

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDÜSTRİYEL ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN ÇİNKO ve MANGAN DİRENÇLİ  
BAKTERİLERİN TANIMLANMASI ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

SEVİLAY AKBULUT

HAZİRAN 2012

**Biyoloji Anabilim Dalında** Sevilay AKBULUT tarafından hazırlanan ENDÜSTRİYEL ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN ÇİNKO ve MANGAN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN TANIMLANMASI ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE

\_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN

\_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Sema TAN

\_\_\_\_\_

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Anneanneme*

## ÖZET

### ENDÜSTRİYEL ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN ÇİNKO ve MANGAN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN TANIMLANMASI ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

AKBULUT, Sevilay

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2012, 86 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel atık sulara maruz kalan Kırıkkale-Kızılırmak'tan çinko ve mangan dirençli bakterilerin izole edilmesi, biyokimyasal ve genetiksel olarak karakterizasyonudur. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri 1000 mg/L olan mangan dirençli iki bakteri izole edilmiş, morfolojik ve biyokimyasal testleri sonucu *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Plazmit analizi ve eliminasyonu çalışmaları sonucunda her iki bakterisinde mangan direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu iki bakterinin alüminyum, lityum, demir, kurşun, nikel, stronsiyum gibi metallere, ceftazidime, piperacillin ve piperacillin/tazobactam gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Dış membran ve total protein analizleri sonucunda her iki protein türünün de metal direncinde etkili olduğu görülmüştür. Diğer taraftan MİK değeri 825 mg/L olan çinko dirençli başka bir bakteri izole edilmiş, morfolojik ve biyokimyasal testleri sonucu başka bir *Acinetobacter haemolyticus* suşu olduğu belirlenmiştir. Çinko dirençli bu suşun da alüminyum, lityum, baryum, nikel, stronsiyum, bakır, kalay gibi metallere, gentamicin, pefloxacin ve trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Plazmit profil analiz çalışmaları sonucunda *Acinetobacter*

*haemolyticus* suşunun çinko direnç genlerinin de diğer iki izolatda olduğu gibi kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşta çinko dirençliliğinde dış membran proteinleriyle beraber diğer proteinlerin de etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal dirençliliği, çinko dirençli bakteri, mangan dirençli bakteri, çoklu metal dirençliliği, çoklu antibiyotik dirençliliği

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION and MOLECULAR CHARACTERIZATION of ZINC- and MANGANESE- RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM INDUSTRIAL EFFLUENTS

AKBULUT, Sevilay

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent İÇGEN

June 2012, 86 Pages

The aim of this study to isolate and characterization zinc- and manganese- resistant bacteria from Kırıkkale-Kızılırmak exposed to industrial effluents. Two manganese resistant bacteria with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 1000 mg/L were isolated and identified as *Serratia marcescens* and *Acinetobacter haemolyticus* by using morphological and biochemical tests. Both isolates were shown to be multi metal-resistant to, aluminum, lithium, iron, lead, nickel, strontium and multi-drug resistant to ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam. Plasmid profile analyses and curing experiments revealed that the manganese resistance ability of these two bacteria was chromosome-encoded. Outer membrane and total protein isolation results descriptively showed that not only membrane porins but also other proteins were effective in manganese resistance. On the other hand, a zinc- resistant bacteria with a MIC value of 825 mg/L was isolated and identified as *Acinetobacter haemolyticus* by using morphological and biochemical tests. Zinc- resistant isolate was shown to be resistant to some other heavy metals like aluminium, lithum, barium, nickel, strontium, copper, tin and to some antibiotics like gentamicin, pefloxacin, trimeth-sulfa. Plasmid profile analyses revealed that the zinc-resistant ability of the isolate was also chromosome-encoded. Protein isolation results

descriptively showed that not only membrane porins but also other proteins were effective in zinc resistance.

**Key Words:** Heavy metal resistance, zinc-resistant bacteria, manganese-resistant bacteria, multi metal resistance, multi drug resistance

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve her türlü desteği sağlayan, böyle bir tezde çalışma imkanı sunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman yardımlarını gördüğüm, beni destekleyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye ve Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezim boyunca deneylerimdeki yardımlarının yanısıra manevi destekleriyle de her zaman yanımda olan, Gamze SERİM ve Ceren KOÇHAN'a, Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve diğer laboratuvar çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Büyük emeklerle bu günlere gelmemi sağlayan, hayat boyu maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan babam Ahmet AKBULUT ve annem Mualla AKBULUT'a ve bana her zaman yardımcı olan ağabeyim Çağatay AKBULUT'a çok teşekkür ediyorum.



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kaynak özetleri.....	2
1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları .....	2
1.1.1.1. Çinkonun Fonksiyonları.....	4
1.1.1.2. Manganın Fonksiyonları .....	5
1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri.....	7
1.1.2.1. Çinkonun Çevresel Etkileri .....	8
1.1.2.2. Manganın Çevresel Etkileri.....	9
1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları .....	10
1.1.3.1. Çinkonun Kullanım Alanları.....	12
1.1.3.2. Manganın Kullanım Alanları .....	13
1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	14
1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri .....	14
1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	15
1.1.4.2.1. Ağır Metal Biyosorpsiyonu Mekanizmaları .....	18
1.1.4.2.1.1. Hücre Dışı Akümülayon .....	19
1.1.4.2.1.2. Hücre Yüzeyi Sorpsiyonu.....	20
1.1.4.2.1.3. Hücre İçi Akümülayon.....	20

1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları .....	21
1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	22
1.1.5.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu .....	23
1.1.5.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması .....	24
1.1.5.4. Ekstrasellüler Alıkonma .....	26
1.1.5.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi.....	26
1.1.5.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması .....	27
1.1.6. Çalışmanın Amacı.....	31
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
2.1. Materyal .....	32
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri .....	32
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	32
2.1.1.2. Nutrient Broth.....	32
2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler .....	32
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar .....	33
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	33
2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	34
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	34
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	34
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS) .....	34
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit) .....	34
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50xTAE) Hazırlama .....	34
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	34
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	34
2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu .....	35

2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	35
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu .....	35
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	35
2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu .....	35
2.1.3.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu .....	36
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol .....	36
2.1.3.2.2.9. %70'lik Ethanol .....	36
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM) .....	36
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M) .....	36
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	37
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) .....	37
2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	37
2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon .....	37
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon .....	37
2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	38
2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı .....	39
2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....	40
2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük).....	40
2.1.3.2.7. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması .....	40
2.2. Yöntem.....	41
2.2.1. Çalışma Alanı .....	41
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	42
2.2.3. Mangan ve Çinkoya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....	42
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	43
2.2.5. Mangan ve Çinko Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	43
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	43

2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	44
2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	44
2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....	45
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	45
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	46
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması.....	46
2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	47
2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmid Curing).....	47
2.2.15. Total Protein İzolasyonu.....	47
2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu.....	48
2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	48
2.2.18. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	48
2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	49
2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	49
2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	49
2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerin Boyanması.....	49
2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....	50
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>51</b>
3.1. Mangane ve Çinko Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	51
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	51
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri...53	
3.3.1. Mangane Dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşlarının Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	53
3.3.2. Çinko Dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profili.....	55

3.4. Bakteri Üreme Eğrileri.....	57
3.4.1. Mangan Dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşlarının Üreme Eğrileri .....	57
3.4.2. Çinko Dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşunun Üreme Eğrisi .....	59
3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu.....	59
3.5.1. Mangan Dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşlarının Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu .....	60
3.5.2. Çinko Dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşunun Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu .....	62
3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili.....	63
3.6.1. Mangan Dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşlarının Total ve Dış Membran Protein Profili.....	63
3.6.2. Çinko Dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profili .....	67
<b>4. TARTIŞMA-SONUÇ</b> .....	<b>69</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>76</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi .....	3
1.2. Doğadaki Mn döngüsü .....	6
1.3. Biyokütleden elde edilmiş, metal iyonlarının gideriminde test edilmiş adsorbanlar .....	16
1.4. Biyoremediasyon teknolojilerinde kullanılan mikrobiyal prosesler.....	18
1.5. Bakterilerde görülen çeşitli direnç mekanizmaları .....	21
1.6. <i>E.coli</i> ' de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı.....	24
1.7. Bakterilerde Zn dirençliliğinin mekanizması .....	25
1.8. Czc transport sistemi. ....	29
1.9. Gram negatif bakterilere özgü metal homeostazi modeli.....	30
2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu.....	41
3.1. <i>Serratia marcescens</i> suşunun Mn içeren ve Mn içermeyen ortamdaki üreme eğrisi .....	58
3.2. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun Mn içeren ve Mn içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	58
3.3. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun Zn içeren ve Zn içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	59
3.4. <i>Serratia marcescens</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....	60
3.5. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	61
3.6. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....	62
3.7. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....	63
3.8. Mn dirençli <i>Serratia marcescens</i> suşunun total ve dış membran protein profilleri.....	64
3.9. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	65
3.10. Mn dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun total ve dış membran protein profilleri.....	66

3.11. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	66
3.12. Zn dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun total ve dış membran protein profilleri.....	67
3.13. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Belirli endüstriyel atıklardaki ağır metal dağılımı.....	12
2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları.....	33
2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı.....	38
2.3. SDS-PAGE çalışma solüsyonları.....	39
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	40
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	40
2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	42
3.1. Mn ve Zn dirençli suşların izole edildiği bölgeler.....	51
3.2. Mn ve Zn dirençli suşların biyokimyasal özellikleri.....	52
3.3. Mn dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşlarının çoklu metal dirençlilik profili.....	54
3.4. Mn dirençli <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşlarının antibiyotik dirençlilik profili.....	55
3.5. Zn dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....	56
3.6. Zn dirençli <i>Acinetobacter haemolyticus</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	57



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Ba	Baryum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
MnSO <sub>4</sub>	Mangan Sülfat
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Çinko Sülfat

### KISALTMALAR DİZİNİ

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

## 1. GİRİŞ

Yeterli miktarda taze ve temiz içme suyu kaynağı, tüm insanlar için temel bir ihtiyaçtır. Sucul ortamların toksik metal iyonlarıyla kirlenmesi çok ciddi bir çevre problemi teşkil etmektedir. Ağır metaller sucul ortamda biyolojik olarak ayrışamadıkları için diğer kirleticilere göre daha önemli sayılmaktadırlar. Ağır metallerin eser miktarı enzimatik reaksiyonların kofaktörü olarak önemlidir. Ama bunların yüksek miktarları canlı organizmalar için aşırı derecede toksik sonuç verir ve metabolik reaksiyonları yavaşlatabilir [1]. Ağır metal kirliliği besin zinciri aracılığıyla birikmesi nedeniyle de sağlık açısından ve ekolojik yönden risk oluşturmaktadır. Çevreye boşaltılan ağır metal atıkları; tarımsal, endüstriyel ve askeri işlemlerin sonucu oluşur. Organik kirleticilerin aksine metal iyonları kimyasal ya da biyolojik işlemlerle parçalanamaz [2]. Diğer taraftan ağır metaller, insan kaynaklı kirleticilerin temelini oluşturan toksik elementlerdir. Bu ağır metaller; kadmiyum, krom, kobalt, mangan, civa, nikel, gümüş ve çinkoyu içinde bulundurur. Metalle kontamine olmuş ortamlarda bulunan mikroorganizmalar, ağır metallerin toksik konsantrasyonlarına uyum sağlar ve bu metallere dirençli hale gelir. Metallerin gideriminde mikroorganizmaların biyoteknolojik potansiyelinden dolayı son yıllarda mikroorganizmalar aracılığıyla metal giderimi önem kazanmıştır [3]. Çözünmüş toksik metallerin gideriminde kullanılan; çamur ayırma, kimyasal presipitasyon, kimyasal oksidasyon ya da redüksiyon, iyon değişimi ters ozmos, filtrasyon, aktif kömür uygulanarak yapılan adsorpsiyon, elektrokimyasal arıtım gibi teknikleri barındıran geleneksel yöntemler metal konsantrasyonu 100 mg/L'den daha düşük olduğunda çok etkili olmamaktadır [3]. Ayrıca bu yöntemler pahalıdır ve spesifik olmayan metal bağlanma özellikleri her zaman uygulanabilir değildir. Bu yüzden kirlenmiş atıksulardan, madencilik ve endüstriyel atıklardan ağır metallerin gideriminde mikroorganizmaların kullanımı umut verici olmaktadır [3,4].

## 1.1. Kaynak Özetleri

### 1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Bütün elementlerin çok büyük bir kısmı, onların oksitler ve hidroksitler gibi kararlı olan ve katyonik özellikli formlarına göre karakterize edilirler. Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba; Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Hg ve Zn olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir [5] .

Metaller canlı organizmalardaki metabolik işlevlerde hayati öneme sahiptir. Bu metallere Co, Cr, Ni, Fe, Mn ve Zn gibi bazıları canlılar için mikro besin elementi olarak rol oynar ve iz elementler olarak bilinirler. Redoks reaksiyonları, elektrostatik etkileşim aracılığıyla moleküllerin stabilizasyonu, enzimatik reaksiyonların katalizi, ozmotik dengenin düzenlenmesi gibi birçok önemli işlemde rol alırlar. Diğer yandan Cd, Pb, Hg gibi bazı metaller de organizmada biyolojik role sahip değildir ve düşük konsantrasyonda bile organizmalar için zararlıdır. Örneğin bu ağır metaller mikrobiyal komünitelerin metabolik aktivitesini azaltabilir ve kalitatif ve kantitatif yapılarını etkileyebilir [6].

Her ağır metal ayrı bir toksisite veya fonksiyona sahiptir [6]. Ancak her iki grup metal de fazla miktarda organizma için toksik etkiye sahiptir. Bu metaller mikrobiyal popülasyonun büyüme, morfoloji ve biyokimyasal aktivitelerini etkileyerek sonuçta o popülasyonun biyokütle ve çeşitliliğine zarar verir [7].

Periyodik tabloda (Şekil 1.1) bulunan elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal olarak rol oynarlar. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, işte o zaman katalitik olarak rol oynarlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin sentezinde pek çok element gereklidir. Bu ise elementlerin yapısal fonksiyonudur ve element, son ürünün vazgeçilmez bileşenidir [5,8].

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin Cu hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve bir çok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [9]. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi biyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan Hg'dir [5,10].

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

<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:yellow; border:1px solid black;"></span>	Önemli temel elementler, bütün yaşam türleri
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:orange; border:1px solid black;"></span>	Önemli katyonlar, bütün yaşam türleri
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:blue; border:1px solid black;"></span>	Önemli anyonlar, bütün yaşam türleri
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightblue; border:1px solid black;"></span>	Gerekli iz elementler, bütün yaşam türleri
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:purple; border:1px solid black;"></span>	Özel kullanımlarda gerekli, bazı yaşam türleri
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span>	İndirgenmiş ve/veya metillenmiş durumda transfer edilebilir, bazı mikroorganizmalar
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:gray; border:1px solid black;"></span>	Etkisi bilinmeyen veya bilinmeyen biyolojik fonksiyonlara sahip elementler
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightgray; border:1px solid black;"></span>	Biyolojik açıdan önemli geçiş elementleri

**Şekil 1.1.** Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi [5]

Ağır metaller; hücre membranlarına zarar verebilir, enzim spesifitesini değiştirebilir, hücrenel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilir. Bu metallerin toksisitesi esansiyel metallerin bağlanma bölgelerinin yerini almalarıyla ya da ligant etkileşimleri aracılığıyla olur. Ayrıca toksisite oksidatif fosforilasyon ve ozmotik dengeyle karışan nükleik asit ve proteinlerin konformasyonel yapısının değişmesi sonucu ortaya çıkar [7,12].

Çinko (Zn), yer kabuğundaki en yaygın elementlerden birisidir. Hava, su, toprak ve tüm besinlerde dolayısı ile de besin zincirinin her kademesinde bulunur. Saf Zn, mavi-beyazımsı parlak bir metaldir [13].

Mangan (Mn), kaya, toprak, göl ve okyanus diplerine dağılmış olan birçok tuz ve mineral bileşiğinin yapısında bulunmaktadır. Saf Mn kırılğan ve gümüş renklidir. Doğada saf olarak bulunmayan Mn; sülfürler, oksitler, boratlar, fosfatlar, silikatlar, karbonatlar gibi yüzde fazla mineralin bileşeninden biridir [14].

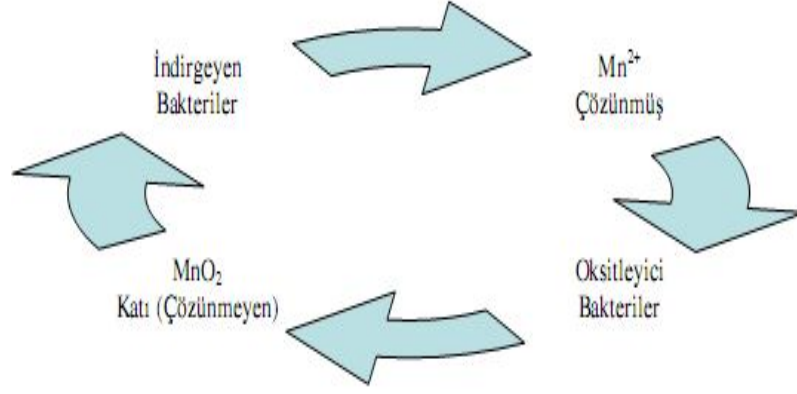
#### **1.1.1.1. Çinkonun Fonksiyonları**

Zn insanlar ve tüm bitki formları ile hayvan yaşamları için önemli ve yaşamsal elementlerden biridir. Yokluğu, sağlık problemlerine neden olduğu gibi, fazlası da akut toksisiteye neden olmaktadır [13]. Gelişme, deri bütünlüğü ve fonksiyonu, yumurta olgunlaşması, bağışıklık gücü, yara iyileşmesi ve karbonhidrat, yağ, protein, nükleik asit sentezi gibi çeşitli metabolik prosesler için gereklidir. Aşırı dozda elementel Zn alındığında, uyuşukluk, kas fonksiyonlarında düzensizlik ve yazmada zorluk çekme gibi semptomlar gözlenir [12].

### 1.1.1.2. Manganın Fonksiyonları

Doğada bulunan Mn'nin büyük bir bölümü metamorfik ve tortul kayalardan, küçük bir bölümü volkanik kayalardan kaynaklanır. Mn diğer birçok element ve bileşikle farklı formlar oluşturabilir. Yeryüzünde bulunan belli başlı Mn cevherleri; piroluzit ( $MnO_2$ ), hausmannit ( $Mn_3O_4$ ), manganit ( $Mn_2O_3 \cdot H_2O$ ), mangan spat ( $MnCO_3$ ) ve rodonit ( $MnSiO_3$ )'tir. Yüksek Mn konsantrasyonları, Mn oksitleyen bakterilerin aktivitesine ve askıdaki taneciklerin üzerindeki adsorbsiyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Doğal sularda pH 7'nin üzerindeki pH'larda çözülmüş Mn formlarının ( $Mn^{2+}$ ) askıdaki tanecikler üzerindeki adsorbsiyon hızının oksidasyon hızından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Askıdaki katı maddeler çoğunlukla kil ve sulu metal oksitler gibi inorganik kolloidler, organik kolloidal maddeler ve canlı mikroorganizmaları bulundurur. Yağmur sularının hem düşük pH, hem de anaerobik şartlar nedeniyle çözülmüş Mn bileşikleri içeren topraklardan geçmesi sonucu sızıntı yağmur suları Mn'nin çözülmüş formlarını içerirler. Bu nedenle yeraltına sızan yağmur suları ile beslenen yeraltı suyu kaynakları yüksek miktarda Mn içermektedir [14].

Mn döngüsü her biri farklı Mn türünü tüketen iki tip bakteri içerir (Şekil 1.2). İndirgeyen anaerobik bakteriler solunum sırasında oksijen yerine katı formda mangan dioksit ( $MnO_2$ ) tüketirler ve çözülmüş Mn ( $Mn^{2+}$ ) açığa çıkar. Oksitleyici bakteriler enerji sağlamak için çözülmüş Mn tüketirler, mangan oksit ortaya çıkar [14].



**Şekil 1.2.** Doğadaki Mn döngüsü [14]

Düşük konsantrasyonlarda Mn ve Fe, siyah balçık üreten Fe bakterilerinin mikrobiyal büyüme ve birikimlerine yol açabilir. Mn varlığı lifli yapıdaki mikroskopik organizmaların (*Crenothrix*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Gallionella*) gelişimini hızlandırır.

Mn biyolojik olarak birçok enzimin aktivitesi için çok gereklidir. Mn, sitozolde karboksilaz fosfatazdan, golgide şeker transferine, mitokondride Mn içeren süperoksit dismutaza kadar pekçok yerde görevlidir [15].

Mn'nin fizyolojik fonksiyonu bazı enzimatik aktivitelerle ve metalloproteinlerle yakından ilişkilidir. Ayrıca  $Mn^{+2}$ , gen ekspresyon süreçlerini ve DNA yapısını stabilize etme özelliklerini içerir. İskelet deformiteleri ve testis bozuklukları, Mn eksikliğinin bir sonucu olabilir [16]. İnsan kanser hücrelerinde Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) aktivitesinin düşük olması ya da yokluğu tümör baskılayıcı eylem gösterimine sebep olur [17].

### 1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Antropojenik kaynaklar gibi doğal kaynaklar yüzünden çevreye bırakılan ağır metaller aracılığıyla oluşan ağır metal kirliliği insan sağlığını önemli ölçüde tehdit eder. Cd, Cu ve Zn de çevreye bırakılan bu ağır metaller arasında yer alır [ 3].

Bir doğal ekosistemde sürekli, dengeli bir madde ve enerji döngüsü vardır. Ekosistemi oluşturan canlı grupları birbirine besin zinciri ile bağlıdırlar. Aldıkları besinleri enerjiye dönüştürüp kullanır, bir kısmını da depolayıp besin zincirinin bir üst halkasındaki canlıya aktarırlar. Canlılardan herhangi birinin kirleticiler ile zarar görmesiyle, madde ve enerji döngüsündeki bu zincirler kırılmakta, canlılar arasında varolan karşılıklı etkileşim bozulmaktadır. İşte bütün insanlığın sorunlarından biri ve belki de en önemlisi doğal çevredeki dengenin yani organik ve inorganik çevre ile bu çevrede yaşayan organizmalar arasındaki uyumun bozulmaya başlamasıdır. Ekosistemde canlılar arasındaki dengeyi bozan bu kirleticileri organik ve inorganik kirleticiler olarak sınıflandırmak mümkündür [13].

Kirleticilerden organik kontaminantların aksine, inorganik kökenli olan ağır metaller konsantrasyon ya da toksisitelerini azaltan parçalanma işlemine uğramazlar. Bazı ağır metaller sucul organizmalara direkt toksik olan çoğu deniz ve nehir organizması tarafından önemli seviyelerde birikirler. Bu birikim, hem sahil ortamındaki canlılar üzerinde metallerin muhtemel zararlı etkileri, hem de insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri açısından bir fikir verir. Günümüzde sahil bölgelerindeki endüstrileşme faaliyetleri deniz ortamlarına özellikle de ağır metal içeriği yüksek endüstriyel atık su deşarjlarını arttırmaktadır. Endüstriyel atık sular ve maden suyu drenajları yüksek oranda ağır metal içerirler. Deniz ortamına antropojenik kaynaklı metal girişleri sonucu metallerin su ortamındaki konsantrasyonları artmaktadır. Ağır metaller, diğer kirleticilerin aksine parçalanmaya dirençli olduklarından deniz ortamındaki ekosistem için tehdit oluşturmaktadırlar [18]. Su ortamlarındaki ağır metal kirliliği son yıllarda giderek artan bir öneme sahip olmuştur. Ağır metaller toprak ve kayaçların doğal bileşenleri olmalarına rağmen, doğal ve antropojenik kaynaklardan sürekli salınımları çevrede biyoakümülyasyonlara sebep olmaktadır. Tatlı su, tuzlu su ve karasal ekosistemlerde besin zincirinin ilk basamağındaki



birincil üreticiler olarak yer alan bitki ve diğer organizmalar ağır metalleri aldıkları besinlerden ekstrakte ederek bünyelerinde konsantre ederler. Bu olay metallerin konsantrasyonlarının çevresel açıdan izin verilebilir seviyelerin üstüne çıkmasına neden olur [19].

Metal toksisitesi ile ilgili iki mekanizma mevcuttur:

1. Enzimin aktif bölgesinde yararlı olan metal, toksik metal ile yer değiştirir.
2. Toksik metal moleküle bağlanır ve metalik katyonun değişmesi enzimin aktivitesini değiştirir.

Bazı ağır metaller nörofizyolojik etkiler yarattıklarından daha toksiktirler. Bu etkiler endokrinolojik ve teratojenik hastalıklar, mutajenik ve kanserojenik etkilerdir. Metallerin toksik etkileri metalden metale organizma içinde değişiklik gösterir. Sonuçta gerekli olsun ya da olmasın ağır metallerin çoğu canlı organizmalar için toksik etkiye sahiptir [20].

Çok geniş yayılım alanına sahip Cd, en önemli toksik kirleticilerden biridir. Bitkiler, hayvanlar ve insanlar için zorunlu değildir ve bu canlılar üzerinde, düşük konsantrasyonda bile yüksek toksisiteye sahiptir. 10-30 yıl gibi bir yarı ömre sahiptir ve vücutta birikimi böbrek, kemik gibi organları etkiler ve kansere sebep olur [21]. Zn ve Cu düşük konsantrasyonlarda mikrobiyal büyümeyi artırırken, yüksek konsantrasyonlarda büyümeyi baskılar [6,22]. Cr, nefrotoksik ve karsinojenik etkiye sahiptir [21,23]. Cu, karaciğer tahribatı, Wilson hastalığı, uykusuzluk gibi problemlere neden olur .

#### **1.1.2.1. Çinkonun Çevresel Etkileri**

Zn doğal prosesler ile çevreye salınır, fakat çoğu durumda, madencilik aktivitelerinden, çelik üretiminden, kömür ve atık yakma gibi işlemler sonucu alıcı ortamlara ulaşır. Toprak, su, sediment ve havadaki toz partikülleriyle birleşir.

Havadan ise yağmur ve kar ile yıkanarak su ortamlarına geçer. İçme suyu sınır değeri ise 5 mg/L'dir [13].

Zn, canlıların beslenmesinde esas rol oynayan elementlerdendir. Yokluğu, sağlık problemlerine neden olduğu gibi, fazlası da akut toksisiteye neden olmaktadır. Buhar olarak solunması, boğaz kuruluğu, öksürük, zayıflama, baş ağrısı, titreme, ateş, mide bulantısı, kusma gibi etkilere sebep olmaktadır.  $ZnCl_2$  buharı, soluk borusunun mukus membranında harabiyetlere sebep olmaktadır. Zn'nin çözünebilir tuzlarının sindirim yolu ile alımı sonucunda ise, mide bulantısı, kusma ve müshil etki göstermektedir. Zn buharının yoğun olarak solunması metal buhar ateşi olarak adlandırılan kısa süreli spesifik bir hastalığa neden olmaktadır. Zn'nin kısa bir süre içerisinde yüksek miktarda yenmesi ile mide krampları, mide bulantısı ve kusma ortaya çıkmaktadır. Daha uzun süreler boyunca alımında ise, anemi, pankreas harabiyeti, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein -iyi yönlü kolestrol) miktarında azalmalara neden olmaktadır. Deney farelerinde yapılan deneylerde de yüksek Zn konsantrasyonlarının kısırlığa sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca deri hastalıklarına da sebep olmuştur. İnsanlarda da cilt tahrişlerine sebep olmaktadır [13].

#### **1.1.2.2. Manganın Çevresel Etkileri**

Mn yeraltı sularında hemen hemen her zaman, yüzeysel sularda ise yılın bazı aylarında yüksek konsantrasyonlarda bulunması sebebiyle içme ve kullanma suları bakımından problem oluşturmaktadır. Oluşan bu problemlerin giderilmesi Mn giderim yöntemlerinin etkin bir şekilde uygulanmasını gerektirmektedir [14].

Mn sularda yeraltı suyu minerali olabileceği gibi yeraltı kirlilik kaynağı olarak da bulunabilir. Doğal sızıntı kaynaklarına bağlı olarak yeraltı sularındaki Mn miktarı kaya ve minerallerin tipine göre değişir. Organik madde içeriği yüksek olan kirlilik kaynakları (düzenli depolama sahalarının sızıntı suları, kompost, benzin gibi bazı kimyasallar) topraktan yeraltı suyuna geçen Mn miktarını artırır [24].

Mn, bitkiler ve hayvanlar için özel bir elementtir. Besinsel zararları insan sağlığı açısından tam olarak değerlendirilmemiştir. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) günlük ortalama psikolojik gerekliliğinin 3-5 mg olduğunu tahmin etmektedir. Çok fazla Mn külü ve tozunu solumak akciğerlerde tahrişe, parkinsona, uykusuzluğa, zihinsel karışıklığa, zayıflığa, spastik hareketlere, felce, öksürüğe, boğaz kuruluğuna, göğüs sıkışmasına, hafif sırt ağrılarına, kusmaya ve bitkinliğe neden olmaktadır. Mn'nin bazı belirtileri tedaviyle azaltılabilir ancak beyne zararı sürekli dir [14].

Mn'nin aşırı birikimi kalsiyum metabolizmasını engelleyebilir ve mitokondriyal DNA'nın replikasyonu sırasında hataların artmasına sebep olabilir. Mn insanlarda önemli bir nörotoksindir ve endüstride kullanımı manganizme neden olur. Mn'ye aşırı seviyelerde maruz kalmak ruhsal bozukluklar ve motor becerilerinde azalmayla karakterize edilen Parkinson hastalığı benzeri nörolojik bozukluklara sebebiyet verir. Metal iyonlarının birikimi ayrıca Alzheimer hastalığının patogenezi, prion aracılı ensefalopati, Amyotrofik lateral skleroz (motor nöron hastalığı) ve yaşa bağlı diğer hastalıklarla ilişkilidir [15,25].

### **1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları**

Nüfusun çoğalması ve sanayinin hızla gelişmesi kullanılan su ve oluşan atık miktarında büyük bir artış meydana getirmiştir. Üretim faaliyetlerinin gelişmesi ile meydana gelen atık sorunu başlangıçta tabiatın zmlenme kapasitesi ile atıkların bertarafını sağlamışsa da, alınan önlemlerin yetersizliği ile günümüzde ciddi evre problemleri ile karşılaşılmaktadır. Endüstri sektörünün hızla ilerlemesi, oluşan atık miktarı ve türünün giderek artması toprak, su ve hava ortamlarının kirlenmesine sebep olmaktadır. Endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan atık sularda bazen eser miktarlarda bazen de yüksek miktarlarda metaller bulunabilir. Bu metaller deşarjın yapıldığı noktadan itibaren akarsu, nehir, gl ve halilerden deniz ve okyanuslara kadar ulaşabilir. [13].

Genellikle maden atıkları yüksek oranda metal (Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, Pb ve Cd) içerir [6]. Küçük ya da büyük ölçekli tekstil, deri, tabakhane, elektrokaplama, galvanizleme, metalurji, boya endüstrileri ve diğer metal işleme ve rafine çalışmaları aracılığıyla hatırı sayılır miktarda toksik metal çevreye bırakılır. Bu toksik iyonlar yalnız insanlar için değil, farklı yaşam formları için de tehdit oluşturmaktadır [26]. Cu genellikle elektrikli eşya ve pirinç üretiminde kullanılır [27]. Cd elektro kaplama, renk maddeleri ve pillerin üretimi gibi çeşitli sanayi dallarında kullanıma sahiptir [21].

Fe, Cu, Zn, Pb, Hg ve Cd gibi metaller, evsel atıklar, metal üretimi yapan endüstriyel tesislerden, deri fabrikalarından, gübre fabrikalarından, krom kaplama ve petrol rafinerilerinden kaynaklanır. Antropojenik kaynaklardan en çok, arıtılmamış maden suyu drenajları, eritme işlemleri, çelik, çimento, plastik, boya, tekstil, elektro kaplama tesislerinin çıkış suları ve yine yağ tankerlerinden atıkların deşarjı gibi faaliyetler de alıcı ortamları kirleten başlıca kaynaklardır [13].

**Çizelge 1.1.** Belirli endüstriyel atıklardaki ağır metal dağılımı [28]

Sanayi Dalları	Ag	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Se	Ti	Zn
Genel Endüstri ve Madencilik	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Elektrolitik Metal Kaplama	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Boya Ürünleri	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Gübre			+	+	+	+	+	+	+	+			
İnsektisit Pestisit	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Tabaklama	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kağıt Ürünleri	-	-	-	+	+		+		+	+		+	+
Fotoğraf Sanayii	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiber	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Baskı/Boya	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Elektronik	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Otomotiv Soğutma Suyu	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boru Sanayii	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

(+) , pozitif; (-), negatif

### 1.1.3.1. Çinkonun Kullanım Alanları

Zn, pillerde, pas önlemede kaplama maddesi olarak, pek çok elektronik komponentlerin kaplamasında diğer metaller ile bir arada kullanılmaktadır. Endüstride de boya, kauçuk imalatında, süs eşyası yapımında ve yiyeceklerin korunmasında katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Özellikle de pillerde, demiryolu yapımında, matbaacılıkta, otomotiv sektöründe, boya astarlarında, tekne boyalarında, siyanür proseslerinde altının ekstrakte edilmesinde, sabun üretiminin yağ alma aşamasında, tutkal yapımında, sulu sodyum bisülfid yapımında ve analitik kimyada rejenerant olarak pek çok alanda kullanılmaktadır [13].

### 1.1.3.2. Manganın Kullanım Alanları

Mn metalinin üretilmesinde yüksek oranda Mn bileşikleri içeren kayalar kullanılmaktadır.

- Mn çoğunlukla çelik yapımında sertliği, dayanıklılığı artırma fonksiyonunu yerine getiren ferromangan bileşiğinin yapımında;
- Mangan dioksit, kibrit, kuru pil, havai fişek, porselen yapımında,
- Mangan klorür, diğer Mn bileşiklerinin üretiminde başlangıç bileşiği olarak, organik bileşiklerin klorlanması işleminde katalizör olarak, özel iz elementleri içerdiği için hayvan besini olarak ;
- Mangan sülfat; cila, gübre, seramik yapımında;
- Potasyum permanganat; metal temizleme, sepileme ve ağartma proseslerinde oksidant ve dezenfektan olarak, çiçek ve meyvelerin tazeliğinin korunmasında kullanılmaktadır.

Ayrıca bazı ülkeler anti vuruntu katkı maddesi olarak organomangan bileşiği olan metil siklo pentadienil mangan trikarbonil (MMT)'i kullanmaktadırlar. Benzinli araç üreticileri bu maddenin benzindeki kurşun miktarını azalttığını belirtmektedirler. Mn içeren mineraller indirgenme şartları altında suyla reaksiyona girdiğinde veya aktif olduğunda konsantrasyonu 1 mg/L'den daha fazla olabilmektedir [14].

## **1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

### **1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

Sulu ortamlardan geleneksel metodlarla metal giderimi; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, filtrasyon, elektrokimyasal arıtım, ters ozmos, membran teknolojileri, gibi teknikleri içerir [21].

1- Ters Ozmos: Ağır metal içeren atıksuların; basınç uygulanarak yarı geçirgen zardan geçirilerek filtrelenmesi işlemi bu adı almaktadır. Bu metodun dezavantajı pahalı olmasıdır.

2-Elektrodiyaliz: Elektrodiyalizde elektrik yüklü membranlar kullanılır. Katyon veya anyonlar seçici membran tarafından reddedilirler. Bu reddedilen anyonlar elektrodiyaliz hücresinden deşarj edilirler. Membranı tıkayan metal hidroksitler, bu metodun kullanılmasında sorun oluşturur.

3-Ultrafiltrasyon: Atık su belirli gözenek boyutundaki geçirgen zarın bir tarafında basınç altında bulunur. Gözenek boyutundan küçük tüm maddeler membrandan geçer, büyük boyutlular kirli su tarafında kalır. Bu metodun dezavantajı ise çok fazla miktarda çamur oluşumudur.

4-İyon Değişimi: İyon değiştirici reçineler üzerindeki elektrostatik kuvvetlerle tutulan iyonların, çözeltide bulunan metal iyonlarıyla yer değiştirmesine dayanır. Yüksek maliyet ve sadece belli iyonların giderilmesi sistemin dezavantajlarından.

5-Kimyasal Çöktürme: Atık sudaki metallerin kimyasal maddelerin yardımıyla yumaklaştırılarak çöktürülmesidir. En önemli dezavantajı toksik bileşenlerin olduğu fazla miktarda çamur oluşumudur.

6-Fotoremediasyon Toprak, sediment ve metal içeren suyun belirli bitkiler kullanılarak temizlenmesi işlemidir. Bu prosesin uzun sürmesi ve bitkinin yeniden kullanımının zor olması sistemin dezavantajlarından [29].

#### 1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

Metal işleyen endüstriler tarafından çevreye ağır metallerin boşaltılması çevre üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Geleneksel arıtma yöntemleri ile sulu ortamlardan metal giderimi ekonomik değildir ve fazla miktarda toksik kimyasal çamur üretir. Mikrobiyal ya da bitki kökenli cansız biyokütle aracılığıyla metallerin sulu ortamdan giderimi yenilikçi ve alternatif bir çözüm oluşturmaktadır. Endüstriyel ortamda metallerin ve kimyasalların artan kullanımı, yüksek seviyelerde toksik ağır metal içeren ve doğada parçalanamayan kirlilik oluşumuna sebep olmaktadır. Buna ek olarak madencilik işlemleri de toksik sıvı atık üretimine sebep olur. Bu sebepler yüzünden çevre mühendisleri ve bilim adamları atık su arıtımı için düşük maliyetli teknolojiler geliştirmek gibi zorlu bir görevle karşı karşıya kalmış durumdadır [21].

Metal gideriminde yukarıda bahsedilen geleneksel yöntemler metal miktarı 1-100 mg/L aralığında olduğunda oldukça pahalı ve yararsız olabilmektedirler. Geleneksel arıtma yöntemlerinin bir diğer büyük dezavantajı toksik kimyasal atık üretirler ve bu atıkta giderimi pahalı olan ve çevre dostu olmayan bir kirlilik oluşturur. Bu nedenle, düşük maliyetli ve çevre dostu olarak çevreye zarar vermeyecek düzeyde toksik ağır metallerin uzaklaştırılması büyük önem kazanmaktadır. Bu bilgilerin bir sonucu olarak biyolojik materyaller ekonomik ve çevre dostu bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır.

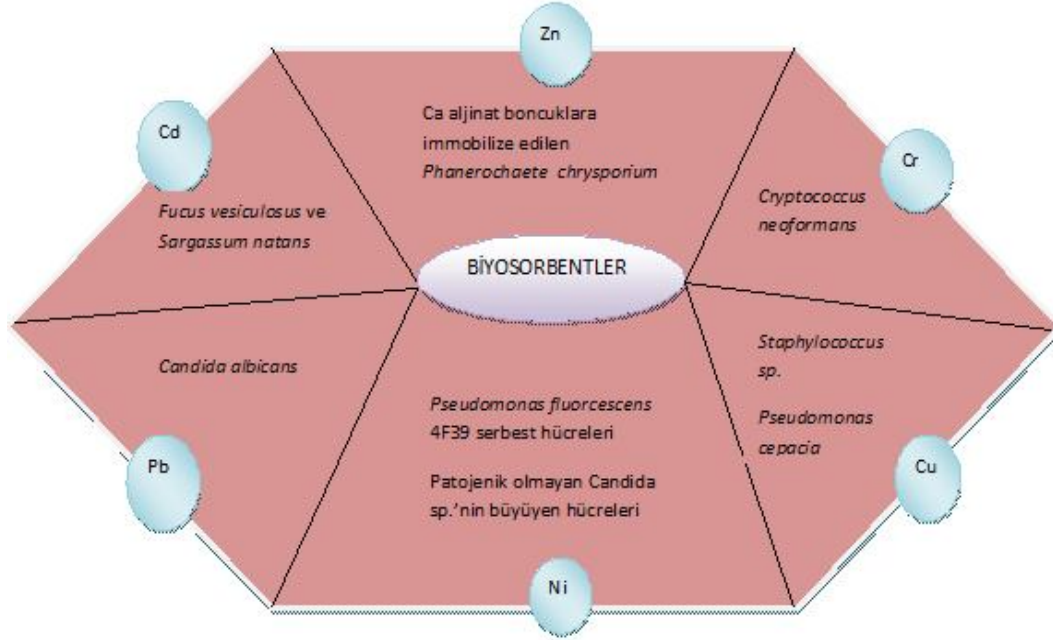
Biyoremediasyon, metabolik süreçler yardımıyla kontaminantların parçalanması ya da farklı forma dönüştürülmesini sağlayan bir işlemdir [30].

Biyolojik materyaller, metallerle etkin bir biçimde etkileşebilirler. Metabolik olarak ölü biyokütle kendine has kimyasal kompozisyonuyla solüsyonlardan metal iyonlarını ve metal kompleksini ayırır.

Sulu ortamlardan, biyomateryaller tarafından metallerin ortamdan giderimi için çok çeşitli metal sorpsiyon yöntemleri bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan çeşitli biyosorbentler Şekil 1.3'te verilmiştir. Metal sorpsiyonu için materyal seçerken (a) fermentasyon endüstrisinin yan ürünü olan mikroorganizmalar (b) doğada fazla



oranda bulunup, kullanılabilen mikroorganizmalar (c) ucuz ortam kullanılarak biyosorpsiyon amacıyla üretilen bakteriler seçilir [21].

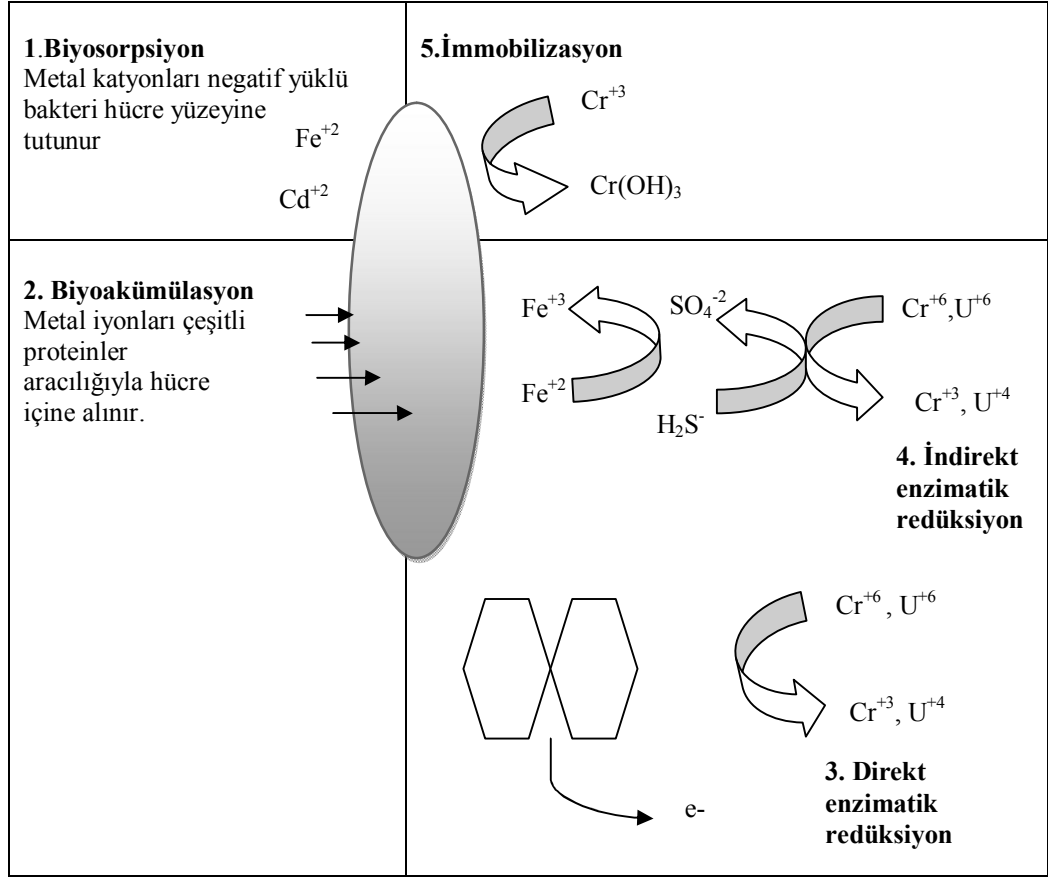


**Şekil 1.3.** Biyokütleden elde edilmiş, metal iyonlarının gideriminde test edilmiş adsorbanlar [31].

Hem ölü hem de canlı mikroorganizmalar metalleri tutma özelliğine sahiptir. 1990'lı yıllardan itibaren biyolojik kökenli maddelerle sulardaki ağır metallerin uzaklaştırılmasına dayanan çalışmalar başlamıştır. Bakteri, mantar ve alglerin zehirli metalleri birçok uzaklaştırma yolları tanımlanmıştır [14]. Ağır metaller, hücre duvarındaki selüloz yapısı içine tutulabilirler ve takiben selüloz yapısı içinde bulunan bağlanma bölgelerine biyosorbe olurlar. Çözeltideki metal iyonları, hücre duvarındaki biyopolimerlerde bulunan kimyasal, fonksiyonel gruplarla tutulurlar. Yüzeydeki bu bağlanmalar amid, amid imidozol, hidroksil, karboksil, fosfat tiyoeter ve diğer fonksiyonel gruplarla gerçekleşir [32].

Bu uzaklaştırma yolu, metabolik çevrimden bağımsız, biyosorpsiyon veya pasif arıtım olarak bilinir. Ayrıca hücre zarından geçerek, metabolik çevrim içine katılabilir.

Düşük derişimlerde birçok ağır metal, mikrobiyal büyüme ve metabolizma için gereklidir. Fakat yüksek derişimler, canlı hücrelerde zehirli etki gösterir. Ağır metal alımındaki, hücre zarından içeri taşınımı içeren daha yavaş hücre içi giderim basamağına aktif giderim veya biyoakümülyasyon (biyobirikim) denir. Canlı hücrelerle yapılan birçok çalışma, önce hızlı biyosorpsiyon basamağı, sonra daha yavaş metabolizmaya bağımlı aktif giderim içeren iki fazlı mekanizmanın varlığından söz etmektedir [32]. Genellikle, ölü biyokütlenin kullanımı daha kolay ve uygulanabilir. Çünkü canlı biyokütle hücreleri, genellikle besin ortamının eklenmesini gerektirirler ve böylece biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) artmaktadır. Ayrıca, ölü biyokütle metal iyonlarının zehirliliğinden etkilenmez ve ölü biyokütlenin performansını geliştirmek için birçok fiziksel ve kimyasal işlem uygulanabilir. Bunların yanı sıra, adsorbe edilen metaller birçok fiziksel ve kimyasal yöntemle biyokütleden geri kazanılabilir ve böylece biyokütle yeniden kullanılarak proses ekonomisi iyileştirilebilir [32,33].



Şekil 1.4. Biyoremediasyon teknolojilerinde kullanılan mikrobiyal prosesler [30]

#### 1.1.4.2.1. Ağır Metal Biyosorpsiyonu Mekanizmaları

Mikroorganizmanın yapısının karmaşıklığı, hücreler tarafından metallerin tutulması için birçok yol olduğunu gösterir (Şekil 1.4). Biyosorpsiyon mekanizmaları çeşitlidir ve anlaşılması zordur. Bu mekanizmalar temel olarak iki farklı kritere göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmanın birincisi hücre metabolizmasına bağlı olarak, ikincisi ise çözeltiden uzaklaştırılan metalin bulunduğu yere bağlı olarak yapılır [34].

Hücre metabolizmasına bağlılığına göre biyosorpsiyon mekanizmaları ikiye ayrılır:

- Metabolizmaya bağlı
- Metabolizmadan bağımsız

Metabolizmaya bağlı biyosorpsiyonla, metabolizmadan bağımsız biyosorpsiyon arasındaki en önemli fark, metabolizmaya bağlı olan biyosorpsiyonun, belirli bir reaksiyon süresi gerektirmesi, hemen olmamasıdır. Oysa metabolizmadan bağımsız biyosorpsiyon oldukça hızlıdır ve tersinir olabilir.

Konuma göre; çözültiden metalin mikroorganizmanın hangi kısmında uzaklaştırıldığına göre biyosorpsiyon mekanizmaları üçe ayrılır:

- a. Hücre dışı akümülyasyon
- b. Hücre yüzeyi sorpsiyonu
- c. Hücre içi akümülyasyon

#### **1.1.4.2.1.1. Hücre Dışı Akümülyasyon**

Bazı prokaryotik (bakteri, arke) ve ökaryotik (alg, küf) mikroorganizmalar, polisakkaritler, glukoprotein, lipopolisakkarit, çözülebilir peptit gibi hücre dışı polimerik maddeler (EPS) üretebilir veya salgılayabilirler. Bu maddeler, metal iyonlarını adsorplayabilen, önemli miktarda anyon fonksiyonel gruplar içerirler. Zehirli metallere karşı mikroorganizma, çökmeyi kolaylaştırıcı bileşikler salgıladığından bu mekanizma metabolizmaya bağımlıdır. EPS ile metal biyosorpsiyonu üzerine yapılan araştırmalar, genellikle *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, sülfat indirgeyici bakteriler (SRB) ve cyanobacteria gibi bakteriyel organizmalar veya aktif çamur ile gerçekleştirilmektedir. Ancak, küf ve alg ile EPS çalışmaları sınırlıdır. Özellikle küf ve maya ile yapılan çalışmalarda, metal gideriminde EPS'nin rolü genellikle ihmal edilmiştir [35,36].

#### **1.1.4.2.1.2. Hücre Yüzeyi Sorpsiyonu**

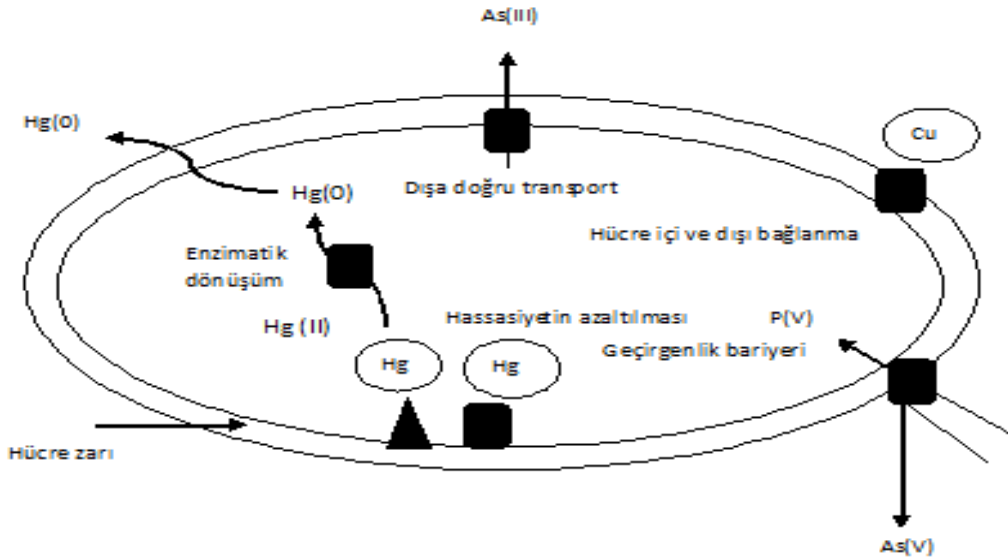
Hücre duvarı, metal iyonları ile etkileşen ilk hücre sel yapıdır. Hücre yüzeyine biyosorpsiyon metabolizmadan bağımsız, hızlı ve tersinirdir. Hücre duvarı tarafından metal kazanımının iki temel mekanizması vardır. Bunlar; hücre duvarı bileşimindeki fosfat, sülfat, karboksil, amin ve fosfodiester gibi fonksiyonel gruplarla stokiyometrik etkileşim ve adsorpsiyon veya inorganik çökeltme yolu ile fizikokimyasal bağlanmadır. Organizmalar tarafından metal giderimini açıklamak için kompleks oluşumu, iyon değişimi, adsorpsiyon, inorganik çökeltme ve oksidasyon ve/veya indirgenme gibi mekanizmalar incelenmektedir. Bu mekanizmaların çoğu biyosorpsiyon sırasında bir arada gerçekleşebilir [35, 37].

#### **1.1.4.2.1.3. Hücre İçi Akümü lasyon**

Hücre dışındaki metal iyonu derişimi hücre içindekinden daha yüksek olduğunda, metal iyonları serbest difüzyon ile biyokütlenin hücre duvarı ve membranını geçerek hücre içine girebilirler. Ayrıca, hücre duvarı doğal bir kuvvetle (örneğin, otoliz) veya yapay bir kuvvetle (örneğin, mekanik kuvvet veya alkali işlemi) parçalandığında da, metal iyonları hücrenin içerisine girebilir. Bu ikinci işlem metabolizmadan bağımsızdır. Ancak, hücre içi akümü lasyon prosesi, canlı hücrelerde gerçekleşen, enerji ve metabolizmaya bağımlı ve oldukça yavaş bir pro sestir. Hücre membranından taşınan metal iyonları hücre içinde farklı türlere dönüştürülürler veya çökeltirler. Farklı çalışmalar, hücre içine alınan metallerin, hücre içinde farklı kısımlara yerleştiğini ve mikroorganizmanın cinsi ile farklılık gösterdiğini belirtmektedir. Hücre içi akümü lasyonun gerçek mekanizması tam olarak bilinmemektedir [35].

### 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 çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler. Uzun süre ağır metallerle maruz kalan bakterilerde bu metallerle karşı çeşitli dirençlilik mekanizmaları gelişmiştir [38]. Bu çalışmalar, çoğunlukla, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* sp. gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-negatif ve Gram-pozitif aerobik bakterileri içermektedir. Toksik metallerle karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerinde yarattığı strestir [6].



Şekil 1.5. Bakterilerde görülen çeşitli direnç mekanizmaları [9]

Mikroorganizmaların geliştirdikleri metal dirençlilik mekanizmaları Şekil 1.5'te gösterildiği gibi;

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

#### **1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması**

Hücre duvarında veya hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturulup metaller hücre dışında tutulur. Bu sayede metale hassas hücresele komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E.coli*'de görülenen  $Cu^{2+}$  direncidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi değiştirilerek  $Cu^{2+}$ 'nin hücreye girişi engellenir [39]. Bu durum tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı geçirgenliğin azaltılması ile gerçekteşmektedir [40].

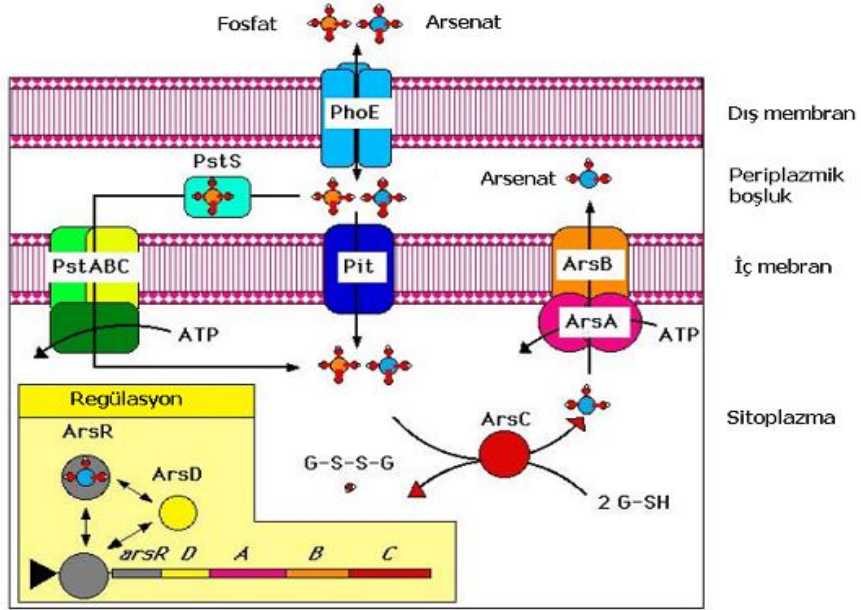
Başka bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır. Tam olarak ispatlanamasa da  $Cu$  dirençliliğinin bazı Őekillerinin periplazmik bağlayıcılık özelliği üzerine kurulu olduğuna inanılmaktadır [41]. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini saran ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorbe ederek hücre içine girişini engellemektedir [42]. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde

gösterilmiştir. Diğer bazı bakterilerde görüldüğü üzere Cd<sup>2+</sup> dirençliliği de böyledir. Ekzopolisakkaritten oluşan bir koruyucu tabaka Cd<sup>2+</sup> çözeltilerinde *K. aerogenes* türlerinin hassasiyetini düzenlemektedir [43]. *K. aerogenes*'in ekstraselüler kapsülü kapsülsüz formlara benzediği takdirde Cd'nin 1 nM'nın girişini engelleyebilmektedir. Ekzopolisakkarit tabaka tek başına Cd<sup>2+</sup> bağlayıcılığında, ekstrasellüler tabakası sağlam bir mikroorganizma gibi verimli değildir. Bu koruyucu tabaka, duyarlı hücresel bileşenler için metal iyonlarını tutarak alımı önlediği görülmektedir [5].

### 1.1.5.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

Aktif transport ya da akış sistemleri metal direnç sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardandır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmit kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin taşıma sistemleri ile alınır, fakat hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı veya ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [44]. Bakterilerdeki Cu, As, Cd, dirençlilikleri çoğunlukla bu tip direnç mekanizmaları ile oluşur. Örneğin As dirençliliği için *ars* operonu aracılığı ile *E.coli* (Şekil 1.6) ve *S.aureus*'ta; Cd(III) direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S.aureus*, *Bacillus* sp., ve *Listeria* sp'de ya da *Alcaligenes eutrophus*'ta *eze* operonu bulunmuştur. Pb<sup>2+</sup> direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus*'ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmit ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [5,40].



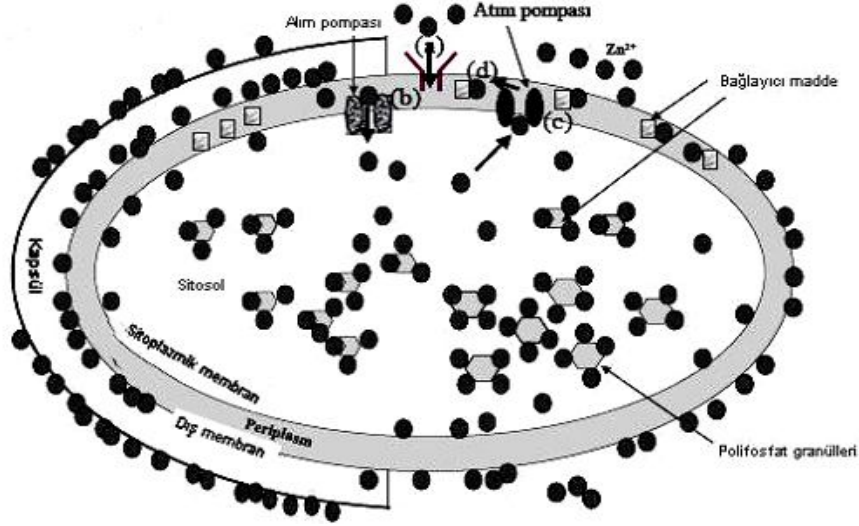


Şekil 1.6. *E. coli*' de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı [5]

### 1.1.5.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması

Hücre içinde alınma, metallerin birikmesinde sitoplazma içinde gerekli olan hücresel bileşenlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  metalleri alınmaktadır (Şekil 1.7). Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek verilebilir.

- Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi,
- Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [46].



Şekil 1.7. Bakterilerde Zn dirençliliğinin mekanizması [5]

Prokaryotlarda metallothionein üretimi yalnızca *Syenochooccus* türlerinde görülür. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothioneinlerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içerir. *SmtA*'daki metallothioneindeki sistein kalıntıları, çok zehirli kationlar için bir azaltıcı gibi davranabilmektedir. Son zamanlarda *smtB*'nin yapısı belirlenmiştir. *SmtB* proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapıya sahip bir dimerdir. Yapı analizi, proteinde dört  $Zn^{2+}$  bağlayıcı yer gösterir [5,48]. Metallerin hücre içinde alıkonmasına ilişkin diğer bir örnek de *Pseudomonas putida*'da görülmektedir. Bu bakteri metallothioneinlere benzeyen 3 farklı sistein bakımından zengin protein üretmektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*'da siyah bakır sülfat formunun çökmesinde alıkoyma aracılığı ile hücre içi birikimi de ispatlanmıştır [5,41].

#### 1.1.5.4. Ekstraselüler Alınma

Bu tip metal dirençliliğinin önceden sadece bakterilerde olduğu düşünölmüştür fakat daha sonraları maya ve funguslarda da bulunmuştur [49]. *Saccharomyces cerevisiae*'daki  $Ni^{2+}$  direncinin bu şekilde oluştuğı düşünölmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek  $Ni^{2+}$  absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere yüksek oranda bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan çalışmalar mayaların metal açısından zengin besi ortamlarına ekstraselüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada  $Cu^{2+}$  direnci gösteren mantarlarda görölmektedir [50]. Bu funguslar metal-okzalat formunda okzalat bileşiklerini salgılamaktadırlar. Mayalar gibi diğere organizmalar ve *Citrobacter* sp. türleri kalsiyum fosfatın çözünmeyen bileşik formlarına direnç göstermektedirler [51]. Maya formları hidrojen sülfid üretimi sırasında 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 ortamdan kaldırma yeteneğini göstermektedir [42,52].

#### 1.1.5.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürölmesi

Tanımlanan birçok bakteriyel ağır metal direnç mekaizması içinde, Hg dirençliliğı en iyi incelenmiş olanıdır. Hg geniş bir yayılma alanına sahiptir ve diğere ağır metal dirençliliklerinden farklıdır. Hg dirençli mikroorganizmaların izole edildikleri yerler ile memelilerin florası hemen hemen aynıdır. Hg dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğı reaktif iyonik  $Hg^{2+}$  formundan elementel ve daha az reaktif  $Hg^0$  formuna detoksifikasyona bağlıdır. Hg'ye dirençli bazı bakteriler Hg'ye geniş spektrumlu dirençli esas bileşiklere sahiplerdir [5,53]. Detoksifikasyona ek olarak,

Hg bileşiklerinin tutulması ve dimetillenmesi ile hücrel geçirgenliğin azalmasından dolayı Hg iyonlarının alımının azaldığı belirtilmiştir [54].

Mikroorganizmalarda enzimatik detoksifikasyonun en iyi örneği Hg dirençliliğidir. Bu dirençlilik tipi hakkında diğerlerine nazaran daha fazla bilgi mevcuttur. Gerek Gram pozitif gerekse Gram negatif bakterilerde Hg<sup>2+</sup>’ye karşı dirençlilik gösterilmiştir [55]. Hg hücre içerisinde enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan tiollere bağlanarak inaktive olmaları sebebi ile toksik etki gösterir. Bazı bakterilerde Hg<sup>2+</sup> dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı mer operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg<sup>2+</sup>’nin detoksifikasyonundan değil aynı zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [55,56].

Hg’nin bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları transkripsiyon düzenlenmesini azaltır. 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<sup>2+</sup>’yi sitoplazmaya taşımaktadırlar.

#### **1.1.5.6. Hücrel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması**

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücrel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır [40]. Hücreler bu işlemi ya mutasyonlar yolu ile belirli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltarak ya da metal inaktivasyonunda kullanılan bazı hücrel bileşenlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir.

DNA tamir mekanizmaları plazmit ve kromozomal DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan bileşenler ya da alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*’de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd<sup>2+</sup>’ye maruz kaldığı zaman önemli DNA hasarları oluştuğu bildirilmiştir, ayrıca

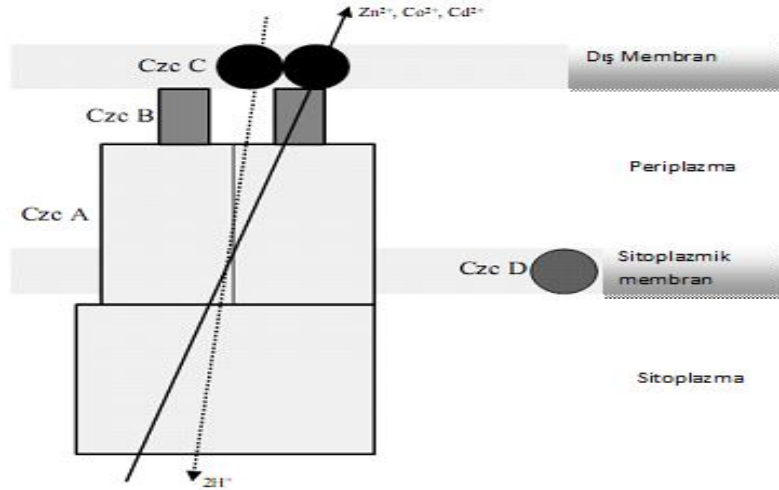
aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [51].  $Cd^{2+}$ 'ye maruz bırakılan organizmaların büyüme fazının kısıldığı belirtilmiştir. Uygun bir başlatıcı olarak DNA tamir mekanizmasının, görevinin bir parçası olarak lag fazın uzatılmasında görev aldığı varsayılmaktadır. Doğal direnç, toleransın temel bir seviyede olmasına izin veren normal hücresel işlevlerden meydana gelebilmektedir [5,40].

Glutasyon  $Ag^{1+}$ ,  $Cu^{1+,2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi metallere koruması için bir örnek teşkil etmektedir [56]. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'den korumayı sağlayabilmektedir [40]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde bulunan direnç yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır [39].  $Cd^{2+}$ 'nin varlığında protein sentezi Gram negatif bakterilerde, Gram pozitiflerden çok daha iyidir.

*Pseudomonas*'ın bir türü, Gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *S. faecium* ve *B.subtilis*) protein sentezinin %50 azalma gösterdiği  $Cd^{2+}$ 'nin konsantrasyonlarının 5-30 katına kadar dirençlilik göstermektedir. Gram pozitif organizmalar *E. coli* ile karşılaştırıldıklarında 28-30 kez daha fazla  $Cu^{2+}$  bağlayabilmektedir [5, 57].

En iyi çalışılan Zn direnç mekanizması bir Gram negatif toprak bakterisi olan *Ralstonia*'da ki *Czc* sistemidir. *Czc* sistemi, *R. eutrophus* CH34 suşunda Cd, Zn ve Co için de direnç sağlar, hücrelerden katyon/proton antiport transportunu gerçekleştirir. Plazmit *czc* operon üç yapısal gen içerir; *czcC*, *czcB* ve *czcA*. Bu genler karmaşık bir katyon akış pompası üretirler [47].

Dizilerdeki dış membran faktörleriyle gösterdiği benzerliklerden dolayı *CzcC*'nin dış membran proteini olduğunu düşünülmektedir. *CzcB* de membran füzyon proteinleri ile homolog olan bölgeleriyle, katyonlar arasında huni görevi görüp periplazmik boşluğu doldururlar böylece serbest katyonların salınımı önlenmiş olur .



**Şekil 1.8.** Czc transport sistemi [47]

Czc transport sistemi (Şekil 1.8) CDF proteini olan CzcA  $H^+$  değişimiyle yönlendirilen pompa gibi çalışır. CzcB, membran füzyon proteini, iç ve dış membran arasında ilişki kurarak iyonların geçişini kolaylaştırır. CzcC bir dış membran proteini olarak, dış membran üzerinden verimli bir taşınma gerçekleşmesini sağlar. CzcD bir sensör görevi görür [47].

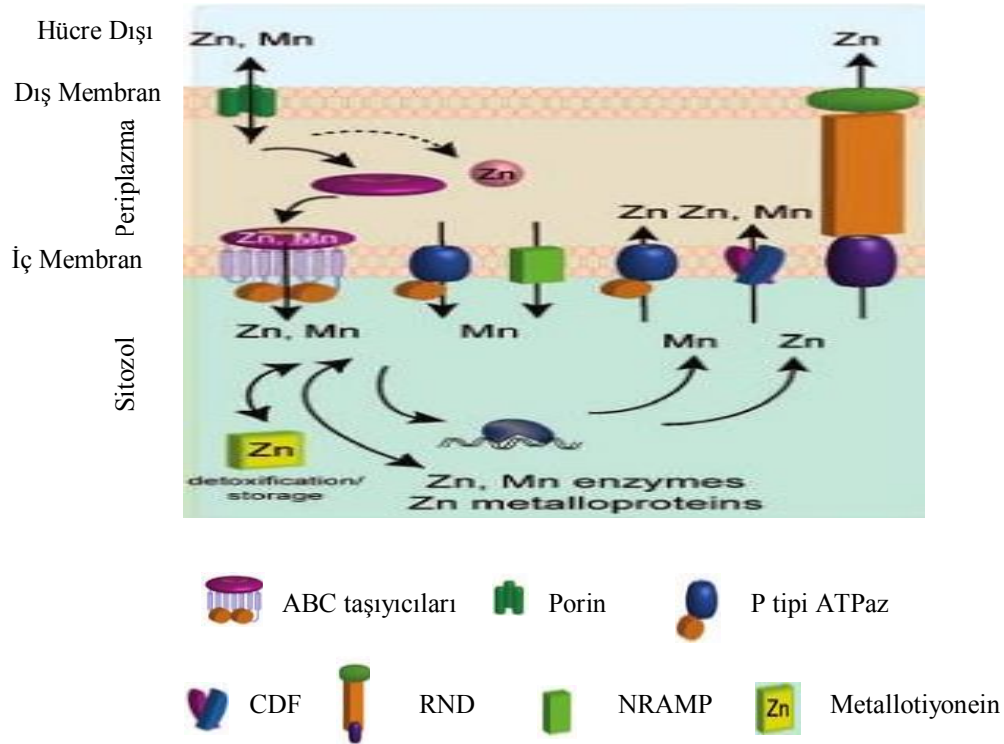
Novick [58] tarafından plazmit kodlu olmayan ağır metal direnci bulunduran *Staphylococcus* suşları tanımlanmıştır. Yakın geçmişte Xiong and Jayaswal [59] Zn(II) ve Co(II)'a karşı dirençli kromozomal kökenli determinantlar belirlediler. Genomik kütüphane izolatından elde edilen bu determinantlar  $zntA_{Saur}$  ve  $zntR_{Saur}$  olarak belirlendi ve CDF (cation diffusion facilitator) protein ailesiyle ve ArsR düzenleyici proteinleriyle önemli benzerlik göstermiştir. CDF protein ailesinin diğer üyesi ZitB, *E.coli*'de bulunmaktadır ve indüklenen Zn(II) taşınmasına aracılık ettiği düşünülmektedir [59].

Yeni bir Zn(II) taşıma sistemi de *Salmonella enterica*'nın serotipi *Typhimurium*'da tanımlanmıştır. ZntB, katyon taşıyıcısı CorA ailesinin homologudur ve sürpriz bir şekilde Mg(II) alımı fonksiyonunu gerçekleştirir. Bu protein bunun yerine enterik bakterilerde, Cd(II) ve Zn(II)'ye tolerans gösteren Zn(II) taşıyıcısı olarak görev yapar [59].

Spesifik metal iyonlarının bakteri hücrelerinde sitozolde birikimi ATP bağlayıcı taşıyıcı kasetleri ve NRAMP taşıyıcıları aracılığıyla olurken, bu metal iyonlarının

transportu (efflux) büyük oranda CDFs (kasyon difüzyonu kolaylaştırıcılar), P tipi ATPaz lar ve üçlü RND (resistance-nodulation-cell division) taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleşir. Bir çift örnek verilecek olursa Cu(I) ya da Mn(II) de metalinin sitozol içine alımından P tipi ATPazlar sorumlu tutulmuştur. *Lactobacillus plantarum*'daki MntA buna örnek verilebilir. Şekil 1.9'da Mn ve Zn taşıma sistemlerini örnekleyen sistemler gösterilmektedir.

Yüksek seviyelerdeki Zn'nin transportu P tipi ATPaz aracılığıyla ya da CDF taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan H<sup>+</sup> antiportu aracılığıyla gerçekleştirilir. CDF'nin en belirgin karakterize edilen üyesi *E.coli* de tanımlanmış olan YiiP'dir. Bu proteinin fonksiyonel homologları *E.coli* de ZitB, *Ralstonia metallidurans*, *S. pneumoniae* ve *B. Subtilis* te CzrD, *T. thermophilus* ve *S. aureus* ta CzrB'dir [60].



**Şekil 1.9.** Gram negatif bakterilere özgü metal homeostazi modeli [60]

Metal taşıyıcılarının her bir yapısal sınıfı çeşitli metalleri hücre içine ve dışına taşıma kabiliyetine sahiptir, fakat bazıları daha seçicidirler. Örneğin NRAMPs Mn ve Fe

taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır fakat ABC taşıyıcı proteinleri neredeyse tüm geçiş metalleri taşıma kapasitesine sahip şekilde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir .

ABC taşıyıcı sistemine ek olarak Mn (II)'nin bir diğer hücre içine alınma sistemi de NRAMP protein ailesinin üyesi olan MntH'dir. Son zamanlarda *S. pneumoniae*'de Mn (II)'de Mn akışını gerçekleştiren MntE tanımlanmıştır [60].

### **1.1.6. Çalışmanın Amacı**

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen ve şehrin endüstrileşmesi sonucu çevresel atıklara maruz kalan Kızılırmak'tan Mn ve Zn metalleri tolere eden suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Mn ve Zn metalleri tolere eden suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK değerleri belirlenmiş ve en yüksek MİK değerine sahip olan suşlar karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşlar morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Mn ve Zn dirençli her bir suş için çoklu antibiyotik ve çoklu metalli dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit DNA profilleri belirlenmiştir.



## **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, kullanımdan 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)'nden oluşmaktadır.

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

#### **2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler**

Mn ve Zn dirençli suşların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinde Çizelge 2.1'de gösterilen antibiyotik diskler kullanılmıştır.

**Çizelge 2.1.** Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>
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 suyla (pH: 8) 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 distile su ile solüsyon 100 mL'ye tamamlanmıştır.

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

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

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

242 g Tris, 37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O tartılarak 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tampon 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 distile suyla (pH: 8.0) tamamlanmıştır.

#### **2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 mL)**

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

#### **2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 mL)**

0.0384 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılarak, 5 mL gliserol ve 100  $\mu\text{L}$ , 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmış ve 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

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

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

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

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

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

96 mL kloroform, 4 mL izoamil alkol ile 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 kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

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

30 mL steril su ile 70 ml %100'lük ethanol karıştırılarak hazırlanmıştır.

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

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

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

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

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

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

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

### **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 çözülmüş ve HCl ile pH: 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

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

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

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

Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24.2 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, konsantre 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 alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 mL distile su içinde çözülür.

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

**Çizelge 2.3.** SDS-PAGE çalışma solüsyonları

<b>Çalışma Solüsyonları</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Solüsyon A %30 akrilamid %0.8 bisakrilamid (100mL)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100mL)	2 M Tris-HCl (pH = 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100mL)	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 tartılıp distile su ile 5 ml'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 µM) 3 g, glisin (192 mM) 14.4 g, SDS (% 0.1) 1 g tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH =8.3
ÖrnekTamponu (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-merkaptolanol, %1 Bromfenol mavisi 1 mL; 0.9 mL distile su. Buzdolabında saklanır.



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

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	7.8 mL
Solüsyon B (Stok)	6 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 boyası tartılarak, %12'lik glasiyal asetik asit ve %50'lik metanol ile karıştırılarak çözülür.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri, 41° 30' Kuzey, 36° 05' Doğu koordinatları arasındadır ve 1150 km'den uzun su yatağı, 75.000 km<sup>2</sup> drenaj alanı ve yıllık ortalama 184.2 m<sup>3</sup>/s debisi ile Türkiye'nin en uzun nehri olup Kızılırmak Deltası'nı geçerek Karadeniz'e ulaşmaktadır [61].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu [62]

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ili'nde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [25].

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

<b>Bölge No</b>	<b>Bölge Adı</b>	<b>Bölge Koordinatları</b>
1	Kesikköprü Barajı Girişi	39° 23' 53,41''K, 33°25' 18,44 D, 775m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98''K, 33° 24' 56,99 D, 819,5m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60''K, 33° 23' 25,53 D, 781m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39''K, 33° 24' 00,99 D, 801m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39° 32' 26,97''K, 33° 23' 59,54 D, 760m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02''K, 33° 24' 38,51 D, 750,5m
7	Sulubük - Kıybağı Mevkii	39° 37' 04,85''K, 33° 26' 11,19 D, 771m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39'42,39''K, 33° 27' 13,46 D, 766,5m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62''K, 33° 28' 59,95 D, 741m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08''K, 33° 27' 42,27 D, 718,5m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92''K, 33° 28' 07,85 D, 706,5m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25''K, 33° 25' 04,24 D, 699,5m

### 2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen ve Çizelge 2.6'da gösterilen 12 istasyondan Kasım 2009'da su örnekleri toplanmıştır.

### 2.2.3. Mangan ve Çinkoya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu

Mn ve Zn ağır metallerine dirençli suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Mn ve Zn dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı  $MnSO_4$  ve  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ağır

metallerini içeren NA ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir. 37°C’de 48 s inkübe edilen örneklerden üreme olan Mn ve Zn dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

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

Mn ve Zn dirençli saf kültürler 37°C’de 48 s inkübe edilerek koloni morfolojisine, ve hücre morfolojisi özelliklerine bakılmıştır. Suşların koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojileri ise, gram boyamayla mikroskop (immersiyon yağıyla ve 100 büyütme objektifle) altında incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

#### **2.2.5. Mangan ve Çinko Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi**

Mn ve Zn ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda  $MnSO_4$  ve  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  eklenerek saptanmıştır. 37°C’de 48 s inkübe edilmiştir ve üreme olan petrilereki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki ayrı ayrı Mn ve Zn metalleri bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 s sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

#### **2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması**

Kırıkkale-Kızılırmak’tan Mn ve Zn dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiştir ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiştir ve API 20 kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Bu sonuçlara göre suşlar tanımlanmıştır [63,64].

### **2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi**

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

Mn dirençli suşların, çoklu metal direnç profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Cd, Al, Li, Ba, Cr, Pb, Sr, Fe, Cu, Sn, Ag, Zn, Hg, Sb, ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. 37°C'de 48 s inkübe edilmiştir ve üreme olan suşların ortama eklenen metale karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Zn dirençli suşta ise Mn dirençli suşlarda kullanılan metod uygulanmıştır.

Mn ve Zn dirençli suşların antibiyotik direnç profilini belirlemek için bu metalleri içermeyen NA besiyeri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerine Çizelge 2.1'de belirtilen antibiyotik diskleri uygulanmış 37°C 48 s inkübe edilmiştir. Disk etrafında zon görülmesi o antibiyotiğe duyarlı olduğu, zon görülmemesi durumunda dirençli olduğu tespit edilmiştir.

### **2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

MİK değerleri belirlenen Mn ve Zn metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Mn ve Zn metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Kültürler 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD<sub>600</sub> nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

### 2.2.9. Plazmit İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [65]. Plazmit izole edilecek bakterilerin, 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda  $MnSO_4$  ve  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır.  $37^\circ C$ '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  $\mu L$  GTE (glukoz/ tris/ EDTA) ilave edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200  $\mu L$ , 0.2 N NaOH/ %1 SDS solüsyonun üzerine ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 150  $\mu L$ , 3M 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  $\mu L$  tüplere konulmuş ve  $-20^\circ C$ '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 atılmıştır ve pellet üzerine 20  $\mu L$  su ve 5  $\mu l$  boya ilave edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

### 2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzole edilen Mn ve Zn dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [66] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. 15 ml'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 5.7 ml TE tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30  $\mu L$  %10 SDS, 30  $\mu L$  proteinaz K ve RNAaz eklenerek 60 dakika  $37^\circ C$  inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra 100  $\mu L$  5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800  $\mu L$  CTAB/NaCl tamponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika  $65^\circ C$ 'de tekrar inkübe edilmiştir. Kloroform/ izoamil alkol solüsyonu ekleyerek 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/ kloroform/ izoamilalkol

tamponu eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13000 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 uzaklaştırılmıştır ve pellet kurutularak 200 µL TE tamponu eklenmiştir ve -20°C’de saklanmıştır.

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

%1.5’luk 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 kutusuna dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice ayrılmıştır. 20-25 µL’lik miktarlarda DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet ile örnek çukurlarına yüklenmiştir. Separe edilen plazmitlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacı ile jeldeki çukurlardan birine 3 µL marker DNA (Sigma Lambda DNA Hind III ready to use solution) yüklenmiştir. Jel agaroz aparatına yerleştirilmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu konulmuştur. 100 V/cm<sub>2</sub> 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 tamamlanınca jel elektroforez aparatından 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 MgSO<sub>4</sub> solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Jel daha sonra U.V. transillüminatör üzerine konularak fotoğrafları çekilmiştir [67].

### **2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA/HindIII marker referans alınmış, ve jel üzerinde marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların molekül ağırlıkları değerleri ile standart eğri çizilmiştir ve bu metod ile bilinmeyen DNA bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

### **2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmid Curing)**

İzole edilen Mn dirençli ve Zn dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılmıştır [68]. Mn11 kodlu suşun üreme sıcaklığı 37°dir. Plazmit eliminasyon çalışmalarında NB besiyerine ekimi yapılan Mn dirençli suş için en yüksek denenen sıcaklık 43°C olup, bu sıcaklıkta üremediği gözlemlenmiştir. 42°C denenmiş ve bu sıcaklıkta üreme olduğu gözlemlenmiş olup Mn içeren ve içermeyen 2 farklı NA besiyeri hazırlanmış ve 42°C'de üreyen Mn dirençli suştan ekim yapılmış, 37°C'de 48 s inkübe edilmiştir.

### **2.2.15. Total Protein İzolasyonu**

Mn ve Zn metallerine dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [69] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda MnSO<sub>4</sub> ve ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 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 eklenmiş ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır. 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 [70] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Dış membran proteinleri izole edilecek bakteriler metal içermeyen ve belirlenen konsantrasyonlarda,  $MnSO_4$  ve  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun bulunduğu 100 mL NB besiyerlerine ekilmiştir. Kültürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 10 mL, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 4°C'de 3000 rpm'de, 20 dakika, santrifüj yapılarak uzaklaştırılmış ve süpernatant temiz tüplere alınarak 4°C'de 20.000 rpm, 60 dakika, santrifüj edilmiştir. Pelletler üzerine 150 µL distile su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örnekler 200 µL Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de, 90 dakika, 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pelletler üzerine 50 µl tampon eklenmiş ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

### **2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Dış membran ve total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla PageRuler Plus Prestained Protein Ladder referans alınarak, her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuş ve bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

Dış membran ve total protein Laemmli'ye [71] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

### **2.2.18.1. Ayrırma Jelinin Hazırlanışı**

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 polimerize olması için bekletilmiştir.

### **2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı**

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 Jellerinin 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 dk'lık

aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [72]. 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 [73].

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Mangan ve Çinko Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden Mn ve Zn dirençli suşlar izole edilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi Mn’ye dirençli 9 ve Zn’ye dirençli 8 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. Mn için MİK değeri 1000 mg/L olan iki suş (Mn11 ve Mn12), Zn için ise MİK değeri 825 mg/L olan bir suş (Zn01) karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Mn ve Zn dirençli suşların izole edildiği bölgeler

İzolasyon Bölgeleri ve Bakteri Üreme Durumları												
Ağır metaller	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mn	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Zn	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(-), negatif; (+), pozitif

#### 3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2’de Mn ve Zn dirençli suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek tanımlanması yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.** Mn ve Zn dirençli suşların biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Özellikler	Mangan Dirençli Suş		Çinko Dirençli Suş
	Mn11	Mn12	Zn01
Şekil	Basil	Basil	Basil
Gram Reaksiyon	(-)	(-)	(-)
Akışkanlık	Akışkan	Akışkan	Mukoid
Optik Özellikler	Opak	Opak	Saydam
Pigment	Yok	Yok	Beyaz
DP300 (DP3)	+	-	-
Üre (URE)	-	-	-
Malonat (MLT)	+	-	-
İnositol (INO)	+	-	-
Arabinoz (ARA)	-	-	-
Sitrat (CIT)	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	-	-
Adonitol (ADO)	+	-	-
Glukoz (GLU)	+	-	-
Malonat (MAL)	-	+	+
Ksiloz (XYL)	-	+	+
Arjinin (ARG)	-	-	-
Asetamin (ACE)	-	-	-
TDA (TDA)	-	-	-
Rafinoz (RAF)	-	-	-
Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S)	-	-	-
Lizin Dekarboksilaz (LYS)	+	-	-
Eskülin (ESC)	-	-	-
Polimiksin B (PXB)	+	-	-
Sorbitol (SOR)	+	-	-
ONPG (ONP)	-	-	-
Ornitin (ORN)	+	-	-
Plant indican (PLI)	-	-	-
Laktoz % 10 (LAC)	-	+	+
Sükroz (SUC)	+	-	-
Ramnoz (RHA)	-	-	-
Oksidaz (OXI)	-	-	-
<b>Tanımlanan Türler</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>

(-), negatif; (+), pozitif

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi Mn dirençli Mn11 ile Mn12 kodlu suşların sırasıyla Gram negatif basil olan *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* olduğu belirlenmiştir. Zn dirençli Zn01 kodlu suşun ise yine Gram negatif basil olan *Acinetobacter haemolyticus* olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Mn’ye dirençli

her iki suşun da sitrat pozitif olduğu tespit edilmiştir. Zn dirençli suşun ise sitrat, malonat, ksiloz ve laktoz pozitif olduğu belirlenmiştir.

### **3.3. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri**

Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşları ile Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

#### **3.3.1. Mangan Dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* Suşlarının Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri**

Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi Al, Li, Ba, Pb, Fe, Ag, Cu, Sn, Ni, Zn, Sb, Sr gibi metallere karşı çoklu direnç gösterdiği, Hg, Cd, Cr, Co metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının çoklu metal dirençlilik profili

Kullnılan Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili	
		<i>Serratia marcescens</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	195	S	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	R	R
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	R	R
FeCl <sub>3</sub>	450	R	R
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	R	R
K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1400	R	R
AgNO <sub>3</sub>	8	R	R
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	750	S	S
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	160	R	R
LiCl	5000	R	R
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	R	R
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	R	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	1050	S	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R	R
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	395	R	R
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	750	S	S

R, dirençli; S, duyarlı

Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi *Serratia marcescens*'in ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam gibi antibiyotiklere; *Acinetobacter haemolyticus*'un ise aztreonam, ceftazidime, gentamisin, oxacillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam ve trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının antibiyotik dirençlilik profili

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

R, dirençli; S, duyarlı

### 3.3.2. Çinko Dirençli *Acinetobacter haemolyticus* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profili

Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi Mn, Ag, Cu, Sn, Li, Al, Ba, Sr ve Ni gibi metallere karşı çoklu direnç gösterdiği, Hg, Pb, Fe, Co, Cd, Sb, Cr metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.



**Çizelge 3.5.** Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

<b>Kullanılan Metal Formu</b>	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>	<b>Dirençlilik Profili</b>
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	195	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	S
MnSO <sub>4</sub>	1000	R
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	750	S
FeCl <sub>3</sub>	450	S
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	450	R
K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1400	S
AgNO <sub>3</sub>	8	R
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	750	S
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	160	R
LiCl	5000	R
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	300	R
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2700	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	1050	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R
NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	395	R

R, dirençli; S, duyarlı

Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi gentamicin, pefloxacin, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

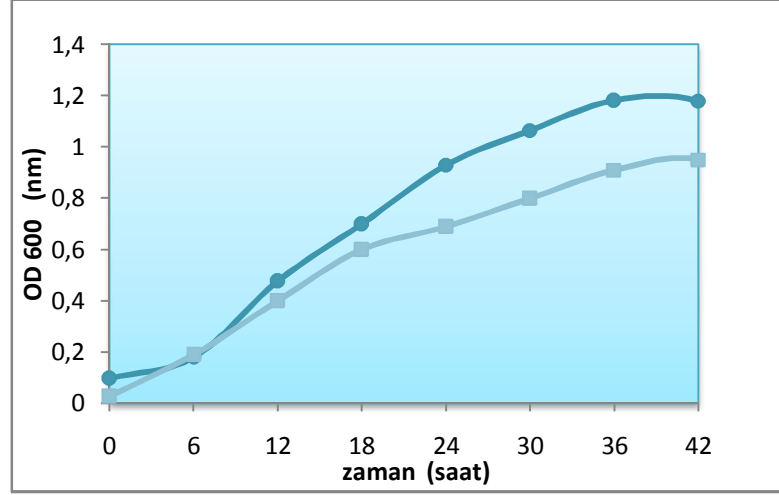
<b>Antibiyotikler (µg/disk)</b>	<b>Dirençlilik Profili</b>
Amikacin (30)	S
Amoxycilli/CA (20/10)	S
Ampicilin (10)	S
Aztreonam (30)	S
Bacitracin (10)	S
Cefepime (5)	S
Ceftazidime (30)	S
Ciprofloxacın (5)	S
Chloramphenicol (30)	S
Gentamicin (10)	R
Erythromycin (15)	S
Imipenem (10)	S
Netilcimin (30)	S
Oxacillin (1)	S
Pefloxacın (5)	R
Penicillin (10)	S
Piperacilin (100)	S
Piperacilin/Tazobactam (100/10)	S
Rifampin (5)	S
Sulbactam/CFP (75/30)	S
Tetracycline (30)	S
Ticarcillin (75)	S
Ticarcillin/CA (75/10)	S
Trimeth sulfa(25)	R
Tobramycin (10)	S
Vancomycin (30)	S

R, dirençli; S, duyarlı

### 3.4. Bakteri Üreme Eğrileri

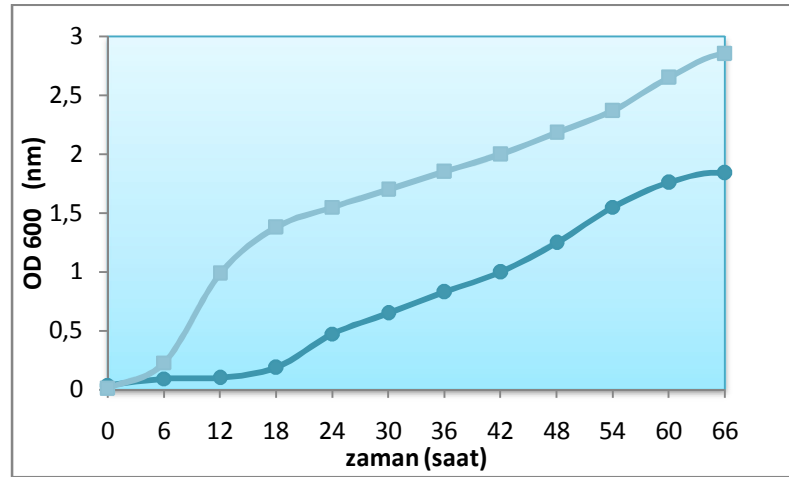
#### 3.4.1. Mangan Dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* Suşlarının Üreme Eğrileri

Mn dirençli *Serratia marcescens* suşunun elde edilen üreme eğrisi Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu suşun Mn içeren ortamda yaklaşık 12. saatten itibaren logaritmik fazında artış olduğu görülmektedir. Mn varlığı OD’de artışa neden olmuştur. Bu sonuç bize *Serratia marcescens* suşunun Mn’yi; metabolize ettiğini göstermektedir.



**Şekil 3.1.** *Serratia marcescens* suşunun Mn içeren ( —●— ) ve Mn içermeyen ( —■— ) ortamdaki üreme eğrisi

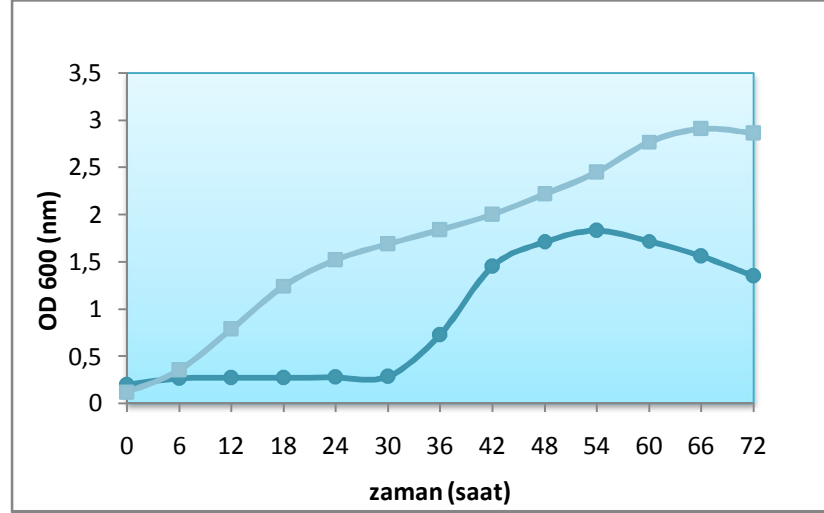
Mn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun elde edilen üreme eğrisi Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Bu suşun Mn içeren ortamda logaritmik faza yaklaşık 12 saat geç girdiği görülmüştür. Mn içeren ve içermeyen ortamdaki üreme grafiğine bakıldığında, metalli ortamın belirgin şekilde bakterinin üremesini etkilediği görülmektedir.



**Şekil 3.2.** *Acinetobacter haemolyticus* suşunun Mn içeren ( —●— ) ve Mn içermeyen ( —■— ) ortamdaki üreme eğrisi

### 3.4.2. Çinko Dirençli *Acinetobacter haemolyticus* Suşunun Üreme Eğrisi

Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun elde edilen üreme eğrisi Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Bu suşun Zn içeren ortamda yaklaşık 24 saat sonra log fazına girdiği görülmektedir. Ayrıca metal içeren ortamda, metal içermeyen ortama göre yaklaşık 16 saat daha erken ölüm fazına geçmesi Zn'nin toksik etkisini göstermektedir.



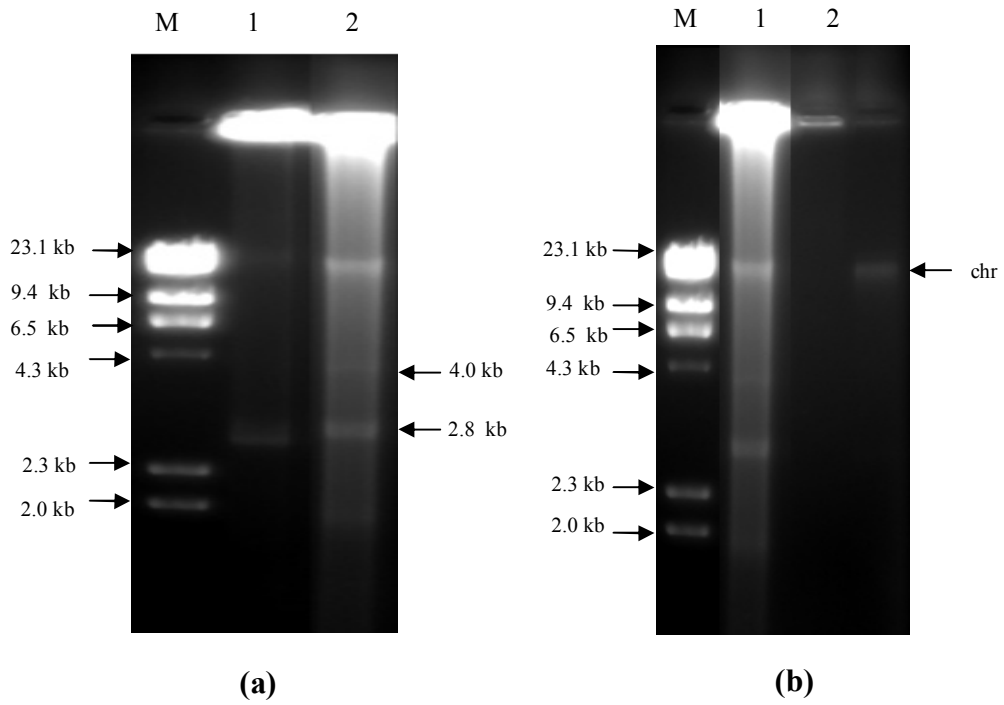
Şekil 3.3. *Acinetobacter haemolyticus* suşunun; Zn içeren (—●—) ve Zn içermeyen (—■—) ortamdaki üreme eğrisi

### 3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Mn ve Zn dirençli suşların metal dirençliliği ile bu suşların plazmit içerikleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerde plazmit izolasyonu ve eliminasyonu çalışmaları yapılmıştır.

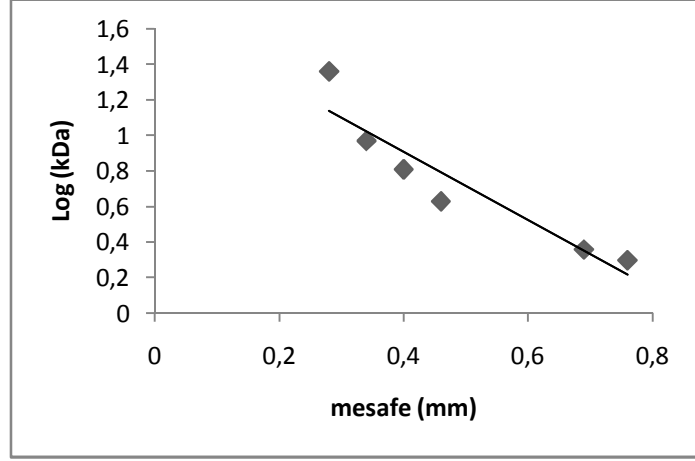
### 3.5.1. Mangan Dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* Suşlarının Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Mn dirençli *Serratia marcescens* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Her bir jel için ayrı ayrı elde edilen ve Şekil 3.4’de bir örneği gösterilen standart eğri ile moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit DNA’ların moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. *Serratia marcescens*’te Mn içeren ve içermeyen her iki ortamda da sırasıyla 2.0, 2.8 ve 4.0 kb büyüklüğünde küçük molekül ağırlıklı 3 adet plazmit varlığı gösterilmiştir (Şekil 3.5). Plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında *Serratia marcescens* suşunun tüm plazmitleri elimine edilmiştir. Plazmit eliminasyonu yapılan suшта metal ve antibiyotik dirençlilik profillerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda metal ve antibiyotik direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir.



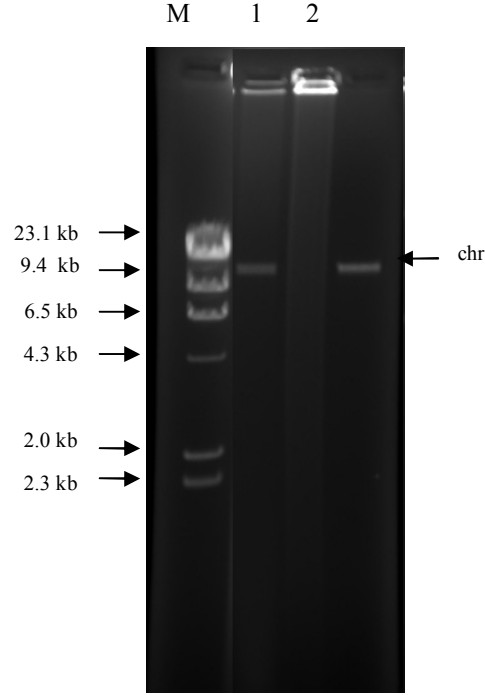
**Şekil 3.4.** *Serratia marcescens* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

- (a) 1; Mn içermeyen, 2; Mn içeren ortam,  
(b) 1; plazmit DNA eliminasyonu öncesi, 2; plazmit DNA eliminasyonu sonrası,  
chr; kromozomal DNA, M; marker (Lambda DNA HindIII),



**Şekil 3.5.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

Mn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi *Acinetobacter haemolyticus*'ta Mn içeren ve içermeyen ortamda herhangi bir plazmit varlığı tespit edilememiştir. Bundan dolayı çoklu metal ve antibiyotik direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

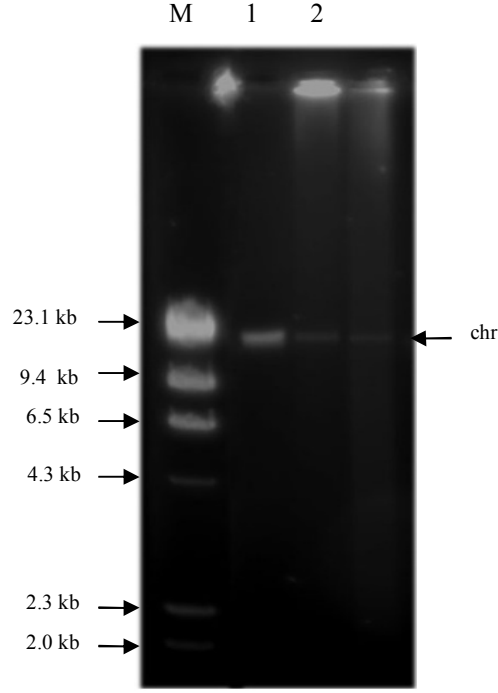


**Şekil 3.6.** *Acinetobacter haemolyticus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

1; Mn içermeyen, 2; Mn içeren ortam, chr; kromozomal DNA, M; marker (Lambda DNA HindIII)

### 3.5.2. Çinko Dirençli Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Çinko dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.7’de gösterildiği gibi *Acinetobacter haemolyticus* ta Zn içeren ve içermeyen ortamda herhangi bir plazmit varlığı tespit edilememiştir. Bundan dolayı çoklu metal ve antibiyotik direnç genlerinin bu suşta da kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.7.** *Acinetobacter haemolyticus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

1; Zn içermeyen, 2; Zn içeren ortam, chr; kromozomal DNA , M; marker (Lambda DNA HindIII)

### 3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili

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

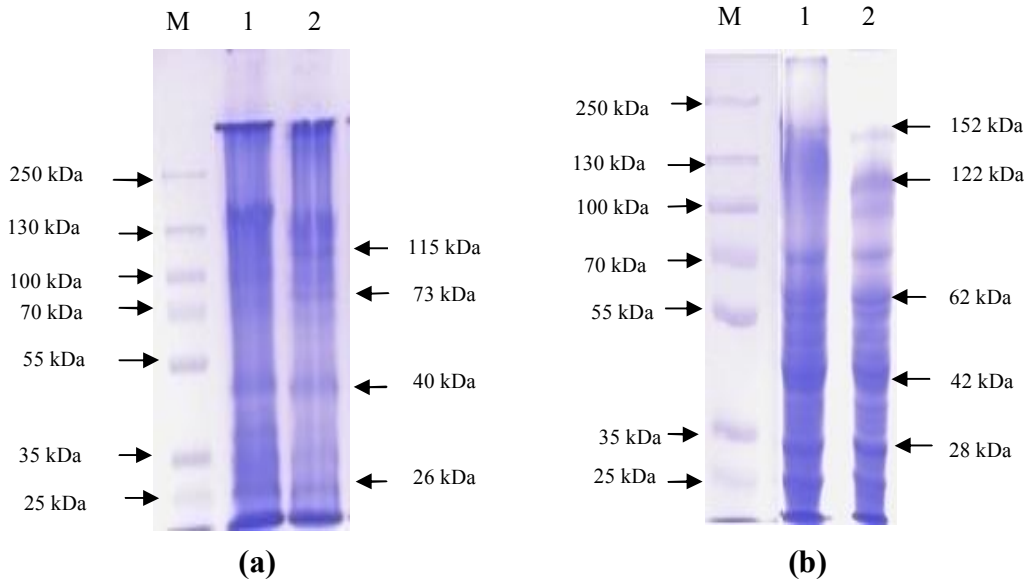
#### 3.6.1 Mangan Dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus*

##### Suşlarının Total ve Dış Membran Protein Profili

Mn dirençli *Serratia marcescens* suşunun dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir (Şekil 3.8). Şekil 3.9’da bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein analizleri sonucunda *Serratia marcescens*

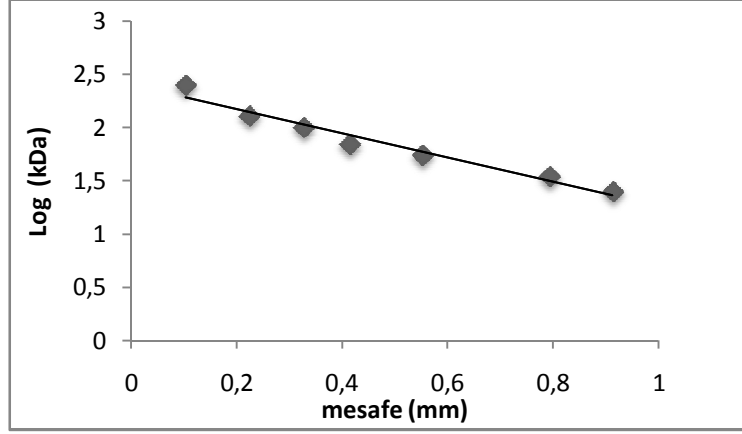


suşunun 115 ve 72 kDa büyüklüğündeki bantların Mn içermeyen ortamda ekspresse olmayıp, sadece Mn içeren ortamda ekspresse olduğu tespit edilmiştir. Dış membran protein profilleri incelendiğinde de Mn içeren ortamda; 62 kDa'luk bantta 3,42 kat ekspresyon artışı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bu suşun metal içeren ortamda hem total hem de dış membran proteinlerinin metal dirençliliğinde etkin olduğunu göstermektedir.



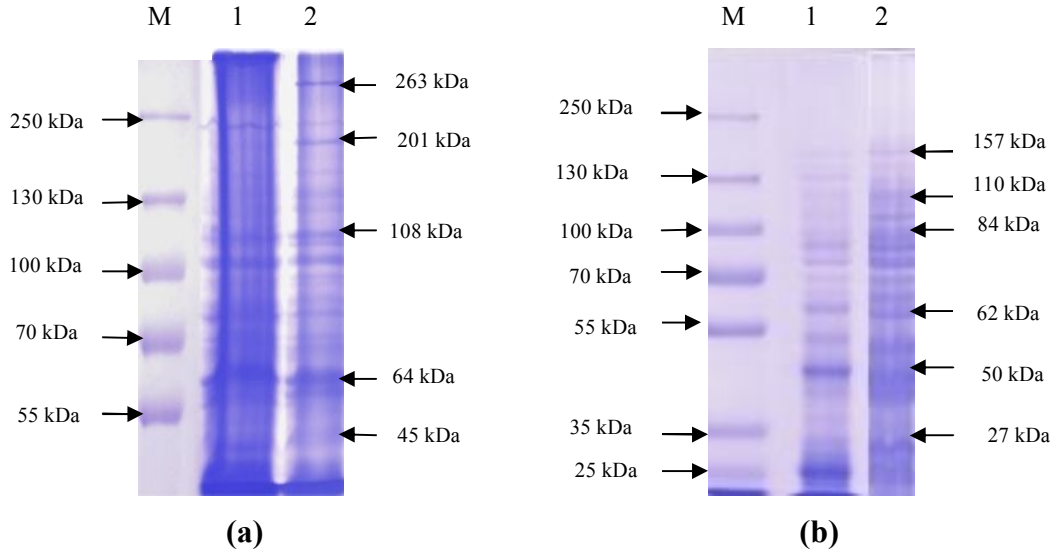
**Şekil 3.8.** Mn dirençli *Serratia marcescens* suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri

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

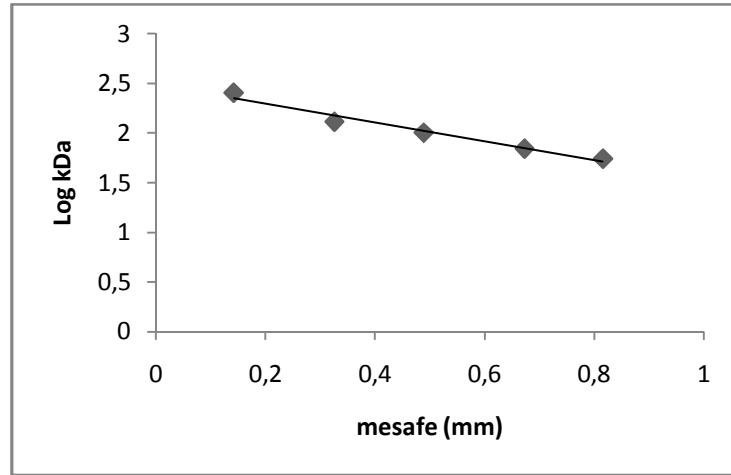


**Şekil 3.9.** Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

Mn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir (Şekil 3.10). Şekil 3.11’de bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre total protein analizi incelendiğinde 263 ve 201 kDa’luk bantlar metal içermeyen ortamda eksprese olmazken, metal içeren ortamda eksprese olmuşlardır. Ayrıca 250 kDa’luk bantın ekspresyonunda metal içeren ortamda 1.6 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Dış membran proteinlerinin neredeyse tamamının ekspresyonu metal içeren ortamda bariz artış göstermiştir. Bu sonuçlar bu suşunda metal dirençliliğinde hem total hem de dış membran proteinlerinin aktif olduğunu göstermiştir.



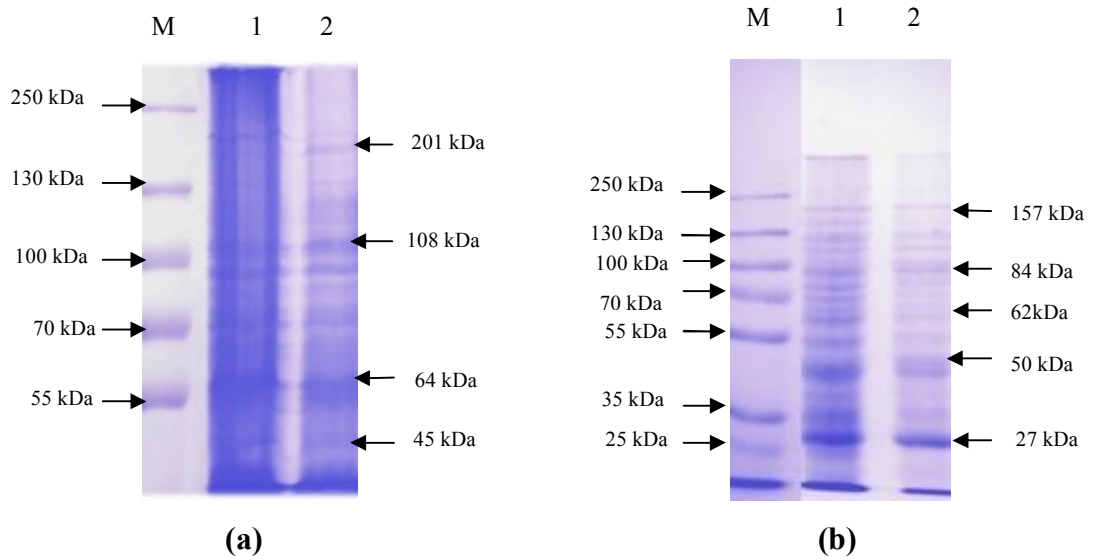
**Şekil 3.10.** Mn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri  
M; marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 1; Mn içermeyen 2; Mn içeren ortam



**Şekil 3.11.** Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

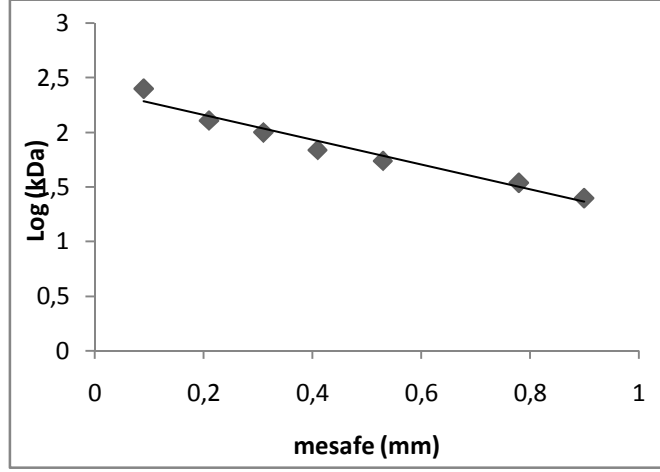
### 3.6.2. Çinko Dirençli *Acinetobacter haemolyticus* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profili

Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir (Şekil 3.12). Şekil 3.13'te bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein profilinde 201 kDa'luk bandın metal içermeyen ortamda eksprese olmazken, metal içeren ortamda ise eksprese olduğu tespit edilmiştir. Dış membran proteinlerinin ekspresyonunda ise metal içeren ortamda 50 kDa'luk bantta 1.7 kat artış, 62 kDa'luk bantta ise 4.8 kat azalış tespit edilmiştir. Böylece total ve dış membran proteinlerinin bu suşun Zn dirençliliğinde etkin olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.12** Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri

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



**Şekil 3.13.** Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

#### 4. TARTIŞMA – SONUÇ

Kırıkkale-Kızılırmak'ta endüstriyel atıkların karışma olasılığının bulunduğu 12 istasyondan örnek toplanmış, bu bölgelerin dokuzundan MİK değeri 1000 mg/L Mn dirençli bakteriler 11. ve 12. bölgeden izole edilmişlerdir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenen bu suşlar sırasıyla *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. MİK değeri 825 mg/L Zn dirençli olan ve 1. bölgeden izole edilen diğer bir suşta morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak *Acinetobacter haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Mn ve Zn dirençli bakterilerin çoklu-metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri de incelenmiştir. 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 edilmiştir. Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun ise Mn, Ag, Cu, Sn, Li, Al, Ba, Sr ve Ni metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. 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 gösterdiği tespit edilmiştir. Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun ise gentamicin, pefloxacin, trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir.

*Serratia marcescens*, Enterobacter familyasına ait Gram negatif, basil bir bakteridir. ve doğada özellikle sucul ortamlarda sıklıkla üreme gösterir. *Serratia marcescens*, endokardit, septisemi, menenjit gibi birçok rahatsızlığa sebep olmaktadır [74].

İzole edilen diğer bakteri *Acinetobacter*'ler ise doğada, toprak ve sularda yaygın olarak bulunurlar. Fırsatçı patojen *Acinetobacter* türleri hastane ortamına yerleşerek, hastanede yatan ve immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli hastane enfeksiyonlarına neden olurlar. Ayrıca yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* cinsi bakteriler, en sık etken Gr (-) basiller arasında üçüncü sırada ve % 18.2 oranında saptanmıştır [38].

Bhadra ve arkadaşları [75] tarafından yapılan çalışmada Torsa Nehri'nden elde edilen izolatlardan Zn ve Ni direnci olanların; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Moraxella* cinslerine ait olduğunu göstermişlerdir. Tür düzeyinde yapılan çalışmalar sonucu ise bu bakterilerin *Acinetobacter haemolyticus* ve *Serratia marcescens* olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımıza benzer niteliktedir. Çin Xiangtan'da Mn atıklarının bulunduğu bölgede *Chenopodium album* L. bitkisinin rizosferinden Mn'ye dirençli bakteriler izole edilmiş ve *Serratia marcescens* olarak tanımlanmıştır [76]. Zakaria ve arkadaşları [77] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ağır metalle kontamine olmuş atıksulardan *Acinetobacter haemolyticus* suşu izole etmiş, As, Cd, Zn ve Cr için MİK değerlerini sırasıyla 700, 400, 200, 70 mg/L olarak bulmuşlardır. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda Zn için elde edilen MİK değerinin daha yüksek olduğu dikkat çekicidir. Bu durum izolasyonların yapıldığı bölgelerdeki bakterilerin Zn tolere etme yeteneklerinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Piotrowska-Seget ve arkadaşları [78] maden atıklarının bol olduğu Polonya Katowice bölgesinde 288 mg/L Zn ve 1233 mg/L Cu direnci olan *Pseudomonas gladioli* suşunu izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Çin'in Jiangsu eyaletinde Pb-Zn madeni yakınlarından çoklu metal direnci gösteren bir suş olan *Cupriavidus metallidurans* izole edilmiş ve bu suşun  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  metallere karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu suşun  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  metalleri için MİK değerleri sırasıyla 254, 582, 1000, 788, 874, 1000 mg/L olarak bulunmuştur [79].

Choudhary ve arkadaşları [80] tarafından yapılan bir çalışmada uranyum maden atıklarından, uranyum ve diğer çeşitli metallere karşı direnç gösteren bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Serratia* türlerini içerdiği belirtilmiştir. *Serratia* sp.'nin de ve Zn için belirlenen MİK değerinin 72 mg/L olarak belirtilmiştir.

Bir diğer çalışmada endüstriyel kirli sularla sulanan tarım topraklarında yüksek düzeyde Fe, Cr, Cu, Zn, Ni ve Cd ağır metalleri analiz edilmiş, bu topraklardan elde edilen 40 bakteri izolatından 17 tanesinin *Enterobacteriaceae* familyasına ait, 10

tanisinin ise *Pseudomonas* sp. olduğu gösterilmiştir [81]. MİK değerleri ise Cd için 200, Zn ve Cu için 400, Ni için 800, Pb için 1600 mg/L olarak belirlenmiştir.

Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atıksularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. İlgili endüstri kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenic ve gümüş gibi metal iyonlarını ihtiva etmektedir. Etkili bir arıtım yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz, okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemleri ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır. Ayrıca, arıtım sistemlerinde hiçbir zaman parçalanamayan 'bu tür rekalsitrant maddeler, temel arıtımda etkin olan; özellikle biyolojik arıtım süreçlerinde önemli rolü bulunan mikroorganizmalar için de çok küçük miktarlarında bile toksik etki yaptığı için arıtımın gerçekleşmediği görülmektedir. Metal ihtiva eden çevrelerdeki selektif baskılar, tüm toksik metallere karşı belli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır [82]. Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. [83,84]. Bir antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu kemoterapötik maddeye yapıca veya etki tarzı bakımından yakın diğer antibiyotiklere karşı da direnç gelişebilir, bu duruma çapraz direnç (cross resistance) denir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise çok ilaca dirençlilik (multiple-drug resistance) denir [85]. Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal dirence sahip olabildikleri gibi, kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da direnç geliştirebilmektedirler. Direnç gelişiminde enzim üretimi, bağlanma noktalarının modifikasyonu, membran geçirgenliğinin bozulması ve pompa mekanizması gibi çeşitli mekanizmalar sıklıkla bir arada rol oynamaktadır. Enzim üretimine bağlı direnç gelişimi beta-laktam, aminoglikozid ve kloramfenikol grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Bağlanma noktalarının modifikasyonu penisilin, kinolon, makrolid ve tetrasiklin grubuna karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Membran geçirgenliğinin bozulması sonucu beta-laktam, penisilin, kinolon grubuna karşı



direnç gelişebilmektedir. Pompa mekanizması ise karbapenem, kinolon, tetrasiklin ve makrolidlere karşı dirençte önem kazanmıştır.

Wright ve arkadaşları [86] yaptıkları çalışmada As, Cu, Mn, Zn, Co ve Ag metallerine karşı çoklu direnç gösteren suşların aynı zamanda ciprofloxacın, tetrasiklin, kloromfenikol ve ̢-lactam antibiyotiklerine de karşı da çoklu direnç geliştirdiklerini tespit etmişlerdir. Bakterilerdeki metal ve antibiyotik dirençliliğinin ortak direnç mekanizmaları ile kazanıldığı da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [86]. Bizim bulgularımızda bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Ajithkumar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [87], Saku'da evsel atıksu arıtma tankından izole edilen *Serratia marcescens* bakterisinin tetrasiklin, eritromisin, polimiksin, linkomisin, benzilpenisilin antibiyotiklerine dirençli; kloromfenikol, gentamisin, kanamisin, streptomisin ve karbenisilin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Diğer Enterobakterler ve Gram negatif bakterilerden farklı olarak bu bakterinin spor oluşturduğu görülmüştür ve *Serratia marcescens*'ten farklı olarak isimlendirilmesi gerektiği anlaşılmıştır. 2003 yılında tanımlanan bu bakteriye *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* adı verilmiştir.

Mn ve Zn dirençliliğinin plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkisini belirlemek amacı ile Mn ile Zn dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Mn dirençli *Serratia marcescens* suşunun Mn içeren ve içermeyen her iki ortamda da sırasıyla 2.0, 2.8 ve 4.0 kb boyutunda 3 tane kk moleküler ağırlıklı plazmit bulundurduğu tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu ile tüm plazmitleri elimine edilen *Serratia marcescens* suşunun metal ve antibiyotik dirençlilik profillerinde bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Diğer taraftan Mn ve Zn dirençli her iki *Acinetobacter haemolyticus* suşu ile yapılan çalışmalar sonucu herhangi bir plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda her üç suş içinde Mn ve Zn direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Xiong ve arkadaşlarının [88] yaptığı çalışmada çoklu metal dirençliliği gösteren *Comamonas testosteroni* S44 suşunun yüksek konsantrasyonda Zn<sup>+2</sup> (10mM)

dirençliliği gösterdiği tespit edilmiştir.  $Zn^{2+}$  dirençliliğinin yanı sıra  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  dirençliliği de görülmüştür. *C. testosteroni*'de bu direncin  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  RND tipi  $Co^{2+}/Cd^{2+}/Zn^{2+}$  efflux pompası tarafından kromozomal DNA üzerinde kodlandığı tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada çoklu metal dirençliliği gösteren ( $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Tl^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $CrO_4^{2-}$ ) *Cupriavidus metallidurans* CH34 (*Ralstonia metallidurans* CH34) suşunun bu dirençten sorumlu olan iki megaplazmit içerdiği tespit edilmiştir [89].

Co, Zn, Cd, metallerine dirençliliği araştırılan *Alcaligenes eutrophus* suşunun iki plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Bu plazmitlerden biri 163 kb ağırlığındaki Ni, Hg ve Co dirençliliğinin bulunduğu pMOL28 plazmiti, diğerinin ise 238 kb ağırlığındaki Zn, Cd, Hg ve Co dirençliliğinin bulunduğu pMOL30 plazmiti olduğu tespit edilmiştir [90].

Özer [91], Kızılırmak'daki ağır metaller üzerine yaptığı çalışmada MİK değeri 8 mg/L olan Ag'ye dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları ile MİK değeri 2000 mg/L olan Sr'ye dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarını izole etmiştir. Aynı zamanda çoklu metal dirençlilik profillerine bakılmıştır. Ag dirençli suşlar Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine direnç gösterirken, Sr dirençli suşlar Al, Li, Ba, Ni metallerine direnç göstermiştir. Ag dirençli *Pseudomonas putida* suşunun Ag dirençlilik genlerinin plazmit DNA üzerinde olduğu, *Klebsiella pneumoniae* suşunun ise kromozomal DNA üzerinde olduğunu tespit edilmiştir. Sr dirençli *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens* suşlarının ise metal dirençliliği kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının total ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. *Serratia marcescens*'in total protein profili incelendiğinde 115 ve 72 kDa büyüklüğündeki bantların Mn içermeyen ortamda ekspresse olmayıp, Mn içeren ortamda ekspresse olduğu görülmüştür. *Serratia marcescens*'in dış membran protein profili incelendiğinde ise 42 ve 62 kDa'luk bantların ekspresyonunda farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Metal içeren ortamda 62 kDa'luk bantta 3.0, 42 kDa'luk bantta 1.8, 28

kDa'luk bantta 2.3 ve 25 kDa'luk bantta ise 1.9 kat artış meydana geldiği belirlenmiştir. Bu suşun metal içeren ortamda hem total hem de dış membran proteinlerinin metal toleransında etkin olduğunu göstermektedir..

Mn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun total protein analizi sonucunda 263 ve 201 kDa'luk bantların sadece metal içeren ortamda ekspresse oldukları belirlenmiştir. Ayrıca metal içeren ortamda 250 kDa'luk bandın ekspresyonunda 1.6 kat azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Dış membran proteinlerinin metal içeren ortamda daha etkin ekspresse oldukları belirlenmiştir. Bu suş içinde total ve dış membran proteinlerinin metal dirençliliğinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir.

Zn dirençli *Acinetobacter haemolyticus* suşunun da dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir. Total protein profilinde 201 kDa'luk bandın sadece metalli ortamda ekspresse olduğu belirlenmiştir. Dış membran proteinlerinin ekspresyonunda ise metal içeren ortamda metalsiz ortama göre 50 kDa'luk bantta 1.7 kat artış olmasına karşın, 62 kDa'luk bantta 4.8 kat azalma belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında total ve dış membran proteinlerinin her ikisinin birden bu suş için Zn direncinde etkin rol oynadığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Serratia marcescens*'te moleküler ağırlıkları sırasıyla 42, 40 ve 39 kDa olan 3 adet dış membran proteini izole edilmiş ve Omp1, Omp2, Omp3 olarak adlandırılmıştır [92]. Bu proteinlerden Omp1'in önemli oranda bakteriyel dirence katkısı olmasına rağmen bu porinden yoksun mutantlarda duyarlılığın azaldığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda metal içeren ortamda 42 kDa'luk dış membran proteinin ekspresyonundaki artış bu çalışmanın sonucuyla paralellik göstermektedir. Omp 1,  $\beta$  laktam, aminoglikozit, tetrasiklin ve kloromfenikol gibi küçük hidrofilik bileşiklerin hücreye alınmasına neden olan porin olarak tanımlanmıştır. Bu yüzden bu proteinin yokluğunda bu antibiyotiklere direnç sağlanmaktadır [74].

Turalı [93], Kırıkkale-Kızılırmak'da bulunan Cu dirençli *Pseudomonas putida* ve Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşlarının total protein analiz çalışmaları ile Cr ve Cu dirençli suşların metal varlığında total protein ekspresyonun arttığını tespit etmiştir. Özer [91], yapmış olduğu çalışmada Ag'ye dirençli *Pseudomonas putida* ve

*Klebsiella pneumoniae* suşları ile Sr'ye dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının total ve dış membran protein analizleri yapılmıştır. Metal varlığı Ag ve Sr'nin total ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunda bir artış göstermiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları yapılarak dış membran ve total proteinlerinin ekspresyonlarında bir azalış olduğu tespit edilmiştir.

Aktan [94], Kızılırmak'dan izole ettiği kurşun dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun total protein analiz sonuçları kurşun varlığında bazı proteinlerin ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen mangan ve çinko dirençli suşlar biyokimyasal ve genetiksel özellikleri bakımından incelenmiştir. Biyokimyasal özellikler esas alınarak mangan ve çinko dirençli suşlar tanımlanmıştır. Tanımlanan bu suşların çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Genetiksel karakterizasyon çalışmalarında plazmit DNA, kromozomal DNA, total ve dış membran protein profilleri belirlenerek, bu profillerin metal dirençlilik mekanizması ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] Omalu, I., Eze, G., Olayemi, I., Gbesi, S., Adeniran, L., Ayanwale, A., Mohammed, A., Chukwuemeka, V., Contamination of sachet water in Nigeria: assessment and health impact. *Online Journal of Health and Allied Sciences*. 9 (4), 2010.
- [2] Deeb, B., Plasmid mediated tolerance and removal of heavy metals by *Enterobacter* sp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 5 (1): 47-53, 2009.
- [3] Keramati, P., Hoodaji, M., Tahmour, A., Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (7): 831-837, 2011.
- [4] Iyer, A., Mody, K., Jha, B., Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*. 50, 340-343, 2005.
- [5] E. Sevgi, Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmitlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [6] Silver, S., Ji, G., Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspectives*. 102, 107-113, 1993.
- [7] Rathnayake, V, N., Megharaj, M., Bolan, N., Naidu, R., Tolerance of heavy metals by Gram positive soil bacteria. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 53, 2009.
- [8] M. G. Gürbüz, Bakır(II) ve Nikel(II) İyonlarının *Entreomorpha prolifera*'ya Biyosorpsiyonunda Denge, Kinetik ve Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Mersin, 2006.

- [9] Dopson, M., Austin, B. C., Koppineedi. P. R., Bond, P. L., Growth in sulfidic mineral environments metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*. 149, 1959-1970, 2003.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] A. Kaya., Ağır Metallerin Sulu Çözeltilerden Polimer Membranlar ve Polimer Adsorplayıcılar Kullanılarak Ayrılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 2007.
- [13] Z. S. Taylan., *Phaeodactylum tricornutum* ve *Dunaliella tertiolecta* Tarafından Metal Biyokullanımı, Biyobirikimi ve Toksikite Değerlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2005.
- [14] H. Özgün., Oksidasyon ve Filtrasyon Aşamalarında Sularda Mangan Giderimini Etkileyen Bazı Faktörlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.
- [15] Jensen, L. T., Alemanji, M. A., Culotta, V. C., The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (43): 42036-42040, 2003.
- [16] Plumlee, GS., Ziegler, TL., The medical geochemistry of dusts, soils and other earth materials. *Treatise on Geochemistry*. 9, 263-310, 2003.
- [17] Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B., Trace elements from soil to human. 193-208. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2007.

- [18] Torres, E., Cid, P., Herrero-J. Abalde., Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology*. 63, 213-220. 1998.
- [19] Nellessen, J.E., Fletcher, J.S., Assessment of published literature on the uptake, accumulation and translocation of heavy metals by vascular plants. *Chemosphere*. 27, 1669-1680, 1983.
- [20] Tolun, L.G., Okay, O.S., Gaines, A.F., Tolay, M., Tüfekçi, H., Kıratlı, N., The pollution status and the toxicity of surface sediments in İzmit Bay (Marmara Sea), Turkey. *Environmental International* 26, 163-168, 2001.
- [21] Ahluwalia, S. S., Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. 98 (12): 2243–2257, 2007.
- [22] Ge, HW., Lian, MF., Wen, FZ., Yun, YF., Jian, FY., Ming, T. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*. 162, 50-56, 2009.
- [23] Chen, HM., Zheng, CR., Zhou, DM., Tu, C., Gao, L., Changes in soil fertility and extractable heavy metals in Dexing copper mine tailing pool after revegetation. *Acta Pedologica Sinica*. 42, 29-36, 2005.
- [24] Doula, M. D., Removal of  $Mn^{2+}$  ions from drinking water by using Clinoptilolite and a Clinoptilolite-Fe oxide system. *Water Research*. 40, 3167-3176, 2006.
- [25] Y. Gündoğan, Kızılırmak Nehri'ndeki (Kırıkkale) *Cladhophora*' da Ağır Metal Birikimi Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2005.
- [26] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261–278, 2004.

- [27] Volesky, B., Schiewer, S., Biosorption, metals. Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. 1, 433–453, 2000.
- [28] Ramachandra, TV., Ahalya, N., Kanamadi, RD., Biosorption: Techniques and Mechanisms, Rapor No: 110. 91s, 2006.
- [29] A. Özvardarlı, Çevre Biyoteknolojisi Uygulamalarında Biyosorpsiyonun Yeri. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Çorlu, 2006.
- [30] Ramasamy, K., Banu, S. P., Bioremediation of metals: microbial processes and techniques. Environmental Bioremediation Technologies. 173-187. Ed: by S. H. Singh ve R. D. Tripathi. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2007.
- [31] Mudhoo, A. Garg, V. K., Wang, S., Removal of heavy metals by biosorption. Environmental Chemistry Letters. 10 (2): 109-117, 2012.
- [32] Ö. Akçelik, Ağır Metallerin *Saccharomyces cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [33] Abu Al-Rub, F. A., El-Naas, M. H., Ashour, I., Al-Marzouqi, M., Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. Process Biochemistry. 41, 457-464, 2006.
- [34] Veglio, F., Beolchini, F., Removal of metals by biosorption: a review . Hydrometallurgy. 44 (3): 301-316, 1997.
- [35] P. Yılmaz, Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [36] Flemming, H. C., Wingender, J., Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Water Science and Technology. 43, 9-16, 2001.



- [37] Brady, D., Duncan, J. R., Binding of heavy metals by the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 16, 633-638, 1994.
- [38] T. Akkan, İskenderun Körfezindeki Gr(-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmit Profillerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2009.
- [39] Rouch, D. A., Lee, B. T. D., Morby, A. P., Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14, 132-141, 1995.
- [40] Ji, G., Silver, S., Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14, 61-168, 1995.
- [41] Mergeay, M., Towards an understanding of the genetics of bacterial resistance. *Trends in Biotechnology*. 9, 17-24, 1991.
- [42] Scott, J. A., Palmer, S. J., Cadmium biosorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnology Letters*. 10, 21-24, 1988.
- [43] Scott, J. A., Palmer, S. J., Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied and Environmental Microbiology*. 33, 221-225, 1990.
- [44] Silver, S., Misra, T. K., Bacterial transformation of and resistances to heavy metals. *Basic Life Sciences*. 28, 23-46, 1984.
- [45] Nies, D. H., Silver, S., Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*. 14, 186-199, 1990.
- [46] Archer, GL., Niemeyer, DM., Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiology*. 2, 343-347, 1994.

- [47] Choudhury, R., Srivastava, S., Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*. 81 (7):768-775, 2001.
- [48] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 32, 447-464, 1986.
- [49] Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., Murayama, T. Nickel resistance in yeast and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14, 64-168, 1995.
- [50] Murphy, R. J., Leavy, J. F. Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 81, 165-168, 1983.
- [51] McEntee, J. D., Woodrow, J. R., Quirk, A. V., Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 51, 515-520, 1986.
- [52] Aiking, H., Kok, K., Heerikhuizen, H. V., Van't, R. J., Adaption to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*. 44, 938-944, 1982.
- [53] Summers, A.O., Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. *Annual Review of Microbiology*. 40, 607–634, 1986.
- [54] Osborn, AM., Bruce, KD., Strike P., Ritchie DA., Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiology Reviews*. 19, 239–262, 1997.
- [55] O'Halloran, T., Transition metals in control of gene expression. *Science*. 261, 715-725, 1993.

- [56] Ni'bhriain, N. N., Silver, S., Foster, T. J., Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R 100-1, *Journal of Bacteriology*. 155, 690-703, 1983.
- [57] Beveridge, T. J., Fyfe, W. S. Metal fixation by bacterial cell walls. *Canadian Journal of Earth Science*. 22, 1893-1898, 1985.
- [58] Novick, R. P., Roth, C., Plasmid-linked resistance to in-organic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 95, 1335-1342, 1968.
- [59] Blencowe, D. K., Morby, A. P., Zn(II) metabolism in prokaryotes, *FEMS Microbiology Reviews*. 27, 291-311, 2003.
- [60] Ma, Z., Jacobsen, F. E., Giedroc, D. P., Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chemical Reviews*. 109, 4644-4681, 2009.
- [61] Yılmaz, M., <http://www.cevreorman.gov.tr/sulak/sulakalan/kizilirmak.htm> (Erişim Tarihi: 04.03.2011)
- [62] <http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmaknehri> (Erişim Tarihi : 08.03.2012)
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] Birnboim HC., Doly J., Arapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7, 1513-1523, 1979.

- [66] Cutting, S.M., Horn, P.B., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus*, 27-74, UK, 1990.
- [67] Manniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. 545, 1982.
- [68] 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.
- [69] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates. Microbios. 86, 143-156, 1996.
- [70] 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.
- [71] Laemli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-684, 1970.
- [72] Demiralp, H., Celik, S., Koksel H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. European Food Research Technology. 211, 322-325, 2000.
- [73] Mukhallad AM, Malcolm PS. The distribution of heavy-chain isoforms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. Biochemical Journal. 260, 421-426, 1989.
- [74] Hejazi, A., Falkiner, F. R., *Serratia marcescens*. Journal of Medical Microbiology. 46, 903-912, 1997.
- [75] Bhadra, B., Nanda, A. K., Chakraborty, R., Fluctuation in recoverable nickel and zinc resistant copiotrophic bacteria explained by the varying zinc ion

content of Torsa River in different months. *Archives of Microbiology*. 188, 215–224, 2007.

- [76] Xue, S., Lei, J., Zhou, X., Ma, Y., He, Z., Biological characteristics of a manganese resistant microorganism. *Water Resource and Environmental Protection (ISWREP), International Symposium on*. 4, 3013-3016, 2011.
- [77] Zakaria, Z., Zakaria, Z., Surif, S., Ahmad, W. A., Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 146, 30–38, 2007.
- [78] 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. *African Journals Online*. 38 (1), 2011.
- [79] Zhao, X. Q., Wang, R., Lu, X., Li, J., Hu, H., Tolerance and biosorption of heavy metals by *Cupriavidus metallidurans* strain XXKD isolated from a subsurface laneway in the Qixiashan Pb-Zn Sulfide minery in Eastern China. *Geomicrobiology Journal*. 29, 274-286, 2012.
- [80] Choudhary, S., Islam, E., Kazy, S. K., Sar, P., Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 47, 622-637, 2012.
- [81] Ansari, M. I., Malik, A., Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*. 98, 3149–3153, 2007.
- [82] 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 and Biotechnology*. 14, 132-141, 1995.

- [83] Harnett, N. M., and Gyles, C. L., Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains, *Applied Environmental Microbiology*. 48, 930-945, 1984.
- [84] McEntee, J. D., Woodrow, J. R., and Quirk, A. V., Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp., *Applied Environmental Microbiology*. 51, 515-520, 1986.
- [85] Öztürk, R., Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 27-51, 1997.
- [86] Austin, C. B., Wright, M. S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 14 (4): 176-182, 2006.
- [87] Ajithkumar, B., Ajithkumar, V. P., Iriye, R., Doi, Y., Sakai, T., Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. sakuensis subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 253-258, 2003.
- [88] Xiong, J., Li, D, Li, H., He, M., Miller, S.J., Yu, L., Rensing, C., Wang, G., Genome analysis and characterization of zinc efflux systems of a highly zinc-resistant bacterium, *Comamonas testosteroni* S44. *Research in Microbiology*. 162, 671-679, 2011.
- [89] Hassan, S. H. A., Abskharon, R. N. N., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M. Research paper isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *Journal of Basic Microbiology* 48 (3): 168–176, 2008.
- [90] Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., Gijsegem, F. V., *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-

bound resistance to heavy metals. Journal of Bacteriology. 162 (1): 328-334, 1985.

- [91] G. Özer, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2011.
- [92] Ruiz, N., Maier, R., Andersen, C., Benz, R., Vinas, M., Molecular and functional characterisation of the *Serratia marcescens* outer membrane protein Omp1. Biophysical Chemistry. 109, 215-227, 2004.
- [93] G. Turalı, Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [94] 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.