



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN FENOLÜN
BİYODEGRADASYONU

EDA AÇIKGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

TEMMUZ - 2013



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN FENOLÜN
BİYODEGRADASYONU

EDA AÇIKGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

TEMMUZ - 2013

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN FENOLÜN
BİYODEGRADASYONU**

EDA AÇIKGÖZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Doç.Dr. Birgül ÖZCAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 12/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Birgül ÖZCAN
Başkan

Doç.Dr. Gül ÖZYILMAZ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Hayri BABA
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 664

Doç. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 1105Y0106

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

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılmayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Eda AÇIKGÖZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Halofilik Mikroorganizmalar	3
2.1.1. Halofilik Arkeler.....	4
2.2. Tuzlu Ortamlarda Organik Maddelerin Biyodegradasyonu	9
2.2.1 Aerobik Biyodegradasyon.....	11
2.2.2. Fenol ve Biyodegradasyonu	14
2.2.2.1. Fenol Biyodegradasyonu.....	16
2.3. Mikroorganizmaların Büyüme Kinetiği ve Monod Modeli.....	19
2.3.1. Mikroorganizmaların Büyüme Kinetiği	19
2.3.2. Monod Modeli	21
2.3.3. Fenol Degradasyonu ve Üreme Kinetiği	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	25
3.1.2. Halofilik Arkeler.....	26
3.1.3. Besiyerleri.....	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi	26
3.2.2. Fenol Parçalayabilme Yeteneğine Sahip Suşların Taranması.....	26
3.2.3. Fenol Tayini.....	27
3.2.4. Halofilik Arke izolatlarının Fenol ve Toluene Adaptasyonu.....	27
3.2.4.1. Fenol Adaptasyonu.....	27
3.2.4.2. Toluen Adaptasyonu.....	28

3.2.5. Halofilik Arke İzolatının Büyüme Kinetiği.....	29
3.2.5.1. Hücre Yoğunluğu Standart Grafiği.....	29
3.2.5.2. Farklı Fenol Konsantrasyonlarındaki Üreme Eğrisi ve Kinetiğinin Hesaplanması.....	29
3.2.6. Fenol Biyodegradasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	29
3.2.6.1. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Fenol Konsantrasyonunun Etkisi.....	29
3.2.6.2. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi.....	30
3.2.6.3. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	30
3.2.6.4. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine pH'nın Etkisi.....	30
3.2.6.5. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Sıcaklığın Etkisi	30
3.2.6.6. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi.....	31
3.2.6.7. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Yeast Ekstrakt Miktarının Etkisi.....	31
3.2.7. Fenol Degradasyon Ürünlerinin Analizi	31
3.2.7.1. <i>Meta</i> -Yıkım Analizi	31
3.2.7.2. <i>Orto</i> -Yıkım Analizi	31
3.2.8. Fenol Biyodegradasyonunda Rol Oynayan Enzimlerin Taranması	31
3.2.8.1. Fenol Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini	32
3.2.8.2. Kateşol 1,2-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tayini.....	32
3.2.8.3. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu.....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. Standart Grafikler	34
4.2. Fenolü Parçalayabilen Suşların Taranması	35
4.3. Fenol ve Toluen Adaptasyon Sonuçları	38
4.4. Üreme Kinetiği-Monod Modeli	41
4.4.1. 50 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve	

Üreme Eğrilerinin Hesaplanması.....	41
4.4.2. 75 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması.....	43
4.4.3. 100 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması	44
4.4.4. 125 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması.....	45
4.4.5. 150 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması.....	47
4.4.6. 200 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması	48
4.4.7. Monod Grafiği	50
4.4.7.1. Maksimum Spesifik Büyüme Hızı (μ_{max}) Değeri	50
4.5. Fenol Biyodegradasyon Koşullarının Optimizasyon Sonuçları	52
4.5.1.Fenol Biyodegradasyonunun Fenol Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	53
4.5.2. Fenol Biyodegradasyonunun İnokulum Miktarına Bağlı Değişimi.....	54
4.5.3. Fenol Biyodegradasyonunun NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	55
4.5.4. Fenol Biyodegradasyonunun pH'a Bağlı Değişimi.....	57
4.5.5. Fenol Biyodegradasyonunun Sıcaklığa Bağlı Değişimi.....	58
4.5.6. Fenol Biyodegradasyonunun Çalkalama Hızına Bağlı Değişimi...	60
4.5.7. Fenol Biyodegradasyonunun Yeast Ekstrakt Miktarına Bağlı Değişimi.....	61
4.6. Fenol Degradasyon Ürünlerinin Analiz Sonucu.....	63
4.7. Fenol Biyodegradasyonunda Rol Oynayan Enzimlerin Tarama Sonucu.....	64
4.7.1.Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Optimizasyon Sonuçları.....	65
4.7.1.1.Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tuz	

Optimizasyon Sonucu.....	65
4.7.1.2. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Sıcaklı	
Optimizasyon Sonucu.....	66
4.7.1.3. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin pH Optimizasyon	
Sonuçları.....	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	72
TEŞEKKÜR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ÖZET

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN FENOLÜN
BİYODEGRADASYONU

Endüstriyel aktiviteler sonucu üretilen ve endüstriyel atık suların genel bir bileşeni olan fenol toksik aromatik bir bileşiktir. Fenollü atık sular genellikle yüksek miktardaki tuz içerdiğinden dolayı biyolojik arıtımı halofilik mikroorganizmalar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki tuzlu su ve topraktan, tuz madeninin ve tekstil atık suyundan izole edilmiş halofilik bakteri ve arke izolatlarının fenol biyodegradasyon aktiviteleri araştırılmıştır. 121 izolat arasından A235 isimli arke izolatının, fenolü tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği ve % 20 NaCl içeren katı ve sıvı ortamlarda en yüksek fenol yıkım oranına (% 42) sahip olduğu belirlenmiştir. Üreme üzerindeki substrat inhibisyonunun giderilmesi amacıyla izolatın, 250 ppm'e kadar artırılan fenol konsantrasyonuna adaptasyonu sağlanmıştır. Ayrıca izolatın çapraz toluen adaptasyonu ile fenol yıkım oranında yaklaşık % 14'lük bir artış sağlanmıştır. Fenol varlığında arkeal izolatın fenol üreme kinetiği belirlenmiş ve Monod modeline uyduğu saptanmıştır, μ_{max} ve K_s değerlerinin sırasıyla $0,015h^{-1}$ ve $71,4 \text{ mg/l}$ olduğu bulunmuştur. İzolatın fenol yıkım koşullarının optimizasyonu sonucunda en yüksek yıkım oranı, % 20 NaCl, pH 7.5, 37°C , 200 rpm ve % 0.025 yeast ekstrakt içeren ortam koşullarında elde edilmiştir. Biyokimyasal analizler ve enzim tarama sonuçları halofilik arke suşunun fenolü kateşol 2,3-dioksigenaz ile *meta*-yıkım yolunu kullanarak parçaladığı belirlenmiştir. Kateşol 2,3-dioksigenaz için en yüksek enzim aktivitesinin 2M KCl, 42°C ve pH 8'de gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Bilgilerimiz doğrultusunda bu çalışma ile ilk kez, bir ekstrem halofilik arkenin yüksek tuz konsantrasyonunda fenolü parçalayabildiği gösterilmiş ve dolayısıyla halofilik arkelerin de fenol gideriminde biyoteknolojik potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir.

2013, 89 sayfa

Anahtar kelimeler: Halofilik arke, Fenol biyodegradasyonu, Adaptasyon, Üreme kinetiği, *Meta*-yıkım, Kateşol 2,3-dioksigenaz.

ABSTRACT

PHENOL BIODEGRADATION BY HALOPHILIC MICROORGANISMS

Phenol that is a common component of industrial waste waters is a toxic aromatic compound produced as a result of industrial activities. Biological treatment of highly saline waste waters containing phenol can be performed through halophilic microorganisms. In this study, phenol biodegradation activities of halophilic organisms isolated from brine and saline soils from different part of Turkey, salt mine and textile waste water, were investigated. Among 121 isolates, archaea A235 strain was determined as the highest phenol degradation capacity on solid and liquid media containing 20 % NaCl and phenol as the sole carbon and energy source. The strain was adapted sequentially to increasing phenol concentrations (up to 250 ppm). There was also an increase of approximately 14 % removal of phenol via cross-toluene adaptation. Growth kinetics of A235 strain was determined in the presence of phenol and it was found to fit Monod model. The values of μ_{max} and K_s were calculated to be 0.015 h^{-1} and 71.4 mg/l , respectively. Phenol biodegradation by A235 was optimal at the presence of 20 % NaCl, 0.025 % yeast extract and 10 % inoculum (v/v) concentrations, pH 7.5, 37 °C and 200 rpm at initial phenol concentration of 100 ppm. Biochemical analysis and enzyme screening indicated that the degradation of phenol was achieved by using catechol 2,3-dioxygenase and *meta*-cleavage pathway. Catechol 2,3-dioxygenase requires 2M KCl, 42 °C and pH 8 for its highest catalytic activity.

To the best of our knowledge, this is the first report about the phenol biodegradation activity of an extremely halophilic archaeon at higher salt concentrations and hence, they must be considered for their biotechnological potentials.

2013, 89 pages

Key Words: Halophilic archaea, Phenol biodegradation, Adaptation, *Meta*-cleavage, Catechol 2,3-dioxygenase.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAP	Aminoantipirin
DGD	Dialkil Gliserol Dieter
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FMTÖ	Fenol Mineral Tuz Ortamı
h	Saat
HMSA	Hidroksimukonik semialdehid
K _s	Monod sabiti
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
PHA	Poli-β- hidroksialkonat
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RNA	Ribonükleik Asit
S	Substrat
SG	Shengal-Gibson besiyeri
TMTÖ	Toluen mineral tuz ortamına
U	Unite
V	Hacim
μ	Spesifik büyüme hızı (h ⁻¹)
μ _{max}	Maksimum spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları.....	25
Çizelge 4.1. Fenole toleranslı suşların değerlendirilmesi.....	35
Çizelge 4.1. (Devam) Fenole toleranslı suşların değerlendirilmesi.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Aerobik mikroorganizmalar tarafından hidrokarbonların parçalanması.....	12
Şekil 2.2. Kateşol ve protokateşole dönüştürülen doğal ve yapay aromatik bileşikler.....	13
Şekil 2.3. Fenolün kimyasal yapısı	14
Şekil 2.4. Kesikli üretilen bir bakteri popülasyonunun karakteristik üreme eğrisi..	20
Şekil 2.5. Hücre için Lineweaver-Burk grafiği.....	22
Şekil 4.1. Fenol standart grafiği.....	34
Şekil 4.2. Hücre yoğunluk standart grafiği.....	34
Şekil 4.3. Fenole Toleranslı İzolatların fenol biyodegradasyon (%) oranları.....	37
Şekil 4.4. A138, A405 ve A235 izolatlarının ortalama fenol biyodegradasyon (%) oranları	37
Şekil 4.5. A235 izolatının inkübasyon periyoduna bağlı olarak farklı fenol konsantrasyonu ve yeast ekstrakt miktarlarındaki üreme yoğunluğu ...	39
Şekil 4.6. Toluen ve fenole adapte edilmiş A235 izolatının 100 ppm fenol içeren ortamdaki zamana bağlı fenol biyodegradasyonu (%).....	40
Şekil 4.7. 50 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğunun ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.....	42
Şeki 4.8. A235 izolatının 50 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	42
Şekil 4.9. 75 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğunun ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.....	43
Şekil 4.10. A235 izolatının 75 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	44
Şekil 4.11. 100 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğunun ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi	44
Şekil 4.12. A235 izolatının 100 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	45
Şekil 4.13. 125 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğunun ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.....	46

Şekil 4.14. A235 izolatının 125 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	46
Şekil 4.15. 150 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğunun ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi	47
Şekil 4.16. A235 izolatının 150 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	48
Şekil 4.17. A235 izolatının 200 ppm fenolün bulunduğu ortamdaki hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi....	48
Şekil 4.18. A235 izolatının 200 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{Hücre yoğunluğu})$ 'nın zamana bağlı değişimi.....	49
Şekil 4.19. A235 izolatının spesifik büyüme hızı(μ)'nın substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi.....	50
Şekil 4.20. A235 izolatının $1/[S]-1/\mu$ grafiği.....	51
Şekil 4.21. Farklı fenol konsantrasyonunda fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	53
Şekil 4.22. Farklı fenol konsantrasyonunda hücre miktarının zamana bağlı değişimi	54
Şekil 4.23. Farklı inokulum miktarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	55
Şekil 4.24. Farklı inokulum miktarında hücre miktarının zamana bağlı değişimi.....	55
Şekil 4.25. Farklı NaCl konsantrasyonunda fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	56
Şekil 4.26. Farklı NaCl konsantrasyonunda hücre miktarının zamana bağlı değişimi.....	57
Şekil 4.27. Farklı pH değerlerinde fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.28. Farklı pH değerlerinde hücre miktarının zamana bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.29. Farklı sıcaklık derecelerinde fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi	59

Şekil 4.30. Farklı sıcaklık derecelerinde hücre miktarının zamana bağlı değişimi.....	60
Şekil 4.31. Farklı çalkalama hızlarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	61
Şekil 4.32. Farklı çalkalama hızlarında hücre miktarının zamana bağlı değişimi...	61
Şekil 4.33. Farklı yeast ekstrakt miktarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi.....	62
Şekil 4.34. Farklı yeast ekstrakt miktarında hücre miktarının zamana bağlı değişimi.....	62
Şekil 4.35. A235 izolatında <i>meta</i> -yıkım analizi sonucunda oluşan sarı renk.....	64
Şekil 4.36. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine KCI etkisi.....	66
Şekil 4.37. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	67
Şekil 4.38. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	67

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde meydana gelen hızlı endüstriyel değişimle birlikte temel ihtiyaçların karşılanabilmesi için üretim sektörüne öncelik verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlılar üzerindeki etkileri pek fazla önemsenmemiştir. Çevreye bırakılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıkların en önemlilerinden birisi fenol ve fenol türevleridir. Fenol bileşikleri ve homologlarının çoğu zehirli maddelerdir ve organik kirleticiler içerisinde büyük bir grubu oluşturmaktadırlar (EPA-Çeve Koruma Örgütü). Fenol ve fenolik bileşikler patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kâğıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok endüstriyel proseste kullanılmakta ve atıklarında yer almaktadır.

Endüstriyel tuzlu atık sularında ve toprakta bulunan fenol ve fenolik bileşikler ciddi çevresel problemlere neden olmakla birlikte son derece tehlikeli ve toksik özelliğe de sahiptir. Yüksek hacimli endüstriyel atık suların arıtımı için en uygun teknik/ler, fenolik bileşiklerin herhangi bir toksik son ürün oluşturmada tamamen uzaklaştırılmasına yönelik olmalıdır. Tuzlu ortamlardan fenolün uzaklaştırılması amacıyla çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlar kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle etkili bir şekilde fenol gideriminin yapılabilmesi için, aşırı miktarda kimyasal kullanılması ve sonrasında bunların yok edilmesinin yanı sıra pahalı teçhizat kullanımı ve yüksek işlem maliyeti de söz konusudur. Bu derece önemli sınırlayıcı faktörlere sahip olan kimyasal süreçlere alternatif olarak biyolojik işlemlerin uygulanması giderek ivme kazanmaktadır. Biyolojik tekniklerle, tuzlu ortamlardaki fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması, teknolojiye yapılan harcamaların azaltılması ve zaman-verim açısından kazanç sağlanması amaçlanmaktadır. Tuzlu ortamlardaki fenol ya da fenolik bileşiklerin biyodegradasyon stratejisinde mikroorganizmaların ve/veya enzimlerinin kullanılması, ekonomik ve etkili bir yaklaşımdır. Mikrobiyal veya enzimatik degradasyon, çevre dostu ve düşük maliyetli olması, düşük su tüketimi ve çamur oluşumuna sebep olması ve toksik metabolitleri tamamen mineralize edebilmesi gibi önemli avantajlara sahiptir. Mikrobiyal fenol degradasyonu söz konusu avantajları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiş ve son yıllarda farklı taksonomik gruplardan suşların fenol degradasyon etkinliği araştırılmaya başlanmıştır.

Tuzlu ortamlardaki fenol çalışmalarında karşılaşılan en büyük problem konvansiyonel mikroorganizmaların yüksek miktardaki tuzdan zarar görmesine bağlı olarak fenol yıkımını gerçekleştirilememesidir. Bu nedenle yüksek tuz konsantrasyonunda fenol degradasyonu için halofilik organizmaların büyük bir potansiyele sahip olduğu açıktır. Halofililik mikroorganizmalardan ılımlı halofilik özellikteki bakterilerle fenol biyodegradasyonu üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmasına rağmen arkelerle ilgili henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Halofilik bakteri ve arkeler, düşük su aktivitesine sahip enzimleri ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı uyum stratejileri nedeniyle biyoteknoloji alanında birçok araştırmacının ilgisini çeken organizmalar haline gelmiştir. Dolayısıyla halofilik arke ve bakterilerin, birçok biyoteknolojik çalışma ve çevre biyoteknolojisi kapsamında, organik maddelerin degradasyonunda kullanılması büyük avantaj sağlayacaktır. Özellikle endüstriyel atık suların yüksek oranda tuz içermesinden dolayı, fenol giderimi ve biyolojik yıkımı konusunda halofilik arkelerin kullanım potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma ile yüksek tuz konsantrasyonunda yaşamaya adapte olmuş halofilik organizmaların fenol biyodegradasyon etkinliğinin belirlenerek biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyellerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Tez kapsamında;

- ✓ Türkiye'nin çeşitli tuzlu bölgelerinden ve tekstil atık suyundan izole edilmiş 121 adet halofilik arke ve halofilik/halotolerant bakteri izolatının fenol varlığında üreme ve fenölü tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneklerinin taranması,
- ✓ seçilen izolat/ların yüksek fenol konsantrasyonuna adaptasyonunun yapılması,
- ✓ izolat/ların fenol varlığında büyüme kinetikleri ve fenole olan afinitelerinin belirlenmesi,
- ✓ optimum fenol yıkımının sağlandığı ortam koşullarının belirlenmesi,
- ✓ fenol yıkım yolu, bu biyokimyasal yolda rol oynayan enzimin belirlenmesi,
- ✓ enzimin optimum aktivite gösterdiği tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık derecesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Halofilik Mikroorganizmalar

Tatlı sulardan Ölü Deniz gibi hipertuzlu göllere, tuzla kristalizasyon göllerine ve sodyum klorüre doymuş diğer yerler dahil çeşitli tuz derişimine sahip doğal habitatlara kadar yaşam mevcuttur. Yeryüzündeki tuzlu ve hipertuzlu habitatların farklı özelliklere sahip olması, bu koşullarda yaşamaya adapte olmuş mikrobiyal kcommunitylerinde büyük bir çeşitlilikte olmasına neden olmuştur (Oren, 2002). Hipertuzlu ortamların büyük bir kısmı deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşmuştur ve yüz kompozisyonu deniz suyundakine benzemektedir ve pH nötralden hafif alkaliye kadar değişebilmektedir. Devam eden buharlaşma sonucunda cips ve diğer minerallerin birikmesine bağlı olarak iyonik kompozisyon da değişmektedir. Bu ortamların rengi orada yaşayan pigmentli organizmalardan dolayı kırmızıya dönmektedir. İyonik kompozisyonu denizdekinden farklı olup deniz kaynaklı olmayan tuzlu ortamlarda da benzer organizmalar yaşamaktadır (Oren, 2008).

Tuzla olan ilişkilerine göre mikroorganizmalar 3 temel kategoriye ayrılmıştır; optimum olarak 2.5-5.2 M üreyenler, ekstrem halofil 1.5-4.0 M'da üreyenler sınır ekstrem halofili), optimum olarak 0.5-2.5 M tuzda üreyenler ılımlı halofil ve üremek için tuz gerektirmeyen ancak 2.5 M 'a kadar yüksek tuz konsantrasyonlarında da iyi üreyebilenler halotolerant mikroorganizmalar olarak gruplandırılmıştır (Kushner, 1978; Kamekura, 1998; Oren, 2008). Basit bir ifadeyle ise bir halofil, optimum üremesi 50 g/l yada daha fazla miktardaki tuz konsantrasyonlarında olan ve en azından 100 g/l tuzu tolere eden organizma olarak tanımlanmıştır (Oren, 2008)

Hipertuzlu ortamlarda halofilik arkeler ve bunlarla birlikte daha az oranda halofilik bakteriler, halofilik fungi ve protistalar bulunmaktadır (Pasic ve ark., 2005). 16s rRNA dizilerine göre halofilik mikroorganizmalar *Archaea*, *Bacteria* ve *Eukarya* olmak üzere 3 domaine dağılmıştır. *Archaea* içerisinde en tuzcul olanlar *Halobacteriales* ordosunda bulunmaktadır ve *Methanosarcinales* ordosunda ise halofilik ya da yüksek halotolerant üyelere rastlanmıştır. Halofilik arkeler arke domaininin sadece *Euryarchaeota* filumunda tespit edilmiştir, henüz *Crenarchaeota* filumuna dahil olan halofilik üye bildirilmemiştir. Bakteri domaininde de halofili yaygındır ve halofilik üyeleri *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* ve *Bacteroidetes* filumlarında yer almaktadır. Yüksek

tuzlu ortamlarda ökaryotik mikroorganizmalardan tek hücre yeşil alg *Dunaliella* ve bazı kabuklular yaşamaktadır. Funguslar arasında halofik kriterlerine uygun şekilde yüksek hatta doygunluğa yakın tuz konsantrasyonlarında üreyebilen üyeler mevcuttur; *Trimmatostroma salinum* ve *Hortaea werneckii*. Bu organizmalar tuzlu su ve diğer hipertuzlu ortamların doğal canlılarıdır. *Pleurostomum flabellatum* ve *Halocafetaria seosinensis* gibi flagellalı veya flagellasız protistler de doygunluğa yakın tuz konsantrasyonlarında yaşamaktadır (Oren, 2008).

2.1.1. Halofilik Arkeler

Halofilik arkeler, *Archaea* domaini *Euryarchaeota* filumu, *Halobacteria* sınıfına dahil *Halobacteriales* ordosunun tek familyası olan *Halobacteriaceae* altında toplanmıştır. *Halobacteriaceae* ilk olarak 1974 yılında Gibbons tarafından, gelişebilmeleri için minimum 2 M NaCl gerektiren obligat halofilik mikroorganizmaları içeren familya olarak tanımlanmıştır (Savage ve ark., 2007).

Halobacteriaceae familyası içerisinde günümüze kadar 42 cins tanımlanmıştır; *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halarchaeum*, *Haloarchaeobius*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobellus*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halogranum*, *Halolamina*, *Halomarina*, *Halomethanococcus*, *Halomicrobium*, *Halonotius*, *Halopelagius*, *Halopenitus*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorientalis*, *Halorubrobacterium*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovenus*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronoarchaeum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobi*, *Natronomonas*, *Natronorubrum*, *Salarchaeum* (Euzéby, 2013).

Halofilik arkeler genel olarak; aerobik ya da fakültatif anaerobik, içerdikleri karotenoid pigmentlerinden dolayı pembe-kırmızı renk tonlarında ve çok çeşitli hücre şekillerinde bulunabilen (çubuk, kok, üçgen, kare, yamuk), katalaz ve oksidaz aktivitelerine sahip, Gram (-), kemoorganotrofik ve üremeleri için minimum 1.5 M NaCl'e ihtiyaç duyan organizmalardır (Castillo ve ark., 2007). Üremeleri için 1.5 M NaCl gereksinimleri olmasına rağmen bazı familya üyeleri deniz suyu ve kükürtçe zengin kaynak suyu gibi düşük tuzlu çevrelerden de izole edilebilmişlerdir (Rodriguez-Valera, 1979; Elshahed ve ark., 2004).

Halobacteriaceae familyası üyeleri, tuz gölleri, sodalı göller, tuzlalar ve tuzlu topraklar gibi toplam tuz konsantrasyonu, iyonik kompozisyon ve pH bakımından çeşitlilik gösteren yüksek tuzlu ortamlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Halofilik arkelerin doğadaki dağılımını belirleyen en önemli faktörler; toplam tuz konsantrasyonu, tuzların iyonik kompozisyonu ve mevcut besinlerdir. Halofilik arkelerin çoğu türleri, 2,5-3 M'ın altındaki tuz konsantrasyonlarında gelişmemektedirler. 1-2 M tuzlu su içerisinde hücreler zarar görmekte ve türlerin çoğu ise lizize uğramaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda tuz konsantrasyonunun bulunması halofilik arkelerin gelişebilmeleri için ön şarttır. Halofilik arkeler ayrıca yüksek pH değerlerine sahip tuzlu sularda da (Magadi gölü-Kenya ve Wadi Natürn gölü-Mısır) yoğun olarak bulunmaktadır. Doğal ortamların yanı sıra bu grup organizmalar yüksek tuz içeren tuzlanmış et, deri, sos gibi yapay ortamlardan da izole edilmişlerdir (Oren, 2001).

Halofilik arkelerin büyük bir kısmı nötral pH derecelerinde üreme özelliğine sahipken, asidofilik karakterde halofilik arkeler henüz rapor edilmemiştir. pH değeri 6,0 civarında olan Ölü Deniz halofilik arkelerin yoğun olarak gelişebildikleri en asidik ortam olmasıyla dikkat çekmektedir (Oren ve Gurevich, 1993). Ancak, *Halobacteriaceae* familyasına ait olduğu tespit edilen MHI-52-I suşunun pH değeri 4.4 olan ortamlarda üreyebilme özelliğinin olduğu rapor edilmiştir (Minegishi ve ark., 2008).

Halofilik arkelerin çoğu genellikle 35°C ile 50°C aralığındaki yüksek sıcaklıkları tercih ederler (Shand ve Perez, 1999). Tüm ekstrem halofilik arkelerde en yüksek optimum sıcaklık değerine sahip olan organizma *Natronolimnobius aegyptiacus* 'dur. Bu organizma optimum olarak 55°C sıcaklığında üreyebilmektedir (Allen ve ark., 2008). Bunun dışında, *Haloferax elongans*, *Haloarcula quadrata*, ve *Haloferax mediterranei*'nin optimum üreme sıcaklığı 51-53°C arasında değişmektedir. Fakat bu sıcaklıklardan çok daha soğuk ortamlara adapte olmuş türler de bulunmaktadır. Antartika'daki Deep Lake, sıcaklığı 0°C'nin altındaki sıcaklıklarla 11,5°C arasında değişen su sıcaklığına sahip bir göldür. Bu gölden *Halorubrum lacusprofundi* halofilik arke türü izole edilmiştir. Bu türün optimum üreme sıcaklığı 31°C ile 37°C arasında olmasına rağmen 4°C gibi düşük sıcaklıklarda da yavaş gelişebilmektedir (Franzmann ve ark., 1988). Halofilik arkeler ayrıca tuzlu topraklardan da izole edilmiştir.

İspanya'nın Akdeniz kıyıları (Queseda ve ark., 1982), eski SSCB'nin yüksek dağ ve düzlüklerindeki çorak alanlardan da izole edilmiştir (Kulicheuskaya ve ark., 1992; Zyvagintseva ve Tarasov 1988). *Halobacteriaceae* üyeleri ayrıca, bozulmadan saklanması için tuzlanmış yiyecek, deri ve diğer ürünlerde de bulunabilmektedirler (Rodriguez-Valera, 1988).

Halofilik arkelerde hücresel yapıları bakımından diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında önemli farklılıklara sahiptirler ve bu farklılıklar filogenetik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin aksine arkelerde peptidoglikan yapısında bir hücre duvarı bulunmamaktadır. Bakteri ve ökaryotların hücre zarında gliserole ester bağı ile bağlanan yağ asitleri bulunurken, arkelerin hücre zarında ise gliserole eter bağları ile bağlanmış uzun hidrokarbon zincirleri bulunmaktadır (Kates, 1992). Halofilik bakterilerin gliserol eter lipidleri; gliserolün 2. ve 3. karbon atomlarına eter bağıyla fitanil alkil (ör; C₂₀ izoprenoid türevi) zincirlerin bağlanması sonucu oluşur. Difitanil gliserol dieterler (C₂₀, C₂₀) tüm halofilik bakterilerde majör yapıdır (Russell, 1989). Halofilik bakterilerde C₄₀, C₄₀ dibifitanildigliserol tetraeter yapısı yoktur. Bu yapıda C₄₀ alkil zincirlerini oluşturmak üzere 2 dieter üzerinde yer alan fitanil zincir çiftleri birleşmektedir. Tetraeterler termofilik Arkelerde baskın lipidlerdir ve metanogenik Arkelerde de bulunmaktadır. Halofilik bakterilerde tetraeterlerin yokluğu yüksek tuzlulukta halobakteriyal membran yapısını akışkan tutma ihtiyacından kaynaklanmış olacağı düşünülmektedir. Çünkü tetraeter yapısı çift tabakayı birbirine kitleyerek bir monolayer tabakası oluşturmakta ve böylece daha sağlam bir yapı oluşturmaktadır. Ancak bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. (Russel, 1989). Gliserol eter yapısı bir baş grubu ile bağlantılıdır. Bu baş grubu fosfotidilgliserol, fosfotidilgliserolfosfat, fosfotidilgliserolsülfat olabilmektedir. Böylece difitanilgliserol dieterin analogları üretilmektedir (Russell, 1989). Baş grubundaki gliserol kısmı iki ya da üç şekerle glikolipidleri oluşturmak için glikozillenebilir buradaki son şeker sülfatlanabilir (Russell, 1989). Halofilik arkelerde, membran yapısında Finatil, sesterpanil ve izopirenoid içeren Dialkil gliserol dieterler (DGD) bulunmaktadır. 10% ile 30% NaCl(w/v) arasındaki tuz konsatrasyonlarında büyüeyebilen *Halorhabdus utahensis*, *Natronomonas pharaonis*, *Haloferax sulfurifontis* ve *Halobaculum gomorense* ile yapılan çalışmalar değişik tuz konsatrasyonlarına adaptasyon ile membranda bulunan lipitlerdeki dialkil gliserol dieterler (DGDs) ve

bunların doymuş, doymamış veya aşırı doymuş olmaları arasında bir korelasyonun olduğunu göstermiştir. Doygun olmayan DGD'ler yüksek tuzlu çevrelerde osmotik strese karşı oluşturulan fizyolojik bir yanıttır (Dawson ve ark., 2012).

Halofilik arkelerin çok büyük bir bölümü hücre zarlarında çok yüksek miktarda α -bakterioruberin'in C_{50} düz zincir türevli karotenoid pigmentlerinden ve daha az miktarda içerdikleri C_{40} tipi karotenoidlerden (likopen ve β -karoten) dolayı parlak kırmızıdan turuncuya kadar değişen renk tonlarında görülürler. Karotenoid pigmentleri sayesinde hücreyi iyonize radyasyona karşı korumaktadırlar ve fotoreaktivasyona yardım etmektedirler (Wu ve ark., 1983). Ayrıca halofilik arkelerde retinal pigment içeren 4 farklı protein tanımlanmıştır; bakteriyorodopsin (ışıkla çalışan dış proton pompası), halorodopsin (ışıkla çalışan iç Cl^- pompası) ve 2 adet alıcı rodopsin (ışığa duyarlı fototaksis olayına katılırlar). Mor pigmentli bakteriyodopsin, *Halobacterium salinarum* ve *Halorubrum sodomense*'de bulunmuştur (Oesterhelt, 1998; Oren, 2001). *H.salinarum*'daki bakteriyorodopsin retinal içeren sadece bir polipeptid zincirinden meydana gelmiş bir integral zar proteinidir. Bu protein hücre dışına protonların ışık ile transferini sağlayarak transmembran elektrokimyasal gradiyenti ile ATP sentezlenmesini sağlar (Yatsunami ve ark., 2000).

Halofilik arkelerin büyük bir bölümü, çözünür oksijen miktarı düşük olan tuzlu sularda oksijen ve ışık alınımlarını arttıran ve yüzmeye olanak sağlayan gaz vezikülleri içermektedirler. Ayrıca bu gaz veziküllerinin UV ışınlarına karşı da koruyucu kalkan görevi gördüğü belirtilmiştir (DasSarma, 1993; Beard ve ark., 1997).

Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuzda yaşamaları nedeniyle ortamda düşük su aktivitesi bulunmaktadır. Biyolojik membranlar suya geçirimli olduğu için hücre içi katı madde konsantrasyonu ortamdaki tuz konsantrasyonuna ozmotik olarak en az eşit olacak şekilde ayarlanmaktadır. Aksi takdirde hücre su kaybedecektir. Bunun dışında hücrenin genişlemesine ve büyümesine izin vermek için minimal turgor basıncının en az düzeyde var olması gerekmektedir. Mikrobiyal yaşam gerekli ozmotik ayarlamayı sağlamak için iki farklı strateji geliştirmiştir. Biyoyumlu moleküller biriktirmek ve hücre sitoplazmasında yüksek konsantrasyonlarda K^+ ve Cl^- iyonu biriktirmektir. Halofilik arkeler doymuş tuz konsantrasyonlarında (5,2 M NaCl) yaşayabilmek için "salt-in" stratejisi ile ozmotik dengeyi sağlamak zorundadırlar. Bu amaçla yüksek osmotik basınca karşı koyabilmek için sitoplazmalarında başta K^+ ve Cl^-

olmak üzere yüksek oranlarda iyonlar biriktirmektedirler. Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun, büyük kısmını KCl ve daha az olmak üzere NaCl oluşturmaktadır (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989). Halofilik arkeler, iç ortamlarında ozmolit çözünür madde olarak, dış ortamdakinin 100 katı oranında KCl biriktirdikleri için, hücresel bileşenleri de bu tuz konsantrasyonuna adapte olmuştur. Proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için bu tuz oranı gereklidir. Halofilik arkeler protein yapısında diğer canlılara göre negatif yüklü amino asit sıklığını arttırmış ve ortamın “salting out” etkisini dengelemek için polar olmayan amino asit miktarını azaltarak adapte olmuşlardır (Danson ve Hough, 1997; Sellek ve Chaudhuri, 1999; Hough ve Danson, 1999; Kunte ve ark., 2001).

Halofilik arkeler hücre çeperlerindeki asidik polisakkaritleri sayesinde dış ortamın yüksek tuz konsantrasyonu olan 5M NaCl’de yaşayabilmekte ve tuza gereksinim duymaktadır. Çeperde asidik polisakkaritlerin bulunması asidik olan ve eksi yüklü olan bu yapının pozitif bir yükü nötrleştirilmesi gerektirmektedir. Bu nötrleştirme olayı dışarıdaki habitatın tuz içeriği sayesinde gerçekleşmektedir. Optimum olarak yüksek tuzda yaşadıkları için ortamda tuzların yokluğunda hücreler ölmektedir. Çünkü çeperde bulunan asidik polisakkaritler nötrleşemediği zaman kimyasal bir olay olan iki negatif yükün birbirini itmesinden dolayı çeperde porlar oluşmakta ve hücre çeperi lizis olmaktadır. Bu nedenle yüksek tuz ekstrem halofilik Arke’ler için hayati önem taşımaktadır (Grand ve ark., 2001).

Halofilik arkeler aerobik ve heterotrofik karakterdedirler. Karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, glioksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi ile trikarboksilik asit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO), dimetilsülfoksit (DMSO), arjinin varlığında veya ışık varlığında bakteriyorodopsin aracılığıyla anaerobik olarak üreme yeteneğine sahiptirler (Hartmann ve ark., 1980; Mancinelli ve Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren ve Litchfield, 1999).

Halobacteriales ordosunda bulunan Halofilik arkeler önemli biyoteknolojik potansiyel ve uygulamalara sahiptirler. Halofilik arkelerin eter lipidleri esterazlara karşı dirençli oldukları için lipozom yapımında kullanılması ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren ekzoenzimleri,

yüksek tuz içeriğine sahip ortamlardaki makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Chaga ve ark., 1993; Margesin ve Scihinner, 2001). *Halobacterium salinarum*'dan elde edilen ışığa bağımlı proton pompası bakteriorodopsin önemli biyoteknolojik potansiyele sahip olup bilgi depolamada kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Oesterhelt ve ark., 1991). Bakteriorodopsin'in protein tabanlı güçlü bilgisayarlar da işlemci ve hafıza olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Birge, 1995). Ayrıca bakteriorodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması gibi alanlarda da biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Margesin ve Scihinner, 2001). Bazı halofilik arke türleri hücrelerinde biyoplastik yapımında kullanılan poli- β -hidroksialkonat (PHA) biriktirmektedirler (Rodriguez-Valera ve ark., 1991; Hezayen ve ark., 2002).

2.2. Tuzlu Ortamlarda Organik Maddelerin Biyodegradasyonu

Biyolojik parçalanma, kompleks kimyasal bileşiklerin biyolojik olarak katalizlenerek azaltılması ve daha az zararsız ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanabilir (Alexander, 1994). Organik kirleticilerin çoğu aerobik şartlar altında hızlı bir şekilde mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmektedir (Riser-Roberts, 1998).

Organik bileşiklerce kontamine olan çevreler genellikle aşırı tuzlu, asidik, bazik, yüksek veya düşük sıcaklık özellikleri ile karakterize edilmektedir. Yüksek tuz içeriğine sahip olan ortamlar oldukça önemli ekolojik değerlere sahiptir. Bu ortamlar insan ve/veya çevresel kaynaklı bazı nedenlerden dolayı organik kirleticilere maruz kalmaktadır.

Avrupa birliğinde yılda 30 milyon tonu aşan kullanımı dikkate alındığında NaCl'in ekonomik öneminin çok büyük olduğu anlaşılmaktadır. Tuzun kullanıldığı başlıca sektörler; kimya endüstri (özellikle kloralkali sektörü), yol buzunun çözülmesi ve tarım-gıda endüstrileridir. Bu alanlara oranla daha az kullanılan alanlar ise tekstil ve deri, petrol ve sert su yumuşatma sektörleridir. Tüm bu alanlarda hem tuz (NaCl) hem de organik madde yönünden zengin tuzlu atık sular üretilmektedir. Bu atık su arıtılmadan önce alıcı ortama verildiği zaman, toprak, yüzey ve yeraltı sularının kirlenmesi şeklinde ciddi zararlara neden olabilmektedir (Lefebvre ve Moletta, 2006). Tuzlu atık suların tipik atık su uygulamalarında kullanılan konvansiyonel

organizmalarla arıtımı zordur. Dilusyon yapmadan organik maddeleri biyolojik arıtımla gidermek için yüksek tuz derişimlerinde yaşamaya adapte olmuş organizmaların kullanılması gerekmektedir. Büyük bir kısmı arke domaininine ait ekstrem halofilik organizma enzimlerinin yüksek iyonik şiddette aktivite gösterecek şekilde adapte olmaları, yüksek tuz içeren endüstriyel atık suların biyolojik arıtımında bu organizmaların kullanım potansiyellerini arttırmaktadır (Hough ve Danson, 1999).

Tuzlu çevrelerde halofilik mikroorganizmalarca organik kirleticilerin biyodegradasyonu ile ilgili fazla bilgi bulunmamakla birlikte endüstriyel atıkların % 5'nin tuzlu ve aşırı tuzlu olduğu tahmin edilmektedir (Borgne ve ark., 2008). Tuzlu ve aşırı tuzlu çevreler endüstriyel aktiviteler neticesinde organik bileşiklerle kontamine edilmektedir (Oren ve ark., 1992). Organik bileşikler ve tuzca zengin atık sulardaki kontaminant gideriminin geleneksel organizmalarca gerçekleştirilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle, son zamanlarda halofilik ve/veya halotolerant mikroorganizmalarla biyodegradasyon proseslerinin uygulanması cazip hale gelmektedir. Artan tuz oranıyla birlikte organik bileşiklerin (hidrokarbonların) biyodegradasyonunun negatif yönde etkilendiği bildirilmiştir (Ward ve Brock, 1978). Mikrobiyal hidrokarbonoklastik aktivite üzerinde tuzluluğun etkisinin mikroorganizmaların habitatlarında maruz kaldıkları tuz derişimine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Çok düşük tuz konsantrasyonlarının hidrokarbonoklastik aktiviteyi azalttığı ve optimum biyodegradasyonun ılımlı tuzluluk oranlarında gerçekleşebileceği vurgulanmıştır (Abed ve ark., 2006; Díaz ve ark.,2002). Ancak tuzlu su sedimentlerinden izole edilen halofilik arke *Haloarcula vallismortis* ile eicosan gibi hidrokarbonların yüksek tuz konsantrasyonlarında daha iyi parçalanabildiğini gösterilmiştir (Bertrand ve ark., 1990). Son zamanlarda özellikle hidrokarbon parçalayabilme yeteneğinde olan halofilik arkelere olan ilgi tuzlu atıksulardaki petrol kirliliğine bağlı olarak artmıştır (Tapilatu ve ark., 2010). İlk bilinen hidrokarbon parçalayıcı arke, Bertrand ve ark. (1990) tarafından Aigues-Mortes tuzlu bataklığından izole edilmiş ve *Halobacterium* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, *Haloferax mediterranei* M-11 suşunun tek karbon kaynağı olarak petrolü kullanabildiği gösterilmiştir (Zvyagintseva ve ark., 1995). Tapilatu ve ark. (2010) *Haloarcula* ve *Haloferax* cinslerine ait arkelerin hidrokarbonları parçalayabildiğini göstermiştir. Erdoğan ve ark. (2013)'nın 16S rRNA sekans analizlerine göre tanımladığı *Halobacterium piscisalsi*, *Halorubrum ezzemoulense*, *Halobacterium salinarium*,

Haloarcula hispanica, *Haloferax sp.*, *Halorubrum sp.* ve *Haloarcula sp.* suşlarının tek karbon ve enerji kaynağı olarak *p*-hidroksibenzoik asit, naftalin, fenantren ve pireni kullanabildiği bildirilmiştir. Tuzlu petrol kaynakları ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen *Haloferax sp.* S1227 ve *Haloarcula sp.* D1 suşları ile yapılan diğer çalışmalarda, mikroorganizmaların benzoat, sinnamat, 3-fenilpropionat ve 4-hidroksibenzoik asit gibi organik bileşikler parçalayabildikleri gösterilmiştir (Fu ve Oriel, 1999; Gescher ve ark., 2002).

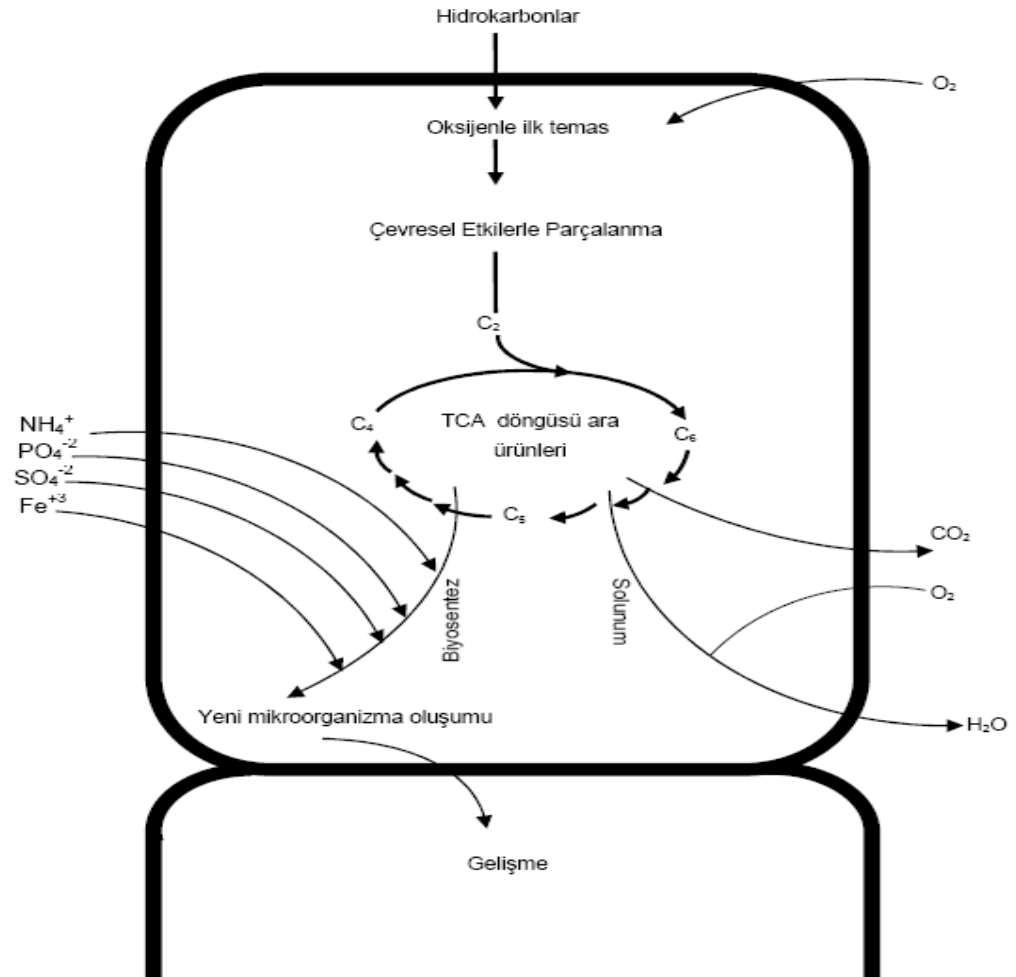
Arkeler dışında diğer bakteri ve fungusların dahil olduğu ılımlı halofilik/halotolerant organizmaların da petrol hidrokarbonları, aromatik bileşikler, fenol ve fenolik bileşikler, halojenli bileşikler ve organik solventler, BTEX (benzen, toluen, etilbenzen, ksilen), organofosforlu bileşikler ve tekstil boyalarını parçalayabildiği bildirilmiştir (Oie ve ark., 2007; Peyton ve ark., 2002; Borgne ve ark., 2008; Garcia ve ark., 2004; Bastos ve ark., 2000).

Ortamdaki hidrokarbonların mikroorganizmalarca yıkıma uğratılabilmesi için öncelikle bu bileşiklerin çözünebilir forma getirilmesi gerekmektedir. Bazı halofilik organizmaların hidrokarbonların çözünmesini sağlayan bazı maddeler üretebildikleri gözlenmiştir (Diaz ve ark., 2002). Tuzlu ortamlardaki hidrokarbonların biyodegradasyonu ortamdaki tuz konsantrasyonu ve ilgili hidrokarbonun çözünürlüğünün yanı sıra, önemli ölçüde oksijen miktarından da etkilenmektedir. Aerobik hidrokarbon biyodegradasyonunda oksijen önemli rol oynamaktadır. Tuz derişiminin artması ve çözünmüş oksijen miktarının azalmasına bağlı olarak degradasyon oranını azalmaktadır (Martins ve Peixoto, 2012).

2.2.1 Aerobik Biyodegradasyon

Aerobik mikrobiyal gelişim ve solunum oranı çözünmüş oksijen miktarına bağlıdır. Aerobik biyodegradasyon için kritik oksijen konsantrasyonunun 0.01-0.038 mg/l arasında değiştiği bildirilmiştir. Yüksek oksijen düzeylerinin aerobik hidrokarbon biyodegradasyonu için gerekli olduğu ve bu gereksinimin glukoz gibi daha küçük molekülle ağırlığına sahip ve aromatik olmayan bileşiklerin yıkımı için gereken oksijenden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Aromatik halkanın yıkımı süresince ko-substrat olarak oksijenin gerekli olduğu belirtilmiştir (Wilson ve Bouwer, 1997).

Mikroorganizmalar gelişimlerini sürdürebilmek için karbon ve enerji kaynağı olarak organik kirleticileri kullanabilmektedir. Aerobik biyodegradasyonun temel enzimatik reaksiyonları oksijenazlar ve peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Oksijenazlar, substrat içerisine oksijeninin katılımını gerçekleştiren oksidoredüktazlardır. Aerobik degradasyon gerçekleştiren organizmalar metabolik yolda başlangıçtaki substrata atak esnasında ve solunum zincirinin son aşamasında olmak üzere 2 aşamada oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijenaz prosesleri, yıkımı zor olan organik kirleticilerin ko-metabolik degradasyonunu artırılmasında önemli bir role sahiptir. Organik kirleticilerin aerobik mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının temel prensipleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

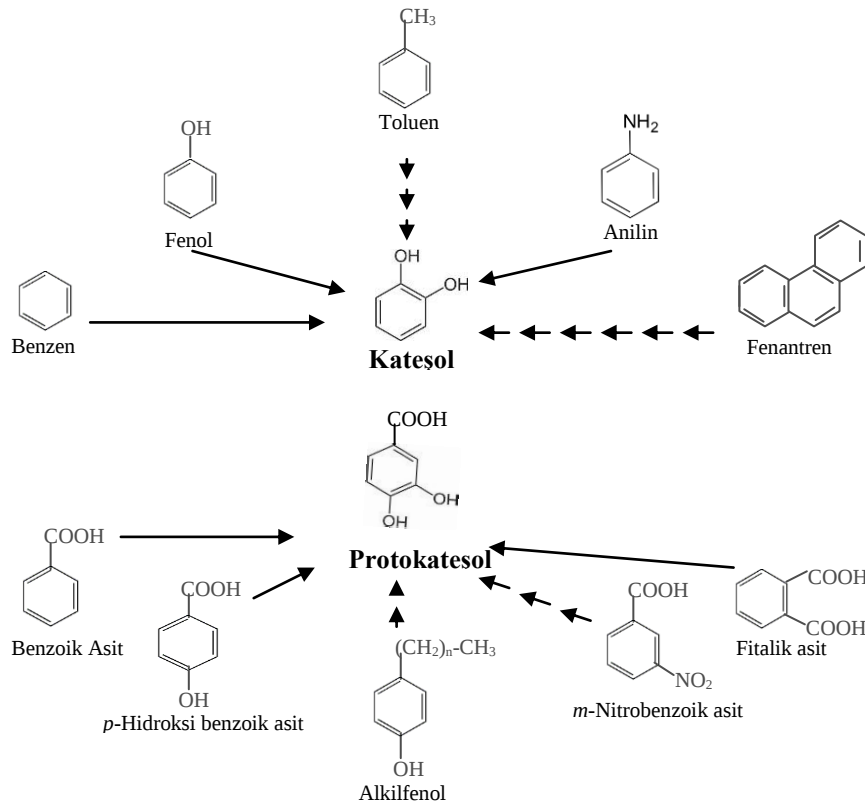


Şekil 2.1. Aerobik mikroorganizmaların tarafından hidrokarbonların parçalanması (Fritsche ve Hofrichter, 2008).

Organik kirleticilerin, aerobik mikroorganizmalar tarafından parçalanmasındaki temel prensipler (Fritsche ve Hofrichter, 2008);

- Mikroorganizmalar ve organik kirleticiler arasındaki metabolik proseslerin gerçekleşebilmesi için kimyasalların organizmalar tarafından erişilebilir olması gerekmektedir.
- Biyolojik parçalanmada hücre içinde gerçekleştirilen ilk aşama oksidasyondur. Bu aşama oksijenaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir.
- Organik kirletici hücre içerisinde metabolik yollar üzerinden kademeli olarak parçalanır ve merkezi parçalanma mekanizmasına girecek forma dönüştürülür.
- Mikrobiyal kütlelenin oluşması metabolitlerin biyosentezi ile sağlanır. Çeşitli biyosentezleme ve üreme için gerekli olan şeker glikoneogenez ile sağlanır.

Yapay organik aromatik bileşiklerin (ksenobiyotik) mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmesi için öncelikle doğada bulunan doğal bileşiklere dönüştürülmesi gereklidir. Bu amaçla ksenobiyotik bileşikler öncelikle kateşol ve protokateşol'e dönüştürülür (Şekil 2.2).

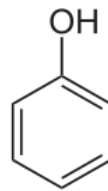


Şekil 2.2. Kateşol ve protokateşole dönüştürülen doğal ve yapay aromatik bileşikler (Fritsche ve Hofrichter, 2008).

Mikroorganizmaların oksijenazlar aracılığıyla hidrokarbonları oksitleyebilmeleri için aerobik şartlar gereklidir. Ortamdaki tuz konsantrasyonunun hem osmotik basıncı arttırması hem de oksijen çözünürlüğünü azaltması nedeniyle aerobik degradasyonu olumsuz yönde etkilenmektedir. Ulrich ve ark. (2009), artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak alifatik ve aromatik substratların mineralizasyonunun azaldığını bildirmiştir.

2.2.2. Fenol ve Biyodegradasyonu

Fenol, mevcut organik bileşikler içerisinde en yaygın kullanılan maddedir ve bir çok sentetik organik bileşiğin temel yapısal birimini oluşturmaktadır. Doğada fenol, ölü çürüyen organik madde ve kömürde bulunur. Alman kimyacı Runge 1834 yılında kömür katranından fenolü izole etmiş ve karbolsaure (kömür-petrol asidi ya da karbolik asit) olarak isimlendirmiştir ve 1841 yılına kadar fenolün kimyasal yapısının bilinmediği tahmin edilmektedir. Fenol (hidroksi benzen) (Şekil 2.3) hem sentetik hem de doğal olarak üretilen aromatik bileşiktir. İlk olarak demiryolu traverslerinin ve gemi kalaslarının bozulmasını önlemek ve lağım arıtımı esnasında kokuyu önlemek amacıyla kullanılmıştır. Oda ısısında yarı-şeffaf, renksiz, kristal yapıda, su ile karıştırıldığında beyaz toz ya da kıvamlı bir sıvı görünümündedir. Kristalleri higroskopiktir ve havayla temas edince kırmızı-pembe renge dönüşür. Suda daha az olmak üzere alkol, gliseril ve petrolde çözünür. Fenol ve türevleri büyük ölçüde yükseltgenebilir olduklarından sudaki çözünmüş oksijeni alarak suyun oksijenini azaltırlar (Basha ve ark., 2010)



Şekil 2.3. Fenolün (Hidroksi benzen) kimyasal yapısı

Fenol ve türevleri, reçine, farmasötik, boya, pestisit plastik, patlayıcı, herbisit üretimi, kömür endüstrisi ve rafinerilerde yaygın olarak kullanılmakta ve sulara karışmaktadır. Çevreye doğal yollardan da fenol girişi olmaktadır; lignin, tanen gibi aromatik halka içeren polimerlerin biyodegradasyonu ve aromatik amino asit öncüllerinden kaynaklanan metabolitler. Ayrıca ahşap koruyucu ve fungusit sentezinde yaygın olarak kullanılan ksenobiyotiklerin biyodegradasyonu sonucu açığa çıkan

metabolitler şeklinde de doğal ortama verilmektedir (ATSDR,1998; Abd-El-Halem ve ark., 2002).

Fenoller, düşük konsantrasyonlarda bile insan dahil tüm organizmalara zararlı oldukları için öncelikli ve tehlikeli kirleticiler sınıfında yer almaktadır (Banat ve ark., 2000). Fenol genel bir bakterisidal etkiye sahiptir, örneğin *E. coli*'de fenol uygulaması sonrası, ATP ve potasyum iyonlarının membrandan geçtiği gösterilmiştir (Van Schie ve Young, 2000). İçme ve sulama sularında fenol bulunması, insanlar ve hayvanlar açısından ciddi bir sağlık tehlikesi oluşturmaktadır. Fenollerin insanlar üzerinde, solunum yollarında tahriş, baş ağrısı ve gözlerde yanma gibi kısa dönemli etkileri (akut) ve düşük düzeyde fenole maruz kalmış insanlarda halsizlik, kas ağrısı, sinirlilik, kilo kaybı ve yorgunluk şeklinde uzun dönemli (kronik) etkileri olduğu tespit edilmiştir. Yüksek düzeyde maruz kalmış insanlarda ise, akciğer kanserinde artışa, kalp hastalıklarına ve bağışıklık sisteminin olumsuz etkilenmesine neden olduğu belirtilmiştir (IRIS, 2002).

Genellikle petrol rafineleri ve kömür işletme tesisleri gibi endüstrilerden çevreye bırakılan fenol ve bileşiklerinin ekolojik dengeyi bozarak, akuatik yaşamı olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. 5-25 mg/L gibi düşük konsantrasyonlarda dahi balıklar üzerinde öldürücü etkileri bulunduğu tespit edilmiştir (Saha ve ark., 1999). Ayrıca fenol içeren suların klorlanması sonucu oluşan poliklorlu fenol bileşiklerinin, canlılar üzerinde doğrudan toksik etki yaptığı belirlenmiştir (Nakhia and Al-Harazin, 1993; Yeom ve ark., 1997; Saha ve ark.,1999).

Çok düşük derişimlerde dahi organizmalara zarar veren fenoller, atık sulardaki öncelikli kirleticiler olarak kabul edilmektedir. Çevre koruma örgütü (EPA) atık sulardaki fenol miktarının 1 ppm den daha düşük olması için düzenlemeler yapmaktadır (Al-Asheh ve ark., 2003). Biyosfer için oldukça toksik olan fenolün giderimi önemli olup, bu amaçla kimyasal, fiziksel ve biyolojik teknikler kullanılabilir. Solvent ekstraksiyonu, adsorpsiyon, oksidasyon, katyonik maddeler ile koagülasyon işlemi, ozonlama, iyon değişimi ve membran filtrasyonu gibi biyolojik olmayan yöntemlerle fenol giderimi gerçekleştirilmektedir. Ancak bu tekniklerin maliyeti yüksek olmakta ve zararlı yan ürünler açığa çıkmakta ve tek başına bu yöntemlerin kullanılması pek etkili de olmamaktadır. Biyolojik yıkım yöntemleri ise daha düşük bütçe gerektirdiği ve kullanılan mikroorganizmaların bir dizi katabolik reaksiyonlarla mineralizasyonu tam

gerçekleştirdiği için tercih edilmektedir (Diaz ve Prieto, 2000; Buska ve ark., 2008; Basha ve ark., 2010).

2.2.2.1. Fenol Biyodegradasyonu

Fenol biyodegradasyonu bakteri, fungus ve aktinomisetleri içeren çok değişik mikroorganizmaların aktiviteleri sonucunda gerçekleşmektedir. Çeşitli bakteri suşları (Babu ve ark., 1995; Ahamad ve Kunhi 1996; Ahamad ve ark., 1996; Mordocco ve ark., 1999; Prieto ve ark., 2002; Chung ve ark., 2003; El-Sayed ve ark., 2003; Feitkenhauer ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2005; Karigar ve ark., 2006; Shetty ve ark., 2007; Agarry ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009; Ma ve ark., 2010), bazı mayalar (Fialova ve ark., 2004; Yan ve ark., 2005; Agarry ve ark., 2008) ve miselli funguslar (Anselmo ve ark., 1989; Santos ve ark., 2003; Agarry ve ark., 2008; Yordanova ve ark., 2009) fenolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Saf ve karışık kültürler kullanılarak fenolün biyodegradasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Collins ve ark., 2005; Dursun ve Tepe, 2005; Marrot, 2006; Laowansiri ve ark., 2008; Celik ve ark., 2008; Shen ve ark., 2009; Santos ve ark., 2009).

Fenol biyodegradasyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda kullanılan mikroorganizmaların (*Pseudomonas Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Fusarium sp*, *Phanerocheate chrysosporium*, *Corious versicolor*) yüksek tuz konsantrasyonunda üremeleri inhibe olmaktadır (Prieto ve ark., 2002). Tuzlu ortamlarda fenol ve fenolik bileşiklerin biyoremediasyonunun sıradan mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmesi mümkün değildir. Ekstremofillerden halofilik organizmaların enzimleri yüksek iyonik şiddette aktive gösterecek şekilde adapte olduğu için özellikle yüksek oranda tuz içeren endüstriyel atık sulardaki fenolün biyolojik yıkımını sağlayarak giderimi konusunda halofilik/halotolerant bakteri ve/veya halofilik arkelerin kullanım daha etkili bir seçenek olarak görülmektedir. Endüstriyel prosesler sonucunda açığa çıkan fenolik bileşiklerin arıtımında karşılaşılan en büyük problem, degradasyon etkinliğini azaltan yüksek miktardaki tuzdan dolayı, son zamanlarda fenol degradasyonu ile yapılan çalışmalarda halofilik organizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Halofililik ve halotolerant bakterilerle fenol biyodegradasyonu üzerine az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, endüstriyel potansiyele sahip ekstreozimler içeren halofilik arkelerin fenol degradasyonu ve detoksifikasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Woolard ve Irving (1995), büyük tuz gölünden izole ettikleri halofilik bakteriyal biyofilmi ile, Hinteregger ve Schreiber (1997) ise aynı bölgeden izole ettikleri ve fenol parçalayabilen ve optimum %3-5 arasındaki tuz konsantrasyonunda üreyen *Halomonas* suşu ile fenol degradasyon kapasitesi ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Alva ve Peyton (2003)'un yaptığı diğer bir çalışma ile haloalkalifilik bir bakteri olan *Halomonas campisalis*'in fenol ve kateşol biyodegradasyonu yapabildiği bildirilmiştir. *Coprinus cinereus*, *coprinus micaceus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Graphium* sp. FIB4, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon cutaneum* gibi fungusların fenolü ve fenolik bileşikleri kullanabildiği ve bu organizmalar arasından sadece *Candida tropicalis*'in osmotik stres altında fenolü parçalayabildiği bildirilmiştir (Bastos ve ark., 2000; Singh, 2006).

Yüksek fenol konsantrasyonu birçok mikroorganizma için toksik özelliğe sahip olduğundan dolayı substrat inhibisyonunun üstesinden gelebilmek için adaptasyon, hücre immobilizasyonu ve yeast ekstrakt ya da glukoz gibi diğer karbon kaynağı ilavesi uygulamaları yapılmaktadır (Lop ve Tar, 2000; Masque ve ark., 1987; Loh ve Wang, 1998; Viggiani ve ark., 2006). Mikroorganizma hücrelerinin yüksek fenol konsantrasyonlarına adaptasyonunun, substrat inhibisyonu problemi çözümünde en etkili yöntem olduğu bildirilmiştir (Lob ve Tar, 2000). Yüksek fenol konsantrasyonlarına adaptasyonla, fenol yıkımına karışan belirli intraselüler enzimlerin ifade edilerek mikroorganizmaların yüksek fenol ortamına uyumu sağlanmaktadır (Kumar ve ark., 2004). Ayrıca adaptasyonla fenol parçalama etkinliği olmayan ya da düşük olan mikroorganizmalar etkin hale getirilebilmektedir. Arai ve ark. (1998) tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenolün bulunduğu bir ortamda gelişebilme yeteneği bulunmayan *Comamonas testosteroni* TA441'nin 2-3 hafta fenol içeren ortamda inkübe edildikten sonra fenolden yararlanabilme yeteneğinin kazandırılabilindiğini ve fenol hidroksilaz ve kateşol 2,3-dioksigenaz enzimlerinin fenole adapte hücrelerde indüklenebildiğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada, *Pseudomonas fluorescence* KNU417 suşunda ön-adaptasyon ile fenol yıkım oranının önemli ölçüde hızlandırılabilindiği ve adaptasyonla sağlanan bu etkinin kateşol 1,2-dioksigenaz indüksiyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Kwon ve Yeom, 2009).

Mikrobiyal adaptasyondaki yeni yaklaşımlardan birisi çapraz adaptasyondur. Aromatik bileşiklerden benzen, toluen gibi organik bileşiklere adapte edilen kültürlerin

fenole adapte edilen kùltùrlere kıyasla fenolù daha etkili bir şekilde parçalayabildikleri gösterilmiştir (Yoem ve ark., 1997).

Fenol, bakteriler tarafından aerobik şartlar altında karbondioksite, anearobik şartlar altında ise karbondioksit ve metana dönüştürölür (Fedorak ve Hrudey, 1986; Fedorak ve ark., 1986; Dobbins ve ark., 1987; Aquino ve ark., 1988). Ara ürün olarak benzoat, kateşol, *cis-cis* mukonat, β - ketoadipat, suksinat ve asetat açığa çıkmaktadır (Fedorak ve ark., 1986; Knoll ve Winter, 1987). Aerobik koşullar altında kararlı yapıda olan fenol, oksijen ilavesiyle karasız bir yapıya sahip olan kateşole dönüştürölür (Harwood ve Parales 1996; Basha ve ark., 2010). Fenol degradasyonunun ilk reaksiyonunda aromatik halka içine bir oksijen atomunun dahil ederek merkezi ara ürün olan kateşolün açığa çıkmasını sağlayan enzim fenol hidroksilaz (PH) (E.C.1.14.13.7). Sonraki aşamada kateşol halka yapısı *orto* veya *meta* oksidasyonu ile açılır. Aromatik halkanın açılması ile ilgili olan ana enzimler aromatik degradasyonu gerçekleştiren değişik bakteriler arasında korunmuş bölgelere sahiptir. Bu aşamada rol oynayan enzimler intradiol ve ekstradiol olmak üzere iki grup altında toplanmıştır. İntradiol enzimler iki hidroksik grubu (*orto*-yıkım) arasındaki halkanın yıkımını gerçekleştirirken, ekstradiol enzimler ise (*meta*-yıkım) bir hidroksil grubu ve onun hidroksillenmemiş karbonu arasındaki halkanın yıkımını gerçekleştirirler (Bonfá ve ark., 2013). Kateşol *orto*-yıkım ile *cis,cis*-mukonik aside dönüştürölür. Bu metabolik yol aynı zamanda β -ketoadipate yolu olarak da bilinmektedir. Bu yolu katalizleyen enzim kateşol 1,2-dioksigenazdır (EC 1.13.11.1). Kateşolün 2-hidroksimukonik semialdehide (2-HMSA) dönüşümü ise *meta* yıkım yolu ile gerçekleşir. Bu basamakta fonksiyon gösteren enzim ise kateşol 2,3-dioksigenazdır (EC 1.13.11.2) (Feist ve Hegeman, 1969; Ornston ve Stainer, 1966). Çeşitli reaksiyonlardan sonra *orto* yol sonunda süksinil-CoA ve Asetil-CoA oluşur. Diğer taraftan, *meta* yol sonunda ise pürivat ve asetaldehid oluşur. Her iki yol sonunda oluşan ürünler TCA döngüsüne katılırlar (Shingler,1996). Bu nedenle fenolün *orto*- metabolik yol yıkımı için *cis-cis*-mukonik asit, *Meta*- metabolik yol yıkımı için ise 2-hidroksimukonik semialdehit indikatör olmaktadır.

Aerobik halofilik ve ılımlı halofilik bakterilerin fenolü, temelde *meta*- ve *orto*-yıkım yolu ile parçaladığı, bazılarının bu iki yoldan sadece birini bazılarının ise her iki metabolik yolu kullanarak fenolü parçaladığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2006; Borgne

ve ark., 2008). Erdoğan ve ark. (2013), halofilik arke izolatlarıyla 4 farklı aromatik hidrokarbon yıkımı çalışması neticesinde, degradasyonun kateşol 1,2-dioksigenaz enzim varlığına bağlı olarak *orto* metabolik yolu üzerinden gerçekleştiğini bildirmiştir. *Halomonas* suşları ile yapılan çalışmalarda, fenolün kateşole yıkımında kateşol 1,2-dioksigenaz enziminin rol oynadığı belirtilmiştir (Hinteregger ve Schreiber 1997; Alva ve Peyton, 2003). Haloalkalifik *Halomonas* EF11 suşunda fenol yıkım yolunun kültür ortamındaki C/N oranına bağlı olarak *orto* ya da *meta* yolu üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (Maskow ve Kleinstuber, 2004). Wang ve ark (2007) *Acinetobacter* sp. PD12 ile yapılan fenol biyodegradasyonu çalışmasında, yıkımın kateşol 1,2-dioksigenaz ile yani parçalanmanın *orto*-yıkım yolu ile gerçekleştiğini belirtmiştir.

2.3. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği ve Monod Modeli

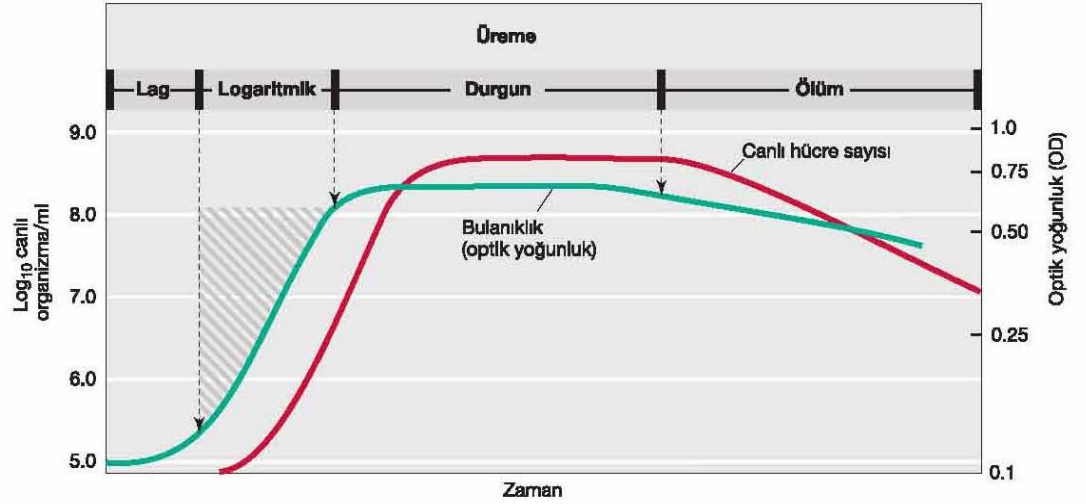
Biyodegradasyon reaksiyonlarında, matematiksel modellerin yer aldığı üreme kinetiği çalışmaları ile mikroorganizmaların mevcut substrattan ve ortam koşullarından nasıl etkilenebileceği belirlenebilmektedir. Bu modellerden elde edilen veriler, organizma-substrat ilişkisinin değerlendirilmesinde, etkin proseslerin ve reaktörlerin tasarlanmasında yol gösterici olmaktadır.

2.3.1. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği

Kesikli sistemde bir mikroorganizmanın üremesi, lag, üstsel (logaritmik) artış, durgun ve ölüm fazı olmak üzere farklı evrelerde gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.) (Telefoncu, 1995; Waites ve ark., 2001; Madigan ve Martinko, 2010).

Lag fazı: Besin ortamına inoküle edilen hücre miktarında başlangıçta bir değişikliğin olmadığı ve hücre bölünmesinin görülmediği kısa bir süreden sonra, yavaş hücre çoğalmasının gerçekleştiği (üstsel olmayan) aşamadır. Mikroorganizma biyosentez gerektiren bir besin ortamına ekildiğinde lag fazı görülür. Bu aşamada DNA miktarı artar, enzim sentezi devam eder ve hücrelerdeki RNA miktarında önemli artış olur.

Logaritmik üreme fazı: Üremenin üstsel olarak gerçekleştiği aşamadır ve üreme hızı maksimuma ulaşmaktadır. Bu aşamada RNA'ya oranla DNA sentezi daha fazladır. Bu evredeki hücre çoğalması kolayca hesaplanabilir.



Şekil.2.4. Kesikli üretilen bir bakteri popülasyonunun karakteristik üreme eğrisi (Madigan ve Martinko, 2010)

Durgun faz: Kültür ortamındaki besinlerin tüketilmesine ya da bazı atık ürünlerin üremeyi engelleyecek düzeyde birikmesine bağlı olarak yeni oluşan hücre sayısı ile ölen hücre sayısı dengelenir. Toplam hücre sayısında net bir artış ya da azalma olmaz, sabit kalır.

Ölüm fazı: Ölen hücrelerin sayısı yeni oluşarlardan daha fazladır. Ölüm fazı da logaritmiktir ancak logaritmik üreme evresinde gerçekleşene göre çok daha yavaştır. Otoliz sebebiyle ortamın yoğunluğu ve viskozitesi azalır (Telefoncu, 1995; Madigan ve Martinko, 2010).

Mikroorganizmaların spesifik üreme hızları ve substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki biyoteknolojide oldukça değerli bir ölçüt olarak kabul edilmektedir. Herhangi bir biyodegradasyon prosesinin modellemesinde biyomasın spesifik üreme hızı ile substratın tüketim hızı arasındaki denge ile ilişkisi göz önüne alınır. Spesifik üreme hızı (μ) hücrelerin spesifik üreme hızı olup hücre kütlesinin toplam biyokütleyle göre birim zamandaki artışıdır. Spesifik üreme hızı, üreme eğrisinin üstsel üreme fazına bağlı olarak ve üreme eğrisinin birinci türevi üzerinden belirlenmektedir (Telefoncu, 1995; El-Naas ve ark., 2009; Al-Khalid ve El-Naas, 2012).

2.3.2. Monod Modeli

Monod modelinde biyokütlenin artışı ortamda bulunan besine bağlıdır. Monod modeline göre, üremeyi sınırlandırıcı substrat konsantrasyonu arttıkça spesifik üreme hızı da (μ) artar. Kritik substrat konsantrasyonundan sonra ise bu değer sabit kalır. Bu değerden sonra substrat konsantrasyonundaki artış μ değerini etkilemez. Çünkü artık hücre üremesi besin sınırlamasında değildir. Substrat konsantrasyonu ile spesifik üreme hızı arasındaki ilişki;

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

olarak ifade edilmektedir ve;

μ = Spesifik üreme hızı

$\mu_{\max}$ = Maksimum spesifik üreme hızı

S = Substrat konsantrasyonu

K_s = Doygunluk sabiti ya da Monod sabitini ifade etmektedir (Okpokwasilli ve Nweke, 2005).

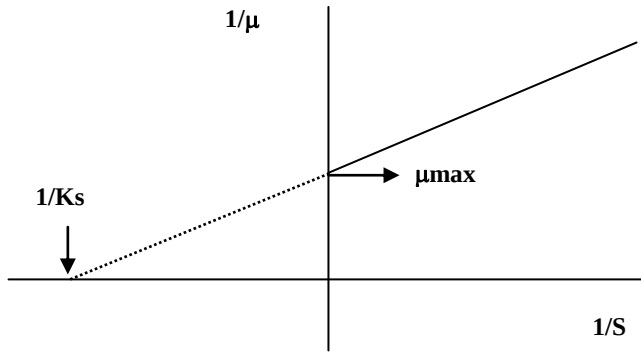
Monod modelindeki K_s , üreme hızının maksimum değerinin yarısına ulaştığı substrat konsantrasyonudur ve birimi mg/l'dir. Spesifik üreme hızının tersi alınarak Lineweaver-Burk ifadesine benzer bir eşitlik oluşturulabilir;

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S}$$

$1/\mu$ ile $1/S$ arasında çizilen grafikten (Şekil 2.5) K_s ve $\mu_{\max}$ değerleri hesaplanır. Düşük K_s değeri mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde de hızlı ürediğini gösterir (Higgins ve ark, 1985; Bailey ve Ollis, 1986).

2.3.3. Fenol Degradasyonu ve Üreme Kinetiği

Yüksek fenol konsantrasyonunun üremeyi sınırlandırıcı etkisi oldukça iyi bilinmektedir. Bu nedenle, karışık (Marrot ve ark., 2006; Gonzalez ve ark., 2001; Alcocer ve ark., 2007) ve saf kültürlerde (Bandhyopadhyay ve ark., 1999; Ho ve ark., 2009) üreme dinamiğinin tanımlanabilmesi için değişik substrat inhibisyon modelleri



Şekil 2.5. Hücre için Lineweaver-Burk grafiği (Atkinson ve Mavituna, 1991)

kullanılmaktadır. Fenollü ortamlarda fenol yıkımı ve mikrobiyal üreme kinetiğinin tanımlanması için Monod ve Andrew (Haldane) eşitlikleri ve bunların modifiye formları sıklıkla kullanılmaktadır (Sokol, 1998; Bandyopadhyay ve ark., 1998; Reardon ve ark., 2000; Oboirien ve ark., 2005). Monod (1949) ve Haldane (Andrew), (1968) eşitlikleri spesifik üreme hızına bağlı olmakla birlikte, spesifik substrat tüketim hızıyla da ilişkilidir (Edwards, 1970; Solomon ve ark., 1994). Bir başka araştırma grubu ise Yano ve Koga eşitliklerinin daha uygun olduğunu göstermiştir (Schroeder ve ark., 1997).

Kesikli kültürlerde gerçekleştirilen fenol biyodegradasyon çalışmalarında daha çok Monod üreme modeli tercih edilmektedir. Ancak yüksek fenol konsantrasyonlarında bu geçerli olamamaktadır. Üremeyi inhibe edici yüksek konsantrasyonlardaki fenol çalışmalarında Haldane metodunun daha uygun olduğu belirlenmiştir. Monod modelinde K_s değeri ile mikroorganizmaların substrata olan afiniteleri arasında ters orantı bulunmaktadır (Pirt, 1975). K_s değeri arttığında mikroorganizmaların substrata olan ilgileri azalmaktadır. K_s ve μ_{max} değerleri başlangıç fenol konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Başlangıç fenol konsantrasyonu arttırıldığında K_s değeri artarken, μ_{max} değeri azalmaktadır.

Peyton ve ark. (2002)'de yüksek tuz konsantrasyonlarında, karışık kültürler ile yaptıkları kinetik çalışmalarında, spesifik üreme hızının 0.09 ile 0.22 arasında değiştiğini ve bu oranın artan başlangıç fenol konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığını bildirmiştir. Non halofilik *Pseudomonas putida* ATCC 17484 ile yüksek fenol konsantrasyonlarında yapılan kinetik çalışmalarda μ_{max} ve K_s değerleri sırasıyla $0.03h^{-1}$ ve 280 mg/l olarak bulunmuştur. (González ve ark., 2001). Afzal ve ark. (2007) farmasötik endüstrisi atıksularından izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* ve

Pseudomonas pseudomallei ile yaptıkları kinetik çalışmalarında maksimum başlangıç fenol konsantrasyonlarındaki spesifik üreme hızını sırasıyla 0.016 h^{-1} ve 0.013 h^{-1} olarak bulmuştur. Her iki suş için düşük fenol konsantrasyonlarında lag fazının görülmediği ancak başlangıç yüksek fenol konsantrasyonlarında lag fazının uzadığı bildirilmiştir. Fenol yıkıcı suşların lag fazı başlangıç fenol konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak uzadığı ve lag fazı uzunluğunun, mikroorganizmaların önceden fenole adapte edilip edilmemesine bağlı olarak da değiştiği belirtilmiştir. *Pseudomonas putida* LY1 ile yapılan diğer çalışmada da başlangıç fenol konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak lag fazının 0-25 saat arasında değiştiği ve kesikli kültür ortamındaki fenolün tamamen bitmesine rağmen biyomass konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Li ve ark., 2010). Diğer araştırmacıların *Pseudomonas* suşları ile yaptığı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve deneysel aşamada gözlenemeyen ve fenolün parçalanması sonucunda açığa çıkan ara ürünlerin mikroorganizma hücreleri tarafından substrat olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Hao ve ark., 2002; Saéz ve Rittmann, 1993). *Pseudomonas putida* ATCC 49451 suşunun fenol degradasyonu ve üreme kinetiği ilişkisinde spesifik üreme hızının Haldane eşitliği ile ifade edilebileceği ancak fenol yıkım profilinin tanımlanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle, özellikle metabolik ara ürün inhibisyon etkisinin olduğu metabolik yolları için daha uygun olan yeni bir model önerilmiştir. Bununla beraber fenol biyodegradasyonu sonucunda meydana gelen bütün ara ürünlerinin etkisinin incelenmesi çok zor olacağı ve metabolik yolda oluşan temel ara ürünlerin etkisinin incelenebileceği belirtilmiştir (Loh ve Wang, 1998). Bir başka çalışmada ise *Pseudomonas putida* F1 suşunun fenol, toluen ve benzen varlığında üreme kinetiği çalışılmış ve ilgili kinetik parametrelerin belirlenebilmesi için Andrews modeli kullanılmıştır. Toluene, benzen ve fenol için bulunan maksimum spesifik üreme hızlarının sırasıyla 0.61 ; 0.62 ; 0.051 h^{-1} olduğu bildirilmiştir (Abuhamed ve ark., 2004).

Halofilik arkelerde ise bu tip çalışmaya rastlanılmamıştır ancak termoasidofilik arke *Sulfolobus solfataricus* 98/2 ile geri beslemeli bioreaktörde yapılan kinetik çalışmalarda yeni geliştirilen bir model kullanılmış ve spesifik üreme hızının $0.034 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ olduğu bulunmuştur. Geliştirilen modelde fenol yıkımı sonrasında biriken ara ürünlerin etkisi de göz önünde bulundurulmuştur. Çalışmada, spesifik fenol degradasyon hızı ve spesifik üreme hızının fenole adapte edilen hücrelerde glukoz

adapte edilenden daha yüksek olduğu ve fenole adapte edilen kùltùrlerde lag fazını kısaltđđı bildirilmiştir (Christen ve ark., 2011).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Fenol (C_6H_5OH), Sodyum klorür ($NaCl$), Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Mangan klorür ($MnCl_2$), Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Demir (III) klorür ($FeCl_3$), Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Borik asit (H_3BO_4), Amonyum nitrat (NH_4NO_3), Sodyum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), Amonyak (NH_3), 4-Aminoantipirin (4-AAP), Potasyum ferri siyanür ($K_3Fe(CN)_6$), İndol, N,N-dimetilformamid, Potasyum klorür (KCl), Sodyum sitrat, Kalsiyum klorür (KCl), Amonyum klorür (NH_4Cl), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Dipotasyum mono hidrojen fosfat (K_2HPO_4), Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), Kateşol, Sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), EDTA, Fosforik asit (H_3PO_4), Toluen ($C_6H_5CH_3$), Sodyum nitroprusid ($Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$), Asetonitril, Metanol (CH_3OH), Yeast ekstrakt, Etanol, Trizma, Agar Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Hassas Terazî	Ohaus EP 214C
Otoklav	Alp CL32S
Manyetik Karıştırıcı	Are
Sıcaklık Ayarlı Sabit inkübatör	Nüve EN 500
Sıcaklık Ayarlı Çalkalamalı İnkübatör	Edmund Bühler GmbH
Santrüfuj	Hettich zentrifugen EBA 12R
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1208
Laminer kabin	Kojair KR-130 Golden Line
Su Banyosu	Nüve BM 402
Vorteks	Mhisheler IKA
Etüv	Heraeus
pH metre	İnılab wtw series
Sonikatör	Bandelin

3.1.2. Halofilik arkeler

Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında bulunan ve Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden ve tekstil atık suyundan izole edilmiş 121 adet halofilik bakteri ve arke izolatu kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

Halofilik arke izolatlarının aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla Sehgall-Gibbons (SG) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri; 250 g/L NaCl, 20 g/L MgSO₄.7H₂O, 2 g/L KCl, 3 g/L Sodyum sitrat, 0.023 g/L FeSO₄.7H₂O, 7.5 g/L casamino asit, 1 g/L yeast ekstrakt içermektedir ve pH'ı 7.35'e ayarlanmıştır (Ozcan ve ark., 2007). Fenol biyodegradasyonu çalışmalarında Oren ve Porter (2009)'den modifiye edilen Fenol Mineral Tuz Ortamı (FMTO) (NaCl:200 g/L, MgSO₄.7H₂O:25 g/L, MgCl₂.6H₂O:10 g/L, CaCl₂.2H₂O:1.25 g/L, KCl: 5g/L, Trisma base, NH₄Cl (1M), Potasyum fosfat tamponu (0.5 M, pH 7.5), iz element çözeltisi (MnCl₂.4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, FeCl₃, CuSO₄.5H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, H₃BO₄, NH₄NO₃) kullanılmıştır. Fenol ve iz element çözeltisi membran filtre ile steril edildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Üretilmesi

Halofilik arke koleksiyonuna ait izolatlar gliserol stoklarından ardışık pasajlar yapılarak aktifleştirilmiştir. Katı ve sıvı ortama ekimi yapılan izolatlar 37 °C'de üretilmiştir. Sıvı ortamdaki üretimleri çalkalamalı olarak yapılmıştır.

3.2.2. Fenol Parçalayabilme Yeteneğine Sahip Suşların Taranması

Aktifleştirilen halofilik arke izolatlarının fenol degradasyon yeteneklerinin ve toleranslarının belirlenmesi amacıyla bileşiminde karbon kaynağı olarak sadece fenol (50, 100 ve 200 ppm) içeren tuzlu ortamlar kullanılmıştır. Fenol içeren katı besiyerlerine inokulum olarak, sıvı besiyerinde üretildikten (A₆₀₀~3) sonra steril koşullarda 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanıp 2 kez yıkanmış hücre peletleri kullanılmıştır. Hücre peletleri 20µl tampon ile süspanse edilmiş ve her bir besiyerine 4 µl olacak şekilde nokta ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37°C

sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Fenolü kullanabilen ve tolere edebilen suşlar besiyerindeki üremelerine bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Fenol kullandığı belirlenen suşların fenol parçalama etkinliklerinin değerlendirilebilmesi için içerisinde tek karbon kaynağı olarak 50 ppm fenol bulunan sıvı besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan sıvı ortamların inkübasyonu 120 rpm de 37°C’de yapılmıştır. Periyodik olarak her bir kültür ortamından örnek alınarak hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) belirlenmiş ve fenol tayini yapılmıştır.

Fenol içeren ortamda geliştiği ve fenolü kullandığı tespit edilen suşların sıvı ortamdaki fenol toleransları belirlenmiştir. Bu amaçla 50 ppm fenol içeren ortamda ürettiği ve fenolü kullandığı tespit edilen suşlar tek karbon kaynağı olarak 100 ppm fenol içeren ortama ekilerek 120 rpm de 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Yine periyodik olarak her bir kültür ortamından örnek alınarak hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) belirlenmiş ve fenol tayini yapılmıştır. Aynı işlemlere kademeli ve ardışık olarak 150, 200 ve 250 ppm fenol içeren ortamlar kullanılarak devam edilmiştir. Kademeli olarak artan fenol konsantrasyonunda üretim işlemleri sonucunda fenolü en etkin parçalayabilen halofilik arke suşları belirlenmiştir.

3.2.3. Fenol Tayini

Fenol konsantrasyonu 4-amino antipirin (4-AAP) metodu ile belirlenmiştir (Yang ve Humphrey, 1975). Santrifüj sonrası elde edilen kültür süpernatanın (2 ml) pH’ı fosfat tamponu ile 7.9’a ayarlanmış ve üzerine 0.1 ml NH₄OH (2 N) çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Karışıma 0.05 ml 4-aminoantipirin (%2) çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra üzerine 0.05 ml K₃Fe(CN)₆ (%8) çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 500 nm’de absorbans ölçülmüştür.

3.2.4. Halofilik Arke İzolatlarının Fenol ve Toluene Adaptasyonu

3.2.4.1. Fenol Adaptasyonu

Adaptasyon çalışması El-Naas ve Al-Muhtaseb (2009)’e göre yapılmıştır. Fenol yıkma etkinliğinin yüksek olduğu belirlenen halofilik arke suşu, kademeli olarak karbon kaynağının azaltılıp fenol konsantrasyonunun artırıldığı ortama ekilmiştir. Bu yöntemle mikroorganizmanın yüksek fenol konsantrasyonuna adaptasyonu sağlanmıştır. Son

aşamada ise karbon kaynağı olarak sadece fenol bulunan ortama ekim yapılmıştır. Halofilik arke izolatu, bileşiminde 50 ppm fenol ve % 0.1 yeast ekstrakt bulunan FMTO'ya ekilmiş ve 37°C'de, 120 rpm'de belirli hücre yoğunluğuna gelinceye kadar ($OD_{600} \sim 1$) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüjle toplanarak tamponla iki defa yıkandıktan sonra içerisinde 50 ppm fenol ve % 0.075 yeast ekstrakt bulunan ortama ekilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Adaptasyon çalışmasına benzer koşullarda ve aşağıda verilen fenol ve yeast ekstrakt oranları kullanılarak devam edilmiştir.

100 ppm fenol + % 0.075 yeast → 100 ppm fenol + % 0.05 yeast → 150 ppm fenol + % 0.05 yeast → 150 ppm fenol + % 0.025 yeast → 200 ppm fenol + % 0.025 yeast → 200 ppm fenol + % 0.005 yeast → 250 ppm fenol + % 0.005 yeast → 250 ppm fenol.

3.2.4.2. Toluen Adaptasyonu

Toluen adaptasyon çalışması Yeom ve ark. (1997)'den modifiye edilerek yapılmıştır. Bu aşamada kademeli olarak karbon kaynağı azaltılıp toluen konsantrasyonu artırılarak halofilik arke izolatının yüksek toluen konsantrasyonuna adaptasyonu sağlanmıştır. Adaptasyon aşamasında toluen içeren mineral tuz ortamı (TMTO) kullanılmıştır.

Halofilik arke izolatu, bileşiminde 10 ppm toluen ve % 0.1 yeast ekstrakt bulunan TMTO'ya ekilmiş ve 37°C'de, 120 rpm'de hücre yoğunluğu yaklaşık 1'e (OD_{600}) ulaşmaya kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj ile toplanarak tamponla iki defa yıkandıktan sonra içerisinde 20 ppm toluen ve % 0.075 yeast ekstrakt bulunan ortama ekilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Adaptasyon çalışmasına benzer koşullarda ve aşağıda verilen toluen ve yeast ekstrakt oranları kullanılarak devam edilmiştir.

30 ppm toluen + % 0.05 yeast → 50 ppm toluen + % 0.025 yeast → 50 ppm toluen

3.2.5. Halofilik Arke İzolatının Üreme Kinetiği

3.2.5.1. Hücre Yoğunluğu Standart Grafiği

SG besiyerinde üretilen izolatın hücre sayısındaki değişiminin belirlenmesi amacıyla kültür örneklerinin 600 nm'deki hücre yoğunluğu ölçülmüştür. Hücre yoğunluğu değerlerine karşılık gelen hücre sayısı (kob/ml), seri sulandırım ile yayma ekim yapılarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. Farklı Fenol Konsantrasyonlarındaki Üreme Eğrileri ve Üreme Kinetiğinin Hesaplanması

Halofilik arke izolatı farklı fenol konsantrasyonuna sahip ortamlarda geliştirilerek üreme eğrileri oluşturulmuştur. İzolatın spesifik üreme hızı (μ), maksimum spesifik üreme hızı (μ_{max}) ve Monod sabiti (K_s) hesaplanmıştır.

Farklı fenol konsantrasyonlarında geliştirilen izolatın periyodik olarak hücre yoğunluğu ölçülmüş ve hücre yoğunluğu standart grafiğinden yararlanarak hücre sayıları belirlenmiştir. Hücre sayısı ve zaman parametreleri kullanılarak izolatın üreme grafikleri çizilmiştir. Üreme grafiklerinden izolatın logaritmik üreme fazları ve logaritmik üreme fazlarında zamana bağlı değişen hücre sayısı (dx/dt) belirlenmiştir. Elde edilen değerlerin doğal logaritmaları hesaplanarak zamana karşı çizilen grafikten μ değerleri belirlenmiştir. Bulunan μ değerleri ile substrat konsantrasyonları kullanılarak çizilen grafikte Monod eğrisi oluşturulmuş ve eğri üzerinden μ_{max} ve K_s değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. Fenol Biyodegradasyon Koşullarının Optimizasyonu

Fenol biyodegradasyonu koşullarının optimizasyonu çalışmaları Bayoumi ve Abul-Hamd (2010)'dan modifiye edilerek yapılmıştır.

3.2.6.1. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Fenol Konsantrasyonunun Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine fenol konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla 50, 75, 100, 150 ve 200 ppm fenol içeren besiyerine % 10 ($OD_{600} \sim 1$) hücre kültürü inokule edilerek 120 rpm'de, 37 °C'de

inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.2. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine inokulum miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyonda fenol içeren besiyerine % 2.5, 5, 10, 15 olacak şekilde hücre inokulasyonu yapılmıştır. Kültürler 120 rpm’de, 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.3. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine NaCl konsantrasyon etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyonda fenol içeren besiyerine %10, 15, 20, ve 25 NaCl eklenerek optimum miktarda inokulasyon yapılmıştır. Kültürler 120 rpm’de, 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.4. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine pH’nın Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine pH’nın etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyonda fenol, NaCl içeren ve pH’sı 6, 7, 7.5, 8 ve 8.5’a ayarlanmış ortamlara optimum miktarda inokulasyon yapılmıştır. Kültürler 120 rpm’de, 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.5. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla daha önce tespit edilmiş olan optimum fenol, inokulum, NaCl, pH sabit tutularak hazırlanan kültürler 120 rpm’de, 25, 30, 37, 45 ve 50 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.6. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine çalkalama hızının etkisinin belirlenmesi amacıyla daha önce tespit edilmiş olan optimum fenol, inokulum, NaCl ve pH sabit tutularak hazırlanan kültürler optimum sıcaklık derecesinde 120, 140, 170 ve 200 rpm’de ve statik olarak inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.6.7. Fenol Biyodegradasyonu Üzerine Yeast Ekstrakt Miktarının Etkisi

Halofilik arke izolatının optimum fenol yıkımı üzerine yeast ekstrakt miktarının belirlenmesi amacıyla daha önce tespit edilmiş olan optimum fenol, inokulum, NaCl, pH sabit tutularak % 0.1 0.3, 0.05, 0.025 yeast ekstrakt içeren kültürler optimum sıcaklık ve çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Kültürlerden belirli periyotlarda örnekler alınarak hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.7. Fenol Degradasyon Ürünlerinin Analizi

3.2.7.1. Meta-Yıkım Analizi

Optimum fenol biyodegradasyon koşullarında geliştirilen halofilik arke kültüründen belirli periyotlarda 1ml örnek alınarak 4°C’de, 10.000 rpm’de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre peleti tris tamponunda (pH 8) süspanse edilmiş ve üzerine membranın çözünmesi için 0.5 ml toluen eklenmiştir. Elde edilen solüsyona 0.2 ml kateşol (1M) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Birkaç dakika içerisinde sarı rengin oluşup oluşmadığı gözlenmiştir (Nair, 2006).

3.2.7.2. Orto-Yıkım Analizi

Optimum fenol biyodegradasyon koşullarında geliştirilen halofilik arke kültürüne (2.5 ml) 1g amonyum sülfat ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Karışım 30°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen süspansiyonun pH’sı 0.5 ml amonyak (5N) ile 10’a ayarlanmıştır. 1% sodyum nitroprusid damlatılıp ve iyice karıştırılmıştır. Koyu mavi rengi oluşumu incelenmiştir (Nair, 2006).

3.2.8. Fenol Biyodegradasyonunda Rol Oynayan Enzimlerin Taranması

Enzim taranması işlemi Oren ve Mana, (2003) ve Serrano ve ark. (1998)'dan modifiye edilerek yapılmıştır. Ekspansiyon fazdaki kültür +4 °C'de, 15000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan hücre peleti KCI içeren yıkama tamponuyla iki defa yıkandıktan sonra tampon ilave edilerek +4 °C'de buz üzerinde sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. Süspansiyondan hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için +4°C, 15000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.8.1. Fenol Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini

Fenol hidroksilaz enzim aktivitesi NADH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür (Clauben ve Schmidt, 1998). Tris-HCl (pH 7.5, 50mM), 30 µl NADH (10 mM), 5µl fenol (10 mM) ve enzim kaynağı içeren reaksiyon karışımındaki NADH miktarı 25 °C'de 340 nm'de absorbans ölçülerek tayin edilmiş ve aktivite 1 dakikada 1µmol NADH'ın oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \text{NADH } (\mu\text{mol}) \times V_T (\text{ml}) / \text{enzim kaynağı (ml)} \times \text{zaman (dk)}$$

$$\text{NADH}_{\epsilon_{340}}: 36.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

3.2.8.2. Kateşol 1,2-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Kateşol 1,2-dioksigenaz enzim aktivitesi reaksiyon ortamında cis,cis-mukonik asit oluşumunun spektrofotometrik olarak (260 nm) ölçülmesiyle belirlenmiştir (Feist ve Hegeman, 1969). Enzim aktivitesi belirlenmeden önce enzim ektraktı %5 H₂O₂ ile inkübe edilmiştir. Tris-HCl (pH 7.5, 50 mM), 0.1 ml 2-merkaptoetanol (100 mM) ve enzim kaynağı içeren reaksiyon karışımındaki 25 °C'de 5 dakika içerisinde oluşan cis,cis-mukonik asit miktarı 260 nm'de absorbans ölçülerek tayin edilmiş ve aktivite 1 dakikada 1µmol cis,cis-mukonik asit oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \text{ürün } (\mu\text{mol}) \times V_T (\text{ml}) / \text{enzim kaynağı (ml)} \times \text{zaman (dk)}$$

$$\text{cis,cis-mukonik asit } \epsilon_{260}: 16.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

3.2.8.3. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu

Kateşol 2,3-dioksigenaz enzim aktivitesi reaksiyon ortamında 2-hidroksimukonik semialdehid oluşumunun spektrofotometrik olarak (375 nm) ölçülmesiyle belirlenmiştir (Feist ve Hegeman, 1969). Tris-HCl (pH 7.5, 50 mM), 0.2 ml kateşol (100 mM) ve enzim kaynağı içeren reaksiyon karışımındaki 25 °C’de 5 dakika içerisinde 2-hidroksimukonik semialdehid oluşumu 375 nm’de absorbans ölçülerek tayin edilmiş ve aktivite 1 dakikada 1µmol cis,cis-mukonik asit oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi (U/ml) = ürün (µmol) x V_T (ml) / enzim kaynağı (ml) × zaman (dk)

2-hidroksimukonik semialdehid ϵ_{375} : 36.000 M⁻¹.cm⁻¹

Kateşol 2,3-dioksigenaz enzim aktivitesinin optimizasyonu çalışmalarında optimum degradasyon koşullarında geliştirilen kültür kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin optimizasyonu için farklı NaCl konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerlerinde aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Optimum NaCl Konsantrasyonunun Saptanması

Optimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği NaCl konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 1.5, 2, 2.5, 3 ve 3.5 M NaCl içeren tampon çözeltileri kullanılmıştır.

Optimum Sıcaklık Derecesinin Saptanması

Optimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, optimum NaCl konsantrasyonuna sahip tampon çözelti ortamında 20, 27, 32, 37, 42, 47 ve 52 °C olmak üzere yedi farklı sıcaklık derecesinde inkübasyon yapılmıştır.

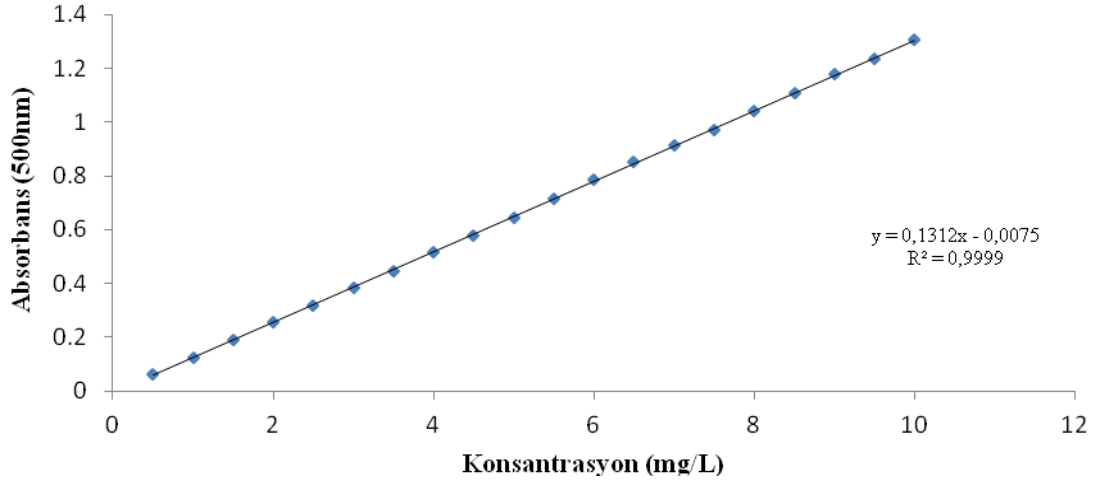
Optimum pH Değerinin Saptanması

Optimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH’ı 5.0, 6.0, 6.5, 7, 7.5, 8.0 ve 8.5 olan tampon çözeltileri kullanılmıştır.

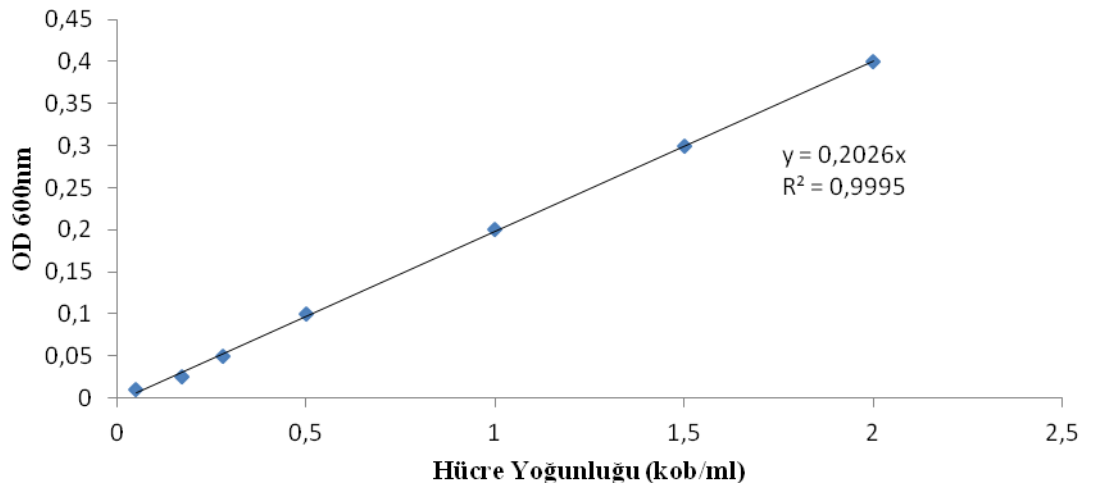
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Standart Grafikler

Fenol konsantrasyonunun ve hücre sayısının tayini için hazırlanan standart grafikler sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Fenol standart grafiği



Şekil 4.2. Hücre yoğunluk standart grafiği

4.2. Fenolü Parçalayabilen Suşların Taranması

Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden tekstil atık suyundan izole edilmiş halofilik mikroorganizma koleksiyonuna ait halofilik arke izolatları gliserol stoklarından aktifleştirildikten sonra 50, 100 ve 200 ppm fenol içeren FMTO katı besiyerine ekilmiş ve suşların katı besiyerindeki üreme yoğunluklarına göre tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenolü kullanma etkinlikleri ve fenol toleransları belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Üreme yoğunluklarına göre taranan izolatlar arasında halofilik arke olan B44A, A43, A138, A405, A235, A29B, A29C ve SD60'ın fenolü kullanabildiği ve 200 ppm fenol konsantrasyonuna toleranslı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya bu izolatlar ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1. Fenole toleranslı suşların değerlendirilmesi

İzolat	Fenol konsantrasyonu (ppm)			İzolat	Fenol konsantrasyonu (ppm)		
	50	100	200		50	100	200
B44A	+++++	+++++	++++	A82	---	---	---
A43	+++++	+++++	++++	A85	---	---	---
A83A	+++	+++	++	A137	---	---	---
F92A	+++	+++	++	A191	++	+	---
E49	+++	+++	++	A181A	+++	---	---
E57B	++++	++++	+++	A263A	---	---	---
E107	++++	++++	+++	A283	++++	+++	++
F4A	+++	+++	++	A337	+++	++	+
F23	---	---	---	A347	+++	++	+
F23A	---	---	---	A407	+++	++	+
F42A	---	---	---	A471	---	---	---
F73	+++	+++	++	A263A	---	---	---
D6	---	---	---	B88	+	---	---
D31	+	+	---	C13	---	---	---
D34	+	+	---	C37	+	---	---
D50	+	+	---	C15	++	---	---
D74	---	---	---	D1B	---	---	---
D91	---	---	---	D19	---	---	---
D58A	++	++	+	D108	---	---	---
A29B	++++	+++	++	D113	++	+	---
A29C	+++++	++++	+++	CHB3	++	+	+
CH7	+++	+++	++	E7	---	---	---
CHB1	---	---	---	E55	++	---	---
CH2	++	+	---	F5	++	---	---

üreme yoğunluğuna bağlı olarak; çok iyi (+++++); iyi (++++); orta (+++); zayıf (++); çok zayıf (+); üreme yok (---)

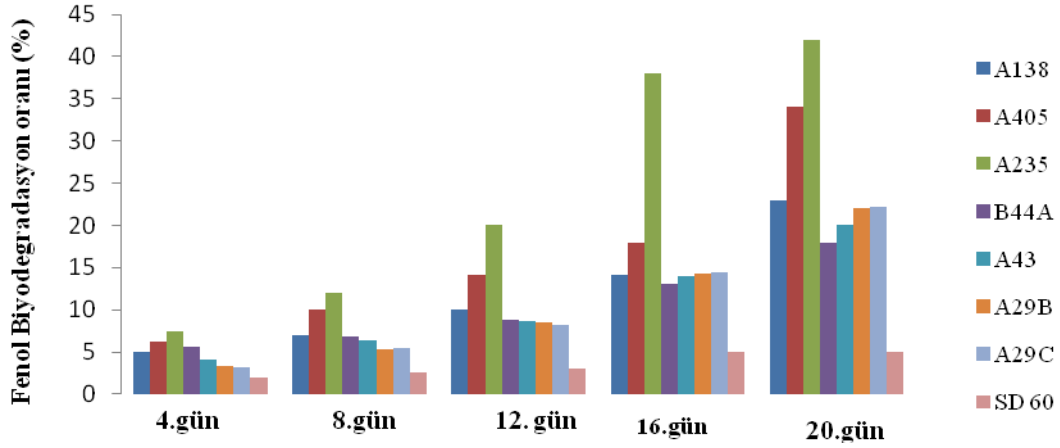
Çizelge 4.1. (Devam) Fenole toleranslı izolatların değerlendirilmesi

İzolat	Fenol konsantrasyonu (ppm)			İzolat	Fenol konsantrasyonu (ppm)		
	50	100	200		50	100	200
F42B	---	---	---	F100	++	+	---
CH8K	---	---	---	F30A	---	---	---
F89A1	+++++	++++	+++	F57A	+++	++	+
F36	+++	++	+	F75A	+	+	---
A87B2a	+++	++	++	A181A	++	+	---
CHC	+++	++	++	A43	+++++	++++	+++
F92B	++	+	+	A29A	+++	++	++
A408	---	---	---	A212	---	---	---
A62A	++	+	---	A138	+++++	++++	++++
A235	+++++	+++++	++++	A405	+++++	+++++	++++
A420	+++	++	+	A206B	++	+	---
B19	---	---	---	A87B1	++	+	---
B44B	++++	+++	+++	A87B2k	++	+	---
B49	++	+	---	B38A	++	+	+
B85	++	+	---	B38B	+	---	---
C23	++	+	---	B65	---	---	---
C36	++	+	---	B77B	+	---	---
D50	---	+	---	D107	---	---	---
E92A	---	---	---	SD31B	---	---	---
A206A	+	---	---	SD11K	++	---	---
B71	+++	++	+	SD7	++	+	---
B53	---	---	---	SD60	+++	+	---
B54A	---	---	---	SD30	---	---	---
D83A	+++	+++	+	SD50	---	---	---
D118A	---	---	---	SD8	---	---	---
E20	---	---	---	SD21O	++	---	---
E57A	++	+	---	HTX11	+++	++	++
F56	++	++	+	HTX22	+++	++	+
SD3	---	---	---	HTX2	++++	+++	+++
SD59	---	---	---	HTX10	+++	++	++
SD15	---	---	---	HTX1	++++	+++	++
SD23B	+++	+	+	HTX15	+++	+++	++
SD21Ş	---	+	+	HTX7	+++	++	+
SD23	---	---	---	HTX9	+++	++	+
SD26	+	---	---	HTX4	+++	++	+
SD37O	+	---	---	HTX14	+++	++	+
SD37Ş	---	---	---				

üreme yoğunluğuna bağlı olarak; çok iyi (+++++); iyi (++++); orta (+++); zayıf (++); çok zayıf (+); üreme yok (---)

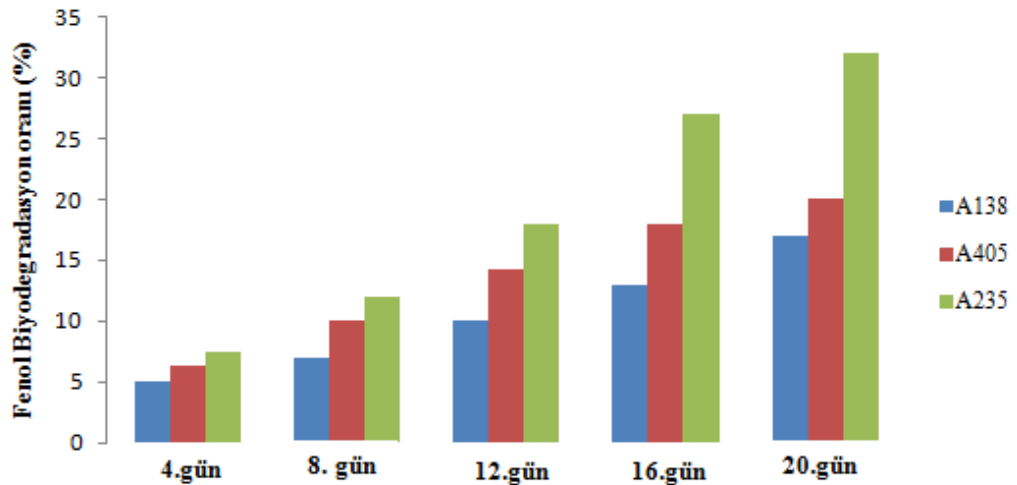
Seçilen suşların tek karbon kaynağı olarak 50 ppm fenol içeren sıvı ortamda fenol parçalama etkinlikleri, üreme yoğunluğu ve ortamdaki % fenol

konsantrasyonunun belirlenmesiyle tayin edilmiştir. A235, A405 ve A138 nolu izolatların fenol içeren ortamda daha iyi üreyebildiği ve fenolü daha etkili bir şekilde parçalayabildiği saptanmış ve bu izolatların üremenin 20. gününde fenolü parçalama oranları sırasıyla % 42, 34 ve 23 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Fenole toleranslı izolatların fenol biyodegradasyon (%) oranları

Seçilen üç izolat arasında fenolü daha efektif parçalayanın belirlenebilmesi amacıyla içerisinde tek karbon kaynağı olarak 100, 150 ve 200 ppm fenol bulunan ortamlardaki inkübasyon sonrası üreme yoğunluğu ve fenol tayininden elde edilen verilerin ortalamasından A235 izolatının fenolü daha etkin parçalayabildiğini göstermiştir (Şekil 4.4). Bu aşamadan itibaren çalışmaya A235 izolatıyla devam edilmiştir.



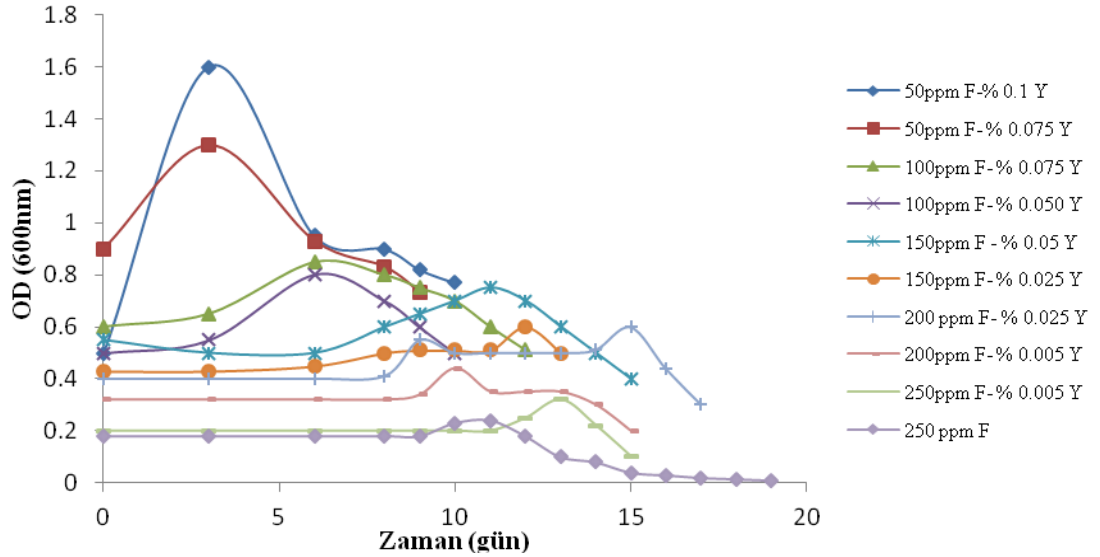
Şekil 4.4. A138, A405 ve A235 izolatlarının ortalama fenol biyodegradasyon (%) oranları

Fenol bakterisidal etkiye sahip bir kimyasal olmasına rağmen mikroorganizmaların büyük bir kısmı fenole karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirilebilmekte ve fenol mikroorganizmalar tarafından tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir (Van Schie ve Young, 2000). Halofilik olmayan mikroorganizmalarla fenolün biyodegradasyonu üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak halofilik arkelerle fenol degradasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte diğer halofilik ve/veya halotolerant organizmalarda ise sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. *Halomonas* cinsi üyelerinin, *Arhodomonas aquaeolei* ve *Modicisalibacter tunisiensis*'in, denizel kaynaklı bakteri suşu SM5'in, *Thalassobacillus devorans*'ın ılımlı halofilik bakteri konsorsiyumunun ve *Candida tropicalis* fungusunun farklı NaCl konsantrasyonlarında fenolü parçalayabildiği bildirilmiştir (Hinteregger ve Schreiber, 1997; Bastos ve ark., 2000; Munoz ve ark., 2001; Alva ve Peyton, 2003; Garcia ve ark., 2004; Maskow ve Kleinstuber, 2004; Garcia ve ark., 2005a; Hong-Xia, 2011; Bonfa ve ark., 2012). Ayrıca Woolard and Irvine (1994 ve 1995) ılımlı halofilik bakterilerle NaCl varlığında yapmış oldukları ardışık kesikli reaktör ve biyofilm çalışmalarıyla, fenolün yıkıldığını bildirmişlerdir.

4.3. Fenol ve Toluene Adaptasyon Sonuçları

Mikrobiyal komüniteler uzun süreli bir kimyasala maruz kaldığında ilgili kimyasalı yıkabilme yetenekleri artabilmektedir yani adapte olabilmektedir. Adaptasyon belirli enzimlerin indüklenmesi veya baskılanması ve genetik değişimle gerçekleşmektedir (Shimp ve Pfaender, 1987). A235 suşu ile etkili bir yıkım sağlayabilmek amacıyla ortamdaki yeast ekstrakt miktarı azaltılıp, fenol konsantrasyonu arttırılarak yapılan adaptasyon çalışması sonucunda; fenol konsantrasyonundaki artışın ve yeast ekstrakt miktarındaki azalmanın lag fazının uzamasına neden olduğu belirlenmiştir. Fenol konsantrasyonun aynı yeast ekstrakt miktarının azaltıldığı serilerde de lag fazında artış olduğu gözlenmekle birlikte yeast ekstrakt miktarı yüksek olan seride ise hücre yoğunluğunun daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). Genel olarak yeast ekstraktın üremeyi olumlu yönde etkilediği, toksik etkiye sahip olan yüksek fenol konsantrasyonlarının ise üremeyi olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Dolayısıyla Fenol adaptasyon çalışmasında ortama ilave edilen yeast ekstrakt miktarının A235 izolatının yüksek fenol konsantrasyonlarının büyüme inhibe edici özelliğine

karşı önemli bir avantaj kazandırdığı tespit edilmiştir. Fenol degradasyonunu yeast ekstraktın olumlu yönde etkilediği önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Krishnaswamy ve Namasivayam, 2010).

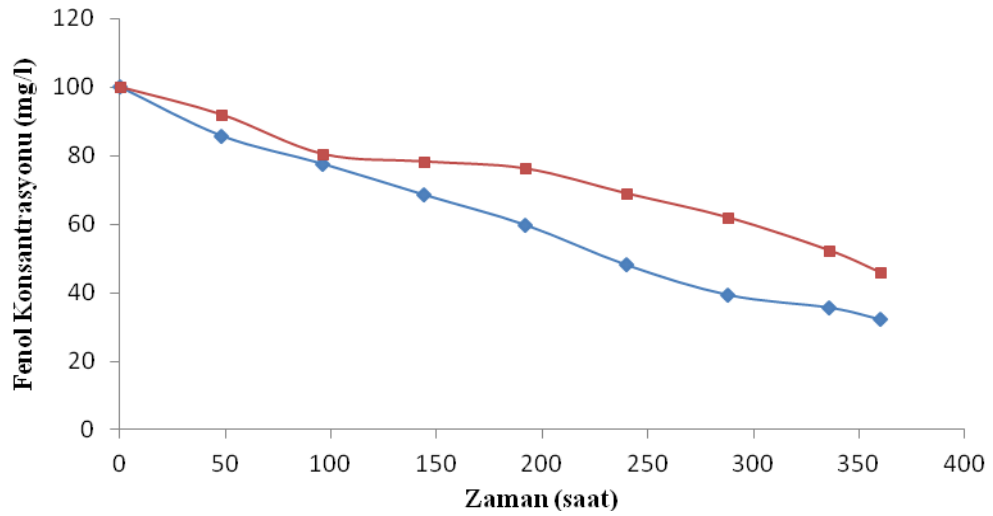


Şekil 4.5. A235 izolatının inkübasyon periyoduna bağlı olarak farklı fenol konsantrasyonu ve yeast ekstrakt miktarlarındaki üreme yoğunluğu (F:fenol; Y:yeast ekstrakt)

A235 izolatının tekrarlı ön-adaptasyon çalışmaları ile tek karbon kaynağı olarak maksimum 250 ppm fenol içeren ortamda uzun bir lag fazı aşaması sonrasında gelişebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). İlk aşamada yüksek fenol konsantrasyonu uygulamalarının substrat inhibisyonuna neden olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda fenol yıkımında adaptasyon tekniğinin etkili olduğu bildirilmiştir (Masque ve ark., 1987; Lob ve Tar, 2000). Ayrıca toksik özelliğe sahip fenolün adaptasyon tekniği ile daha etkili parçalanabildiği ve günümüzde endüstriyel proseslerdeki fenol degradasyon çalışmalarında ön basamak olarak adaptasyon tekniğinin kullanıldığı belirtilmiştir (Bastos ve ark., 2000). *Pseudomonas fluorescence* KNU417 ile yapılan diğer bir çalışmada ise, aynı fenol konsantrasyonunda yapılan tekrarlı ön-adaptasyon denemelerinde fenol degradasyon oranında önemli bir artışın olmadığı bildirilmiştir (Kwon ve Yeom, 2009). Genel olarak fenol biyodegradasyonu ile ilgili belirli intraselüler enzimlerin ifadesinin indüksiyonunda ve yüksek fenol miktarının inhibisyon

etkisinin azatılmasında adaptasyon tekniği önemli olabilmektedir. Çünkü bazı intraselüler enzimler adaptasyon aşamasında ifade edilerek mikroorganizmaların söz konusu fenol konsantrasyonunda gelişebilmesini sağlamaktadır (Kumar ve ark., 2004).

Toluenin, A235 izolatının fenol degradasyonunu ne ölçüde etkilediğinin belirlenmesi amacıyla fenol ve toluene adaptasyonu yapılmış her bir izolatın 100 ppm fenolü parçalama sonuçları Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. Toluen ve fenole adapte edilmiş A235 izolatının 100 ppm fenol içeren ortamdaki zamana bağlı fenol biyodegradasyonu (%). (◆, toluene adapte edilmiş izolat; ■, fenole adapte edilmiş izolat)

Membranda birikerek membran yapısını bozan toluen çok düşük düzeylerde dahi çoğu mikroorganizma için toksik olabilmektedir (Ramos ve ark., 2002). Ancak halofilik arke suşları, *Haloarcula vallismortis*, *Haloarcula* OHF-1 ve OHF-2 ile yapılan çalışmada, suşların yüksek tuz konsantrasyonlarında organik solventlere toleranslarının yüksek olduğu belirtilmiştir (Usami ve ark., 2005). Toluenin tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada ise toluenin *Halobacterium*, *Halococcus* ve *Haloferax* suşlarının üremesini desteklediği bildirilmiştir (Mailem ve ark., 2010b). Çalışmamızda toluene adapte edilen izolatın fenol yıkımında daha etkili olduğu saptanmış olup, fenolü % 67.7 oranında parçaladığı, fenole adapte edilen izolatın ise %54 oranında fenolü parçaladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Tek bir aromatik bileşiğe adapte edilen hücrelerin benzer yapıya sahip diğer aromatik bileşiklerin asimilatif kapasitesini artırabildiği bildirilmiştir (Shimp ve Pfaender, 1985).

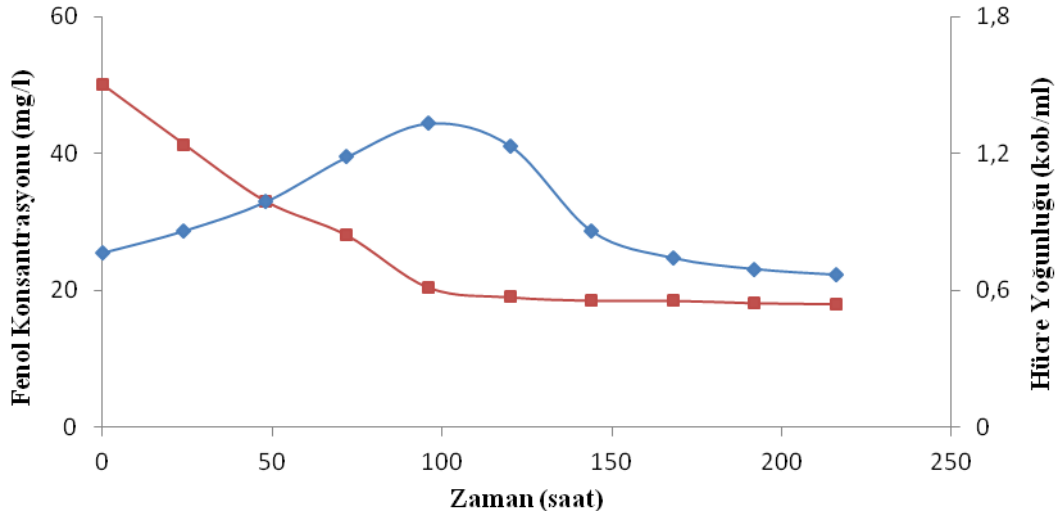
Non halofilik organizmalarla yapılan fenol yıkım çalışmalarında da benzer bulgulara değinilmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 ile yapılan fenol biyodegradasyon çalışmalarında benzen adapte edilen hücrelerde daha yüksek fenol yıkım oranı saptanmıştır (Yeom ve ark., 1997). *Pseudomonas putida* F1 ATCC 700007 (Pp F1)'in fenol, benzen ve toluen biyodegradasyonu üzerine adaptasyonun etkisi ile ilgili yapılan çalışmada mikroorganizmaların bu üç kimyasala adaptasyonunun biyodegradasyon süresini azalttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada toluen adaptasyonunun benzen adaptasyonuna göre fenol yıkımını daha fazla artırdığı belirtilmiştir (Abuhamed ve ark., 2004). *Pseudomonas* sp. OX1 suşunda, aromatik bileşiklerin tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlayan metabolik yolun başlangıç aşamasında toluen monooksijenaz, fenol hidroksilaz ve kateşol 2,3-dioksijenaz enzimleri yer almakta ve bu enzimler aromatik molekülleri oksidasyon reaksiyonları ile modifiye etmektedir. Modifiye edilen aromatik halkalar sonraki aşamalarda *meta* enzimleriyle bölünerek açığa çıkan ürünler bakterinin yaşaması için gerekli temel metabolik yollara girmektedir. Toluene monooksijenaz ve fenol hidroksilaz enzimleri geniş bir substrat spesifitesine sahiptir ve kendi doğal substratlarının yanı sıra çeşitli aromatik hidrokarbonları da okside etmektedir (Powlowski ve ark., 1994; Cafaro ve ark., 2004; Tinberg, 2011).

4.4. Üreme Kinetiği-Monod Modeli Sonuçları

4.4.1. 50 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

Karbon kaynağı olarak 50 ppm fenolde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.7'de verilmiştir.

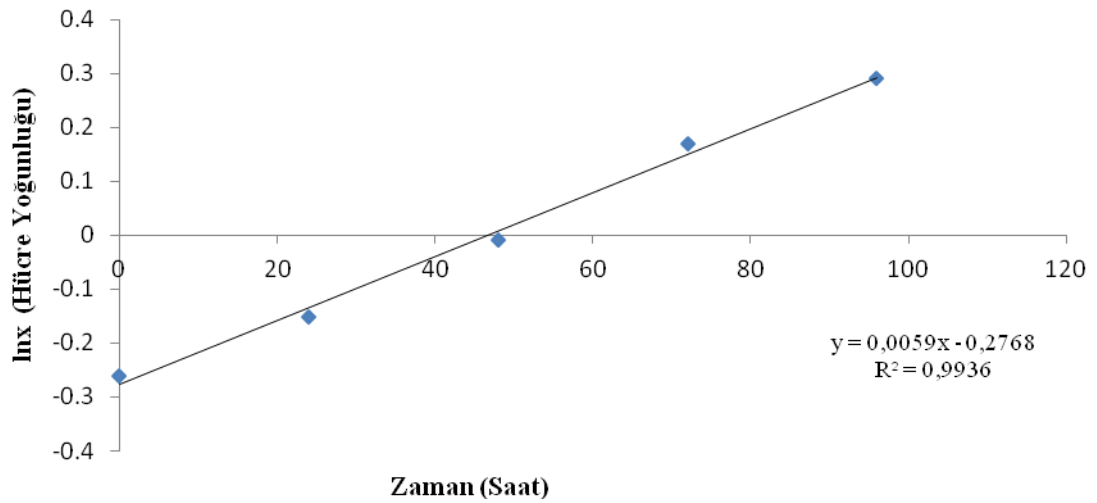
A235 izolatının 50 ppm fenol konsantrasyonundan elde edilen hücre yoğunluk grafiğinden lag fazının olmadığı veya çok kısa sürdüğü anlaşılmaktadır (Şekil 4.7). İlaç sanayi atıksularından izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas pseudomallei* ile yapılan kinetik çalışmalarda, her iki suş için düşük fenol konsantrasyonlarında lag fazı görülmediği ancak başlangıç fenol konsantrasyonu



Şekil 4.7. 50 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (◆, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

yüksek tutulduğunda lag fazının uzadığı bildirilmiştir (Afzal ve ark., 2007). Çalışmada en yüksek hücre yoğunluğu üreme periyodunun 96. saatinde saptanmış ve artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak fenol konsantrasyonun da önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. 144. saatin sonunda ortamdaki fenol konsantrasyonunun yaklaşık olarak % 80 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ölüm fazında ise fenol konsantrasyonunun sabit kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.7).

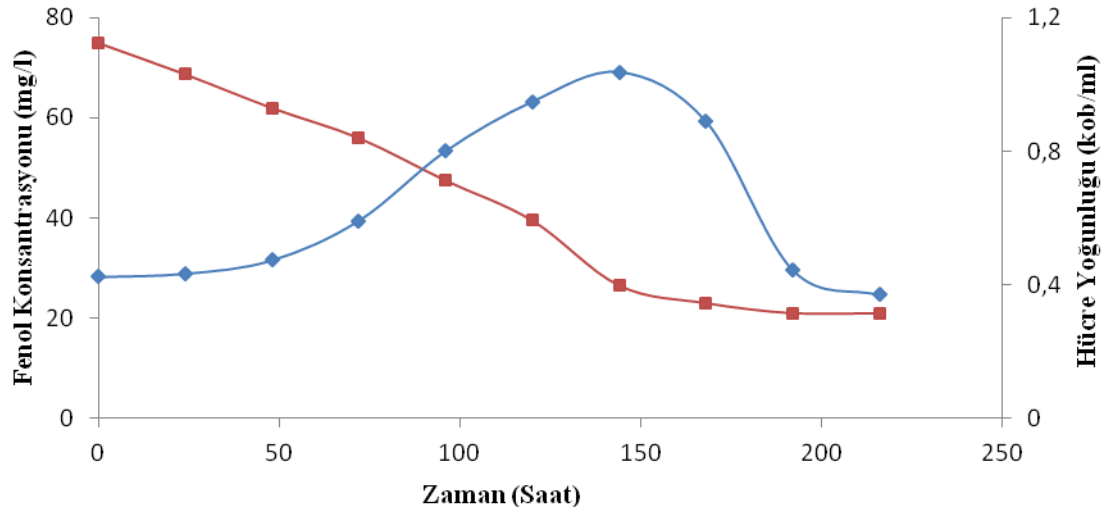
50 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. A235 izolatının 50 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln$ (hücre yoğunluğu)’in zamana bağlı değişimi

4.4.2. 75 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

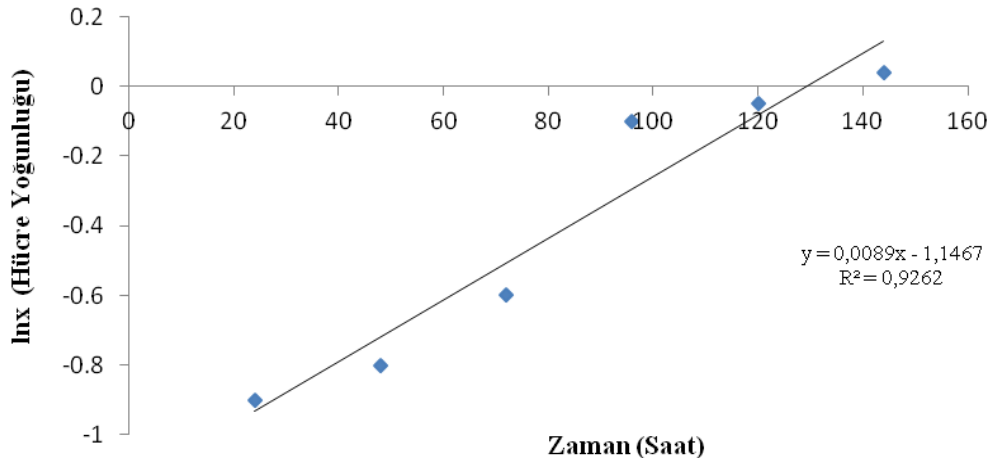
Karbon kaynağı olarak sadece 75 ppm fenol içeren besiyerinde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. 75 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (♦, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

A235 izolatının 75 ppm fenol konsantrasyonundan elde edilen hücre yoğunluk grafiğinden, lag fazının 48. saatte kadar sürdüğü saptanmıştır (Şekil 4.9). Fenol konsantrasyonunun lag fazında yavaş bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu üremenin 144. saatinde belirlenmiş olup, artan hücre yoğunluğuna bağlı fenol konsantrasyonunda ise önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. 192. saatin sonunda ortamdaki fenol konsantrasyonunun yaklaşık olarak % 72 oranında azaldığı belirlenmiştir. Hücreler ölüm fazına girdiğinde ise fenol konsantrasyonunun sabit kaldığı tespit edilmiştir.

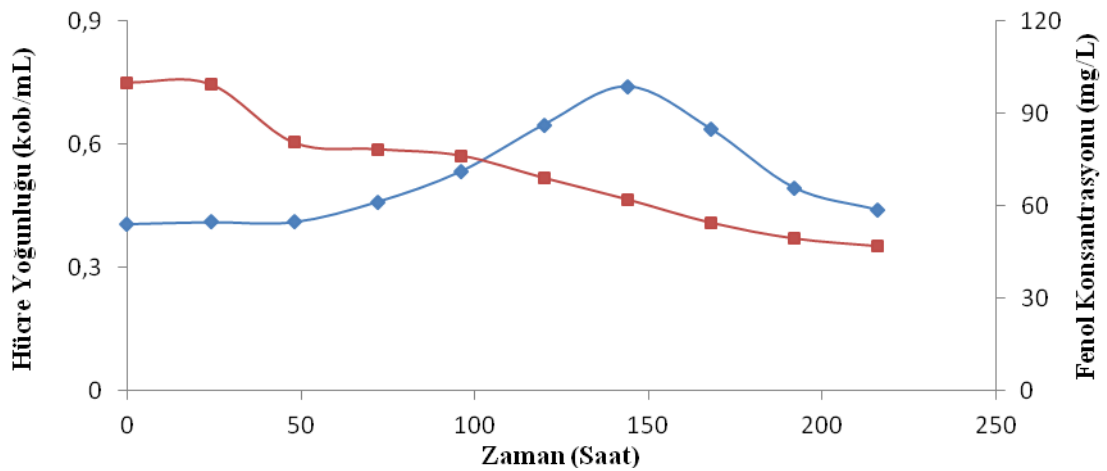
75 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (Hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.10. A235 izolatının 75 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln$ (hücre yoğunluğu)'nin zamana bağlı değişimi

4.4.3. 100 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

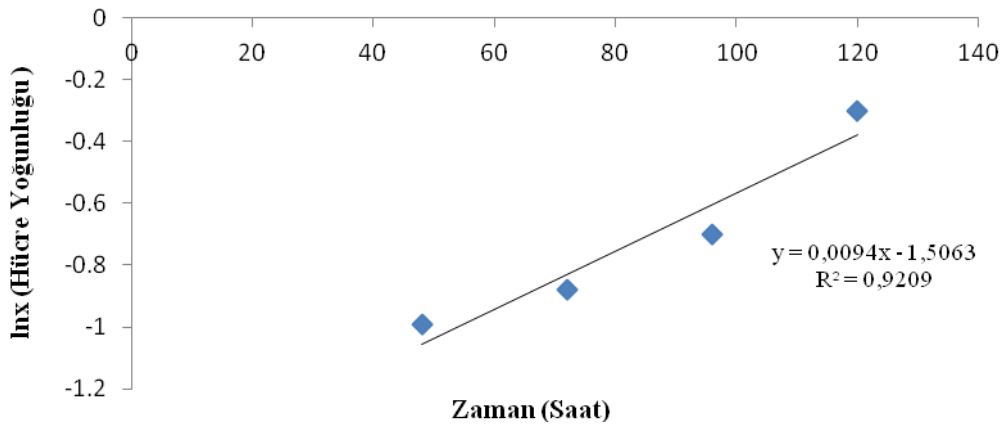
Karbon kaynağı olarak sadece 100 ppm fenol içeren besiyerinde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. 100 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (♦, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

A235 izolatının 100 ppm fenol konsantrasyonundan elde edilen hücre yoğunluk grafiğinden lag fazının 48. saatte kadar sürdüğü belirlenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu 150. saatin sonunda tespit edilmiştir. Fenol konsantrasyonu ise yaklaşık olarak ilk 24 saat sabit kalmış ve artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak azalma göstermiştir. Üreme periyodunun 216. saatinde ortamdaki fenol konsantrasyonunun yaklaşık olarak % 54 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

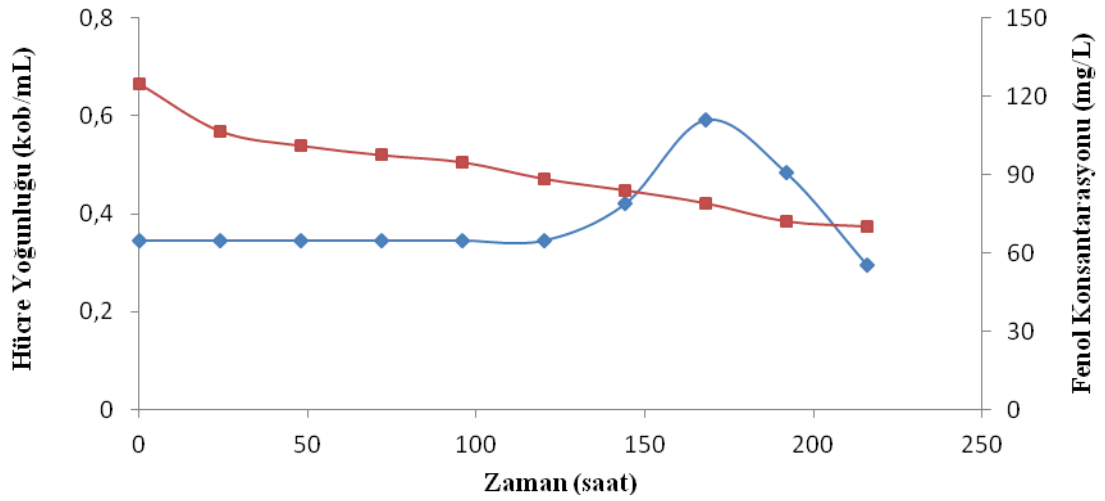
100 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (Hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. A235 izolatının 100 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln$ (hücre yoğunluğu)’in zamana bağlı değişimi

4.4.4. 125 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

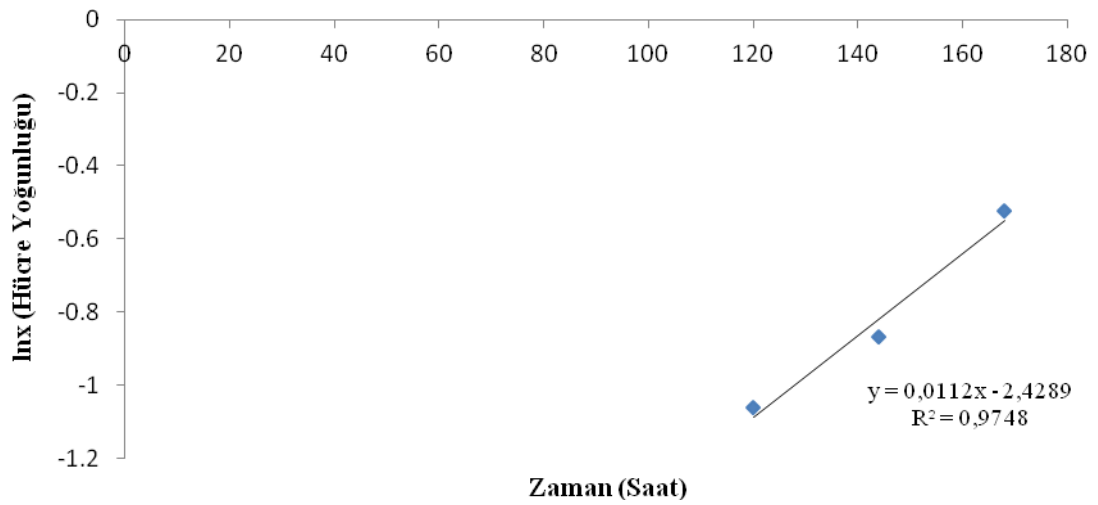
Karbon kaynağı olarak 125 ppm fenolde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.13’de verilmiştir. Hücre yoğunluk grafiğinden lag fazının 120. saatte kadar sürdüğü belirlenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu 168. saatin sonunda tespit edilmiştir. Fenol konsantrasyonu ise lag fazının ilk 24 saatinde sabit kaldığı ve ilerleyen süre içerisinde



Şekil 4.13. 125 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (♦, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

hücre yoğunluğunda önemli bir artış olmamasına rağmen fenol konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak fenol konsantrasyonunda daha hızlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Üreme periyodunun 192.saatte saatinde ortamdaki fenol konsantrasyonunun yaklaşık olarak % 47.2 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

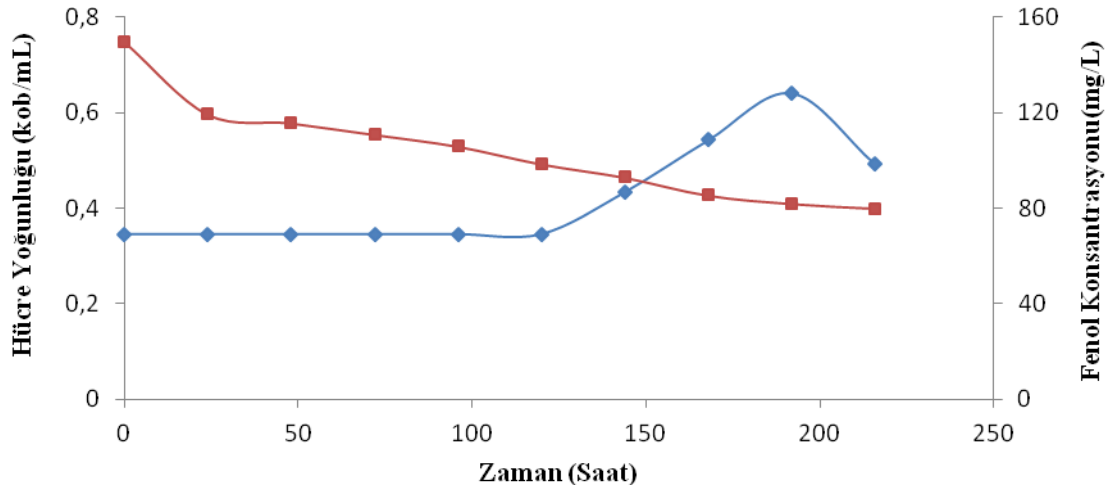
125 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (Hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14. A235 izolatının 125 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln$ (hücre yoğunluğu)’in zamana bağlı değişimi

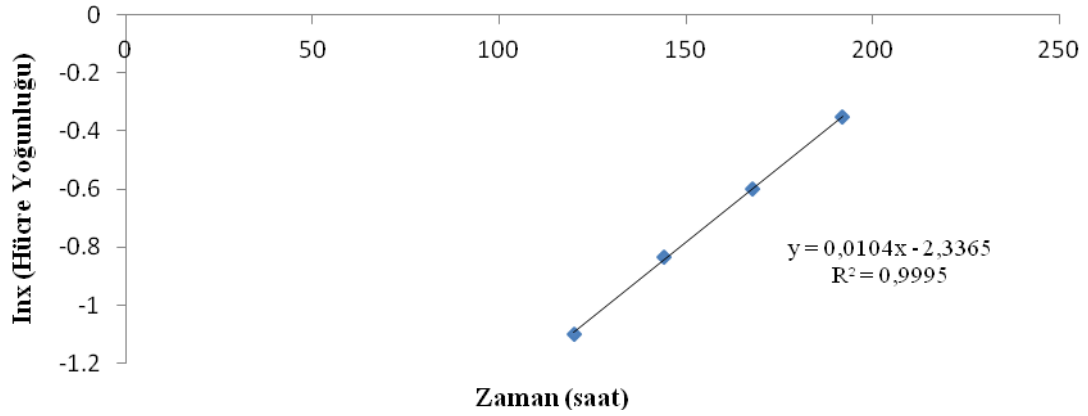
4.4.5. 150 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

Karbon kaynağı olarak sadece 150 ppm fenol içeren besiyerinde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.15’de verilmiştir. Hücre yoğunluk grafiğinden lag fazının 120. saatte kadar tespit edilmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu 192. saatin sonunda tespit edilmiştir. Fenol konsantrasyonu ise lag fazının ilk 24 saatinde sabit kaldığı ve ilerleyen süre içerisinde hücre yoğunluğunda önemli bir artış olmamasına rağmen fenol konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak fenol konsantrasyonunda lag fazına göre daha hızlı bir azalma olduğu saptanmakla birlikte azalmanın diğer fenol konsantrasyonlarına göre daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Üreme periyodunun 216. saatinde ortamdaki fenol konsantrasyonunun yaklaşık olarak % 46.6 oranında azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. 150 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi. (♦, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

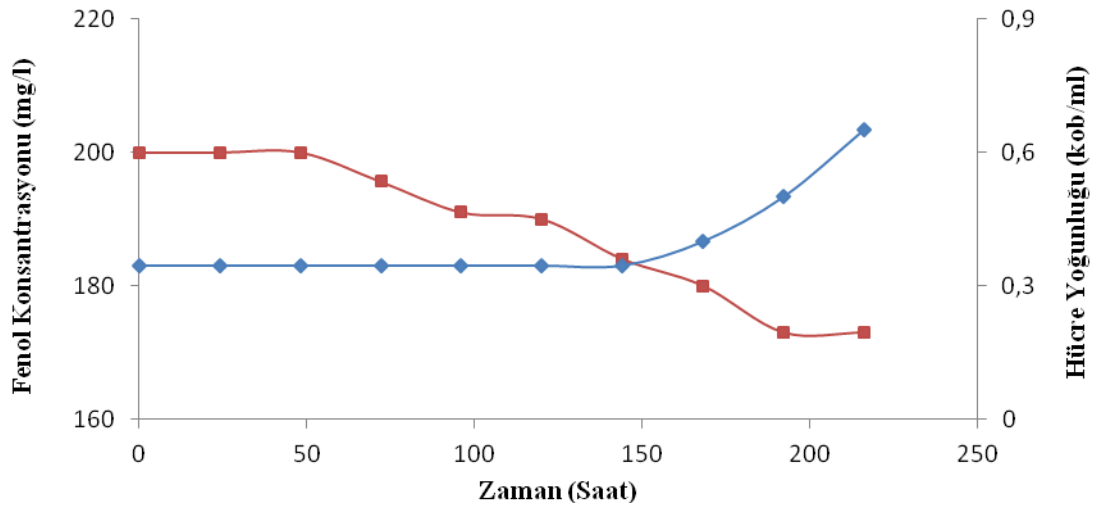
150 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. A235 izolatının 150 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln(\text{hücre yoğunluğu})$ 'nin zamana bağlı değişimi

4.4.6. 200 ppm Fenol Konsantrasyondaki Fenol Biyodegradasyonu ve Üreme Eğrilerinin Hesaplanması

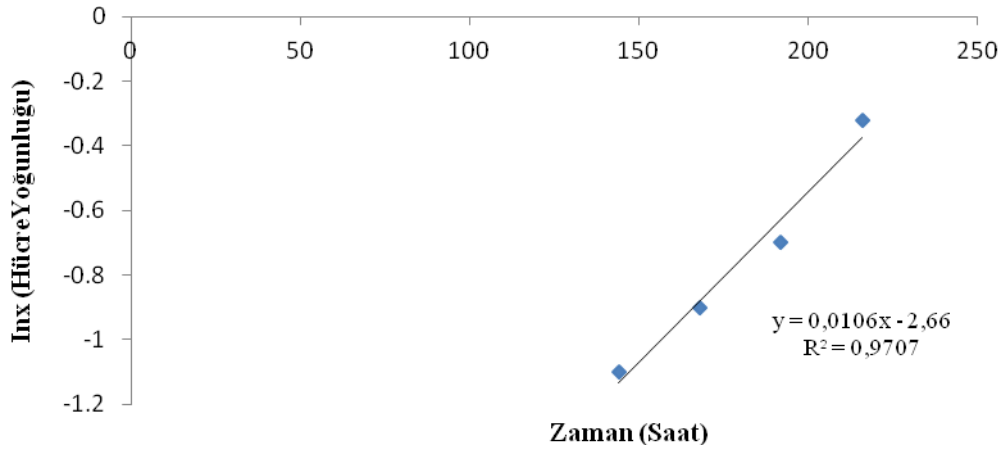
Karbon kaynağı olarak sadece 200 ppm fenol içeren besiyerinde geliştirilen A235 izolatının kültür ortamındaki fenol konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. 200 ppm fenol varlığında A235 izolatının hücre yoğunluğu ve fenol konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (♦, hücre yoğunluğu (kob/ml); ■, fenol konsantrasyonu (mg/l))

A235 izolatının 200 ppm fenol konsantrasyonundan elde edilen hücre yoğunluk grafiğinde lag fazının 144. saatte kadar sürdüğü belirlenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu 216. saatin sonunda saptanmıştır. Fenol konsantrasyonu yaklaşık olarak lag fazının ilk 72 saatinde sabit kaldığı ve ilerleyen süre içerisinde de fenol konsantrasyonunda önemli bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Hücre yoğunluğunun artmasıyla birlikte fenol konsantrasyonun da azaldığı belirlenmiş, ancak azalmanın diğer fenol konsantrasyonlarındaki sonuçlara kıyasla daha yavaş olduğu tespit edilmiştir.

200 ppm fenol varlığında üretilen A235 izolatının zamana bağlı $\ln x$ (hücre yoğunluğu) değişimi Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. A235 izolatının 200 ppm fenol konsantrasyonundaki $\ln$ (hücre yoğunluğu)'nin zamana bağlı değişimi

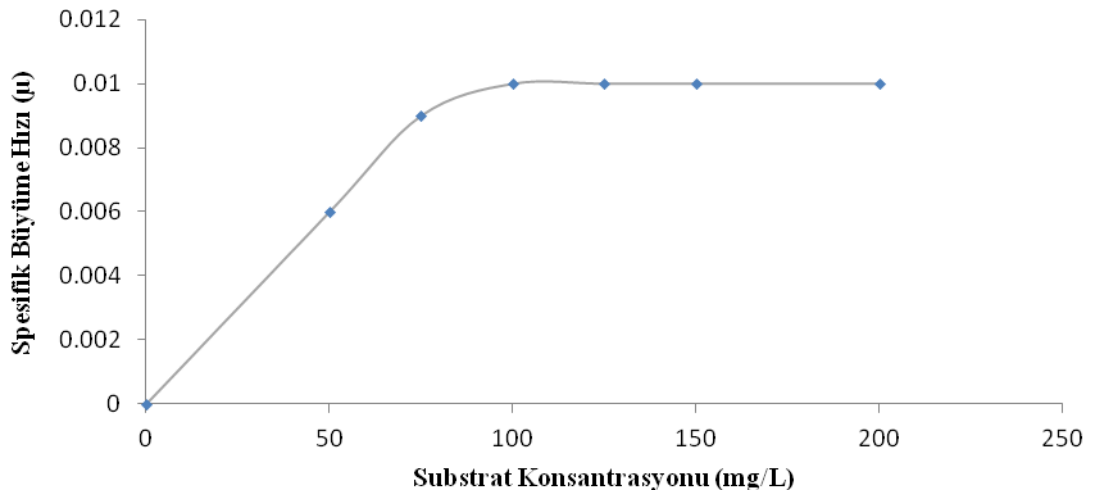
Genel olarak başlangıç fenol konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak lag fazının uzadığı (0-144 saat) ve hücre artışına bağlı olarak fenol yıkımının artmaya başladığı görülmektedir. Halofilik arkelerde fenol varlığında üreme kinetiği çalışması bulunmamakla birlikte halofilik ya da non-halofilik diğer bakterilerle yapılan çalışmalar mevcuttur. Karışık ılımlı halofilik bakteri kültürü ile yapılan fenol degradasyonu çalışmasında başlangıç fenol konsantrasyonu yüksek tutulduğunda lag fazının arttığı ve spesifik büyüme hızının azalmasına bağlı hücre miktarının da azaldığı, bu durumun substrat inhibisyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. (Peyton ve ark., 2002). *Rhodococcus* ve *bazidiyomycetes* grubuna dahil mayalarla yapılan diğer fenol degradasyonu çalışmasında da lag büyüme fazının fenol toksisitesinin inhibisyonuna

bağlı olarak başlangıç fenol konsantrasyonunun artmasıyla artış gösterdiği bildirilmiştir (Margesin ve ark., 2005). *Pseudomonas fluorescence* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan karışık kültür fenol kinetik çalışmalarında, 100-500 mg/l arasında değişen başlangıç fenol konsantrasyonlarında lag fazının 0. saatten 18 saate ve degradasyon prosesinin ise 24. saatten 96. saate çıktığı bildirilmiştir (Agarry ve ark., 2008). 1100 mg/l fenol konsantrasyonlarını tolere edebilme yeteneğindeki *Xanthobacter flavus* MTCC 9130 için artan başlangıç fenol konsantrasyonlarına bağlı olarak lag fazının arttığı bununla birlikte ortamdaki yüksek fenol konsantrasyonunun bakteri üzerinde negatif etkiye neden olduğu da gösterilmiştir (Nagamani ve ark., 2009). Li ve ark. (2010) *Pseudomonas putida* LY1 ile yaptıkları kinetik çalışmalarında lag faz uzunluğunun 0-25 saat arasında değiştiğini bildirmiştir.

4.4.7. Monod Grafiği

4.4.7.1. Maksimum Spesifik Büyüme Hızı (μ_{max}) Değeri

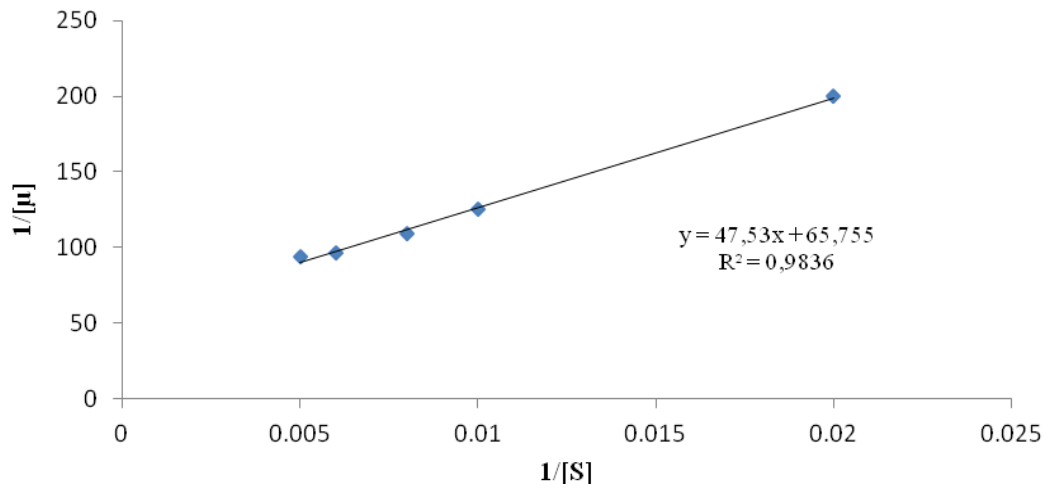
Farklı konsantrasyonlarda çizilen $\ln$ (Hücre yoğunluğu)-zaman grafiklerinden hesaplanan spesifik büyüme hızının (μ) substrat konsantrasyonuna (mg/l) karşı değişimi Şekil 4.19'da verilmiştir. Substrat konsantrasyonuna bağlı spesifik gelişme hızının belirlemek için Monod modeli kullanılmaktadır (Bailey ve Ollis, 1986; Stanbury ve Whitaker, 1989; Telefoncu, 1995; Boulton ve ark., 1996; Marin, 1999; Waites ve ark., 2001).



Şekil 4.19. A235 izolatının spesifik büyüme hızı (μ)'nın substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi

A235 izolatının fenol varlığında oluşturulan spesifik büyüme hızı-substrat konsantrasyonu grafiğinden, maksimum spesifik büyüme hızının ($\mu_{\max}$) 0.015 h^{-1} olduğu bulunmuştur. Üremeyi sınırlayan substrat konsantrasyonu arttıkça spesifik büyüme hızı (μ) belli bir noktaya kadar artmış ve kritik substrat konsantrasyonundan sonra bu değerin sabit kaldığı tespit edilmiştir. Termoasidofilik arke türü *Sulfolobus solfataricus* 98/2'un geri beslemeli bioreaktör kullanılarak yapılan fenol kinetik çalışmalarında, spesifik büyüme hızının 0.034 h^{-1} olduğu bildirilmiştir (Christen ve ark., 2010). Karışık ılımlı halofilik bakteri kültürünün kullanıldığı diğer bir çalışmada fenol varlığında spesifik büyüme hızının 0.09 ile 0.22 h^{-1} arasında değiştiği bildirilmiştir (Peyton ve ark., 2002). İlaç sanayi atık tuzlu suyundan izol edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas pseudomallei* suşlarının kullanıldığı fenol biyodegradasyonu çalışmasında ise, maksimum başlangıç fenol konsantrasyonundaki spesifik büyüme hızlarının sırasıyla 0.016 h^{-1} ve 0.013 h^{-1} olduğu bildirilmiştir (Afzal ve ark., 2007).

A235 izolatının fenole olan affinitesini belirlemek amacıyla $1/\mu$ ve $1/S$ değerleri üzerinden çizilen grafikten (Şekil 4.20) K_s değeri 71.4 mg/l olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. A235 izolatının $1/[S]$ - $1/\mu$ grafiği

Fenol içeren ortamlarda mikrobiyal büyüme kinetiğinin tanımlanması amacıyla farklı substrat tüketim ve inhibisyon modelleri kullanılmaktadır. Bu değişik modeller

içerisinde, Monod ve Andrew (Haldane) eşitlikleri sıklıkla fenol biyoderadasyon kinetiğinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Bandyopadhyay ve ark., 1998; Reardon ve ark., 2000; Peyton ve ark., 2002; Oboirien ve ark., 2005). Bu çalışma ile fenol içeren ortamda üretilen A235 izolatının üreme kinetiğinin belirlenmesinde monod modelinin uygun olduğu tespit edilmiştir.

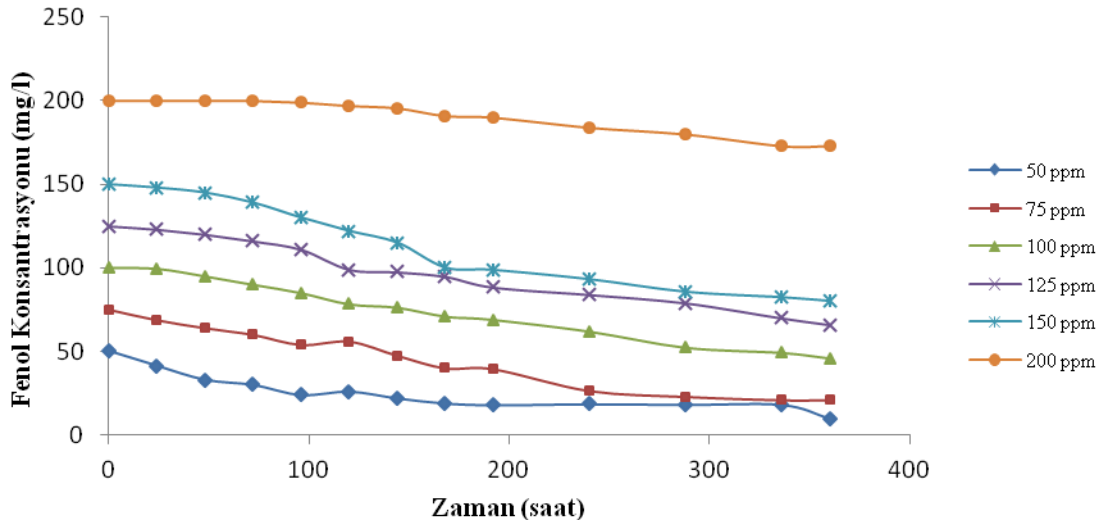
μ_{max} değerinin yarısına eşit olan Ks değeri ile mikroorganizmaların substrata olan afiniteleri arasında ters orantı bulunmaktadır (Pirt, 1975). Ks değeri arttığında mikroorganizmaların substrata olan ilgileri azalmaktadır. Yüksek fenol veya tuz konsantrasyonu içeren ortamlarda yapılan çalışmalarda Ks değerinin arttığı bildirilmiştir (González ve ark., 2001; Peyton ve ark., 2002; Agarry ve Solomon, 2008). Çalışmamızda elde edilen Ks değerinden, yüksek tuz konsantrasyonunda üretilen A235 izolatının fenol afinitesinin düşük olduğu anlaşılmaktadır. Pirt, (1975) mikrobiyal büyüme kinetiği ile ilgili çalışmasında başlangıç fenol konsantrasyonundaki artışın Ks değerinin artmasına ve μ_{max} değerinin azalmasına neden olduğunu bildirmiştir. Fenol degradasyonu ile ilgili çalışmalarda yüksek fenol konsantrasyonlarının inhibe edici etkisi bildirilmiş olup, membran bütünlüğünün sağlanabilmesi için gerekli enerjinin belirlenmesi, verimli fenol yıkım koşullarının tasarlanması ve endüstriyel proseslere uygun biyoreaktör tasarımının sağlanması için gereken bilgiler kinetik çalışmalarından elde edilerek endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Onysko ve ark., 2000; Bai ve ark., 2007). Fenol kinetik parametrelerinin (Ks, μ , μ_{max}) fenol biyodegradasyonu sonucunda açığa çıkan 2-hidroksimukonik asit semialdehid, *cis-cis* mukonik asit gibi ara ürünlerin varlığından da etkilenmektedir. Bunun dışında Monod kinetik parametrelerini etkileyen değişik faktörler de bulunmaktadır. Monod kinetik parametreleri üzerinde diğer faktörlerin etkisi üzerinde bazı araştırmalar yapılmıştır. Monod saturasyon sabiti üzerinde sıcaklığın etkisi daha önceki çalışmalarda açıkça belirtilmemiştir.

4.5. Fenol Biyodegradasyon Koşullarının Optimizasyon Sonuçları

A235 izolatı içerisinde karbon ve azot kaynağı olarak sadece 100 ppm fenolün bulunduğu ortamdaki koşulların optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En yüksek fenol parçalanma oranı ve hücre miktarının gerçekleştiği parametreler saptanmıştır.

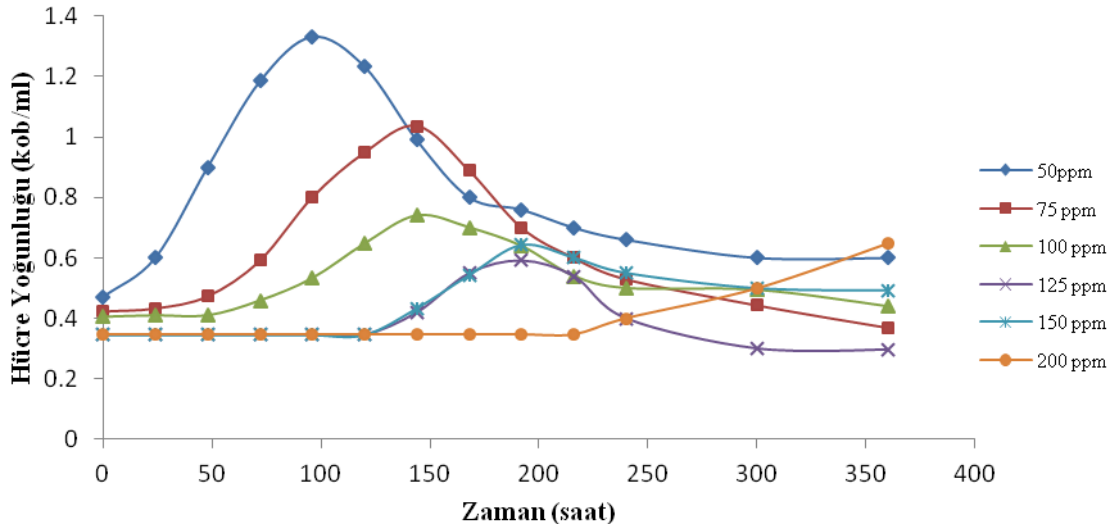
4.5.1. Fenol Biyodegradasyonunun Fenol Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

A235 izolatının 6 farklı fenol konsantrasyonu içeren ortamdaki fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.21 ve 4.22’de verilmiştir. Karbon kaynağı olarak içerisinde sadece fenolün bulunduğu 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 ppm fenol miktarlarındaki biyodegradasyon oranı sırasıyla % 80, 72, 54, 47.2, 46.6 ve 13.5’dur. Buna göre en yüksek fenol degradasyon oranı (% 80) içerisinde karbon kaynağı olarak sadece 50 ppm fenol konsantrasyonunun olduğu ortamda gözlenmiştir. Artan fenol konsantrasyonunun fenol biyodegradasyonunu olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır.



Şekil 4.21. Farklı fenol konsantrasyonunda fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi

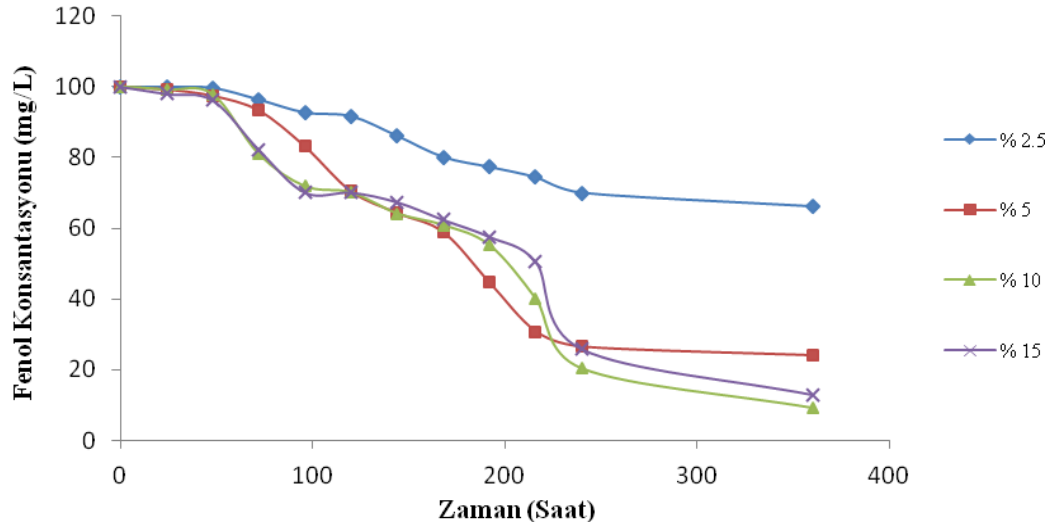
Üreme kinetiği çalışmalarında olduğu gibi, yüksek fenol konsantrasyonunun A235 izolatının gelişmesini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir. Benzer şekilde *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Fusarium* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Corious versicolor* ile yapılan biyodegradasyon çalışmalarında da yüksek fenol konsantrasyonunda substrat inhibisyonu nedeniyle üremenin negatif yönde etkilendiği bildirilmiştir (Peyton ve ark., 2002; Prieto ve ark., 2002).



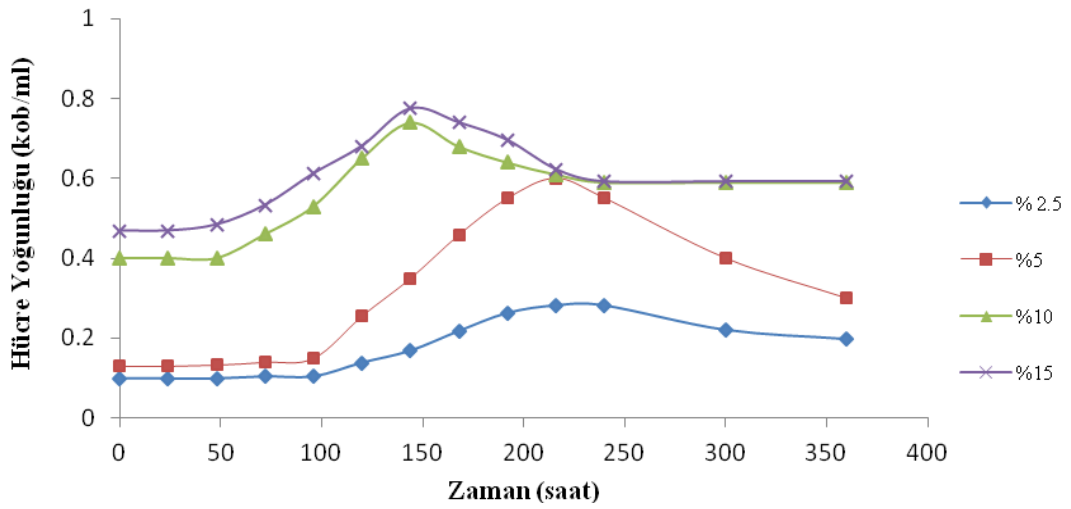
Şekil 4.22. Farklı fenol konsantrasyonunda hücre miktarının zamana bağlı değişimi

4.5.2. Fenol Biyodegradasyonunun İnokulum Miktarına Bağlı Değişimi

Optimum fenol konsantrasyonu ve 4 farklı inokulum miktarı içeren ortamdaki fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.23 ve 4.24’de verilmiştir. Buna göre en yüksek fenol degradasyon oranı ve hücre miktarı, %10 inokulum varlığında belirlenmiş olup artan inokulum miktarına bağlı olarak lag fazı süresinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Fenol gibi toksik bileşik içeren ortamlara transfer edilen inokulum hacminin biyodegradasyon üzerinde önemli olduğu ve belirli oranda artan inokulum miktarının fenol biyodegradasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Santos ve ark., 2001; Hong-xia, 2011). Ekilmiş sulakalan arıtım sistemelerindeki *Pseudomonas pseudoalcaligenes* hücrelerinin bulunduğu biyofilm aracılığıyla yüksek fenol giderimi sağlandığı ve bu durumun yüksek bakteri içeriği nedeniyle gerçekleştiği belirtilmiştir (Kurzbaum ve ark., 2010). Buna karşın, fenol biyodegradasyonunun tamamen bakteri miktarı ile ilişkili olmadığı ve bakteri sayısından etkilenen yıkım oranlarının tam ve hızlı fenol biyodegradasyonu veya mineralizasyonunu gerçekleştirebilen bakteri popülasyonundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Klecka ve ark., 2001).



Şekil 4.23. Farklı inokulum miktarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi

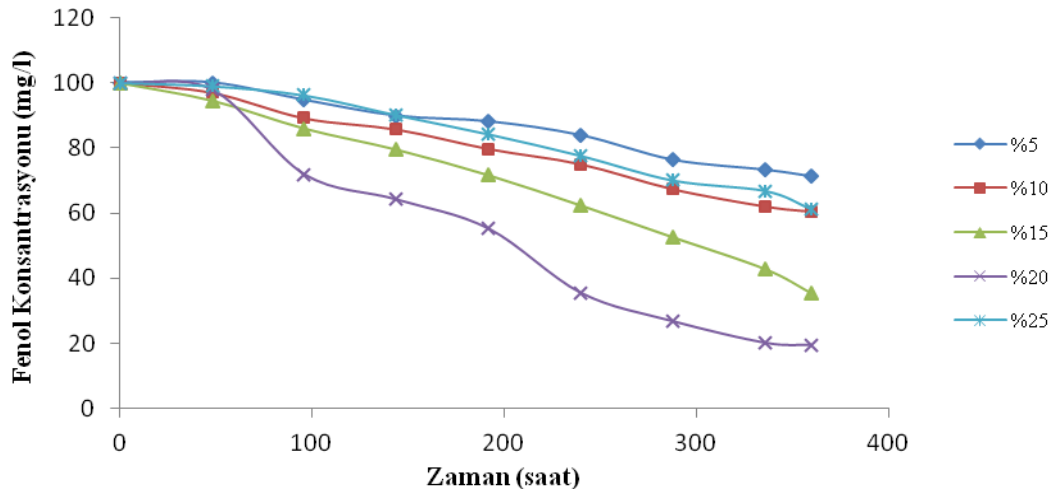


Şekil 4.24. Farklı inokulum miktarında hücre miktarının zamana bağlı değişimi

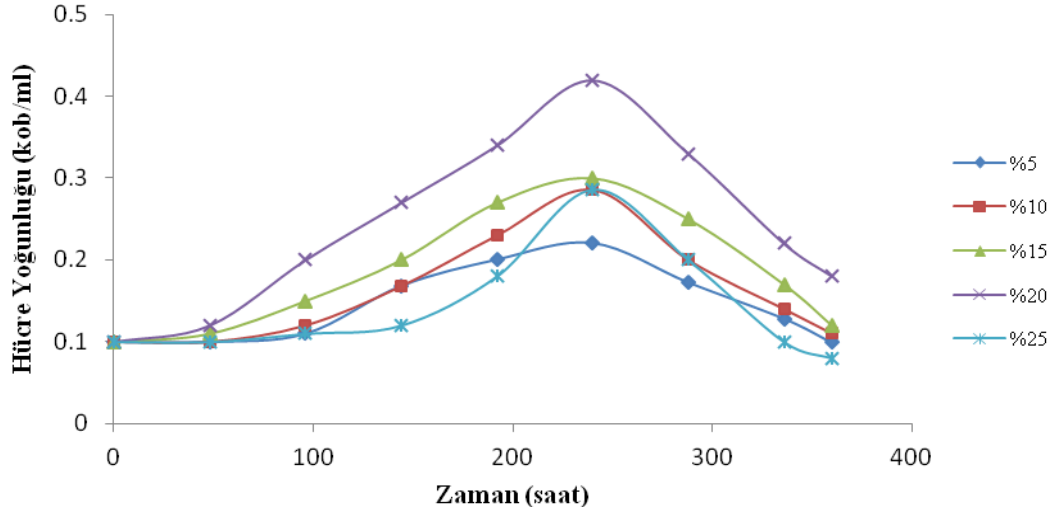
4.5.3. Fenol Biyodegradasyonunun NaCl Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Optimum fenol konsantrasyonu, inokulum miktarı ve 5 farklı NaCl konsantrasyonu içeren ortamdaki fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.25 ve 4.26'da verilmiştir. Buna göre en yüksek fenol degradasyon oranı ve hücre miktarı % 20 NaCl konsantrasyonunda belirlenmiştir. Ilımlı

halofilik mikroorganizmalardan fenolü parçalayabildiği tespit edilen *Halomonas* sp. suşunun % 1-14, *Halomonas organivorans* ve *Thalassobacillus devorans* türlerinin % 7.5-10, haloalkalifilik *Halomonas campisalis*'in % 0-15, *Halomonas venusta* suşunun % 8, yağmur ormanlarından izole edilen *Candida tropicalis*'in % 15 ve *Alcaligenes faecalis*'in % 5.5 tuz varlığında fenolü yıkabildiği bildirilmiştir (Hinteregger ve Streichsbier, 1997; Bastos ve ark., 2000; Munoz ve ark., 2001; Alva ve Peyton, 2003; Garcia ve ark., 2004; Garcia ve ark., 2005). Halofilik biyofilmin yapay atık sudaki fenolü % 5-15 NaCl'de % 99 oranında yıktığı belirtilmiştir (Woolard ve Irvine 1994, 1995). Halofilik bakteri konsorsiyumu ile yapılan diğer bir çalışmada % 5 NaCl içeren ortamda fenol yıkımının % 99 oranında olduğu ancak artan tuz konsantrasyonunda (% 15) yıkım oranının azalarak % 14'e düştüğü ve optimum NaCl miktarının ise % 5 olduğu bildirilmiştir (Gayathri ve Vasudevan, 2010). Farklı tuzlu ortamlardan izole edilen halofilik bakteriler *Arhodomonas aquaeolei* ve *Modicisalibacter tunisiensis*'in 100g/l NaCl ve 3mM fenol bulunan ortamlarda gelişebildiği ve fenolü parçalayabildiği gösterilmiştir (Bonfá ve ark., 2013).



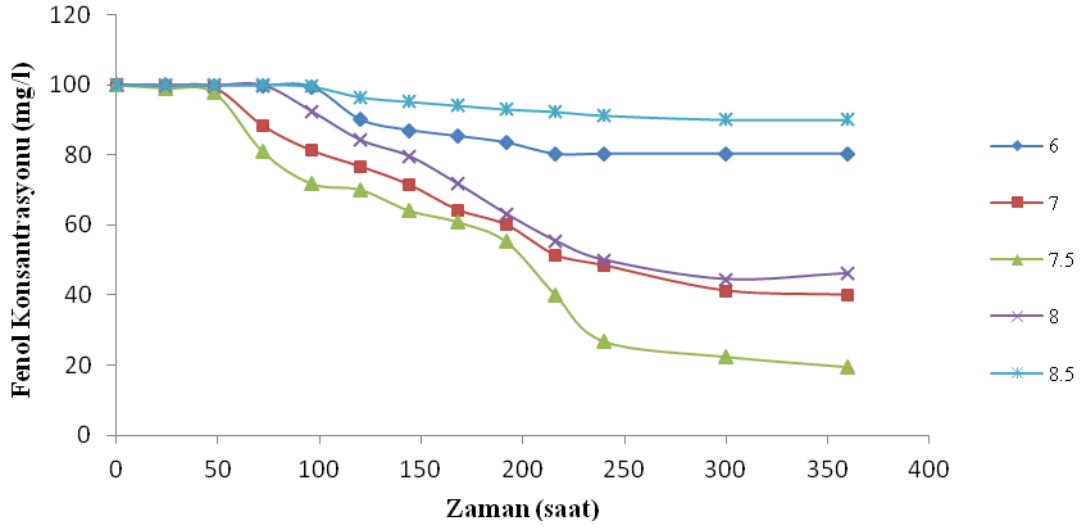
Şekil 4.25. Farklı NaCl konsantrasyonunda fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi



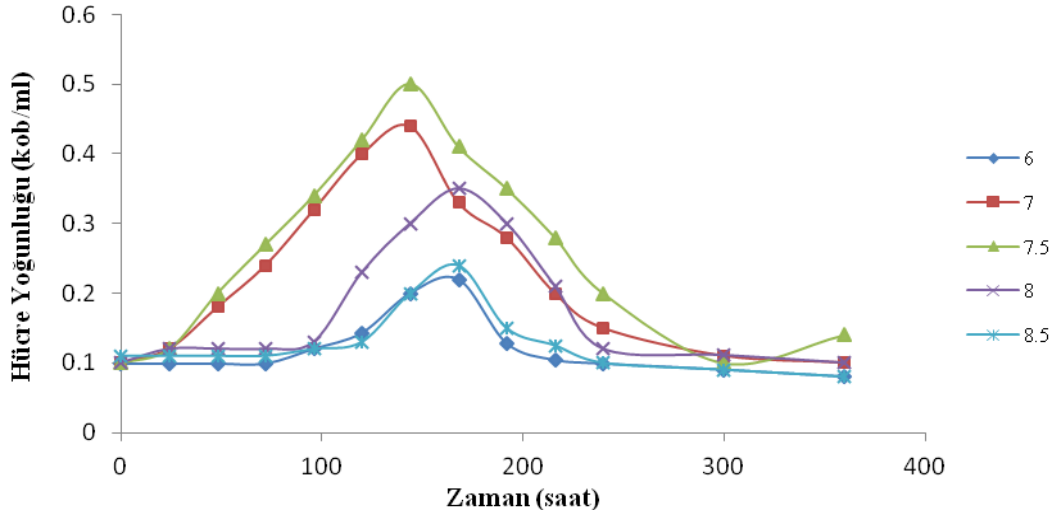
Şekil 4.26. Farklı NaCl konsantrasyonunda hücre miktarının zamana bağlı değişimi

4.5.4. Fenol Biyodegradasyonunun pH'a Bağlı Değişimi

Optimum fenol ve NaCl konsantrasyonu, inokulum miktarı ve 5 farklı pH'a sahip ortamdaki fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.27 ve 4.28'de verilmiştir. Buna göre en yüksek fenol degradasyon oranı ve hücre miktarı için pH'nın 7.5 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız A235 izolatu nütrofilik bir halofilik arke olup, alkalifilikler ve MHI-52-I suşu hariç diğer halofilik arkelerin de büyük bir kısmının optimum üremesi nötral pH derecelerinde gerçekleşmektedir (Minegishi ve ark., 2008; Bowers ve Wiegel, 2011). Halofilik arkeler dışında, ılımlı halofilik bakterilerden oluşan karışık kültürle yapılan fenol degradasyonu kinetiği pH'ı 7 olan ortamda çalışılmıştır (Peyton ve ark., 2002). Denizel kökenli ılımlı bir halofilik bakteri olan SM5 suşu ile yapılan fenol yıkım çalışmasında başlangıç pH'nın önemli olduğu ve nötr pH aralığında üreyen suşun optimum fenol yıkımını pH 7'de gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Hong-xia, 2011). Haloalkalifilik *Halomonas campisalis*'te fenol fdegradasyonu için optimum pH'nın 8-11 arasında olduğu belirtilmiştir (Alva ve Peyton, 2003). Non halofiliklerle yapılan fenol yıkım çalışmalarında ise optimum pH derecelerinin *Ewingella americana* için 7.5, % 99.99 giderim sağlayan mikrobiyal konsorsiyum için 8 ve petrolle kontamine olmuş topraklardan izole edilen *Rhodococcus* UKMP-5M için 7.5 olduğu bildirilmiştir (Khleifat, 2006; Hamitouche ve ark., 2010; Suhaila ve ark., 2013).



Şekil 4.27. Farklı pH değerlerinde fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi

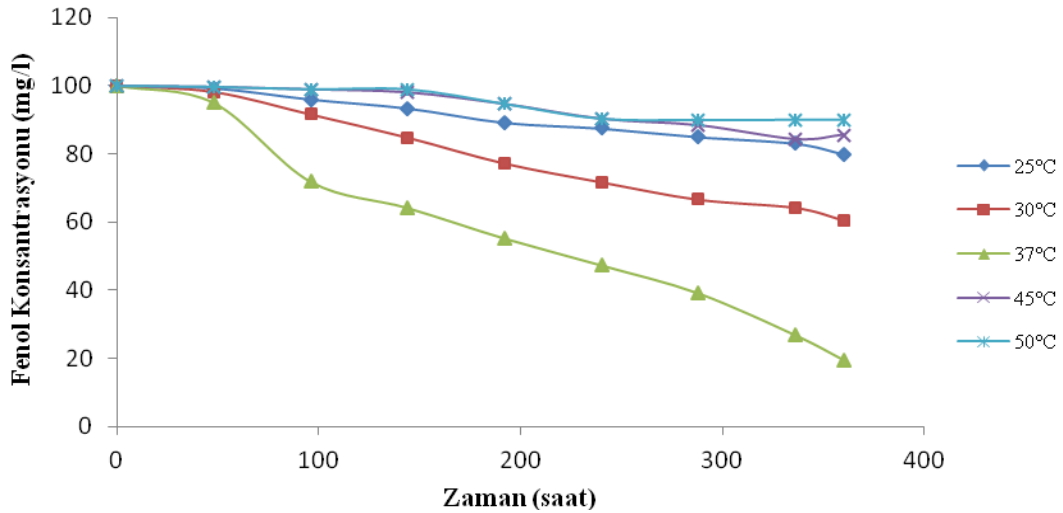


Şekil 4.28. Farklı pH değerlerinde hücre miktarının zamana bağlı değişimi

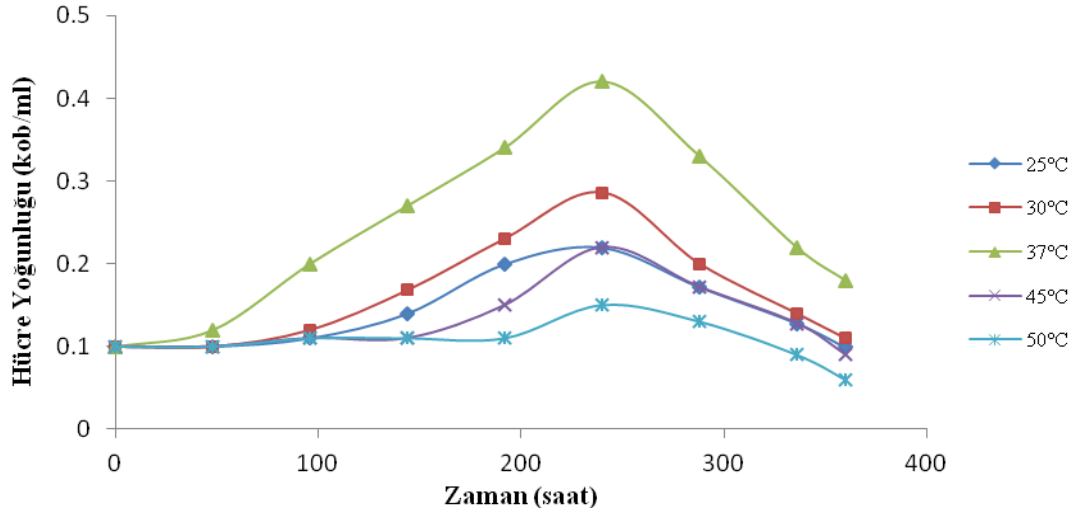
4.5.5. Fenol Biyodegradasyonunun Sıcaklığa Bağlı Değişimi

Optimum fenol ve NaCl konsantrasyonu, inokulum miktarı ve pH'ya sahip ortamın 5 farklı sıcaklık derecesinde inkübasyonu sonucunda fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.29 ve 4.30'da verilmiştir. Buna göre en yüksek fenol degradasyon oranı ve hücre miktarı için

sıcaklığın 37°C olduğu ve yüksek sıcaklık derecelerinde bu oranların önemli miktarda azaldığı tespit edilmiştir. Ekstrem halofilik arkeal türlerin yarısından fazlasının (% 63) optimum 40°C veya altındaki sıcaklık değerlerinde optimum ürettiği ve bu yüzde dilimi içerisindeki mikroorganizmaların optimum sıcaklık değerlerinin 38-40°C olduğu bildirilmiştir (Bowers ve Wiegel, 2011). Peyton ve ark. (2002) ılımlı halofilik bakterilerden oluşan karışık kültürle fenol degradasyon kinetiği çalışmasını 30°C’de gerçekleştirmiştir. Denizel kökenli SM5 suşunun optimum fenol yıkımını (% 95.7) 37°C de gerçekleştirdiği ve 28°C de yıkım oranının biraz daha azaldığı (% 93.8) bildirilmiştir (Hong-xia, 2011). Bunların yanı sıra fenol yıkım çalışmalarında aşırı yüksek ve düşük sıcaklıkların biyodegradasyon oranını etkilediği de bildirilmiştir (Kargi ve Uygur, 1996). *Pseudomonas putida* bakterisi ile yapılan fenol yıkım çalışmasında, yüksek sıcaklığı bakteri aktivitesini negatif yönde etkilediği ve biyodegradasyon kapasitesini engellediği bildirilmiş ve 35°C’den daha yüksek sıcaklıklarda fenol biyodegradasyon prosesinin temel basamağı olan benzen halkasının yarılmasından sorumlu bakteriyel enzim aktivitelerinin etkilenebileceği belirtilmiştir (Kira ve ark., 2000).



Şekil 4.29. Farklı sıcaklık derecelerinde fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi

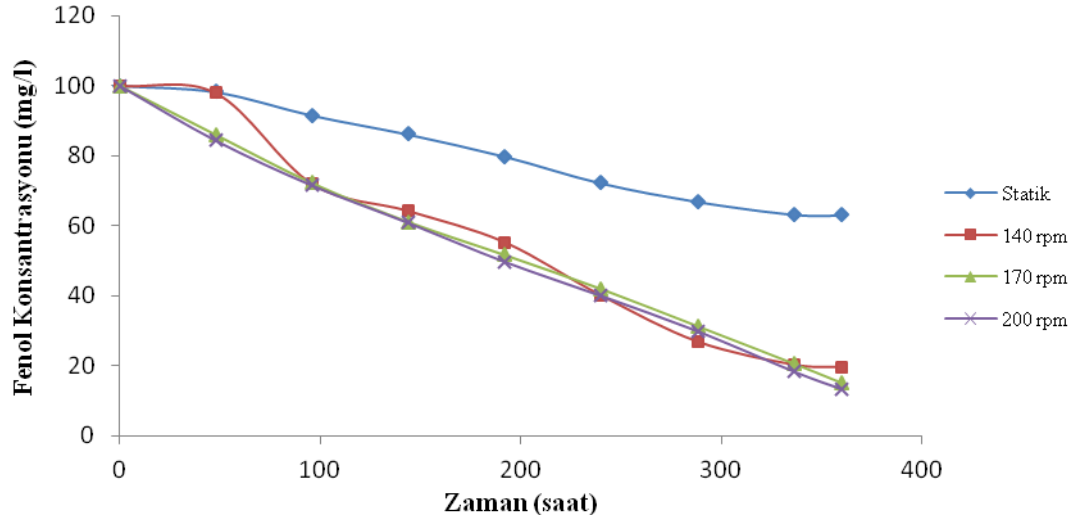


Şekil 4.30. Farklı sıcaklık derecelerinde (°C) hücre miktarının zamana bağlı değişimi

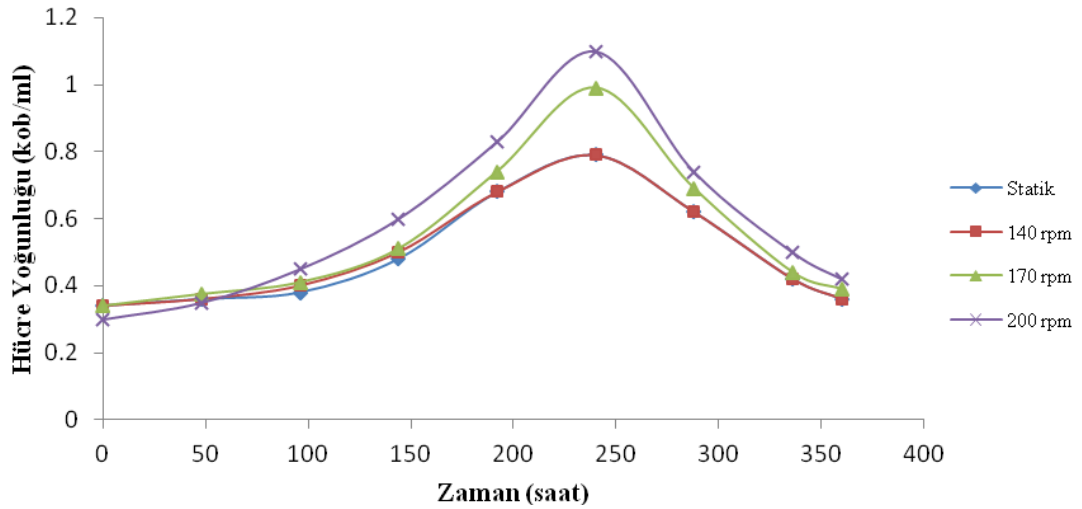
4.5.6. Fenol Biyodegradasyonunun Çalkalama Hızına Bağlı Değişimi

Optimum fenol ve NaCl konsantrasyonu, inokulum miktarı, pH ve sıcaklık derecesi belirlendikten sonra, kültür ortamının çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla 3 farklı çalkalama hızı ve statik koşulda inkübasyonu sonucunda fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.31 ve 4.32’de verilmiştir. Artan çalkalama hızına bağlı olarak lag fazının kısaldığı ve fenol konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek fenol degradasyon oranı ve hücre miktarı için optimum çalkalama hızının 200 rpm olduğu belirlenmiştir. Halofilik arkeler aerobik ve heterotrofik karakterdedirler. Hipertuzlu sistemlerde oksijen çözünürlüğü azaldığından dolayı halofilik organizmaların kültürasyonu esnasında oksijenlenmeyi sağlamak için çalkalamalı inkübasyon koşulları gerekmektedir (Schneegurt, 2012). Karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, glioksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi ile trikarboksilikasit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir (Vaino ve ark., 2000). Aerobik mikroorganizmalar genellikle oksijen reaksiyonları yoluyla aromatik çekirdeğin aktivasyonu ile aromatik bileşiklerin degradasyonunu gerçekleştirmektedirler (Pérez-Pantoja ve ark., 2009). Halofilik arkeler ile aromatik hidrokarbonların (polisiklik aromatik hidrokarbon, naftalin, antrasin, fenantrin, piren) biyodegradasyonu ile yapılan diğer bir çalışmada petrol ile kontamine olmuş alanlardaki degradasyon için bu mikroorganizmaların

oksijene ihtiyaç duyduğu ve artan oksijenlenme oranına bağlı olarak degradasyon hızında da bir artış olduğu vurgulanmıştır (Bonfa ve ark., 2011).



Şekil 4.31. Farklı çalkalama hızlarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi

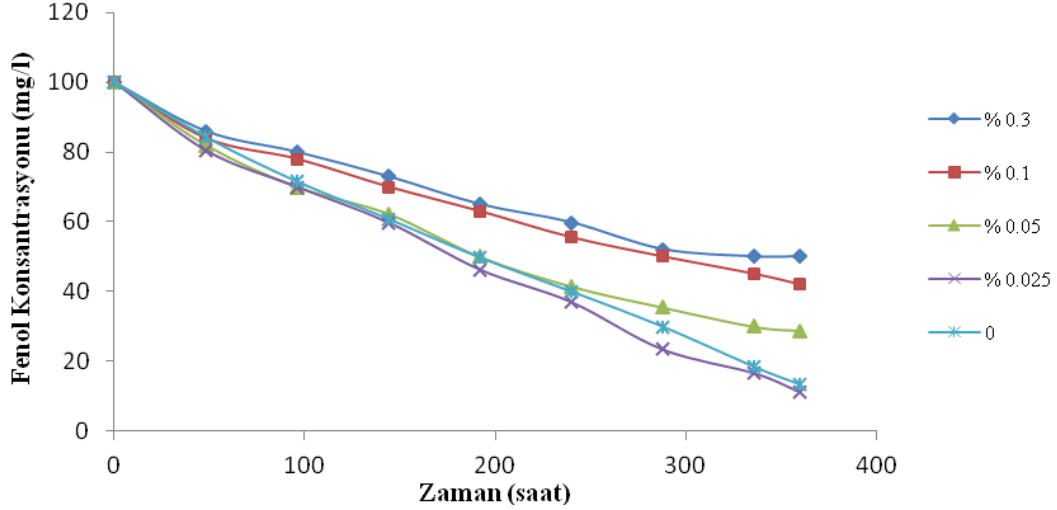


Şekil 4.32. Farklı çalkalama hızlarında hücre miktarının zamana bağlı değişimi

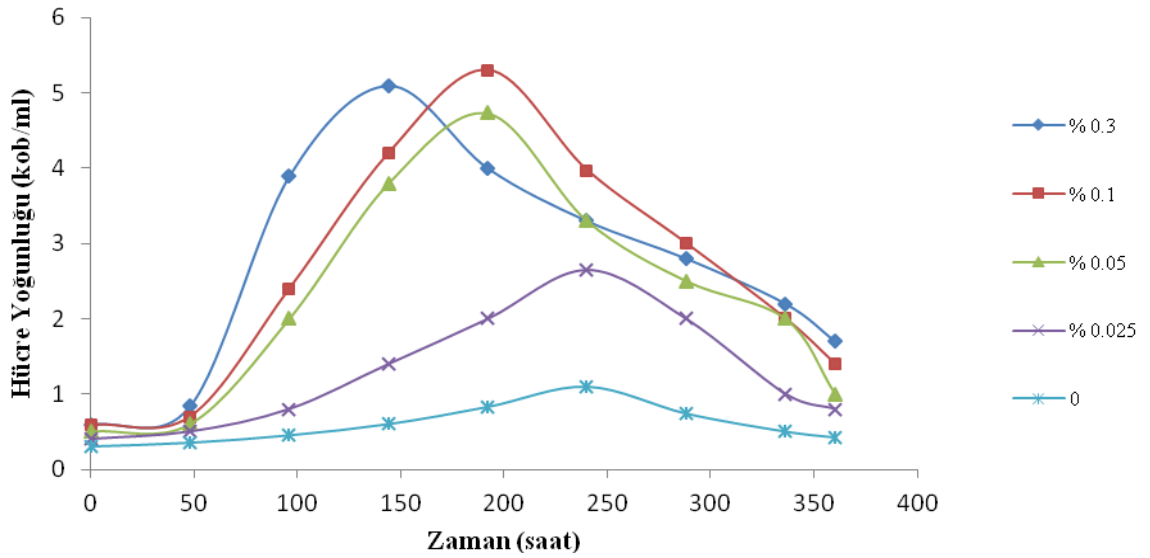
4.5.7. Fenol Biyodegradasyonunun Yeast Ekstrakt Miktarına Bağlı Değişimi

Optimum fenol ve NaCl konsantrasyonu, inokulum miktarı, pH, sıcaklık derecesi ve çalkalama hızı belirlendikten sonra, yeast ekstrakt miktarının etkisini belirlemek amacıyla 4 farklı yeast ekstrakt miktarı ve yeast ekstrakt içermeyen ortamda

inkübasyon sonucunda fenol biyodegradasyonunun ve hücre miktarının zamana bağlı değişimi Şekil 4.33 ve 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.33. Farklı yeast ekstrakt miktarında fenol degradasyonunun zamana bağlı değişimi



Şekil 4.34. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonunda hücre miktarının zamana bağlı değişimi

Fenol degradasyonu için optimum yeast ekstrakt miktarı % 0.025 olarak bulunmuştur. Daha yüksek yeast ekstrakt konsantrasyonlarında ise fenol yıkımının azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamaya adapte olan

ekstrem canlıların daha fazla besinsel ihtiyaçlara gereksinim duyduğu ve bu nedenle kompleks besin içeriklerinin yüksek tuz konsantrasyonlarındaki canlıların gelişimini stimüle ettiği vurgulanmaktadır (Oren ve ark., 1992). Aşırı tuzlu ortamlardan izole edilen arke suşunun (EH7) yeast ekstakt, pepton ve kazamino varlığında ekosan ($C_{20}H_{42}$) degradasyonunu hızlandırdığı ve yıkım süresini azalttığı belirtilmiştir (Bertrand ve ark., 1990). Carla ve ark. (2004) Halofilik ve halotolerant mikrosom tarafından BTEX bileşiklerinin degradasyon hızının yeast ekstrakt, vitamin ya da iz element ilavesiyle arttığını bildirmiştir. Gladyshev ve ark. (1998) yüksek konsantrasyonda inorganik besinlerin fenol yıkımını arttırdığını organik besinlerin ise azalttığını bildirmesine rağmen Woolard ve Irvine (1995), ortama eklenen yeast ekstraktın ılımlı halofillerde fenol yıkım verimini arttırdığını belirtilmiştir. *Pseudomonas putida* ile yapılan fenol biyodegradasyonunda, 0.05-0.25 (g/l) arasında değişen miktarlardaki yeast ekstraktın etkisi incelenmiş olup, 0.05 ile 0.15 (g/l) arasında artan yeast ekstrakt miktarına bağlı olarak fenol yıkımının da % 50-98 arasında arttığı, 0.15 g/l üzerindeki konsantrasyonun ise fenol yıkımını arttırmadığı belirtilmiştir (Annadurai ve ark., 2008). Ayrıca fenol yıkım çalışmalarında glukoz, yeast ekstrakt ve $(NH_4)_2 SO_4$ gibi besinlerin adaptasyon çalışmalarında kullanılmasının fenol yıkım yeteneğini hızlandırdığı da rapor edilmiştir (Al-Khalid ve El-Naas, 2012).

A235 izolatında artan yeast ekstrakt miktarlarına bağlı olarak hücre yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.34). Halofilik bakteriyel konsorsiyum ile yapılan fenol biyodegradasyon çalışmalarında toksik bir substrat olan fenol varlığında ortama ilave edilen yeast ekstraktın mikrobiyal gelişimi destekleyip artırmasına bağlı olarak fenol giderimini de hızlandırdığı belirlenmiştir (Veenagayathri ve Vasudevan, 2010). Yeast ekstrakt içerdiği bazı amino asitler, peptitler, vitaminler ve pirüvik asit dahil bazı organik asitler nedeniyle mikroorganizmaların üremesine destek sağlamaktadır (Annadurai ve ark., 2008).

4.6. Fenol Degradasyon Ürünlerinin Analiz Sonucu

Optimum fenol biyodegradasyon koşullarında ve fenol varlığında üretilen A235 izolatının fenol biyodegradasyonunu, *meta*-yıkım yolu üzerinden gerçekleştirdiği, *orto*-yıkım yolunu kullanmadığı belirlenmiştir. Fenol degradasyon ürünlerinin biyokimyasal analizinin son basamağında reaksiyon ortamına kateşol ilavesi sonrası

oluşan sarı renk (Şekil 4.36), fenolün *meta* yıkım yolu üzerinden parçalandığını göstermektedir.



Şekil 4.35. A235 izolatında *meta*-yıkım analizi sonucunda oluşan sarı renk

Aerobik halofilik ve ılımlı halofilik bakterilerin fenolü, temelde *meta*- ve *orto*-yıkım yolu ile parçaladığı, bazılarının bu iki yoldan sadece birini bazılarının ise her iki metabolik yolu kullanarak fenolü parçaladığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2006; Borgne ve ark., 2008). Degradasyon yolağını karakterize edebilmek için en basit yaklaşımlardan biri katabolik enzim varlığının analiz edilmesidir (Cao ve ark., 2008). Erdoğan ve ark. (2013), halofilik arke izolatlarıyla 4 farklı aromatik hidrokarbon yıkımı çalışması neticesinde, uyguladıkları Rothera test sonuçlarına bağlı olarak sarı *meta* yıkım ürünlerinin oluşmamasından dolayı parçalanmanın *orto* yıkım ile gerçekleştiği ve enzim çalışmalarının da bunu desteklemesine bağlı olarak biyokimyasal testlerin metabolik yolun belirlenmesinde destekleyici rollerinin olduğunu vurgulamışlardır. Fenolle kontamine olmuş farklı bölgelerden izole edilen ılımlı halofilik bakteriyel konsorsiyumu ile yapılan degradasyon metabolik yolunu belirleme ve enzimlerle ilgili çalışmada fenol degradasyonu süresince ara ürün olarak *cis,cis* mukonik asit olduğu, 4-klorofenol yıkımında ise ara ürün olarak 5-kloro-2-hidroksimukonat olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan ılımlı halofilik bakteri konsorsiyumunun, fenol biyodegradasyonunda *orto*-yıkım yolunu kullandığı, 4-klorofenol degradasyonunda ise *meta*-yıkım yolunu kullanarak parçalayabildiği tespit edilmiştir (Veenagayathri ve Vasudevan, 2011). Maskow ve Kleinsteuber (2004), tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenolü kullanan haloalkalifil *Halomonas* EF11 suşunda fenolün, yüksek C/N oranında *meta* yolu ile düşük C/N oranında ise *orto* yolu ile asimile edildiğini belirtmiştir. Ilımlı halofilik bakteri türü *Halomonas organivorans* ile aromatik bileşiklerin degradasyonu çalışmasında ise kateşolün *orto* yolu ile yıkıldığı belirtilmiştir (Garcia ve ark., 2005b).

4.7. Fenol Biyodegradasyonda Rol Oynayan Enzimlerin Tarama Sonucu

Aerobik ortamlarda fenol önce multikomponent bir fenol hidroksilaz ile kateşole sonra *orto* veya *meta* yıkım yolu üzerinden temel metabolizma ara ürünlerine parçalanır. Fenol halkasındaki ilk açılmanın, *orto*-yıkım yolunda kateşol 1,2-dioksigenaz veya *meta*-yıkım yolunda kateşol 2,3-dioksigenaz enzimi ile katalize edilmesine bağlı olarak *cis*-mukonik asit yada 2-hidroksimukonik semialdehid oluşur (Gurujealakshmi ve Oriel, 1988; Nordlund ve ark., 1990). Fenol metabolizmasına giren bu üç enzim intrasellüler ve indüklenebilir özelliktedir (Bastos ve ark., 2000; Alexieva ve ark., 2010; Yemendzhiev ve ark., 2012). Erdoğan ve ark. (2013), halofilik arke izolatlarıyla 4 farklı aromatik hidrokarbon yıkımı çalışması neticesinde, degradasyonun *orto* metabolik yolu üzerinden gerçekleştiğini bildirmiştir. *Halomonas* suşları ile yapılan çalışmalarda, fenolün *orto* yolu üzerinden parçalandığı belirtilmiştir (Hinteregger ve Schreiber, 1997; Alva ve Peyton, 2003). Haloalkalik *Halomonas* EF11 suşunda fenol yıkım yolunun kültür ortamındaki C/N oranına bağlı olarak *orto* ya da *meta* yolu üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (Maskow ve Kleinstuber, 2004). A235 izolatında fenol yıkımında rol oynayan enzimlerin tarama çalışmalarından elde edilen veriler ise parçalanmanın kateşol 2,3-dioksigenaz ile gerçekleştirildiğini göstermiştir. Enzim tarama sonucunda elde edilen bulgularla ve fenol degradasyon ürün analizi çalışmaları (Şekil 4.36) birbirini desteklemiştir.

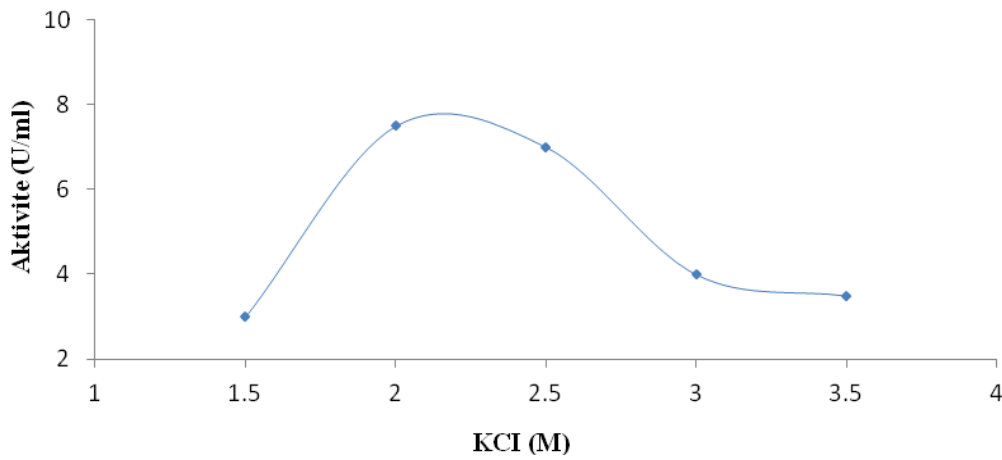
4.7.1. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Optimizasyon Sonuçları

Optimum fenol biyodegradasyon koşullarında ve fenol içeren ortamda geliştirilen A235 izolatının kateşol 2,3-dioksigenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği KCI konsantrasyonu, sıcaklık derecesi ve pH değeri belirlenmiştir.

4.7.1.1. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Tuz Optimizasyon Sonucu

Enzim aktivitesi üzerine KCI konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla 5 farklı tuz derişiminde alınan sonuçlara göre en yüksek aktivite 2M KCI derişiminde 7.5 µmol/dk olarak bulunmuştur (Şekil 4.37). Halofilik arkeler, ortamlarındaki yüksek miktarda bulunan NaCl ve diğer tuzlara karşı ozmotik dengeyi sağlamak amacıyla hücre içerisinde yüksek miktarda KCI biriktirirler. Bu nedenle intrasellüler enzimleri 4 M kadar yüksek KCI konsantrasyonlarında aktif ve stabil kalmaktadır (Danson ve Hough

1998; Oren ve Mana, 2002). *Haloferax* sp. D1227A suşundan saflaştırılan gentisat 1,2-dioksigenaz enziminin maksimum aktivitesini 2 M KCl ya da NaCl'de gösterdiği bildirilmiştir (Fu ve Oriel, 1998). Diğer haloarkeal kaynaklı intraselüler enzimlerden, *Haloferax volcanii* ligazının (Hv LigN) 3.2 M KCl'de maksimum aktivite gösterdiği, NaCl'nin ise aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Ortega ve ark., 2011). *Haloferax mediterranei* aldolazı ile yapılan diğer bir çalışmada ise maksimum aktivitenin 0.5 M KCl varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir (D'Souza ve ark., 1997).

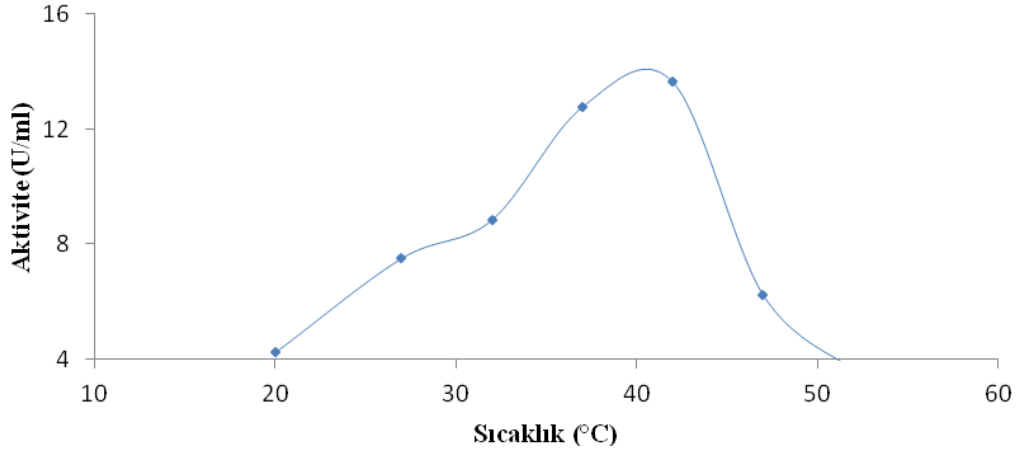


Şekil 4.36. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine KCl etkisi

4.7.1.2. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin Sıcaklık Optimizasyon Sonucu

Optimum tuz konsantrasyonu belirlenen enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 7 farklı sıcaklık derecesinde alınan sonuçlara göre en yüksek aktivite 42°C'de 13.64 $\mu\text{mol/dk}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.38). Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesinden hafif termofilik bir karaktere sahip olduğu söylenebilir. Haloarkeal ekstremozimlerin sadece tuzla toleranslı olmayıp aynı zamanda termofilik karakterde olduğunun bildirilmiştir (Madern ve ark., 2000; Ozcan ve ark., 2009). Non halofilik organizmalardan izole edilen kateşol 2,3-dioksigenazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecelerinin; *Pseudomonas* sp. ZJF08 için 30°C, *P. S-47* için 35°C, gram pozitif *Planococcus* sp. S5 için 60 °C, termofilik bakteri

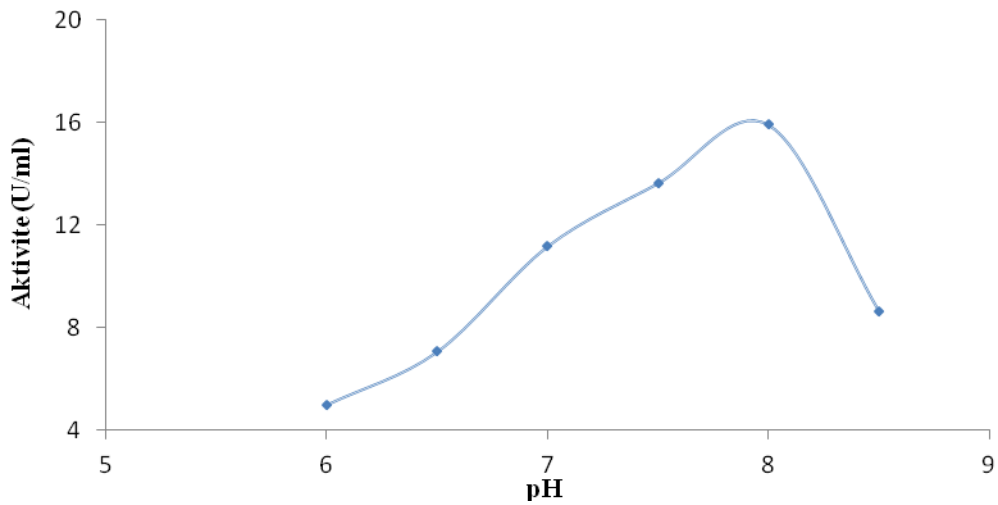
Bacillus thermoleovorans A2 için 70 °C olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 1997; Milo ve ark., 1999; Zou ve ark., 2007; Hupert-Kocurek ve ark., 2012).



Şekil 4.37. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.7.1.3. Kateşol 2,3-dioksigenaz Enzim Aktivitesinin pH Optimizasyon Sonuçları

Optimum tuz konsantrasyonu ve sıcaklık derecesi belirlenen enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla 6 farklı pH'da alınan sonuçlara göre en yüksek aktivite pH 8'de 15.92 $\mu\text{mol/dk}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.39). Ilımlı halofilik



Şekil 4.38. Kateşol 2,3-dioksigenaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

bakteri konsorsiyumu ile yapılan çalışmalarda ise kateşol-2,3-dioksigenaz enzim aktivitesi için optimum pH değerinin 7 olduğu ve pH 8’de aktivitenin azaldığı bildirilmiştir (Veenagayathri ve Vasudevan, 2011). Halofilikler haricinde diğer organizmalarla yapılan çalışmalarda ise optimum pH değerlerinin, termofilik arke *Sulfolobus solfataricus* 98/2 suşu için 7.0-7.5, termofilik bakteri *Bacillus thermoleovorans* A2 için 7.2, *Planococcus* sp. S5 için 8 olduğu belirtilmiştir (Murakami ve ark., 1998; Milo ve ark., 1999; Hupert-Kocurek ve ark., 2012).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilinen en toksik ve tehlikeli organik kirleticiler arasında yer alan fenol ve türevleri endüstriyel atık sularda sıklıkla bulunmaktadır. Dünya çapında, yağ rafineleri, patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kâğıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidan üretimi gibi bir çok procesten kaynaklanan ve fenolik bileşikleri içeren endüstriyel atık suların büyük bir kısmında farklı konsantrasyonlarda fenol bulunmaktadır. Günümüzde, çevre kirliliğinin engellenmesi amacıyla fenollü atık sulara uygulanan fiziksel ve kimyasal arıtmada kullanılan yöntemlere kıyasla çevre dostu, düşük maliyetli ve toksik metabolitleri tamamen mineralize edebilme gibi avantajları bulunan biyolojik süreçler önem kazanmıştır. Bunlardan biyodegradasyon, fenolik kontaminantların uzaklaştırılmasında temel mekanizmayı oluşturmaktadır. Mikrobiyal degradasyon, atık sulardaki fenol giderimi için tercih edilen bir metod olmasına rağmen, yüksek tuz konsantrasyonlarının tolere edilmesi noktasında bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Tuzlu çevrelerde fenol ve fenolik bileşiklerin biyoremediasyonunun konvansiyonel mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmesi mümkün değildir. Özellikle yüksek miktarda tuz içeren endüstriyel atık sulardaki fenol biyodegradasyonunun halofilik organizmalarla gerçekleştirilmesini kaçınılmaz kılmaktadır. Hücreleri ve enzim aktiviteleri için yüksek tuz konsantrasyonuna adapte olmuş ekstrem halofilik organizmaların fenol ve diğer organik bileşiklerin giderimi yönünden sahip oldukları biyoteknolojik potansiyelleri birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Ancak ekstrem halofillerin kullanıldığı biyodegradasyon çalışmaları sınırlı sayıda bulunmaktadır.

Organik bileşiklerin büyük bir kısmını oluşturan fenolik maddelerin tuzlu ortamlardaki giderimi ile ilgili biyoteknolojik proseslerin genelinde ılımlı halofilik bakteriler kullanılmıştır. Ancak, aşırı tuzlu ortamlarda bu organizmalar yetersiz kalabildiği için, halofilik arkeler ön plana çıkarak önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Ekstrem tuzlu ortamlarda hidrokarbonların biyodegradasyonunda halofilik arkelerin kullanılması ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte spesifik olarak arkeal fenol yıkımını içeren herhangi bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bu çalışma ile ilk olarak halofilik arkelerin fenol biyodegradasyon potansiyeli belirlenmiş olup, çalışma konusunun bu yönüyle özgün olduğu aşıkardır.

Çalışma kapsamında Türkiye'nin çeşitli tuzlu bölgelerinden izole edilmiş 123 halofilik arke ve halofilik/halotolerant bakteri izolatlarının fenollü ortamda gelişebilme

ve fenol degradasyon potansiyelleri belirlenmiştir. Katı ve sıvı ortamlarda kademeli fenol tarama işlemleri sonrasında seçilen izolatlar arasından 200 ppm fenol konsantrasyonunda üreyebilen 8 izolat, bu izolatlar arasından ise A235'in tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenolü en yüksek oranda (% 42) parçalayabildiği belirlenmiştir. Toksik bir madde olan fenolün yüksek konsantrasyonlarının organizmanın gelişimini inhibe etmesini engellemek için kademeli bir şekilde normal karbon kaynağı olarak kullanılan yeast ekstrakt miktarı azaltılıp fenol konsantrasyonu artırılarak izolatın yüksek fenol konsantrasyonuna adaptasyonu sağlanmıştır. Fenol adaptasyon çalışması sonucunda fenol konsantrasyonundaki artışın ve yeast ekstrakt miktarındaki azalmanın lag fazının uzamasına neden olduğu ve yeast ekstrakt miktarının fenolün büyümeyi inhibe edici özelliğine karşı önemli bir avantaj kazandırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca toluen kullanılarak yapılan çapraz adaptasyonla birlikte fenol yıkımının yaklaşık %14 daha fazla arttığı bulunmuştur.

Fenollü ortamda geliştirilen A235 izolatının μ (spesifik büyüme hızı), μ_{max} (maksimum spesifik büyüme hızı) ve K_s (Doygunluk sabiti= Monod sabiti) gibi hücre büyüme kinetik parametreleri hesaplanmış ve izolatın fenol büyüme kinetiğinin belirlenmesinde Monod modelinin uygun olduğu tespit edilmiştir. A235 izolatı ile yüksek tuz konsantrasyonlarında yapılan kinetik çalışmalarında μ_{max} değeri $0.015h^{-1}$ ve K_s değeri ise 71.4 mg/l olarak bulunmuştur.

Tek karbon ve enerji kaynağı olarak 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 ppm konsantrasyonlarında fenol içeren ortamlarda A235 izolatının fenol biyodegradasyon oranlarının sırasıyla %80, 72, 54, 47.2, 46.6 ve 13.5 olduğu bulunmuştur. Fenol biyodegradasyonu yüksek iyonik güç, pH, sıcaklık ve diğer karbon kaynaklarından etkilendiğinden dolayı, A235 izolatının fenol yıkımı üzerine ortam koşullarının etkisi incelenmiş ve 100 ppm fenol varlığında optimum yıkımın; % 20 NaCl konsantrasyonu, %10 inokulum miktarı, pH 7.5, 37 °C ve 200 rpm'de gerçekleştiği tespit edilmiştir.

A235 izolatının hangi metabolik yol üzerinden fenolü kateşol 2,3-dioksigenaz enzimini kullanarak *meta*-yıkım yolu ile parçaladığı belirlenmiştir. A235 suşundan izole edilen kateşol 2,3-dioksigenaz enziminin optimum aktivitesini 2M KCl, 42 °C ve pH 8'de gösterdiği ($15.92 \mu\text{mol/dak}$) saptanmıştır.

Günümüzde biyoremediasyon kapsamında uygulanan biyodegradasyon çalışmaları kirleticileri yok etmek ya da toksinlerinden arındırmak için mükemmel bir

strateji olarak kabul edilmektedir. Halofilik organizmalar fenol içeren yüksek tuzlu endüstriyel atık suların biyodegradasyon için potansiyeli yüksek organizmalardır. Arke kaynaklı biyodegradasyon çalışmalarında reaktör ölçekli üretimlerinin arttırılmasıyla endüstriyel alanda kullanılabilirliğinin de önemli ölçüde artacağı düşünülmektedir. Ayrıca hücre immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve uygun tekniğin fenol biyodegradasyon çalışmalarına uyarlanması etkili olabileceği de düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile ilk kez bir halofilik arkenin fenolü yıkabildiği ve tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği fenolün 3,4 M tuz konsantrasyonunda optimum biyoyıkımını gerçekleştirdiği ortaya konmuştur. Çalışmamızdaki tuz konsantrasyonu göz önüne alındığında ekstrem halofilik özelliğe sahip prokaryotların, fenolle kirli hipertuzlu ortamların biyoremediasyonu, otomatik olarak temizlenmesi (self-cleaning) yada biyodegradasyonu için elverişli biyolojik materyaller olabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Abed, R.M.M., Al-Thukair, A., De Beer, D., 2006. Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 57: 290-301.
- Abd-El-Haleem, D., Moawad, H., Zaki, E.A., Zaki, S., 2002. Molecular characterization of phenol-degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems. **Microb Ecol.**, 43(2):217-24.
- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., Mehmetoğlu, Ü., 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, 39; 983-988.
- Adamczak, H., Materna, K., Urbanski, R., Szymanowski, J., 1999. Ultrafiltration of micellar solutions containing phenols. **J Colloid Interface Sci**, 218:359-68.
- Afzal, M., Samina, I., Sakandar, R., Khalid, Z.M., 2007. Characteristics of phenol biodegradation in saline solution by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Hazardous Materials**, 149: 60-66.
- Agarry, S.E., Durojaiye, A.O., Solomon, B.O., 2008. Microbial degradation of phenols: a review. **Int J Environ Pollut**, 32:12-28.
- Agarry, S.E., Solomon, B.O., 2008. Kinetics of batch microbial degradation of phenol by indigenous *Pseudomonas fluorescence*. **Int. J. Environ. Sci. Tech**, 5 (2): 223-232.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1998. Toxicological Profile for Phenol, Public Health Service, U.S. **Department of Health and Human Services**, Atlanta, GA.
- Ahamad, P.Y.A., Kunhi A.A.M., 1996. Degradation of phenol through ortho-cleavage pathway by *Pseudomonas stutzeri* strain SPC-2. **Lett Appl Microbiol.**, 22:26-29.
- Ahamad, P.Y.A., Kunhi, A.A.M., 1999. Degradation of high concentrations of cresols by *Pseudomonas sp.* CP4. **World J Microbiol Biotechnol.**, 15:28-283.
- Al-Asheh, S., Banat, F., Abu-Aitah, E., 2003. Adsorption of phenol using different types of activated bentonites. **Sep. Pur. Technol.**, 33: 1-10.
- Al-Khalid, T., El-Naas, M. H., 2012. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review, **Environmental Science and Technology**, 42:1632-1690.
- Alcocer, A.S., Ordaz, N.R., Ramírez, C.J., Mayer, J.G., 2007. Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia sp.*, *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. **Biochem. Eng. J.**, 37: 201-211.
- Alexander, M., 1994. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, A division of Harcourt Brace & Company, 71-98, New York.
- Alexieva, Z., Yemendzhiev, H., 2010. Plamena Zlateva Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interactions in the mixture with phenol Biodegradation. **Biotechnol. & Biotechnol.**, 21:625-635.
- Allen, A. M., Goh, F., Leuko, S., Echigo, A., Mizuki, T., Usami, R., Kamekura, M., Neilan, B. A. and Burns, P., 2008. *Haloferax elongans sp. Nov. And Haloferax mucosum sp. Nov.*, isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 58:798-802.

- Alva, V., Peyton, B.M., 2003. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. **Environ Sci Technol.**, 37: 4397–4402.
- Andrews, J. F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substance. **Biotechnol. Bioeng.**, 10:707-723.
- Annadurai, G., L.Y. Ling and J.F. Lee, 2008. Adsorption of reactive dye from an aqueous solution by chitosan: Isotherm, kinetic and thermodynamic analysis. **J. Hazardous Mater.**, 152: 337-346.
- Anselmo, A.M., Cabral, J.M.S., Novais, J.M., 1989. The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on celite particles and their use in the degradation of phenol. **Appl Microbiol Biotechnol**, 31:200–203.
- Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Kudo, M.T., 1998. Adaptation of *Cornamonas testosteroni* TAM1 to utilize phenol : organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. **Microbiology**, 144: 2895-2903.
- Atkinson, B., Mavituna, F., 1991. **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**. Macmillan Publishers Ltd, 1271s, USA.
- Aquino, M.D., Korol, S., Santini, P., Moreton, J., 1988. Biodegradation of phenolic compounds: Improved degradation of phenol and benzoate by indigenous strains of *Acinobacter* and *Pseudomonas*. Rev. **Latinoam. Microbiology**, 30(3):283–288.
- Babu, K.S., Ajith-Kumar, P.V., Kunhi, A.A.M., 1995a. Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and phenolic compounds by a defined mixed culture of *Pseudomonas spp.* **World J Microbiol Biotechnol**, 11:148–152.
- Bai, J., Wen, J. P., Li, H.M., Jiang, Y., 2007. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*. **Pro Biochem**, 42(4): 510–517.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1986. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill Book Company, 984s, JAPAN.
- Banat, F.A., AL-Bashir, B., AL-Asheb, S., Hayajneh, O., 2000. Adsorption of Phenol by Bentonite. **Environmental Pollution**, 107(3): 391-398.
- Bandhyopadhyay, K., Das, D., Maiti, B. R., 1998 . Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. **Bioproc. Eng.**, 18 (5): 373 – 377.
- Bandhyopadhyay, K., Das, D., Maiti, BR., 1999. Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation. **Appl Microbiol Biotechnol**, 51: 891–895.
- Basha, K.M., Rajendran, A., Thangavelu, V., 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. **Society of Applied Sciences**, 2: 219-234.
- Bastos, A.E.R., Moon, D.H., Rossi, A., Trevors, J.T., Tsai, S.M., 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Arch Microbiol**, 174:346–52.
- Bayoumi, AR., Abul-Hamd, AT., 2010. Optimization of Bacterial Biodegradation of Toluene and Phenol Under Different Nutritional and Environmental Conditions. **Journal of Applied Sciences Research**, 6(8): 1086-1095.
- Beard, S.J., Hayes, P.K., Walsby, A.E., 1997. Growth competition between *Halobacterium salinarum* strain PHH1 and mutants affected in gas vesicle synthesis. **Microbiology UK**, 143: 467-473.

- Bertrand, J.C., Amallah, M., Acquaviva, M., Millie, G., 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. **Lett. Appl. Microbiol**, 11: 260–3.
- Birbir, M., Sesal, C., 2003. Extremely Halophilic Bacterial Communities in Sereflikoçhisar Tuz Lake in Turkey. **Turk. J. Biol.**, 27 (7) :7-22.
- Birbir, M., Ogan, A., Cali, B. And Mertoglu, B., 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. **World J. Of Microbiol and Biotechnol.**, 20:613-621.
- Birge, R. R., 1995. Protein-based computers. **Sci. Am.**, 66-71.
- Bonfá, M.R.L., Grossman, M.J., Piubeli, F., Mellado, E., Durrant, L.R., 2011. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. **Chemosphere**, 2: 1671–1676.
- Bonfá, M.R.L., Grossman, M.J., Piubeli, F., Mellado, E., Durrant, L.R., 2013. Phenol degradation bacteria isolated from hypersaline environments. **Biodegradation**, DOI 10.1007/s10532-012-9617-y.
- Borgne, S., Paniaqua, D., Vazquez-Duhalt, R., 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 15: 74-92.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., 1996. **Principles and Practices of Winemaking**. International Thomson Publishing, 604s, USA.
- Bowers, K.J., Wiegel, J., 2011. Temperature and pH optima of extremely halophilic Archaea. **Extremophiles**, 15: 119–128.
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., Arrighi, L., 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. **Journal of Hazardous Materials**, 160: 265–288.
- Bülbül, G., Aksu, Z., 1997. Atıksulardaki Fenol Kirliliğinin Serbest ve Ca- Aljinata Tutuklanmış *P.putida* ile Giderilmesinin Kesikli Karıştırmalı Tepkime Kabında Karıştırmalı Olarak İncelenmesi. **Turkish J. Eng. Environ Sci.**, 21:175-181.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., Di Donato, A., 2004. Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70:2211–2219.
- Callega, G., Serra, J., Rodriguez, J., 1993. Kinetics of Adsorption Phenolic Compounds from Wastewater onto Activated Carbon. **Carbon**, 3: 691-697.
- Cao, B., Geng, A., Chee, L., 2008. Induction of ortho- and meta- cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes, genomics and proteomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 81: 99–107.
- Carla, A. N., Babu, Z. F., 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Appl. Environ. Microbiol**, 70 (2): 1222-1225.
- Castillo, A.M., Gutierrez, M.C., Kamekura, M., Ma, Y., Cowan, D.A., Jones, B. E., Grant, W.D., Ventosa, A., 2006a. *Halovivax asiaticus* gen. Nov., sp. Nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from inner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 56: 765- 770.

- Castillo, A. M., Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A., 2007. *Halorubrum ejinorens* sp. Nov., isolated from lake Ejnor, inner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 2538-2542.
- Celik, G.Y., Aslim, B., Beyatli, Y., 2008. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. **J. Environ. Biol.**, 29: 867-870.
- Chaga, G., Porath, J., Illéni, T., 1993. Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. **Biomedical chromatography**, 7: 256-261.
- Chang, S., Li, J., Liu, F., 2011. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Ener.**, 36: 1517-1522.
- Christen, P., Davidson, S., Combet-Blanc, Y., Auria, R., 2011. Phenol biodegradation by the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* 98/2 in a fed-batch bioreactor. **Biodegradation**, 22: 475-484.
- Chung, T.P., Tseng, H.Y., Juang R.S., 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. **Process Biochem**, 38: 1497-1507.
- Clauben, M., Schmidt, S., 1998. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hypomycete *Scedosporium apiospermum*. **Res. Microbiol**, 149: 399-406.
- Collins, G., Clare, F., Sharon, M., Therese, M., Flaherty, V.O., 2005. Anaerobic biological treatment of phenolic wastewater at 15-18°C. **Water Res.**, 39: 1614-1620.
- Dagley, S., 1986. **Biochemistry of Aromatic Hydrocarbon Degradation in Pseudomonads**: In: Gonsalus, I.C., Sokatch, J.R.&Ornston, L.N. (Eds.) *The bacteria*, 10: 527-556.
- Danson, M., Hough, D.W., 1997. The structural basis of protein halophilicity. **Comp. Biochem. Physiol.**, 117A (3): 307-312.
- DasSarma, S., 1993. Identification and analysis of the gas vesicle gene cluster on an unstable plasmid of *Halobacterium halobium*. **Experientia**, 49: 482-486.
- Dawson, K.S., Freeman, K.H., Macalady, J. L., 2012. *Molecular characterization of core lipids from halophilic archaea grown under different salinity conditions*. **Organic Geochemistry**, 48: 1-8.
- Diaz, E., Prieto, M.A., 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 11: 467-475.
- Díaz, M.P., Boyd, K.G., Grigson, S.G.W., Burgess, J.G., 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnol. Bioeng.** 79(2):145-153.
- Dobbins, D. C., Thornton-Manning, J.R., Jones, D.D., Federle, T.W., 1987. Mineralization potential for phenol in subsurface soils. **J. Environ. Qual.**, 16:54-58.
- D'Souza, S.E., Altekar, W., D'Souza, S.F., 1997. Immobilization of *Haloferax mediterranei* aldolase by cross-linking in a proteinic matrix: stability and halophilic characteristics. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 13: 56-564.

- Dursun, A.Y., Tepe, O., 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. **J Hazard Mater.**, 126:105–111.
- Edwards, V. H., 1970. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. **Biotechnol. Bioeng.**, 12 (5):679-712.
- Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A., 2004. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. **World J. Microbiol. and Biotechnol.**, 20: 719-725.
- El-Naas, M., Al-Muhtaseb, S.A., Makhoul, S., 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **Journal of Hazardous Materials**, 164: 720–725.
- El-Sayed, W.S., Ibrahim, M.K., Abu-Shady, M., El-Beih, F., Ohmura, N., Saiki, H., Ando, A., 2003. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. **Biosci Biotechnol Biochem**, 67: 2026–2029.
- Elshahed, M.S., Savage, K.N., Oren, A., Gutierrez, M.C., Ventosa, A., Krumholz, L.R., 2004. *Haloferax sulfurifontis* sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 54: 2275-2279.
- Erdogmus, S.F., Mutlu, B., Korcan, S.E., Güven, K., Konuk, M., 2013. Aromatic Hydrocarbon Degradation by Halophilic Archaea Isolated from Çamaltı Saltern, Turkey. **Water Air Soil Pollut**, 224:1449.
- Euzeby, J.P., 2013. <http://www.bacterio.cict.fr>
- Fedorak, P.M., Hruday, S.E., 1986. Nutrient requirements for the methanogenic degradation of phenol and p-cresol in anaerobic draw and feed cultures. **Water Res.**, 20(7):929-934.
- Fedorak, P.M., Roberts, D.J., Hruday, S.E., 1986. The effects of cyanide on the methanogenic degradation of phenolic compounds, **Water Res.**, 20(10): 1315-1320.
- Feist, C.F., Hegeman, G.D., 1969. Phenol and Benzoate Metabolism by *Pseudomonas putida* : Regulation of Tangential Pathways. **J. Bacteriol.**, 100: 869.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Muller, R., Markl, H., 2003. Kinetic parameters of continuous cultures of *Bacillus thermoleovorans* sp. A2 degrading phenol at 65°C. **J Biotechnol**, 103: 29–135.
- Fialova, A., Boschke, E., Bley, T., 2004. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. **Int Biodeterior Biodegradation**, 54: 69–76.
- Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T.A., Burton, H. R., 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. System. **Appl. Microbiol.**, 11:20-27.
- Fritche W., Hofrichter, M., 2008. **Aerobic Degradation by Microorganism**. Rehm J., Reed.i G (Editor). Biotechnology: Enviromental Prosses II, Volume 11b, Second Edition, Weinheim, 144-167s, Germany.
- Fu, W., Oriel P., 1998. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227. **Extremophiles**, 2: 439–436.
- Garcia, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C., Ventosa, A., 2004. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. **Int J Syst Evol Microbiol**, 54: 1723–1728.

- García, M.T., Gallego, V., Ventosa, A., Mellado, E., 2005. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55: 1789–1795.
- García, M.T., Gallego, V., Ventosa, A., Mellado, E., 2005b. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. **Int J Sys Evol Microbiol**, 55: 1789–1795.
- García, M.T., Ventosa, A., Mellado, E., 2005b. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. **FEMS Microbiol Ecol**, 54: 97–109.
- Gayathri, K.V., Vasudevan, N., 2010. Enrichment of Phenol Degrading Moderately Halophilic Bacterial Consortium from Saline Environment. **J Bioremed Biodegrad**, 1: 104.
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schagger, H., Fuchs, G., 2002. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. **Journal of Bacteriology**, 184:6301–6315.
- Gibson, D.T., Zylstra, G.J., Chauhan, S., 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. **American Society for Microbiology**, 121-132.
- Gladyshev, M. I., Sashchik, N. N., Kalachova, G. S., Shchur, L. A., 1998. The effect of algal blooms on the disappearance of phenol in a small forest pond. **Water Res.** 32:2769–2775.
- González, G., Herrera, G., Garcia, M.T., Pena, M., 2001. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, 80: 137-142.
- Göçmen, A., 1983. **Haliç Sularında Fenoller, Eser Elementler, Sülfür Asidi ve “Oksitlenebilirlik Değerlerinin incelenmesi.** Doktora Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 101s, İstanbul.
- Grand, W. D., Kamekura, M., McGenitty, T. J. and Ventosa, A., 2001. **Order I. Halobacteriales In: Bergey’s manuel of systematic bacteriology V.I, the Archaea nd deeply branching and phototrophic bacteria,** (man.Ed.) 2nd Ed. New York.
- Guerra, R., 2001, Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, 44(8): 1737-1747.
- Gurujeyalekshmi, G., Oreil, P., 1988. Isolation of phenol degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55(2): 500-502.
- Hamitouche, A., Amrane, A., Bendjama, Z., Kaouah, F., 2010. Effect of the Ammonium Chloride Concentration on the Mineral Medium Composition – Biodegradation of Phenol by a Microbial Consortium. **Int. J. Environ. Res.**, 4(4): 849-854.
- Hao, O.J., Kim, M.H, Seager, E.A. Kim, H., 2002. Kinetics of Phenol and chlorophenol Utilization by *Acinetobacter* species. **Chemosphere**, 46: 797-807.
- Hartmann, R., Sickinger, H., D., Oesterhelt, D., 1980. Anaerobic growth of halobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77 (6): 3821-3825.
- Harwood, C.S., Parales, R.E., 1996. The b-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. **Annual Review of Microbiology** 50: 553–590.

- Hedrick, D.B., Guckert, J.B., White, D.C., 1991. Archaeobacterial Ether Lipid Diversity Analyzed by Supercritical Fluid Chromatography: Integration with a Bacterial Lipid Protocol. **J. Lipid Res.**, 32 : 659-666.
- Hezayen, F. F., Tindall, B. J., Steinbüchel and Rehm, B. H. A., 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobioforma nitratireducens* comb. nov. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol**, 52: 2271-2280.
- Higgins, I.J., Best, D.J., Jones, J., 1985. **Biotechnology**. Blackwell Scientific Publications, 422s, London.
- Hinteregger, C., Streichsbier, F., 1997. *Halomonas* spp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. **Biotechnology Letters** 19: 1099–1102.
- Hong-xia, C. 2011. Biodegradation of phenol by a newly isolated marine bacterial strain SM5. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(84):19551-19555.
- Hough, D. W., Danson, M. J., 1989. Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. **Letters in Applied Microbiology**, 9: 33-39.
- Hough, D.W., M.J. Danson., 1999. Extremozymes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 3: 39-46.
- <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/phenol.html>, Technology Transfer Network Air Toxics Website, Phenol.
- Hupert-Kocurek, K., Guzik, U., Wojcieszynska, D., 2012. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration. **Acta Biochim Pol.**, 59(3):345-51.
- ICSP, 2007. International Committee on Systematics of Prokaryotes (<http://www.theicsp.org/>).
- In support of summary information on the integrated risk information system (IRIS)., 2002, Toxicological Review of phenol.
- Inoue, A., Horikoshi, K., 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentration of toluene. **Nature**, 338: 264-266.
- Jiang, J.Q., Cooper, C., Ouki, S., 2002. Comparison of modified montmorillonite adsorbents. Part I: preparation, characterization and phenol adsorption. **Chemosphere**, 47: 711–6.
- Jiang, H.L., Tay, S.T., Maszenan, A.M., Tay, J.H., 2006. Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. **FEMS Microbiol Ecol.**, 57: 182–191.
- Kamekura, M., 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. **Extremophiles**, 2: 289-295
- Kaplan, İ., 2001. **Fermantasyon Kinetigi ve Modelleme**. Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 71s, İstanbul.
- Kargi, F., Uygur, A., 1996. Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing halophilic bacteria. **Environ. Technol.**, 17:325–330.
- Karigar, C., Mahesh, A., Nagenahalli, M., Yun, DJ., 2006. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. **Biodegradation**, 17: 47–55.
- Kates, M., Kushwaha, S.C., Sprott, G.D., 1982. Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria. **Methods in Enzym.**, 88:98-111.

- Kates, M., 1992. **Archabacterial lipids: structure, biosynthesis and function in: the archaeobacteria: biochemistry and biotechnology.** (Danson, M. J., Hough, D. W. and Lunt, G. G. Editor). The biochemical society, Portland press, London.
- Khleifat., K.M., 2006. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry** 41: 2010–2016.
- Kim, J.W., Humenick, M.J., Armstrong, N.E., 1981a. A comprehensive study on the biological treatabilities of phenol and methanol. I. Analysis of bacterial growth and substrate removal kinetics by a statistical method. **Water Res** 15: 1221–1231.
- Kim, E., Zylstra, G.J., 1995. Molecular and Biochemical Characterization of Two meta – cleavage Dioxygenases Involved in Biphenyl and m -xylene Degradation by *Beijerinckia* sp. Strain B1. **Bacteriol.**, 177 (11): 3095-3103.
- Kim, K.P., Seo, D.I., Min, K.H., Ka, J.O., Park, Y.K., Kim, C.K., 1997. Characteristics of catechol 2,3-dioxygenase produced by 4-chlorobenzoate- degrading *Pseudomonas* sp. S-47. **J. Microbiol**, 35: 295–299.
- Kira, H.M. Budman, C., Robinson, W., 2000. Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida*. **Biotechnol. Bioeng.**, 70 (3):291–299.
- Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., 2001. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. **Environ. Toxicol. Chem.**, 20: 2725–2735.
- Knoll, G., J. Winter., 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge: Benzoate formation from phenol and carbon dioxide in the presence of hydrogen. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 25:384–391.
- Krishnaswamy, V., Namasivayam, V., 2010 . Effect of pH, Nitrogen Sources and Salts on the Degradation of Phenol by the Bacterial Consortium Under Saline Conditions. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, 783–791.
- Kulichevskaya, I. S., Zvyagintseva, I. S., Tarasov, A. L. And Plakunov, V. K., 1992. The extremely halophilic archaeobacteria from some hypersaline ecotops. **Microbiology**, 46: 51-56.
- Kumar, A., Kumar, S. and Kumar, S., 2004. Biodegradation kinetics of phenol and cathecol using *Pseudomonas putida* 1194. **Biochemical Engineering Journal**, 22: 151-159.
- Kumaran, P., Paruchuri, Y.L., 1997. Kinetics of phenol biotransformation. **Water Res.**, 31:11-22.
- Kunte, H. J., Trüper, G., Stan-Lotter, H., 2001. Halophilic microorganisms. Astrobiology. (G. Horneck, C. Baumstark-Khan, Editor) In: **The quest for the conditions of life.** Heidelberg: Springer-verlag, ISBN: 3-540-42101-7.
- Kushner, D.J., 1978. Life in high salt and solute concentrations. Kushner DJ (ed.) In: **Microbial life in extreme environments.** Academic Press, 317–368, London.
- Kushner, D.J., 1985. The Bacteria, In *The Halobacteriaceae*, **Academic Press, Inc.**, 8 (3):171-213.
- Kurzbaum, E., Zimmels, Y., Kirzhner, F., Armon, R., 2010. Removal of phenol in a constructed wetland system and the relative contribution of plant roots, microbial activity and porous bed. **Water Science & Technology**, 6: 1327.

- Kwon, K.H., Yeom, S.H., 2009. Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. **Bioprocess Biosyst Eng**, 32: 435–442.
- Laowansiri, S., Vinitnantharat, S., Chaiprasert, P., Ha, S.R., 2008. Anaerobic degradation kinetics of reactive dye with different carbon sources. **J. Environ. Biol.**, 29: 309–314.
- Lefebvre, O., Moletta, R., 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. **Water Res.**, 40(20): 3671–82.
- Li, Y., Li, J., Wang, C., Wang, P., 2010. Growth kinetic and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. **Bioresource Technology** 101:6740–6744.
- Liu, YJ., Zhang, AN., Wang, XC., 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. **Biochem Eng J**, 44: 187–192.
- Lob, K.C., Tar, P.P., 2000. Effect of Additional Carbon Source on Biodegradation of Phenol. **Buletin of Environmental Contamination and Toxicology** 64: 756–767.
- Loh, K.C., Wang, S.J., 1998. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. **Biodegradation**, 8: 329–338.
- Luong, J.H.T., 1985. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, XXVII:280–285.
- Ma, H., Li, G., Fang, P., Zhang, Y., Xu, D., 2010. Identification of phenol-degrading *Nocardia* sp. strain C-14-1 and characterization of its ring-cleavage 2,3-dioxygenase. **Biotechnology and Bioengineering**, 2: 476–489.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles** 4: 91–8.
- Madigan, M. T., Martinko, M. J., Parker, J., 2000. **Biology of Microorganisms. Prentice Hall International**, ISBN: 0-13-085264-3.
- Madigan, T., Martingo, J.M., 2006. Prokaryotic Diversity: The Archaea in: *Biology of Microorganisms*. **Pearson Education Inc.**, 419–446.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock. 2010. **Mikroorganizmaların biyolojisi**. (11. baskıdan çeviri, Çeviri Edt. Cumhuriyet Çökmüş) Palme Yayıncılık, Ankara.
- Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Eliyas M., Radwan, S.S., 2010b. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. **Extremophiles**, 14(3): 321–328.
- Mancinelli, R. L., Hochstein L. I., 1986. The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, 35: 55–58.
- Marangeni, A.G., 2003. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. Department of Food Science University, 216s, Guelph.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Appl Microbiol Biotechnol**, 56: 650–663.
- Marin, M.R., 1999. Alcoholic Fermentation Modelling: Current State and Perspectives. **Am. J. Enol. Vitic.**, 50(2):166–178.
- Marrot, B., Barrios, A., Martinez, P., 2006. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. **Biochem. Eng. J.**, 30: 174–183. dioxygenase. **Int J Biol**, 2:79–83.

- Martins, L.F., Peixoto, R.S. 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Brazilian Journal of Microbiology**, 865-872.
- Maskow, T., Kleinstaub, S., 2004. Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* spp. EF11 growing on phenol. **Extremophiles**, 8: 133–141.
- Masque, C., Nolla, M., Bordons, A., 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. **Biotechnol Lett**, 9:655–660.
- McKEE, J.E., Wolf, H.W., 1963 **Water Quality Criteria**, Second Edition, A Report Prepared for the State of California Water Pollution Control Board.
- Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Fukushima, T., Kamekura, M., Usami, R., 2008. Acidophilic haloarchaeal strains are isolated from various solar salts. **Saline Syst.**, 4:16.
- Milo, R.E., Duffner, F.M., Muller, R., 1999. Catechol 2,3- dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. **Extremophiles**, 3: 185–190.
- Monod, J., 1949 .The growth of bacterial cultures. **Ann. Rev. Microbiol.**, 3:371-394.
- Monteiro, A.M.G., Boaventura, A.R., Rodrigues, A.E., 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. **Biochemistry Engineering Journal**, 6:45–49.
- Mordocco, A., Kuek, C., Jenkins, R., 1999. Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. **Enzyme Microb Technol** 25:530–536.
- Muñoz, J.A., Pérez-Esteban, B., Esteban, M., Escalera, S., Gómez, M.A., Martínez-Toledo, M.E., González-López, J. 2001. Growth of moderately halophilic bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source. **Folia Microbiologica**, Volume 46, 4: 297-302.
- Murakami, S., Nakanishi, Y., Kodama, N., Takenaka, S., Shinke, R., Aoki, K., 1998. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3- dioxygenase from the aniline- assimilating bacterium *Pseudomonas species* AW-2. **Biosci Biotechnol Biochem**, 62: 747–752.
- Nair, I.C., 2006. **Microbial degradation of phenol by a species of Alcaligenes isolated from soil**. P.h.D. Thesis, University of Mahatma Gandhi, 151s, India.
- Nagamani, A., Soligalla, R., Lowry, M., 2009. Isolation of phenol degrading *Xanthobacter flavus*. **African Journal of Biotechnology**, 20: 5449-5453.
- Nakhia, G.F., Al- Harazin, J.M., 1993. Simplified analysis of biodegradation kinetics of phenolic compound by heterogeneous cultures. **Environmental Technology**, 14: 751-760.
- Nordlund, I., Powlowski, J., Shingler, V., 1990. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. **J Bacteriol**, 172: 6826–6833.
- Nuridan, K.P., Azmi, T., 2005. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. **Process Biochemistry**, 40: 1807-1814.
- Oboirien, B., Amigun, O., Ojumu, B., Ogunkunle, T.V., Adetunji, O. A., Betiku, E., Solomon, B. O., 2005. Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. **Biotechnol**, 4(1):56-61.

- Oie, C.S.I., Albaugh, C.E., Peyton, B.M., 2007. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. **Water Research**, 41: 1235–1242.
- Oesterhelt, D., 1998. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. **Current opinion in structural biology**, 8: 489- 500.
- Okpokwasilli, G.C., Nweke, C.O., 2005. Microbial growth and substrate utilization kinetics. **African Journal of Biotechnology**, 5 (4): 305-317.
- Onysko, K.A., Budman, H.M., Robinson, C.W., 2000. Effect of Temperature on the Inhibition Kinetics of Phenol Biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5. **Biotechnology And Bioengineering**, 70: 3.
- Oren, A., Trüper, H. G., 1990. Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine *N*-oxide. **FEMS Microbiol. Letters**, 70: 33-36.
- Oren A., Peter G., Azachi M., Henis Y., 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. **Biodegradation**, 3: 387–398.
- Oren, A., Gurevich, P., 1993. Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the Dead Sea. **FEMS microbiology Ecology**, 12: 249- 256.
- Oren, A. 1994. The ecology of the extremely halophilic archaea. **FEMS mic. Reviews**, 13: 415-440.
- Oren, A., Litchfield, D. C., 1999. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 173: 353-358.
- Oren, A., 2001. The order halobacteriales. (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. And Stackebrandt, E., Editor). **In: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identifications, applications**. 3rd. Edition. Springer-Verlag, New york.
- Oren, A., Mana, L., 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. **Extremophiles**, 6: 217–223.
- Oren A., 2002b. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 28: 56–63.
- Oren, A., Mana, L., 2003 Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. **FEMS Microbiology Letters**, 223: 83-87.
- Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, 4: 2.
- Ornston, L.N., Stainer, R.Y., 1966. The Conversion of Catechol and Protocatechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. **IV Regulation, J.Biol. Chem** , 241:3800.
- Ortega, G., Lain, A., Tadeo, X., López-Méndez, B., Castaño, D., Millet, O., 2011. Halophilic enzyme activation induced by salts. **Scientific Reports**, 1: 6.
- Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., Caliskan, M., 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. **Microbiology**, 75(6): 739-748.
- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., Cokmus, C., 2007. Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17(6): 985-992.
- Ozcan B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36: 105–110.

- Pasic, L., Bartual, S.G., Ulrih, N.P., Grabnar, M., Velikonja, B.H., 2005. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. **FEMS Microbiol Ecol.** 54(3): 491-8.
- Patterson, J.W., 1977. **Wastewater Treatment Tecnology.** Ann Arbor Science pub. Inc., 532s ,USA.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D.H., 2009. Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2: 1-39.
- Peyton, B.M., Wilson, T., Yonge, D.R., 2002. Kinetic of phenol biodegradation in high salt solution. **Water Research**, 36: 4811–4820.
- Pirt, S. J., 1975. **Principles of microbe and cell cultivation.** Blackwell scientific publication. Oxford, United Kingdom.
- Powlowski, J., Shingler, V., 1994. Genetics and Biochemistry of Phenol Degradation by *Pseudomonas* sp.CF600. **Biodegradation.**, 5: 219–236.
- Prieto, M.B., Hidalgo, A., Rodriguez, FC., Serra, JL., Llama,MJ., 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis*. UPV-1 immobilized in air-stirred reactor with clarifier. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 58: 583-859.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F. and Ramos-Cormenzana., 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. **J.Appl. Bacteriol.**, 53: 155-161.
- Ramos, J., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., Segura, A., 2002. Mechanism of solvent tolerance in gram-negative bacteria. **Annu.Rev. Microbiol.**, 56: 743-768.
- Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, J. D., 2000. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. **Biotechnol. Bioeng**, 69 (4):385-400.
- Riser-Roberts, E., 1998, **Remediation of petroleum-contaminated soils: Biological, physical, and chemical Processes.** Lewis Publishers, ISBN: 0873718321 Boca Raton, FLA.
- Rodríguez, G. V., Youssef, C.H., Vilanova, J. W., 2006. Two-step modeling of the biodegradation of phenol by an acclimated activated sludge. **Chemical Engineering Journal**, 117: 245–252.
- Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A., 1979. Isolation of extreme halophiles from seawater. **Appl. And Environ. Microbiol**, 38 (1):164-165.
- Rodríguez-Valera, F., Lillo, J. A. G., Anton, J., Meseguer, I., 1991. Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. (Rodríguez-Valera, Editor). In: **General and applied aspects of halophilic microorganisms** Plenum. Pres New York, 373-380, New York.
- Russell, N. J., 1989. Adaptive Modifications in Membranes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes.**,2(1): 87-98.
- Sa, C. S. A., Boaventura, R. A. R., 2001. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a trickling bed reactor. **Biochem. Eng. J.**, 9 (3):211-219.
- Saéz, P.B., Rittmann, B.E., 1993. Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). **Biodegradation**, 4: 3–21.

- Saha, N.C., Bhunia, F., Kaviraj, A., 1999. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 63:195-202.
- Santos, V.L., Heilbuth, N.M., Braga, D.T., Monteiro, A.S., Linardi, V.R., 2003. Phenol degradation by a *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents. **J Basic Microbiol.**, 43:238–248.
- Santos, V.L., Linardi, V.R., 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential. **Proc Biochem**, 39(8): 1001-1006.
- Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A., Elshahed, M. S., 2007. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. Nov., sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a low salt, sulfide-rich spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 19-24.
- Schneegurt, M.A. 2012. Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. R. H. Vreeland (ed.), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*, VII, **Springer** pp:35-58.
- Schroeder, M., Muller, C., Posten, C., Deckwer, W.D., Hecht, V., 1997. Inhibition kinetics of phenol degradation from unstable steady state data. **Biotechnol. Bioeng.**, 54 (6):567-576.
- Sellek, G. A., Chaudhuri, J. B., 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme and Microbial Biotech.**, 25: 471-482.
- Serrano, J.A., Camacho, M., Bonete, M.J., 1998. Operation of glyoxylate cycle in halophilic archaea: presence of malate synthase and isocitrate lyase in *Haloferax volcanii*. **FEBS Letters**, 434: 13-16.
- Shand, R. F., Perez, A. M., 1999. Haloarchaeal growth physiology. (J.seckbah, Editor). In: **Enigmatic microorganisms and life in extreme environment**. Kluwer Academic Publisher, 414-424, Dordrecht.
- Shen, J., Rui He, H., Yu, L., Wang, J., Zhang, X., Sun, J., Li, W., Han and Lu Xu., 2009. Biodegradation of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in a biological aerated filter (BAF). **Bioresource Technol.**, 11:1922-1930.
- Shetty, K.V, Ramanjaneyulu, R., Srinikethan, G., 2007. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: effect of dilution rate and influent phenol concentration. **J Hazard Mater.**, 149:452–459.
- Shimp, R. J., Pfaender, F.K., 1985. Influence of Easily Degradable Naturally Occurring Carbon Substrates on Biodegradation of Monosubstituted Phenol by Aquatic Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49:394.
- Shingler, V., 1996. **Molecular and Regulatory Checkpoints in Phenol Degradation by Pseudomonas sp. CP600**. In: Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D., Silver, S. (eds.,) *Molecular Biology of Pseudomonads* Am. Soc. Microbiol., 153-164, Washington.
- Singh, H., 2006. **Mycoremediation**. Wiley Interscience, 467s, New Jersey.
- Solomon, B. O., Posten, C., Harder, M. P. F., Hecht, V., Deckwer, W.D., 1994. Energetics of *Pseudomonas cepacia* growth in a chemostat with phenol limitation. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 60 (3): 275-282.
- Sokol, W., 1988. Dynamics of continuous stirred-tank biochemical reactor utilizing inhibitory substrate. **Biotechnol. Bioeng.**, 31 (3):198-202.
- Sokol W., 1998. Uptake Rate of Phenol by *Pseudomonas putida* Grown in Unsteady State, **Biotechnology and Bioengineering**, 32:1097-1103.

- Stanbury, P.F., Whitaker, A., 1989. **Principles of Fermentation Technology**. Pergamon Pres, 1-24, Oxford.
- Stevens, D.K., Berthouex, P.M., Chapman, T.W., 1989. Dynamic model of nitrification in fluidized bed. **J Environ Div ASCE**, 115:910–929.
- Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği (SKKY), Resmi Gazete; 2004 tarihli ve 26687 sayılı Yönetmelik.
- Suhaila, Y.N., Rosfarizan M., Latif İ.A., Ariff, A.B., Ahmad, S.A., 2013. Nutrients and culture conditions requirements for the degradation of phenol by *Rhodococcus* UKMP-5M. **Journal of Environmental Biology**, 34: 635-643.
- Tang, L., Zeng, G.M., Shen, G.L., Li, Y.P., Zhang Y, Huang D.L., 2008. Rapid detection of picloram in agricultural field samples using a disposable immunomembranebased electrochemical sensor. **Environ Sci Technol.**, 42:1207–12.
- Tapilatu, Y. H., Grossi, V., Acquaviva, M., Militon, C., Bertrand, J. C., Cuny, P., 2010. Isolation of hydrocarbon degrading extremely halophilic Archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). **Extremophiles**, 14: 225– 231.
- Telefoncu, A., 1995. **Biyoteknoloji**. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No:152, 356s. İzmir.
- Tinberg, C.E., Song, W.J., Izzo, V., Lippard, S.J., 2011. Multiple roles of component proteins in bacterial multicomponent monooxygenases: phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. OX1. **Biochemistry**, 50(11): 1788-98.
- Tuah, M., Abdul Rashid, N.A., Salleh, M.M., 2009. Degradation Pathway Of Phenol Through-Cleavage By RETL-Cr1. **Borneo Science**, 24:432-567.
- Ulrich, A.C., Guigard, S.E., Foght, J.M., Semple, K.M., Pooley, K., Armstrong, J.E., Biggar, K.W., 2009. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. **Springer**, 20: 27-38.
- Usami, R., Fukushima, T., Mizuki, T., Yoshida, Y., Inoue, A., Horikoshi, K., 2005. Effect of NaCl concentration on the tolerance and polar lipid composition. **The society for biotechnology**, 2: 169-174.
- Vaino, M., Tindall, B. J. and Ingvorsen, K., 2000. *Halorhabdus utahensis* gen. Nov., sp. Nov., an aerobic, extremely halophilic member of the archaea, from Great Salt Lake, Utah. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 50: 183-190.
- Valenzuela, J., Bumann, U., Cespedes, R., Padila, R., Gonzalez, B., 1997. Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) in bleached kraft mill effluent. **Applied Environment Microbiology**, 63: 227–32.
- Van Schie, P.M., Young, L.Y., 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. **Bioremediation**, 4: 1–18.
- Veenagayathri, K., Vasudevan, N., 2011. Ortho and meta cleavage dioxygenases detected during the degradation of phenolic compounds by a moderately halophilic bacterial consortium. **International Research Journal of Microbiology (IRJM)**, 2(10): 406-414.
- Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Donato, A.D., Marzocchella, A., Salatino, P., Barbieri, P., Galli, E., 2006. An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. **J Biotechnol.**, 123:464–477.

- Vreeland, R.H., Straight, S., Krammes, J., Dougherty, K., Rosenzweig, W. D., Kamekura, M., 2002. *Halosimplex carlsbadense* gen. Nov., sp. Nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. **Extremophiles**, 6: 445-452.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G., 2001. **Industrial Microbiology: A Introduction**. Marston Book Services Ltd, 288s, LONDON.
- Wang, S.J., Loh, K.C., 1999. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 177–184.
- Wang, Y., Ye, T., Bin, H., Zhao H.B., BI, J., CAI, B., 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. **Journal of Environmental Sciences**, 19: 222–225.
- Ward, D.M., Brock, T.D., 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. **Appl Environ Microbiol.**, 35(2): 353-9.
- Wilson, L.P., Bouwer, E.J., 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnolog**, 18: 116–130.
- Woese, C.R., Kandler, O. And Wheelis, M. L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87: 4576-4579.
- Woolard, C.R., Irvine, R.L., 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. **Water Environ Res**, 66(3):230–5.
- Woolard, CR., Irvine, RL., 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. **Water Res**, 29(4):1159–68.
- Wu, I., Chow, K., Mark, K., 1983. The rol of pigments in Halobacterium cutirubrum against uv irradiation. **Microbiol. letter**, 24: 85-90.
- Yan, J., Jianping, W., Hongmei, L., Suliang, Y., Zongding, H., 2005. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. **Biochem Eng J**, 24: 243–247.
- Yang, R., Humphrey, A., 1975. Dynamics and steady state studies of Phenol degradation in pure and mixed cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, 17: 1211-1235.
- Yatsunami, R., Kawakami, T., Ohtani, H., 2000. A novel bacteriorhodopsin like protein from Haloarcula japonica strain TR-1: gene cloning, sequencing, and transcript analysis. **Extremophiles**, 4: 109-114.
- Yemendzhiev, H., Peneva, N., Zlateva, P., Krastanov, A., Alexieva, Z., 2012. Growth Of Trametes Versicolor in nitro and hydroxyl phenol derivatives. **Biotechnol. & Biotechnol.**, 26(1):2726-2730.
- Yeom, S.H., Kim, S.H., Yoo, Y.J., Yoo, I.S., 1997. Microbial adaptation in the degradation of phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. **Korean J Chem Eng**, 14: 37–40.
- Yıldız, G., 2001. **Çeşitli Aktif Karbonlar Kullanılarak Atıksulardan Adsorbsiyon Yöntemi ile Fenol Giderimi**. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 48s, Erzurum.
- Yordanova, G., Ivanova, D., Godjevargova, T., Krastanov, A., 2009. Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on modified polyacrylonitrile membrane. **Biodegradation**, 20: 717–726.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. **Chemosphere**, 41: 1463-1468.

- Zeng, G.M., Xu, K., Huang, J.H., Li, X., Fang, Y.Y., Qu, Y.H., 2008. Micellar enhanced ultrafiltration of phenol in synthetic wastewater using polysulfone spiral membrane. **J Membr Sci**, 310:149–60.
- Zhang, W., Bouwer, E., Wilson, L., Durant, N., 1995. Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms. **Water Sci Technol.**, 31: 1–14.
- Zhi-Feng, L., Guang-Ming, Z., Jing, W., Zhong, H., Ying, D., Xing-Zhong, Y., 2010. Effects of monorhamnolipid and Tween 80 on the degradation of phenol by *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, 45: 805–809.
- Zou, Y., Wei, J., Jiang, T., Gao, W., Ma, Y., Wei, D., 2007. Characterisation of thermostable catechol 2,3-dioxygenase from phenanthrene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ZJF08. **Ann Microbiol**, 57: 503–508.
- Zvyagintseva, I. S., Tarasov, A. L., 1988. Extreme halophilic bacteria from saline soils. **Microbiology**, 56: 664–668.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikirlerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Birgül ÖZCAN'a ayrıca tezimin başlangıcından sonuna kadar her konuda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen sorularımı sabırla cevaplayan değerli hocam Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN'a, çalışmamda önerilerini esirgemeyen Dr. Vinothkannan RAVİCHANDİRAN'a, manevi desteğini esirgemeyen Dr. Eminur Elçi'ye ve deneylerimde yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Evrim YILDIZ, Zehra EROĞLU, Yıldız İNEL ALÇI, Ümit TOR, Eaylettin ÖZTÜRK ve Yağmur AL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim esnasında ve sonrasında manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşım Mustafa ÜRE'ye ve kardeşim Ece AÇIKGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen başta annem Yüksel AÇIKGÖZ'e ve aileme teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Hatay’da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Hatay’da tamamladım. 2004 yılında, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde (Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Opsiyonu) lisans eğitimime başladım ve 2009 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldum. 2007 yılında, Ege Üniveristesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünde (Biyoteknoloji Ağırlıklı Biyokimyagerlik Opsiyonu) Çift Ana Dal programını kazandım ve 2010 yılında bölümden mezun oldum. 2010 yılında Progen Tohumculuk A.Ş. Biyoteknooloji Laboratuvarında Asistan olarak çalışmaya başladım ve aynı yıl içinde Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisansa başladım. Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Aynı zamanda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı’nda ÖYP Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.