SDS3, *P. fluorescens* SDS6, *P. baetica* SDS8 ve *P. fluorescens* SDS12-1 suşları için PZR yöntemi kullanarak *sdsA* gen bölgesi çoğaltılmıştır.

Bu tez ile deterjan kirliliğinin olduğu belirlenen Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde yer alan bölgeler Sarımusalı Mevkii, Bucakuyazı-Sazbucağı Mevkii, Kapulukaya Baraj Girişi ve Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı Mevkii belirlenmiştir. Bu bölgelerden deterjan degrade eden izolatlar *Pseudomanas fluorescens* SDS3 *Pseudomanas fluorescens* SDS6, *Pseudomanas baetica* SDS8 *Pseudomanas fluorescens* SDS12-1 belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 179-196, 1999.
- [2] Minareci, O., Öztürk, M., Egemen, Ö., Minareci, E., Manisa organize sanayi arıtım tesisinin, Gediz nehrinde deterjan kirliliğine olan etkilerinin belirlenmesi. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (1): 65 – 72, 2008.
- [3] Minareci O., Minareci E., Öztürk M., Karaçay’da (Manisa) deterjan, fosfat ve bor kirliliğinin araştırılması. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 3 (26): 171-177, 2009.
- [4] Berkes F., Kışlalıoğlu M. *Ekoloji ve Çevre Bilimleri, Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayınları*, Ankara, 1993.
- [5] Çevre Bakanlığı, 2000’li yıllara Doğru Çevre. Ankara: Çevre Bakanlığı yayınları. Çevre Bakanlığı. Çevre notları. Ankara, 1998.
- [6] Atıcı, T., Ahıska, S., *Pollution and Algae of Ankara Stream. Gazi Üniversitesi Journal of Science*, 18 (1): 51-59, 2010.
- [7] Anonim, Çevre yönetimi-Su kirliliği, Manisa İl Çevre ve Orman Müdürlüğü, Manisa, 2007.
- [8] Done R., Hutchins I., *Teaching Strategy Relationship Structure-Biodegradability of Agro-Ecosystems Specific Pollutants. Ars Docendi Publishing House*, 1: 51-56, 2008.
- [9] CIR publication, Final report on the safety assessment of sodium lauryl

- sulfate and ammonium lauryl sulfate. *International Journal of Toxicology*,2 (7): 127–181, 1983.
- [10] Marrakchi, S., Maibach, H.I., Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19 (3): 177–80, 2006.
- [11] Nassif, A., Chan, S.C., Storrs, F.J., Hanifin, J.M., Abnormal skin irritancy in atopic dermatitis and in atopy without dermatitis. *Archives of Dermatology*, 130 (11): 1402–7,1994.
- [12] Robello, S., Asok, A.K., Mundayoor, S., Jisha M.S., *Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation*, 12 (29): 275-287, 2013.
- [13] Deterjan. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Deterjan> (Erişim tarihi: 04.01.2015)
- [14] Chaturvedi A. D., Tiwari K. L., Effect of household detergents (surfactants) degraded through aquatic fungi. *Recent Research in Science and Technology*,5 (5): 12-16, 2013.
- [15] Selberg A., Budashova J., Tenno T., Column study of the leaching and degradation of anionic surfactants in oil-polluted soil. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 56 (2): 87–97, 2007.
- [16] Yardımcı, C.H., Temel, M., Riva Deresi (İstanbul)'nde deterjan ve nitrit, nitrat, fosfat arasındaki korelasyon. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23: 39-45, 2007.
- [17] Anonim, deterjan nedir?  
<http://www.solverkimya.com/site/makaleler/deterjan-makaleleri/deterjan-nedir.html> (Erişim tarihi: 13.03.2015)

- [18] Güven K. C., Nesimigil F., Cumalı, S., Yalçın A., Gazioglu C., Çoban B., Anyonik deterjan LAS'ın 2004-2007 yıllarında Türkiye sahillerindeki kirliliği ve Karadeniz'e verilen miktarı. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 16(1): 5-24, 2010.
- [19] Subramanian M.S., *Environmental chemistry and analysis*. Indian Institute of Technology Madras, 379: 519-525, 2004.
- [20] Marchesi, J.R., Owen, S.A., White, G.F., House, W.A., Russell, N.J., SDS-degrading bacteria attach to riverine sediment in response to the surfactant or its primary biodegradation product dodecan-1-ol. *Microbiology*, 140: 2999-3006, 1994.
- [21] F. Rediguieri C., Porta V., S. G. Nunes D., M. Nunes, T., E. Junginger, H., Kopp, S., K. Midha, K., P. Shah, V., Stavchansky, S., B. Dressman, J. and M. Barends, D., Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (5): 1618–1627, 2011.
- [22] Elsayed, A., Al-Remawi, M., Maghrabi, I., Hamaidi, M., Jaber, N., Development of insulin loaded mesoporous silica injectable particles layered by chitosan as a controlled release delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 461 (1-2): 448-458, 2014.
- [23] Smulders, E., Rybinski, W., Sung, E., Rähse, W., Steber, J., Wiebel F., Nordskog A, *Laundry Detergents in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 2002.
- [24] Hayashi, T., Nagai, Y., The anomalous behavior of collagen peptides on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis is due to the low

content of hydrophobic amino acid residues. *Journal of Biochemistry*, 66(1): 304–309, 1980.

- [25] Deterjan kirliliği. [www.cevremuhendisleri.net/deterjan-kirliligi](http://www.cevremuhendisleri.net/deterjan-kirliligi) (Erişim tarihi: 03.04.2015)
- [26] P. Mukerjee and K. J. Mysels, Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems. NSRDS-NBS 36, US. Government Printing Office, Washington, D.C., 1971.
- [27] Turro, N.J.; Yekta, A., Determination of the aggregation number of detergent micelles using steady-state fluorescence quenching. *Journal American Chemistry Society*, 100: 5951, 1978.
- [28] Rapport, R.A., and Eckhoff W.S., *Monitoring Linear Alkyl Benzene Sulphanete in the Environment*, 1986.
- [29] Kosswig K., *Surfactants in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [30] Söğüt M. Ü., Jermisid ajanlardan katyonik deterjanlar, *Journal of Experimental and Clinical Medicine Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*, 30 (1): 1309-4483, 2012.
- [31] Anonim, atıksu. <https://en.wikipedia.org/wiki/Wastewater> (Erişim tarihi: 06.05.2015)
- [32] Anonim, atıksu kirliliği. [https://en.wikipedia.org/wiki/Water pollution](https://en.wikipedia.org/wiki/Water_pollution) (Erişim tarihi: 06.05.2015)

- [33] Tchobanoglous, G., Burton, F.L., and Stensel, H.D, Wastewater Engineering Treatment Disposal Reuse / Metcalf & Eddy, Inc. (4th ed.). McGraw-Hill Book Company, 2003.
- [34] Ronda, A., Martí'n-Lara, M.A., Dionisio, E., Blazquez, G. and Calero, M., Effect of lead in biosorption of copper by almond shell. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 44: 466-473, 2013.
- [35] Çakır, E., Kıvanç, M., Porsuk Çayı'ndan izole edilmiş bakteriler tarafından deterjan aktif maddelerinin biyolojik parçalanabilirliği. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 1: 129-135, 2000.
- [36] Shrestha, S., Kazama., Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin, Japan. Environmental Modelling and Software, 22: 464-475, 2007.
- [37] Okpokwasili, G.C., Olisa., River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. Water Research, 25: 1425-1429, 1991.
- [38] Ojo, O.A., Oso, B.A., Biodegradation of synthetic detergents in wastewater, African Journal of Biotechnology, 8: 1090-1109, 2009.
- [39] Chaturvedi V., Kumar A., Diversity of culturable SDS degrading bacteria isolated from detergent contaminated ponds situated in Varanasi City, India. International Biodeterioration & Biodegradation 65 (7): 913-1110, 2011.
- [40] Shukor, M.Y., Husin W.S. W., Rahman, M.F.A., Shamaan, N.A., Syed, M.A., Isolation and characterization of an SDS-degrading *Klebsiella oxytoca*. Journal of Environmental Biology, 30 (1): 129-134, 2009.
- [41] Demirel, S., Molecular techniques for determining microbial diversity in



- treatment systems. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 30: 179-192, 2012.
- [42] Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K., Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 143-169, 1995.
- [43] Sanz, J.L., Kochling, T., Molecular biology techniques used in wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 42: 119-133, 2007.
- [44] Iasur, Kruh, L., Hadar, Y., Milstein, D., Gasith, A., Minz, D., Microbial population and activity in wetland microcosms constructed for improving treated municipal wastewater. *Microbial Ecology*, 2010.
- [45] Brissonb, J., Campera, A.K. and Stein, O. R., Microbial processes influencing performance of treatment wetlands. *Ecological Engineering*, 35: 987-1004, 2009.
- [46] Calli, B., Mertoglu, B., Roest, K., Inanc, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology*, 97: 641-647, 2006.
- [47] Brown, T.A., Gen klonlama ve DNA Analizi. Nobel Yayın Dağıtımı, Ankara, 2009.
- [48] Madigan, M.T. Martinko, J.M., Pearson Education. *Brock of Microorganism*. USA, 2010.
- [49] Yelboğa, E., Biyofilmde 16S rDNA Yöntemi Kullanılarak Mikroorganizma Tayini. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2008.
- [50] Monis, P.T., Andrews, R.H. and Saint, C.P., Molecular biology techniques

in parasite ecology. *International Journal for Parasitology*, 32: 551-562, 2002.

- [51] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5463-5467, 1977.
- [52] Maxam, A. M. and Gilbert, W., A new method for sequencing DNA. *Process National*, 74(2): 560-564, 1977.
- [53] Ludwig, W. and Schleifer, KH., Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiological Reviews*, 15 (2-3):155-173, 1994.
- [54] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology*, 97: 641-647, 2006.
- [55] Yiğit, N., Aktaş A. E., Uslu, H., Comparison of different systems for identification of candida strains. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38 (2): 83-86, 2008.
- [56] Beyhan, Y. E., Samsun Yöresi Mandalarda Kistik Ekinokokozisin Yayınlığı Suşların PZR ve DNA Dizi Analizi ile Tesbiti. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2011.
- [57] Wiener, P., Müller-Graf, C., Barcus, V., Bacterial evolution in modern times: trends and implications for research. *Reviews in Undergraduate Research*, (2): 1-6, 2003.
- [58] Wang, Y., Quian P. Y., Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic

studies. Plus One 2009.

- [59] Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A. and Olsen, G.J., Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2461-2470, 2008.
- [60] S. Önal, Yapay Sinir Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin Akım Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009
- [61] Bahadır, M., Kızılırmak nehri akım değişimlerinin istatistiksel analizi. *International periodical for the languages. Literature and History of Turkish or Turkic*. 6 (3): 1339-1356, 2011.
- [62] Ojo, O.A., Oso, B.A., Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1090-1109, 2009.
- [63] Shahbazi, R., Kasra-Kermanshahi, R., Gharavi, S., Moosavi-Nejad, Z., Borzooee, Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkyl sulfatase enzyme activity. *Iran Journal of Microbiology*, 5,153-158, 2013.
- [64] Önganer, A.N., Kırbağ, S., Diyarbakır'da taze olarak tüketilen çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25:(1-2) 24-33, 2009.
- [65] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edit by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, *Genetic analysis in molecular biological methods for Bacillus*. 27-74, UK, 1990
- [66] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A.,

- Schild, T. A., Henze, G. and Beyermann, B., Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex and time-release PCR. *Biotechniques* 24 (1): 154–158, 1998.
- [67] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membranelipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates, *Microbios.* 86: 143-156, 1996.
- [68] Shahbazi, R., Kasra-Kermanshahi, R., Gharavi, S., Moosavi-Nejad, Z., Borzooee, F., Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkyl sulfatase enzyme activity. *Iran Journal of Microbiology*, 5: 153-158, 2013.
- [69] Chaturvedi, V., Kumar, A., Isolation of sodium dodecyl sulfate degrading strains from a detergent polluted pond situated in Varanasi city. India, *Journal of Molecular Cell Biology*, 8: 103-111, 2010.
- [70] Demiralp, H., Celik, S., Koksel, H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. *European Food Research and Technology*, 211: 322-325, 2000.
- [71] Yılmaz, F., 16S rRNA Probları Kullanılarak Etkin Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Nehir İzolatlarının Takip Edilmesi. Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2013
- [72] Başaran, A.K., Pollution parameters in Bakırçay Delta and relation Çandarlı Bay (in Turkish). Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2004.
- [73] Britschgi, T.B., Giovannoni, S.J., Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 1707-1713, 1991.

- [74] Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Tekse, A., Gomez, A. V., Sogin, M.L., Benthic eukaryotik diversity in the Guaymas Basin Hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11: 7658-7662, 2002
- [75] Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, P Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Archives of Biological Science*, 114: 19-24, 2002.
- [76] Alejandro, A., Schäffer, L., Aravind, Thomas, L., Madden, Sergei, Shavirin, John L., Spouge, Yuri I., Wolf, Eugene V., Koonin, and Stephen F., Altschul, Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Research*. 29: 2994-3005, 2001.
- [77] Schober, M., Gadler, P., Knaus, T., Kayer, H., Birner-Grünberger, R., Gully, C., Macheroux, P., Wagner, U. and Faber K.A., Stereoselective inverting sec-alkylsulfatase for the deracemization of sec-alcohols. *American Chemical Society Publications*, 13(16): 4296–4299, 2011.
- [78] Gomez V., Laura, Rusniok, C., Rolando, M., Neou, M., Dervins-R., D., Demirtas, j., Rouy, Z., J Moore, R., Chen, H., K Petty, N., Jarraud, S., Etienne, J., Steinert, M., Heuner, K., Gribaldo, S., Médigue, C., Glöckner, G., L Hartland E. and Buchrieser, C., Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biology*, 15: 505, 2014.
- [79] Chwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterhelt D., Kunte H. J. A., blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Environmental Microbiology*, 13 (8):1973-1994, 2010.

- [80] Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M., Jin, Q., Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (21): 7564-7569, 2008.
- [81] Jovicic, B., Begovic, L., Lozo, J., Topisirovic, L. and Kojic, M., Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC 19151. Archives of Biological Science, 61 (2): 159-164, 2009.
- [82] Shrestha, S., Kazama, F., Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin, Japan. Environmental Modelling and Software, 22: 464-475, 2007.
- [83] Hosseini, F., Malekzadeh, F., Amirmozafari, N., Ghaemi, N., Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. International Journal of Environmental Science, 4 (1): 127-132, 2007.
- [84] Schleheck, D., Lechner, M., Schonenberger, R. Desulfonation of the disulfodiphenylethercarboxylates from alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants. Applied and Environmental Microbiology, 69: 938-944, 2003.
- [85] Singh, K.L., Kumar, A., Kumar, A., *Bacillus cereus* capable of degrading SDS shows growth with a variety of detergents. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14: 777-779, 1998.
- [86] Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. Gene, 114: 19-24, 1992.

- [87] Ambily, P.S., and Jisha, M.S., Characterization of Alkyl sulphatase required for the biodegradation of Sodium dodecyl Sulphate(SDS). *European Journal of Experimental Biology*, 1(4): 41-49, 2011.
- [88] Dodgson, K.S., White, G.F., Fitzgerald, J.W., *Sulfatases of Microbial Origin*. CRC Press, Boca Raton, 1982.
- [89] Lillis, V., Dodgson, K.S., White, G.F., Initiation of activation of a premergent herbicide by a novel alkyl sulfatase of *Pseudomonas putida* FLA, *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 988-994, 1983.
- [90] Hales, S.G. Microbial degradation of linear ethoxylate sulfates. Ph.D. Thesis, University of Wales, 1981.