

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

LİSE SEVİYESİ FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI: BAKTERİALTECH

PROJE ADI

DALAPON (2,2-DCP) HERBİSİTİNİ PARÇALAYAN

BAKTERİLERİN İZOLASYONU,

KARAKTERİZASYONU VE TANISI

BAŞVURU ID

349519

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....	3
2. Problem/Sorun.....	3
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem.....	5
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	12
6. Uygulanabilirlik.....	12
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	12
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar).....	13
9. Riskler.....	13
11. Kaynaklar.....	14

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Tarımda kullanılan herbisitler gibi haloalkanoik asit yapılı kimyasallar, uzunca bir süreden beri kullanıldığından, çevre ve insan sağlığı bakımından önemli bir risk teşkil etmektedir. Dalapon gibi herbisitlerde aktif bileşen olarak sıklıkla kullanılan sentetik haloalkanoik asitler, çevre için toksiktir ve canlı organizmalar için zararlıdır. Son yıllarda canlı habitatlarında özellikle tarımsal alanlarda sentetik haloalkanoik asit bazlı kimyasal birikimi ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın amacı, çevre ve insan sağlığına zararlı 2,2-dikloropropionik asit (2,2-DCP)'i indirgeyip, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen yararlı bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve genomik DNA yöntemleri ile tanımlanmasını yapmaktır. Bu çalışmada 2,2-DCP (Dalapon) indirgeyen bakteri ırkı Fatsa bölgesinde sucül habitatlardan izole edilmiştir. 2,2 DCP içeren katı minimal besi yerine tek karbon kaynağı olarak 2,2 DCP eklenmiş ve bakteri ırkında dehalogenaz enzim varlığı tespit edilmiştir. İzole edilen ırkın, 10 mM 2,2-DCP ihtiva eden sıvı minimal ortamda çoğaldığı gözlemlenmiştir. İrkin çeşitli konsantrasyonlarda 2,2-DCP içeren besi ortamlarında (10 mM, 20 mM, 30 mM ve 40 mM) büyümesi değerlendirilmiştir. Daha sonra, bakteri ırkı morfolojik ve biyokimyasal testler yapılarak tanımlanmıştır. Filogenetik ilişkisi ise genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 16s rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. İstenilen büyüklükte bantlar elde edilmiştir.

Elde edilen dizi 16S rRNA gen nukleotid dizisi NCBI veri bankasındaki veriler ile eşleştirilmiş ve eşleştirme sonucunda % 99 oranında *Pseudomonas fluorescens* bakterisine benzerlik göstermiştir. Bu izolatın 16S rRNA dizisi NCBI' in genbank alt veri tabanına yüklenmiştir(MN098848). İrk *Pseudomonas fluorescens* strain fatsa001 olarak isimlendirilip literatüre kazandırılmıştır. Bakteri suşunun toksik halojen parçalama kabiliyetinin, grup I dehalogenaz geninin varlığından kaynaklandığı PCR verileri ile doğrulanmıştır. Fatsa bölgesinde sucül habitatlardan Dalapon herbisitini indirgeyen bakterilerin tanınması için yapılan bu çalışma literatürde ilk olma niteliği taşımaktadır.

2. Problem/Sorun

İnsanların öncelikli ihtiyacı gıdadır, nüfus artışıyla birlikte iyice azalan tarım alanlarından daha fazla verim elde etmek amacıyla yapılan her bilinçsiz davranış zaten yetersiz olan tarım alanlarının nitelik olarak da kaybına neden olmuştur. Birim alandan daha fazla verim almak adına gerçekleştirilen fazla ve bilinçsizce pestisit/kimyasal gübre kullanımı sonucunda toprağın kimyasal yapısının bozulması ve kuraklaşma gibi önemli çevre sorunları ortaya çıkmıştır(Willer vd, 2018). İsektisit ve herbisitler gibi pestisitlerde de bulunan ksenobiyotik bileşikler, insanlar tarafından sentetik olarak üretilen suni maddelerdir (Chaudhry ve Chapalamadugu, 1991).

Kullanılan bu bileşikler kısa vadede yarar sağlamakla birlikte; topraktan temizlenmelerinin zor olması, çiftçilerin yanlış kullanmaları toprağın zamanla verimsizleşmesine, yetiştiriciliği yapılan kültür bitkilerinden alınan verimin düşmesine neden olmakta ve sürdürülebilir tarımı engellemektedir (Barman ve Varshney, 2008 Sondhia ve Singhai, 2008). Zirai ilaçlar ve herbisitler halojenli organik bileşiklerin türevleridir bu bileşiklerin yaygın kullanımını, topraktan başka, yeraltı suyu ve diğer su kaynaklarında da önemli çevre kirliliği unsurlarıdır (Chaudhry ve Chapalamadgu, 1991; Slater vd, 1995; Fetzner, 1998; Hill vd, 1999;). Kontamine

olmuş topraklarda PGPR (bitki gelişimini teşvik eden rhizobakteriler) istenilen verimi gösterememektedir. Buna ek olarak, halojenli organik bileşiklerin toksisite seviyesi insan sağlığı ve ekosistem üzerindeki olası olumsuz etkileri arttırmaktadır. Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan tarım işçilerinde birçok genetik hasarın yanı sıra karaciğer, böbrek ve gözlerde kalıcı bozukluklar görülürken anneye verilen pestisitlerin 5 saat sonra plasentadan fetüse geçtiği ve fetüsün göz, sinir sistemi ve karaciğerine yerleştiği gözlenmiştir. Aynı şekilde anne sütüne de geçtiği belirlenmiştir. Örneğin; ticari adı Dalapon olan 2,2 dikloropropiyonik asit bileşiği, tarımda yabancı ot kontrolünde kullanılan bir herbisittir (Hägglom ve Bossert, 2004). Dalapon, biyotik ve abiyotik etkenlere karşı dirençlidir. Dalapon gibi herbisitlerin yoğun kullanımı sonucu tarımsal alanlarda haloalkanoik asit birikimi ortaya çıkmıştır (Kirpi, 2007). Türkiye'de bulunan tarım arazilerinde, tarımsal faaliyetlerde rutin olarak kullanılan pestisitler çevreye yayılmıştır. Son yıllarda canlı habitatlarında özellikle tarımsal alanlarda haloalkanoik asit birikimi ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı topraklarda çoraklık artmıştır tarımsal açıdan ise verimlilik ve ürün kalitesi düşmüştür.

Bakteriyel dehalojenazlar, biyoremediasyon yöntemi olarak kullanılarak kirlenmiş olan toprağın, suyun ve çevrenin temizlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

Toprakta herbisitlerin bozunmaları, toprağın yapısı, iklim şartları ve herbisitlerin sahip oldukları kimyasal şartlara bağlıdır. Bitkiler tarafından metabolize edilme ve mikrobiyal parçalanma yoluyla gerçekleşen parçalanma biyotik parçalanmadır. Toprakta bulunan pestisitlerin topraktan yıkanması, buharlaşma, ışınla parçalanma, kimyasal olarak parçalanması gibi adımlarla gerçekleşmesi de abiyotik parçalanma olarak adlandırılmaktadır. Toprakta bulunan bu pestisitlerin abiyotik parçalanma yoluyla parçalanıp topraktan temizlenmeleri sınırlıdır. Yani toprakta bulunan pestisitlerin topraktan parçalanıp temizlenmesi oldukça güç bir olaydır (Sondhia ve Singhai, 2008).

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyolojik bozunma, ekonomik olarak daha güvenli ve çevresel açıdan daha zararsız olduğu için tercih edilmektedir (Mesri vd, 2009). Toprak mikroorganizmaları indirgenmeyi gerçekleştirdikten sonra halide iyonu serbest bırakırken büyüme için tek karbon kaynağı olarak α^- ve β^- haloalkanoik asidi içeren halojenli bileşikler kullanırlar (Fetzner ve Lingens, 1994).

Bizim bu çalışmamızda, herbisit ve pestisit kontaminasyonu bulunan sucul habitatlardan 2,2 DCP bozucu bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanması üzerine odaklanılmıştır. Bu zamana kadar literatürde sucul habitatlardan izole edilip 2,2 DCP'yi parçalayabilen *Pseudomonas* cinsine ait bir türün olduğu bu çalışma ile tespit edilmiştir.

3. Çözüm

1. Dalapon herbisiti ile kontamine olan karasal ve sucul habitatlarda mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen daha ekonomik, daha güvenli ve çevresel açıdan daha zararsız bir bozunma yönteminin kullanılması,

2. Bu gibi bakteriler, pestisitlerle kirlenmiş olan tarımsal alanlarda ekosistemin işleyişini bozan pestisit kökenli halojenli bileşiklerin etkilerini azaltabilir veya tamamen ortadan kaldırabilir,

3.Rizobakterilerin ağır metallerin detoksifikasyonu, pestisitlerin parçalanması, tuzluluk toleransı, bitki hastalık ve zararlılarının biyolojik mücadelesi, bitki tarafından besin elementleri ve minerallerin kullanımının artırılması, fitohormon ve enzim üreterek bitki gelişimini desteklemesi gibi etkileri bulunmaktadır. Hem tarımsal hem de çevresel açıdan son derece önemli olan Rizobakterilerin doğal yaşam alanlarının korunması,

Bakteriyel dehalojenazlar, biyoremediasyon aracı olarak kullanılarak kirlenmiş olan toprağın, suyun ve çevrenin temizlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar ve tehlikeli atık yönetimi için potansiyel araçlardır. Dehalojenazlar kimyasal endüstride non-stereoseçici biyokatalistler olarak çok önemlidirler ve sıklıkla kullanılmaktadırlar (Buchana-Wollaston, 1992; Kaya vd, 2013a; Kaya vd, 2013b). Örneğin 2,2 DCP, dehalogenez enzimi ile reaksiyona girdiğinde son ürün olarak pirüvik asite dönüşür. Bu yöntem daha ekonomik ve daha güvenilir bir yöntemdir. Önereceğimiz bu projenin değerlendirmesi aşamasında, ilk akla gelen soru, bu bakterilere nasıl ulaşılacağı, üretilen ürünün sürdürülebilir olup olmayacağıdır.

Tüm çalışmalar sonrasında bakterilerden elde edilecek sulu ekstrat gübreleri fayda doğuran ve ticari olabilecek inovatif bir ürüne dönüşeceğinin bir örneği olacaktır.

4. Yöntem

Materyal ve yöntem aşamasında yapılacak çalışmalar ve izlenecek yollar aşağıda çizelge 1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 1: Materyal ve yöntemin şematik basamaklandırılması



Çalışmamızda nicel yöntemlerden deneysel yöntem ve in siliko yöntemi kullanılmıştır.

4.1 Örneğin Alınması: Örneğimiz Ordu ilinin Fatsa ilçesindeki Elekçi Dere’sinden izole edilmiştir (enlem: 40°59'53.1"N; boylam: 37°26'53.8"E)

4.2 Bakteri izolasyonu: Alınan su örnekleri laboratuvara getirildikten sonra pipet yardımıyla 30 µl alınarak 250 ml'lik erlenlerde 100 ml hacimde hazırlanmış sıvı Luria Broth (LB) ortamına aktarılıp (Çizelge 2), 28 °C'de 180 rpm'de 7 gün çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiş ve mikroorganizmaların bu ortamda gelişmeleri sağlanmıştır. Daha sonra tekrar Luria Broth agar içeren katı besiyeri hazırlanmış ve ekim yapılarak, petriler 28 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu besiyerinde yetişebilen bakterilerden alınan örnekler, önceden hazırlanan 250 ml'lik erlenlerde bulunan 100 ml sıvı içeren Minimal + Dalapon besiyerine ekimi yapılmıştır. Minimal besiyeri içeriği 7 gün süresince 28 °C'de inkübe edilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 2. LB (Luria Bertani) - AGAR

Bileşimi	g/L
Tryptone	10,0
NaCl	5,0
Maya	5,0
Agar	17,5
Distile su	1 lt' ye tamamlanır.

Çizelge 3. Minimal Media

STOK A (Bazal tuzlar)		STOK B (İz metal tuzlar)	
Bileşimi	g/L	Bileşimi	g/L
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	42,5	Nitriloacetic acid (C ₆ H ₉ NO ₆)	1.00
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	10	MgSO ₄ . 7H ₂ O	2.00
(HH ₄) ₂ SO ₄	20	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.12
		MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.03
		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.03
		CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.01

4.3 Morfolojik Karakterizasyon: LA (LB + Agar) içeren katı besiyeri üzerindeki saf kültürün tek koloni morfolojisi; koloninin büyüklüğü, pigmentasyon, form (koloninin şekli), çerçeve (koloninin dış kenarı) ve yükseklik gibi karakteristik özellikleri incelenip gözlemlenmiştir

4.4 Biyokimyasal Karakterizasyon: Bakteri Vitek2 compact cihazında gram negatif kartta farklı biyokimyasal testlere tabii tutulmuştur. VITEK2, karbon kaynağı kullanımını, enzimatik aktiviteleri ve tanımlanacak mikroorganizmaların direncini ölçmek için yerleşik biyokimyasal yöntemleri ve yeni geliştirilen substratları kullanan ticari bir tanımlama sistemidir. Bu cihazla 47 biyokimyasal test yapılmıştır.(OMÜ Veterinerlik Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir.)



Şekil 1: Vitek2 compact barkod sistemli tanımlama kartları ve süspansiyon tüpleri, (Pincus, 2006)

4.5 Genomik DNA izolasyonu: Genomik DNA izolasyonu için AMBRD®'nin bakteriyel genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

4.6 PCR Amplifikasyonu: PCR karışımı her bir örnek için 25 µl' lik final hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR döngüsü başlangıç denatürasyon basamağı için 94 °C' de 5 dk, bunu takip eden soğutmanın ardından 94 °C' de 1 dk denatürasyon 55 °C' de 1 dk uzama ve 72 °C' 1 dk uzama ve 72 °C' de 10 dk son uzama aşaması olarak ayarlanmış, DNA çoğaltımı 30 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir(Çizelge 4).

Çizelge 4. PCR içerikleri

Sıcaklık		Zaman
Başlangıç sıcaklığı	94 °C	5 dk
Denatürasyon	94 °C	1 dk
Uzama	55 °C	1 dk
Uzama	72 °C	1 dk
	72 °C	10 dk
Son uzama	4 °C	∞

} 30 döngü

4.7 16S rRNA gen bölgesi PCR amplifikasyonu: Genomik DNA izolasyonu tamamlanan test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi PCR amplifikasyonları (Forward) ve (Reverse) evrensel primerleri kullanılarak Termal Cycler (Corbett Life Sciences, Australia) cihazında gerçekleştirilmiştir (Weightman vd, 1982). PCR amplifikasyon ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde PCR markör ile birlikte 100 voltta 30 dakika yürütülerek UV-transillüminatör üzerinde kontrol edilmiştir. UV-transillüminatörde istenilen büyüklükte bantların oluştuğu gözlenmiştir (Tamura vd, 2007). Kalitesinden emin olunan 16S rRNA PCR ürünleri sentromer firmasına gönderilerek 16S rRNA' nın nükleotit dizisi elde edilmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. PCR bileşenleri

Bileşen	Hacim / Reaksiyon
10X Reaksiyon tampon	2,5 µl
10 mM dNTP mix	0,5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
Forward primer(dehE1)	1 µl
Reverse primer (dehE2)	1 µl
Template DNA	2 µl ≥ 0,5 µg
Distile su	14,8 µl
Toplam hacim	25 µl

4.8 16S rRNA dizi verilerinin analizi: İzolatların 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi tamamlandıktan sonra elde edilen nükleotit dizi verisi NCBI (National Center for Biotechnology Information)' ın BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) seçeneği kullanılarak en yakın akraba organizmalarla 16S rRNA nükleotit benzerliği belirlenmiştir. Filogenetik analizler için ise MEGA 7 programı kullanılmıştır (Tamura vd, 2011).Bakteri türleri 16S rRNA analizi gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Bakteri DNA sının PCR ürünü jel kullanılarak görüntülenmiş ve bu ürünün 500 bç (baz çifti) büyüklüğünde olduğu görülmüştür.

4.9 Dehalogenez geninin bakteri genomunda varlığının tespiti: DehI ve DehII geninin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6:16S rRNA primerleri

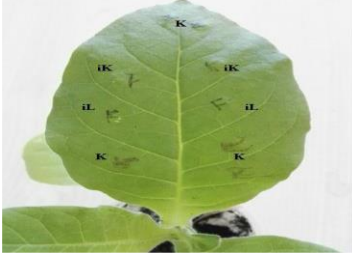
Primer adı	Primer sekansı
16S rRNA (Forward)	5' ..GGAGCACACATATGTTAAACGCTGCG.. 3'
16S rRNA (Reverse)	5 ' ..AGAAGAATTCTGGTATTCATAAGTAGTCC.. 3'

4.10 dehE geninin PZR'da çoğaltılması: Deh E geni için de (Forward) ve (Reverse) evrensel primerleri kullanılarak Termal Cyler (Corbett Life Sciences, Australia) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 7. DehE geninin PCR amplifikasyonu için primer listesi.

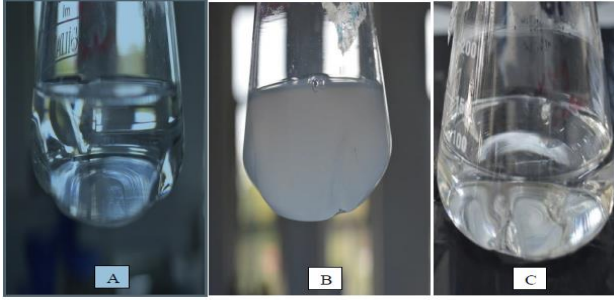
Primer adı	Primer sekansı
DehE1 (Forward)	5' ..GGAGCACAC <u>CATATG</u> TTAAACGCTGCG.. 3'
DehE2 (Reverse)	5' ..AGAAGA <u>ATTCTG</u> GTATTCATAAGTAGTCC.. 3'

inkübasyona bırakılmıştır. Bu testte inkübasyon sonrası doku negrozları şeklinde belirtiler oluşur. Doku negrozlarının oluşması pozitif reaksiyonun göstergesi iken bu durumun tersi negatif bir reaksiyonun göstergesidir.



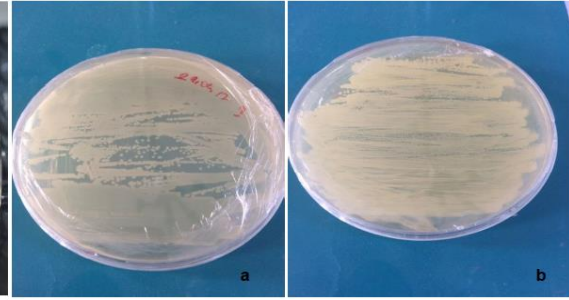
Şekil 4 Patojenite testi

Çalışmayı yorumladığımız da; Bu çalışmada kullanılan örnekler Ordu'nun Fatsa İlçesindeki altın madeni yakınındaki Elekçi deresinden alınmıştır. Sucul habitat kaynaklı örneklerden dalaponu parçalayıp zararsız forma dönüştürme yeteneğindeki bakteriler 10 mM 2,2 dikloropropiyonik asit içeren dalaponlu minimal besin ortamı kullanılarak izole edilmiştir. Bu izolatlar a ait 16S rRNA dizileri, evrensel primerler kullanılarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'da spesifik olarak klonlanmıştır. PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi için Sentromer firmasına gönderilmiştir. Dizileme sonucunda elde edilen izolatın 16S rRNA gen dizileri NCBI'da BLAST aracı ile diğer bakterilerin 16S rRNA gen dizileriyle filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için hizalanmıştır. MEGA7 (Kumar vd, 2018) *in siliko* analiz aracı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *İnsiliko* analiz dalaponlu ortamdan izole edilen bakterinin *Pseudomonas* türleriyle özellikle *Pseudomonas fluorescens* ile yakın akraba olduğunu önermiştir. Bu izolatın 16S rRNA dizisi NCBI'ın genbank alt veri tabanına yüklenmiştir (MN0 98848). Irk *Pseudomonas fluorescens strain fatsa001* olarak isimlendirilip literatüre kazandırılmıştır. Bakterilerin dalaponu parçalama yetenekleri ve dehidrohalojenaz (E) geninin bakterilerin genomundaki varlığı, bu gene spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda kanıtlanmıştır. Morfolojik testler dahilinde izolatların koloni şekli, koloni çapı, koloni yüksekliği, koloni rengi, koloni yüzey ve kenarı, koloni görünümü ve bakteri şekli incelenmiştir. Biyokimyasal testler Vitek2 cihazında yapılmıştır. Ayrıca bu izolatların tarım arazilerindeki dalaponun temizlenmesinde kullanılabilir olup olmadığının belirlenmesi amacıyla izolat tütün bitkisine enjekte edilmiş enjeksiyonlu bitki inkübasyona bırakılmıştır. Tütünde yapılan aşırı duyarlılık-patojenite testiyle izolatın bitki patojeni olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; Yaptığımız tüm çalışmalar. *P. fluorescens fatsa001* izolatının dalapon kontaminasyonlu tüm alanlarda kontaminasyonu ortadan kaldırmak amacıyla biyoremediasyon ajanı olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarıyla ilgili bazı görseller Şekil, 5, 6, 7 8'de gösterilmiştir.



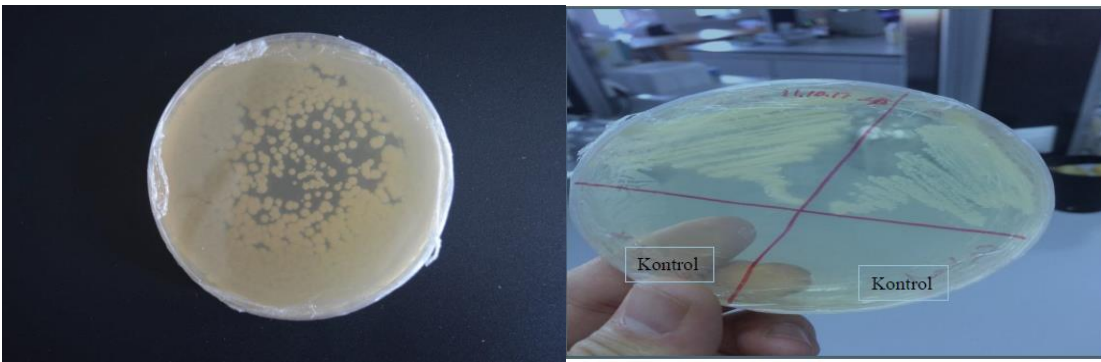
Şekil 5

A: Minimal besiyeri negatif kontrol,
B: Minimal besiyeri + dalapon + bakteri,
C: Minimal besiyeri + bakteri

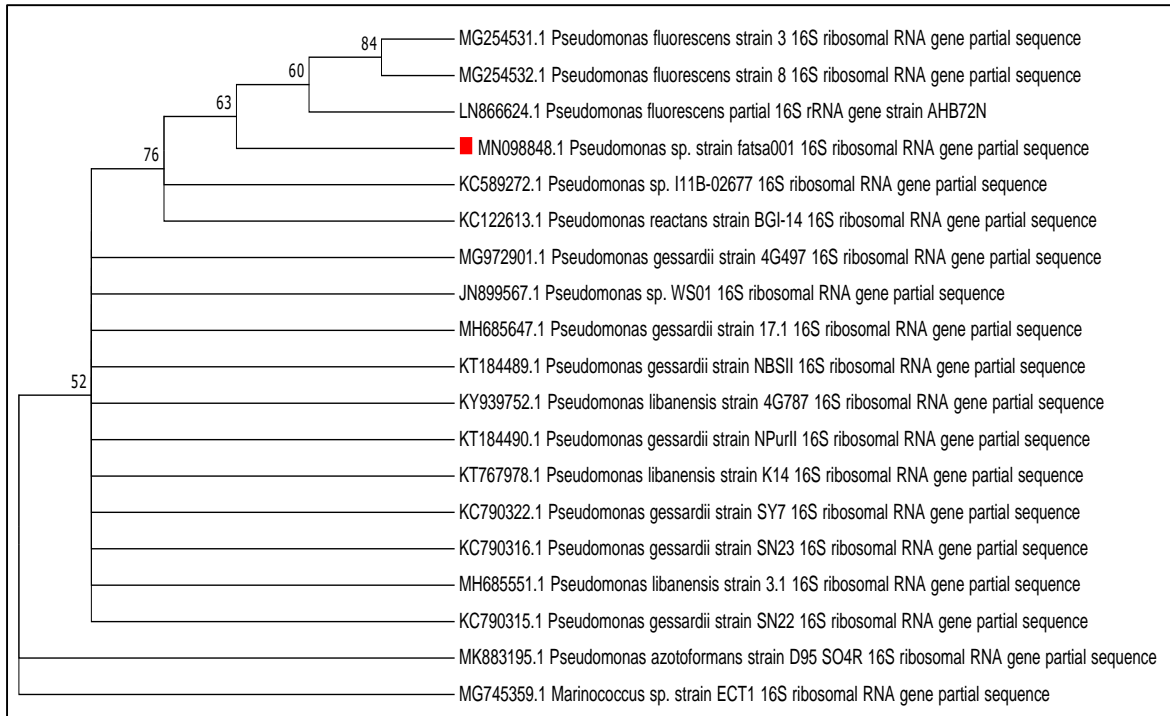


Şekil 6

A: Minimal katı besi ortamındaki gelişimi
B: Çizgi ekim



Şekil 7 ve 8 : (LB) besi ortamında 2 gün süreyle gelişen bakteriyel izolat ve saf koloniler

Şekil 9: *Pseudomonas fluorescence* fatsa001 Phylogenetic tree.

Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Bu zamana kadar literatür de sucul habitatlardan izole edilip 2,2 DCP'yi parçalayabilen *Pseudomonas* cinsine ait bir türün olduğu bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatür taramasına göre, birkaç *Pseudomonas* sp. α -haloasidi parçalama yeteneğini gösteren sonuçlar bulunmuştur *P. putida* PP3 (Weightman vd 1982), ve *P. halophila* HX (Edbeib vd 2017). Adı geçen bakteriler, tek karbon ve enerji kaynağı olarak 2,2-DCP'nin metabolize edilmesinde etkilidirler. Bununla birlikte, bu çalışmada izole edilen *P. fluorescence* bakterileri, 2,2-DCP'yi parçalama kapasitesine sahip türlerin bildirilen ilk vakasıdır. Çalışmamız bu alandaki ilk çalışma örneğidir. Üstün adaptasyon yetenekleri sayesinde tarım ilaçları, ilçe çöplüğü ve altın madeni atıklarının bulunduğu bir ortamda yaşayabilen bu mikroorganizmalar tarım ve biyoremediasyon gibi alanlarda değerlendirilmelidir. Bakteri tanımlamasını yaparken günümüz bakteriyel biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan en yeni yöntemlerden biri olan genetiksel tanılama ve *in silico* yöntemlerini kullanmamız çalışmamızın diğer yenilikçi yönüdür.

5. Uygulanabilirlik

Bu çalışmada yeni keşfedilen bakteri suşunun uygun dozları organik gübre üretiminde kullanılarak ticari bir ürün geliştirilebilir. Ayrıca ürünümüzün biyoremediasyon işlemlerinde de gönül rahatlığıyla kullanılabilceği öngörülmektedir. Bakterimizin biz sadece bir halojenli organik bileşik olan dalapon herbisitini parçalama yeteneğini inceledik ancak başka alanlarda ki işlevleri araştırılabilir ve başka ticari boyutları da kanıtlanabilir. Bu konu daha çok bilimsel araştırmaya açık bir konudur.

6. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Proje kapsamında tüm deneysel çalışmalar Dr Öğr. Üyesi Yılmaz Kaya Danışmanlığında 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Dr Öğr. Üyesi Yılmaz Kaya deneyde kullanılan tüm kimyasal madde ve cihazları kullanma imkânı sunmuştur.

Çizelge 8. Malzeme ve Fiyat Listesi

Adı, Modeli	Birim Fiyatı	Adet	Toplam Bedeli (KDV Dahil, TL)	Gereçesi
pipet ucu - şeffaf - 10 u	90	6	540	MolekülerAnalizler
pipet ucu - şeffaf - 200 ul	90	6	540	MolekülerAnalizler
pipet ucu - şeffaf - 1000 ul	90	6	540	MolekülerAnalizler
Taq DNA Polymerase, recombinant	480	1	480	MolekülerAnalizler
100 BP DNA LADDER	900	1	900	MolekülerAnalizler
Ameliyat Eldiveni	75	10	750	MolekülerAnalizler
Steril Petri	2,1	500	1050	MolekülerAnalizler
Agaroz	750	1	750	MolekülerAnalizler
Toplam			5550	

Çizelge 9. Proje Zaman Planlanması

İşin Tanımı	Aylar									
	1.AY	2.AY	3.AY	4.AY	5.AY	6.AY	7.AY	8.AY	9.AY	10.AY
LİTERATÜR TARAMASI	x	x	x	x	x	x				
VERİ TOPLANMASI	x	x	x	x	x	x	x	x		
VERİLERİN ANALİZ EDİLMESİ					x	x	x	x	x	
PROJENİN SUNUMA HAZIR HALE GETİRİLMESİ									x	x

7. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Dünyadaki toplam yıllık pestisit kullanımı incelendiğinde pestisit tüketimi miktarının 3 milyon tondan daha fazla olduğu, Türkiye'deki pestisit kullanımı incelendiğinde ise bu miktarın 2018 yılı itibariyle yaklaşık 60.020 tona ulaştığı görülmüştür. Türkiye'deki kimyasal gübre (azot, fosfor, potasyum) kullanımının ise her yıl 100 milyon tondan daha fazla gerçekleştiği tahmin edilmektedir. 1960'lardan bu yana pestisit kullanımı 15-20 kat artmasına rağmen; zararlı, hastalık ve yabancı otlardan kaynaklanan verim kaybının hala yüksek oranda olduğu bilinmektedir. Kullanılan bu bileşikler zamanla sürdürülebilir bir tarımı engellemektedirler (Barman ve Varshney, 2008 Sondhia ve Singhai, 2008).

Dünyamızda bulunan tüm ekolojik ortamlar, tarım alanları ve sucul ortamlar projemizin hedef kitesidir. Bu herbisit(Dalapon) suda yüksek oranda çözünür olduğu için tüm toprak tiplerinde yüksek hareket kabiliyetine sahiptir ve bu nedenle dalapon sızıntısı meydana gelebilir, su kaynakları kolayca kirlenebilir. Klorlu hidrokarbonun besin zincirine ve su ürünlerine salınmasından sonra sürekliliği, biyolojik birikimi ve toksisitesinin bir sonucu olarak önemli çevre kirliliğine ve insan sağlığı sorunlarına yol açtığı bilinmektedir. Önerilen proje ile üretilecek olan organik ürünün tamamen doğal, biyoyoumlu, sürdürülebilir ve biyoekonomik anlamda çok değerli bir ürün olduğu düşünülmektedir.

8. Riskler

Önerilen projedeki en önemli ve en zor aşama sözü edilen bakterilerin laboratuvar ortamında optimize edilmiş koşullarda yetiştirilmesidir. Bu aşamadaki en büyük risk yetiştirilen bakterilerin kontamine olmasıdır. Böyle bir olayın yaşanması ihtimaline karşı izole edilen örneklerden stok kültürler ayrılıp derin dondurucuda saklanmaktadır. Bir kontaminasyon halinde o anki kültürler iptal edilecek olup; o an kullanılan bütün cihaz ve malzemeler steril edildikten sonra yeniden bakteri ekim ve saflaştırma işlemleri yapılarak steril kabinlerde çalışmaya devam edilecektir.

Yaptığımız patojenite testinde herhangi bir negroz oluşumu gözlemlenmemiştir. Tütünde yapılan aşırı duyarlılık testi negatif reaksiyon vermiştir. 10Mm Dalapon içeren ortamda klorür salınımı gayet başarılı olarak gerçekleşmiştir. İzolatın dalapon kontaminasyonlu alanlarda kontaminasyonu ortadan kaldırmak amacıyla biyoremediasyon ajanı olarak rahatlıkla

kullanılabileceği düşünülmektedir. Proje hayata geçirilirken karşılaşılabilecek çok büyük bir risk ön görülmemektedir.

10. Kaynakça

- Barman, K. and Varshney, J. G. *Impact of herbicides on soil environment. Indian Journal of Weed Science*, 40, 10-17. (2008).
- Buchanan-Wollaston, V., Snape, A. and Cannon, F., *A plant selectable marker gene based on the detoxification of the herbicide dalapon. Plant cell reports*, 11:12, 627-631. (1992).
- Chaudhry, G. R. and Chapalamadugu, S.. *Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiological reviews*, 55:1, 59-79. (1991).
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., Kaya, Y. and Huyop, F. *In silico characterization of a novel dehalogenase (DehHX) from the halophile Pseudomonas halophila HX isolated from Tuz Gölü Lake, Turkey: insights into a hypersaline-adapted dehalogenase. Annals*. (2017).
- Fetzner, S. and Lingens, F. *Bacterial Dehalogenases - Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. Microbiological Reviews*. 58(4), 641-685. (1994).
- Hägglom, M. M. and Bossert, I. D. *Halogenated Organic Compounds-A Global Perspective Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Springer*, 3-29. New Brunswick NJ, USA. (2004).
- Kaya, Y., Yilmaz, S., Gozukirmizi, N. and Huyop, F. *Evaluation of transgenic Nicotiana tabacum with dehE gene using transposon based IRAP markers. American Journal of Plant Sciences*, 4:08, 41. (2013).
- Kirpi, E. *Heterohalkalı makromoleküler bileşik sentezi. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, 347, İstanbul. (2007).
- Mesri, S., Wahab, R. A. and Huyop, F. *Degradation of 3-chloropropionic acid (3CP) by Pseudomonas sp. B6P isolated from a rice paddy field. Annals of microbiology*, 59(3), 447-451. (2009).
- Slater, J. H., Bull, A. T. and Hardman, D. J. *Microbial dehalogenation. Biodegradation*, 6:3, 181-189. (1995).
- Sondhia, S. and Singhai, B. *Persistence of sulfosulfuron under wheat cropping system. Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 80:5, 423-427. (2008).
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S.. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596–9. doi:10.1093/molbev/msm092. (2007).
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A. and Kumar, S. *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution*, 30:12, 2725-2729. (2013).
- Weightman, A. L. and Slater, J. H. *Stereospecificity of 2- monochloropropionate dehalogenation by the two dehalogenases of Pseudomonas putida PP3: evidence for two different dehalogenation mechanisms. Journal of General Microbiology*, 128(8), 1755. (1982).
- Willer, H., Lernoud, J., Huber, B. and Sahota, A. *The world of organic agriculture Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. Prescott's Microbiology. 2011. McGraw-Hill International, USA, 8th Edition*. (2018).