

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAĞ ASİDİ ve 16S rRNA SEKANS ANALİZLERİ İLE TANIMLANAN
LİTYUM, ÇİNKO VE MANGAN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN
BİYOSORPSİYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZGÜN ŞAHİN

ARALIK 2013

ÖZET

YAĞ ASİDİ ve 16S rRNA SEKANS ANALİZLERİ İLE TANIMLANAN LİTYUM, ÇİNKO VE MANGAN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BİYOSORPSİYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

ŞAHİN, Özgün

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Eş Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Aralık 2013 95 sayfa

Yüksek konsantrasyonda ağır metal iyonlarını içeren kentsel ve endüstriyel atık sular ciddi bir çevre sorunudur. Günümüzde, bu atık sulardan ağır metal iyonlarının uzaklaştırılmasında filtrasyon, adsorpsiyon, kimyasal presipitasyon, iyon değişimi, membran ayrımı ve elektro remediasyon gibi çeşitli teknolojiler kullanılmaktadır. Ancak bu teknolojilerin çoğu düşük konsantrasyonlar da ki ağır metal iyonlarının gideriminde etkili olamamakla birlikte ekonomik olmayan teknolojilerdir. Ayrıca kullanımları sonucu oluşan sekonder atıkların çevre üzerindeki olumsuz etkileri söz konusu bu teknolojilerin çoğu zaman verimli bulunmamasına neden olmaktadır. Bu ve benzeri nedenlerden dolayı atık sulardan ağır metal uzaklaştırılması için etkin biyolojik bir adsorbant ya da sorbant kullanılması oldukça ekonomik olan alternatif bir çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı da atık sularda bulunan mangan, çinko ve lityum gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılacak etkin adsorpsiyon yeteneğine sahip mikrobiyal suşların izole edilmesi ve tanımlanmasıdır. Bu amaçla, ağır metal kirliliği gösteren yüzey sularından mangan, çinko ve lityum metallerine karşı yüksek direnç gösteren dört suş izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar yağ asidi (FAME) analizi ve 16S rRNA sekans analizi gibi moleküler metodlar

kullanılarak tanımlanmıştır. Tanımlamaları yapılan suşlar daha sonra ki aşamada ise yüksek direnç gösterdikleri metallere karşı olan adsorpsiyon yetenekleri bakımından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucu mangan direnci gösteren *Acinetobacter haemolyticus* ve *Serratia nematodiphila* olarak tanımlanmış olan iki suşun adsorpsiyon verimlilikleri sırasıyla %23 ve %53 olarak tespit edilmiştir. *Acinetobacter haemolyticus* olarak tanımlanmış olan çinko dirençli suşun adsorpsiyon kapasitesinin ise %16 olduğu belirlenmiştir. Lityum dirençli olan suş ise *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmış ve lityum adsorpsiyonunun da %35 oranında etkin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lityum dirençli bakteri, Çinko dirençli bakteri, Mangan dirençli bakteri, 16S rDNA sekans analizi, Yağ asidi analizi, Biyosorpsiyon.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF BIOSORPTION ABILITIES OF LITHIUM-, ZINC-, AND MANGANESE-RESISTANT BACTERIA IDENTIFIED BY FAME and 16S rRNA SEQUENCE ANALYSES

ŞAHİN, Özgün

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

Dec 2013, 95 Pages

The increasing contamination of urban and industrial wastewaters by toxic metal ions is a serious environmental problem. At present, a number of technologies can be used to remove heavy metals from the contaminated wastewater such as filtration, adsorption, chemical precipitation, ion exchange, membrane separation and electro remediation methods. However, most of these methods might not be efficient in removing heavy metals at very low concentrations, and could be relatively expensive. These methods are also not effective due to their secondary effluent impact on the recipient environment. For this reason, the uses of some low-cost materials for sorbent/adsorbent of metals from contaminated wastewater have been popular. This study aimed at identifying the isolates efficient in sorption of the heavy metals manganese, zinc, and lithium. For this reason, four isolates highly resistant to manganese, zinc, and lithium were isolated from heavy metal-contaminated surface waters. These isolates were identified by using molecular methods including fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA sequence analyses, and further assessed for their sorption abilities. Out of four, two different manganese resistant isolates were identified as *Acinetobacter haemolyticus* and *Serratia nematodiphila* with 23 and 53% biosorption abilities, respectively. The zinc-resistant isolate, *Acinetobacter*

haemolyticus, only showed 16% biosorption capacity. The isolate *Staphylococcus aureus* which was found to be lithium-resistant showed 35% efficiency in lithium biosorption.

Key Words: Manganese resistant bacteria, zinc resistant bacteria lithium resistant bacteria, fatty acid analysis, 16S rRNA analysis, biosorption

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye ve eş danışman hocam Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e çok teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans hayatım süresince benden destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkür ederim. Ayrıca deney ve analizlerimde her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen Yüksek Kimyager Ogün BOZKAYA ve Biyolog Hilal TOPBAŐ'a teşekkür ederim çalıőmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Dr. Fadime YILMAZ'a ve aynı laboratuvarı paylaőtığım bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim

Bugüne kadar beni destekleyen, çalıőmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen annem Esmâ ŞAHİN ve babam Mehmet ŞAHİN'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özetleri.....	2
1.1.1. Çevre Kirliliği.....	2
1.1.2. Su Kirliliği.....	2
1.1.3. Ağır Metaller, Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri.....	3
1.1.3.1. Çinko.....	5
1.1.3.1.1. Çinkonun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	5
1.1.3.1.2. Çinkonun Biyolojik ve Toksik Özellikleri.....	6
1.1.3.2. Mangan.....	7
1.1.3.2.1. Manganın Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	7
1.1.3.2.2. Manganın Biyolojik ve Toksik Özellikleri.....	8
1.1.3.3. Lityum.....	8
1.1.3.3.1. Lityumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	8
1.1.3.3.2. Lityumun Biyolojik ve Toksik Özellikleri.....	9
1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	10

1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri İle Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	10
1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu.....	11
1.1.4.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonma.....	12
1.1.4.4. Ekstrasellüler Alıkonma.....	14
1.1.4.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi.....	15
1.1.4.6. Hüresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması.....	15
1.1.5. Mikroorganizmaların Biyosorpsiyon Yetenekleri.....	16
1.1.5.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları.....	17
1.1.6. Mikrobiyal İdentifikasyon.....	20
1.1.6.1. Geleneksel Teknikler.....	21
1.1.6.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi.....	21
1.1.6.2.1.FAME'in Avantaj ve Dezavantajları.....	23
1.1.6.3. 16S rRNA Dizi Analizi.....	23
1.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	25
1.1.6.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları.....	27
1.2. Çalışmanın Amacı.....	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1. Materyal.....	29
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	29
2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı.....	29
2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı.....	29
2.1.1.3. Plate Count Agar Besiyerinin Hazırlanışı.....	29
2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Besiyerinin Hazırlanışı.....	30
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	30

2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	30
2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	30
2.1.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler...30	
2.1.2.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu.....	30
2.1.2.2.1.2. %10'luk SDS Tamponu.....	30
2.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması.....	31
2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu.....	31
2.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	31
2.1.2.2.1.6. Kloroform/izoamil Alkol Tamponu.....	31
2.1.2.2.1.7. Kloroform/İzoamil/Fenol Tamponu.....	31
2.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol.....	32
2.1.2.2.1.9. %70'lik Etil Alkol.....	32
2.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....	32
2.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....	32
2.1.2.2.1.12. Elektrophorez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	32
2.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması.....	32
2.1.2.4. Yağ Asidi Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	33
2.1.2.4.1. Solüsyon I.....	33
2.1.2.4.2. Solüsyon II.....	33
2.1.2.4.3. Solüsyon III.....	33
2.1.2.4.4. Solüsyon IV.....	33
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1.Çalışma Alanı.....	34
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	35
2.2.3. Mangan Çinko ve Lityum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması.....	36
2.2.4. İzolatların Elektron Mikroskobu Analizleri.....	36

2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon (MTK)	
Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
2.2.6. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.7. Koloni Oluşturan Brirm Sayımı.....	37
2.2.8. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi.....	37
2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini.....	38
2.2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Amplifikasyonu.....	39
2.2.11. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	40
2.2.12. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	40
2.2.13. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması.....	41
2.2.14. DNA Sekans Analizi.....	41
2.2.15. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması.....	41
2.2.16. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi.....	41
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
3.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	43
3.2. Bakterilerin Üreme Eğrileri.....	43
3.2.1. Mn12 Koldu Suşun değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri.....	43
3.2.2. Mn11 Kodlu Suşun değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri.....	44
3.2.3. Zn01 Kodlu Suşun değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri.....	46
3.2.4. Li12 Koldu Suşun değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri.....	47
3.3. Bakterilerin Tanımlanması.....	49
3.3.1. Yağ Asidi Analizi Analiziz ile Tanımlama.....	49
3.3.1.1. Mn12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi.....	49
3.3.1.2. Mn11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi.....	50
3.3.1.3. Zn01 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi.....	52
3.3.1.4. Li12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi.....	53

3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi.....	54
3.3.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu.....	54
3.3.2.2. Mn12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu	55
3.3.2.3. Mn12 Kodlu Suşun Tanımlanması.....	56
3.3.2.4. Mn11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu.....	59
3.3.2.5. Mn11 Kodlu Suşun Tanımlanması.....	60
3.3.2.6. Zn01 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu.....	63
3.3.2.7. Zn01 Kodlu Suşun Tanımlanması.....	64
3.3.2.8. Li12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu.....	67
3.3.2.9. Li12 Kodlu Suşun Tanımlanması.....	68
3.4. Bakterilerin Biyosoprsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	71
3.5. Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	73
4.TARTIŞMA-SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>E.coli</i> 'de Arsenik'in Hücre Dışına Aktif Taşınımı.....	12
1.2. Bakterilerde Çinko Dirençlilik Mekanizması.....	13
1.3. <i>Synechococcus</i> 'ta <i>Smta</i> ve <i>Smtb</i> Genleri.....	14
1.4. Biyosorpsiyon Mekanizmaları.....	18
1.5. Gram Pozitif ve Gram Negatif Hücre Yüzeyi.....	19
1.6. PZR Aşamaları.....	25
2.1. Kızılmak Lokasyonu.....	34
3.1. Mn 12 kodlu suşun pH 6 ve pH 7'deki üreme eğrisi.....	44
3.2. Mn12 kodlu suşun pH 7'deki mangan içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	44
3.3. Mn 11 kodlu suşun pH 6, pH 7, pH 9'daki üreme eğrisi	45
3.4. Mn11 kodlu suşun pH 7'deki mangan içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	46
3.5. Zn01 kodlu suşun pH 7 ve pH 9'daki üreme eğrisi.....	47
3.6. Zn01 kodlu suşun pH 7'deki çinko içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	47
3.7. Li12 kodlu suşun pH 6, pH 7, pH 9'daki üreme eğrisi.....	48
3.8. Li12 kodlu suşun pH 7'deki çinko içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	48
3.9. Mn12 Kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	50
3.10. Mn11 Kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	51
3.11. Zn01 Kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	52

3.12. Li12 Kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	54
3.13. Kromozomal DNA analizi.....	55
3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Mn12 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	55
3.15. Farklı MgCl ₂ Konsantrasyonlarında Mn12 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	56
3.16. Mn12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	57
3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Mn11 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	59
3.18. Farklı MgCl ₂ Konsantrasyonlarında Mn11 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	60
3.19. Mn11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	61
3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Zn01 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	63
3.21. Farklı MgCl ₂ Konsantrasyonlarında Zn01 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	64
3.22. Zn01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	65
3.23. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Li12 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	67
3.24. Farklı MgCl ₂ Konsantrasyonlarında Li12 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	68
3.25. Li12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	69
3.26. <i>Serratia nematodiphila</i> 'nın ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 'un mangan biyosorpsiyonu, <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 'un çinko biyosorpsiyonu ve <i>Staphylococcus aureus</i> 'un lityum biyosorpsiyonu.....	72
3.27. <i>Serratia nematodiphila</i> 'a ait mangan içeren ve içermeyen ortamlardaki elektron mikroskobu görüntüleri	73
3.28. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 'a ait mangan içeren ve içermeyen ortamlardaki elektron mikroskobu görüntüleri	74
3.29. <i>Staphylococcus aureus</i> 'a ait çinko lityum ve içermeyen ortamlarda ki elektron mikroskobu görüntüleri	74
3.30. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 'a ait çinko içeren ve içermeyen ortamlardaki elektron mikroskobu görüntüleri	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Başlıca Elementlerin Yer Kabuğundaki Konsantrasyonları.....	4
2.1. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	33
3.1. Mn12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	47
3.2. Mn11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	48
3.3. Zn01 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	49
3.4. Li12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	51
3.5. Mn12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	55
3.6. Mn11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	59
3.7. Zn01 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	63
3.8. Li12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

Pb	Kurşun
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
As	Arsenik
LiCl	Lityum Klorür
SnCl ₂	Kalay Klorür

KISALTMALAR DİZİNİ

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
MTK	Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon
SI	Similarity İndex

1. GİRİŞ

Günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesi ile insanoğlu daha iyi yaşam koşullarına kavuşmuş ancak bu gelişimle birlikte daha önceden bilinmeyen yepyeni sorunlar ortaya çıkmıştır. Çevre sorunları geniş alan ve toplulukları etkilemesi nedeniyle oldukça önemlidir. Çevre kirliliğini arttıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Canlıların yaşamını zorlaştıracak, ekosistemin dengesini bozacak ve kullanım amacına uygun olmayan sulara kirlenmiş veya kirletilmiş su denilir. Etkili bir arıtım yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz ve okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemler ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır [1]. Su kirlenmesi, su kaynağının fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde meydana gelir. Su kirliliği antropojenik etkiler sonucunda ortaya çıkan, kullanımı kısıtlayan veya engelleyen ve ekonomik dengeleri bozan kalite değişimleridir [2]. Bu açıdan ele alındığında su kirliliğini tetikleyici birçok unsur vardır. Bunlar çeşitlerine ve bu çeşitliliğe sebep olan kaynaklarına göre birçok gruba ayrılmakla beraber en önemli gurubu kimyasal kaynaklı kirlenme oluşturmaktadır [2]. Hiç şüphesiz ki kimyasal su kirliliğinin en, tehlikeli boyutunu ağır metal birikimi oluşturur.

İz metalle eş anlamlı olarak kullanılan ağır metal terimi esansiyel olan ve olmayan iz metalleri kapsar. Yani, kimyasal olarak; elektron verip (+) değerlikli iyon olabilen, asitlerde bulunan H iyonlarıyla yer değiştirebilen, ametallerle bileşik oluşturabilen fakat kendi aralarında oluşturamayan, oksitleri bazik olan, fiziksel olarak ise; civa hariç normal şartlarda katı olan, ısı ve elektriği iyi ileten, levha ve tel haline gelebilen ve metalik bir renk ve parlaklığa sahip olan bütün maddeler ağır metal olarak tanımlanmaktadır. Bunların tamamı, yüksek konsantrasyonda canlı organizmalar için potansiyel birer tehlikedir [2].

Atıksulardan metallerin gideriminde kullanılan klasik yöntemler ekonomik olmamaktadır. Ayrıca, klasik sistemler yüksek enerji gerektirmekte ve zehirli çamur

oluşturmakla birlikte bu çamuru dikkatli uzaklaştırma ve bertaraf problemi oluşturmaktadır. Sıvı çözeltilerdeki ağır metallerin biyosorpsiyon yöntemi ile giderilmesi ve geri kazanılması, endüstriyel atıksu arıtımında alternatif bir teknoloji olabilmektedir [3].

1.1. Literatür Özetleri

1.1.1. Çevre Kirliliği

Çevre; insan veya başka bir canlının yaşamı boyunca ilişkilerini sürdürdüğü dış ortamdır. Hava, su ve toprak bu çevrenin fiziksel unsurlarını, insan, hayvan, bitki ve diğer mikroorganizmalar ise biyolojik unsurlarını teşkil etmektedir. Doğanın temel fiziksel unsurları olan, hava, su ve toprak üzerinde olumsuz etkilerin oluşması ile ortaya çıkan ve canlı öğelerin hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkileyen çevre sorunlarına "Çevre Kirliliği" adı verilmektedir [4]. Çevre unsurlarına göre çevre kirliliği, hava, toprak, su ve ses kirliliği olmak üzere dört gruba ayrılır. Bu dört unsurda çevre kirliliğini oluşturan ana sebeplerdir ve her biri ayrı bir konu başlığı altında incelenebilir. Fakat bu çalışma doğrultusunda su kirliliğine neden olan etmenlerden ağır metallerin mikroorganizmalar üzerine etkileri hakkında detaylı bir araştırma yapılmıştır.

1.1.2. Su Kirliliği

Hızlı kentleşme, sanayi atıklarının kimyasal olarak arıtılmadan su sistemlerine verilmesi, tarım alanlarında yaygın ve aşırı miktarda pestisit kullanımı su kaynaklarının kirlenmesine neden olmuştur [5]. Bu durum öncelikle tatlı su ekosistemlerinin ve dolaylı olarak da kirletilmiş suyu kullanan tarım alanları başta olmak üzere diğer ekosistemlerin bozulması sonucunu gündeme getirmiştir. Su ekosistemlerinde özellikle de tatlı su kaynaklarında, ağır metal miktarlarının yüksek olması gerek sucul organizmaların gerekse de insanların hayatlarını olumsuz yönde etkileyerek potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Endüstriyel veya kentsel atık suları

ile kirlenmiş akarsu ve göllerin tarımsal amaçla kullanılması sonucunda, topraklarda önemli düzeyde iz element ve ağır metal birikimi olduğu bilinmektedir. Canlı sisteme giren ağır metaller, besin zinciri ile bir organizmadan diğerine taşınarak canlı sistemlerde yüksek konsantrasyonlara ulaşmakta ve zararlarını yıllarca sürdürebilmektedir [5].

1.1.3. Ağır Metaller, Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri

Her ne kadar ağır metal tanımı net olmasa da yoğunluk ağır metal tanımında en çok öne çıkan faktördür. Genellikle yoğunluğu 5 g/cm^3 'den yüksek olan metaller ağır metal olarak tanımlanmaktadır [6]. Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Çizelge 1.1'de yerkabuğunda en bol bulunan 12 element ile daha az bulunan bazı elementler gösterilmiştir. En bol bulunan bu 12 elementin toplam kütlesi, yerkabuğu kütlesinin %99,4'ü kadardır [7].

Çizelge 1.1. Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları [15]

Element	Konsantrasyon (ppm)
Bol oranda bulunanlar	
*Oksijen	466000
*Silisyum	277200
Alüminyum	81300
Demir	50000
Kalsiyum	36300
Sodyum	28300
Potasyum	25900
Magnezyum	20900
Titanyum	4400
*Hidrojen	1400
*Fosfor	1180
Mangan	1000
Eser oranda bulunanlar	
Baryum	425
Vanadyum	135
Nikel	75
Çinko	70
Bakır	55
Kurşun	12,5
Berilyum	2,8
Uranyum	2,7
Kalay	2
Kadmiyum	0,2
Cıva	0,08
Gümüş	0,07
Altın	0,004

* Metal olmayanlar

Bilinen elementlerin nerdeyse %80'ini metaller ve metaloidler oluşturur. Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonlarına redoks tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır [8]. Bir çok metal genellikle eser miktarlarda fizyolojik işlemler için gereklidir. Bu duruma Oksijen taşınmasında demir kullanımı, mangan ve selenyumun antioksidant sistemde gerekliliği, çinkonun metabolizmadaki rolü, bakırın kırmızı kan hücrelerinde ki oksidasyon ve redüksiyon prosesinin bir parçası olması örnek olarak verilebilir. [9] Bu zorunlu metaller, çok düşük veya çok yüksek konsantrasyonlarda toksik özellik göstermektedirler. Diğer taraftan bazı metallerin; arsenik, cıva, kurşun gibi, herhangi bir fizyolojik özellikleri yoktur ve toksik özellik gösterirler.

Ağır metaller h¼cre membranlarına zarar verebilir, enzim spesifitesini değiştirebilir, h¼crenel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilir. Bu metallerin toksisitesi esansiyel metallerin bağlanma b¼lgelerinin yerini almalarıyla ya da ligant etkileşimleri aracılığıyla olur. Ayrıca toksisite oksidatif fosforilasyon ve ozmotik dengeyle karışan n¼kleik asit ve proteinlerin konformasyonel yapısının değişmesi sonucu ortaya ¼ıkar [10,11].

Akut ve kronik arsenik toksisitesi, sinir, dolaşım, solunum, sindirim ve hepatik sistemini olumsuz etkiler. Civa toksisitesi ciddi n¼rolojik bozukluklara yol a¼maktadır Kadmiyum i¼eren topraklarda yetişen tarım ¼r¼nleri ile beslenen insanlar sigaranın i¼erdiđinden daha fazla kadmiyuma maruz kalırlar [12]. Kurşun, kadmiyum ve mangan fiziksel ve kimyasal ¼zelliklerinden dolayı ziraat ve end¼strinin ¼eřitli alanlarında kullanılırlar [12] Bu metallerin y¼ksek konstrasyonu dolayısıyla oluşan zehirlenmeler b¼brek, karaciğer ve sinir sistemini olumsuz etkiler. Deneysel ¼alıřmalar g¼stermiřtir ki; bu metaller ¼zellikle i¼erdikleri katekolaminler y¼z¼nden beyin nerotransmitter metabolizmasını etkileyerek davranış bozukluklarına yol a¼maktadır.

1.1.3.1. ¼inko

1.1.3.1.1. ¼inkonun Genel ¼zellikleri ve Kullanım Alanları

¼inko demir dışı ana metaldir, genellikle mavi-beyaz, sarı, kahverengi veya siyah renktedir. En .çok kullanılan cevherleri sfalarit, smitsonit, kalamın ve franklinittir. 900°C'de kayanadığından ve erime sıacaklığının d¼ř¼k olması nedeniyle işlenmesi zor bir metaldir. ¼inko, demir ve ¼elik galvanizlemede, prin¼ üretiminde, alaşım yapımında ve kimyasal ve ila¼lara beyaz rengini kazandırmak i¼in eczacılıkta kullanılır. [13] Bunun dışında pillerde, matbaacılıkta, otomotiv sekt¼r¼nde, boya astarlarında, siyan¼r proseslerinde altının ekstrakte edilmesinde, sabun ¼retiminin yağ alma aşamasında, tutkal yapımında, sulu sodyum bis¼lfit yapımında ve analitik kimyada rejenerant olarak pek ¼ok alanda kullanılmaktadır [14].

1.1.3.1.2. Çinkonun Biyolojik ve Toksik Etkileri

Çinko insan metabolizması için demirden sonra ikinci en gerekli elementtir. Yetişkin insan vücudu yaklaşık 2 g çinko içermektedir. Çinko, binlerce metaloproteinlerin veya çinko bağlayana proteinlerin yapısında ve hatta nükleik asitlerin bir bileşeni olduğundan demirin aksine tüm vücutta bulunabilir. Çinko, proteinlerin, enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin, hormonal reseptör bölgelerinin ve biyolojik membranların yapılarında bulunur ve fonksiyonlarında görev alır, DNA ve RNA metabolizmasında gen ekspresyonunda ve apoptosiste rol oynar. Ayrıca çinko metaloenzimleri ve çinko bağımlı enzimler hücre bölünmesine, farklılaşmasına ve büyümesine etkileri vardır. [15]

Çinko, canlıların beslenmesinde esas rol oynayan elementlerdendir. Yokluğu, sağlık problemlerine neden olduğu gibi, fazlası da akut toksisiteye neden olmaktadır. Buhar olarak solunması, boğaz kuruluğu, öksürük, zayıflama, baş ağrısı, titreme, ateş, mide bulantısı, kusma gibi etkilere sebep olmaktadır. $ZnCl_2$ buharı, soluk borusunun mukus membranında harabiyetlere sebep olmaktadır. Zn^{2+} nin çözünebilir tuzlarının sindirim yolu ile alımı sonucunda ise, mide bulantısı, kusma ve müshil etki göstermektedir. Zn buharının yoğun olarak solunması metal buhar ateşi olarak adlandırılan kısa süreli spesifik bir hastalığa neden olmaktadır. Deney farelerinde yapılan deneylerde de yüksek Zn konsantrasyonlarının kısırlığa sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca deri hastalıklarına da sebep olmuştur. İnsanlarda da cilt tahrişlerine sebep olmaktadır [14]. Bir çok akut çinko zehirlenmesi besin zehirlenmesi sonucu meydana gelmektedir. Doğal yapısı asidik olan yiyecek veya içecekler galvanize olmuş kaplarda uzun süre muhafaza edildikleri zaman kabın yüzeyinden belirli miktarda çinko bu yiyecek veya içeceğe karışmasıyla toksik etki yaratır, etkileri mide bulantısı, kusma, epigastrik ağrı, abdominal kramp ve ishal olarak ortaya çıkar. Daha uzun süreler boyunca alımında ise, anemi, pankreas harabiyeti, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein -iyi yönlü kolesterol) miktarında azalmalara neden olmaktadır. Ayrıca çinko immün cevap ve kan lipid profilleri üzerinde de olumsuz etkileri vardır [16]

1.1.3.2. Mangan

1.1.3.2.1. Manganın Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Mangan kaya, toprak, göl ve okyanus diplerine dağılmış olan birçok tuz ve mineral bileşiğinin yapısında bulunmaktadır. Doğada bulunan Manganın büyük bir bölümü metamorfik ve tortul kayalardan, küçük bir bölümü volkanik kayalardan kaynaklanır. Mangan toprakta, çözünmeyen mangan oksit formunda bulunmaktadır. Mangan diğer birçok element ve bileşikle farklı formlar oluşturabilir. Yeryüzünde bulunan belli başlı Mangan cevherleri; piroluzit (MnO_2), hausmannit (Mn_3O_4), manganit ($Mn_2O_3 \cdot H_2O$), mangan spat ($MnCO_3$) ve rodonit ($MnSiO_3$)' tir.

Yüksek Mangan konsantrasyonları, Mangan oksitleyen bakterilerin aktivitesine ve askıdaki taneciklerin üzerindeki adsorbsiyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Doğal sularda pH 7' nin üzerindeki pH' larda çözülmüş mangan formlarının (Mn^{2+}) askıdaki tanecikler üzerindeki adsorbsiyon hızının oksidasyon hızından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Askıda katı maddeler çoğunlukla kil, sulu metal oksitler gibi inorganik kolloidler, organik kolloidal maddeler ve canlı mikroorganizmaları içerir. Yağmur sularının hem düşük pH, hem de anaerobik şartlar nedeniyle çözülmüş Mn bileşikleri içeren topraklardan geçmesi sonucu sızıntı yağmur suları Mn' nin çözülmüş formlarını içerirler. Bu nedenle yeraltına sızan yağmur suları ile beslenen yeraltı suyu kaynakları yüksek miktarda mangan içermektedir [17].

Mangan çoğunlukla çelik yapımında sertliği, dayanıklılığı artırma fonksiyonunu yerine getiren ferromangan bileşiğinin yapımında; mangan dioksit, kibrit, kuru pil, havai fişek, porselen yapımında, mangan klorür, diğer Mn bileşiklerinin üretiminde başlangıç bileşiği olarak, organik bileşiklerin klorlanması işleminde katalizör olarak, özel iz elementleri içerdiği için hayvan besini olarak; mangan sülfat; cila, gübre, seramik yapımında; potasyum permanganat; metal temizleme, sepileme ve ağartma proseslerinde oksidant ve dezenfektan olarak, çiçek ve meyvelerin tazeliğinin korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca bazı ülkeler anti vuruntu katkı maddesi olarak organomangan bileşiği olan metil siklo pentadienil mangan trikarbonili kullanmaktadırlar. Benzinli araç üreticileri bu maddenin benzindeki kurşun miktarını

azalttığını belirtmektedirler. Mn içeren mineraller indirgenme şartları altında suyla reaksiyona girdiğinde veya aktif olduğunda konsantrasyonu 1 mg/L'den daha fazla olabilmektedir [17].

1.1.3.2.2. Manganın Biyolojik ve Toksik Etkileri

Mangan, bakteriler ve funguslarda dahil olmak üzere tüm mikroorganizmalar için gerekli metallere biridir [18] Manganın bu önemi bir çok enzimin aktivitesi için gerekli metal olduğundan ileri gelir. Karboksilaz, fotofosfataz, şeker transferazları, mangan içeren süperoksit dismutazlar aktivasyon için mangana ihtiyaç duyarlar [19]. Düşük konsantrasyonlarda Mn ve Fe, siyah balçık üreten Fe bakterilerinin mikrobiyal büyüme ve birikimlerine yol açabilir. Mn varlığı lifli yapıdaki mikroskobik organizmaların (*Crenothrix*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Gallionella*) gelişimini hızlandırır [17].

Mangan insanlarda önemli bir nörotoksindir. Özellikle çocuklarda merkezi sinir sistemini etkilemekte, hafıza davranış ve motor fonksiyonlarda bozukluklara neden olmaktadır. Mangan toksisitesi ayrıca kalsiyum metabolizmasını etkilemektedir, nöron hücrelere oksidatif hasar vermekte ve sinirsel dopamin iletimini engellemektedir [20].

1.1.3.3. Lityum

1.1.3.3.1. Lityumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Lityum periyodik tabloda hidrojen ve helyumdan sonra gelen üçüncü elementtir. Atomik ağırlığı 6.938 olup en hafif metaldir. Yerkabuğunda ki lityum oranı yaklaşık %0.006 iken deniz suyunda ise 0.1 ppm civarındadır. Lityumun ana kaynağı kil, mineral ve deniz suyudur [21]. Lityum; cevher ve konsantre cevher, metalik lityum ve lityum bileşikleri olmak üzere üç grupta kullanılmaktadır. Lityum cevheri ve konsantresi en çok; cam, seramik ve porselen emayesi alanında kullanılır. Metalik lityum en çok butil lityum (eczacılık, yapay kauçuk ve roket yakıtı endüstrilerinin

önemli bileşenlerinden) üretiminde kullanılır. Bundan başka; demir dışı metallerin metalurjisinde, oksijen ve kükürdü tutmada, alüminyum ve magnezyum alaşımlarında, kurşunla beraber kablo kaplamasında ve deoksidan olarak bakırda kullanılır. Lityum bileşiklerinden lityum karbonat, alüminyum üretiminde geniş bir kullanım alanı bulur. Bunun yanı sıra; seramik endüstrisi, diğer lityum bileşiklerinin üretimi ve tıpta manik depresyon tedavisi (bir ruh hastalıkları gurubu) karbonat olarak kullanıldığı diğer alanlardır. Lityum hidrür hidrojen gazı üretiminde, Lityum hidroksit motor yağı ve gres üretiminde, lityum klorür ve bromür soğutma sistemlerinde kullanım alanı bulur. Lityum en çok lityum karbonat olarak kullanılır. Onun da en çok kullanıldığı alan alüminyum endüstrisidir [22]. Bunların dışında lityum şarjedilebilir pil teknolojisinde başlıca elementtir [23].

1.1.3.3.2. Lityumun Biyolojik ve Toksik Etkileri

Endüstride ki kullanımının yanında Lityum 19. Yüzyıldan bu yana tıpta kullanılan alkali bir iyondur. Lityum bipolar bozukluk başta olmak üzere duygu durum bozukluğu tedavisinde vazgeçilmez ilaçlardan biridir. Ancak lityum tiroid işlevleri, paratroid ve kalsiyum metabolizması ve böbrek işlevleri üzerinde ve sinir sisteminde olumsuz etkileri vardır [24]. Lityum ağızdan alınımı sonrası 6-8 saat içinde mide-barsak sisteminden hızla ve tam olarak emilir. Plazma tepe konsantrasyonuna oral alımından 30 dakika ile 2 saat sonra ukaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz ve tüm vücut sıvılarına dağılır. Toksik belirtiler 1.5 mEq/L üzerinde görülür. Lityum hücre içine sodyum ve potasyum kanalları aracılığıyla kolayca girmekle birlikte hücreden enerji gerektiren mekanizmalarla çıkabilmektedir. Bu nedenle lityumun hücre içerisinde birikimi kolay olmaktadır. Lityum düzeyinin kanda 1.5-2.5 mEq/L arasında olması hafif, 2.5-3.5 mEq/L arasında olması orta, 3.5 mEq/L ve üzerinde olması ise şiddetli lityum zehirlenmesinin göstergesidir. Hafif lityum zehirlenmesinde; ince titreme, çevreye karşı ilgisizlik, yorgunluk, kas güçsüzlüğü, refleks artışı, orta derecede lityum zehirlenmesinde; kaba titreme, dizartri, kulak çınlaması, ataksi, hipertoni, myoklonus, şiddetli lityum zehirlenmesinde ise stupor, epileptik nöbet, koma, fasikülasyon, spastisite, rijidite, kore, atetoz, parezi ve paralizi gibi nörolojik yan etkiler görülmektedir [25,26].

1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücrenel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *Escherichia coli*'deki Cu^{2+} dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi değiştirilerek Cu^{2+} 'nin hücreye girişi engellenir [27]. Bu tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir. Diğer bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır. Tamamen ispatlanamasa da Cu^{2+} dirençliliğinin bazı biçimlerinin periplazmik bağlayıcılık özelliği üzerine kurulu olduğuna inanılmaktadır. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kuşatan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak hücre içine girişini engellemektedir. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir [27]. *Staphylococcus aureus*'un bazı türlerinde, peniklinaz'ın kodlarını bulunduran plazmitler, hücre membranı değişimi aracılığı ile Cd^{2+} geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu Cd^{2+} un 0,01-0,1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [27].

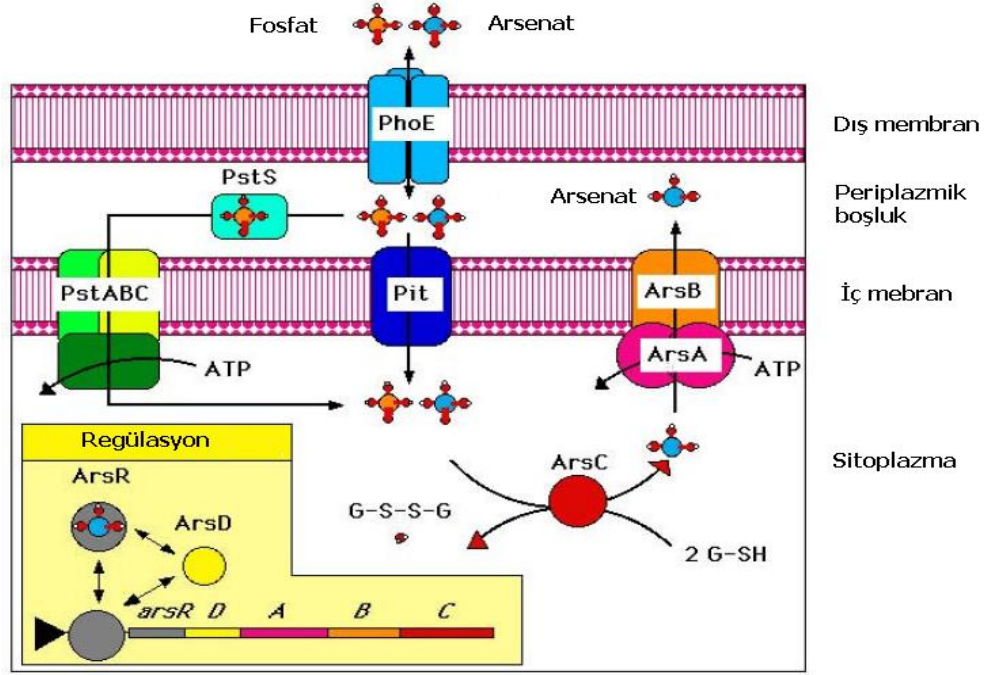
1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

Aktif pompa sistemleri her tür hücrede (bakteri, maya, küf, insan) bulunabilmekte ve çeşitli substratlardan ve çoğunlukla amfilik olan ilaçlardan hücreleri korumaktadır. Aktif pompa sistemleri, gerek gram-negatif gerekse gram-pozitif bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Tek bir substrata özgül olabildikleri gibi yapısal olarak birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilirler. Bu durum çoğul antibiyotik direncine ve yanı sıra substrat profilinin genişliğine bağlı olarak bazı boyalara, deterjanlara, dezenfektanlara karşı dirence neden olmaktadır. Pompa sistemi proteinlerinin normalde bulunan operonun bir parçası olabileceği ve düzenleyici bir genin kontrolü altında ortaya çıktığı düşünülmektedir [28]. Pompa mekanizması ile direnç kazanma yeteneğine sahip bazı bakteriler şunlardır; *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Stenotrophomonas maltophilia* [29].

CPx-tip ağır metal ATPaz'ların Cu, Zn, Cd ve Pb gibi toksik metallerin hücre membranlarından geçişinde rol aldığı bildirilmiştir [30]. Korunmuş bir membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin (CPx) motifine sahip oldukları için tip IB olarak sınıflandırılan ağır metal taşıyıcıları CPx-ATPaz'lar olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin plazma membranında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında pompalar olarak fonksiyon gördüğü veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [31]

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmit kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı yada ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [32]. Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığı

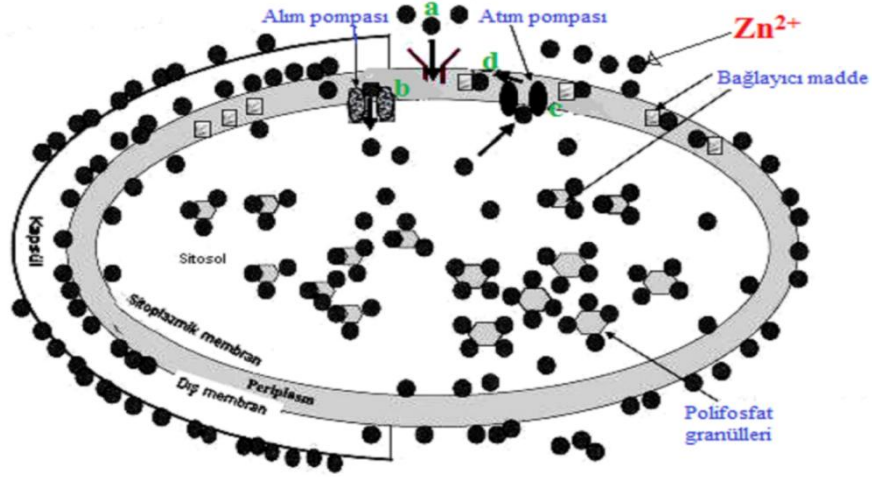
ile *E.coli* (Şekil 1.1.) ve *S.aureus*'ta; Cd^{3+} direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S.aureus*, *Bacillus* sp., ve *Listeria* sp'de veya *Alcaligenes eutrophas*'ta *eze* operonu bulunmuştur. Pb^{+2} direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus* ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmit ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [33].



Şekil 1.1. *E.coli*'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı [34]

1.1.4.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması

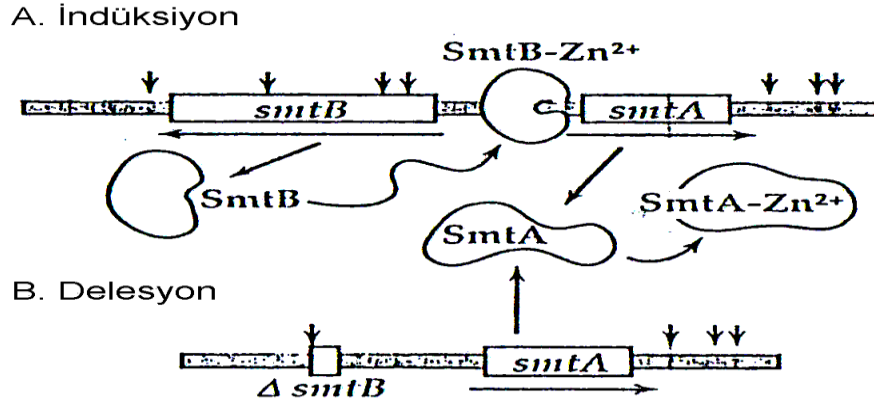
Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hüresel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} metalleri alıkonmaktadır (Şekil 1.2.). Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek bulunmaktadır. Bunlar; *Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi ve *Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [35].



Şekil 1.2. Bakterilerde çinko dirençlilik mekanizması [36]

Synechococcus denizlerde yaşayan bir Cyanobacteria'dır. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır (Şekil 1.3.) Bunlardan *SmtA*, Cd^{2+} ve Zn^{2+} 'ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [37].

Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Synechococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothionein'lerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. *SmtA*'daki metalothionindeki sistein kalıntıları, çok zehirli katyonlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda *SmtB*'nin yapısı belirlenmiştir. *SmtB* proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapıya sahip bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört Zn^{2+} bağlayıcı yer göstermektedir [38]. Metallerin hücre içinde alıkonmasına ilişkin diğer bir örnek de *Pseudomonas putida*'da görülmektedir. Bu bakteri metallothioneinlere benzeyen 3 farklı sistein bakımından zengin protein üretmektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*'da siyah bakır sülfat formunun çökmesinde alıkoyma aracılığı ile hücre içi birikimi de ispatlanmıştır [39].



Şekil 1.3. *Synechococcus* 'ta *smtA* ve *smtB* genleri [37]

1.1.4.4. Ekstrasellüler Alınma

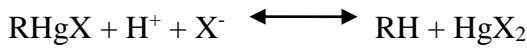
Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur. *Saccharomyces cerevisiae*'deki Ni^{2+} dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni^{2+} absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallerle çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metalle zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu^{2+} dirençli mantarlarda görülmektedir [40].

Penninckx ve Jaspers'ın raporlarına göre [41], mikroorganizmalarda glutatyon gibi kükürt bakımından zengin bileşiklerin sentezi, ağır metallerle karşı direnç sağlamaktadır. Glutatyon, L-sistein, L-glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşan ve ağır metallerle karşı yüksek affinitesi olan bir tripeptittir [42].

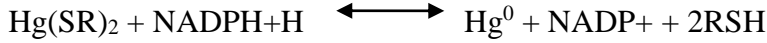
1.1.4.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi

Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki –SH gruplarına bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler. Civa bu özelliğinden dolayı toksik metal olarak kabul edilmektedir. Bazı bakteri grupları civayı enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirmektedirler. Bazı bakteriler Hg²⁺ dirençliliği sağlayan ve bir operon (*mer* operonu) tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon; sadece Hg²⁺'yi detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir. *Mer* operonu, organik civa liyaz ve civa redüktaz olmak üzere iki enzim kodlamaktadır. Organik civa liyaz enzimi C-Hg bağı kırarak, civa redüktaz Hg²⁺'yi Hg⁰'a indirgemektedir [42, 43,44].

1- Organik civa liyaz: C-Hg bağının hidrolizinde etkilidir.



2- Civa redüktaz: Hg²⁺'yi Hg⁰'a (metalik civa)'ya indirgemektedir.



Mer operonu tarafından kodlanan transport proteinleri aracılığı ile metalik civa, hücre membranından geçirilerek dışarı verilmektedir [42,43,44].

Bacillus, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*, Hg²⁺'ye karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir [45].

1.1.4.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltmak sureti ile ya da metal inaktivasyonunda kullanılan belli bazı hücresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir [27]. DNA tamir mekanizmaları plazmit ve

genomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd²⁺a maruz kaldığında önemli DNA hasarları oluştuğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [27].

1.1.5. Mikroorganizmaların Biyosorpsiyon Yetenekleri

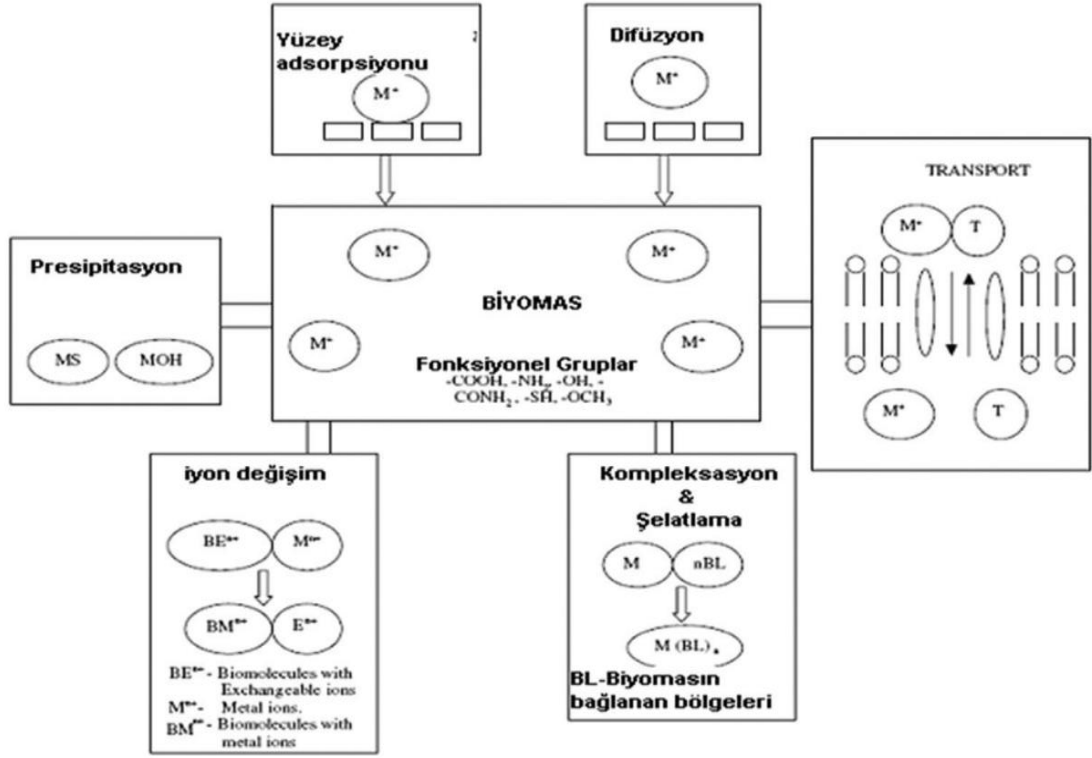
Ağır metallerin sulu ortamlardan giderilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, aktif karbon ile adsorpsiyon, ters osmoz, filtrasyon ve membran teknolojileri şeklinde sıralanabilir [46,47]. Bu geleneksel metotlar ile ortamda bulunan metaller tam olarak giderilemeyebilir. Bunun dışında bu tekniklerin; pahalı ekipman ve takipsistemleri gerektirmesi, fazla kimyasal ve enerji ihtiyacının olması, toksik çamur ve diğer atık ürünler oluşturması gibi dezavantajları vardır [48,47]. Bu nedenlerden dolayı metal iyonlarının sulu ortamlardan giderilmesi üzerine farklı teknolojiler geliştirmek günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Bu konuda geliştirilen yöntemlerden biri de biyosorpsiyon yöntemidir. Su ve atıksulardan toksik ağır metallerin giderilmesinde mikrobiyal biyokütlelerin kullanılması var olan metotlara, düşük maliyeti ile yeni bir alternatif oluşturmaktadır. Biyosorpsiyon teknolojisinin en önemli avantajları atık sulardaki ağır metal konsantrasyonlarını çok düşük seviyelere indirmekteki etkinliği ve bol miktarda kolayca üretilen, ekonomik biyosorbent materyallerinin kullanılmasıdır. Bu biyosorbentler metal iyonlarının giderilmesinde yüksek seçiciliğe sahiptirler [49,50]. Ayrıca bu yöntem ile çok seyreltik sulardan bile kirleticiler etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Biyosorpsiyon yönteminin diğer avantajları ise bu yöntemin yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir [51].

Biyosorpsiyon yönteminde biyokütle olarak; bakteri, alg, mantar, maya türleri gibi çok çeşitli türler kullanılabilir [52,53]. Bu türler biyosorpsiyon işleminde ölü veya canlı olarak kullanılabilir. Canlı biyokütleye nazaran ölü biyokütle kullanılması bazı

avantajları vardır. Ölü hücreler; uzun süre oda sıcaklığında saklanabilirler, metal toksisitesinden etkilenmezler ve nutriente ihtiyaç duymazlar. Bunların dışında biyokütlenin fiziksel veya kimyasal işlemlerle öldürülmesi ve bazı ön işlemlere tabi tutulması biyosorpsiyon kapasitesini arttırabilir [54]. Biyosorpsiyon veya biyoadsorpsiyon metallerin biyokütle ile pasif olarak hareketsizleştirilmesidir. Hücre yüzeyinde gerçekleşen giderim olayının mekanizması hücre metabolizmasından bağımsızdır. Bu prosesin giderim mekanizmaları metal ile hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşimlere dayanır [55]. Biyosorpsiyon işlemi; metabolizmadan bağımsız pasif birleşme (topaklaşma) proseslerinin ve fiziksel ve/veya kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleksleştirme, şelat oluşumu ve mikroçökelme proseslerinin birleştirilmiş bir yöntemi olarak düşünülebilir [54,56].

1.1.5.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları

Biyosorpsiyon mekanizmaları mikroorganizma yapılarının kompleks olması nedeni ile çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar, hücre metabolizmasına dayalı biyosorpsiyon ve metalin uzaklaştırıldığı bölgeye dayalı biyosorpsiyon olmak üzere iki ana başlık altında toplamak mümkündür Şekil 1.4' de bakteriyal biyomaslarda biyosorpsiyon mekanizmaları özetlenmektedir.



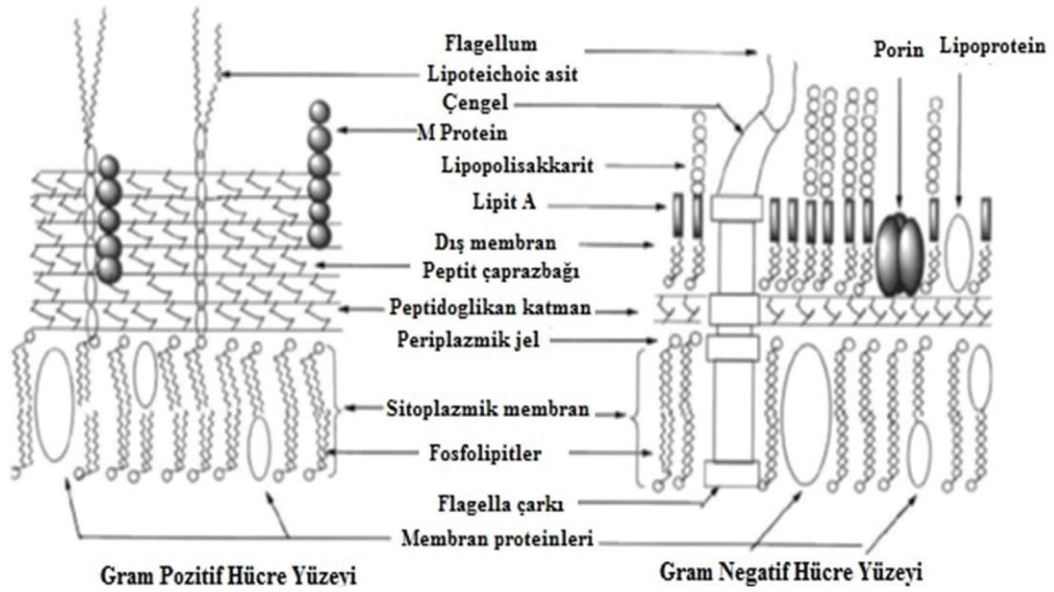
Şekil 1.4. Biyosorpsiyon mekanizmaları [103]

Metal ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşim sırasında fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi ve kompleks oluşumu gerçekleşir ve buna hücre yüzeyinde sorpsiyon denir ve metabolizmadan bağımsızdır. Mikrobiyal biyokütlenin hücre duvarı büyük oranda polisakkarit, protein ve yağlar içerir, çok sayıda metal bağlama fonksiyonel grubuna sahiptir. Bu gruplar; karboksilik, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gruplarıdır. Bu fizikokimyasal metal biyosorpsiyonu, metabolizmadan bağımsızdır ve nispeten hızlıdır; algde 5-10 dakika içerisinde gerçekleşir [57-59] ve metaller geri kazanılabilir [60,61].

Metal bağlama süreci iki basamakta gerçekleşmektedir [62]. Birinci basamak, hücre duvarında metal ve reaktif kimyasal gruplar arasında sitokimyasal etkileşimdir, ikincisi ise artan metal miktarlarının inorganik birikimidir. Bakteri hücre duvarı, metal iyonları ile temasta bulunan ilk bileşendir. Ölü veya inaktif hücre ile metal sorpsiyonunun tipi ekstrasellüler olduğu için hücre duvarının kimyasal fonksiyonel

grupları biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Bakteri hücre duvarında bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, fosfonat, amin ve hidroksil gruplarıdır.

Bakteri ve siyanobakterilerin hücre duvarları temelde peptid zincirleri ile birlikte N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit disakkaritlerini içeren peptidoglikan tabakadan meydana gelmiştir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, Gram pozitiflere nazaran daha ince olup, kuvvetli çapraz bağlara sahip değildir dış zar lipopolisakkarit, fosfolipid ve protein tabakalarından oluşmaktadır. Şekil 1.5' de Gram pozitif ve Gram negatif hücre yüzeyi şematize edilmektedir.



Şekil 1.5. Gram pozitif ve gram negatif hücre yüzeyi [104]

Cd^{2+} biyosorpsiyonu açısından gram pozitif ve gram negatif bakterileri karşılaştırmışlar ve Gram pozitif bakteri hücre duvarlarında bulunan glikoproteinlerin, LPS ve fosfolipidlerden daha fazla Cd^{2+} 'u bağlama bölgesine sahip olduğunu ayrıca her iki grubun da metal bağlama açısından farklı kapasitelere sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bakteri hücre duvarlarının yapısında sadece bu yapılar metal bağlama görevi yapmazlar bundan başka gram pozitiflerde teikoik asit ve teikronik asitte metal bağlamada önemli rol oynamaktadır. *E. coli* dış zarında bulunan fosfolipid ve LPS'nin

sahip olduğu fosforil grupları da metal katyonlarının bağlanabileceği muhtemel bölgeler arasında yer almaktadırlar [63].

Streptomyces pilosus' un karboksil gruplarının bakır bağlamadan sorumlu olduğu, bundan başka amin gruplarının da metal uzaklaştırmada etkili olduğu, katyonik metal iyonlarını şelatlamakla kalmayıp aynı zamanda hidrojen bağladığı ya da elektrostatik etkileşim sonucu anyonik metal türlerini ve boyaları adsorblayabildikleri rapor edilmiştir [64].

Metallerin bağlandığı yapılardan bir diğeri de ekstrasellüler polimerik maddelerdir (LPS). Yapılan çalışmalar da LPS' nin yüksek metal biriktirme potansiyeli ile birlikte seçici olarak metal iyonlarını bağladığı bildirilmiştir. Bu polimerler anyonik yapıya sahip olup metal katyonlarını bağlamaktadırlar, bazı durumlarda meydana getirdikleri kapsül yapısı ile hücrelerin etrafındaki agregatları gevşetmektedirler [65].

Farklı pH değerlerinde metal türleri farklı yüke sahip olduklarından yüzeyler tarafından değişik şekilde adsorblanabilmektedirler. Nikel ile yapılan bir çalışmada, pH 1-7 aralığında Ni⁺² iyonları (%90), pH 9'da (% 68) oranında adsorbe olurken, %10 oranında Ni₄OH₄⁺⁴ ve %8.6 oranında Ni(OH)⁺ oluşacak şekilde biyosorbe olmaktadır. Bazı pH değerlerinde metal presipitasyonu meydana geldiğinden biyosorbent potansiyelinin komplike olarak değerlendirilmesi gerekliliği rapor edilmiştir [66].

Biyosorbent olarak önemli bir yere sahip olan mikrofungus ve mayalar da tercih edilmektedir. Mikrofungus biyomaslar, çok iyi metal bağlama özelliği gösteren hücre duvarı yapısına sahip olduklarından biyosorpsiyonda avantajlı mikroorganizmalardır. Özellikle *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Streptoverticillum* ve *Saccharomyces* biyosorpsiyonda oldukça etkili fungal cinslerdir [65].

Günümüzde biyosorpsiyon mekanizmalarının anlaşılabilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Mikrobiyal biyomas üzerinde veya içerisinde metallerin yerleşimi elektron mikroskobu ve X-ışını enerji dağıtıcı (EDAX) analiz çalışmaları kullanılarak anlaşılmaya çalışılmaktadır. Kimyasal analizi için X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanmaya başlanmış olup, atom ya da moleküllerde elektronların bağlanma enerjisini tayin eden yeni bir teknik atom/iyonun oksidasyon derecesi hakkında bilgi

vermektedir. Bundan başka FTIR analizi ile de biyosorpsiyon mekanizması hakkında bilgi edinmek mümkündür [65].

1.1.6. Mikrobiyal İdentifikasyon

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [67]. Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile “moleküler mikrobiyal ekoloji” olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediyent yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [68].

1.1.6.1. Geleneksel Teknikler

Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili geniş bilgi vermektedir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex-situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda

istenmeyen başka türler oluşabilmektedir. Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı oldukça azdır ve bakteriyel çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [69,70]. Bununla birlikte, mikroorganizma çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

1.1.6.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi

Hücre sel yağ asitlerinin belirlendiği gaz-sıvı kromatografisi metodu çevre ve klinik kökenli bakterilerin, mikobakterilerin ve mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikrobiyal identifikasyon Sistemi (MIS) türlere özgü olan tüm yağ asiti metil esterleri, dimetil asetil, aldehid gibi bileşikler yüksek ayrıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MIS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvar da izole edilen bir çok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır [87].

Mikrobiyal hücrelerde yağ asitlerinin kaynağı hücre membranlarının başlıca bileşiği olan lipitlerdir veya gram negatiflerde lipopolisakaritlerin lipitid A bileşiği ve gram pozitiflerde lipoteikoik asittir. Tüm lipidlerin yağ asidi içeriği türe özgü biyosentez basamaklarıyla belirlenir. Küçük genoma sahip organizmalar genellikle az sayıda yağ asitleri bulundururken büyük genomlu bakteriler 20'den fazla yağ asidine sahiptirler [87].

Bakteriler ökaryotlarda bulunmayan özgün bazı yağ asitlerini içerirler. Genellikle dallı zincirli yağ asitleri gram pozitifleri, siklopropan yapıda olan yağ asitleri gram negatif bakterileri karakterize eder. Gram negatif bakteriler, gram pozitif bakterilere oranla daha çok sayıda karbon içeren doymuş ve tekli doymamış yağ asidi içerirler [87]. Analiz için örneklerin hazırlanması, saponifikasyon, metilasyon, ekstraksiyon ve yıkama olmak üzere 4 basamaktan oluşur [87].

Öncelikle, 24-48 saat inkübe edilmiş hücreler kültürden alınır, sponifikasyon için sodyumhidroksit-metanol karışımı ile muamele edilir. Bu basamakta yağ asitleri hücresel lipitlerden ayrılır. İkinci adımda HCl-metanol karışımı ile metilasyon basamağı gerçekleştirilir. Üçüncü basamakta, meydana gelen yağ asidi metil esterleri hekzan ve metil terbütül eterden oluşan solüsyonla ekstrakt edilir. Son olarak ekstrakt sodyumhidroksit çözeltisi ile yıkanıp gaz kromatografisi için tüplere aktarılır. Örneklerin değerlendirilmesi MIS ile yapılır. Sistem, alev iyonizasyon dedektörü, kapiler silikon kolon, otomatik örnekleyici, entegratör, bilgisayar ve yazıcıdan oluşur [87].

1.1.6.2.1. FAME'in Analizinin Avantaj ve Dezavantajları

Yağ asitleri ile bakterilerin tanılanması sistemi ile bakteriyel organizmalar alt tur düzeyinde bile tanılabilmekte ve birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. MIS ile elde edilen sonuçların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçlarından daha duyarlı ve cabuk, moleküler temele dayalı tanı testleriyle % 100'e yakın bir benzerlik gösterdiği ve bu sistemin bakteriyel organizmaların tanısında başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. MIS sisteminin rutin çalışmalar için nisbeten klasik yöntemlerden pahalı olsada özellikle zaman açısından çok uygun bir tanı yöntemi olduğu düşünülmektedir [88]. Ayrıca örneklerin hazırlanması yaklaşık 1 saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir [87]. Ancak yağ asidi analizinin enstrümantasyonu diğer analizlere nazaran maliyetli ve komplekstir [87]. Ve kimi zaman doğru sonuç vermeyebilir [86].

1.1.6.3. 16S rRNA Dizi Analizi

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem genus hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler

kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir [71].

Sekans analizi, etken DNA'sının belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [72]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [73] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotit dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert [74] ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [72].

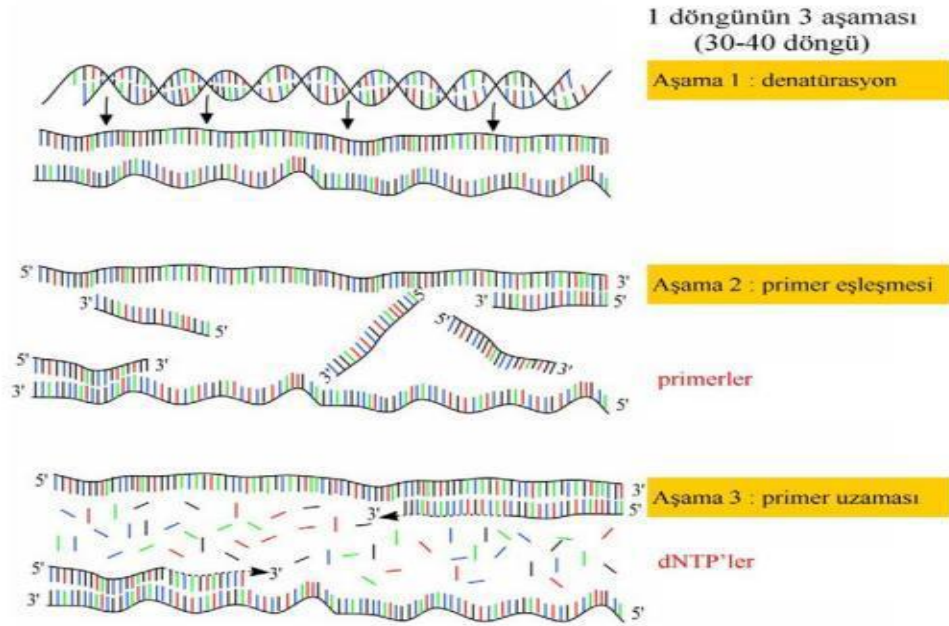
DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayırımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayırımı için DNA sekanslamanın kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir [75].

PZR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması, dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi bazı güçlükler de mevcuttur [76]. Ayrıca 16S rDNA geni, antimikrobiyal özelliği olan çeşitli kimyasallara duyarlıdır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, organizmanın bu kimyasallara duyarlılığını etkileyebilir ve antimikrobiyal ajanlara fenotipik direnç, 16S rDNA gen dizilimi sayesinde fark edilir [77,78]. Bununla birlikte bu

karakteristikler, 16S rDNA gen diziliminin klinik mikrobiyolojide kullanıldığı gibi bakteriyel tanımlamada ya da cins ve tür düzeyinde yakın ilişkilerin kararlaştırılmasında kullanımının önüne geçmez veya bunu etkilemez. Ancak bu karakteristikler genetik açıdan daha uzak mesafeli ilişkilerin ortaya çıkarılmasında daha büyük etkiye sahiptir [79].

1.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır [80].



Şekil 1.6. PZR aşamaları [81]

Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan

bölgelerle baz eşleşmesi yapar. Primerlerin özgün olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Bu üç aşamanın 25-30 tekrarı ile bir tek DNA parçasından teorik olarak 68 milyar kopya elde edilebilmektedir (Şekil 1.6.). Art arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 1.6.). Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır [80]. PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂'dir [82].

Kalıp DNA: Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA, plazmit ve faj DNA, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir. PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir [82].

Polimerazlar: Taq DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP ile arasına nükleotitler eklenerek, fosfodiester bağlar katalizler. Sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus* izolatından elde edilen Taq DNA polimerazdır [82].

Primerler: Gen çoğaltılması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotit primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak

elde edilebilirler. Bu primerler genellikle oluşumu bilinmeyen çeşitli nokta mutasyonlarının olduğu bölgelere bağlanma amacıyla seçilir [83].

dNTP Karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dördü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir [82].

Tamponlar ve MgCl₂: PZR’de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Mg²⁺ iyonları dNTP’ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA’nın Tm değerini artırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. (Tm değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) Bu nedenle MgCl₂’ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır [82].

1.1.6.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur [84]. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [85]. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Buna

rağmen nispeten pahalı olabilir, hassas çalışma gerekir ve sekanslamada türler arası yüksek benzerlik çıkabilir [86].

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar ile [96,97] Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilmiş ve kültüre alınmış olan mangan, çinko ve lityum dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesidir. Kültüre alınmış olan çinko ve lityuma direnç gösteren suşlar, yağ asidi analizi (FAME) ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır. Sonraki aşamada da tanımlanan bu suşların söz konusu metaller için biyosorpsiyon yetenekleri belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Nutrient agar besiyeri; pepton (5 g), et özütü (5 g), maya özüyü (1 g) ve agaradan (12 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.2. Nurient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi, DNA izolasyonu, biyosorpsiyon gibi deneyler için kullanılmıştır. Nurient broth besiyeri; pepton (5 g) ve et özütünden (3 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Koloni oluşturan birim sayımında kullanılmıştır. Plate count agar besiyeri; tripton (5 g), maya özütü (2.5 g), glukoz (1 g) ve agardan (12 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C'de 1 atm basınçta steril edilmiştir.

2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Hazırlanışı

İndikatör veya inhibitör içermeyen, bir çok mikroorganizmanın gelişebilmesi için yeterince zengin besin maddesi içeren genel kullanım amaçlı besiyeridir. Yağ asidi analizi öncesinde bakteri örneklerinin inkübasyonunda kullanılmıştır. Trypticase soy broth agar; tripticase soy broth (30 g) ve agardan (15 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C’de 1 atm basınçta steril edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Merk ve Sigma firmalarında temin edilmiştir.

2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1 Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL)

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılarak 250 mL distile suyla (pH 8.0) tamamlanmıştır.

2.1.2.2.1.2. %10’luk SDS Tamponu (100 mL)

10 gram SDS tartılarak 100mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.3 Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

0.0384 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 5 mL gliserol ve 100 μL 1M Tris-HCl (pH 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg proteinaz-K çözülmüştür.

2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)

20 g NaCl tartılarak 100 mL distile su ile çözülmüştür.

2.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)

4.1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülmüştür ve 10 g CTAB yavaşca solüsyona eklenerek 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

96 mL kloroform 4mL izoamil alkol ile karıştırılarak 100mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 ml)

48 mL kloroform 2 mL izoamil alkol ve 50 mL fenol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.2.2.1.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL)

70 mL %100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)

70 mL %100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)

0.12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA₂H₂O tartılarak 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılacaktır. Diziler forward primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve reverse primer:

5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' primerleri kullanılacaktır. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S Forward Primer (20 pmol), 5 µL 16S Reverse Primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl₂, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içeren), 61.5 µL steril distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polymerase karıştırılıp santrifüjlenecektir. Thermal cycler da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanacaktır.

2.1.2.4. Yağ Asidi Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.

2.1.2.4.1. Solüsyon I

45 g sodyum hidroksit 150 mL metanol ve 150 mL distile su karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.2. Solüsyon II

325 mL 6.0 N hidroklorik asit ve 275 mL metil alkolle karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.3. Solüsyon III

200 mL hekzan ve 200 mL metil tert-bütül eter karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.4. Solüsyon IV

20.8 g sodyum hidroksit tartılarak 900 mL distile su içinde eritilerek stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [89]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m³/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18.4 m³/sn ve en çok 1.673 m³/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.1.). Nehir üzerinde 12 önemli baraj vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [90].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu [89]

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma

ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ilinde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [94]

2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen 12 bölgeden Eylül 2012'da su örnekleri toplanmıştır.

Çizelge 2.1. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

Bölge Numarası	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı	39°22'16.39''K, 33° 26'49.26''D, 890 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39°23'43.98''K, 33°25'38.24''D, 833 m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39°26'03.30''K, 33°24'08.43''D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39°28'39.46''K, 33°24'26.73''D, 740 m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39°31'09.87''K, 33°24'39.32''D, 738 m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39°34'34.39''K, 33°26'11.61''D, 763 m
7	Sulubük - Kıyıbağı Mevkii	39°37'02.34''K, 33°26'38.26''D, 773 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39°39'53.04''K, 33°28'55.46''D, 852 m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39°43'59.01''K, 33°28'25.63''D, 737 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39°48'38.97''K, 33°29'14.57''D, 684 m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39°50'28.41''K, 33°28'02.13''D, 686 m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39°57'22.98''K, 33°25'04,35''D, 679 m

2.2.3. Mangan Çinko ve Lityum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması

Mn, Zn ve Li ağır metale dirençli bakterilerin seçimi için ağır metal içeren ortamlar kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Mn Zn ve Li ağır metale dirençli suşları seçmek için her üç metal ve örnek için ayrı ayrı nutrient agar içeren petrilere hazırlanmış ve petrilere literatürde belirlenen konsantrasyonlarda Mn için $MnSO_4$, Zn için $ZnSO_4$ ve Li için LiCl konulmuştur. Bu petrilere her bölgeden alınan su örnekleri seyreltilerek ekilmiştir. 30°C'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan koloniler seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Dirençli olan suşlar, toplandıkları bölgeleri ve dirençli oldukları metali temsil edecek biçimde kodlanmıştır. Mangan dirençli olan iki suş, Mn 11 ve Mn 12, lityum dirençli suş Li 12 ve çinko dirençli suş Zn 01 olarak kodlanmıştır.

2.2.4. İzolatların Elektron Mikroskopu Analizleri

Mn, Zn ve Li dirençli saf kültürlerin her biri ayrı ayrı dirençli olduğu metli içeren ve içermeyen ortamlarda gerekli üreme sıcaklığında 24- 48 saat inkübe edildikten paraformaldehit ile fiksasyonu yapılarak elektron mikroskopu analizleri yapılmıştır.

2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi

Mik değerlerinin belirlemek amacıyla suşların her biri agarlı ortamda giderek artan konsantrasyonlarda Mn için $MnSO_4$, Zn için $Zn SO_4$ ve Li için LiCl eklenerek gerekli sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan petrideki koloniler daha yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren petrilere ekilmiştir. Bu işlem üreme gözlemlenilmeyinceye kadar tekrarlanmıştır. Üremenin görüldüğü en yüksek konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir.

2.2.6. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

Her bir suşun metal içeren ve içermeyen bir gecelik kültürlerinden 100 µL örnek alınarak yine Her bir suş için MİK değerlerine göre belirli konsantrasyonlarda metal içeren 100 mL NB ortamına ekim yapılmıştır. Kültürle 30°C’de çalkalamalı etüvide inkübe edilmiş ve 0. saatten itibaren OD₆₀₀ nm’de, her iki saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı

Bir gecelik kültürlerden 100 µL alınıp her bir suş için ilgili metali içeren ve içermeyen sıvı ortamlara ekim yapıp ekim yapılan ortamlardan her 2 saatte bir 1mL örnek alınıp seyreltme yapıldı seyreltilmiş örnekler plate count agarlara ekilip bir gün beklenerek koloni oluşumu gözlemlendi ve sayıldı [117].

2.2.8. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi

Seçilen Mn11, Mn 12 Li12 ve Zn01 suşlarının tüm yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [95]. Örnekler nutrient agara dört bölgeden oluşan çizgi ekim yapılmış 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üçüncü bölgede gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipidlerin parçalanıp, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine Solüsyon I’den 1 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiştir. 100°C’lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra tekrar vortekslenmiş ve daha sonra tekrar 100°C’lik su banyosunda 25 dakika tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanmış, serbest yağ asitlerine ester bağlarıyla metil eklenmiş ve yağ asit metil esterler elde edilmiştir. Bunun içinse 100°C’lik su banyosundan çıkarılan tüplere Solüsyon II’den 2 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiş ve 80°C’lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında soğutulan tüplerin üzerine

Solüsyon III'den 1.25 mL ilave edilmiş ve 10 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu basamak sonunda tüplerde altta asidik, üstte organik sıvı faz olmak üzere iki faz gözlenmiştir. Tüplerdeki asidik faz pastör pipeti ile uzaklaştırılmış, yağ asit metil esterler asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanmış ve organik faz muhafaza edilmiştir. Son basamakta ise tüplerin üzerine Solüsyon IV'den 3 mL ilave edilmiş ve 5 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Böylece serbest yağ asit metil esterlerinin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Tüplerde gözlenen üst faz pastör pipeti ile 2 mL viellere alınmıştır. Örneklerin yağ asidi analizi gaz kromatografisi (Shimadzu GC-2010) ile gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisinin çalışma prensipleri verilmiştir. Yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları ve toplam yağ asitleri miktarları, analiz edilen örneklerin kromatogramındaki pikleri, standarttaki bütün yağ asitlerinin alıkonma zamanları teşhis edilmiştir.

2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen Mn, Zn, Li dirençli bakterilerin kromozom DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [92].15 mL'lık kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5.7 µL TE tampon eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz-K ve 30 µL RNAaz eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB /NaCl tamponu karışımın üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Aynı hacimde kloroform / izoamil alkol solüsyonu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrede yapılmıştır. Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'de

ki absorbansları hesaplanmış (OD_{260} ve OD_{280}) ve bu değerler arasında ki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. OD_{260}/OD_{280} oranının 1.6 ve 1.8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha yukarıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha aşağıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir [91]. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA'ların miktarlarının hesaplanması için OD_{260} değeri kullanılmış ve DNA miktarları;

$DNA (\mu g/mL) = OD_{260} \times \text{Seyreltme oranı} \times 50$ formülü ile hesaplanmıştır [91].

2.2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Amplifikasyonu

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılacaktır. Diziler (forward) F primer:

5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve (reverse) R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 50 μL PZR karışımı için 1 μL kromozomal DNA (100 ng), 1 μL 16S Forward Primer (20 pmol), 1 μL 16S Reverse Primer (20 pmol), 0,5 μL 5 mM 4 dNTP karışımı, 5 μL 50 mM $MgCl_2$, 5 μL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içermeyen), 31.5 μL steril distile su, 1 μL (2.5U) Taq DNA polymeraz karıştırılıp santrifüjlenecektir [91].

PZR protokolünün optimizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda optimum protokol tespit edilmiş olup tüm örnekler spesifik primerler kullanılarak bu protokole göre PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonunda Çizelge 2.7'de kullanılan DNA, F primer, R primer, dNTP, $MgCl_2$, Taq buffer, Taq DNA Polymerase ve PZR Master Mix miktarları belirtilmiştir. Son hacim steril distile su (water nuclease-free) ile 50 μL 'ye tamamlanmıştır.

Techne TC-Plus marka otomatik termocycler PZR amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Döngüler; 95°C'de 5 dakika denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 30 saniye bağlanma basamağı, 72°C'de 2 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [93].

2.2.11. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünleri Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit ile saflaştırılmıştır. Eppendorf tüplerin içinde bulunan PZR ürünlerinin üzerine 1:1'lik bir hacimde Binding Buffer eklenmiştir. İyice karıştırılıp çözümün rengini kontrol edilmiştir. Sarı renk DNA bağlayıcı için optimum pH'ı göstermektedir. Çözeltinin rengi turuncu ya da mor olursa, 10 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2) çözeltisi ilave edilmelidir. Karışımın rengi tekrar sarıya dönecektir. Karışım filtreli tüpe alınıp 1 dakika 12.500 rpm de santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtrelerin tam ortasına 700 µL Wash Buffer konulmuştur. Tekrardan 1 dakika 12.500 rpm de santrifüj edilmiştir. PZR ürünleri filtre üzerinde tutulmuştur. Altta toplanan sıvı dökülüp tekrardan 12.500 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon filtresinin alt kısmına steril eppendorf yerleştirilmiş ve üzerine 50 µL Elution Buffer ilave edilmiştir. 1 dakika 12.500 rpm de santrifüj edilmiştir. Kolon filtresi atılmış ve saflaştırılan PZR ürünleri eppendorfta toplanmıştır.

2.2.12 PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

%0.7'lik agaroz jel hazırlamak için 0.35 g agaroz tartılıp 50 mL 1x TBE tamponu ile çözüldükten sonra mikrodalga fırında ısıtılarak eritilmiştir. Jel yatağına önceden tarak yerleştirilmiş ve yatak su terazisi ile dengeye getirilmiştir. Çözelti yaklaşık 45-50°C'ye kadar soğutulmuş ve jel yatağına dökülmüştür. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice alınmış, jel yatağı örneklerin yürüyeceği içinde tampon çözeltinin bulunduğu elektroforez tankına aparat yerleştirilmiştir. Her bir örnekten 6 µL alınarak 2 µL 6X Orange Loading Dye ile boyanmıştır. DNA örnekleri mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder yüklenmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu eklenmiştir. 80 V/cm² voltaj ve 40 mA amper uygulanarak yaklaşık 45 dakikada yürütme işlemi tamamlanmıştır.

2.2.13. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0,5 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromür boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası 1 mM MgSO₄ ile 15 dakika muamele edilerek geri alınmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

2.2.14. DNA Sekans Analizi

İzole edilen Mn 11, Mn 12 Li 12 ve Zn 01 suşlarının 16S rDNA gen sekansları yapılacaktır. Saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Gelen nükleotid dizilerinin, çift yönlü dizi analizi ile 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuştur.

2.2.15. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

İzole edilen gümüş dirençli bakterilerin 16S rDNA gen sekans dizileri Clustal Multiple Alignment Program (ClustalW 2.0) kullanılarak dizinler oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları, Mega 5.1 programında komşu bağlantı (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir.

2.2.16. Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Her bir suş için belirlenen mik değerleri kadar metal içeren, Mn11 kodlu suş için 16, Mn12 kodlu suş için 15, Zn01 kodlu suş için 14, Li12 kodlu suş için 21 tane sıvı besi yeri hazırlandı. Besiyerlerine bir gecelik kültürlerden 100µL konuldu ve 30°C sıcaklıkta çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Sırasıyla her iki saatte bir besi

yerlerinden birisi alınıp 20 dakika, 4000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırıldı. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülerek bakterinin stationary fazına kadar ki bisorpsiyon yeteneği değeriendirildi [116].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bakterilerin İzolasyonu

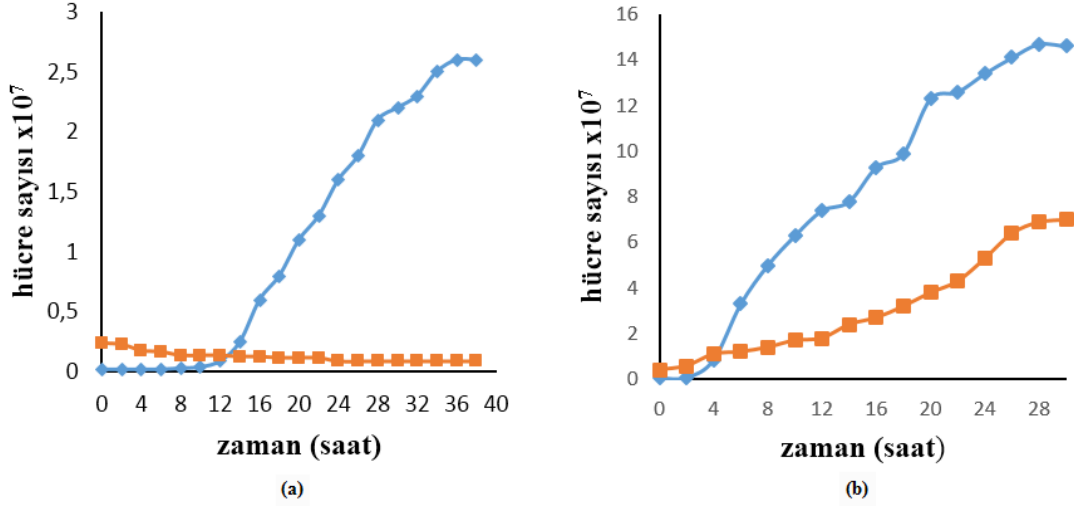
Laboravtuarımız tarafından daha önce yapılan çalışmalar [96,97] ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan mangan, çinko ve lityum dirençli suşlar izole edilmiş ve suşlar dirençli oldukları metalleri ve izole edildikleri lokasyonu temsil edecek şekilde kodlanarak kültüre alınmıştır. Mangan dirençli olan iki suş sırasıyla Mn12 ve Mn11, çinko dirençli olan suş Zn01 ve lityum dirençli olan suş ise Li12 olarak kodlanmıştır.

3.2. Bakterilerin Optimum Üreme Koşulları

İzole edilmiş olan suşlar optimum üreme koşullarının belirlenmesi amacıyla değişik pH'larda üreme eğrileri çıkartılmıştır.

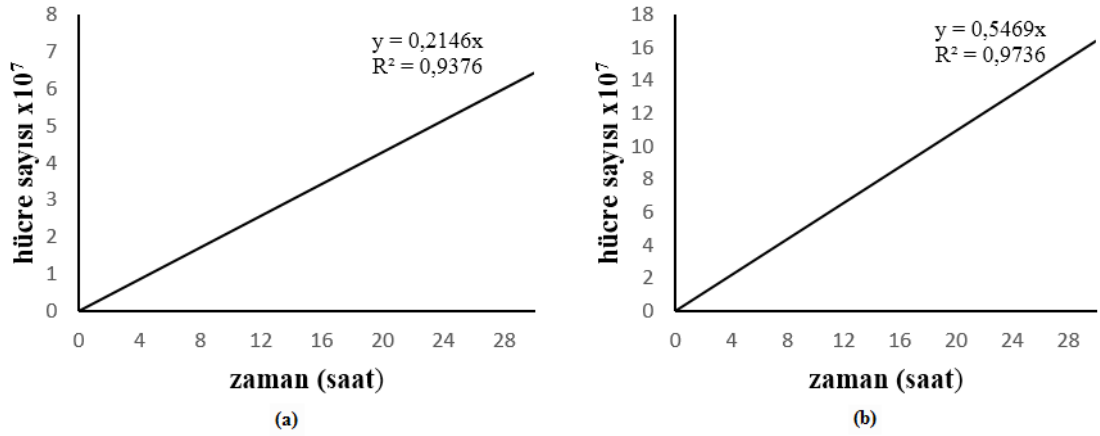
3.2.1. Mn12 Kodlu Suşun Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Mn12 kodlu suş pH 7'de 28 saatlik bir inkübasyon sonrasında mangan içeren ortamda 6.9×10^7 , mangan içermeyen ortamda ise 14.7×10^7 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Mangan varlığında, hücre sayısı ve OD'de pH 7'de %50 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.1.). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Mn 12 kodlu suşun pH 6 (a) ve pH 7'de ki (b) üreme eğrisi

—■— Mn içeren, —●— Mn içermeyen ortam

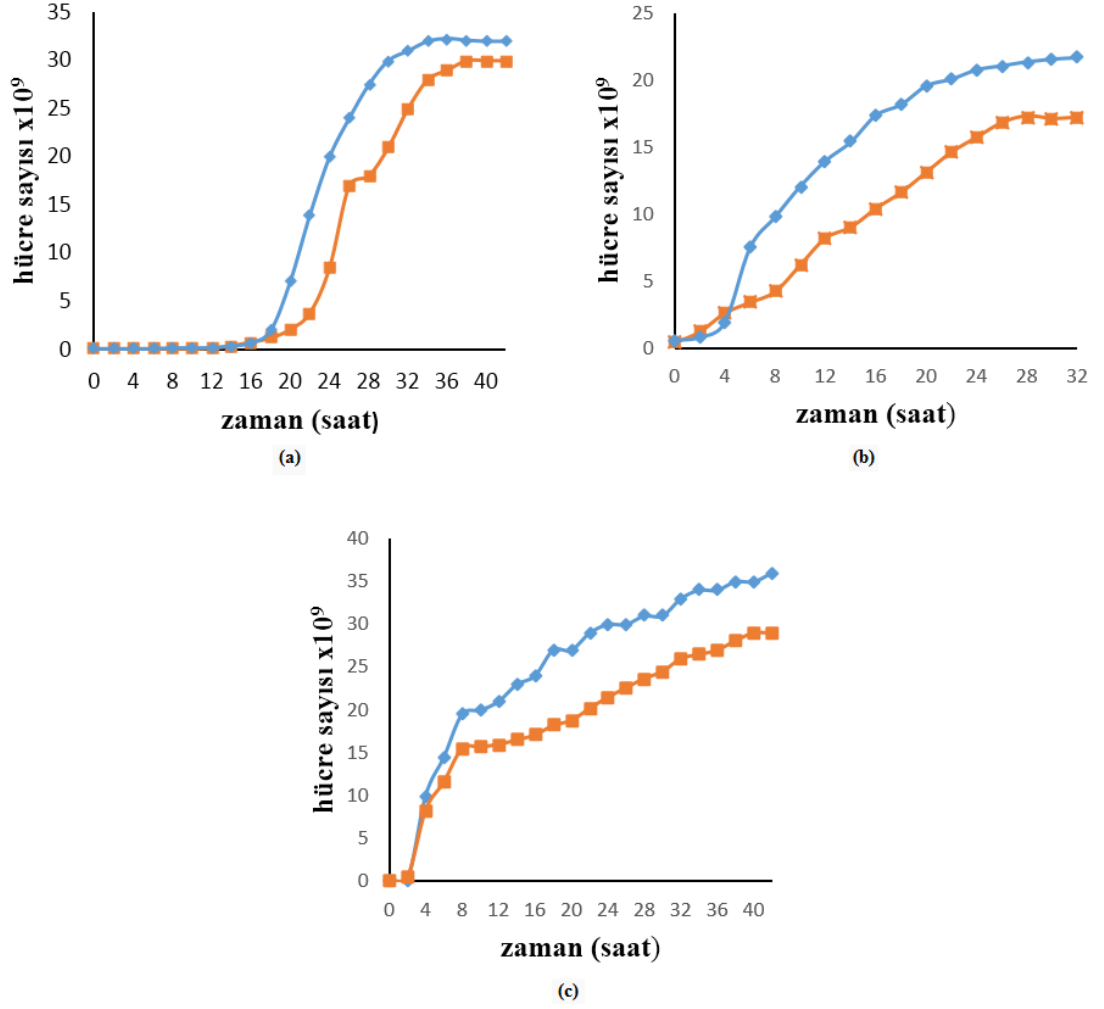


Şekil 3.2. Mn12 kodlu suşun pH 7'de ki mangan içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.2. Mn11 Kodlu Suşun Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

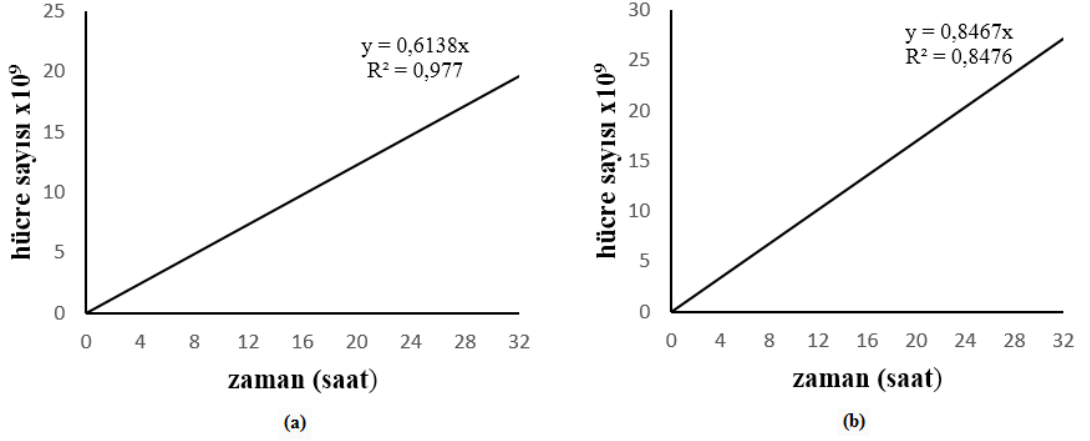
Mn11 kodlu suş pH 9'de 40 saatlik bir inkübasyon sonrasında mangan içeren ortamda 29×10^9 , mangan içermeyen ortamda ise 35×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Mangan varlığında, hücre sayısı ve OD'de pH 9'de %14 oranında bir

düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.3.). pH 7’de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.3. Mn 11 kodlu suşun pH 6 (a), pH 7 (b), pH 9’da ki (c) üreme eğrisi

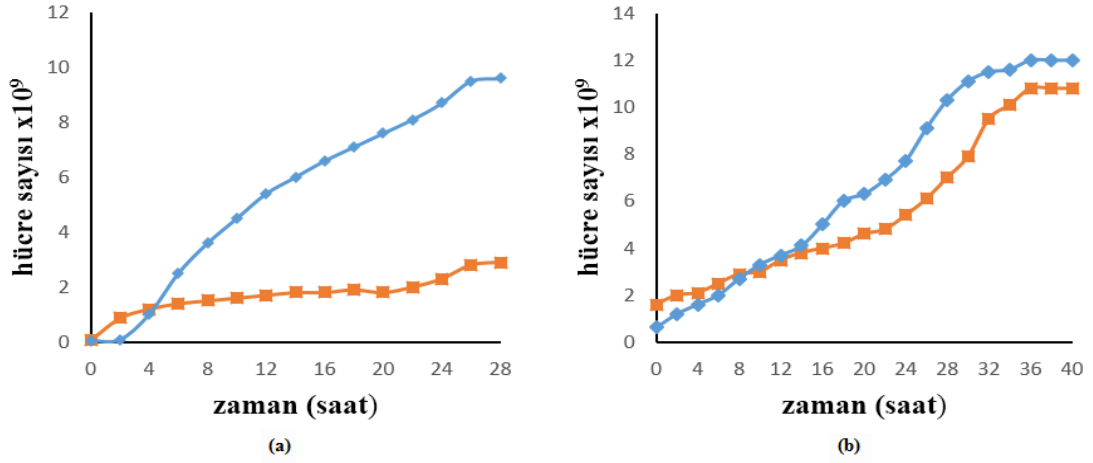
—■— Mn içeren —◆— Mn içermeyen ortam



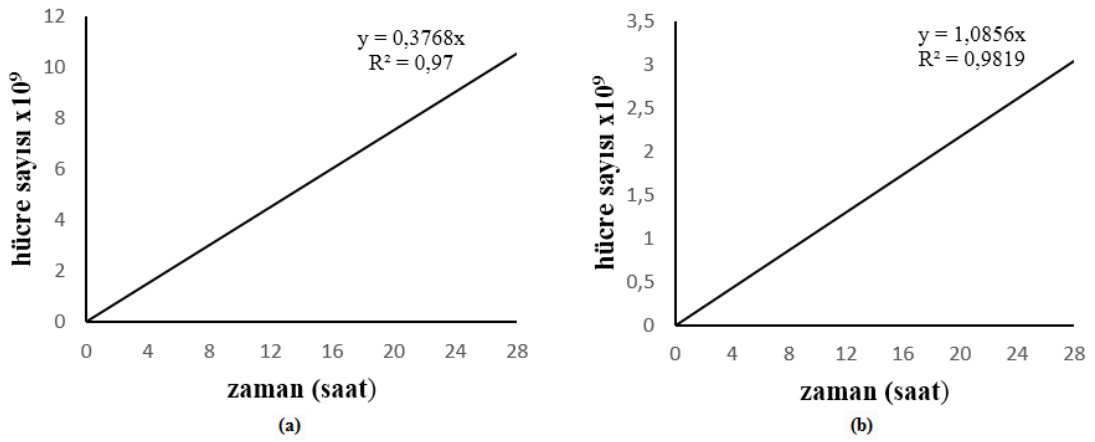
Şekil 3.4. Mn11 kodlu suşun pH 7’de ki mangan içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.3. Zn01 Kodlu Suşun Değişik pH’larda ki Üreme Eğrileri

Zn01 kodlu suş pH 9’de 36 saatlik bir inkübasyon sonrasında çinko içeren ortamda 10.8×10^9 , çinko içermeyen ortamda ise 12×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Çinko varlığında, hücre sayısı ve OD’de pH 7’de %16 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.5.). pH 7’de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri şekil 3.6’de verilmiştir.



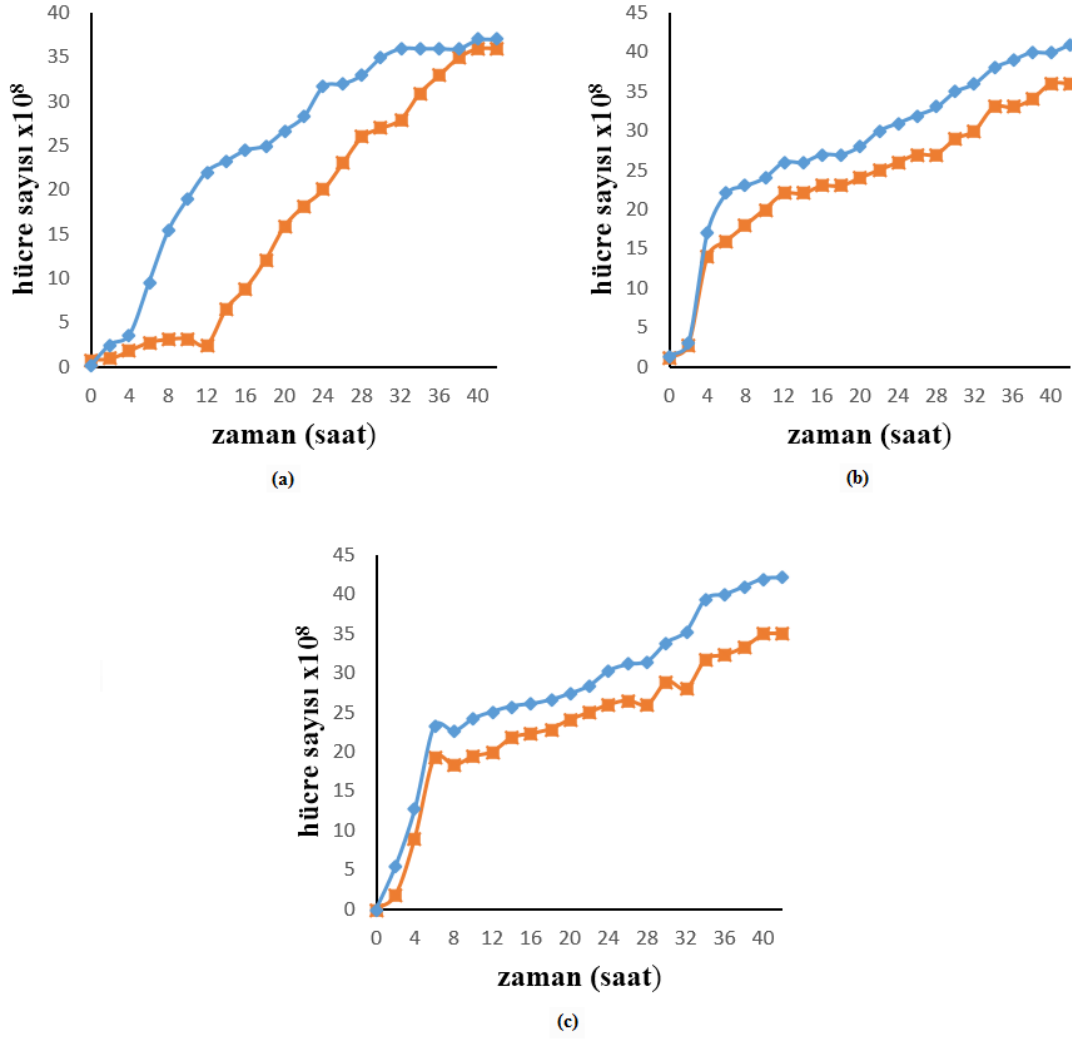
Şekil 3.5. Zn01 kodlu suşun pH 7 (a) ve pH 9'da ki (b) üreme eğrisi
 —■— Zn içeren, —●— Zn içermeyen ortam



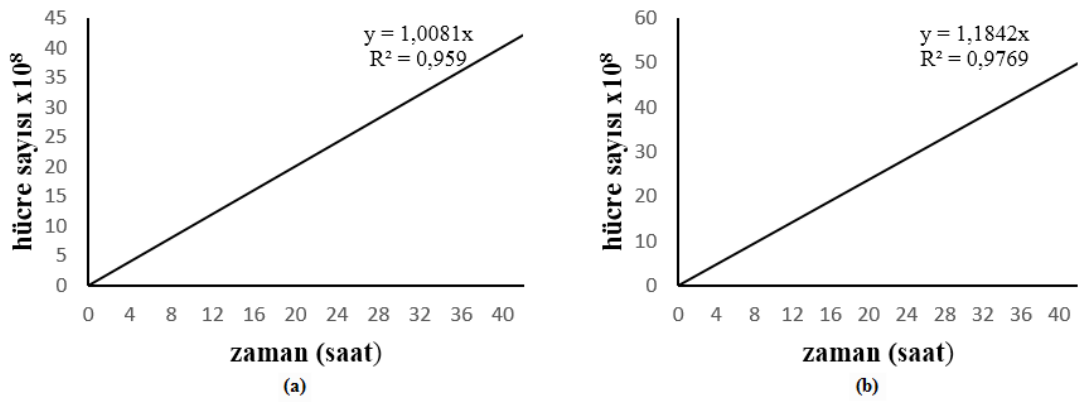
Şekil 3.6. Zn01 kodlu suşun pH 7'de ki çinko içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.4. Li12 Kodlu Suşun Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Li12 kodlu suş pH 9'de 38 saatlik bir inkübasyon sonucunda lityum içeren ortamda 35×10^7 , lityum içermeyen ortamda ise 42×10^7 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. lityum varlığında, hücre sayısı ve OD değerinde pH 7'de %14 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.7.). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Li2 kodlu suşun pH 6 (a), pH 7 (b), pH 9’da ki (c) üreme eğrisi
 —■— Li içeren, —◆— Li içermeyen ortam



Şekil 3.8. Li2 kodlu suşun pH 7’de ki lityum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.3. Bakterilerin Tanımlanması

Uygun kültür şartları belirlenen yağ asidi analizi ile tanımlamaları yapılmış ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak tanımlanmıştır

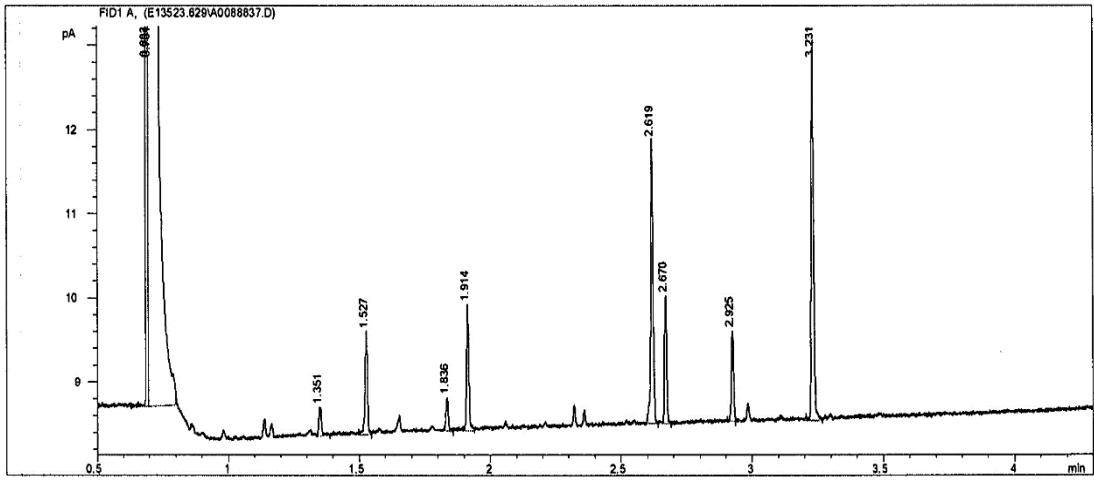
3.3.1. Yağ Asidi Analizi ile Tanımlama

3.3.1.1. Mn12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Mn12 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile çizelge 3.1’de ve GC kromotogramı Şekil 3.9’da verilmiştir. Mn12 kodlu suşun yağ asidi profilinin %30.8 oranında C_{18:1} w9c, %11.26 oranında C_{12:0} 3OH, %10.46 oranında C_{12:0} içerdiği belirlenmiştir. %23.84 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Mn12 kodlu suş 0.139 SI değeri ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. Mn12 kodlu suş a ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6929	325450	0.004	----	6.6908		----	< min rt	
0.7012	9.53E+8	0.016	----	6.7525	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.3505	463	0.010	1.115	11.1778	10:0 2OH	3.24	ECL deviates 0.000	
1.5272	1566	0.009	1.064	12.0000	12:0	10.46	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
1.8358	496	0.009	1.006	13.2046	12:0 2OH	3.13	ECL deviates 0.001	
1.9141	1804	0.009	0.994	13.4836	12:0 3OH	11.26	ECL deviates 0.001	
2.6190	4081	0.009	0.931	15.8352	Sum In Feature 3	23.84	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6703	1702	0.008	0.928	16.0000	16:0	9.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
2.9253	1278	0.009	0.917	16.8123	17:1 w8c	7.36	ECL deviates -0.003	
3.2314	5403	0.010	0.908	17.7892	18:1 w9c	30.80	ECL deviates -0.005	
----	4081	---	----	----	Summed Feature 3	23.84	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c



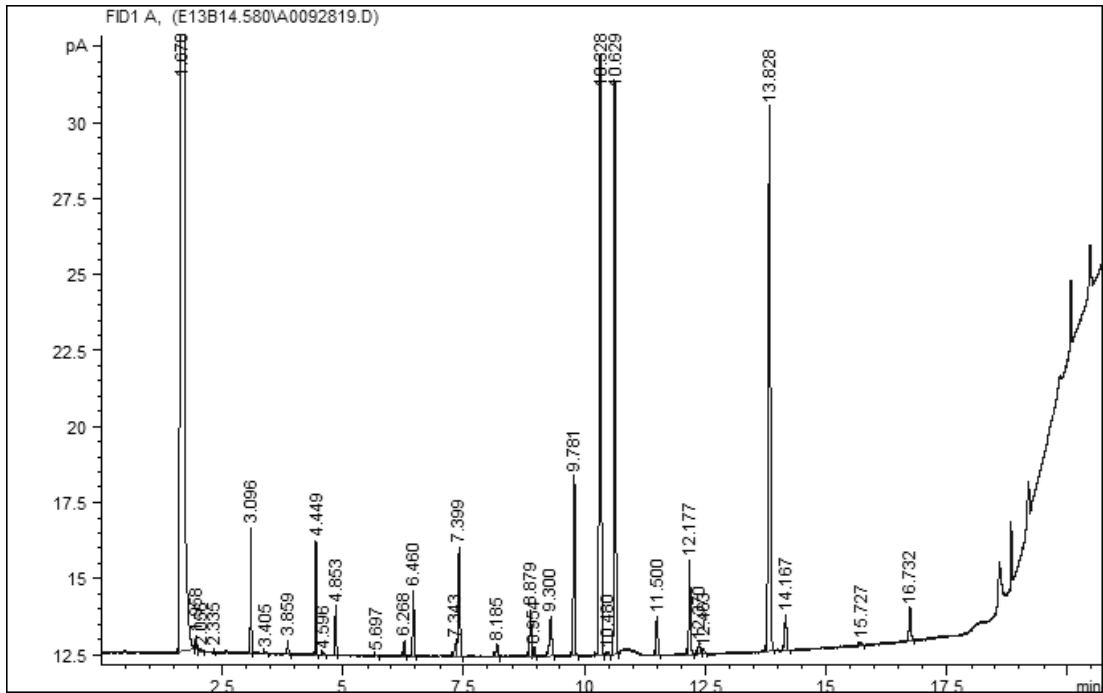
Şekil 3.9. Mn12 kodlu suş a ait GC kromotogramı

3.3.1.2. Mn11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Mn11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile çizelge 3.2.'te ve GC kromotogramı Şekil 3.10'te verilmiştir. Mn11 kodlu suş %24.1 oranında C_{18:1} w7c, %32.61 oranında C_{16:0} içermektedir. %25.1 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Mn11 kodlu suşun 0.639 SI değeri ile *Enterobacter cloacae* ile eşleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Mn11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.805E+8	0.026	----	7.010	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.788	5613	0.020	----	7.224		----	< min rt	
1.958	1213	0.025	----	7.555		----	< min rt	
2.054	244	0.023	----	7.742		----	< min rt	
2.605	710	0.026	----	8.815		----	< min rt	
3.095	7812	0.020	----	9.770		----		
4.448	12459	0.026	----	11.567		----		
4.597	290	0.024	----	11.727		----		
5.568	415	0.037	1.007	12.614	13:0 ISO	0.17	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
5.690	509	0.043	----	12.719		----		
6.458	9911	0.030	----	13.319		----		
6.874	2813	0.038	0.960	13.619	14:0 ISO	1.10	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.013	205	0.022	0.957	13.719	14:0 ANTEISO	0.08	ECL deviates 0.012	
7.401	497	0.035	0.947	13.999	14:0	0.19	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
8.368	14919	0.039	0.931	14.623	15:0 ISO	5.63	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.511	115704	0.038	0.929	14.715	15:0 ANTEISO	43.59	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
8.879	8157	0.034	0.924	14.952	unknown 14.959	3.06	ECL deviates -0.007	
10.005	7113	0.041	0.915	15.627	16:0 ISO	2.64	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
10.629	3949	0.043	0.912	15.999	16:0	1.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.500	7363	0.039	0.909	16.500	15:0 3OH	2.72	ECL deviates -0.003	
11.724	13993	0.041	0.909	16.630	17:0 ISO	5.16	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.886	48472	0.046	0.909	16.722	17:0 ANTEISO	17.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
12.369	557	0.039	0.909	17.001	17:0	0.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
13.484	4093	0.045	0.910	17.631	18:0 ISO	1.51	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
14.042	508	0.038	----	17.947		----		
14.138	19489	0.057	0.912	18.001	18:0	7.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
15.247	4087	0.046	0.915	18.633	19:0 ISO	1.52	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
15.417	8540	0.045	0.915	18.730	19:0 ANTEISO	3.17	ECL deviates -0.001	
15.893	840	0.042	0.917	19.002	19:0	0.31	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
16.734	6766	0.041	----	19.485		----		
16.996	510	0.041	0.919	19.636	20:0 ISO	0.19	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
17.626	5969	0.054	0.920	19.998	20:0	2.23	ECL deviates -0.002	Reference -0.005



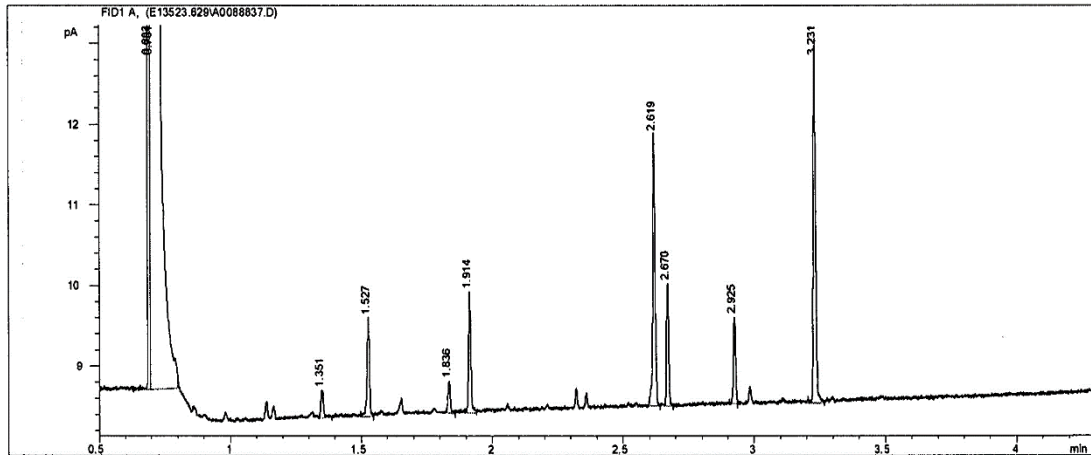
Şekil 3.10 Mn11 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.1.3. Zn01 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Zn01 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile çizelge 3.3'de ve GC kromotogramı Şekil 3.9'da verilmiştir. Zn01 kodlu suşun yağ asidi profilinin %30.8 oranında C_{18:1} w9c, %11.26 oranında C_{12:0} 3OH, %10.46 oranında C_{12:0} içerdiği belirlenmiştir. %23.84 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Zn01 kodlu suş 0.139 SI değeri ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.3. Zn10 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6929	325450	0.004	----	6.6908		----	< min rt	
0.7012	9.53E+8	0.016	----	6.7525	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.3505	463	0.010	1.115	11.1778	10:0 2OH	3.24	ECL deviates 0.000	
1.5272	1566	0.009	1.064	12.0000	12:0	10.46	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
1.8358	496	0.009	1.006	13.2046	12:0 2OH	3.13	ECL deviates 0.001	
1.9141	1804	0.009	0.994	13.4836	12:0 3OH	11.26	ECL deviates 0.001	
2.6190	4081	0.009	0.931	15.8352	Sum In Feature 3	23.84	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6703	1702	0.008	0.928	16.0000	16:0	9.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
2.9253	1278	0.009	0.917	16.8123	17:1 w8c	7.36	ECL deviates -0.003	
3.2314	5403	0.010	0.908	17.7892	18:1 w9c	30.80	ECL deviates -0.005	
----	4081	---	----	----	Summed Feature 3	23.84	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c



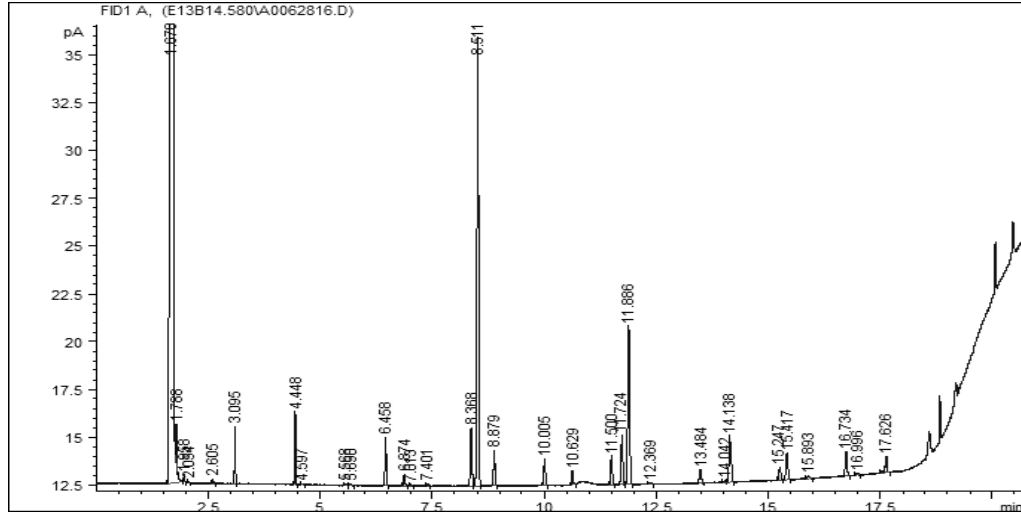
Şekil 3.11. Zn10 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.1.4. Li12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Li12 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile çizelge 3.4.'te ve GC kromotogramı Şekil 3.12'te verilmiştir. Li12 kodlu suşun yağ asidi profilinin %43.59 oranında C_{15:0} anteiso, %17.87 oranında C_{17:0} anteiso içerdiği belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Li12 kodlu suşun 0.202 SI değeri ile *Bacillus atrophaeus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.4. Li12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.805E+8	0.026	----	7.010	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.788	5613	0.020	----	7.224		----	< min rt	
1.958	1213	0.025	----	7.555		----	< min rt	
2.054	244	0.023	----	7.742		----	< min rt	
2.605	710	0.026	----	8.815		----	< min rt	
3.095	7812	0.020	----	9.770		----		
4.448	12459	0.026	----	11.567		----		
4.597	290	0.024	----	11.727		----		
5.568	415	0.037	1.007	12.614	13:0 ISO	0.17	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
5.690	509	0.043	----	12.719		----		
6.458	9911	0.030	----	13.319		----		
6.874	2813	0.038	0.960	13.619	14:0 ISO	1.10	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.013	205	0.022	0.957	13.719	14:0 ANTEISO	0.08	ECL deviates 0.012	
7.401	497	0.035	0.947	13.999	14:0	0.19	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
8.368	14919	0.039	0.931	14.623	15:0 ISO	5.63	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.511	115704	0.038	0.929	14.715	15:0 ANTEISO	43.59	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
8.879	8157	0.034	0.924	14.952	unknown 14.959	3.06	ECL deviates -0.007	
10.005	7113	0.041	0.915	15.627	16:0 ISO	2.64	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
10.629	3949	0.043	0.912	15.999	16:0	1.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.500	7363	0.039	0.909	16.500	15:0 3OH	2.72	ECL deviates -0.003	
11.724	13993	0.041	0.909	16.630	17:0 ISO	5.16	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.886	48472	0.046	0.909	16.722	17:0 ANTEISO	17.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
12.369	557	0.039	0.909	17.001	17:0	0.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
13.484	4093	0.045	0.910	17.631	18:0 ISO	1.51	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
14.042	508	0.038	----	17.947		----		
14.138	19489	0.057	0.912	18.001	18:0	7.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
15.247	4087	0.046	0.915	18.633	19:0 ISO	1.52	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
15.417	8540	0.045	0.915	18.730	19:0 ANTEISO	3.17	ECL deviates -0.001	
15.893	840	0.042	0.917	19.002	19:0	0.31	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
16.734	6766	0.041	----	19.485		----		
16.996	510	0.041	0.919	19.636	20:0 ISO	0.19	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
17.626	5969	0.054	0.920	19.998	20:0	2.23	ECL deviates -0.002	Reference -0.005



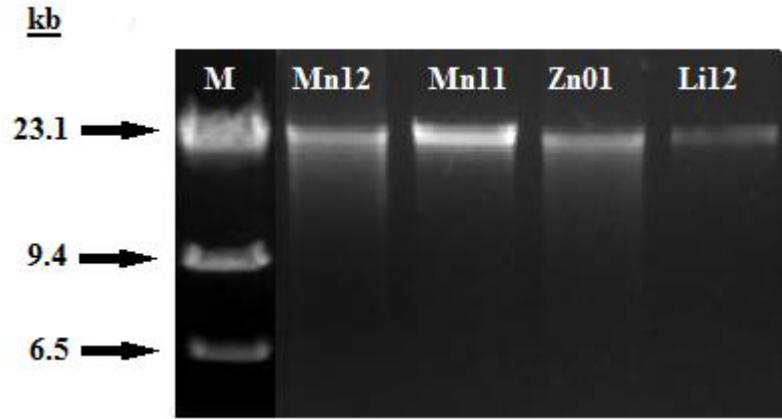
Şekil 3.12. Li12 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi

Yağ asidi analizinden elde edilen bulguları doğrulamak amacıyla bakteriler 16S rRNA sekans analizi kullanılarak da tanımlanmıştır. Bu amaçla bakterilerden kromozomal DNA izole edilmiş, PZR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. 16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, Naitonal Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır.

3.3.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu

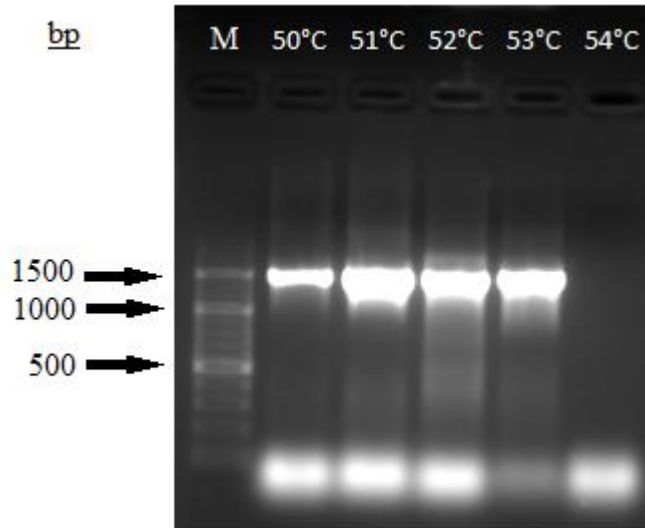
PZR amplifikasyonu öncesi izole edilmiş suşlardan kromozomal DNA izolasyonu yapılmış ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek incelenmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Kromozomal DNA analizi

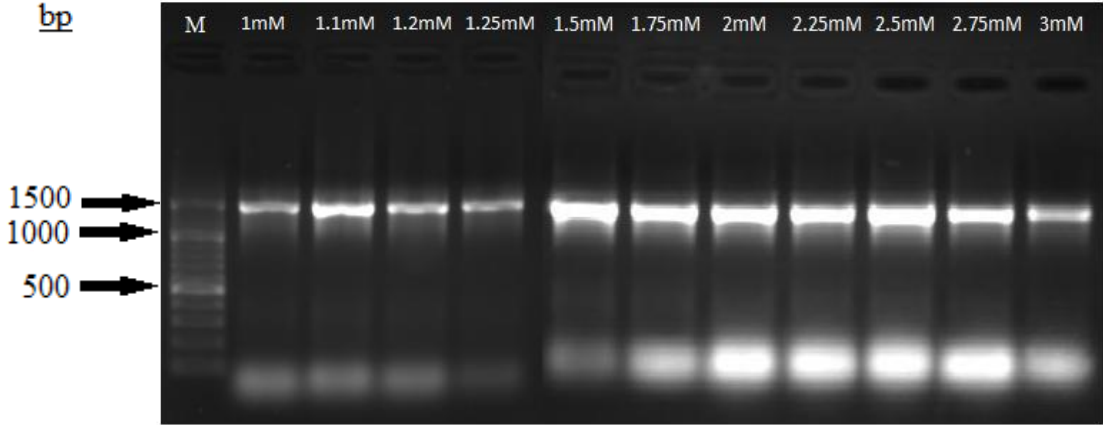
3.3.2.2. Mn12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.14'de Mn12 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 53°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.14. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Mn12 kodlu suşa ait PZR ürünleri
Marker (M)

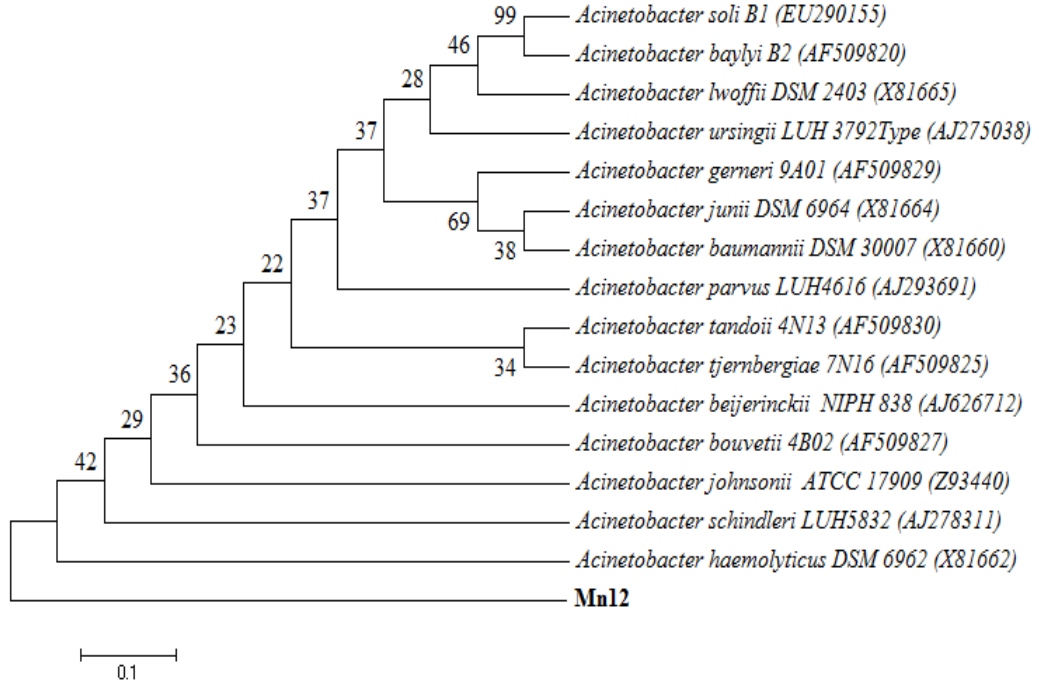
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.15’de Mn 12 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 1.25 mM seçilmiştir.



Şekil 3.15. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Mn12 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.3. Mn12 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Mn12 kodlus suşun %99 oranında *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962 (X81662) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Mn12 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.16’te görüldüğü gibi Mn12 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.16. Mn12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

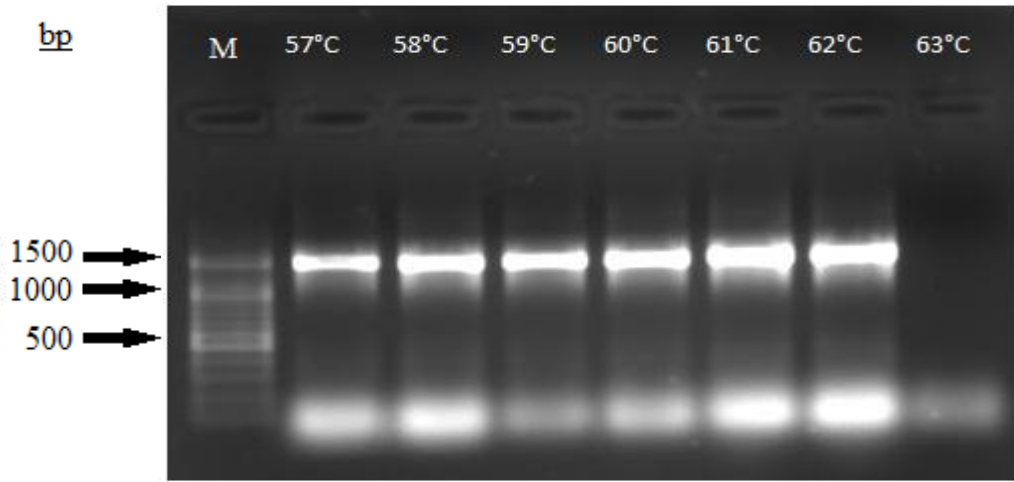
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.1 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). Filogenetik analizler sonucunda Zn01 kodlu suşa en yakın tür *Acinetobacter haemolyticus* en uzak tür ise *Acinetobacter gerneri* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5. Mn12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Mn12															
2. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1,140														
3. <i>Acinetobacter bouveti</i>	1,152	0,020													
4. <i>Acinetobacter beijerinckii</i>	1,160	0,019	0,007												
5. <i>Acinetobacter johnsonii</i>	1,145	0,015	0,007	0,010											
6. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,197	0,032	0,022	0,019	0,023										
7. <i>Acinetobacter parvus</i>	1,156	0,030	0,020	0,019	0,020	0,032									
8. <i>Acinetobacter schindleri</i>	1,151	0,024	0,016	0,023	0,016	0,033	0,030								
9. <i>Acinetobacter ursingii</i>	1,172	0,034	0,025	0,022	0,026	0,030	0,028	0,040							
10. <i>Acinetobacter junii</i>	1,154	0,030	0,028	0,026	0,024	0,036	0,018	0,031	0,030						
11. <i>Acinetobacter baumannii</i>	1,169	0,035	0,024	0,027	0,027	0,032	0,019	0,030	0,030	0,011					
12. <i>Acinetobacter soli</i>	1,192	0,041	0,031	0,033	0,034	0,025	0,022	0,041	0,029	0,025	0,019				
13. <i>Acinetobacter tandoii</i>	1,171	0,029	0,016	0,020	0,021	0,037	0,023	0,030	0,031	0,033	0,030	0,036			
14. <i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	1,174	0,035	0,024	0,026	0,026	0,040	0,030	0,034	0,040	0,043	0,038	0,045	0,031		
15. <i>Acinetobacter baylyi</i>	1,198	0,046	0,037	0,040	0,042	0,030	0,029	0,049	0,035	0,032	0,026	0,011	0,039	0,045	
16. <i>Acinetobacter gernerii</i>	1,182	0,038	0,040	0,040	0,038	0,043	0,038	0,041	0,040	0,024	0,025	0,037	0,044	0,049	0,038

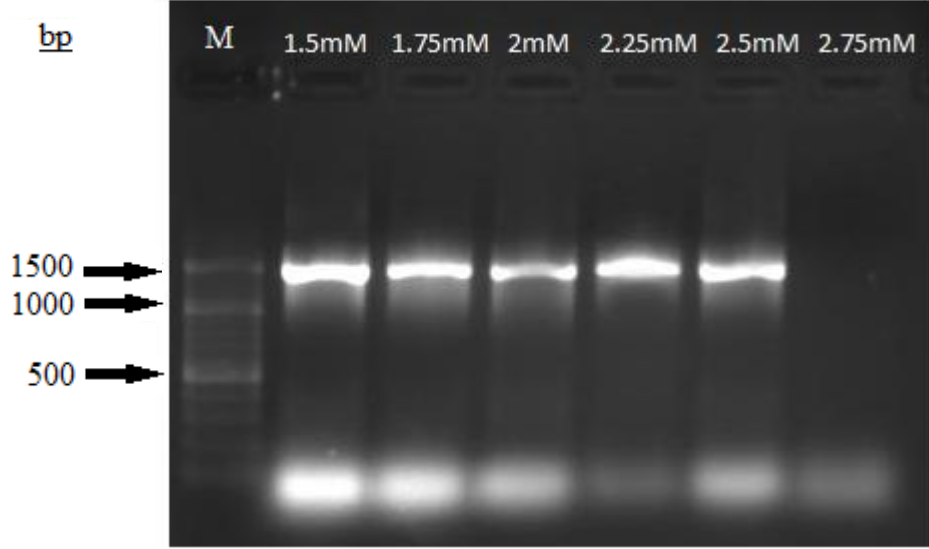
3.3.2.4. Mn11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.17'de Mn11 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 59°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.17. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Mn11 kodlu suşa ait PZR ürünleri
Marker (M)

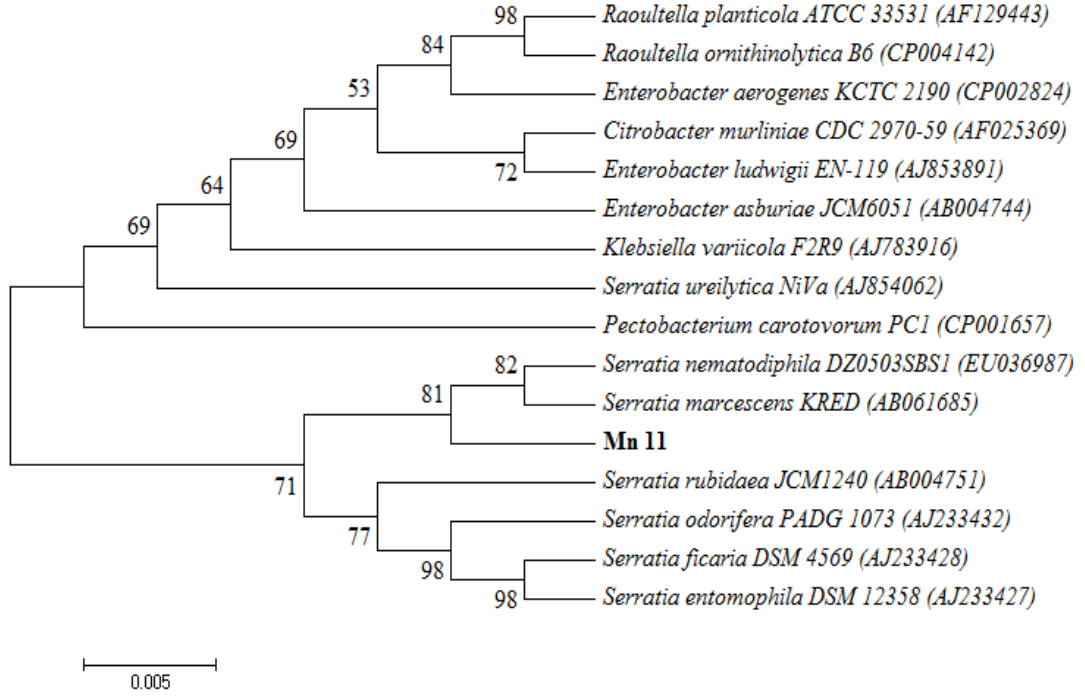
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.18'de Mn11 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 2.25 mM seçilmiştir



Şekil 3.18. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Mn 11 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.5. Mn11 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Mn11 kodlu suşun %99 oranında *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1 (EU036987) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Mn11 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.19'te görüldüğü gibi Mn11 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.19. Mn11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

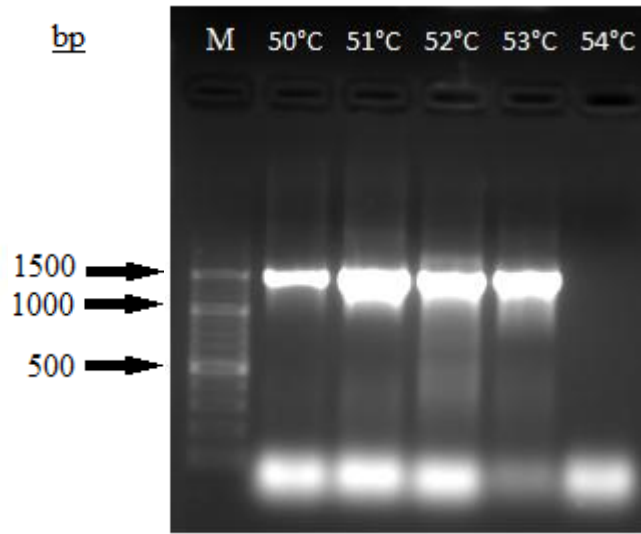
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.1 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). Filogenetik analizler sonucunda Zn01 kodlu suşa en yakın tür *Serratia nematodiphila* en uzak tür ise *Klebsiella variicola* olduğu tespit edilmiştir

Çizelge 3.6. Mn11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Mn11															
2. <i>Serratia nematodiphila</i>	0,006														
3. <i>Serratia marcescens</i>	0,006	0,001													
4. <i>Serratia ureilytica</i>	0,015	0,014	0,014												
5. <i>Serratia ficaria</i>	0,026	0,022	0,021	0,035											
6. <i>Serratia entomophila</i>	0,026	0,022	0,021	0,035	0,007										
7. <i>Serratia odorifera</i>	0,024	0,021	0,021	0,034	0,018	0,019									
8. <i>Raoultella planticola</i>	0,024	0,021	0,023	0,024	0,037	0,037	0,037								
9. <i>Serratia rubidaea</i>	0,027	0,023	0,023	0,034	0,035	0,034	0,032	0,042							
10. <i>Enterobacter asburiae</i>	0,025	0,021	0,021	0,018	0,038	0,036	0,032	0,021	0,041						
11. <i>Citrobacter murlinae</i>	0,027	0,025	0,025	0,017	0,046	0,046	0,040	0,017	0,043	0,018					
12. <i>Enterobacter aerogenes</i>	0,027	0,024	0,026	0,018	0,040	0,039	0,040	0,007	0,044	0,013	0,011				
13. <i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,027	0,024	0,025	0,031	0,033	0,035	0,032	0,030	0,043	0,034	0,037	0,033			
14. <i>Raoultella ornithinolytica</i>	0,028	0,025	0,027	0,024	0,037	0,037	0,040	0,005	0,046	0,023	0,019	0,010	0,034		
15. <i>Enterobacter ludwigii</i>	0,027	0,024	0,026	0,018	0,043	0,044	0,042	0,019	0,045	0,013	0,011	0,013	0,033	0,021	
16. <i>Klebsiella variicola</i>	0,027	0,021	0,023	0,024	0,040	0,039	0,038	0,024	0,042	0,020	0,024	0,019	0,029	0,024	0,024

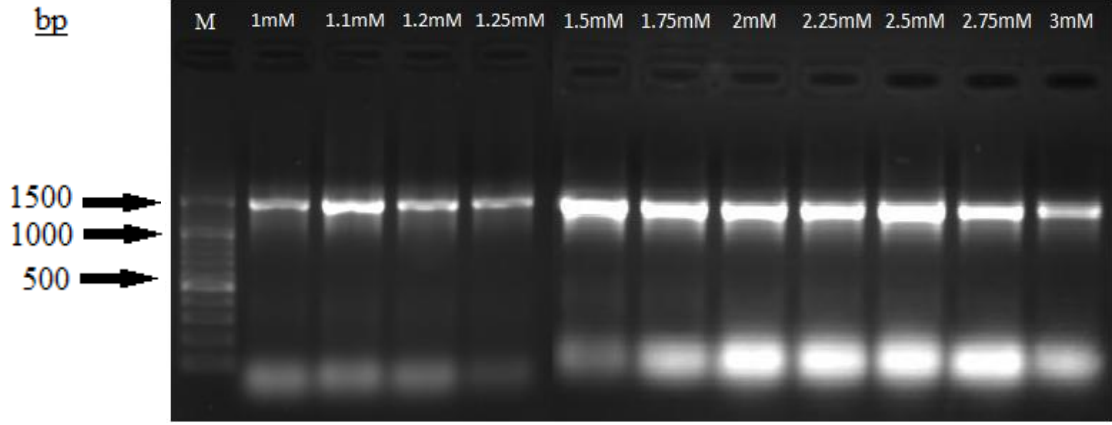
3.3.2.6. Zn01 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.20'de Zn01 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 53°C olduğu görülmektedir



Şekil 3.20. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Zn01 kodlu suşa ait PZR ürünleri Marker (M)

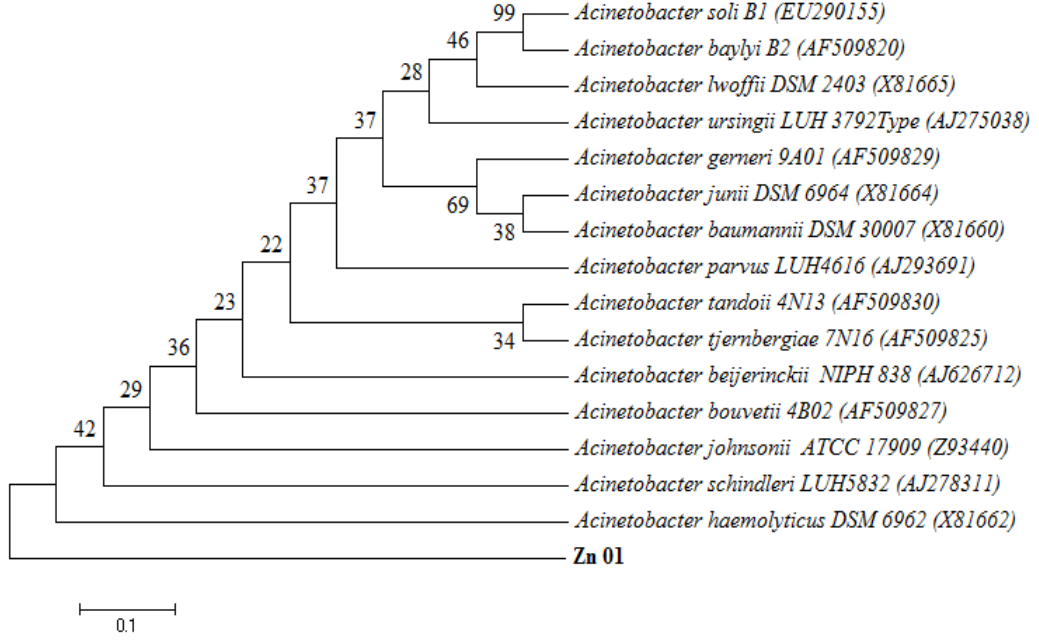
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.21'de Zn01 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 1.25 mM seçilmiştir



Şekil 3.21. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Zn01 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.7. Zn01 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Zn01 kodlu suşun %99 oranında *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962 (X81662) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Zn01 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.22'de görüldüğü gibi Zn01 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.22. Zn01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

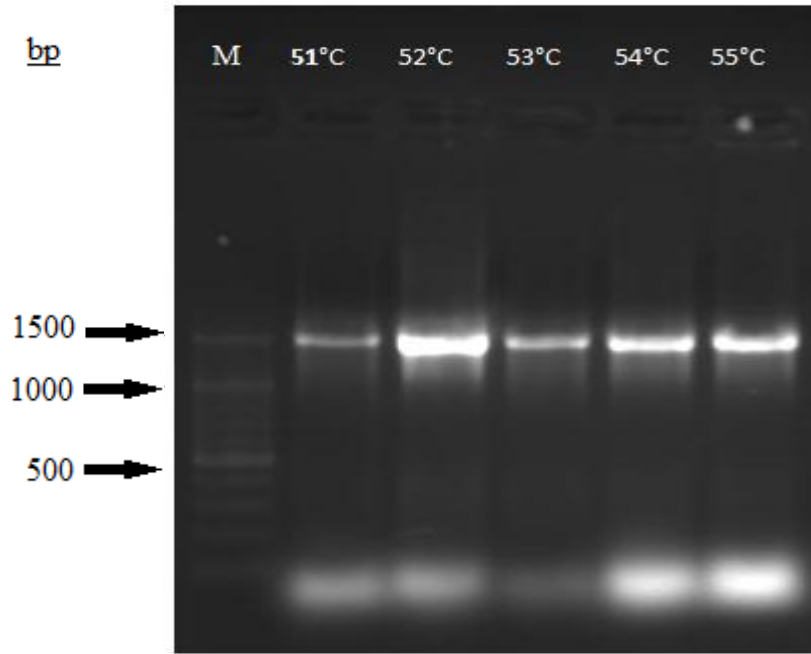
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.1 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.7). Filogenetik analizler sonucunda Zn01 kodlu suşa en yakın tür *Acinetobacter haemolyticus* en uzak tür ise *Acinetobacter gerneri* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.7. Zn01 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Zn01															
2. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1,140														
3. <i>Acinetobacter bouveti</i>	1,152	0,020													
4. <i>Acinetobacter beijerinckii</i>	1,160	0,019	0,007												
5. <i>Acinetobacter johnsonii</i>	1,145	0,015	0,007	0,010											
6. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,197	0,032	0,022	0,019	0,023										
7. <i>Acinetobacter parvus</i>	1,156	0,030	0,020	0,019	0,020	0,032									
8. <i>Acinetobacter schindleri</i>	1,151	0,024	0,016	0,023	0,016	0,033	0,030								
9. <i>Acinetobacter ursingii</i>	1,172	0,034	0,025	0,022	0,026	0,030	0,028	0,040							
10. <i>Acinetobacter junii</i>	1,154	0,030	0,028	0,026	0,024	0,036	0,018	0,031	0,030						
11. <i>Acinetobacter baumannii</i>	1,169	0,035	0,024	0,027	0,027	0,032	0,019	0,030	0,030	0,011					
12. <i>Acinetobacter soli</i>	1,192	0,041	0,031	0,033	0,034	0,025	0,022	0,041	0,029	0,025	0,019				
13. <i>Acinetobacter tandoii</i>	1,171	0,029	0,016	0,020	0,021	0,037	0,023	0,030	0,031	0,033	0,030	0,036			
14. <i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	1,174	0,035	0,024	0,026	0,026	0,040	0,030	0,034	0,040	0,043	0,038	0,045	0,031		
15. <i>Acinetobacter baylyi</i>	1,198	0,046	0,037	0,040	0,042	0,030	0,029	0,049	0,035	0,032	0,026	0,011	0,039	0,045	
16. <i>Acinetobacter gernerii</i>	1,182	0,038	0,040	0,040	0,038	0,043	0,038	0,041	0,040	0,024	0,025	0,037	0,044	0,049	0,038

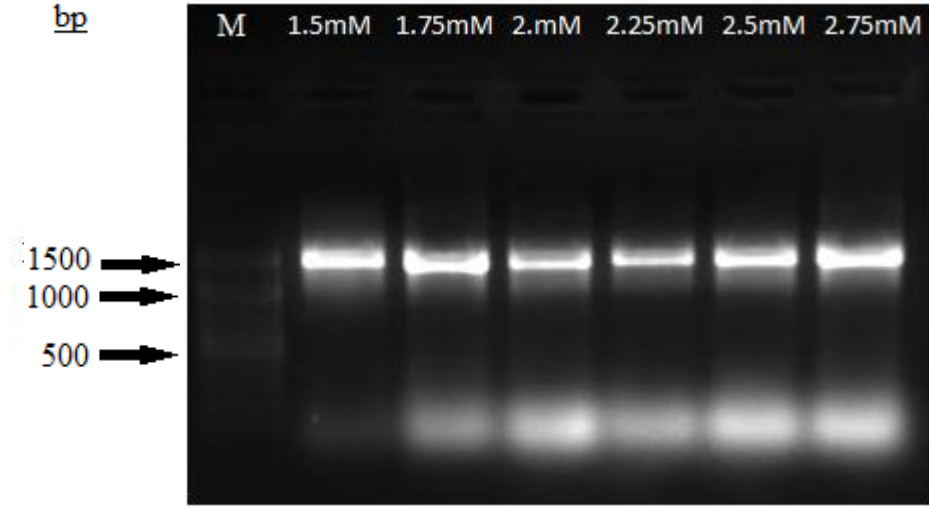
3.3.2.8. Li12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.23.'de Li12 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 53°C olduğu görülmektedir



Şekil 3.23. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Li12 kodlu suşa ait PZR ürünleri; Marker (M)

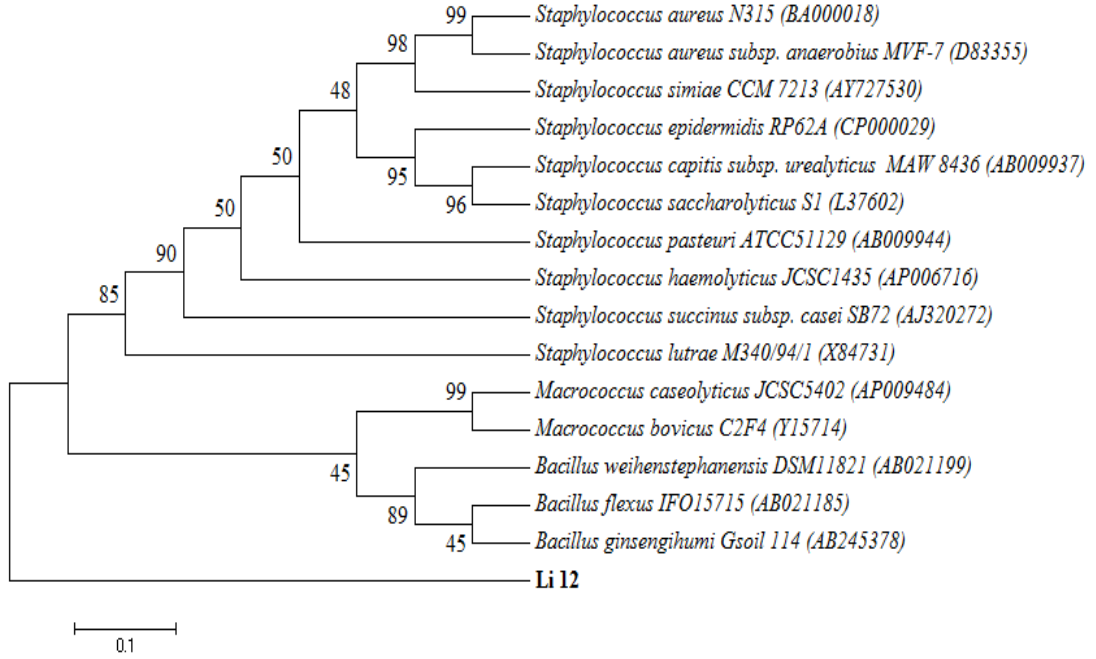
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.24'de Li12 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 1.5 mM seçilmiştir



Şekil 3.24. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Li12 suşuna ait PZR ürünleri;
Marker (M)

3.3.2.9. Li12 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Li12 kodlu suşun %99 oranında *Staphylococcus aureus* N315 (BA000018) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Li12 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.25'te görüldüğü gibi Li12 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur



Şekil 3.25. Li12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

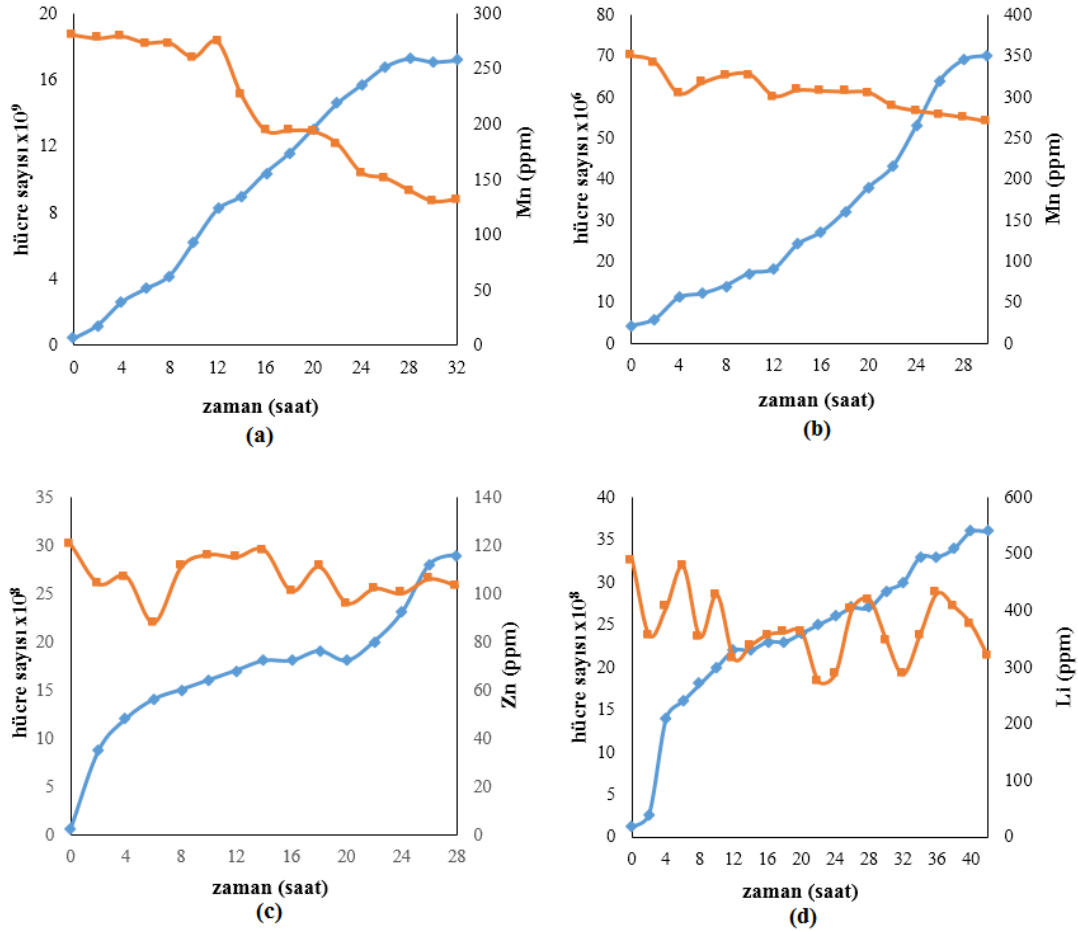
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.1 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Filogenetik analizler sonucunda Li12 kodlu suşa en yakın tür *Staphylococcus aureus* en uzak tür ise *Bacillus ginsengihumi* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8. Li12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Li12															
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	0,999														
3. <i>Staphylococcus aureus subsp. anaerobius</i>	1,005	0,002													
4. <i>Staphylococcus simiae</i>	1,002	0,005	0,005												
5. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,002	0,013	0,013	0,012											
6. <i>Staphylococcus capitis subsp. urealyticus</i>	0,999	0,015	0,014	0,016	0,005										
7. <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	0,999	0,017	0,017	0,017	0,007	0,005									
8. <i>Staphylococcus pasteurii</i>	1,002	0,019	0,019	0,018	0,014	0,014	0,017								
9. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,008	0,017	0,017	0,015	0,015	0,018	0,020	0,015							
10. <i>Staphylococcus succinus subsp. casei</i>	1,005	0,024	0,024	0,021	0,028	0,030	0,031	0,025	0,018						
11. <i>Staphylococcus lutrae</i>	0,994	0,037	0,037	0,036	0,031	0,032	0,034	0,032	0,031	0,038					
12. <i>Macrococcus caseolyticus</i>	1,017	0,056	0,056	0,058	0,062	0,065	0,067	0,063	0,059	0,054	0,061				
13. <i>Macrococcus bovicus</i>	0,997	0,060	0,060	0,061	0,057	0,060	0,062	0,064	0,060	0,061	0,061	0,021			
14. <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1,017	0,080	0,080	0,082	0,078	0,081	0,082	0,084	0,078	0,077	0,079	0,082	0,078		
15. <i>Bacillus flexus</i>	1,028	0,081	0,081	0,079	0,084	0,087	0,088	0,091	0,086	0,081	0,084	0,069	0,069	0,050	
16. <i>Bacillus ginsengihumi</i>	1,014	0,090	0,090	0,087	0,086	0,087	0,090	0,091	0,087	0,093	0,092	0,082	0,078	0,061	0,057

3.4. Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Suşların tanımlamaları yapıldıktan sonra biyosorpsiyon değerleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *Acinetobacter haemolyticus*, 350 ppm mangan varlığında 28 saatlik inkübasyon sonrası 7×10^7 hücre ile ortamda ki mangan konsantrasyonunu 270 ppm'e düşürerek %23'lük bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Acinetobacter haemolyticus* 120 ppm çinko varlığında ise 28 saatlik inkübasyon sonrası 3×10^9 hücre ile ortamdaki çinko konsantrasyonunu 103 ppm'e düşürerek %16'lık bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Serratia nematodiphila* 280 ppm mangan varlığında 32 saatlik inkübasyon sonucu 17×10^9 hücre ile ortamdaki çinko konsantrasyonunu 132 ppm'e düşürerek % 53'lük bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* 488 ppm lityum varlığında 44 saatlik inkübasyon sonucu 36×10^8 hücre ile ortamdaki lityum konsantrasyonunu 319 ppm'e düşürerek %35'lik bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.26.).

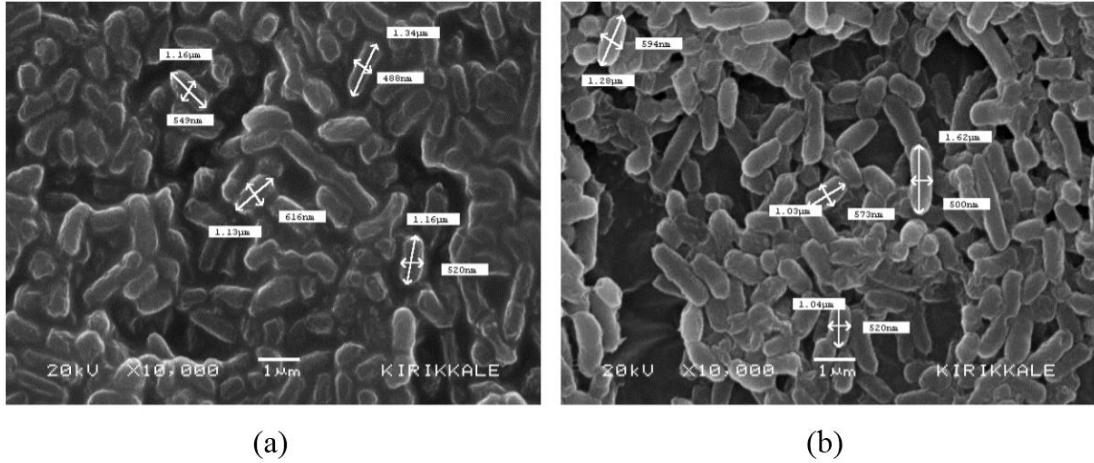


Şekil 3.26. *Serratia nematodiphila*'nın (a) ve *Acinetobacter haemolyticus*'un (b) mangan biyosorpsiyonu, *Acinetobacter haemolyticus*'un (c) çinko biyosorpsiyonu ve *Staphylococcus aureus*'un (d) lityum biyosorpsiyonu

—■— biyosorpsiyon —◆— hücre sayısı

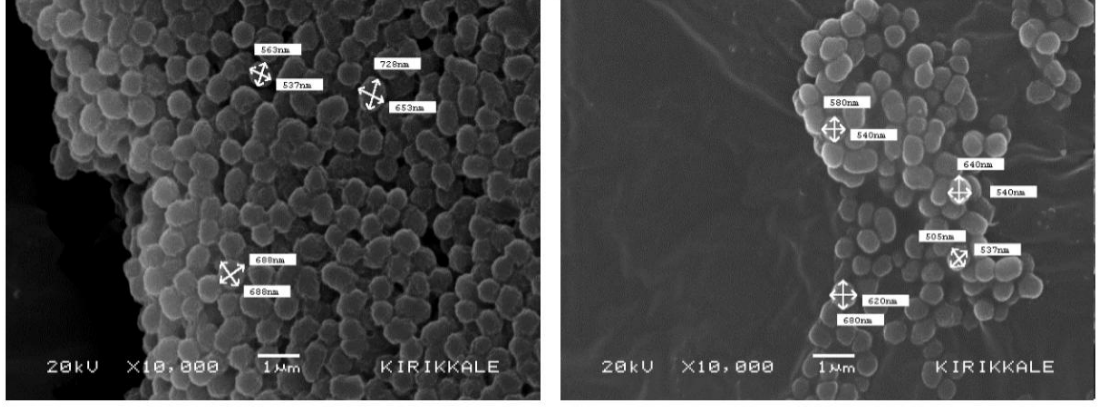
3.5. Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Bakterilerin biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesi için analizleri kullanılmıştır. *Serratia nematodiphila*'nın mangan içermeyen ortamda ki boyutlarının ortalama 509x1007 nm olmasına rağmen mangan içeren ortamda ki boyutlarının ortalama 551x1210 nm'ye yükseldiği belirlenmiştir.



Şekil 3.27. *Serratia nematodiphila*'a ait mangan içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki elektron mikroskobu görüntüleri (x10.000 objektif)

Acinetobacter haemolyticus'un mangan içermeyen ortamda ki boyutlarının ortalama 600x513 nm olmasına rağmen mangan içeren ortamda ise boyutlarının ortalama 717x680 nm'ye yükseldiği belirlenmiştir.

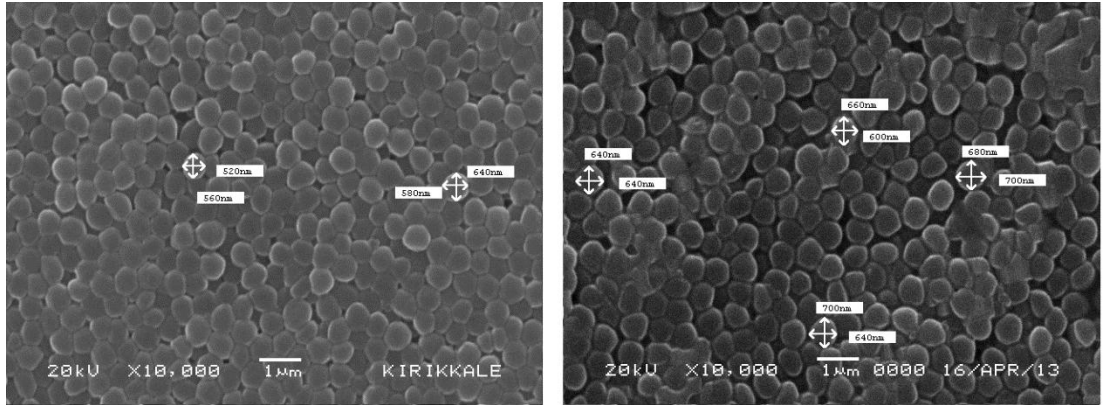


(a)

(b)

Şekil 3.28. *Acinetobacter haemolyticus*'a ait mangan içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki elektron mikroskobu görüntüleri (x10.000 objektif)

Staphylococcus aureus'un lityum içermeyen ortamda ki boyutlarının ortalama 660x577 nm olmasına rağmen lityum içeren ortamda ki boyutlarının ortalama 666x507 nm'ye yükseldiği belirlenmiştir.

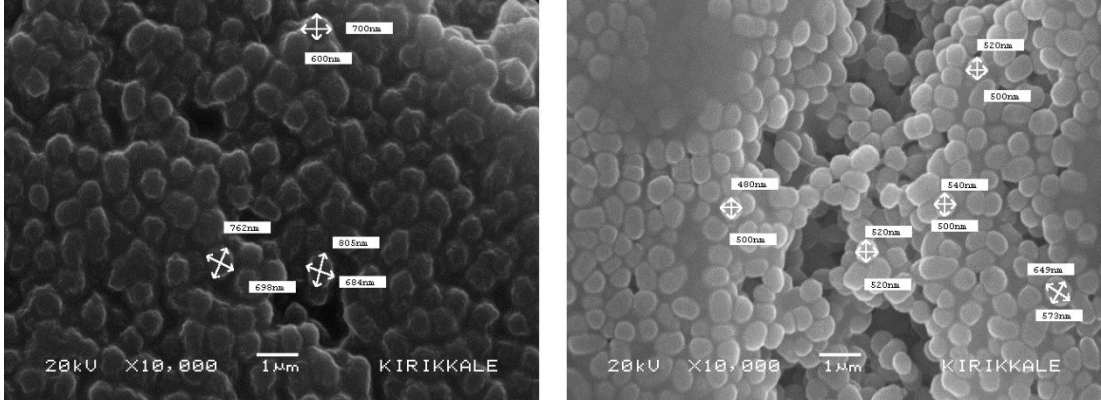


(a)

(b)

Şekil 3.29. *Staphylococcus aureus*'a ait lityum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki elektron mikroskobu görüntüleri (x10.000 objektif)

Acinetobacter haemolyticus'un çinko içermeyen ortamda ki boyutları ortalama 603x580 nm olmasına rağmen çinko içeren ortamda ki boyutlarının ortalama 612x650 nm'ye yükseldiği belirlenmiştir.



(a)

(b)

Şekil 3.30. *Acinetobacter haemolyticus*'a ait çinko içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki elektron mikroskobu görüntüleri (x10.000 objektif)

4. TARTIŞMA SONUÇ

Bu tezin amacı Kırıkkale-Kızılırmaktan daha önce ki çalışmalar kapsamında [96,97] izole edilmiş olan mangan, çinko ve lityum dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesidir. Akbulut'un [96] yapmış olduğu çalışmada mangan dirençli olan Mn11 ve Mn12 ile çinko dirençli olan Zn01 kodlu suşlar biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Buna göre Mn11 kodlu suş gram negatif, basil, Mn12 ve Zn01 kodlu suşlar ise gram negatif, kok olarak belirlenmiştir. Orman [97] ise yapmış olduğu çalışmada Li12 kodlu suşu biyokimyasal yöntemler kullanarak gram pozitif, kok olarak belirlemiştir. MTK değerleri ise Mn12 kodlu suş için 350, Mn11 kodlu suş için 280, Zn01 kodlu suş için 120 ve Li12 kodlu suş için de 488 ppm olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile daha önce biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması yapılan bu izolatların ilk olarak değişik pH'larda optimum üreme koşulları belirlenmiştir.

Mn12 kodlu suşun pH 7'de mangan içeren ortamda 28 saat inkübasyon sonrasında 6.9×10^7 , mangan içermeyen ortamda 28 saat inkübasyon sonrasında 14.7×10^7 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Mn12 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının mangan varlığında %50 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Mn11 kodlu suşun pH 9'da mangan içeren ortamda 40 saat inkübasyon sonrasında 29×10^9 , mangan içermeyen ortamda 40 saat inkübasyon sonrasında 35×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Mn11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının mangan varlığında %14 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Zn01 kodlu suşun pH 9'da çinko içeren ortamda 36 saat inkübasyon sonrasında 10.8×10^9 , çinko içermeyen ortamda 36 saat inkübasyon sonrasında 12×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Zn01 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının çinko varlığında %16 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Li12 kodlu suşun pH 9'da lityum içeren ortamda 38 saat inkübasyon sonrasında 42×10^8 , lityum içermeyen ortamda 38 saat inkübasyon sonrasında 35×10^8 hücre

sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Li12 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının lityum varlığında %14 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Bhadra ve arkadaşları [111] tarafından yapılan çalışmada Torsa Nehri'nden elde edilen izolatlardan Zn ve Ni direnci olanların; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Moraxella* cinslerine ait olduğunu göstermişlerdir. Tür düzeyinde yapılan çalışmalar sonucu ise bu bakterilerin *Acinetobacter haemolyticus* ve *Serratia marcescens* olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımıza benzer niteliktedir. Zakaria ve arkadaşları [112] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ağır metalle kontamine olmuş atıksulardan *Acinetobacter haemolyticus* suşu izole etmiş, As, Cd, Zn ve Cr için MTK değerlerini sırasıyla 700, 400, 200, 70 mg/L olarak bulmuşlardır. Choudhary ve arkadaşları [113] tarafından yapılan bir çalışmada uranyum maden atıklarından, uranyum ve diğer çeşitli metallere karşı direnç gösteren bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Serratia* türlerini içerdiği belirtilmiştir. *Serratia* sp.'nin de Ni ve Zn için belirlenen MİK değerinin 16.25 ppm, Co, Cu, Cd, Cr için belirlenen MİK değerinin ise 6.5 ppm olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmalar *Acinetobacter* türlerinin çinkoya, *Serratia* türlerinin mangana dirençli olduğunu göstermiştir. Shukla ve arkadaşlarının [114], yapmış oldukları çalışmada nehirden aldıkları su örneklerinin tanımlanması için 16S rRNA gen sekansı yapılmış ve *Staphylococcus* türleri tanımlanmıştır. Bu bulgular bizim çalışmamızdaki bulguları doğrular niteliktedir. Abdelatey ve arkadaşları [115] tarafından, topraktan izole edilen ağır metal dirençli bakteriler tanımlanmıştır. *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* gibi gram pozitif bakteriler ve *Pseudomonas* sp., *Bordetella* sp. gibi gram negatif bakteriler tespit edilmiştir. Bu bakteriler farklı konsantrasyonlarda Cd²⁺ ve Co²⁺ ağır metallerine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda yapılan biyokimyasal testler tür düzeyinde bir tanımlama için yeterli olmadığından [96,97], moleküler tekniklerden FAME ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak bakterilerin tanımlaması yapılmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan FAME analizleri sonucunda Mn12 kodlu suşun C_{18:1} w9c, C_{12:0}3OH, C_{12:0} yağ asitlerini sırasıyla %30.8, %11.26, %10.46 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Mn12 kodlu suş 0.139 SI değeri ile *Acinetobacter*

calcoaceticus olarak tanımlanmıştır. Mn11 kodlu suşun C_{18:1} w7c ve C_{16:0} yağ asitlerini sırasıyla %24.1 ve %23.61 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Mn11 kodlu suş 0.639 SI değeri ile *Enterobacter cloacae* olarak tanımlanmıştır. Zn01 kodlu suşun C_{18:1} w9c, C_{12:0}3OH ve C_{12:0} yağ asitlerini sırasıyla %30.8, %11.26 ve %10.46 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Zn01 kodlu suş 0.139 SI değeri ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır. Li12 kodlu suşun ise C_{15:0} anteiso ve C_{17:0} anteiso yağ asitlerini sırasıyla %43.59 ve %17.87 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Li12 kodlu suş 0.639 SI değeri ile *Bacillus atrophaeus* olarak tanımlanmıştır.

Bakterilerin içerdikleri yağ asidi kompozisyonu buldukları ortama ve sıcaklığa göre değişebilmektedir. Bu sebeple tanımlamalar 16S rRNA sekans analizi ile tamamlanmıştır. 16S rRNA bölgesinin tüm bakterilerde bulunması, evrim süresince korunmuş olması, uygun büyüklükte olması ve zengin veri tabanının olması tür düzeyinde tanımlama için sekanslamada en uygun bölge olmasını sağlamaktadır [98]. d16S rRNA sekans analizi için izolatların genomik DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar universal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinde spesifik olmayan bağlanmaların en aza indirgenmesi amacıyla annealing sıcaklığı ve tuz konsantrasyonu optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda Mn12 ve Zn01 kodlu suş için annealing sıcaklığı 53, tuz konsantrasyonu 1.25, Mn11 kodlu suş için annealing sıcaklığı 59, tuz konsantrasyonu 2.25 ve Li12 kodlu suş için annealing sıcaklığı 53°C tuz konsantrasyonu 1.5 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda PZR uygulanarak elde edilen PZR ürünlerinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan 16S rDNA sekans analizleri sonucu Mn11 kodlu suş %99 homoloji ile *Serratia nematodiphila*, Mn12 ve Zn01 kodlu suş %99 homoloji ile *Acinetobacter haemolyticus*, Li12 kodlu suş ise %99 homoloji ile *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır.

Suşların evrimsel akrabalık dereceleri daha iyi değerlendirilmek amacıyla MEGA 5.1 programı kullanılarak uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour joining trees) oluşturulmuş ve evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisleri hesaplanmıştır. 16S rRNA verileri ile elde edilen soyağacına ve uzaklık

matrikslerine göre genetik olarak Mn11 kodlu suş olan *Serratia nematodiphila*, *Serratia marcescens* ile yakın tür, Mn12 ve Zn01 kodlu suş olan *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii* ile yakın tür, Li12 kodlu suş olan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* ile yakın tür olarak tespit edilmiştir. Ibrahim ve arkadaşlarının [100] *Acinetobacter* türleri üzerine yapmış olduğu filogenetik çalışmada *Acinetobacter haemolyticus*'u, *Acinetobacter lwoffii* ile yakın tür olarak tespit etmiştir. Kwok ve arkadaşlarının [101] *Staphylococcus* türleri üzerine yapmış olduğu çalışmada *Staphylococcus aureus* ile *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*'u yakın türler olarak tespit etmiştir. Ovcharenko ve arkadaşlarının [99] yapmış olduğu filogenetik çalışmalar ise *Serratia nematodiphila* ve *Serratia marcescens*'i yakın tür olarak tespit etmiştir ve yapmış olduğumuz filogenetik çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Yaptığımız moleküler tanımlamalar sonucunda FAME analizi düşük SI değerleri verirken 16S rRNA analizlerinden alınan sonuçlar yüksek homoloji gösterdiği belirlenmiştir. FAME ve 16S rRNA analiz sonuçları kıyaslandığında Zn01 ve Mn12 kodlu suşlar için FAME ve 16S rRNA analizlerinin genus düzeyinde uyumlu olduğu belirlenmiştir. Li12 ve Mn11 kodlu suşlar için ise genus düzeyinde dahi uyumlu bulunmamıştır. FAME analizi, diğer tanımlama yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermesine rağmen doğruluğu %100 değildir [102]. FAME analizi diğer tanımlama yöntemleri ile kıyaslanarak doğruluğu değerlendirilmiştir. Christ ve arkadaşları [103] 550 klinik maya izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada suşların MIS ile %68.0'inin doğru, %15.8'inin yanlış tanımlandığını, %16.2'sinin ise tanımlanamadığını bildirmişler, Kellogg ve arkadaşları [104] MIS ile identifikasyonunda klinik *Candida* izolatlarının %74'ünü doğru, %16'sını yanlış tanımlamışlar ve %28'ini ise tanıfide edememişlerdir. Christ ve arkadaşları [105] 477 maya suşu ile yaptıkları bir diğer çalışmalarında MIS'in doğru tanımlama oranını %70.2, yanlış tanımlama oranını %14.3 ve tanımlayamama oranını %6.1 olarak belirlemişlerdir. Stoakes ve arkadaşlarının [106] gram negatif basiller üzerine yaptığı çalışmada genus düzeyinde %93'ünün doğru ancak tür düzeyinde %62.2'sinin doğru olarak tanımlamışlardır. Osterhout ve arkadaşları [107] 199 *Pseudomonadaceae* türünden 107 tanesini doğru tanımlayarak %54'lük bir doğruluk oranı tespit etmişlerdir. Bu tez kapsamında elde

edilen FAME sonuçları 16S rRNA analizi ile kıyaslanmıştır ve 4 suştan 2 tanesi genus düzeyinde 16S rRNA analiz sonuçları ile eşleştiği tespit edilmiştir.

Tanımlanan suşların biyosorpsiyon yetenekleri incelendiğinde *Acinetobacter haemolyticus* 350 ppm mangan içeren ortamda 28 saatlik bir inkübasyon sonucunda %22 oranında manganı biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *Acinetobacter haemolyticus* 120 ppm çinko içeren ortamda ise 28 saatlik bir inkübasyon sonrasında %16 oranında çinkoyu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *Serratia nematodiphila* 280 ppm mangan içeren ortamda 32 saatlik inkübasyon sonrasında %50 oranında manganı biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* 488 ppm lityum içeren ortamda 44 saatlik bir inkübasyon sonrasında %35 oranında lityumu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. Suşların metal içeren ortamda ki inkübasyonları sonrasında elektron mikroskopunda boyutları incelenmiş ve *Serratia nematodiphila*'nın mangan varlığında boyutlarının ortalama 509x1007 nm'den 551x1210 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. *Acinetobacter haemolyticus*'un mangan varlığında boyutlarının ortalama 600x513 nm'den 717x680 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. *Staphylococcus aureus*'un lityum varlığında ortalama boyutlarının 660x577 nm'den 666x507 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. *Acinetobacter haemolyticus*'un çinko varlığında boyutlarının ortalama 603x580 nm'den 612x650 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Mikroorganizmalar çeşitli biyosorpsiyon mekanizmaları ortamdaki metal iyonlarını hücre duvarına bağlayabilmekte ve bu da hücre boyutunda artışa neden olmaktadır [108]. Hücre boyutlarında ki gözlemlediğimiz bu artışlar elde edilen biyosorpsiyon verilerini desteklemektedir. Ajao ve arkadaşlarının [109] yapmış olduğu çalışmalar *Acinetobacter* ve *Serratia* türlerinin hidro karbon biyoremediasyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda ki bulgular bu türlerin mangan ve çinko biyoremediasyon çalışmaları için de potansiyel taşıdığını göstermektedir. Özdemir ve arkadaşlarının [110] Cd, Cu, Mn, Ni ve Zn biyosorpsiyonunda *Geobacillus* türlerinin etkisini göstermiştir. Yaptığımız çalışmalarda Mn ve Zn biyosorpsiyonunda *Acinetobacter* ve *Serratia* türlerinin de etkili olabileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında mangan, lityum ve çinko dirençli suşların değişik pH'larda ki optimum üreme koşulları belirlenmiş, moleküler teknikler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve biyosorpsiyon yetenekleri belirlenmiştir. Mikrobiyal tanımlamada elde

edilen veriler sonucunda FAME analizi sonuçlarının düşük SI değerlerinden dolayı güvenirliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda sonucu Mn11 kodlu suş *Serratia nematodiphila*, Mn12 ve Zn01 kodlu suşlar *Acinetobacter haemolyticus*, Li12 kodlu suş ise *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. Biyosorpsiyon yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucu *Serratia nematodiphila*'nın %50 oranında mangan biyosorpsiyonu yaptığı, *Acinetobacter haemolyticus*'un %16 oranında çinko biyosorpsiyonu, %22 oranında mangan biyosorpsiyonu, *Staphylococcus aureus* 'un %35 oranında lityum biyosorpsiyonu yaptığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında *Serratia nematodiphila* yüksek konsantrasyonda manganı tolere edebilmiş ve mangan biyosorpsiyon yeteneği dikkate alındığında adsorpsiyon kinetiği ve biyoremediasyon çalışmaları için potansiyel olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Öner, Ö., Çelik, A., Gediz Nehri Aşağı Gediz Havzası'ndan Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Bazı Kirlilik Parametrelerinin İncelenmesi. *Ekoloji* 20 (78): 48-52, 2011.
- [2] Sönmez, Y. A., Hisar, O., Yanık, T., Karasu Irmağında Ağır Metal Kirliliğinin Tespiti ve Su Kalitesine Göre Sınıflandırılması. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43 (1): 69-77, 2012.
- [3] İleri, R., Çakır, G., Bakır İyonlarının (Cu^{+2}) Sıvı Ortamdan Biyosorpsiyonla Gideriminin İzoterm Sabitlerinin Matlab Programı İle Belirlenmesi. *Ekoloji* 15 (59): 8-17, 2006.
- [4] Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M.O.C., Egwurugwu, J. N., Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects, *International Journal of Physical Sciences*. 2 (5): 112-118, 2007.
- [5] Yücel, E., Edirnelioğlu, E., Soydam, S., Çelik, S., Çolak G., *Myriophyllum spicatum* (Spiked water-milfoil) as a biomonitor of heavy metal pollution in Porsuk Stream/Turkey. *Biological Diversity and Conservation* 133-144 2010.
- [6] Järup L., Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167-182, 2003.
- [7] Gündüz, T., Çevre Sorunları. 1. baskı, A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara, s: 131-148, 1994.
- [8] Nies, D.H., Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol Biotechnol Mini-Review*. 51, 730- 750, 1999.

- [9] Dopson, M., Austin, B. C., Koppineedi. P. R., Bond, P. L., Growth in sulfidic mineral environments metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*. 149, 1959-1970, 2003.
- [10] Rathnayake, V, N., Megharaj, M., Bolan, N., Naidu, R., Tolerance of heavy metals by Gram positive soil bacteria. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 53, 2009.
- [11] Kaya, A., Ağır Metallerin Sulu Çözeltilerden Polimer Membranlar ve Polimer Adsorplayıcılar Kullanılarak Ayrılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 2007.
- [12] Inoue, K.I., Heavy Metal Toxicity *J Clinic Toxicol* 3, 2003.
- [13] Kharakwal, J.S., and Gurjar, L.K., Zinc and Brass in Archaeological Perspective. *Ancient Asia*. 1, 2006.
- [14] Taylan, Z.S., *Phaeodactylum tricornutum* ve *Dunaliella tertiolecta* Tarafından Metal Biyokullanımı, Biyobirikimi ve Toksikite Değerlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2005.
- [15] Hambidge, K. M., and Krebs, N. F., Zinc Deficiency: A Special Challenge. *The Journal of Nutrition*. 137: 1101-1105, 2007.
- [16] Fosmire, G.J., Zinc Toxicity. *American Society for Clinical Nutrition*. 51: 225-227, 1990.
- [17] Özgün, H., Oksidasyon ve Filtrasyon Aşamalarında Sularda Mangan Giderimini Etkileyen Bazı Faktörlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.

- [18] Georgieva N., Bryaskova R., Lazarova N., Racheva R., Immobilization of Trichosporon Cutaneum R57 on PVA/TEOS/MPTEOS Hybrid Matrices For Removal of Manganese Ions. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 27(5): 4078-4081, 2013.
- [19] Jensen, L.T., Alemanji, M.A., Culotta V.C., The Saccharomyces cerevisiae High Affinity Phosphate Transporter Encoded by PHO84 Also Functions in Manganese Homeostasis *J. Biol. Chem.* 278:42036-42040, 2003.
- [20] Henn, B.C., Schnaas, L., Ettinger, A.S., Schwartz, J., Figueroa, H.L., Avila, M.H., Amarasiriwardena, C., Hu, H., Bellinger, D.C., Wright, R.O., Rojo, M.M.T., Associations of Early Childhood Manganese and Lead Coexposure with Neurodevelopment. *Environmental Health Perspectives.* 120:1 2012.
- [21] Büyükburç, A., Robust Design of Lithium Extraction From Boron Clays by Using Statistical Design and Analysis of Experiments. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2003.
- [22] http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanım (Erişim Tarihi: 16. 11. 2013).
- [23] Yoshio, M., Brodd, R.J. and Kozawa, A., Lithium-Ion Batteries: Science and Technologies, Springer Science and Business Media, Newyork, USA, 1-7. 2009.
- [24] Eker, Ö.D., Eker, M.Ç., Lityumun Metabolik Yan Etkileri. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar Current Approaches in Psychiatry.* 2(1): 2651 2010.
- [25] Derinöz, O., Ünlüsoy, A., Kanburoğlu, K., Etkili Sıvı Tedavisine Yanıt Veren Lityum Zehirlenmesi *Türkiye Çocuk Hast Derg.* 3(4): 53-56 2009.
- [26] Özdin, S., Sarısoy, G., Lityumun Nörolojik Yan Etkileri *Journal of Mood Disorders.* 3(3): 119-27 2013

- [27] Sevgi, E., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [28] Dr. Pınar ZARAKOLU , Mikroorganizmalarda Direnç Mekanizması Olarak Aktif Pompa Sistemleri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, 2003.
- [29] Webber, M.A., Piddock, L.J.V., The Importance of Efflux pumps in Bacterial Antibiotic Resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 9-11, 2003.
- [30] Williams, L.E., Pittman, J.K. ve Hall, J.L., Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 104-126, 2000.
- [31] Yang, X., Jin, X., Feng, Y. ve Islam, E., Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance in Plants. *Journal of Integrative Biology*, 47, 1025-1035, 2005.
- [32] Silver, S., Misra, T. K., Bacterial Transformation of and Resistances to Heavymetal. *Basic Life Sci.* 28: 23-46, 1984.
- [33] Ji, G., and Silver, S., Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concer. *J. Ind. Microbiol.* 14: 61-168, 1995.
- [34] Nies, D. H., Silver, S., Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistances. *Journal of Industrial Microbiology.* 14: 186- 199, 1990.
- [35] Archer, G.L, Niemeyer, D.M., Origin and Evolution of DNA Associated with Resistance to Methicillin in Staphylococci. *Trends Microbiol.* 2: 343-347, 1994.
- [36] Choudhury, R., and Srivastava, S., Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria, <http://www.ias.ac.in/currsci/oct102001/768.pdf>, 2007.

- [37] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial Metallothioneins: Biochemistry and Molecular Genetics, *J. Industr. Microbiol.* 14:119-125, 1995.
- [38] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., Cadmium Transport, Resistance and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi, *Can. J. Micribiol.* 32: 447-464, 1986.
- [39] Mergeay, M., Towards an Understanding of The Genetics of Bacterial Resistance. *Trends Biotechnol.* 9:17-24, 1991.
- [40] Deng, X., Li, Q.B., Lu, Y.H., Sun, D.H., Huang, Y.L., Chen, X.R., Bioaccumulation of Nickel from Aqueous Solutions Bygenetically Engineered *Escherichia coli*. *Water Research.* 37 :2505-2511, 2003.
- [41] Lemire, J., Auger, C., Bignucolo, A., Appanna, V. P., Appanna, V. D., Metabolics Strategies Deployed by *Pseudomonas fluorescens* to Combat Metal Pollutants: Biotechnological Prospects. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Formatex, Current Research, 177-187, 2010.
- [42] Silver, S., Genes for all Metals - A Bacterial View of the Periodic table the 1996 Thom Award Lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20: 1-12, 1998.
- [43] Silver, S., Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27: 1-3, 1992.
- [44] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J. Hobman, J.L. and Wilson, J.R., Mercury transport and resistance. *Biochem. Soc.*, 30: 715-718, 2002.
- [45] Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A. Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. *Environ. Pollut.*, 97(1-2): 71-78, 1997.

- [46] Hussein H., Ibrahim S. F., Kandeel K. et. al., Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 7, 38-46, 2004.
- [47] Liu H., Chen B., Lana Y., Chenga Y., Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chem. Engineering J.* 97: 195–201, 2004.
- [48] Horsfall M. Jnr., Abia A. A., Spiff A.I., Removal of Cu (II) and Zn (II) ions from wastewater by cassava (*Manihot esculenta* Cranz) waste biomass. *African J. of Biotech.* 2: 360-364, 2003.
- [49] Bayramoglu, G., Celik, G., Yalcin, E. Et. al., Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr⁶⁺ removal efficiencies from aqueous medium. *J. Hazar. Mater.* 2005
- [50] Stanley, C. L., Ogden L. K., Biosorption of copper (II) from chemical mechanical planarization wastewater, *J. Env. Man.*, 69: 289-297, 2003
- [51] Tewari, N., Vasudevan, P., Guha, B.K., Study on biosorption of Cr(VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochemical Engineering Journal* 23: 185-192, 2005
- [52] Kovacevic, Z. F., Sipos, L., Briski F., Biosorption of Chromium, Copper, Nickel and Zinc Ions onto Fungal Pellets of *Aspergillus niger* 405 from Aqueous Solutions. *Food tech. Biotech.*, 38: 211-216, 2000.
- [53] Nasernejad B., Zadeh E. T., Pour B. B. Et. al., Comparison for biosorption modeling of heavy metals (Cr(III), Cu(II), Zn(II)) adsorption from wastewater by carrot residues”, *Process Biochem.*, 40, 1319-1322, 2005.
- [54] Gökşungur Y. ,Üren S., Guvenc U., Biosorption of Copper Ions by Caustic Treated Waste Baker's Yeast Biomass. *Turk. J. Biol.*, 27: 23-29, 2003

- [55] Kadukova, J., Vircikova E., Comparison Of Differences Between Copper Bioaccumulation And Biosorption. *Environment International* 31(2): 227-232,2005.
- [56] Breierova, E., Vajczikova, I., Sasinkova, V. Et. al., Biosorption of Cadmium Ions by Different Yeast Species. *Z. Naturforsch.*, 57: 634-639, 2002.
- [57] Gadd, G.M., De Rome, L. Biosorption of copper by fungal melanine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:610-617. 1988.
- [58] Zhang, W.X., Majidi, V. Monitoring the Cellular Response of *Stichococcus Baccillaris* to Exposure of Several Different Metals Using In Vivo P-31 NMR And Other Spectroscopic Techniques. *Environ. Sci. Technol.* 28:1577-1581. 1994.
- [59] Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L. *Algal Ecology, Freshwater benthic ecosystems.* Academic Press, 753s, California. 1996.
- [60] Kuyucak, N., Volesky, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnol. Lett.* 10:137-142. 1988.
- [61] Veglio, F., Beolcini, F. Removal Of Metals by Biosorption: A Review. *Hydrometallurgy.* 44:301-316. 1997.
- [62] Vijayaraghavan, K., Yun Y. S. Bacterial Biosorbents and Biosorption. *Biotechnology Advances* 26:266-291. 2008.
- [63] Gourdon R., Bhende S., Rus E., and Sofer S. S. *Biotech Lett.* 12(11):8 1990.
- [64] Golab, Z., Breitenbach, M. Sites Of Copper Binding in *Streptomyces Pilosus*. *Water Air Soil Pollut.* 82:713-21 1995.

- [65] Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra H. Microbial Biosorbents: Meeting Challenges Of Heavy Metal Pollution In Aqueous Solutions. *Current Science*. 78,8:967-73. 2000.
- [66] López, A., Lázaro, N., Priego, J. M., Marquès, A.M. Effect of pH on the Biosorption Of Nickel And Other Heavy Metals By *Pseudomonas Fluorescens* 4F39. *J. Ind. Microbiol. Biotech*. 24:146-51. 2000.
- [67] Muyzer, G., DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ekosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2:317-322, 1999.
- [68] Muyzer, G. and Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141, 1998.
- [69] Amann, R I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic identification and in situdetection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169, 1995.
- [70] Sanz, J.L., Kochling, T.K., Molecular Biology Techniques Used In Wastewater Treatment: An Overview, *Process Biochemistry*, 42 119-133, 2007.
- [71] Leblond-Bourget, N., 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter And Intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny. *International Journal of Systemic Bacteriology*. 102-111, 1996.
- [72] Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., Molecular Biology Techniques in Parasite Ecology. *International Journal of Parasitology*. 32: 551-562, 2002.
- [73] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA Sequencing With Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467, 1977.

- [74] Maxam, A., Gilbert, W., A new method of sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 74: 560-564, 1977.
- [75] Klaenhammer, T.R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12: 39-86, 1993.
- [76] Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F., Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Food Science and Technology. 20: 1-12, 2005.
- [77] Pfister, P., Risch, M., Brodersen, D.E., Bottger, E.C., Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47: 1496-1502, 2003.
- [78] Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, E.C., Westhof, E., The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. Biochem. 4: 1078-1088, 2003.
- [79] Garrity, G.M., Holt, J.G., The Road Map to the Manual. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 119-166. Ed: by G.M. Garrity, Springer-Verlag, New York, 2001.
- [80] İnternet: Maxam-Gilbert metodu ile oligonükleotit dizileme, [http:// www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif](http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif) . Erişim tarihi: 07.05.2013
- [81] Vierstraete, A. Sequencing of the obtained PCR product. 2004. Erişim: <http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>. Erişim tarihi: 12.03.2013
- [82] Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan, G., Arda, N. (eds.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 101-107, 2004.

- [83] Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res. Microbiol.* 155 (6): 409-421, 2004.
- [84] Ludwig, W. and Schleifer, KH., Bacterial Phylogeny Based on 16S and 23S rRNA Sequence Analysis, *FEMS Microbio Rev.*, 15 (2-3):155-173, 1994.
- [85] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate, *Bioresource Technology*, 97: 641-647, 2006.
- [86] Yiğit, N., Aktaş A. E., Uslu, H., Comparison Of Different Systems For İdentification Of Candida Strains *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 38 (2): 83-86, 2008.
- [87] Welch, D.F., Applications of Cellular Fatty Acid Analysis *Clinical Microbiology Reviews* 4: 422-438, 1991.
- [88] Tozoğlu, S., Uslu, H., Ertaş, Ü., Kaya, Ö., Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Orofacial Infections *Düzce Tıp Dergisi* 12(1): 48-53, 2010.
- [89] Anonim, Kızılırmak Nehri.
http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1%C4%B1rmak_nehri (Erişim tarihi: 13.11.2013)
- [90] Bahadır, M., Kızılırmak nehri akım değişimlerinin istatistiksel analizi. *International periodical for the languages. Literature and History of Turkish or Turkic.* 6 (3): 1339-1356, 2011.
- [91] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M., Sohrab, A.D., Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. *Biotechnol.* 9 (1): 1-8, 2010.

- [92] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic analysis in molecular biological methods for bacillus. 27-74, UK, 1990
- [93] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T. A., Henze, G., and Beyermann, B., Advantages of a new *Taq* DNA polymerase in multiplex and time-release PCR. *BioTechniques* 24 (1): 154–158, 1998.
- [94] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır Arıca, Ş., Kırındı, T., *Mytilus sp* (midye), *Gammarus sp* (nehir tırnağı) ve *Cladophora sp* (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak nehrindeki ağır metal kirliliğinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9 (1): 52-60, 2007.
- [95] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., Newark, DE. 2001.
- [96] Akbulut S., Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko Ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması Ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [97] Orman N., Lityum Ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [98] Demirel S., Molecular Techniques For Determining Microbial Diversity In Treatment Systems. *Sigma* 30, 179-192, 2012
- [99] Ovcharenko, L. P., Voznyuk T. M., Zaetz I. E., Potopalsky A. I., Reva O., Kozyrovska N. O., A Mobile Genetic Element In *Serratia Marcescens*, A Causative Agent Of Onion Disease. 26. (4), 2010.

- [100] Ibrahim, A., Smidt P.G., Liesack W., Phylogenetic Relationship of the Twenty-one DNA Groups the Genus *Acinetobacter* as Revealed by 16s Ribosomal DNA Sequence Analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47 (3): 837-841, 1997.
- [101] Kwok, Y.C.A., Chow, W.A., Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 87-92, 2003.
- [102] Yiğit, N., Aktaş, A.E., Uslu, H., *Candida* suşlarının identifikasyonunda farklı yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38 (2): 83-86, 2008.
- [103] Chtist, E.A.Jr., Lynn M. J., Patrick J. B., Evaluation of the Microbial Identification System for Identification of Clinically Isolated Yeasts. *Journal Of Clinical Microbiology*, 34(19): 2408-2410, 1996.
- [104] Kellogg, J. Bankert, D.A., Chaturvedi, V., Variation in microbial identification system accuracy for yeast identification depending on commercial source of Sabouraud dextrose agar. *J Clin Microbiol*, 37: 2080-2083, 1999.
- [105] Kellogg, J, Bankert, D.A., Chaturvedi. V., Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolated. *J Clin Microbiol*, 36: 1197-1200 1998.
- [106] Stoakes L, Kelly T, Schieven D, Harley D, Ramos M, Lannigan R, Groves D & Hussian Z. Gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid for identification of gram-negative anaerobic bacilli. *J Clin Microbiol*, 29: 2636-2638 1991.
- [107] Osterhout GJ, Shull VH & Dick JD. Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *J Clin Microbiol*, 29: 1822-1830, 1991.

- [108] Wang, J., Chen, C., Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* 24: 427-451, 2006.
- [109] Ajao, A.T; Oluwajobi, A.O; Olatayo, V.S., Bioremediation of Soil Microcosms from Auto-Mechanic Workshops. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 15(3): 473-477, 2011.
- [110] Özdemir, S., Kilinc., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K., Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn, and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152: 195-206, 2009.
- [111] Bhadra, B., Nanda, A. K., Chakraborty, R., Fluctuation in recoverable nickel and zinc resistant copiotrophic bacteria explained by the varying zinc ion content of Torsa River in different months. *Archives of Microbiology*. 188, 215-224. 2007.
- [112] Zakaria, Z., Zakaria, Z., Surif, S., Ahmad, W. A., Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 146, 30-38, 2007.
- [113] Choudhary, S., Islam, E., Kazy, S. K., Sar, P., Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 47, 622- 637, 2012.
- [114] Shukla, P., Srivastava, S., Srivastava, R., Rawat, A. K., Sequencing of 16S rRNA Gene for Identification of *Staphylococcus* Species in Water Sample. *Research* 5(29): 5142-5146, 2011.

- [115] Abdelatey, L. M., Khalil W. K. B., Ali, T. H., Mahrous, K. F., Heavy Metal Resistance and Gene Expression Analysis of Metal Resistance Genes in Gram Positive and Gram-Negative Bacteria Present in Egyptian Soils. *Research, Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 6 (2): 201-211, 2011.
- [116] Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T., Assessment of Interference in Biosorption of a Heavy Metal. *Biotechnology And Bioengineering*. 54(4): 344-350, 1997.
- [117] Önganer, A.N., Kırbağ, S., Diyarbakır’da Taze Olarak Tüketilen Çökelek Peynirlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 25:(1-2) 24-33, 2009.