

Benzalkonyum klorürlerin *Pseudomonas* sp. BIOMIG1 tarafından farklı koşullar altında biyotransformasyon kinetiği

Biotransformation kinetics of benzalkonium chlorides by *Pseudomonas* sp. BIOMIG1 under different conditions

Fatma Özge YILMAZ¹, Emine ERTEKİN², Ulaş TEZEL^{3*}

^{1,2,3}Çevre Bilimleri Enstitüsü, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
fozgeylmz@gmail.com, emertekin@gmail.com, ulas.tezel@boun.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 23.03.2018, Kabul Tarihi/Accepted: 12.07.2018

* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2018.85226

Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Dezenfektan aktif maddeleri kentsel ve endüstriyel atıksularda oldukça sık rastlanan kirleticilerdir. Bu kirleticilerin biyolojik sistemlerde giderimi oldukça zordur. Yüzeysel sularda da sıkça karşılaşılan bu kirleticiler hem doğal hayatı hem de insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu çalışmanın amacı, atıksuda en çok karşılaşılan kirleticilerden biri olan benzalkonyum klorürlerin (BAK'ler) biyolojik sistemlerde en verimli şekilde giderimini sağlayacak koşulların belirlenmesidir. Bu amaçla, atıksudan izole edilmiş BAK gideren bir bakteri olan *Pseudomonas* sp. BIOMIG1'in farklı koşullarda BAK biyotransformasyon kinetiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler ve Michaelis-Menten modeli kullanılarak, bu mikroorganizmanın BAK biotransformasyon kinetiği parametreleri hesaplanmış ve uygulanan koşulların kinetiğe etkisi belirlenmiştir. BIOMIG1, BAK'leri 1.4 mg/L-saat hızında giderebilmekte ve bu kirleticileri amonyak ve karbon dioksit dönüştürmektedir. Mililitrede yüz bin adet bakteri yoğunluğu gibi düşük bakteri yoğunluklarında bile BAK gecikmeli de olsa yüksek hızda giderilebilmektedir. BAK homologlarının biyotransformasyon hızı karşılaştırıldığında, 14 karbon alkil zincir uzunluğuna sahip BAK en hızlı, 16 karbonlu BAK ise en yavaş biyotransformasyon hızına sahiptir. BAK giderim hızının en yüksek olduğu sıcaklık 35°, bu sıcaklık üstündeki sıcaklıklarda BIOMIG1 yaşayamamaktadır. Dolayısıyla yüksek sıcaklıklarda BAK parçalanması ya benzildimetilamin birikmesiyle sonlanmış ya da hiç gerçekleşmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, özellikle BAK gibi mikrokirleticilerin arıtımını hedefleyen ileri arıtma sistemlerinin tasarlanması ve işletilmesinde faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Benzalkonyum klorür, Biyodönüşüm, Kinetik, Modelleme, *Pseudomonas* sp. BIOMIG1.

Abstract

Active ingredients of disinfectants are very common pollutants in urban and industrial wastewater. Removal of these contaminants is very difficult in biological treatment systems. As a result; these pollutants, which are also frequently detected in surface waters, threaten both nature and human health. The objective of this study is to determine the optimum conditions that will provide the most efficient removal of benzalkonium chlorides (BACs), a common contaminant, in biological treatment systems. For this purpose, BAC biotransformation kinetics were determined under different conditions using *Pseudomonas* sp. BIOMIG1, a bacterium that is the key BAC degrader in the environment. Using the data collected and the Michaelis-Menten growth model, BAC biotransformation kinetic parameters were calculated and the effect of the applied conditions on kinetics was determined. BIOMIG1 can transform BACs at a rate of 1.4 mg/L-hour and converts these pollutants into ammonia and carbon dioxide. BAC mineralization can be achieved even at low bacterial densities such as 100000 cells/mL after a short delay. When biotransformation rate of BAC homologs was compared, BAC with 14 carbon alkyl chain length had the fastest and BAC with 16 carbons had the slowest rate of biotransformation. The temperature at which the BAC biotransformation rate was the highest was 35 degrees. BAC was converted to benzyl dimethylamine at all temperatures above 35 degrees since BIOMIG1 does not survive above this temperature. The outcomes presented in this study would be used for the design and operation of advanced treatment systems targeting the removal of micropollutants like BACs.

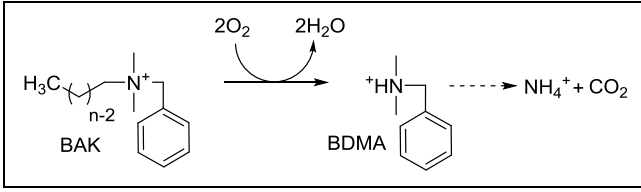
Keywords: Benzalkonium chloride, Biotransformation, Kinetics, Modeling, *Pseudomonas* sp. BIOMIG1

1 Giriş

Benzalkonyum klorürler (BAK'ler) dördüncül amonyum bileşikleridir (DAB'ler) grubuna dahil antimikrobiyel biyositlerdir. Gerek endüstride gerekse gündelik hayatımızda kullandığımız temizlik malzemeleri içinde dezenfektan aktif maddesi olarak yer alan bu kimyasallar, klinik uygulamalarda da sıklıkla tercih edilmektedirler [1]. Dolayısıyla BAK'ler, evsel atıksularda en çok bulunan kirleticilerdendir; konsantrasyonları 20 ila 300 µg/L arasında değişmektedir [2],[3]. Bununla birlikte hastane ve mezbaha atıksuyunda BAK konsantrasyonunun 10 mg/L'ye kadar çıktığı tespit edilmiştir [2],[4]. BAK'ler atıksuya karıştıktan sonra ya doğrudan veya atıksu arıtma tesislerinden geçerek alıcı ortama salınmaktadır. BAK'lerin bu ortamlardaki bakterilerle düşük dozlardaki teması, dirençli bakterilerin seçilmesine ve dirençli hale gelmelerine sebep olmaktadır [5]. Bu hadiseye literatürde "antimikrobiyel direnci" denmektedir. Antimikrobiyel direnci günümüzde

kamu sağlığını tehdit eden unsurların başında gelmektedir [6],[7].

BAK'lerin hem alıcı ortamlardaki hem de atıksu arıtma tesislerindeki akıbetini etkileyen en önemli mekanizma biyotransformasyondur. Son zamanlarda yapılan kapsamlı çalışmalarda; BAK'lerin genelde *Pseudomonas* türü özel mikroorganizmalarca benzildimetilamine (BDMA) dönüştürülerek biyosit özelliğini kaybettiği, sonrasında oluşan alkanolik asit ve aminlerin; amonyak ve karbon dioksit dönüştürüldüğü belirlenmiştir (Şekil 1), [8]. BAK'lerin N-dealkilasyon reaksiyonu ile BDMA'ya dönüşümü enzimatik bir reaksiyon olup, oxyBAC denilen Rieske tipi bir monooksijenaz ile gerçekleştirilmektedir [9]. BAK ve diğer DAB'ler üzerinde yapılan biyotransformasyon çalışmalarında, oxyBAC denen enzimden sorumlu genin çoğunlukla *Pseudomonas* cinsi bakterilerde olduğu belirlenmiştir [10].



Şekil 1: *Pseudomonas sp.* BIOMIG1 tarafından aerobik koşullar altında gerçekleştirilen BAK biyotransformasyon yolu (n: Alkil zincirindeki karbon sayısı) [9].

BAK gibi dezenfektan aktif maddelerinin sebep olduğu antimikrobiyel direncinin günümüzde insan sağlığını tehdit eden etmenlerin başında geldiği mutlaklıdır [11]. Şu aşamada, biyotransformasyon BAK'lerin bertarafını sağlayacak bir mekanizmadır. Dolayısıyla biyolojik arıtım BAK'lerin atıksudan gideriminde kullanılacak ve bu tür bileşiklerin çevreye salınımını engelleyecek en etkin ve nihai yöntem olarak görülmektedir. Ne yazık ki BAK'lerin bu sistemlerdeki akıbetleri tam olarak bilinmemektedir. Literatürde DAB'lerin biyolojik sistemlerdeki giderimlerinin %0 ila %100 arasında değiştiği belirtilmiştir. Rapor edilen geniş giderim aralığı, bu kimyasalların biyotransformasyonunda çeşitli faktörlerin ayrı ayrı veya beraber rol oynadığını göstermektedir [12]. Keza aynı şekilde BAK'lerin biyotransformasyonunda da, mikroorganizmaların ortamdaki miktarı, sıcaklık, organik/inorganik yüzeylere adsorbsyon gibi pek çok faktör rol oynamaktadır [13]. Bu çalışmanın amacı da; BAK'leri BDMA'ya dönüştüren ve giderimini sağlayan bir enzim olan oxyBAC'ı bulunduran ve yerel bir aktif çamur tankından alınan örnekten izole edilmiş *Pseudomonas sp.* BIOMIG1 kullanılarak çeşitli biyolojik, fiziksel ve kimyasal faktörlerin BAK biyotransformasyonuna etkisini değerlendirmek ve optimum BAK giderim koşullarını belirlemektir.

2 Araçlar ve yöntemler

2.1 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan BAK karışımı Lonza Kimya Şti.'ten (Basel, İsviçre) alınmıştır. Bu karışımdaki BAK'ler ve oranları şöyledir (Kısaltma, moleküler formülü ve ağırlığı): %40 dodesil benzil dimetil amonyum klorür (C₁₂BDMAK, C₂₁H₃₈NCl, 340 g/mol), %50 tetradesil benzil dimetil amonyum klorür (C₁₄BDMAK, C₂₃H₄₂NCl, 368 g/mol) ve %10 hekzadesil benzil dimetil amonyum klorür (C₁₆BDMAK, C₂₅H₄₆NCl, 396 g/mol).

Yukarıda adı geçen her bir BAK ayrıca ayrı ayrı ve yüksek saflıkta TCI Kimya Şti.'ten (Tokyo, Japonya) temin edilmiştir. Deneylerde ve instrumental analizlerde kullanılan mineral tuzlar ve organik çözücüler yüksek saflıkta Merck veya Sigma-Aldrich Kimya Şti.'lerinden alınmıştır.

2.2 Mikroorganizma kültürü

Bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas sp.* BIOMIG1, İstanbul Paşaköy İleri Atıksu Arıtma Tesisi aktif çamur tankından alınan örnekten seçici kültürleme yöntemiyle izole edilmiştir. BIOMIG1, Luria Bertani (LB) besiyeri içerisinde 22 °C sıcaklıkta 0.69 saat¹'lik bir hızla büyümektedir. Bu büyüme hızına karşılık gelen bölünme süresi ise 1 sa. olarak hesaplanmıştır. BIOMIG1, 1024 mg/L BAK ve üzerinde inhibisyona uğramadan büyüyebilmektedir. Bu suş genomik olarak yine aynı atıksu arıtma tesisinin giriş suyundan izole edilen suşa %100 benzemektedir (GenBank erişim no: KU175168).

2.3 BAK biyotransformasyon kinetiğinin belirlenmesi

BAK biyotransformasyon kinetiği deneyleri, 250-mL'lik Erlenmeyer'lerde yapılmıştır. BIOMIG1, 50 mg/L BAK içeren 5 mL LB'de bir gün büyütülmüştür. Hazırlanan bakteri kültürünün 3 mL'si, 10.000 g ivme ile santrifüj edilip, hücre çökteltisi 1.5 mL tuz besiyeri içerisinde homojenize edilmiştir. Bu hücre çözeltisi, Erlenmeyer içerisinde 50 mg/L BAK ihtiva eden 98.5 mL tuz besiyerine geçirilmiştir. Bu muamele sonucunda Erlenmeyerler içerisinde elde edilen hücre konsantrasyonu 10⁸ CFU/mL'dir. Her Erlenmeyer, yörüngesel çalkalayıcı üzerinde 130 rpm çalkalama devrinde bir gün bekletildikten sonra, içerisinde istenilen konsantrasyonda BAK olacak şekilde tekrar beslenmiştir. İkinci besleme sonrasında, her 30 dakika'da bir örnek alınıp sıvı kromatografisinde BAK ve biyotransformasyon ürünleri ölçülmüştür. Elde edilen zamana bağlı BAK konsantrasyonu verisi kullanılarak, BAK parçalama kinetiği sabitleri Berkeley-Madonna yazılımı ile hesaplanmıştır. Bu yöntem farklı sıcaklıklar ve hücre konsantrasyonlarında tekrarlanmıştır. Her bir deney için içerisinde BIOMIG1 bulunmayan Erlenmeyerler kontrol reaktörleri olarak kullanılmıştır. Test reaktörlerine yapılan her muamele, kontrol reaktörlerine de uygulanmıştır.

2.4 Analitik metotlar

Bu çalışmada BAK'ler ve biyotransformasyon yan ürünlerinin analizlerinde, diyot array detektörü ile donanımlı Agilent 1260 Serisi (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) yüksek performanslı sıvı kromatografi ünitesi (HPLC) kullanılmıştır. Analizlerde Phenomenex Luna SCX kolon (250 x 4.6 mm, 5µ) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA) ve buna ardışık bağlı Polaris C18A kolon (50x4.6 mm, 3.2 µ) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kullanılmıştır. Kolonlar 35 °C'de tutulmaktadır. Ölçümlerde mobil faz olarak %40 50 mM fosfat tamponu ile %60 asetonitrilden oluşan karışım kullanılmıştır. Bu karışım kolonlardan 1 mL/dk. akış hızında geçirilmiştir. Her bir bileşiğin alınan örnekler içerisindeki konsantrasyonu o bileşik için belirli derişim aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve 210 nm dalga boyunda elde edilen absorpsiyon tepesinin altındaki alan kullanılarak tayin edilmiştir.

3 Bulgular ve tartışma

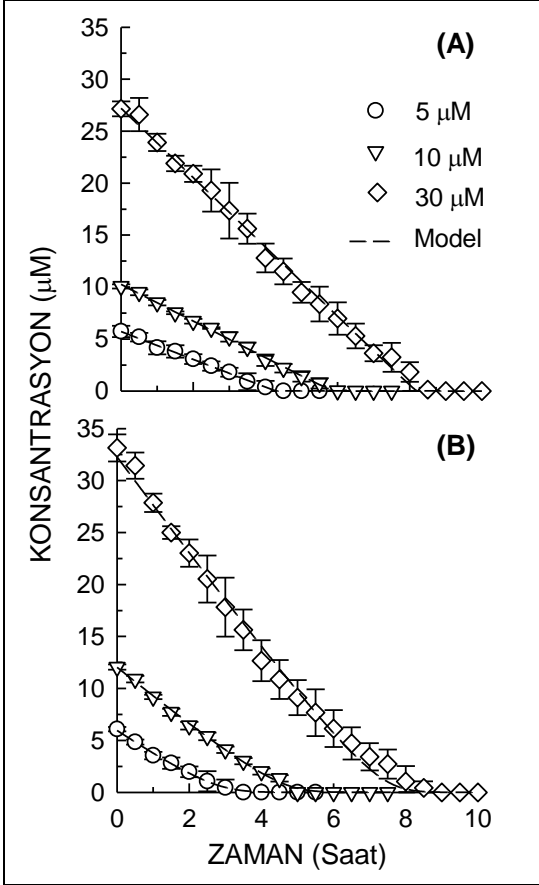
3.1 BAK biyotransformasyon kinetiği ve modellenmesi

BIOMIG1'in BAK parçalama profili 5, 10 ve 25 mg/L toplam BAK konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Test edilen toplam BAK konsantrasyonlarında kültüre eklenen BAK karışımındaki C₁₂BDMAK ve C₁₄BDMAK'nin molar konsantrasyonları yaklaşık 5, 10 ve 30 µM'dir. Uygulanan 5 µM başlangıç konsantrasyonunda BIOMIG1, C₁₂BDMAK'yi yaklaşık 5 saat C₁₄BDMAK'yi ise yaklaşık 4 saat içerisinde tüketmiştir (Şekil 2A ve B). Uygulanan başlangıç derişimi arttıkça bu süre de artmıştır, örneğin 10 ve 30 µM konsantrasyonda C₁₂BDMAK 6 ve 9 saat C₁₄BDMAK ise 5 ve 8 sa. içerisinde tamamen tükenmiştir (Şekil 2A ve B). Buna karşın kontrol reaktörlerinde BAK biyotransformasyonu gözlenmemiştir.

C₁₂ ve C₁₄BDMAK'nin giderim profilleri Michaelis-Menten büyüme modeli (Denklem 1) kullanılarak simüle edilmiş ve elde edilen deneysel verilere eğri uydurma yöntemi kullanılarak BAK biyotransformasyon kinetiği parametreleri hesaplanmıştır [14]. Bu çalışmadaki eğri uydurma ve parametre tahminleri Berkeley-Madonna yazılımı yardımıyla Runge-Kutta 4 integrasyon metodu ve hata azaltma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

$$\frac{d[BAK]}{dt} = \frac{k \times [BAK]}{K_{BAK} \times [BAK]} \quad (1)$$

Denklem 1'de $[BAK]$: BAK konsantrasyonu (μM), t : Zaman (saat), k : görünen BAK biyotransformasyon hız sabiti ($\mu\text{M}/\text{saat}$) ve K_{BAK} : yarı doyunluk sabitidir (μM).



Şekil 2: BIOMIG1 suşunun (A) C_{12} BDMAK ve (B) C_{14} BDMAK'yi 5, 10 ve 30 μM başlangıç konsantrasyonunda giderim profili (22 °C sıcaklıkta, hata barları ortalama \pm bir standart sapmayı gösterir, $n = 3$)

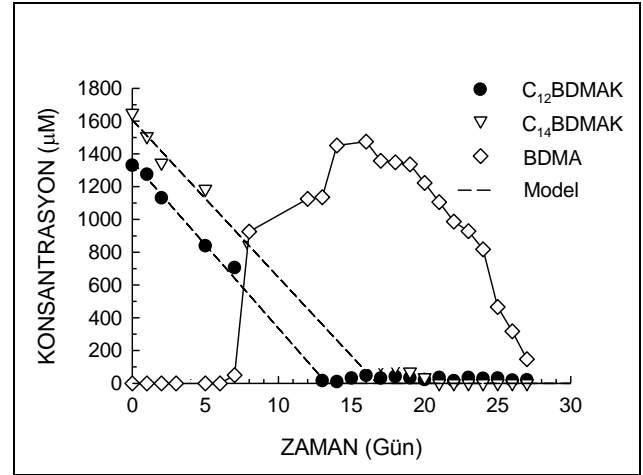
BAK biyotransformasyon kinetiği, seçilen model ve uygulanan yöntemle başarılı şekilde simüle edilmiştir ($r^2 > 0.98$) (Şekil 2A ve B). Eğri uydurma işlemi sonucunda C_{12} ve C_{14} BDMAK için hesaplanan K_{BAK} değerleri sırasıyla $0.02 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ve $1.13 \pm 0.33 \mu\text{M}$ 'dir. Buna göre oxyBAC enziminin C_{12} BDMAK'yi giderme eğilimi daha fazladır. Zhang ve diğ. (2011) C_{14} BDMAK ağırlıklı bir BAK karışımını besledikleri aktif çamur ile yaptıkları deneyde bu mikrobiyal topluluk için BAK K_{BAK} değerini 1.7 μM olarak rapor etmiştir [13]. Dolayısı ile o çalışmada elde edilen değer ile bizim bulduğumuz değer örtüşmektedir.

Bulunan K_{BAK} değerleri sabit tutularak C_{12} ve C_{14} BDMAK için hesaplanan k değerleri 5, 10 ve 30 μM başlangıç konsantrasyonları için sırasıyla şöyledir: 1.34, 2.77 ve 3.34 $\mu\text{M}/\text{sa}$. ve 2.58, 3.00 ve 3.86 $\mu\text{M}/\text{sa}$. görüldüğü gibi her iki BAK için biyotransformasyon hızları konsantrasyon ile artmaktadır. Bunun yanında, C_{14} BDMAK'nin parçalanma hızı her konsantrasyonda C_{12} BDMAK'den fazladır. BIOMIG1 C_{12} BDMAK'yi bağli olarak daha fazla tercih etmesine rağmen C_{14} BDMAK'yi daha hızlı giderilmektedir. Tezel ve diğ. (2012) sedimandan geliştirilmiş BAK gideren *Pseudomonas* baskın bir

mikrobiyal toplulukta C_{14} BDMAK parçalanma hız sabitini 130 μM konsantrasyonda 6.9 $\mu\text{M}/\text{saat}$ olarak bulmuştur [8]. Tezel ve diğ. (2012) tarafında rapor edilen bu değer, çalışmada test edilen konsantrasyon göz önüne alınırsa, bizim bulduğumuz hız sabitleri ile uyum göstermektedir.

Bu deneye ek olarak, BIOMIG1'in BAK parçalanma kapasitesi 100 (0.3 mM), 1000 (3 mM) ve 10.000 mg/L (30 mM) toplam BAK konsantrasyonlarında da denenmiştir. BIOMIG1 C_{12} ve C_{14} BDMAK'yi 100 ve 1000 mg/L toplam başlangıç konsantrasyonlarında tamamen tüketebilirken, 10.000 mg/L'de her hangi bir giderim faaliyeti gözlemlenmemiştir. BIOMIG1'in MİK'si 1024 mg/L olduğu için, suş 10.000 mg/L konsantrasyonda inhibe olmuştur. Buna karşın BIOMIG1, 1000 mg/L gibi MİK konsantrasyonuna yakın bir konsantrasyonda BAK'leri parçalayabilmektedir. Bu konsantrasyonda BIOMIG1, C_{12} ve C_{14} BDMAK'yi 20 gün içerisinde tamamen tüketmiştir (Şekil 3). Bu süre içerisinde 7. günden itibaren BDMA'nın biriktiği ve BAK'ler bitir bitmez onun da giderilmeye başladığı gözlemlenmiştir. Diğer deneylerde test edilen düşük BAK konsantrasyonlarında böyle bir durum ile karşılaşmamıştır. BDMA, BAK parçalanma yolundaki ilk yan üründür [8]. BIOMIG1, BDMA'yı BAK'lere göre daha hızlı parçalayabilmektedir [9]. Buna karşın BDMA'yı gideren enzim oxyBAC'tan farklı bir enzimdir. Dolayısıyla, inkübasyon sırasında Erlenmeyerler içerisinde geçici olarak BDMA'in tespit edilmesi, BDMA dönüştüren enzimin BAK'ler tarafından inhibe edildiğinin bir göstergesi olabilir.

1000 mg/L toplam BAK konsantrasyonunda C_{12} ve C_{14} BDMAK parçalanma hızı sabitleri 4.24 ve 4.00 $\mu\text{M}/\text{sa}$. olarak hesaplanmıştır. Bu verileride gözönüne alarak maksimum BAK parçalanma hızının her iki BAK için yaklaşık 4 $\mu\text{M}/\text{saat}$ 'tir.

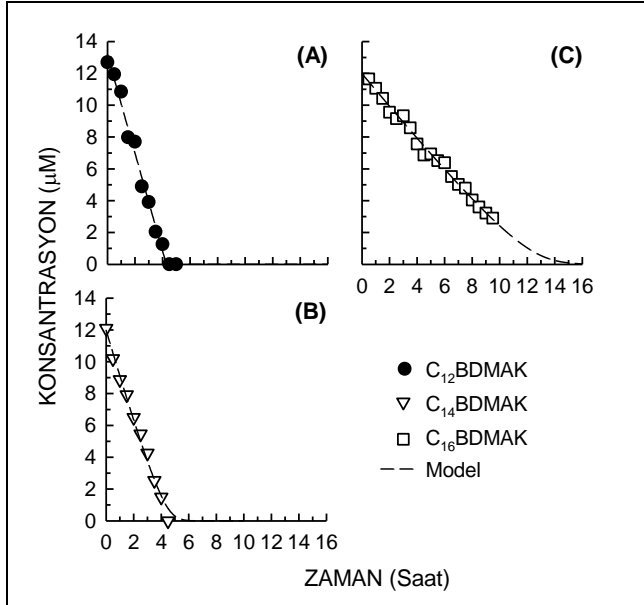


Şekil 3: BIOMIG1 suşunun 1000 mg/L toplam BAK konsantrasyonunda C_{12} BDMAK ve C_{14} BDMAK'yi giderme ve BDMA oluşturma profili (22 °C sıcaklıkta).

3.2 BAK moleküler yapısının etkisi

BAK'lerin moleküler yapısının biyotransformasyona etkisi, C_{12} , C_{14} veya C_{16} BDMAK ile ayrı ayrı hazırlanan Erlenmeyerlerde 12 μM başlangıç konsantrasyonu, 10^8 CFU/mL hücre yoğunluğu ve 22 °C sıcaklıkta test edilmiştir. BIOMIG1 C_{12} ve C_{14} BDMAK'yi yaklaşık 5 sa. içerisinde tamamen tüketmiştir (Şekil 4A ve B). Buna karşın C_{16} BDMAK ise 10 sa.'lik inkübasyon süresi içerisinde tamamen tükenmemiştir. Bu bileşiğin yaklaşık 15 sa. içerisinde tükeneneği kullanılan model yardımıyla tahmin edilmiştir (Şekil 4). Eldeki veriler ve model kullanılarak yapılan eğri

uydurma işlemi sonucunda C₁₂, C₁₄ ve C₁₆BDMAK'nin parçalanma hız sabitleri sırasıyla 3.09, 3.17 ve 1.12 µM/saat'tir. Bu bulgular göz önüne alındığında C₁₂ ve C₁₄BDMAK'nin neredeyse aynı hızda, C₁₆BDMAK'nin ise bu ikisinden 3 kat daha yavaş giderildiği söylenebilir. van Ginkel ve Kolvenbach (1991) yaptıkları çalışmada BAK'lerin alkil carbon zinciri uzunluğunun arttıkça daha zor parçalandıklarını belirtmişlerdir [15]. Bunun nedenini adsorpsiyonla ilişkilendirip, daha hidrofobik olan uzun karbon zincirli BAK'lerin daha az biyoerişilebilir olduğu, dolayısıyla daha zor giderildiği şeklinde açıklamışlardır. Bununla beraber deney süresince kontrol reaktörlerinde BAK giderimi gözlemlenmemiştir.



Şekil 4: BIOMIG1 suşunun 12 µM başlangıç konsantrasyonunda (A) C₁₂BDMAK, (B) C₁₄BDMAK ve (C) C₁₆BDMAK'yı parçalama profili (22 °C sıcaklıkta).

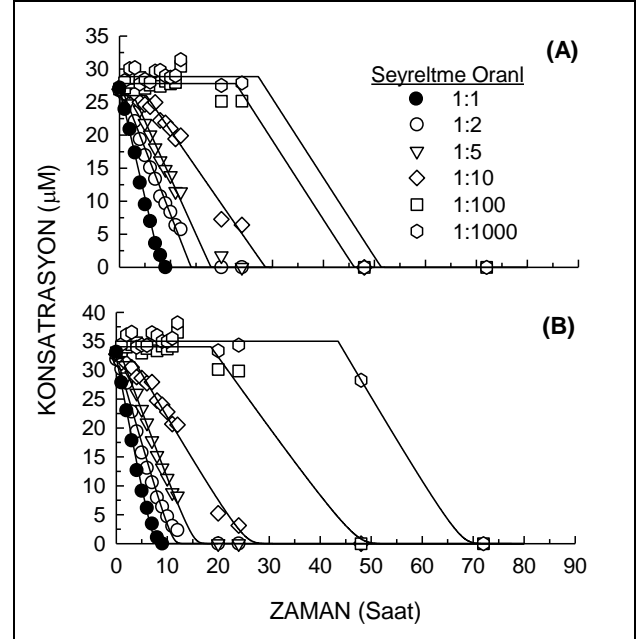
3.3 Mikroorganizma yoğunluğunun etkisi

Bu çalışmada yapılan tüm deneylerde kullanılan mikroorganizma yoğunluğu 10⁸ CFU/mL'dir. Bunun altındaki mikroorganizma yoğunluklarında BAK biyotransformasyon kinetiğinin nasıl etkileneceği, başlangıçtaki miktar 2'den (5×10⁷ CFU/mL) 1000 (10⁵ CFU/mL) kata kadar seyreltilerek test edilmiştir.

Her seyreltmede hem C₁₂ hem de C₁₄BDMAK biyotransformasyonu belirli bir gecikme evresinden sonra başlayabilmiştir (Şekil 5). Bu gecikme evresi 2 seyreltme faktörü uygulandığında 2 sa. iken 100 ve 1000 seyreltme faktörlerinde C₁₂BDMAK için 25 ve 30 (Şekil 5A), C₁₄BDMAK için ise 20 ve 45 sa.'e kadar çıkmıştır (Şekil 5B). Seyreltmenin bir diğer etkisi de BAK parçalanma hızlarında görülen azalmadır: Uygulanan BAK konsantrasyonunda, seyreltme olmadan elde edilen BAK biyotransformasyon hızı sabiti C₁₂BDMAK için 3.34 µM/sa. iken, 10 seyreltme faktöründe bu değer 1µM/sa.'e kadar düşmüş ve bunun üstündeki seyreltmelerde bu hız değişmemiştir. Aynı şekilde, C₁₄BDMAK parçalanma hızı 10⁸ CFU/mL mikroorganizma yoğunluğunda 3.86 µM/saat iken 10 seyreltme faktörü uygulandığında (10⁷ CFU/mL) hız sabiti 1.55 µM/saat'e kadar düşmüş ve bunun üstündeki seyreltmelerde bu hız değişmemiştir.

Seyreltme deneyleri sırasında yapılan gözlemler sonucunda BAK gideriminin gecikme olmadan, en yüksek hızda gerçekleşmesi

için gereken eşik mikroorganizma yoğunluğunun 10⁸ CFU/mL olduğu anlaşılmıştır. Bu yoğunluğun altında hem BAK biyotransformasyonunun başlamasında bir gecikme hem de hızında bir azalma rapor edilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak, seyreltme uygulandığında görülen gecikme süreleri Denklem 1'e çarpan olarak eklenen zamana bağlı değişen bir seyreltme katsayısı (D) ile simule edilmiştir (Denklem 2) [14]. Bu katsayı enzim sentezlenme hızı ile artmakta ve 1'e ulaştığında, yani eşik mikroorganizma sayısına eşitlendiğinde, BAK giderimini başlatmaktadır.



Şekil 5: BIOMIG1 suşunun 30 µM başlangıç konsantrasyonu ve 1:1-1:1000 (ca 10⁸ -10⁵ CFU/mL) seyreltme oranlarında (A) C₁₂BDMAK ve (B) C₁₄BDMAK parçalanma profili (22 °C sıcaklıkta).

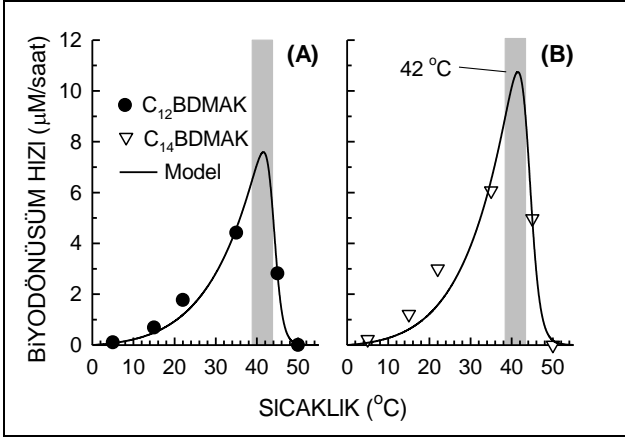
$$\frac{dD}{dt} = D \times k_{enzim} \quad (2)$$

Denklem 2'de D: mikroorganizma seyreltme katsayısı (birimsiz, D≤1) ve k_{enzim}: enzim sentezlenme hızı'dır (saat⁻¹). D katsayısı çarpan olarak kullanılarak değiştirilen Denklem 1 seyreltmenin C₁₂ ve C₁₄BDMAK biyotransformasyonuna etkisini, özellikle gecikme evresinin uzunluğunu, başarılı şekilde simule edebilmiştir (Şekil 5). Eğri uydurma işlemiyle hesaplanan ortalama enzim sentezleme hızı 0.62±0.47 saat⁻¹ (n=10) olarak hesaplanmıştır. Bu değer BIOMIG1 için hesaplanan büyüme hızı değerine yakındır [9]. Mikroorganizmalar büyüme sırasında tüm enzimlerinin birer kopyasını üreterek bölünürler, bu nedenle iki ayrı deney sonucunda elde edilen enzim sentezlenme ile büyüme hızlarının birbirine yakın olması beklenen bir sonuçtur.

3.4 Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın BAK biyotransformasyonu üzerindeki etkisi 5, 15, 22, 35, 45 ve 50 °C'de yapılan deneylerle belirlenmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen hız sabitleri C₁₂ ve C₁₄ BDMAK için sırasıyla şöyledir: 0.10, 0.68, 1.77, 4.41, 2.81 ve 0.00 µM/saat; 0.22, 1.21, 3.00, 6.07, 4.97 ve 0.00 µM/sa. Görüldüğü gibi her iki BAK için parçalanma hızları 5 °C'ten 35 °C'ye kadar artmıştır (Şekil 6). Buna karşın, parçalanma 45 °C'de 35 °C'ten daha yavaş gerçekleşmiştir. 50 °C'de ise BAK

biyotransformasyonu gözlenmemiştir. Kontrol reaktörlerinde BAK konsantrasyonu test edilen hiç bir sıcaklıkta değişmemiştir.



Şekil 6: BIOMIG1 suşunun (A) C₁₂BDMAK ve (B) C₁₄BDMAK'ı 12 µM başlangıç konsantrasyonunda giderim hızının 5-50 °C arasında değişim profili

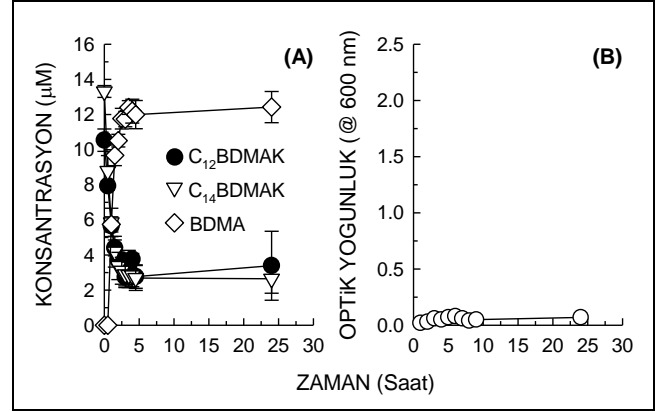
Bu veriler kullanılarak sıcaklığın BAK biyotransformasyonu üzerindeki etkisi enzim aktivasyonu ve deaktivasyonunu dikkate alan Arrhenius denklemi kullanılarak simule edilmiştir (Denklem 3) [16].

$$k = \frac{\beta T \exp\left[\frac{-E_a}{RT}\right]}{1 + \exp\left[\frac{\Delta S}{R} + \frac{\Delta H}{RT}\right]} \quad (3)$$

Denklem 3'te, k: görünen BAK biyotransformasyonu hız sabiti (µM/saat); β: biyotransformasyon orantılılık faktörü (µM/saat-K); T: salt sıcaklık (K); E_a: aktivasyon enerjisi (kcal/mol); R: Gaz sabiti (1.987 x 10⁻³ kcal/mol-K); ΔS: Enzim deaktivasyonunun entropi değişimi (kcal/mol-K) ve ΔH: enzim deaktivasyonunun entalpi değişimidir (kcal/mol). Denklem 3'teki parametreler bu denklemin 12 µM derişimde 5'ten 50 °C'ye kadar elde edilmiş BAK biyotransformasyon hızlarına lineer olmayan regresyonu ile hesaplanmıştır (Şekil 6). C₁₂BDMAK ve C₁₄BDMAK için elde edilen regresyon katsayıları (R²) sırasıyla 0.98 ve 0.94'tür. BAK biyotransformasyonunun sıcaklığa bağlı değişimini betimleyen parametreler C₁₂BDMAK için: β=7.3x10⁷ µM/saat-K; E_a=12.3 kcal/mol; ΔS=0.63 kcal/mol-K; ΔH=200 kcal/mol, C₁₄BDMAK için ise: β=4.8 x 10⁸ µM/sa.-K; E_a=13.3 kcal/mol; ΔS=0.53 kcal/mol-K; ΔH=167 kcal/mol bulunmuştur. Bu değerlerin her iki BAK içinde birbirine çok yakın olması bu BAK'lerin sadece oxyBAC tarafından parçalandığının bir göstergesidir. Bu bulgular doğrultusunda, oxyBAC enzimin optimum sıcaklığının yaklaşık 42 °C olduğu söylenebilir.

Bunlara ek olarak değişik sıcaklıklarda yapılan BAK biyotransformasyon deneylerinde ilginç bir gözlem yapılmıştır: 45 °C gerçekleşen BAK biyotransformasyonu sırasında ortamda giderilen BAK kadar BDMA biriktiği belirlenmiştir (Şekil 7A). Diğer sıcaklıklarda gözlenmeyen bu durum BAK biyotransformasyonunu gerçekleştiren oxyBAC enzimin BDMA biyotransformasyonunda rol oynamadığı ve bu enzimin daha yüksek sıcaklıklarda da işlevini koruduğunu göstermiştir. Buna ek olarak BIOMIG1'in 45 °C zengin LB besiyerinde büyümemesi (Şekil 7B), fakat aynı sıcaklıkta BAK ile indüklenmiş kültürün BAK'leri BDMA'ye dönüştürebilmesi (Şekil 7 A) BAK biyotransformasyonunda rol oynayan enzimin

muhtemelen BIOMIG1'e özgü olmadığı ve başka bir tür bakteriden BIOMIG1'e yatay gen transferiyle geçmiş olabileceğinin bir göstergesidir. BIOMIG1'in tüm genomunun incelendiği çalışmada da oxyBAC geninin integras gibi mobil genetik elemanına yakın olduğunun bulunması bu sonucu desteklemektedir [9].



Şekil 7: BIOMIG1 suşunun 45 °C'de (A) 12 µM başlangıç konsantrasyonunda C₁₂BDMAK ve C₁₄BDMAK'ı giderme ve BDMA oluşturma ve (B) LB besiyeri içerisinde büyüme profilleri (Hata barları ortalama ± bir standart sapmayı gösterir, n = 3).

4 Sonuçlar

Yerel bir arıtma tesisinin aktif çamurundan alınan örnekten izole edilen ve BAK parçalayan *Pseudomonas* sp. BIOMIG1, BAK'lere 1024 mg/L konsantrasyona kadar dayanıklıdır. Bu konsantrasyon altında BAK'leri maksimum 4 µM/saat hızla giderebilmektedir. BAK biyotransformasyon hızı BAK konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekte ve Michaelis-Menten büyüme modelini izlemektedir. 12 ve 14 karbon uzunluğunda alkil zinciri olan BAK'ler 16 karbonlu BAK'a göre daha hızlı giderilmektedir. Mikroorganizma yoğunluğunun belirlenen 10⁸ CFU/mL eşik değerden az olduğu durumlarda BAK biyotransformasyonu belirli bir gecikme evresinden sonra başlayabilmektedir. Bu gecikme evresi azalan mikroorganizma yoğunluğuna paralel olarak artmaktadır. Ayrıca, mikroorganizma yoğunluğunun eşik değerinin altında olması BAK parçalanma hızını da azaltmaktadır. BAK transformasyonunda rol oynayan enzimin optimum faaliyet sıcaklığı 42 °C olarak bulunmuştur, bu sıcaklık üzerinde ve altındaki sıcaklıklarda biyotransformasyon hızı azalmaktadır. Buna karşın BIOMIG1 35 °C'nin üzerinde yaşayamamaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, biyolojik arıtma sistemlerinde BAK gibi dezenfektanları parçalayıp zararsız hale getirebilecek mikroorganizmaların bulunduğunu fakat konsantrasyon ve moleküler yapının, mikroorganizma yoğunluğunun ve sıcaklığın bu tür kimyasalların etkin şekilde arıtılmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.

5 Teşekkür

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 113Y528 ve Boğaziçi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen S6507 No'lu projeler kapsamında gerçekleştirilmiştir.

6 Kaynaklar

- [1] Tezel U, Pavlostathis SG. *Role of Quaternary Ammonium Compounds on Antimicrobial Resistance in the Environment*. Editors: Keen PL, Montforts MHMM. Antimicrobial Resistance in the Environment, 349-388, New Jersey, USA, Wiley-Blackwell, 2012.
- [2] Martinez-Carballo E, Sitka A, Gonzalez-Barreiro C, Kreuzinger N, Furrhacker M, Scharf S, Gans O. "Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria". *Environmental Pollution*, 145(2), 489-496, 2007.
- [3] Clara M, Scharf S, Scheffknecht C, Gans O. "Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage". *Water Research*, 41(19), 4339-4348, 2007.
- [4] Kummerer K, Eitel A, Braun U, Hubner P, Daschner F, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F, Verhoef J. "Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection". *Journal of Chromatography A*, 774(1-2), 281-286, 1997.
- [5] Tandukar M, Oh S, Tezel U, Konstantinidis KT, Pavlostathis SG. "Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance". *Environmental Science & Technology*, 47(17), 9730-9738, 2013.
- [6] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. "Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides". European Commission, Directorate-General for Health & Consumers, Brussels, Belgium, 2009.
- [7] Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. "Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health?". *Microbial Drug Resistance*, 16(2), 91-104, 2010.
- [8] Tezel U, Tandukar M, Martinez RJ, Sobczyk Pa, Pavlostathis SG. "Aerobic biotransformation of n-tetradecylbenzyltrimethylammonium chloride by an enriched *Pseudomonas* spp. community". *Environmental Science & Technology*, 46(16), 8714-8722, 2012.
- [9] Ertekin E, Konstantinidis KT, Tezel U. "A Rieske-type oxygenase of *Pseudomonas* sp. BIOMIG1 converts benzalkonium chlorides to benzyltrimethyl amine". *Environmental Science & Technology*, 51(1), 175-181, 2017.
- [10] Ertekin E, Hatt JK, Konstantinidis KT, Tezel U. "Similar microbial consortia and genes are involved in the biodegradation of benzalkonium chlorides in different environments". *Environmental Science & Technology*, 50(8), 4304-4313, 2016.
- [11] American Academy of Microbiology. "Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on the Old Problem". American Academy of Microbiology, Washington DC, USA, 2009.
- [12] Boethling RS. *Environmental Aspects of Cationic Surfactants*. Editors: Cross J, Singer EJ. Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation, 96-130, New York, USA, Marcel Dekker Inc., 1994.
- [13] Zhang C, Tezel U, Li K, Liu D, Ren R, Du J, Pavlostathis SG. "Evaluation and modeling of benzalkonium chloride inhibition and biodegradation in activated sludge". *Water Research*, 45(3), 1238-1246, 2011.
- [14] Rittmann BE, McCarty PL. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Boston, USA. McGraw-Hill, 2001.
- [15] van Ginkel CG, Kolvenbach M. "Relations between the structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegradability". *Chemosphere*, 23(3), 281-289, 1991.
- [16] Tas DO, Pavlostathis SG. "Temperature and pH effect on the microbial reductive transformation of pentachloronitrobenzene". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5390-5398, 2007.