

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALÜMİNYUM ve BARYUM DİRENÇLİ ÇEVRE İZOLATLARININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

GAMZE SERİM

HAZİRAN 2012

Biyoloji Anabilim Dalında Gamze SERİM tarafından hazırlanan “Alüminyum ve Baryum Dirençli Çevre İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu” 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

Ortak Danışman

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU _____

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE _____

Üye (Ortak Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN _____

Üye : Doç. Dr. Mustafa TÜRK _____

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN _____

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ALÜMİNYUM ve BARYUM DİRENÇLİ ÇEVRE İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

SERİM, Gamze

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2012, 83 sayfa

Bu çalışmanın amacı Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen alüminyum ve baryum dirençli bakterilerin tanımlanması ve moleküler karakterizasyonudur. Alüminyum için minimal inhibitör konsantrasyonu 300 mg/L olan bir suş izole edilmiş ve biyokimyasal testler kullanılarak *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanmış olan bu izolata baryum, lityum, kurşun, gümüş ve kalay gibi ağır metallere karşı çoklu dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Plazmit DNA analiz çalışmaları sonucunda *S. aureus*'un alüminyum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan baryum için minimal inhibitör konsantrasyonu 2700 mg/L olan iki suş izole edilmiş ve biyokimyasal testler kullanılarak bu suşlar sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* olarak tanımlanmıştır. Baryum dirençli *S. aureus* suşunun gümüş, lityum, krom ve stronsiyum gibi ağır metallere karşı çoklu dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Plazmit DNA analiz çalışmaları sonucunda *S. aureus*'un baryum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Alüminyum ve baryum dirençli her iki *Staphylococcus aureus* suşunun total proteinleri analiz edilerek alüminyum ve baryum dirençliliğinde bu proteinlerin etkileri incelenmiştir. Baryum dirençli diğer suş olan *Stenotrophomonas*

rhizophila'nın ise kurşun, gümüş, kalay, lityum, alüminyum, stronsiyum ve nikel gibi ağır metallere karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Plazmit DNA analiz çalışmaları ile *S. rhizophila* suşunun baryum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. *S. rhizophila* için yapılan total ve dış membran protein analizleri sonucunda sadece total proteinlerin baryum dirençliliğinde etkin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Alüminyum dirençli bakteri, baryum dirençli bakteri, moleküler karakterizasyon, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION of ENVIRONMENTAL ISOLATES RESISTANT to ALUMINIUM and BARIUM

SERİM, Gamze

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent İÇGEN

June 2012, 83 Pages

The aim of this study to isolate and characterize aluminium and barium-resistant bacteria from the river Kızılırmak, Kırıkkale. Aluminium-resistant bacterium with a minimal inhibitory concentration of 300 mg/L was isolated and identified as *Staphylococcus aureus* by using biochemical tests. The identified isolate was shown to be resistant to other heavy metals like barium, lithium, lead, silver and tin. Plasmid DNA analyses results showed that the aluminium-resistant ability of *S. aureus* was chromosome-encoded. On the other hand, barium-resistant two bacteria with a minimal inhibitory concentration of 2700 mg/L were isolated and identified as *Staphylococcus aureus* and *Stenotrophomonas rhizophila* by using biochemical tests. Barium-resistant *S. aureus* was shown to be resistant to other heavy metals like, silver, lithium, chrome and strontium. Plasmid DNA analysis results showed that the barium resistant ability of *S. aureus* was chromosome-encoded. Total proteins were analysed in order to reveal their function in aluminium an barium resistance in both isolates of *S. aureus*. The other barium-resistant bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* was shown to be resistant to other heavy metals like lead, silver, tin, lithium, aluminium, strontium and nickel. Plasmid DNA analysis results showed that

the barium-resistant ability of *S. rhizophila* was also chromosome-encoded. Total protein and outer membrane protein profiles revealed that only total membrane proteins were functional in barium tolerance of *S. rhizophila*.

Key words: Aluminium-resistant bacteria, barium-resistant bacteria, molecular characterization, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Staphylococcus aureus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana öncülük eden, bizlere bu çalışma imkanlarını sağlayan ve her daim arkamda duran tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye teşekkür ederim.

Tezim üzerinde çok emeği olan, çalışmalarımın her aşamasında engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ortak tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Fadime YILMAZ'a, ayrıca çalışma arkadaşlarıma ve Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Laboratuvar (KUBTAL) çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana destek olan değerli arkadaşlarım Ceren KOÇHAN ve Sevilay AKBULUT'a bana kattıkları her şey için ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her daim dik durmamı sağlayan, maddi ve manevi hiçbir konuda desteğini esirgemeyen babam Doğan SERİM, annem Döne SERİM, kardeşlerim İlayda SERİM ve Gizem SERİM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kaynak Özetleri.....	2
1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları	2
1.1.1.1. Alüminyumun Fonksiyonları	6
1.1.1.2. Baryumun Fonksiyonları.....	7
1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri	7
1.1.2.1. Alüminyumun Çevresel Etkileri.....	8
1.1.2.2. Baryumun Çevresel Etkileri	9
1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları	9
1.1.3.1. Alüminyumun Kullanım Alanları	10
1.1.3.2. Baryumun Kullanım Alanları.....	10
1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri	11
1.1.4.1. Geleneksel Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.4.2. Biyolojik Uzaklaştırma Yöntemleri	14
1.1.4.2.1. Biyoremediasyon	14
1.1.4.2.1.1. Biyosorpsiyon.....	15

1.1.4.2.1.2. Biyoakümülyasyon	17
1.1.4.2.1.3. Biyoliç.....	17
1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları	19
1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması	20
1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı	21
1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması	22
1.1.5.4. Ekstraselüler Alıkonma	23
1.1.5.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu.....	24
1.1.5.6. Metallerin Etki Ettiği Hüresel Komponentlerin Metal Hassasiyetinin Azaltılması	25
1.1.6. Çalışmanın Amacı	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	27
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	27
2.1.1.2. Nutrient Broth	27
2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri	28
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	29
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler	29
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	29
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)	29
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)	29
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit)	29
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50X TAE) Hazırlama	29
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar..	30
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	30

2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu	30
2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	30
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu.....	30
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	30
2.1.3.2.2.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu	31
2.1.3.2.2.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu	31
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol.....	31
2.1.3.2.2.9. %70'lik Etanol.....	31
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 Mm)	31
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1M)	31
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler.....	32
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄).....	32
2.1.3.2.4 .Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler.....	32
2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon.....	32
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon.....	32
2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	33
2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	34
2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)	35
2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)	35
2.1.3.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması	35
2.2. Yöntem	36
2.2.1. Çalışma Alanı	36
2.2.2. Örnekleri Toplanması	37
2.2.3. Alüminyum ve Baryuma Dirençli Bakterilerin Belirlenmesi	38
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerini Saptanması.....	38

2.2.5. Alüminyum ve Baryuma Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi	38
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması	39
2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği	39
2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	40
2.2.9. Plazmit DNA İzolasyonu	40
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu	41
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi	41
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması	42
2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi	42
2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmit Curing)	42
2.2.15. Total Protein İzolasyonu	42
2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu	43
2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi	43
2.2.18. SDS-PAGE Jellerin Hazırlanması	44
2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması	44
2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması	44
2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi	44
2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerin Boyanması	45
2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü	45
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
3.1. Alüminyum ve Baryum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi	46
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu	47
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri	48

3.3.1. Alüminyum Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri	48
3.3.2. Baryum Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> Suşlarının Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ..	50
3.4. Bakterilerin Üreme Eğrileri.....	54
3.4.1. Alüminyum Dirençli Bakterinin Üreme Eğrisi.....	54
3.4.2. Baryum Dirençli Bakterilerin Üreme Eğrisi.....	55
3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonu	56
3.5.1. Alüminyum Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu	56
3.5.2. Baryum Dirençli Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu.....	58
3.6. Bakterilerin Dış Membran Protein ve Total Protein Profili	60
3.6.1. Alüminyum Dirençli Suşun Total Protein Profili	60
3.6.2. Baryum Dirençli Suşların Dış Membran Protein ve Total Protein Profilleri.....	61
4. TARTIŞMA-SONUÇ	65
KAYNAKLAR	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin periyodik tabloda gösterimi.....	3
1.2. Metalin su ortamında izlediği yol	6
1.3. Biyoarıtımı etkileyen faktörler	15
1.4. Mikrobiyal metal direnç mekanizması.....	20
1.5. Ağır metal direncinde metal taşıyıcı sistemler.....	21
1.6. <i>Synechococcus</i> 'ta <i>smtA</i> ve <i>smtB</i> genleri ve Zn'yi bağlaması.....	23
1.7. Bakterilerdeki civa dirençliliği ve <i>mer</i> operonu.....	24
1.8. <i>E.coli</i> ' de arsenik dirençliliği	25
2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu.....	36
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun alüminyum içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	54
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun baryum içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	55
3.3. <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşunun baryum içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	56
3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu	57
3.5. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	57
3.6. <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu	58
3.7. <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....	59
3.8. Al dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun total protein profili	60

3.9. Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	61
3.10. Ba dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun total protein profili.....	62
3.11. Ba dirençli <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşunun total protein profili	63
3.12. Ba dirençli <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşunun dış membran protein profili.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ağır metallerin sağlık üzerindeki etkilerine göre gruplandırılması.....	2
1.2. İz elementler ve fonksiyonel rolleri	4
1.3. Bazı ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları	10
1.4. Geleneksel metal uzaklaştırma teknolojileri	13
1.5. Metal biyosorpsiyonunda kullanılan organizmalar	16
1.6. Geleneksel ve biyolojik metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	18
2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları	28
2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışı	33
2.3. SDS-PAGE çalışma solüsyonları	34
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	35
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	35
2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	37
3.1. Alüminyum ve baryum dirençli suşların bölgelere göre yayılımı	46
3.2. Alüminyum ve baryum dirençli suşlarının biyokimyasal özellikleri	47
3.3. Al dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili	49
3.4. Al dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	50
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşlarının çoklu metal dirençlilik profili.....	51
3.6. Ba dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> suşlarının antibiyotik dirençlilik profili.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Ba	Baryum
Be	Berilyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Se	Selenyum
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
AlCl ₃ .6H ₂ O	Alüminyum klorür hegzahidrat
BaCl ₂ .2H ₂ O	Baryum klorür dihidrat

KISALTMALAR DİZİNİ

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

1. GİRİŞ

Yoğun sanayileşme; organik, inorganik, ağır metal gibi güvenli bir şekilde üstesinden gelinmesi gereken tehlikeli atıklar oluşturur. Organik kontaminantları alifatik, alisiklik, aromatik ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pestisitler ve patlayıcılar oluştururken; inorganik kontaminantlara örnek olarak Ag, Al, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe, Ni, Pb, Sb, Se, Zn gibi metaller, radyoaktif elementler ve onların türevleri verilebilir [1].

Metaller ve bileşikleri yer kabuğunda değişik konsantrasyonlarda bulunurlar. İz metaller çevre kirlenmesi bakımından yüksek konsantrasyonlu metallere oranla çok daha tehlikelidirler. Tabii minerallerdeki metaller normal olarak çözünmeyen bileşikler halinde olup canlı organizmalara zararsızdırlar. Buna karşılık bunların çözünen türevleri, genellikle organizmalar için toksiktirler [1,2].

Ağır metaller genellikle metal kaplama endüstrisi, otomobil endüstrisi, elektriksel ve elektronik materyallerin üretilmesi ve kullanılması, boru, silah ve lastik endüstrilerinde kullanılır [3,4]. Diğer kirleticilerle karşılaştırıldığında metallerin daha önemli olması bu maddelerin sulu ortamda biyolojik olarak ayrışmamasından kaynaklanır [3]. Ağır metaller besin zincirine girerek canlı dokularda birikebilmektedir. Bu durum besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşmalarına neden olmaktadır [4].

İnsan sağlığı ve su ekosistemleri üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı metal iyonları çeşitli yöntemlerle su ve atık sulardan giderilmelidir [1]. Ağır metallerin sulu ortamlardan giderilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, aktif karbon ile adsorpsiyon, ters osmoz, filtrasyon ve membran teknolojileri şeklinde sıralanabilir [3]. Bu geleneksel tekniklerin; pahalı ekipman ve takip sistemleri gerektirmesi, fazla kimyasal ve enerji ihtiyacının olması, metallerin tam olarak giderilememesi gibi dezavantajları vardır [3,5]. Bu nedenle biyolojik arıtma yöntemleri önem kazanmaktadır [4].

1.1. Kaynak Özetleri

1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Ağır metaller atomik yoğunluğu 5 gr/cm^3 'ten fazla olan metaller olarak tanımlanırlar. Metaller, canlıların metabolik süreçlerinde önemli rol oynarlar [6]. Metaller bilinen elementlerin %75'ini oluştururlar ve biyosferde her yerde bulunabilirler. Sanayi, altyapı ve günlük yaşam içinde oldukça önemli bir yer teşkil ederler. Sanayi Devrimi'nden bu yana metallerin karasal ve sucul ortamda birikimi ile çevrede yeniden dağılımı, biyota ve insan sağlığına karşı olumsuz etkileri ile ilişkilendirilmiştir [7].

Ağır metaller sağlık üzerindeki etkilerine göre 4 temel gruba ayrılabilir (Çizelge 1.1) [8].

Çizelge 1.1. Ağır metallerin sağlık üzerindeki etkilerine göre gruplandırılması

Esansiyel metaller	Cu, Zn, Co, Cr, Mn ve Fe
Esansiyel olmayan metaller	Ba, Al, Li ve Zr
Toksitesisi az olan metaller	Sn ve Al
Toksitesisi çok olan metaller	Hg, Cd ve Cd.

Metaller belli konsantrasyonun üzerinde alındığında hücrenin metabolizmasına ve gelişmesine zarar verirse toksik olurlar. Tabiki tüm metaller yüksek konsantrasyonda alınırsa toksik etki gösterirler. Fakat bazılarının çok düşük miktarları bile çok zehirli ve hatta öldürücü olabilir. Ağır metaller normalde, kayaların ve maden cevherlerinin bünyesinde bulunduğu için, organizmalarda, sularda, sedimentlerde ve toprakta da bulunması doğaldır [9].

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

 Tüm canlılar için önemli ve gerekli	 Bazı canlılarda spesifik kullanım
 Tüm canlılar için önemli katyonlar	 Bazı canlılarda indirgeyici veya taşıyıcı
 Tüm canlılar için önemli anyonlar	 Bilinmeyen biyolojik fonksiyon
 Tüm canlılar için gerekli iz elementler	 Biyolojik olarak önemli geçiş elementleri

Şekil 1.1. Esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin periyodik tabloda gösterimi

[10]

Çevrede bulunan ağır metallerin çeşitli formları, mikrobiyal toplulukların yapısı ve fonksiyonları üzerinde önemli değişikliklere sebep olmaktadır [11]. Metaller, doğrudan ya da dolaylı olarak canlıların büyümesine, farklılaşmasına ve metabolizmasına etki etmektedir [12].

Bazı ağır metaller, organizmalar için gereklidir ve “iz elementler” olarak adlandırılırlar. Bunlar K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo vb. metallerdir. Çizelge 1.2.’de gösterildiği gibi bu metaller; redoks tepkimelerinde, enzimatik reaksiyonların katalizlenmesinde, osmotik dengenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. [6,12,13]. Esansiyel olan bazı metaller enzimler için kofaktör görevi görmektedir. Ancak bu metaller de yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedirler [11].

Çizelge 1.2. İz elementler ve fonksiyonel rolleri [7,14]

Element	Fonksiyonel rolü
Sodyum (Na)	Yük taşıyıcı, osmotik denge
Potasyum (K)	Yük taşıyıcı, osmotik denge
Magnezyum (Mg)	Hidrolaz ve izomeraz enzimlerinin yapısal komponentlerinde bulunur.
Kalsiyum (Ca)	Kalmodullin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin aktivatörüdür.
Vanadyum (V)	Oksidaz enziminin kofaktörüdür. Azot fiksasyonunda görev alır.
Mangan (Mn)	Bitkilerde, ATP ile enzim kompleksleri (fosfokinazlar ve fosfotransferazlar) arasında köprü oluşturmak, trikarboksilik asit döngüsünün dekarboksilaz ve dehidrogenaz enzimlerini etkinleştirmek gibi birçok biyokimyasal işlevleri vardır.
Demir (Fe)	Bakır ve kalsiyum gibi bazı minerallerin emilimi ve kanda oksijeni taşıyan kırmızı kan hücrelerinin ve çeşitli enzimlerin üretimi için gereklidir. Ayrıca, bağışıklık sistemini de güçlendirir.
Kobalt (Co)	Birçok enzimde B12 vitamininin metal komponenti olarak bulunur.
Nikel (Ni)	Hidrojenaz enzimlerinin kofaktörüdür.
Bakır (Cu)	Oksijen taşıma sistemlerinde kofaktör olarak görev alır ve elektron transfer proteini gibi görev yapar.
Çinko (Zn)	Karbonik anhidraz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin katalitik bileşenini oluşturur.

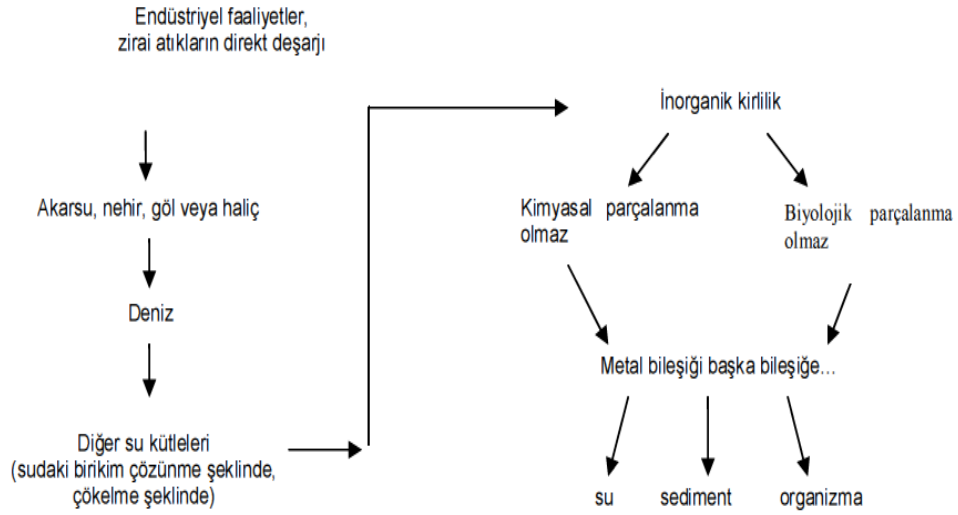
Diğer taraftan bazı ağır metallerin biyolojik rolleri bilinmemektedir. Bunlar ise Al, Ag, Cd, Sn, Au, Sr, Hg, Tl, Pb'dir [6,12].

Bununla birlikte canlıların yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan metallerde gereksiz olan metallerde yüksek konsantrasyonlarda canlılar üzerinde toksik etki yaratmaktadır [6,12]. Ağır metal iyonları yalnızca insan sağlığı üzerinde potansiyel bir tehlike oluşturmakla kalmayıp diğer yaşam formları için de tehlike yaratmaktadır. Ağır metal iyonları fiziksel rahatsızlıklara neden olabilir ve bazen yaşamı tehdit eden hastalıklara da yol açabilirler [6].

Hemen bütün organizmaların yüzeyi negatif yüklü olduğundan pozitif yüklü metal iyonlarını (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cr^{+3} , Cr^{+6} , Fe^{+2} , Fe^{+3} vs.) adsorbe etme yeteneğine sahiptirler. Bazı canlı organizmalar metal iyonlarını hücre içine alarak vakuollerde biriktirirler. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks yaparak adsorplanabilecekleri gibi bazı mikroorganizmalar hücrelerin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyerek çözültideki metal iyonlarını bağlayabilirler. Ayrıca hücre duvarındaki proteinler, iyonları bağlamak için fonksiyonel grupları ve peptid bağlarını da tercih edebilirler. Ağır metal iyonlarının mikroorganizma yüzeyine tutunması adsorpsiyon izotermi ile gösterilebilen tersinir bir taşınım olayıdır. Ayrıca, ağır metaller mikroorganizmaların gelişmelerini, morfolojilerini, biyokimyasal aktivitelerini etkileyerek biyokütlenin ve çeşitliliğin azalmasına da neden olmaktadır [6].

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metaller ve türevlerinin çevrede yaygın olarak bulunması endüstriyel faaliyetlerin doğal bir sonucudur. Ancak ağır metallerin canlı tarafından fark edilmeden dokularda biriktirilebilmesi ve metabolizmada bu ağır metallerin neden olabileceği toksik etkiler tartışılmaz bir gerçektir. Bu durum çevre ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir [15,16]. Ağır metaller sucül ortamların bileşiminde doğal olarak iz miktarda bulunur. Ancak endüstriyel atıklar, tarımsal atıklar, jeokimyasal yapı ve madencilik faaliyeti sonucunda bu oran artmaktadır [17].

Metal kirliliğinin çoğu sularda birikir. Sulardaki birikim, 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 ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenirler. Sucül ekosistemlerde ağır metal kirliliği; nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşmenin gelişmesi gibi nedenlerden ötürü evrensel bir sorun haline almaktadır [2,18]. Metal kirlenmesi, organik kirlenmeler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmaz, bir metal bileşiği başka bir metal bileşiğine dönüşür. Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi dönüşme ne olursa olsun metal iyonu kaybolmaz [2].



Şekil 1.2. Metalin su ortamında izlediği yol [2]

1.1.1.1. Alüminyumun Fonksiyonları

Alüminyum, dünya yüzeyinde % 8.3 bulunma yoğunluğu ile oksijen (% 45.5) ve silisyumdan (% 25.7) sonra en çok bulunan üçüncü elementtir [19]. Toprakta ve dolayısıyla suda, magnezyum, demir, çinko gibi metallere daha çok bulunabilmesine rağmen, fizyolojik fonksiyonelliği açısından dünyada yaşayan organizmalar için biyolojik olarak gerekli metaller içinde bulunmamaktadır [20]. Doğada bol ve toksik formlarda bulunmasına rağmen organizmalara neden belli formlarının etki ettiği yönünde soruların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Alüminyumun dünyada en bol bulunan element olan silisyum ile kolaylıkla reaksiyona girerek alüminyumsilikat oluşturması ve oksijenle reaksiyona girerek boksit oluşturabilmesi sadece bazı çözünebilir formlarının toksik etkide olmasını sağlamaktadır. İşte bu nedenle de alüminyumun biyolojik olarak bulunabilirliği azalmaktadır. Örneğin, insanda bulunabilecek alüminyumun kaynağı, alınan alüminyum katkılı ilaçlar, suya veya yiyeceklere karışmış alüminyumdur. Toprağın veya suyun pH'sının düşmesi, alüminyumunu daha çözünebilir ve biyolojik olarak bulunabilir duruma sokmaktadır [19].

1.1.1.2. Baryumun Fonksiyonları

Baryum, yaklaşık olarak yer kabuğunun yüzde 0.05'ini meydana getirir. Aktifliği nedeniyle elementel halde bulunmaz. En çok viterit ($BaCO_3$) ve barit ($BaSO_4$) minerallerinde bulunur. Bu iki önemli mineralden başka tabiatta fosfatlı ve silikatlı bileşiklerine de rastlanır. Ancak bunlar o kadar önemli değildir. Baryum çok aktif bir element olduğundan, bileşiklerinin oluşumundaki serbest enerji (dışarı verilen ısı) çok yüksektir. Bileşikler oluşurken büyük miktarda ısı çıkışı olur. Baryum; su, oksijen, azot, hidrojen, amonyak, halojen ve kükürt ile reaksiyon verir. Ayrıca magnezyum, kurşun, platin, silisyum, kalay, çinko, alüminyum ve civa ile malgama oluşturur. Sonuç olarak, baryumun, hava veya diğer oksitleyici gazların mevcut olduğu ortamda tutulması, şiddetli reaksiyona neden olması sebebiyle, tehlikelidir. Bu sebeple toz baryum, kuru hava, argon ve helyum gibi inert gaz atmosferinde depo edilir. Yüksek aktifliği sebebiyle baryum toksik kabul edilir [21].

1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Endüstriyel aktiviteler sonucunda ortaya çıkan ve doğaya bırakılan ağır metallerin miktarı her geçen gün artmaktadır. Bu metaller, zehirli olmaları, doğada belirsiz bir süre boyunca bozunmadan kalmaları, besin zinciri boyunca dolaşmaları ve birikmeleri nedeniyle çevre ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. İnsan vücudu metalleri işleyemez ve kullanamaz. Bunun sonucu olarak metaller çeşitli organlarda birikir [22]. Metallerin zehirli etkileri her metalin özelliğine göre değişmektedir. Ancak genel olarak metallerin hepsi birden fazla organ ve sistemi etkilemektedir. Zehirli ağır metaller; sınırlara ve kemiklere zarar vermekte, vital enzim gruplarının fonksiyonlarını bloke etmekte ve kansere neden olmaktadır [23]. Bununla birlikte ağır metaller böbreklerin işlevini yitirmesine, beyin, karaciğer ve merkezi sinir sisteminin zarar görmesine de neden olmaktadır [24]. Ağır metallerin zehirli karakterleri şu şekilde görülmektedir:

- 1) Zehirlilik, doğada uzun bir süre devam edebilir.
- 2) Bazı ağır metaller, buldukları bazı ortamlarda düşük zehirli formlardan daha yüksek zehirli formlara dönüşebilirler.
- 3) Metaller yalnızca farklı türlere dönüşebilirler, ancak biyoişlemler dahil hiçbir yöntemle bozunamazlar.
- 4) Ağır metallerin besin zinciri tarafından biyoakümüasyonu normal fizyolojik aktiviteye zarar verebilir ve sonunda insan yaşamını tehlikeye sokabilir [24].

Ağır metaller insan faaliyetlerinin yoğun olduğu alanlarda önemli çevre kirleticileri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunların sulardaki derişimlerinin belirli bir seviyenin üzerinde olması canlıların yaşamını sınırlamaktadır [25]. Ağır metal kirliliği bugün en önemli çevre sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır [26].

1.1.2.1. Alüminyumun Çevresel Etkileri

Alüminyumlu bileşiklerin çözünebilir formlara dönüşmesinden dolayı alüminyumun doğal olarak bulunduğu topraklarda toprak asitliği düşmekte ve bu da özellikle tahıl üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Dünya tarım alanlarının yaklaşık % 40'lık bir kısmını asidik topraklar oluşturmaktadır. Düşük su tutma kapasitesi, toprak kabuklanması ve erozyon gibi fiziksel etkiler asidik toprakların zaten düşük olan üretkenliğini daha da kötüleştirir [27]. Alüminyum toksikliği toprağın kireçlenmesiyle iyileştirilebilir. Bu işlem toprağın pH'sını artırır ve alüminyumun çözünemeyen formlara dönüştürülmesini sağlar. Ancak bu işlemler, oldukça pahalıdır ve toprağın gerçek pH değerinde kalmasını sağlamaz. Bu nedenle, gelişmiş ülkeler alüminyuma dirençli bitkilerin kullanımı üzerine durmaktadırlar. Bazık, nötral veya hafif asidik topraklarda bitkiler için zararlı etki oluşturmamasına rağmen, pH'nın 4.5'ten düşük olduğu durumlarda çözünebilir toksik formlar oluşturmaktadır [19,28,29]. Alüminyum bulunduğu ortamlarda, sülfat, florür ve fosfatlarla kompleks bileşikler oluşturur. Bu formlar arasında Al toksikliği ile ilgili olan form inorganik monomerik alüminyumdur. Bu nedenle total Al yerine inorganik monomerik alüminyum miktarının bilinmesi, Al toksikliğinin belirlenmesinde iyi bir

indikatördür. pH 4.0'ın altındaki solüsyonlarda Al-tolerans mikroorganizmalar ancak asit-tolerans bakteriler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Alüminyumun toksik etkisi sadece bitkiler için değil, aynı zamanda bakteriler için de geçerlidir. Mikroorganizmaların bünyesinde veya yaşadıkları ortamda fazla miktarda bulunması durumunda ortamdaki alüminyum iyonları, DNA ve proteinlerle bağ yaparak fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra, hücrede aktif rol oynayan Fe^{+2} , Fe^{+3} ve Ca^{+2} gibi iyonları da inhibe etmektedir [30]. Örneğin, alüminyum, canlılık faaliyetleri için gerekli olan ATP'ye, hidrolizi için mutlaka gerekli olan magnezyum iyonlarından 10^7 kat daha fazla bağlanmakta ve böylece kullanımını engelleyerek mikroorganizmaların büyümesini durdurmaktadır [19]. Bunların dışında Al^{+3} iyonları, hücrenin yapıtaşları olan nükleik asit, protein ve polisakkaritlerdeki oksijen atomlarının da en önemli bağlayıcısıdır [31]. Bakteriler bu tür toksik etkilere karşı, hücre içi metal konsantrasyonlarını belli sınırlar içerisinde tutmak zorundadırlar.

1.1.2.2. Baryumun Çevresel Etkileri

Baryumun sağlık üzerine etkileri suda çözünebilirliği ile ilişkilidir. Suda çözünen baryum bileşiği insan sağlığı için zararlı olabilmektedir. Suda çözünen baryumun çok yüksek miktarlarda alınması felce ve hatta ölümlere bile neden olabilmektedir. Az miktarda alınması, nefes alıp vermede zorluğa, kan basıncının artmasına, kalp ritmi değişikliklerine, mide tahrişine, kas güçsüzlüğüne, sinir reflekslerinde değişikliklere, beyinde ve karaciğerde şişkinliğe, böbrek ve kalp rahatsızlıklarına neden olabilmektedir [32].

1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları

Metal kirliliği içeren atık suların kaynağı; başlıca maden işletmeleri (kurşun, demir, çinko, krom, bakır, gümüş, altın ve uranyum eldesine yönelik süreçler sonucunda), metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom, vb.) ve diğer metal kaplama,

kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileridir [24].

Toksik metaller boya sanayi, otomobil ve ilaç sanayi gibi endüstriyel aktiviteler ve fosil yakıt tüketimi ile yer değiştirmektedir. Sonuçta besin zinciri yoluyla birikmekte, ciddi ekolojik problemler ve sağlık problemlerine temel oluşturmaktadır [33].

Çizelge 1.3. Bazı ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları [13,34-36]

Endüstri Dalı	Al	Ba	Cd	Co	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	Zn
Alaşımalar	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Boya Sanayi	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Cam Sanayi	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Elektrik-Elektronik	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Gübre ve Tarım İlaçları	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
İnşaat Sanayi	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Kimya Sanayi	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Lastik Sanayi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Metalürji	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Otomotiv Sanayi	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Pil Üretimi	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Silah Sanayi	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

(+), pozitif; (-), negatif

1.1.3.1. Alüminyumun Kullanım Alanları

Alüminyum, elektriksel iletkenliğinin iyi olması, hafifliği, korozyon direnci gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Alüminyumun kullanım alanları alaşımlar, elektrik-elektronik, gübre ve tarım ilaçları, inşaat sanayi, kimya sanayi, otomotiv sanayi, silah sanayi ve metalürji şeklinde sıralanabilir [37].

1.1.3.2. Baryumun Kullanım Alanları

Bujilerde, havai fişeklerde, vakum tüplerinde ve floresan lambalarda kullanılır. Baryum sülfat ve çinko sülfat içeren bir pigment olan ‘litopon’, iyi bir kaplayıcı maddedir ve sülfidlerin varlığında kararır. Baryum sülfat, kalıcı beyaz özelliğiyle X-ışını incelemelerinde, boyaların içeriğinde ve cam yapımında kullanılır. Barit, ağırlık kazandırıcı unsur olarak petrol kuyularını açmakta kullanılan sıvıların içeriğinde ve kauçuk yapımında, baryum karbonat fare zehiri olarak, baryum nitrat ve klorat ise piroteknide (fişekçilik) yeşil rengin eldesinde kullanılır [38].

1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

Ağır metaller ile toprak ve suyun kirlenmesi hem insan sağlığı açısından hemde toprak ve su ekosistemi açısından ciddi bir problem oluşturmaktadır. Kirlenmiş toprak, atıksu ve endüstriyel atıklardan ağır metallerin uzaklaştırılması zordur. Çünkü ağır metaller biyobozunmaya uğramazlar. Filtrasyon, asit liçi, elektrokimyasal işlemler ya da iyon değişimi gibi konvansiyonel fizikokimyasal teknikler pahalıdır ve çok etkili olmayabilirler. Biyoremediasyon ise mikroorganizmalar, bitkiler ya da diğer biyolojik sistemlere dayalı düşük maliyetli, çevre dostu metal uzaklaştırma metodudur [39].

1.1.4.1. Geleneksel Uzaklaştırma Yöntemleri

Ağır metaller; insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalar için önemli toksisiteye sahiptir [40,41]. Bu nedenle yüzey ve yeraltı suları aracılığıyla bu kirleticilerin yayılmasını önlemek esastır. Son yıllarda bu atıkların ortadan kaldırılmasında fiziksel, kimyasal ya da biyolojik işlemler tek halde ya da birleştirilmiş olarak kullanılmaktadır [41].

Çevreden ağır metal uzaklaştırmak için kullanılan geleneksel metodların yeni çevresel sorunlar yarattığı, yetersiz ve pahalı olduğu bilinmektedir. Atık sulardan

ağır metal uzaklaştırmak için kullanılan indirgeme, çöktürme, oksidasyon, filtrasyon, iyon değiştirme, buharlaştırma, ters osmos gibi fiziksel ve kimyasal metodlar genellikle yüksek işletme masrafları gerektirmeleri ve oluşan katı atık çamurlarının zor işlenir olmasından dolayı ticari olarak pratik değildir. Çok miktarda kimyasal gereksinimi ve önceden öngörülemeyen metal giderimi bu teknikler için söz konusu olan bazı dezavantajlardır. Ayrıca, desorpsiyon için güçlü ve kontamine olmuş kimyasalların kullanımı, oluşan toksik çamurların depolanacağı özel bölgelerin gerekmesi, ikincil çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu dezavantajlar özellikle kompleks yapıcı organik madde ve düşük metal kontaminasyonu içeren büyük hacimli endüstriyel atık suların işlenmesi sırasında daha belirgin olmakta ve proses maliyetini arttırmaktadır. Ayrıca seyreltik çözeltilerden (1-100 mg/L) ağır metallerin uzaklaştırılması açısından da yeni metodların geliştirilmesi önemlidir. Biyoteknolojik yaklaşımlar bu gibi sorunları çözmek için, 1980'lerden sonra ortaya çıkmıştır [42]. Bu yüzden ağır metallerle kirlenen ortamların temizliğinde bakteri, alg, maya gibi canlıların kullanılmasına olan ilgi artış göstermektedir.

Ayrıca diğer geleneksel yöntemlerin etkisiz kaldığı, seyreltik çözeltilerden metal uzaklaştırılması açısından da yeni metodların geliştirilmesi önemlidir. Bu gibi sorunların halledilmesi için biyolojik yöntemlerin kullanılması söz konusu olmuştur [42].

Çizelge 1.4. Geleneksel metal uzaklaştırma teknolojileri [43]

Metod	Dezavantaj	Avantaj
Kimyasal çöktürme ve filtrasyon	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek konsantrasyon için zor ayrılma• Etkin değil• Atık çamur oluşması	<ul style="list-style-type: none">• Basit• Ucuz
Kimyasal oksidasyon ve indirgenme	<ul style="list-style-type: none">• Yaygın olmayan kimyasallar gerektirmesi• Ortam hassasiyeti	<ul style="list-style-type: none">• İnaktivasyon
Elektro kimyasal yöntemler	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek konsantrasyon için zor ayrılma• Etkin değil• Pahalı	<ul style="list-style-type: none">• Metali geri elde etme
Ters osmos	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek basınç• Membran boyutu önemli• Pahalı	<ul style="list-style-type: none">• Saf atık (geri dönüşüm için)
İyon değişimi	<ul style="list-style-type: none">• Partiküllere hassas olması• Reçinelerin pahalı olması	<ul style="list-style-type: none">• Verimli• Saf atık metalin geri dönüşümünün mümkün olması
Adsorpsiyon	<ul style="list-style-type: none">• Tüm metaller için uygulanamaması	<ul style="list-style-type: none">• Geleneksel sorbentler (karbon)
Buharlaştırma	<ul style="list-style-type: none">• Fazla enerji• Pahalı• Atık çamur oluşturması	<ul style="list-style-type: none">• Saf atık (geri dönüşüm için)

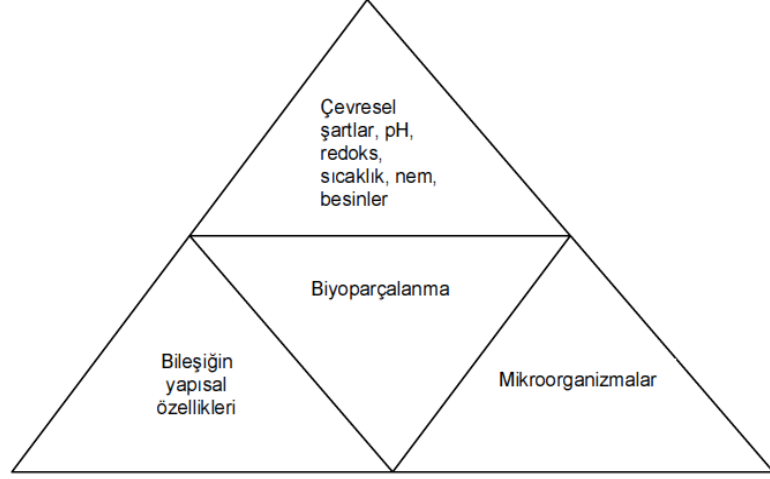
1.1.4.2. Biyolojik Uzaklaştırma Yöntemleri

1.1.4.2.1. Biyoremediasyon

Mikroorganizmalar her yerde bulunabilen ve toksik bileşenleri yararlı hale getirmek ya da parçalamak adına olağanüstü metabolik sistemlere sahip canlılardır [1]. Bu canlılarda, toksik maddelerin aerobik ya da anaerobik yollarla parçalanmasını sağlayan enzimler görev alır [1]. Yaşam başladığından beri yaklaşık 4 milyar yıldır toksik ağır metaller dünya üzerinde fazla miktarda bulunur ve sonuçta bakteriler de bu metallere maruz kalmışlardır [44].

Biyoremediasyon, kirleticilerin daha az toksik forma dönüştürülmesinde ya da yok edilmesinde canlı sistemlerin kullanıldığı bir tekniktir [45].

Mikroorganizmalar çevrede bulunan toksik ağır metallere karşı çeşitli direnç mekanizmalarına sahiptirler. En yaygın ağır metal direnç mekanizması aktif transport ile hücreden metal iyonlarının çıkarılmasıdır ama metal bağlayıcı faktörler ve enzimatik dönüşümler (oksidasyon, redüksiyon, metilasyon ve dimetilasyon) toksik metallere karşı ikinci bir savunma sistemi olarak rol oynarlar [46]. Bu mekanizmalar plazmit üzerinde kodlanmış olabilmektedir ve böylece direnç genini bir hücreden diğer hücreye aktarmak mümkün olabilmektedir. Dirençli mikroorganizmaların bu yeteneği, kirli sulardan toksik metalleri uzaklaştırmak amacıyla biyoremediasyonda kullanılabilir [47].



Şekil 1.3. Biyoarıtımı etkileyen faktörler

Ağır metale dirençli bakteriler atıksu arıtma işleminde önemli role sahiptir. Ağır metal atıkları bu mikroorganizmalar tarafından biyosorpsiyon, biyoakümülyasyon ve biyoliç gibi işlemlerle giderilebilir [48].

1.1.4.2.1.1. Biyosorpsiyon

Biyosorpsiyon metodu endüstriyel atıksulardan, toksik metallerin gideriminde ya da çok değerli metallerin kazanımında geleneksel metodlara karşı verimli ve ekonomik bir alternatif oluşturur [1]. 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 [26]. Biyosorpsiyon işleminde ölü ya da canlı olarak kullanılan mikroorganizmaların dış yüzeylerine ligandlarla ya da fonksiyonel gruplarla metal iyonlarının adsorbe olması sağlanır [1]. *Rhizobium radiobacter*'in salgıladığı ekstrasellüler polimerik maddelerin biyosorbent olarak kullanıldığı ve Cu ve Mn iyonlarının sulu ortamlardan giderildiği çalışma da biyosorpsiyona örnek olarak verilebilir [49]. Güçlü metal biyosorbentlerini genellikle

Bacillus, *Pseudomonas*, *Enterobacter* ve *Streptomyces* sınıfına ait bakteriler oluşturmaktadır [50].

Çizelge 1.5. Metal biyosorpsiyonunda kullanılan organizmalar [26,51]

Organizma	Metal biyosorpsiyon çeşidi
Bakteri Türleri <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter sp.</i> <i>Arthrobacter sp.</i>	Kadmiyum/ nikel/ uranium
Fungus Türleri <i>Neurospora .crassa</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Penicillium spinulosum</i> <i>Aspergillus niger</i>	Nikel/ kadmiyum/ bakır/ uranyum
Alg Türleri <i>Chlorella homosphaera</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Scenedesmus carinatus</i> <i>Sargassum natans</i>	Çinko/ kurşun/ kobalt Kadmiyum/ altın
Bitki Türleri <i>Azolla pinnata</i> <i>Eichharnia crassipes</i> <i>Lycopersican esculentum</i> <i>Nicotiana tobaccum</i>	Kurşun/ çinko kadmiyum/ civa

1.1.4.2.1.2. Biyoakümülyasyon

Biyoakümülyasyon, canlı hücreler tarafından metalin hücre dışında biriktirilmesi olarak tanımlanır. Bu işlemine aktif biyosorpsiyon da denilebilmektedir. Biyoakümülyasyon, düşük sıcaklık ve enerji kaynaklarının eksikliği gibi metabolik inhibitörler tarafından inhibe edilebilir yani hücre metabolizmasına bağlı bir olaydır [52].

1.1.4.2.1.3. Biyoliç

Biyoliç metodunda ekstrem ekosistemlerde (çok asidik pH ya da yüksek oranda metal konsantrasyonu içeren solüsyonlar gibi) çoğalabilen ve mineral sülfidlerin 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 [1].

Çizelge 1.6. Geleneksel ve biyolojik metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları [7,53]

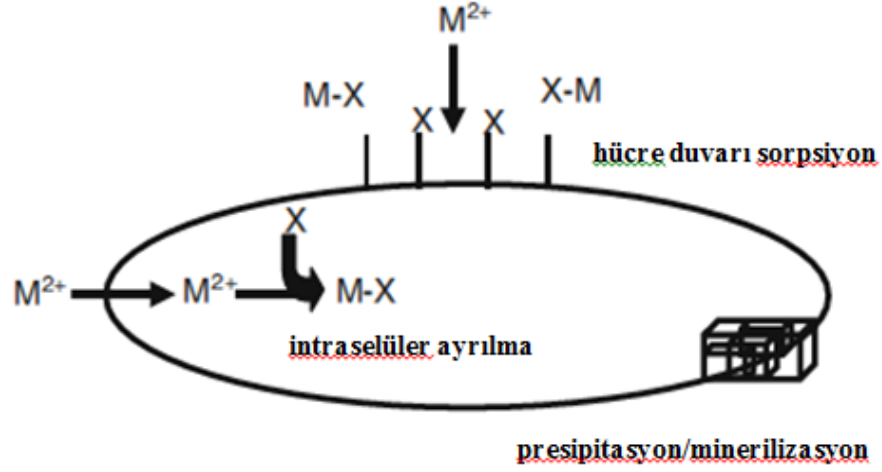
	DEZAVANTAJLARI	AVANTAJLARI
Geleneksel Uzaklaştırma Yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"> • Çok pahalı olmaları • Tamamen uzaklaştırma yapamamaları • Düşük seçici olmaları • Uygulamada fazla enerji harcamaları • Pahalı ekipmana gereksinim duymaları • Ağır metal kirliliğinin yüksek konsantrasyonda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

1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları

Metaller, mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedenleriyle toksiktir. Önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi yaparlar. Çevrede bulunan çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara sebep olabilirler. Uzun süre ağır metallere maruz kalan bakterilerde bu ağır metallere karşı çeşitli dirençlilik mekanizmaları gelişmiştir. Mikrobiyal metal dirençliliği mekanizmaları arasında metallerin fosfat, karbonat ve sülfat olarak presipitasyonları, etil veya metil gruplarının eklenmesi ile metallerin buharlaşması, enerji gerektiren metal sistemleri ve düşük moleküler ağırlıklı sisteince zengin proteinler ile intraselüler müdahale, membrandaki elektronegatif bileşenler ve ekzopolimerler tarafından fiziksel çıkarılma sayılabilir [33].

Metallere karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayat başladıktan hemen sonra gelişmeye başlamıştır. Çünkü bakterilerin geliştiği ortamlarda metaller her zaman var olmuşlardır. Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Bunun nedeni her iki tip dirençte de organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmesidir. Plazmitlerin metal dirençlilik ve antibiyotik genlerini taşıdığı bilinmektedir. Bazı durumlarda, antibiyotik dirençliliği ile metal dirençliliği aynı plazmit kökenli olabilmektedir [11,54].

Çinko ve bakır gibi bazı metallerin eser konsantrasyonları gelişme için gerekli olsa da tüm ağır metallerin yüksek konsantrasyonları bakteriler için toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle, ağır metal varlığında hayatta kalmak amacıyla, bakteriler ağır metal detoksifikasyon mekanizmalarına sahip olmalıdırlar [44]. Şekil 1.4.'te bazı mikrobiyal direnç mekanizmaları gösterilmektedir.



Şekil 1.4. Mikrobiyal metal direnç mekanizmaları. M, metal; X, metal bağlayıcı molekül [55]

Ağır metal direnci için bilinen altı mekanizma vardır [13,54]:

- 1) Geçirgenlik bariyeri ile metallerin dışarıda tutulması,
- 2) Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu (Efflux),
- 3) Metallerin proteine bağlanması yolu ile hücre içinde alıkonması,
- 4) Ekstraselüler alıkonma,
- 5) Metallerin daha az toksik formlara dönüştürüldüğü enzimatik detoksifikasyon,
- 6) Metallerin etki ettiği hücresel komponentlerin metal hassasiyetinin azaltılması

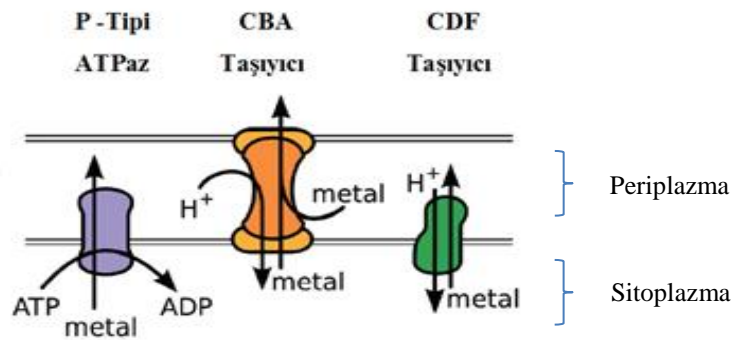
1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

Hücre zarında ya da hücre duvarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Bu sayede metale karşı duyarlı hücresel komponentler korunmuş olur. Buna örnek olarak *Escherichia coli*'deki Cu^{+2} dirençliliği verilebilir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi değiştirilerek Cu^{+2} 'nin hücreye girişi engellenir [56]. Bu tek bir gen

mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir [57]. Diğer bir örnek, dış membran veya zar tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruması sağlamaktadır. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kaplayan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak, metallerin hücre içine girişini engellemektedir. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir [54].

1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı

Aktif transport mekanizması, mikroorganizmaların toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için kullandıkları mekanizmalardan biridir. Bu direnç mekanizması metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olanıdır [58]. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmit kökenli olabilir [57]. Esansiyel olmayan metaller hücreye besin transport sistemleri ile alınırlar, ancak hücre içerisinde tutulmazlar ve hemen dışarıya atılırlar. Şekil 1.5.'te gösterildiği gibi hücre dışına iyonların aktarılmasında görevli olan iyon pompaları, membrana yerleşmiş durumda bulunan adenozin trifosfatazlar (ATPaz'lar) olarak bilinirler [20]. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı ya da ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir. Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} gibi zehirli iyonlara karşı toleransta veya dirençlilikte yine ATPaz'ların rol aldığını görülmektedir [20].



Şekil 1.5. Ağır metal direncinde metal taşıyıcı sistemler [59]

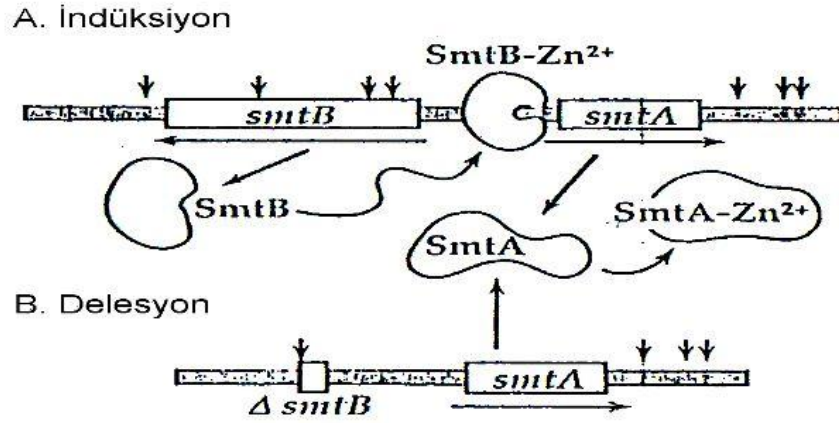
1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması

Metal bağlayan proteinlere metallothiyonin denir. Metallothiyoninler (MT), küçük molekül ağırlıklı, asidik pH'da metal bağlama yetenekleri artabilen, enzimatik olmayan, hücre içi metal bağlayıcı proteinlerdir [60]. Bu proteinlerin yasamsal rolü Cd, Hg gibi toksik metallerle, Cu ve Zn gibi iz elementleri bağlamasıdır. Çinkodan yoksun beslenmelerde, toksik metal alımında, enfeksiyonlarda, yangıda, stres durumlarında ve toksik oksijen radikalleri Cu ve Zn gibi iz element homeostazisi ile Cd, Hg gibi ağır metallerin detoksifikasyonunda MT'lerin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir [60,61].

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücrenel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle Cu^{+2} , Zn^{+2} metalleri alıkonmaktadır.

Synechococcus PCC 7942 bakterisinin Cd^{+2} dirençli suşu, artan Cd^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak *smtA* geninin kopya sayısının arttırarak hem Cd^{+2} 'ye hem de diğer divalent katyonlara bağlanma yeteneğindeki bir prokaryotik metallothiyonin kodlanmaktadır [20].

Synechococcus denizlerde yaşayan bir *Cyanobacteria*'dir. Şekil 1.6.'da gösterildiği gibi bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır. Bunlardan *SmtA*, Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'ye bağlanan bir metallothiyonini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *SmtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothiyoninin üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [54].



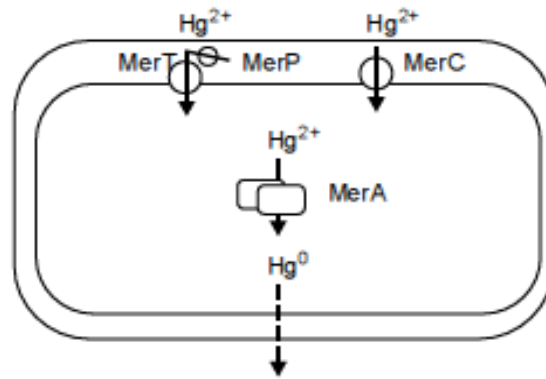
Şekil 1.6. *Synechococcus* 'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve Zn'yi bağlaması [54]

1.1.5.4. Ekstraselüler Alınma

Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur [62]. *Saccharomyces cerevisiae*'deki Ni^{+2} dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni^{+2} absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metalce zengin besi ortamlarına ekstraselüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu^{+2} dirençli mantarlarda görülmektedir. Bu funguslar metal-okzalit formunda okzalit bileşiklerini salgılamaktadırlar. Mayalar gibi diğer organizmalar ve *Citrobacter sp.* türleri kalsiyum fosfatın çözünmez bileşik formlarına direnç göstermektedirler. Maya formları hidrojen sülfid üretimi boyunca çeşitli kompleksler kullanırken *Citrobacter sp.* fosfat kullanmaktadır. *K. aerogenes*'in bir türü sülfür çıkararak sınırlı miktardaki metali içeri alırken, yakınında dış çöktürme aracılığı ile Cd^{+2} iyonlarını etrafını çevreleyen ortamdaki kaldırma yeteneğini göstermektedir [54].

1.1.5.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu

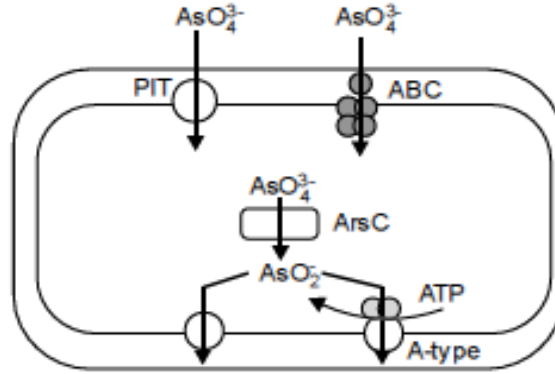
Mikroorganizmalarda enzimatik detoksifikasyonun en iyi örneği civa dirençliliğidir. Civa dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik Hg^{+2} formundan elementel ve daha az reaktif Hg^0 formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde Hg^{+2} 'ye karşı dirençlilik gösterilmiştir (Şekil 1.7) [63]. Civa hücrede enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan tiollere bağlanarak inaktive olmaları nedeni ile toksik etkiye sahiptir. Bazı bakterilerde Hg^{+2} dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı *mer* operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg^{+2} 'nin detoksifikasyonundan değil aynı zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [54,63]. Civanın bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları transkripsiyon düzenlenmesini azaltmaktadırlar. Bu genler bir periplazmik bağlayıcı proteinin üretimini ve membran bağlantılı taşıma proteinlerini de şifrelemektedirler. Detoksifikasyon için etrafını çevreleyen ortamdan periplazmik bağlayıcı proteinler ve taşıma proteinleri aracılığı ile Hg^{+2} 'yi sitoplazmaya taşımaktadırlar.



Şekil 1.7. Bakterilerdeki civa dirençliliği ve *mer* operonu [64]

Plazmitler aracılığı ile As^{+5} 'in direncini içeren başka enzimatik detoksifikasyon sistemleri *B.subtilis*, *S. aureus* ve *E. coli*'de görülmektedir [56]. *Ars* operonunda bulunan *ArsC* geni arsenat redüktazı kodlamaktadır. Bu enzim As^{+3} 'ten daha zehirli olan intrasellüler As^{+5} 'i indirgemektedir. As^{+3} *Ars* operonundaki diğer genlerde

bulunan kodlanmış bir akış pompası aracılığı ile kaldırılır (Şekil 1.8). Bu enzim arsenatı indirgemedi kendi üzerinde bir bağlama proteinine ihtiyaç duymaktadır. Bu bağlama proteinleri ise mikroorganizmalarda farklılık göstermektedir. Örneğin: *S. aureus*'ta tiyoredoksin, *E. coli*'de glutaredoksin kullanılmaktadır [54].



Şekil 1.8. . *E.coli*' de arsenik dirençliliği [64]

1.1.5.6. Metallerin Etki Ettiği Hücresel Komponentlerin Metal Hassasiyetinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücresel komponentlerin metale karşı olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır [57]. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltarak ya da metalin inaktive edilmesinde kullanılan belli bazı hücresel komponentlerin üretimini arttırarak gerçekleştirmektedir. DNA tamir mekanizmaları plazmit ve genomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Ayrıca mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Bu şekilde adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd^{+2} 'ye maruz kaldığında önemli DNA hasarları oluştuğu rapor edilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde Cd^{+2} 'ye karşı direnç görülmüştür. Cd^{+2} 'ye maruz bırakılan organizmaların logaritmik artış fazının kısaldığı bildirilmiştir. DNA tamir mekanizmalarının, lag fazının

uzatılmasında görev aldığı düşünülmektedir. Doğal direnç, toleransın belli bir seviyede kalmasına izin veren normal hücresel işlevlerden meydana gelebilmektedir [54,57]. Glutasyon organizmanın, Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Hg^{+2} gibi metallere karşı korunmasına yardım etmektedir. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak Cu^{+2} ve Fe^{+2} 'den korunmayı sağlayabilmektedir [57]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde bulunan dirençlilik yetenekleri farklılık göstermektedir [57]. Cd^{+2} '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^{+2} 'nin konsantrasyonlarınının 5-30 katına kadar dirençlilik göstermektedir. Gram pozitif organizmaların *E.coli* ile karşılaştırıldıklarında 28-30 kez daha fazla Cu^{+2} bağlayabildikleri tespit edilmiştir [54].

1.1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan alüminyum (Al) ve baryum (Ba) ağır metallerine dirençli suşların izolasyonu ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Al ve Ba metallerine dirençli suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiş ve MİK değeri en yüksek olan suşlar, ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Suşlar morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Al ve Ba dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların çoklu antibiyotik ve metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmalarını belirlemek amacıyla total protein, dış membran proteini ve plazmit DNA izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkileri kurulmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar

İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Nutrient agar besiyeri; pepton (5 g), et özütü (5 g), maya özütü (1 g) ve agar (12 g)'dan oluşmaktadır.

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 Atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.2. Nutrient Broth

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi, plazmit izolasyonu, protein izolasyonu gibi deneyler için kullanılmıştır. Nutrient broth besiyeri; pepton (5 g), et özütü (3 g)'dan oluşmaktadır.

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 Atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Al ve Ba dirençli suşlar için Çizelge 2.1’de gösterilen antibiyotikler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Konsantrasyon (µg/disk)
Amikacin (AK)	30
Amoxycillin/CA (AMC)	20/10
Ampicilin (AM)	10
Aztreonam (ATM)	30
Bacitracin (B)	10
Cefepime (FEP)	5
Ceftazidime (CAZ)	30
Ciprofloxacin (CIP)/	5
Chloramphenicol (C)	30
Gentamicin (CN)	10
Erythromycin (E)	15
Imipenem (IPM)	10
Netilcimin (NET)	30
Oxacillin (OX)	1
Pefloxacin (PEF)	5
Penicillin (P)	10
Piperacilin (PRL)	100
Piperacilin/Tazobactam (TPZ)	100/10
Rifampin (RA)	5
Sulbactam/CFP (CES)	75/30
Tetracycline (TE)	30
Ticarcillin (TIC)	75
Ticarcillin/CA (TIM)	75/10
Trimeth-sulfa (SXT)	25
Tobramycin (TOB)	10
Vancomycin (VA)	30

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)

0.990 g glukoz, 0.394 g Tris, 0.372 g EDTA tartılarak 100 mL su ile (pH:8.0) tamamlanmıştır.

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 steril su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

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

74 g K-asetat tartılmıştır ve 28.75 mL glasiyal asetik asit ile çözülmüştür. Solüsyonun son hacmi 250 mL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50X TAE) Hazırlanması

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL)

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılıp 250 mL steril suyla (pH:8.0) tamamlanmıştır.

2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 mL)

10 g SDS tartılarak 100 mL steril 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 μL , 1 M Tris-HCl (pH:8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır. 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 steril su ile çözülmüştür.

2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL)

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

2.1.3.2.2.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

96 mL kloroform, 4 mL izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

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 tampon hazırlanmıştır.

2.1.3.2.2.8.İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.3.2.2.9. %70'lik Etanol (100 mL)

30 mL steril su, 70 mL %100'lük etanol ile karıştırılarak kullanılmıştır.

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

8.47 g Tris-HCl tartılarak 50 mL steril suda çözülmüştür ve pH:8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır.

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

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

2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH₂PO₄, K₂HPO₄)

6.8 g KH₂PO₄ ve 8.7 g K₂HPO₄ tartılıp 1000'er mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranda karıştırılarak pH:7.0'ye ayarlanmıştır.

2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon (10 mM Tris-HCl, pH: 8.0)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülmüştür ve HCl ile pH:8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon

1.75 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülmüştür ve 1.67 mL Triton X-100 eklenerek HCl ile pH:7.6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışı

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24.2 g 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 g Tris tartılır, 50 mL distile suda çözülür, derişik HCl ile pH:6.8'e ayarlanıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
SDS (%10)	10 g SDS tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Gliserol (%50)	50 mL %100'lük gliserol tartılıp 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 g akrilamid ve 0.8 g 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'luk SDS 4 mL, distile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	1 M Tris-HCl (pH:6.8) 50 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 46 mL. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 mL)	0.5 g amonyum persülfat tartılarak distile su ile 5 mL'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 µM) 3 g, glisin (192 mM) 14.4 g tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH:8.3
Örnek Tamponu (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. Ayrıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)

Çizelge 2.4. Ayrıcı jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	7.8 mL
Solüsyon B (Stok)	6 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 mL
Distile su	4.67 mL
Amonyum persülfat	27 µL
TEMED	6.6 µL

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 çözülmüştür.

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 [65]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m³/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18,4 m³/sn ve en çok 1.673 m³/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.1). Nehir üzerinde 12 önemli baraj vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [66].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu [65]

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 illerimizden biridir. Kırıkkale

ilinde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır. [67].

2.2.2. Örnekleri 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

Bölge No	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı Girişi	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-Kıyıbağı 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	Irmak Mevkii-Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25"K, 33° 25' 04,24"D, 699,5 m

2.2.3. Alüminyum ve Baryuma Dirençli Suşların Belirlenmesi

Al ve Ba ağır metallerine dirençli bakterilerin seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Al ve Ba ağır metallerine dirençli suşları seçmek için literatürde belirlenen konsantrasyonlarda ayrı ayrı $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ağır metalleri içeren nutrient agar (NA) ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlarda her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir. $37^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Al ve Ba dirençli koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması

Al ve Ba dirençli saf kültürler $37^\circ C$ '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 100 büyütme objektifle) incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

2.2.5. Alüminyum ve Baryuma Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Al ve Ba ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ eklenerek saptanmıştır. $37^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petrillerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyonlardaki ayrı ayrı Al ve Ba metalleri bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saat sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

Kırıkkale-Kızılırmak'tan Al ve Ba 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 [68,69].

2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği

Kızılırmak' tan izole edilen suşların Al ve Ba ağır metallerine dirençli her bir suşun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallere dirençlilikleri de tespit edilmiştir. Böylece suşların çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

Al dirençli suşun, çoklu metal dirençlilik profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Cd, Ba, Li, Cr, Mn, Pb, Co, Fe, Cu, Sn, Ni, Zn, Hg, Sb, Sr ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme görülen suşların ortama ekilen metale karşı dirençli, üreme görülmeyenlerin ise o metale karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ba dirençli suşlarda ise Al dirençli sušta kullanılan metod uygulanmıştır.

Al dirençli suşun antibiyotik dirençlilik profilini belirlemek için Al içermeyen NA besiyeri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerine Çizelge 2.1'de belirtilen antibiyotik diskleri uygulanmış 37°C 48 saat inkübe edilmiştir. Disk etrafında zon görülmesi o antibiyotiğe duyarlı olduğu, zon görülmemesi durumunda dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ba dirençli suşlarda ise Al dirençli sušta kullanılan metod uygulanmıştır.

2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

MİK değerleri belirlenen Al ve Ba metallere bulduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Al ve Ba metallere bulduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Kültürler 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve 0.saatten itibaren, OD₆₀₀ nm'de, her iki saate bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

2.2.9. Plazmit DNA İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [70]. Plazmiti izole edilecek bakterilerin, 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda AlCl₃.6H₂O ve BaCl₂.2H₂O metallere bulduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilen kültürlerden 1.5 mL alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1.5 mL kültür konularak işlem tekrarlanmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µL GTE (glukoz/ tris/ EDTA) ilave edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200 µL, 0.2 N NaOH/ %1 SDS solüsyonun üzerine ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 150 µL, 3 M potasyum asetat ilave edilmiştir ve karıştırılarak 5 dakika bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen solüsyonun üst kısmı toplama tüpüne alınarak pellet kısmı atılmıştır. %100'lük etanolden 900 µL tüplere konulmuş ve -20°C'de 1 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 atılmış ve pellet üzerine 20 µL su ve 5 µL boya ilave edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzole edilen Al ve Ba dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [71] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 15 mL'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 5.7 mL TE tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz 55 karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Kloroform/izoamil alkol solüsyonu ekleyerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenmiş ve tekrar 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 santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmış ve pellet kurutularak 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi

%1,5'lük jel hazırlamak için, 1.5 g agaroz 100 mL 10x TAE tamponu ile çözüldükten sonra ısıtılarak eritilmiştir. Çözelti yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulup, jel küvetine dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmıştır. 20-25 µL'lik miktarlarda DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet ile örnek kuyucuklarına yüklenmiştir. Separe edilen plazmitlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacı ile jeldeki kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA (Sigma Lambda DNA Hind III ready to use solution) yüklenmiştir. Jel, yürütme tankına yerleştirilmiştir. Yürütme tankına jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu konulmuştur. 100 V/cm² voltaj uygulanarak 1.5 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır. Separasyon zamanını sonlandırmak için, yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin jelde katettiği mesafe bize yol gösterir.

2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıca jel, yürütme tankından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromid boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası jeli 1 mM MgSO₄ solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Daha sonra jel, U.V. transillüminatör üzerine konularak fotoğrafları çekilmiştir [72].

2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA Hind III marker referans alınarak, her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlıkları ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen DNA bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmit Curing)

İzole edilen Al dirençli ve Ba dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen Ba dirençli suş için yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılmıştır [73].

2.2.15. Total Protein İzolasyonu

Al ve Ba metallerine dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [74] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda AlCl₃.6H₂O ve BaCl₂.2H₂O metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 5 mL steril su eklenerek 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Pelletler üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz tüplere transfer edilmiştir. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu

Dış membran proteinleri Achtman ve arkadaşları [75] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Dış membran proteinleri izole edilecek bakterilerin, 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Kültürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 10 mL, 10 mM Tris-HCl tamponu pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 3000 rpm'de, 20 dakika, 4°C'de santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Süpernatant temiz tüplere alınarak 20.000 rpm, 60 dakika, 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µL steril su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örnekler 200 µl Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de, 90 dakika, 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pelletler üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Dış membran ve total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Protein Weight Marker MW-SDS-70 referans alınarak, 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.

2.2.18. SDS-PAGE Jellerin Hazırlanması

Dış membran ve total protein anaizlerinde Laemli'ye göre %4'lük dengeleyici jel ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır [76].

2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması

16.7 mL Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk), 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1,5 M Tris- HCl (pH 8.6), 500 mL %10'luk APS (amonyum persülfat), 500 mL %10'luk SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 mL TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve jel polimerize olması için bekletilmiştir.

2.2.18.2. 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 iyice 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.

2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile 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.

2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitleme çözeltisi içerisinde bir 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 [77]. Jellerin fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar, jel görüntüleme cihazı (Corestream Molecular Imaging Software Standart Edition) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. 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 [78].

3.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Alüminyum ve Baryum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden Al ve Ba dirençli suşlar izole edilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi Al’ye dirençli 8 suş ve Ba’ya dirençli 11 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. Al için MİK değeri 300 mg/L olan suş 11. bölgeden izole edilmiş ve Al11 olarak kodlanmıştır. Ba için ise en yüksek MİK değeri 2700 mg/L olan iki suş 1 ve 11. bölgelerden izole edilmiş ve sırasıyla Ba01 ve Ba11 olarak kodlanmışlardır.

Çizelge 3.1. Alüminyum ve baryum dirençli suşların bölgelere göre yayılımı

İzolasyon Bölgesi												
Ağır Metaller	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AlCl ₃ .6H ₂ O	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BaCl ₂ .2H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

(-), negatif; (+), pozitif

3.2.Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2.'de Al ve Ba dirençli suşların moleküler ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek tanımlaması yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Al ve Ba dirençli suşlarının biyokimyasal özellikler

	Al Dirençli Şuş	Ba Dirençli Suşlar	
Biyokimyasal Testler	Al11	Ba01	Ba11
Şekil	Kok	Kok	Kok
Gram Reaksiyon	(+)	(+)	(-)
Akışkanlık	Mukoid	Mukoid	Mukoid
Optik Özellikler	Opak	Opak	Opak
Pigment	Turuncu	Turuncu	Sarımtırak
DP300 (DP3)	-	+	-
Ure (URE)	+	+	-
İnositol (INO)	-	-	-
Arabinoz (ARA)	-	-	-
Sitrat (CIT)	-	-	-
Mannitol (MAN)	+	+	-
Glukoz (GLU)	+	+	+
Malonat (MAL)	-	-	-
Ksiloz (XYL)	-	-	-
Arjinin (ARG)	-	-	-
Asetamin (ACE)	-	-	-
Rafinoz (RAF)	-	-	-
Hidrojen sulfur (H ₂ S)	+	+	-
Eskülin (ESC)	-	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-
Ornitin (ORN)	+	+	+
Laktöz % 10 (LAC)	+	+	+
Sükroz (SUC)	+	+	-
Ramnoz (RHA)	-	-	-
Oksidaz (OXI)	-	-	-
Tanımlanan Türler	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>

(-), negatif; (+), pozitif

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi Al dirençli Al01 kodlu suş Gram pozitif kok olan *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir. Ba dirençli Ba01 kodlu olan suş yine Gram pozitif kok olan *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir. Ba dirençli Ba11 kodlu olan suşun ise Gram negatif kok olan *Stenotrophomonas rhizophila* olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Al’ye ve Ba’ya dirençli. *S. aureus*’un laktoz, sükroz, glukoz ve mannitol pozitif olduğu belirlenmiştir. *S. rhizophila* ’nın ise glukoz, ornitin ve laktoz pozitif olduğu belirlenmiştir.

3.3. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

İzole edilen alüminyum dirençli suş *Staphylococcus aureus* ile baryum dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

3.3.1. Alüminyum Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Çizelge 3.3’te gösterildiği gibi Pb, Ag, Sn, Li ve Ba gibi metallere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hg, Mn, Zn, Fe, Cu, Sb, Cd, Ni, Cr, Sr ve Co metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

Kullanılan Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili
		<i>Staphylococcus aureus</i>
Hg(NO ₃) ₂ H ₂ O	195	S
Pb(NO ₃) ₂	1200	R
MnSO ₄	1000	S
ZnSO ₄ 7H ₂ O	825	S
FeCl ₃	450	S
CuSO ₄ 5H ₂ O	450	S
K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆	1400	S
AgNO ₃	8	R
Cd(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	S
SnCl ₂ 2H ₂ O	160	R
LiCl	5000	R
NiSO ₄ 7H ₂ O	395	S
BaCl ₂ 2H ₂ O	2700	R
CrN ₃ O ₉	1050	S
Sr(NO ₃) ₂	2000	S
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	S

R, dirençli; S, duyarlı

Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Çizelge 3.4’te gösterildiği gibi amikacin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacın, imipenem, netilcimin, pefloxacın, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin ve ticarcillin/CA gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik
Amikacin (30)	R
Amoxycillin/CA (20/10)	S
Ampicilin (10)	S
Aztreonam (30)	R
Bacitracin (10)	S
Cefepime (5)	R
Ceftazidime (30)	R
Ciprofloxacin (5)	R
Chloramphenicol (30)	S
Gentamicin (10)	S
Erythromycin (15)	S
Imipenem (10)	R
Netilcimin (30)	R
Oxacillin (1)	S
Pefloxacin (5)	R
Penicillin (10)	S
Piperacilin (100)	R
Piperacilin/Tazobactam (100/10)	R
Rifampin (5)	S
Sulbactam/CFP (75/30)	S
Tetracycline (30)	S
Ticarcillin (75)	R
Ticarcillin/CA (75/10)	R
Trimeth-sulfa (25)	S
Tobramycin (10)	S
Vancomycin (30)	S

R, dirençli; S, duyarlı

3.3.2. Baryum Dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* Suşlarının Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Ba dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Çizelge 3.5’te gösterildiği gibi Li, Cr, Sr ve Ag metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hg, Pb, Mn, Zn, Fe, Cu,

Sb, Cd, Sn, Al, Co, ve Ni metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun ise çizelge 3.5’de gösterildiği gibi Pb, Ag, Sn, Li, Al, Sr ve Ni metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hg, Mn, Zn, Fe, Cu, Sb, Cd, Co ve Cr metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Ba dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının çoklu metal dirençlilik profili

Kullanılan Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
Hg(NO ₃) ₂ H ₂ O	195	S	S
Pb(NO ₃) ₂	1200	S	R
MnSO ₄	1000	S	S
ZnSO ₄ 7H ₂ O	825	S	S
FeCl ₃	450	S	S
CuSO ₄ 5H ₂ O	450	S	S
K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆	1400	S	S
AgNO ₃	8	R	R
Cd(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	S	S
SnCl ₂ 2H ₂ O	160	S	R
LiCl	5000	R	R
AlCl ₃ 6H ₂ O	300	S	R
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	S	S
CrN ₃ O ₉	1050	R	S
Sr(NO ₃) ₂	2000	R	R
NiSO ₄ 7H ₂ O	395	S	R

R, dirençli; S, duyarlı

Ba dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi aztreonam, ceftazidime, gentamicin, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun ise Çizelge 3.6'de gösterildiği gibi ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacın, gentamicin, erythromycin, imipenem, netilcimin, oxacillin, pefloxacın, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin, ticarcillin/CA, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. Ba dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının antibiyotik dirençlilik profili

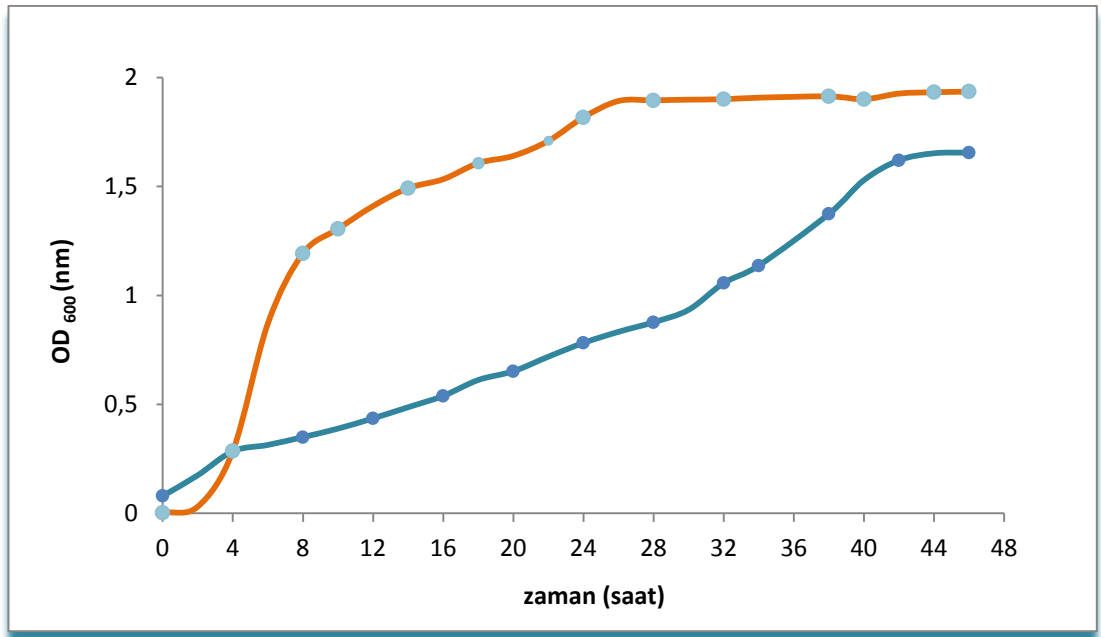
Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
Amikacin (30)	S	S
Amoxycillin/CA (20/10)	S	S
Ampicilin (10)	S	R
Aztreonam (30)	R	R
Bacitracin (10)	S	S
Cefepime (5)	S	R
Ceftazidime (30)	R	R
Ciprofloxacin (5)	S	R
Chloramphenicol (30)	S	S
Gentamicin (10)	R	R
Erythromycin (15)	S	R
Imipenem (10)	S	R
Netilcimin (30)	S	R
Oxacillin (1)	S	R
Pefloxacin (5)	S	R
Penicillin (10)	S	R
Piperacilin (100)	S	R
Piperacilin/Tazobactam (100/10)	S	R
Rifampin (5)	S	S
Sulbactam/CFP (75/30)	S	S
Tetracycline (30)	S	S
Ticarcillin (75)	S	R
Ticarcillin/CA (75/10)	S	R
Trimeth-sulfa (25)	R	R
Tobramycin (10)	R	R
Vancomycin (30)	S	S

R, dirençli; S, duyarlı

3.4. Bakterilerin Üreme Eğrileri

3.4.1. Alüminyum Dirençli Bakterinin Üreme Eğrisi

Alüminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun üreme eğrisi Şekil 3.1' de verilmiştir. *S.aureus* suşunun Al içeren ortamda yaklaşık 4. saatten sonra logaritmik artış fazına geçtiği görülmektedir. Bununla beraber metal içeren ortamda OD'nin az olmasına rağmen yaklaşık 36 saatlik bir logaritmik faz tespit edilmiştir.

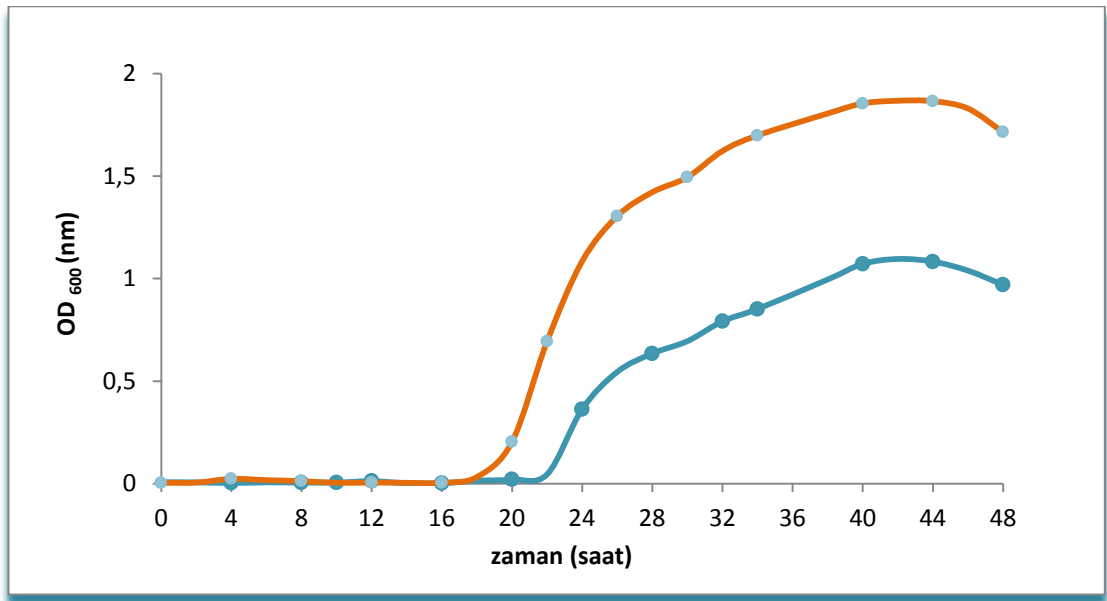


Şekil 3.1. Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun (—●—) Al içermeyen ortam ve (—●—) Al içeren ortamdaki üreme eğrisi

3.4.2. Baryum Dirençli Bakterilerin Üreme Eğrisi

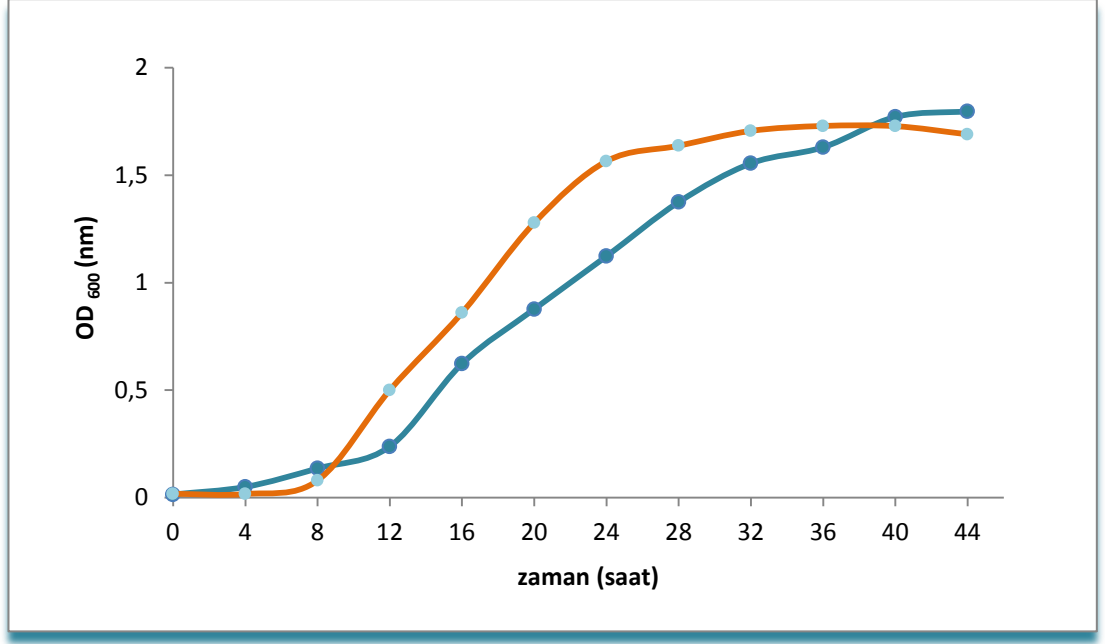
Baryum dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının üreme eğrileri Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Ba dirençli *S.aureus* suşunun (Şekil 3.2) metal içeren ve metal içermeyen her iki ortamda da gecikme fazının uzun olduğu görülmektedir. Ancak Ba içeren ortamda OD’de %50’den fazla azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Ba dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun (—) Ba içermeyen ortam ve (—) Ba içeren ortamdaki üreme eğrisi

Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun ise baryum içeren 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 3.3).



Şekil 3.3. Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun (—●—) Ba içermeyen ortam ve (—●—) baryum içeren ortamdaki üreme eğrisi

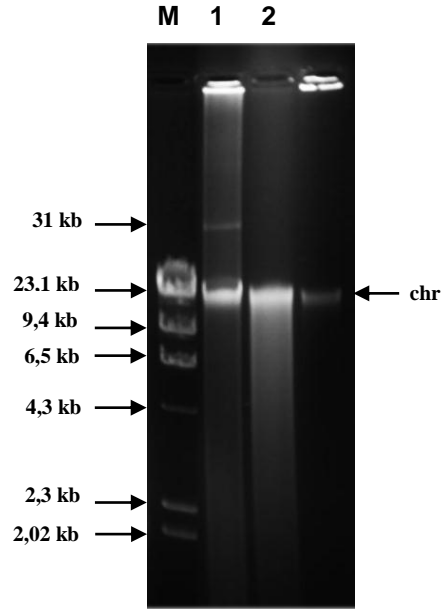
3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Alüminyum ve baryum 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.

3.5.1. Alüminyum Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

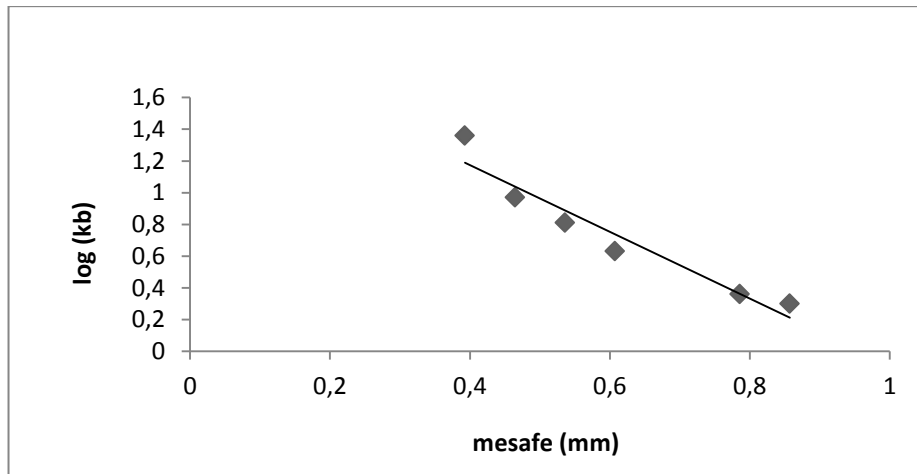
Alüminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Her bir jel için ayrı ayrı elde edilen ve Şekil 3.5'te bir örneği gösterilen standart eğri ile moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit DNA'ların moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Şekil 3.4'te gösterildiği gibi alüminyum içermeyen ortamda 31 kb büyüklüğünde bir plazmit DNA tespit

edilmiştir. Alüminyum içeren ortamda ise herhangi bir plazmit varlığı gösterilememiştir.



Şekil 3.4. *Staphylococcus aureus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

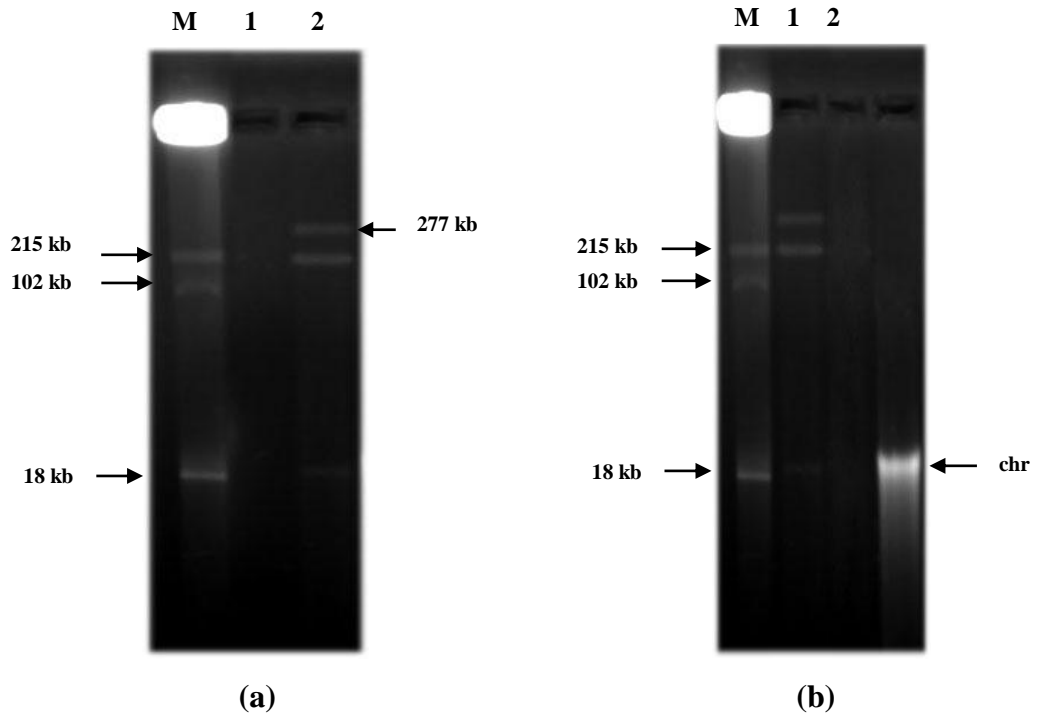
M, marker (Lambda Hind III); 1, alüminyum içermeyen ortam;
2, alüminyum içeren ortam; chr, kromozomal DNA



Şekil 3.5. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.5.2. Baryum Dirençli Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

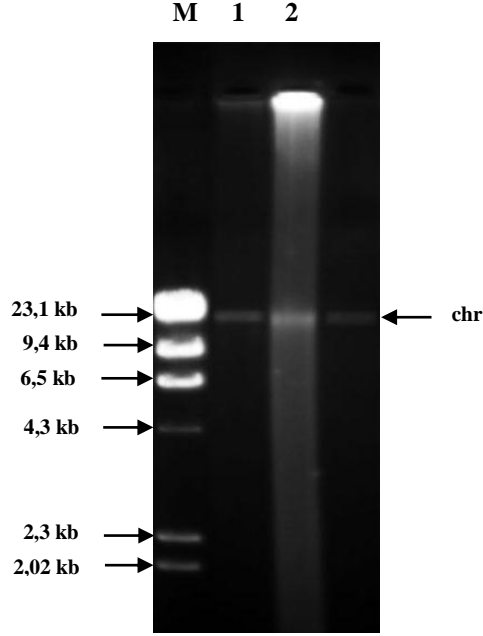
Baryum dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Baryum dirençli *Staphylococcus aureus*'da baryum içeren ortamda 277 ve 215 kb büyüklüğünde 2 adet mega plazmit belirlenmiştir. Buna karşılık metal içermeyen ortamda herhangi bir plazmit varlığı görülmemiştir. Plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında *Staphylococcus aureus* suşunun tüm plazmitleri elimine edilmiş, metal ve antibiyotik dirençlilik profillerinde ise bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda metal ve antibiyotik direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.6. *Staphylococcus aureus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

- (a) 1, baryum içermeyen; 2, baryum içeren ortam,
(b) 1, plazmit DNA eliminasyonu öncesi, 2, plazmit DNA eliminasyon sonrası,
chr, kromozomal DNA, M, Marker (*Agrobacterium tumefaciens* 215,102 ve 18 kb)

Şekil 3.7’de gösterildiği gibi baryum dirençli *Stenotrophomonas rhizophila*’da ise baryum içeren ve içermeyen her iki ortamda da plazmit varlığı tespit edilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda metal ve antibiyotik direnç genlerinin bu suş için de kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

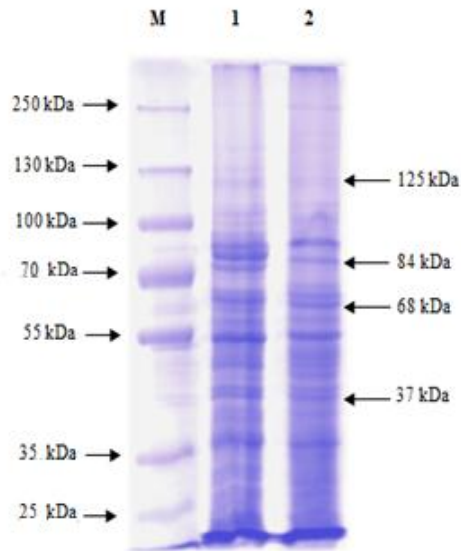
M, marker (Lambda Hind III), 1, baryum içermeyen;, 2, baryum içeren ortam, chr, kromozomal DNA

3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili

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

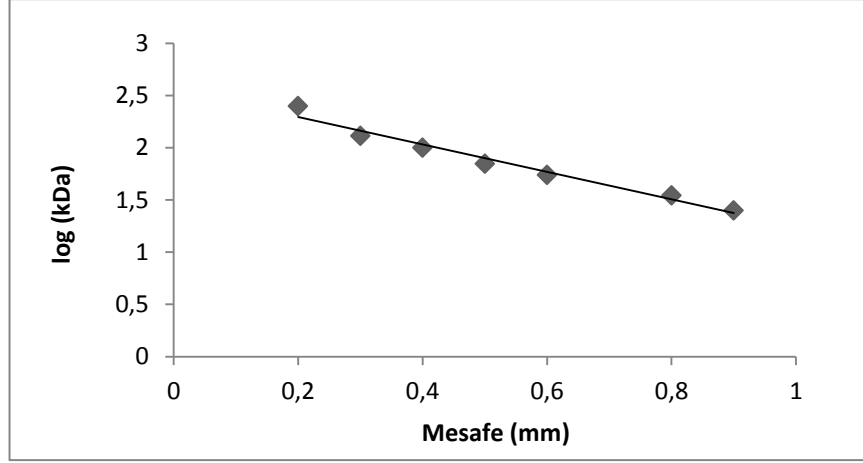
3.6.1. Alüminyum Dirençli Suşun Total Protein Profili

Alüminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun total protein profili belirlenmiştir ve Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Şekil 3.9’da bir örneği gösterilen ve her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein analizleri sonucunda *Staphylococcus aureus* suşunun alüminyum içeren ortamda 125, 84, 68, 55 ve 37 kDa büyüklüğündeki protein bantlarının ekspresyonlarında sırasıyla 1.7, 2.3, 1.5 ve 3.0 kat azalma tespit edilmiştir. Diğer proteinlerin ekspresyonlarında ise herhangi bir değişiklik belirlenememiştir.



Şekil 3.8. Al dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun total protein profili

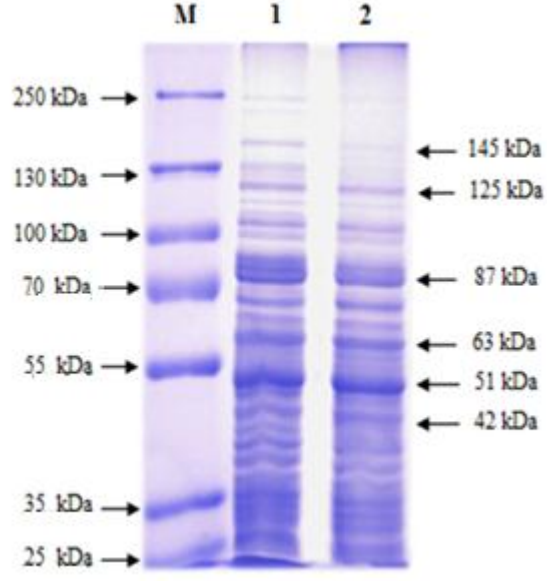
M, marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); 1, Al içermeyen;
2, Al içeren ortam



Şekil 3.9. Total protein ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

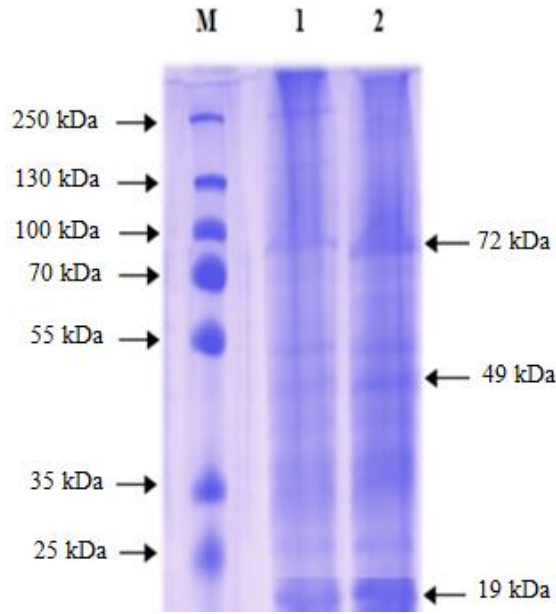
3.6.2. Baryum Dirençli Suşların Dış Membran ve Total Protein Profilleri

Baryum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun total protein profili belirlenmiştir ve şekil 3.10’da gösterilmiştir. Şekil 3.9’ da bir örneği gösterilen ve her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein analizi sonucunda *Staphylococcus aureus* suşunun baryum içeren ortamda 130 kDa’luk bandın metal içeren ortamda eksprese olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 250,145, 125, 87, 63, 51 ve 42 kDa’luk bantların ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir.



Şekil 3.10. Ba dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun total protein profili
M, marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); 1, Ba içermeyen; 2, Ba içeren ortam

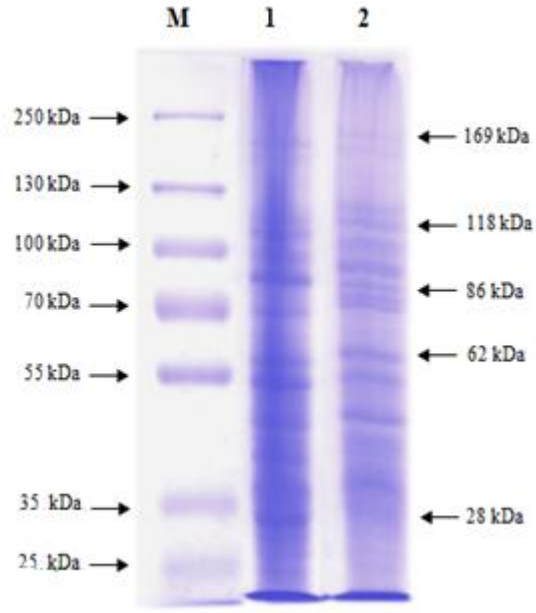
Baryum dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun ise total protein ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir ve Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Total protein analizi sonucunda *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun baryum içeren ortamda 72 ve 19 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonlarının 5’er kat arttığı tespit edilmiştir. Bu suşun dış membran protein analizi sonucunda ise bantların ekspresyonunda herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir.



Şekil 3.11. Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun total protein profili

M, marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); 1, Ba içermeyen;

2, Ba içeren ortam



Şekil 3.12. Ba dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun dış membran protein profili

M, marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); 1, Ba içermeyen;

2, Ba içeren ortam

4) TARTIŞMA-SONUÇ

Kırıkkale-Kızılırmak'tan MİK değeri 300 mg/L (1.24 mM) olan alüminyuma dirençli bir suş izole edilmiş ve bu suşun biyokimyasal özellikleri esas alınarak *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca MİK değeri 2700 mg/L (11.05 mM) olan baryuma dirençli iki ayrı suş daha izole edilmiş ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak sırasıyla, *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* olarak tanımlanmışlardır.

Spain ve arkadaşlarının [79], *E.coli* ile yaptıkları çalışmada bu suşun MİK değerlerini; civa için 0.01 mM, gümüş için 0.02 mM, kadmiyum için 0.05 mM, kobalt için 1 mM, nikel için 1mM, krom için 10 mM, antimon için 5 mM ve alüminyum için 2 mM olarak belirlemişlerdir.

Konishi ve arkadaşları [80], asidik çay tarlalarından izole ettikleri mikroorganizmanın yüksek alüminyum konsantrasyonu ve düşük pH'de üreyebildiğini tespit etmişlerdir. İzole edilen bu mikroorganizma *Flavobacterium sp.* olarak tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmanın 2000 mg/L alüminyum konsantrasyonuna kadar alüminyumu tolere ettiğini rapor etmişlerdir.

Kawai ve arkadaşları [29], çay tarlalarından asit ve alüminyum dirençli mikroorganizmalar izole etmişlerdir. İzole edilen strainler *Penicillium sp.*, *Penicillium janthinellum Biourge* ve *Trichoderma asperellum* olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerin alüminyumu 100-200 mM'a kadar tolere ettikleri tespit etmişlerdir.

Jackson ve arkadaşlarının [81], yaptığı bir çalışmada Plankenburg nehriindeki metal konsantrasyonlarını Al için 11.56 mg/L, Ni için 0.17 mg/L, Fe için 12.2 mg/L olduğunu tespit etmişlerdir. Olası metal dayanıklılığına sahip mikroorganizmalar *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Delftia tsuruhatensis A90*, *Kocuria kristinae 6J-5b*, *Comamonas testosteroni WDL7*, *Stenotrophomonas maltophilia 776*, *Staphylococcus sp. MOLA:313*, *Micrococcus sp. TPR14*, *Sphingomonas sp. 8b-1* ve *Microbacterium sp. PAO-12.* olarak tanımlamışlardır. Lemire ve arkadaşları [82],

yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas fluorescens*'in Al ile mücadelede ve bu kirleticinin dekontaminasyonunda yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada *P. fluorescens*'in Al'yi 0.05 mM'den 50 mM konsantrasyona kadar tolere etme yeteneğinin olduğunu göstermişlerdir. Ken-ichiro ve arkadaşları [83] *Panicum repens* denilen bir su otundan alüminyum dayanıklı bakteri straini AL46^T'yi izole etmişlerdir. 16 S rRNA sekans analizine göre strain AL46^T'in, tür bazında *Acidocella facilis* ve *Acidocella aminolytica*'ya yakın olduğunu belirtmişlerdir. Beriş [20], yapmış olduğu çalışmada *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin 100 mM alüminyum direncine sahip olduğunu göstermiştir. Sivolodskii [84], yaptığı çalışmada sentetik besin ortamı kullanarak *Pseudomonas* suşlarının baryum iyonlarına karşı duyarlılığını saptamıştır. Bakterilerin baryum iyonlarına karşı duyarlılığını belirlemek için baryum klorürü dilue edilerek besiyerine uygulamıştır. Bu çalışmada baryum için MİK değeri 0.5-6 g/L olarak belirtilmiştir.

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 bağısladığı bir savunma aracı gibi

düşünebiliriz. Duyarlı bir bakteri bu genetik elementleri ancak bir genetik olayla kazanabilmektedir.

Çalışmamızda, alüminyum dirençli ve baryum dirençli bakterilerin diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profilleri incelenmiş ve alüminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun çoklu metal dirençlilik profiline bakıldığında Li, Ba, Pb, Ag, Sn metallerine ve ayrıca amikacin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloksacin, imipenem, netilmicin, pefloksacin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin ve ticarcillin/CA gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Saxena ve arkadaşları [85], izole ettikleri *Pseudomonas putida S4* suşunun alüminyum, bakır, çinko, nikel ve kobalt gibi ağır metallere karşı direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu bakterinin 1 mM Al, 1 mM Cu, 1 mM Ni, 1 mM Co ve 2 mM Zn varlığında üreyebildiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, baryum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun ise Li, Cr, Ag, Sr metallerine ve aztreonam, ceftazidime, gentamicin, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmişken, baryum dirençli diğer bir şus olan *Stenotrophomonas rhizophila'nın* Al, Li, Pb, Ag, Sn, Ni ve Sr metallerine ve ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloksacin, gentamicin, erythromycin, imipenem, netilmicin, oxacillin, pefloksacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin, ticarcillin/CA, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Uğur ve Ceylan [86], klinik örneklerden izole ettikleri *Staphylococcus* türlerinin kobalt başta olmak üzere kurşun ve krom gibi birden fazla metale karşı direnç gösterdiklerini ve ayrıca bu izolatların penisiline de dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Altalhi [87], yaptığı çalışmada bakteri popülasyonlarının *Vitis vinifera L* (asma) bitkisi ile ilişkisini kurmaya çalışmıştır. Bu çalışmada değişik bölgelerden topladığı bitkilerin yaprak ve sap örneklerinden toplam 111 bakteri izole etmiştir. İzole edilen

bu bakterileri *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Methylococcus*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Acetobacter* ve *Streptomyces* olmak üzere 14 cins altında toplamıştır. Tüm izolatların plazmiti, DNA içeriği, antibiyotik ve ağır metal dirençliliğini çalışmıştır. Bu izolatların MİK değerlerini Cu ve Cd için 50 µg/mL, Hg için 10 µg/mL, Mn, Ni ve Zn için ise 200 µg/mL olarak belirlemiştir. Ayrıca izolatların %57'sinin ampisilin, %53'ünün kanamisin ve %26'sının tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu rapor etmiştir.

Özer [88], yapmış olduğu çalışmada gümüş dirençli ve stronsiyum dirençli bakterilerin diğer ağır metallere karşı dirençlilik profillerini incelemiş ve gümüş dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*'ya göre daha fazla ağır metale ve antibiyotiğe direnç gösterdiğini tespit etmiştir. *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine ve aztreonam, pefloxacin, ticarcillin ve ticarcillin/CA antibiyotiklerine ortak direnç gösterdiklerini saptanmıştır. Stronsiyum dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profiline bakıldığında *Sphingomonas paucimobilis*'in metal dirençliliğinin *Pseudomonas fluorescens*'e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik profili incelendiğinde ise, *Pseudomonas fluorescens*'in daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği görülmüştür. *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının Al, Li, Ba, Ni metallerine ve aztreonam, pefloxacin, tobramycin ve gentamicin antibiyotiklerine ortak direnç gösterdiklerini saptamıştır.

Aktan [89], 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 [90], Kızılırmak'tan izole ettiği Cu dirençli *P. putida'nun* 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 [91], 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 [92], Mn ve Zn dirençli bakterilerin çoklu-metal ve antibiyotik dirençliliklerini incelemiştir. Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının Al, Li, Ba, Pb, Fe, Ag, Cu, Sn, Ni, Zn, Sb, Sr metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit etmiştir. Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun ise Mn, Ag, Cu, Sn, Li, Al, Ba, Sr ve Ni metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirtmiştir. Mn dirençli bakterilerden *Serratia marcescens*'in ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam antibiyotiklerine, *Acinetobacter 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.

Ağır metal dirençliliği ile ilgili genlerin plazmit DNA üzerinde mi yoksa kromozomal DNA üzerinde mi olduğunu belirlemek amacıyla alüminyum dirençli suş ile baryum dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir.

Yapılan deneylerde, *Staphylococcus aureus*'un alüminyum içermeyen ortamda 31 kb ağırlığında plazmit bulundurduğu, ancak alüminyum içeren ortamda ise herhangi bir plazmit bulundurmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu suşun alüminyum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde kodlanmış olduğu belirlenmiştir.

Beriş [20], *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisi ile yaptığı çalışmada alüminyum dirençlilik geninin, “pHK281” olarak adlandırılan plazmitte bulunduğunu tespit etmiştir. Bu bulgu bizim bulgumuzdan farklılık göstermektedir. Diğer taraftan Wood [93], *Pseudomonas fluorescens* ve *Rhizobium* bakterileriyle çalışmış ve bu bakterilerdeki alüminyum direncinin plazmit aracılı olmadığını rapor etmiştir. Bu bulgu ise bizim bulgumuz ile paralellik göstermektedir. Direnç genlerinin bakteriler arasında yayılmasında transpozonların çok büyük rolü vardır. Birçok direnç geni transpozon denilen DNA elementlerinde yer alırlar. Transpozonların bakteriyofaj-plazmit-bakteri kromozomu arasında birinden diğerine atlamalarını (transpozisyonlarını) sağlayan genleri de vardır. Bu nedenle sıçrayıcı genler olarak da tanımlanabilirler. Bu özellikleri dolayısıyla örneğin kromozomal olan bir direnç genini bakteride bulunan bir plazmite, plazmitte kodlanan bir direnç genini bakteri kromozomuna veya bir başka plazmite geçirebilirler. Bu da bakteriler arasında direnç genlerinin yayılmasına yol açar.

Baryum dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşlarının da plazmit profilleri belirlenmiştir. *Stenotrophomonas rhizophila* suşunda, baryum içeren ve baryum içermeyen her iki ortamda da herhangi bir plazmit varlığı tespit edilememiştir. Bu veriler doğrultusunda bu suşun da baryum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Baryum dirençli diğer bir suş olan *Staphylococcus aureus* 'un ise baryum içermeyen ortamda herhangi bir plazmit varlığı tespit edilmezken, baryum içeren ortamda 277 kb ve 215 kb ağırlığında 2 adet mega plazmit içerdiği belirlenmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda tüm plazmitleri elimine edilen baryum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun metal ve antibiyotik dirençlilik profillerinde herhangi bir değişiklik belirlenememiştir. Bu veriler doğrultusunda bu suşun da baryum direnç genlerinin kromozol DNA kökenli olduğu belirlenmiştir.

Literatürde baryum dirençliliği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma özgün bir nitelik taşımaktadır.

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 arttırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir [91].

Çalışmamızda, alüminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun total protein profili belirlenmiştir. Total protein analizleri sonucunda *Staphylococcus aureus* suşunun alüminyum içeren ortamda 125, 84, 68, 55 ve 37 kDa büyüklüğündeki protein bantlarının ekspresyonlarında sırasıyla 1.7, 2.3, 1.5 ve 3.0 kat azalma tespit edilmiştir. Bakterilerin metal varlığında kendini korumaya almak için söz konusu metal bağlayan proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir.

Baryum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun da total protein profili belirlenmiştir. Total protein analizi sonucunda *Staphylococcus aureus* suşunun baryum içeren ortamda 130 kDa'luk bandın eksprese olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 250, 145, 125, 87, 63, 51 ve 42 kDa'luk bantların ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Benzer şekilde bu bakterinin de metal varlığında kendini korumaya almak için söz konusu metali bağlayan proteinlerinin ekspresyonunu ya tamamen durdurduğu ya da azalttığı düşünülmektedir.

Orman [91], Kızılırmak'tan izole ettiği lityuma dirençli *S.aureus* suşu ile kalaya dirençli *P. Agglomerans* suşunun total protein analiz çalışmaları sonucunda metal varlığında total protein ekspresyonlarının arttığını tespit etmiştir.

Baryum dirençli *Stenotrophomonas rhizophila* suşunun ise total protein ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucunda bu suşun baryum içeren ortamda 72 ve 19 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonlarının 5'er kat arttığı tespit edilmiştir. Dış membran protein analizi sonucunda ise bantların ekspresyonunda herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir.

Turalı [90], Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole ettiği bakır dirençli *P. putida* ve krom dirençli *Enterococcus faecalis* suşlarının total protein analiz çalışmaları sonucunda krom ve bakır dirençli suşların metal varlığında total protein ekspresyonlarının arttığını tespit etmiştir.

Aktan [89], Kızılırmak'tan izole ettiği kurşun dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun total protein analiz çalışmaları sonucunda kurşun varlığında bazı proteinlerin ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Özer [88], 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 ekspresyonunu arttığını tespit etmiştir.

Akbulut [92], Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun dış membran ve total protein profillerini incelemiştir. Yapmış olduğu çalışmalar sonucunda total ve dış membran proteinlerinin her ikisinin birden bu suş için Zn direncinde etkin rol oynadığını tespit etmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen alüminyum ve baryum dirençli suşlar moleküler özellikleri bakımından incelenmiştir. Biyokimyasal özellikler esas alınarak alüminyum ve baryum dirençli suşlar tanımlanmış, çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri, plazmit DNA profilleri, kromozomal DNA lokasyonları, total ve dış membran protein profilleri belirlenerek, bu profillerin metal dirençlilik mekanizması ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] 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.
- [2] Taylan, Z.S., Özkoç, H.B., Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9 (2): 17-33, 2007.
- [3] Ilhan, S., Nourbakhsh, N.M., Kılıçarslan, S., Özdağ, H., Removal of chromium, lead and copper ions from industrial wastewaters by *Staphylococcus saprophyticus*. Turkish Electronic Journal of Biotechnology. 2: 50-57, 2004.
- [4] Aslan, S., Bozkurt, Z., Tekeli, A.N., Removal of Cu (II), Ni (II), Cd (II) and Cr (VI) ions from aqueous solution by biosorption processes. Journal of Engineering and Natural Sciences. 25 (2): 209-222, 2007.
- [5] Liu, H., Chenb, B., Lana, Y., Chenga, Y., “Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*”. Chemical Engineering Journal. 97: 195-201, 2004.
- [6] Rathnayake, I.V.N., Megharj, M., Bolan, N., and Naidu, R., Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. World Academy of Science, Engineering and Technology. 53: 2009.
- [7] Gadd, G.M., Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 156: 609-643, 2010.
- [8] Raikwar, M.K., Kumar, P., Singh, M., and Singh, A., Toxic effect of heavy metals in livestock health. Veterinary World. 1 (1): 28-30, 2008.

- [9] C.S. Ciminli, Gölbaşı Gölü'nde ve Bazı Organizmalarda Ağır Metal Birikimi. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Antakya, 2005.
- [10] Wackett, L.P., Dodge, A.G., Ellis, L.B.M., Microbial genomics and the periodic table. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2): 647-655, 2004.
- [11] 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. *Science of the Total Environment*. 407: 279-285, 2008.
- [12] Affan, O.A., Shoeb, E., Badar, U., and Akhtar, J., Isolation and characterization of bacterial isolates having heavy metal tolerance. *Journal of Basic and Applied Sciences*. 5 (2): 55-60, 2009.
- [13] Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., and Bond, P.L., Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*. 149: 1959-1970, 2003.
- [14] H. Karadede, Atatürk Baraj Gölü'nde Su, Sediment ve Balık Türlerinde Ağır Metal Birikiminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 1997.
- [15] Çabuk, A., Akar, T., Kotluk, Z., Şaşmaz, S., *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile ağır metal giderimi ve metal toleransı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 05 (3): 1-7, 2007.
- [16] Ren, A., Li, C., and Gao, Y., Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium Arundinaceum* Darbyshire Ex. Schreb. *International Journal of Phytoremediation*. 13 (3): 233-243, 2011.
- [17] Tekin-Özan, S., Determination of heavy metal levels in water, sediment and tissues of tench (*Tinca tinca* L., 1758) from Beysehir Lake (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment*. 145: 295-302, 2008.

- [18] Zhang, C., Qiao, Q., Piper, J.D.A., Huang, B., Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods. *Environmental Pollution*. 1-14, 2011.
- [19] Fischer, J., Quentmeier, A., Gansel, S., Sabados, V., and Friedrich, C.G., Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other *Acidophilic* bacteria. *Archives of Microbiology*. 178: 554-558, 2002.
- [20] F.Ş. Beriş, *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Alüminyuma Dirençlilik Geninin Belirlenmesi, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2006.
- [21] Anonim, Baryum. <http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/baryum> (Erişim tarihi: 08.05.2012).
- [22] Gavrilescu, M., Removal of heavy metals from environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 4 (3): 219-232, 2004.
- [23] Silóniz, M.I., Balsalobre, L., Alsa, C., Valderrama, M.J., Peinado, J.M., Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology*. 153: 173-180, 2002.
- [24] Ö. Akçelik, Ağır Metallerin *Saccharomyces cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [25] Alp, M.T., Şen, B., Özbay, Ö., Hazar Gölü'nde mevsimsel olarak ortaya çıkan *Cladophora glomerata*'da bazı ağır metal düzeyleri. *Ekoloji*. 20 (78): 13-17, 2011.
- [26] Wang, J., Chen, C., Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27: 195-226, 2009.

- [27] C.A. Hamilton, Possible role for the vacuolar H⁺-ATPase and F₀ F₁ -ATPase in aluminum resistance. Doktora Tezi. University of Alberta, Kanada, 2002.
- [28] Jo, J., Jang, Y., Kim, K., Kim, M., Kim, I., and Chung, W., Isolation of ALU1-P gene encoding a protein with aluminum tolerance activity from *Arthrobacter viscosus*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 239: 835-839, 1997.
- [29] Kawai, F., Zhang, D., and Sugimoto, M., Isolation and characterization of acid- and Al tolerant microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 189: 143-147, 2000.
- [30] Schott, E.J., and Gardner, R.C., Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Genetics and Genomics. 254: 63-72, 1997.
- [31] Mossor-Pietraszewska, T., Effect of aluminium on plant growth and metabolism. Acta Biochimica Polonica. 48 (3): 673-686, 2001.
- [32] Aslan, K., Elementler. <http://www.biyotip.com/images/File/e.pdf> (Erişim tarihi: 22.05.2012)
- [33] T. Akkan, İskenderun Körfezi'ndeki Gram (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmit Profillerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. ukurova Üniversitesi, Adana, 2009.
- [34] 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.
- [35] Y. şahin, Kurşun ile Kirlenmiş Toprakların Bitkisel Ekstraksiyon ile İyileştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2007.

- [36] Volesky, B., Detoksification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. 59: 203-216, 2001.
- [37] Lodeiro, P., Herrero, A.G.L., Herrero, R., Vicente, M.E.S., Aluminium removal from wastewater by refused beach cast seaweed. Equilibrium and dynamic studies. *Journal of Hazardous Materials*. 178: 861-866, 2010.
- [38] Anonim, Elementlerin Kullanım Alanları. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/periodik/kullanim3.html> (Erişim tarihi: (16.05.2012))
- [39] Li, K., Ramakrishna, W., Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*. 189: 531-539, 2011.
- [40] Parizanganeh, A., Hajisoltani, P., Zamani, A., Assessment of heavy metal pollution in surficial soils surrounding zinc industrial complex in Zanzan-Iran. *Procedia Environmental Sciences*. 2: 162-166, 2010.
- [41] Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., He, Y., Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus sp.* L14. *Bioresource Technology*. 101: 8599-8605, 2010.
- [42] Gavrilescu, M., Removal of heavy metals from environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 4 (3): 219-232, 2004.
- [43] Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., Matis, K.A., Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*. 39: 909-916, 2004.

- [44] Silver, S., Phung, L.T.A., bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 587-605, 2005.
- [45] Kavamura, V.S., Esposito, E., Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28: 61-69, 2010.
- [46] Leedjarv, A., Ivask, A., and Virta, M., Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*. 2680-2689, 2008.
- [47] Chouhan, S., Tuteja, U., and Flora, S.J.S., Isolation, identification and characterization of fluoride resistant bacteria: possible role in bioremediation. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48 (1): 43-50, 2012.
- [48] Rajbhansi, A., Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment. *Plant Our Natura*. 6 (1): 52-57, 2008.
- [49] Wang, L., Ma, F., Feng, S., Sun, D., Yu, B., Xing, J., Biosorption characteristics of extracellular polymeric substance (EPS) produced by *Rhizobium radiobacter* for removal of Cu (II) and Mn (II) ions form aqueous solutions. 2010.
- [50] Chakravarty, R., Banerjee, P.C., Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium. *Bioresource Technology*. 108: 176-183, 2012.
- [51] Sağlam, N., Cihangir, N., Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorbsiyonu çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*. 11: 157-161, 1995.
- [52] Oh, S.E., Hassan, S.H.A., Joo, J.H., Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 25: 1771-1778, 2009.

- [53] A. Özvardarlı, Çevre Biyoteknolojisi Uygulamalarında Biyosorpsiyonun Yeri. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Çorlu, 2006.
- [54] 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.
- [55] Haferburg, G., Kothe, E., Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87: 1271-1280, 2010.
- [56] Rouch, D.A., Lee, B.T.D., and Morby, A.P., “Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance”. *Journal of Industrial Microbiology.* 14: 132-141, 1995.
- [57] Ji, G., and Silver, S., “Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern”. *Journal of Industrial Microbiology.* 14: 61-168, 1995.
- [58] Teitzel, G.M., and Parsek, M.R., Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69 (4): 2313-2320, 2003.
- [59] A. Hynninen, Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensing. University of Helsinki, Helsinki, 2010.
- [60] Şimşek, N., Alabay, B., Metalloitiyoninlerin histofizyolojik önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2 (2): 75-81, 2007.
- [61] Janssens, T.K.S., Roelofs, D., and Straalen, N.M., Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Molecular Insect Science* 16: 3-18, 2009.

- [62] Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., and Murayama, T., Nickel resistance in yeast and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 64-168, 1995.
- [63] O'Halloran, T., Transition metals in control of gene expression. *Science* 261: 715-725, 1993.
- [64] Nies, D.H., Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 730-750, 1999.
- [65] Anonim, Kızılırmak Nehri. http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak_nehri (Erişim tarihi: 10.04.2012)
- [66] 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.
- [67] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır Arıca, Ş., Kırındı, T., *Mytilus sp* (midye), *Gammarus sp* (nehir tırnağı) ve *Cladophora sp* (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak nehriindeki ağır metal kirliliğinin araştırılması. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 9 (1): 52-60, 2007.
- [68] 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 377-381, 2002.
- [69] Behme, R., Shuttleworth, R., McNabb, A., Colby, W.D., Identification of *Staphylococci* with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (12): 3075-3084, 1996.
- [70] Birnboim, H.C., Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523, 1979.

- [71] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edited by: Harwood, C., Cutting, S., Wiley, J., and Chichester, S., Genetic analysis in molecular biological methods for *Bacillus*. 27-74, UK, 1990.
- [72] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. 545, 1982.
- [73] 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.
- [74] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates. Microbios. 86: 143-156, 1996.
- [75] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., Silver, R.P., Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K isolates. Infection and Immunity. 39: 315-335, 1983.
- [76] Laemli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-684, 1970.
- [77] Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. European Food Research and Technology. 211: 322-325, 2000.
- [78] Mukhallad, A.M., Malcolm, P.S., The distribution of heavy-chain isoforms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. Biochemical Journal. 260: 421-426, 1989.
- [79] Spain, A., Alm, E., Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. Reviews in Undergraduate Research. 2: 1-6, 2003.

- [80] Konishi, S., Souta, I., Takahashi, J., Ohmoto, M., and Kaneko, S., Isolation and characteristics of acid and aluminum-tolerant bacterium. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58: 1960-1963, 1994.
- [81] Jackson, V.A., Paulse, A.N., Odendaal, J.P., Khan, S., Khan, W., Identification of metal-tolerant organisms isolated from the Plankenburg River, Western Cape, South Africa. *Water SA*. 38 (1): 29-38, 2012.
- [82] Lemire, J., Auger, C., Bignucolo, A., Appanna, V.P., and Appanna, V.D., Metabolic strategies deployed by *Pseudomonas fluorescens* to combat metal pollutants: Biotechnological prospects. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2010.
- [83] Kimoto, K., Aizawa, T., Urai, M., Bao Ve, N., Suzuki, K., Nakajima, M., and Sunairi, M., *Acidocella aluminiidurans* sp. nov., an aluminium tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 764-768, 2010.
- [84] Sivolodskii, E.P., Determination of the sensitivity of bacteria to barium ions, a taxonomic marker of the genus *Pseudomonas*. *Microbiology*. 81 (1): 112–117, 2012.
- [85] Saxena, D., Joshi, N., Srivastava, S., Mechanism of copper resistance in a copper mine isolate *Pseudomonas putida* Strain S4. *Current Microbiology*. 45: 410-414, 2002.
- [86] Uğur, A., Ceylan, Ö., Occurrence of resistance to antibiotics, metals in clinical strains of *Staphylococcus aureus* spp. *Archives of Medical Research*. 34: 130-136, 2003.

- [87] Altalhi, A., Plasmids profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.). African Journal of Biotechnology. 8 (21): 5873-5882, 2009.
- [88] G. Özer, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [89] Y. Aktan, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [90] G. Turalı, Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [91] N. Orman, Lityum ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [92] S. Akbulut, Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [93] Wood, M., A mechanisms of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implication. Plant and Soil. 171: 63-69, 1995.