



## 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT)'in Mikrobiyal Degradasyonu ve TNT ile Kirlenmiş Bölgelerin Biyoremediasyonu

Zehra Gün Gök<sup>1</sup>, Murat İnal<sup>1\*</sup>, Mustafa Yiğitoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Kırıkkale, Türkiye, 71450.

(Dergiye gönderilme tarihi: 21 Ocak 2016, kabul tarihi 7 Nisan 2016)

### Özet

2,4,6-trinitrotoluen (TNT) yaygın olarak kullanılan patlayıcı bir kimyasaldır. TNT güvenli üretimi ve depolanması, düşük erime noktası, kimyasal ve termal kararlılığı gibi özelliklerinden dolayı her iki dünya savaşında ana patlayıcı madde olarak kullanılmıştır. TNT'nin askeri faaliyetler için imalatı, kullanımı ve imha edilmesi hem toprak hem de yeraltı sularının kirlenmesine neden olmaktadır. TNT'nin yaygın olarak patlayıcı madde olarak kullanılmasına karşın insan dahil birçok organizma üzerinde toksik etkileri vardır ve TNT yapısında bulunan nitro gruplarının simetrik düzeninden dolayı doğada uzun süre bozunmadan kalabilmektedir. TNT'nin hem yer altı sularında hem de toprakta neden olduğu kirliliğin biyolojik yöntemlerle remediasyonu insan sağlığı ve ekosistem açısından oldukça önemlidir. Bir toksik bileşiğin biyolojik olarak muamele edilebilirliği bu bileşiğin biyodegradasyonunun mümkün olmasına bağlıdır. TNT doğada uzun süre bozunmadan kalabilmesine karşın mikrobiyal ataklar karşısında hassastır. Çeşitli aerobik ve anaerobik bakteriler ve mantarlar sentezledikleri nitroreduktaz enzimleri ile TNT ve TNT'nin transformasyon metabolitlerini parçalayabilmektedir. TNT ile kirlenmiş bölgelerin ıslahı için, TNT'yi parçalayabilme yeteneğine sahip mikroorganizmaların kullanıldığı çeşitli biyolojik temelli teknolojiler geliştirilmiştir. Bu çalışmada konuyla ilgili literatür incelenerek TNT'nin mikrobiyal degradasyon mekanizmaları ve TNT degradasyon kapasitesine sahip mikroorganizma türleri belirlenmiştir. Ayrıca, TNT ile kirlenmiş bölgelerin ıslahında kullanılan biyoremediasyon yöntemleri araştırılmış, yöntemlerin uygulanmasına ait çalışmalar ve yöntemlerin uygulamadaki avantaj ve dezavantajları literatür kaynaklarından derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nitroaromatik bileşikler, 2,4,6-trinitrotoluen, mikrobiyal degradasyon, biyoremediasyon.

## Microbial Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and Bioremediation of Contaminated Areas with TNT

2,4,6-trinitrotoluene (TNT) is a widely used explosive chemical. TNT was used as the main explosive in both two World wars due to characteristics such as safe manufacture and storage of TNT, its low melting point and its chemical and thermal stability. The manufacturing, use and disposal of TNT for military activities have caused contamination of both soil and groundwater. Although TNT is widely used as an explosive material, there are toxic effects of TNT on many organisms including humans and because of the symmetrical arrangement of the nitro groups in the structure of TNT, it can be stay in nature without degradation for a long time. Remediation of soil and groundwater contamination caused by TNT with biological approaches is very important in terms of human health and ecosystems. The availability of biological treatment of a toxic compound depends on the possibility of biodegradation of the compound. Though TNT is persistent in nature for a long time, it is sensitive to microbial attacks. A variety of aerobic and anaerobic bacteria and fungi can degrade TNT and TNT's transformation metabolites with nitroreductase enzymes which they synthesize. For the remediation of contaminated areas with TNT, various biological-based technologies employing microorganisms that are capable of degrading TNT have been developed. In this study, by examining relevant literature, microbial degradation mechanisms of TNT and microorganism species that have TNT degradation capacity have been designated. Furthermore, bioremediation methods used for the treatment of contaminated sites with TNT were investigated, studies on the implementation of the methods and advantages and disadvantages of these methods in practice were compiled from literature sources.

**Keywords:** Nitroaromatic compounds, 2,4,6-trinitrotoluene, microbial degradation, bioremediation.

\* Sorumlu Yazar: Murat İNAL, [inalmrt@yahoo.com](mailto:inalmrt@yahoo.com), 03183574242-1224.

## 1. Giriş

Nitroaromatik bileşikler ksenobiyotiklerin önemli bir grubunu oluşturmaktadırlar. Aromatik halkaya bağlı bir nitro grubu bulunduran sadece birkaç nitroaromatik bileşik mikroorganizmalar tarafından sekonder metabolitler olarak üretilmektedir. Patlayıcı, boyar madde, herbisit, böcek öldürücü ve çözücü olarak kullanılan birçok nitroaromatik bileşik ise sentetik endüstriyel kimyasallardır (Park ve ark., 2003a). Nitroaromatik bileşikler oldukça toksik ve mutajeniktir ve birçoğu kanserojen ya da şüpheli kanserojen olarak rapor edilmiştir (Ju ve Parales, 2010). Bu bileşikler genel olarak doğada uzun süre bozunmadan kalabildiklerinden dolayı insan, balıklar, algler ve mikroorganizmalar üzerinde toksik ve mutajenik etkilerin oluşmasına sebep olan çevre kirliliği oluşturmaktadırlar. En iyi bilinen ve patlayıcı madde olarak en yaygın kullanılan nitroaromatik bileşik TNT'dir. TNT ile kontamine olmuş alanların çoğu eski mühimmat atık bölgeleridir ancak TNT ile kirlenmiş çoğu bölge hala çevresel olarak tehlike altındadır. Bu bölgelerde TNT kontaminasyonu yaygın olarak bilinmesine rağmen bu bölgeler ve bölgelerin kirlilik seviyeleri ile ilgili literatürde çok az bilgi bulunmaktadır (Park ve ark., 2003a). Eski ve yeni askeri bölgelerde ve patlayıcı üretim tesislerinde toprak ve suyun TNT kirliliğine maruz kalması ciddi bir çevre sorunudur. Bu bölgelerde, TNT uzun süre çözünmeden kalabilmekte ya da yeraltı sularında çözünmektedir. TNT toksik ve mutajenik bir kimyasaldır ve yeraltı sularına karışması çevre ve insan sağlığı açısından ciddi tehditler oluşturmaktadır (Maeda ve ark., 2007).

TNT her iki dünya savaşında da ana patlayıcı madde olarak kullanılmıştır (Park ve ark., 2003b). TNT'nin askeri faaliyetler için imalatı, kullanımı ve imha edilmesi hem toprak hem de yeraltı sularının kirlenmesine neden olmaktadır (Gallagher, 2010). TNT ile kirlenmiş bölgelerin doğal kaynaklara zarar vermeyen ve kamuoyu tarafından yüksek kabul gören yöntemlerle remediasyonu insan sağlığı ve ekosistem için oldukça önemlidir. TNT kirliliğine maruz kalmış alanları temizlemek için birkaç fizikokimyasal yöntem geliştirilmiştir, bunlar: yakma, adsorpsiyon, kompostlama, ileri oksidasyon ve kimyasal indirgenme işlemleridir. Ancak bu işlemlerin her birinin maliyetli olma, problematik atık ürünlerin oluşması ve atmosfere zararlı gazların açığa çıkması gibi kendi sınırlamaları vardır (Park ve ark., 2003b). Son araştırmalar TNT gibi patlayıcılarla kirlenmiş bölgelerin temizlenmesinde mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreli arıtım prosesleri olarak tanımlanan biyoremediasyon işlemi gibi alternatif yöntemlerin üzerinde odaklanmıştır. Biyoremediasyon doğal yollarla gerçekleşir ve maliyet açısından diğer yöntemlere kıyasla daha ekonomik bir proses olmasından dolayı oldukça avantajlıdır (Dindar ve ark., 2010).

Bu çalışmada, konuyla ilgili literatür incelenerek TNT'nin yapısı, özellikleri ve toksik etkileri, mikrobiyal parçalanması, TNT'yi parçalayabilen mikroorganizmalar ve TNT'nin bioremediasyonu hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

## 2. TNT

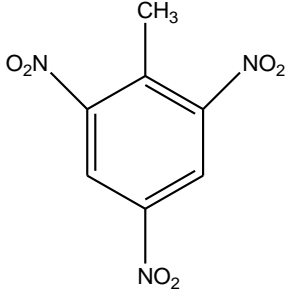
1830 yıllarında organik kimyanın gelişimi ile kimyagerler nitrolama yöntemiyle birçok yeni bileşik sentezlemiştir. Birkaç yıl boyunca üretilen bu nitratlı bileşiklerin bazılarının patlayıcı özelliği keşfedilmiş ve bu bileşiklerin askeri ve endüstriyel amaçlar için kullanım yolları aranmıştır. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, infilak edilmeye kadar kararlı olan nitroaromatik bileşikler TNT ve 2,4,6-trinitrofenol (pikrik asit) sentezlenmiş ve TNT birinci dünya savaşında en yaygın olarak kullanılan patlayıcı olmuştur (Lewis ve ark., 2004).

## 2.1. TNT'nin Yapısı ve Özellikleri

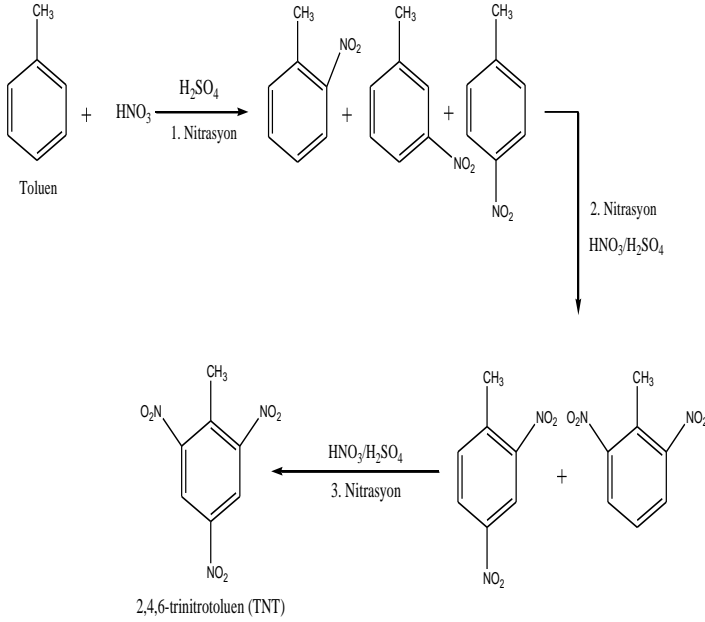
TNT ilk kez 1863 yılında Alman kimyager Joseph Wilbrand tarafından sentezlenmiş ve o yıllarda boyar madde olarak kullanılmıştır. Alman ordusunun 1902 yılında TNT'nin patlayıcı özelliğini keşfetmesinden sonra TNT fişeklerin, bombaların ve el bombalarının ana patlayıcı maddesi olarak Alman askeri sanayisinde önemli kullanım alanları bulmuştur (Yinon, 1990). Polinitroaromatik bir bileşik olan TNT 2, 4, 6. pozisyonlardaki C atomuna bağlı oksitlenmiş 3 adet NO<sub>2</sub> gruplarından ve 1. pozisyonundaki bir metil grubundan oluşmaktadır (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Yüksek bir patlayıcı olan TNT oda sıcaklığında katı bir kristal olan tek halkalı nitroaromatik bir bileşiktir.

TNT kokusuz sarı renkli doğal olarak meydana gelmeyen katı bir maddedir. TNT 80,6 °C'de erimekte ve donduğunda iğne gibi rensiz kristallere dönüşmektedir. TNT'nin oda sıcaklığında sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür ama etanol, aseton ve metanol gibi çözücülerde iyi derecede çözünmektedir. Patlama şiddeti ortalama olarak 6900 ms<sup>-1</sup>'dir. TNT kararlı ve sudaki çözünürlüğü düşük olduğu için nem tutmayan bir bileşiktir ve sürtünme, darbe, şok ve elektrostatik enerji gibi uyarıcılara karşı hassas değildir (Üzer, 2004; Mercimek, 2011). Tablo 1'de TNT'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir.

Tablo 1. TNT'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (ATSDR, 1995 ve Ayoub ve ark. 2010)

TNT'nin yapısal formülü	
	<b>Moleküler Formülü:</b> C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
	<b>IUPAC Numarası:</b> 2-metil-1,3,5-trinitrobenzen
	<b>Moleküler Ağırlığı:</b> 227,13 g/mol
	<b>Kristal Formu:</b> TNT rensiz ortorombik kristaller ya da soluk sarı renkli monoklinik kristaller şeklinde mevcuttur.
	<b>Erime Noktası :</b> 80,65 °C
	<b>Kaynama Noktası:</b> 210 °C
	<b>Parlama Noktası:</b> 240 °C
	<b>Tutuşma Noktası:</b> 295 °C
	<b>Yoğunluk :</b> 1,65 g/mL
	<b>Çözünürlüğü:</b> 20 °C'de g/100 g çözücüde; suda 0.0130, etanolde 1.23, eterde 3.29, toluende 55, benzende 67, asetonunda 109.
<b>Patlama Şiddeti:</b> 6900 m/s	

TNT toluenin nitrik ve sülfürik asit çözeltisi ile muamelesi sonucu elde edilmektedir (ATSDR, 1995). TNT, üç adımda sentezlenmektedir. İlk olarak toluen, sülfürik-nitrik asit karışımı bir çözeltide nitrolanarak MNT (mononitrotoluen) sentezlenir. Sonrasında elde edilen MNT tekrar nitrolanarak dinitrotoluen (DNT) elde edilir ve en son adımda üçüncü bir nitrolama ile oluşan DNT'lerden TNT elde edilir (Üzer, 2004). TNT'nin toluenden elde edilmesi Şekil 1.'de verilmiştir.



Şekil 1. Başlangıç materyali toluenden TNT'nin sentez mekanizması (Anonim, 2015)

## 2.2. TNT'nin Toksik Etkileri

Yüzyıldan fazladır TNT'nin yaygın olarak kullanımı TNT'yi toprak ve yeraltı sularının ana kirletici ajanı haline getirmiştir. Toprakta TNT kontaminasyonunun 10 mg/kg'dan 12000 mg/kg'a ve bazen 35000 mg/kg seviyelerine ulaştığı rapor edilmiştir. Yine atık sularda 70 mg/L TNT konsantrasyonu rapor edilmiştir. TNT doğada uzun süre bozunmadan kaldığı için çevre üzerinde negatif etkilere sahiptir ve yüksek konsantrasyonlarda, TNT toksik, mutajenik ve potansiyel kanserojendir (Qasim ve ark., 2007).

TNT'ye maruz kalma deride döküntü ve kaşıntıya, mukus ve kan hastalıklarına neden olmaktadır. Tarihte, büyük ölçekli TNT üretim tesislerinde çalışan işçilerde TNT'nin toksik etkileri karaciğer hasarı (toksik hepatit) ve anemi olarak rapor edilmiştir. Ames testi ile TNT'nin güçlü bir mutajen olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rahal ve Moussa, 2011).

İnsanlarda küçük miktarlarda TNT'ye maruz kalmak baş ağrısına, anemiye ve alerjik reaksiyonlardan dolayı derinin tahriş olmasına sebep olmaktadır. Anemi TNT toksisitesinin sık belirtilen semptomudur. TNT'nin standart hematolojik parametreler üzerindeki olumsuz etkileri sıçanlarda, farelerde ve köpeklerde rapor edilmiştir (ATSDR, 1995). Yüksek miktarlarda TNT'ye maruz kalma ise karaciğerde, gözde ve sinir sisteminde hasarlar meydana getirmektedir. Bunların dışında, insan vücudunda TNT metabolizasyonu sonucu açığa çıkan reaktif nitrozo türleri ve reaktif oksijen türleri DNA gibi makromoleküllerle bağlanmakta ve oksidatif DNA hasarına sebep olmaktadır. Bundan dolayı, TNT ve TNT'nin metabolizasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen türü metabolitler genetik bozukluklara ve kansere sebep olmaktadır. İnsan ve çevre üzerindeki TNT'nin toksik etkisi TNT'nin doğada birikmesi ile artmaktadır (Qasim ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalar ile bazı memeli türlerinde TNT'nin akut oral toksisitesi belirlenmiştir. Örneğin, TNT'nin oral medyan öldürücü dozu hem erkek hem de dişi farelerde 660 mg/kg, dişi sıçanlarda 795 mg/kg ve erkek sıçanlarda 1320 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu hayvanlarda, TNT'ye maruz kalmadan 1-2 saat sonra kasılma nöbetleri gözlemlenmiştir. Bütün ölümler maruz kalmadan 24 saat sonra meydana gelmiş ve maruz kalmanın diğer

etkileri kırmızı renkli idrar ve uyuşukluk olarak rapor edilmiştir (Williams ve ark., 2015).

Karın içine 100 ile 150 mg/kg oranında TNT enjekte edilen kedilerde 5,5 saat içinde ölümler gözlemlenmiştir. 40 mg/kg TNT enjeksiyonu ise kasılma nöbetlerine, arka bacak felcine, vücut sıcaklığı düşüşüne ve tükürük salgısında artışa sebep olmuştur. Ayrıca kedilerin kanında methemoglobine rastlanmıştır. Günlük 50 mg/kg oranında TNT deri altı enjeksiyonu ile kedilere verildiğinde, kedilerde 4 ile 9 gün arasında ölümler gözlemlenmiştir (Williams ve ark., 2015).

Yan ve ark. (2002) Çin'de sekiz silah fabrikasında çalışan erkek işçiler arasından kanser hastalık oranı ve ölüm oranını rapor eden bir çalışma yayınlamışlardır. Çalışmaya 2683 TNT'ye maruz kalan erkek işçi ve 42494 TNT'ye maruz kalmayan erkek işçi dahil edilmiştir. TNT'ye maruz kalan işçilerde en sık görülen kanser türü tüm kanser vakalarının % 32'sini oluşturan karaciğer kanseridir. TNT'ye maruz kalmayan işçiler ile karşılaştırıldığında, TNT'ye maruz kalan işçilerde karaciğer kanseri oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede (RR = 3,46, p <0,01) yüksek olduğu bildirilmiştir.

Tüm patlayıcılar gibi TNT'de çeşitli derecede toksik bir kimyasaldır ve Amerika Çevre Koruma Ajansı tarafından C sınıfı kanserojen madde olarak sınıflandırılmaktadır (Gümüştü ve Tekinay, 2013).

## 3. TNT'nin Mikrobiyal Degradasyonu

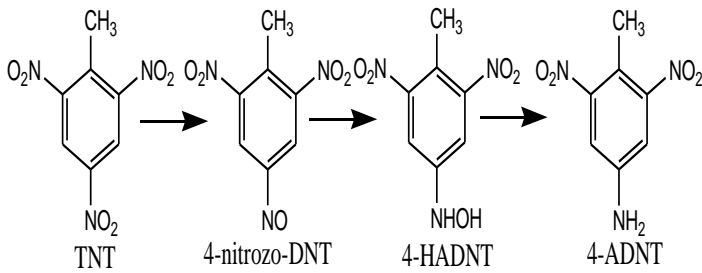
TNT mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebilen sentetik bir kimyasaldır ve mikroorganizmalar sentezledikleri nitroreduktaz enzimleri ile TNT'yi hidroksilamindinitrotoluenlere (HADNT), aminodinitrotoluenlere (ADNT), diaminomononitrotoluenlere (DAMNT) ve dinitrotoluenlere (DNT) indirgemekte ve azot kaynağı olarak kullanabilmektedir. Günümüze kadar TNT ve TNT gibi polinitroaromatik bileşikler oksijenin varlığında veya yokluğunda gerçekleşen aerobik ve anaerobik prosesler ile parçalamaya yeteneğine sahip birçok mikroorganizma tanımlanmıştır (Oh ve ark., 2000; Mercimek, 2011) ve TNT ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde biyoremediasyon yöntemini daha verimli hale getirmesini sağlayacak mikroorganizmaların keşfi amacı ile aerobik bakteriler (Gümüştü ve Tekinay, 2013; Mercimek ve ark., 2013), anaerobik bakteriler (Esteve-Nuñez ve ark., 2000, Lin ve ark., 2013), mantarlar (Gao ve ark., 2010) ve bitkiler (Ryloott ve Bruce, 2009) tarafından TNT'nin biyodegradasyonu birçok bilim insanı tarafından yıllarca çalışılmıştır.

### 3.1 TNT'nin Bakteriler Tarafından Degradasyonu

TNT oksidatif mikrobiyal degradasyona karşı dirençlidir çünkü TNT'nin yapısında bulunan üç tane elektron çekici nitro grupların varlığı sterik engelle ve aromatik halkada elektron eksikliğine sebep olmaktadır (Claus, 2014). Oksidatif degradasyon yerine, birçok bakteri TNT'nin yapısında bulunan nitro grupları hidroksilamin veya amin gruplarına indirgeyerek TNT molekülünü aminonitroaromatik bileşiklerinin farklı izomerlerine dönüştürmektedirler (Esteve-Nuñez ve ark., 2001; Claus, 2014).

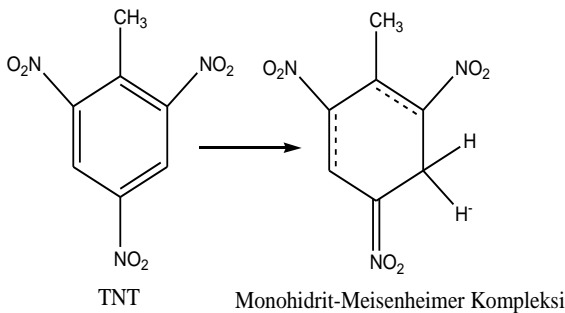
TNT'nin mikrobiyal degradasyonu Şekil 2.'de gösterildiği gibi bir nitro grubun önce nitrozo (-NO) sonra hidroksilamin (-NHOH) ve en sonunda amin (-NH<sub>2</sub>) grubuna dönüşmesi ile başlamaktadır (Claus, 2014). Aerobik koşullar altında, bakteriler bir veya iki nitro grubunu hidroksilamin veya amin gruplarına

indirgemektedir ama üçüncü nitro grubunun indirgenmesi için anaerobik koşullar gerekmektedir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001; Ayoub ve ark., 2010; Claus, 2014). TNT'nin nitro gruplarının indirgenmesinde birinci nitro grubun indirgenmesi diğer nitro gruplarının indirgenmesine göre çok daha hızlıdır. Çünkü ilk nitro grubunun amin grubuna dönüştürülmesi aromatik halkanın elektron eksikliğini azaltır ve dolayısıyla diğer nitro grupların indirgenmesi için daha düşük redoks potansiyeli gerekir. Bu nedenle, TNT'nin indirgenmesi sonucu triaminotoluen (TAT) oluşumu -200 mV redoks potansiyelinin altında gerçekleşmektedir ve bu sadece oksijensiz ortamda sağlanabilmektedir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Düşük redoks potansiyelinin oksijensiz ortamda sağlanması ile katı olarak anaerobik olan *Clostridium* sp., *Desulfovibrio* sp. ve *Methanococcus* sp. gibi bakteriler tarafından TNT tamamen TAT molekülüne indirgenmektedir (Claus, 2014). Aerobik ve anaerobik koşullar altında bakteriler tarafından TNT'nin biyodegradasyon mekanizmaları Şekil 3. ve Şekil 4.'te sırasıyla verilmiştir.



Şekil 2. Nitro grubunun indirgenmesi ile TNT'nin mikrobiyal degradasyonu (Claus, 2014)

Mikrobiyal degradasyonda ikinci önemli yol aromatik halkaya hidrit iyonları eklenerek monohidrit ve dihidrit-Meisenheimer komplekslerinin oluşumu ile TNT'nin doğrudan indirgenmesidir (Şekil 5). Her iki degradasyon mekanizması da (nitro grupların indirgenmesi ve aromatik halka-indirgenmesi) aynı hücre içinde gerçekleşebilmektedir. Dihidrit-Meisenheimer kompleksi ve HADNT arasındaki kondensasyon reaksiyonları nitrit iyonlarının açığa çıkması ile diarilaminlerin oluşmasına yol açmaktadır (Claus, 2014).



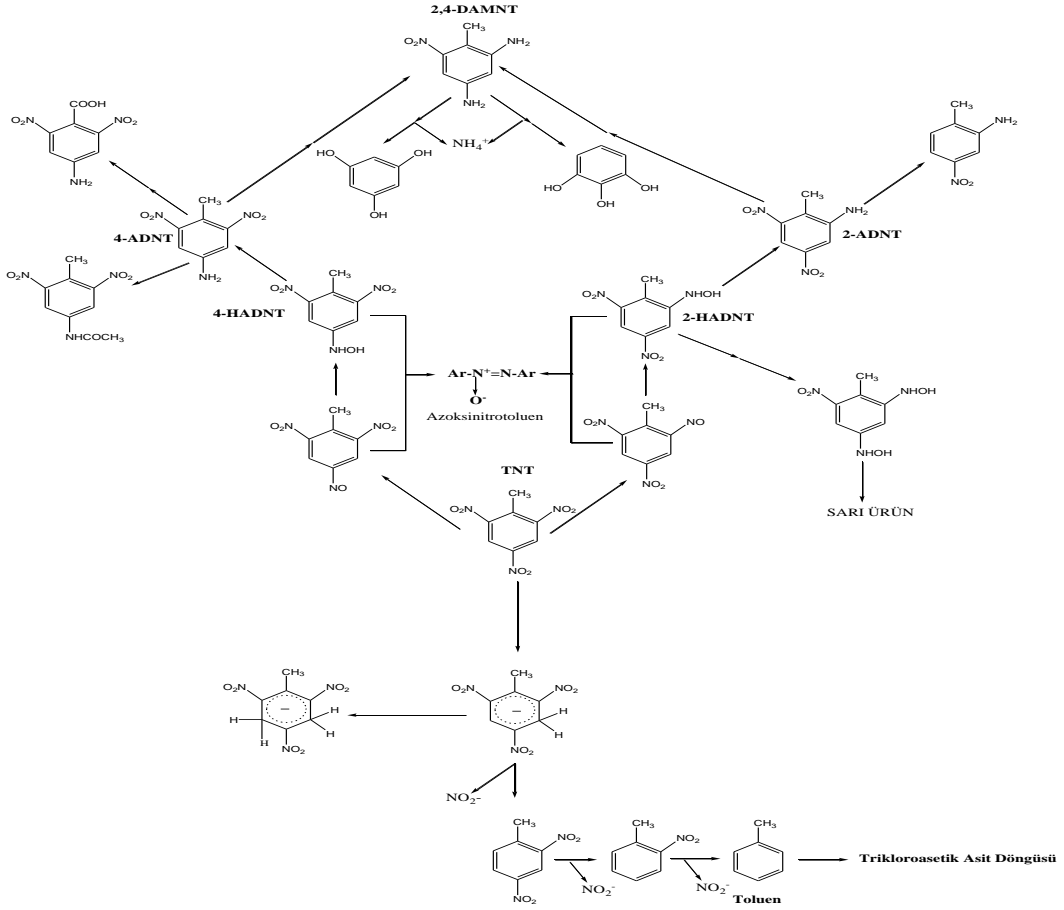
Şekil 5. TNT'ye hidrit iyonunun eklenmesi ile Meisenheimer kompleksinin oluşması ve TNT'nin mikrobiyal transformasyonu (Claus, 2014)

TNT'nin bakteriler tarafından degradasyonu TNT ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde etkili bir biyoteknolojik yaklaşımın daha verimli hale getirilmesi için yüksek TNT yıkım kapasitesine sahip mikroorganizmaların keşfi amacı ile yıllarca bilim adamları tarafından çalışılmıştır (Ayoub ve ark., 2010). TNT'yi aerobik ve anaerobik koşullar altında parçalama yeteneğine sahip literatürde rapor edilen aerobik ve anaerobik bakteri türleri sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

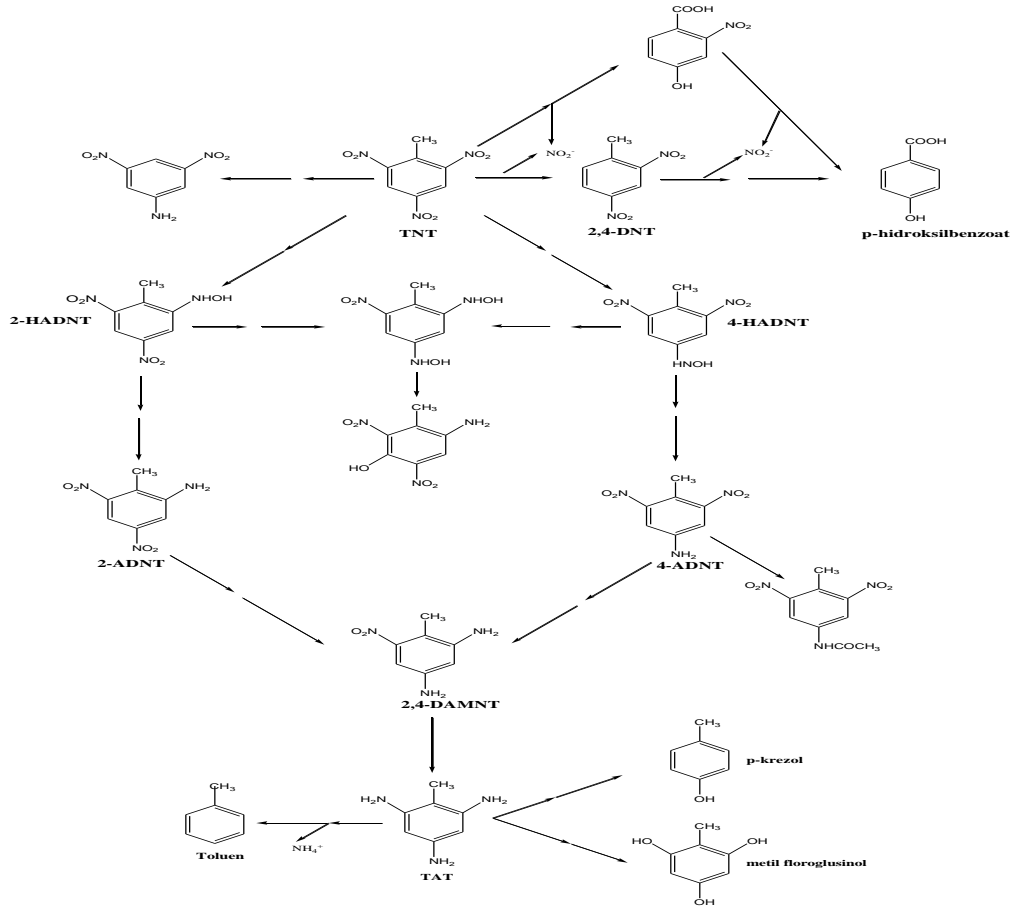
Preuss ve ark. (1993) azot kaynağı olarak sadece TNT, karbon ve enerji kaynağı olarak piruvat kullanarak *Desulfovibrio* bakterisini izole etmiştir. Bu izolat herhangi bir indirgeyici ajan olmayan hücre süspansiyonunda TNT'nin anaerobik koşullar altında TAT molekülüne indirgenmesini kataliz etme yeteneğine sahiptir.

Kore'de TNT ile kontamine olmuş topraklardan yüzlerce bakteri izole edilmiş ve izolatlar arasında en aktif olan bakteri suşu API testi ile *Pseudomonas putida* KP-T201 olarak Park ve ark. (2002) tarafından belirlenmiştir. Bu izolat karbon kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda (20, 50 ve 100 mg/L) TNT bulunan besiyerinde büyütülmüş ve 20, 50 ve 100 ppm TNT içeren besi yerinde başlangıçtaki TNT'nin sırası ile 6 saat, 16 saat ve 36 saat içinde degrade edildiği belirlenmiştir. İzolatın TNT degradasyonu için biyokinetik parametreleri belirlenmiştir. Degradasyon ürünlerinin analizi HPLC ile yapılmış ve metabolitler 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT ve 2,6-DNT olarak belirlenmiştir.

Lin ve ark. (2013) demiri indirgeyen bakteri topluluğunda izole ettikleri ve 16S rDNA analizi tekniği ile tanımladıkları *Bacillus mycooides* bakteri suşu ile TNT'nin mikrobiyal degradasyonunu araştırmıştır. Bu bakteri ile hem aerobik hem de anaerobik olarak TNT'nin degradasyonunu çalışılmıştır. İzolat ile yapılan degradasyon çalışmalarında izolatın aerobik şartlarda başlangıçtaki TNT'nin 16 saatte % 93'ünü, anaerobik şartlarda başlangıçtaki TNT'nin 24 saatte % 94'ünü yaktığı belirlenmiştir. TNT'nin biyotransformasyon metabolitleri GC/MS ile tanımlanmış ve 4-ADNT ve 6-ADNT olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Aerobik bakterilerde TNT'nin biyodegradasyon mekanizması (Esteve-Nuñez ve ark., (2001)'den değiştirilerek)



Şekil 4. Anaerobik bakterilerde TNT'nin biyodegradasyon mekanizması (Esteve-Nuñez ve ark., (2001)'den değiştirilerek)



Tablo 2. TNT'yi aerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri

<b>Aerobik Bakteri Türü</b>	<b>Referans</b>
<i>Achromobacter spanius</i> STE 11	Gümüştü ve Tekinay, 2013
<i>Acinetobacter noscomialis</i>	Sangwan ve ark., 2015
<i>Bacillus cereus</i>	Mercimek ve ark., 2013
<i>Bacillus mycoides</i>	Lin ve ark., 2013
<i>Bacillus SF</i>	Nyanhongo ve ark., 2009
<i>Clavibacter agropyi</i>	Rahal ve Moussa, 2011
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	French ve ark., 1998
<i>Enterobacter sp.</i>	Bae ve ark., 1995
<i>Klepsiella sp.</i>	Kim ve ark., 2002
<i>Mycobacterium vaccae</i>	Vanderberg ve ark., 1995
<i>Mycobacterium sp. strain</i> HL4NT-1	Vorbeck ve ark., 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mercimek ve ark., 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pak ve ark., 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B3468	Naumova ve ark., 1988
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Fiorella ve Spain, 1997
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Martin ve ark., 1997
<i>Pseudomonas sp. clone</i> A	Duque ve ark., 1993
<i>Pseudomonas putida</i>	Park ve ark., 2002; Chien ve ark., 2014
<i>P. fluorescens strain</i> TM42	Maeda ve ark., 2006
<i>Pseudomonas sp. strain</i> TM55	Maeda ve ark., 2006
<i>Pseudomonas sp. strains</i> TM15	Maeda ve ark., 2006
<i>Pseudomonas sp.</i>	Chien ve ark., 2014
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Vorbeck ve ark., 1998
<i>Serratia marcescens</i>	Montpas ve ark., 1997
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	Rahal ve Moussa, 2011
<i>Sphingomonas sp.</i>	Maeda ve ark., 2006
<i>Raoultella terrigena</i>	Claus ve ark., 2007
<i>Staphylococcus sp.</i>	Kalafut ve ark., 1998
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Oh ve Kim, 1998

Tablo 3. TNT'yi anaerobik koşullar altında metabolize edebilen bakteri türleri

<b>Anaerobik Bakteri Türü</b>	<b>Referans</b>
<i>Bacillus mycoides</i>	Lin ve ark., 2013
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Ederer ve ark., 1997
<i>Clostridium bifermentans</i> CYS-1	Shim ve Crawford, 1995
<i>Clostridium bifermentans</i> LJP-1	Lewis ve ark., 1997
<i>Clostridium pasterianum</i>	McCormick ve ark., 1976
<i>Clostridium sordelii</i>	Ederer ve ark., 1997
<i>Clostridium sp.</i>	Hughes ve ark., 1998
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	Kalderis ve ark., 2011
<i>Desulfovibrio sp. suşu</i> B	Boopathy ve Kulpa, 1992
<i>Desulfovibrio sp.</i>	Preuss ve ark., 1993
<i>Desulfovibrio sp.</i>	Drzyzga ve ark., 1998
<i>Escherichia coli</i>	Ederer ve ark., 1997
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ederer ve ark., 1997
<i>Methanococcus sp. suşu</i>	Boopathy ve Kulpa, 1994
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Kalderis ve ark., 2011
<i>Pseudomonas sp. suşu</i> JLR11	Esteve-Nuñez ve Ramos, 1998
<i>Serratia marcescens</i>	Kalderis ve ark., 2011
<i>Veillonella alkalescens</i>	McCormick ve ark., 1976

### 3.2. TNT'nin Mantarlar Tarafından Degradasyonu

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi, TNT'nin funguslar tarafından yıkılmasındaki ilk adım nitro gruplarının indirgenmesidir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Çoğu mantar TNT'nin en az bir nitro grubunun indirgenmesini katalize edebilmektedir (Spain, 1995). Bu degradasyondan beyaz çürükçül mantarların lignin parçalama sisteminin ekstrasellüler enzimleri sorumludur ve bu enzimler peroksidazlar (lignin peroksidaz, Mn-bağımlı peroksidaz) ve ahşabın içerdiği ligninin parçalanmasını katalizleyen oksido-redüktazlar (lakkazlar) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Esteve-Nuñez ve ark., 2001; Claus, 2014). Ligninolitik sistem nonspesifik bir sistemdir ve nitroaromatik bileşiklerde dahil olmak üzere birçok sentetik kimyasalların biyodegradasyonunda görev almaktadır (Spain, 1995). TNT'nin nitro gruplarının indirgenmesi sonucu 4-ADNT ve 2-ADNT eldesi ile funguslarda TNT'nin metabolizasyonu başlamaktadır. Daha sonra, formillenmiş ve asetillenmiş ürünlerin eldesi için çeşitli açılma reaksiyonları meydana gelebilmektedir. Bu formillenmiş ürünlerden biri, 2-amino-4-formamido-6-nitrotoluen lignin peroksidaz için substrat olarak tanımlanmıştır. Oluşan diğer ürünler de ligninolitik koşullar altında parçalanmakta ve mineralizasyon gerçekleşmektedir (Claus, 2014). Lignin peroksidaz negatif mantar *Nematoloma frowardii* için gösterildiği gibi Mangan-bağımlı peroksidazlar 4-ADNT'yi doğrudan mineralize edebilmektedir (Scheibner ve ark., 1997a). Buna ek olarak, intrasellüler sitokrom P-450 bağımlı enzim sistemi *Bjerkandera adusta* türünde TNT'nin mineralizasyonunda görev almaktadır (Eilers ve ark., 1999; Claus, 2014). Mantarlar tarafından TNT biyodegradasyon mekanizması Şekil 6.'da gösterilmekte ve TNT'yi degrade edebilme kapasitesine sahip mantar türleri Tablo 4'te verilmiştir.

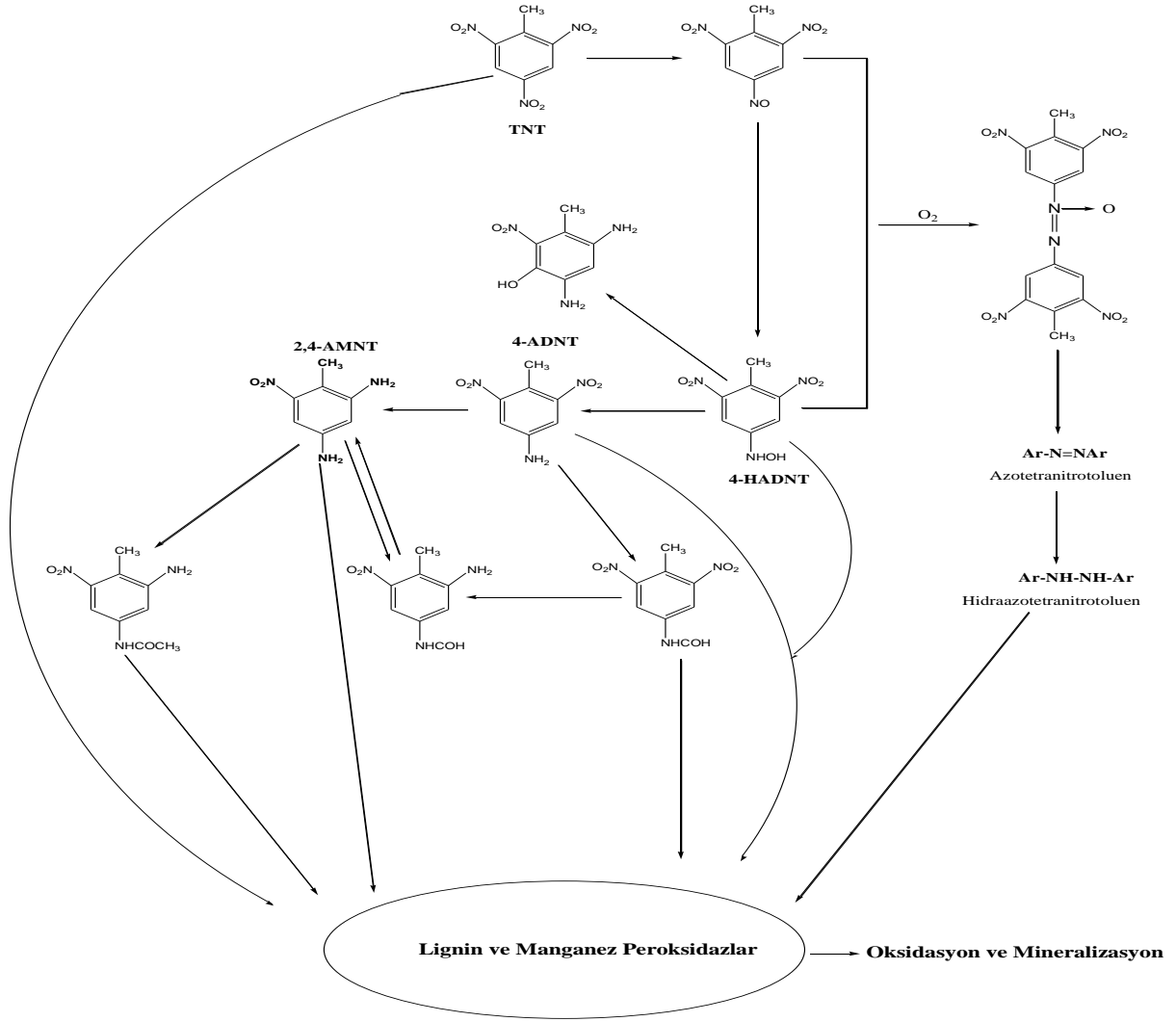
Mantarlarla yapılan bir TNT degradasyon çalışmasında 32 farklı ekolojik ve taksonomik cinse ait 91 mantar suşunun TNT'yi metabolize ve mineralize etme kabiliyetleri incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm mantar suşları TNT'yi hızlı bir şekilde ADNT'ye metabolize etmiştir. Mikroskobik mantarlar şapkacı ahşap ve çürükçül mantarlara göre daha fazla ADNT üretmektedirler. En aktif mantar suşları *Clitocybula duseii* Tmb12 ve *Stropharia rugosa-annulata* DSM11372 ile yapılan degradasyon çalışmalarında 64 günlük inkübasyon sonunda TNT'nin yapısında ki radyoaktif karbonun sıralı ile % 42'si ve % 36'sı CO<sub>2</sub>'de olduğu belirlenmiştir (Scheibner ve ark., 1997b; Claus, 2014).

Fernando ve ark. (1990) beyaz çürükçül mantar *Phanerochaete chrysosporium* ile TNT'nin degradasyonunu incelemiştir. 1,3 mg/L başlangıç TNT konsantrasyonunda TNT'nin yapısında bulunan radyoaktif işaretli karbon atomunun 18 gün inkübasyon süresi sonunda % 35,4 ± 3,6'sının CO<sub>2</sub>'de olduğu belirlenmiştir. *Phanerochaete chrysosporium* mantar türü ile TNT'nin degradasyonunu hem toprak hem de sıvı kültürde araştırılmıştır. Toprak ve sıvı kültürlerde çevrede karşılaşılabilecek TNT konsantrasyonlarında (toprak için 10,000 mg/kg, su için 100 mg/L), 90 günlük inkübasyon süresi sonunda toprak ve sıvı kültürde TNT'nin CO<sub>2</sub>'ye mineralizasyon oranı sırası ile % 18,4 ± 2,9 ve % 19,6 ± 3,5 olduğu görülmüştür. 90 günlük inkübasyon sonunda sıvı kültür için 100 mg/L ve toprak kültüründe 10,000 mg/kg TNT konsantrasyonunda TNT'nin yaklaşık % 85'inin degrade edildiği belirlenmiştir.

### 4. TNT'nin Biyoremediasyonu

Tehlikeli maddeleri, zararsız (su ve karbondioksit) veya daha az zararlı maddelere parçalamak için canlı organizmaların daha çok mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Toksik etkileri önlemek ve çevre kirliticilerini parçalamak için mikroorganizmaların kullanımına dayanan biyoremediasyon, çevre kirliliğinin yok edilmesinde ve önlenmesinde etkili ve çevre dostu bir biyoteknolojik yaklaşım olarak günümüzde önem kazanmaktadır (Dindar ve ark., 2010). Biyoremediasyon proseslerinin avantajları düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve doğal yollarla gerçekleştiği için kamu tarafından yüksek kabul gören bir yöntem olmasıdır (Rodgers ve Bunce, 2001; Dindar ve ark., 2010).

TNT ile kirlenmiş bölgelerin ıslahı için çeşitli biyolojik temelli teknolojiler geliştirilmiştir, bu teknolojiler arasında en yaygın kullanılan metotlar kompostlama, biyoreaktörler, arazi düzenleme ve fitoremediasyon yöntemleridir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Her yaklaşımın avantajları ve dezavantajları vardır ve ana uygulamaları aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 6. Mantarlarda TNT'nin biyodegradasyon mekanizması (Esteve-Nuñez ve ark., (2001)'den değiştirilerek)

Tablo 4. TNT'yi parçalayabilen mantar türleri

Mantar Türü	Referans
<i>Absidia</i> sp.	Kalderis ve ark., 2011
<i>Acremonium</i> sp.	Kalderis ve ark., 2011
<i>Agaricus aestivalis</i> TMAest1	Kalderis ve ark., 2011
<i>Agrocybe praecox</i> TM70.84,	Kalderis ve ark., 2011
<i>Aspergillus terreus</i> MWi458,	Kalderis ve ark., 2011
<i>Bjerkandera adjusta</i> DSM 3375,	Kalderis ve ark., 2011
<i>Ceratocystis coeruleascens</i>	Kalderis ve ark., 2011
<i>Cladosporium resiniae</i>	Bayman ve Radkar, 1997
<i>Clitocybula dusenii</i>	Bayman ve Radkar, 1997
<i>Coprinus comatus</i> TM6	Kalderis ve ark., 2011
<i>Cunninghamella elegans</i> DSM1980	Kalderis ve ark., 2011
<i>Cyathus stercoreus</i> 36910	Kalderis ve ark., 2011
<i>Nematoloma frowardii</i>	Scheibner ve ark., 1997b
<i>Neurospora crassa</i> TM	Kalderis ve ark., 2011
<i>Paxillus involutus</i> TM2	Kalderis ve ark., 2011
<i>Penicillium frequentans</i> ATCC 96048	Kalderis ve ark., 2011
<i>P. chrysosporium</i>	Fernando ve ark., 1990
<i>P. sordida</i>	Kalderis ve ark., 2011
<i>Phlebia radiate</i>	Van Aken ve ark., 1997
<i>Rhizoctonia solani</i> Mwi5	Kalderis ve ark., 2011
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Scheibner ve ark., 1997b
<i>Trametes modesta</i>	Kalderis ve ark., 2011
<i>Trichoderma</i> sp.	Kalderis ve ark., 2011



#### 4.1. Kompostlama

Kompostlama, patlayıcılarla kirlenmiş askeri alanların arıtımı için kullanılan, test edilmiş ve uygulanmış ilk biyoteknolojik arıtım işlemidir (Özcan ve Türkdoğan, 2014). Kompostlama patlayıcılarla kirlenmiş toprağın arıtılmasında uygulanabilir bir teknoloji olarak kabul edilmektedir. Bu zamanda kadar yapılan araştırmalar TNT'nin kirlenmiş topraktan uzaklaştırılabilir olduğunu göstermiştir (Williams ve ark., 1992; Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Kompostlama işleminde, kirleticilerden arındırılmak istenen toprak kalınlaştırıcı ajanlarla (hacim artırıcı maddeler) ve saman, yonca, talaş gibi tarımsal proseslerin yan ürünleri ile karıştırılır. Windrow (gübrelerin sıra sıra yığılması) ve anaerobik-aerobik kompostlama sistemleri TNT ile kirlenmiş toprakların arıtılması için son derece verimli yöntemlerdir (Bruns-Nagel ve ark., 2000). Bu koşullar altında, anaerobik fazda TNT, amino ve diaminonitrotoluenlere indirgenir ve daha sonra havalandırma fazında birçok transformasyon ürünü muhtemelen kovalent bağlarla toprağa bağlanarak ortadan kaldırılmış olur (Bruns-Nagel ve ark., 1998). İnsan monositleri üzerinde bu bileşiklerin toksik etki testlerinde, biyoremediasyon ile arıtılan toprakların atık suyu ile nitroaromatik bileşikler içeremeyen kompost arasında benzer bir etki bulunmuştur (Bruns-Nagel ve ark., 1999). Tan ve ark. (1992) TNT ile kirlenmiş toprakların kompostlama işleminden sonra mutajenik etkisinin belirgin bir şekilde azaldığını rapor etmiş ve bu sonuç Jarvis ve ark. (1998) tarafından da teyit edilmiştir. Kompostlama tekniğinin başlıca dezavantajları ise uzun inkübasyon süresi, sistemin kurulum ve sürdürülmesi maliyeti ve degradasyon sürecine dahil olan mikroorganizmalar konusunda bilgi eksikliğidir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

TNT'nin degradasyonu için bakterilerin kapasitesini artırmak amacıyla, Muter ve ark. (2012) inorganik tuzlardan, bitki özlerinden ve melastan oluşan besinleri değişen konsantrasyonlarda toprak ve sıvı ortam ile karıştırmıştır. TNT ile kirlenmiş topraktan izole edilen ve TNT'yi parçalama yeteneği gösteren bakterilerin konsorsiyumu kirleticilerden arındırılmak istenen toprağı inokule etmek için kullanılmıştır. Konsorsiyumda filogenetik olarak yedi farklı cinse ait bakteri vardır ve bu bakteri cinsleri; *Klebsiella*, *Raoultella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Achromobacter* ve *Pseudomonas*'tır. Konsorsiyumun besinlerle birlikte sıvı ortama eklenmesi ve 14 gün inkübasyon süresinin ardından, başlangıçta toprakta bulunan TNT ve TNT'nin degradasyon ürünlerinin miktarı % 90'a kadar azalmıştır. Toplam TNT miktarı 100 mg/L'den az olduğunda, TNT konsantrasyonu bakteriler tarafından kullanılan şekerin miktarını etkilememektedir.

#### 4.2. Biyoreaktörler

Biyoreaktörler de sulu faz işlemi, kontamine olmuş toprak, su ve besin kaynakları ile doldurulmuş özel biyoreaktörlerden oluşmaktadır. Bu sistemler mekanik karıştırma ile ya da havalandırma ile besinlerin ve elektron alıcıların kütle transferini optimize etmek için tasarlanmıştır (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Doğada uzun süre parçalanmadan kalabilen ve toksik kirleticilerle kontamine olmuş toprakların biyoremediasyon ile ıslahında etkili yöntem çevre şartlarının kontrol edilebildiği biyoreaktör yöntemidir (Dindar ve ark., 2010). Bu yöntemde kirleticilerin parçalanmasında mikroorganizmaların aktivitelerini devam ettirmek ve optimum koşulları sağlamak için sıcaklık, pH, besin kaynaklarının ve oksijenin konsantrasyonu kontrol edilmektedir (Haselhorst, 1999; Özcan ve Türkdoğan, 2014). Bu teknoloji ile yapılan tüm çalışmalar oksijen varlığında yer alan polimerizasyon reaksiyonlarını önlemek için anaerobik inkübasyon şartlarında

yapılır ama bazen ek bir aerobik arıtma gerekebilir. TNT'nin oksijensiz ortamda metabolizasyonu için nişasta, glikoz, melas gibi ek karbon kaynağı gerekmektedir. Bu karbon kaynakları aerobik mikroorganizmaların büyümesi sağlayarak ortamda var olan oksijenin tükenmesini ve TNT'nin nitro gruplarının indirgenmesi için ortama elektron sağlamaktadır. Biyoreaktörlerle TNT'nin biyoremediasyonu için iki farklı yaklaşım vardır. Bunlar; ana hedef olarak mikroorganizmalar tarafından patlayıcının mineralizasyonu ve TNT metabolitlerinin geri dönüşümsüz olarak toprak matrisine bağlanmasıdır (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

Biyoreaktör yöntemi Joliet Askeri Mühimmat Fabrikasında (Illinois, Amerika) patlayıcılarla kirlenmiş bölgenin arıtılmasında test edilmiştir. Aerobik ve anaerobik koşullar arasında değişen döngülü biyoreaktör kullanılmış ve TNT ve ilgili kirleticilerin % 99 oranında parçalanması sağlanmıştır. Kullanılan iki fazlı aerobik/anaerobik arıtma sistemi ile TNT CO<sub>2</sub>'ye, basit organik asitlere ve karbon parçacıklarına yıkılmıştır (Haselhorst, 1999).

Biyoreaktör teknolojisi aynı zamanda ksenobiyotik bileşiklerin toprak matrislerine geri dönüşümsüz olarak bağlanmasını artırmak amacı ile de kullanılmaktadır. Biyolojik kaynaklı TNT'nin immobilizasyon yöntemini teknik bir ölçekte test etmek için sükröz ve amonyum klorür ilaveli 10 m<sup>3</sup> su ve 18 m<sup>3</sup> TNT ile kirlenmiş toprak ( 314 mg TNT/g toprak) Terranox reaktörü içerisinde karıştırılmıştır. Bu yöntemle 30 hafta içerisinde toprakta başlangıçtaki TNT, RDX ve DNT'nin % 98'inin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Arıtılan toprağın çeşitli kimyasallarla ekstraksiyonlarında TNT ve metabolitlerine rastlanmamıştır (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

#### 4.3. Arazi Düzenleme

Arazi iyileştirilmesi olarak bilinen ve mikrobiyal parçalama ile toprakta bulunan kirleticilerin azalmasını sağlayan bir toprak arıtım prosesidir (Clark ve Boopathy, 2007; Dindar ve ark., 2010). Arazi düzenleme yöntemi katı-faz arıtma yöntemi olup bu proseste kirlenmiş toprak besin ve nem ile karıştırılır ve toprak karışımının havalanmasını artırmak için toprak karışımı periyodik olarak döndürülür (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Bu yöntemde çoğunlukla kirleticilere maruz kalmış toprak yerinden kazılır ve başka bir alana ince tabaka halinde yayılır. İnce tabaka halinde yayılmış toprağa besin ve nem ilavesiyle ve periyodik olarak toprağın havalandırılması ile toprakta bulunan aerobik mikroorganizmaların gelişimi teşvik edilir. Mikrobiyal aktivitenin artması ile toprakta bulunan kirleticiler mikroorganizmalar tarafından parçalanır ve topraktan uzaklaştırılır (Dindar ve ark., 2010). Mikroorganizmaların degradasyon kabiliyetlerini devam ettirmek ve gelişimlerini artırmak için gerek duyulursa toprağa belirli aralıklarla besin ilavesi yapılmaktadır (Widrig ve ark., 1997; Dindar ve ark., 2010).

Widrig ve ark. (1992) TNT ile kirlenmiş toprakların arazi düzenleme yöntemi ile biyoremediasyonunu incelemiştir. Bu çalışmada mikrobiyal aktiviteyi artırmak amacıyla toprağın özelliklerinin geliştirilmesi için substrat olarak melas ve parçalanmış çim kullanılmıştır. TNT'nin degradasyonu, radyoaktif olarak işaretlenmiş <sup>14</sup>C içeren TNT'nin mineralizasyonu ve hücre biyokütlesinde <sup>14</sup>C bulunması ile gösterilmiştir. Laboratuvar ölçekli bu çalışmanın sonuçları prosesinin büyük ölçekli uygulamalara aktarılması için umut vericidir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

#### 4.4. Fitoremediasyon

Kirlenmiş toprak ve suların arıtılmasında yeşil bitkilerin kullanıldığı yöntem fitoremediasyon olarak bilinmektedir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001). Bu yöntem düşük maliyetli olması, yüksek konsantrasyonlarda bile etkili olması ve uygulamasının kolay olmasından dolayı oldukça avantajlıdır (Rodgers ve Bunce, 2001). Fitoremediasyon prosesi sırasında, bitkiler, hücre duvarları ve kofulları vasıtasıyla TNT'yi bünyesine alarak parçalar ve stabilize ederler. TNT'nin bitkiler sayesinde stabilize olmasıyla, yer altı sularını TNT kontaminasyonuna maruz kalma ihtimali azalır. Fitoremediasyonun avantajlarından biri, TNT'nin hızlı bozunması ve hidroksitoluenlerin bitki maddesine kolayca tutunabilmesidir. Bu durum, bitkileri, yüksek TNT konsantrasyonuna toleransı hale getirmekte ve böylece bitkilerin TNT ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde potansiyel biyoremediasyon ajanı olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Lewis ve ark., 2004). İkinci avantajı ise, özel ekipman gereksiniminin ve ortama yeni kimyasal girişinin olmamasıdır (Panz ve Miksch, 2012; Özcan ve Türkdoğan, 2014).

Kontamine olmuş toprakların fitoremediasyonu için TNT'yi mono/dinitrotoluen ve diaminonitrotoluen metabolitlerine dönüştürme yeteneğine sahip *Pseudomonas* bakteri türü ile bitki-bakteri kombinasyonları geliştirilmektedir. *Bromus erectus* bitkisinin bu bakteri ile inkübasyonu ile nitroaromatik metabolizasyonunda rol alan kök yüzeyi ve kök yüzeyini çevreleyen bölgede artış ve toprakta bulunan TNT miktarında azalış görülmüştür (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

Fitoremediasyon yöntemi için TNT'nin mikrobiyal degradasyonunu sağlayan enzimleri ifade eden transgenik bitkilerde geliştirilmiştir. *Enterobacter cloacae* bakteri türünden pentaeritrol tetranitrat redüktaz enziminin klonlandığı transgenik tütün bitkilerinin yaprak ve kök dokularında redüktaz enziminin ekspresyonu görülmüştür. Patlayıcıları parçalayabilen enzimleri ifade edebilen transgenik bitkiler çimlenmeye ve gelişmeye devam etmekte ve transgenik olmayan bitkilerin gelişimini engelleyici patlayıcı konsantrasyonlarında büyüyebilmektedir (Esteve-Nuñez ve ark., 2001).

Das ve ark. (2010) vetiver (buğdaygiller familyasından bir bitki türü) bitkisi ile 40 mg/kg başlangıç TNT konsantrasyonuna sahip topraktan 3 gün içerisinde başlangıçtaki TNT'nin % 97'sini uzaklaştırmayı başarmışlardır. Toprakta bulunan TNT konsantrasyonu 80 mg/kg olduğunda ise, 3 gün içerisinde başlangıçtaki TNT'nin % 39'unun, 12 gün içerisindeyse % 88'inin uzaklaştırıldığı görülmüştür. Ayrıca çalışmada, 40 mg/kg TNT konsantrasyonlarında büyüyen bitkilerde kontrol gruplarına göre morfolojik değişimler gözlemlenmezken, 80 mg/kg TNT konsantrasyonlarında yetişen bitkilerin inkübasyondan yedi gün sonra yapraklarında sararmalar gözlemlenmiştir. Toprağa % 0,1 oranında üre eklenmesinin bitkiler tarafından TNT'nin metabolizasyonunu artırdığı, bu artışın özellikle yüksek TNT konsantrasyonlarında dikkate değer olduğu belirlenmiştir. 80 mg/kg konsantrasyonunda TNT içeren toprağa üre eklenmesi ile 3 gün içerisinde TNT degradasyon oranı % 39'dan % 84'e çıkmıştır.

You ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Enterobacter cloacae* bakteri türüne ait NAD(P)H-flavin nitroredüktaz enzimin aktarıldığı *Arabidopsis* (fare kulağı teresi) transgenik bitkiler ile TNT'nin fitoremediasyonu araştırılmıştır. *Enterobacter cloacae* bakteri türüne ait nitroredüktaz geni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılıp, pCAMBIA-1301 vektörüne klonlanmıştır. Oluşturulan vektör *Arabidopsis* bitkilerine *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi kullanılarak aktarılmıştır. Toplamda 20 tane transgenik bitki elde edilmiştir.

Elde edilen transgenik bitkiler ile yabancı tip bitkiler toprakta ya da yarı-kuvvetli MS agar plakaları üzerinde aynı fenotip özellikler göstermiştir, buda EcNFSAS geninin yerleştirilmesiyle bitkilerde morfolojik değişimlerin olmadığını göstermektedir. Transgenik bitkiler ve vahşi tip bitkiler çeşitli TNT konsantrasyonlarında (0,025, 0,050 ve 0,075) büyütülmüş ve vahşi tip bitkilerin transgenik bitkilere göre köklerinin daha kısa oldukları gözlemlenmiştir. TNT'li ortamda, bütün transgenik bitkiler vahşi tip bitkilere göre farklı olmasına karşın transgenik bitkiler arasında farklılıklar gözlemlenmemiştir. Yabancı tip ve transgenik bitkilerin toplam klorofil içeriğinin TNT konsantrasyonu arttıkça azaldığı belirlenmiştir. 0,025, 0,050 ve 0,075 TNT konsantrasyonlarında iki hafta boyunca büyütülen bitkiler TNT absorpsiyon çalışmaları için 0,05, 0,10 ve 0,15 mM TNT konsantrasyonlarına sahip ortama aktarılmıştır. Yapılan TNT absorpsiyon çalışmalarında, transgenik bitkilerin sıvı medyumda yabancı bitkiler ile karşılaştırıldığında TNT absorpsiyon oranlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Transgenik bitkiler 0,05, 0,10 ve 0,15 mM TNT konsantrasyonlarında sırası ile 96, 120 ve 144 saatte tüm TNT'yi absorbe etmiştir. Bu çalışmada nitroredüktaz enzimin aktarılması ile elde edilen *Arabidopsis* bitkilerin TNT'yi tolere etme, absorplama ve detoksifiye etme yeteneklerinde yabancı bitkiler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artış gözlemlenmiştir.

Fitoremediasyon, diğer biyoremediasyon yöntemleri gibi, ön görülemeyen iklim koşullarından etkilenmektedir ve degradasyon oranlarını tahmin etmek zordur. Buna karşın, fitoremediasyon fiziksel koşullara ve değişimlere karşı mikrobiyal reaktörlere göre daha dayanıklıdır. Kirleticileri daha verimli bünyesine katabilen bitki suşlarının eldesi ve bitkilerin kirleticilerden kaynaklanan olumsuz koşullar altında büyüme kabiliyetlerini arttırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (Rodgers ve Bunce, 2001).

#### 5. Sonuç

TNT potansiyel bir kanserojendir, insan dahil tüm organizmalar için toksiktir ve toprağın organik materyallerine sıkıca bağlanmakla birlikte biyolojik bozunmaya karşı dirençli bir kimyasaldır (Khan ve ark., 2013). TNT ile kirlenmiş alanların sorunu TNT'nin ekosistem ve canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileridir. İnsanlar TNT ile kirlenmiş sudan direkt olarak ya da kirlenmiş toprakta yetiştirilen veya kirlili su ile sulaması yapılan bitkilerin yenmesi yoluyla dolaylı olarak TNT'ye maruz kalabilmektedir. TNT'nin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin yanı sıra TNT ile kirlenmiş bölgelerde toprağın tarım için kullanımını ya da toprağın biyolojik çeşitliliği gibi belirli işlevleri TNT kirliliğinden etkilenmektedir. Ayrıca, TNT ile kirlenmiş bölgelerin kontrol edilmesi önemlidir çünkü bu bölgelerde TNT yayılarak su yüzeyine ya da yer altı sularına ulaşabilmektedir. Bu nedenle, TNT ile kontamine olmuş bölgelerin remediasyonu oldukça önemlidir. Termal oksidasyon veya torağın yakılması gibi kontamine olmuş alanların arıtılmasında kullanılan geleneksel yöntemler son derece pahalı ve tahrip edicidir. Ayrıca bu yöntemlerde büyük miktarlarda CO<sub>2</sub> ve NO<sub>x</sub> dahil istenmeyen sera gazları açığa çıkmaktadır.

TNT doğada uzun süre bozunmadan kalmasına karşın çeşitli mikroorganizmalar (bakteriler ve mantarlar) tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, TNT'yi metabolize edebilen mikroorganizmaların kullanıldığı biyoremediasyon yöntemleri uygulanabilir, düşük maliyetli ve çevre dostu bir yaklaşım olarak görülmektedir. TNT'nin biyoremediasyon yöntemleri uygulanacak alanın özelliklerine göre değişmektedir. Kompostlama düşük TNT konsantrasyonu olan ve bütün degradasyon ürünlerinin uzaklaştırılmasının gerekli

olmadığı bölgelerde uygundur. Biyoreaktörler kirleticilerin uzaklaştırılmasında hızlı bir yöntemdir ve yeraltı sularına kirleticilerin ulaşmasını minimize etme avantajına sahiptir. Kompostlama ve fitoremediasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, biyoreaktörlerde biyodegradasyon oranları daha hızlıdır (Rezaei ve ark., 2010), remediasyon süresi daha kısadır ve daha yüksek oranlarda kirletici olan bölgelerin remediasyonu için biyoreaktörlerde arıtım prosesi daha uygundur. Ancak kompostlama ve diğer yöntemlere göre biyoreaktörlerde arıtım prosesi daha fazla emek isteyen pahalı bir işlemdir (Kalderis ve ark., 2011). Fitoremediasyon yaygın olarak kullanılmamasına karşın düşük TNT konsantrasyonu olan bölgelerde büyük bir strateji olma potansiyeline sahiptir (Kalderis ve ark., 2011). Bitki türlerinin çoğu toprakta 0,05-0,1 g/kg aralığında TNT konsantrasyonlarına tolerans göstermektedir (Mulla ve ark., 2014). Bitkilere toksik olabilecek seviyede kirletici seviyelerin olmadığı ve kompostlama ya da biyoreaktör yöntemiyle arıtılan bölgelerin yeniden temizlenmesinde fitoremediasyon yöntemi oldukça uygun bir yöntemdir (Haselhorst, 1999).

Bütün biyoremediasyon yöntemleri öngörülemez iklim koşullarından etkilenmektedir ve bu yöntemlerin soğuk iklimlerde (kış aylarında) uygulanabilirliği azalmaktadır. Bütün bunlara karşın biyolojik prosesler daha düşük maliyetli olma ve biyolojik yollarla gerçekleştiği için kamu tarafından yüksek kabul görme avantajlarına sahiptir.

## Kaynaklar

- Anonim, Trinitrotoluene, University of Torino, [http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2008\\_Esplosivi/TNT.html](http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2008_Esplosivi/TNT.html) (Erişim Tarihi: 12.10.2015).
- ATSDR. 1995. U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 2,4,6-trinitrotoluene. Georgia, 1-208.
- Ayoub, K., Hullebusch, E.D., Cassir, M., Bermond, A. 2010. Application of advanced oxidation processes for TNT removal: A review. *Journal of Hazardous Materials* 178, 10-28. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.042.
- Bae, B., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S. 1995. Aerobic biotransformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. 231-238. In R. E. Hinchee, R. E. Hoepfel, and D. B. Anderson (ed.), *Bioremediation of recalcitrant organics*. Battelle Press, Columbus, Ohio.
- Bayman, P., Radkar G.V. 1997. Transformation and Tolerance of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39, 45-53.
- Boopathy, R., Kulpa, C.F. 1992. Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio sp.* (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Current Microbiology* 25, 235-241.
- Boopathy, R., Kulpa, C.F. 1994. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus sp.* (strain B) isolated from a lake sediment. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 273-278.
- Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Steinbach, K., Schmidt, C., von Löw, E., Gorontzy, T., Blotevogel, K.H., Gemsa, D. 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environmental Science & Technology* 32, 1676-1679.
- Bruns-Nagel, D., Scheffer, S., Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Löw, E., Gemsa, D. 1999. Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes. *Environmental Science & Technology* 33, 2566-2570.
- Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Gemsa, D., von Löw, E. 2000. Composting (humification) of nitroaromatic compounds. 357-393. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Ed: by J. Spain, J.B. Hughes, and H.-J. Knackmuss. Publishers, Boca Raton, Fla
- Bumpus, J.A., Tatarko, M. 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. *Current Microbiology* 28, 185-190.
- Chien, C.-C., Kao, C.-M., Chen, D.-Y., Chen, S.C., Chen, C.-C. 2014. Biotransformation of Trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas* spp. Isolated from a TNT-contaminated Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (5), 1059-1063.
- Clark, B., Boopathy, R. 2007. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials* 143, 643-648.
- Claus, H. 2014. Microbial Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene In Vitro and in Natural Environments. 15-38. In *the Biological remediation of explosive residues*. Ed: S.N. Singh. *Environmental Science and Engineering*, Springer International Publishing Switzerland, doi: 10.1007/978-3-319-01083-0\_2.
- Claus, H., Bausinger, T., Lehmler, I., Perret, N., Fels, G., Dehner, U., König, H. 2007. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation* 18, 27-35.
- Das, P., Datta, R., Makris, K.C., Sarkar, D. 2010. Vetiver grass is capable of removing TNT from soil in the presence of urea. *Environmental Pollution* 158, 1980-1983.
- Dindar, E., Topaç Şağban, F.O., Başkaya, H. 2010. Kirilenmiş Toprakların Biyoremediasyon İle Islahı. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi* 15(2), 123-137.
- Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel, K.H., Gemsa, D. 1998. Mass balance studies with <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species. *Current Microbiology* 37, 380-386.
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F., Ramos, J.L. 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology* 175, 2278-2283.
- Ederer, M.M., Lewis, T.A., Crawford, R.L. 1997. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridia* isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18, 82-88.
- Eilers, A., Rüngeling, E., Stündl, U.M., Gottschalk, G. 1999. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P450. *Applied Microbiology Biotechnology* 53, 75-80.
- Esteve-Nuñez, A., Caballero, A., Ramos, J.L. 2001. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 335-352. doi: [10.1128/MMBR.65.3.335-352.2001](https://doi.org/10.1128/MMBR.65.3.335-352.2001)
- Esteve-Nuñez, A., Lucchesi, G., Philipp, B., Schink, B., Ramos, J.L. 2000. Respiration of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11. *Journal of Bacteriology* 182, 1352-1355.
- Esteve-Nuñez, A., Ramos, J.L. 1998. Metabolism of 2,4,6-Trinitroroluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *Environmental Science & Technology* 32, 3802-3808.
- Fernando, T., Bumpus, J.A., Aust, S.D. 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6 trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* 56, 1666-1671.



- Fiorella, P.D., Spain, J.C. 1997. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. Applied Environmental Microbiology 63, 2007-2015.
- French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. Applied Environmental Microbiology 64, 2864-2868.
- Gallagher, E.M. 2010. Anaerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): molecular analysis of active degraders and metabolic pathway. The State University of New Jersey, PhD Thesis, 115s, New Jersey.
- Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.M., Liang, H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. Critical Reviews in Biotechnology 30, 70-77.
- Gümüşçü, B., Tekinay, T. 2013. Effective biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene using a novel bacterial strain isolated from TNT-contaminated soil. International Biodeterioration&Biodegradation 85, 35-41.
- Haselhorst, L. 1999. Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) at munitions sites. Restoration And Reclamation Review 4 (7), 1-9.
- Hughes, J.B., Wang, C., Yesland, K., Bhadra, R., Richardson, A., Bennet, G., Rudolph, F. 1998. Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 343-348.
- Jarvis, A.S., McFarland, V.A., Honeycutt, M.E. 1998. Assesment of the effectiveness of composting for the reduction of toxicity and mutagenicity of explosives-contaminated soil. Ecotoxicology and Environmental Safety 39, 131-135.
- Ju, K.S., Parales, R.E. 2010. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74 (2), 250-272.
- Kalafut, T., Wales, M.E, Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K., Wild, J.R. 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. Current Microbiology. 36, 45-54.
- Kalderis, D., Juhasz, A.L., Boopathy, R., Comfort, S. 2011. Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of the-art remediation processes (IUPAC Technical Report)\*. Pure and Applied Chemistry 83 (7), 1407-1484.
- Khan, M.I., Lee, J., Park, J. 2013. A Toxicological Review on Potential Microbial Degradation Intermediates of 2,4,6-Trinitrotoluene, and Its Implications in Bioremediation. KSCE Journal of Civil Engineering 17 (6), 1223-1231.
- Kim, H.Y., Bennett, G., Song, H.G. 2002. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Klebsiella* sp. isolated from activated sludge. Biotechnology Letter 24, 2023-2028.
- Lewis, T.A., Ederer, M.M., Crawford, R.L., Crawford, D.L. 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 18, 89-96.
- Lewis, T.A., Newcombe, D.A., Crawford, R.L. 2004. Bioremediation of soils contaminated with explosives. Journal of Environmental Management 70, 291-307.
- Lin, H., Yu, C., Chen, Z. 2013. Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoide*. Ecological Engineering 52, 270-277.
- Maeda, T., Kadokami, K., Ogawa, H.I. 2006. Characterization of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)-Metabolizing Bacteria Isolated from TNT-Polluted Soils in the Yamada Green Zone, Kitakyushu, Japan. Journal of Environmental Biotechnology 6, 33-39.
- Maeda, T., Nakamura, R., Kadokami, K., Ogawa, H.I. 2007. Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 26, 237-241.
- Martin, J.L., Comfort, S.D., Shea, P.J., Kokjohn, T. A., Drijber, R.A. 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. Canadian Journal of Microbiology 43, 447-455.
- McCormick, N.G., Feeherry, F.E., Levinson, H.S. 1976. Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds. Applied Environmental Microbiology 31, 949-958.
- Mercimek, H.A. 2011. 2,4,6-trinitrotoluen'in Mikrobiyal Biyodegradasyonu. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, 158s, Adana.
- Mercimek, H.A., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., Matyar, F. 2013. Aerobic biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* isolated from contaminated soil. Microbial Ecology 66, 512-521.
- Mercimek, H.A., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., Matyar, F., Arkut, A., Kayis, F., Sumengen Ozdefne, M. 2015. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites. Brazilian Journal of Microbiology 46, 104-111.
- Montpas, S., Samson, J., Langlois, E., Lei, J., Piche, Y., Chevenert, R. 1997. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. Biotechnology Letters 19, 291-294.
- Mulla, S.I., Talwar, M.P., Ninnekar, H.Z. 2014. Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene Explosive Residues. 201-233. In the Biological remediation of explosive residues. Ed: S.N. Singh. Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland, doi: 10.1007/978-3-319-01083-0\_2.
- Muter, O., Potapova, K., Limane, B., Sproge, K., Jakobsone, I., Cepurnieks Bartkevics, V. 2012. The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. Journal of Environmental Management 98, 51-55.
- Naumova, R.P., Selivanovskaya, S.L.U., Mingatina, F.A. 1988. Possibilities for the deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. Mikrobiologia 57, 218-222.
- Nyanhongoa, G.S., Aicherniga, N., Ortnera, M., Steinerb, W., Guebitza, G.M. 2009. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. Journal of Hazardous Materials 165, 285-290.
- Oh, B.T., Sarah, G., Shea, P.J., Drijber, R.A., Comfort, S.D. 2000. Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a *Pseudomonas* enzyme assay. Journal of Microbiological Methods 42, 149-158.
- Oh, K.H., Kim, Y.J. 1998. Degradation of Explosive 2,4,6-Trinitroroluene by s-Triazine Degrading Bacterium Isolated from Contaminated Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61, 702-708.
- Özcan, G., Türkdoğan, F.İ. 2014. Askeri Alanlardaki Kirliliklerin Gideriminde Biyoremediasyon Teknikleri. KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17, 31-36.
- Pak, J.W., Knoke, K.L., Noguera, D.R., Fox, B.G., Chambliss, G.H. 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl. Environmental Microbiology 66, 4742-4750.
- Panz, K., Miksch, K. 2012. Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. Journal of Environmental Management 113, 85-92.
- Park, C., Kim, T.H., Kim, S. 2003b. Optimization of biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by

- Pseudomonas putida*. Journal of Bioscience and Biengineering 95, 567-571.
- Park, C., Kim, T-H., Kim, S., Lee, J., Kim, S-W. 2002. Biokinetic Parameter Estimation for Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) with *Pseudomonas putida* KP-T201. Journal of Bioscience and Biengineering 94, 57-61.
- Preuss, A., Fimpel, J., Dickert, G. 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Archives of Microbiology 159, 345-353.
- Qasim, M.M., Moore, B., Taylor, L., Honea, P., Gorb, L., Leszczynski, J. 2007. Structural Characteristics and Reactivity Relationships of Nitroaromatic and Nitramine Explosives – A Review of Our Computational Chemistry and Spectroscopic Research, International Journal of Molecular Sciences 8, 1234-1264.
- Rahal, A.Gh., Moussa, L.A. 2011. Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5(2), 8-17.
- Rezaei, M.R., Abdoli, M.A., Karbassi, A., Baghvand, A., Khalilzadeh, R. 2010. Bioremediation of TNT Contaminated Soil by Composting with Municipal Solid Wastes Soil and Sediment Contamination 19, 504–514.
- Rodgers, J.D., Bunce, N.J. 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. Water Research 35, 2101-11.
- Rylott, E.L., Bruce, N.C. 2009. Plants disarm soil: engineering plants for the phytoremediation of explosives. Trends in Biotechnology 27, 73-81.
- Sangwan, P, Mary Celin, S., Hooda, L. 2015. Response Surface Methodological Approach for Optimizing Process Variables for Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene using *Acinetobacter Noscomialis*. European Journal of Advances in Engineering and Technology 2(4), 51-56.
- Schackmann, A., Müller, R. 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 34, 809-813.
- Scheibner, K., Hofrichter, M., Fritsche, W. 1997a. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Biotechnology Letters 19, 835-839.
- Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., Fritsche, W. 1997b. Screening for fungi intensely mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Microbiology and Biotechnology 47, 452-457.
- Shim, C.Y., Crawford, D.L. 1995. Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by a strain of *Clostridium bifermentan*. 57-69. In R. E. Hinchee, J. Fredrickson, and B. C. Alleman (ed.), Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus, Ohio.
- Spain, J. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annual Review of Microbiology 49, 523-555.
- Tan, E.L., Ho, C.H., Griest, W.H., Tyndall, R.L. 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. Journal of Toxicology and Environmental Health 36, 165-175.
- Üzer, A. 2004. Bazı Nitrofenollerin Temel ve Türev Spektrofotometrik Analizi. İstanbul Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 77s, İstanbul.
- Van Aken, B., Skubusz, K., Naveau, H., Agathos, S.N. 1997. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. Biotechnology Letters 19, 813-817.
- Vanderberg, L.A., Perry, J.J., Unkefer, P.J. 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. Applied Microbiology and Biotechnology 43, 937-945.
- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Knackmuss, H.J. 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. Journal of Bacteriology 176, 932-934.
- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J.C., Knackmuss, H.J. 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Applied and Environmental Microbiology 64, 246-252.
- Widrig, D.L., Boopathy, R., Manning, J.F. 1997. Bioremediation of TNT contaminated soil: A laboratory study. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 1141-1148.
- Williams, M., Reddy, G., Quinn, M., Johnson, M. 2015. Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern. Elsevier Inc., Oxford, UK.
- Williams, R.T., Ziegenfuss, P.S., Sisk, W.E. 1992. Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 9, 137-144.
- Yan, C., Wang, Y., Xia, B., Li, L., Zhang, Y., Liu, Y. 2002. The retrospective survey of malignant tumor in weapon workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases 20(3), 184-188.
- Yinon, J., 1990. Toxicity and Metabolism of Explosives. CRC Press, Florida.
- You, S-H., Zhu, B., Han, H-J., Wang, B., Peng, R-H., Yao, Q-H. 2015. Phytoremediation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Arabidopsis* plants expressing a NAD(P)H-flavin nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. Plant Biotechnology Reports 9, 417-430.