

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜMÜŞÜ TOLERE EDEN BAKTERİLERİN 16S rDNA SEKANSLAMASI ile  
TANIMLANMASI

SERKAN KOÇ

HAZİRAN 2013

**Biyoloji Anabilim Dalında** Serkan KOÇ tarafından hazırlanan GÜMÜŞÜ TOLERE EDEN BAKTERİLERİN 16S rDNA SEKANSLAMASI ile TANIMLANMASI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bülent İÇGEN  
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Sema TAN \_\_\_\_\_  
Üye (Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN \_\_\_\_\_  
Üye : Prof. Dr. Aysun ERGENE \_\_\_\_\_

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### GÜMÜŞÜ TOLERE EDEN BAKTERİLERİN 16S rDNA SEKANSLAMASI ile TANIMLANMASI

KOÇ, Serkan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2013, 147 Sayfa

Ağır metallere kaynaklanan çevresel kirlenme son yıllarda önemli bir problem oluşturmaktadır. Sucul ekosistem başta olmak üzere tüm canlıların sağlığını tehdit eden bu durumu bertaraf etmek amacıyla ağır metal iyonlarının su ortamından giderilebilmesi için çok pahalı ve ileri düzeyde kimyasal teknolojiye ihtiyaç vardır. Ağır metale dirençli bakterilerin kullanıldığı biyoremediasyon ise daha ucuz bir alternatif oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale- Kızılırmak'tan izole edilen gümüş dirençli bakterilerin 16S rDNA sekanslaması ile tanımlanmasıdır. Bu amaçla gümüş için minimal inhibitör konsantrasyonu 8 mg/L olan iki suş izole edilmiş biyokimyasal testler, 16S rDNA sekans ve yağ asidi analizleri kullanılarak *Pseudomonas plecoglossicida* ve *Raoultella planticola* olarak tanımlanmıştır. *P. plecoglossicida* olarak tanımlanmış olan izolatin alüminyum, lityum, kalay, nikel ve stronsiyum gibi ağır metallere karşı çoklu dirence sahip olduğu belirlenmiştir. *R. planticola* olarak tanımlanmış olan diğer izolatin ise alüminyum, lityum, bakır, nikel, stronsiyum, baryum, mangan, kurşun, demir ve kalay gibi ağır metallere karşı çoklu dirence sahip olduğu belirlenmiştir. *P. plecoglossicida* suşunun aztreonam, pefloxacin, ticarcilin ve ticarcilin/CA antibiyotiklerine, *R. planticola* suşunun ise amoxicillin/CA, ampicillin, aztreonam, erythromycin, imipenem, oxacillin, pefloxacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, rifampisin, ticarcilin,

ticarcilin/CA ve vancomycin antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Kromozomal DNA, plazmit DNA ve plazmit eliminasyon çalışmaları sonucu her iki suşun gümüş direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu gösterilmiştir. Her iki suş için yapılan total ve dış membran protein analizleri sonucunda özellikle dış membran proteinlerinin gümüş dirençliliğinde etkin olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gümüş Dirençli Bakteri, Moleküler Karakterizasyon, Ağır Metal Dirençliliği, Biyoremediasyon, 16S rDNA Sekans, Yağ Asidi Analizi

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION of SILVER-TOLERANT BACTERIA by 16S rDNA SEQUENCING

KOC, Serkan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Bulent ICGEN

June 2013, 147 Pages

Environmental pollution caused by toxic heavy metals has become a very important issues in recent years. The removal of heavy metals especially from aquatic environment needs some advanced chemical technologies which are very expensive. On the other hand, bioremediation in which heavy metal-resistant bacteria used is one of the cheapest alternative. The aim of this study is to isolate and identify silver resistant bacteria from Kızılırmak-Kırıkkale by using 16S rDNA sequencing. Two silver-resistant bacteria with a minimal inhibitory concentration of 8 mg/L were isolated and identified as *Pseudomonas plecoglossicida* and *Raoultella planticola* by using biochemical tests, 16S rDNA sequencing and fatty acid methyl ester analyses. Both of isolates were shown to be resistant to other heavy metals including aluminum, lithium, tin, nickel and strontium. *P. plecoglossicida* strains, aztreonam, pefloxacin, ticarcilin and ticarcilin/CA antibiotics, the strains *R. planticola*, amoxicillin/CA, ampicillin, aztreonam, erythromycin, imipenem, oxacillin, pefloxacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, rifampisin, ticarcilin, ticarcilin/CA and vancomycin antibiotics multiple antibiotic resistance have been identified. Chromosomal DNA, plasmid DNA and plasmid curing experiment revealed that the tin resistant ability of the borh isolates was chromosome-encoded.

Total protein and outer membrane protein profiles revealed that only outer membrane proteins were functional in silver resistant ability of the both isolates.

**Key Words:** Silver-Resistant Bacteria, Molecular Characterization, Heavy Metal Resistance, Bioremediation, 16S rDNA Sequencing, Fatty Acid Analysis

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarından İlhan COŞAR'a, Barış KAHYAOĞLU'na, Semih CERİT'e, Özgün ŞAHİN'e, Mehmet GÜVEN'e ve çalışmalarım boyunca emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım da her türlü yardımını esirgemeyen ve her konuda destek olan can dostum, kardeşim Burak KABATAŞ'a teşekkür ederim.

Bugüne kadar beni destekleyen, çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen babam Salih KOÇ, annem Müzeyyen KOÇ ve abim Volkan KOÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xv
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Literatür Özetleri.....	2
1.1.1. Çevre Kirliliği.....	2
1.1.2. Su Kirliliği Kaynakları.....	2
1.1.3. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları.....	5
1.1.3.1. Gümüşün Fonksiyonları.....	8
1.1.4. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri.....	8
1.1.4.1. Gümüşün Çevresel Etkileri.....	9
1.1.5. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları.....	9
1.1.5.1. Gümüşün Kullanım Alanları.....	10
1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.6.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	13
1.1.6.2.1. Biyoremediasyon.....	13
1.1.6.2.2. Biyosorpsiyon.....	15
1.1.6.2.3. Biyoakümülyasyon.....	17
1.1.6.2.4. Biyoliç.....	18
1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	19
1.1.7.1. Geçirgenlik Bariyeri İle Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	21
1.1.7.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu.....	21
1.1.7.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması.....	23
1.1.7.4. Ekstrasellüler Alınma.....	24
1.1.7.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi.....	25



1.1.7.6. Hüresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması.....	27
1.1.8. Dirençliliğin Genetik Özellikleri.....	28
1.1.8.1. Plazmit.....	28
1.1.8.2. Transpozon.....	28
1.1.8.3. İntegron.....	29
1.2. Mikroorganizmalarda Gen Transfer Metodları.....	30
1.2.1. Transförmasyon.....	30
1.2.2. Transdüksiyon.....	31
1.2.3. Konjugasyon.....	32
1.3. Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	33
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	36
1.5. Nükleotit Dizi Analizi.....	39
1.5.1. Sanger Yöntemi.....	39
1.5.2. Maxam- Gilbert Yöntemi.....	40
1.6. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç.....	41
1.6.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler.....	42
1.6.1.1. Karakter Temelli Yöntemler.....	42
1.6.1.1.1. Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony) Yöntemi.....	42
1.6.1.1.2. Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) Metodu.....	43
1.6.1.1.3. Bayes Metodu.....	43
1.6.1.2. Mesafe( Distance) Temelli Yöntemler.....	44
1.6.1.2.1. Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu.....	44
1.6.1.2.2. Komşu Bağlantı Metodu (Neighbour joining).....	44
1.7. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi.....	45
1.8. Çalışmanın Amacı.....	49
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
2.1. Materyal.....	50
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	50
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	50

2.1.1.2. Nutrient Broth.....	50
2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler.....	51
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	52
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	52
2.1.3.2. Kullanılan Tamponlar.....	52
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	52
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	52
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS).....	52
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit).....	53
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50X TAE) Hazırlanması.....	53
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	53
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL).....	53
2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 mL).....	53
2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 mL).....	54
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL).....	54
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL).....	54
2.1.3.2.2.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL).....	54
2.1.3.2.2.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 mL).....	54
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 mL).....	55
2.1.3.2.2.9. %70'lik Etanol (100 mL).....	55
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL).....	55
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL).....	55
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	55
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	55
2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	56
2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon (10 mM Tris-HCl, pH: 8.0).....	56
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon.....	56
2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	56
2.1.3.2.6. SDS- PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	57
2.1.3.2.6.1. Ayrıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....	57
2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük).....	58
2.1.3.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	58

2.1.3.2.8. Hücresel Yağ Asitlerinin Analizinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	58
2.1.3.2.8.1. Solüsyon I (Hücre parçalayıcı).....	58
2.1.3.2.8.2. Solüsyon II (Metilleştirme).....	58
2.1.3.2.8.3. Solüsyon III (Saflaştırma).....	59
2.1.3.2.8.4. Solüsyon IV (Bazık Yıkama).....	59
2.1.3.3. PZR Amplifikasyonu için Örneklerin Hazırlanması.....	59
2.2. Yöntem.....	60
2.2.1. Çalışma Alanı.....	60
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	61
2.2.3. Gümüşe Dirençli Bakterilerin İzolasyonu .....	62
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	63
2.2.5. Gümüşe Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	63
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testler ile Tanımlanması.....	63
2.2.7. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	63
2.2.8. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini.....	64
2.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Amplifikasyonu.....	65
2.2.10. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	66
2.2.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	67
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması.....	67
2.2.13. DNA Sekans Analizi.....	67
2.2.14. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması.....	68
2.2.15. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi.....	68
2.2.16. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi.....	69
2.2.17. Plazmit DNA İzolasyonu.....	70
2.2.18. Transformasyon.....	71
2.2.19. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	72
2.2.20. Plazmit DNA'nın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	72
2.2.21. Plazmit Eliminasyonu.....	72
2.2.22. Total Protein İzolasyonu.....	73
2.2.23. Dış Membran Protein İzolasyonu.....	73

2.2.24. Dış Membran ve Total Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	74
2.2.25. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	74
2.2.25.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması.....	74
2.2.25.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması.....	75
2.2.25.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi.....	75
2.2.25.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması.....	75
2.2.25.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....	76
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>75</b>
3.1. Gümüş ve Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	77
3.2. Bakterilerin Tanımlanması.....	77
3.3. Bakteri Üreme Eğrileri.....	77
3.3.1. Gümüş Dirençli <i>P. plecoglossicida</i> Suşunun Üreme Eğrisi.....	80
3.3.2. Gümüş Dirençli <i>R. planticola</i> Suşunun Üreme Eğrisi.....	81
3.4. Gümüş Dirençli Bakterilerden Kromozomal DNA İzolasyonu.....	82
3.5. Gümüş Dirençli Bakterilerin PZR Amplifikasyon Optimizasyonu.....	83
3.5.1. Gümüş Dirençli Ag101 Suşunun PZR Amplifikasyon Optimizasyonu.....	83
3.5.2. Gümüş Dirençli Ag111 Suşunun PZR Amplifikasyon Optimizasyonu.....	84
3.6. Gümüş Dirençli Bakterilerin 16S rDNA Dizisinin Belirlenmesi.....	86
3.6.1. Gümüş Dirençli Ag101 Suşuna ait 16S rDNA'nın Kısmi Sekans Dizisi ve Tür Tayini.....	86
3.6.2. Ag101 Suşuna Ait 16S rDNA Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz.....	88
3.6.3. Gümüş Dirençli Ag111 Suşuna ait 16S rDNA'nın Kısmi Sekans Dizisi ve Tür Tayini.....	90
3.6.4. Ag111 Suşuna Ait 16S rDNA Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz.....	92
3.7. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi.....	94

3.8. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	97
3.8.1. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi.....	97
3.9. Gümüş Dirençli Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	97
3.10. Bakterilerin DNA Analizi.....	100
3.10.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin DNA Analizi.....	100
3.11. Transformasyonu.....	102
3.12. Bakterilerin Protein Profilleri.....	104
3.12.1. Ag Dirençli <i>P. plecoglossicida</i> Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profilleri.....	104
3.12.2. Ag Dirençli <i>R. planticola</i> Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profilleri.....	107
<b>4. TARTIŞMA-SONUÇ.....</b>	<b>110</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>127</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Metalin su ortamında izlediği yol.....	4
1.2. Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi.....	7
1.3. Biyosorpsiyon mekanizmaları.....	16
1.4. <i>E. coli</i> 'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı.....	22
1.5. <i>Synechococcus</i> 'ta <i>smtA</i> ve <i>smtB</i> genleri ve çinkoya bağlanması.....	23
1.6. Bakterilerdeki civa dirençliliği ve <i>mer</i> operonu.....	25
1.7. Gümüş direnç genleri, transkripsiyon mekanizması ve protein üretimi.....	26
1.8. Transpozon mutagenezi.....	29
1.9. İntegron yapısı.....	30
1.10. Moleküler tekniklerin uygulama diyagram.....	34
1.11. PZR aşamaları.....	36
1.12. PZR döngüleri sonucu teorik olarak oluşan kopya sayısı.....	37
1.13. Sanger tarafından geliştirilen nükleotit dizi analizi.....	39
1.14. Maxam-Gilbert yöntemiyle oligonükleotit dizileme.....	40
1.15. Bakteriyel yağ asit analizi aşamaları.....	46
1.16. Bakteriyel yağ asit elde edilmesi aşamaları.....	47
2.1. Kızıllık'ın lokasyonu.....	60
2.2. Örneklerin alındığı bölgelerin uydu fotoğrafı.....	62
3.1. Gram boyama ile Ag101 (a) ve Ag111 (b) suşlarının mikroskopik görüntüsü...79	
3.2. Gümüş dirençli <i>P. plecoglossicida</i> suşunun Ag içermeyen (a) ve içeren (b) ortamlardaki elektron mikroskop görüntüsü.....	79
3.3. Gümüş dirençli <i>R. planticola</i> suşunun Ag içermeyen (a) ve içeren (b) ortamlardaki elektron mikroskop görüntüsü.....	80
3.4. Ag dirençli <i>P. plecoglossicida</i> suşunun; Ag içermeyen ve içeren ortamdaki üreme eğrileri.....	81
3.5. Ag dirençli <i>R. planticola</i> suşunun; Ag içermeyen ve içeren ortamdaki üreme eğrileri.....	82
3.6. Gümüş dirençli Ag101 (a) ve Ag111 (b) suşlarının DNA profilleri.....	82
3.7. Ag101 suşu için yapılan farklı annealing sıcaklıklarındaki PZR amplifikasyonu.....	83

3.8. Ag101 suşu için yapılan farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR amplifikasyonu.....	84
3.9. Ag111 suşu için yapılan farklı annealing sıcaklıklarındaki PZR amplifikasyonu.....	85
3.10. Ag111 suşu için yapılan farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR amplifikasyonu.....	85
3.11. Gümüş dirençli <i>P. plecoglossicida</i> suşuna ait neighbour - joining dendrogramı .....	88
3.12. Gümüş dirençli <i>R. planticola</i> suşuna ait neighbour - joining dendrogramı.....	92
3.13. Gümüş dirençli Ag101 suşunun FAME analiz sonucu dendogramı .....	94
3.14. Gümüş dirençli Ag101 suşunun FAME profili.....	95
3.15. Gümüş dirençli Ag111 suşunun FAME analiz sonucu dendogramı .....	96
3.16. Gümüş dirençli Ag111 suşunun FAME profili.....	96
3.17. <i>P. plecoglossicida</i> suşunun DNA analizi.....	100
3.18. <i>R. planticola</i> suşunun DNA analizi.....	101
3.19. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	102
3.20. Transformant DNA analizi.....	103
3.21. Gümüş dirençli <i>P. plecoglossicida</i> suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki total protein profili.....	105
3.22. Gümüş dirençli <i>P. plecoglossicida</i> suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki membran protein profilleri.....	106
3.23. Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	106
3.24. Gümüş dirençli <i>R. planticola</i> suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki total protein profili.....	107
3.25. Gümüş dirençli <i>R. planticola</i> Ag gümüş içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki membran protein profili.....	108
3.26. Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	108

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Metallerin toksisitelerine göre sınıflandırılması.....	6
1.2. Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dallar.....	10
1.3. Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler.....	12
1.4. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler.....	14
1.5. Metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	18
1.6. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri.....	19
1.7. Antibiyotik direnç mekanizması.....	20
1.8. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar.....	35
2.1. Antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları.....	51
2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı.....	56
2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları.....	57
2.4. Ayrıcı jelin hazırlanması.....	57
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	58
2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	61
2.7. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar.....	65
2.8. PZR amplifikasyon koşulları.....	66
2.9. GC genel çalışma prensibi.....	69
3.1. Gümüş dirençli suşların bölgelere göre yayılımı.....	77
3.2. Gümüş dirençli suşların biyokimyasal özellikleri.....	78
3.3. Ag101 suşunun 16S rDNA sekans analiz sonuçları.....	87
3.4. <i>P. plecoglossicida</i> suşuna ait 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri.....	89
3.5. Ag111 suşunun 16S rDNA sekans analiz sonuçları.....	91
3.6. <i>R. planticola</i> Suşuna ait 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri.....	93
3.7. Ag dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profili.....	98
3.8. Ag dirençli suşların antibiyotik dirençlilik profili.....	99



## 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 <sub>2</sub>	Kalay Klorür
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür

## KISALTMALAR DİZİNİ

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
LB	Lizojenik Broth
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FAME	Fatty Acid Methyl Esther
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
TE	Tris Edta
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
TBE	Tris Base, Borik asit, EDTA
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ATCC	American Type Culture Collection
FPC	Fermentation Produced Chymosin
Kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca, toplumlar doğa ile etkileşim halinde yaşamışlardır. Geçen süreç içerisinde, insanlar doğayı tükenmez kaynak zinciri olarak algılamış, hiçbir önlem almadan yapılan ve işletilen sanayi işletmeleri tüm dünyaya yayılmıştır. Tarım alanlarının açılması ve yeni yerleşim birimleride doğayı olumsuz yönde etkilemiştir. İnsan aktiviteleri sonucu meydana gelen aşırı miktardaki organik ve inorganik bileşikler her yıl çevreye bırakılmaktadır. Bunların bir kısmı bilinçli olarak bir takım düzenlemelerle, bir kısmı ise kaza sonucuyla çevreye verilmektedir [1]. Ağır metallerin nehirlerde ve sulu ortamlarda birikmesi hem akuatik yaşamı olumsuz yönde etkilemekte [2], hem de besin zinciri içerisinde insan sağlığını tehdit etmektedir. Ayrıca bazıları, çevrede lipofil özellik kazanarak su, bitki ve hayvanlarda birikip besin zinciri ile insanlara ulaşmaktadır [3-4].

Atıksularda mevcut ağır metal iyonları (bakır, kurşun, çinko, mangan, nikel, civa, kadmiyum, demir, krom, gümüş, altın, kobalt vs.) suda yaşayan canlılar üzerine toksik etki yaparlar [5]. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır [6]. Ağır metallerin zehirleyici özelliklerinden dolayı ekosistemi kirletme etkileri insan sağlığını da tehlikeye sokmaktadır. Bu nedenle kirlilik kaynaklarından oluşan atıksular çevreye verilmeden önce arıtılarak çeşitli su standartlarına göre izin verilen kirlilik değerlerinin altına düşürülmelidir. Ağır metallerin giderilmesinde kullanılan klasik yöntemler özellikle ekonomik ve pratik olmamaktadır [7]. Bu amaçla atıksulardaki ağır metal iyonlarının ekonomik olarak giderimi ve kazanımında mikroorganizmaların kullanılması mümkündür. Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar seçici olarak atıksulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptir [7].

## **1.1. Literatür Özeti**

### **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 [8].

Çevre unsurlarına göre çevre kirliliği 4 gruba ayrılır;

- a) hava,
- b) toprak,
- c) su ve
- d) ses kirliliği.

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 Kaynakları**

Su kirliliğinin nedenlerini aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür;

a) Tarımsal faaliyetlerin neden olduğu kirlilik: Her türlü tarımsal faaliyet sonucu ortaya çıkan katı ve sıvı atıkların neden olduğu kirliliktir. Bunun yanı sıra erozyon, tarım toprağının en verimli ve tarıma uygun olan üst kısmının sürüklenerek bazı su kaynaklarına yığılmasına neden olur. Göllerin, limanların, baraj göllerinin, göletlerin tabanları taşınan toprakla örtülür ve su kütlelerinin kullanma ömürleri kısılır [9].

b) Bitki besin maddelerinin oluşturduğu kirlilik: Tarla tarımında verimin artması, bitki besin maddelerinin kullanımına bağlıdır. Azot ve fosfordan oluşan yapay gübreler toprağa karışıp su kaynaklarını kirletirler. Azot ve fosfor belli miktarlar

içinde tüm canlılar için yararlı olan kimyasallardır. Ancak, yüksek miktardaki azot, zehirlenmeye neden olmakta ve toplu balık ölümlerine yol açmaktadır [9].

c) Hayvan atıklarının oluşturduğu kirlilik: Hayvancılık yapılan yerlerde hayvan barınaklarının yağışlarla yıkanmasıyla oralandaki hayvan artıkları yüzey sularına karışırlar. Ayrıca tarlalara serilen gübrenin de yağışlarla yüzey sularına karışması, su kaynaklarının kirlenmesinde önemli bir etkidir [9].

d) Tarımsal mücadele ilaçlarından kaynaklanan kirlilik: Tarla ve bahçe tarımında yetiştirilen ürünlerin niteliğinin ve niceliğinin artması, bu bitkilere zarar veren yaban otları, asalaklar ve böceklerin yok edilmesi için kullanılan ilaçlar yağışlarla su kaynaklarına karışırlar. Tarımsal mücadelede kullanılan kimyasal ilaçlar kalıcı özelliğe sahiptirler [9].

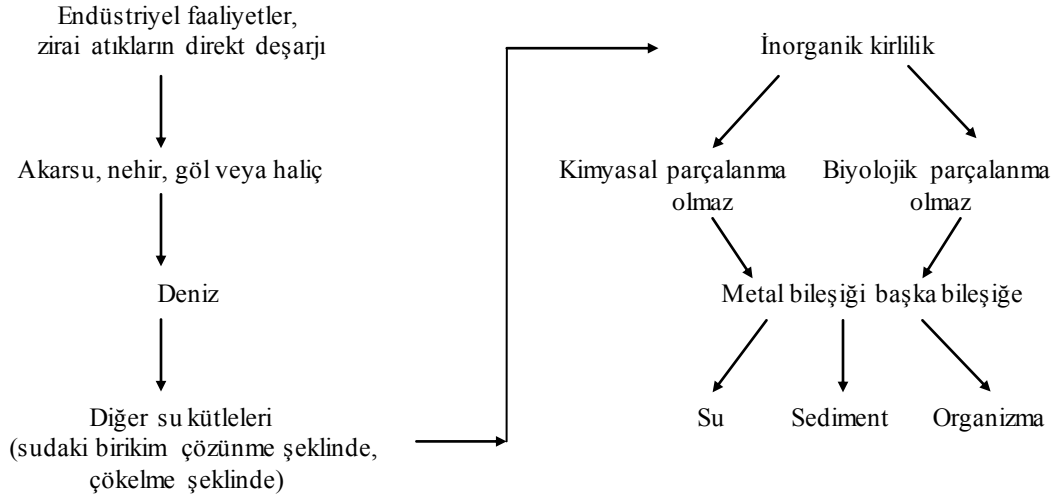
e) Sanayi faaliyetlerinin neden olduğu kirlilik: Sanayinin çevre sorunlarının ortaya çıkışındaki ağırlıklı etkisi, su kirliliğinde de kendini göstermektedir. Çeşitli sanayi faaliyetleri sonucunda oluşan atık ve toksik ağır metaller doğrudan su kirliliğine yol açarlar. Özellikle petrol rafineri atıkları, kağıt, metal kaplama, deterjan, gıda, plastik, ilaç ve deri sanayi atıkları ve atık suları ağır metal bakımından başta gelen kirleticilerdir [9].

Su kirliliğinin en önemli nedenleri; endüstriyel faaliyetler sonrasında açığa çıkan atık suların herhangi bir işlemde geçirilmeden alıcı ortamlara verilmesidir [9]. Bu atık suların içerdikleri çeşitli ağır metaller, tuzlar, pestisitler ve deterjanlar, sularda kimyasal ve fiziksel değişikliklere neden olur. Endüstrilerin çıkardığı atıklar, çevredeki tarım arazilerini etkilemekte, ormanları tahrip etmektedir, mevcut yeraltı ve yerüstü su kaynakları kirlendiğinden, bu kaynakların içme ve sulama amacıyla kullanım olanakları azalmaktadır [9]. Adedeji ve arkadaşlarının [10], yapmış oldukları çalışmada alaro nehrindeki kirleticileri belirlemek için çalışılmıştır. Sonuç olarak endüstriyel ve ev atıklardan kaynaklı ağır metallerin nehirde birikiminin artmış olduğu tespit edilmiştir.

Sularda ağır metal birikimi, çözünme şeklinde olabileceği gibi, çözünmeden suların dibinde çökme şeklinde de olabilir. Bu şekilde bir kirlenme endüstriyel ve zirai atıklardan meydana geldiği gibi herhangi bir yolla atmosfere verilen metal türü

maddelerden de meydana gelebilir. Atmosfere verilen metal türü maddeler sonunda yeryüzüne dönerler ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenirler [11].

Metal kirlenmesi, organik kirlenmeler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmazlar, bir metal bileşiği başka bir metal bileşiğine dönüşür. Dönüşme ne olursa olsun metal iyonu kaybolmaz (Şekil 1.1) [12].



**Şekil 1.1.** Metalin su ortamında izlediği yol [12]

Su ortamları tek başına su kütlelerinden ibaret olmayıp, bünyesinde bir çok hayvan ve bitki kökenli yüzen veya dipteki sediment tabakasında yaşayan organizma grupları ihtiva etmektedir. Kirleticiler sadece suda çözünmekle kalmayıp, ortam şartlarına göre organizmaya geçmekte, besin zincirinde birikmekte veya dibe çökmektedirler. Dolayısıyla bir kirletici sadece suda değil, aynı zamanda o su ortamında bulunan tüm canlıların yapısına geçmektedir [12]. Su ortamlarında ağır metal üç şekilde ölçülebilir; suda, sedimentte ve canlıda. Suda, sedimentte ve organizmalarındaki kirlilik seviyelerinin belirlenmesiyle ve izlenmesiyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu üç bileşen ya kirletici seviyelerini izlemek ya da kirleticilerin çevresel davranışlarını tanımlamak için kullanılmıştır [12].

### 1.1.3. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Ağır metal, fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'den daha yüksek olan metalik özellik gösteren elementlerden oluşan, açık ve tam bir tanımlaması yapılmamış olan grupta bulunan elementlere verilen isimdir. Bu grubun içinde geçiş metalleri, bazı yarı metaller, lantanitler ve aktinidler bulunmakta ve kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal bulunmaktadır. Bu elementler yerkürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür olarak bulunmaktadır [13-14].

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. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır [15]. Örneğin  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  gibi metaller esansiyeldir ve yüksek konsantrasyonda toksiktirler. Enzimlerin kofaktör olarak ihtiyaç duydukları bazı metal iyonları şunlardır:  $\text{Zn}^{2+}$  alkol dehidrogenaz, karbonik anhidraz, karboksipeptidaz;  $\text{Co}^{2+}$  kobalamin (vitamin  $\text{B}_{12}$ );  $\text{Mn}^{2+}$  arjinaz, fosfotransferaz;  $\text{Fe}^{2+}$  sitokromlar, peroksidaz, katalaz, ferrodoksin;  $\text{Cu}^{2+}$  tirozinaz, sitokrom oksidaz;  $\text{Mo}^{4+}$  azot fiksasyonu, nitrat redüksiyonu. Ayrıca bu ağır metaller besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bunlar, mikrobesein olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^+$ ,  $\text{Au}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  gibi ağır metallerin biyolojik önemleri ve besinsel değerleri yoktur. Canlılar için esansiyel olmayıp eser miktarları bile toksik etki gösterebilir [15]. Bu toksik metaller önemli hücresele bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresele fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir [16].

Organizmalar üzerindeki etkilerine bağılı olarak metaller, kritik olmayan, toksik ve çok toksik olarak Çizelge 1.1’de sınıflandırılmıştır [17].

**Çizelge 1.1.** Metallerin toksisitelerine göre sınıflandırılması [17]

Kritik Olmayan	Toksik	Çok Toksik
Na, C, K, P, Li Mg, Fe, Rb, Ca, S, Sr, H, Cl, Al, O, Br, Si	Ti, Ga, Hf, La, Zr, Os, Rh, Nb, W Ta, Ru, Re, Ba	Be, As, Co, Se, Hg, Ni, Te, Tl, Cu, Pd, Pb, Zn, Ag, Sb, Sn, Cd, Bi

Na; sodyum, C; karbon, K; potasyum, P; fosfor, Li; lityum, Mg; magnezyum, Fe; demir, Rb; rubidyum, Ca; kalsiyum, S; kükürt, Sr; stronsiyum, H; hidrojen, Cl; klor, Al; alüminyum, O; oksijen, Br; brom, Si; silisyum, Ti; titanyum, Ga; galyum, Hf; hafniyum, La; lantan, Zr; zirkonyum, Os; osmiyum, Rh; rodyum, Nb; niobyum, W; volfram, Ta; tal, Ru; rutenyum, Re; renyum, Ba; baryum, Be; berilyum, As; arsenik, Co; kobalt, Se; selenyum, Hg; civa, Ni; nikel, Te; tellür, Tl; talyum, Cu; bakır, Pd; paladyum, Pb; kurşun, Zn; çinko, Ag; gümüş, Sb; antimon, Sn; kalay, Cd; kadmiyum, Bi; bizmut

Metaller, mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedenleriyle toksiktir [18]. Önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki yaparlar [18]. Çevrede çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler [18]. Örneğin; yeterli konsantrasyonda  $Hg^{+2}$  ve  $CH_3Hg^+$  sadece yüksek organizmalar için değil mikroorganizmalar içinde toksik olabilmektedir. Bununla birlikte, birkaç bakteri biyolojik olarak civanın toksik formlarını toksik olmayan formlarına dönüşümünü sağlayabilir. Cıvaya dirençli gram negatif bakterilerde civa redüktaz denen NADPH bağılı bir enzim  $Hg^{+2}$ 'yi  $Hg^0$ 'a indirger. Bu reaksiyonda üretilen  $Hg^0$  uçucudur ama insanlara ve hayvanlara toksik değildir [19].

Ağır metal kirliliğinin artması çevre ve canlılar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [20]. Metallerin bazıları arsenik, bakır, demir ve nikel gibi düşük konsantrasyonlarda vücut için yararlıdır fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilidir [20]. Alüminyum, berilyum, kadmiyum, kurşun ve civa gibi diğer metallerin hiçbir biyolojik fonksiyonları yoktur ve büyük ölçüde bedensel fonksiyonlarını bozan son derece zehirli metallerdir [21]. Örneğin; arsenik metali oyuncak ve duvar kağıtlarında renklendirici madde olarak, böcek ve fare zehiri olarak ayrıca ahşapları termitlerden korumak için kullanılır. Arseniğin toksisitesi, küçük kan damarlarının



geçirgenliğini artırır bağırsak mukozasında nekroza neden olur ve mitokondriyal enzim sistemi ile karışır. Arsenik zehirlenme etkisine, deri kanserlerine, karn ağrısına, iştahsızlık ve kusmaya sebep olur [21].

Periyodik tabloda (Şekil 1.2) bulunan elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal olarak rol oynarlar. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, işte o zaman katalitik olarak rol oynarlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin sentezinde pek çok element gereklidir. Bu ise elementlerin yapısal fonksiyonudur ve element, son ürünün vazgeçilmez bileşenidir [22].

Grup Periyot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	H																	He
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn

<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:yellow; border:1px solid black;"></span> Tüm canlılar için önemli ve gerekli	<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightblue; border:1px solid black;"></span> Bazı canlılarda spesifik kullanım
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:orange; border:1px solid black;"></span> Tüm canlılar için önemli katyonlar	<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span> Bazı canlılarda indirgeyici veya taşıyıcı
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:blue; border:1px solid black;"></span> Tüm canlılar için önemli anyonlar	<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightgrey; border:1px solid black;"></span> Bilinmeyen biyolojik fonksiyon
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightorange; border:1px solid black;"></span> Tüm canlılar için gerekli iz elementler	<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span> Biyolojik olarak önemli geçiş elementleri

Şekil 1.2. Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi [23].

### 1.1.3.1. Gümüşün Fonksiyonları

Gümüş iyonları aşırı derecede toksik olan, mikroorganizmaların hücre fizyolojisi ve biyokimyasını etkileyen bir metaldir. Gümüş iyonları, mikrobiyal hücre duvarlarındaki proteinlerin, disülfid (S-S) ve sülfidril (-SH) gruplarına güçlü olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma olayı ile hücrenin normal metabolik süreci bozulmaktadır ve hücre ölmektedir. Ayrıca hücre membranındaki sülfidril gruplarıyla gümüş kompleks bir yapı oluşturarak enzim yapısı ile birleşmektedirler ve dolayısıyla da transmembrandaki enerji üretimine ve elektrolit transferine katılmaktadırlar. Bu durum R-S-S-R bağlarının oluşumuna neden olarak solunum ve elektron taşınımını engellemektedir. Ayrıca gümüş iyonları, pürin ve pirimidin bazlarındaki nitrojene bitişik olan hidrojen bağlarıyla yer değiştirmektedirler. Bu durum kararlı yapıdaki DNA'nın, helezon bir yapı almasını, DNA'nın replikasyonunu ve sonraki hücre bölünmelerini engellemektedir [24].

### 1.1.4. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Çabuk sanayileşme ve şehirleşme sonucunda toksik metal miktarındaki artma ekosistem için potansiyel bir risk haline gelmiştir. Madencilik ve akımla kaplamanın yer aldığı pek çok endüstride, uranyum, kadmiyum, kurşun, civa ve bakır gibi ağır metaller yüksek seviyede dışarıya verilmektedir. Bu üretim prosesleri sonucu oluşan işlenmemiş atıkların çevre üzerinde olumsuz etkileri vardır [25]. Ağır metaller endüstriyel atık sularının içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olmaktadır [5].

Son zamanlarda ağır metal kirliliği, sucul sistemlerde büyük bir çevresel sorun haline gelmektedir. Besin zincirinde ağır metal iyonları mobilize olabilir veya taşınabilmektedirler. Böylece ağır metal kirliliği sucul alanlarda ve toprakta görülebilmektedir. Ağır metallerin konsantrasyonları, besin zincirinin bir üst basamağında artarak organizmalarda birikmektedir. İnsanlar ve diğer yaşam formlarında, metallerin düşük konsantrasyonları bile toksik etkiye neden olmaktadır

[26]. Ekolojik veya kamu sağlığı açısından ağır metallerin toprakta, suda veya tortularda olması potansiyel olarak bir tehlikedir. Örneğin, ortamda bulunan fazla miktarlardaki ağır metal bileşenleri organizmalar tarafından kullanılmamaktadır ve öldürücü etkiye neden olmaktadır [21]. Krom, kurşun, bakır, civa, gümüş, çinko, manganez, kadmiyum gibi katyonik metallerle kontamine olmuş sistemlerdeki canlılar olumsuz yönde etkilenmektedir. rnek olarak, krom; insanlarda karsinogenik ve alerjik etkiye sahipken, kurşun; kan hücrelerindeki bölünmeleri baskılamaktadır, mangan; hayvanlarda merkezi sinir sistemi bozukluklarına neden olmaktadır ve fazla çinko alımı da lethal etki göstermektedir [15].

#### **1.1.4.1. Gümüşün Çevresel Etkileri**

Gümüş iyonları tüm canlılar için toksik etkiye sahiptir. İnsanlarda ve hayvanlarda vücuda gümüş alımı ile bazı organlarda işlev bozukluğu görülebilmektedir. Gümüş, gözler ve derinin gri-mavi renk aldığı argyria hastalığına neden olmaktadır. 0.4-1.0 mg/L aralığındaki konsantrasyonlar böbrekler, karaciğer ve dalakta patolojik değişmelere sebep olmaktadır. Hayvanlar, sindirim yoluyla alınan gümüşün yaklaşık %10 unu absorbe edebilmektedir. Çesitli organlarda özellikle karaciğer ve dalakta, metal şeklinde gümüş saptanmaktadır. İnsanlarda gümüş alındıktan 16 gün sonra, alınan gümüşün %50 den fazlası karaciğerde saptanmıştır. Bazı enzim sistemlerinde ve biyolojik önemi olan kimyasal gruplarda sülfidril komponent şeklinde bağlanarak, proteinlerin presipitasyonu ve bazı enzimlerin inaktivasyonunda rol oynamaktadır [28].

#### **1.1.5. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Daları**

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle esitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metal temizleme, metal işleme, elektronik kaplama, deri, boya, tekstil, matbaacılık, elektrik-elektronik, seramik, cam, otomotiv ve fotoğrafçılık gibi endüstrilerden gelen atık sular, kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal

iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler. Bu ağır metaller, endüstriyel faaliyetler sonucunda doğal konsantrasyonlarının üzerinde çevreye yayılmaktadır [29-31].

**Çizelge 1.2.** Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dallar [24, 29-32].

Ağır Metal	Kullanıldığı Sanayi Dalları
Gümüş	Tıp alanında, fotoğrafçılıkta, takı yapımında, maden endüstrisi
Kadmiyum	Petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, enerji üretimi
Krom	Çimento, kağıt, boya sanayinde
Bakır	Ağaç ve metal işletmeciliği, ev aletleri yapımı sanayi, maden kaplama işletmeciliği
Demir	Tekstil sanayi, maden endüstrisi
Civa	Bazı metallerin üretim prosesleri, kağıt sanayi, madencilik
Nikel	Madencilik, rafinasyon işlemleri
Kurşun	Kozmetik, maden endüstrisi, kurşunlu benzin üretimi, seramik
Stronsiyum	Savunma ile ilişkili aktiviteler ve çeşitli endüstriyel işlemlerde
Çinko	Karışık endüstri sanayileri, tekstil sanayi

Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi metal kirliliği içeren atıksuların başlıca kaynakları arasında; maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum üretimi), metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom vb.) ve diğer metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri gelmektedir [8, 18, 24, 26].

#### **1.1.5.1. Gümüşün Kullanım Alanları**

Antimikrobiyal etkisinden dolayı birçok tıbbi uygulamalarda gümüş kullanılmaktadır [24]. Örneğin, dişçilerde kullanılan amalgamlar, %35 gümüş ve %50 civa içermektedir. Gümüşün elektrokimyasal deneylerinde, gümüşün potansiyel olarak klorun alternatifi olduğu, içme sularında da dezenfeksiyon uygulamaları için kullanıldığı da görülmektedir [24].

İlk olarak Avrupa'da gümüş, onlarca yıl boyunca etkili bir biçimde su dezenfeksiyonunda ve ayrıca su filtrelerindeki ve havuzlardaki mikroorganizmaların büyümesini önlemek amacıyla da kullanılmıştır. Bu filtrelerde insan sağlığını tehdit etmeyecek kadar düşük oranda (1-50 ppb) gümüş kullanılmaktadır [24]. Martinez ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [24], 0.3 ppm Cl, 200 ppm Ag ve 1.2 ppm Cu ile kombine edilerek, soğutma sistemlerindeki mikroorganizmaların büyümelerinin kontrol edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca günümüzdeki antiseptikler gümüş nitrat ve gümüş sülfadazin içermektedirler [24]. Örneğin; bir topikal kremde %1.0 gümüş sülfadazin bulunmaktadır. Ag/Cu iyonizasyonu ise, soğutma sistemlerinde bakterilerin büyümelerini kontrol edebilmek için kullanılmaktadır.

#### **1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

##### **1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

Ağır metal içeren atık suların arıtımı, genelde işletmenin kapasitesine, atık su debisi ve karakteristiklerine, prosese, arıtma tesisine, kullanılan kimyasallara bağlı olmakla birlikte, temeli; kimyasal olarak metal iyonunun çökebilir bir bileşiği şekline dönüştürülmesi ilkesine dayanır [33]. Kirlenmiş toprak ve suların çeşitli remediasyon metotları daha önce gösterilmiştir (Çizelge 1.3) [34-35].

**Çizelge 1.3.** Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler [34, 36]

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Uygulamalar
Çökeltme	Basit, ekonomik	Yüksek derişim için zor ayrılma, etkin değil, atık çamur oluşması	Ağır metallerin uzaklaştırılması
İyon değişimi	Kısa süreli verimli, saf atık metalin geri dönüşümünün mümkün olması	Oksidasyon ve pH değişiminin yeraltı sularını etkileyebilmesi, parçacıklara duyarlı olması, reçinelerin pahalı olması, küçük ölçekli uygulama	Çözünmüş metallerin giderimi ve sulu çözeltideki radyokaktifler
Ters ozmos	Saf atık (geri dönüşüm için)	Pahalı, yüksek basınç, membran boyutu önemli	Suyun içindeki istenmeyen tüm mineralleri sudan ayıran ve saf su ve içme suyu teminine yönelik olarak kullanılan
Mikrofiltrasyon	Çözünmüş maddelerin hızla uzaklaştırılması	Ticari olarak bu maddelerden yararlanılmaz	Ağır metallerin uzaklaştırılması
Elektrodiyaliz	Yüksek sıcaklığa dayanıklıdır ve yeniden kullanılabilir	Yüksek metal konsantrasyonları için geçerli, spesifik koşullara duyarlı	Çözünmüş maddelerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması

Geleneksel yöntemlerin çok pahalı olmaları, tamamen uzaklaştırma yapmamaları, seçiciliklerinin düşük olması, uygulamada fazla enerji harcamaları, pahalı ekipmana gereksinim duymaları, ağır metal kirliliğinin yüksek derişimlerde olması durumunda etkin olmaları ve zehir etkisi oluşturmaları gibi dezavantajları vardır [37]. Bu yöntemler, özellikle sulu çözeltilerdeki metal iyonu derişimi 1 - 100 mgL<sup>-1</sup> gibi düşük derişimlerde olduğunda etkisizdir ve aynı zamanda işlenmesi gereken çok büyük miktarlarda çamur üretirler. Emisyon standartlarının zamanla daraltılması geleneksel yöntemleri yetersiz kılmıştır [38].

Atık sulardaki ağır metallerin uzaklaştırılması için kullanılan bu yöntemler dört kısımda incelenebilir. Bunlar;

a) İndirgeme – çökeltme yöntemi: Bu yöntemle yüksek değerlikli metal, çökebilene bir şekline indirgendikten sonra, nötrale edilir, reaktifin aşırısı metali çökeltir.

Çöktürmede karıştırma, yumaklaşma (flokülasyon), koyulaştırma ve süzme işlemleri yapılır. Bu yöntem özellikle kromlu atıkların arıtımında kullanılır [33].

b) Yükseltgeme – çökeltme yöntemi: Bu yöntemde indirgenmiş metal, kararlı, yükseltgenmiş ve çözünmeyen şekillerine dönüştürülür. Bu tür bir atık arıtma prosesinde, havalandırma – çökeltme – süzme olmak üzere ardışık üç basamak vardır. Kolayca yükseltgenmeyen metaller için söz konusu prosese kimyasal yükseltgeme basamağını da eklemek gerekir. Bu yöntem özellikle demir ve mangan içeren atıkların arıtımında kullanılır [33].

c) Nötralizasyon – çöktürme yöntemi:  $Cr^{4+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  gibi ağır metal iyonları ortama kireç, soda veya sodyum hidroksit katılarak nötralize edilir, hidroksitleri şeklinde çöktürülerek atık sudan uzaklaştırılır [33].

d) İyon değişimi: Bu yöntem ağır metal iyonlarının, elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzeyinde tutularak, ortamdaki farklı türdeki iyonlarla değiştirilmesi ilkesine dayanır. Bu amaçla iyon değiştirici reçineler kullanılır [33].

### **1.1.6.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

#### **1.1.6.2.1. Biyoremediasyon**

Biyoremediasyon; canlı organizmalar kullanarak toksik formdaki kirleticileri daha az toksik veya toksik olmayan bileşiklere dönüştürme yöntemidir [40]. Biyolojik yöntemler günümüzde en çok başvurulan metal giderim yöntemleridir [41].

Bu yöntemin avantajları; maliyetin düşük olması, işlem süresinin kısa olması, temiz ve kolay işletilebilir olmasıdır. Dezavantajı ise, metal gideriminin düşük olması, filtrelerin veya enjeksiyon kanallarının mikroorganizmalarca tıkanabilmesi, düşük geçirgenli akiferlere (yer altı suyunu tutan ve ileten kayalar) uygulanmasının zor olması, uygulanan akiferlerde sadece fazla geçirgen tabakaların temizlenebilmesi, sürekli izleme ve bakım gerektirmesi sayılabilir [37, 39].

Biyoremediasyonla metal arıtımı, özellikle mikropsal hücrelerle yapılan metal biyosorpsiyonu etkili ve alternatif bir teknoloji oluşturacak güçtedir. Metallerle biyosorpsiyon sürecinin temelinde iki hedef vardır. Birincisi altın, gümüş ve platin gibi değere sahip paslanmaz metallerin geri kazanımını; ikincisi ise canlı sistemleri ve çevresi için çok küçük derişimlerde bile son derece zehirli olan civa, bakır, demir, kurşun, krom, kadmiyum, nikel ve çinko gibi ağır metallerin kirli sulardan uzaklaştırılmasıdır [41].

Biyoremediasyon sistemi her koşulda aynı verimlilikte çalışmamaktadır. Verimliliği etkileyen faktörler Çizelge 1.4'de gösterilmiştir. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler: biyoremediasyon işlemi aerobik, heterotrof mikroorganizmaların aktivitelerine dayalıdır. Hızlı degradasyon için substrata özgü mikroplar elverişli çevresel faktörler içinde bulunmalıdırlar. Kirleticileri degrede etmek için fizyolojik ve metabolik yetenekleri olan mikroplar fungi ve bakterileri içerebilirler. Biyoremediasyona direkt etki gösteren faktörler; enerji kaynakları, elektron alıcıları, nutrientler, pH, sıcaklık ve substrat inhibisyonu veya metabolitlerdir [42-43].

**Çizelge 1.4.** Biyoremediasyonu etkileyen faktörler [39]

Faktörler	Önemleri
Mikrobiyal	Kritik biyomas üretimi, enzim indüksiyonu, duyarlı mikrobiyal populasyonun zenginleşmesi ve toksik metabolitlerin üretimi
Çevresel	Öncelikli substratların tükenimi ve çevresel kondisyonların inhibisyonu
Substrat	Çok düşük kontaminant konsantrasyonu, kimyasal yapı, kontaminantların çözünebilirliği ve toksisitesi
Aerobik / anaerobik işlem	Elektron alıcılarının oksidasyon / redüksiyon potansiyeli ve uygunluğu
Kirleticilerin fiziko-kimyasal biyouygunluğu	Eşit soğurma, geri dönüşümsüz soğurma, Incorporation into humic Matters
Kütle transfer sınırlaması	Oksijen difüzyonu, nutrient difüzyonu ve çözünebilirliği, suda çözünebilirlik

Suda yaşayan pek çok organizma çözülmüş ağır metalleri ve radyoaktif elementleri bünyelerine adsorplayabilmektedirler. Mikroorganizmaların bu özelliklerinden yararlanarak deniz suyu, endüstriyel ve atık sular ve radyoaktivite sonucu kirlenmiş



sularda yer alan zararlı metal iyonlarının giderilmesi mümkün olmaktadır [44]. Bu giderilmede bakteriler, mantarlar, algler ve mayalar kullanılmaktadır. Bunlar yapılarında ve yüzeylerinde ağır metal adsorplayabilme yeteneği olan mikrobiyal türlerdir [45-46].

#### **1.1.6.2.2. Biyosorpsiyon**

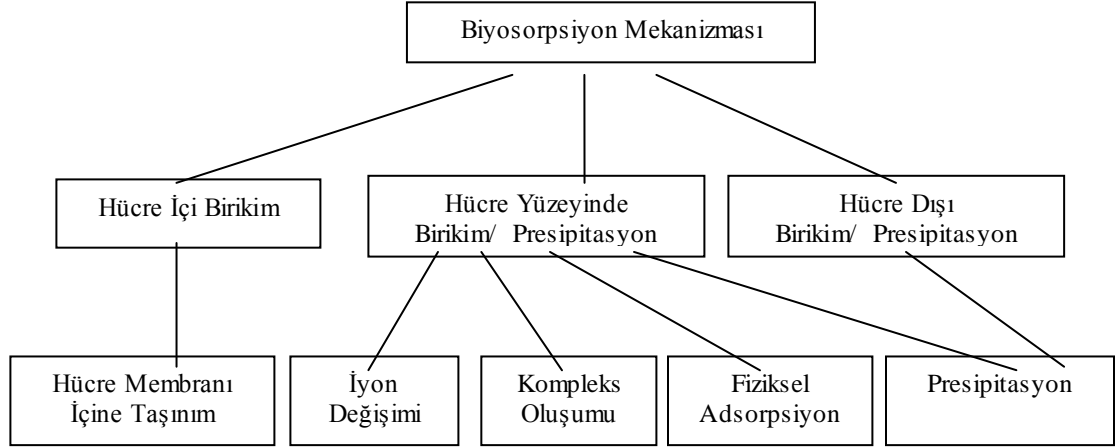
Biyosorpsiyon metodu endüstriyel atıksulardan, toksik metallerin gideriminde ya da çok değerli metallerin kazanımında geleneksel metodlara karşı verimli ve ekonomik bir alternatif oluşturur [47]. Biyosorpsiyon işleminde, bakteri, mantar, maya, yosun gibi biyolojik kökenli doğal malzemeler kullanılmaktadır. Bu biyosorbentler, metal bağlama özellikleri sayesinde ağır metal iyonlarını bağlayarak çözelti içindeki ağır metal iyonu konsantrasyonunun azalmasını sağlarlar [48]. Biyosorpsiyon işleminde ölü ya da canlı olarak kullanılan mikroorganizmaların dış yüzeylerine ligandlarla ya da fonksiyonel gruplarla metal iyonlarının adsorbe olması sağlanır [47].

Adsorbsiyon, akışkan fazda çözünmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı adsorbent yüzeyine tutunmasına dayanan ve faz yüzeyinde görülen bir ayırma yöntemidir. Katı matriks yüzeyinde bulunan iyonlar, çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözeltideki maddeleri katı yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözeltideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Katı yüzeyinde tutunma işleminin gerçekleşebilmesi için, çözünmüş maddenin çözeltiden uzaklaştırılması, çözücünün katı yüzeyden uzaklaştırılması ve çözünmüş maddenin yüzeye tutunması gerekmektedir. Yüzeye tutunan madde adsorblanan, yüzeyinde tutunmanın gerçekleştiği madde ise adsorbent olarak adlandırılır [49].

Mikroorganizmaların kompleksliği, hücre tarafından tutulan metaller için pek çok yolun olduğunu gösterir. Biyosorpsiyon mekanizmaları bu yüzden farklıdır. Bu mekanizmalar aşağıdaki gibi farklı kriterlere ayrılabilir. Hücre mekanizmasına bağlı olarak biyosorpsiyon mekanizması metabolizmaya bağlı ve metabolizmadan bağımsız olmak üzere ikiye ayrılır.

Çözeltilerden uzaklaştırılan metalin bulunduğu yere göre biyosorpsiyon 3'e ayrılır (Şekil 1.3);

1. hücre dışı birikim/presipitasyon
2. hücre yüzeyinde sorpsiyon/presipitasyon
3. hücre içi birikim [50]



**Şekil 1.3.** Biyosorpsiyon mekanizmaları [50]

Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyi, çeşitli anyonik yapılar nedeniyle negatif yüke sahiptir. Bu durum bakteriye metal katyon bağlama yeteneği vermektedir. Çeşitli mikrobiyal türlerin uranyum, bakır ve kirli atıklardaki diğer metal iyonlarının biyosorpsiyonu için oldukça verimli oldukları görülmüştür [1]. Biyosorpsiyon, hücrel ve pozitif yüklü metal iyonlarını yok etmemektedir. Hücre yüzeyi üzerindeki negatif iyonik gruplar ilk olarak metalleri absorblar ve pozitif ile negatif yükler birbirlerine tutunurlar. Bakteriler üzerindeki polisakkarit tabaka veya diğer ekstrasellüler yapılar (kapsüller ve salgı tabakaları) genellikle bu bağlanma için yardımcı olmaktadır. Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle spesifik olmayan bir şekilde bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma, dış membranda yer alan  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$ ,  $-SO_3H$ ,  $-COOH$  ve  $-PO_3H$  grupları ile metal iyonları arasındaki spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir [51, 53]. Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal iyonlarını biyosorblama yeteneğine sahiptir ve bu sayede iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı metalle karşı

sınırlı bir koruma sağlanmaktadır [39]. Metal iyonlarını bağlama özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir [52].

### 1.1.6.2.3. Biyoakümülyasyon

Biyoakümülyasyon, canlı hücreler tarafından metalin hücre dışında biriktirilmesi olarak tanımlanır. Bu işleme aktif biyosorpsiyon da denilebilmektedir. Biyoakümülyasyon, düşük sıcaklık ve enerji kaynaklarının eksikliği gibi metabolik inhibitörler tarafından inhibe edilebilir yani hücre metabolizmasına bağlı bir olaydır [54].

Biyoakümülyasyon, bir organizma tarafından belirli konsantrasyonlarda bulunan maddelerin kayıp oranları fazla olduğunda gerçekleşen bir işlemdir. Ağır metallere maruz kalan mikrobiyal hücrelerin membranından geçen metal iyonları, hücre sitoplazmasından içeri geçerek sitoplazma içerisinde tutulmaktadır [53]. Birçok alg, fungus ve bakteri türlerinin metal iyonlarını absorbe ettikleri ya da biriktirdikleri bilinmektedir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringa*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı gram-negatif bakteri türlerinin biyoakümülyasyon yetenekleri, intrasellüler olarak sentezlenen kadmiyum-bağlayan proteinlerin sentezi ile anlaşılmıştır [56]. Biyoakümülyasyon, metabolik bağımlı bir süreçtir. Kirlilik veya katyonların ortamda bulunduğu durumlarda, hücre içinde veya hücre membranı üzerinde birikebilmekte veya metabolik döngüye katılabilmektedir [55]. Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyleri negatif yüklü çeşitli anyonik yapıya sahiptir ve bakterilere metal katyonlarının bağlanmasına neden olmaktadır. Çeşitli mikrobiyal türler, başlıca *Pseudomonas*'lar, farklı metallere karşı oldukça etkili biyoakümülyasyon gösterebilmektedir [57].

#### 1.1.6.2.4. Biyoliç

Biyoliç metodunda ekstrem ekosistemlerde (çok asidik pH ya da yüksek oranda metal konsantrasyonu içeren solüsyonlar gibi) çoğalabilen ve mineral sülfürün oksidasyonundan enerji kazanabilen mikroorganizmalar kullanılır. Metallerin biyolojik olarak çözünmesinde bu yöntem uzun zamandır kullanılmaktadır. Cd, Ni, Zn, Co, Pb, Cu, Fe, Mn, ve Sb gibi bazı metallerin oksidasyonunda bu yöntemden yararlanılmıştır. Bu işlemlerde en çok kullanılan bakteriler ise *Acidithiobacillus ferrooxidans* ve *Acidithiobacillus thiooxidans*'tır. Ayrıca *Acidianus infernus*, *Metallosphaera sedula*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* gibi daha birçok bakteri metal stresiyle baş ederek çevreyi temizleme adına olağanüstü denilebilecek kapasiteye sahiptir [47].

**Çizelge 1.5.** Metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları [58-59].

YÖNTEM	DEZAVANTAJLARI	AVANTAJLARI
Geleneksel Uzaklaştırma Yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"><li>- Çok pahalı olmaları</li><li>- Tamamen uzaklaştırma yapamamaları</li><li>- Düşük seçici olmaları</li><li>- Uygulamada fazla enerji harcamaları</li><li>- Pahalı ekipmana gereksinim duymaları</li><li>- Ağır metal kirliliğinin yüksek konsantrasyonda olması durumunda etkin olmaları</li><li>- Toksik kirlilik yaratmaları</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Basit</li><li>- Bazı geleneksel yöntemlerin ucuz olması</li><li>- Metali geri elde etme</li></ul>
Biyolojik Uzaklaştırma Yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"><li>- Filtrelerin veya enjeksiyon kanallarının mikroorganizmalarca tıkanabilmesi</li><li>- Düşük geçirgenli akiferlere (yer altı suyunu tutan ve ileten kayalar) uygulanmasının zor olması</li><li>- Uygulanan akiferlerde sadece fazla geçirgen tabakaların temizlenebilmesi,</li><li>- Sürekli izlenme ve bakım gerektirmesi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Diğer yöntemlerden daha ekonomik olması</li><li>- Yüksek verim</li><li>- Proses sonunda atık madde üretmemesi</li><li>- Diğer teknolojilerle birleştirilebilmesi</li><li>- Kimyasal veya biyolojik çamurun azaltılması</li><li>- İlave nütrient gereksinimi olmaması</li></ul>

### 1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

İnsan aktiviteleri, madenlerin işlenmesi ve çeşitli endüstriyel kirlilikler, metallerin çevrede birikimine neden olmaktadır. Mikroorganizmaların bu çevrelere bazı özel direnç mekanizmaları ile adapte olduğu rapor edilmiştir [60]. Mikroorganizmaların metallere karşı dirençlilikleri, metal toksisitesine tolerans sağlayan değişik direnç mekanizmaları sayesinde gelişmektedir [60]. Yapılan araştırmalar ile antibiyotik direnci ve ağır metal direnci arasında bir ilişkiye işaret edilmektedir. Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönmesi olarak tanımlanır [61]. Önemli sayıdaki raporlar, doğal çevredeki metal kontaminasyonunun, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasını ve korunmasını desteklediğini göstermektedir. Çizelge 1.6'da antibiyotik dirençliliği genel, yapısal ve fonksiyonel karakter olarak metal dirençliliği ile ortak özelliklere sahip olduğu gösterilmektedir [62].

**Çizelge 1.6.** Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri [62]

Direnç Mekanizması	Metal İyonları	Antibiyotikler
Membran geçirgenliğinin azaltılması	As, Cu, Mn, Zn, Co, Ag	Cip, Tet, Chl, $\beta$ -lactams
Antibiyotik ve metal değiştirme	As, Hg	$\beta$ -lactams, Chl
Atım mekanizması	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tet, Chl, $\beta$ -lactams
Hücrel hedef değiştirme	Hg, Zn, Cu	Cip, $\beta$ -lactams, Trim, Rif
Antibiyotik ve metal ayrılma	Zn, Cd, Cu	CouA

As; arsenik, Cu; bakır, Mn; mangan, Zn; çinko, Co; kobalt, Ag; gümüş, Hg; civa, Ni; nikel, Cd; kadmiyum, CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; A, coumermycin; RIF, rifampin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim

Genelde tek veya birçok antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarına karşı direnç oluşumu; plazmit yapılar aracılığı ile meydana gelmektedir. Antibiyotiklere karşı

gelişen direçlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir [54]. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnci genetik olarak ya kromozomal ya da direnç plazmitlerinde kodlanır. Özgül dirençler, bir lokasyonda ya da diğerinde tipik tarzda genetik temellere sahiptir (Çizelge 1.7) [19].

**Çizelge 1.7.** Antibiyotik direnç mekanizması [19]

Direnç Mekanizması	Antibiyotik Örnek	Direncin Genetik Temeli	Mekanizmanın Mevcut Olduğu Organizma
Geçirgenliğin azaltılması	Penisilinler	Kromozomal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Enterik Bakteriler
Antibiyotik inaktivasyonu (örneğin penisilinaz; metilaz, asetilaz, fosforilaz ve diğerleri modifiye eder)	Penisilinler Kloromfenikol Aminoglikozitler	Plazmit ve Kromozomal Plazmit	<i>Staphylococcus aureus</i> , Enterik Bakteriler, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>S. aureus</i>
Hedef bölgenin değiştirilmesi	Eritromisin, Rifamisin, Streptomisin, Norfloksasin	Kromozomal	<i>S. aureus</i> , Enterik Bakteriler
Dirençli biyokimyasal yolun geliştirilmesi	Sülfonamidler	Kromozomal	<i>S. aureus</i> , Enterik Bakteriler
Hücresel dışına pompalama	Tetrasiklinler, Kloromfenikol, Eritromisin	Plazmit Kromozomal	<i>S. aureus</i> Enterik Bakteriler, <i>Staphylococcus spp.</i>

Mikroorganizmalar, toksik metal varlığında adaptasyon için çeşitli mekanizmalar kazanmışlardır [63]. Bu adaptasyon mekanizmaları;

1. Geçirgenlik bariyeri ile metallerin hücre dışında alıkonması
2. Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu
3. Metallerin proteinlere bağlanarak hücre içinde alıkonma
4. Ekstrasellüler alıkonma
5. Metallerin enzimatik detoksifikasyonla metallerin daha az zararlı fonksiyonlara dönüştürülmesi
6. Hücresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerinin azaltılması

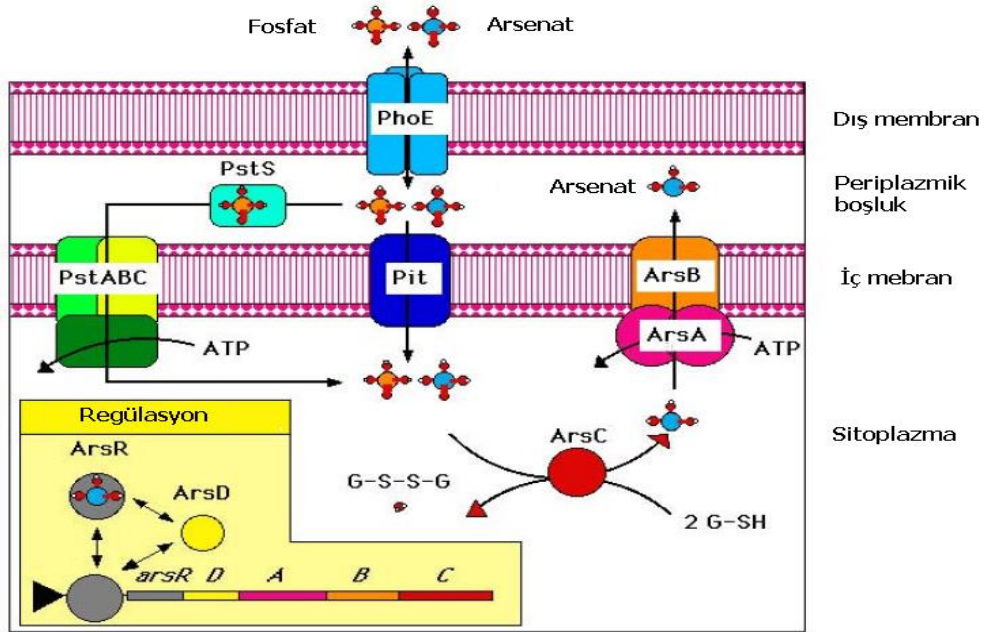
### 1.1.7.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

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 *E.coli*'deki  $Cu^{2+}$  dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi değiştirilerek  $Cu^{2+}$ 'nin hücreye girişi engellenir [1]. 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 [64]. *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 [64].

### 1.1.7.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

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 [65]. 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 [66].



Şekil 1.4. *E. coli*'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı [67]

Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığı ile *E. coli* (Şekil 1.4) 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 [68].

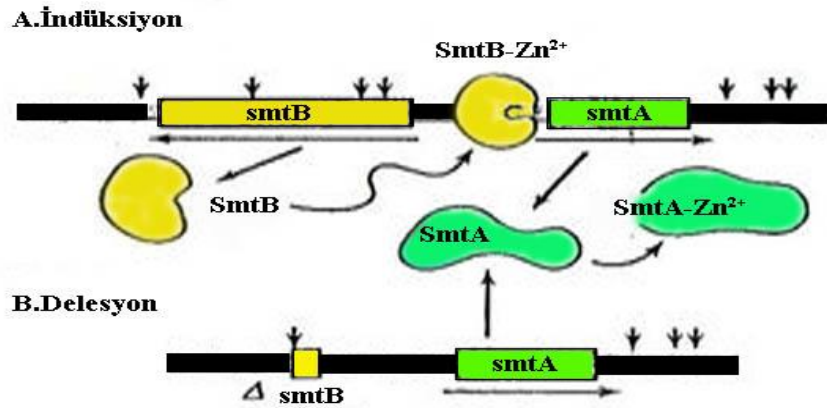


### 1.1.7.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması

Metal bağlayan proteinlere metallothionein denir. Metallothioneinler, küçük molekül ağırlıklı, asidik pH'da metal bağlama yetenekleri artabilen, enzimatik olmayan, hücre içi metal bağlayıcı proteinlerdir [69].

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücrel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metalleri alıkonmaktadır. Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek bulunmaktadır. Bunlar; *Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi ve *Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [70].

*Synechococcus* denizlerde yaşayan bir Cyanobacteria'dır. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır (Şekil 1.5) Bunlardan *SmtA*,  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  konsantrasyonlarında induklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteininin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [71].



Şekil 1.5. *Synechococcus*'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve çinkoya bağlanması [71]

Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Synechococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothioneinlerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. SmtA'daki metalothioneindeki

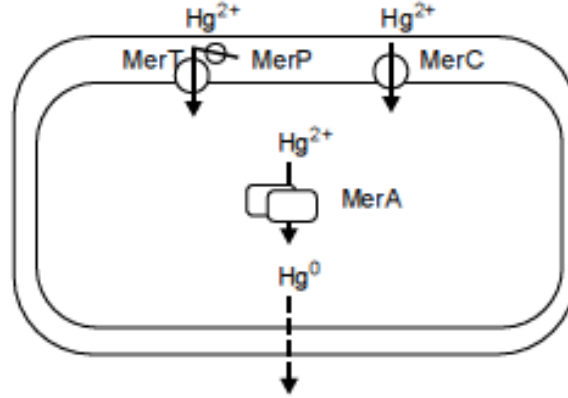
sistein kalıntıları, çok zehirli katyonlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda SmtB'nin yapısı belirlenmiştir. SmtB proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapılı bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört  $Zn^{2+}$  bağlayıcı yer göstermektedir [72]. 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 [73]. Metallothionein, metal kirliliğinin olduğu bir ortamdan izole edilen *Pseudomonas putida* da tespit edilmiştir ve *Synechococcus smtA* genleri ile yüksek derecede homoloji gösterdiği saptanmıştır. *Pseudomonas*'larda (*Pseudomonas putida* KT2440 ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve *Synechococcus* metallothioneinlerinin dizilimlerinde bir veya iki sistein kalıntılarının metal bağlamada rol aldıkları saptanmıştır [74].

#### 1.1.7.4. Ekstrasellüler Alıkonma

Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur. *S. cerevisiae*'deki  $Ni^{2+}$  dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek  $Ni^{2+}$  absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metale zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada  $Cu^{2+}$  dirençli mantarlarda görülmektedir [75]. Penninckx ve Jaspers'ın raporlarına göre, mikroorganizmalarda glutatyon gibi kükürt bakımından zengin bileşiklerin sentezi, ağır metallere karşı direnç sağlamaktadır [76]. Glutatyon, L-sistein, L-glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşan ve ağır metallere karşı yüksek affinitesi olan bir tripeptittir [77].

### 1.1.7.5. 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  $Hg^{2+}$  dirençliliği sağlayan ve bir operon (*mer* operonu) tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon; sadece  $Hg^{2+}$ '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 bağını kırarken, civa redüktaz  $Hg^{2+}$ 'yi  $Hg^0$ 'a indirgemektedir [77-79].

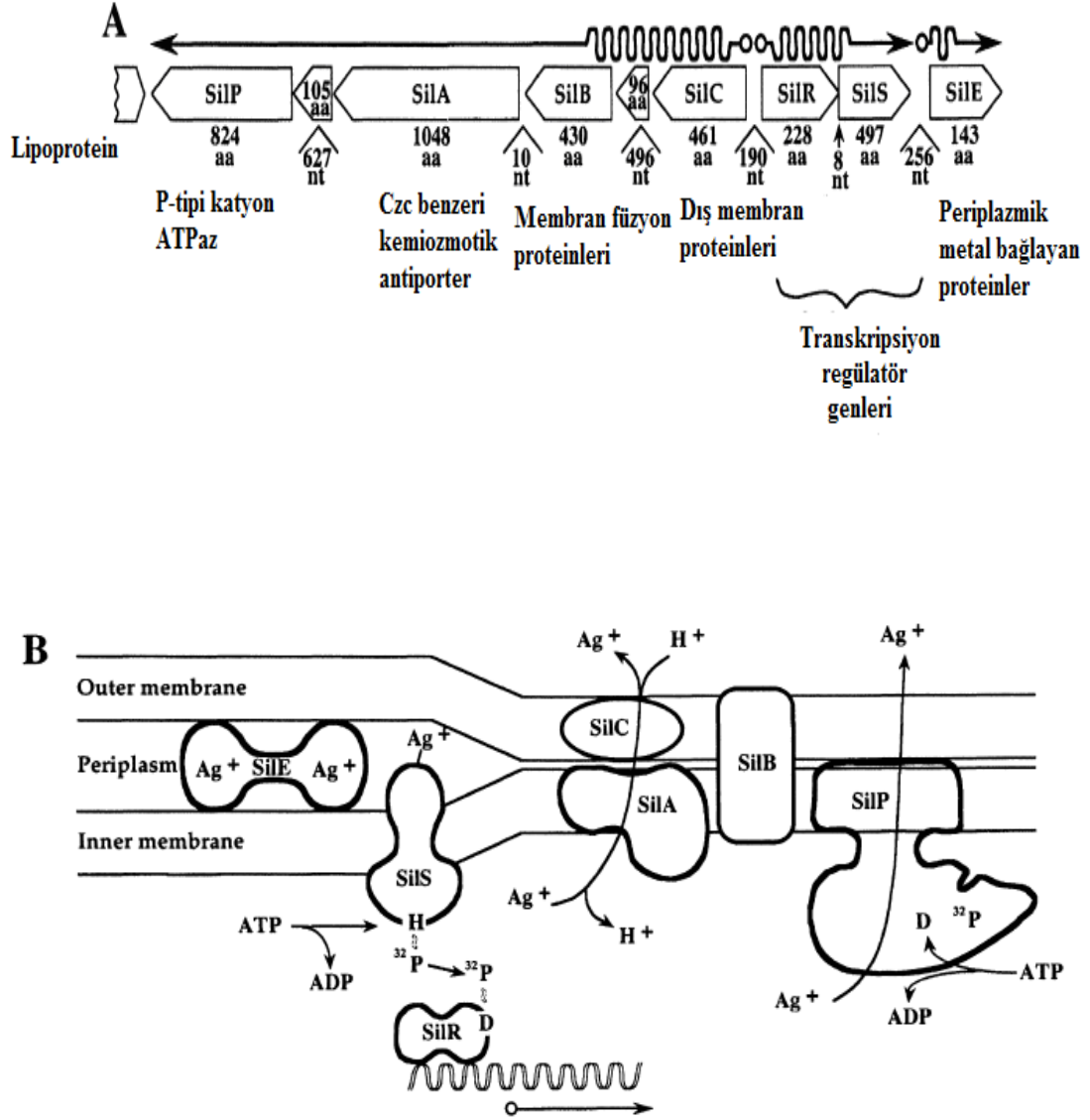


Şekil 1.6. Bakterilerdeki civa dirençliliği ve *mer* operonu [15]

*Mer* operonu tarafından kodlanan transport proteinleri aracılığı ile metalik civa, hücre membranından geçirilerek dışarı verilmektedir [77-79].

Yapılan çalışmalarda çevresel ve klinik kaynaklardan gümüş iyonlarına dirençli suşlar izole edilmiştir. İzole edilen suşlar *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* ve *Salmonella typhimurium*'dur. Bu suşların gümüşe karşı dirençliliğinin plazmit aracılı olduğu gösterilmiştir [56]. Gümüş iyonları proteinlerdeki sülfidril gruplarına yüksek affinite ile bağlanarak veya metal atım mekanizması ile gümüş iyonları hücre dışına atılarak, bakterilerin gümüşe karşı dirençliliği sağlanmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, gümüş bulunan ortamda

bakterilerdeki membran proteinlerinin ekspresyonu artarak direnç geliştirildiği de görülmüştür [18].



**Şekil 1.7.** Gümüş direnç genleri, transkripsiyon mekanizması ve protein üretimi [74]

Gümüş katyonları için bakterilerin geliştirmiş olduğu direnç mekanizmasında rol alan bazı proteinler ve bu proteinleri kodlayan genler vardır. Gümüş dirençliliğinde silE proteini 143 aminoasitten oluşmaktadır ve hücre membranındaki periplazmik boşlukta gümüş katyonlarını bağlama fonksiyonu vardır. SilR ve silS, yanıtlayıcı

membran sensör proteinleridir. SilB, dış membran proteinleridir ve ortamda gümüş iyonları olduğunda membran geçirgenliğini azaltarak katyonların hücre içine girmesine engel olmaktadır. Bu genlerin başka metal dirençlilikleri için homologları vardır. Örneğin; SilE proteini; bakır dirençliliğini sağlayan PcoE proteini ile homologdur, silR ve silS ise; kadmiyum, kobalt ve çinko dirençliliğini sağlayan CzcR ve CzcS proteinleri ile homologdur (Şekil 1.7) [74].

#### 1.1.7.6. Hüresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hüresel 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 hüresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir [64]. 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* Cd<sup>2+</sup>a maruz kaldığında önemli DNA hasarları olduğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [64].

Glutasyon organizmanın, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup> gibi metallere karşı korunmasına yardım etmektedir. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> den korunmayı sağlayabilmektedir [68]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde bulunan dirençlilik yetenekleri farklılık göstermektedir [68]. Cd<sup>2+</sup>'nin varlığında Gram negatif bakterilerdeki protein sentezi, Gram pozitif bakterilerdeki protein sentezinden çok daha iyidir. *Pseudomonas*'ın bir türü Gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *S. faecium* ve *B. subtilis*) protein sentezinin %50 azaldığı Cd<sup>2+</sup>'nin konsantrasyonlarınının 5-30 katına kadar dirençlilik göstermektedir. Gram pozitif organizmaların *E. coli* ile karşılaştırıldıklarında 28-30 kez daha fazla Cu<sup>2+</sup> bağlayabildikleri tespit edilmiştir [80].

## 1.1.8. Dirençliliğin Genetik Özellikleri

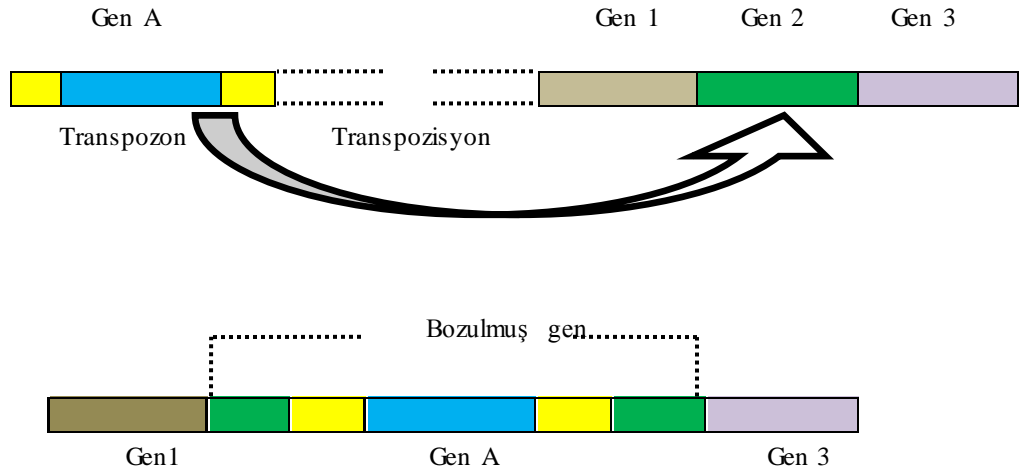
### 1.1.8.1. Plazmit

Plazmitler genel olarak; bakteri hücrelerinde ve bazı ökaryotik hücrelerde bağımsız olarak var olan ve sirküler DNA molekülleri olarak tanımlanmıştır [81]. Doğal oluşumlu plazmitler için en kullanışlı sınıflandırma, plazmit genleri tarafından kodlanan temel özelliklere dayanmaktadır. Bu tip sınıflandırmaya göre plazmitler 5 grup altında toplanır. Bunlar; fertilite (F), dirençlilik (R), kolisin (Col), parçalayıcı ve virülens plazmitlerdir [81]. Plazmit stabilitesinin en yüksek düzeyde etkilendiği koşullar, bakterilerin gelişebildiği sıcaklık değerleridir. Zira plazmitlerin hücrelerden eliminasyonu, kopya sayılarının düşürülmesi ve replikasyonlarının bloke edilmesi sureti ile gerçekleştirilmektedir [82]. Kesikli üretimlerde uzayan inkübasyon sürelerinde, suşun üremesi sonucu ortamdaki besin maddelerinin azalması ve metabolitlerin birikimi, başta pH ve toksik atık ürünler olmak üzere, değişik stres koşulları yaratmaktadır. Bakteriler bu stres koşullarına dirençlilik için değişik yanıt mekanizmaları geliştirmiştir. Adaptif stres yanıtının oluşumu, büyük ölçüde genetik esneklik ile ilişkili olduğundan, bu özelliğin gen kodu genellikle plazmitler üzerinde kodlanmaktadır [82-83].

### 1.1.8.2. Transpozon

Transpozon (*Tn*) genlerine ek olarak diğer genleri de taşıyan genetik element tipidir. [19]. Bakteriyel transpozonlar insersiyon dizi (*IS*) elementlerinden büyüktür ve transpozisyonlarıyla ilişkili olmayan protein kodlayan genler içerirler. *Tn* elementleri bakteriyel plazmitler üzerine çoklu ilaç direnci yerleştirebildiklerinden halen özel ilgi çekmektedirler. R faktörleri adını alan bu plazmitler; ağır metallere, antibiyotiklere ve diğer ilaçlara eş zamanlı olarak direnç oluşturan birçok *Tn* elementleri içerebilirler. Bu elementler plazmitlerden bakteriyel kromozomlara hareket edebilir ve farklı bakteriyel suşlar arasında çoklu ilaç direncini yayabilirler [84].

Bir transpozon elementinin insersiyon bölgesi eğer bir genin içinde ise, transpozonun eklenmesi mutasyon ile sonuçlanacaktır. Dolayısıyla transpozonlar kromozom boyunca kolayca mutasyon oluşturabilirler. Şekil 1.8’de transpozon gen 2’nin ortasına doğru hareket eder. Bu durum gen 2 transpozon tarafından bozulur ve inaktive olur. Transpozon üzerindeki A geni her iki yerde de ifade edilecektir [19].



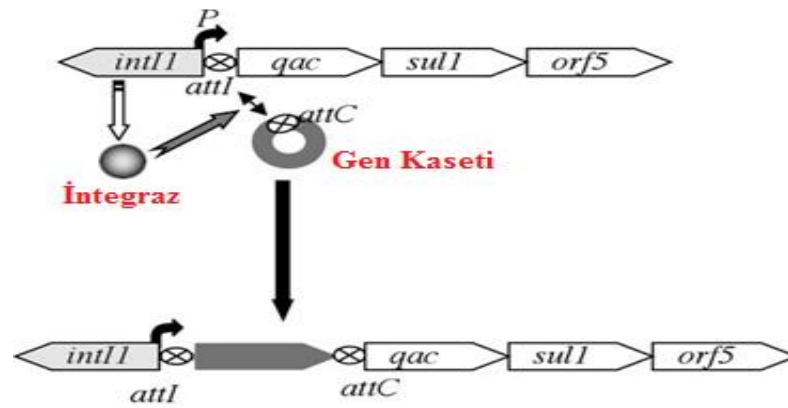
Şekil 1.8. Transpozon mutagenesi [19]

### 1.1.8.3. İntegron

İntegronlar diğer kaynaklardan gelen genleri yakalayıp ifade edebilen transpozonlardır. Fakat diğer transpozonlardan farklı olarak, integronlar rastgele insersiyon yapmazlar ve insersiyon bölgesi konusunda oldukça seçicidirler. Bunlar sıklıkla plazmitlere insersiyon yaparlar. İntegronlar plazmitlerin, transpozonların hatta bakteri kromozomlarının bir parçasına dönüşebilirler. Bazı integronlar 5 farklı gen kaseti içerebilirler. Bu tip kasetlerde 40’den fazla farklı antibiyotik direnç geni ve bazı patojenik bakterilerin virülensi ile ilgili çeşitli genler tanımlanmıştır [19].

İntegronlar konuma özgü gen kodlayan integras (integrasyon) olarak bilinen rekombinazlardan (recombinase) oluşmuştur, bağlanma bölgesi (*attI*) ve bu bölgenin aşağısındaki (downstream) genleri ifade eden promotor (P) bulundurur. Şekilde kuaterner amonyum direnç geni *qac*, sülfonamid direnç geni *sulI* ve fonksiyonu bilinmeyen *orf5* geni içeren *Tip1* integron gösterilmiştir. Genler integras tarafından

yürütülen konum-özgü rekombinasyonla *attI* ile *attC* arasına girebilirler (Şekil 1.9). Gen alımından sonra rekombinasyon bölgeleri yeniden oluşur bu da yeni gen kasetlerinin birleşmesine olanak tanır. Bu yapı bakteri populasyonları arasında antibiyotik direnç genlerinin transferi ile düzenlenmesine olanak tanır. Antibiyotik genleri diğer ekolojik avantaj sağlayan genler ile aynı üniteye kümelenebilir. İntegronlar antibiyotik direnç kazanımında büyük role sahip olan modüler yapılardır. Benzer tipteki integron örnekleri insanlarda, hayvanlarda ve doğal habitatlarda da bulunmuştur, bu da gen alan (gen-recruiting) elementlerin farklı ekosistemler arasında geçiş yapabildiğini gösterir [85].



Şekil 1.9. İntegron yapısı [85]

## 1.2. Mikroorganizmalarda Gen Transfer Metodları

### 1.2.1. Transformasyon

Bazı bakteri türleri, ortamda bulunan verici hücre tarafından bırakılmış lineer, tek iplikli, çıplak DNA parçalarını uygun koşullar altında, hücre içine alabilme yeteneğine sahiptir. Bu genler homolog rekombinasyonla kromozomal DNA'ya entegre olur [88]. Burada önemli olan alıcı hücrenin özelliğidir. Alıcı hücre, çevresinde bulunan DNA parçalarını içine alabilmek için hücre duvarında bazı değişiklikler meydana getirmek zorundadır. Hücre bölünmesinin belli bir döneminde yapılan bazı proteinler (kompetans faktörü) aracılığıyla hücre geçirgenliği değiştirilmekte; hücre bu işlem sonucu, belli büyüklükte olması koşuluyla, DNA



parçalarını içine alabilme özelliğine kavuşmaktadır. Hücre içine alınan DNA parçası rekombinasyon yoluyla hücre kromozomuna katılmakta, yeni genetik özellikler bu yolla kazanılmaktadır [87]. Örneğin *Streptococcus pneumoniae*, mozaik PBP genlerini bu yolla kazanır [86]. Diğer bir başka örnek olarak ise; Griffith'in deneyi gösterilebilir. Farelere, önce virulent ve kapsüllü olan II-S suşundan mutasyonla elde edilen canlı II-R suşu (avirulent ve kapsülsüz) verilir. Bunun arkasından, ısı ile öldürülmüş olan II-S suşundan fazla miktarda şırınga edilir (aslında II-R suşu pneumonia oluşturmadığı gibi, II-S 'de öldürülmüş olduğu için infeksiyöz yeteneği yoktur). Ancak, deneme sonunda ölen farelerden katı besi yerine yapılan ekimlerde, üreyen koloniler arasında, bazılarının II-S karakterinde (kapsüllü ve virulent) oldukları görülür. Bu durum, aynı in vitro deneyde olduğu gibi, II-R suşları, fare vücudunda, II-S 'lere ait bazı genetik materyalleri almış ve II-S karakterine dönüşmüş ve fareleri öldürmüştür [84].

### 1.2.2. Transdüksiyon

Genetik bilginin bir bakteriden diğerine bakteriyofaj aracılığı ile taşınmasına transdüksiyon denir. Viruslar aracılığı ile konak hücre genlerinin transferi iki şekilde meydana gelir [84]. İkiye ayrılır;

Genel Transdüksiyon: Bu tip transdüksiyonda, fajların enfekte ettikleri konak kromozomu üzerindeki genlerin yaklaşık olarak eşit şansa alıcı bakterilere taşınabilmesi söz konusudur. Faj bakteri hücre duvarına tutunarak DNA'sını hücre içine bırakır. Bakteriyel DNA faj enzimlerince parçalanırken, faj DNA'sı kopyalanır, faj kılıf proteinleri de hücresel enzimler aracılığıyla sentezlenir. Faj DNA'sı ve kılıf proteinleri bir araya getirilerek yeni fajlar oluşturulurken bakteriye ait DNA parçacıklarından bazıları faj DNA'sı içinde yer alır. Hücrenin parçalanması ile ortama salınan fajlar diğer hücreleri infekte eder [87].

Özelleşmiş Transdüksiyon: Bakteriyofaj girdiği bakteri hücresinin kromozomunun hep aynı noktasına yapışıp bütünleştiği için ayrılırken her zaman aynı DNA parçasını yeni girdiği bakteriye aktarır. Özelleşmiş transdüksiyon yapabilen fajların en

önemlisi, *E. coli*'nin  $\lambda$  fajıdır. Bu durumda transdüksiyon, *gal* (galaktoz) veya *bio* (biotin) genleri ile sınırlanmıştır. Transdüksiyonun bu genlerle sınırlı kalmasının nedeni;  $\lambda$  fajının her zaman *E. coli* kromozomunda bu iki gen arasındaki *att* "attachment" denilen yerden girmesidir [84-88].

### 1.2.3. Konjugasyon

Konjugasyon, hücre-hücre teması ile genetik bilginin bir bakteriden diğerine transferidir [84]. Konjugasyon konjugatif plazmidler, konjugatif transpozonlar gibi çeşitli genetik elemanlar aracılığıyla gerçekleşmektedir [89]. Konjugatif plazmidlerin prototipi F plazmididir. Verici hücre  $F^+$  hücre olarak, alıcı hücre ise  $F^-$  hücre olarak adlandırılmaktadır [88]. F plazmid üzerindeki genetik bilgi seks pilusu sentezleme yeteneği gibi bakteri hücrelerinin verici hücre olması için gerekli faktörleri sağlamaktadır. Pilus, konjugasyon sırasında iki hücre arasında temas kurar [90]. Konjugatif plazmidlerin bir tipi olan R (direnç) plazmidleri antibiyotik direnç genlerini ve plazmidin transferi için gerekli genleri taşımaktadır [90].

Konjugasyonu kontrol eden genler plazmidin *tra* bölgesinde yer alır [88]. Relaksozom adı verilen bir nükleoprotein kompleksi plazmidin özel baz dizisine sahip transfer orjininin (*oriT*) tek zincirinde bir kırık/çentik oluşturur [91]. Çentik, dönen halka "rolling circle" replikasyonunu başlatır ve dönen halkanın lineer kolu pilus içinde karşı tarafa doğru hareket eder. Diğer iplik verici hücrede kalır. Bu iki iplik DNA replikasyonu için kalıp görevi görür. Transfer devam ederken verici ve alıcı hücrede tamamlayıcı DNA iplikleri sentezlenir [88].

F plazmidi serbest ya da kromozoma entegre olabilir. Kromozoma entegre olmuş F plazmide sahip olan ve etkin bir genetik rekombinasyon gösteren bakteriyel suşlar Hfr (yüksek sıklıkta rekombinasyon yapabilen) olarak adlandırılır. Plazmid, kromozomun parçası olduğu için Hfr suşlarında konjugasyon, konak hücre kromozomunun transferine yol açmaktadır [88, 90].

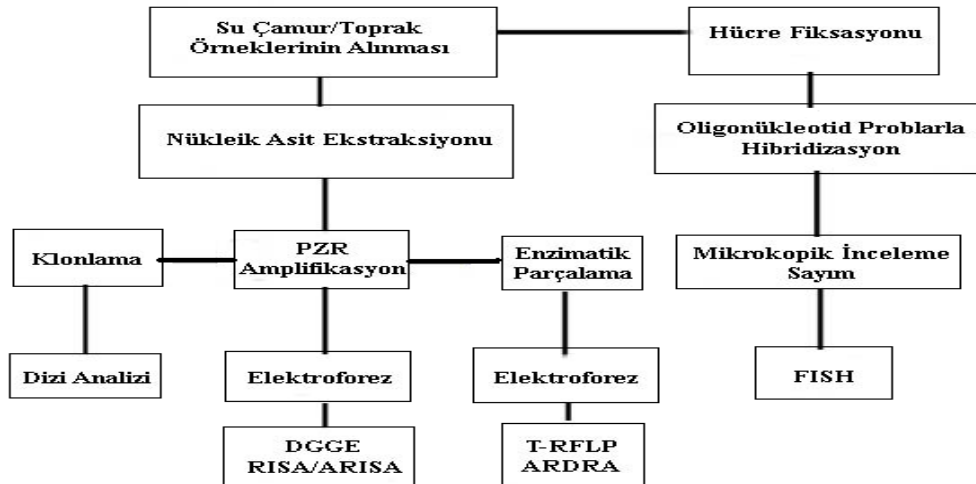
### 1.3. Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler

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 [92]. 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, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan (16S rDNA parçalarının kopyalanması gibi) yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [93].

1. Biyokimyasal Yöntemler; 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 (Bakteri ve arkeler) 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 [94-95]. Bununla birlikte, mikroorganizma

çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda arıtma sistemlerinde hem arıtma verimini değerlendirmek hem de mikroorganizma gruplarındaki değişimi izleyebilmek için moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır [96].

2.Moleküler Yöntemler; 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 [97]. 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 [98]. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistikî olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Moleküler tekniklerin kullanıldığı yöntemler çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Şekil 1.10 moleküler tekniklerin uygulanmasında kullanılan adımları göstermektedir.



Şekil 1.10. Moleküler tekniklerin uygulama diyagramı [99].

Atıksu ya da kirletilmiş alanların arıtılmasında rol alan mikrobiyal grupları belirleme ile ilgili çalışmalarda klonlama ve gen kütüphanesi oluşturma, denatürleyici jel elektroforezi (DGGE), floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), ribosomal genlerarası boşluk analizi (RISA, ARISA), çoğaltılmış ribosomal DNA kesim analizi (ARDRA), uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (T-RFLP) gibi birçok yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 1.8). Bu derleme çalışmasında bu yöntemler, uygulamadaki avantaj ve dezavantajları ile birlikte ele alınmaktadır.

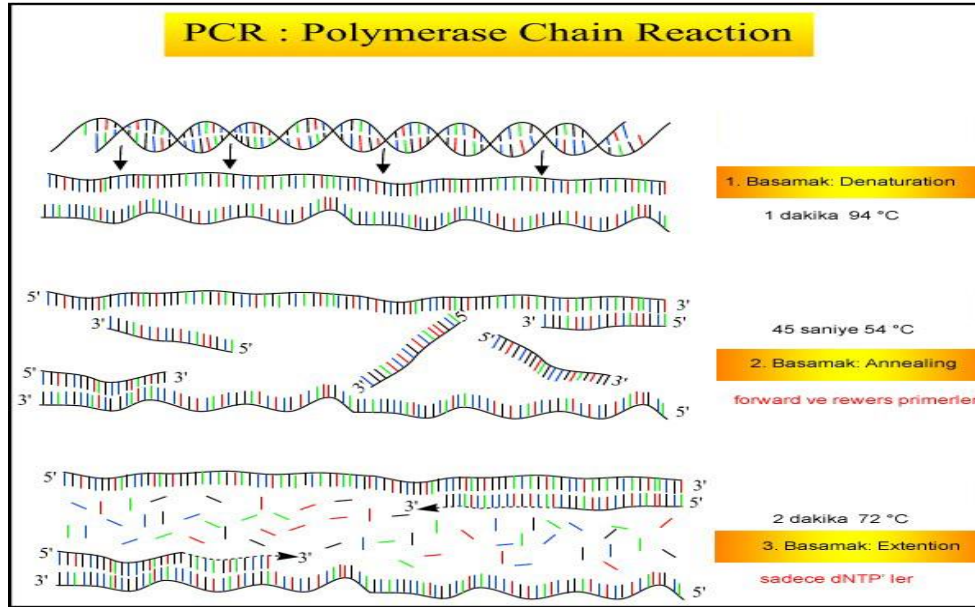
**Çizelge 1.8.** Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar [99].

Teknik	Avantajları	Kısıtlamaları	Kullanım örnekleri
Çoğaltılmış ribosomal DNA kesim analizi	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve PZR sapmaları Sayısal değildir.	Aktif çamurda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi
Ribosomal RNA genlerarası boşluk analizi	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. Bakteriler arasındaki mesafe ve dizilemede önemli heterojenlik	DNA ekstraksiyonu ve PZR sapmaları Sayısal değildir. Bakteriler arasındaki mesafe ve dizilemede önemli heterojenlik	Farklı kağıt endüstrisi atıksularında bakteriyel çeşitlilik ve komünite analizi
Denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE)	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. rRNA gen dizilimi hetero-jenliğinin kullanımı	DNA ekstraksiyonu ve PZR sapmaları Sayısal değildir. Kısa hedef dizilemelerinden dolayı özgünlük sorun olabilir	Mikrobiyal komünite kompozisyonu Populasyon değişimi
Uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (t-RFLP)	Kültürden bağımsız geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. Hızlı ve yarı sayısal olması	DNA ekstraksiyonu ve PZR sapmaları	Selüloz fabrikası atıksuyunda mikrobiyal komünite kompozisyonu
Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon (FISH)	Sayısal Kültür edilemeyenleri de içeren mikrobiyal hücrelerin doğrudan görsel olarak ayırt edilmesi	İnaktif hücreler tespit edilemeyebilir.	Evsel atıksuyunda bakteriyel komünite kompozisyonu Aktif çamurda mikrobiyal komünite yapısının yerinde analizi

Yukarıdaki moleküler yöntemlere ek olarak son yıllarda mikroorganizmaların karboksilik grupların metilasyonu ile yağ asitlerinin metil esterlerinin (FAME) analizinde bakteriyal identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır [114].

#### 1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

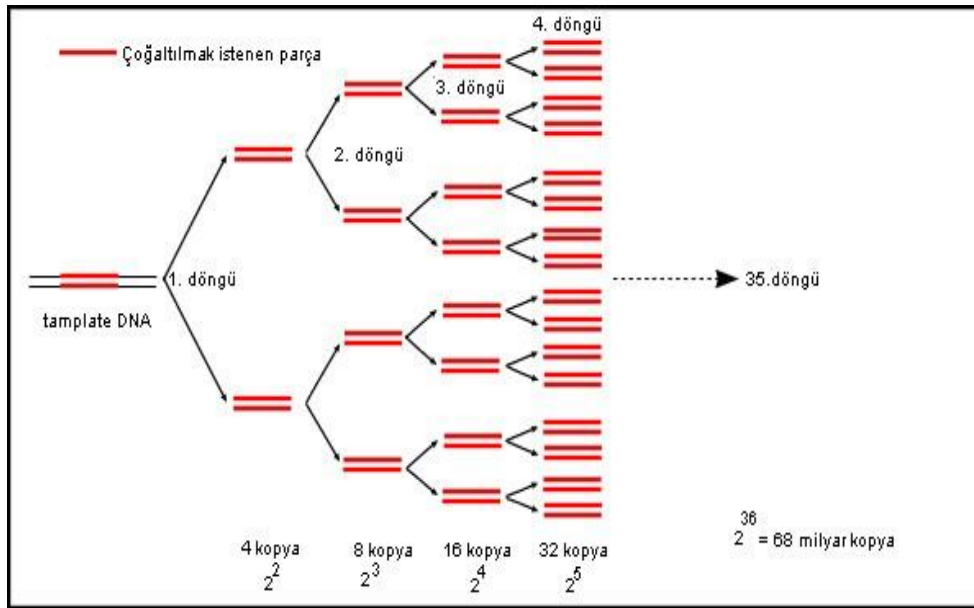
Polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır [107].



Şekil 1.11. PZR aşamaları [102]

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 1.11 ve 1.12). Art arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 1.11). 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 [107].



**Şekil 1.12.** PZR döngüleri sonucu teorik olarak oluşan kopya sayısı [102]

PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve  $MgCl_2$ 'dir [100].

**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 [100].

**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'üçtan 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 kullanılanı *Thermus aquaticus* izolatından elde edilen Taq DNA polimerazdır [100].

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. Buna rağmen PZR, TEM ve SHV'nin farklı tipleri arasında ayırım yapamaz [100-101].

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 [100].

Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>: PZR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Mg<sup>2+</sup> iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar.(Tm değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) Bu nedenle MgCl<sub>2</sub>'ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır [100].

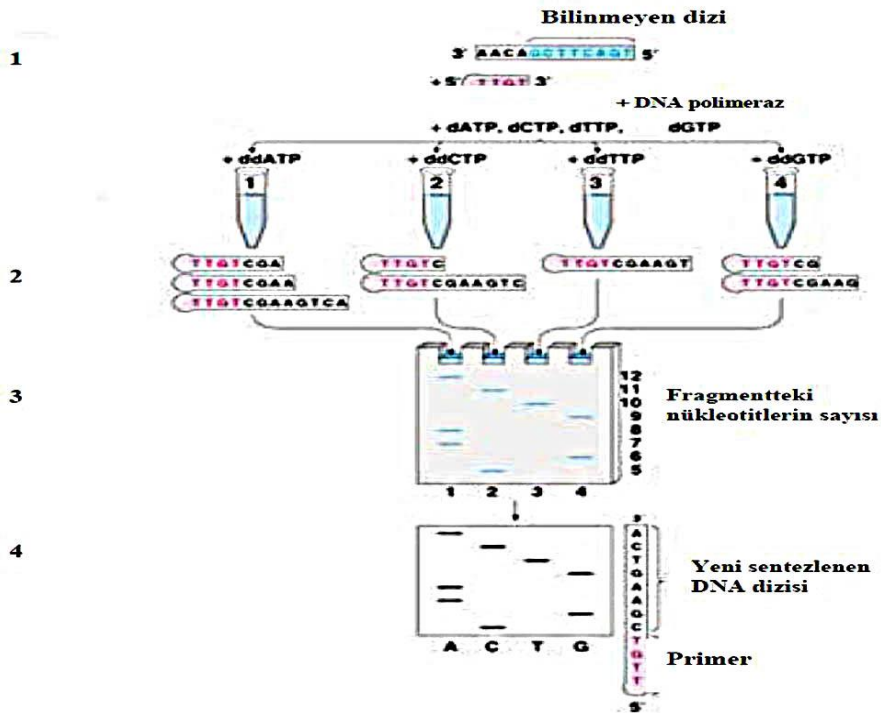


## 1.5. Nükleotit Dizi Analizi

DNA dizi analizi tekniklerinden en iyi bilineni Sanger ve arkadaşlarının enzimatik yöntemi (1977) ve Maxam ve Gilbert'in kimyasal parçalama yöntemidir [103].

### 1.5.1. Sanger Yöntemi

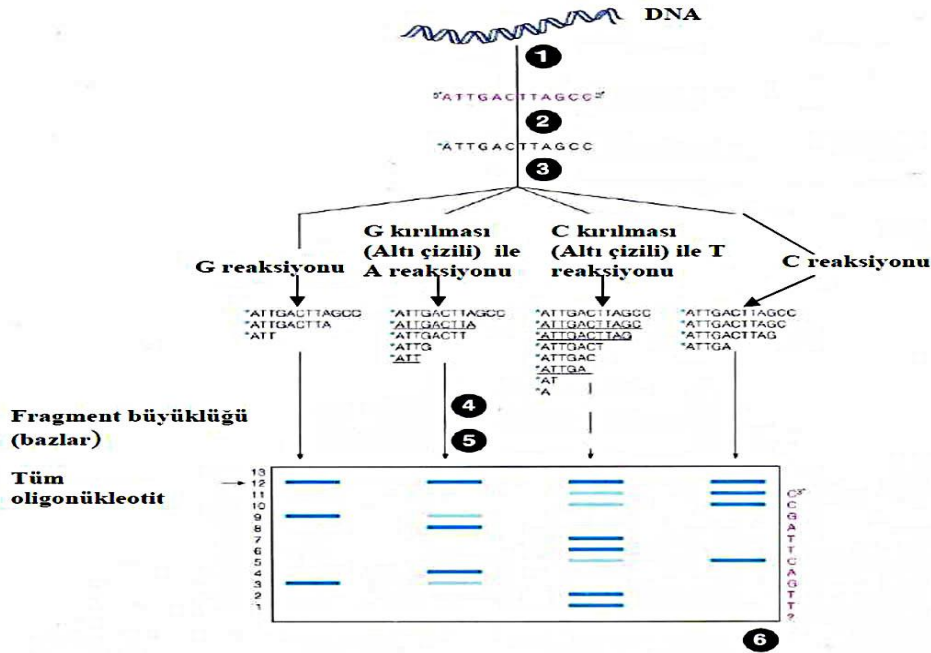
Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve DNA polimeraz enziminin DNA molekülünü 5'-3' yönünde sentezlenmesi esasına dayanan enzimatik bir yöntemdir [96]. Bu yöntemde göre, tek iplikli DNA ve bunun için yapılan radyoaktif (floresan etiketli) primer (DNA ipliği de primer de çok sayıda) ile her bir tüpe 4 çeşit nükleotit (ATP, GTP, CTP, TTP) ve her bir tüp için farklı bir dideksinükleotit trifosfat (Dideksinükleotit trifosfat bir nükleotide eklenirken, kendisine nükleotit eklenemeyeceğinden DNA sentezi herhangi bir ddNTP'nin girdiği yerde durur) eklenerek reaksiyonun her bir nükleotitin bulunduğu yerde durması sağlanır. Radyoaktif işaretli bu fragmetler, elektroforez kullanılarak otoradyografi ile DNA'nın nükleotit dizisi belirlenir (Şekil 1.13) [105].



Şekil 1.13. Sanger tarafından geliştirilen nükleotit dizi analizi [106].

## 1.5.2. Maxam-Gilbert Yöntemi

Bu yöntem, DNA nükleotitlerinin bazı kimyasal maddeler ile reaksiyona girmesi ve DNA zincirinin reaksiyon noktalarında kırılması esasına dayanır. Bunun için, nükleotit dizilişi saptanacak olan DNA parçası 5'ucundan radyoaktif fosfat ( $P^{32}$ ) ile işaretlenir; daha sonra bu DNA molekülü uygun bir restriksiyon enzimiyle kesilerek yalnızca bir ucunda işaret kalması sağlanır. Bundan sonraki işlem; bir ucu işaretli milyarlarca DNA molekülünün dört deney tüpüne ayrılması ve her birinde G, A, T ya da C nükleotitlerini kırarak gerekli kimyasal reaksiyonun gerçekleştirilmesidir. Reaksiyon sırasında her DNA zincirinde bir ya da birkaç nükleotit kırılır. Ucunda işaret taşıyan DNA parçaları dikkate alındığında, bunların gittikçe kısalan seriler oluşturduğu görülür. Oluşturulan seriler poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak uzunluklarına göre birbirlerinden ayrılırlar ve sonuçta otoradyografi yöntemiyle gözle görülebilir duruma getirilirler. Bu sayede nükleotit dizisinin okunması mümkün olur (Şekil 1.14) [104]. Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemleri incelenirse, iki yöntemin ana prensibi tam birbirinin tersine çalışmaktadır. Maxam-Gilbert yönteminde, DNA yıkıma uğratarak dizi tespit edilirken, Sanger yönteminde DNA polimeraz aracılığı ile sentez yapılırken dizi tespit edilmektedir [105].



Şekil 1.14. Maxam-Gilbert yöntemiyle oligonükleotit dizileme [107].

Nükleotit dizi analizi yöntemi, beta-laktamaz saptamada altın standarttır. Bu yöntemle yeni enzimler belirlenebilmekte, farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir. Yöntem pahalıdır ve uygulanabilmesi için özel cihaz gerektirir [108].

## **1.6. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç**

Filogeni kısaca; evrimsel akrabalık ilişkisi olarak tanımlanabilir. Filogenetik analiz ise; mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasıyla soy ağaçlarının oluşturulmasıdır [109]. Filogenetik ağaç bir grubun evrimsel tarihinin grafiksel özetidir.

Filogenetik ağaç; dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar, türleşme sırasını kaydeder, hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir.

Filogenetik bir ağaçta; dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler; bir popülasyonun (taksonun) iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktalara denir [110]. Dal uçları ise; soyu tükenmiş veya bugün yaşayan türleri ifade eder. Filogenetik ağaçlar köklü veya köksüz olabilir. Köklü Ağaçlar; inceleme altındaki soy hattını nereden köklendiğini tanımladığı için ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarlar. [110]. Köksüz ağaçlar ise; köklü ağaçların tersine, türler arasındaki ilişkiyi ortaya koyar. Fakat, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce veya sonra açığa çıktığına işaret etmez [111]. Ağaçlardaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin (basamakların) sayısını belirler [112].

### **1.6.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler**

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak iki ana başlık altında incelenir:

Karakter temelli yöntemler;

- Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony)
- Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
- Mr. Bayes

Mesafé temelli yöntemler;

- Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu (UPGMA)
- Komşu Bağlantı Metodu(Neighbour-Joining)
- Minimum Evrim Metodu
- En Az Kareler Metodu

#### **1.6.1.1. Karakter Temelli Yöntemler**

Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter hangi taksonun hangisiyle yakın akraba olduğu konusunda bize yardım eder. Bu karakterler; DNA dizisi gibi özellikler olabilir.

##### **1.6.1.1.1. Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony) Yöntemi**

Parsimoni metodu, olası birçok filogenetik ağaçlar arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yol göstericidir.

Parsimoniye göre olması en muhtemel ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [111]. Yani en az farklı olan birimler,

birbirine çok yakın ve en çok benzeyen birimlerdir. Bu nedenle; Parsimoni (MP), Minimum Evrimsel Metod (parsimoni, tutumluluk) olarak tanımlanabilir.

Maksimum parsimoni yönteminin dezavantajları;

- Yüksek seviye homoplasilerde yanılabilirler.
- İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir.
- MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır.

#### **1.6.1.1.2. Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) Metodu**

En yüksek ihtimal metodunda, tüm ağaç topolojileri değerlendirilir. Neticede, yarışan ağaç topolojilerinden en yüksek gerçekleşme olasılığı olan ağaç seçilir.

Maximum likelihood yönteminin avantajları :

- Mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olanıdır.
- Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilirler.
- Sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilir.
- Nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer data tiplerine uygulanabilir.

Bütün bu avantajlarının yanında Maximum Likelihood metodu, basit ve sezgisel olmayışı, parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılabilmesi ve parsimoni metoduna göre daha yavaş olması gibi dezavantajlara sahiptir [111].

#### **1.6.1.1.3. Bayes Metodu**

Bayes metodu, temelde maximum likelihood metoduna benzemektedir, ancak sonraki (posterior) olasılık kullanımı nedeniyle bu yöntemden ayrılır. Mevcut gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir durum hakkında sonuç çıkarma prensibine dayanır. Bu metodta baz alınan “önceki olasılık” kavramı analiz öncesinde tüm olası

ağaç topolojileri için geçerli olan olasılığı ifade eder. Bu metod günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır [111].

### **1.6.1.2. Mesafe (Distance) Temelli Yöntemler**

Mesafe temelli yöntemler; dizi hizlanması sonucu elde edilen evrimsel mesafelerle bir veri matrisi oluşturularak daha sonra matristeki mesafe skorlarına göre tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturma esasına dayanmaktadır [113]. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir [111]. Tercih edilen ağaçlar, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçlardır [112].

Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümeleme temelli veya en iyi durum (optimum durum) temelli algoritmalar olarak ikiye ayrılırlar. Mesafe temelli yöntemlerden bazıları; UPGMA ve Neighbour- joining yöntemleridir.

#### **1.6.1.2.1. Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu**

Bir takson için uzaklık matrisi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matrisi baz alınır. Hızlı bir yöntemdir ve geniş data setlerini çabukça analiz edebilir fakat karakter analizinde kullanılamazlar. Bir atanın iki yavrusunun aynı miktarda değişime uğradığını (dalların eşit uzunlukta olduğunu) savunması gerçekçi değildir [109].

#### **1.6.1.2.2. Komşu Bağlantı Metodu (Neighbour joining)**

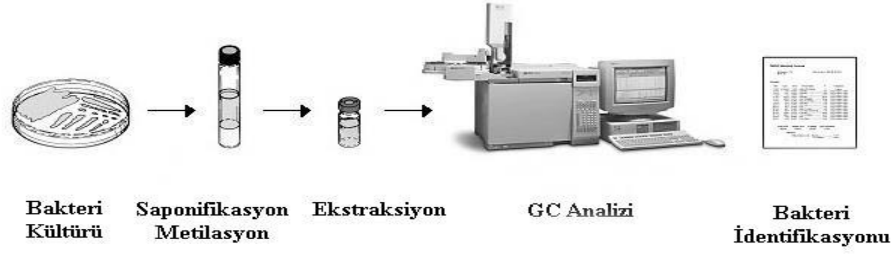
Bu metod içerik olarak “cluster” analize alakalıdır. Ancak, dallar boyunca moleküler değişikliklerin eşit olmayan oranları için metod izin verir. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklıdır. Bu yöntemde bir

tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez [109].

### **1.7. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi**

Bakteriyal lipid kompozisyonu ve taksonomik sınıflandırma arasındaki ilişki bakteriyal identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır. Yağ asiti profillerine dayanan bakterial sınıflandırmalar nükleik asit homolojisine dayalı sınıflandırmalarla iyi karşılaştırılmış durumdadır. Lipid analizleri metodolojisindeki gelişmeler bir çok bakteri için bu ilişkiyi sağlamıştır. Lipid ekstraksiyonlarının gaz kromatografisi, hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu metod bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir. Genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarları (yağ asitleri profili) aynıdır ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmez. Yağ asitlerinin analizleri sonucunda farklı profillerin oluşması mikroorganizmalar arasındaki genetik akrabalıkların göstergesidir [114, 115]. Kültür ortamında çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı ve gerekse onların taksonomik sınıflarının belirlenmesi için yağ asitleri profillerini kullanılabileceği bir çok bilimsel çalışma ile ispat edilmiştir. İlk defa 1985 yılında, ABD’de MIDI, inc. firması tarafından mikroorganizmaları yağ asitlerine göre tanımlayan bir sistem geliştirilmiştir. Bu sistem üç ana parçadan ibarettir (Şekil 1.15);

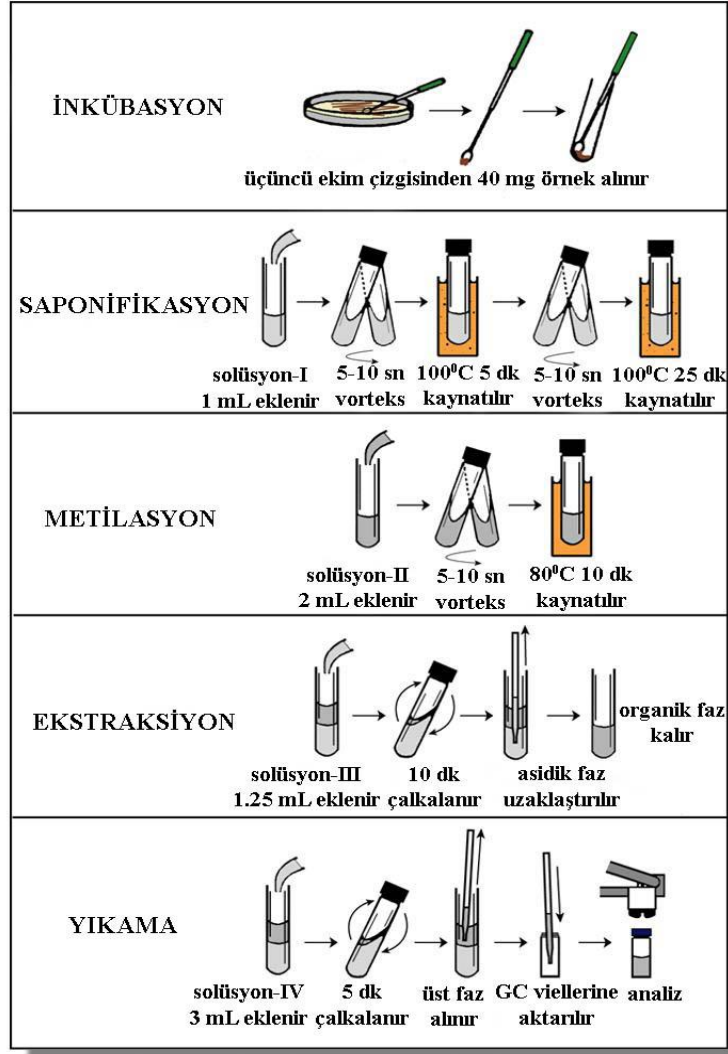
- 1) Gaz kromatografisi,
- 2) Kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava),
- 3) Bilgisayar sistemi (Sherlock system software, library generation software, bakteri ve funguslar için hazırlanmış paket kütüphaneler).



**Şekil 1.15.** Bakteriye yağ asit analizi aşamaları [117].

Her bir mikroorganizmadan saf olarak izole edilen yağ asidi metil esterlerin profilleri MIS cihazında gaz kromatografisi belirlenmektedir. Test edilen gaz kromatografik çıktıları (yağ asitleri profilleri) sistemin veri tabanındaki bilinen mikroorganizmaların yağ-asit profilleri ile karşılaştırılarak tanı yapılmaktadır [114]. Stoakes ve ark. [116]; Gaz-Sıvı Kromatografisi 'ni kullanarak, Microbial Identification System (MIS) ile Stafilokokların identifikasyonu için hücresel yağ asitlerini belirlemişlerdir. İdentifikasyon için yağ asitleri analiz sonuçları ile geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen analiz sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Analize aldıkları 470 izolatın 430'unun analiz sonuçları her iki yöntemle de uyumlu bulunurken; 45 izolat yanlış identifiye edilmiştir. 12 izolatın ise bu sistemde karşılığı bulunamamıştır. *S. hominis* ve *S. saprophyticus* türleri % 52.6 oranında yanlış identifiye edilmiş ve 78 izolat yeniden test edilmiştir. Sonuç olarak 73'ünün isimlendirilmesi değişmezken, 5'inin isimlendirilmesinin değiştiği bulunmuşlardır [116].





**Şekil 1.16.** Bakteriyel yağ asit elde edilmesi aşamaları [117].

Gaz kromatografik işlem basamaklarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Ekstraksiyon: Sıvı veya katı örnek analiz edilecek bileşikleri çözebilen bir çözücü ile ekstrakte edilir. Bu işlem bir blenderda veya bir ayırma hunisinde gerçekleştirilir.
2. Temizleme: Ekstraksiyon sonucu ele geçen ekstraktta ilgilenilen bileşiklerin dışında pek çok bileşik bulunmaktadır. Analizde girişimlerden korunmak için bu kirlenici bileşiklerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için pratikte kolon, ince tabaka kromatografileri ve ayırma hunisinde sıvı-sıvı partiyon kromatografisinden yararlanılmaktadır.

3. Konsantrasyon: Temizlenmiş ekstrakttaki çözücünün buharlaştırılarak örneğin konsantre edilmesi gerekir. Bunun için vakumlu döner buharlaştırıcıdan yararlanılır.

4. Türevlendirme: Temizlenmiş ve konsantre edilmiş örnek içerisindeki bazı bileşenlerin analizi için bileşik çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile başka bir forma dönüştürülür ve böylece gaz kromatografisi dedektörü tarafından duyarlı hale gelmiş olur. Bu işlem her gaz kromatografik analizde zorunlu değildir. Türevlendirme basamağı bazen önceki basamakla yer değiştirebilir [118].

## 1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan gümüş ağır metallerini tolere eden suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri toplanarak, gümüş metali tolere eden suşlar izole edilerek en yüksek MİK değerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşların biyokimyasal testler, yağ asidi ve 16S rDNA sekans analizi kullanılarak tanımlanmıştır. Ag dirençli her bir suş için antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu (curing) çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkilendirilmesi kurulmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1. Nutrient Agar

Mikroorganizmalar için gerekli besin maddelerince yeterli ve zengin, birçok mikroorganizmaların gelişmesini sağlayan besiyeridir. İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Gerekli ölçeklerde hazırlanan besiyeri 121°C'de 1 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g/L</u></b>
Pepton	5.0 g/L
Et özütü	3.0 g/L
Maya özütü	1.0 g/L
Agar	12.0 g/L

##### 2.1.1.2. Nutrient Broth

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g/L</u></b>
Pepton	5.0 g/L
Et özütü	3.0 g/L

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi (growth curve), plazmit izolasyonu, DNA izolasyonu, protein izolasyonu gibi deneyler için kullanılmıştır.

### 2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Antibiyotik disklerinin tamamı Merck ve Sigma marka olup isimleri ve içerdikleri madde miktarları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

	<b>Antibiyotikler (µg/disk)</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>
Beta lactams	Ampicillin (AMP)	10
	Amoxicillin-Clavulanic acid (AMC)	20/10
	Oxacillin (OXA)	1
	Penicillin (PEN)	10
	Ticarcillin (TIC)	75
	Ticarcillin-Clavulanic acid (TIM)	75/10
	Imipenem (IPM)	10
	Piperacilin (PIP)	100
	Piperacilin-Tazobactam (TZP)	100/10
Aminoglycosides	Amikacin (AMK)	30
	Gentamicin (GEN)	10
	Tobramicin (TOB)	10
Quinolones	Ciprofloxacin (CIP)	5
	Pefloxacin (PEF)	5
Cephalosporins	Aztreonam (ATM)	30
	Cefepime (FEP)	5
	Ceftazidime (CAZ)	30
	Sulbactam-Cefoperazone (CFP)	75/30
Polypeptide	Bacitracin (BAC)	10
Sulfonamides	Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT)	25
Polyketides	Tetracycline (TET)	30
Rifamycins	Rifampin (RIF)	5
Macrolides	Erythromycin (ERY)	15
Glycopeptides	Vancomycin (VAN)	30
Amphetamine	Chloramphenicol (CHL)	30

### **2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar**

#### **2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar**

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

#### **2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler**

##### **2.1.3.2.1. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

Deneylerde kullanılan bakteri suşlarının plazmit DNA izolasyonu yapılarak profilleri belirlenmiştir.

##### **2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)**

<b><u>Bileşimi</u></b>	<b><u>g/L</u></b>
Glukoz	9.9 g
Tris	3.94 g
EDTA	3.72 g

Toplam hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. (pH 8.0)

##### **2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)**

5 N NaOH çözeltisinden 4 mL, %10'luk SDS çözeltisinden de 10 mL alınarak karıştırılır. 86 mL distile su ile solüsyon 100 mL'ye tamamlanır.

### 2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit)

74 gram K-asetat tartılır ve 28.75 mL glasiyal asetik asit ile çözülür. Solüsyonun son hacmi 250 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

### 2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	242 g
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	37.2 g
Glasiyal Asetikasit	57.1 mL

Toplam hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

### 2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

#### 2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	0.3 g
EDTA	0.008 g

Toplam hacim 250 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. (pH 8.0)

#### 2.1.3.2.2.2. %10'lük SDS Tamponu (100 mL)

10 gram SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

#### **2.1.3.2.2.3. 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  $\mu\text{L}$ , 1 M 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.

#### **2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)**

20 g NaCl tartılarak, 100 mL distile su ile çözülmüştür.

#### **2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu (100 mL)**

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



#### **2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 mL)**

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.3.2.2.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)**

8.47 g Tris-HCl tartılarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile çözülmüştür. (pH 8.0)

#### **2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

##### **2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )**

6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8.7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartılıp 1000'er mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti pH 7.0 olacak şekilde belirli oranlarda karıştırılmıştır.

#### 2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

##### 2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyonu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve HCl ile pH 8.0'e ayarlanır. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

##### 2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon (11.1 mM Tris-HCl, Triton X-100, pH 7.6)

1.75 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve 1.67 mL Triton X-100 eklenerek HCl ile pH 7.6'ya ayarlanır. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

#### 2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24.2 gram Tris tartılır, 50 mL distile suda çözülür, derişik HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Tris-HCl, 1 M	12.1 gram Tris tartılır, 50 mL distile suda çözülür, konsantre HCl ile pH 6.8'e ayarlanıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
SDS (%10)	10 gram SDS tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Gliserol (%50)	50 mL %100'lük gliserol alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 mL distile su içinde çözülür.

### 2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0.8 bisakrilamid (100 mL)	29.2 gram akrilamid ve 0.8 gram bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH 8.8) 75 mL, %10'lık SDS 4 mL, distile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	1 M Tris-HCl (pH 6.8) 50 mL, %10'lık SDS 4 mL, distile su 46 mL. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 mL)	0.5 gram amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 mL'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 M) 3 gram, glisin (192 mM) 14.4 gram, SDS (% 0.1) 1 gram tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH 8.3
ÖmekTamponu (5x) (10 mL)	1 M Tris-HCL (pH 6.8) 0,6 mL, %50 Gliserol 5 mL, % 10 SDS 2 mL; 0.5 mL 2-merkaptotanol, % 1 Bromfenol mavisi 1 mL; 0.9 mL distile su. Buzdolabında saklanır.

#### 2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	7.8 mL
Solüsyon B (Stok)	6.0 mL
Distile su	10.08 mL
Amonyum persülfat	79.2 µL
TEMED	15.6 µL

### 2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)

Çizelge 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	1.33 mL
Solüsyon C (Stok)	2.0 mL
Distile su	4.67 mL
Amonyum persülfat	27.0 µL
TEMED	6.6µL

### 2.1.3.2.7. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

%0.1 Coomassie Brilliant Blue boya tartılarak, %12'lik glasiyal asetik asit ve %50'lik metanol ile karıştırılarak çözülür.

### 2.1.3.2.8. Yağ Asit Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

#### 2.1.3.2.8.1. Solüsyon I

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

#### 2.1.3.2.8.2. Solüsyon II

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

#### **2.1.3.2.8.3. Solüsyon III**

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

#### **2.1.3.2.8.4. Solüsyon IV**

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

#### **2.1.3.3. PZR Amplifikasyonu için 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'-CCGAATTCGTCG ACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve reverse primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGT TACGACTT-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 MgCl<sub>2</sub>, 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 cyler da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanacaktır [133].

## 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 [119]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi  $184 \text{ m}^3/\text{sn}$  olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az  $18.4 \text{ m}^3/\text{sn}$  ve en çok  $1.673 \text{ m}^3/\text{sn}$  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, Hırfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [120].



**Şekil 2.1.** Kızılırmak'ın lokasyonu [119]

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 ili'nde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [121].

### 2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen 12 bölgeden Eylül 2009'da su örnekleri toplanmıştır.

**Çizelge 2.6.** Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

<b>Bölge Numarası</b>	<b>Bölge Adı</b>	<b>Bölge Koordinatları</b>
1	Kesikköprü Barajı	39° 23' 53,41"K, 33° 25' 18,44"D, 775 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98"K, 33° 24' 56,99"D, 819,5 m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60"K, 33° 23' 25,53"D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39 "K, 33° 24' 00,99"D, 801 m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39° 32' 26,97"K, 33° 23' 59,54"D, 760 m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02"K, 33° 24' 38,51"D, 750,5 m
7	Sulubük - Kıyıdağı Mevkii	39° 37' 04,85"K, 33° 26' 11,19"D, 771 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39' 42,39"K, 33° 27' 13,46"D, 766,5 m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62"K, 33° 28' 59,95"D, 741 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08"K, 33° 27' 42,27"D, 718,5 m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92"K, 33° 28' 07,85"D, 706,5 m
12	İrmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25"K, 33° 25' 04,24"D, 699,5 m



Şekil 2.2. Örneklerin alındığı bölgelerin uydu fotoğrafı (Google Earth)

### 2.2.3. Gümüşe Dirençli Bakterilerin İzolasyonu

Ag ağır metallerine dirençli bakterilerin seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Ag ağır metale dirençli suşları seçmek için literatürde belirlenen konsantrasyonlarda ayrı ayrı  $AgNO_3$  ağır metali içeren nutrient agar (NA) ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlarda her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir.  $30^{\circ}C$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Ag dirençli koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.



#### **2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması**

Ag dirençli saf kültürler 30°C’de 48 saat inkübe edilerek koloni morfolojisine ve hücre morfoloji özelliklerine bakılmıştır. Suşların koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkan/yapışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojileri ise, gram boyamayla mikroskop altında (immersiyon yağıyla ve x100 büyütme objektifi) incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

#### **2.2.5. Gümüşe Dirençli Bakterilerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi**

Ag ağır metale dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> eklenerek saptanmıştır. 30°C’de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petrilerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyonlardaki ayrı ayrı Ag metali bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saat sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

#### **2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testler ile Tanımlanması**

Kırıkkale-Kızılırmak’tan Ag dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiştir ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiş, API 20 kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmış ve bu sonuçlara göre suşlar tanımlanmıştır [122-123].

#### **2.2.7. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

MİK değerleri belirlenen Ag metalinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Ag metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Kültürler 30°C’de çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve 0.saatten itibaren, OD<sub>600</sub>

nm'de, her iki saate bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

### 2.2.8. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen Ag dirençli bakterilerin koromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [124]. 15 mL'lik 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 karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Aynı hacimde kloroform/izoamil alkol solüsyonunu 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 uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır [124].

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'deki absorpsanları hesaplanmış ( $OD_{260}$  ve  $OD_{280}$ ) ve bu değerler arasındaki 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 [125]. 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 [125].

### 2.2.9. 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'-CCGAATTCGTCG ACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve (reverse) R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGT TACGACTT-3'. 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 [125].

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<sub>2</sub>, Taq buffer, Taq DNA Polymerase ve PZR Master Mix miktarları belirtilmiştir. Son hacim steril distile su (water nuclease-free) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 2.7.** PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar

Genomik DNA	1.86 µL
F Primer	0.50 µL
R Primer	0.50 µL
dNTP	2.00 µL
MgCl <sub>2</sub>	3.75 µL
Taq tampon	5.00 µL
Taq DNA poly	0,75 µL
Su	35.64 µL
PZR toplam karışımı	50.00 µL

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 [126].

**Çizelge 2.8.** PZR amplifikasyon koşulları

Analiz Modu	Sıcaklık - Zaman	Döngü
Ön denatürasyon	95°C - 5 dakika	1 döngü
Amplifikasyon	Denatürasyon	94°C - 1 dakika
	Primerlerin bağlanması	52-65°C - 30 saniye
	Yeni iplikçeğin yazılımı	72°C - 2 dakika
Son yazılım	72°C - 10 dakika	1 döngü
Soğutma	72°C - 10 dakika	1 döngü

### 2.2.10. 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 filtrelili 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.

### **2.2.11. 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/cm<sup>2</sup> voltaj ve 40 mA amper uygulanarak yaklaşık 1 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır.

### **2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması**

Elektroforez işlemi tamamlandıca 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 MgSO<sub>4</sub> 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.

### **2.2.13. DNA Sekans Analizi**

İzole edilen Ag101 ve Ag111 suşlarının 16S rDNA gen sekansları yapılacaktır. Safaştırılmış 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.

#### **2.2.14. 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. [128-133]

#### **2.2.15. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi**

Seçilen Ag101 ve Ag111 suşlarının tüm yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [134]. 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 lipitlerin 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.

**Çizelge 2.9.** GC genel çalışma prensibi

Enjeksiyon miktarı	0.50 µL
Dedektör sıcaklığı	250°C
Enjeksiyon bloğu sıcaklığı	250°C
Ayrılma oranı	1:90
Taşıyıcı gaz azot	0.5 mL/dakika
Kolon (Fırın) sıcaklığı	Sıcaklık programlı, 60°C'dan 200°C'a kadar dakikada 2°C artacak şekilde
Sonlandırma	200°C'da 10 dakika bekletilerek analiz tamamlanmıştır

### **2.2.16. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi**

Kızılrnak' tan izole edilen suşların Ag ağır metaline dirençli her bir suşun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallere dirençlilikleri de tespit edilmiştir.

Böylece suşların çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Ag dirençli suşun, çoklu metal dirençlilik profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Al, Cd, Ba, Li, Cr, Mn, Pb, Co, Fe, Cu, Sn, Ni, Zn, Hg, Sb, Sr ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme görülen suşların ortama ekilen metale karşı dirençli, üreme görülmeyenlerin

ise o metale karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ag dirençli suşun antibiyotik dirençlilik profilini belirlemek için Ag içermeyen NA besiyeri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerine Çizelge 2.1’de belirtilen antibiyotik diskleri uygulanmış 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Disk etrafında zon görülmesi o antibiyotiğe duyarlı olduğu, zon görülmemesi durumunda dirençli olduğu tespit edilmiştir.

### **2.2.17. Plazmit DNA İzolasyonu**

İzole edilen Ag dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu Birnboim ve Doly tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [135]. Plazmit izole edilecek bakterilerin 100 mL’lik metal içermeyen NB (Nutrient Broth) besiyerine ve 100 mL’lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> metalinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. 30°C’de 20 saat kalay ve 37°C’de 24 saat lityum inkübe edilmiştir. İnkübe edilen kültürlerden 1.5 mL alınarak 12.500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1.5 mL kültür konularak işlem tekrarlanmış ve süpernatant atılmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µL Solüsyon I (Glukoz/ Tris/ EDTA) ilave edilmiştir. Tüplerdeki karışım homojen oluncaya kadar vortekslenir ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Tüpler buz içinden çıkarılıp üzerlerine 200 µL Solüsyon II (NaOH/ SDS) ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 150 µL Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit) ilave edilmiştir ve tüpleri birkaç kez alt üst ettikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınarak pellet atılmıştır. %100’lük etanolden 900 µL tüplere konulmuş ve -20 °C’de bir gece bekletilmiştir. Gece sonunda beklemiş olan solüsyon 13.100 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine %70’lik etanolden 1 mL eklenerek 15 dakika 13.100 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz atılmıştır ve pellet üzerine 20 µL su ve 5 µL boya ilave edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.



## 2.2.18. Transformasyon

Sambrook ve Russell tarafından tanımlanan kalsiyum klorür yöntemi kullanılarak *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) hücreleri kompetan hale getirilmiş ve transformasyon yapılmıştır. Yöntemin basamakları aşağıda verilmiştir. [136]. LB agarda 37°C'de 16-20 saat inkübe edilmiş standart *E. coli* DH5 $\alpha$  kültüründen bir koloni alınarak 1L'lik erlen içindeki 100 mL LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Kültür çalkalanarak 3 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Üreme OD<sub>600</sub>'de 1 absorbans olana kadar spektrofotometrede ölçülerek takip edilmiştir. Üreme sonunda bakteri hücreleri steril, disposable 50 mL'lik polipropilen tüplere aktarılmıştır. Kültürler 10 dakika buz üzerinde bekletilerek 0°C'ye soğuması sağlanmıştır. Tüpler 13.100 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda besiyeri dökülmüştür. Tüpler ters pozisyonda kağıt havlu üzerinde 1 dakika bekletilerek tüm besiyerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Her bir pellet 30 ml soğuk CaCl<sub>2</sub> solüsyonu ile nazıkçe süspansiyon edilmiştir. Hücreler 13.100 rpm'de 4°C 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant dökülmüş ve tüpler kağıt havlu üzerinde ters pozisyonda 1 dakika bekletilerek süpernatant artıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. 50 mL'lik kültürlerden elde edilen pelletlerin her biri soğuk 2 mL CaCl<sub>2</sub> ile süspansiyon edilmiştir. Bu aşamada elde edilen hücreler direkt transformasyon için kullanılmıştır. Artan hücreler daha sonra kullanılmak üzere 200 mL'lik alikotlara ayrılarak -70°C'de dondurularak saklanmıştır. Transformasyona başlamadan önce kullanılacak mikropipet uçları ve tüpler -20°C'de bekletilerek soğutulmuştur. CaCl<sub>2</sub> ile muamele edilmiş hücreler soğutulmuş 17 x 100 mm 'lik polipropilen tüplere aktarılmıştır. Hücrelerin üzerine izole edilen plazmid DNA'ları (50 ng veya 10  $\mu$ L) eklenmiştir. Tüpler nazıkçe çalkalanarak hücre ve DNA'nın karışması sağlanmış ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler daha önceden 42°C'ye ısıtılmış su banyosuna aktarılmış ve 90 saniye bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler hızlıca buz üzerine alınmış ve 1-2 dakika bekletilmiştir. Tüplere 800  $\mu$ L SOC besiyeri eklenmiş ve 45 dakika 37°C'ye ısıtılmış su banyosunda inkübe edilmiştir. Transformasyon edilmiş kompetan hücrelerden uygun miktarda (90 mm'lik plaklar için 200  $\mu$ L) alınarak 20 mM MgSO<sub>4</sub> ve 100 $\mu$ g/mL ampisilin içeren SOB agara ekilmiştir. Ekilen hücreler besiyerinde absorbe olana

kadar plaklar oda ısısında bekletilmiştir. Plaklar ters çevrilerek 37°C’de inkübe edilmiştir. 12-16 saat sonra transformant kolonileri görünür hale gelmiştir.

### **2.2.19. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması**

%0.7’lik hazırlanan agaroz jel solüsyonu, yaklaşık 45-50°C’ye soğutulduktan sonra tarak yerleştirilmiş jel kabına dökülmüştür. Polimerize olan jelden tarak çıkarıldıktan sonra 20 µL plazmit DNA örnekleri 5 µL yükleme tamponu ile karıştırılmış ve mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Plazmit DNA’larının moleküler ağırlıklarını hesaplamak amacıyla bir kuyucuğa 3 µL marker DNA (Lambda DNA/ HindIII) yüklenmiştir. Aparata jelin yüzeyini kaplayacak şekilde yürütme tamponu ilave edilmiş ve 80 V/cm<sup>2</sup> voltaj, 6 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır. Elektroforez yapıldıktan sonra boyalı bantlar jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

### **2.2.20. Plazmit DNA’nın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi**

Plazmit DNA’ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA/ HindIII marker (23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 kb) referans alınarak her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen DNA bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

### **2.2.21. Plazmit Eliminasyonu**

İzole edilen Ag dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık ve etidyum bromür kullanılarak plazmit eliminasyon çalışmaları yapılmıştır [137]. Plazmit taşıdığı tespit edilen *R. planticola* suşunun optimum üreme sıcaklığı 30°C’dir ve en yüksek denenen sıcaklık 41°C

olup, bu sıcaklıkta üremediği gözlemlenmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmalarında NB besiyerine ekimi yapılan Ag dirençli *R. planticola* suşu için en yüksek denenen sıcaklık 41°C olup, bu sıcaklıkta üremediği gözlemlenmiştir. 40°C sıcaklık ve 10 mL NB besiyerine 10 µg/µL etidyum bromür ilave edilerek denenmiş ve bu sıcaklıkta üreme olduğu gözlemlenmiş olup Ag içeren ve içermeyen 2 farklı NA besiyeri hazırlanmış ve 40°C'de üreyen Ag dirençli suştan ekim yapılmış, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.22. Total Protein İzolasyonu**

İzole edilen Ag dirençli bakterilerin total protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [138]. 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> metalinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerinden uzaklaşmak için santrifüj yapılmıştır, süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5 mL steril su eklenerek 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır, süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant temiz tüplere alınmıştır. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tampon ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

### **2.2.23. Dış Membran Protein İzolasyonu**

İzole edilen Ag dirençli bakterilerin dış membran izolasyonu Achtman ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [139]. 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> metalinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerinden uzaklaşmak için santrifüj yapılmıştır, süpernatant atılmıştır. 10 mL, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 4°C'de 3000 rpm, 20 dakika santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Süpernatant yeni tüplere alınarak 4°C'de, 20.000 rpm, 60 dakika

santrifij yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µL steril su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örneklere 200 µL Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20 dakika bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de 2000 rpm, 90 dakika santrifij yapılmıştır süpernatant atılmıştır. Pelletler üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100 °C'de 5 dakika bekletilmiştir.

#### **2.2.24. Dış Membran ve Total Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Dış membran ve total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Page Ruler Pstained Protein Ladder (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25 kDa), marker referans alınarak her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

#### **2.2.25. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması**

Dış membran, total protein analizleri Laemmli'ye göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır [140].

##### **2.2.25.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

16,7 mL %30'lük Akrilamid/ Bis Akrilamid, 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 mL %10'lük APS (amonyum persülfat), 500 mL %10'lük SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 mL TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığına sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin

üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir [140].

#### **2.2.25.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması**

3.4 mL %30'luk Akrilamid/ Bis Akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 mL %10'luk APS ve 200 mL %10'luk SDS birbiri ile iyici karıştırıldıktan sonra 20 mL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir [140].

#### **2.2.25.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrez**

Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve 30 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 1 saat yürütülmüştür [140].

#### **2.2.25.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması**

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller tespitleme çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dakikalık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [140]. Jellerin fotoğrafları SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmış, karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir [140].

#### **2.2.25.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü**

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taramıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [142].

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Gümüş ve Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi 4, 6, 10, 11 ve 12. bölgelerden gümüşe dirençli 5 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. MİK değeri AgNO<sub>3</sub> için 8 mg/L olan ve 10. ile 11. bölgelerden izole edilen iki suş Ag101 ve Ag111 kodları verilerek sonraki çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Gümüş dirençli suşların bölgelere göre yayılımı

Örnek Alınan Bölgeler ve Bakteri Üreme Durumları												
Ağır Metal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AgNO <sub>3</sub>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+

(-), negatif; (+), pozitif

#### 3.2. Bakterilerin Tanımlanması

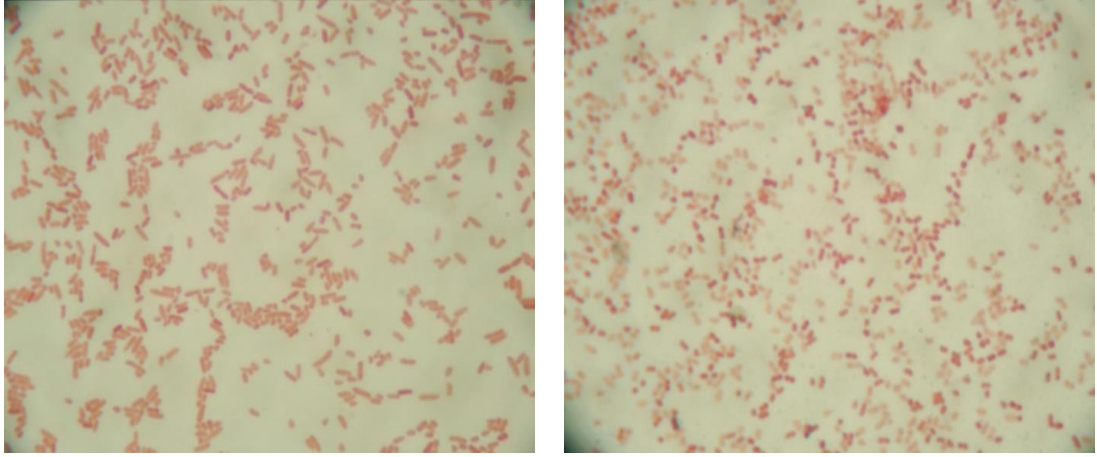
Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi Ag101 ve Ag111 olarak adlandırılan suşların biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Suşların optik özellik bakımından Ag101 suşunun saydam olduğu ve Ag111 suşunun ise opak görünüme sahip olduğu belirlenmiştir. Ag101 ve Ag111 suşlarının hücre morfolojilerini belirlemek için gram boyama yapılmış ve her iki suşunda gram negatif olduğu belirlenmiştir. Hücre şekilleri incelendiğinde ise her iki suşunda basil morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Gümüş dirençli suşların biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Testler	Suşlar	
	Ag101	Ag111
Morfoloji	Basil	Basil
Gram Reaksiyon	-	-
Akışkanlık	Akışkan	Mukoid
Optik Özellikler	Saydam	Opak
Pigment	-	Beyaz
DP300 (DP3)	+	-
Üre (URE)	-	+
Maltoz (MLT)	-	+
İnositol (INO)	-	+
Arabinoz (ARA)	-	+
Sitrat (CIT)	+	+
Mannitol (MAN)	-	+
Adonitol (ADO)	-	+
Glukoz (GLU)	-	+
Malonat (MAL)	+	+
Ksiloz (XYL)	+	+
Arjinin (ARG)	+	-
Asetamin (ACE)	+	-
Rafinoz (RAF)	-	+
Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S)	-	-
Eskülin (ESC)	-	+
Polimiksin B (PXB)	+	-
Sorbitol (SOR)	-	+
ONPG (ONP)	-	+
Ornitin (ORN)	-	-
Plant indican (PLI)	-	+
Laktoz %10 (LAC)	-	+
Sükroz (SUC)	-	+
Ramnoz (RHA)	-	+
Oksidaz (OXI)	+	-
<b>Tanımlanan Türler</b>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Raoultella planticola</i>

(-), negatif; (+), pozitif



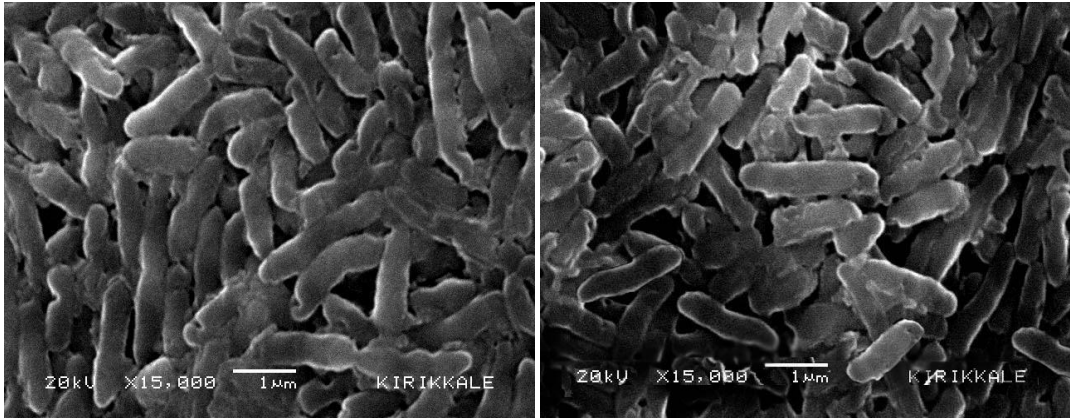


(a)

(b)

**Şekil 3.1.** Gram boyama sonrası Ag101 (a) ve Ag111 (b) suşlarının mikroskopik görüntüsü (x100)

Ag101 ve Ag111 suşları yapılan biyokimyasal testler sonucu sırasıyla *P. plecoglossicida* ve *R. planticola* olarak tanımlanmıştır. Her iki suşunda Gram negatif (-), basil şekilli hücreler olduğu ayrıca sitrat, malonat ve ksiloz (+) olduğu tespit edilmiştir.



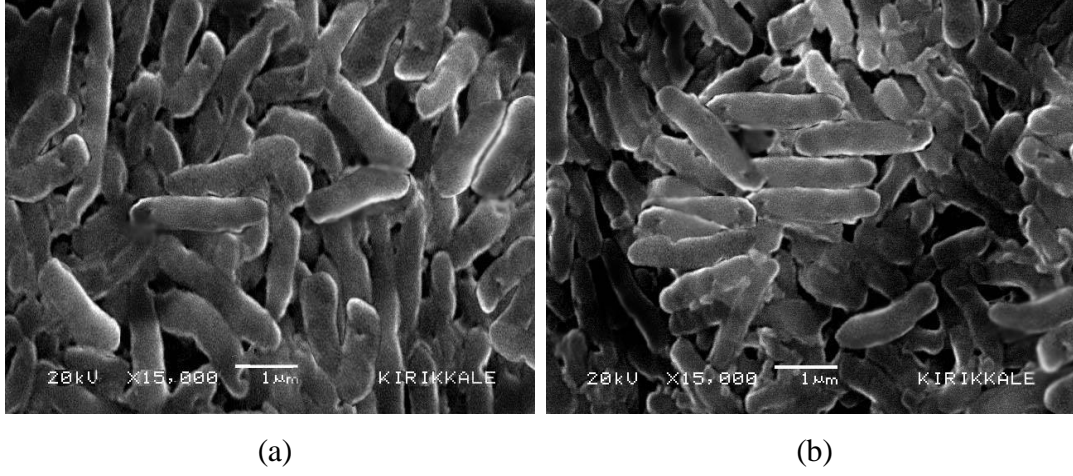
(a)

(b)

**Şekil 3.2.** Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun Ag içermeyen (a) ve içeren (b) ortamlardaki elektron mikroskop görüntüsü

Yapılan çalışmalar sonucunda gümüş içermeyen ortamda üremiş olan *P. plecoglossicida* suşunun eninin uzunluğu ortalama 496 nm, boyunun uzunluğu ise ortalama 1.67 µm olduğu belirlenmiştir. Gümüş içeren ortamda üremiş olan *P.*

*plecoglossicida* suşunun eninin uzunluğu ortalama 454 nm, boyunun uzunluğu ise ortalama 1.69 µm olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.3.** Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun Ag içermeyen (a) ve içeren (b) ortamlardaki elektron mikroskop görüntüsü

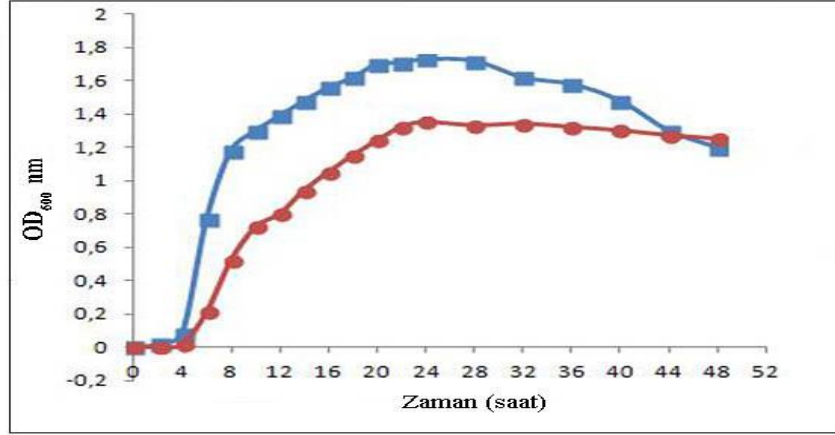
Yapılan çalışmalar sonucunda gümüş içermeyen ortamda üremiş olan *R. planticola* suşunun eninin uzunluğu ortalama 475 nm, boyunun uzunluğu ise ortalama 1.56 µm olduğu belirlenmiştir. Gümüş içeren ortamda üremiş olan *R. planticola* suşunun eninin uzunluğu ortalama 473 nm, boyunun uzunluğu ise ortalama 1.52 µm olduğu görülmüştür.

### 3.3. Bakteri Üreme Eğrileri

#### 3.3.1. Gümüş Dirençli *P. plecoglossicida* Suşunun Üreme Eğrisi

Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun üreme eğrisi Şekil 3.4' de gösterilmiştir. *P. plecoglossicida* suşunun gümüş içermeyen ortamda içeren ortama göre daha yüksek OD göstermiştir. *P. plecoglossicida* suşunun ikiye katlanma süresi (doubling time) gümüş içermeyen ortamda 1.6 saat, gümüş içeren ortamda ise 2.4 saat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *P. plecoglossicida* suşunun üstel büyüme hızı (exponential

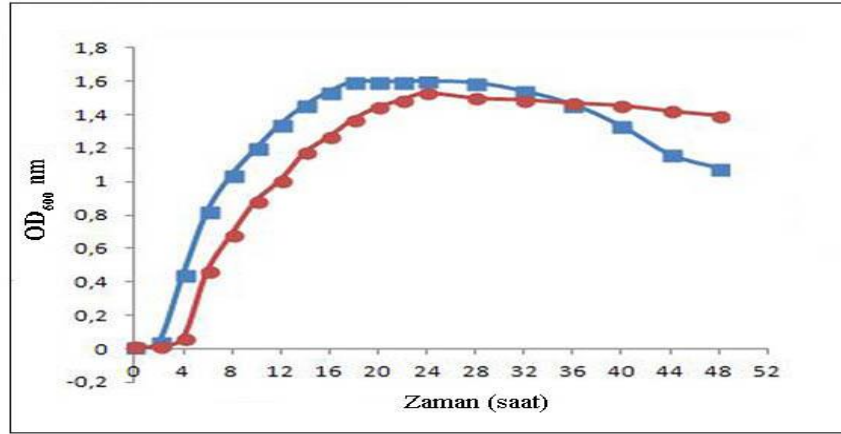
growth rate) gümüş içermeyen ortamda 0.42, gümüş içeren ortamda ise 0.28 olarak bulunmuştur [143].



Şekil 3.4. Ag dirençli *P. plecoglossicida* suşunun (■) Ag içermeyen ve (●) içeren ortamdaki üreme eğrileri

### 3.3.2. Gümüş Dirençli *R. planticola* Suşunun Üreme Eğrisi

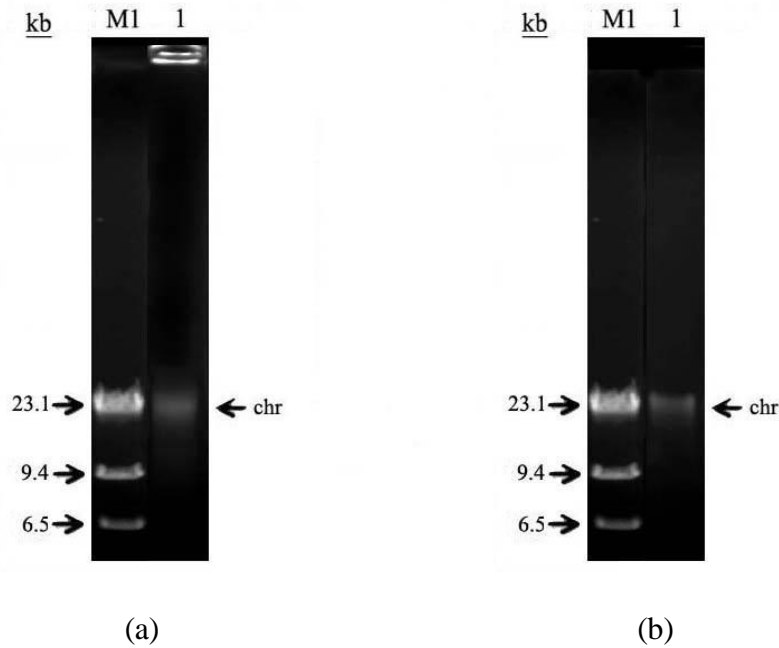
Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun üreme eğrisi Şekil 3.5' de gösterilmiştir. *R. planticola* suşunun ise gümüş içermeyen ortamda daha kısa bir gecikme fazı geçirdikten sonra logaritmik faza daha çabuk geçtiği tespit edilmiştir. Her iki ortamda da bakterinin OD'si paralellik göstermiştir (Şekil 3.5). *R. planticola* suşunun ikiye katlanma süresi (doubling time) gümüş içermeyen ortamda 1.9 saat, gümüş içeren ortamda ise 3.0 saat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *R. planticola* suşunun üstel büyüme hızı (exponential growth rate) gümüş içermeyen ortamda 0.35, gümüş içeren ortamda ise 0.22 olarak bulunmuştur. [143].



Şekil 3.5. Ag dirençli *R. planticola* suşunun (■) Ag içermeyen ve (●) içeren ortamdaki üreme eğrileri

### 3.4. Gümüş Dirençli Bakterilerden Kromozomal DNA İzolasyonu

Gümüş dirençli Ag101 ve Ag111 suşlarından kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından agaroz jelde yürütülerek bantlar kontrol edilmiş ve PZR amplifikasyon çalışmalarında bu suşlara ait DNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.6 Gümüş dirençli Ag101 (a) ve Ag111 (b) suşlarının DNA profilleri

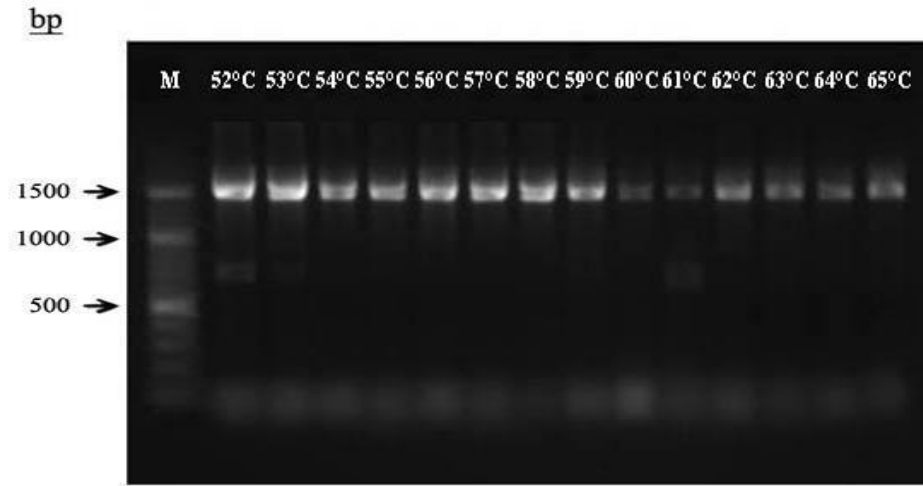
M1; marker Lambda DNA/ HindIII

### 3.5. Gümüş Dirençli Bakterilerin PZR Amplifikasyon Optimizasyonu

Spesifik olmayan ürünler oluşturmadan, spesifik bir gen bölgesini amplifiye etmek optimal bir PZR reaksiyonuna bağlıdır. PZR'de kullanılan temel bileşenlerden primer bağlanma sıcaklığı ve  $MgCl_2$  konsantrasyonu optimize edilmiştir.

#### 3.5.1. Gümüş Dirençli Ag101 Suşunun PZR Amplifikasyon Optimizasyonu

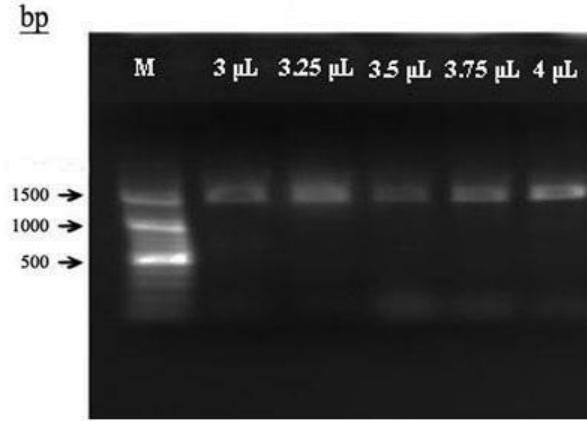
Sıcaklık: PZR reaksiyon karışımının optimizasyonu için farklı annealing sıcaklıklarının optimizasyona olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.7). Bu amaçla Ag101 suşunun DNA'sı kalıp olarak kullanılmış ve 52-65°C arası 14 farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Bu sırada diğer reaksiyon bileşenleri sabit tutulmuştur. Sonuç olarak Ag101 suşu için spesifik olmayan bağlanmaların minimum olduğu optimal annealing sıcaklığı 63°C olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.7.** Ag101 suşu için yapılan farklı annealing sıcaklıklarındaki PZR amplifikasyonu M; marker Fermentas O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder

$MgCl_2$  Konsantrasyonu: Ag101 suşu için optimal bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarının optimizasyona olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.8). Bu amaçla Ag101 suşunun DNA'sı kalıp olarak kullanılmış ve 4 farklı

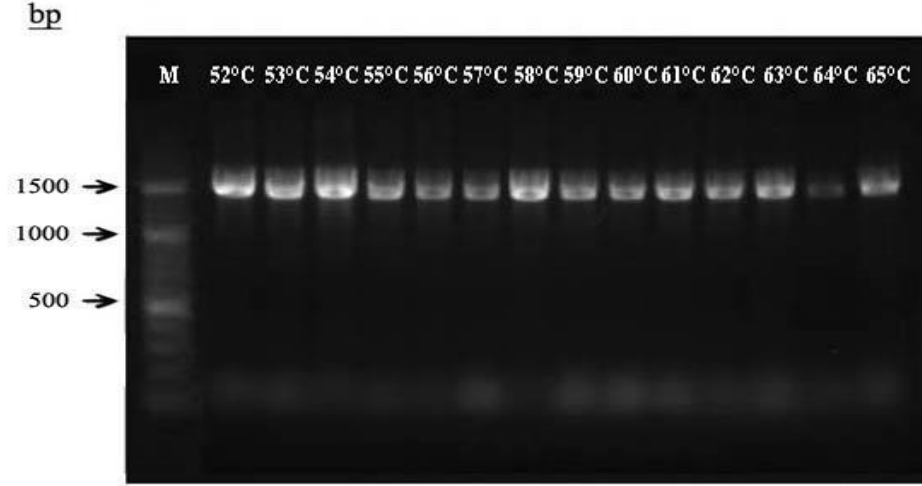
MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu denenmiştir. Bu sırada diğer reaksiyon bileşenleri sabit tutulmuştur. Sonuç olarak Ag101 suşu için optimal olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 3 µL 50 mM olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.8.** Ag101 suşu için yapılan farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR amplifikasyonu M; marker Fermentas O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder

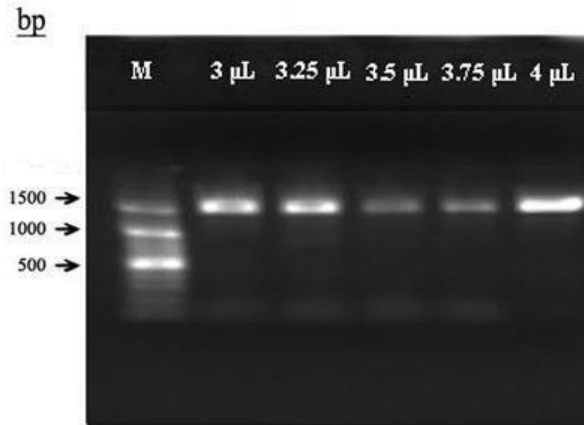
### 3.5.2. Gümüş Dirençli Ag111 Suşunun PZR Amplifikasyon Optimizasyonu

Sıcaklık: PZR reaksiyon karışımının optimizasyonu için farklı annealing sıcaklıklarının optimizasyona olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.9). Bu amaçla Ag111 suşunun DNA'sı kalıp olarak kullanılmış ve 52-65°C arası 14 farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Bu sırada diğer reaksiyon bileşenleri sabit tutulmuştur. Sonuç olarak Ag111 suşu için optimal annealing sıcaklığı 58°C olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.9.** Ag111 suşu için yapılan farklı annealing sıcaklıklarındaki PZR amplifikasyonu M; marker Fermentas O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder

MgCl<sub>2</sub> Konsantrasyonu: Ag111 suşu için optimal bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının optimizasyona olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.10). Bu amaçla Ag101 suşunun DNA'sı kalıp olarak kullanılmış ve 4 farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu denenmiştir. Bu sırada diğer reaksiyon bileşenleri sabit tutulmuştur. Sonuç olarak Ag111 suşu için spesifik olmayan bağlanmaların minimum olduğu optimal olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 4 µL 50 mM olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.10.** Ag111 suşu için yapılan farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR amplifikasyonu M; marker Fermentas O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder

### **3.6. Gümüş Dirençli Bakterilerin 16S rDNA Dizisinin Belirlenmesi**

#### **3.6.1. Gümüş Dirençli Ag101 Suşuna ait 16S rDNA'nın Kısmi Sekans Dizisi ve Tür Tayini**

Gümüş dirençli Ag101 suşuna ait 16S rDNA dizisi iki farklı universal primer (27F-1492R) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center Of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Blast programı doğrultusunda NCBI genbank, EMBL ve Ribosomal Database Project (RDP)'de yayımlanan kayıtlı sekanslar ile karşılaştırılmıştır.

16S rDNA sekanslarının NCBI gen bankası sonuçlarına göre Ag101 suşunun %99 oranında *P. plecoglossicida* strain FPC951 (NR\_024662) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

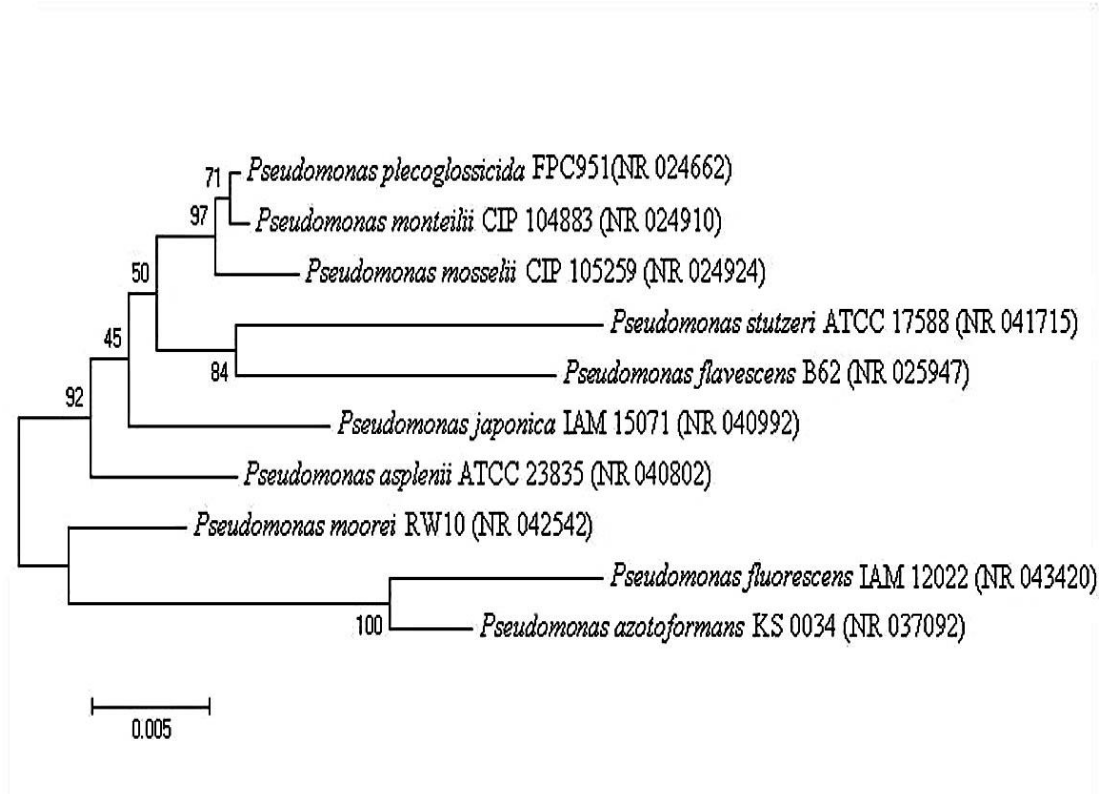


**Çizelge 3.3.** Ag101 suşunun 16S rDNA sekans analiz sonuçları

İzolat	Tanımlanan Tür	EMBL / Gen Bank No	Nükleotid Dizisi
Ag101	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> %99	NR_024662.1	AGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCC ACTCCCATGGTGTGCCGGGCGGTGT GTACAAGGCCCGGAACGTATTAC CGCGACATTTCTGATTCGCGATTACT AGCGATTCGACTTCACGCAGTCGA GTTGCAGACTGCGATCCGGACTACG ATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCAC CTCGCGGCTTGCAACCCCTCTGTAC CGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCC CAGGCCGT AAGGGCCATGATGACTT GACGTCATCCCCACCTTCTCCGGT TTGTACCAGGCGAGTCTCCTTAGAGT GCCACCAT AACGTGCTGGTAACTA AGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGG GACTTAACCCAACATCTCACGACAC GAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC CTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACC AATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGC ATGTCAAGGCCTGGTAAGGTCTTTC GCGTTGCTTCGAATTAACCACATG CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGT CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACT TAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAA TCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTG ACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTTTTGCTCCCC ACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTA TCAGTCCAGGTGGTCGCTTCGCCA CTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCA TTTCACCGCTACACAGGAAATTC CCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTG CCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGT TGAGCCCCGGGCTTTACATCCAAC TTAACAAACCACCTACGCGCGCTTT ACGCCCAGTAATCCGATTAACGCT TGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTG CTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTA TTCTGTCCGT AACGTCAAAACAGCA AGGTATTAGCTTACTGCCCTTCTC CCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCG AAGACCTTCTTACACACACGCGCAT GGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTG TCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCC CGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAG TTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTC AGACCAGTTACGGATCGTCGCTTG GTGAGCCATTACCCACCAACTAGC TAATCCGACCTAGGCTCATCTGATA GCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCT TTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTAT TAGCGTTCTTTGAAACGTTGTCC CCCCTACCAGGAGATTCTAGGC ATTACTACCCGTCGCGCGCTGAAT CAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCC
	<i>Pseudomonas monteilii</i> %99	NR_024910.1	
	<i>Pseudomonas mosselii</i> %99	NR_024924.1	
	<i>Pseudomonas japonica</i> %98	NR_040992.1	
	<i>Pseudomonas asplenii</i> %98	NR_040802.1	
	<i>Pseudomonas flavescens</i> %98	NR_025947.1	
	<i>Pseudomonas moorei</i> %97	NR_042542.1	
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> %97	NR_041715.1	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> %96	NR_043420.1	
	<i>Pseudomonas azotoformans</i> %96	NR_037092.1	

### 3.6.2. Ag101 Suşuna Ait 16S rDNA Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz

Yapılan analizde, komşu bağlantı kriter olarak alınmıştır. Oluşan ağaç, 144 basamaklık (step) bir uzunluğa sahiptir. (Şekil 3.11). Yapılan çalışmada, 10 taksonun her birine ait 1530 karakterden 1355 karakter sabit, 115 karakter değişken ve 60 karakter filogeni açısından bilgi verici (informatif) dir [130-133].



Şekil 3.11. Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşuna ait neighbour - joining dendrogramı (0.005, nükleotidler arasındaki farklılık)

Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gereklidir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi hesaplanmıştır. İki tür arasındaki uzaklık matris değeri ne kadar küçükse, türler birbirine o kadar yakındır [130-131].

**Çizelge 3.4.** *P. plecoglossicida* suşuna ait 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri (distance matrix)

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Pseudomonas mosselii</i>	-									
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.005	-								
<i>Pseudomonas monteilii</i>	0.005	0.001	-							
<i>Pseudomonas japonica</i>	0.016	0.013	0.014	-						
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.025	0.024	0.024	0.028	-					
<i>Pseudomonas moorei</i>	0.018	0.017	0.017	0.024	0.029	-				
<i>Pseudomonas flavescens</i>	0.024	0.019	0.020	0.029	0.029	0.027	-			
<i>Pseudomonas asplenii</i>	0.016	0.013	0.013	0.014	0.028	0.019	0.029	-		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.038	0.035	0.035	0.039	0.050	0.028	0.048	0.029	-	
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	0.030	0.029	0.028	0.033	0.044	0.022	0.041	0.030	0.013	-

*P. plecoglossicida* 16S rDNA bölgesine göre sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (Neighbour Joining Trees) oluşturulmuştur (Şekil 3.11). Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisi hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). 16S rDNA için elde edilen dendograma ve uzaklık matris verilerine göre genetik olarak *P. plecoglossicida*, *P. monteilii* ile yakın tür (uzaklık matrisi, 0.001) olduğu bulunmuştur. *P. plecoglossicida* suşunun *P. fluorescens* (uzaklık matrisi, 0.035) ve *P. azotoformans* (uzaklık matrisi, 0.029) ile uzak türler olduğu tespit edilmiştir.

### **3.6.3. Gümüş Dirençli Ag111 Suşuna ait 16S rDNA'nın Kısmi Sekans Dizisi ve Tür Tayini**

Gümüş dirençli Ag111 suşuna ait 16S rDNA dizisi iki farklı universal primer (27F-1492R) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center Of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Blast programı doğrultusunda NCBI genbank, EMBL ve Ribosomal Database Project (RDP)'de yayımlanan kayıtlı sekanslar ile karşılaştırılmıştır.

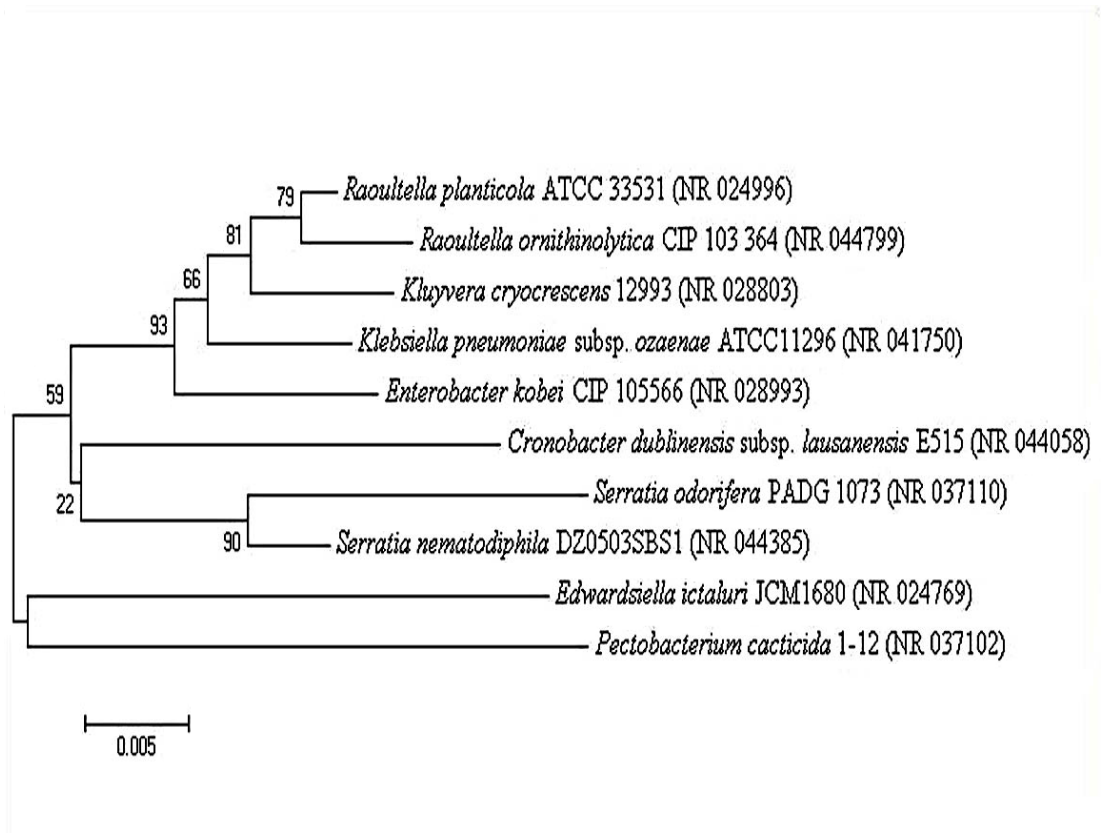
16S rDNA sekanslarının NCBI gen bankası sonuçlarına göre Ag111 suşunun %99 oranında *R. planticola* strain ATCC 33531 ile (NR\_024996) homoloji gösterdiği saptanmıştır.

**Çizelge 3.5.** Ag111 suşunun 16S rDNA sekans analiz sonuçları

İzolat	Tanımlanan Tür	EMBL / Gen Bank No	Nükleotid Dizisi
Ag111	<i>Raoultella planticola</i>	%99	NR_024996.1
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	%99	NR_044799.1
	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	%99	NR_028803.1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	%98	NR_041750.1
	<i>Serratia nematodiphila</i>	%98	NR_044385.1
	<i>Enterobacter kobei</i>	%98	NR_028993.1
	<i>Cronobacter dublinensis</i>	%97	NR_044058.1
	<i>Serratia odorifera</i>	%97	NR_037110.1
	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	%96	NR_024769.1
	<i>Pectobacterium cacticida</i>	%96	NR_037102.1

### 3.6.4. Ag111 Suşuna Ait 16S rDNA Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz

Yapılan analizde, komşu bağlantı kriter olarak alınmıştır. Oluşan ağaç, 225 basamaklık (step) bir uzunluğa sahiptir. (Şekil 3.12). Yapılan çalışmada, 10 taksonun her birine ait 1538 karakterden 1312 karakter sabit, 149 karakter değişken ve 77 karakter filogeni açısından bilgi verici (informatif) dir. [130-131-132-133].



Şekil 3.12. Gümüş dirençli *R. planticola* suşuna ait neighbour - joining dendrogramı (0.005, nükleotidler arasındaki farklılık)

Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gereklidir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi hesaplanmıştır. İki tür arasındaki uzaklık matris değeri ne kadar küçükse, türler birbirine o kadar yakındır [130-131].

**Çizelge 3.6.** *R. planticola* Suşuna ait 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri (distance matrix)

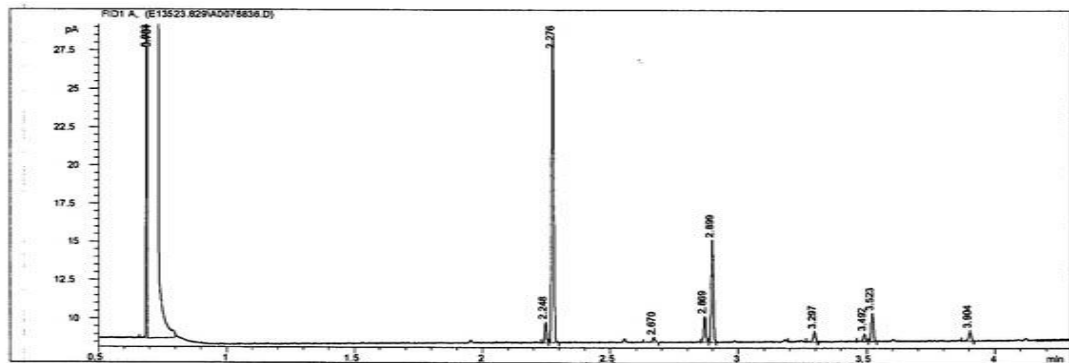
Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Raoultella planticola</i>	-									
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0.007	-								
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0.013	0.013	-							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.015	0.019	0.015	-						
<i>Cronobacter dublinensis</i>	0.029	0.035	0.038	0.036	-					
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	0.042	0.049	0.047	0.043	0.045	-				
<i>Serratia odorifera</i>	0.036	0.041	0.039	0.039	0.045	0.056	-			
<i>Enterobacter kobei</i>	0.020	0.023	0.020	0.017	0.035	0.042	0.045	-		
<i>Serratia nematodiphila</i>	0.020	0.026	0.028	0.026	0.033	0.043	0.020	0.026	-	
<i>Pectobacterium cacticida</i>	0.047	0.047	0.047	0.042	0.056	0.052	0.047	0.046	0.046	-

*R. planticola* 16S rDNA bölgesine göre sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (Neighbour Joining Trees) oluşturulmuştur (Şekil 3.13). Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisi hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). 16S rDNA için elde edilen dendograma ve uzaklık matrisi verilerine göre genetik olarak *R. planticola*, *R. ornithinolytica* ile yakın tür (uzaklık matrisi, 0.007) olduğu bulunmuştur. *R. planticola* suşunun *P. cacticida* (uzaklık matrisi, 0.047) ve *E. ictaluri* (uzaklık matrisi, 0.042) ile uzak türler olduğu tespit edilmiştir.

### 3.7. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin (FAME) Analizi

Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Ag dirençli Ag101 ve Ag111 kodlu suşlar için yağ asiti analizi yapılmıştır. Hüresel yağ asiti profilleri, MIS (Microbial Identification System)'in içerdiği TSBA kütüphanesi veri tabanına göre analiz edilmiştir.

Gümüş dirençli Ag101 suşunun içerdiği yağ asitlerinin iso (i) ve anteiso (ai) formlarında olduğu, %58.11 oranında pentadekanoik asit (ai-C<sub>15:0</sub>), %19.78 oranında heptadekanoik asit (ai-C<sub>17:0</sub>) içerdiği belirlenmiştir.



**Şekil 3.13.** Gümüş dirençli Ag101 suşunun FAME analiz sonucu dendogramı (Agilent 6890 USA, cihaz çıktısı)



Volume: DATA File: E135236.29A Samp Ctr: 7 ID Number: 8836  
 Type: Samp Bottle: 6 Method: RTSBA6  
 Created: 5/23/2013 3:56:46 PM  
 Sample ID: Ag10

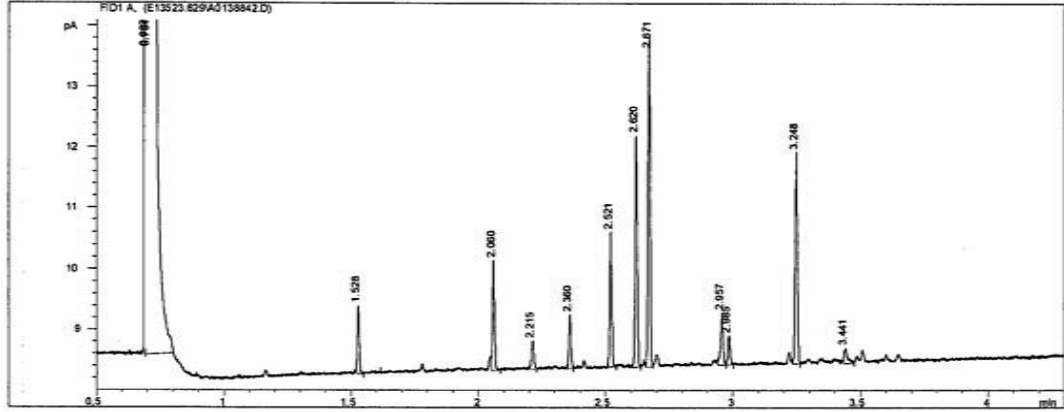
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6925	307858	0.004	----	6.6905		----	< min rt	
0.7005	9.663E+8	0.016	----	6.7500	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
2.2480	1471	0.009	0.957	14.6323	15:0 iso	3.94	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
2.2758	21737	0.009	0.955	14.7249	15:0 anteiso	58.11	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.6697	423	0.010	0.928	16.0010	16:0	1.10	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
2.8687	1960	0.009	0.919	16.6352	17:0 iso	5.04	ECL deviates -0.002	Reference -0.010
2.8991	7696	0.009	0.918	16.7321	17:0 anteiso	19.78	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
3.2969	917	0.010	0.907	18.0018	18:0	2.33	ECL deviates 0.002	Reference -0.007
3.4920	676	0.009	0.904	18.6382	19:0 iso	1.71	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
3.5226	2215	0.010	0.903	18.7379	19:0 anteiso	5.60	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
3.9036	949	0.010	0.899	19.9996	20:0	2.39	ECL deviates 0.000	Reference -0.008

ECL Deviation: 0.001 Reference ECL Shift: 0.008 Number Reference Peaks: 9  
 Total Response: 1831887 Total Named: 338464  
 Percent Named: 18.48% Total Amount: 319280  
 Profile Comment: Column Overload: A peak's response is greater than 400000.0. Dilute and re-run.

\*\*\* Library match not attempted

**Şekil 3.14.** Gümüş dirençli Ag101 suşunun FAME profili (Agilent 6890 USA, cihaz çıktısı)

Gümüş dirençli Ag111 suşunun yağ asiti analizi yapılmıştır. Analize göre en çok rastlanılan yağ asidinin %26.76 oranında palmitik asit (C<sub>16:0</sub>) olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.15. Gümüş dirençli Ag111 suşunun FAME analiz sonucu dendogramı (Agilent 6890 USA, cihaz çıktısı)

E135236.29A [8842] Ag11

Page 1

Volume: DATA File: E135236.29A Samp Ctr: 13 ID Number: 8842  
 Type: Samp Bottle: 12 Method: RTSBA6  
 Created: 5/23/2013 4:48:36 PM  
 Sample ID: Ag11

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6924	320931	0.004	----	6.6847		----	< min rt	
0.7006	9.564E+8	0.016	----	6.7455	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.5282	1261	0.009	1.064	11.9999	12:0	6.51	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.0602	1989	0.008	0.976	14.0006	14:0	9.42	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
2.2146	636	0.009	0.960	14.5157	unknown 14.502	----	ECL deviates 0.000	
2.3602	1011	0.009	0.948	15.0013	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.5205	2510	0.009	0.937	15.5167	Sum In Feature 2	11.41	ECL deviates 0.001	14:0 3OH/16:1 iso I
2.6199	4389	0.009	0.931	15.8362	Sum In Feature 3	19.83	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6706	5940	0.008	0.928	15.9990	16:0	26.76	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
2.9571	1156	0.010	0.916	16.9124	17:0 cyclo	5.14	ECL deviates -0.003	
2.9847	571	0.009	0.915	17.0006	17:0	2.54	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
3.2481	4173	0.010	0.908	17.8422	Sum In Feature 8	18.39	ECL deviates -0.005	18:1 w7c
3.4409	536	0.013	----	18.4652		----		
----	2510	----	----	----	Summed Feature 2	11.41	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	----	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	4389	----	----	----	Summed Feature 3	19.83	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	4173	----	----	----	Summed Feature 8	18.39	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.003 Number Reference Peaks: 4  
 Total Response: 22525 Total Named: 21989  
 Percent Named: 97.62% Total Amount: 22176  
 Profile Comment: Total response less than 50000.0. Concentrate and re-run.

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.568	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup A
	0.527	Photorhabdus-luminescens-luminescens (Xenorhabdus)
	0.522	Kluyvera-cryocrescens-GC subgroup B
	0.491	Escherichia-coli-GC subgroup C (DNA homology with Shigella)
	0.477	Kluyvera-cryocrescens-GC subgroup A
	0.439	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0.401	Enterobacter-cloacae
	0.397	Escherichia-fergusonii-GC subgroup A
	0.388	Escherichia-coli-GC subgroup D (DNA homology with Shigella)
	0.370	Salmonella-typhimurium-GC subgroup B

Şekil 3.16. Gümüş dirençli Ag111 suşunun FAME profili (Agilent 6890 USA, cihaz çıktısı)

### **3.8. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri**

İzole edilen gümüş dirençli *P. plecoglossicida* ve *R. planticola* suşlarının metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

#### **3.8.1. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi**

Kızılırmak' tan izole edilen suşların Ag ağır metale dirençli her bir suşun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallere dirençlilikleri de tespit edilmiştir.

Böylece suşların çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Ag dirençli suşun, çoklu metal dirençlilik profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Al, Cd, Ba, Li, Cr, Mn, Pb, Co, Fe, Cu, Sn, Ni, Zn, Hg, Sb, Sr ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme görülen suşların ortama ekilen metale karşı dirençli, üreme görülmeyenlerin ise o metale karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ag dirençli suşun antibiyotik dirençlilik profilini belirlemek için Ag içermeyen NA besiyeri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerine Çizelge 2.1'de belirtilen antibiyotik diskleri uygulanmış 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Disk etrafında zon görülmesi o antibiyotiğe duyarlı olduğu, zon görülmemesi durumunda dirençli olduğu tespit edilmiştir.

### **3.9. Gümüş Dirençli Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri**

Ag dirençli *P. plecoglossicida* suşunun Çizelge 3.7'ta gösterildiği gibi Ag, Al, Li, Sn, Ni ve Sr metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hg, Pb, Mn, Zn, Fe, Sb, Cd, Sn, Ba, Cr ve Co metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ag dirençli *R. planticola* suşunun ise, Çizelge 3.7'ta gösterildiği gibi Ag, Pb, Cu, Mn, Fe, Ni, Sn, Li, Al, Ba ve Sr metallere çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hg, Zn, Sb, Cd, Cr ve Co metallerine karşı ise kullanılan

konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her iki suşunda Ag, Al, Li, Sn, Ni ve Sr metallerine karşı ortak direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Ag dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profili

Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili	
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Raoultella planticola</i>
AgNO <sub>3</sub>	8	R	R
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	195	S	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	S	R
MnSO <sub>4</sub>	1000	S	R
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	S	S
FeCl <sub>3</sub>	450	S	R
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	395	R	R
K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1400	S	S
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	S	R
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	750	S	S
SnCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	160	R	R
LiCl	5000	R	R
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	R	R
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	S	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9H <sub>2</sub> O	1100	S	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R	R
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	750	S	S

R, dirençli, S, duyarlı

Ag dirençli *P. plecoglossicida* suşunun Çizelge 3.8’de gösterildiği gibi aztreonam, pefloxacin, ticarcilin ve ticarcilin/CA antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ag dirençli *R. planticola* suşunun ise Çizelge 3.10’de gösterildiği gibi amoxicillin/CA, ampicillin, aztreonam, erythromycin, imipenem, oxacillin, pefloxacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, rifampisin, ticarcilin, ticarcilin/CA ve vancomycin antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca her iki suşunda aztreonam, pefloxacin, ticarcilin ve ticarcilin/CA antibiyotiklerine karşı ortak direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Ag dirençli suşların antibiyotik dirençlilik profili

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili	
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Raoultella planticola</i>
Amikacin (AMK) (30)	S	S
Amoxicillin/CA (AMC) (20/10)	S	R
Ampicillin (AMP) (10)	S	R
Aztreonam (ATM) (30)	S	R
Bacitracin (BAC) (10)	S	S
Cefepime (FEP) (5)	S	S
Ceftazidime (CAZ) (30)	S	S
Ciprofloxacin (CIP) (5)	S	S
Chloramphenicol (CHL) (30)	S	S
Gentamicin (GEN) (10)	S	S
Erythromycin (ERY) (15)	S	R
Imipenem (IPM) (10)	S	R
Netilcimin (NAL) (30)	S	S
Oxacillin (OXA) (1)	S	R
Pefloxacin (PEF) (5)	R	R
Penicillin (PEN) (10)	S	R
Piperacilin (PIP) (100)	S	R
Piperacilin/Tazobactam (TZP) (100/10)	S	R
Rifampisin (RIF) (5)	S	R
Sulbactam/CFP (CFP) (75/30)	S	S
Tetracycline (TET) (30)	S	S
Ticarcillin (TIC) (75)	R	R
Ticarcillin/CA (TIM) (75/10)	R	R
Trimeth-sulfa (SXT) (25)	S	S
Tobramycin (TOB) (10)	S	S
Vancomycin (VAN) (30)	R	R

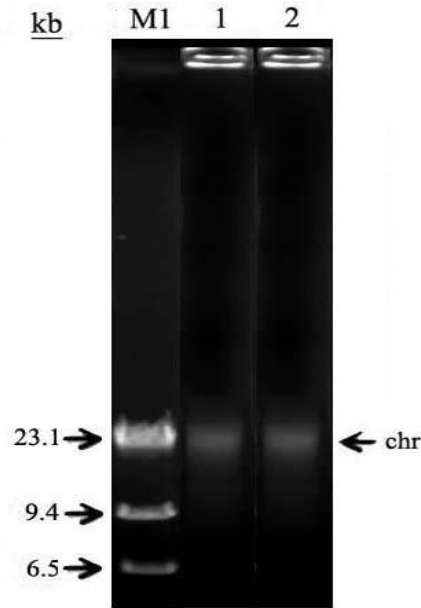
R, dirençli, S, duyarlı

### 3.10. Bakterilerin DNA Analizi

Gümüş dirençli suşların metal dirençliliği ile plazmit profilleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit DNA izolasyonu ve plazmit eliminasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.10.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin DNA Analizi

Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun plazmit DNA profili çıkarılmış kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.17'de gösterildiği gibi *P. plecoglossicida* suşunun gümüş içeren ve içermeyen her iki ortamda da plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *P. plecoglossicida* suşunda gümüş direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

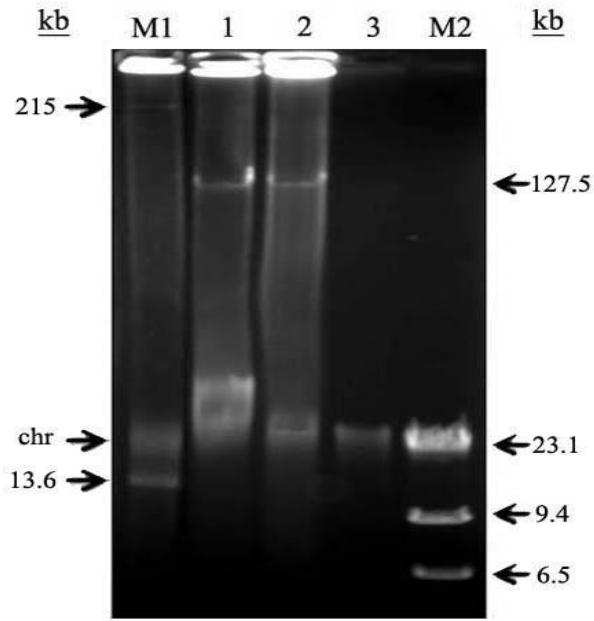


**Şekil 3.17.** *P. plecoglossicida* suşunun DNA analizi

M1; marker Lambda DNA/ HindIII, 1; Ag içermeyen, 2; içeren ortam, chr; kromozomal DNA

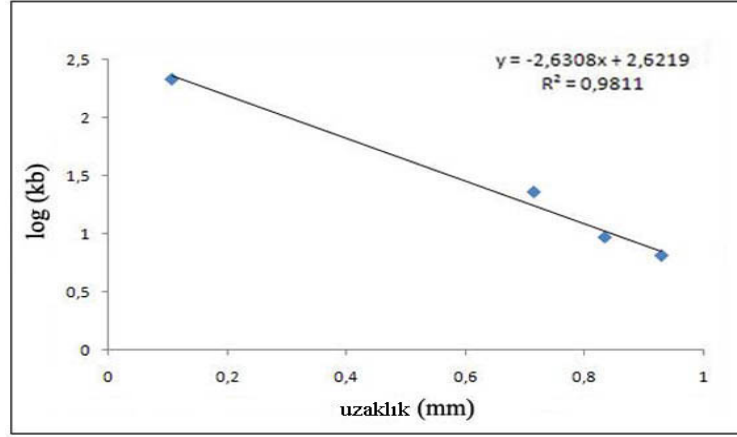
Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun plazmit DNA profili çıkartılmış ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.18'de gösterildiği gibi *R.*

*planticola* suşunun gümüş içeren ve içermeyen ortamda 127.5 kb boyutunda büyük moleküler ağırlıkta bir plazmit tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında 127.5 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *R. planticola* suşunun gümüş dirençliliğini koruduğu, ancak erythromycin, rifampin ve vancomycin direncini kaybettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gümüş direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu; erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı olan direnç genlerinin ise plazmit DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.18.** *R. planticola* suşunun DNA analizi

M1; marker *Agrobacterium tumefaciens*, 1; gümüş içermeyen, 2; içeren ortam, 3; plazmit eliminasyon sonrası, chr; kromozomal DNA, M2; marker Lambda DNA/HindIII



**Şekil 3.19.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

*Agrobacterium tumefaciens* suşunun moleküler ağırlığı bilinen plazmitleri marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmitlerin moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır (Şekil 3.19).

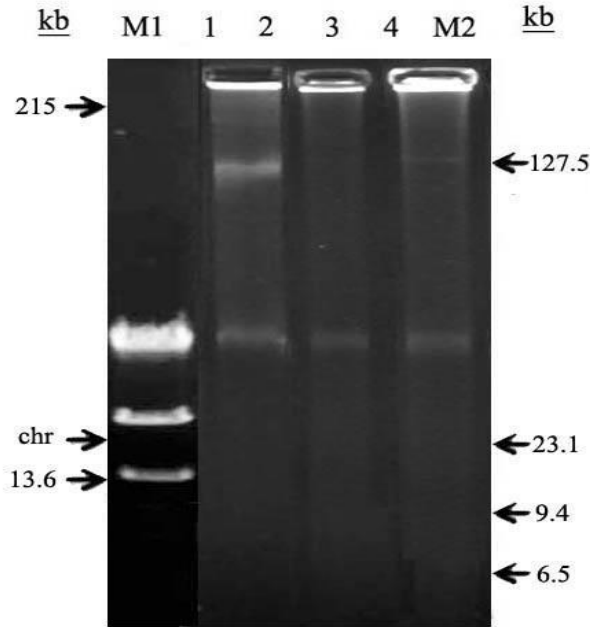
### 3.11. Transformasyon

Gümüş dirençli Ag111 kodlu *R. planticola* suşunun 127.5 kb boyutunda büyük moleküler ağırlıkta bir plazmite sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı olan direnç genlerinin ise plazmit DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bunun üzerine ortaya çıkan sonucu desteklemek amacıyla plazmit DNA aktarımı (transformasyon) çalışması yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak herhangi bir plazmiti bulunmayan kompetant bakteri *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşu alıcı olarak kullanılmıştır.

Transformasyon öncesinde *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı duyarlı ve kanamisin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Kalsiyum klorür yöntemi kullanılarak *E. coli* DH-5 $\alpha$  hücreleri kompetan hale getirilmiş ve transformasyon yapılmıştır. Transformasyon deneyi gerçekleştirildikten sonra *E. coli* hücreleri vancomycin içeren selektif besiyerine ekilmiştir. Daha sonra üreyen bakterilerden tek koloni seçimi yapılmış ve



erythromycin, rifampin, vancomycin antibiyotik diskleri ile antibiyogram işlemi gerçekleştirilmiştir. Antibiyogram sonuçlarına göre erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı daha önceden duyarlı olduğu tespit edilen *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun transformasyon sonrası bu antibiyotiklere karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir. Ortaya çıkan sonucu moleküler yöntemler ile desteklemek amacıyla transformant *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşundan plazmit DNA izolasyonu yapılmış ve agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonucunda transformant *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun tek bir plazmit DNA'ya sahip olduğu ve boyutunun 127.5 kb olduğu tespit edilmiştir. Buradanda plazmit profilinin başarılı bir şekilde transforme edildiği anlaşılmıştır (Şekil 3.20).



**Şekil 3.20.** Transformant DNA analizi

M1; marker; Lambda DNA/ HindIII, 1; *R. planticola*, 2; *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun plazmit DNA profili, 3; Transformant *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun plazmit DNA profili, chr; kromozomal DNA

Transformasyon deneyi gerçekleştirildikten sonra *E. coli* hücreleri vancomycin içeren selektif besiyerine ekilmiş ve toplam 25 koloni sayılmıştır.

Transformant koloni oluşturan birimler (colony forming units (CFU)):

Koloni sayısı x Seyreltme oranı x Transformasyonda kullanılan hücre hacmi / Seçici besiyerlerine ekilen hücre hacmi

$$25 \times 10000 \times 100/50 = 5.0 \times 10^5$$

Transformasyon verimliliği (Transformation efficiency): Transformant koloni oluşturan birimler (CFU) / plazmit DNA miktarı (DNA miktarı; 0.5 µl (1µg/µl)

$$5.0 \times 10^5/0.5 = 1.0 \times 10^6 \text{ CFU}/\mu\text{g}$$

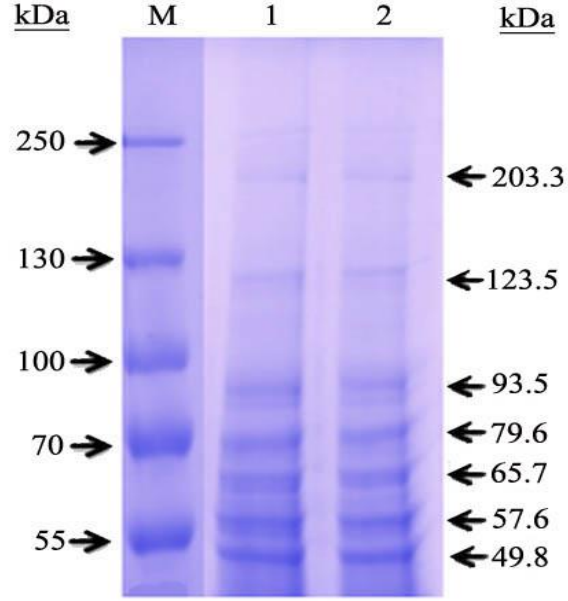
olarak belirlenmiştir.

### **3.12. Bakterilerin Protein Profilleri**

Gümüş dirençli suşların metal içeren ve içermeyen ortamlardaki dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir.

#### **3.12.1. Ag Dirençli *P. plecoglossicida* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profilleri**

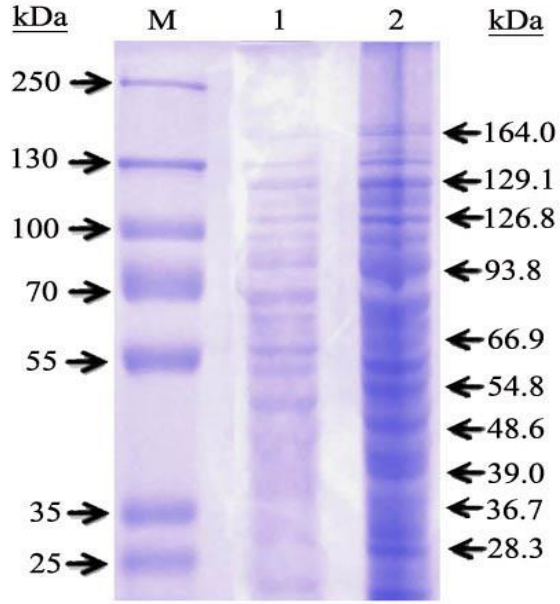
Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun total ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucu *P. plecoglossicida* suşunun gümüş içeren ortamda 65.7, 57.6 ve 49.8 kDa boyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla %41, %5 ve %2 artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21). Bu sonuçlar doğrultusunda gümüş dirençliliğinde özellikle 65.7 kDa ağırlığındaki proteinlerin etkin rol oynadığı belirlenmiştir



**Şekil 3.21.** Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki total protein profili

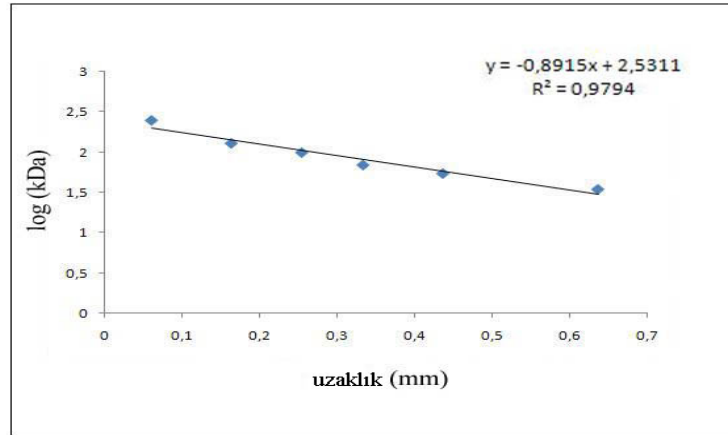
M; marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

Dış membran protein analizi sonucunda *P. plecoglossicida* suşunun gümüş içeren ortamda 66.9, 54.8, 48.6, 39.0, 36.7 ve 28.3 kDa boyutundaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla %77.0, %49.6, %132.0, %125.7, %139.0 ve %39.4 artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22). Bu sonuçlar doğrultusunda gümüş dirençliliğinde özellikle 48.6, 39.0, ve 36.7 kDa ağırlığındaki dış membran proteinlerinin etkin olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.22.** Gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki membran protein profili

M; marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

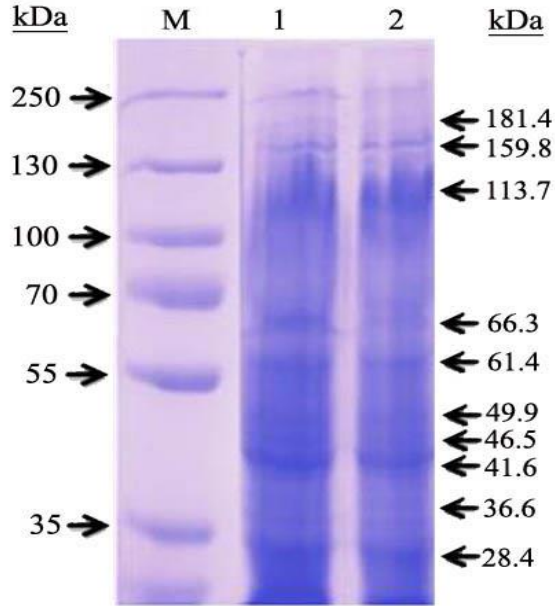


**Şekil 3.23.** Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder moleküler ağırlığı bilinen protein marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır (Şekil 3.23).

### 3.12.2. Ag Dirençli *R. planticola* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profilleri

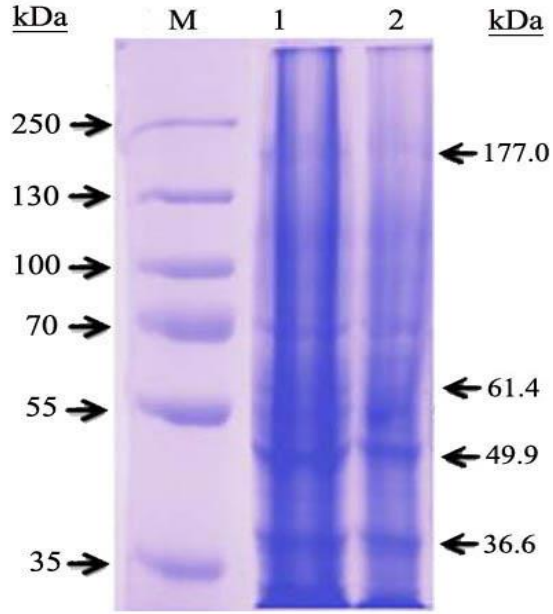
Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun total ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucu *R. planticola* suşunun gümüş içeren ortamda 181.4, 159.8, 113.7, 66.3, 61.4, 49.9, 41.6 ve 36.6 kDa boyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla %20, %40, %35, %59, %60, %59, %58 ve %4 azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.24). Bu sonuçlar doğrultusunda gümüş dirençliliğinde özellikle 66.3, 61.4, 49.9, 41.6 kDa ağırlığındaki proteinlerin etkin rol oynadığı belirlenmiştir.



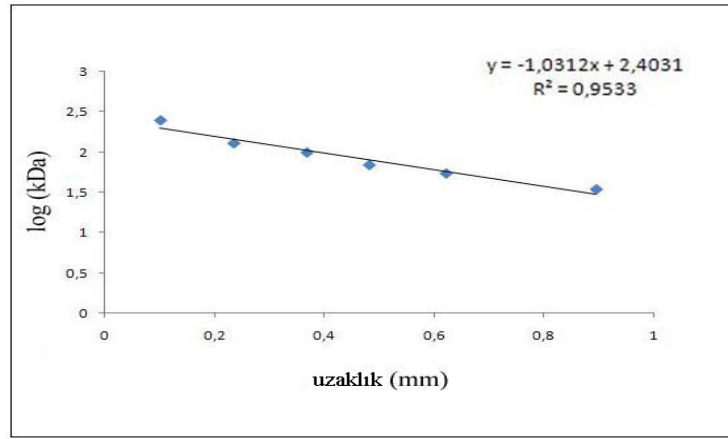
**Şekil 3.24.** Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki total protein profili

M; marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

Dış membran protein analizi sonucunda *R. planticola* suşunun gümüş içeren ortamda 61.4, 49.9, ve 36.6 kDa boyutundaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla %60, %10, ve %4 kat azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.25). Bu sonuçlar doğrultusunda gümüş dirençliliğinde özellikle 61.4 kDa ağırlığındaki dış membran proteininin etkin olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.25.** Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun Ag içermeyen (1) ve içeren (2) ortamlardaki membran protein profili  
M; marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder



**Şekil 3.26.** Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder moleküler ağırlığı bilinen protein marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır (Şekil 3.26).

#### 4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden 4, 6, 10, 11 ve 12. bölgelerden gümüşe dirençli 5 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. MİK değeri  $AgNO_3$  için 8 mg/L olan ve 10. ile 11. bölgelerden izole edilen iki suş, Ag101 ve Ag111 kodları verilerek sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen suşlar biyokimyasal testler, 16S rDNA sekans ve yağ asidi analizleri kullanılarak sırasıyla *Pseudomonas plecoglossicida* ve *Raoultella planticola* olarak tanımlanmıştır. Gümüş dirençli bu iki suş, Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkiinin bulunduğu 10. bölgeden ve Mezbahane-Kırıkkale-Makine Kimya Fabrikalarının yakın olduğu 11. bölgeden izole edilmişlerdir. Kum ocağında aktif olarak kum çıkartma faaliyetleri gerçekleştirilmektedir. Bunun sonucunda toprakta bulunan metal cevherlerinin insan aktiviteleriyle yeryüzüne çıkmasına, içme ve yer altı sularına karışmasına zemin hazırlamakta, oluşan doğa olayları yardımıyla da bu cevherler Kızılırmak sularına taşınmaktadır. Ayrıca Kırıkkale-Kızılırmak hattı boyunca yerleşmiş olan sanayi kuruluşlarının atıkları nehir suyuna karışmaktadır. Bu nedenlerden dolayı Kızılırmak hattı boyunca biriken ağır metallere karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmesi gerçekleşmektedir. Başta gümüş olmak üzere birçok ağır metale karşı dirençli olan Ag101 suşu Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkiinden izole edilmiştir. Ag111 kodlu suş ise Mezbahane - Makina ve Kimya Endüstrisi (MKE) tesisleri mevkinden izole edilmiştir. Bu suş *Raoultella (Klebsiella)* olarak tanımlanmıştır. Bu suşun hayvanlarda patojeniteye sebep olan mikroorganizmalardan biri olması Mezbahannede kesilen hayvanların atıklarının nehir sularına karışmış olma ihtimalini güçlendirmektedir. Gümüşün özellikle savunma sanayinde kaplama malzemesi olarak kullanılması da bu açıdan bakıldığında kayda değerdir. Bütün bu unsurlar dikkate alındığında söz konusu bölgede gümüş dirençli mikroorganizmaların gelişmesi kaçınılmaz olacaktır. Bu durumu destekleyen çalışmalar literatürde oldukça yaygındır. Otitoloji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [144], Thames nehrinden su örnekleri alınarak  $AgNO_3$  dirençli suşları izole etmişlerdir. Nutrient agar besiyerine 0.16 mg/L'den başlayarak artan konsantrasyonlarda  $AgNO_3$  eklenerek en yüksek direnci gösteren 3 suşu seçmişlerdir. Bu suşlar *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp.'dir. Birçok raporda, maden işletmelerinin bulunduğu kirli alanlardan, fotoğraf film



üretim veya işleme ile ilgili alanlardan ve endüstriyel su dağıtım sistemlerinden gümüş dirençli bakterilerin izole edildiği gösterilmiştir. Bazı gümüş dirençli bakteri türleri de çeşitli çevrelerden izole edilmiş ve gümüş toksisitesi dirençli bakteri seçimi için belirleyici olmuştur [24]. Gümüş dirençli bakteriler *Salmonella* suşları, *K. pneumoniae*, *E. coli* R1 ve *P. stutzeri* bakterileridir [144-146]. Chopra [147], AgNO<sub>3</sub> için yapılan MİK değeri belirleme çalışmalarında, *S. aureus* (100 suş) ve *Pseudomonas* sp. (100 suş) için MİK değerinin, 8-80 mg/L aralığında olduğunu belirlemiştir. Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*, *Bacillus cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* ve *B. anthia* gibi bakterilerin gümüş iyonlarına karşı dirençlilikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin MİK değerleri 1 ve 10 µg/mL aralığında belirlenmiştir [148]. Percival ve arkadaşları [149], hastane atıklarının karıştığı sulardan *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *P. stutzeri*, *A. baumannii*, *S. typhimurium* ve *K. pneumoniae* suşlarını izole etmişler ve bu bakterilerin gümüşe karşı direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir. İzole edilen bu bakterilerin MİK değerlerinin 1 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Haefeli ve arkadaşları [150], gümüş madeninden gümüş dirençli *P. stutzeri* izole etmişler ve bu suş için MİK değerini 0.8 mg/L olarak belirlemişlerdir. Özer [62], yapmış olduğu çalışmada Kızıllırmak'tan su örnekleri olarak gümüş dirençli bakteriler izole etmiş ve yapılan MİK değeri belirleme çalışmalarında ise, MİK değeri, 8 mg/L olarak tespit etmiştir. Bu suşların ise *K. pneumoniae* ve *P. putida* olarak tanımlamıştır.

Bizim çalışmamızda da yapılan biyokimyasal testler sonucu gümüş dirençli bakteriler *P. plecoglossicida* ve *R. planticola* olarak tanımlanmıştır. Her iki suşun da Gram negatif (-), basil şekilli hücreler olduğu tespit edilmiştir. *P. plecoglossicida* suşunun üre, maltoz, inositol, arabinoz, mannitol, adonitol, glukoz, rafinoz, hidrojen sülfür, eskülin, sorbitol, ornitin, laktoz, sükroz, ramnoz (-); sitrat, malonat, ksiloz, arjinin, asetamin, oksidaz (+) olduğu gözlenmiştir. *R. planticola* suşunun ise arjinin, asetamin, hidrojen sülfür, ornitin, oksidaz (-); üre, maltoz, inositol, arabinoz, sitrat, mannitol, adonitol, glukoz, malonat, ksiloz, rafinoz, eskülin, sorbitol, laktoz, sükroz, ramnoz (+) olduğu tespit edilmiştir.

Nishimori ve arkadaşlarının [151], yaptıkları çalışmada yüzey sularından aldıkları su örneklerinden elde ettikleri suşu tanımlamak için biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi kullanmışlardır. 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre bu suşun %100 oranında *P. plecoglossicida* FPC 951<sup>T</sup> ile homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çevre izolatu olan *P. plecoglossicida* suşunun ayrıca biyokimyasal özelliklerini de karakterize etmişlerdir. Buna göre arabinoz, mannitol, sükröz, ramnoz (-); malonat, ksiloz, arjinin, asetamin, oksidaz (+) olduğunu belirtmişlerdir. Song ve arkadaşlarının [152], yaptıkları çalışmada Ulsan ve Choengju sanayi bölgesi ve pirinç çeltik fabrikası atık sularından izole ettikleri suşları *P. plecoglossicida* olarak tanımlamışlardır. Bu suşun üre, arabinoz, mannitol, adonitol, glukoz, sükröz, ramnoz, oksidaz (-); ksiloz, oksidaz, sitrat, malonat (+), olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen biyokimyasal veriler ile bizim elde ettiğimiz biyokimyasal veriler paralellik göstermektedir.

*Raoultella*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram (-) basil morfolojiye sahip *Klebsiella* sp ile yakın bir cinistir. *R. planticola* ilk olarak *K. planticola* ismiyle 1981 yılında tanımlanmıştır. Genel olarak toprak ve su ortamında yaşayan bir çevre izolatu olmasına rağmen klinik izolatları da bulunmaktadır [153]. Bagley ve arkadaşlarının [154], yaptıkları çalışmada yüzey sularından aldıkları örneklerden izole ettikleri suşları biyokimyasal testler ile *K. planticola* olarak tanımlamışlardır. Tanımladıkları *K. planticola* suşunun Gram negatif (-) basil morfolojiye sahip olduğunu; indol, arjinin, ornitin (-); sitrat, adonitol, sorbitol, laktoz, ramnoz (+) olduğunu tespit etmişlerdir. Sugimori ve arkadaşlarının [155], yaptıkları çalışmada kontamine atık sulardan izole ettikleri suşu biyokimyasal ve moleküler metodlar ile *R. planticola* olarak tanımlamışlardır. *R. planticola*'nın indol, arjinin, ornitin, oksidaz (-);üre, inositol, arabinoz, mannitol, glukoz, sorbitol, sükröz, ramnoz (+) gibi biyokimyasal karaktere sahip olduğunu belirlemişlerdir ki; bu çalışmalardan elde edilen biyokimyasal bulgular ile bizim elde ettiğimiz biyokimyasal bulgular paralellik göstermektedir.

Gümüş dirençli suşlar biyokimyasal olarak tanımlandıktan sonra moleküler olarak tanımlamak için 16S rDNA gen sekans analizi yapılmıştır. Bunun için öncelikle

suşlardan DNA izolasyonu yapılmış ve 16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer olan 27F-1492R kullanılmıştır.

Son yıllarda biyokimyasal yöntemler yanında moleküler yöntemler bakteri tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bakterilerden 16S rRNA çoğaltılmasını sağlayan üniversal primer kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması filojenik çalışmalarda standart yöntem olarak yerini almıştır. Son 25 yılda, rRNA'yı kodlayan genlerin analizini içeren teknikler prokaryotik taksonomisini tamamen değiştirmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar rRNA genlerinin, protein sentezinin gerçekleştiği ribozomdaki önemli rollerinden dolayı evrimsel açıdan son derece korunmuş olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu korunmuşluk, ribozomal proteinlerin primer yapısını da yansıtmaktadır [156-157]. rRNA'lar organizmaların çevresindeki değişimlerden etkilenmeyen ve canlılar arasında evrensel olarak dağılıma gösteren moleküllerdir. Ayrıca, rRNA'lar önemli ölçüde genetik bilgi içeren ve prokaryotik dünyada filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında temel moleküller olarak seçilmiştir. Üstelik bu yöntemde kültüre edilemeyen türlerin belirlenmesi de mümkün olmaktadır. Bu nedenden dolayı oldukça etkili bir yöntemdir ve son zamanlarda daha sık kullanıldığı görülmektedir [158].

16S rDNA ile sekans analizi ile tanımlama yapmak için ilk önce gümüş dirençli Ag101 kodlu suşun total DNA izolasyonu ve pürifikasyonu yapılmış sonrasında üniversal primerler kullanılarak değişen sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ag101 suşu için optimum annealing derecesi 63°C ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 3 µL (50 mM) olarak tespit edilmiştir. Optimum şartlar altında yapılan PZR sonucu elde edilen bantların 16S rDNA sekansları belirlenmiş ve bu sekans NCBI Gen bankası sonuçları ile karşılaştırılarak Ag101 suşunun %99 oranında *P. plecoglossicida* strain FPC951 (NR\_024662) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Nishimori ve arkadaşlarının [151], yaptıkları çalışmada yüzey sularından aldıkları su örneklerinden suş izole etmişlerdir. Bu suşu tanımlamak için 20F-1500R primeri kullanarak PZR amplifikasyonu yapmışlar ve 16S rDNA sekans analizi gerçekleştirmişlerdir. 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen

bankası sonuçlarına göre bu suşun %100 oranında *P. plecoglossicida* FPC 951<sup>T</sup> ile homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir. Song ve arkadaşlarının [152], yaptıkları çalışmada Ulsan ve Choengju sanayi bölgesi ve pirinç çeltik fabrikası atık sularından suşlar izole etmişlerdir. Bu suşları tanımlamak için 27F-1492R primeri kullanarak PZR amplifikasyonu yapmışlar ve 16S rDNA sekans analizini gerçekleştirmişlerdir. 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre bu suşlar; iki suş %98 ve %99 oranında *P. plecoglossicida*. üç suş % 99 oranında *Xanthobacter flavus*, % 99 oranında *Comamonas testosteroni*, *Ralstonia eutropha*, *Bosea vestrisii*, *Alpha proteobacterium*, *Ancyclobacter sp* ve % 98 oranında *Burkholderiales* olmak üzere 11 suş tanımlanmıştır. Bu sonuçlar bizim 16S rDNA sekans analizi sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

16S rDNA ile sekans analizi ile tanımlama yapmak için ilk önce gümüş dirençli Ag111 kodlu suşun total DNA izolasyonu ve pürifikasyonu yapılmış sonrasında universal primerler kullanılarak değişen sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ag111 suşu için optimum annealing derecesi 58°C ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 4 µL (50 mM) olarak tespit edilmiştir. Optimum şartlar altında yapılan PZR sonucu elde edilen bantların 16S rDNA sekansları belirlenmiş ve bu sekans NCBI Gen bankası sonuçları ile karşılaştırılarak Ag111 suşunun %99 oranında *R. planticola* strain ATCC 33531 ile (NR\_024996) homoloji gösterdiği saptanmıştır. Takahashi ve arkadaşları [159] yaptıkları çalışmada, sudan izole ettikleri suşları 27F-1492R primerlerini kullanarak PZR amplifikasyonu yapmış ve 16S rDNA sekans analizi kullanarak tanımlamış *R. planticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Morganella morganii*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium phosphoreum* türleri olduklarını tespit etmişlerdir. Pramod ve arkadaşları [160] yaptıkları çalışmada, bataklıktan izole ettikleri kadmiyum dirençli suşu tanımlamada PZR amplifikasyonu ve 16S rRNA sekans analizi yapmışlardır. Bu amaçla 16S rRNA gen bölgesine yönelik fD1 ve rP1 primerlerini kullanmışlardır. 16S rRNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre bu suşun %100 oranında *R. planticola* (X93215) ile homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar ışığında elde edilen veriler bizim elde ettiğimiz 16S rDNA sekans analiz verileri ile uyumaktadır.

*P. plecoglossicida* 16S rDNA bölgesine göre sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour joining trees) oluşturulmuştur. Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisi hesaplanmıştır. 16S rDNA için elde edilen dendograma ve uzaklık matris verilerine göre genetik olarak *P. plecoglossicida*, *P. monteilii* ile yakın tür (uzaklık matrisi, 0.001) olduğu bulunmuştur. *P. plecoglossicida* suşunun *P. fluorescens* (uzaklık matrisi, 0.035) ve *P. azotoformans* (uzaklık matrisi, 0.029) ile uzak türler olduğu tespit edilmiştir. Uzaklık matrisi, türler arasındaki genetik uzaklık değeridir. İki tür arasındaki uzaklık matris değeri ne kadar küçükse, türler birbirine genetik olarak o kadar yakındır [130-131]. Elde edilen bulgular doğrultusunda *P. plecoglossicida* suşunun; *P. monteilii* ile en yakın tür, *P. fluorescens* ve *P. azotoformans* ile en uzak türler olduğu tespit edilmiştir ve soyağacı oluşturularak elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. Jha ve arkadaşları [161] yaptıkları çalışmada *P. plecoglossicida* suşunun filogenetik analizini gerçekleştirmişler ve *P. plecoglossicida*'ya en yakın tür olarak *P. monteilii* ve en uzak tür olarak *P. fluorescens* olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar ile bizim tespit ettiğimiz filogenetik veriler paralellik göstermektedir..

*R. planticola* 16S rDNA bölgesine göre sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour joining trees) oluşturulmuştur. Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisi hesaplanmıştır. 16S rDNA için elde edilen dendograma ve uzaklık matris verilerine göre genetik olarak *R. planticola*, *R. ornithinolytica* ile yakın tür (uzaklık matrisi, 0.007) olduğu bulunmuştur. *R. planticola* suşunun *Pectobacterium cacticida* (uzaklık matrisi, 0.047) ve *Edwardsiella ictaluri* (uzaklık matrisi, 0.042) ile uzak türler olduğu tespit edilmiştir. Uzaklık matrisi türler arasındaki genetik uzaklık değeridir. İki tür arasındaki uzaklık matris değeri ne kadar küçükse, türler birbirine genetik olarak o kadar yakındır [130-131]. Elde edilen bulgular doğrultusunda *R. planticola* suşunun; *R. ornithinolytica* ile en yakın tür, *P. cacticida* ve *E. ictaluri* ile en uzak türler olduğu tespit edilmiştir ve soyağacı oluşturularak elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. Drancourt ve arkadaşları [162] yaptıkları çalışmada *K. planticola* suşunun filogenetik

analizini gerçekleştirmişler ve *K. planticola*'ya en yakın tür olarak *K. ornithinolytica* ve en uzak tür olarak *P. chrysanthemi* olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar ile bizim tespit ettiğimiz filogenetik veriler paralellik göstermektedir.

Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Ag dirençli Ag101 ve Ag111 kodlu suşları yağ asidi analizi kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Hücresel yağ asiti profilleri, MIS (Microbial Identification System)'in içerdiği TSBA kütüphanesi veri tabanına göre analiz edilmiştir. Gümüş dirençli Ag101 suşunun içerdiği yağ asitleri incelendiğinde en çok %58.11 pentadekanoik asit (ai-C<sub>15:0</sub>), %19.78 heptadekanoik asit (ai-C<sub>17:0</sub>), %5.60 nonadekanoik asit (ai-C<sub>19:0</sub>), % 5.04 heptadekanoik asit (i-C<sub>17:0</sub>) olarak saptanmış ve kütüphanede karşılığı tespit edilememiştir. Haack ve arkadaşlarının [163], yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* sp suşunun yağ asiti analizini yapmışlardır. Bu analize göre suşun içerdiği yağ asiti profili laurik asit (C<sub>12:0</sub>), laurik asit (C<sub>12:0</sub> 2-OH), laurik asit (C<sub>12:0</sub> 3-OH), miristik asit (C<sub>14:0</sub>), pentadekanoik asit (i-C<sub>15:0</sub>), palmitik asit (C<sub>16:0</sub>), palmitoleik asit (C<sub>16:1</sub>), heptadekanoik asit (i-C<sub>17:0</sub>), oleik asit (C<sub>18:1</sub>) olarak bulmuşlardır. En çok rastlanılan yağ asidi palmitoleik asit (C<sub>16:1</sub>) olup, ortalama değeri %36.6 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, bizim FAME bulgularımız ile paralellik göstermemektedir. Stoakes ve arkadaşlarının [116], bilgisayar destekli mikrobiyal identifikasyon sistemi (MIS) kullanarak gaz-sıvı kromatografisi ile bakterilerin yağ asitlerini belirlemişlerdir. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar geleneksel yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. 470 izolattan 413'ü her iki yöntemle uyumlu iken 45 izolat yanlış identifiye edilmiş, 12 izolatın ise bu sistemde karşılığı bulunamamıştır. 78 izolat yeniden test edilerek aynı sonuçlar bulunurken beş izolatın sonuçlarının değiştiğini rapor etmişlerdir.

Gümüş dirençli Ag111 suşunun yağ asiti analizi yapılmıştır. Gümüş dirençli Ag111 suşunun yağ asiti analizi yapılmıştır. Analize göre en çok rastlanan yağ asidi palmitik asit (C<sub>16:0</sub>) olup, ortalama değeri %26.76 olarak saptanmıştır. Stewart ve arkadaşlarının [165], yaptıkları çalışmada *K. pneumoniae* suşunun yağ asiti analizini yapmışlardır. Bu analize göre suşun içerdiği yağ asiti profilini laurik asit (C<sub>12:0</sub>), miristik asit (C<sub>14:0</sub>), pentadekanoik asit (C<sub>15:0</sub>), palmitik asit (C<sub>16:0</sub>), palmitoleik asit (C<sub>16:1</sub>), heptadekanoik asit (C<sub>17:0</sub>), nonadekanoik asit (C<sub>19:0</sub>) olarak bulmuşlardır. En

çok rastlanılan yağ asidi palmitik asit (C<sub>16:0</sub>) olup, ortalama değeri %30.6 olarak saptanmıştır. Bu bulgular bizim FAME bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Vreelad ve arkadaşlarının [164], yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bir “Permian” bakteri ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür (species) düzeyinde ayırım yapamadığı, ancak cins (genus) düzeyinde farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır.

İnsan aktiviteleri, madenlerin işlenmesi ve çeşitli endüstriyel kirlilikler, metallerin çevrede birikimine neden olmaktadır. Mikroorganizmaların bu çevrelere bazı özel direnç mekanizmaları ile adapte olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [60]. Mikroorganizmaların metallere karşı dirençlilikleri, metal toksitesine tolerans sağlayan değişik direnç mekanizmaları sayesinde gelişmektedir [60]. Yapılan araştırmalar ile antibiyotik direnci ve ağır metal direnci arasında bir ilişkiye işaret edilmektedir. Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale gelmesi olarak tanımlanır [61]. Önemli sayıdaki raporlar, doğal çevredeki metal kontaminasyonunun, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasını ve korunmasını desteklediğini göstermektedir[62]. Bu nedenlerden dolayı gümüş dirençli bakterilerin diğer ağır metallere ve antibiyotiklere karşı dirençlilik profilleri de incelenmiştir. *R. planticola*, *P. plecoglossicida*'ya göre daha çok sayıda ağır metal ve antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. *P. plecoglossicida* ve *R. planticola* suşlarının Ag, Al, Li, Sn, Ni ve Sr metallerine karşı ise ortak direnç gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca her iki suşunda aztreonam, pefloxacin, ticarcilin ve ticarcilin/CA antibiyotiklerine karşı ortak direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

Abosereh ve arkadaşları [166], *Pseudomonas* suşlarında çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini çıkarmışlardır. Gümüşe dirençli olan suşların, bakır, nikel, demir, civa, çinko, kadmiyum ve kurşun metallerine de ortak direnç gösterdiklerini saptamışlardır. Ayrıca gümüş dirençli *Pseudomonas* suşlarının, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline ve ampicillin antibiyotiklerine de ortak direnç gösterdikleri

saptanmıştır. Bizim çalışmamızda *Pseudomonas* suşunun ile kanamycin ve nikel karşı ortak dirençlilik göstermesi bu çalışmalarla uyumludur.

Zolgharnein ve arkadaşları [167], Basra körfezinden izole ettikleri *P. putida* suşlarının kadmiyum, bakır, kurşun ve çinko metallerine dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Leedjarv ve arkadaşları [56], *P. putida* KT2440 suşunda çoklu metal direnci üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *P. putida* KT2440 suşunu ayrı ayrı çinko, kadmiyum, kurşun, kobalt ve nikel metallerin bulunduğu ortamda inkübe etmişler. *P. putida* KT2440 suşunun en çok direnci çinkoya ve en az direnci de kadmiyum metaline karşı gösterdiği saptanmıştır. Singh ve arkadaşları [168], endüstriyel kirliliğin etkin olduğu Hindistan'ın Paonta Sahib H. P. bölgesinde ağır metallere dirençli sekiz *Pseudomonas* suşunu izole etmişlerdir. Bu suşların antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır ve izole edilen suşların dirençlilik profilleri belirlenmiştir. En fazla dirençliliğin tetracycline antibiyotiğine olduğu, en az dirençliliğin de meropenem, bacitracin, amikacin antibiyotiklerine olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, Li ve arkadaşları [169], gümüş dirençli *E. coli* 116, 496 ve B1 suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeylerini incelemişlerdir. Bu suşların cephaloridine, cephalothin, cefepime, cefpirom, tetracycline ve chloramphenicol antibiyotiklerine karşı dirençlilikleri gösterilmiştir. Bu 3 suşun en fazla dirençliliği cephalothin antibiyotiğine gösterdiği belirtilmiştir. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerine dayanılarak tanımlanan *K. pneumoniae* türlerinin ampicillin, streptomycin, gentamicin, ofloksasin, tetracycline ve chloramphenicol farklı derecelerde direnç gösterdikleri gösterilmiştir [167]. Yapılan diğer bir çalışmada ise, Rajbanshi [63] ve arkadaşları, krom metaline direnç gösteren *K. pneumoniae* suşunun antibiyotik dirençliliği de incelenmiştir. Bu suşun, gentamycin, cotrimoxazole antibiyotiklerine duyarlılığı, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, ampicillin antibiyotiklerine karşı da dirençlilikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmalar çoklu antibiyotik direnci ile çoklu ağır metal direnci arasında bir ilişki olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Wright ve arkadaşları [170] yaptıkları çalışmada As, Cu, Mn, Zn, Co ve Ag metallerine direnç geliştiren suşların aynı zamanda Cip, Tet, Chlor ve  $\beta$ -lactams antibiyotiklerine de direnç geliştirdiklerini tespit etmişlerdir. Bakterilerdeki metal ve antibiyotik dirençliliğinin ortak direnç



mekanizmaları ile kazanıldığı da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [170]. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu bulguları destekler niteliktedir.

Özer [62], yapmış olduğu çalışmada gümüş dirençli ve stronsiyum dirençli bakterilerin diğer ağır metallere karşı dirençlilik profillerini incelemiş ve gümüş dirençli *K. pneumoniae*, *P. putida*'ya göre daha fazla ağır metale ve antibiyotiğe direnç gösterdiğini tespit etmiştir. *P. putida* ve *K. pneumoniae* suşlarının Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine ve aztreonam, pefloxacin, ticarcillin ve ticarcillin/CA antibiyotiklerine ortak direnç gösterdiklerini saptanmıştır. Aktan [171], Kızılırmak'tan izole ettiği *E. faecalis*'in Ag, Al, Ba, Cr, Fe, Li, Ni, Sn, Sr ve Zn metallerine de dirençli olduğunu belirlemiştir. Ayrıca bu suşun amikasin, aztreonam ve gentamisin antibiyotiklerine karşı da dirençlilik gösterdiğini tespit etmiştir. Turalı [172], Kızılırmak'tan izole ettiği Cu dirençli *P. putida*'nın Al, Li, Ag, Ni, Zn metallerine karşı dirençli olduğunu belirlemiştir. Antibiyotiklerden ise aztreonam, gentamisin, bacitrasin, eritromisin, sefalotin, pefloksasin, ticarsillin ve vankomisine dirençli olduğunu belirlemiştir. Orman [173], yaptığı çalışmada lityum dirençli *S. aureus*'un antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profillerini incelemiş ve *S. aureus*'un Ag, Sn, Ni, Al, Ba, Sr gibi metallere ve ampicilin, aztreonam gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacilin, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun ise Pb, Sb, Ag, Li, Al, Ba, Sr gibi metallere ve bacitracin, oxacillin, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Akbulut [174], Mn ve Zn dirençli bakterilerin çoklu-metal ve antibiyotik dirençliliklerini incelemiştir. Mn dirençli *S. marcescens* ve *A. haemolyticus* suşlarının Al, Li, Ba, Pb, Fe, Ag, Cu, Sn, Ni, Zn, Sb, Sr metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit etmiştir. Zn dirençli *A. haemolyticus* suşunun ise Mn, Ag, Cu, Sn, Li, Al, Ba, Sr ve Ni metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirtmiştir. Mn dirençli bakterilerden *S. marcescens*'in ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam antibiyotiklerine, *A. haemolyticus*'un ise aztreonam, ceftazidime, gentamicin, oxacillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam ve trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun ise gentamicin, pefloxacin, trimeth sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiğini belirlemiştir. Özer [175], stronsiyum dirençli suşların çoklu metal

dirençlilik profiline bakıldığında *S. paucimobilis*'in metal dirençliliğinin *P. fluorescens*'e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik profili incelendiğinde ise, *P. fluorescens*'in daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği görülmüştür. *S. paucimobilis* ve *P. fluorescens* suşlarının Al, Li, Ba, Ni metallerine ve aztreonam, pefloxacin, tobramycin ve gentamicin antibiyotiklerine ortak direnç gösterdiklerini saptamıştır. Serim [176], baryum dirençli *S. aureus* suşunun ise Li, Cr, Ag, Sr metallerine ve aztreonam, ceftazidime, gentamicin, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit etmiş, baryum dirençli diğer bir şus olan *Stenotrophomonas rhizophila*'nın Al, Li, Pb, Ag, Sn, Ni ve Sr metallerine ve ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacın, gentamicin, erythromycin, imipenem, netilcimin, oxacillin, pefloxacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin, ticarcillin/CA, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiğini belirlemiştir. Koçhan [177] Nikel dirençli bakterinin antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profili de incelenmiştir. *C. testosteroni* suşunun Al, Li, Ba, Ag, Sn, Sr metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlemiştir. Antibiyotik direnç profiline bakıldığında ise penicillin, ampicilin, sulbactam, oxacillin, vancomycin, gentamicin, netilcimin, pefloxacin, trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği saptamıştır. Ayrıca kobalt dirençli bakterinin antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profillerini incelemiştir. *Staphylococcus warneri* suşunun Cd, Al, Li, Ba, Mn, Pb, Ag, Sn, Ni, Zn metallerine ve ciprofloxacın, gentamicin, netilcimin, pefloxacin, trimethsulfa gibi antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiğini saptamıştır.

Antibiyotik ve metal direnç genlerinin genellikle plazmit veya transpozonlarda ve aynı genetik elemanlarda birlikte bulunmaları nedeniyle Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında antibiyotik direnciyle birlikte ağır metal direncinin de yatay geçişinin mümkün olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, antibiyotikler dirençli bakterilerin özellikle hastane ortamlarında seleksiyona uğramaları, ağır metallere dirençli suşların da seleksiyonla baskın hale gelmesi ya da tersi anlamını taşımaktadır. Antibiyotiklere direnç sağlayan beta-laktamazlar, aminoglikozidleri modifiye eden enzimler vb. gibi molekülleri kodlayan genler kromozomda, plazmitlerde veya transpozonlarda bulunur. Kromozomda bulunanlar da ortamda

antibiyotik bulunduğu için oluşmamışlardır; ya intrensik olarak esasen mevcuttur (bazen antibiyotik bu genlerin ekspresyonunu indükler), ya bu genleri taşıyan bir bakteriden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyonla ya da plazmit veya transpozondaki genlerin kromozoma integrasyonu ile kazanılır. Plazmitler ve transpozonlar gibi genetik elementler veya bunlardaki direnç determinantları (beta-laktamaz enzimlerinin, aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin vb. genleri) antibiyotik bulunduğu için oluşmazlar. Bu genetik elementler esasen doğada bulunmaktadır. Bunları antibiyotik üreten mikroorganizmalarla aynı ortamda yaşamak durumunda olan bakterilere doğanın bağışladığı bir savunma aracı gibi düşünebiliriz. Duyarlı bir bakteri bu genetik elementleri ancak bir genetik olayla kazanabilmektedir. Enterik bakterilerin rezervuarı olan kanalizasyon sularının, artılmaksızın sucul ortamlara katılımı, R- plazmidlerinin geniş alanlara yayılmasına neden olmaktadır [178]. Mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinin kaynağının kromozomal DNA, plazmid DNA veya transpozonlar üzerinde taşınan genler olduğu rapor edilmiştir [180]. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmid DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir [180]. Transpozonlar, kromozomal DNA-plazmid DNA veya plazmid DNA-plazmid DNA arasında değişebilen gen parçalarıdır. Bakterilere biyodegradatif özelliğin yanı sıra antibiyotik dirençliği gibi bazı avantajlar da sağlamaktadır [181]. Ağır metal dirençliliği ile ilgili genlerin plazmit DNA üzerinde mi yoksa kromozomal DNA üzerinde mi olduğunu belirlemek amacıyla gümüş dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir.

Yapılan DNA izolasyon çalışmaları sonucunda, *P. plecoglossicida*'nın gümüş içeren ve içermeyen her iki ortamda da herhangi bir plazmit varlığı tespit edilememiştir. Bu nedenle bu suşun gümüş dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Sevgi [50] en yüksek MİK değerine sahip bakterilerden *Pseudomonas* sp.ve *Bacillus* sp. arasından seçtiği 36 adet bakteride plazmit DNA varlığını araştırmak için bu suşlardan plazmit DNA izolasyonu yapmış, bu suşlardan sadece sekizinde büyüklükleri 2.1 ve 1.8 kb olan 2 adet, bir suşta da 28 kb, 2.1 kb ve 1.8 kb büyüklüğünde üç adet plazmit tespit etmiştir. Plazmit içeren bu suşların Ni, Zn, Cu ve Cr ağır metallerine karşı belirli bir dirence sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak diğer metallere dirençli suşlarda bu ve buna benzer büyüklüklerde plazmitlere

rastlanmamış olması, metal dirençlilik informasyonunun plazmid kodlu olmadığı izlenimini vermektedir, dolayısıyla dirençliliğin kromozomal kökenli olduğu söylenebilir. Bu sonuç, metal kontaminasyonuna uzun yıllar maruz kalmış bölgenin bakteri populasyonu için beklenen bir durumdur. Çünkü plazmit kodlu dirençlilik bu tip adaptasyonlarda genetik bilgiyi transfer etme biçimlerinden tercih edilendir. Uzun süreli maruziyetler, söz konusu genetik bilgilerin daha kalıcı olduğu kromozoma taşınması için yeter zamanı sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada *P. plecoglossicida* suşunun Ag içeren ortamda plazmit bulunmaması uzun süreli bu metale maruz kalması sonucunda direnç genlerinin kromozoma taşınmış olabileceğini destekler niteliktedir. Turalı [172] Kırıkkale-Kızılırmak'da bulunan bakır dirençli *P. putida* suşunun Cu içeren ortamda plazmit bulundurmadığını tespit etmiş ve bu nedenle Cu dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğunu bulmuştur.

*R. planticola*'nın gümüş içeren ve içermeyen her iki ortamda yaklaşık olarak 127.5 kb ağırlığında bir plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu ile plazmiti elimine edilen *R. planticola*'nın Ag direncini kaybetmediği ve erythromycin, rifampin, vancomycin antibiyotiklerine karşı duyarlı hale geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, gümüş direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu; erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı olan direnç genlerinin ise plazmit DNA üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Kromozomal DNA'ya transpozonlar aracılığı ile gümüş dirençlilik genlerinin entegre olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da değişik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu nedenle bizim çalışmamızın sonucunda bu olasılık ağırlık kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda da *K. pneumoniae* suşunun gümüş dirençliliğinin kromozomlar üzerindeki genler ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [182]. Gümüş dirençlilik genlerini kodlayan, plazmitler üzerindeki *silCBA* gen bölgesi homologlarının, *K. pneumoniae*'deki kromozomal DNA üzerinde bulunduğunu tespit etmişlerdir [182]. Gupta ve arkadaşları [100], gümüş dirençliliğinin ilişkili olduğu pMG101 plazmiti üzerindeki *sil* genlerinin, *E. coli* K-12 ve O157:H7 suşlarındaki kromozomal DNA üzerindeki *agr* genleri ile homolog olduklarını göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda klinik alanlardan ve çevresel kaynaklardan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının gümüş dirençliliğinin plazmit ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [170]. Diğer bir çalışmada ise, Lok ve arkadaşları [183], gümüş miktarını adım adım arttırarak

gümüşe en çok direnç gösteren bakteriyi izole etmişlerdir. İzole edilen bu bakteriyi *E. coli* olarak tanımlamışlardır ve gümüş dirençliliğinin kökeninin kromozomal DNA ile bağlantısı olduğunu göstermişlerdir. Gram negatif bakterilerdeki gümüş dirençliliğinin genellikle plazmit aracılı olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Enerjiye bağımlı atım mekanizması ile gümüş iyonlarının atılmasından sorumlu genlerin plazmit üzerinde olduğu belirtilmiştir [24].

Gümüş dirençli Ag111 kodlu *R. planticola* suşunun 127.5 kb boyutunda büyük moleküler ağırlıkta bir plazmite sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı olan direnç genlerinin ise plazmit DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bunun üzerine ortaya çıkan sonucu desteklemek amacıyla plazmit DNA aktarımı (transformasyon) çalışması yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak herhangi bir plazmiti bulunmayan kompetant bakteri *E.coli* DH-5 $\alpha$  suşu alıcı olarak kullanılmıştır. Transformasyon sonrası antibiyogram sonuçlarına göre erythromycin, rifampin ve vancomycin antibiyotiklerine karşı daha önceden duyarlı olduğu tespit edilen *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun transformasyon sonrası bu antibiyotiklere karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir. Daha sonra transformasyon verimliliği hesaplanmış ve 10<sup>6</sup> CFU/ $\mu$ g transformant elde edildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *E.coli* hücrelerinin normal şartlarda 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ $\mu$ g hücre oluşturabildikleri bulunmuştur [184].

Metal direnç yollarında stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir [173]. Bu çalışmada da gümüş dirençli *P. plecoglossicida* suşunun total protein ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucunda bu suşun gümüş içeren ortamda 65.7, 57.6 ve 49.8 kDa boyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla %41, %5 ve %2 artış olduğu belirlenmiştir. Dış membran protein analizi sonucunda ise 66.9, 54.8, 48.6, 39.0, 36.7 ve 28.3 kDa boyutundaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla %77.0, %49.6,

%132.0, %125.7, %139.0 ve %39.4 artış olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında *P. plecoglossicida* suşunun gümüş dirençliliğinde daha çok dış membran proteinlerinin aktif olduğu düşünülmektedir. Canovas ve arkadaşları [74] *P. putida* KT2440 suşunun krom atım mekanizması için ChrA proteini, gümüş ve bakır atım sistemi için de CusC, CusB, CusA proteinlerinin rolleri olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda *P. putida* da metal dirençlilik mekanizması araştırılmıştır ve metallerin proteinlere bağlanarak hücre içinde alıkonmasıyla ağır metallerle karşı dirençlilik geliştirdiğini gösterilmiştir. *P. putida*'nın metallothioneinlere benzeyen, 3 farklı sistein bakımından zengin protein ürettiği tespit edilmiştir [56]. *P. putida* 06909 suşunda ilk olarak ATPaz'ın sorumlu olduğu CadA sistemi keşfedilmiştir. CadA sisteminin gen ürünleri hücre içindeki ağır metallerle bağlanarak bakterinin direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Bu sistem *P. putida* 06909 suşunun, kadmiyum ve çinkoya karşı direnç kazanmasını sağlamıştır. Aynı sistem *P. fluorescens* ATCC 13525 ve *P. putida*'da karakterize edilmiştir [57]. *Enterococcus hirae* bakterisinde Cu(II) dirençliliğinden sorumlu cop operonunun bulunduğu bildirilmiştir. Bu operonun genleri Cu(II)'nin hücre içinden hücre dışına salınmasında görev alan proteinleri kodlamaktadır [180]. Bazı *Pseudomonas* suşlarında da benzer bir operon bulunduğu bildirilmiştir [185].

Gümüş dirençli *R. planticola* suşunun ise total protein ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucunda bu suşun gümüş içeren ortamda gümüş içeren ortamda 181.4, 159.8, 113.7, 66.3, 61.4, 49.9, 41.6 ve 36.6 kDa boyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla %20, %40, %35, %59, %60, %59, %58 ve %4 azalma olduğu belirlenmiştir. Dış membran protein analizi sonucunda ise gümüş içeren ortamda 61.4, 49.9, ve 36.6 kDa boyutundaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla %60, %10, ve %4 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin metal varlığında kendini korumaya almak için söz konusu metal bağlayan proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir. Otitoloji ve arkadaşları [144], *K. pneumoniae*, *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının gümüş dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Gümüş içeren ortamda 45.2 kDa boyutundaki TolC dış membran proteininin ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bar ve arkadaşları [186] yaptıkları çalışmada ağır metale maruz kalmış nehirden izole ettikleri  $Co^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  dirençli *K. pneumoniae* suşunu

tanımlamışlardır. Daha sonra hücrel proteinleri incelemişler ve metal içeren ortamda, içermeyen ortama oranla dış membran proteinlerinde ekspresyonunda azalma olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Choudhury ve arkadaşları [187] yaptıkları çalışmada, Hindistan'nın Sundarbans kıyı bölgesinden aldıkları su örneklerinden çoklu antibiyotik ve ağır metal dirençli *K. pneumoniae* suşu izole etmişlerdir. Bu suşun  $Ag^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  gibi metallere ve erythromycin, ampicillin, furazolidone, penicilin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *K. pneumoniae* suşunun  $Cd^{2+}$  içeren ortamda protein profilini incelemişler ve 14 kDa boyutundaki dış membran proteinin  $Cd^{2+}$  içeren ortamda, içermeyen ortama oranla ekspresyonunda azalma olduğunu ve dolayısıyla metal dirençliliğinde dış membran proteinlerinin etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Turalı [172], Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole ettiği bakır dirençli *P. putida* ve krom dirençli *E. faecalis* suşlarının total protein analiz çalışmaları sonucunda krom ve bakır dirençli suşların metal varlığında total protein ekspresyonlarının arttığını tespit etmiştir. Özer [62], Kızılırmak'tan izole ettiği gümüşe dirençli *P. putida* ve *K. pneumoniae* suşları ile stronsiyuma dirençli *S. paucimobilis* ve *P. fluorescens* suşlarının total ve dış membran protein analizleri sonucunda metal varlığının gümüş ve stronsiyumun total ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan gümüş ağır metalini tolere eden bakterilerin izolasyonu, biyokimyasal, 16S rDNA sekanslaması, yağ asidi analizi tanımlanması ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri toplanarak, gümüş metalini tolere eden suşlar izole edilerek en yüksek MİK değerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşlar biyokimyasal testler, yağ asidi ve 16S rDNA sekans analizi kullanılarak *P. plecoglossicida* ve *R. planticola* olarak tanımlanmıştır. Ag dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu (curing) çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile

ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda tanımlanan lokal suşların olası biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmak üzere potansiyel oluşturabileceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Gavriescu, M., Removal of heavy metals from environment by biosorption. *Eng. Life Sci.* 3: 219-232, 2004.
- [2] Senthilkumaar,S., Bharathi,S., Nithyanandhi, D., Subburam,V., Biosorption of toxic heavy metals from aqueous solutions. *Bioresource Technol.* 75 (2): 163-165, 2000.
- [3] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30 (2): 261-278, 2004.
- [4] Skontzou, P., Soupioni, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M., Lead (II) uptake during baker`s yeast production by aerobic fermentation of molasses. *Process Biochem.* 38 (10): 1479-1482, 2003.
- [5] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., Microbial resistance to metals in the enviroment. *Ecotox. Environ. Safe.* 45 (3): 198-207, 2000.
- [6] Nies, D.H., Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2-3): 313-339, 2003.
- [7] İleri, R., Çevre Biyoteknolojisi. 501-503. Değişim Yayınları, Adapazarı, 2000.
- [8] Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Egwurugwu, J. N., Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2 (5): 112-118, 2007.
- [9] Evangelou, V. P., Environmental soil and water chemistry. Principles and Applications, John Wiley&Sons, Inc., 1998.
- [10] Adedeji O. B., Adeyemo O. K., Oyedele M. O., Heavy metals in snail and water samples from Alaro River in Oluyole Industrial Area Of Ibadan Southwestern Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.* 6 (2): 115-121, 2011.

- [11] Taylan Z. S., Böke Özkoç H., Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. BAÜ FBE Dergisi. 9 (2): 17-33, 2007.
- [12] Rainbow, P.S., Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 31 (4-12): 183-192, 1995.
- [13] Atalay N., Ni (II) İyonlarının Poli(2,5-Dihidro-2,5-Dimetoksi Furan) Üzerine Adsorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [14] Kahvecioğlu Ö., Kartal G., Güven A. ve Timur S., Metallerin çevresel etkileri. I.Metalurji Dergisi. 136 : 47-53, 2004.
- [15] Nies, D.H., Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol Mini-Review. 51 (6): 730- 750, 1999.
- [16] Çalışkan, E., Asi Nehri'nde Su, Sediment ve Karabalık (*Clarias Gariepinus* Burchell, 1822)'ta Ağır Metal Birikiminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 2005.
- [17] Lobban, C. S., Harrison, P. J., Saeweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press. 366, 1997.
- [18] Matyar, F., Kaya, A., Dinçer, S., Antibacterial agents and heavy metal resistance in gram-negative bacteria isolated from seawater. Shrimp and Sediment in Iskenderun Bay, Turkey. 407 : 279–285, 2008.
- [19] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Çeviri: Çökmüş C., Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
- [20] Zeng, X., Tang, J., Yin, H., Liu, X., Jiang,P. and Liu, H., Isolation, identification and cadmium adsorption of a high cadmium-resistant *Paecilomyces Lilacinus*. Afr. J. Biotechnol. 9 (39): 6525-6533, 2010.

- [21] Ray, S.A., Ray, M.K., Bioremediation of heavy metal toxicity with special reference to chromium. *Al Ameen Journal of Medical Sciences*. 2 (2): 57 – 63, 2009.
- [22] Gürbüz, M., G., Bakır(II) Ve Nikel(II) İyonlarının Entromorpha Prolifera'ya Biyosopsiyonunda Denge, Kinetik ve Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2006.
- [23] Wackett, L. P., Dodge, A. G., Ellis L. B. M., Microbial genomics and the periodic table. *Appl. Environ. Microb.* 70 (2): 647–655, 2004.
- [24] Silvestry- Rodriguez, N., Ruleas- Sicairos, E. E., Gerba, C. P., Bright, K. K., Silver as a disinfectant. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 191 : 23–45, 2007.
- [25] Gutnick, D. L., Bach, H., Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals. Taylor & Francis Group, LLC. 507-527, 2005.
- [26] Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V, Venkateshwar, P., Biosorption: an eco-friendly alternative for heavy metal removal. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (25): 2924-2931, 2007.
- [27] Tony Jong, T., Parry, D L., Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulfides. *J. Colloid Interf. Sci.* 275 (1): 61–71, 2004.
- [28] Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., Kimyasallar ve çevre, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, No: 50, 2001.
- [29] Özden, Y., Enne ve Porsuk Barajı Sedimentine Bağlı Ağır Metallerin *Cyprinus carpio*'nun Değişik Dokularına Biyoakümülyasyonunun Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, 2008.

- [30] Dan'Azumi, S., Bichi, M. H., Industrial pollution and heavy metals profile of Challawa River in Kano. Department of Hydraulics and Hydrology. 5 (1): 23-29, 2010.
- [31] Tsezos ve Volesky, Biosorption of uranium and thorium. Biotech. And Bioeng. 23 (3): 583-604, 1981.
- [32] Khan, M. M. A., Umar, R., Lateh, H., Study of trace elements in groundwater of Western Uttar Pradesh. Sci. Res. Essays. 5 (20): 3175-3182, 2010.
- [33] Sağ, Y., Kaya, A., Ağır metal iyonlarının *R. arrhizus*'a ok bileşenli biyosorpsiyonunun incelenmesi. TÜBİTAK YDABÇAG-525, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, 1-14, 1999.
- [34] Nataraj S.K., Sridhar S., Shaikha I.N., Reddy D.S., Aminabhavi T.M., Membrane-based microfiltration/electrodialysis hybrid process for the treatment of paper industry waste water. Sep. Purif. Technol. 57 (1): 185-195, 2007.
- [35] Gupta R. and Mahapatra H., Microbial Biomass: An economical alternative for removal of heavy metals from waste water. Indian. J. Exp. Biol. 41 (9): 945-966, 2003.
- [36] Volesky, B., Detoksification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. Hydrometallurgy. 59 (2-3): 203-216, 2001.
- [37] Yılmaz, P., Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 1-17, 2006.
- [38] Akçelik, Ö., Ağır Metallerin *Saccharomyces Cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.

- [39] Filiz, E., Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Adsorbanlarla Sulardan Ağır Metal Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.
- [40] Kavamura, V. N., Esposito, E., Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnol Adv.* 28 (1): 61-69, 2010.
- [41] Sağlam, N., Cihangir, N., Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorpsiyonu çalışmaları. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi. 11:157-161, 1995.
- [42] Jagadevan S. and Mukherji S, Successful in-situ oil bioremediation programmes – key parameters. *Indian. J. Biotechnol.* 3 (4): 495-501, 2004.
- [43] Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Woiciechowski A.L., Thomaz-Soccol V., Correia C.T, Pandey A., Bioremediation an important alternative for soil and Industrial wastes clean-up. *Indian. J. Exp. Biol.* 41 (9): 1030-1045, 2003.
- [44] Chatterjee, S. Chattopadhyay, P., Roy, S., and Sukanta K. S. , Bioremediation: A tool for cleaning polluted environments. *IJPAB* 10 (11): 594-601, 2008.
- [45] İlhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kılıcarslan, S., Ozdag, H., Removal of chromium, lead and copper, ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology.* 2 : 50-57, 2004.
- [46] Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y., Aksu, Z., Bioaccumulation of Cu(II), Pb(II) and Cr(VI) by growing *Aspergillus Niger*. *Process Biochem.* 38 (12): 1647-1651, 2003.
- [47] Brar, S., Verma, M., Surampalli, R.Y., Misra, K., Tyagi, R.D., Menuier, N., Blais, J.F. Bioremediation of hazardous wastes—a review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management.* 10 (2): 59-72, 2006.

- [48] Wang, J., Chen, C., Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27 (2): 195-226, 2009.
- [49] Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y., Güzel, F., Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by Kaolinite. *Water Res.* 37 (4): 948-952, 2003.
- [50] Nakıboğlu, T., Deri Endüstrisi Atıksularından Kromun Çeşitli Alglerle Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
- [51] Gazso, L. G., The Key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environmen. *Cejoem*, 7 (3-4): 178-185, 2001.
- [52] Emtiaza, G., Ethemadifar, Habibi, M. H., Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *Afr. J. Biotech.* 3 (6): 330-333, 2004.
- [53] Ratul Saikia, R., *Microbial Biotechnology*. New India Publishing, 2008.
- [54] Oh, S.E., Hassan, S.H.A., Joo, J.H., Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *World J. Microb. Biot.* 25 (10): 1771-1778, 2009.
- [55] Choong, C. C., Ting, A. S. Y., Bioaccumulation and biosorption efficacy of trichoderma isolate SP2F1 in removing copper (Cu(II)) from aqueous solutions. *World J. Microb. Biot.* 25 : 1431-1437, 2009.
- [56] Chovanová, K., Sládeková, D., Kmet., V., Prokšová, M., Harichová, J., Andrea, P., Polek, B. and Ferianc., F. Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. *Biologia.* 59 (6): 817-27, 2004.
- [57] Hussein et. Al., Cadmium resistance in *Pseudomonas putida*: growth and uptake of cadmium. *Gen. Microbiol.* 131 (10): 2539-2544, 1984.

- [58] Gadd, G.M., Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*. 156 (3): 609-643, 2010.
- [59] A. Özvardarlı, Çevre Biyoteknolojisi Uygulamalarında Biyosorpsiyonun Yeri. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Çorlu, 2006.
- [60] Yılmaz, E. İ., Metal Tolerance and Biosorption Capacity of *Bacillus circulans* Strain EB1, University of Dicle. Faculty of Sciences, Department of Biology, Diyarbakır, Turkey, 2003.
- [61] Demirtürk, N., Demirdal, T., Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 5 (2): 17-21, 2004.
- [62] Özer, G., Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2011.
- [63] Rajbanshi A., Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. *Our. Nature*. 6 (1): 52-57, 2008.
- [64] Sevgi E., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [65] Silver, S., Misra, T. K., Bacterial transformation of and resistances to heavy metal. *Basic Life Sci*. 28 : 23-46, 1984.
- [66] Dr. Pınar ZARAKOLU , Mikroorganizmalarda direnç mekanizması olarak aktif pompa sistemleri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, 2003.
- [67] Nies, D. H., Silver, S., Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol*. 14 (2): 186- 199, 1995.

- [68] Ji, G., and Silver, S., Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concer. *J. Ind. Microbiol.* 14 (2): 61-168, 1995.
- [69] Şimşek, N., Alabay, B., Metallotiyoninlerin histofizyolojik önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2 (2): 75-81, 2007.
- [70] Archer GL, Niemeyer D.M., Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* 2 (10): 343-347, 1994.
- [71] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial metallothioneins. *Biochemistry and Molecular Genetics, J. Industr. Microbiol.* 14 (2): 119-125, 1995.
- [72] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae, and fungi, *Can. J. Micribiol.* 32 (6): 447-464, 1986.
- [73] Mergeay, M., Towards an understanding of the genetics of bacterial resistance. *Trends Biotechnol.* 9 (1): 17-24, 1991.
- [74] Canovas, D., Cases, I., Lorenzo V., Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ. Microbiol.* 5 (12): 1242–1256, 2003.
- [75] 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 Res.* 37 (10): 2505–2511, 2003.
- [76] 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.



- [77] Silver, S., Genes for all metals - a bacterial view of the periodic table the 1996 thom award lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 20 (1): 1-12, 1998.
- [78] Silver, S., Plasmid-determined metal resistance mechanisms. Range and Overview *Plasmid.* 27 (1): 1-3, 1992.
- [79] 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 (4): 715-718, 2002.
- [80] S. Ersoy, Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmitlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [81] Brown, T.,A., Çeviri Coral, G., Ünalđı Coral, N., Gen klonlama, 322, 2005.
- [82] Mills, S. , McAuliffe, O.E., Coffey, A. Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P., Plasmids of lactococci-genetic accessories or genetic necessities. *FEMS Microbiol. Review.* 30 (2): 243-273, 2006
- [83] Dmowski, M., Sitkiewicz, I. and Ceglowski, P., Characterization of a novel partition system encoded by the c and d genes from the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* 188 (12): 4362-4372, 2006.
- [84] Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Genetik Kavramlar. 8. Baskı, Çeviri Ed. Öner, C., Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
- [85] Martinez J. L., Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157 (11): 2893–2902, 2009.
- [86] Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi, s. 91-112, 1999.

- [87] Alaeddinoğlu G. Mikroorganizma genetiği. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi,. s. 71-79, 1999.
- [88] Madigan M.T, Partinko J.M, Parker J. Brock biology of microorganism. 9: 290-337, 2000.
- [89] Roberts A.P, Mullany P., Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. *Periodontol* 2000. 42 : 36-46, 2006.
- [90] McKane L, Kandel J., *Microbiology essentials and applications*. Second Edition. McGraw- Hill Inc. 13 (2): 208-211, 1996.
- [91] Liosa M, de la Cruz F., Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res. Microbiol.* 156 (1): 1-6, 2005.
- [92] Muyzer, G., DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin Microbiol.* 2 (3): 317-322, 1999.
- [93] 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 (1): 127–141, 1998.
- [94] Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 (1): 143-169, 1995.
- [95] Sanz J.L., Kochling T.K., Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochem.* 42 (2): 119–133, 2007.
- [96] Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Florent C., Burr, M.D., Brisson, J., Camper A.K., Steina O.R., Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecol. Eng.* 35 (6): 987–1004, 2009.

- [97] Ludwig, W. and Schleifer, KH., Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbio Rev.* 15 (2-3): 155-173, 1994.
- [98] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresour. Technol.* 97 (4): 641–647, 2006.
- [99] Demirel, S., Molecular techniques for determining microbial diversity in treatment systems. *Journal of Engineering and Natural Sciences.* 30: 179-192, 2012.
- [100] 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.
- [101] Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Res. Microbiol.* 155 (6): 409-421, 2004.
- [102] Vierstraete, A. Sequencing of the obtained PCR product. 2004. Erişim: [<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>]. Erişim tarihi: 12.03.2013.
- [103] Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular cloning A laboratory Manual* 3 thed., Cold Spring Harbor, New York, 12.3– 8.27, 2001.
- [104] Bahçeci, Z., *Moleküler Biyoloji* 2. Baskı, Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir, 290-293, 2002.
- [105] Ensari, N. Y., *Moleküler Biyoloji* 1. Baskı, D. Ü. Basımevi Müdürlüğü, Diyarbakır, 122-124, 2002.
- [106] İnternet: Sanger DNA dizi analizi, <http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/GEP/Lecture15/Image31.gif> . (Erişim tarihi: 07.05.2013)

- [107] İnternet: Maxam-Gilbert metodu ile oligonükleotit dizileme, <http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif> . (Erişim tarihi: 07.05.2013)
- [108] Durmaz, R., Moleküler Epidemiyoloji, Uygulamalı moleküler biyoloji 2. Baskı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya, Nobel Tıp Kitabevi, 130-158, 2001.
- [109] Saitou, N. and İmanishi, T., Relative efficiens of the fitch-margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6 (5) : 514, 1989.
- [110] Freeman S. and Herron, J.C., Evrimsel Analiz, Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytuğ, S., and Gündüz, G., Palme Yayıncılık, 1999.
- [110] Basıbüyük, H. H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D. L. J., *Phylogenetic Systematics*, Önder Matbaa, Sivas, 2000.
- [111] Mount, D., *Bioinformatics*, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, *Phylogenetic prediction*. 7 : 281, 2001.
- [113] Felsenstein, J., Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *J. Mol Evol.* 26 (1-2): 123-131, 1987.
- [114] Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Pazarlıoğlu, N. *Biyoinformatik I, Yağ Asit Profillerine Göre Mikroorganizmaların Tanısı ve Karakterizasyonu*, İzmir, 2003.
- [115] Embley, T.M. ve Wait,R., *Chemical methods in prokaryotic systematics, structural lipids of eubacteria*. Donelli Chichester, New York, A.B.D., 1994.
- [116] Stoakes, L., John, M.A., Lamngan, R., Schieven, B.C., Ramos, M., Harley, D. ve Hussain, Z., Gas-liquid chromatografy of cellular fatty acids for identification of staphylococci, *J. Clin. Microbiol.* 32 (8): 1908-1910, 1994.

- [117] MIDI, Inc. Sherlock Microbial Identification System References. 2001.
- [118]. Hışıl, Y., Enstrümental Gıda Analizleri-2. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 4. Baskı, 2004.
- [119] Anonim, Kızılırmak Nehri.  
[http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak\\_nehri](http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak_nehri) (Erişim tarihi: 10.04.2013)
- [120] 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.
- [121] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır Arıca, Ş., Kırmıdı, T., *Mytilus sp* (midye), *Gammarus sp* (nehir trnağı) ve *Cladophora sp* (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak nehrindeki ağır metal kirliliğinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9 (1): 52-60, 2007.
- [122] Chang, Y., Han, J., Chun, J., Lee, K.C., Rhee, M., Kim, Y., Bae, K.S., *Comamonas koreensis* sp. nov., a non-motile species from wetland in Woopo, Korea. Int. J. Syst. Evol. Micr. 52 (2): 377-381, 2002.
- [123] Behme, R., Shuttleworth, R., McNabb, A., Colby, W.D., Identification of *Staphylococci* with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. J. Clin. Microbiol. 34 (12): 3075-3084, 1996.
- [124] 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.

- [125] Zolgharnein, H., K. Karami, M.M. Assadi and A.D. Sohrab. Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. *Biotechnol.* 9 (1): 1-8, 2010.
- [126] 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.
- [127] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory. 545, 1982.
- [128] Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4): 406-425, 1987.
- [129] Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39 (4): 783-791, 1985.
- [130] Tamura K., Nei M., and Kumar S., Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (30): 11030-11035, 2004.
- [131] Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S., MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Bio. Evol.* 28 (10): 2731-2739, 2011.
- [132] Nei M. and Kumar S., *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford University Press, New York, 2000.
- [133] Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D.,

Gibson, T.J., Higgins, D.G., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948, 2007.

[134] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., Newark, DE. 2001.

[135] Birnboim, H.C., Doly, J., Arapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6): 1513-1523, 1979.

[136]. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Third Edition. New York, Cold spring harbor laboratory press, Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. 1 (25): 1.105-1.111, 2001.

[137] Kumar, N., Narayanan, R., Kavitha, N., and Dhanalakshmi, B., Plasmid profile of lactic acid bacteria with antifungal properties. *As. J. Food Ag-Ind.* , 3 (02), 229-235, 2010.

[138] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates. *Microbios.* 86 (348): 143-156, 1996.

[139] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A. & Silver, R. P., Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* 39 (1): 315-335, 1983.

[140] Laemli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (5259): 680-684, 1970.

[141] Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. *Eur. Food. Res Technol.* 211 : 322-325, 2000.

- [142] Mukhallad AM, Malcolm PS., The distribution of heavy-chain isoforms myosin in airway smooth muscle from adult and neonate humans. *Biochem. J.* 260 (2): 421-426, 1989.
- [143] <http://www.endmemo.com/bio/bacteriagrowth.php> (Erişim tarihi: 07.05.2013)
- [144] Otitoloju, A. A., Rogers, G. B., Bury, N. R., Hogstrand, C., Bruce, K. D., Chromosomal genes conferring tolerance to heavy metal (Ag) toxicity. *Environmentalist.* 29 (1): 85–92, 2009.
- [145] Kaur,P., Vadehra, D.V., Mechanism of resistance to silver ions in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 (1): 165–167, 1986.
- [146] Starodub, M.E., Trevors, J.T., Mobilization of *Escherichia coli* R1 silver resistance plasmid pJT1 by Tn5-Mob into *Escherichia coli* C600. *Biol. Met.* 3 (1): 24-7, 1990.
- [147] Chopra, I., The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern. *J. Antimicrob Chemoth.* 59 (4): 587–590, 2007.
- [148] Burke, A., Balch, A. L., Enemark, J. H., Palladium and platinum complexes resulting from the addition of hydrazine to coordinated isocyanide. *J. Am. Chem. Soc.* 92 (8): 2555-2557, 1970.
- [149] Percivala, S. L., Bowlera, P. G., Russell, D., Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60 (1): 1–7, 2005.
- [150] Haefeli, C., Franklin, C. and Hardy. K., Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158 (1): 389-392, 1984.



- [151] Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. and Wakabayashi, H., *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Int. J. Syst Evol. Microbiol. 50 (1): 83–9. 2000.
- [152] Song, J.S., Lee, D.H., Lee, K. and Kim, C.K., Characteristics of several bacterial isolates capable of degrading chloroaliphatic compounds via hydrolytic dechlorination. J. Microbiol. 41 (4): 277-283, 2003.
- [153] Koc, S., Kabatas, B., and Içgen, B. Multidrug and heavy metal-resistant *Raoultella planticola* isolated from surface water. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. in press. DOI: 10.1007/s00128-013-1031-6, 2013.
- [154] Bagley, S.T, Seidler, R.J, Brenner, D.J, *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. Curr. Microbiol. 6 (2): 105-109, 1981.
- [155] Sugimori, D., Watanabe, M., Utsue, T., Isolation and lipid degradation profile of *Raoultella planticola* strain 232-2 capable of efficiently catabolizing edible oils under acidic conditions. Appl. Microbiol Biotechnol. , 97 (2): 871, 2013.
- [156] Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G., Roots of bacterial systematics. In Handbook of New Bacterial Systematics,. Edited by M. Goodfellow and A. G. O'Donnell. Academic Press, London. 5 : 3-56 1993.
- [157] Manfio, G. P., Toward Minimal Standards for the Description of *Streptomyces* species. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne, England, U. K., 1995.
- [158] Rosselló-Mora, R. and Amann, R., The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology. 25 : 39-67, 2001.
- [159] Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M. and Fujii, T., Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-

producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5): 2568- 2579, 2003.

[160] Pramod K. Sharma, David L. Balkwill, Anatoly Frenkel and Murthy A. VaraVamurthy, New *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7): 3083, 2000.

[161] Jha, B.K, Pragash, M.G., Cletus, J., Raman, G., Sakthivel,N., Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World J Microbiol. Biotechnol.* 25 (4): 573–581. 2009.

[162] Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. and Rousselier, P., Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. of Syst Evol Micr.* 51 (3): 925-932, 2001.

[163] Haack, S.K., Garchow, H., Odelson, D.A., Forney.LJ and Klug, M.J., Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communitiest. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7): 2483, 1994.

[164] Vreeland, R.H., Rosenzweig, W. H., Lowenstein, T., Satterfield, C., Ventosa, A., Fatty acid and DNA analyses of Permian bacteria isolated from ancient salt crystals reveal differences with their modern relatives. *Extremophiles.* 10 (1): 71-78, 2006.

[165] Stewart,M.H. and Olson, B.H., Physiological studies of chloramine resistance developed by *klebsiella pneumoniae* under low nutrient growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2918-2927, 1992.

- [166] Salam, A., Abosereh, N. A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M., Resistance plasmids of indigenous *Pseudomonas* in Egypt. Journal of Applied Sciences Research. 3 (9): 873-878, 2007.
- [167] Zolgharnein, H., Azmi, M. L. M., Saad, M. Z., Mutalib, A. R., Mohamed, C.A.R., Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas. Iranian Journal of Biotechnology, 5 (4): 232-239, 2007.
- [168] Singh, V., Chauhan, P. K., Kanta, R., Dhewa, T., Kumar, V., Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. Academic Journal 3 (2): 164, 2010.
- [169] Li, X.Z., Nikaido, H. and Williams, K.E., Silver-resistance mutants of *Escherichia. coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. J. Bacteriol., 179 (19): 6127-6132, 1997.
- [170] Austin- Baker, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., McArthur, J. V., Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol, 14 (4): 176-182, 2006.
- [171] Aktan, Y., Tan, S., and Içgen, B. Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. Environ. Monit. Assess. 185 (6): 5285-5293, 2013.
- [172] G. Turalı, Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [173] N. Orman, Lityum ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, 2012.
- [174], S. Akbulut, Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması ve Moleküler Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi. Kırıkkale 2012.

- [175] Ozer, G., Ergene, A., and Icen, B. Biochemical and molecular characterization of strontium-resistant environmental isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Sphingomonas paucimobilis*. Geomicrobiol. J. 30 (5): 381-390, 2013.
- [176] G. Serim Alüminyum ve Baryum Dirençli Çevre İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi .Kırıkkale 2012.
- [177] C. Koçhan Nikel ve Kobaltı Tolere Eden Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi .Kırıkkale 2012.
- [178] Karayakar, F., Ay, Ö., Cıçık, B., Mersin kıyı şeridinden alınan su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının bazı antibiyotiklere karşı plazmid kökenli dirençliliğin saptanması. Eko. Çev. Kor. 13 (52): 28, 2004.
- [179] Kotsal, J., Sushanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B. And McBeth, D.L., *Pseudomonas* C12B, an SDS degrading strain, harbours a plasmid coding for degradation of medium chain length n-alkanes. Int. Biodeter. Biodegr. 42: 221-228, 1998.
- [180] Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W., *Pseudomonas pickettii*: a common oil and groundwater aerobik bacteria with pathogenic and biodegradation Properties. Ecotox. Environ. Safe. 47: 105-111, 2000.
- [181] S. Gülcan, Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, 2006.
- [182] Gupta, A., Phung, L. T., Taylor, D. E., Silver, S., Diversity of silver resistance genes in incH incompatibility group plasmids. Microbiol. 147 (12): 3393-3402, 2001.

- [183] Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., Tam, P., Chiu, J. F., Che, C. M., Proteomic identification of the cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. *J. Proteome Res.* 7 (6): 2351–2356, 2008.
- [184] Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H., High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96 (1): 23–28, 1990.
- [185] Sandrin T. R., Chech A. M., Maier R. M., A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl. Environ. Microb.* 66 (10): 4585-4588, 2000.
- [186] Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J., Gade, W.N., Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-a proteomic approach. *J. Biotechnol.* 128 (3): 444-51, 2007.
- [187] Choudhury P, Kumar R., Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Can J Microbiol.* 44 (2): 186-9, 1998.