

Mikroorganizmalar Aracılığı ile Mayın Arama ve Parçalama Yöntemleri

Zübeyde Hano¹, İsmail Karaboz², Atakan Sukatar³

Giriş

Kara mayınları günümüz savaşlarının başlangıcından itibaren bilinen ve en yaygın olarak kullanılan savaş aletleridir. Dünyada 165 ülkede kara mayınlarının döşenmiş olduğu tahmin edilmekte olup, bu ülkelerden yaklaşık 58 tanesi kara mayınları nedeniyle ciddi kayıplar vermiş ve her yıl 15 – 20 bin insanın ölümüne neden olmaktadır. Bu durum dünya için gerçekten ciddi bir kayıptır [1]. Dünyadaki mayınların yol açtığı katliamlar bir yana, var olan mayınların azaltılması ile geri kalmış ülkelerin ekonomisi ve kullanılmayan tarım alanlarının iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Her yerleştirilen 2,3 milyon mayından sadece 100.000'i yok edilebilmektedir. II. Dünya Savaşında Büyük Britanya ve Kuzey Afrika'nın çöllere yerleştirilen mayınlar insanların hayatını günümüzde bile tehdit etmeye devam etmektedir. Kara mayınlarının aranması ya da kontrolü yavaş ama dikkatli ve özenli bir arama gerektirmektedir.

Tüm yukarıda saydığımız nedenlerden dolayı mayınların aranması için birçok yöntem geliştirilmiştir [2]. Mayınların aranmasında fiziksel, biyolojik ve kimyasal olmak üzere birçok yöntem kullanılmıştır [3].

Mayınların aranmasında karşılaşılan başlıca zorluklar; mayınların döşenmiş olduğu topraklarda insanlar tarafından yapılmış olan nesnelere benzerliği, çeşitli toprak ve çevre şartlarının olması (kuru ve nem içerikli topraklar) ve mayınların farklı şekil, büyüklük ve materyallerden yapılmış olmasıdır. Bugün dünya üzerinde 2500 farklı tipte mayın olduğu bilinmektedir. Tüm bunlar mayınların bulunmasını güçleştirmektedir.

¹Mikrobiyolog, ² Prof. Dr., Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın elektronik posta adresi: ismail.karaboz@ege.edu.tr

³ Prof. Dr. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir.

Mayın Arama Yöntemleri

- 1) Fiziksel yöntemler
 - a) Kızılötesi alıcılar
 - b) Radyo dalgaları
 - c) Metal detektörler
- 2) Biyolojik yöntemler
 - a) Köpeklerin kullanılması
 - b) Arıların kullanılması
 - c) Bitkilerin kullanılması
 - d) Bakterilerin kullanılması
- 3) Biyosensörlerin geliştirilmesi
 - a) TNT aranmasında bakterilerin biyosensör olarak kullanılması
 - b) TNT aranmasında alglerin biyosensör olarak kullanılması

Mayın Parçalama Yöntemleri

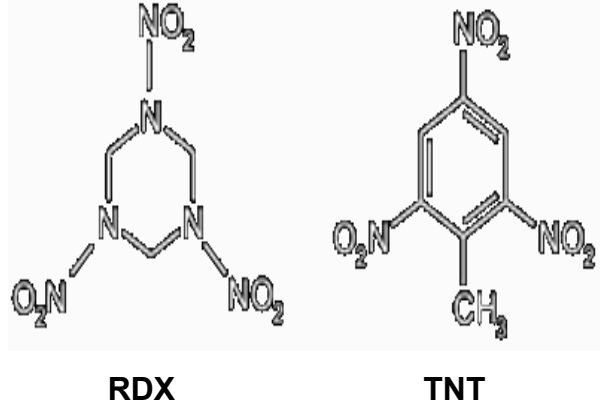
- 1) Bitkilerin kullanılması
 - a) Helofitlerin (Bataklık bitkilerinin) kullanılması
- 2) Bakterilerin kullanılması
 - a) Aerobik parçalama
 - b) Anaerobik parçalama
- 3) Fungusların kullanılması
- 4) Kimyasal yöntemler
 - a) TiO_2 kullanılması

TNT Nedir?

Birçok uygulama alanı olan TNT (trinitro-toluen), yapısında 3 nitro grubu (NO_2) bulunduran benzen halkalı nitroaromatik bir bileşik olup, doğada yaygın olarak bulunan ve kendiliğinden parçalanmayan ksenobiotik kimyasallardandır [4]. Köpüklerin sentezlenmesinde, ilaç sanayiinde, pestisitlerde ve patlayıcıların yapımında kullanılmaktadır [4]. Bu bileşikler toksik olup doğada çok zor parçalanırlar. Nitroaromatik bileşiklerden en çok bulunan TNT'dir [4]. TNT sarı renkli, kokusuz, toksik ve doğal olarak oluşmayan tehlikeli bir bileşiktir [5, 6, 7, 8]. Bu yüzden doğadan uzaklaştırılması gerekmektedir.

TNT'nin Kimyası

Çift bağılı elektronlar TNT'nin aromatik halkalarından elektronegatif nitro grupları ile uzaklaştırılır. Nitro grupları iki farklı element içerir. Bunlar azot ve oksijendir. N ve O elektronegatif olduğundan polar yapıdadır. Azot atomlarının pozitif yüklenmesi ve elektronegativitesi ile birleşmesi nitro gruplarının kolaylıkla redüklenmesini sağlar. Redüklenme işlemini katalizleyen enzim nitroredüktazdır.



Nitroaromatik bileşikleri katalizleyen diğer enzimler ise aldehit oksidaz, dihidrolipik amid dehidrogenaz ve diaforazlardır. Nitroredüktaz enzimi oksijene duyarlı olduğundan *Clostridium* spp. ve *E. coli* gibi anaerobik bakterilerde bulunur [4, 9].

Fiziksel Yöntemler

Arama sistemi içeren bir helikopter, gizlenmiş mayınların bulunabileceği bir alan üzerinden geçerken, bu alanda bulunabilecek patlayıcı maddelerin sinyalleri ya da yoğunluğu helikopterde bulunan kızılötesi alıcılarda saptanabilir. Bu alıcılar gizlenmiş maddelerin bulunduğu bölgelerin diğer bölgelerden çok daha fazla ısıya sahip olduğunu gösterebilmektedir.

Bu şekilde algılanan ısı farkı, bir bilgisayar ekranına pikler şeklinde yansımakta ve bu pikler patlayıcıların yerleşimi konusunda bilgi vermektedir. Magnetometreler ve metal detektörler metallerin varlığını algılayabilirler. Radyo dalgaları ise yeraltında bulunan bir obje ile bu objenin etrafında bulunan ısı farkını algılayarak patlayıcıların boyutu ve yerleşimi konusunda bilgi vermektedir [10].

Aynı zamanda bu alıcılar gömülmüş savaş gereçlerinin aranmasında da kullanılmaktadır. ORNL de UXO (unexploded ordnance) üzerine çalışan ekip, orduda gizlenmiş aletlerin işaretlerini ve simgelerini geliştirmek için çalışmaktadır. Bu ekip daha fazla bilgi toplamak için deneme bölgeleri oluşturmakta ve denemelerde kontrol alıcıların yol izinden bilgi toplayıp, bilgisayar programı geliştirmektedir. Bu bilgilerin bilgisayarda görselliğe dönüştürülmesiyle, patlayıcı maddelerin nerede olduğu ve hangi tehlikeli patlayıcıları içerdiği saptanmaktadır. Böylece, hangi bölgenin güvenli olduğu yada mayınlardan temizlenmesi gerektiği bilgileri elde edilmektedir [11].

Mayınların aranmasında kullanılan bir diğer yöntem ise metal detektörlerin kullanılmasıdır. Bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmıştır ancak son yıllarda mayınların metal yerine plastik maddelerden üretilmesi nedeniyle metal detektörlerin kullanımı sınırlanmıştır. Metal detektörler doğru sonuçlar vermesi yanı sıra, toprağın karmaşık yapısı nedeniyle bazen yanlış sonuçlar da verebilmektedir.

Kimyasal Yöntemler

TiO₂ ile TNT Parçalanması

TNT'nin fotokatalitik parçalanmasında UV bir ışık kaynağı gibi, TiO₂ ise daha çok bir fotokatalist olarak kullanılır. Deneme aşamasında TNT'nin başlangıç konsantrasyonuna ve pH'sına bakılır. TiO₂ ve UV ikisi birlikte varken, bunlardan sadece birinin varlığına göre TNT daha hızlı parçalanır. TNT nötral pH' da çok yüksek bir fotokatalitik parçalanmaya uğrar. TiO₂'nin fotokatalizdeki rolünü göstermek için katalistli ve katalistsiz 3 deney seti kurulur.

- a) TiO₂ ile beraber 30 mg TNT içerecek şekilde,
- b) TNT U.V' ye maruz bırakılıp TiO₂ olmadan (fotoliz koşulları)
- c) TNT TiO₂ varlığında U.V' ye maruz bırakılır.

Önce TiO₂' li olan deneyde TNT'nin sadece %10 u absorblamakta ve ilk 10 dk içerisinde TNT ortamda azalmakta ve daha sonra ise sabitleşmektedir. Fotoliz reaksiyonunda ise TNT'nin %70'i parçalanmaktadır. Son olarak fotokataliz deneyinde ise TNT'nin tamamı 90 dk içerisinde parçalanmaktadır. Böylece renksiz olan ortamın pembeye dönüştüğü görülür [12].

Biyolojik Yöntemler

Köpeklerin Kullanılması

Patlayıcıları aramada yöntem olarak öncelikle köpekler kullanılmış, yapılan araştırmalarda köpeklerin patlayıcılara karşı kimyasal sensörlerden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (13) .

Patlayıcı arama çalışmalarında Angola, Norveç ve Amerika'dan olmak üzere eğitilmiş 3 köpek, mayınların olduğu bölgelerde arama çalışmaları için kullanılmıştır.

Köpeklerin mililitrede çok küçük miktarlarda (10^{-6} oranında) bile TNT'nin varlığının saptanmasında rol oynadıkları görülmüştür. Verimli bir aramanın sağlanması için köpeklerin periyodik olarak eğitilmesi ve ödüllendirilmesi gerekmektedir. Köpeklerin bu algılama yeteneği patlayıcı buharının ne kadar uzağa yayıldığı ile ilgilidir. Buhar ne kadar yakına yayılırsa o kadar verimli sonuçlar elde edilebilir [14, 15, 16].

Arıların Kullanılması

Buradaki amaç arıların TNT'yi bir feromen gibi algılayabilmesini sağlamaktır. Hedef kimyasala şekerin bağlanmasıyla arılar patlayıcı aranması için de eğitilebilir. Entomologlar arıların kullanılması için iki strateji öne sürmüşlerdir. Birincisi eğitilmiş bir arının patlayıcıya doğru gittiği yol izinden diğer arıların gitmesinin sağlanması, ikincisi de arı kovanlarının üstüne TNT eklenmesi yöntemidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda petri kapları içine kumla birlikte TNT konularak eğitilmiş arıların TNT' nin aranmasında kullanılmasıdır. Arıların mililitre başına 0. 7- 13.0 ppb oranında TNT' yi algılayabildiği tahmin edilmektedir[14, 15].

Bitkilerin Kullanılması

Yapılan denemelerde genetik yapısı değiştirilmiş bitkilerin çevresel tehlikelerle ilgili tutarlı bilgi verdikleri görülmüştür. GM (genetically modified) bitkiler, kontaminantların aranmasında biyosensör olarak kullanılabilirler. Bu kontaminantlar: ağır metaller, PCB'ler gibi toksinler ve kara mayınlarıdır. Birçok bitki biosensör olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem bir veya daha fazla marker kodlayan genlerle bağlanabilen özel promotorların izolasyonunu gerektirmektedir. Bu görülebilir marker Pasifik Denizanası'ndan (*Aquera victoria*) alınan GFP (green fluorescence protein) dir. GFP mavi ya da ultraviyole ışıkla uyarıldığında fluoresans yeşil renk verme özelliğine sahiptir. Spesifik bir promotor içeren DNA, GFP ile bağlanıp bir bitki içine transfer edilebilir. Örneğin, bakıra duyarlı genleri içeren genetik yapısı değiştirilmiş bir promotor olsun, bu promotoru içeren bitki bakırdan yapılmış bir mayının etrafına yerleştirildiğinde, eğer mayında bulunan bakır yeterli konsantrasyonda ise promotor indüklenerek ve bu mayının parçalanması için gerekli genlerin proteinleri sentezlenecektir. Bitkilerle ilgili yapılan çalışmalar genellikle kara mayınları gibi patlayıcıların aranmasıdır.

Kara mayınları genellikle TNT (trinitrotoluen) ya da diğer patlayıcıları içeren çok ucuz plastik patlayıcılardır. Mayınların birçok boyut ve şekli vardır. Kamboçya, Pakistan gibi ülkeler ordu tarafından yerleştirilen mayınları içeren başlıca ülkelerdir [16].

Bitki temelli arama sistemlerinin bir avantajı makroskopik gözlenebilir organizmaların kullanılmasıdır. Diğer bir avantaj ise bitkilerin özel ekolojik koşulları optimize edebilmesidir. TNT, bitki köklerinde absorblanmakta ve oradan yapraklara transfer edilmektedir. Bu bölgelerde ışımaya kolaylıkla görülebilir. Kök yapıları, patlayıcı izlerinin aranmasında çok etkilidir. Bitki temelli TNT arama sistemi şöyle kurulur:

İlk basamak dedektör bitki tohumlarının kara mayınlarının olduğu bölgelere ekilmesidir. Bunun için helikopter gerekir. Bu bitkilerin normal protein sentezini gerçekleştirmesini sağlamak için helikopter yoluyla bitkilere su ve besin verilir. Sonuçta mayınlar üzerinde bulunan bitkiler yeşil renkten kırmızıya dönecek, mayınlara uzak olan bitkilerde ise renk değişimi görülmeyecektir. Bu bitki genetik olarak değiştirilmiş bir hardal bitkisidir. Görüldüğü gibi TNT'yi kullanma kapasitesinde olan bu bitki TNT'yi absorbladıkça ilgili gen bölgesi indüklenerek ve TNT'yi parçalayan enzimler sentezlenerek, renk değişimi görülecektir.

Bitkilerin kullanılmasıyla ilgili bir sorun, kullandıkları mayın alanlarının bitkinin büyümesini engellemeyecek şekilde olması gerektiğidir. Verimli bir sonucun elde edilmesi için ortamın su ve besin koşullarının uygun olması gerekmektedir.

Bakterilerin Kullanılması

Savannah River Technology Center (SRTC) mikrobiyal mayın arama sistemini geliştirmiştir (15). Kara mayınlarının aranmasında mikroorganizmalar biyosensör olarak kullanılmıştır. SRTC araştırmalarında kullandığı bakterilerin patlayıcı maddelerde doğal olarak bulunan azot, trinitrotoluen, dinitrotoluen, nitrat, nitrit, nitroz oksit gibi maddelerle uyarıldıklarını gösterilmiştir [16].

SRTC 'nin kültür koleksiyonunda 10 bine yakın orijinal bakteri bulunmaktadır. Bu bakteriler büyüme ya da metabolik aktivite sırasında kara mayınlarının aranmasını sağlayan farklı özelliklere sahiptir. Bu bakterilerden bazılarının, kara mayınlarının bulunduğu bölgelerde, patlayıcıların buharlarına maruz kaldığında biyoluminesens oluşturarak, mayınların varlığını gösterdiği saptanmıştır (17). MMDS (Microbial mine detection system) uygulama koşullarının sürekliliği, ucuz olması ve tanıma teknolojisinin yüksek olması nedeniyle uygun bir yöntemdir.

İlk kez 30 Ekim 1996 da genetik olarak değiştirilmiş bakteriler tehlikeli savaş kalıntılarının aranmasında kullanılmıştır. Tennessee Üniversitesi ve Oak Ridge National Laboratory'nın bilim adamları naftalini kullanan ve kullanırken de ışık oluşturan bir mikroorganizma üretmek için 3 mikroorganizmanın genetik özelliklerini *Pseudomonas fluorescence* HK44 bakterisinde birleştirmişlerdir. Bu bakteri naftalinin olduğu bölgeye aktarıldıktan 5 hafta sonra bile canlı kalabilmiş ve naftalini parçalayabilmiştir. Genetik olarak değiştirilmiş bakterilerinden farklı olarak bazı bakteriler özel olup , saklı bomba ya da patlayıcıları ararken ışık oluşturarak patlayıcıların varlığını gösterirler . Bu sistem içeriklerini buhar olarak sızdıran bomba ya da patlayıcıların aranmasında kullanılmaktadır. Aramada kullanılan *Pseudomonas putida* TNT yiyen bir bakteri olup, kirli olan her yerde üreyebilmektedir (1, 15).

Deneme için Kuzey Carolina'da yapay bir mayın alanı oluşturulmuş. Bu alanın üzeri mikroorganizmalarla kaplanmış, sonuç olarak bakteri yoğunluğu ile mayınların bulunduğu bölgeler arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür.

Sıcaklığa duyarlı olan bakteriler neme ihtiyaç duyarlar. Eğer bu bakteriler sıcak yerlerde büyürse her koşulda büyüebilirler. TNT' yi doğal olarak parçalayan bakteriler olduğu gibi parçalayamayan bakteriler de vardır. Bu bakterilere TNT' yi parçalama özelliğinin kazandırılması için genetik modifikasyon yapılması gerekmektedir. Genetik modifikasyon prosesi şu şekildedir: önce uygun bir bakteri straini seçilir. Bu bakterinin kimyasalla etkileşime girdiğinde indüklenen geni belirlenir, daha sonra ilgili gene bioraportör bağlanarak gen modifiye edilir. Böylece bakteri hedef kimyasalla karşılaştığında gen indüklenir ve sinyal oluşturulur.

Böylece genetik olarak değiştirilmiş bakteriler mayınların bulunabileceği alanlar üzerine zirai dağıtıcılarla püskürtülür. Püskürtmeden sonra ortam UV ile aydınlatılır, eğer ortamda patlayıcı varsa ilgili gen bölgesi indüklenecek ve TNT'nin parçalanmasıyla ilgili genlerin proteinleri sentezlenecek ve bu gen bölgesine bioraportör olan GFP de bağlı olduğu için bu da indüklenerek bakteriler mavi renkte fluoresens verecektir.

Bakteri İzolasyonu

Buradaki amaç kara mayınlarının bulunduğu bölgelere adapte olan patojenik-olmayan mikrobiyal konsorsiyumları tanımlamak ve izole etmektir.

SRTC mikrobiyal ekoloji laboratuvarı patlayıcı ve mayınlarla kontamine olan bölgelerdeki toprak örneklerini alma girişiminde bulunmuştur.

Ford A.P. Hill'den alınan örnekler toplama bölgelerinde stabilize edilir taşınır ve işlenir. Mikroorganizmalar bu toprak örneklerinden izole edilir. Bu mikroorganizmalar patlayıcıları parçalamalı ya da kullanmalı ve TNT' ye olan kemotaktik cevapları vermelidir. TNT kontamineli topraklardan alınan mikrobiyolojik örnekler incelenmiş, sonuç olarak bu bölgelerdeki toprağın mikrobiyal büyümeyi yüksek oranlarda desteklediği görülmüştür (15). Örneklerdeki TNT düzeylerinin mikrobiyal büyüme üzerinde önemli bir inhibitör etki göstermediği görülmektedir.

TNT kontamineli topraklar saf çevrelerle karşılaştırıldığında, mikrobiyal büyümeyi daha fazla etkilediği gözlenmiştir. Akridin oranla ilgili bilgiler bu örneklerde bulunan TNT düzeylerinin bakteriyel popülasyonlar için optimum olabileceğini göstermiştir.

Elde edilen bu bilgiler TNT kontamineli topraklarda bulunan mikroorganizmaların özel türler olmayıp TNT'yi doğal olarak kullanan mikroorganizmalar olduğunu göstermektedir. Aseptik mikrobiyolojik örnekler 5 farklı kara mayınının olduğu test alanlarından toplanmıştır. Örnekler birbirine 2, 5 cm yakınlığında olan kara mayınlarının üzerinden alınmıştır. Kontrol bölgeleri ise bu alanlara 250 ile 500 cm yakınlığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Buradaki bakteriyel yoğunluklar incelenmiş, uzun zaman periyodları boyunca TNT ye maruz kalma yerine bu komüniteler bir yıldan daha az sürede mayınlardan çıkan buhara maruz bırakılmıştır(15).

Yoğunluktaki düşme mayınların 250 cm uzağından toplanan örnekler olduğunu göstermektedir. Daha yakından toplanan örneklerde ise daha yoğun bakteriyel popülasyonlar gözlenmiştir. Bu örnek kara mayınlarının topraktaki mikrobiyal komüniteler için potansiyel bir zenginleştirici kaynak olduğunu göstermektedir.

Canlıların (mikroorganizma) sayısını elde etmek için 2 farklı kültür ortamı kullanılmıştır. Bunlar % 1 PTYG ve MPY ortamıdır. Topraktaki çalışmalar için genel olarak PTYG ortamı kullanılmış ve aynı zamanda bu ortam biyoluminesen bakteriler için de seçicidir. Sonuçta MPY seçici ortam olmasına rağmen bakteriyel yoğunluğu büyük oranda etkilediği görülmüş fakat yinede bakteriyel çeşitlilik % 1 PTYG' de MPY'ye göre daha fazladır. Aynı zamanda farklı morfolojilerdeki koloniler % 1 PTYG de daha fazladır. MPY ortamı seçilerek dominant fluoresen pseudomonaslar elde edilmiştir. Benzer bulgular RDX (6 azot atomundan oluşan hegzosiklik halka) için de saptanmıştır [17].

Biyosensörlerin Geliştirilmesi

Luminesen bakteriler topraktaki patlayıcı ve toksik maddelerin aranmasında kullanılmaktadır. Deniz luminesen bakterisi olan *Vibrio fischeri* su toksikolojisinde kullanılan en önemli test organizmasıdır. Bu test organizmasının bazı avantajları vardır. Bu avantajlar hızlı analiz edilmesi, yüksek duyarlılığa sahip olması ve ucuz bir yöntem olmasıdır. Denemeye ilgili sonuçlar *Vibrio fischeri*'nin TNT kontamineli suyla inkübasyonundan sonra oluşan luminesens konsantrasyonuna bakılarak ölçülür. Işık oluşturulması organik bileşiklerin oksidasyonunu gösterir (lusiferin). Bu oksidasyon lisuferaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Nitrit gibi iyonlar TNT içeren maddeler üzerinde (kara mayını) yüksek bir oranda birikirler.

Bu iyonlar ve *Vibrio fischeri* arasındaki reaksiyon test edilir. Üretilen ışığın azalması ya da çoğalması bu bakteriyi patlayıcıları aramak için bir marker yapar. Test için nitrit iyonlarının farklı konsantrasyonları bakteri örneklerine verilir. Niteliksel ve niceliksel ölçümler yapılır. Işık yoğunluğunu ölçmek için spektrofotometre kullanılır. Ortama verilen ışık oranı bakterinin kullandığı nitritle ilgilidir. Patlayıcıların bulunduğu topraklarda nitrit oranı normal topraklardan çok fazla olduğundan ve *Vibrio fischeri* bu bölgede olduğundan, oluşan ışığın diğer yerlere göre çok daha fazla olduğu görülür. Bu bakterilerin insana hiçbir zararı olmaması, çok kolay kültür edilmesi ve çevrede herhangi bir değişikliğe neden olmaması nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar.

Bu yöntemdeki tek sorun *Vibrio fischeri* 'nin su bakterisi olmasından dolayı toprakta uzun süre kullanılamamasıdır. Bu sorunu çözmek için, luminesensten sorumlu olan bir gen alınıp topraktaki bir bakteriye transfer edildiğinde, transformasyon yapılan bu bakterinin patlayıcı aranmasında kullanılması sağlanır. Yukarıda bahsedilen tüm bu sistemlerle patlayıcı (TNT) kontamine topraklar hızlı, ucuz ve etkili bir şekilde temizlenebilir [19, 20]. Mikroorganizmaların karakteristiği göz önüne alınarak DNT ve TNT buharlarına en duyarlı olan mikroorganizmaları seçme şansı yaratılmış olur [21].

Amikrobiyal arama sistemleri trichloroethylene aranmasında da kullanılmaktadır [22]. Sistem önce laboratuarda kurulur. Özel bölgelerin iklim şartları toprak tipi ve mayınların yerleşimiyle ilgili diğer etkenler düzenlenir. Seçilen konsorsiumda az sayıda olan farklı mikroorganizmalar seçilir. Bunlardan çeşitli koşullar içinde en çok gelişen mikroorganizma grubu biyosensör olarak seçilir.

Antijen niteliğindeki ilaç ya da herhangi bir patlayıcı molekül kurulmuş olan sistemden geçerken iç kısımda bunlar antikorlarla birleşerek çökeler ve piezo-elektrik quartz kristaller oluşur. Oluşan bu çökeltme monitöre pikler şeklinde yansır böylece bir biyosensör sistem kurulmuş olur.

TNT Aranmasında Biyosensör Olarak Alglerin Kullanılması

Günümüzde toprak kontaminantlarının aranmasında alg biyosensörleriyle ilgili olarak yoğun bir biçimde çalışılmaktadır [23]. Günümüzde yapılan çalışmalarda rezistant alg mutantları spontan mutasyonlarla elde edilmekte ve bu yöntemde seçilen alglerin TNT konsantrasyonlarına karşı oluşturduğu floresens yoğunluğu biyolojik sinyal olarak kabul edilmektedir.

Mikroalglerden bir tür olan *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) algkültür koleksiyonundan sağlanır (DcG1wt yaban tip). Alınan bu yaban tip 20° C de 20 ml BG-11 ortamında (Sigma, St. Louis, USA) 60 mikromol ışık yoğunluğu altında büyütülür. *D. chlorelloides* TNT'ye karşı dayanıklı mutantların elde edilmesinde kullanılır. İlk basamakta herhangi bir yabancı tip tür, inoküle edilmiş olan tüplerde büyüme belli bir yoğunluğa ulaşıncaya kadar, BG-11 ortamında büyümeye bırakılır. Bu tüpler içine daha sonra 30 mg TNT konulur. 5 gün içinde bazı tüplerde hiç büyüme gözlenmezken haftalar sonra bazı türlerin büyüdüğü görülmüştür. İşte büyüyen bu türler dayanıklı türlerdir.

İkinci deneme setinde ise, değişen TNT konsantrasyonlarına karşı, her tüpte aynı oranda alg içeren tüplerdeki fluoresens inhibisyon oranları ölçülür. Yabani tip ve dayanıklı türlerin TNT'ye olan duyarlılığı inhibisyon oranı ile ölçüldüğünde, en yüksek TNT konsantrasyonunda yabani tiplerde %95 oranında inhibisyon görülürken, rezistent mutantların aynı TNT konsantrasyonunda %70 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir.

Yapılan fluoresens denemelerinde ise yabani tip alglerin 0.818 TNT konsantrasyonun da inhibe olup ışık vermezken, TNT'ye dayanıklı türlerin 0.823 TNT konsantrasyonunda inhibe olmayıp ışık oluşturduğu görülmüştür.

Mayın Parçalama Yöntemleri

TNT'nin parçalanması için birçok yöntem vardır. TNT bakteriler tarafından küçük miktarlarda parçalanabilir [24]. *Pseudomonas spp.* ve bazı funguslar TNT 'yi azot kaynağı olarak kullanabilir. Anaerobik mikroorganizmalar ise TNT'yi farklı yol izleri kullanarak parçalayabilirler. TNT'yi parçalayabildiği yeni saptanan bir tür de *Shewanella halifaxensis*' dir (6). Örneğin *Desulfovibrio* ve *Clostridium* gibi bakterilerin bazı türleri TNT'yi triaminotoluene parçalarlar. *Pseudomonas* JLR11, TNT'deki nitro gruplarını serbest bırakıp amonyuma dönüştürmekte olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas*' ta TNT' nin %85' i hücre içinde organik azot biçiminde bulunduğu saptanmıştır.

TNT, indirgenme ürünleri olan mononitrotoluen ve dinitrotoluen bileşiklerinden çok daha sıkı bir yapıdadır. Bunun nedeni, nitro gruplarının TNT de bulunma simetrisinden dolayıdır. Bazı *Clostridium* türlerinde TNT, hidroksilamin ve dinitrotolune kadar parçalanmaktadır.

TNT'nin Toprak Mikroorganizmaları Tarafından Parçalanması

TNT'nin mikrobiyal transformasyonu nitro gruplarından birinin indirgenmesi ile başlar. İndirgenme nitroredüktaz enzimi ile katalizlenir. Bu enzim *Pseudomonas alcaligenes* bakterisinden elde edilmiş olup, TNT'yi mono ve dihidroksil amino'ya dönüştürebilir. TNT'nin 2 nitro grubu aerobik mikroorganizmalarla, 3. nitro grubu ise anaerobik mikroorganizmalarla parçalanır. TNT'nin parçalanması en az 3 bakteriyel strain ile gerçekleştirilir. Bunlara örnek: *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium* ve *Pseudomonas savastona*'dır. *Enterobacter cloacae* pentaerythritol tetranitrat redüktaz enzimine sahiptir.

TNT'nin Aerobik Parçalanma Metabolizması

TNT'nin aerobik parçalanma metabolizması, nitro gruplarının mononitro ve dinitro bileşiklere indirgenmesini içerir. Oksijen varlığında redüklenme sonucu oluşan ürünler çok stabildir. Bu nedenle, kültür ortamında birçok mikroorganizma tarafından parçalanamaz.

TNT'yi azot ya da karbon kaynağı olarak kullanan birkaç mikroorganizma vardır. Mineral ortamlarda bu mikroorganizmalar izole edilebilir. Patlayıcıların bulunduğu bir topraktan alınan *Pseudomonas spp.*'nin ve yine *Enterobacter cloacae* 'nin PB2 straini TNT'yi azot kaynağı olarak kullanıp büyüebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle biyoteknolojik uygulamalar yapılarak bakterilerin TNT'yi parçalaması sağlanabilir.

Örneğin TNT indirgeyen (PETN) enzimini kodlayan gen ORN (organik nitrat redüktaz) biçiminde düzenlenir. Bu gen *E.coli* içinde klonlanıp ifade edilir. PETN'yi ifade eden rekombinant bakteri TNT'den nitrat gruplarını uzaklaştırabilir. *Pseudomonas fluorescens*'ten saflaştırılan NADH bağlı bir oksidoredüktaz enzimi, TNT'nin indirgenmesini katalizleyebilir. *Mycobacterium vaccae* bakterisi TNT'yi propan varlığında karbon ve enerji kaynağı gibi kullanabilmektedir. TNT'yi kullanabilen diğer bakteriler; *Staphylococcus*, *Enterobacter* ve *Bacillus* türleridir.

TNT' nin Anaerobik Parçalanma Metabolizması

TNT' nin anaerobik parçalanma sürecinde oksijen olmadığı için substratın oksidatif polimerizasyonu en alt düzeye indirilir. *Veillenella alkalescens*'te elektron vericisi olarak hidrojen kullanılıp TNT triamino toluene (TAT) indirgenebilmektedir. *Clostridium* ve *Desulfovibrio* türleri anaerobik parçalanma sistemlerinin varlığı nedeniyle üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalardır.

Anaerobik TNT parçalanması için ortama redüksiyon potansiyelini düşürücü substratlar eklenebilir. Bazı *Clostridium* türlerinde dihidroksilamino gibi ara bileşikler oluşturulur. TNT kadar DNT metabolizması da önemlidir.

Desulfovibrio azot kaynağı olarak TNT, karbon ve enerji kaynağı olarak da piruvatın olduğu bir ortamdan izole edilip saflaştırılır. TNT' nin mineralizasyonu amino gruplarının TAT'dan eliminasyonu ile olmaktadır. TAT' nin biyolojik transformasyonu nötral pH ve anoksik koşullarda olasıdır. Parçalanmada farklı elektron alıcıları kullanılabilir. Nitrat, sülfat, karbondioksit gibi elektron alıcıları kullanılabilir. TNT: *E.coli*, *Salmonella enterica serovar typhimurium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.lactis* tarafından da anaerobik olarak parçalanır.

TNT 'nin Funguslarla Parçalanma Metabolizması

TNT'nin bioremediasyonunda kullanılan funguslar genel olarak beyaz çürükçül funguslar olarak bilinir. Bu funguslar TNT'nin nitro gruplarını indirgeyerek azoksi dimerlere kadar parçalarlar. Azoksi dimerler toprağın humus fraksiyonlarına kovalent olarak bağlanmakta olup, bu durum detoksifikasyonda oldukça önemlidir. En yaygın olarak kullanılan funguslar; *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes modesta*, *Absidia cylindriospora* ve bazı Ascomycota ile Zygomycota üyeleridir. Fungal parçalanma ligninlerin sindiriminden salınan enzimlerle gerçekleştirilir. Bu enzimler lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, hidrojenperoksidaz ve quinol oksidazdır. Funguslarda en çok çalışılan *Trametes modesta*' dir. Çünkü bu fungus diğerlerinden farklı olarak lakkaz enzimini sentezler ve TNT' ye daha dayanıklıdır.

Birçok fungus TNT'ye toleranslıdır. Fakat Basidimycota üyeleri 50 ppm'in altındaki TNT konsantrasyonlarına dayanamaz. Zygomycota ve Ascomycota üyeleri ise TNT' yi aminodinitrotoluene ve azoksi boyalarına dönüştürerek parçalamaya büyük katkı sağlamaktadır. Aşağıdaki resimde *Absidia cylindrospora*'nın 14 gün boyunca değişen (0-1000 ppm) TNT konsantrasyonlarına olan toleransı ölçülmüş ve 0 ppm de çok fazla üreme varken, TNT konsantrasyonu arttıkça buna bağlı olarak büyümenin de azaldığı görülmektedir.

TNT' nin Helofitler (Bataklık bitkileri) Tarafından Parçalanması

Seçilen bazı helofitlerin TNT parçalanmasındaki etkisini göstermek amacıyla *Phragmites australis*, *Juncus glaucus*, *Carex gracilis* ve *Typha latifolia* türleri denemelerde materyal olarak kullanılmıştır. Denemeler için kullanılan toprak miktarı 1000 mg olup, hazırlanan 20 mL sıvı ortam içine 7 g bitki olacak şekilde kullanılmıştır. *Phragmites australis* ve *Typha latifolia* gibi türler yüzey tohumlarından, *Carex gracilis* ve *Juncus glaucus* gibi türler ise apikal meristemlerinden elde edilir.

Tohumlar önce %1 sodyum hipokloritle muamele edildikten sonra yıkanmış ve hormonsuz MS (Murashige and Skoog) ortamına alınmıştır. Bitkiler aseptik olarak 150 mL' lik glisinli ortamda ışık altında büyütülmüştür. Ortamda sakkaroz, vitamin, pirodoksın tiamin ve fitohormon bulunmaktadır. Bu koşullarda bitkiler gelişmekte ancak kök oluşturamamaktadırlar. Kök oluşturan ve oluşturmayan bitkiler invitro hormonsuz MS ortamında 100 mg TNT ile kültüre edilmekte olup, TNT'nin ortamdan kaybolması ise bitki dokularınca parçalanma ürülerine dönüştüğünü göstermektedir. TNT'nin % 90'ı 10 gün içinde yukarıda sayılan helofitlerce alınmaktadır. Kök oluşturan ve oluşturmayan bitkiler karşılaştırıldığında, köklü bitkilerin TNT'yi daha hızlı parçaladığı görülmüştür. TNT nin bu türler üstündeki fitotoksik etkisi büyüme oranlarına bakılarak istatistiksel olarak ölçülmüştür.

Sonuçlar

Metal dedektörlerin kullanılmasıyla birçok olumlu sonuç elde edilmiş, ancak patlayıcılar plastikten yapıldığında veya toprak içeriği farklı olduğunda bu dedektörlerin mayınları bulma oranı düşmüştür.

Kimyasal yöntemlerde doğru sonuçlar alınmakla birlikte yanlış sinyaller de alınacağı için çok fazla kullanılmamaktadır. Çünkü kimyasal materyallerin duyarlılığı düşüktür [24, 25]. Biyolojik yöntemlerin birçok avantajı olmakla birlikte dezavantajları da vardır. Örneğin denemelerde çok ucuz ve taşınabilir olması nedeniyle bakteriler kullanıldığında, mayınların bulunduğu alanlarda bakterilerin çevresel koşullara (pH, sıcaklık, kuraklık) olan duyarlılığı nedeniyle, kesin sonuçlar vermemekte ve bu yöntemin uygulanmasında güçlükler yaşanmaktadır. Bununla birlikte birçok mayınlı alanın temizlenmesi, bakterilerle gerçekleştirilmiştir.

Bitkiler kullanıldığında ise toprak nemliliği, su ve besinin sağlanması gibi faktörler için içine girmekle birlikte, mayın aranmasında bitkilerin kullanımı iyi bir alternatiftir. TNT nin helofitlerle aranmasında verimli sonuçların elde edilebilmesi, bu bitkiler için ışık yoğunluğunun optimum olacak şekilde ayarlanmasını gerektirmektedir. Funguslarla yapılan denemelerde, fungusların çoğunun başarılı bir şekilde TNT' yi parçaladığı ya da misel yapısında akümüle ettiği görülmüştür.

Bu yöntemlerin yanında genetik olarak değiştirilmiş bitki ve bakterilerin TNT aranmasında kullanılması geliştirilmiş en son yöntemdir. *Vibrio fischeri* bir su bakterisi olduğu için kurak koşullar nedeniyle karada kullanılması uygun değildir. Ancak bu bakteri kara koşullarında geliştirilirse uygun koşulların sağlanması gerekir.

Günümüze değin TNT aranmasında büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Bunların yanı sıra bu gibi yöntemlerin geliştirilmesiyle birçok mayın yok edilebilmiştir. Tüm bu yöntemler ile dünyada yaklaşık her yıl 100.000 mayın yok edilebilmektedir. Bu durum yaşadığımız dünyanın geleceği yeni tarım ve yaşam alanlarının açılması açısından bizlere umut vermektedir.

Kaynaklar

- [1] Frische, T. 2002. Screening for soil Toxicity and Mutagenicity Using Luminescent Bacteria—A Case Study of the Explosive 2, 4,6 Trinitrotoluene(TNT). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51,133- 134.
- [2] Suresh, J.G., Likate,G.M., Ghole, V.S. 2002. TNT biotransformation potential of the clinical isolate of *Salmonella typhimurium* – potantial ecological implications. *Indian J Occup Environ Med.* 9, 29- 34.
- [3] Frische, T., Höper, H. 2003. Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation TNTcontaminated soils,*Chemosphere*, 50, 415- 427.
- [4] Esteve-Nunez, A, Caballero, A., Ramos, J.L. 2001. Biological Degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev* , 65:3, 335- 352 .
- [5] Nyanhongo, G.S., Couto,S.R., Guebitz, G.M. 2006.Coupling of 2,4,6 Trinitrotoluene metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*, *Chemosphere*, 64, 359- 370.
- [6] Zhao,J._S., Mano, D., Leggiadro, C., O'Neil, D., Hawari, J. 2006. *Shewanella halifaxensis* sp., A novel obligately respiratory and denityrfying psychrophile. *Int. J. Sys. Evo. Microbiol.* 56, 205- 212.
- [7] Bayman, P., Ritchey, S.D. and Bennett, J. W. 1995. Fungal interactions with the explosive RDX, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15 :5, 418- 423.
- [8] Bennett, J. W., Hollrah, P., Waterhouse, A., Horvath, K. 1995. Isolation of bacteria and fungi from TNT-contaminated composts and preparation of ¹⁴C- ring labeled TNT. *International Biodeterioration&Biodegradaion.* 35:), 421- 430.

- [9] Hawari, J., Zhao, J. S., Spain, J. 2006. Phylogenetic and metabolic diversity of Hexahydro- 1, 3,5- trinitro- 1, 3, 5-triazine (RDX)-transforming bacteria in strictly anaerobic mixed cultures enriched on RDX as nitrogen source. *FEMS Microbiology Ecology*, 46: 2, 189- 196.
- [10] Kalafut, T., Wales, M.E., Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K., Wild, J.R. 1998. Biotransformasyon patterns of 2, 4, 6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Current Microbiolog.* 36: 1, 45- 54.
- [11] Lendenmann, U., Spain, J.C., Smets, B.F. 1998. Simultaneous biodegradation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene in an aerobic fluidized-bed biofilm reactor. *Environmental Science&Technology*, 32:1, 82- 87
- [12] Hyun-Seok, S.L., Il Hyoung, C., Kyung_duk, Z. 2004. Kinetics and mechanism of TNT Degradation in TiO₂ photocatalysis. *Chemosphere* 57: 4, 309- 317.
- [13] Phelan, J.M. and Barnett, J. 2002. Chemical sensing thresholds for mine detection dogs. *Proc. SPIE*, 4742, 532.
- [14] Boopathy, R., Manning, O., Kulpa C.F. 1998. Biotransformasyon of explosives by anaerobic consortia in liquid culture and in soil slurry. *International Biodeterioration &Biodegradation*. 41:1, 67- 74.
- [15] Fliermans, C.B. and Lopez-de-Victoria G. 1998. Microbial mine detection system (MMDS). *Proc. SPIE*, 3392, 462.
- [16] Robertson, B.K., Jjemba P.K. 2005. Enhanced bioavailability of sorbed 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by bacterial consortium. *Chemosphere*: 58, 263- 270.
- [17] Loomis, A.K., Childress, A.M., Daigle, D., Bennett, J.W. 1994. Prospect for fungal bioremediation of TNT munition waste. *International Biodeterioration &Biodegradation*, 34:1, 21- 34.
- [18] Thompson, K.T., Crocker, F.H., Fredrickson, H.L. 2005. Mineralization of the cyclic nitramine explosive Hexahydro- 1, 3, 5- trinitro- 1, 3,5-triazine by *Gordonia* and *Williamsia spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 71 :12, 8265- 8272.
- [19] Altamirano, M., Garcia- Villada,L., Agrelo,M., Sanchas-Martin, L., Martin-Otero, L., Flores-Moya, A., Rico,M., Lopez-Rodas, V., Costas, E. 2004. A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors & Bioelectronics* 19, 1319- 1323.
- [20] Nepovim, A., Hebner, A. Soudek, P., Gerth, A., Thomas, H., Smircek, S., Vanek, T. 2005. Degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by selected helophytes. *Chemosphere*, 60:10, 1451- 1461.
- [21] Bromdan, B.W., Lee, S.Y. (1998). Biodegradation of 1, 3, 5-trinitro -1, 3,5-triazine *Current Microbiology* ,37:2, 127- 131.
- [22] Oh, B.T., Sarah, G., Shea, P.J. 2001. TNT nitroreductase from a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:7-8, 875- 881.

[23] Boopathy, R., Gurgas, M., Ullian, J., Manning, J.F. 1998. Metabolism of explosive compounds by sulfate-reducing bacteria. *Current Microbiology*, 37: 2, 127- 131.

[24] Juck, D., Driscoll, B.T., Charles, T.C., Greer C.W. 2003. Effect of experimental contamination with the explosive hexahydro-1,3,5-triazine on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 2, 255- 262.

[25] Schmelling, D, C., Kimberly, A.G., Prashant, V.K. (1996). Role of Reduction in the Photocatalytic Degradation of TNT. *Environmental Sci. Technol*, 30, 2547- 2555.