*Research Journal of Biology Sciences*
*E-ISSN: 1308-0262 16(1): 26-37, 2023*
*Research Article*

# *Pseudomonas hydrolytica* BAKTERİSİ İLE PİREN HİDROKARBONUNUN BİYODEGRADASYONU

Dilara Ulusoy [1,a,*], Cansu Filik İşçen [2,b]

[1]*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 26480, Eskişehir, Türkiye*

[2] *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, 26480, Eskişehir, Türkiye*

[*]*Corresponding Author:*

*E-mail: dulusoy133@gmail.com*

(Received 24th April 2023; accepted 26th May 2023)

a: ORCID 0000-0002-9212-3125, b: ORCID 0000-0001-5463-8825

**ÖZET.** Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) kullanımı sırasında yapılan ihmal ve hatalar sonucunda, petrolün dökülmesiyle ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bırakılan toksik, mutajen ve kanserojen bileşiklerdir. PAH'ların çevrede birikmeleri ve uzun süre kalmaları çevreyi ve biyolojik dengeyi etkilemektedir. PAH'ların çevreden uzaklaştırılmasında, biyodegradasyon en önemli ve en temel mekanizmadır. Mikroorganizmalar tarafından çeşitli kimyasal bileşikler enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılarak farklı biyolojik ürünlere dönüştürülmektedir. Piren, ABD Çevre Koruma Ajansının öncelikli kirleticiler olarak sınıflandırdığı hidrokarbonlar arasında yer alır. Piren yüksek molekül ağırlıklı bir PAH'dır. Bu PAH grubu biyolojik parçalanmaya karşı dirençlidir ve bu sebeple çevrede daha kalıcıdır. Bu çalışmada Sinop Limanından alınmış toprak örneğinden izole edilen *Pseudomonas hydrolytica*'nın piren hidrokarbonunu %73 oranında degrade ettiği bulunmuştur. Taguchi metodu kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmış ve biyodegradasyon üzerine etki eden faktörlerin sıcaklık, pH ve tuzluluk olduğu; sıcaklık 31°C, pH 6, piren konsantrasyonu 1g/L ve tuzluluk oranı 0.1 g/L olduğunda en iyi biyodegredasyon saptanmıştır. Sonuç olarak, biyodegradasyon yeteneğine sahip mikroorganizmalar kullanılarak çevrede problem oluşturan PAH'ların ortadan kaldırılması ve kirliliğin azaltılması, PAH'ların biyoremediasyon çalışmaları için potansiyel oluşturmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Poliaromatik hidrokarbonlar, Biyolojik Parçalanma, Bakteri*

## GİRİŞ

PAH olarak adlandırdığımız polisiklik aromatik hidrokarbonlar 2 ya da 7 benzen halkasına sahip organik, apolar ve hidrofobik bileşiklerdir. Bu hidrokarbonların uzun süre çevrede kalmaları ve çevrede birikmeleri biyolojik dengeyi etkilemektedir. Bu kirliliğin etkileri kısa veya uzun sürebilir. Sucul ekosistemlerde polisiklik aromatik hidrokarbonlar hidrofobik olduklarından su içinde çözünmez, dağılmış süspanse şekilde suyu sararlar. Yüzeydeki PAH'ların yaklaşık olarak %25'i bir günde buharlaşır kalan kısımda emülsiyon durumuna dönüşerek, küçük tanecikler şeklinde suya karışmaktadır [1].

PAH'ların oluşumları doğal veya insan kaynaklı olabilir. Orman yangınları, volkanik patlamalar doğal kaynaklı PAH oluşumuna örnek verilebilir. İnsan kaynaklı PAH oluşumları ise sigara, motorlu taşıtlar, endüstriyel kaynaklardandır. Endüstriyel kaynaklar, petrol rafinerileri, asfalt üretimi, metal üretimi, çimento fabrikaları, çöp yakımı gibi durumları kapsar.

PAH'lar mutajenik, toksik ve kanserojeniktirler. Bu durumlarından dolayı gıdalardaki ve çevredeki miktarları canlı sağlığı bakımından önemli hale gelmiştir. Salamura ürünleri,

sigara ve yanan odun dumanları, sebze, meyve, bakliyat, et, kirlenmiş anne sütü veya inek sütünde PAH'lar karşımıza çıkmaktadır.

Kirlenmiş havada, toprakta ve suda yetişen ürünler de aynı şekilde PAH içerebilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda pişirilme, mangal gibi durumlar da PAH miktarında artışa neden olmaktadır [2]. Polisiklik aromatik hidrokarbonları biyolojik olarak parçalayan mikroorganizmaların tespit edilmesi, izolasyonu ve karakterizasyonu, çevrenin minimum zamanda temizlenmesi için büyük önem taşımaktadır. ABD Çevre Koruma Ajansı( EPA) 16 tane polisiklik aromatik hidrokarbonları 'öncelikli kirleticiler' olarak sınıflandırmıştır. Bunlar; piren, benzo(a)piren, naftalen, asenaften, asenaftilen, antrasen, benzo(a)antrasen, floren, fenantren, floranten, benzo(b)floranten, benzo(k)floranten, krisen, indenol(1,2,3-c,d) piren, benzo(g,h,i)perilen ve dibenzo(a,h)antrasen'dir [2]. Bu sıralanan 16 PAH bileşikleri ve bunların yıkım ürünleri, hücre bölünmesini denetleyen mekanizmalar üzerinde onarılamayan hasarlara ve tümör oluşumuna yol açarlar [3]. 16 PAH'ın öncelikli kirleticiler arasında sayılmasının nedenlerinden birincisi; bu PAH'larla ilgili daha fazla bilgiye sahip olunmasıdır. Bu PAH'lar diğerlerine göre fazla toksiktir, zararlı etki gösterirler ayrıca bu PAH'lara diğerlerine göre maruz kalma riski daha fazladır [2].

Biyodegradasyon, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleriyle organik kirleticileri zararsız formlara dönüştürme reaksiyonlarına denir. Biyodegradasyonla kirleticiler doğal yollarla, kontamine olmuş bölgeden uzaklaştırılmaktadır [4]. Mikroorganizmalar, karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli organik maddeleri kullandıkları için, organik kirleticilerden kaynaklanan kirliliklerin giderilmesinde biyodegradasyon yöntemlerinde parçalayıcı ajan olarak kullanılır [4]. Biyodegradasyonda biyolojik olarak parçalanabilen bileşikler, mikroorganizmanın ekstraselüler enzimlerine bağlanıp hücre zarından geçip, hücre içerisine taşınırlar. Hücre içinde seri dönüşüm reaksiyonlarıyla daha küçük ara ürünlere parçalanırlar. Bu tepkimeler sırasında enerji açığa çıkar ve bu enerji hücrelerin onarılmasında, bileşiklerin hücreye taşınmasında ve hareket etmesi için kullanılır [4].

Biyodegradasyon sürecinde, funguslar karsinojenik yan ürün oluşumuna yol açarken bakteriler karsinojenik madde oluşturmaz, aromatik hidrokarbonları detoksifiye eder [5]. Bakterilerin ve fungusların polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayabilme mekanizmaları birbirinden farklı gelişir [6]. Bakteriler karbon kaynağı olarak hidrokarbonu kullanırlar. Funguslar ise enzim salgılayarak hidrokarbonları suda çözünür bileşiklere dönüştürürler. Sitokrom P-450 enzim sistemiyle funguslar polisiklik aromatik hidrokarbonları okside ederek trans-dihidrodiolleri ve fenolleri oluştururlar [6].

Piren yüksek molekül ağırlıklı bir PAH'dır. Bu PAH grubu biyolojik parçalanmaya karşı dirençlidir ve bu sebeple çevrede daha kalıcıdır. Bu yüzden çalışmada hidrokarbon olarak piren tercih edilmiştir [7,8,9,10]. Pirenin halka yapısının etrafında bulunan p- elektronları sebebiyle biyodegradasyona karşı dirençlidir bu sebeple de çevrede uzun yıllar kalmaktadır. Kimyasal formülü C16H10 olarak gösterilir. Organik bileşiklerin yanması sonucunda meydana gelir. Sarı ve kristal formda bulunur, hidrofobik yapıdadır ve saf su içinde çözünmezler. Keskin bir kokuya sahiptir [6].

Günümüze kadar pireni degrade edebilen birçok mikroorganizmalarla çalışmalar sürdürülmüştür. *Mycobacterium* pireni karbon kaynağı olarak kullanabilen ve degrade edebilen bir cinstir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Pseudomonas, Rhodococcus* cinslerine ait bazı türlerin de piren hidrokarbonunu parçaladığı bildirilmiştir [10,11].

Bu çalışmada *Pseudomonas hydrolytica* bakterisinin piren hidrokarbonunu degradasyonu ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

### *Bakteri İzolasyonu*

Sinop ve Ayancık İstefan Limanı'nın petrol ile kirlenmiş bölgelerinden su ve toprak örnekleri alınıp bakteri izolasyonları yapılmıştır [12].

### *Pireni Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi*

İzole edilen bakterilerin piren hidrokarbonunu degrade edebilme yeteneklerinin araştırılması için Zhao ve ark. (2009) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem, piren biyodegradasyonun tespit edilmesi için kullanılan basit ve oldukça hızlı bir yöntemdir [12,13].

### *Piren Degradasyonunun Belirlenmesi*

*Spektrofotometrik Yöntem*

Farklı konsantrasyonlarda piren içeren Bushnell Haas besiyerinde üretilen kültürler 10. gün sonunda çıkartılıp falkonlara alınıp 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek pelet kısmı uzaklaştırılmıştır. Elde edilen supernatant kısmına DCM (diklorometan) (1:2) eklenerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ortamda bulunan piren ve aseton/EtOAc, DCM içinde çözünerek alt faza geçip, üst faz alt fazdan ayrılarak uzaklaştırılmıştır. Ekstrakte edilen hidrokarbon 420 nm 'ye ayarlanmış olan spektrofotometrede köre karşı okutulup hidrokarbonun başlangıç ve son absorbans değerleri arasındaki fark % biyodegradasyon olarak değerlendirilmiştir [14].

*GC_MS ile Metabolitlerin Belirlenmesi*

Analiz öncesi piren hidrokarbonuna türevlendirme yapılmıştır. İzolatlar 8 mg piren içeren 100 ml BH besiyerinde 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 10. günün sonunda alınan örnekler 4000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatant alınıp 3 kez 10 ml etilasetatla sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Üst faz alınarak Rotary Evoparotörde vakum altında buharlaşana kadar konsantre edilmiştir. Kalan kalıntı 1 ml kloroform ile çözdürülüp tekrar buharlaştırılmıştır. Buharlaştıktan sonra 40µl piridin, 40µl N,o-bis-trimetilsililasetamid ve 20µl trimetilklorosilan ile karıştırılmasının ardından 80 $^{o}$C'de 10 dakika boyunca azot atmosferi altında inkübe edilmiştir. GC_MS analizinden önce tekrar 1 ml kloroform ile seyreltilmiştir [15]. Türevlendirmeden sonra Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezine GC-MS analizi için örnekler gönderilmiştir.

### *Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Testler*

Bakteri identifikasyonu için; gram boyama, katalaz, oksidaz, lipaz, hareket, sıcaklık, indol, $H_2S$ testleri uygulanmıştır.

### *İzole edilen Mikroorganizmaların Tanımlanması*

Moleküler testler hizmet alımı şeklinde, Eskişehir MST Lab Biyoteknoloji Şirketinde yapılmış ve işlemler takip edilmiştir.

### *Piren Varlığında Degradasyon Oranının Deneysel Tasarımı*

Taguchi metodu kullanılarak, sıcaklık, pH, tuzluluk gibi parametrelerin piren biyodegradasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişken ve düzeyler belirlenirken diğer literatür çalışmaları göz önünde bulundurulmuştur. Deney tasarım sonuçları ANOVA ile hesaplanmıştır. Denemelere göre toplamda 27 deney seti kurulmuştur. Deneyler paralel olarak yapılmıştır. Sıcaklık için 27 ºC- 37 ºC -47 ºC düzeyleri, pH için 6-7-8 düzeyleri, piren konsantrasyonu için, 0,1 g/L- 0,5 g/L- 1 g/L düzeyleri, tuzluluk için, 0,1 g/L- 0,5 g/L- 1 g/L düzeyleri çalışılmıştır. Değişkenlerin deneme düzeyleri Çizelge 1.'de gösterilmiştir.

***Çizelge 1.*** *Değişkenlerin deneme düzeyleri*

| Deney | Sıcaklık | pH | Tuzluluk | Piren Kons. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 27 | 6 | 0,1 | 0,1 |
| 2 | 27 | 6 | 0,1 | 0,1 |
| 3 | 27 | 6 | 0,1 | 0,1 |
| 4 | 27 | 7 | 0,5 | 0,5 |
| 5 | 27 | 7 | 0,5 | 0,5 |
| 6 | 27 | 7 | 0,5 | 0,5 |
| 7 | 27 | 8 | 1 | 1 |
| 8 | 27 | 8 | 1 | 1 |
| 9 | 27 | 8 | 1 | 1 |
| 10 | 37 | 6 | 0,5 | 1 |
| 11 | 37 | 6 | 0,5 | 1 |
| 12 | 37 | 6 | 0,5 | 1 |
| 13 | 37 | 7 | 1 | 0,1 |
| 14 | 37 | 7 | 1 | 0,1 |
| 15 | 37 | 7 | 1 | 0,1 |
| 16 | 37 | 8 | 0,1 | 0,5 |
| 17 | 37 | 8 | 0,1 | 0,5 |
| 18 | 37 | 8 | 0,1 | 0,5 |
| 19 | 47 | 6 | 1 | 0,5 |
| 20 | 47 | 6 | 1 | 0,5 |
| 21 | 47 | 6 | 1 | 0,5 |
| 22 | 47 | 7 | 0,1 | 1 |
| 23 | 47 | 7 | 0,1 | 1 |
| 24 | 47 | 7 | 0,1 | 1 |
| 25 | 47 | 8 | 0,5 | 0,1 |
| 26 | 47 | 8 | 0,5 | 0,1 |
| 27 | 47 | 8 | 0,5 | 0,1 |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### *Bakteri İzolasyonu*

Sinop Limanı'ndan alınan örneklerle yapılan izolasyonda toprak örneklerinden 28, su örneklerinden 18 olmak üzere toplamda 46 izolat elde edilmiştir [12].

### *Pireni Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi*

En iyi büyüme sağlayan izolatların 13, 17 ve 62 olduğu ve bu izolatların piren hidrokarbonunu parçalayabildikleri tespit edilmiştir. Şekil 1.'de izolatın tek karbon kaynağı piren olan Bushnell Haas besiyerinde üremesi görülmektedir. İnkübasyondan sonra filtre kağıdının üzerinde ve çevresinde üremenin gerçekleşmesi, bu izolatların pireni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp parçalayabildiklerini, üreme yoksa pireni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmadıklarını göstermektedir [12].



***Şekil 1.*** *Pireni Degrade Eden Bakteri*

***Piren Degradasyonunun Spektrofotometrik Yöntem ile Belirlenmesi***

80 ppm de en iyi büyüme gösteren 13 numaralı izolatın biyodegradasyon yüzdesini belirlemek için kullanılan spektrofotometrik yöntem sonucunda, bu izolatın 80 ppm de %73 oranında pireni degrade ettiği bulunmuştur [12]. Çizelge 2.'de 13 numaralı izolatın biyodegradasyon yüzdeleri verilmiştir.

***Çizelge 2.*** *13 Numaralı İzolatın Biyodegradasyon Yüzdeleri*

| PPM | BİYODEGRADASYON % |
|---|---|
| 20 | 42 |
| 40 | 44 |
| 80 | 73 |
| 120 | 42 |
| 160 | 57 |

***Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Testler***

PAH ile kirlenmiş ortamlardan izole edilen bakteri örneğine Çizelge 3.'te yer alan testler uygulanmıştır. Testler sonucunda bakterinin gram negatif, basil, ve hareketli olduğu +4 $^{o}$C 'de üreyemediği ancak 41 $^{o}$C'de büyüme gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanında uygulanan testler sonucu oksidaz, katalaz, lipaz, $H_2S$ üretimi pozitif, indol üretimi negatif olarak gözlenmiştir.

***Çizelge 3.*** *Uygulanan biyokimyasal ve morfolojik testler*

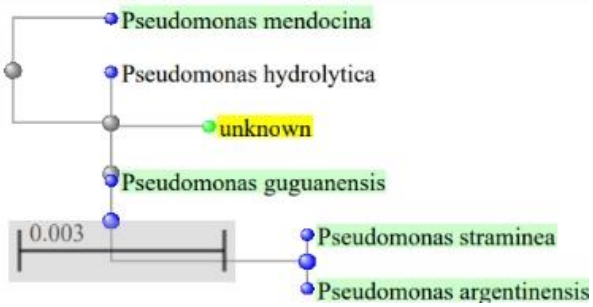
| Biyokimyasal ve Morfolojik Testler | *Pseudomonas hydrolytica* |
|---|---|
| Gram Boyama | - |
| Oksidaz Testi | + |
| Katalaz Testi | + |
| İndol Testi | - |
| Hareket Testi | + |
| Lipaz Testi | + |
| $H_2S$ Testi | + |
| Sıcaklık Testi 4 °C | - |
| Sıcaklık Testi 41 °C | + |

***İzole edilen Mikroorganizmaların Tanımlanması***

Dizi analizi için 1492R primeri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 13 numaralı izolatın %99,86 oranında *Pseudomonas hydrolytica* türüyle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.'te 13 nolu izolatın dizi analiz sonucu verilmiştir. Şekil 2.'de izolatın filogenetik ağacı gösterilmiştir.

***Çizelge 4.*** *13 Numaralı izolatın dizi analizi sonucu*

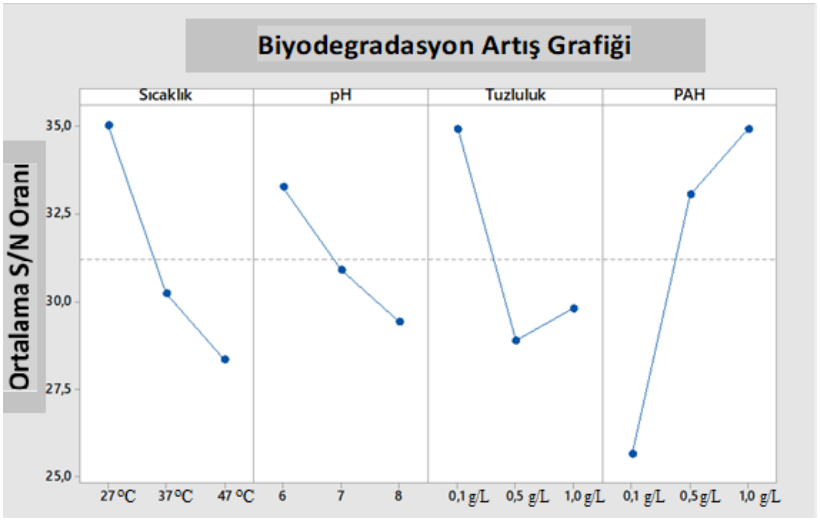
| İzolat Kodu | Primer | Benzerlik gösteren tür | % | Referans Numarası |
|---|---|---|---|---|
| 13 | 1492R | *Pseudomonas hydrolytica* strain DSWY01 16S ribosomal RNA, partial sequence | %99,86 | NR_170428.1 |




***Şekil 2.*** *13 numaralı izolatın filogenetik ağacı ve kısmi 16S rRNA gen dizilerine dayanan yakından ilişkili türlerin tip suşları.*

***Piren Varlığında Degradasyon Oranının Deneysel Tasarımı***

Analiz sonuçlarına göre, $p<0,05$ değerler anlamlı kabul edilirken $p>0,05$ değerler anlamsız olarak değerlendirilmiştir. Sıcaklık, pH, tuzluluk değişkenleri $p<0,05$ aralığını sağladığı için anlamlı kabul edilmektedir. Ancak piren konsantrasyonu değişkeni $p>0,05$ olduğundan anlamsızdır. Şekil 3.'te değişkenlerin biyodegradasyon artış hareketleri grafiği yer almaktadır.




***Şekil 3.*** *Değişkenlerin biyodegradasyon artış hareketleri grafiği*

Şekil 3.'te dört farklı değişkenin en yüksek biyodegradasyon artış hareketleri gösterilmektedir. Sıcaklık değeri 27 $^{o}$C iken biyodegradasyon artışının maksimum olduğu görülmektedir. Sıcaklık 37 $^{o}$C ve 47 $^{o}$C 'ye çıkarıldığında biyodegradasyonda azalış meydana gelmektedir. Biyodegradasyon ortalaması olarak maksimize edilen değer 31$^{o}$C'dir. Sıcaklık, PAH'ların biyodegradasyon hızlarına, çözünebilirliğine etki etmektedir. Biyodegradasyonun geniş sıcaklık aralıklarında gerçekleşebilmesinin yanında, düşük sıcaklıklarda da biyodegradasyon hızlarında düşme yaşanır. Sıcaklık faktörü düşük molekül ağırlığına sahip PAH'larda uçuculuğu azaltarak mikroorganizma üzerinde toksik etki yaratır. Genellikle en yüksek biyodegradasyon, toprakta 30$^{o}$C ila 40$^{o}$C arasında görülmektedir [16]. Literatür de yüksek sıcaklıklarda, PAH'ların mikrobiyal membranlarda toksik etki gösterdiği, termofilik bakterilerin sadece alkanların biyodegradasyonunda yüksek sıcaklıklarda etkili olabileceği belirtilmektedir [17]. Çalışmamızda 37 $^{o}$C ve 47 $^{o}$C'de biyodegradasyonun azalışı yukarıdaki bilgiyi desteklemektedir. Singh ve ark. piren biyodegradasyonunda optimum sıcaklık değerini 30 $^{o}$C olarak bulmuşlardır[18].

pH değişkeni için değerlendirme yapıldığında, pH 6 iken biyodegradasyon artışı maksimum değerde ancak pH 7 ve pH 8 de biyodegradasyonda azalış söz konusudur. PAH biyodegradasyonu genellikle nötral pH aralığında gerçekleşmektedir. Ancak çeşitli organik kirleticileri ve ağır metal bulunduran ortamlar gibi asidik pH koşullarında da biyodegradasyon gerçekleşmektedir [16,19].

Tuzluluk değişkeni için değerlendirme yapıldığında, 0,1 g/L tuzluluk oranında biyodegradasyon artışı maksimum düzeydedir. Tuzluluk arttıkça biyodegradasyonda azalış meydana gelmektedir. PAH'ların mikroorganizmalar ile biyodegradasyonu tuzcul ortamlarda yüksek tuz konsantrasyonu nedeniyle, osmatik strese, besin azlığına ve suya yanıt oluşturamayacağından her mikroorganizmayla yapılamamaktadır, bu durumlarda halotolerant veya halofilik mikroorganizmalar gereklidir [20,21]. Besiyerinde ki yüksek tuz konsantrasyonları, elde ettiğimiz izolatın hücresel aktivitesinde ve büyümesinde düşüşe

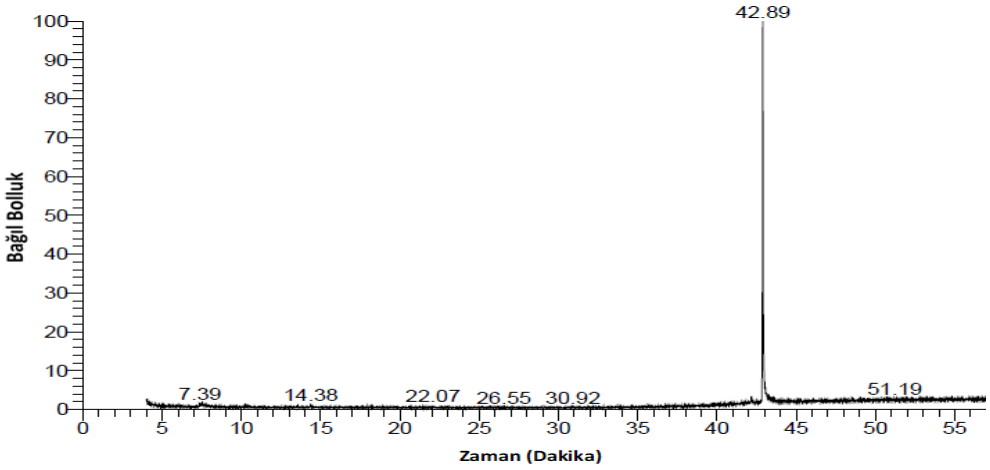
sebep olduğu için 0,5 g/L ve 1 g/L tuz konsantrasyonlarında biyodegradasyonu azalmıştır. Singh ve ark. yaptıkları çalışmada optimum tuzluluk oranı 0,1 g/L olarak belirlemişlerdir[18].

Piren konsantrasyonu için bakıldığında ise piren miktarı arttıkça biyodegradasyonda artış gözlemlenmiştir. Maksimum biyodegradasyon artışı 1 g/L piren konsantrasyonunda meydana gelmiştir. *Pseudomonas hydrolytica* için yüksek piren konsantrasyonları degradasyon hızını arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda düşük konsantrasyonların bakteri için karbon kaynağı ve enerji kaynağı açısından yetersiz kalabileceğini, yüksek konsantrasyonların da bakteri için gerekli olan oksijen ve besini sınırlayarak biyodegradasyonun azalmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir [14,22,23]. Singh ve ark. yaptıkları çalışmada optimum piren konsantrasyonunu 0,5 g/L olarak belirlenmiştir [18].

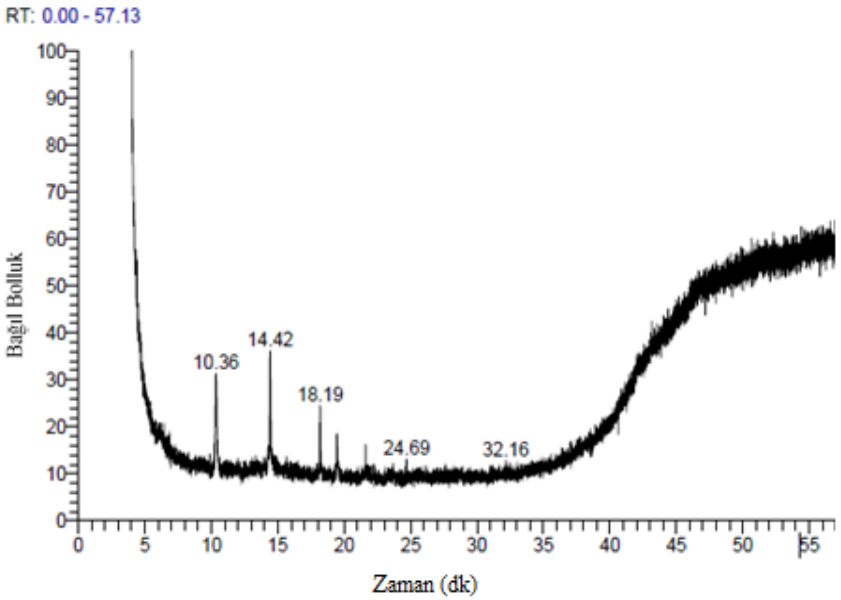
### *GC-MS ile Metabolitlerin Belirlenmesi*

İzolatın Taguchi metodu ile optimizasyon koşullarının belirlenmesinin ardından spektrofotometrik yöntemle belirlenen piren biyodegradasyonunun, desteklenmesi ve parçalanma ürünlerinin tespit edilmesi için GC-MS analizi yapılmıştır.

Piren hidrokarbonun verdiği pik Şekil 4.'te, piren biyodegradasyon metabolitlerinin GC-MS kromatogramı Şekil 5.'te, elde edilen parçalanma ürünleri ise Çizelge 5.'te verilmiştir.




***Şekil 4.*** *Piren Hidrokarbonun GC Kromatogramında verdiği pik*




***Şekil 5.*** *Piren biyodegradasyon metabolitlerinin GC-MS kromatogramı*

***Çizelge 5.*** *GC-MS sonrası oluşan metabolitler*

| Pik# | Metabolit Adı | Alıkonma süresi | % Alan | Alan |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Siklohekzasiloksan, dodekametil | 10.34 | 28.54 | 2762681.26 |
| 2 | Sikloheptasiloksan, tetradekametil | 14.42 | 21.61 | 2091369.83 |
| 3 | Benzoik asit, 2,4-bis(trimetilsiloksi)-trimetilsili ester (CAS) | 18.19 | 11.45 | 1108504.22 |
| 4 | Metan (CAS) | 19.46 | 9.04 | 875318.96 |
| 5 | Silikon yağı | 21.61 | 4.71 | 456051.17 |
| 6 | Asetamid, N-[(4-metoksi fenil) metil)]- (CAS) | 24.69 | 1.85 | 178751.54 |
| 7 | Katin (CAS) | 24.69 | 1.85 | 178751.54 |
| 8 | Benzoik asit, 3,4,5-trihidroksi-,propan ester(CAS) | 51.00 | 1.51 | 146021.88 |

Çizelge 5'de ki 1. sütun oluşan pik numaralarını göstermekte, 3. sütun alıkonma sürelerini, 4. sütun oluşan yan ürünün örnek içindeki bulunma yüzdesini, 5.sütun ise pik alanını göstermektedir. Pik yüksekliği madde miktarıyla doğru orantılıdır. Kromatogramlardaki düşük şiddetli piklerin sebebi dedektör kaynaklı olabilmektedir.

Degradasyon sonrası elde edilen metabolitler; Siklohekzasiloksan dodekametil, sikloheptasiloksan tetradekametil, benzoik asit, metan, silikon oil, asetamid, katin olarak belirlenmiştir. Piren hidrokarbonunun degradasyon sonrası daha az toksik benzoik asit, silicone oil, katin gibi ürünlere dönüştürüldüğü gözlenmiştir. Oluşan ürünlerden benzoik asit, antimikrobiyal özellikleri sebebiyle çikolata, soslar, ketçap, mayonez, sakız, fırın mamulleri gibi gıdalarda, kozmetik ürünlerinde, ilaçlarda ve merhem yapımında kullanılmaktadır [24,25,26]. İnsanlarda benzoik asitin akut toksisitesi düşüktür, vücutta birikmez, vücuttan kolaylıkla dışarı atılır [27]. Silikon yağları düşük toksisiteye ve düşük yan etkiye sahip olduğu için tıpta da oldukça kullanılan bir üründür. Ayrıca bakteriler için de herhangi, bir toksik etkisi görülmemiştir [28]. Katinler, merkezi sinir sistemini uyarırlar, dopaminerjik ve noradrenerjik aktiviteye sahiptir. Farmakoloji endüstrisinde kullanılmaktadır [29].

## SONUÇ

PAH'lar, kanserojen ve mutajen etkileri sebebiyle en fazla araştırılan organik bileşiklerdir. Beyaz, renksiz ya da sarı renkte, suda çözünmeyen hidrofobik yapıya sahiptirler. Özellikle kıyı bölgeleri, büyükşehirler, sanayi bölgeleri çevredeki PAH kirliliğinin artışına sebep olmaktadır. PAH'ların atmosferdeki yüksek konsantrasyon seviyeleri de ciddi sağlık sorunlarına sebebiyet vermektedir.

Bu çalışmada petrol türevli bir hidrokarbon olan pirenin, petrol kirliliği olduğu düşünülen su ve toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ile biyolojik parçalanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 46 izolat arasından 3 izolatın degradasyon yeteneğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Farklı piren konsantrasyonlarında belirlenen 3 izolat arasında en iyi büyüme gösteren 13 numaralı izolat seçilmiş, 80 ppm'lik piren konsantarsyonunda %73 oranında biyodegradasyon oranı bulunmuştur. 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre bu izolatın, *Pseudomonas hydrolytica* olduğu belirlenmiştir.

Taguchi Metodu kullanılarak piren varlığında degradasyon oranlarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu metot sonucunda en iyi biyodegradasyon artışına etki eden düzeylerin sıcaklık, pH ve tuzluluk olduğu, varyans analizi sonucunda da bu düzeylerin anlamlı bulunduğu belirlenmiştir. Biyodegradasyon ortalamasına göre sıcaklık 31 $^{o}$C, pH 6, tuz oranı 0.1g/L ve piren konsantrasyonu 1g/ L olduğunda en yüksek biyodegradasyon oranı tespit edilmiştir. Çalışmada piren degradasyonu üzerinde en büyük etkiye sıcaklık, pH ve tuzluluğun sahip olduğu piren konsantrasyonunun degradasyonda en az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada, GC-MS yöntemi ile metabolitler belirlenmiştir. Degradasyon sonrası elde edilen metabolitler; Siklohekzasiloksan dodekametil, sikloheptasiloksan tetradekametil, benzoik asit, metan, silikon oil, asetamid, katin olarak belirlenmiştir. Metabolitlerden katin, benzoik asit, silicone oil gıda, kozmetik, ilaç sanayilerinde kullanılmaktadır. Benzoik asit; gıdalarda kontaminasyonu önlemek için kullanılmaktadır ve birçok bitkinin yaprak, kabuk ve meyvelerinde bulunur. Katin; uyarıcı olarak işleve sahip amfetamin türevi bir maddedir, ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Silicone oil, gazlı bez, nasır kremleri, tıraş ve cilt bakım ürünleri gibi medikal ve kozmetik sektörde karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, PAH'ların sebep olduğu atıklar doğada kendi kendine parçalanamayıp canlı sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Biyodegradasyon yeteneğine sahip mikroorganizmalar kullanılarak çevrede problem oluşturan PAH'ların ortadan kaldırılması, kirliliğin azaltılması, PAH'ların biyoremediasyon çalışmaları için potansiyel oluşturmaktadır. Bu çalışma özellikle PAH kirliliğinin giderilmesinde pahalı sistemler kullanılmasını yerine mikroorganizma gibi maliyeti düşük biyolojik tekniklerin kullanılabileceğinin mümkün olduğunu göstermektedir.

**Teşekkür.** "Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2021-1742 nolu proje kapsamında desteklenmiştir".

## KAYNAKLAR

[1] Demir, İ., & Demirbağ, Z. (1999). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik Olarak Parçalanması. *Tr. J. of Biology, 23*, 293–302.

[2] Alver, E., Demirci, A., & Özcimder, M. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and their Effects on Health. *Mehmet Akif Ersoy University Institute of Natural and Applied Sciences*

*Journal*, *3*(1), 45-52..
[3] Kander, S., & İzgi, B. (2020). *Eurasian Journal of BiologicalandChemical Sciences Optimization of a chromatographic method for the quantification of polycylic aromatic hydrocarbons in drinking water samples*. *3*(1), 10–14.
[4] Baltacı, N. (2013). *Petrol Hidrokarbonu Kirleticierinin Halofilik Bakteri Ve Archaea Türleri Kullanılarak Biyodegredasyonu*.
[5] Ubalua, A. O. (2011). Bioremediation strategies for oil polluted marine ecosystems. *Australian Journal of Agricultural Engineering*, *2*(6), 160–168. http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=73311573&site=ehost-live
[6] Erdoğmuş, S. F. (2012). *Bazı halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların, fenantren, piren ve naftalen parçalayabilme yeteneklerinin araştırılması*.
[7] Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K. (2009). *Biodegradation of aromatic compounds : current status and opportunities for biomolecular approaches*. 207–228. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4
[8] Kim, S., Kweon, O., & Cerniglia, C. E. (2009). *Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways*. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.03.006
[9] Nzila, A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, *178*, 474–482. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.042
[10] Seo, J., Keum, Y., & Li, Q. X. (2009). *Bacterial Degradation of Aromatic Compounds*. https://doi.org/10.3390/ijerph6010278
[11] Ma, J., Xu, L., & Jia, L. (2013). *Bioresource Technology Characterization of pyrene degradation by Pseudomonas sp . strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge*. *140*, 15–21. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.184
[12] Ulusoy Dilara, İşçen F. Cansu, '' Sinop Limanından İzole Edilen Mikroorganizmalar İle Pyrene Biyodegradasyonu'', 4.Uluslararası Palandöken Bilimsel Çalışmalar Kongresi, 28-29 Nisan 2022, Erzurum 2022, s. 412-418.
[13] Zhao, B., Wang, H., Mao, X., & Li, R. (2009). A rapid screening method for bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in Applied Microbiology*, *49*(3), 408–410. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02668.x
[14] Özyürek, S. (2016). *Ham petrol, sondaj çamuru ve çamur çukurundan izole edilen mikroorganizmalar ile petrol biyoyıkımının araştırılması*.
[15] Nzila, A., Ramirez, C. O., Musa, M. M., Sankara, S., Basheer, C., & Li, Q. X. (2018). Pyrene biodegradation and proteomic analysis in Achromobacter xylosoxidans, PY4 strain. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *130*(April), 40–47. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.014
[16] Baltacı, M. (2020). *Ham petrol kontaminasyonunun mikrobiyal olarak biyoremediasyonu*.
[17] Darvishi, P., Mowla, D., Ayatollahi, S., & Niazi, A. (2011). *Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an effi cient strain , ERCPPI-1*. *28*, 46–54
[18] Singh, P., & Tiwary, B. N. (2017). Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by Pseudomonas stutzeri P2 isolated from Chirimiri coal mines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *10*(January), 20–29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.001.
[19] Qin, X., Tang, J. C., Li, D. S., & Zhang, Q. M. (2012). *Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil*. *1994*, 210–217. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x
[20] Baltacı, N., & Yüksekdağ, Z. (2015). Organik Kirleticilerin Tuzcul Çevrelerde Biyodegredasyonu. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *3*(2), 48–48. https://doi.org/10.17100/nevbiltek.210932
[21] Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(5–6), 650–663. https://doi.org/10.1007/s002530100701
[22] Esmeray, E., & Ceyhan, N. (2012). *Petrol Kirliliği ve Biyoremediasyon*. *5*(1), 95–101.
Evci, Y. M. (2016). *Aktif Ve Pasif Örnekleme Yöntemleri İle Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (Pah'Lar) Mevsim Değişiminin İncelenmesi*.

[23] Sawadogo, A., Harmonie, O. C., Sawadogo, J. B., Kaboré, A., Traoré, A. S., & Dianou, D. (2014). *Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Wastewaters in Ouagadougou , Burkina Faso*. *September*, 1183–1196.
[24] Çakır, R. (2011). *Bazı Gıda Ürünlerinde Sorbik Asit Ve Benzoik Asit Varlığının Tespiti*.
[25] Hewala, I. I. (1994). *Stability - Indicating Hplc Assay for Paracetamol , Guaiphenesin , Sodium Benzoate and Oxomemazine in Cough Syrup . August 2013*, 37–41. https://doi.org/10.1080/00032719408006347
[26] Erkmen, O. (2010). *Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi*. 220–235.
[27] Wibbertmann, A. (2005). *Benzoıc Acıd And Sodıum Benzoate*.
[28] Özvezir, E. (2022). *Polidimetilsiloksan Nanokompozitlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu*.
[29] Brenneisen, R., Fisch, H., Koelbing, U., Geisshusler, S., & Kalix, P. (1990). *Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone*. 825–828.