

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALÜMİNYUM, BARYUM VE KURŞUN TOLERE EDEN YÜZEY SUYU
İZOLATLARININ BİYOSORPSİYON POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

RAMAZAN KOÇAK

MAYIS 2014

ÖZET

ALÜMİNYUM, BARYUM VE KURŞUN TOLERE EDEN YÜZEY SUYU İZOLATLARININ BİYOSORPSİYON POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

KOÇAK, Ramazan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2014, 107 sayfa

Bu çalışmanın amacı da atık sularda bulunan alüminyum, baryum ve kurşun gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir etkin adsorpsiyon yeteneğine sahip mikrobiyal suşların izole edilmesi ve tanımlanmasıdır. Bu amaçla, ağır metal kirliliği gösteren yüzey sularından alüminyum, baryum ve kurşun metallerine karşı yüksek direnç gösteren dört suş izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar yağ asidi analizi (FAME) ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas rhizophila* ve *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. Alüminyum direnci gösteren *Staphylococcus aureus*'un % 81 oranında biyosorpsiyon gösterdiği fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), zeta potansiyeli, izoterm ve kinetik çalışmaları ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, Baryum, Kurşun, 16S rRNA, FAME, Biyosorpsiyon, FTIR, Zeta potansiyel.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF BIOSORPTION POTENTIAL OF ALUMINIUM, BARIUM AND LEAD TOLERATING SURFACE WATER ISOLATES

KOÇAK,Ramazan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

May 2014, 107 Pages

The purpose of this study to isolate and identify the strains which might be useful for the removal of aluminium, barium and lead from waste waters. For this purpose, four isolates resistant to these heavy metals were isolated and identified as *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Enterococcus faecalis* by fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA sequencing analyses. Among these isolates, *Staphylococcus aureus* was found to be highly efficient (81 %) for the biosorption of aluminium through fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), zeta potential, isotherm and kinetic studies done.

Keywords: Aluminium,Barium, Lead, 16S rRNA, FAME, Biosorption, FTIR, Zeta potential.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlamamda bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez yöneticisi değerli hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE ve değerli eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bilimsel konularda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Sema ÇETİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren çalışmalarım boyunca her an beraber olduğumuz, tüm maneviyatı ile yanımda olan Dr. Fadime YILMAZ, Semih CERİT, Özgün ŞAHİN, Barış KAHYAOĞLU, İrem AKIN, Selçuk TOKLUCU, Mehmet GÜVEN ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xii |
| SİMGELER DİZİNİ | xii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Literatür Özetleri | 1 |
| 1.1.1. Çevre Kirliliği..... | 1 |
| 1.1.2. Su Kirliliği | 2 |
| 1.1.3. Ağır Metaller, Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri..... | 2 |
| 1.1.3.1. Kurşun | 4 |
| 1.1.3.1.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları..... | 4 |
| 1.1.3.1.2. Kurşun Biyolojik ve Toksik Etkileri | 5 |
| 1.1.3.2. Baryum | 6 |
| 1.1.3.2.1. Baryumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları..... | 6 |
| 1.1.3.2.2. Baryumun Biyolojik ve Toksik Etkileri | 6 |
| 1.1.3.3. Alüminyum..... | 7 |
| 1.1.3.3.1. Alüminyumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları | 7 |
| 1.1.3.3.2. Alüminyumun Biyolojik ve Toksik Etkileri..... | 7 |
| 1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları | 8 |
| 1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması | 8 |
| 1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu | 8 |
| 1.1.4.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması | 10 |
| 1.1.4.4. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı | 12 |
| 1.1.4.5. Ekstrasellüler Alıkonma | 12 |

| | |
|--|-----------|
| 1.1.4.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması | 13 |
| 1.1.5. Mikroorganizmaların Biyosorpsiyon Yetenekleri | 13 |
| 1.1.5.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları | 14 |
| 1.1.5.2. Adsorpsiyon | 17 |
| 1.1.5.2.1. Adsorpsiyon İzotermi | 17 |
| 1.1.5.2.1.1. Langmuir İzotermi | 18 |
| 1.1.5.2.1.2. Freundlich İzotermi | 19 |
| 1.1.5.2.2. Adsorpsiyon Kinetiği | 20 |
| 1.1.5.2.2.1. Pseudo Birinci Derece Eşitliği | 21 |
| 1.1.5.2.2.2. Pseudo İkinci Derece Eşitliği | 22 |
| 1.1.6. Mikrobiyal İdentifikasyon | 22 |
| 1.1.6.1. Geleneksel Teknikler | 23 |
| 1.1.6.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi | 24 |
| 1.1.6.2.1. FAME Analizinin Avantaj ve Dezavantajları | 25 |
| 1.1.6.3. 16S rRNA Dizi Analizi | 25 |
| 1.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) | 27 |
| 1.1.6.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları | 31 |
| 1.1.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) | 31 |
| 1.1.8. Zeta Potansiyeli | 35 |
| 1.2. Çalışmanın Amacı | 36 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM | 37 |
| 2.1. Materyal | 37 |
| 2.1.1. Kullanılan Besiyerleri | 37 |
| 2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı | 37 |
| 2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı | 37 |
| 2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı | 37 |
| 2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Hazırlanışı | 38 |
| 2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar | 38 |
| 2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar | 38 |
| 2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler | 38 |
| 2.1.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler | 38 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL) | 38 |
| 2.1.2.2.1.2. %10'luk SDS Tamponu (100 mL) | 38 |
| 2.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)..... | 39 |
| 2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL) | 39 |
| 2.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)..... | 39 |
| 2.1.2.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL) | 39 |
| 2.1.2.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 ml) | 39 |
| 2.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL) | 40 |
| 2.1.2.2.1.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL) | 40 |
| 2.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL) | 40 |
| 2.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL) | 40 |
| 2.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama..... | 40 |
| 2.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması..... | 40 |
| 2.1.2.4. Yağ Asidi Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı. | 41 |
| 2.1.2.4.1. Solüsyon I..... | 41 |
| 2.1.2.4.2. Solüsyon II | 41 |
| 2.1.2.4.3. Solüsyon III | 41 |
| 2.1.2.4.4. Solüsyon IV | 41 |
| 2.2. Yöntem | 42 |
| 2.2.1. Çalışma Alanı | 42 |
| 2.2.2. Örneklerin Toplanması..... | 43 |
| 2.2.3. Metal Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması..... | 44 |
| 2.2.4. İzolatların Elektron Mikroskobu Analizleri | 44 |
| 2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi | 44 |
| 2.2.6. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi..... | 45 |
| 2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı | 45 |
| 2.2.8. FAME Analizi | 45 |
| 2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini | 46 |
| 2.2.10. PZR Amplifikasyonu..... | 47 |
| 2.2.11. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması | 48 |
| 2.2.12. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi | 48 |
| 2.2.13. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.14. DNA Sekans Analizi | 49 |
| 2.2.15. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması | 49 |
| 2.2.16. Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi..... | 49 |
| 2.2.17. İzoterm Çalışmaları | 50 |
| 2.2.18. Adsorpsiyon Kinetiği Çalışmaları | 50 |
| 2.2.18. Bakterilerin FTIR Analizi ile Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi..... | 51 |
| 2.2.19. Zeta Potansiyeli Ölçümü | 51 |
| 3. ARAŞTIRMA BULGULARI | 52 |
| 3.1. Bakterilerin İzolasyonu | 52 |
| 3.2. Bakterilerin Optimum Üreme Koşulları | 52 |
| 3.2.1. A111 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri | 52 |
| 3.2.2. Ba01 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri | 54 |
| 3.2.3. Ba11 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri | 55 |
| 3.2.4. Pb06 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri..... | 57 |
| 3.3. Bakterilerin Tanımlanması | 58 |
| 3.3.1. FAME ile Tanımlama..... | 58 |
| 3.3.1.1. A111 Kodlu İzolatın FAME Analizi | 58 |
| 3.3.1.2. Ba01 Kodlu İzolatın FAME Analizi | 60 |
| 3.3.1.3. Ba11 Kodlu Suşun FAME Analizi | 61 |
| 3.3.1.4. Pb06 Kodlu Suşun FAME Analizi | 63 |
| 3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi | 65 |
| 3.3.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu | 65 |
| 3.3.2.2. A111 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu | 65 |
| 3.3.2.3. A111 Kodlu Suşun Tanımlanması | 67 |
| 3.3.2.2. Ba01 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu | 69 |
| 3.3.2.3. Ba01 Kodlu Suşun Tanımlanması..... | 70 |
| 3.3.2.2. Ba11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu | 73 |
| 3.3.2.3. Ba11 Kodlu Suşun Tanımlanması..... | 74 |
| 3.3.2.2. Pb06 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu | 77 |
| 3.3.2.3. Pb06 Kodlu Suşun Tanımlanması | 78 |
| 3.4. Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi | 81 |
| 3.4.1. A111 Kodlu Suşun Elektron Mikroskop Görüntüleri | 82 |
| 3.4.2. A111 kodlu Suşun Kesikli İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi | 83 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.3. A111 kodlu Suşun Kesikli Kinetik Çalışması..... | 84 |
| 3.5. A111 Kodlu Suşun FTIR Analizi..... | 86 |
| 3.6. Zeta Potansiyeli | 88 |
| 4. TARTIŞMA SONUÇ | 89 |
| KAYNAKLAR | 95 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>SEKİL</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 1.1. Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemleri..... | 9 |
| 1.2. Metal ile mikroorganizma arasındaki etkileşim mekanizmaları | 11 |
| 1.3. Biyosorpsiyon mekanizmaları..... | 14 |
| 1.4. Gram negatif (a) ve gram pozitif (b) hücre membrnı yapısı | 15 |
| 1.5. Langmuir izotermi | 19 |
| 1.6. Freundlich izotermi | 20 |
| 1.7. Fame analizi | 25 |
| 1.8. 16S rRNA sekans analizi | 27 |
| 1.9. PZR aşamaları | 28 |
| 1.10. FTIR analizi | 32 |
| 1.11. Zeta potansiyeli | 35 |
| 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu..... | 42 |
| 3.1. A111 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri..... | 53 |
| 3.2. A111 kodlu suşun alüminyum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri | 53 |
| 3.3. Ba01 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri | 54 |
| 3.4. Ba01 kodlu suşun baryum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri | 55 |
| 3.5. Ba11 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri | 56 |
| 3.6. Ba11 kodlu suşun baryum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri | 56 |
| 3.7. Pb06 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri | 57 |
| 3.8. Pb06 kodlu suşun kurşun içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri | 58 |
| 3.9. A111 kodlu suşa ait GC kromotogramı | 59 |
| 3.10 Ba01 kodlu suşa ait GC kromotogramı | 61 |
| 3.11. Ba11 kodlu suşa ait GC kromotogramı | 63 |
| 3.12. Pb06 kodlu suşa ait GC kromotogramı | 64 |
| 3.13. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında A111 suşuna ait PZR ürünleri..... | 66 |

| | |
|--|----|
| 3.14. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Al11 suşuna ait PZR ürünleri..... | 66 |
| 3.15. Al11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram | 67 |
| 3.16. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ba01 suşuna ait PZR ürünleri | 69 |
| 3.17. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Ba01 suşuna ait PZR ürünleri | 70 |
| 3.18. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram..... | 71 |
| 3.19. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ba11 suşuna ait PZR ürünleri | 73 |
| 3.20. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Ba11 suşuna ait PZR ürünleri | 74 |
| 3.21. Ba11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram..... | 75 |
| 3.22. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Pb06 suşuna ait PZR ürünleri | 77 |
| 3.23. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Pb06 suşuna ait PZR ürünleri..... | 78 |
| 3.24. Pb06 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram | 79 |
| 3.25. <i>S. aureus</i> 'un alüminyum (a) ve baryum (b), <i>S. rhizophila</i> 'nın baryum (c), <i>E. faecalis</i> 'in kurşun biyosorpsiyonu | 82 |
| 3.26. <i>S. aureus</i> 'a ait Alüminyum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki..... | 83 |
| 3.27. <i>S. aureus</i> suşuna ait Freundlich (a) ve Langmuir (b) izoterm grafikleri..... | 83 |
| 3.28. Alüminyum metali için kesikli kinetik çalışmasında biyosorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi | 85 |
| 3.29. <i>S. aureus</i> yüzeyinde alüminyum adsorpsiyonunun pseudo birinci | 85 |
| 3.30. Al11 kodlu suşun alüminyum içeren ortamdaki FTIR sonuçları | 86 |
| 3.31. Al11 kodlu suşun alüminyum içermeyen ortamdaki FTIR sonuçları | 87 |
| 3.31. <i>S. aureus</i> 'un alüminyum konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli değişim..... | 88 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>ÇİZELGE</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1. Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları | 3 |
| 1.2. FTIR Kütüphanesi | 34 |
| 2.1. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları..... | 43 |
| 3.1. A111 kodlu izolata ait yağ asidi profilleri | 59 |
| 3.2. Ba01 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri..... | 60 |
| 3.3. Ba11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri..... | 62 |
| 3.4. Pb06 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri | 64 |
| 3.5. A111 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri..... | 68 |
| 3.6. Ba01 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri..... | 72 |
| 3.7. Ba11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri..... | 76 |
| 3.8. Pb06 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri..... | 80 |
| 3.9. Alüminyum için Freundlich ve Langmuir izoterm sabitleri | 84 |
| 3.10. Alüminyum için pseudo birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri | 85 |
| 3.11. <i>S. aureus</i> 'a ait FTIR sonuçları | 87 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| Fe | Demir |
| Ag | Gümüş |
| Al | Alüminyum |
| Cd | Kadmiyum |
| Cu | Bakır |
| Co | Kobalt |
| Cr | Krom |
| Pb | Kurşun |
| Hg | Civa |
| Li | Lityum |
| Mn | Mangan |
| Ni | Nikel |
| Sb | Antimon |
| Sn | Kalay |
| Sr | Stronsiyum |
| Zn | Çinko |
| AlCl ₃ | Alüminyum Klorür |
| BaCl ₂ | Baryum Klorür |
| Pb(NO ₃) ₂ | Kurşun Nitrat |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------|---|
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| NA | Nutrient Agar |
| NB | Nutrient Broth |
| MTK | Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon |
| SI | Similarity İndex |
| FTIR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| FAME | Yağ Asidi Metil Ester Analizi |

1.GİRİŞ

Son yıllarda teknolojinin gelişmesi sonucu, endüstri ve sanayi atıkları ile kentsel atıkların bulunduğu kanalizasyon sularının boşaltıldığı nehir ve göller kirlenmekte, sucul ortamda yaşayan canlı organizmaların hayatı tehdit edilmektedir. Sulardaki anorganik kirlenmenin en önemli kaynağını ağır metaller oluşturur. Ağır metaller erozyonla taşınan kaya parçalarıyla, rüzgarın taşıdığı tozlarla, volkanik aktivitelerle, ormanların yanmasıyla ve bitki örtüsüyle sulara taşınır. Kimyasal kirleticiler atmosfer yoluyla da önemli ölçüde sucul ortama karışır. Çünkü atmosferde bulunan bu elementler zamanla rüzgar ve yağışlarla suya geçmekte ve sucul sistem üzerinde etkili olmaktadır. Sulardaki ağır metal kirliliğinin sebeplerinin başında madencilik endüstrisi gelmektedir. Maden cevherlerinden metallerin kazanılması sırasında meydana gelen atıklar, çoğu kez tabii tutuldukları işlemlerle aktifleşip birer kirlilik kaynağı haline gelir [1]. Sanayinin gelişmesiyle birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağırmetal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmış ve ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilktanımlanan zehirlenmeler Japonya’da ortaya çıkmıştır. Ağır metal grubuna Kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere birçok metal dahildir [2].

1.1. Literatür Özetleri

1.1.1. Çevre Kirliliği

Çevre kirliliği; hava, su, toprak gibi ortamlardaki doğal dengelerin insan faaliyetleri sonucunda ortaya çıkan madde ve enerji artıklarıyla olumsuz yönde bozulması olarak tanımlanır. Gittikçe artan çevre kirliliğinin önlenmesi için birçok bilim dalının katkılarıyla yerel ve dünya çapında çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar çevre kirlenmesini farklı boyutlarda ele almakta ve çözüm yolları önermektedir [3]. Çevre kirliliği; su, hava, toprak ve ses kirliliği olmak üzere dört başlık altında ele alınabilir. Bu dört temel unsurdan sadece su kirliliğine sebebiyet veren ağır metallerin mikroorganizmalar üzerine etkisi üzerinde araştırma yapılmıştır [4].

1.1.2. Su Kirliliği

Hızlı kentleşme, sanayi atıklarının kimyasal olarak arıtılmadan su sistemlerine verilmesi, tarım alanlarında yaygın ve aşırı miktarda pestisit kullanımı su kaynaklarının kirlenmesine neden olmuştur. Bu durum öncelikle tatlı su ekosistemlerinin ve dolaylı olarak da kirletilmiş suyu kullanan tarım alanları başta olmak üzere diğer ekosistemlerin bozulması sonucunu gündeme getirmiştir. Su ekosistemlerinde özellikle de tatlı su kaynaklarında, ağır metal miktarlarının yüksek olması gerek sucul organizmaların gerekse de insanların hayatlarını olumsuz yönde etkileyerek potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Endüstriyel veya kentsel atık sularıyla kirlenmiş akarsu ve göllerin tarımsal amaçla kullanılması sonucunda, topraklarda önemli düzeyde iz element ve ağır metal birikimi olduğu bilinmektedir. Canlı sisteme giren ağır metaller, besin zinciri ile bir organizmadan diğerine taşınarak canlı sistemlerde yüksek konsantrasyonlara ulaşmakta ve zararlarını yıllarca sürdürebilmektedir [5].

1.1.3. Ağır Metaller, Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ten daha yüksek olan metaller için kullanılır [2]. Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Çizelge 1.1'de yer kabuğunda en bol bulunan 12 element ile daha az bulunan bazı elementler gösterilmiştir. En bol bulunan bu 12 elementin toplam kütlesi, yer kabuğu kütlesinin % 99.4'ü kadardır [6]. Metaller boşaltım ortamlarındaki canlı yaşamı üzerinde konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yaparlar. Eser miktarlarda bile sakıncalı olabilen bu maddeler arasında en önemli grubu ağır metalleri diye adlandırılan Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, S, T, U, V, Zn gibi elementler oluşturur [7]. Birçok metal genellikle eser miktarlarda fizyolojik işlemler için gereklidir. Bu duruma Oksijen taşınmasında demir kullanımı, mangan ve selenyumun antioksidant sistemde gerekliliği, çinkonun metabolizmadaki rolü, bakırın kırmızı kan hücrelerinde ki oksidasyon ve redüksiyon prosesininin bir parçası olması örnek olarak verilebilir [8]. Bu zorunlu metaller, çok

düşük veya çok yüksek konsantrasyonlarda toksik özellik göstermektedirler. Diğer taraftan bazı metallerin; arsenik, civa, kurşun gibi, herhangi bir fizyolojik özellikleri yoktur ve toksik özellik gösterirler. Ağır metaller hücre membranlarına zarar verebilir, enzim spesifitesini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilir [9,10].

Çizelge 1.1. Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları [6]

| Element | Konsantrasyon (ppm) |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Bol Oranda Bulunanlar | |
| Demir | 50000 |
| *Silisyum | 277200 |
| Alüminyum | 81300 |
| *Oksijen | 466000 |
| Kalsiyum | 36300 |
| Sodyum | 28300 |
| Potasyum | 25900 |
| Magnezyum | 20900 |
| Titanyum | 4400 |
| *Hidrojen | 1400 |
| *Fosfor | 1180 |
| Mangan | 1000 |
| Eser oranda bulunanlar | |
| Bakır | 55 |
| Vanadyum | 135 |
| Nikel | 75 |
| Çinko | 70 |
| Baryum | 425 |
| Kurşun | 12.5 |
| Berilyum | 2.8 |
| Uranyum | 2.7 |
| Kalay | 2 |
| Kadmiyum | 0,2 |
| Civa | 0,08 |
| Gümüş | 0,07 |
| Altın | 0,004 |

*Metal olmayanlar

1.1.3.1. Kurşun

1.1.3.1.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Biyosfere insan faaliyetlerine bağlı olarak önemli oranda yayılan kurşun, günümüzden 4000-5000 yıl öncesinde, antik uygarlıklar tarafından gümüş üretimi esnasında yanürün olarak keşfedilmiş ve tarih boyunca kurşun üretimi ve kullanımı giderek artışgöstermiştir. Kurşun, Roma İmparatorluğunda su borularında, su saklamahaznelerinde kullanılmıştır ve günümüz bilim adamları ve tarihçiler bu kullanımşeklinin Roma İmparatorluğunun sonunu hazırladığı görüşünü ortaya atmaktadırlar. Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararlı veren ilk metal olmaözelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve herdurumda toksik özellik taşıdığındançevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. 1920'lerde kurşun bileşikleri $Pb(C_2H_5)_4$ benzine ilave edilmeye başlanmıştır ve bu kullanım alanıkurşunun ekolojik sisteme yayınında önemli rol oynar (227.250 ton/yıl ABD). Günümüzde kurşunsuz benzin kullanımı ile atmosfere kurşun yayını azalmaklaberaber kurşunsuz benzin bileşiminde bulunan kurşun bir çok birincil metal üretimaşamasından atmosfere kurşun ve bileşiklerinin yayını devam etmektedir. Dünyadaen yaygın kurşun kullanımı kuzey amerikadadır ve yıllık tüketim 1.300.000 tonseviyelerine ulaşır ve bu kullanım koşullarında atmosfere atılan miktar yıllık 600.000 ton seviyelerine ulaşır. Kurşun dağılımı incelendiğinde sanayileşme ve araba kullanımı ile kurşunyayını arasındaki ilişki açıkça ortaya görülmektedir.Kurşunun diğer önemli kullanım alanları ise; teneke kutu kapakları,kurşun-kalay alaşımli kaplar, seramik sırları, böcek ilaçları, aküler vb. alanlardır. Kurşunlu benzin ve boya maddelerinin yanı sıra yiyecekler ve su da kurşun kaynağıolabilmektedir. Özellikle endüstriyel ve şehir merkezlerine yakın yerlerde yetişenyiyecekler; tahıllar, baklagiller, bahçe meyveleri ve birçok et ürünü bünyesindenormal seviyelerin üzerinde kurşun bulundurur. Su borularında kullanılan kurşunkaynaklar ve eski evlerde bulunan kurşun tesisatlarda, kurşunun suya karışmasınasebep olabilmektedir. Kozmetik malzemelerde bulunan birçok pigment ve diğer anamaddelerde kurşun bulundururlar. Diğer taraftan sigara ve böcek ilaçları da kurşunkaynakları arasında sayılabilirler [12,18].

1.1.3.1.2. Kurşun Biyolojik ve Toksik Etkileri

İnsan vücudundaki kurşun miktarı tahmini ortalama olarak 125-200 mg civarındadır ve normal koşullarda insan vücudu normal fonksiyonlarla günde 1-2 mg kadar kurşunu atabilme yeteneğine sahiptir. Birçok kişinin maruz kaldığı günlük miktar 300-400 mg'ı geçmemektedir. Buna rağmen çok eski iskeletler üzerinde yapılan kemik analizleri günümüz insanı kemiklerinde, atalarımızdakinin 500-1000 katı kadar fazla kurşun bulunduğunu göstermektedir. Kurşunun vücutta absorpsiyonu çocuklarda daha yüksek olmakla beraber normalde %5 gibi düşük bir oranda gerçekleşmektedir. Bu oran dahi kalsiyum ve demir gibi birçok mineralin vücut tarafından emilimini azaltmaktadır. Kana karışan kurşun buradan kemiklere ve diğer dokulara gitmekte ya da dışkı ve böbrekler yoluyla vücuttan atılmaktadır. Kemiklerde biriken kurşun zamana bağlı olarak (yarılanma ömrü yaklaşık 20 yıl) çözünerek böbreklerde tahribata neden olur. Kurşun bir nörotoksindir ve anormal beyin ve sinir sistemi fonksiyonlarına sebep olmaktadır. Çocuklar üzerinde yapılan araştırmalarda kanda kurşun miktarı arttıkça IQ seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan kurşun nörotoksik özelliğinden dolayı sinir sisteminde iletimin azalmasına da yol açmaktadır. Kurşunun çoğu kemiklerde depolanmasına rağmen beyne, anne karnındaki cenine ve anne sütüne de geçebilmektedir. Bebekler ve çocuklarda düşük olan kurşun oranı, ilerleyen yaşla beraber, kurşuna maruz kalınmasıyla artış göstermektedir. Kanda 40 mg/L seviyesini aşınca tansiyon artırıcı etki de ortaya çıkar. Diğer taraftan kronik kurşun alınımları ile sperm sayısı ve morfolojisinde sınırlanır. Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasına göre (1995) kurşun 2. sınıf kanserojen gruptadır [19]. Ekolojik olarak kurşun katı olarak çökme eğilimindedir ve özel durumlar dışındaki kompleks oluşturmaz. Genellikle doğaya salınan kurşun zor çözünür bileşikler $Pb_3(PO_4)_2$, $Pb_4O(PO_4)_2$, $Pb_5(PO_4)_3OH$, $PbCO_3$ PbS oluşturur, bu nedenle beslenme zincirinde yer alan bitkilerden kurşun alınımları söz konusu değildir [20]. Besin zincirinde kurşun yayılımı genellikle midye türü kalsiyumlu kabuklular üzerinden ve kalsiyuma bağlı olarak gerçekleşir. Tek hücreli canlıların ve balıkların 0.04-0.198 mg/L inorganik kurşun içeren suları tolere edebildikleri ancak daha düşük miktarlarda kurşunun besin yoluyla alınmasında akut zehirlenme gösterdikleri bilinmektedir [19].

1.1.3.2. Baryum

1.1.3.2.1. Baryumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Yaklaşık olarak yer kabuğunun yüzde 0.05'ini meydana getirir. Aktifliği sebebiyle elementel halde bulunmaz. En çok viterit ($BaCO_3$) ve barit veya ağır spat ($BaSO_4$) minerallerinde bulunur. Baryumun doğada, doğal olarak bulunma seviyesi oldukça düşüktür. Barit başlıca baryum cevheridir. Baritin en çok kullanıldığı yerlerden biri boyalardır. Yüksek miktarlardaki baryum sadece toprakta ve fıstık, fındık, deniz yosunu, balık ve bazı bitkiler gibi gıdalarda bulunur. Gıdalarda ve sularda bulunan baryum miktarı genellikle bir sağlık riskine neden olacak kadar yüksek değildir. Baryuma bağlı en büyük risk baryum endüstrisinde çalışan kişilerde gözlenmektedir[21].

1.1.3.2.2. Baryumun Biyolojik ve Toksik Etkileri

Suda çözünen baryumun çok yüksek miktarlarda alınması felce ve hatta bazı durumlarda ölümlere bile neden olabilmektedir. Suda çözünen baryumun az miktarda alınması, nefes alıp vermede zorluğa, kan basıncının artmasına, kalp ritmi değişikliklerine, mide tahrişine, kas güçsüzlüğüne, sinir reflekslerinde değişikliklere, beyinde ve karaciğerde şişkinliğe, böbrek ve kalp rahatsızlıklarına neden olabilmektedir. Baryumun insanlarda kansere neden olduğu gözlenmemiştir. Baryumun gıdalardan kaynaklanan herhangi bir toksisitesine dair henüz bir kayıt bulunmamaktadır [22]. Çoğu sağlık riski baryum sülfat ($BaSO_4$) veya baryum karbonat ($BaCO_3$) içeren havanın solunması ile oluşmaktadır. Çoğu tehlikeli atık bölgeleri belirli bir miktar baryum içermektedir. Bu bölgelere yakın yerlerde yaşayan kişiler tehlikeli düzeyde baryuma maruz kalabilirler. Maruz kalma, baryumla kirlenmiş havanın solunması, toprağın ve bitkilerin yenmesi ile oluşmaktadır. Ayrıca deri teması ile de oluşmaktadır. Baryumun sağlık etkileri suda çözünebilirliği ile alakalıdır [16].

1.1.3.3. Alüminyum

1.1.3.3.1. Alüminyumun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Alüminyum yer kabuğunda % 7.5-8.1 miktarında bulunmasına rağmen serbest halde çok nadir bulunur ve bu nedenle bir zamanlar altından bile daha kıymetli görülmüştür. Alüminyumun ticari olarak üretiminin tarihi 100 yıldan biraz fazladır. Alüminyumun çok çeşitli mineralleri olmasına karşılık, dünya alüminyum üretiminin hemen hemen tamamı boksit $Al_2O_3 \cdot H_2O$ minerallerinden sağlanır. Alüminyum bileşiklerinin birçoğu sanayide önemli kullanım alanlarına sahiptir. Alüminyum üretiminin yanısıra yalıtkanların, taşımacılık ve mimaride ve daha pekçok ürünün yapımında da kullanılır [23].

1.1.3.3.2. Alüminyumun Biyolojik ve Toksik Etkileri

Alüminyumun canlı hücreler üzerinde yararlı bir işleve sahip olduğu gözlemlenmemiştir. Bazı kişilerde, alüminyumun herhangi bir formundan kaynaklanabilen temas dermatiti (deri iltihabı), stiptik (kan durdurucu) veya ter önleyici ürünler kullanımıyla birlikte ortaya çıkan kaşıntılı kızarıklık, alüminyum tencerelerde pişen yemeklerin yenmesiyle ortaya çıkan sindirim bozuklukları ve besinlerin emiliminin durması, ve Roloids, Amphojel, ve Maalox gibi antasit (asit giderici) ilaçların kullanımıyla ortaya çıkan kusma vb. gibi zehirlenme belirtileri şeklinde alerjik reaksiyonlar yaratabilir. Diğer kişilerde alüminyum, ağır metaller kadar zehirli olmasa da ve alüminyumdan yapılmış mutfak gereçleri kullanımının (yüksek korozyon direnci ve iyi ısı iletkenliği nedeniyle tercih edilir), genelde alüminyum zehirlenmesine yol açtığı kanıtlanmamış olsa da, yüksek dozlarda alındığında zehirlenme belirtileri gösterebilir. Alüminyum bileşikleri içeren antasitlerin aşırı dozda tüketimi ve alüminyum içeren ter önleyicilerin aşırı miktarda kullanımı zehirlenme nedeni olabilir. Alüminyumun Alzheimer hastalığına yol açtığı iddia edilmişse de o araştırma, tam tersine, Alzheimer hastalığının neden olduğu tahribatın, vücutta alüminyum birikimine yol açtığı şeklinde çürütülmüştür. Özetle, eğer alüminyum zehirlenmesi varsa bunun oldukça spesifik bir mekanizma ile

gerçekleşmesi gerekir. Zira insanın yaşamı boyunca, toprakta doğal kil mineralinin içindeki alüminyum ile olan teması zaten yeterince yüksektir [24].

1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

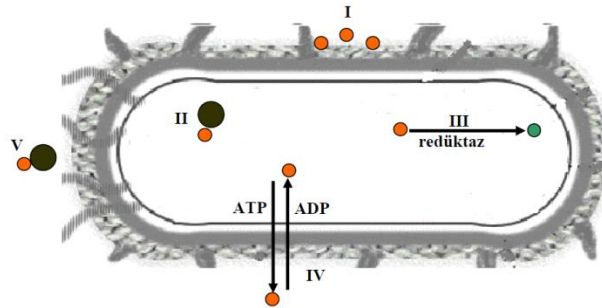
1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

Hücre duvarında, zar da veya duvar proteinlerinde meydana gelen değişimler metalin hücreye girişini engeller. *Escherichia coli*'deki "porin" denilen zar proteinlerinin yapısının değişmesi ile birlikte bakırın hücre içine alınmaması buna örnek olarak gösterilebilir. Bu durum sıklıkla tek gen mutasyonu ile açıklanmaktadır. Bu mutasyonla zarın geçirgenliği azalır. Ayrıca metallerin dış zar da veya hücre proteinlerine spesifik olmayan şekilde bağlanması da geçirgenliği azaltır. Bakterilerin doğal olarak buldukları ekstraselüler polisakkarit kısım metal iyonlarını biyolojik olarak tutmakta ve onları hücre bileşenleri ile etkileşimden korumaktadır [26]. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kuşatan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak hücre içine girişini engellemektedir. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir [2]. *Staphylococcus aureus*'un bazı türlerinde, peniklinaz'ın kodlarını bulduran plazmitler, hücre membranı değişimi aracılığı ile Cd^{2+} geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu Cd^{2+} 'un 0.01-0.1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [25].

1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

Metaller aktif taşıma yoluyla hücre dışına pompalanırlar, bu mekanizma plazmit veya kromozom kökenli olabilir. Dışarı pompalama sistemi ATP'ye bağımlı ve ATP'ye bağımsız olarak gerçekleşir. ATP bağımlı sistemlerde hidrolizle enerji elde

edilirken, ATP'ye bağımsız sistemlerde zar potansiyeli metal geçişi için kullanılır. Örneğin arsenik *E. coli*' de ATP bağımlı sitemle pompalanırken, *Staphylococcus aureus*'da arsenik zar potansiyeli yardımıyla geçer [26]. CPx-tip ağır metal ATPaz'ların Cu, Zn, Cd ve Pb gibi toksik metallerin hücre membranlarından geçişinde rol aldığı bildirilmiştir [27]. Korunmuş bir membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin (CPx) motifine sahip oldukları için ağır metal taşıyıcıları CPx-ATPaz'lar olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin plazma membranında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında pompalar olarak fonksiyon gördüğü veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [28]. Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmit kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı yada ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [29]. Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığıyla *E. colive S.aureus*'ta; Cd³⁺ direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S.aureus*,*Bacillus* sp.,ve *Listeria* sp.'deveya *Alcaligenes eutrophas*'taeze operonu bulunmuştur. Pb⁺² direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus*' ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmit ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [30].

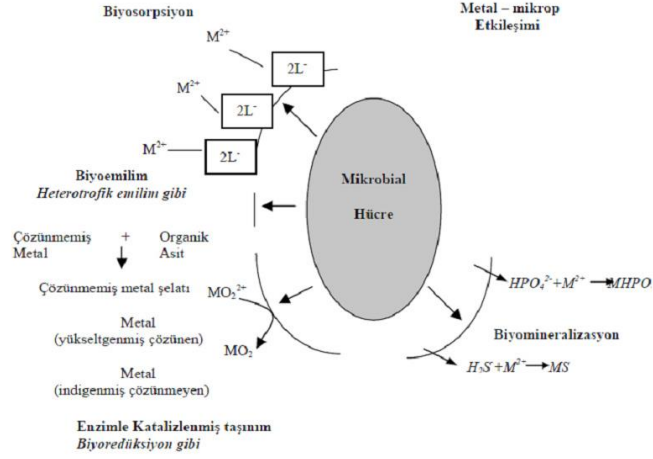


Şekil 1.1. Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemleri[26]

Şekil1.1’de I. Hücre içine alınmama II. Metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulmasıIII. Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi IV. Metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması V. Metalin hücre dışında tutulması gösterilmiştir [26].

1.1.4.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması

Bu mekanizma ile ağır metallerin hücre içinde bir yerde birikmesi ve hücrel organellerle etkileşmesi önlenir. Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücrel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Metaller, mikroorganizmaların hücre zarını, sitoplazmasını, metabolizmasını ve yapısal işlevlerini bozmak suretiyle olumsuz yönde etkilemektedirler. Metabolizma üzerindeki etkileri ise transkripsiyonun inhibisyonu, hücre membranının bozulması, translasyonun inhibisyonu, DNA tahribi, hücre bölünmesinin inhibisyonu ve protein denatürasyonudur. Ancak mikroorganizmalar bünyelerine çeşitli yollarla giren metallerin toksisitesinden korunmak için bazı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu savunma mekanizmaları arasında; pozitif yüklü iyonların negatif yüklü hücre yüzeyine (dış zar ya da hücre membranına) bağlanması, bu metalleri hücrenin EPS (ekzopolisakkarit) olarak ta bilinen hücre dışı polimerik maddelere bağlaması, volatilizasyon, hücre içinde indirgeme, moleküler pompa, hücre içinde alıkoyma, sitoplazmada metalotiyonein gibi proteinlerin üretimi, sitoplazmada metal tuzları olarak presipite etme yer almaktadır. Şekil 1.2’de mikroorganizmaların metaller ile etkileşim mekanizmaları özetlenmiştir [31, 94].



Şekil 1.2. Metal ile mikroorganizma arasındaki etkileşim mekanizmaları [94]

Synechococcus denizlerde yaşayan bir *Cyanobacteria*'dir. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır. Bunlardan *SmtA*, Cd^{2+} ve Zn^{2+} ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [32]. Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Syenchococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothionein'lerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. *SmtA*'daki metalothioneindeki sistein kalıntıları, çok zehirli kationlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda *SmtB*'nin yapısı belirlenmiştir. *SmtB* proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapıya sahip bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört Zn^{2+} bağlayıcı yer göstermektedir [33]. 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 [34].

1.1.4.4. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi

Bu sistem hücre içinde ve enzimatik yollarla gerçekleşir. Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler. Civa bu özelliğinden dolayı toksik metal olarak kabul edilmektedir. Bazı bakteri grupları civayı enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirmekte kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir [38,39]. Direnç gram negatif ve gram pozitiflerde benzer genler tarafından sağlanır. *Bacillus cereus* RC607 deki direnç ile ilgili olan *merA* geninin *Clostridium butiricum*'daki *merA* genleri ile nükleotit sekanslarının benzerliği % 76. 8'den % 100'e kadar değişmektedir. *MerA* genleri plazmit veya kromozom kökenli olabilirler [36]. Metallerin sorbsiyon verimliliğinde ortamda bulunan metal türüne ve sayısına, bu metallerin kendilerine has özelliklerine bağlı olarak sinerjik ve antagonistik etki görülmektedir [37].

1.1.4.5. Ekstrasellüler Alıkonma

Saccharomyces cerevisia büyük miktarda glutasyonu boşaltarak nikel adsorbsiyonunu azaltır. *S. cerevisia* taşıdığı metilglioksal geni metallerin yoğun olduğu bölgelerde ekstrasellüler glutasyon maddesi oluşturur. Glutasyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metalle zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutasyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutasyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Toksikmetal bu komplekslere tutunur ve hücreye giremez. Funguslarda bakır direnci sağlanırken, metal oksalat kompleksleri oluşturmak üzere hücre dışına oksalat salgılandığı ispatlanmıştır [35,36].

1.1.4.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltmak sureti ile ya da metal inaktivasyonunda kullanılan belli bazı hücresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir [25]. DNA tamir mekanizmaları plazmit vegenomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd^{2+} maruz kaldığında önemli DNA hasarları olduğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [25].

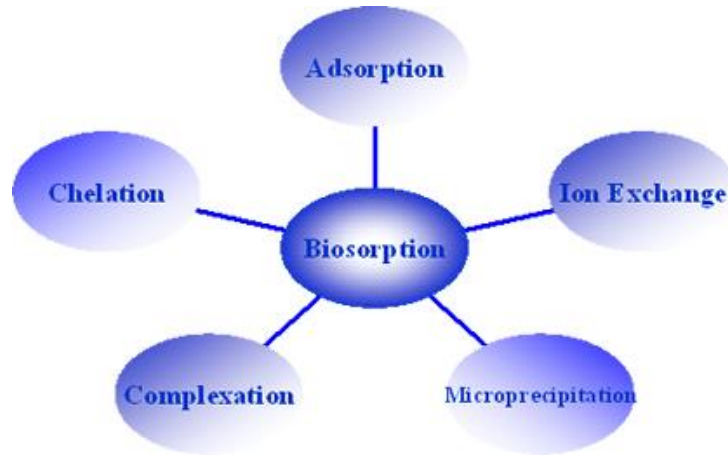
1.1.5. Mikroorganizmaların Biyosorpsiyon Yetenekleri

Endüstriyel atıklardaki boya ve metal iyileştirilmesi için geliştirilen teknikleri abiyotik ve biyotik metotlar olmak üzere iki ana sınıfta incelemek mümkündür. Abiyotik metotlar; presipitasyon, adsorbsiyon, iyon değişim, membran ve elektrokimyasal teknolojilerdir. Bu metotların bir çoğu pahalı, çevre dostu olmayan ve genellikle atığın konsantrasyonuna bağlı teknolojiler olduğundan uygulamada fazla rağbet görmemektedir günümüzde daha etkili, ekolojik anlamda dost ve ucuz yöntemler araştırılmaktadır [40]. Abiyotik sistemler yüksek enerji gereksinimi, yüksek maliyet nedeni ile özellikle sucul ekosistemlerdeki metallerin uzaklaştırılması için uygun görülmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar atıkların iyileştirilmesi için ticari ölçekte biyolojik metotlar üzerine yoğunlaşmıştır. Biyosorpsiyon bu dezavantajları taşımadığından daha çok tercih edilmektedir. Biyolojik materyaller kullanılarak atık sulardan ya da topraktan ağır metallerin metabolizmalar aracılığı ile biriktirilmesi ya da fizikokimyasal yollarla alımı olarak tanımlanan, biyosorpsiyon için yaygın olarak kullanılan biyosorbentler ise algler, bakteriler ve mayalardır [41,42]. Biyolojik yöntemlerin avantajlarından biri de kirlenmiş bölgelerde in situ uygulamaya izin vermesi, diğeri ise biyoproses teknolojilerinin çevresel olması yani

ikinci bir kirliliğe neden olmamaları ve etkili yöntemler arasında yer almasıdır [40]. Bunların dışında düşük maliyet, yüksek verim, ek besinlere gereksinim olmaması, biyosorbentin rejenerasyonu, metalin geri kazanılma ihtimali de avantajları olarak görülmektedir [43].

1.1.5.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları

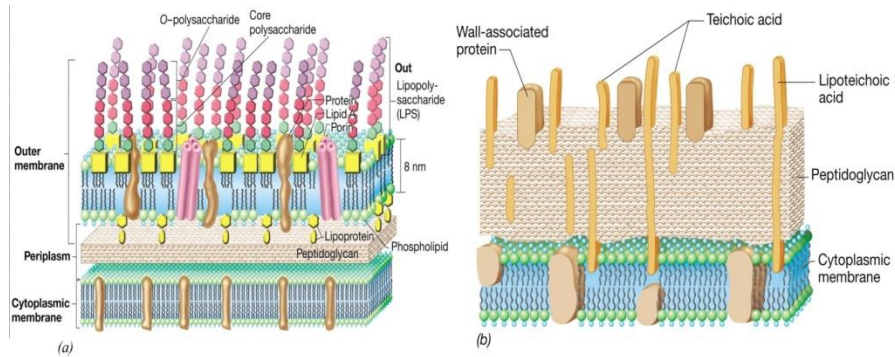
Biyosorpsiyon mekanizmaları mikroorganizma yapılarının kompleks olması nedeni ile çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar iki ana başlık altında toplamak mümkündür Şekil 1.3’ de bakteriyel biyomaslarda biyosorpsiyon mekanizmaları özetlenmektedir.



Şekil 1.3. Biyosorpsiyon mekanizmaları [46]

Metal ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşim sırasında fiziksel adsorpsiyon, iyondeğişimi ve kompleks oluşumu gerçekleşir ve buna hücre yüzeyinde sorpsiyon denir ve metabolizmadan bağımsızdır. Mikrobiyal biyokütlenin hücre duvarı büyük oranda polisakkarit, protein ve yağlar içerir, çok sayıda metal bağlama fonksiyonel grubuna sahiptir. Bu gruplar; karboksilik, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gruplarıdır. Bu fizikokimyasal metal biyosorpsiyonu, metabolizmadan bağımsızdır ve nispeten hızlıdır; algile 5-10 dakika içerisinde gerçekleşir ve metaller geri kazanılabilir [44-48]. Metal bağlama süreci iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamak, hücre duvarında metal ve reaktif

kimyasal gruplar arasında sitokimiyetik etkileşimdir, ikincisi ise artan metal miktarlarının inorganik birikimidir. Bakteri hücre duvarı, metal iyonları ile temasta bulunan ilk bileşendir. Ölü veya inaktif hücre ile metal sorpsiyonunun tipi ekstrasellüler olduğu için hücre duvarının kimyasal fonksiyonel grupları biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Bakteri hücre duvarında bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, fosfonat, amin ve hidroksil gruplarıdır [40]. Bakteri ve siyanobakterilerin hücre duvarları temelde peptid zincirleri ile birlikte N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) disakaritlerini içeren peptidoglikan tabakadan meydana gelmiştir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, Gram pozitiflere nazaran daha ince olup, kuvvetli çapraz bağlara sahip değildir dış zar lipopolisakarit (LPS), fosfolipid ve protein tabakalarından oluşmaktadır. Şekil 1.4’ de Gram pozitif ve Gram negatif hücre yüzeyi şematize edilmektedir. Cd^{2+} biyosorpsiyonu açısından Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri karşılaştırmışlar ve Gram pozitif bakteri hücre duvarlarında bulunan glikoproteinlerin, LPS ve fosfolipidlerden daha fazla Cd^{2+} ’ye bağlama bölgesine sahip olduğunu ayrıca her iki grubun da metal bağlama açısından farklı kapasitelere sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bakteri hücre duvarlarının yapısında sadece bu yapılar metal bağlama görevi yapmazlar bundan başka Gram pozitiflerde teikoik asit ve teikronik asitte metal bağlamada önemli rol oynamaktadır. *E. coli* dış zarında bulunan fosfolipid ve LPS’nin sahip olduğu fosforil grupları da metal katyonlarının bağlanabileceği muhtemel bölgeler arasında yer almaktadırlar [49].



Şekil 1.4. Gram negatif (a) ve gram pozitif (b) hücre membranı yapısı [93]

Streptomyces pilosus’ un karboksil gruplarının bakır bağlamadan sorumlu olduğu, bundan başka amin gruplarının da metal uzaklaştırmada etkili olduğu, katyonik metal iyonlarını şelatlamakla kalmayıp aynı zamanda hidrojen bağladığı ya da elektrostatik etkileşim sonucu anyonik metal türlerini ve boyaları adsorblayabildikleri rapor edilmiştir [52]. Metallerin bağlandığı yapılardan bir diğeri de ekstrasellüler polimerik maddelerdir (EPS). Yapılan çalışmalar da EPS’ nin yüksek metal biriktirme potansiyeli ile birlikte seçici olarak metal iyonlarını bağladığı bildirilmiştir. Bu polimerler anyonik yapıya sahip olup metal katyonlarını bağlamaktadırlar, bazı durumlarda meydana getirdikleri kapsül yapısı ile hücrelerin etrafındaki agregatları gevşetmektedirler [50]. Farklı pH değerlerinde metal türleri farklı yüke sahip olduklarından yüzeyler tarafından değişik şekilde adsorblanabilmektedirler. Nikel ile yapılan bir çalışmada, pH 1-7 aralığında Ni^{+2} iyonları (% 90), pH 9’da (% 68) oranında adsorbe olurken, % 10 oranında $Ni_4OH_4^{+4}$ ve % 8.6 oranında $Ni(OH)^+$ oluşacak şekilde biyosorbe olmaktadır. Bazı pH değerlerinde metal presipitasyonu meydana geldiğinden biyosorbent potansiyelinin komplike olarak değerlendirilmesi gerekliliği rapor edilmiştir [51].

Biyosorbent olarak önemli bir yere sahip olan mikrofungus ve mayalar da tercih edilmektedir. Mikrofungus biyomaslar, çok iyi metal bağlama özelliği gösteren hücre duvarı yapısına sahip olduklarından biyosorpsiyonda avantajlı mikroorganizmalardır. Özellikle *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Streptovercillum* ve *Saccharomyces* biyosorpsiyonda oldukça etkili fungal cinslerdir [50]. Günümüzde biyosorpsiyon mekanizmalarının anlaşılabilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Mikrobiyal biyomas üzerinde veya içerisinde metallerin yerleşimi elektron mikroskobu ve X-ışını enerji dağıtıcı (EDAX) analiz çalışmaları kullanılarak anlaşılmaya çalışılmaktadır. Kimyasal analizi için X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanmaya başlanmış olup, atom ya da moleküllerde elektronların bağlanma enerjisini tayin eden yeni bir teknik atom/iyonun oksidasyon derecesi hakkında bilgi vermektedir [50].

1.1.5.2. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, birden fazda bulunan iyon ya da moleküllerin, bir diğer fazın yüzeyinde yoğunlaşması ve konsantre olması işlemi olarak tanımlanmaktadır. Çevre mühendisliği açısından en genel olarak bir kirleticinin bir fazdan başka bir faza taşınması olarak tanımlanabilir. Adsorpsiyon prosesi bir yüzey olayı olmasından dolayı adsorplama işlemini yapan katının yüzey özellikleri son derece önemlidir. Yüzey alanı ne kadar genişse o kadar iyi bir adsorban özelliği taşır. Diğer bir deyişle, bu fazdaki iyonlar ya da moleküller, çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak adsorban yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözültideki maddeleri adsorban yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin adsorban yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Adsorpsiyon işleminde adsorplanan türlere adsorbant denir. Adsorbantlar bir ya da birden fazla sayıda olabilir. Yüzeyinde adsorpsiyon gerçekleşen madde ise (adsorbent) adsorbantdır. Günümüzde adsorpsiyon birçok doğal fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemde önem taşımaktadır. Ayrıca adsorpsiyon prosesi, atıksulardaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine tutularak giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır [102].

1.1.5.2.1. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi bir yüzeye adsorbe olan madde için denge şartlarını gösterir. Genel olarak, adsorbe olan madde miktarı, adsorplayan maddenin konsantrasyonunun kompleks bir fonksiyonudur. Adsorpsiyon izotermi, adsorban yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözültide kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder [103]. Sabit sıcaklıkta adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya konsantrasyonu arasındaki bağıntıya adsorpsiyon izotermi denir [104]. Adsorpsiyon izotermi, adsorbent üzerinde biriken adsorbantın miktarı ile sabit sıcaklıkta sıvı fazda kalan adsorbant konsantrasyonu arasındaki denge ilişkilerini açıklar. Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyonun arıtma prosesi olarak kullanılabilirliği hakkında bilgi verir [104]. Ağır metal iyonlarının biyosorbent yüzeyine bağlanması, adsorpsiyon

izotermine uygunluk gösterir. Bunlardan en sık kullanılanları; Freundlich ve Langmuir izotermidir [103].

1.1.5.2.1.1. Langmuir İzotermi

Langmuir izotermi, katı yüzeyler üzerinde aktif adsorpsiyon alanlarında meydana gelen tutulmanın fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer izotermelere göre daha iyi açıklamaktadır [104]. Langmuir izoterminde adsorpsiyon, adsorplanan maddenin başlangıç konsantrasyonu ile birlikte doğrusal olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeyde tutulmuş madde miktarı sabit kalmaktadır. Adsorpsiyon hızı, adsorplanacak madde konsantrasyonu ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır [105].

Bu kabullerden yola çıkarak Langmuir aşağıdaki eşitliği ortaya koymuştur.

$$qe = X/M = a.b.C/(1+bC)$$

$$x = Co - Ce$$

Burada;

$qe = X/M$ = Birim adsorplayıcı ağırlığı başına adsorplanan madde miktarı, (g/g)

a = Birim adsorplayıcı ağırlığı başına tek sıralı filmde tutulan mol sayısı ile ilgili sabit

b = Enerji ile ilgili sabit

C = Adsorpsiyondan sonra çözeltilde kalan madde derişimi (ppm)

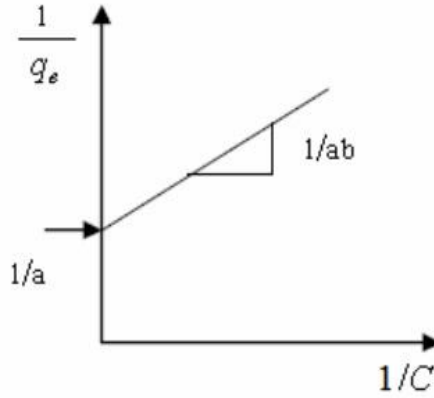
Langmuir adsorpsiyon izotermi linerize edilmiş şekli ile;

$$C/qe = C/(X/M) = 1/a.b + C/aveya$$

$$1/q_e = 1/(X/M) = 1/a + (1/a.b) (1/C)$$

denklemini elde edilir.

C ye karşı $C/(X/M)$ değerleri veya $1/C$ ye karşı $1/(X/M)$ değerleri kullanılarak elde edilen bu grafikler yardımı ile a ve b değerleri hesaplanabilir (Şekil 1.5) [106].



Şekil 1.5. Langmuir izotermi [106]

Langmuir modelinden elde edilen a ve b değerlerinin büyüklüğü iyi bir biyosorpsiyona işaret etmektedir [106].

1.1.5.2.1.2. Freundlich İzotermi

Freundlich (1926), adsorpsiyon prosesini ifade eden bir ampirik eşitlik geliştirmiştir. Freundlich'e göre bir adsorplayıcı maddenin yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir. Diğer bir ifade ile farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından oluşur. Freundlich izotermi aşağıdaki şekilde ifade edilir [102,107].

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n}$$

q_e : Birim adsorban üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g)

K_f : deneysel olarak belirlenen adsorbsiyonun kapasitesini gösteren sabit

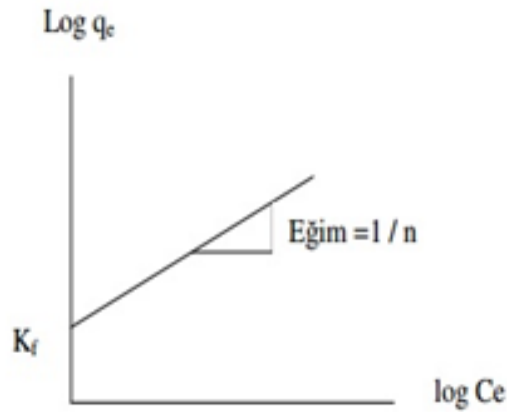
n : Adsorbsiyonun yoğunluğunu gösteren sabit (Freundlich izotermi sabiti)

C_e :Denge halindeki çözeltide adsorban(adsorbent) konsantrasyonu, (ppm veya mol/L)

Freundlich denkleminin her iki tarafının logaritması alınırsa, eşitlik aşağıdaki biçimi alır:

$$\log q_e = \log K_f + 1/n \log C_e$$

Böylece, $\log q_e$ değerlerine karşı $\log C_e$ değerleri grafik üzerinde gösterildiğinde, eğer izoterm Freundlich izotermine uyuyorsa Şekil 1.6. gibi bir doğru elde edilir. Burada n ve K_f sabitleri doğrunun eğimi ve eksen kesme noktalarıdır [102].



Şekil 1.6. Freundlich izotermi [102]

1.1.5.2.2. Adsorbsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği adsorban ve adsorbat arasındaki etkileşime ve sistem koşullarına bağlıdır. Adsorpsiyon prosesinde mekanizma ve reaksiyon hızı önemlidir. Kinetik analizinden katı alım hızı hesaplanabilir. Bunun formüle edilebilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Lagergren (1898) oksalik asit ve

malonik asidin odun kömürü ile adsorpsiyonunu formüle etmiştir. Lagergren Eşitliği katı maddenin kapasitesine dayanan sıvı-katı sistemin adsorpsiyonunu tarif eden ilk eşitliktir. Katının adsorpsiyon kapasitesi ve çözeltinin konsantrasyonuna dayanan kinetik eşitliğini ayırmak için Lagergren'in birinci dereceden eşitliği Pseudo-birinci mertebeden eşitlik tanımlanmıştır [104].

Daha önce Lagergren'in adsorpsiyon kinetik eşitliği uygulaması Trivedi tarafından kalsiyum silikat kullanılarak kloroformdan selüloz triasetat adsorpsiyonu için kullanılmıştır. Son otuz yılda kinetik eşitlik kirleticilerin adsorpsiyonunda sulu çözeltilerden metaller, boyalar ve organizmalar gibi maddelerin adsorpsiyonunda hesaplanmıştır. Weber-Morris Eşitliği, Pseudo-birinci-derece eşitliği, Pseudo-ikinci-derece eşitliği, Düzenlenmiş-ikinci-derece eşitliği ve Elovich eşitliği adsorpsiyon kinetiğini açıklamak üzere tanımlanmış eşitliklerdir. Ancak Düzenlenmiş-ikinci-derece eşitliği ve Elovich eşitliği daha çok gazların katı maddeler tarafından adsorpsiyonunda kullanılmaktadır [104].

1.1.5.2.2.1. Pseudo Birinci Derece Eşitliği

Sıvı-katı adsorpsiyon sistemlerinde katının adsorplama kapasitesi esas alan, Lagergren tarafından önerilmiş eşitliktir.

$$dq/dt=k_1(qe-qt)$$

Denklem, $t = 0$, $t = t$, $qt = 0$ ve $qe = qt$ sınır değerleri için integre edildiğinde:

$$\ln (qe-qt) = \ln qe - k_1t$$

şeklini alır.

Bu denklemde:

t : Zaman (dakika)

k_1 : Pseudo birinci derece kinetik sabiti (dak^{-1})

qe : Denge halinde adsorplanan madde miktarı(mg/g)

qt : Herhangi bir t anındaki adsorplanan madde miktarı(mg/g)

Grafik $\ln(q_e - qt)$ ye karşı t değerleri alınarak çizilmekte ve k_1 ile q_e değerleri elde edilmektedir [104].

1.1.5.2.2.2. Pseudo İkinci Derece Eşitliği

Pseudo-ikinci-derece eşitliği, katı fazın adsorplama kapasitesini ölçmek için kullanılmaktadır ve bir hız kontrol adımı olarak kemisorpsiyon mekanizmasını tanımlamaktadır.

$$dq/dt = k_2.(q_e - qt)^2$$

t : Zaman (dak.)

k_2 : Pseudoikinci derece kinetik sabiti (g/mg dak)

q_e : Denge halinde adsorplanan madde miktarı(mg/g)

qt : Herhangi bir t anındaki adsorplanan madde miktarı(mg/g)

Denklem (16), $t_0 = 0$, $t = t$, $q = 0$ ve $q_e = q$ sınır değerleri için integre edildiğinde:

$$qt = t/(1/k_2qe^2 + t/qe)$$

Denklem doğrusallaştırılırsa:

$$t/qt = (1/k_2qe^2) + (1/qe).t$$

şeklini alır [104].

1.1.6. Mikrobiyal İdentifikasyon

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur.

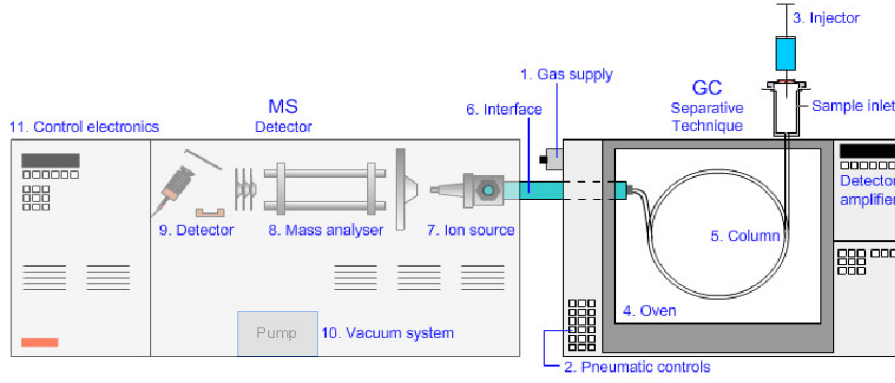
Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [53]. Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile “moleküler mikrobiyal ekoloji” olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [54].

1.1.6.1. Geleneksel Teknikler

Mikrobiyolojik yöntemler; geleneksel ve hızlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Gelenekselyöntemler halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan geleneksel biyokimyasal testlerde yoğun işgücü ile yüksek miktarda ayraç ve besiyeri tüketilmektedir [55,56]. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex-situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir. Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı oldukça azdır ve bakteriyel çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [57,58].

1.1.6.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi

Hücrel yağ asitlerinin belirlendiği gaz-sıvı kromatografisi metodu çevre ve klinik kökenli bakterilerin, mikobakterilerin ve mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikrobiyal identifikasyon Sistemi (MIS) türlere özgü olan tüm yağ asiti metil esterleri, dimetil asetil, aldehid gibi bileşikleri yüksek ayrıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MIS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvarında izole edilen bir çok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır (Şekil 1.7) [68]. Mikrobiyal hücrelerde yağ asitlerinin kaynağı hücre membranlarının başlıca bileşiği olan lipitlerdir veya gram negatiflerde lipopolisakaritlerin lipitid A bileşiği ve gram pozitiflerde lipoteikoik asittir. Tüm lipidlerin yağ asidi içeriği türe özgü biyosentez basamaklarıyla belirlenir. Küçük genoma sahip organizmalar genellikle az sayıda yağ asitleri bulundururken büyük genomlu öbakterler 20'den fazla yağ asidine sahiptirler [68]. Bakteriler ökaryotlarda bulunmayan özgün bazı yağ asitlerini içerirler. Genellikle dallı zincirli yağ asitleri gram pozitifleri, siklopropan yapıda olan yağ asitleri gram negatif bakterileri karakterize eder. Gram negatif bakteriler, gram pozitif bakterilere oranla daha çok sayıda karbon içeren doymuş ve tekli doymamış yağ asidi içerirler [68]. Analiz için örneklerin hazırlanması, saponifikasyon, metilasyon, ekstraksiyon ve yıkama olmak üzere 4 basamaktan oluşur [68]. Öncelikle, 24-48 saat inkübe edilmiş hücreler kültürden alınır, saponifikasyon için sodyumhidroksit-metanol karışımı ile muamele edilir. Bu basamakta yağ asitleri hücrel lipitlerden ayrılır. İkinci adımda HCl-metanol karışımı ile metilasyon basamağı gerçekleştirilir. Üçüncü basamakta, meydana gelen yağ asidi metil esterleri hekzan ve metil tertbütil eterden oluşan solüsyonla ekstrakt edilir. Son olarak ekstrakt sodyumhidroksit çözeltisi ile yıkayıp gaz kromatografisi için tüplere aktarılır. Örneklerin değerlendirilmesi MIS ile yapılır. Sistem, alev iyonizasyon dedektörü, kapiler silikon kolon, otomatik örnekleyici, entegratör, bilgisayar ve yazıcıdan oluşur [68].



Şekil 1.7. Fame analizi [68]

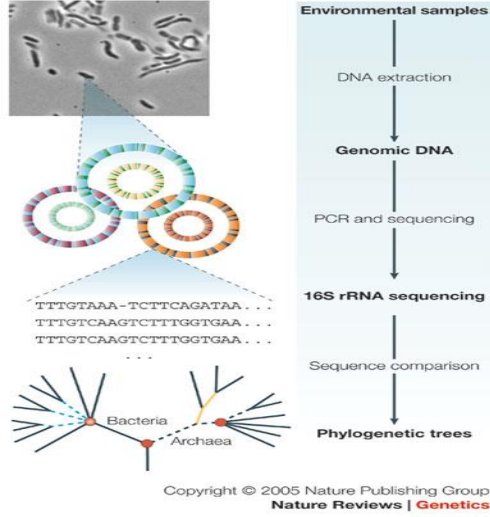
1.1.6.2.1. FAME Analizinin Avantaj ve Dezavantajları

Yağ asitleri ile bakterilerin tanılanması sistemi ile bakteriyel organizmalar alt tür düzeyinde bile tanılabilmekte ve birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. MIS ile elde edilen sonuçların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçlarından daha duyarlı ve cabuk, moleküler temele dayalı tanı testleriyle ile % 100'e yakın bir benzerlik gösterdiği ve bu sistemin bakteriyel organizmaların tanısında başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. MIS sisteminin rutin çalışmalar için nisbeten klasik yöntemlerden pahalı olsada özellikle zaman açısından çok uygun bir tanı yöntemi olduğu düşünülmektedir [70]. Ayrıca örneklerin hazırlanması yaklaşık 1 saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir [68]. Ancak yağ asidi analizinin enstrümantasyonu diğer analizlere nazaran maliyetli ve komplekstir [68].

1.1.6.3. 16S rRNA Dizi Analizi

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem genus hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir [67]. Sekans analizi, etken DNA'sının belirli bir bölgesinin nükleotid

dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir (Şekil1.8). DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [61]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [62] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2.3-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert [63] ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [61]. DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayırımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayırımı için DNA sekanslamanın kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir [59]. PZR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması, dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi bazı güçlükler de mevcuttur [60]. Ayrıca 16S rDNA geni, antimikrobiyal özelliği olan çeşitli kimyasallara duyarlıdır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, organizmanın bu kimyasallara duyarlılığını etkileyebilir ve antimikrobiyal ajanlara fenotipik direnç, 16S rDNA gen dizilimi sayesinde fark edilir [61, 62]. Bununla birlikte bu karakteristikler, 16S rDNA gen diziliminin klinik mikrobiyolojide kullanıldığı gibi bakteriyel tanımlamada ya da cins ve tür düzeyinde yakın ilişkilerin kararlaştırılmasında kullanımının önüne geçmez veya bunu etkilemez. Ancak bu karakteristikler genetik açıdan daha uzak mesafeli ilişkilerin ortaya çıkarılmasında daha büyük etkiye sahiptir [63].

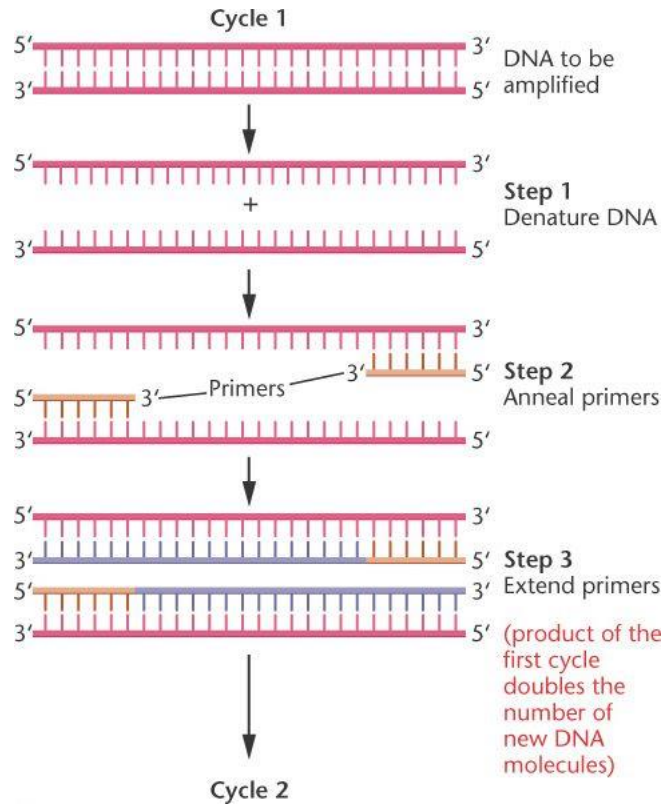


Şekil 1.8. 16S rRNA sekans analizi [65]

1.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (*Taq*) kullanılarak *in vitro* olarak amplifikasyonunu sağlayan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir (Şekil1.9) [64]. Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır [65]. Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşur [65]. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar. Sentezlenen DNA

ürününün saptanması, kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleşmektedir [66]. Şekil 1.6'de PZR amplifikasyonunun basamakları gösterilmiştir. PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dir [67].



Şekil 1.9. PZR aşamaları [100]

Kalıp DNA: Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA, plazmit ve faj DNA, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir. PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir [67].

Polimerazlar: Taq DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP ile arasına nükleotitler eklenerek, fosfodiester bağlar katalizler. Sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus* izolatından elde edilen Taq DNA polimerazdır [100].

Primerler: Gen çoğaltılması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotit primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Bu primerler genellikle oluşumu bilinmeyen çeşitli nokta mutasyonlarının olduğu bölgelere bağlanma amacıyla seçilir. Buna rağmen PZR ve TEM'in farklı tipleri arasında ayırım yapamaz [67, 68].

dNTP Karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dördümlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir [67].

Tamponlar ve MgCl₂: PZR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Mg²⁺ iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini 1 artırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar.(Tm değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) Bu nedenle MgCl₂'ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır [100].

DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon): Kalıp DNA (template DNA), 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [69, 70].

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilen baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [71].

Primer Uzaması (Primer Extension), DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [72]. PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır [70]. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PZR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır. PZR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat ile boyanarak gözlemlenir [70]. PZR yönteminde temel bileşenler; kalıp DNA, kalıp DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli oligonükleotidler (primerler), deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPler), tampon, MgCl₂ ve ısıya dayanıklı DNA polimerazdır. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilir ki buna Taq DNA polimeraz adı verilir [74]. PZR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PZR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PZR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuvarında yeniden ayarlanması gerekmektedir [75]. Eğer PZR şartları yeni PZR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir [72].

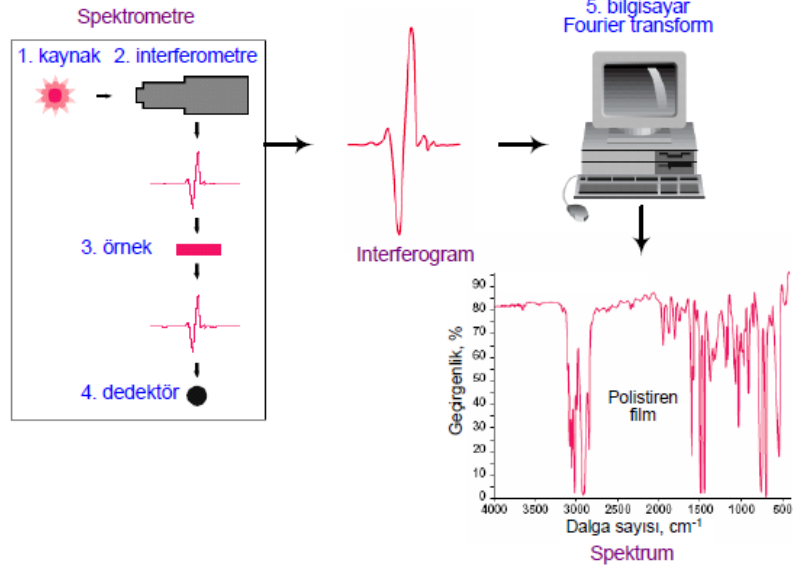
1.1.6.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur [78]. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [79]. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyobelirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Bununla birlikte nispeten pahalı olabilir, hassas çalışma gerekir ve sekanslamada türler arası yüksek benzerlik çıkabilir [80].

1.1.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fransız matematikçisi Sean Fourier'in (1786-1830) geliştirdiği ve Fourier transformasyonu (dönüşüm) olarak adlandırılan bir matematiksel işleme göre, bir dalga hareketi basit sinüs veya kosinüslü ifadelerin toplamı ile tanımlanabilir [96].



Şekil 1.10. FTIR analizi [96]

Şekil 1.10'da siyah cisim kaynaktan (1) çıkan infrared ışın demeti, enerjiyi kontrol eden bir yarıktan geçerek spektral kodlamanın yapıldığı interferometreye (2) girer. Oluşan interferogram sinyali örnek (3) kompartımanına yönlendirilir; burada örneğin özel-liğine ve analiz tipine göre geçirilir veya yansıtılır. Enerjinin özel frekansları örnek tarafından absorblanır. Örnek kompartımanından çıkan demet son ölçme için dedektörden (4) geçer; dedektör, özel interferogram sinyalini algılayabilecek özellikte olmalıdır. Ölçülen sinyal sayısallaştırılır ve bilgisayara (5) gönderilir; burası Fourier transformasyonun gerçekleştirildiği kısımdır. Sonuç olarak IR spektrum kaydedilir ve kullanıcıya sunulur [96].

Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\text{-}14000 \text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır. MIR bölgesindeki bantlar ile hücre duvarı bileşenleri, proteinler ve nükleik asitler gibi bakteri hücrelerinin toplam bileşenleri belirlenebilir ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin tanımlanmasına sağlar. Bir organik maddenin ışık dizisinde $3600\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$ aralığına, fonksiyonel gruplar bölgesi denir. İkinci bölge parmak izi bölgesi olarak tanımlanan $1200\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ bölgesidir. Bu bölge, özellikle moleküldeki küçük yapısal ve bileşim değişikliklerini incelemekte kullanılır. Molekülün yapısında

ve bileşiminde meydana gelen küçük değişiklikler, bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde yer değiştirmesine neden olur. Bundan dolayı, bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğuna bir işarettir. Tek bağların çok büyük bir kısmı bu bölge veya aralıkta absorpsiyon bantları verir. Bölgenin oldukça dar olması nedeniyle, bu bölgedeki titreşim frekansları, enerjilerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle birbirlerini çok etkiler. Bu nedenle, maddelerin ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları kompozit bantlardır, yani sadece bir bağ frekansından ileri gelen saf bir absorpsiyon bandı değildir. Bu bölge ışık dizisinin karmaşık kısmıdır ve ancak diğer bölgelerden elde edilen bilgiler de dikkate alınarak bir sonuca varılabilir. Ayrıca madde miktarlarıyla orantılı olarak kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu değişmekte ve bu özellikten kantitatif analizde yararlanılmaktadır [108].

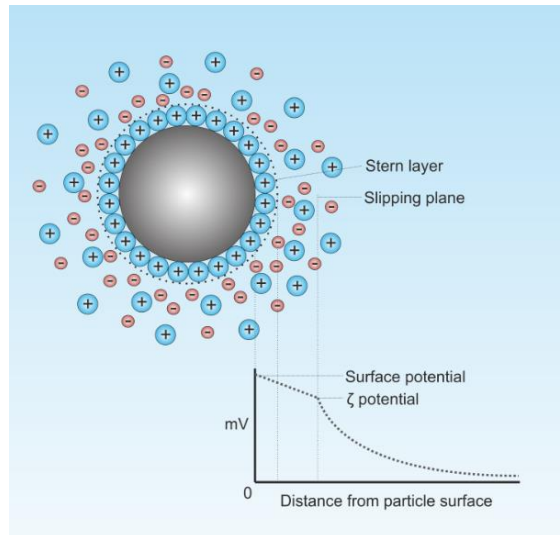
Çizelge1.2. FTIR Kütüphanesi [104]

| Gruplar | Frekans aralığı (cm ⁻¹) |
|--|-------------------------------------|
| A. Alkil | |
| C-H (stretching) | 2853-2962 |
| isopropil, -CH(CH ₂) ₂ | 1380-1385 |
| | 1365-1370 |
| tert-bütül, -C(CH ₃) ₃ | ~1365 |
| B. Alken | |
| C-H | 3010-3095 |
| C=C | 1620-1680 |
| R-CH=CH ₂ | 985-1000 |
| | 905-920 |
| R ₂ C=CH ₂ | 880-900 |
| cis RCH-CHR | |
| trans-RCH=CHR | 960-975 |
| C. Alkil | |
| =C-H | ~3300 |
| C=C | 2100-2260 |
| D. Aromatik | |
| Ar-H | ~3030 |
| C=C | 1450-1600 |
| C-H | 690-860 |
| E. Alkol, Fenol ve Karboksilik Asitler | |
| O-H | |
| Alkoller, Fenoller (seyreltik çözelti) | 3590-3650 |
| Alkoller, Fenoller (hidrojen bağlı) | 3200-3550 |
| Karboksilik asitler (hidrojen bağlı) | 2500-3000 |
| F. Eter ve alkoller | |
| C-O-C | 1020-1275 |
| G. Aldehit, keton, ester, karboksilik asit ve amidler | |
| C=O | 1630-1780 |
| Aldehitler | 1690-1740 |
| Ketonlar | 1680-1750 |
| Esterler | 1735-1750 |
| Karboksilik asitler | 1710-1780 |
| Amidler | 1630-1690 |
| H. Aminler | |
| N-H | 3300-3500 |

1.1.8. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür [109]. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Ölçümü ve tanımı çift iyon tabakası teorisine göre yapılır. Bu teoriye göre, negatif yüklü partiküllerin etrafında iki ayrı bölge bulunur, bunlardan birincisi Stern Tabakası olarak bilinir ve partikül yüzeyine çok yakın bir şekilde sınırlanmış yüksek derişimde zıt (pozitif) iyonlardan oluşur. Stern tabakası ve dağılımlı tabaka arasındaki iyon dağılımı ortamda potansiyel yükler önem kazanmaktadır (Şekil 1.11) [109].

Sıvı çözelti içerisinde bulunan katı parçacıkların veya mineralin ölçülebilen yüzey potansiyeli olan zeta potansiyelinin birimi milivolt (mV) veya voltur. Zeta potansiyel değeri pozitif ve negatif değerli (bu yüzeyin elektriksel yükünü gösterir) veya sıfır olabilir. Zeta potansiyel değeri çözeltinin pH'sına, ortamdaki iyonlara (elektrolitlere) ve çözeltinin cinsine, iyon konsantrasyonuna bağlıdır [110].



Şekil 1.11. Zeta potansiyeli [109]

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar [81,82] sonucunda Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilmiş ve kültüre alınmış olan alüminyum, baryum ve kurşun dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesidir. Kültüre alınmış olan alüminyum baryum ve kurşun direnci gösteren suşların, yağ asidi analizi (FAME) ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır. Sonraki aşamada da tanımlanan bu suşların söz konusu metaller için biyosorpsiyon yetenekleri FTIR, zeta potansiyeli ve kinetik çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı

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

2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

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

2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

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

2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Hazırlanışı

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

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Merk ve Sigma firmalarında temin edilmiştir.

2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1 Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL)

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

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

10 gram SDS tartılarak 100mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.3 Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

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

2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)

20 g NaCl tartılarak 100 mL distile su ile çözülmüştür.

2.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)

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

2.1.2.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

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

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

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

2.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

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

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

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

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

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

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

2.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

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

2.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

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

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

2.1.2.4. Yağ Asidi Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.

2.1.2.4.1. Solüsyon I

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

2.1.2.4.2. Solüsyon II

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

2.1.2.4.3. Solüsyon III

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

2.1.2.4.4. Solüsyon IV

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [83]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m³/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18.4 m³/sn ve en çok 1.673 m³/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.1). Nehir üzerinde 12 önemli baraj vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [84].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu (Google Earth'den alıntı)

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırmave Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ilinde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [85]

2.2.2. Örneklerin Toplanması

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

Çizelge 2.1. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

| Bölge No | Bölge Adı | Bölge Koordinatları |
|----------|--|--|
| 1 | Kesikköprü Barajı | 39°22'16.39' 'K,33°26'49.26 ' 'D, 890m |
| 2 | Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi | 39°23'43.98 ' 'K, 33°25'38.24 ' 'D, 833m |
| 3 | Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii | 39°26'03.30 ' 'K, 33°24'08.43 ' 'D, 781m |
| 4 | Akkoşan Merkez Mevkii | 39°28'39.46 ' 'K, 33°24'26.73 ' 'D, 740m |
| 5 | Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii | 39°31'09.87 ' 'K, 33°24'39.32 ' 'D, 738m |
| 6 | Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii | 39°34'34.39 ' 'K, 33°26'11.61 ' 'D, 763m |
| 7 | Sulubük - Kıybağı Mevkii | 39°37'02.34 ' 'K, 33°26'38.26 ' 'D, 773m |
| 8 | Kapulukaya Barajı Girişi | 39°39'53.04 ' 'K, 33°28'55.46 ' 'D, 852m |
| 9 | Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi | 39°43'59.01 ' 'K, 33°28'25.63 ' 'D, 737m |
| 10 | Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii | 39°48'38.97 ' 'K, 33°29'14.57 ' 'D, 684m |
| 11 | Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii | 39°50'28.41 ' 'K, 33°28'02.13 ' 'D, 686m |
| 12 | İrmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı | 39°57'22.98 ' 'K, 33°25'04.35 ' 'D, 679m |

2.2.3. Metal Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması

Al, Ba ve Pb ağır metale dirençli bakterilerin seçimi için ağır metal içeren ortamlar kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Al, Ba ve Pb ağır metale dirençli suşları seçmek için her üç metal ve örnek için ayrı ayrı nutrient agar içeren petrilere hazırlanmış ve petrilere literatürde belirlenen konsantrasyonlarda Al için $AlCl_3$, Ba için $BaCl_2$ ve Pb için $Pb(NO_3)_2$ kullanılmıştır. Bu petrilere her bölgeden alınan su örnekleri seyreltilerek ekilmiştir. $30^{\circ}C$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan koloniler seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Dirençli olan suşlar, toplandıkları bölgeleri ve dirençli oldukları metali temsil edecek biçimde kodlanmıştır. Baryum dirençli olan iki suş, Ba01 ve Ba11, alüminyum dirençli suş Al11 ve kurşun dirençli suş Pb06 olarak kodlanmıştır.

2.2.4. İzolatların Elektron Mikroskopu Analizleri

Aldirençli saf kültürün dirençli olduğu metali içeren ve içermeyen ortamlarda gerekli üreme sıcaklığında 24-48 saat inkübe edildikten paraformaldehit ile fiksasyonu yapılarak elektron mikroskopu analizleri yapılmıştır.

2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Maksimum tolere edilebilen konsantrasyon (MTK) değerlerinin belirlemek amacıyla suşların her biri agarlı ortamda giderek artan konsantrasyonlarda Al için $AlCl_3$, Ba için $BaCl_2$, Pb için $Pb(NO_3)_2$ eklenerek gerekli sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan petrideki koloniler daha yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren petrilere ekilmiştir. Bu işlem üreme gözlemlenilmeyinceye kadar tekrarlanmıştır. Üremenin görüldüğü en yüksek konsantrasyon MTK değeri olarak belirlenmiştir.

2.2.6. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

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

2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayımı

Bir gecelik kültürlerden 100 µL alınıp her bir suş için ilgili metali içeren ve içermeyen sıvı ortamlara ekim yapıp ekim yapılan ortamlardan her 2 saatte bir 1mL örnek alınıp seyreltme yapıldı seyreltilmiş örnekler plate count agarlara ekilip bir gün beklenerek koloni oluşumu gözlemlendi ve sayıldı [86].

2.2.8. FAME Analizi

Seçilen A111, Ba01 Ba11 ve Pb06 suşlarının tüm yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [87]. Örnekler nutrient agara dört bölgeden oluşan çizgi ekim yapılmış 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üçüncü bölgede gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipidlerin parçalanıp, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine Solüsyon I’den 1 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiştir. 100°C’lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra tekrar vortekslenmiş ve daha sonra tekrar 100°C’lik su banyosunda 25 dakika tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanmış, serbest yağ asitlerine ester bağlarıyla metil eklenmiş ve yağ asit metil esterler elde edilmiştir. Bunun içinse 100°C’lik su banyosundan çıkarılan tüplere Solüsyon II’den 2 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiş ve 80°C’lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında

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

2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen Al, Ba, Pb dirençli bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [88]. 15 mL'lık kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5.7 µL TE tampon eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz-K ve 30 µL RNAaz eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB /NaCl tamponu karışımın üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Aynı hacimde kloroform/izoamil alkol solüsyonu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır. İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrede yapılmıştır.

Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplanmış (OD₂₆₀ ve OD₂₈₀) ve bu değerler arasında ki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1.6 ve 1.8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha yukarıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha aşağıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir [89]. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA'ların miktarlarının hesaplanması için OD₂₆₀ değeri kullanılmış ve DNA miktarları;

DNA (µg/mL)= OD₂₆₀ x Seyreltme oranı x 50 formülü ile hesaplanmıştır [89].

2.2.10.PZR Amplifikasyonu

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılacaktır. Diziler (forward) F primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve (reverse) R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 50 µL PZR karışımı için 1 µL kromozomal DNA (100 ng), 1 µL 16S Forward Primer (20 pmol), 1 µL 16S Reverse Primer (20 pmol), 0.5 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 5 µL 50 mM MgCl₂, 5 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içermeyen), 31.5 µL steril distile su, 1 µL (2.5U) Taq DNA polymeraz karıştırılıp santrifüjlenecektir [89]. PZR protokolünün optimizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda optimum protokol tespit edilmiş olup tüm örnekler spesifik primerler kullanılarak bu protokole göre PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonunda Çizelge 2.7'de kullanılan DNA, F primer, R primer, dNTP, MgCl₂, Taq buffer, Taq DNA Polymerase ve PZR Master Mix miktarları belirtilmiştir. Son hacim steril distile su (water nuclease-free) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Techne TC-Plus marka otomatik termocycler PZR amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Döngüler; 95°C'de 5 dakika denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 30 saniye bağlanma basamağı, 72°C'de 2 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [90].

2.2.11. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

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

2.2.12. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

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

2.2.13. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromür boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası 1 mM MgSO₄ ile 15 dakika muamele edilerek geri alınmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

2.2.14. DNA Sekans Analizi

İzole edilen A111, Ba01, Ba11, Pb06 suşlarının 16S rDNA gen sekansları yapılacaktır. Saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Gelen nükleotid dizilerinin, çift yönlü dizi analizi ile 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuştur.

2.2.15. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

İzole edilen A1, Ba, Pb dirençli bakterilerin 16S rRNA gen sekans dizileri Clustal Multiple Alignment Program (ClustalW 2.0) kullanılarak dizinler oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları, Mega 5.2 programında komşu bağlantı (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir.

2.2.16. Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Her bir suş için belirlenen MTK değerleri kadar metal içeren, A111 kodlu suş için 16, Ba01 kodlu suş için 15, Ba11 kodlu suş için 15, Pb06 kodlu suş için 15 tane sıvı besi yeri hazırlandı. Besiyerlerine bir gecelik kültürlerden 100µL konuldu ve 30°C ve 37°C sıcaklıkta çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Sırasıyla her iki saatte bir besiyerlerinden birisi alınıp 15 dakika, 5000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant ayrı

bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırıldı. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülerek bakterinin stationary fazına kadar ki bisorpsiyon yeteneği değerlendirildi [91].

2.2.17. İzoterm Çalışmaları

Biyosorpsiyon izotermeleri sabit sıcaklıkta ve dengede metal konsantrasyonunun birfonksiyonu olarak metal biyosorpsiyonunu tanımlar. Bu çalışmada izotermeşitlikleri metal biyosorpsiyonu için uygulanmış ve biyosorpsiyon için en iyi uyumu hangidenklemin sağladığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İçerisinde 5, 10, 15, 20, 25, ve 30 ppm'lik konsantrasyonlarda metal içeren 25 mL'lik 6 adet flaska, kurutulan bakteriler, her bir flask için 25 mg olacak şekilde eklenmiştir. 120 dakika sonra flasklardan örnekler alınmıştır. 20 dakika, 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüş ve izoterm eğrileri çizilmiştir [105].

2.2.18. Adsorpsiyon Kinetiği Çalışmaları

Kinetik parametreleri hesaplanırken Pseudo birinci derece eşitliği ve Pseudo ikinci derece eşitliğine uygunlukları araştırılmıştır. İçerisinde 30 ppm metal bulunan 25 mL'lik 10 adet flaska kurutulan bakterilerden her bir flask için 25 mg olacak şekilde eklenmiştir. 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120. dakikalarda flasklardan örnekler alınmıştır. 20 dakika, 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüş ve kinetik uygunluğu araştırılmıştır [104].

2.2.18. Bakterilerin FTIR Analizi ile Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Yeterli miktarda sıvı besiyeri hazırlandıktan sonra bakteriler üremeye bırakılmıştır. Üreyen bakteriler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Bakterilerin bulunduğu pellet kısmı 2 kere distile su ile yıkanıp tekrar santrifüjlenmiştir. Pellet kısmı 55°C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır. Sıvıdan tamamen ayrılan kuru bakterilerin analizi yapılarak fonksiyonel grupların değerlendirilmesi yapılmıştır [108].

2.2.19. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Bir gecelik kültürlerden ependorf tüpe alınan bakteriler 14500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir. Besiyeri ortamdan uzaklaştırılır ve bakterinin üzerine 1 mL distile su konularak süspanse edilmiştir. Bu karışımdan 100 µL çekilerek hazırlanan 5 farklı metal konsantrasyonu içeren deney tüplerine eklenmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında, 120 rpm'de çalkalamalı etüvde 2-5 saat bırakılmıştır. Süre sonunda alınan örneklerin analizi yapıldıktan sonra değerlendirilmesi yapılmıştır [115].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bakterilerin İzolasyonu

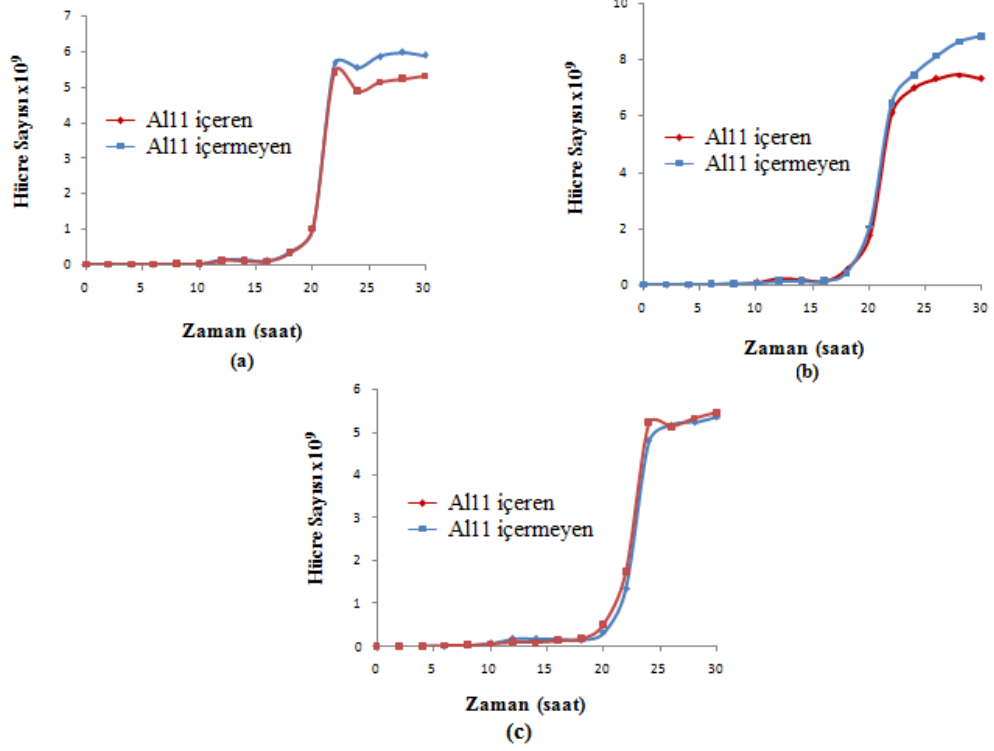
Laboravtuarımız tarafından daha önce yapılan çalışmalar ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan alüminyum, baryum ve kurşun dirençli suşlar izole edilmiş ve suşlar dirençli oldukları metalleri ve izole edildikleri lokasyonu temsil edecek şekilde kodlanarak kültüre alınmıştır. Baryum dirençli olan iki suş sırasıyla Ba01 ve Ba11, Alüminyum dirençli olan suş Al11 ve kurşun dirençli olan suş ise Pb06 olarak kodlanmıştır [81, 82].

3.2. Bakterilerin Optimum Üreme Koşulları

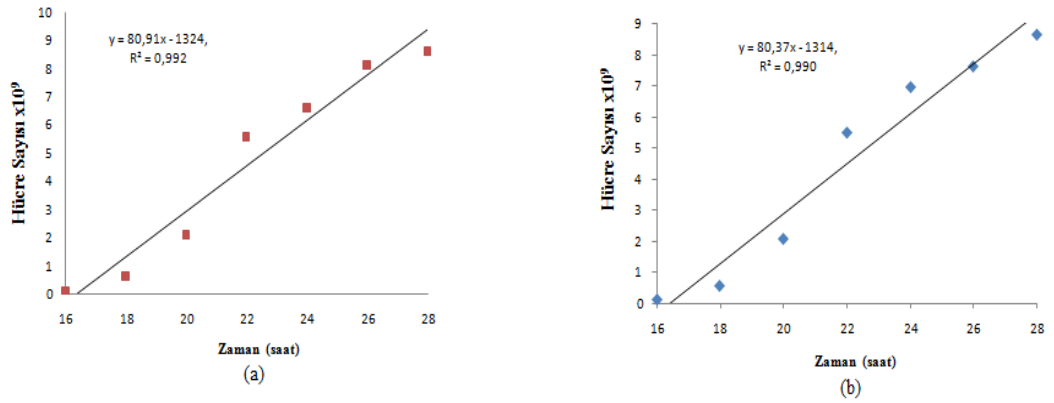
İzole edilmiş olan suşlar optimum üreme koşullarının belirlenmesi amacıyla değişik pH'larda üreme eğrileri çıkartılmıştır.

3.2.1. Al11 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Al11 kodlu suş pH 7'de 32 saatlik bir inkübasyon sonrasında alüminyum içermeyen ortamda 8.8×10^9 , içeren ortamda ise 7.3×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de alüminyum varlığında, hücre sayısında % 17 oranında bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.1). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.2'de verilmiştir.



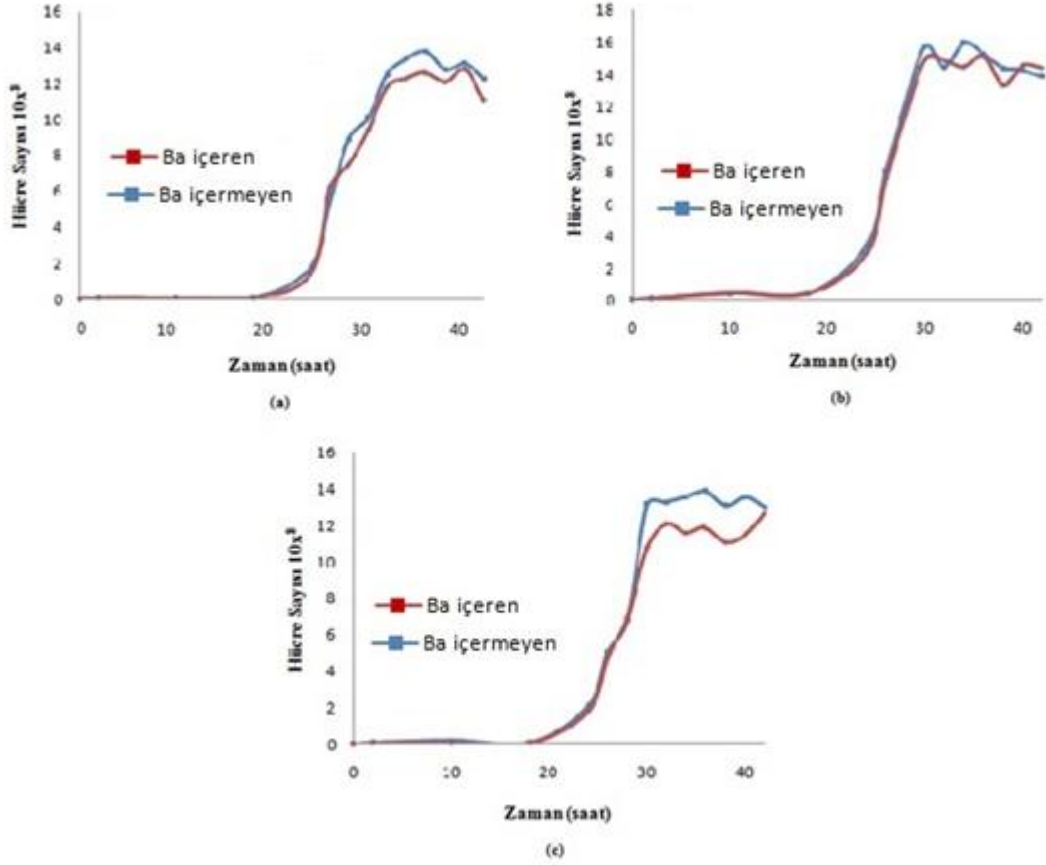
Şekil 3.1. Al11 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri



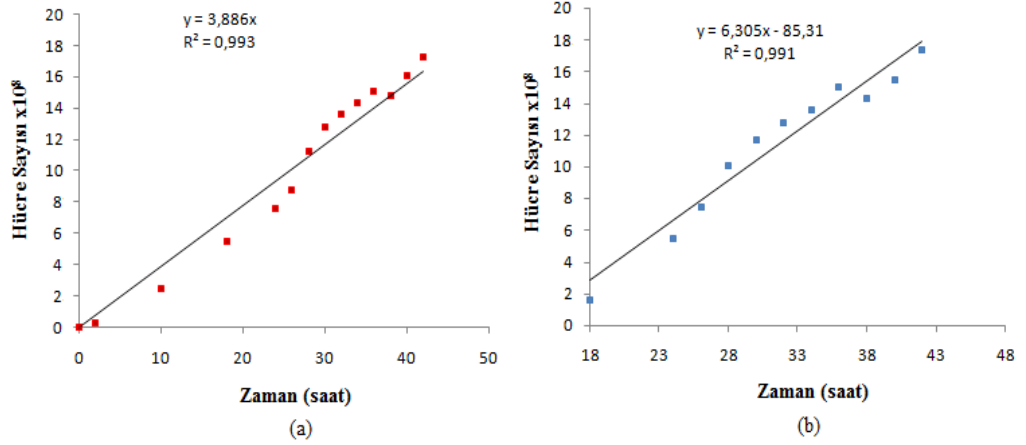
Şekil 3.2. Al11 kodlu suşun alüminyum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.2. Ba01 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Ba01 kodlu suş pH 7'de 40 saatlik bir inkübasyon sonrasında baryum içeren ortamda 14.3×10^8 , içermeyen ortamda ise 13.8×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de baryum varlığında, hücre sayısında % 4 oranında bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.3.). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.4'de verilmiştir.



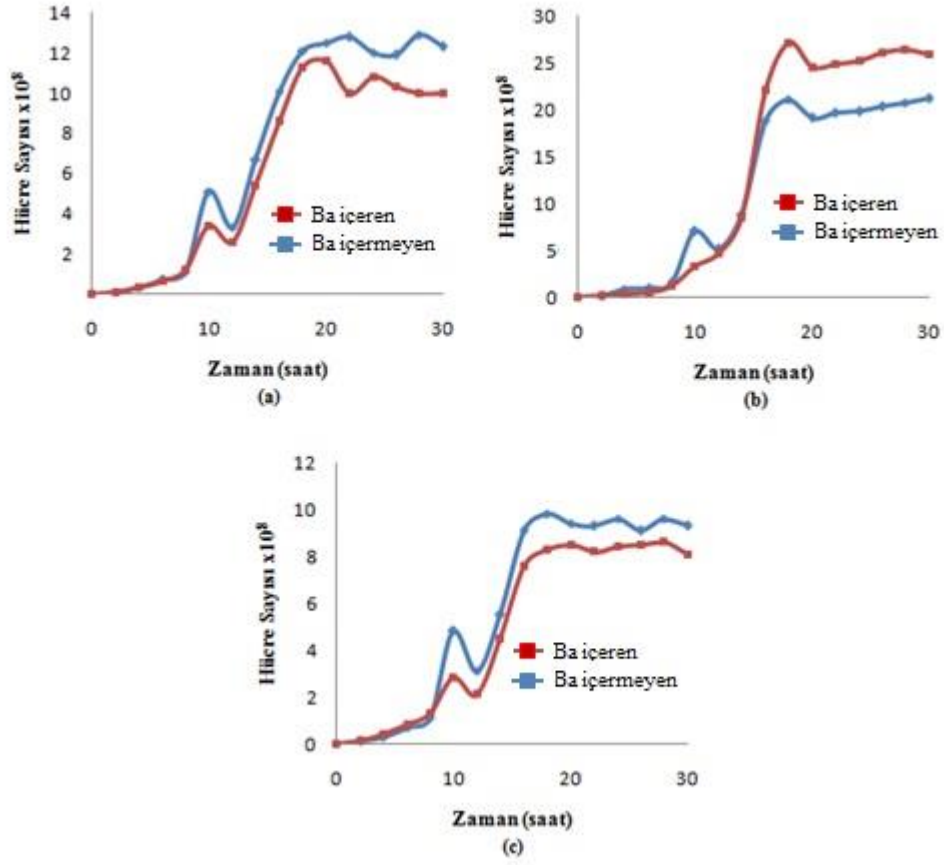
Şekil 3.3. Ba01 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri



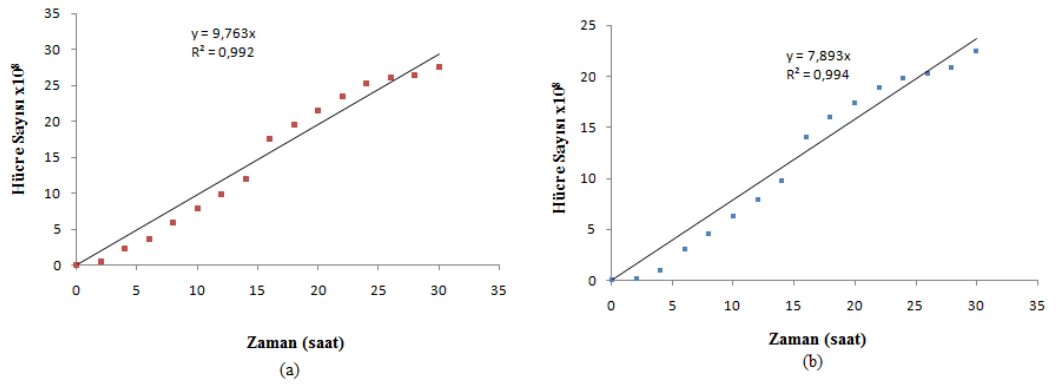
Şekil 3.4. Ba01 kodlu suşun baryum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.3. Ba11 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Ba11 kodlu suşu pH 7'de 30 saatlik bir inkübasyon sonrasında baryum içeren ortamda 25.9×10^8 , içermeyen ortamda ise 21.2×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de baryum varlığında, hücre sayısında % 19 oranında bir artış tespit edilmiştir. (Şekil 3.5). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.6'de verilmiştir.



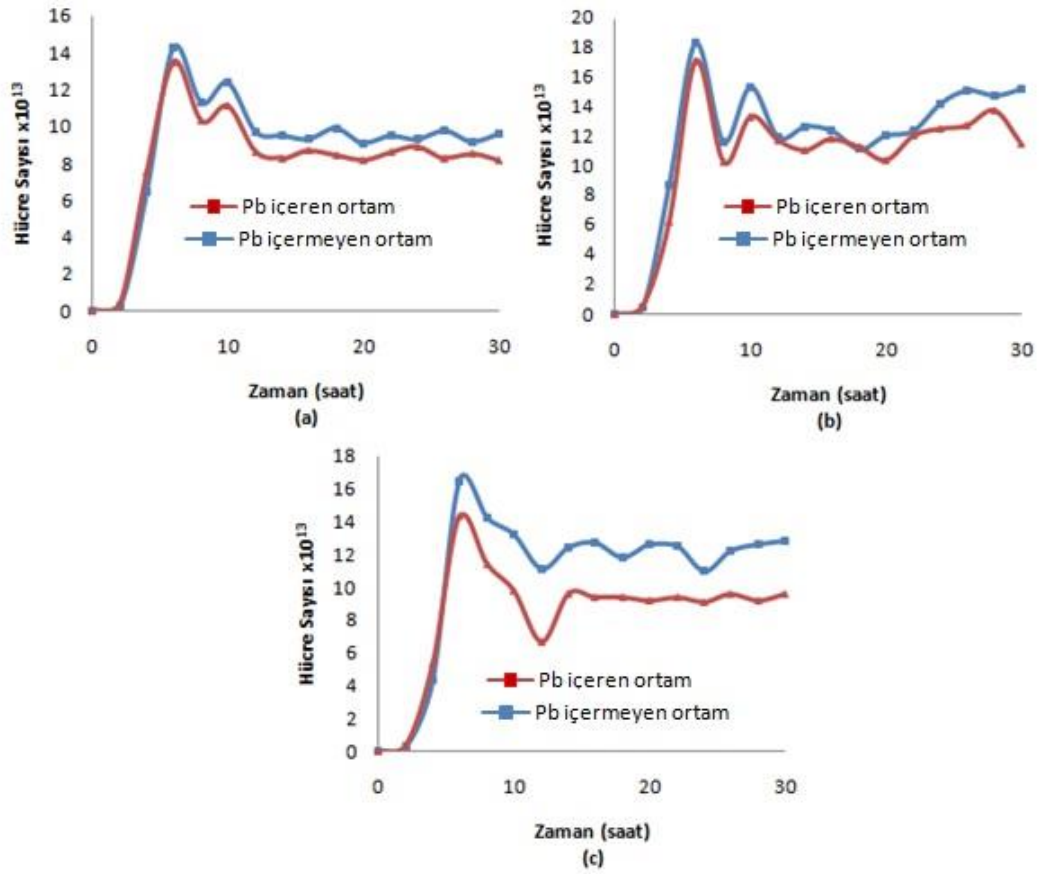
Şekil 3.5. Ba11 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri



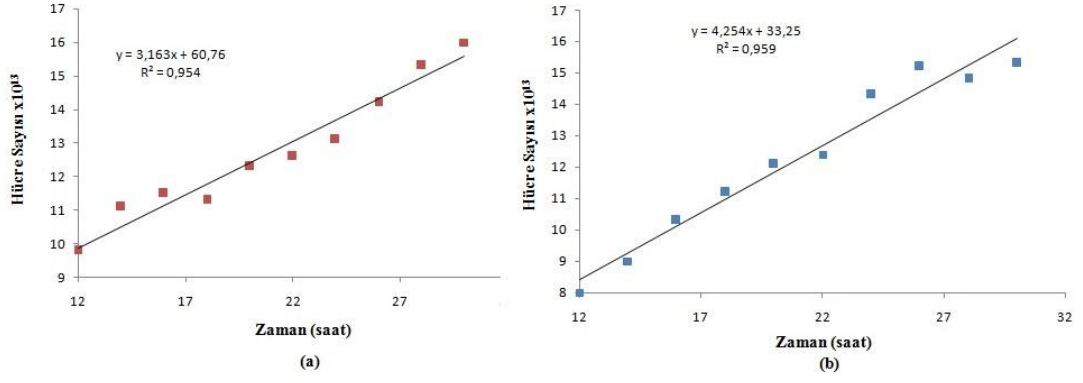
Şekil 3.6. Ba11 kodlu suşun baryum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.4. Pb06 Kodlu İzolatın Değişik pH'larda ki Üreme Eğrileri

Pb06 kodlu suş pH 7'de 30 saatlik bir inkübasyon sonucunda kurşun içeren ortamda 11.6×10^{13} , içermeyen ortamda ise 15.3×10^{13} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de kurşun varlığında, hücre sayısında % 15 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.7). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Pb06 kodlu suşun pH6 (a), pH7 (b), pH8'deki (c) üreme eğrileri



Şekil 3.8. Pb06 kodlu süşun kurşun içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.3. Bakterilerin Tanımlanması

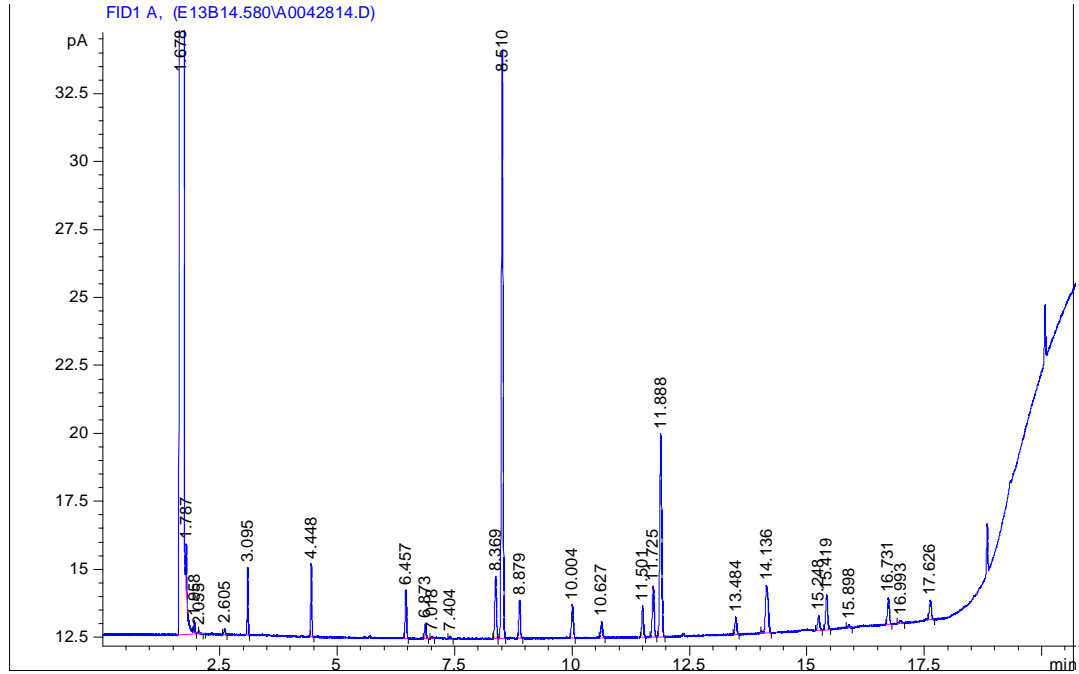
3.3.1. FAME ile Tanımlama

3.3.1.1. A111 Kodlu İzolatın FAME Analizi

A111 kodlu süşun içerdęi yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.1’de ve GC kromotogramı Şekil 3.9’da verilmiştir. A111 kodlu süşun yağ asidi profilinin % 46.99 oranında $C_{15:0}$ anteiso, % 18.32 oranında $C_{17:0}$ anteiso içerdęi belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu A111 kodlu süş 0.271 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. A111 kodlu izolata ait yağ asidi profilleri

| RT | Response | Ar/Ht | RFact | ECL | Peak Name | Perce | Comment1 | Comment2 |
|-------|----------|-------|-------|--------|----------------|-------|---------------------|------------------|
| 1.678 | 3.796E+8 | 0.026 | ---- | 7.009 | SOLVENT | ---- | < min rt | |
| 1.787 | 5059 | 0.022 | ---- | 7.222 | | ---- | < min rt | |
| 1.958 | 1302 | 0.025 | ---- | 7.554 | | ---- | < min rt | |
| 2.055 | 138 | 0.022 | ---- | 7.744 | | ---- | < min rt | |
| 2.605 | 748 | 0.029 | ---- | 8.814 | | ---- | < min rt | |
| 3.095 | 6619 | 0.021 | ---- | 9.769 | | ---- | | |
| 4.448 | 8616 | 0.026 | ---- | 11.566 | | ---- | | |
| 6.457 | 7187 | 0.032 | ---- | 13.318 | | ---- | | |
| 6.873 | 2595 | 0.035 | 0.960 | 13.618 | 14:0 ISO | 1.17 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.002 |
| 7.018 | 227 | 0.024 | ---- | 13.722 | | ---- | | |
| 7.404 | 445 | 0.032 | 0.947 | 14.001 | 14:0 | 0.20 | ECL deviates 0.001 | Reference 0.000 |
| 8.369 | 11457 | 0.040 | 0.931 | 14.623 | 15:0 ISO | 5.00 | ECL deviates 0.000 | Reference -0.001 |
| 8.510 | 107925 | 0.038 | 0.929 | 14.714 | 15:0 ANTEISO | 46.99 | ECL deviates 0.001 | Reference 0.000 |
| 8.879 | 6174 | 0.035 | 0.924 | 14.952 | unknown 14.959 | 2.67 | ECL deviates -0.007 | |
| 10.00 | 6369 | 0.041 | 0.915 | 15.626 | 16:0 ISO | 2.73 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.002 |
| 10.62 | 3211 | 0.042 | 0.912 | 15.998 | 16:0 | 1.37 | ECL deviates -0.002 | Reference -0.004 |
| 11.50 | 5780 | 0.039 | 0.909 | 16.501 | 15:0 3OH | 2.46 | ECL deviates -0.002 | |
| 11.72 | 10373 | 0.043 | 0.909 | 16.630 | 17:0 ISO | 4.42 | ECL deviates 0.000 | Reference -0.002 |
| 11.88 | 42987 | 0.048 | 0.909 | 16.724 | 17:0 ANTEISO | 18.32 | ECL deviates 0.001 | Reference -0.001 |
| 13.48 | 3384 | 0.044 | 0.910 | 17.631 | 18:0 ISO | 1.44 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.003 |
| 14.13 | 14789 | 0.058 | 0.912 | 18.000 | 18:0 | 6.32 | ECL deviates 0.000 | Reference -0.003 |
| 15.24 | 3029 | 0.044 | 0.915 | 18.634 | 19:0 ISO | 1.30 | ECL deviates 0.000 | Reference -0.003 |
| 15.41 | 7584 | 0.046 | 0.915 | 18.731 | 19:0 ANTEISO | 3.25 | ECL deviates 0.000 | |
| 15.89 | 536 | 0.039 | 0.917 | 19.005 | 19:0 | 0.23 | ECL deviates 0.005 | Reference 0.002 |
| 16.73 | 5269 | 0.044 | ---- | 19.484 | | ---- | | |
| 16.99 | 613 | 0.042 | 0.919 | 19.634 | 20:0 ISO | 0.26 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.004 |
| 17.62 | 4298 | 0.049 | 0.920 | 19.998 | 20:0 | 1.85 | ECL deviates -0.002 | Reference -0.005 |



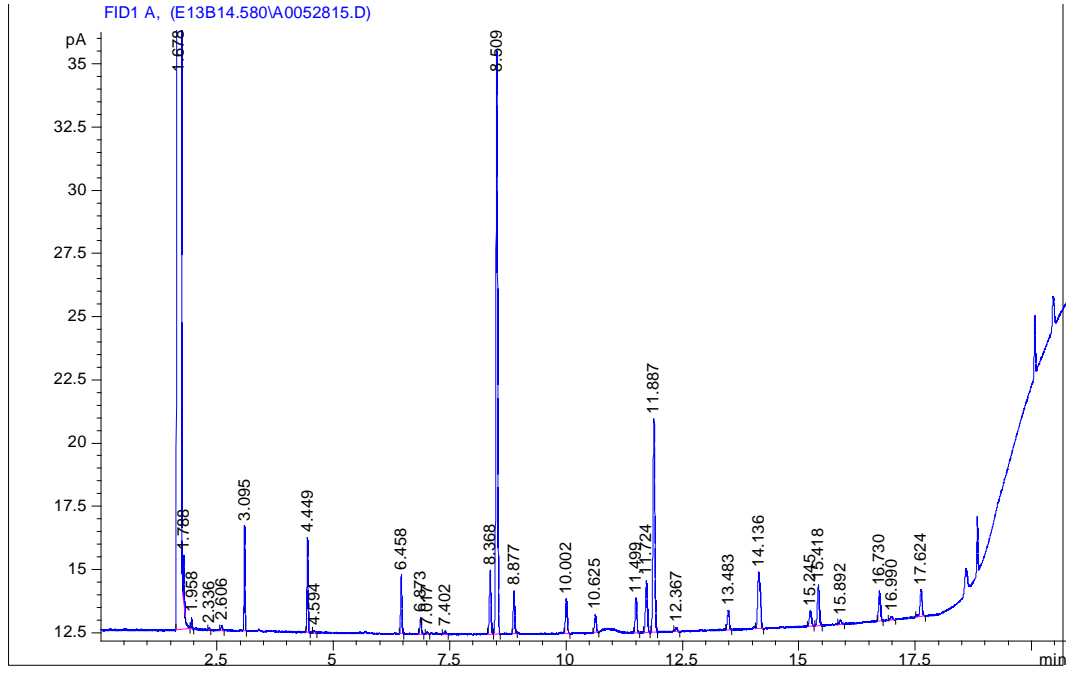
Şekil 3.9. A111 kodlu suşanın GC kromatogramı

3.3.1.2. Ba01 Kodlu İzolatın FAME Analizi

Ba01 kodlu suşuniçerdiği yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.2’de ve GC kromotogramı Şekil 3.10’da verilmiştir. Ba01 kodlu suş % 44.84 oranında C_{15:0} anteiso, % 17.78 oranında C_{17:0} anteiso içermektedir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Ba01 kodlu suşun 0.202 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* ile eşleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Ba01 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

| RT | Respons | Ar/H | RFac | ECL | Peak Name | Perce | Comment1 | Comment2 |
|--------|---------|-------|-------|-------|----------------|-------|--------------|------------------|
| 1.678 | 3.793E+ | 0.026 | ---- | 7.008 | SOLVENT | ---- | < min rt | |
| 1.788 | 5152 | 0.020 | ---- | 7.223 | | ---- | < min rt | |
| 1.958 | 1226 | 0.024 | ---- | 7.554 | | ---- | < min rt | |
| 2.336 | 205 | 0.021 | ---- | 8.289 | | ---- | < min rt | |
| 2.606 | 715 | 0.028 | ---- | 8.815 | | ---- | < min rt | |
| 3.095 | 10920 | 0.020 | ---- | 9.768 | | ---- | | |
| 4.449 | 12126 | 0.026 | ---- | 11.56 | | ---- | | |
| 4.594 | 307 | 0.030 | ---- | 11.72 | | ---- | | |
| 6.458 | 9215 | 0.030 | ---- | 13.31 | | ---- | | |
| 6.873 | 2949 | 0.036 | 0.960 | 13.61 | 14:0 ISO | 1.17 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 7.017 | 265 | 0.027 | ---- | 13.72 | | ---- | | |
| 7.402 | 569 | 0.035 | 0.947 | 14.00 | 14:0 | 0.22 | ECL deviates | Reference -0.001 |
| 8.368 | 12392 | 0.040 | 0.931 | 14.62 | 15:0 ISO | 4.78 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 8.509 | 116359 | 0.039 | 0.929 | 14.71 | 15:0 ANTEISO | 44.84 | ECL deviates | Reference 0.000 |
| 8.877 | 7604 | 0.036 | 0.924 | 14.95 | unknown 14.959 | 2.92 | ECL deviates | |
| 10.002 | 7380 | 0.042 | 0.915 | 15.62 | 16:0 ISO | 2.80 | ECL deviates | Reference -0.003 |
| 10.625 | 3555 | 0.041 | 0.912 | 15.99 | 16:0 | 1.34 | ECL deviates | Reference -0.005 |
| 11.499 | 6954 | 0.041 | 0.909 | 16.50 | 15:0 3OH | 2.62 | ECL deviates | |
| 11.724 | 11535 | 0.045 | 0.909 | 16.63 | 17:0 ISO | 4.35 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 11.887 | 47154 | 0.045 | 0.909 | 16.72 | 17:0 ANTEISO | 17.78 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 12.367 | 945 | 0.047 | 0.909 | 17.00 | 17:0 | 0.36 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 13.483 | 4450 | 0.045 | 0.910 | 17.63 | 18:0 ISO | 1.68 | ECL deviates | Reference -0.004 |
| 14.136 | 18037 | 0.057 | 0.912 | 18.00 | 18:0 | 6.82 | ECL deviates | Reference -0.003 |
| 15.245 | 3813 | 0.046 | 0.915 | 18.63 | 19:0 ISO | 1.45 | ECL deviates | Reference -0.004 |
| 15.418 | 9492 | 0.048 | 0.915 | 18.73 | 19:0 ANTEISO | 3.60 | ECL deviates | |
| 15.892 | 1000 | 0.042 | 0.917 | 19.00 | 19:0 | 0.38 | ECL deviates | Reference -0.001 |
| 16.730 | 6326 | 0.042 | ---- | 19.48 | | ---- | | |
| 16.990 | 791 | 0.039 | 0.919 | 19.63 | 20:0 ISO | 0.30 | ECL deviates | Reference -0.006 |
| 17.624 | 6723 | 0.048 | 0.920 | 19.99 | 20:0 | 2.57 | ECL deviates | Reference -0.006 |



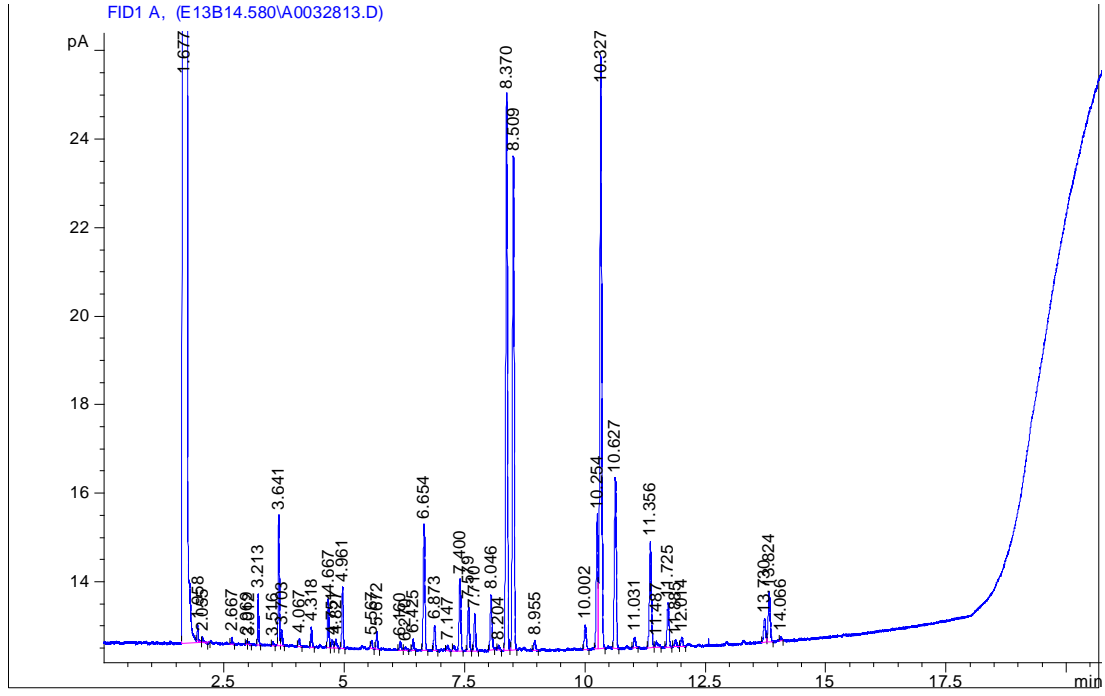
Şekil 3.10. Ba01 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.1.3. Ba11 Kodlu Suşun FAME Analizi

Ba11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.3’de ve GC kromotogramı Şekil 3.11’de verilmiştir. Ba11 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 18.18 oranında C_{15:0} iso, % 16.40 oranında C_{15:0} anteiso içerdiği belirlenmiştir. % 20.91 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Ba11 kodlu suş 0.311 SI değeri ile *Xanthomonas axonopodis* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.3. Ba11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

| RT | Response | Ar/Ht | RFac | ECL | Peak Name | Perce | Comment1 | Comment2 |
|--------|----------|-------|------|--------|------------------|-------|-----------------|-----------------|
| 1.677 | 3.834E+8 | 0.026 | ---- | 7.010 | SOLVENT PEAK | ---- | < min rt | |
| 1.958 | 1115 | 0.025 | ---- | 7.556 | | ---- | < min rt | |
| 2.055 | 477 | 0.030 | ---- | 7.744 | | ---- | < min rt | |
| 2.667 | 550 | 0.029 | ---- | 8.939 | | ---- | < min rt | |
| 2.969 | 226 | 0.025 | 1.29 | 9.525 | unknown 9.531 | 0.09 | ECL deviates - | |
| 3.012 | 188 | 0.025 | 1.28 | 9.610 | 10:0 ISO | 0.08 | ECL deviates | |
| 3.213 | 3501 | 0.024 | 1.23 | 10.000 | 10:0 | 1.37 | ECL deviates | Reference - |
| 3.516 | 358 | 0.034 | ---- | 10.429 | | ---- | | |
| 3.641 | 9563 | 0.026 | 1.16 | 10.606 | 11:0 ISO | 3.54 | ECL deviates | Reference - |
| 3.703 | 1196 | 0.027 | 1.15 | 10.694 | 11:0 ANTEISO | 0.44 | ECL deviates - | Reference - |
| 4.067 | 637 | 0.029 | 1.11 | 11.159 | 10:0 2OH | 0.23 | ECL deviates | |
| 4.318 | 1598 | 0.029 | 1.08 | 11.427 | 10:0 3OH | 0.55 | ECL deviates | |
| 4.667 | 4268 | 0.031 | 1.05 | 11.801 | unknown 11.799 | 1.44 | ECL deviates | |
| 4.751 | 705 | 0.032 | ---- | 11.891 | | ---- | | |
| 4.827 | 1031 | 0.037 | ---- | 11.973 | | ---- | | |
| 4.961 | 5414 | 0.031 | 1.03 | 12.094 | 11:0 ISO 3OH | 1.79 | ECL deviates | |
| 5.567 | 768 | 0.030 | 1.00 | 12.614 | 13:0 ISO | 0.25 | ECL deviates | Reference - |
| 5.672 | 1637 | 0.032 | 1.00 | 12.703 | 13:0 ANTEISO | 0.52 | ECL deviates | Reference |
| 6.160 | 852 | 0.036 | 0.98 | 13.103 | 12:0 ISO 3OH | 0.27 | ECL deviates | |
| 6.270 | 301 | 0.028 | 0.97 | 13.183 | 12:0 2OH | 0.09 | ECL deviates | |
| 6.425 | 1087 | 0.035 | 0.97 | 13.295 | 12:1 3OH | 0.34 | ECL deviates | |
| 6.654 | 13176 | 0.037 | 0.96 | 13.460 | 12:0 3OH | 4.05 | ECL deviates | |
| 6.873 | 2596 | 0.036 | 0.96 | 13.618 | 14:0 ISO | 0.79 | ECL deviates - | Reference - |
| 7.147 | 532 | 0.038 | ---- | 13.816 | | ---- | | |
| 7.400 | 8226 | 0.040 | 0.94 | 13.999 | 14:0 | 2.48 | ECL deviates - | Reference - |
| 7.579 | 5125 | 0.039 | 0.94 | 14.114 | 13:0 ISO 3OH | 1.54 | ECL deviates | |
| 7.710 | 4125 | 0.040 | 0.94 | 14.199 | 13:0 2OH | 1.24 | ECL deviates | |
| 8.046 | 6420 | 0.040 | 0.93 | 14.416 | 15:1 ISO F | 1.91 | ECL deviates | |
| 8.204 | 400 | 0.030 | 0.93 | 14.518 | 15:1 ANTEISO A | 0.12 | ECL deviates - | |
| 8.370 | 61367 | 0.038 | 0.93 | 14.624 | 15:0 ISO | 18.18 | ECL deviates | Reference |
| 8.509 | 55478 | 0.039 | 0.92 | 14.714 | 15:0 ANTEISO | 16.40 | ECL deviates | Reference - |
| 8.955 | 1124 | 0.040 | 0.92 | 15.001 | 15:0 | ---- | ECL deviates | |
| 10.002 | 2926 | 0.042 | 0.91 | 15.626 | 16:0 ISO | 0.85 | ECL deviates - | Reference - |
| 10.254 | 16055 | 0.039 | 0.91 | 15.776 | 16:1 w9c | 4.67 | ECL deviates | |
| 10.327 | 71935 | 0.041 | 0.91 | 15.819 | Sum In Feature 3 | 20.91 | ECL deviates - | 16:1 w7c/15 iso |
| 10.627 | 21283 | 0.041 | 0.91 | 15.999 | 16:0 | 6.18 | ECL deviates - | Reference - |
| 11.031 | 1192 | 0.037 | 0.91 | 16.231 | 15:0 2OH | 0.35 | ECL deviates | |
| 11.356 | 13786 | 0.046 | 0.90 | 16.419 | ISO 17:1 w9c | 3.99 | ECL deviates | |
| 11.487 | 1042 | 0.055 | 0.90 | 16.494 | Sum In Feature 4 | 0.30 | ECL deviates | 17:1 ANTEISO |
| 11.725 | 5639 | 0.045 | 0.90 | 16.631 | 17:0 ISO | 1.63 | ECL deviates | Reference - |
| 11.885 | 822 | 0.044 | 0.90 | 16.723 | 17:0 ANTEISO | 0.24 | ECL deviates | Reference - |
| 12.014 | 1100 | 0.040 | 0.90 | 16.797 | 17:1 w8c | 0.32 | ECL deviates | |
| 13.730 | 3167 | 0.048 | 0.91 | 17.772 | 18:1 w9c | 0.92 | ECL deviates | |
| 13.824 | 6672 | 0.047 | 0.91 | 17.825 | 18:1 w7c | 1.93 | ECL deviates | |
| 14.066 | 364 | 0.033 | ---- | 17.962 | | ---- | | |
| ---- | 71935 | --- | ---- | ---- | Summed Feature 3 | 20.91 | 16:1 w7c/15 iso | 15:0 ISO |
| ---- | 1042 | --- | ---- | ---- | Summed Feature 4 | 0.30 | 17:1 ISO | 17:1 ANTEISO |



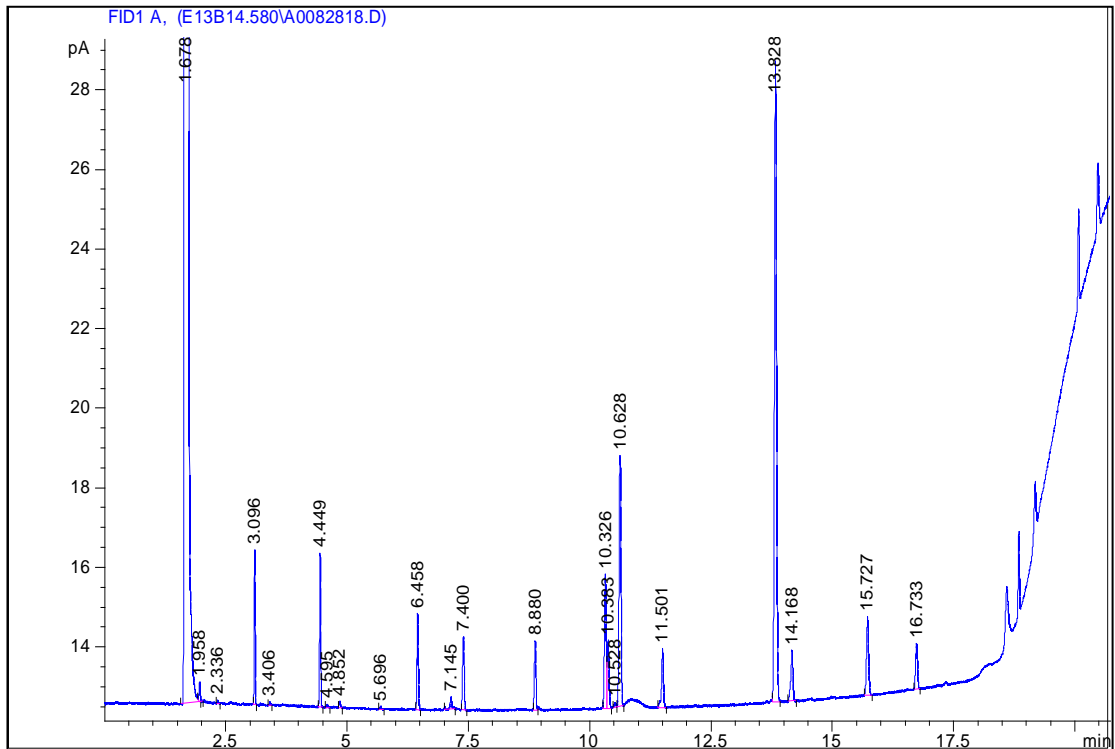
Şekil 3.11. Ba11 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.1.4. Pb06 Kodlu Suşun FAME Analizi

Pb06 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Çizelge 3.4'de ve GC kromotogramı Şekil 3.12'de verilmiştir. Pb06 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 47.25 oranında C_{18:1} w7c, % 17.35 oranında C_{16:0} içerdiği belirlenmiştir. % 13.12 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Pb06 kodlu suşun 0.310 SI değeri ile *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.4. Pb06 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

| RT | Response | Ar/Ht | RFa | ECL | Peak Name | Perce | Comment1 | Comment2 |
|--------|----------|-------|------|--------|------------|-------|--------------|---------------------|
| 1.678 | 3.805E+8 | 0.026 | ---- | 7.012 | SOLVENT | ---- | < min rt | |
| 1.958 | 1465 | 0.026 | ---- | 7.557 | | ---- | < min rt | |
| 2.336 | 124 | 0.017 | ---- | 8.293 | | ---- | < min rt | |
| 3.096 | 10282 | 0.020 | ---- | 9.771 | | ---- | | |
| 3.406 | 279 | 0.028 | ---- | 10.273 | | ---- | | |
| 4.449 | 12581 | 0.026 | ---- | 11.569 | | ---- | | |
| 4.595 | 252 | 0.027 | ---- | 11.726 | | ---- | | |
| 4.852 | 582 | 0.030 | 1.04 | 12.001 | 12:0 | 0.33 | ECL deviates | Reference -0.001 |
| 5.696 | 208 | 0.029 | ---- | 12.725 | | ---- | | |
| 6.458 | 9531 | 0.031 | ---- | 13.319 | | ---- | | |
| 7.145 | 1738 | 0.044 | ---- | 13.815 | | ---- | | |
| 7.400 | 8712 | 0.037 | 0.94 | 13.999 | 14:0 | 4.41 | ECL deviates | Reference -0.002 |
| 8.880 | 7977 | 0.035 | 0.92 | 14.952 | unknown | 3.94 | ECL deviates | |
| 10.326 | 18404 | 0.043 | 0.91 | 15.817 | Sum In | 8.99 | ECL deviates | 16:1 w7c/15 iso 2OH |
| 10.383 | 8456 | 0.037 | 0.91 | 15.852 | Sum In | 4.13 | ECL deviates | 15:0 ISO |
| 10.528 | 559 | 0.034 | ---- | 15.938 | | ---- | | |
| 10.628 | 35572 | 0.045 | 0.91 | 15.998 | 16:0 | 17.35 | ECL deviates | Reference -0.003 |
| 11.501 | 7958 | 0.041 | 0.90 | 16.500 | 15:0 3OH | 3.87 | ECL deviates | |
| 13.828 | 96986 | 0.047 | 0.91 | 17.823 | 18:1 w7c | 47.25 | ECL deviates | |
| 14.168 | 8036 | 0.046 | 0.91 | 18.015 | 18:0 | 3.92 | ECL deviates | |
| 15.727 | 11868 | 0.047 | 0.91 | 18.904 | 19:0 CYCLO | 5.82 | ECL deviates | Reference 0.002 |
| 16.733 | 6383 | 0.044 | ---- | 19.481 | | ---- | | |
| ---- | 26861 | ---- | ---- | ---- | Summed | 13.12 | 16:1 w7c/15 | 15:0 ISO |



Şekil 3.12. Pb06 kodlu suşa ait GC kromotogramı

3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi

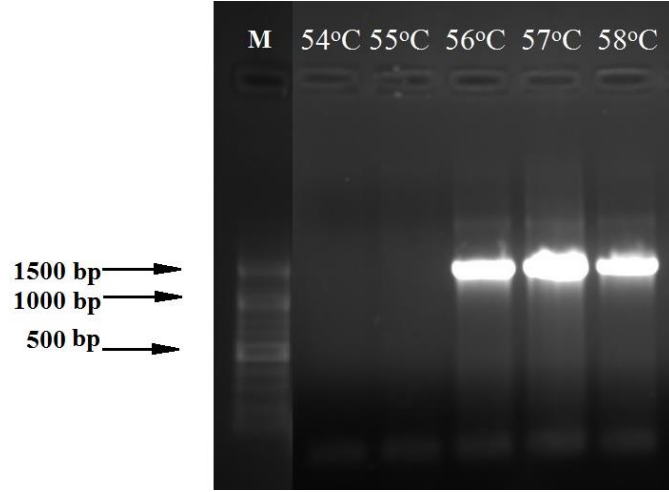
Yağ asidi analizinden elde edilen bulguları doğrulamak amacıyla bakteriler 16S rRNA sekans analizi kullanılarak da tanımlanmıştır. Bu amaçla bakterilerden kromozomal DNA izole edilmiş, PZR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler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

3.3.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu

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

3.3.2.2. A111Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

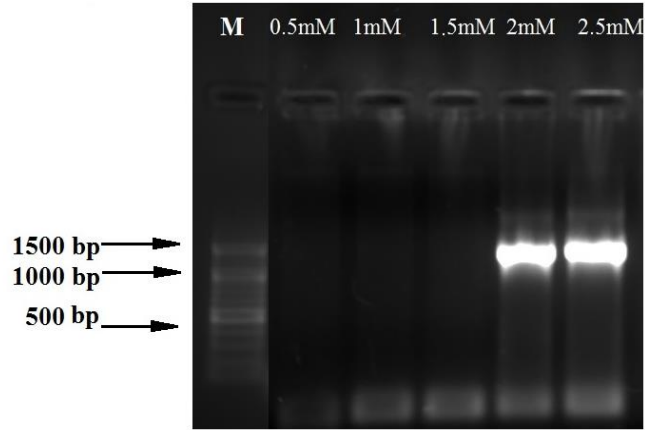
16S rRNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.13'de A111 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 57°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.13. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Al11 suşuna ait PZR ürünleri

Marker (M)

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.15’de Al11 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2.5mM olarak belirlenmiştir.

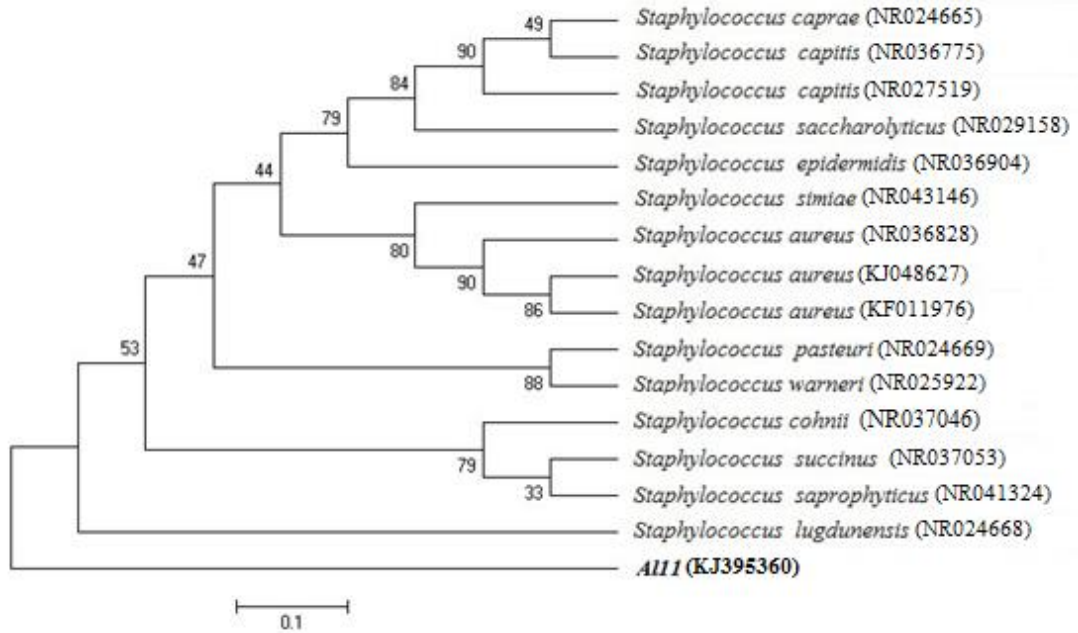


Şekil 3.14. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Al11 suşuna ait PZR ürünleri

Marker (M)

3.3.2.3. A111 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde A111 kodlu suşun % 99 homoloji ile *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. A111 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.15'te görüldüğü gibi A111 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.15. A111 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

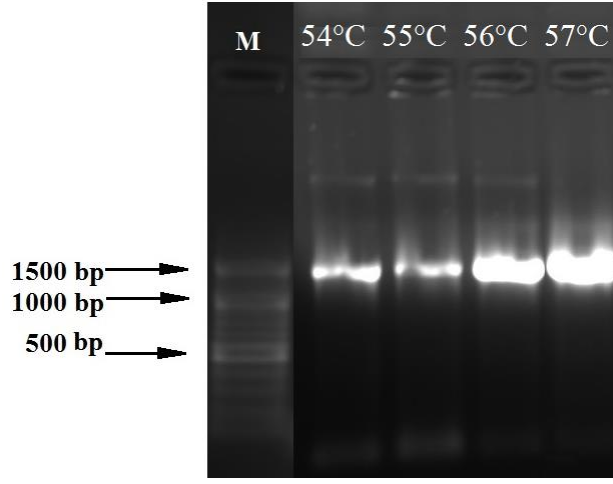
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). Filogenetik analizler sonucunda A111 kodlu suşa en yakın tür *S. aureus* en uzak tür ise *S. capitis* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5. A111 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

| Türler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. A111 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,095 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Staphylococcus simiae</i> | 1,085 | 0,005 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>Staphylococcus capitis</i> | 1,102 | 0,014 | 0,016 | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>Staphylococcus caprae</i> | 1,101 | 0,015 | 0,016 | 0,001 | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1,087 | 0,016 | 0,015 | 0,005 | 0,005 | | | | | | | | | | |
| 7. <i>Staphylococcus capitis</i> | 1,101 | 0,015 | 0,017 | 0,001 | 0,001 | 0,007 | | | | | | | | | |
| 8. <i>Staphylococcus sacharolyticus</i> | 1,090 | 0,017 | 0,018 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | | | | | | | | |
| 9. <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1,099 | 0,020 | 0,019 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,016 | 0,017 | | | | | | | |
| 10. <i>Staphylococcus warneri</i> | 1,101 | 0,020 | 0,017 | 0,016 | 0,016 | 0,014 | 0,017 | 0,018 | 0,005 | | | | | | |
| 11. <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 1,076 | 0,022 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,015 | 0,019 | 0,020 | 0,011 | 0,012 | | | | | |
| 12. <i>Staphylococcus cohnii</i> | 1,102 | 0,024 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,023 | 0,026 | 0,027 | 0,019 | 0,018 | 0,016 | | | | |
| 13. <i>Staphylococcus succinus</i> | 1,091 | 0,024 | 0,020 | 0,030 | 0,030 | 0,027 | 0,030 | 0,032 | 0,024 | 0,020 | 0,020 | 0,011 | | | |
| 14. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1,094 | 0,025 | 0,023 | 0,025 | 0,025 | 0,024 | 0,026 | 0,027 | 0,018 | 0,019 | 0,015 | 0,009 | 0,011 | | |
| 15. <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,095 | 0,001 | 0,005 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,025 | |
| 16. <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,095 | 0,001 | 0,005 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,025 | 0,000 |

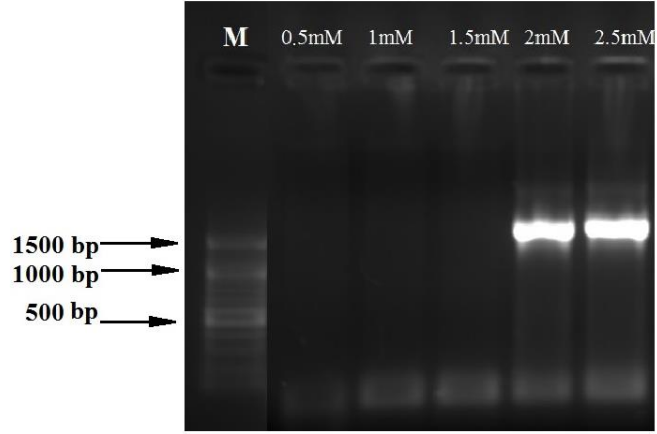
3.3.2.2. Ba01 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.16'de Ba01 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 57°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.16. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ba01 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

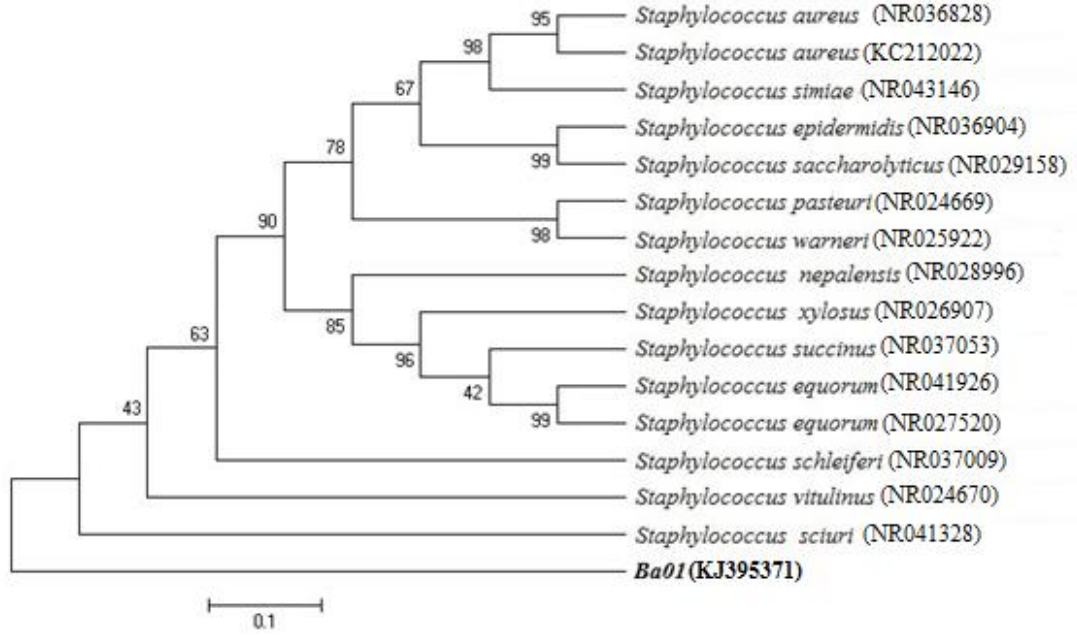
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.17'de Ba01 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 2.5 mM belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Ba01 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.3. Ba01 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Ba01 kodlu suşun % 99 homoloji ile *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. Ba01 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.18'te görüldüğü gibi Ba01 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.18. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

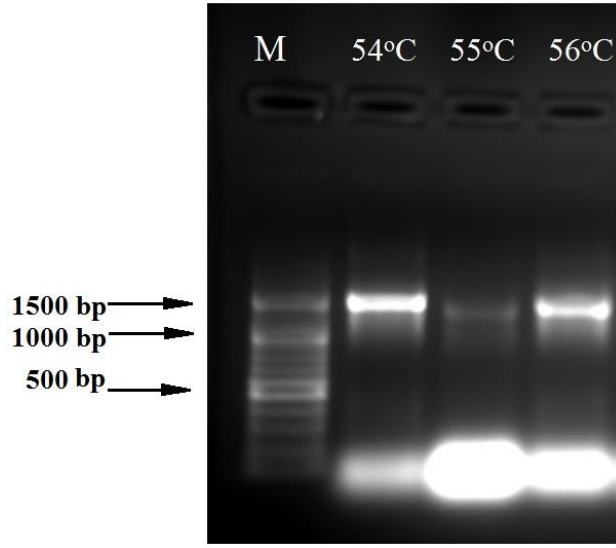
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). Filogenetik analizler sonucunda Ba01 kodlu suşa en yakın tür *S. aureus* en uzak tür ise *S. schleiferi* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. Ba01 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

| Türler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Ba01 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,107 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Staphylococcus simiae</i> | 1,105 | 0,005 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1,104 | 0,014 | 0,016 | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>Staphylococcus sacharolyticus</i> | 1,100 | 0,015 | 0,016 | 0,001 | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1,099 | 0,016 | 0,015 | 0,005 | 0,005 | | | | | | | | | | |
| 7. <i>Staphylococcus warneri</i> | 1,102 | 0,015 | 0,017 | 0,001 | 0,001 | 0,007 | | | | | | | | | |
| 8. <i>Staphylococcus xylosus</i> | 1,101 | 0,017 | 0,018 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | | | | | | | | |
| 9. <i>Staphylococcus succinus</i> | 1,098 | 0,020 | 0,019 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,016 | 0,017 | | | | | | | |
| 10. <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,095 | 0,020 | 0,017 | 0,016 | 0,016 | 0,014 | 0,017 | 0,018 | 0,005 | | | | | | |
| 11. <i>Staphylococcus equorum</i> | 1,099 | 0,022 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,015 | 0,019 | 0,020 | 0,011 | 0,012 | | | | | |
| 12. <i>Staphylococcus equorum</i> | 1,095 | 0,024 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,023 | 0,026 | 0,027 | 0,019 | 0,018 | 0,016 | | | | |
| 13. <i>Staphylococcus nepalensis</i> | 1,085 | 0,024 | 0,020 | 0,030 | 0,030 | 0,027 | 0,030 | 0,032 | 0,024 | 0,020 | 0,020 | 0,011 | | | |
| 14. <i>Staphylococcus schleiferi</i> | 1,066 | 0,025 | 0,023 | 0,025 | 0,025 | 0,024 | 0,026 | 0,027 | 0,018 | 0,019 | 0,015 | 0,009 | 0,011 | | |
| 15. <i>Staphylococcus vitulinus</i> | 1,066 | 0,001 | 0,005 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,025 | |
| 16. <i>Staphylococcus sciuri</i> | 1,060 | 0,001 | 0,005 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,024 | 0,024 | 0,025 | 0,000 |

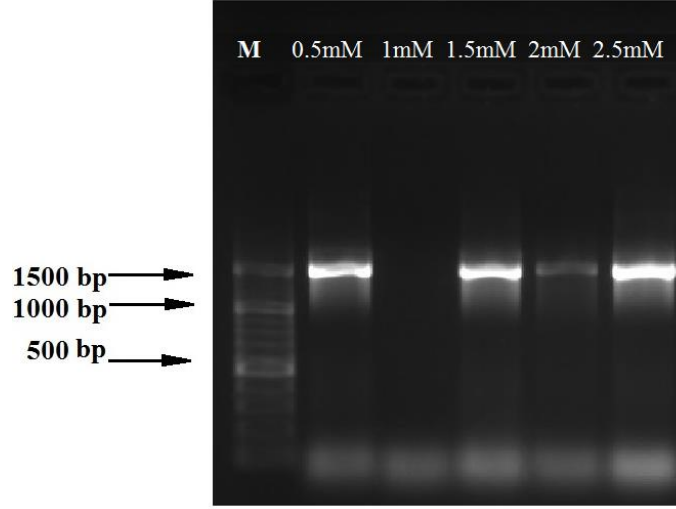
3.3.2.2. Ba11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.19'de Ba11 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 54°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.19. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ba11 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

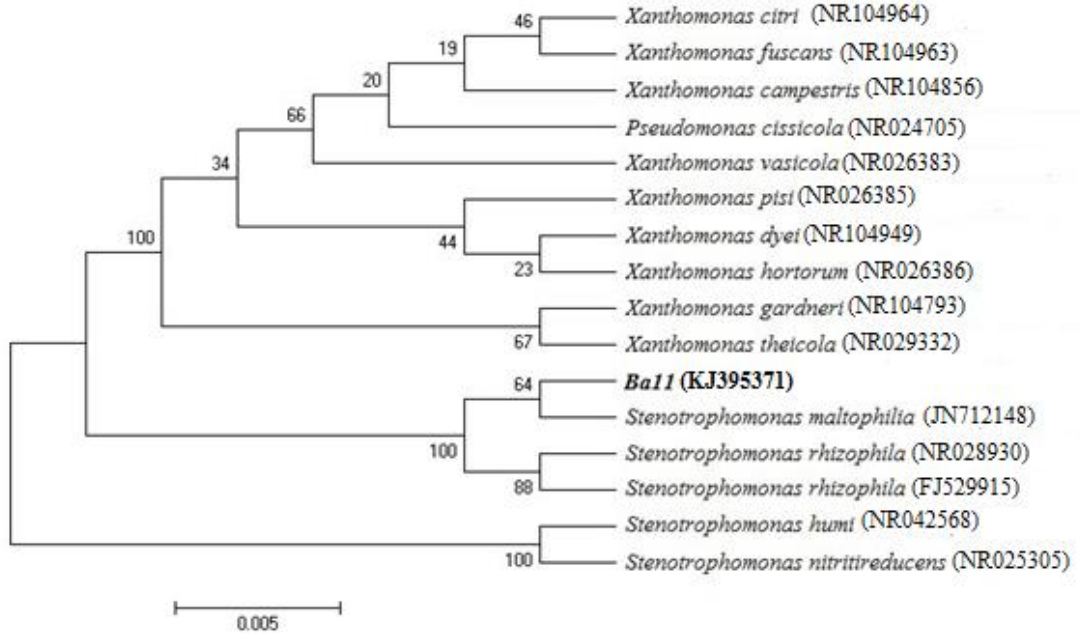
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.20'de Ba11 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu olan 2.5 mM seçilmiştir.



Şekil 3.20. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Ba11 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.3. Ba11 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Ba11 kodlu suşun % 99 homoloji ile *Stenotrophomonas rhizophila* olarak tanımlanmıştır. Ba11 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.21'te görüldüğü gibi Ba11 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.21. Ba11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

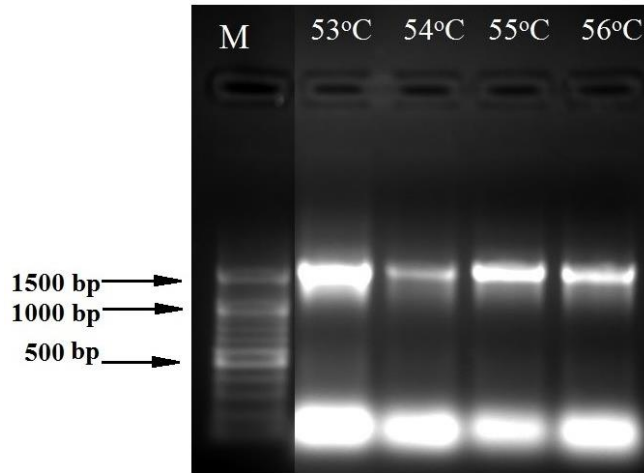
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.7). Filogenetik analizler sonucunda Ba11 kodlu suşa en yakın tür *S. rhizophila* en uzak tür *S. nitritireducens* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge3.7. Ba11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

| Türler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Ba11 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Stenotrophomonas rhizophlia</i> | 0,002 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Xanthomonas dyei</i> | 0,022 | 0,023 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>Xanthomonas vasicola</i> | 0,021 | 0,022 | 0,001 | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>Xanthomonas pisi</i> | 0,022 | 0,023 | 0,000 | 0,001 | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>Xanthomonas citri</i> | 0,022 | 0,021 | 0,001 | 0,005 | 0,005 | | | | | | | | | | |
| 7. <i>Xanthomonas gardneri</i> | 0,023 | 0,022 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,007 | | | | | | | | | |
| 8. <i>Xanthomonas campestris</i> | 0,021 | 0,023 | 0,001 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | | | | | | | | |
| 9. <i>Pseudomonas hortorum</i> | 0,023 | 0,022 | 0,001 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,016 | 0,017 | | | | | | | |
| 10. <i>Xanthomonas cissicola</i> | 0,021 | 0,020 | 0,001 | 0,016 | 0,016 | 0,014 | 0,017 | 0,018 | 0,005 | | | | | | |
| 11. <i>Xanthomonas fuscans</i> | 0,023 | 0,024 | 0,002 | 0,017 | 0,017 | 0,015 | 0,019 | 0,020 | 0,011 | 0,012 | | | | | |
| 12. <i>Xanthomonas theicola</i> | 0,024 | 0,024 | 0,002 | 0,002 | 0,024 | 0,013 | 0,026 | 0,027 | 0,019 | 0,018 | 0,016 | | | | |
| 13. <i>Stenotrophomonas humi</i> | 0,025 | 0,026 | 0,035 | 0,035 | 0,030 | 0,027 | 0,030 | 0,032 | 0,024 | 0,020 | 0,020 | 0,004 | | | |
| 14. <i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> | 0,030 | 0,032 | 0,023 | 0,025 | 0,025 | 0,024 | 0,026 | 0,007 | 0,018 | 0,019 | 0,015 | 0,035 | 0,035 | | |
| 15. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0,002 | 0,004 | 0,025 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,034 | 0,034 | 0,009 | |
| 16. <i>Stenotrophomonas rhizophilia</i> | 0,002 | 0,000 | 0,023 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,027 | 0,026 | 0,025 | 0,032 |

3.3.2.2. Pb06 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

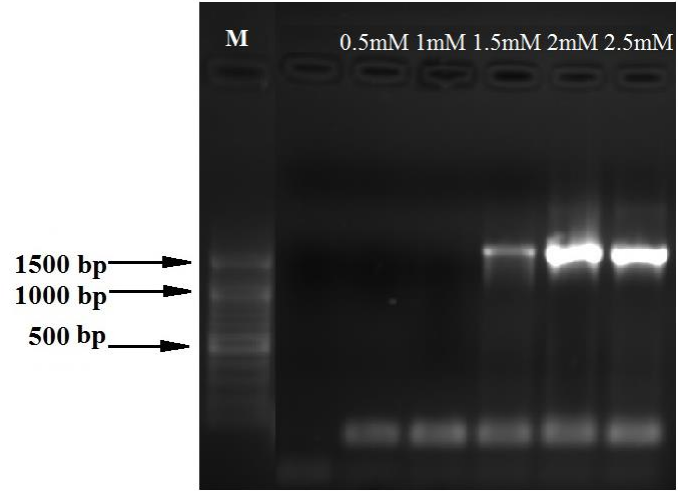
16S rDNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.22'de Pb06 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 55°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.22. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Pb06 suşuna ait PZR ürünleri

Marker (M)

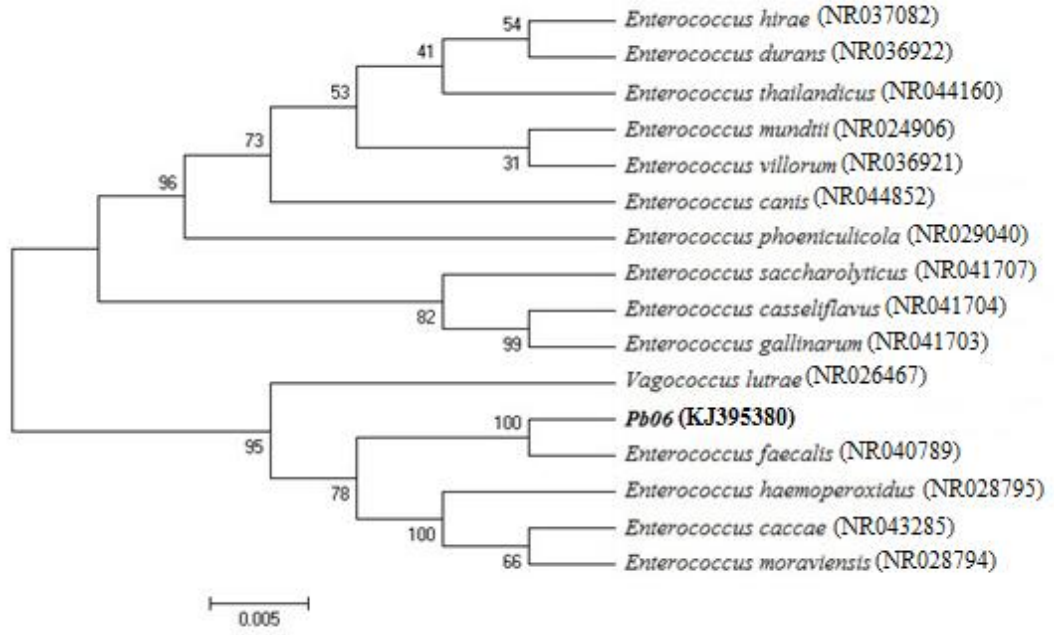
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.23'de Pb06 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında ki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu olan 2.5mM belirlenmiştir.



Şekil 3.23. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Pb06 suşuna ait PZR ürünleri
Marker (M)

3.3.2.3. Pb06 Kodlu Suşun Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Pb06 kodlu suşun % 99 oranında *Enterococcus faecalis* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Pb06 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.24'te görüldüğü gibi Pb06 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.24. Pb06 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasında ki farkı göstermektedir.)

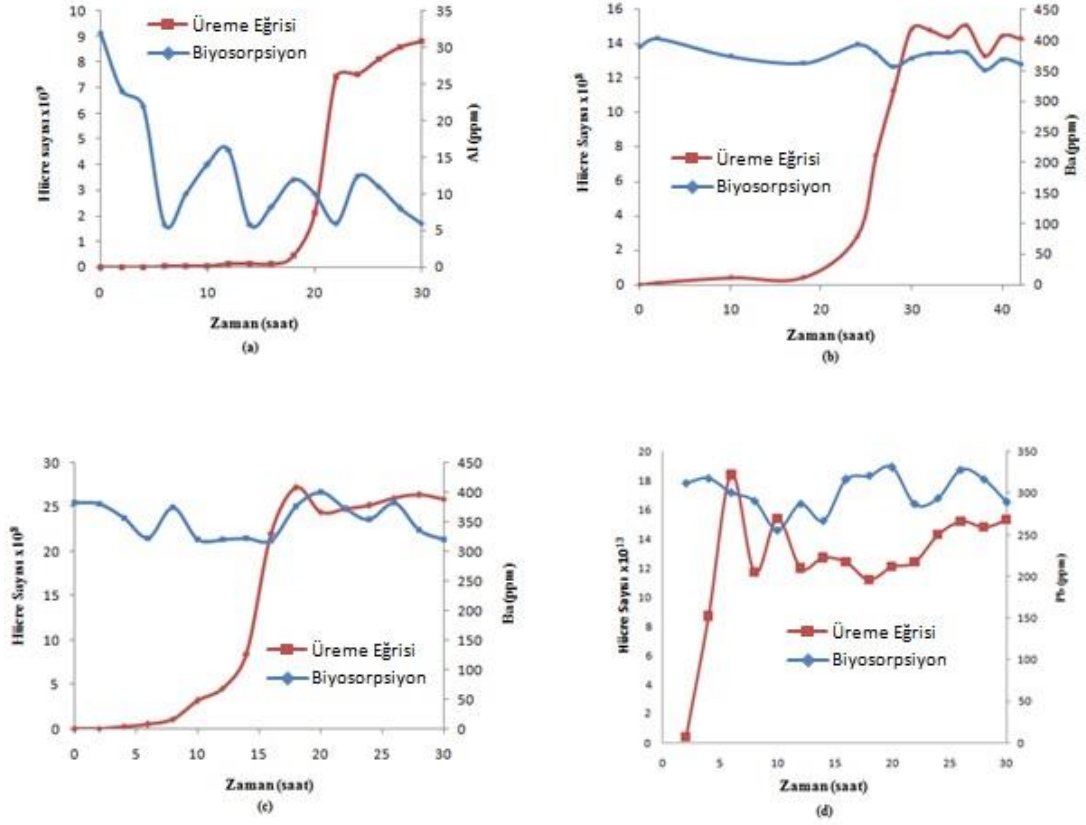
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.8). Filogenetik analizler sonucunda Pb06 kodlu suşa en yakın tür *E. faecalis* en uzak tür ise *E. Phoeniculicola* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8. Pb06 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

| Türler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Ba11 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Enterococcus faecalis</i> | 0,007 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Enterococcus hamoperoxidus</i> | 0,031 | 0,025 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>Enterococcus caccae</i> | 0,034 | 0,028 | 0,003 | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>Enterococcus moraviensis</i> | 0,032 | 0,026 | 0,002 | 0,002 | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>Enterococcus hirae</i> | 0,046 | 0,038 | 0,035 | 0,038 | 0,005 | | | | | | | | | | |
| 7. <i>Enterococcus durans</i> | 0,046 | 0,038 | 0,035 | 0,038 | 0,001 | 0,007 | | | | | | | | | |
| 8. <i>Enterococcus thailandicus</i> | 0,048 | 0,040 | 0,034 | 0,036 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | | | | | | | | |
| 9. <i>Enterococcus mundii</i> | 0,046 | 0,038 | 0,038 | 0,040 | 0,014 | 0,014 | 0,016 | 0,017 | | | | | | | |
| 10. <i>Enterococcus saccharolyticus</i> | 0,052 | 0,044 | 0,050 | 0,052 | 0,016 | 0,014 | 0,017 | 0,018 | 0,005 | | | | | | |
| 11. <i>Enterococcus casseliflavus</i> | 0,049 | 0,041 | 0,048 | 0,050 | 0,017 | 0,015 | 0,019 | 0,020 | 0,011 | 0,012 | | | | | |
| 12. <i>Enterococcus gallinarum</i> | 0,050 | 0,042 | 0,048 | 0,051 | 0,024 | 0,013 | 0,026 | 0,017 | 0,019 | 0,018 | 0,026 | | | | |
| 13. <i>Enterococcus lutrae</i> | 0,052 | 0,044 | 0,049 | 0,052 | 0,030 | 0,027 | 0,030 | 0,032 | 0,024 | 0,020 | 0,020 | 0,002 | | | |
| 14. <i>Enterococcus canis</i> | 0,045 | 0,038 | 0,034 | 0,037 | 0,025 | 0,024 | 0,026 | 0,007 | 0,018 | 0,019 | 0,015 | 0,052 | 0,052 | | |
| 15. <i>Enterococcus villorum</i> | 0,049 | 0,041 | 0,049 | 0,041 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,022 | 0,022 | 0,015 | |
| 16. <i>Enterococcus phoeniculicola</i> | 0,054 | 0,046 | 0,040 | 0,042 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,020 | 0,022 | 0,021 | 0,023 | 0,025 | 0,024 |

3.4. Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

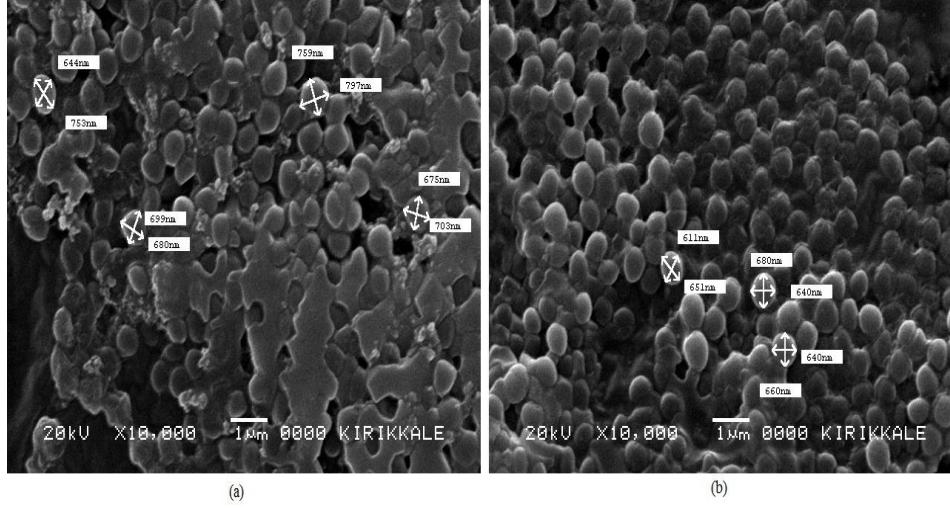
Suşların tanımlamaları yapıldıktan sonra biyosorpsiyon değerleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *S. aureus*'un, 32 ppm alüminyum varlığında 30 saatlik inkübasyon sonrası $8,8 \times 10^9$ hücre ile ortamda ki alüminyum konsantrasyonunu 6.1 ppm'e düşürerek % 81'lik bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *S. aureus*'un 411 ppm baryum varlığında ise 40 saatlik inkübasyon sonrası 14.3×10^8 hücre ile ortamdaki baryum konsantrasyonunu 358 ppm'e düşürerek % 13'lük bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *S. rhizophilia*'nın 411 ppm baryum varlığında 30 saatlik inkübasyon sonucu 25.9×10^8 hücre ile ortamdaki baryum konsantrasyonunu 324 ppm'e düşürerek % 21'lik bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. *E. faecalis*'in 332 ppm kurşun varlığında 30 saatlik inkübasyon sonucu 11.6×10^{13} hücre ile ortamdaki kurşun konsantrasyonunu 286 ppm'e düşürerek %13'lük bir biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.25. *S. aureus*'un alüminyum (a) ve baryum (b) biyosorpsiyonu, *S. rhizophilia*'nın baryum (c) biyosorpsiyonu, *E. faecalis*'in kurşun (d) biyosorpsiyonu

3.4.1. A111 Kodlu Suşun Elektron Mikroskop Görüntüleri

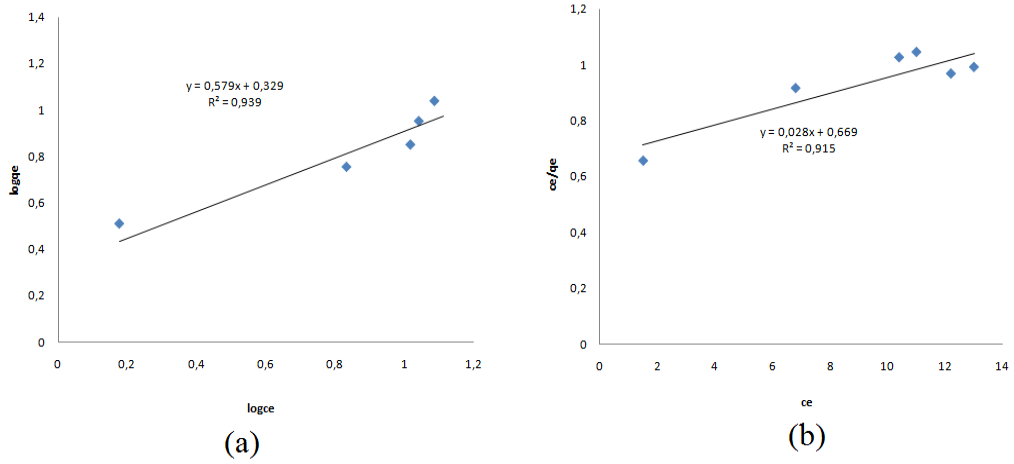
Ağır metallerin bakteri morfoloji üzerine etkisini gözlemek amacıyla dirençli suşlar taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. *S. aureus*'un alüminyum içeren ortamda boyutları ortalama 738x689 nm iken içermeyen ortamda 663x630 nm olduğu Şekil 3.26'dabelirlenmiştir.



Şekil 3.26. *S. aureus*'a ait Alüminyum içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlardaki elektron mikroskobu görüntüleri (x10000)

3.4.2. Al11 kodlu Suşun Kesikli İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Biyosorpsiyon yeteneği belirlenen Al11 suşu izoterm eğrileri çıkartılmak için atomik adsorbsiyon spektrofotometresinde incelenmiştir (Şekil3.27).



Şekil 3.27. *S. aureus* suşuna ait Freundlich (a) ve Langmuir (b) izoterm grafikleri

Elde edilen izoterm sabitleri Çizelge 3.9’de verilmiştir. Al11 suşunun Al üzerinde Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) ile bulunmuştur.

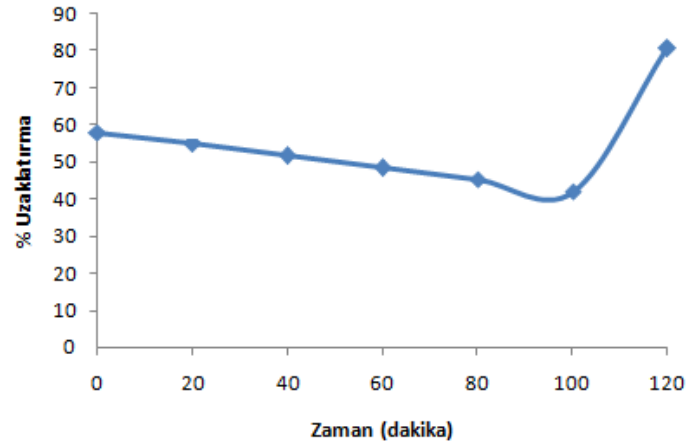
Çizelge 3.9. Alüminyum için Langmuir ve Freundlich İzoterm sabitleri

| <i>S. aureus</i> | Langmuir izotermi | | | Freundlich izotermi | | |
|------------------|-------------------|------|-------|---------------------|-------|-------|
| | qe | b | R^2 | n | kf | R^2 |
| | 35.71 | 5.88 | 0.915 | 1.72 | 2.133 | 0.939 |

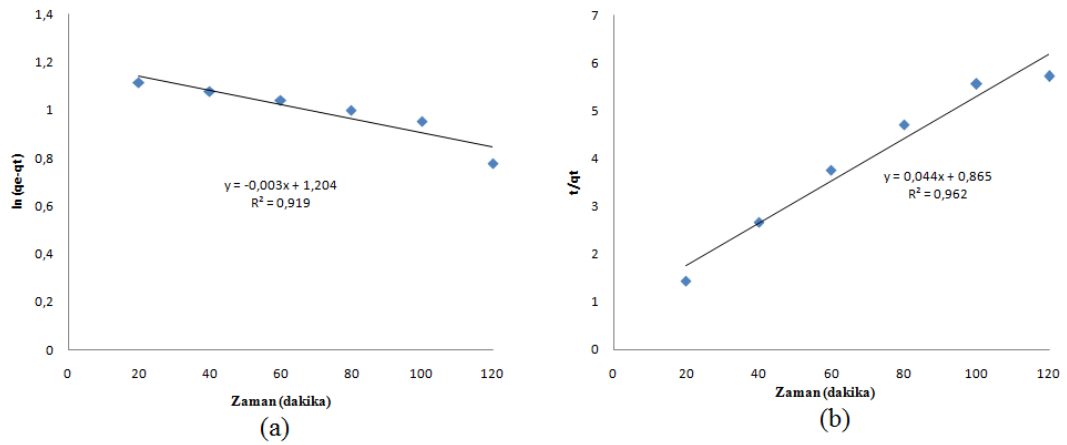
Elde edilen izoterm sabitleri dikkate alındığında Freundlich izotermi daha büyük R^2 değerine sahiptir. Freundlich izotermine R^2 değeri 0.939 olduğundan Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir.

3.4.3. Al11 kodlu Suşun Kesikli Kinetik Çalışması

Al için Şekil 3.28’deki biyosorpsiyon kapasitesinin zaman ile değişim grafiğine bakıldığında biyosorpsiyonunu 120 dakikada tamamlanmış, bu zaman içerisinde biyosorpsiyon kapasitesinin % 81’ü gerçekleşmiştir. Deneysel olarak elde edilen özgül tutulma (q_e) 35 mg alüminyum/g biyomas olarak elde edilmiştir. Biyosorpsiyon kinetiğini belirlemek için çizilen pseudo 1. derece ve pseudo 2. derece reaksiyon kinetiği grafikleri Şekil 3.29’da verilmiştir. Bu şekillerdeki grafiğin regresyon katsayısına bakıldığında 1. derece için R^2 değeri 0.919, 2. derece için R^2 değeri 0.962 olarak elde edilmiştir. Biyosorpsiyon kinetiğini pseudo 2. derece reaksiyon kinetiği 1. derece kinetiği göre regresyon katsayılarına bakıldığında daha yüksek güvenilirlikte açıklayabilmektedir.



Şekil 3.28. Alüminyum metali için kesikli kinetik çalışmasında biyosorpsiyon kapasitesinin zaman ile değişimi



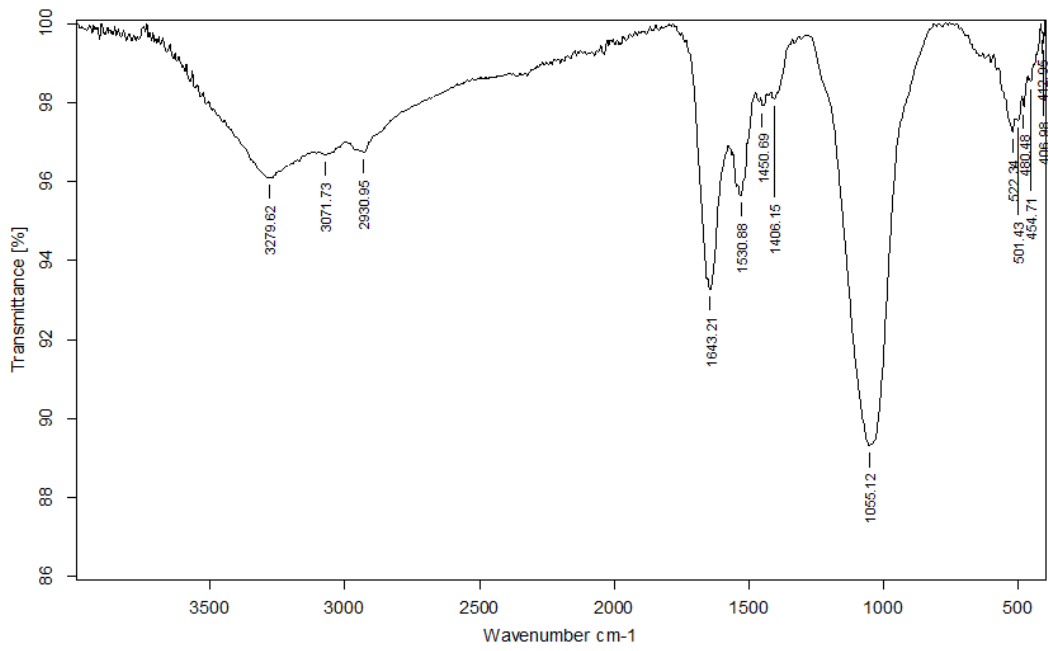
Şekil 3.29. *S. aureus* yüzeyinde alüminyum adsorpsiyonunun pseudo birinciderece (a) ve pseudo ikinci derece (b) reaksiyon kinetiği

Çizelge 3.10. Alüminyum için pseudo birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri

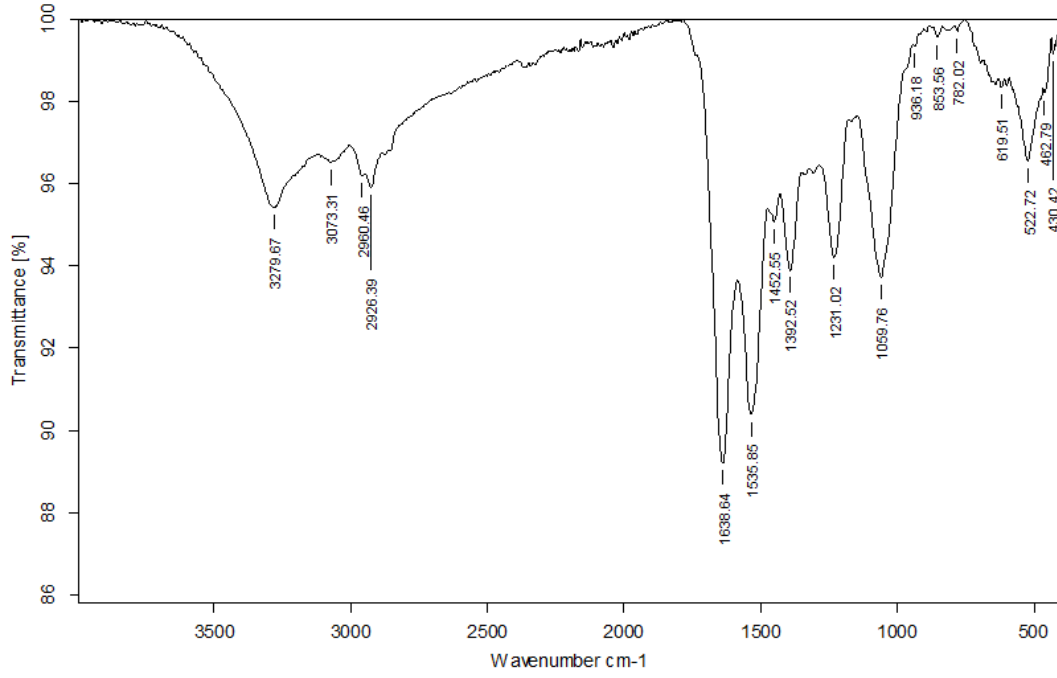
| <i>S.aureus</i> | Pseudo birinci derece | | | | Pseudo ikinci derece | | | |
|-----------------|-----------------------|-------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|
| | q_{den} | q_h | k_1 | R^2 | q_{den} | q_h | k_2 | R^2 |
| | 26 | 24 | 0.003 | 0.919 | 23 | 33.62 | 0.36 | 0.962 |

3.5. Al11 Kodlu Suşun FTIR Analizi

S. aureus'un biyosorpsiyon yeteneği belirlendikten sonra hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplarda meydana gelen farklılıkları belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'e bakıldığında bakterinin hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar ve biyosorpsiyondan sonraki fonksiyonel gruplar FTIRspektrumundaki değişimler gözlemlenmiştir.



Şekil 3.30. Al11 kodlu suşun alüminyum içeren ortamdaki FTIR sonuçları



Şekil 3.31. Al11 kodlu suşun alüminyum içermeyen ortamdaki FTIR sonuçları

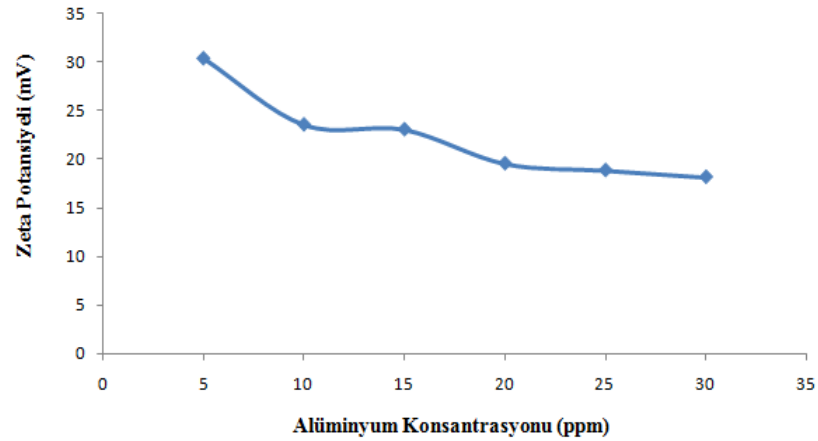
Çizelge 3.11. *S. aureus*'a ait FTIR sonuçları

| Frekans(cm^{-1}) | Frekans(cm^{-1}) | Fonksiyonel Grup |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| Yüksüz bakteri | Sn yüklü bakteri | |
| 3279 | 3279 | O-H (alkol, fenol) Gerilme |
| 3073 | 3071 | C-H (alken) Gerilme |
| 2960 | 2930 | C-H (alkil) Gerilme |
| 1638 | 1643 | C=C (alken) Gerilme |
| 1535 | 1530 | C=C (aromatik) Gerilme |
| 1452 | 1450 | C=C (aromatik) Gerilme |
| 1392 | 1406 | isopropil, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ Eğilme |
| 1231 | 1236 | C-O-C(eter, alkol) Gerilme |
| 1059 | 1055 | C-O-C (eter, alkol) Gerilme |
| 936 | 898 | $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ Eğilme |

FTIR analizlerinden anlaşılacağı gibi; metal biyosorpsiyonunun mekanizmasının, biyosorbentin yapısındaki bulunan fonksiyonel gruplar ve metal iyonları arasındaki kompleksleşimi ve iyonik etkileşim gibi mekanizmalara bağlı olduğu görülmüştür [111]. Sırasıyla metal içermeyen ve içeren bakterilerin frekanslarına bakıldığında 2960 cm^{-1} 'den 2930 cm^{-1} 'a C-H alkil grubu, 1638 cm^{-1} 'den 1643 cm^{-1} 'a C=C alken grubu, 1535 cm^{-1} 'de 1530 cm^{-1} C=C aromatik grubu ve 1392 cm^{-1} 'den 1406 cm^{-1} 'a isopropil grubunda metal etkisi ile değişimin belirlendiği ve bu grupların metal bağlanmada etkili olduğu belirlenmiştir.

3.6. Zeta Potansiyeli

S. aureus'un farklı konsantrasyonlarda metal içeren ortamlarda hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler incelenmiştir (Şekil 3.31). Düşük metal konsantrasyonunda zeta potansiyelinde 31 mV gibi yüksek bir değer ölçülürken konsantrasyonun artmasıyla zeta potansiyelinde hızlı bir düşme görülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda stabilitesini koruyamayıp konsantrasyon arttıkça stabilite sabitlenmiş ve kararlı hale gelmiştir. 25 mV üstündeki yüzey yükünde etraftaki partiküller dağınık halde bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.31. *S. aureus*'un alüminyum konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli değişim grafiği

4. TARTIŞMA SONUÇ

Bu tezin amacı Kırıkkale-Kızılırmaktan daha önce ki çalışmalar kapsamında izole edilmiş olan alüminyum, baryum ve kurşun dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesidir [81,82]. Serim'in yapmış olduğu çalışmada baryum dirençli olan Ba01 ve Ba11 ile alüminyum dirençli olan Al11 kodlu suşlar biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır [96]. Buna göre Al11 veBa01 kodlu suşlar gram pozitif, kok, Pb06 kodlu suş gram negatif, kok, Ba11 kodlu suş gram negatif, basil olarak belirlenmiştir. MTK değerleri ise Al11 kodlu suş için 32, Ba01 kodlu suş için 411 ppm, Ba11 ppm kodlu suş için 411 ppm ve Pb06 kodlu suş için de 332 ppm olarak belirlenmiştir.

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

Al11 kodlu suş pH 7'de 32 saatlik bir inkübasyon sonrasında alüminyum içermeyen ortamda 8.8×10^9 , alüminyum içeren ortamda ise 7.3×10^9 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Alüminyum varlığında, hücre sayısı % 17 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Ba01 kodlu suş pH 7'de 40 saatlik bir inkübasyon sonrasında baryum içeren ortamda 14.3×10^8 , baryum içermeyen ortamda ise 13.8×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Baryum varlığında, hücre sayısı % 4 oranında bir artış tespit edilmiştir. Ba11 kodlu suş pH 7'de 30 saatlik bir inkübasyon sonrasında baryum içeren ortamda 25.9×10^8 , baryum içermeyen ortamda ise 21.2×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Baryum varlığında, hücre sayısı % 19 oranında bir artış tespit edilmiştir. Pb06 kodlu suş pH 7'de 30 saatlik bir inkübasyon sonucunda kurşun içeren ortamda 11.6×10^{13} , kurşun içermeyen ortamda ise 15.3×10^{13} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Kurşun varlığında, hücre sayısı % 15 oranında bir düşüş tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda yapılan biyokimyasal testler tür düzeyinde bir tanımlama için yeterli olmadığından, moleküler tekniklerden FAME ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak bakterilerin tanımlaması yapılmıştır [81,82].

Bu tez kapsamında yapılan FAME analizleri sonucunda A111 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 46.99 oranında C_{15:0} anteiso, % 18.32 oranında C_{17:0} anteiso içerdiği belirlenmiştir. A111 kodlu suş 0.271 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* olarak tanımlanmıştır. Ba01 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 44.84 oranında C_{15:0} anteiso, % 17.78 oranında C_{17:0} anteiso içermektedir. Ba01 kodlu suşun 0.202 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* ile eşleştiği tespit edilmiştir. Ba11 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 18.18 oranında C_{15:0} ISO, % 16.40 oranında C_{15:0} anteiso içerdiği belirlenmiştir. % 20.91 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Ba11 kodlu suş 0.311 SI değeri ile *Xanthomonas axonopodis* olarak tanımlanmıştır. Pb06 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 47.25 oranında C_{18:1} w7c, % 17.35 oranında C_{16:0} içerdiği belirlenmiştir. % 13.12 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Pb06 kodlu suşun 0.310 SI değeri ile *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır.

Bakterilerin içerdikleri yağ asidi kompozisyonu buldukları ortama ve sıcaklığa göre değişebilmektedir. Bu sebeple tanımlamalar 16S rRNA sekans analizi ile tamamlanmıştır. 16S rRNA bölgesinin tüm bakterilerde bulunması, evrim süresince korunmuş olması, uygun büyüklükte olması ve zengin veri tabanının olması tür düzeyinde tanımlama için sekanslamada en uygun bölge olmasını sağlamaktadır [95]. 16S rRNA sekans analizi için izolatların genomik DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar universal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinde spesifik olmayan bağlanmaların en aza indirgenmesi amacıyla annealing sıcaklığı ve tuz konsantrasyonu optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda A111 ve Ba01 kodlu suş için annealing sıcaklığı 57, tuz konsantrasyonu 2.5 mM, Ba11 kodlu suş için annealing sıcaklığı 54, tuz konsantrasyonu 2.5 mM ve Pb06 kodlu suş için annealing sıcaklığı 55°C tuz konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda PZR uygulanarak elde edilen PZR ürünlerinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan 16S rDNA sekans analizleri sonucu A111 ve Ba01 kodlu suşlar % 99 homoloji ile *S. aureus*,

Ba11 ve kodlu suş % 99 homoloji ile *S. rhizophila*, Pb06 kodlu suş ise % 99 homoloji ile *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır.

Suşların evrimsel akrabalık dereceleri daha iyi değerlendirilmek amacıyla MEGA 5.2 programı kullanılarak uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour joining trees) oluşturulmuş ve evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisleri hesaplanmıştır. 16S rRNA verileri ile elde edilen soyağacına ve uzaklık matrislerine göre genetik olarak Ba11 kodlu suş olan *S. rhizophila*, *S. maltophilia* ile yakın tür, A111 ve Ba01 kodlu suş olan *S. aureus*, *S. warneri* ile yakın tür, Pb06 kodlu suş olan *E. faecalis*, *E. Faecium* ile yakın tür olarak tespit edilmiştir.

Arslan ve arkadaşlarının [103] *Staphylococcus* türleri üzerine yapmış olduğu filogenetik çalışmada *Staphylococcus aureus*'u, *Staphylococcus intermedius* ile yakın tür olarak tespit etmiştir. Jalq1 ve arkadaşlarının [102] *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türleri üzerine yapmış olduğu çalışmada *Enterococcus canisile* *Enterococcus hiraе* yakın türler olarak tespit etmiştir ve yapmış olduğumuz filogenetik çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Yaptığımız moleküler tanımlamalar sonucunda FAME analizi düşük SI değerleri verirken 16S rRNA analizlerinden alınan sonuçlar yüksek homoloji gösterdiği belirlenmiştir. FAME ve 16S rRNA analiz sonuçları kıyaslandığında A111 Ba01 Ba11 ve Pb06 kodlu suşlar için FAME ve 16S rRNA analizlerinin genus düzeyinde uyumlu olduğu belirlenmiştir. FAME analizi, diğer tanımlama yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermesine rağmen doğruluğu % 100 değildir. FAME analizi diğer tanımlama yöntemleri ile kıyaslanarak doğruluğu değerlendirilmiştir.

Christ ve arkadaşları [97] 550 klinik maya izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada suşların MIS ile % 68.0'inin doğru, % 15.8'inin yanlış tanımlandığını, % 16.2'sinin ise tanımlanamadığını bildirmişler, Kellogg ve arkadaşları [98] MIS ile identifikasyonunda klinik *Candida* izolatlarının % 74'ünü doğru, % 16'sını yanlış tanımlamışlar ve % 28'ini ise tanımlayamamışlardır. Christ ve arkadaşları [99] 477 maya suşu ile yaptıkları bir diğer çalışmalarında MIS'in doğru tanımlama

oranını % 70.2, yanlış tanımlama oranını % 14.3 ve tanımlayamama oranını % 6.1 olarak belirlemişlerdir. Stoakes ve arkadaşlarının [100] gram negatif basiller üzerine yaptığı çalışmada genus düzeyinde % 93'ünün doğru ancak tür düzeyinde % 62.2'sinin doğru olarak tanımlamışlardır. Osterhout ve arkadaşları [101] 199 *Pseudomonadaceae* türünden 107 tanesini doğru tanımlayarak % 54'lük bir doğruluk oranı tespit etmişlerdir. Bu tez kapsamında elde edilen 80 FAME sonuçları 16S rRNA analizi ile kıyaslanmıştır ve 4 suştan 2 tanesi genus düzeyinde 16S rRNA analiz sonuçları ile eşleştiği tespit edilmiştir.

Tanımlanan suşların biyosorpsiyon yetenekleri incelendiğinde *S. aureus* 32 ppm alüminyum içeren ortamda 30 saatlik bir inkübasyon sonucunda %81 oranında alüminyumu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *S. aureus* 411 ppm baryum içeren ortamda ise 40 saatlik bir inkübasyon sonrasında % 13 oranında baryumu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *S. rhizophila* 411 ppm baryum içeren ortamda 30 saatlik inkübasyon sonrasında % 21 oranında baryumu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *E. faecalis* 332 ppm kurşun içeren ortamda 30 saatlik bir inkübasyon sonrasında % 13 oranında kurşunu biyosorbe ettiği belirlenmiştir. Bozanta ve arkadaşlarının [112] yapmış olduğu çalışmada % 43 oranında alüminyum biyosorpsiyonu yapan *Chryseomonas luteola*, % 21 oranında kurşun biyosorpsiyonu yapan *Pseudomonas putida* belirlenmiş olup çalışmalarımızla benzerlik göstermektedir.

S. aureus suşunun alüminyum içeren ve içermeyen ortamdaki inkübasyonları sonrasında elektron mikroskopunda boyutları incelenmiş ve *S. aureus*'un alüminyum varlığında boyutlarının ortalama 663x630 nm'den 738x689 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Hücre boyutlarındaki gözlemlenilen bu artışlar elde edilen biyosorpsiyon verilerini desteklemektedir.

Kesikli izoterm çalışmasında alüminyum dirençli *S. aureus* suşunun Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) ile bulunmuştur. Freundlich izotermine R^2 değeri Langmuir izoterminden daha büyük olduğu için Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir. Elmacı ve arkadaşları [113] *Cladophora* sp. ile yaptıkları izoterm çalışmasını Langmuir ve Freundlich izotermine uygulamışlardır. Sonuçlara göre Cd ve Co iyonu

adsorbsiyonu Freundlich izotermine, Aliyonu adsorbsiyonu Langmuir izotermine uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Kesikli kinetik çalışmasında alüminyum dirençli *S. aureus* suşunun pseudo birinci ve ikinci derece uygunluk durumu incelenmiştir ve pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiği ile daha iyi ifade edildiği tespit edilmiştir. Şencan [116] aktif çamurlar ile yaptığı kinetik çalışmasında pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiğini daha uygun olduğu tespit etmiştir. Kılıç [114] yine aktif çamurlar yaptığı çalışmada pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiğini uygun olduğunu tespit etmiştir.

Yapılan biyosorpsiyon çalışması sonucu *S. aureus* alüminyumlu ortamdan % 81 oranında uzaklaştırması üzerine FTIR analizi yapılmış ve bakterinin hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplardaki farklılıklar belirlenmiştir. 3073 cm^{-1} ve 3071 cm^{-1} 'de alken gruplarından ortaya çıkan sinyaller biyosorpsiyondan sonra sırasıyla metal içermeyen ve içeren bakterilerin frekanslarına bakıldığında 2960 cm^{-1} 'den 2930 cm^{-1} 'a C-H alkil grubu, 1638 cm^{-1} 'den 1643 cm^{-1} 'a C=C alken grubu, 1535 cm^{-1} 'de 1530 cm^{-1} C=C aromatik grubu ve 1392 cm^{-1} 'den 1406 cm^{-1} 'a isopropil grubunda metal etkisi ile değişimin belirlendiği ve bu grupların metal bağlanmada etkili olduğu belirlenmiştir. Dhankhar ve arkadaşları [118] *S. cerevisiae* ile yaptıkları uranyum giderim çalışmasında 1405.9 cm^{-1} bandının uranyum biyosorpsiyonundan sonra 1377 cm^{-1} 'e kaydığını tespit etmişlerdir.

S. aureus suşunun belli bir alüminyum konsantrasyon değerinden sonra elektriksel çift tabakanın bastırılmasıyla, bakterinin zeta potansiyeli mutlak değerce azalmaktadır. Marsalek [115] yapmış olduğu çalışmada zeta potansiyelinin adsorbsiyon izotermi ile ilgili olduğunu sonucuna ulaşmıştır. Klodzinska ve arkadaşları [117], *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* ile yaptıkları çalışmada bakteri kültürünün kümelenme yapması sonucu zeta potansiyeli değişimlerini incelemişler ve zeta potansiyelinin daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında alüminyum, baryum ve kurşun dirençli suşların değişik pH'lardaki optimum üreme koşulları belirlenmiş, moleküler teknikler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve biyosorpsiyon yetenekleri belirlenmiştir. Mikrobiyal

tanımlamada elde edilen veriler sonucunda FAME analizi sonuçlarının düşük SI değerlerinden dolayı güvenilirliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda sonucu A111 ve Ba01 kodlu suşlar *S. aureus*, Ba11 kodlu suş *S. rhizophila*, Pb06 kodlu suş ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Biyosorpsiyon yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucu *S. aureus*'un % 81 oranında alüminyum biyosorpsiyonu ve % 13 oranında baryum biyosorpsiyonu yaptığı, *S. rhizophila*'un % 21 oranında baryum biyosorpsiyonu, *E. faecalis*'in % 13 oranında kurşun biyosorpsiyonu yaptığı belirlenmiştir.

Alüminyum dirençli *S. aureus*'un yüksek oranında yaptığı biyosorpsiyon; kesikli izoterm, kesikli kinetik, FTIR ve zeta potansiyeli ile desteklenmiştir. Tüm bu veriler ışığında *S. aureus* yüksek konsantrasyonda alüminyumunu tolere edebilmiş ve alüminyum biyosorpsiyon yeteneği dikkate alındığında biyoremediasyon çalışmaları için potansiyel olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Tümen, F., Bildik, M., Baybay, M., Cici, M. and Solmaz, B. Pollution potential of Ergani copper smelter's rigid wastes. *Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 16: 43-53. 1992.
- [2] Alexander Rether, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, Münih, 2002.
- [3] Özek, E. Tarımdan Kaynaklanan Çevre Kirlenmesi ve Simülasyon Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1994.
- [4] Atıcı, T., Ahıska, S., Pollution and Algae of Ankara Stream. *Gazi Üniversitesi. Journal of Science*, 18(1): 51-59, 2010.
- [5] Yücel, E., Edirnelioğlu, E., Soydam, S., Çelik, S., Çolak, G., *Myriophyllum spicatum* (Spiked water-milfoil) as a biomonitor of heavy metal pollution in Porsuk Stream/Turkey. *Biological Diversity and Conservation* 133-144 2010.
- [6] Gündüz T., Çevre Sorunları. Ankara Üniv. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara, 1:131-148, 1994.
- [7] Masters, G.B., *Introduction to Environmental Engineering and Science*. Prentice Hall. New Jersey, 1997.
- [8] 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.

- [9] 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: 118-120, 2009.
- [10] Kaya, A., Ağır Metallerin Sulu Çözeltilerden Polimer Membranlar ve Polimer Adsorplayıcılar Kullanılarak Ayrılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 2007.
- [11] Hambidge, K. M., and Krebs, N. F., Zinc Deficiency A Special Challenge. The Journal of Nutrition, 137: 1101-1105, 2007.
- [12] Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., Chemie und Gesundheit Eine verständliche Einführung in die Toxikologie, Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8 2013.
- [13] Alexander Rether, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur elektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, 2002.
- [14] www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten-t/daten/umweltkatastrophen.htm. (Erişim tarihi 03.12.2014)
- [15] Duffus, J.H., Howard, G.J., Worth, Fundamental toxicology for chemists, Cambridge, UK Royal Society of Chemistry Information Services, 12: 112-114 1996.
- [16] Baldwin, DR, Marshall, WJ. Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation, Annals of Clinical Biochemistry, 36: 267-300 1999.
- [17] http://www.msceast.org/hms/res_field.html (Erişim tarihi: 03.03.2014)
- [18] Duffus, J.H., Environmental toxicology, New York : Wiley, 1980.

- [19] European Commission DG ENV. E3 Project ENV.E.3/ETU/2000/0058, HeavyMetals in Waste, Danimarka 2002.
- [20] Holleman,A.F., Wiberg,E., Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Walter deGruyter Verlag, ISBN 3-11-012641-9 1995.
- [21] Kimya Teknolojisi Metaller 1 Mesleki ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, T.C. M.E.B. Ankara 2008.
- [22] Walter Mertz, Trace Elements in Human And Animal Nutrition-15th Edition Volume 1 Academic Pres 1987.
- [23] Tayfur, M., Ünlüoğlu, İ., Bener, Ö., Alüminyum ve Sağlık. Gıda Dergisi, 27(4): 305-309. 2002.
- [24] Saraçoğlu E. Alüminyum Alaşımlarının Sürtünme Karşılaştırma Kaynağının İncelenmesi. Bitirme Projesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Makina Mühendisliği Bölümü, İzmir, 2008.
- [25] Sevgi, E., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [26] Nies, D.H., Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews,27; 313-339, 2003.
- [27] Williams, L.E., Pittman, J.K., ve Hall, J.L., Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants. Biochimica et Biophysica Acta,1465: 104-126, 2000.

- [28] Yang, X., Jin, X., Feng, Y. and Islam, E., Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance in Plants. *Journal of Integrative Biology*,47; 1025-1035, 2005.
- [29] Silver, S., Misra, T.K., Bacterial Transformation of and Resistances to Heavy metal. *Basic Life Science*,28: 23-46, 1984.
- [30] Ji, G., and Silver, S., Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concern. *Journal of Industrial Microbiology*,14: 61-168, 1995.
- [31] Archer, G.L, Niemeyer, D.M., Origin and Evolution of DNA Associated with Resistance to Methicillin in Staphylococci. *Trends Microbiology*, 2: 343-347, 1994.
- [32] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial Metallothioneins, *Biochemistry and Molecular Genetics*, *Journal of Industrial Microbiology*,14:119-125, 1995.
- [33] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., Cadmium Transport, Resistance and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi, *Journal of Microbiology*, 32: 447-464, 1986.
- [34] Mergeay, M., Towards an Understanding of The Genetics of Bacterial Resistance. *Trends Biotechnol*, 9:17-24, 1991.
- [35] Deng, X., Li, Q.B., Lu, Y.H., Sun, D.H., Huang, Y.L., Chen, X.R., Bioaccumulation of Nickel from Aqueous Solutions Bygenetically Engineered *Escherichia coli*. *Water Research*, 37 :2505-2511,2003.
- [36] Chen Huang, C., Chia Su, C., Hsieh, J.L., Tseng, CP., Lin, P.J., Chang, j.S. Polypeptides for heavy metal biosorption capacity and specificity of two heterogeneous MerP proteins, *Enzyme and Microbial Technology*, 33; 379-385 2003.

- [37] Volesky, B., May, H. and Holan, Z.R., Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41; 826-289 1993.
- [38] Silver, S., Genes for all Metals a Bacterial View of the Periodic table the Thom Award Lecture *Microbiology Biotechnology*,20: 1-12, 1998.
- [39] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J. Hobman, J.L. and Wilson, J.R., Mercury transport and resistance. *Biochemistry society*,30: 715-718, 2002.
- [40] Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology Advances*,26:266–291 2008.
- [41] Volesky B. Biosorbent Materials *Biotechnology. Bioengineering Symposium*, 16: 121-126 1986.
- [42] Fourest E., Roux J. C. Heavy metal biosorption by fungal mycelia by products Mechanisms and influence of pH. *Biotechnology*,37:399–403 1992.
- [43] Kratochvil, D., Volesky, B., Advances in the biosorption of heavy metals, *TIBTECH*,16:291-300 1998.
- [44] Gadd, G. M., De Rome, L., Biosorption of copper by fungal melanine. *Appl. Microbiology. Biotechnology*,29:610-617 1988.
- [45] Kuyucak, N., Volesky, B., Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology, Lett*,10:137-142 1988.
- [46] Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., *Algal Ecology, Freshwater benthic ecosystems*, Academic Press, California, 12: 753-755 1996.
- [47] Veglio, F., Beolcini, F., Removal of metals by biosorption a review. *Hydrometallurgy*, 44:301-316 1997.

- [48] Zhang, W.X., Majidi, V., Monitoring the cellular response of *Stichococcus baccillaris* to exposure of several different metals using in vivo P-31 NMR and other spectroscopic techniques. *Environmental Science Technology*, 28:1577-1581 1994.
- [49] Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E., and Sofer, S.S. *Biotechnology Lett*,12(11):8 1990.
- [50] Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K. and Mohapatra, H., Microbial biosorbents Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*,78,8:967-73 2000.
- [51] López, A., Lázaro, N., Priego, J. M. and Marquès, A.M., Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *Journal of Industrial Microbiology. Biotechnology*,24:146–51 2000.
- [52] Golab, Z., Breitenbach, M., Sites of copper binding in *Streptomyces pilosus*. *Water Air Soil Pollut*,82:713-721 1995.
- [53] Muyzer, G., DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ekosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2:317-322, 1999.
- [54] Muyzer, G. and Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141, 1998.
- [55] Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions. *Bull Tech U Ist*,54 (4): 45-55 2006.
- [56] Blankenfeld-Enkvist GV, Brannback M. Technological trends and needs in food diagnostics, *Technology Review*, 2002: 132, 2002.

- [57] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology Review*, 59: 143-169, 1995.
- [58] Sanz, J.L., Kochling, T.K., Molecular Biology Techniques Used In Wastewater Treatment An Overview, *Process Biochemistry*, 42: 119-133, 2007.
- [59] Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal of Parasitology*, 32: 551-562, 2002.
- [60] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463-5467, 1977.
- [61] Maxam, A., Gilbert, W., A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 560-564, 1977.
- [62] Klaenhammer, T.R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86, 1993.
- [63] Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F., Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, 20: 1-12, 2005.
- [64] Persing, H.D., Polymerase chain reaction: Trends to benches. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1281-1285, 1991.
- [65] Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, E.C., Westhof, E., The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures, 4: 1078-1088, 2003.
- [66] Garrity, G.M., Holt, J.G., *The Road Map to the Manual. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York, 2001.

- [67] Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.. Nobel Tıp Kitapevleri, 101-107 İstanbul, 2004.
- [68] Welch, D.F., Applications of Cellular Fatty Acid Analysis Clinical Microbiology Reviews, 4: 422-438, 1991.
- [69] Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., The polymerase chain reaction In Recombinant DNA Second Edition. New York, 79-98,1992
- [70] Tozoğlu, S., Uslu, H., Ertaş, Ü., Kaya, Ö., Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Orofacial Infections Düzce Tıp Dergisi, 12(1): 48-53, 2010.
- [71] Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs. PCR Protocols a Guide to Methods and Applications. 3-12. Ed: by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press. New York, 1990.
- [72] Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J., Recent advances in polymerase chain reaction. Science,252: 1643-1650, 1991.
- [74] Siqueira, J.F., Roças, I.N., PCR methodology as available tool for identification of endodontic pathogens. Journal of Dentistry, 31 (5): 333-339, 2003.
- [75] Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Florent C., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Steina, O.R., Microbial processes influencing performance of treatment wetlands O.R., Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review, Ecological 2013.
- [76] Schochetman, G., Jones, K.W., Polymerase chain reaction. Infectious Diseases, 158: 1154-1157, 1988.

- [77] http://biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php(Erişim tarihi: 15.05.2014)
- [78] Ludwig, W. and Schleifer, KH., Bacterial Phylogeny Based on 16S and 23S rRNA Sequence Analysis, FEMS Microbio Rev, 15 (2-3):155-173, 1994.
- [79] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate, Bioresource Technology, 97: 641-647, 2006.
- [80] Yiğit, N., Aktaş A. E., Uslu, H., Comparison Of Different Systems For Identification Of Candida Strains Türk Mikrobiyoloji Dergisi, 38 (2): 83-86, 2008.
- [81] Akdan, Y., Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Kurşun Ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması Ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [82] Serim, G., Baryum Ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [83] Anonim, Kızılırmak Nehri. http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/irmak_nehri (Erişim tarihi: 13.03.2014)
- [84] Bahadır, M., Kızılırmak nehri akım değişimlerinin istatistiksel analizi. International periodical for the languages, 6 (3): 1339-1356, 2011.
- [85] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır Arıca, Ş., Kırındı, T., *Mytilus* sp (midye), *Gammarus* sp (nehir tırnağı) ve *Cladophora* sp (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak nehriindeki ağır metal kirliliğinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9 (1): 52-60, 2007.

- [86] Önganer, A.N., Kırbağ, S., Diyarbakır'da Taze Olarak Tüketilen Çökelek Peynirlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25:(1-2) 24-33, 2009.
- [87] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., 2001.
- [88] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edited by Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic analysis in molecular biological methods for bacillus, 27-74, 1990.
- [89] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M., Sohrab, A.D., Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. Biotechnology, 9 (1): 1-8, 2010.
- [90] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T. A., Henze, G., and Beyermann, B., Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex and time-release PCR. BioTechniques, 24 (1): 154-158, 1998.
- [91] Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T., Assessment of Interference in Biosorption of a Heavy Metal. Biotechnology And Bioengineering, 54(4): 344-350, 1997.
- [92] Chtist, E.A.Jr., Lynn M. J., Patrick J. B., Evaluation of the Microbial Identification System for Identification of Clinically Isolated Yeasts. Journal Of Clinical Microbiology, 34(19): 2408-2410, 1996.
- [93] Moat A. G., Foster J. W. Spector M.P. editors. Microbial physiology, 2002
- [94] Lloyd, J. R. Bioremediation of metals; the application of microorganisms that make and break minerals. Microbiology Today, 29: 67-69, 2002.

- [95] Demirel, S., Molecular Techniques For Determining Microbial Diversity In Treatment Systems, 30: 179-192, 2012
- [96] Principles of Instrumental Analysis, D.A.Skoog, D.M. West, II. Ed. 1981
- [97] Chtist, E.A.Jr., Lynn M. J., Patrick J. B., Evaluation of the Microbial Identification System for Identification of Clinically Isolated Yeasts. Journal Of Clinical Microbiology, 14: 116-119, 1996.
- [98] Kellogg, J. Bankert, D.A., Chaturvedi, V., Variation in microbial identification system accuracy for yeast identification depending on commerical source of sabouraud dextrose agar. Journal of Clinical Microbiology,56: 221-225, 1999.
- [99] Kellogg, J, Bankert, D.A., Chaturvedi. V., Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolated. Journal of Clinical Microbiology, 55: 113-115, 1998.
- [100] Stoakes L, Kelly T, Schieven D, Harley D, Ramos M, Lannigan R, Groves D & Hussian Z. Gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid for identification of gram-negative anaerobic bacillus, Journal of Clinical Microbiology, 48: 87-92, 1991.
- [101] Osterhout GJ, Shull VH & Dick JD. Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. Journal of Clinical Microbiology,48: 143-155, 1991.
- [102] Jalql, S., Abolfazl, B., Peyman, M.,Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffaloes Milk, 2013.
- [103] Arslan, E., Çelebi A., Açık, L., Uckun,S.,Characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns 2009.

- [102] Alemdar, S., Biyosorpsiyon Yöntemi ile Kadmiyum Giderimi. Doktora Tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, 2011.
- [103] Kılıç, M., Kurşun (II) Ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2004.
- [104] Boysan, F., Poliüre-Poliamin Reçinesi Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metal Kirliliğinin Adsorpsiyonla Gideriminin İncelenmesi. Doktora Tezi. Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2008.
- [105] Şencan, A., Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr^{+6} İyonunun Aktif Çamur Biyokütlesi ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2006.
- [106] Turan, Z., Atıksulardan Cr^{+6} İyonunun Biyosorpsiyon Yöntemi İle Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2012.
- [107] Jeppua, G.P. and Clement T.P., A Modified Langmuir-Freundlich Isotherm Model for Simulating pH-Dependent Adsorption Effects. Journal of Contaminant Hydrology, 2012.
- [108] Başyigit Kılıç, G. ve Karahan, A.G., Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması, 2010.
- [109] Bhardwaj, N.K., Duong, T.D. and Nguyen, L.K., Pulp Charge Determination by Different Methods Effect of Beating, Colloids and Surfaces Phsyicochemistry Engineering, 2003.
- [110] Korkmaz, E., Eskişehir Yöresi Sepiyoliti'nin Zeta Potansiyellerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Anadalo Üniversitesi, Eskişehir, 2008.

- [111] Gupta, V.K., Rastogi, A., Equilibrium and Kinetic Modelling of Cadmium(II) Biosorption by Nonliving Algal Biomass *Oedogonium* Sp. from Aqueous Phase, *Journal of Hazardous Materials*, 2008.
- [112] Ender BOZANTA Gülten ÖKMEN Biyosorpsiyon ve Mikroorganizmalar .
Doktora Tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 2011.
- [113] Elmacı, A.,Yonar, T., Uludağ Üniversitesi, Gorukle-BURSA Zn(II), Cd(II), Co(II) ve Remazol Turkish Blue-G Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerinde Kurutulmuş *Chara* sp., *Cladophora* sp. ve *Chlorella* sp. Türleri Ile Biyosorpsiyonun Araştırılması. 2011.
- [114] Kılıç, M., Kurşun (II) Ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2004
- [115] Marsalek, R., The Adsorption of Pb^{+2} , Cu^{+2} And Cr^{+3} on Ferro-Precipitate. International Conference on Environment and Industrial Innovation, 12, 2011.
- [116] Şencan, A., Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr^{+6} İyonunun Aktif Çamur Biyokütlesi ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2006.
- [117] Klodzinska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E., Janusz, W. and Buszewski, B., Effect of zeta Potential Value on Bacterial Behavior During Electrophoretic Separation. *Electrophoresis*, 31: 1590-1596, 2010.
- [118] Dhankhar, R., Hooda, A., Solanki, R. and Sainger, P. A., *Saccharomyces cerevisiae*: a Potential Biosorbent for Biosorption of Uranium. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(6): 5397-5407, 2011.