

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKIR ve KROMA DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ve  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

GAMZE TURALI

MAYIS 2012

**Biyoloji Anabilim Dalında** Gamze TURALI tarafından hazırlanan Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Ortak Danışman

Doç. Dr. Sema TAN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE \_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Sema TAN \_\_\_\_\_

Üye (Ortak Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN \_\_\_\_\_

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN \_\_\_\_\_

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### BAKIR ve KROMA DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

TURALI, Gamze

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sema TAN

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2012, 110 sayfa

Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen bakır ve krom dirençli bakterilerin biyokimyasal ve moleküler olarak karakterizasyonudur. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri 450 mg/L olan bakır dirençli bir bakteri izole edilmiş, biyokimyasal testleri dikkate alınarak *Pseudomonas putida* olarak tanımlanmıştır. Plazmit profil analiz çalışmaları sonucunda *Pseudomonas putida*'nın bakır dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu görülmüştür. Bu suşun alüminyum, lityum, gümüş, nikel, çinko metallerine dirençli olduğu belirlenmiştir. *P. putida* için yapılan total ve dış membran protein analizleri sonucunda özellikle total proteinlerinin bakır dirençliliğinde etkin olduğu gösterilmiştir. MİK değeri 1100 mg/L olan krom dirençli bir bakteri izole edilmiş, biyokimyasal testleri dikkate alınarak *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. Plazmit profil analiz çalışmaları sonucunda *E. faecalis*'in krom dirençlilik genlerinin de kromozomal DNA üzerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu suşta total protein analizi çalışmaları yapılarak krom dirençliliğinde etkili olan proteinler belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır-dirençli bakteri, krom-dirençli bakteri, ağır metal dirençliliği, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecalis*, Kırıkkale-Kızılırmak

## ABSTRACT

### BIOCHEMICAL and MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COPPER- and CHROMIUM-RESISTANT BACTERIA

TURALI, Gamze

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Sema TAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

May 2012, 110 Pages

The aim of this study to isolate and identify copper and chromium resistant bacteria from Kırıkkale-Kızılırmak. One copper resistant bacterium with a minimal inhibition concentration (MIC) value of 450 mg/L was isolated and identified as *Pseudomonas putida*. Plasmid profile analyses showed that the copper-resistant ability of *P. putida* was chromosome-encoded. The isolates were shown to be multi-resistant to some other heavy metals namely, aluminum, lithium, silver, nickel, zinc. Total protein and outer membrane protein profiles revealed that only total proteins were functional in copper tolerance of *P. putida*. One chromium-resistant bacterium with a MIC value of 1100 mg/L was isolated and identified as *Enterococcus faecalis*. Plasmid profile analyses showed that the chromium-resistance ability of *E. faecalis* was also chromosome-encoded. Total protein isolation results descriptively showed the importance of these protein in chromium-resistance.

**Key Words:** copper-resistant bacteria, chromium-resistant bacteria, heavy metal resistance, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecalis*, Kırıkkale-Kızılırmak

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlarken her aşamasında bana destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a ve ortak danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda yardımını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bana destek olan çalışma arkadaşlarıma ve Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve çalışmalarım boyunca emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi beni her konuda destekleyen, sabır gösteren ve her zaman yanımda olan babam Yakup TURALI'ya, annem Hatice TURALI'ya ve kardeşlerim Betül ve Büşra TURALI'ya teşekkürü bir borç bilirim

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kaynak Özetleri.....	5
1.1.1. Ağır Metallerin Tanımı.....	9
1.1.2. Ağır Metallerin Özellikleri.....	10
1.1.2.1. Bakırın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	11
1.1.2.2. Kromun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	12
1.1.3. Ağır Metal Atığının Kaynakları.....	13
1.1.3.1. Bakır Kirliliğinin Kaynakları.....	14
1.1.3.2. Krom Kirliliğinin Kaynakları.....	14
1.1.4. Ağır Metallerin Çevre Üzerindeki Etkileri.....	14
1.1.5. Ağır Metallerin Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	15
1.1.5.1. Bakırın Fonksiyonları.....	16
1.1.5.2. Kromun Fonksiyonları.....	17
1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	18
1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	18
1.1.6.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	19
1.1.6.2.1. Biyoremediasyon.....	19
1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	22
1.1.7.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	25
1.1.7.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı.....	28
1.1.7.3. Metallerin Proteine Bağlanması İle Hücre İçinde Tutulması.....	30
1.1.7.4. Ekstrasellüler Alıkonma.....	32
1.1.7.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu.....	32

1.1.8. Çalışmanın Amacı.....	33
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>34</b>
2.1. Materyal.....	34
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	34
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	34
2.1.1.2. Nutrient Broth.....	34
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	34
2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	34
2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	35
2.1.2.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	35
2.1.2.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	35
2.1.2.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS).....	35
2.1.2.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit).....	35
2.1.2.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE)	
Hazırlama.....	35
2.1.2.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan	
Tamponlar.....	35
2.1.2.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	35
2.1.2.2.2.2. %10 SDS Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	36
2.1.2.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M).....	36
2.1.2.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.8. İzopropanol Alkol.....	37
2.1.2.2.2.9. %70'lik etanol.....	37
2.1.2.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....	37
2.1.2.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....	37
2.1.2.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler.....	37
2.1.2.2.3.1. Fosfat Tamponu: ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	37
2.1.2.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler.....	38



2.1.2.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon.....	38
2.1.2.2.4.2. Deterjan Solüsyon.....	38
2.1.2.2.5. SDS PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	38
2.1.2.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanış.....	39
2.1.2.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....	39
2.1.2.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük).....	40
2.1.2.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	40
2.2. Yöntem.....	41
2.2.1. Çalışma Alanı.....	41
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	43
2.2.3. Cu ve Cr'ye Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....	43
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	43
2.2.5. Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	43
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	44
2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği.....	44
2.2.8. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	46
2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....	46
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	47
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	47
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması.....	48
2.2.13. Plazmit DNA Moleküler Ağırlık Belirlenmesi.....	48
2.2.14. Total Protein İzolasyonu.....	48
2.2.15. Dış Membran Protein İzolasyonu.....	49
2.2.16. Dış Membran ve Total Protein Bantları Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	49
2.2.17. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	50
2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	50
2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	50
2.2.17.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	50
2.2.17.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması.....	51
2.2.17.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....	51

<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	52
3.1. Krom ve Bakıra Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	52
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	52
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	54
3.3.1. Bakır Dirençli <i>Pseudomonas putida</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	54
3.3.2. Krom Dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	56
3.4. Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Büyüme Eğrileri.....	58
3.4.1. Bakır Dirençli <i>Pseudomonas putida</i> Büyüme Eğrisi.....	58
3.4.2. Krom Dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> Büyüme Eğrisi.....	59
3.5. Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Profilleri.....	59
3.5.1. Bakır Dirençli <i>Pseudomonas putida</i> Plazmit ve Kromozomal DNA Profili.....	60
3.5.2. Krom Dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> Plazmit DNA ve Kromozomal DNA Profili.....	61
3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Analizi.....	62
3.6.1. Bakır Dirençli <i>Pseudomonas putida</i> Suşunun Dış Membran ve Total Protein Profilleri.....	62
3.6.2. Krom Dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> Suşlarının Total Protein Profili.....	64
<b>4. TARTIŞMA SONUÇ</b> .....	66
<b>KAYNAKLAR</b> .....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>E.coli</i> 'de CopA bakır atım pompası.....	25
1.2. <i>E.hirae</i> ' de bakır homeostasisi.....	26
1.3. <i>E.coli</i> ' de Cus sistemi.....	28
1.4. Kromatin bakteri hücrelerinde toksisitesi ve direnç mekanizmaları göre taşınması .....	30
1.5. <i>E. coli</i> ve <i>P. syringae</i> 'da Pco/Cop sistemleri.....	31
2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu.....	41
3.1. <i>Pseudomonas putida</i> suşunun bakır içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	58
3.2. <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun krom içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	59
3.3. <i>Pseudomonas putida</i> suşunun plazmit ve kromozomal DNA Profili.....	60
3.4. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	61
3.5. <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun plazmit ve kromozomal DNA Profili.....	61
3.6. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	62
3.7. <i>Pseudomonas putida</i> suşunun dış membran ve total proteini.....	63
3.8. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrileri.....	63
3.9. <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun total proteini.....	64
3.10. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bakırın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	11
1.2. Kromun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	12
1.3. Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dalları.....	13
1.4. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri.....	24
2.1. SDS PAGE stok solüsyonları hazırlanışı.....	38
2.2. SDS PAGE çalışma solüsyonları.....	39
2.3. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	39
2.4. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	40
2.5. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	42
2.6. Antibiyotik diskleri ve etki değerlikleri.....	45
3.1. Bakır ve kroma dirençli suşların bölgelere göre dağılımı.....	52
3.2. Bakır ve kroma dirençli suşların biyokimyasal özellikleri.....	53
3.3. Cu dirençli <i>Pseudomonas putida</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....	54
3.4. Cu dirençli <i>Pseudomonas putida</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	55
3.5. Cr dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....	56
3.6. Cr dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
Se	Selenyum
T	Titanyum
U	Uranyum
V	Vanadyum
Be	Berilyum
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Bakır (II) Sülfat Penta Hidrat
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> .9H <sub>2</sub> O	Krom (III) Nitrat Nano Hidrat

### KISALTMALAR DİZİNİ

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

## 1. GİRİŞ

Günümüzde, aşırı nüfus artışı ve yoğun endüstriyel gelişim sonucu kirletici maddelerin miktarında çok büyük artış gözlenmektedir. Bu kirletici maddelerin doğrudan veya dolaylı olarak doğaya verilmesi doğanın dengesinin hızla bozulmasına neden olmaktadır [1]. Giderek artan boyutlarda önem kazanan bu konu dünya nüfusunun beslenmesi ile gelişen endüstrilerin ve daha uygar yaşama düzeyi sağlamak amacıyla sürdürülen çabaların istenilmeyen bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır [2]. Çevre kirliliği bütün dünyada korkutucu boyutlara ulaşmış, hem insan hem de diğer canlıların hayatını tehdit etmeye başlamıştır. Özellikle de sucul habitatların gittikçe kirlenmesi ve tükenmesi ekonomik, ekolojik ve sosyolojik bakımdan ciddi sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bunlar genel olarak; besin maddesi üretiminin azalması, sucul ekosistemlerde ekolojik dengenin bozulması, sosyal ve politik istikrarın sarsılması ve hastalıkların artması olarak sıralanabilir [3-5].

Doğal dengeyi bozan kirletici unsurlar; organik maddeler, ağır metaller, petrol türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktivite, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasallar ve atık ısı olarak sıralanabilir [6, 7]. Maden ve endüstriyel atıklarla sucul ortamlara giren ağır metaller önemli kirleticilerdir [8]. Bu kirleticilerden özellikle ağır metaller, deşarj edildikleri ortamda uzun süre kalabilmeleri, sucul canlılarda toksik etkiler meydana getirmeleri ve besin zincirinde birikerek insan sağlığını tehdit etmeleri nedeniyle büyük önem taşırlar [9, 10]. Bugün sanayide 40'dan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir [11]. Sulardaki ağır metal kirliliğinin sebeplerinin başında madencilik endüstrisi gelmektedir. Maden cevherlerinden metallerin ayrıştırılması sırasında meydana gelen atıklar, çoğu kez maruz kaldıkları işlemlerle aktifleşerek birer kirlilik kaynağı haline gelmektedir [12].

Ağır metaller genellikle, metal kaplama endüstrisi, otomobil endüstrisi, elektriksel ve elektronik materyallerin üretilmesi ve kullanılması, boru, silah ve lastik endüstrilerinde kullanılır. Diğer kirleticilerle karşılaştırıldığında metallerin daha önemli olması bu maddelerin sulu ortamda biyolojik olarak ayrışmamasından kaynaklanır [13, 14].

Canlılarda enzimatik aktivite için bazı ağır metallerin gerekliliği sadece belli konsantrasyonlardadır. Birçok ağır metal, gerekli olsun veya olmasın canlı organizmalar için potansiyel birer toksik ajandır [15]. Özellikle Cd, Hg, Pb ve Cr gibi ağır metaller besin zinciriyle girdikleri canlı bünyelerinden doğal fizyolojik mekanizmalarla atılmadıkları için birikime uğrar ve bünyede belli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yaparlar [16].

Krom bileşiklerinin fizikokimyasal özellikleri, endüstride kullanımı için çok uygun olduğundan çok yaygın olarak kullanılmaktadır [17]. Krom; deri sanayi, tekstil ve boyama sanayi, metal sanayi, kimya sanayi, maden ve petrol işletmeleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır [18]. Krom, metal ve kromatlar şeklinde bulunan ve çok geniş ölçüde korozyon önleyici uygulamalarda kullanılan bir elementtir [19]. Hekzavalent krom tuzu bileşiklerinin karsinojenik ve bakterilerden insanlara kadar [20] birçok organizmada mutajenik oldukları gösterilmiştir [21].

Endüstride bakır da krom kadar yaygın olarak kullanılan bir elementtir. Endüstride bakırın önemli rol oynamasının ve çeşitli alanlarda kullanılmasının nedeni, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, aşınma ve korozyon direnci, çekilebilme ve dövülebilme gibi çok farklı özelliklere sahip olmasıdır [22]. Cu kirliliğine neden olan işletmeler arasında bakır içeren atıksulara sahip işletmeler; kağıt, pulp, kağıt üretim malzemeleri, silikon sentezi, ahşap koruma, gübre üretimi, petrol rafineri işletmeleri, boya ve pigment üretimi, çelik ve benzeri metal sektörü, motor ve motorlu araç üretimi, uçak sanayi ve metal son işlemlerini yapan sektörler sayılabilir [23]. Cu, doğadaki canlılar için gerekli bir element olmakla beraber belirli miktarların üzerinde toksik etki yapmaktadır [24].

Organizmalar, ağır metallerin çok az bulunduğu doğal ortamlarda gelişimlerini sürdürdüklerinden, bunların toksik etkilerini ortadan kaldıracak bir mekanizmaya sahip değildirler [25]. Bu nedenlerden dolayı endüstriyel atıksulardan öncelikle ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir [26]. Ağır metal kirliliği içeren atıksuların standartlara uygunluğu kontrol edilerek istenilen düzeye düşürülmesi gerekmektedir. Ağır metal içeren suların arıtılmasında çöktürme, koagülasyon, elektrokimyasal arıtım, iyon değişimi, buharlaştırılarak geri kazanma gibi fiziko-kimyasal yöntemler

uygulanmaktadır. Kimyasal yöntemler hem pahalıdır hem de metalin geri kazanılmasından çok atıksulardaki aşırı metal kirliliğini kontrol etmeyi ve istenilen konsantrasyonlara düşürmeyi amaçlamaktadır [27, 28]. Ancak kimyasal analizler sonucu elde edilen veriler su ortamında yaşayan biota üzerindeki kirleticilerin etkisini gösterememektedir [29, 30]. Bu nedenlerle son yıllarda yapılan çalışmalarla sucül kirliliği belirlemede organizmalardan yararlanılmaktadır. Organizmalar kirleticilerin organizma içi konsantrasyonları ve bunun sonucunda oluşan biyolojik etkiler arasındaki ilişkinin özelliklerinin anlaşılmasını sağlayabilmektedirler [31]. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atıksulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir [32]. Mikroorganizmaların bu özelliklerinden yararlanılarak endüstriyel atıksudaki ağır metallerin giderimi ve geri kazanımı mümkün olabilmektedir [33, 34]. Ağır metallerin farklı formlarda çevreye girmesi, mikrobiyal topluluklarda ve onların aktivitelerinde kayda değer değişimler yapmaktadır [35]. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilmesi ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarca ağır metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir [36-43].

Kızılırmak Nehri, Türkiye sınırlarından doğan ve tekrar Türkiye sınırları içerisine dökülen en uzun nehirdir, İç Anadolu'nun en doğusunda bulunan Sivas ilinden başlayarak Bafra Burnundan Karadeniz'e dökülür [44]. Kızılırmak deltası, sulak alanları, orman alanları ve çok çeşitli canlı türleri ile kendine özgü, özel bir ekosistemi olan ve bölge halkının da geçim kaynağının sağlandığı deltadır. Bölgede nüfusun düşük ve ekolojik sisteme müdahalenin az olduğu dönemlerde deltadaki su kalitesi korunmuş, ekolojik denge sürdürülebilmiştir. Zamanla nüfusun ve ekonomik etkinliklerin artması, tarım ilaçlarının kullanılması, sulama kanallarının inşasıyla nehrin doğal yatağının değiştirilmesi, konut yapımı, avlanma, bataklıkların kurutulması tarım arazisi oluşturulması gibi nedenlerle hayvan ve bitki türlerinde azalmalar görülmüştür. Delta; çarpık kentleşme, avlanma ve kirlenmenin sebep olduğu olumsuz etkilere rağmen halen flora ve fauna için sağlıklı ve zengin bir doğal



ortam olma özelliğini korumaktadır [45, 46].

Kırıkkale Şehri, İç Anadolu Bölgesi'nin Orta Kızılırmak Bölümü'nde yer almaktadır [47]. Kızılırmak, Kırıkkale'nin 3-4 km kadar batısından geçmektedir [48]. Kırıkkale'de kurulan ilk sanayi kuruluşu 1929'da faaliyete geçen silah fabrikasıdır. Daha sonra silah fabrikalarının sayısı artmış, barut, pirinç, çelik fabrikaları ve 1987 yılında ise petrol rafinerisi kurulmuştur [49]. Bilindiği gibi sanayileşmenin gelişmekte ve nüfusun hızla artmakta olduğu bölgelerde; çevre sorunları gündeme gelmekte, nehirlere, göllere, denizlere atılmadan akıtılan bol miktardaki ev ve sanayi atıkları, çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmaktadır [50].

Bu çalışmanın amacı; Kırıkkale-Kızılırmak'tan Cu ve Cr ağır metallerine dirençli bakterileri izole etmek ve tanımlamaktır. Yapılan ağır metal miktar analizlerine göre; miktarlar normal sınır değerlerini aştığı için böyle bir çalışmaya gerek duyulmuştur. Bunun yanında, Kızılırmak ile ilgili olarak literatürde yapılmış benzer bir çalışma mevcut değildir. Dolayısıyla, yapılan bu çalışma literatürde bu konuda Türkiye için önemli bir nehir olan Kızılırmak ile ilgili eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacaktır.

Doğal uyum teorisi göz önüne alındığında, ağır metal toleransına ve biyoremidasyon aktivitesine sahip olarak üreyebilen mikroorganizmaları içeren endüstriyel drenaj örnekleri, Kırıkkale ili sınırlarından geçen Kızılırmak'tan toplanmıştır. Bu amaçla, atıklarında ağır metal üretme potansiyeli yüksek endüstriyel kuruluşlara yakın 12 istasyon belirlenmiştir.

## 1.1. Kaynak Özetleri

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metaller ve türevlerinin çevrede yaygın olarak bulunması endüstriyel faaliyetlerin doğal bir sonucudur [51]. Sanayi devriminden itibaren ağır metal üretiminin zirai, endüstriyel ve askeri uygulamalarda hızlı bir şekilde artması; özellikle endüstriyel toplumlarda önemli çevre problemlerinden biri olan ağır metallerin oluşumuna neden olmuştur. Rafineri, kömür, doğal gaz üretimi, kâğıt ve klor-alkali endüstrileri gibi yüzlerce kaynak ağır metal kirliliğini oluşturmaktadır [52, 53]. Endüstri kuruluşları, ağır metal giderimi için genellikle kimyasal presipitasyon işlemini veya şelat maddelerini kullanmaktadırlar. Asit maden drenajı ve atıksu arıtma tesislerinde, ağır metallerin giderimi için genellikle kireç veya peroksit ile pH nötralizasyonu, ters osmoz ve iyon değişimi yöntemleri uygulanmaktadır. Geniş araştırma ve tüm bu metal giderimi için harcanan mali kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda çoğunlukla tercih edilen yöntem, nötralizasyonu takip eden presipitasyon yöntemidir [54]. Genellikle, pH nötralizasyonunun başarılı olabilmesi için malzemelerin gerekli reaktif yüzey alanını sağlamak amacıyla ince taneli olması gerekir [55]. Ayrıca, presipitasyon ile oluşan metal hidroksit çamuru gibi ikincil atıkların giderilmesinin maliyeti oldukça yüksek olmaktadır [56]. Bu geleneksel metotlar ile ortamda bulunan metaller tam olarak giderilemeyebilir. Bunun dışında bu tekniklerin; pahalı ekipman ve takip sistemleri gerektirmesi, fazla kimyasal ve enerji ihtiyacının olması, toksik çamur ve diğer atık ürünler oluşturması gibi dezavantajları vardır [57, 58]. Bu nedenlerle metal iyonlarının sulu ortamlardan giderilmesi üzerine farklı teknolojiler geliştirmek günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Geliştirilmiş yöntemlerden birisi olan biyosorpsiyon yöntemi olarak adlandırılan mikrobiyal biyokütlelerin kullanılması var olan metotlara nazaran atıksulardan toksik ağır metallerin giderilmesinde düşük maliyeti ile yeni bir alternatif oluşturmuştur. Biyosorpsiyon teknolojisinin en önemli avantajları atıksulardaki ağır metal konsantrasyonlarını çok düşük seviyelere indirgemekteki etkinliği ve bol miktarda kolayca üretilebilen, ekonomik biyosorbent materyallerinin kullanılması sayılabilir. Biyosorbentler metal iyonlarının giderilmesinde yüksek seçiciliğe sahiptirler [59, 60]. Ayrıca bu yöntem ile çok seyreltik sulardan bile kirleticiler etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Biyosorpsiyon yönteminin diğer avantajları ise yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel

dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir [61].

Son yıllarda endüstriyel atıklardan zehirli metallerinin geri kazanımı için mikroorganizmaların biosorbent olarak alternatif kullanımı oldukça ekonomik bir yöntemdir ve metal giderimi için etkin bir metottur. Özellikle mikroalgler, bakteri ve mantarların metal uzaklaştırma işlemi için kullanılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [62, 63]. Mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi, fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha etkindir ve ağır metallerin gideriminin seçici olarak yapılmasına olanak sağlamaktadır [64]. Mikrobiyal hücreler aynı zamanda biyolojik atıksu arıtma tesisinde atıkların endüstriyel fermantasyonunu da gerçekleştirebilirler [65].

Yüksek miktarda ağır metal; insan, hayvan ve bitkiler için tehlikeli olabilmektedir. Bazı organizmaların, özellikle bakterilerin detoksifikasyon yetenekleri bulunmaktadır. Böylelikle mineralizasyon, dönüşüm ve/veya kirleticilerin immobilizasyonunu yapabilirler ve biyosferin sürdürülebilirliğinde, biyojeokimyasal çevrimlerde önemli rol oynamaktadırlar [66]. Mikrobiyal habitatta; ağır metallerin giderek daha fazla oranda bulunmasından dolayı mikroorganizmalar, ağır metal varlığına uyum sağlamak için bu ağır metalleri anaerobik solunumda terminal elektron alıcısı olarak kullanma mekanizması geliştirmişlerdir. Bakır, çinko, arsenik, krom, kadmiyum ve nikel gibi metaller için tolerans mekanizmaları tespit edilmiştir ve detaylı olarak açıklanmıştır [67]. Çeşitli çalışmalar sonucunda, ağır metallerin mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal faaliyetlerini etkileme etkisinin olduğunu göstermektedir [68]. Önceki çalışmalarla, stresin uzun ve kısa sürede etkisi incelenmiş; yüksek sıcaklık, pH veya kimyasal kirlilik gibi parametrelerin suda yaşayan bakteri popülasyonlarının tür çeşitliliğinde ve plazmid insidansında gelişmeler gösterdiği tespit edilmiştir. Toksik kimyasal atıkların olduğu bölgeden izole edilen bakteriler temiz sulardan izole edilen bakterilere göre daha sıklıkla plazmid DNA içerirler ve daha çok antibiyotik dirençliliği gösterirler. Yapılan çalışmalarla, endüstriyel olarak kirli nehirlerde yaşayan *Pseudomonas*'larda plazmid insidansı (% 18), kirlilik olmayan bölgede yaşayan *Pseudomonas* plazmid insidansına (% 7) göre daha yüksek oranda bulunmuştur [69]. Eğer, ağır metal

bulunan bölgede yaşayabilen mikroorganizmada; plazmidlerin sayısının arttığı tespit edilmişse sorumlu stres faktörü araştırılabilir [70]. Ağır metallerin bakteri suşları için MİK değerleri çeşitli doğal habitatlarda çalışılmıştır. Dirençliliğin bakteriler arasında yayılmasında, değişen çevre koşullarına uyumu kolaylaştıran plazmidlerin etkisi çok önemlidir. Çeşitli habitatlarda yapılan birçok çalışmada; metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmidler [35, 71-73] ve konjugatif transpozonlar [74, 75] üzerinde kodlandığı gösterilmektedir.

Le-Ni Sun ve arkadaşları [76], bakır madeni atıksularından ağır metale dirençli bakteri izolasyonunu ve tanısını gerçekleştirmişlerdir. Poli ve arkadaşları [77], benzer şekilde ağır metale dirençli termofilik bakterileri tespit etmişlerdir.

Ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve sularda metabolik aktiviteleri ile ağır metalleri tolere edebilen özellikle *Pseudomonas* cinsine ait türler ve asidofilik mikroorganizmalar gelişebilmektedir [78]. Ağır metal kirliliğine cevap olarak ya metal-indükleyen ve hücreyi koruyabilen yeni proteinler sentezlenir [79] ya da çeşitli metallere karşı dirençliliği kodlayan plazmidlere sahip metal iyon-dirençli *Staphylococcus aureus* [80] ve *Alcaligenes eutrophus* CH34 suşu (*Ralstonia metallidurans*) [81] gibi birçok mikroorganizma gelişebilir. Bakteriyel plazmidler,  $Ag^+$ ,  $AsO_2^-$ ,  $AsO_4^{-3}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $CrO_4^{-2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Sb^{+3}$ ,  $TeO_3^{-2}$ ,  $Tl^+$  ve  $Zn^{+2}$  gibi toksik metallere karşı direnç sistemlerini kodlarlar [82]. Ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmalar, bu toksik kirleticilere bazı proteinlerinin sentezini artırarak veya yapımını azaltarak cevap vermektedirler [83]. Birçok alg, fungi ve bakteri türünün metal iyonlarını adsorbe ettikleri ya da biriktirdikleri bilinmektedir [84].

Zolgharnein ve arkadaşları [85], Persian Körfezi'nden su, sediment ve endüstriyel atıksulardan olmak üzere 3 ayrı bölgeden alınan örneklerden, ağır metallere dirençli 35 bakteri izole etmişler, izole edilen bakterilerin, Cu, Pb, Cd ve Zn ağır metal dirençlilikleri test edilmiş ve dirençli olan bakterilerin, diğer bakterilere göre plazmide sahip olma sıklığı araştırılmıştır. İzolatların yaklaşık % 66'sının (38-62 kb ya da 4- >2 kb uzunluklarında) plazmid taşıdığı belirlenmiştir. En fazla plazmid görülme sıklığı, endüstriyel atıksulardan izole edilen bakterilerde olup, oranı % 48

olarak tespit edilmiştir. Deniz sedimentinden izole edilen bakterilerde plazmid sıklığı % 30, sudan izole edilen bakterilerde bu oran % 22 olarak belirlenmiştir. İzolatların hücre içerisine ağır metal alma kapasitelerinin farklı olduğu tespit edilmiş ve en iyi sonuç *Delftia tsuruhatensis* ve *Pseudomonas* AU3411'den elde edilmiştir.

Ansari ve Malik [86] tarafından endüstriyel atıksularla sulanan topraklardan alınan örneklerin ağır metal analizleri yapılmış ve Fe, Cr, Cu, Zn, Ni ve Cd miktarlarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu toprak örneklerinden izole edilen bakterileri, *Enterobacteriaceae* familyasına ve *Pseudomonas* sp. cinsine ait türler olarak tanımlamışlardır. Maksimum MİK değerleri Cd için 200, Zn ve Cu için 400, Ni için 800 ve Pb için 1600 µg/ml derişimlerinde belirlenmiştir.

*Alcaligenes eutrophus* CH34 'ün fazla miktarda ağır metal içeren çevrelere çok iyi adapte olmuş bir bakteri olduğu,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $CrO_4^{-2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Tl^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  ağır metallerine karşı direnç sağlayan pMOL28 ve pMOL30 megaplazmidlerini taşıdığı belirtilmiştir. Co, Ni direnç genlerinin pMOL28 plazmidi tarafından kodlandığı; Cd, Cu ve Zn direnç genlerinin de pMOL30 plazmidinde taşındığı ve her iki durumda da direnç mekanizmasının ağır metallerin hücre dışına atılması şeklinde gerçekleştiği tespit edilmiştir [87]. Raja ve Selvam [88], yağ fabrikası atıksularından izole ettikleri *P. aeruginosa*'nın Cd, Cr, Ni ve Pb metallerine karşı direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. Transformasyon ve plazmid curing deneyleri sonucunda; Ni ve ampicillin direnç geninin plazmid DNA tarafından kodlandığı, Cd direnç geninin, Cr ve Pb direnç genleri ile birlikte kromozomal DNA üzerinde olduğu anlaşılmıştır.

Bir metalin toksisitesi; makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır. Örneğin; heksavalent krom ( $Cr^{+6}$ ), trivalent kroma ( $Cr^{+3}$ ) göre daha toksiktir [89, 90].  $Cr^{+3}$  bileşikleri kullanılan işletmelerde çalışan insanlarda, kanser vakalarına rastlanmamıştır, ayrıca  $Cr^{+3}$  ile yapılan testlerde; deney hayvanları üzerinde herhangi bir negatif etki gözlenmemiştir. Kimyasal ve biyolojik olarak kararlı özellik gösteren  $Cr^{+3}$  (oksidant değildir, tahrip edici değildir, hücre zarına geçmez.), kanserojen bir madde olarak düşünülmemektedir. Ancak,  $Cr^{+6}$  'nın hücre zarından kolaylıkla

geçerek  $Cr^{+3}$ 'a indirgenir. Hekzavalent kromun biyolojik etkisi, bu indirgenme reaksiyonundan kaynaklanır.  $Cr^{+6}$ , hücre içindeki ögelere  $Cr^{+3}$  gibi bağlanarak bu ögelerin fonksiyonlarına zarar verdiği ve bu redüksiyonun toksik özellik taşıdığı varsayılmaktadır [89-91].

Toksik etkilerin çoğu, biyolojik membrandan hızlı geçiş ile intraselüler proteinlere ve nükleik asitlere bağlanmanın sonucudur [92]. Boyama endüstrisi, çoğunlukla krom solüsyonu kullanmakta ve doğaya krom tuzları olarak maksimum dozda vermektedir [93]. Çeşitli araştırmacılar tarafından, krom dirençli mikroorganizmalar, bir miktar krom kontaminasyonuna uğramış sedimentlerden izole edilmiştir [92].

Bir metalin değerliğinin oksidoredüksiyon aracılığı ile değişimi, düzenleme ve direnç için gereklidir. Bu, hücre dış yüzeyinde elektron taşıma sistemleri ve indirgeyici enzim sistemleri aracılığıyla başlanır ve bakterilerde metal iyonlarının hareketini ayarlamaya ve detoksifiye etmesine izin verirler. Kromun ( $Cr^{+6}$ ) indirgenmesi, buna bir örnektir. Bakteriler,  $Cr^{+6}$ 'yı aerobik ve anaerobik şartlar altında elektron taşıma sistemleri aracılığıyla sitokromlarda tutarak indirgeyebilirler. Bu direnç, plazmid veya kromozomda şifrelenmekte ve çoğunlukla fakültatif anaeroblarda bulunmaktadır [94].

### **1.1.1. Ağır Metalin Tanımı**

Ağır metal terimi, düşük konsantrasyonlarda zehirli ya da toksik olan, nispeten yüksek bir yoğunluğa sahip metalik kimyasal elementler için kullanılır. Gerçekte ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılmaktadır [95, 96]. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapsedilmiş vaziyette bulunurlar [96].

### 1.1.2. Ağır Metallerin Özellikleri

Su kirliliğine sebep olan ağır metaller zehirli maddeler olarak ilk akla gelenlerdir. Ağır sıvılar, askıda katı maddeler ve reaktifler de zehirleyici özelliğe sahip olabilirler. Tesis atığı içinde bulunan metaller ve diğer elementlerin büyük çoğunluğu canlılar için zehirleyici özellikte maddelerdir [97]. Metaller ve diğer atıklardan oluşan kirleticilerin çok çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmeleri, yaygın kirlenme sebebi oluşturmaları, çevre koşullarına dayanıklı olmaları, daima biyolojik sistemlere yönelik etki göstermeleri ve kolaylıkla besin zincirine girerek canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedeniyle diğer kimyasal kirleticiler arasında ilk sırada yer almaktadırlar [98].

Ağır metaller yerkabuğunda doğal olarak bulunan, bozulmayan ve yok edilemeyen bileşiklerdir. Toprak, su ve havada değişik oranlarda bulunabilen ağır metaller belirli konsantrasyonun üzerinde kirliliğe yol açmaktadır. Bazen mikro besinler (Zn, Cu, Fe, Mn ve Ni) gibi gerekli olan ya da bazen çevresel kirletici (Al, Pb, Hg, Cd vs.) olan ağır metallerin çevrede yaygın bir şekilde birikmesi, tüm canlılar için boyutları giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır [99, 100].

Ağır metaller deniz ortamında iz halinde bulunmalarına karşılık, organizmadaki doğal düzeyleri ve birikimleri farklı olmaktadır. Ağır metal deyimi, doğadaki tüm metalleri ve metalloidleri kapsamaktadır. Bu metaller çevre kirlenmesine neden olmalarından ve çok düşük yoğunluklarda bile deniz organizmalarına ve dolayısıyla insanoğluna zehirleyici etki gösterdiğinden deniz ekosisteminde sürekli etki göstermektedir. Çağımızda endüstrinin hızla gelişmesi ve yaşam standartlarının yükselmesine paralel olarak, ağır metallerin kullanım alanları da giderek artmaktadır. [101-106].

### 1.1.2.1. Bakırın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

**Çizelge 1.1.** Bakırın fiziksel ve kimyasal özellikleri [107-109]

<b>Simgesi</b>	Cu
<b>Atom Numarası</b>	29
<b>Proton ve Elektron Sayısı</b>	29
<b>Nötron Sayısı</b>	35
<b>Element Serisi</b>	Metal (Geçiş Metali)
<b>Sınıflandırma</b>	Ağır Metal
<b>Grup, Periyot, Blok</b>	B, 4, d (4. Periyot I-B)
<b>Görünüş</b>	Metalik kahverengi
<b>Doğadaki Kararlı İzotopları</b>	63. 65 g/mol
<b>Ortalama Atom Ağırlığı</b>	63.546 g/mol
<b>Elektron Dizilimi</b>	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
<b>Enerji Seviyesi Başına Elektronlar</b>	2, 8, 18, 1
<b>Maddenin Hali</b>	Katı
<b>Yoğunluk</b>	8.96 g/cm <sup>3</sup>
<b>Sıvı Haldeki Yoğunluğu</b>	8.02 g/cm <sup>3</sup>
<b>Molar Hacmi</b>	7.11 cm <sup>3</sup> /mol
<b>Yükseltgenme Seviyeleri</b>	(+1), (+2)
<b>Erime Noktası</b>	1084.62 °C
<b>Kaynama Noktası</b>	2562 °C



### 1.1.2.2. Kromun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

**Çizelge 1.2.** Kromun fiziksel ve kimyasal özellikleri [110-112]

<b>Simgesi</b>	Cr
<b>Atom Numarası</b>	24
<b>Proton ve Elektron Sayısı</b>	24
<b>Nötron Sayısı</b>	28
<b>Element Serisi</b>	Metal (Geçiş Metali)
<b>Sınıflandırma</b>	Ağır Metal
<b>Grup, Periyot, Blok</b>	B, 4, d (4. Periyot VI-B)
<b>Görünüş</b>	Gri Renkli
<b>Nitelik</b>	Sert, Kırılgan
<b>Doğadaki Kararlı İzotopları</b>	50, 52, 53, 54 g/mol
<b>Ortalama Atom Ağırlığı</b>	51.996 g/mol
<b>Elektron Dizilimi</b>	[Ar] 3d <sup>5</sup> 4s <sup>1</sup>
<b>Enerji Seviyesi Başına Elektronlar</b>	2, 8, 13, 1
<b>Maddenin Hali</b>	Katı
<b>Yoğunluk</b>	7.19 g/mL
<b>Molar Hacmi</b>	7.78 cm <sup>3</sup> /mol
<b>Yükseltgenme Seviyeleri</b>	+3, +6
<b>Erime Noktası</b>	1857°C
<b>Kaynama Noktası</b>	2672°C

### 1.1.3. Ağır Metal Kirliliğinin Kaynakları

Çevre kirliliğini arttıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atıksularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir [113]. Metal kirliliği içeren atıksular; maden işletmeleri (Pb, Zn, Fe, Cu, Ag, Cr, Au ve U eldesine yönelik süreçler sonucunda), metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom vb) ve diğer metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik - elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri oluşturmaktadır [114]. Bu kuruluşlar gereksinimleri doğrultusunda çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve bu nedenle atıklarında Hg, Zn, Co, Cu, Fe, Pb, Cr, As ve Ag gibi metal iyonları bulunmaktadır [113].

Madencilik faaliyetlerinde atık/ürün oranına bağlı olarak büyük miktarlarda atık oluşmaktadır. Atıklar özelliklerine bağlı olarak çevreye tolere edilebilecek seviyenin üzerinde zarar verme potansiyeline sahip olabilirler. Madencilik faaliyetlerinde atık yönetiminin farklı aşamalarında doğru ve yeterli tedbirler alınmadığı takdirde su kirliliği görülebilir. Su kirliliği sorununu önemli kılan başlıca neden suların hareketli olmasıdır. Kirlilik, akıntılarla ve nehirler yoluyla yüzeyden taşınabileceği gibi, sızma ve süzülme yollarıyla yeraltı sularına karışarak da taşınabilir. Örneğin, yağmur sularının veya madencilik faaliyetleri sonucu oluşan suların atığa sızması çözünmeye neden olabilir. Bu yolla oluşan özüt (liç), sülfid oksidasyonuna ve asit oluşumuna ve böylece ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olur. Bunlar arasında özellikle B, Cd, Cr, Be, Sb, Ag, As, Pb, Hg, Mn, Ni, S, T, U, V, Zn ve Al en önemlileridir [97].

**Çizelge 1.3.** Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dalları [115]

Endüstri	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

### **1.1.3.1. Bakır Kirliliğinin Kaynakları**

Cu kirliliğinin kaynağı olarak; metal temizleme ve kaplama banyoları birinci sırada yer almaktadır. Örneğin kıymetli taş işlemeciliğinde gümüş malzemeler için baz metal olarak çoğunlukla diğer kıymetli metallerin yanı sıra bakır kullanılır. Bakırın en çok karşımıza çıktığı alanlardan biri de baskı elektrik ve elektronik devre üretimidir. Bu alanlara ilâveten bakır içeren atıksulara sahip işletmeler; kağıt, pulp, kağıt üretim malzemeleri, silikon sentezi, ahşap koruma, gübre üretimi, petrol rafineri işletmeleri, boya ve pigment üretimi, çelik ve benzeri metal sektörü, motor ve motorlu araç üretimi, uçak sanayi ve metalson işlemlerini yapan sektörler sayılabilir [23].

### **1.1.3.2. Krom Kirliliğinin Kaynakları**

Cr, tabak yapımı, boyama, alaşım, kimyasal maddelerin yapımı [116], maden sanayii, pigment, tekstil ve elektro kaplamacılıktaki [117] yaygın kullanımına bağlı olarak çeşitli endüstriyel alanlardan doğal su ekosistemlerine girmektedir. Dünyadaki kullanımı her yıl yaklaşık  $10^7$  ton civarındadır; bunun yaklaşık %60-70'i çelik ve %15'i de tabak yapımı, pigment ve elektrokaplama gibi kimyasal endüstri prosesinde yer almaktadır [118, 119].

### **1.1.4. Ağır Metallerin Çevre Üzerindeki Etkileri**

Endüstriyel kullanımının artmasıyla metaller ve ağır metaller öncelikle meslek hastalıkları sorunları olarak gözlenmiştir. Daha sonra toprak ve su kaynaklarının kirliliğinin artmasıyla çevresel salgınlar olarak gündemimize girmeye başlamıştır. [120].

Yeryüzüne inen toksik metal bileşikleri nehir, yağmur ve kar sularıyla yeryüzü sularına (deniz, göl, gölet, baraj gibi) ulaştığı gibi yağmur ve kar sularıyla topraktan sızma suretiyle eser miktarda yeraltı sularına karışabilmektedir. İçme suları yeraltı

sularından temin edildiğinden çeşitli toksik metaller içerebilir. Ağır metal yükü bakımından en tehlikeli olan bölgeler, kaynağın 3 km civarında olan kısımlardır [121].

Çevre kirlenmesi bakımından eser elementler veya metaller, bol bulunan elementlerden çok daha tehlikelidir. Canlılar eser denen bu elementlerle jeolojik devirler boyunca çok az temasa geçtikleri için, bunlara uyum sağlama mekanizmaları geliştirememişlerdir. Son zamanlarda antropojenik faaliyetlerin büyük ölçüde artması, canlıyı yapısının yabancı olduğu toksik metallerle karşı karşıya getirmiş ve bunların toksik etkileri canlı yapısında kendisini göstermeye başlamıştır [122].

Doğal veya yapay nedenlerle ağır metallerin birikimi, önemli çevresel sorunlar arasına girmiştir. Ancak metallerin genellikle eser miktarlarda bulunmaları dolayısıyla ölçümlerinde görülen hata payının büyüklüğünün yanı sıra, fiziksel, kimyasal ve biyolojik mekanizmalardaki dolanım yolunun ayrıntıları ile bilinmemesi gibi nedenlerle metallerin doğadaki dolanım hızları da güçlükle saptanabilmektedir [123].

#### **1.1.5. Ağır Metallerin Canlılar Üzerindeki Etkileri**

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların, organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin; bakır hayvanlar ile insanlarda kırmızı kan hücrelerinin birçok oksidasyon ve redüksiyon sürecinin vazgeçilmez parçasıdır [124, 125]. Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı, dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin; nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak değişir [96]. Özellikle Cd, Cr (Cr<sup>+6</sup> formu), Hg ve Pb metalleri canlılar için esansiyel olmayıp eser miktarı bile toksik etki gösterebilir [126].

Sucul ortamda meydana gelen ağır metal kirliliği, besin zinciri sürecinde artarak biriktirildiklerinden toksik etkileri artmakta ve önemli bir çevresel problem oluşturmaktadır [127]. Ağır metallerin nehirlerde ve sulu ortamlarda birikmesi hem sucul yaşamı olumsuz yönde etkilemekte [128], hem de besin zinciri içerisinde insan sağlığını tehdit etmektedir. Ayrıca bazıları, çevrede lipofil özellik kazanarak su, bitki ve hayvanlarda birikip besin zinciri ile insanlara ulaşmaktadır [32, 129]. Aşırı metal konsantrasyonları; hücre membranının permabilitesini değiştirerek, (-SH) sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek, fosfat grupları ve aktif ADP ya da ATP gruplarıyla reaksiyon affiniteleriyle veya gerekli iyonlarla yer değiştirerek toksisiteye neden olmaktadır [130]. Sunda ve Huntsman [131], ağır metallerin toksik etkilerinin genellikle, metabolik bölgelerdeki besin elementleri ile toksik metallerin yer değiştirmesi sonucu gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Metaller, mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedenleriyle toksiktir [132, 133]. Önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi yaparlar [35]. Uzun süre ağır metallerle maruz kalan bakterilerde bu metallerle karşı çeşitli dirençlilik mekanizmaları gelişmiştir. Mikrobiyal metal dirençliliği mekanizmaları arasında metallerin fosfat, karbonat ve sülfat olarak presipitasyonları; etil veya metil gruplarının eklenmesi ile metallerin buharlaşması; membrandaki elektronegatif bileşenler ve ekzopolimerler tarafından fiziksel çıkarılma; enerji gerektiren metal sistemleri ve düşük moleküler ağırlıklı sisteminde zengin proteinler ile intraselüler müdahale sayılabilir [134-136].

#### **1.1.5.1. Bakırın Fonksiyonları**

Cu organizmalar için gerekli bir mikronutrienttir [137]. Cu içeren biyolojik bileşiklerin ana fonksiyonu oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıdır. Bakır içeren biyolojik moleküller serbest radikaller üretmek için moleküler oksijen ile direkt reaksiyona girerler.

Yüksek Cu konsantrasyonlarının oluşturduğu toksik serbest hidroksil radikallerinin DNA'ya zarar vermesi ile kanser ve hücre proliferasyonunun arttığı tespit edilmiştir [138]. Bunun yanında Cu iyonu, hücre içinde oksijen-bağımlı zararlı reaksiyonlara katılır. Aynı zamanda, sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, askorbat oksidaz, lizin oksidaz ve tirozinaz gibi pek çok enzimlerin yapısal bir parçasıdır [139, 140]. Cu'nun DNA'ya yüksek bir affinite ile bağlandığı bulunmuştur. Özel bölgelere Cu iyonlarının bağlanması; proteinlerin, polinükleotidlerin, DNA'nın ve biyomembranların üç boyutlu yapılarını modifiye edebilir [138]. Bu bağlanma mikrobiyal enzimlerin prostetik grupları olarak iş görmektedir. Bununla birlikte toksik olmasından dolayı Cu homeostasisi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [137]. En fazla Cu<sup>+2</sup> formunun toksik olduğu düşünülmektedir [141].

#### 1.1.5.2. Kromun Fonksiyonları

Cr birçok organizma için iz miktarlarda gerekli bir elementtir ancak yüksek seviyelerde toksik ve mutajeniktir [142].

Cr'nin biyolojik etkileri, oksidasyon basamaklarına göre değişir; Krom çoğu organizmalar için oldukça toksikken Cr<sup>+3</sup> hemen hemen zararsızdır [143, 144]. Krom toksisitesi Cr<sup>+6</sup>'nın daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesi ile ilişkilidir. Cr<sup>+6</sup>'nın Cr<sup>+3</sup>'e indirgenmesi, pek çok biyolojik sistemde açıklanmıştır; Cr<sup>+5</sup>'in geçici oluşumu, krom toksisitesinde en muhtemel mekanizmadır [145]. Cr<sup>+6</sup>'dan Cr<sup>+5</sup> komplekslerinin oluşumu NAD(P)H, FADH<sub>2</sub>, çeşitli pentozlar gibi fizikolojik indirgenme araçları ile oluşurlar [146]. Bu kompleksler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek önemli miktarda OH radikalleri oluştururlar. OH radikalleri diğer toksik etkilerinin yanında DNA'da değişikliklere neden olabilmektedir [146, 147].

Cr'nin DNA üzerindeki hasarı özellikle gen üzerinde toksik etki göstermesidir. Cr<sup>+3</sup> enzimlerin karboksil ve sülfidril grupları ile reaksiyona girerek yapı ve aktivitelerinde değişikliklere neden olabilir [148]. DNA polimeraz ve diğer enzimlerin aktivitelerinin modifikasyonu sonucunda magnezyum iyonları ile Cr<sup>+3</sup> yer değiştirebilir [147, 149].

*Chlorella vulgaris* gelişmesi 45-100 ppm Cr<sup>+3</sup> veya Cr<sup>+6</sup>,dan etkilenmezken, 15 ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarda *Scenedesmus acutus*'da hiçbir gelişme meydana gelmemiştir [150]. Bununla birlikte Brady ve arkadaşları [151], *Scenedesmus* ve *Selenastrum* alg kolonisi büyümesinin, 100 ppm Cr<sup>+3</sup>,den etkilenmediğini ancak 100 ppm Cr<sup>+6</sup>,da büyümenin gerçekleşmediğini kaydetmişlerdir. Bu durum alglerin kroma karşı farklı hassasiyetleri olduğunu açığa çıkarmaktadır.

*Euglena gracilis*'te Cr<sup>+6</sup> varlığında lag büyüme safhası uzamış, Cr<sup>+3</sup> varlığında büyüme hızı azalmıştır [152]. *Chlorella* [143] ve *Scenedesmus*'da [153] fotosentezi engellediği kaydedilmiştir [147].

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

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

Endüstriyel sıvı atıklardan ağır metallerin giderilmesinde çeşitli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır [154]. Ağır metallerin sulu ortamlardan giderilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, aktif karbon ile adsorpsiyon, ters osmoz, filtrasyon ve membran teknolojileri şeklinde sıralanabilir [54, 155]. Bu geleneksel metotlar ile ortamda bulunan metaller tam olarak giderilemeyebilir. Bunun dışında bu tekniklerin; pahalı ekipman ve takip sistemleri gerektirmesi, fazla kimyasal ve enerji ihtiyacının olması, toksik çamur ve diğer atık ürünler oluşturması gibi dezavantajları vardır [53, 54].

Ağır metal iyonu içeren atıksuların arıtılması genelde işletmenin kapasitesine, atık-suyun debisine ve özelliklerine, işletmedeki arıtma tesisi ve kullanılan yöntem ve malzemeye bağlı olmakla beraber temelde metal iyonun kimyasal olarak çöktürülmesine dayanır. Ekonomik ve pratik olmayan bu yöntemler atıksudaki aşırı metal kirliliğini kabul edilebilir seviyelere indirmek için kullanılır [156, 157]. Geleneksel yöntemlerin etkisiz kaldığı, seyreltik çözeltilerden metal uzaklaştırılması

açısından yeni metodların geliştirilmesi önemlidir. Bu gibi sorunların halledilmesi için biyolojik yöntemlerin kullanılması söz konusu olmuştur [158].

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

Ağır metal içeren atıksuların arıtımında biyolojik yöntemler; etkili, pratik ve ekonomik olmaları nedeniyle fiziksel ve kimyasal arıtım yöntemlerine göre tercih edilmekte ve bilimsel araştırmalar bu yönde ağırlık kazanmaktadır [159].

Biyolojik substratların temel avantajları; aktif bağlanma bölgeleri çeşitliliği, küçük ve tek biçimli boyutları, geniş yüzey alanlarına sahip olmaları ve ion değiştirici reçinelerden daha az biyolojik substrat gerektirmesi şeklinde sıralayabiliriz [160]. Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar, seçici olarak atıksulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptir [33, 161, 162].

Sonuç olarak; metallerin biyolojik yöntemlerle uzaklaştırımı ve geri kazanımı, kullanılan klasik fiziksel - kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla tercih edilmekte ve ilgili biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır [163].

##### **1.1.6.2.1. Biyoremediasyon**

Biyoremediasyon, toksik kimyasalların ve diğer zararlı atıkların birikmesiyle sonuçlanan çevresel zararları azaltmak ya da elimine etmek için organizmaların kullanılmasıdır [164]. Son çalışmalar gelişen hücrelerin hücre içi detoksifikasyon mekanizmaları ile metalleri ortadan kaldırabildiğini kanıtlamıştır [32].

Biyoremediasyon, ağır metal içeren endüstriyel kirlilikte biyoabsorpsiyon, biyoakümülyasyon, biyopresipitasyon ve pürifiye polimerler tarafından kirliliğin uzaklaştırılması gibi birkaç biyoteknolojik yöntemin kullanılması ile kimyasal ve fiziksel metotlara alternatif olarak mikroorganizmalardan yararlanmayı ortaya koymaktadır [165].



Metal iyonlarının sulu çözeltilerden mikroorganizmalar ile tutulmasına biyosorpsiyon denir. Ağır metalleri atıksulardan uzaklaştırmak, eser metalleri matriksten ayırmak ve zenginleştirmek için alg, mantar, maya, bakteri gibi mikroorganizmalar son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır [160]. Bu mikroorganizmalar biyosorpsiyon işleminde ölü veya canlı olarak kullanılabilir [166]. Canlı hücrelerin, sulu çevrelerinden metal katyonlarını toplayarak hücre içinde biriktirmeleri bilinen bir özellik olmasına rağmen, mikroorganizmaların ağır metal iyonlarını seçici olarak alıkoyma özelliği üzerindeki çalışmalar yenidir [167].

Canlı biyokütleye nazaran ölü biyokütle kullanılmasının bazı avantajları vardır. Ölü hücreler; uzun süre oda sıcaklığında saklanabilirler, metal toksisitesinden etkilenmezler ve besine ihtiyaç duymazlar. Bunların dışında biyokütlenin fiziksel veya kimyasal işlemlerle öldürülmesi ve bazı ön işlemlere tabi tutulması biyosorpsiyon kapasitesini arttırabilir [166].

Biyosorpsiyon ile metallerin ayrılması hücre duvarı ile metal arasında etkileşimin sonucudur. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks yaparak adsorplanabilecekleri gibi bazı mikroorganizmalar hücrelerin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyerek çözeltilerden metal iyonlarını bağlayabilirler. Ayrıca hücre duvarındaki proteinler, iyonları bağlamak için fonksiyonel grupları ve peptid bağlarını da tercih edebilirler [168]. Hücre duvarındaki muhtemel bağlanma bölgeleri; amin, amit, imidazol, hidroksil, karboksilat, fosfat, tiol, tioeter, sülfat, sülfidril ve diğer fonksiyonel grupları içerir [169-172]. Bu metal bağlamada görev alan grupların fonksiyonu modifikasyon ya da engellemeler kullanılarak ortaya çıkarılabilir [170, 173]. Karboksil gruplarının alglerde Cu ve Al bağlamada görev aldığı düşünülmektedir [170].

Farklı biyolojik metotlar arasında biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyonun, metallerin ortadan kaldırılması için iyi bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [174]. Biyoakümülyasyon, bir organizma tarafından belirli konsantrasyonlarda bulunan maddelerin kayıp oranlarından fazla olduğunda gerçekleşen bir işlemdir [175].

Biyoakümülyasyonda, metal alınımı ilk aşamada çok hızlı bir şekilde cereyan etmekte ve metal iyonlarının hücre duvarlarına temas eder etmez yüzey adsorbsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyine bağlandığını göstermektedir [176]. Ağır metallere maruz kalan mikrobiyal hücrelerin membranından geçen metal iyonları, sitoplazma içerisinde tutulmaktadır [175] Genelde hücre duvarlarına metal bağlanması hızlı ve yüksek verimlilik gösterirken hücrenin sitoplazmasındaki bölgelerde (sitosoluble) çok yavaş ve düşük verimliliktedir [113].

Canlı hücre sistemleri tarafından biyo-alım mekanizmalarında, sistemin ekstrem pH, yüksek metal konsantrasyonu gibi faktörlere duyarlılığı ve dış metabolik enerji gereksinimleri gibi belli kısıtlamalar söz konusudur [176]. Bununla birlikte bu tarz problemlerle; ırk seçimi ve karbon kaynağı olarak organik atık kullanımı sırasında karşılaşılabilir. Daha iyi metal biyosorpsiyonu, biyoakümülyasyonu ve biyoçökeltimi kapasiteleri için tek bir türe bağlı kalmaktan ziyade, çoklu tür kullanımı daha iyi bir yaklaşım olabilir. Çoklu tür birlikteliği, yüksek pH ve yüksek metal konsantrasyonu gibi endüstriyel atıksulardaki ekstrem şartlara daha iyi dayanabilirler [177].

Daha fazla dirençli ve verimli soyları üretmenin diğer pratik yollarından biri hücrelerin devamlı olarak yüksek konsantrasyonlarda ağır metallere adaptasyonu ile gerçekleştirilir. Dönmez ve Aksu [178], *Candida* türlerini Cu ve Ni eklenmiş üreme ortamındaki kültürler ile Cu ve Ni'e adapte etmişlerdir. Adapte hücreler yüksek metal konsantrasyonunun varlığında adapte olmayanlara göre daha iyi geliştiklerini göstermişlerdir. Hatta adapte olan hücreler tarafından özel metal alım kapasitesinin ve % metal uzaklaştırılmasının, tüm test edilen konsantrasyonlarda adapte olmayan hücrelerinkinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, adaptasyon mekanizmalarını tam olarak ortaya koyamamalarına rağmen, metalotiyonein veya diğer Cu bağlayan proteinlerin daimi sentezinden ya da genetik düzenlenişteki adaptasyon faktörlerinden birinin değişikliğinden bahsetmişlerdir. Gelişen hücre sistemlerinde yeterli enerji rezervinin varlığı, vakuol içerisine metalin aktif taşınımını kolaylaştırdığını da göstermişlerdir [178].

### 1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

İnsanların ihtiyaçlarının artması ile bağlantılı olarak sanayileşmedeki gelişmeler, atıksu miktarını ve ağır metal yükünü artırmıştır [179]. Ağır metal iyonları teknolojik öneme sahip olmaları nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu endüstrilerden gelen atıksular kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler [159]. Mikroorganizmaların bu çevrelere bazı özel direnç mekanizmaları ile adapte olduğu rapor edilmiştir [180]. Metallerle karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayat başladıktan hemen sonra gelişmiştir. Çünkü bakterilerin geliştiği ortamlarda metaller her zaman varolmuşlardır [94].

Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki –SH gruplarına bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler. Hg bu özelliğinden dolayı toksik metal olarak kabul edilmektedir [181]. Metal iyonlarının varlığı, genlerdeki enzimatik detoksifikasyon özellikleri aracılığı ile metal dirençliliğini başlatmayı daha fazla düzenleyebilir [182, 183]. Bazı bakteri grupları civayı enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirmektedirler [181]. Cd(II)'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik kadmiyum formları oluşmaktadır [26].

Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atıksulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir [184]. Mikroorganizmaların yüksek miktardaki toksik maddelerle başa çıkabilmesi için, birçok yol mevcuttur [185]. Mikroorganizmalardaki metal dirençlilik mekanizmaları; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışında bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücresel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir [26, 186].

Mikroorganizmalar bu direnç mekanizmalarından sadece birini kullanabildiği gibi birkaçını kombineli olarak da kullanabilmektedir. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksitesine bağlıdır [136].

Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir [187, 188]. Çünkü her iki tip dirençte de organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik kullanımından önce rapor edilmiştir [94]. Atıksulardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus* bakterilerinin ağır metal ve antibiyotiklere karşı dirençli oldukları görülmüştür [189].

Bakterilerde antibiyotiklere direnç doğal ve kazanılmış (mutasyonel ve aktarılabılır) iki şekilde mümkündür [190]. Doğal direncin temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya antibiyotiğin etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması durumu vardır. Bu duruma örnek olarak hücre duvarı olmayan *Mycoplasmalar*'ın beta-laktam antibiyotiklerine olan direnci ve *Mycobacterium tuberculosis*'in kalsifiye odaklarda metabolizması yavaşlamış olarak uzun süre canlı kalabilmesi ve bunun sonucunda antitüberküloz antibiyotiklere dirençli olması verilebilir. Antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girememesi veya etkileyebileceği mekanizmaların olmamasından ileri gelen doğal direnç durumu *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerde penisilin G'ye, Gram-pozitif bakterilerde de polimiksin B'ye karşı görülür [191].

Kazanılmış dirençte ise bakteri popülasyonunun antibiyotik ile ilk temasa gelişinde, antibiyotik bakteriler üzerinde etkilidir ancak, temas süresi boyunca veya yinelenen temaslar sırasında bakteri popülasyonunda ilacın antibakteriyel etkisine karşı direnç gelişir. Kazanılmış direnç, bakterinin kromozomlarında oluşan mutasyon sonucu veya bakterinin ortamdan ya da diğer bakterilerden, transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarından biri vasıtasıyla, direnç yapan gen paketini alması (yani R plazmidleri veya transpozonlar aracılığı ile olan direnç) sonucu meydana gelir [191].

Bakterilerin yapısı ve antibakteriyel etki mekanizması farklı birden fazla antibiyotiğe direnç kazanmasının diğer bir şekli de çoklu (multiple) dirençtir. Çoklu direnç, genellikle bakterinin kromozomlarında ve özellikle plazmidlerinde birden fazla türde

direnç geninin bulunmasına bağlıdır; örneğin dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinde 10 veya daha fazla antibakteriyel ilaç çeşidine karşı direnç oluşmasına yol açan genleri taşıyan plazmidlerin varlığı gösterilmiştir [191]. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* sp. bakteri türleri çoklu antibiyotik dirençlerine sahiptir [192].

**Çizelge 1.4.** Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri [193]

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

As; arsenik, Cu; bakır, Mn; mangan, Zn; çinko, Co; kobalt, Ag, gümüş, Hg; civa, Ni; nikel, Cd; kadmiyum, Chlor, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; CouA, coumermycin A; Rif, rifampicin; Tet, tetracycline; Trim, trimethoprim,  $\beta$ -lactams,  $\beta$ -laktam.

Mikroorganizmalar, toksik metal varlığında adaptasyon için çeşitli mekanizmalar kazanmışlardır [189]. Bu adaptasyon mekanizmaları;

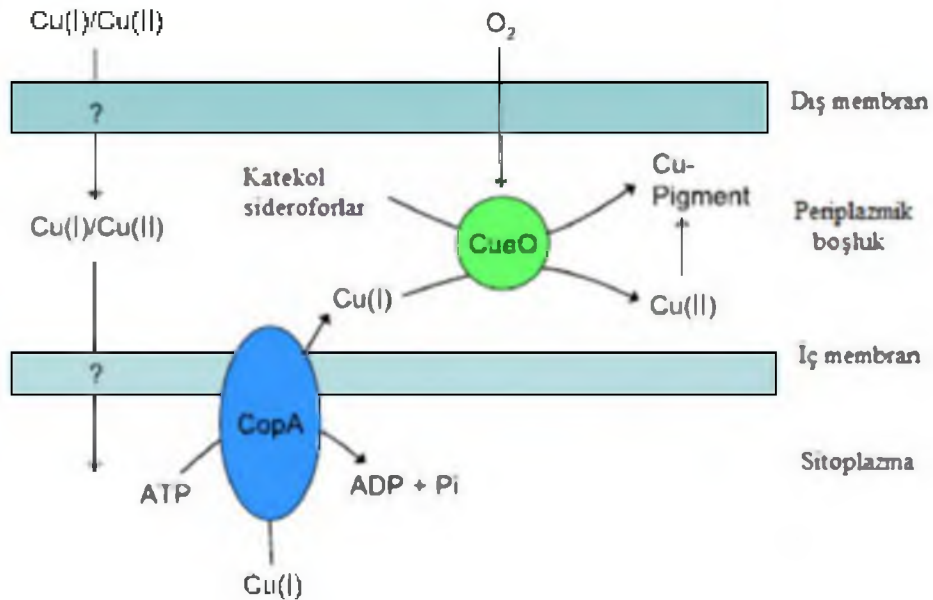
1. Geçirgenlik bariyeri ile metallerin hücre dışında tutulması
2. Metallerin hücreden dışarı doğru aktif taşınımı
3. Metallerin proteine bağlanması ile hücre içinde tutulması
4. Ekstrasellüler alıkonma
5. Metallerin enzimatik detoksifikasyonu' dur.

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

Metal iyonlarının hücre çeperi yüzeyine bağlanmasında çeper yüzeyinde mevcut bulunan bazı polisakkaritler ve proteinler ile yapılarında bulunan karboksil, hidroksil, fosfat ve amino gruplarının etkin oldukları bilinmektedir [194, 195].

Hücre duvarındaki polisakkaritler sulu ortamdaki iki değerlikli metal iyonları ile yer değiştirir. Örneğin, deniz alglerinin aljinatı,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  veya  $Mg^{+2}$  iyonlarının tuzları şeklinde bulunur. Bu iyonlar,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  gibi karşı iyonlarla yer değiştirirler [33].

Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücrel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E.coli*'de  $Cu^{+2}$  dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinleri'nin üretimi değiştirilerek  $Cu^{2+}$ 'nin hücreye girişi engellenir [196].

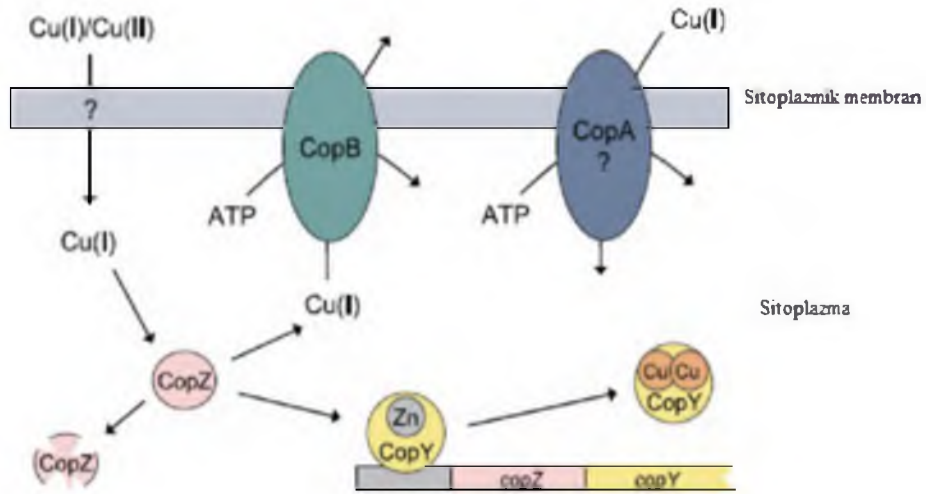


Şekil 1.1. *E.coli* 'de CopA bakır atım pompası [197]

Cop A bakır atım pompası ATP yardımıyla bakırın sitoplazmadan periplazmik boşluğa atılmasını sağlar. Multi bakır oksidaz (CueO) enzimi bakır(I) iyonlarını

periplazmik boşlukta okside etmektedir. Bu enzim ayrıca katekol sideroforların oksitlenmesi sonucunda bakırı pigmentlerine ayrılmaktadır [197].

Ek olarak çeşitli organizmalarda bakırın taşınmasında CopA (bakır alınımı ve bakterinin bakır ihtiyacını karşılar), CopB (bakırın dışarı atılması ve detoksifikasyonundan sorumludur), CopC ve CopD proteinlerinin ve P-tipi ATPazların (*Enterococcus hirae*'deki cop operonundan kodlanır) ilişkili olduğu bulunmuştur [198].



Şekil 1.2. *E. hirae*' de bakır homeostasisi [197]

Yüksek bakır konsantrasyonunda bakır hücreye bilinmeyen bir yolla girmektedir. Hücre içerisine giren  $\text{Cu}^+$  iyonları CopZ tarafından tutularak CopB' ye iletir ya da transkripsiyon reseptörü olan CopY ' ye iletilerek cop operonunda transkripsiyonu hızlandırır. CopY 'nin promotor bölgesine çinko iyonlarının bağlanmasıyla transkripsiyon baskılanır.  $\text{Zn}^{+2}$  yerine  $\text{Cu}^+$  bağlanması sonucunda transkripsiyon indüklenir ve DNA'ya bağlanamaz. Hücre içinde Cu fazla ise copZ bakır proteaz enzimi ile parçalanır. Cu'nun sınırlayıcı etmen olduğunda bakır CopA tarafından ATP harcanarak hücreden dışarı atılmaktadır [197].

*Pseudomonas* sp.'de bulunan bir operonda kodlanmış olan dört genin  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin periplazmik bağlayıcı özelliğinin kodları olduğu bulunmuştur. Bunlar; copA, copB, copC, copD'dir.  $\text{Cu}^{+2}$  dirençliliği; copA, copB ile copC, copD'nin özelliklerinin

toplaminin eklenmesi şartıyla sağlanmaktadır. copA ve copC proteinleri iç ve dış membranlar arasında ve copB ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, periplazmik bağlayıcı veya ekstrasellüler alıkoyma her ikisinden dolayı direnç hipotezini destekler görünmektedir [188].

Mikroorganizmalar aracılığıyla metallerin kompleksleşmesi iki yolla oluşur; (1) metaller hücre çeperi yüzeyinde cıvık tabakaya ya da hücre dışı matrikse spesifik olmayan bağla tutunabilir ya da (2) hücre içine alınabilir. Çalışmalar metal kompleksleşmesinin her iki tipinin de metal toksitesini ve mobilitesini azaltmak için kullanıldığını göstermektedir [199].

Mikroorganizmaların yüksek miktardaki toksik maddelerle başa çıkabilmek için, pekçok yol mevcuttur. Hücre yüzeyi ağır metalleri biriktirmekte veya hücre duvarının dışında jel benzeri bir yapı olan EPS, toksik maddelerin zararlı etkilerini azaltan kimyasal reaksiyonlar tarafından veya sınırlandırılmış difüzyon aracılığı ile toksik maddeleri engellemektedir. EPS, protein, karbonhidrat ve nükleik asit içeriğine bağlı olarak bulundurduğu karboksil, fosforil ve sülfat gruplarıyla metalleri bağlayıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle ortamda toksik metal artışına bağlı olarak, buna direnç göstermek isteyen bakteri daha fazla EPS üretmektedir [185]. Kılıç ve Dönmez [200], *P. aeruginosa*, *Micrococcus* sp. ve *Ochrobactrum* sp. türlerinin, ortamda Cr (VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak daha fazla EPS ürettiklerini saptamışlardır [200]. Aquino ve Stuckey [201] sisteme Cr<sup>+6</sup> verildikten sonra, EPS miktarında %30'a yakın, protein miktarında % 45'e yakın, karbonhidrat miktarında % 300'e yakın, DNA miktarında ise % 50'ye yakın artış gözlemişlerdir.

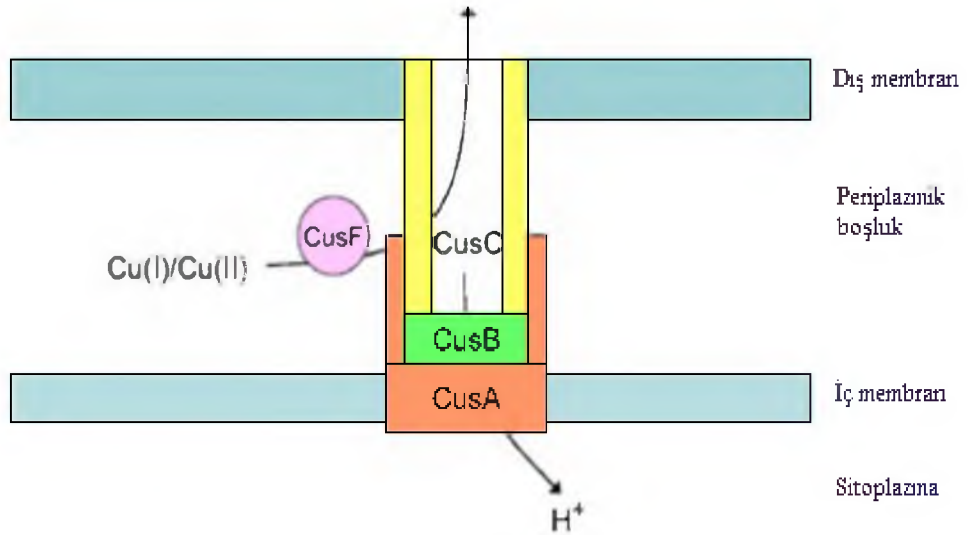
Kang ve arkadaşlarının [202] bir çalışmasında, *Pseudomonas aeruginosa* hücre yüzeyine Cr<sup>+3</sup> ve Cr<sup>+6</sup>,nin adsorpsiyonun incelemiştir. Bir gram-negatif bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın hücre duvarı analiz edilmiş ve peptidoglikan ve teikoik asit içerdiği ve bu oluşumlara bağlı olarak karboksil, fosforil, hidroksil ve amino fonksiyonel gruplarının bulunduğu saptanmıştır.



### 1.7.1.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır [203]. Metal direnci için özelleşmiş efflux pompaları ile yani hücreden dışarıya ağır metal iyonunun aktif salınımı ile gerçekleşir [204]. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı ya da ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [203]. Bakterilerdeki As, Cd, Cu dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir.

Cánovas ve arkadaşları [205] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun Ag, Cd, Zn ve Cr metallerine karşı atım sistemi ile direnç geliştirdiklerini incelemişlerdir. Cd ve Zn dirençliliklerinin ATPaz'ın katalizlediği atım mekanizması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Metal iyonlarının hücreden dışarı atılımı için proteinlerin rolleri vardır. *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun Cr atım sistemi için ChrA proteini, Ag ve Cu atım sistemi için CusC, CusB, CusA proteinleri, Cd ve Zn ATPaz bağımlı atım sistemi için de CadA2 proteinin sorumlu olduğunu göstermişlerdir [205]. *E.coli*'nin bakır atım mekanizması olan Cus sistemi Şekil 1.5.'de gösterilmektedir [197].

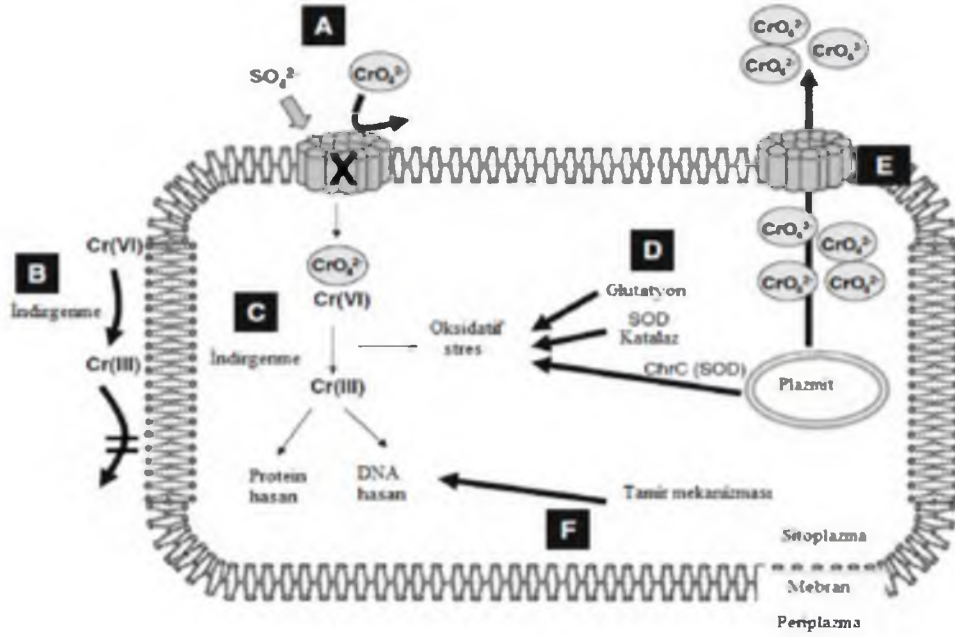


Şekil 1.3. *E.coli*'de Cus sistemi [197]

İç membranda Cus kompleksi olarak bulunan CusA, 12 integral taşıma proteinlerin iki spiral sarmal yaparak oluşturduğu CusB periplazmik proteinleri ve CusC 'nin üçlü bir dış membran proteini olarak oluşturduğu kanal vasıtasıyla periplazmik boşluktan membran dışına çıkarılmaktadır. CusF'nin periplazmik boşluk içerisinde Cu iyonlarını kendisine bağlayarak Cus sistemine taşınmasını sağlamaktadır [197].

ChrA proteini *Pseudomonas aeruginosa*'nın pUM505 plazmitinde ve *Cupriavidus metallidurans*'ın pMOL28 plazmitinde kodlanmıştır. ChrA proteini protonların hareket ettirici gücünü kullanarak kemoosmotik pompa gibi kromatların sitoplazmadan dışarı atımını sağlar [206].

Kroma dirençli çeşitli bakterilerde Cr dirençlilik mekanizmalarının ya plazmitler ya da kromozomal genler tarafından kodlanabileceği bildirilmiştir. Genellikle, plazmit genlerinde kodlanmış olan membran taşıyıcıları krom iyonlarını doğrudan hücre sitoplazmasından salınım vasıtasıyla uzaklaştırmaktadır. Öte yandan, bakteri kromozomları içinde kodlanmış olan direnç mekanizmaları ise; spesifik ya da spesifik olmayan Cr(VI) indirgeme ile ilgili stratejiler, serbest radikallerin giderimi, DNA hasarının giderimi, prosesin sülfür ya da demirle düzenlenmesidir [207].



**Şekil 1.4.** Kromatın bakteri hücrelerinde toksisitesi ve direnç mekanizmalarına göre taşınması [207]. Hasar ve direnç mekanizmaları sırasıyla ince ve kalın oklarla gösterilmiştir

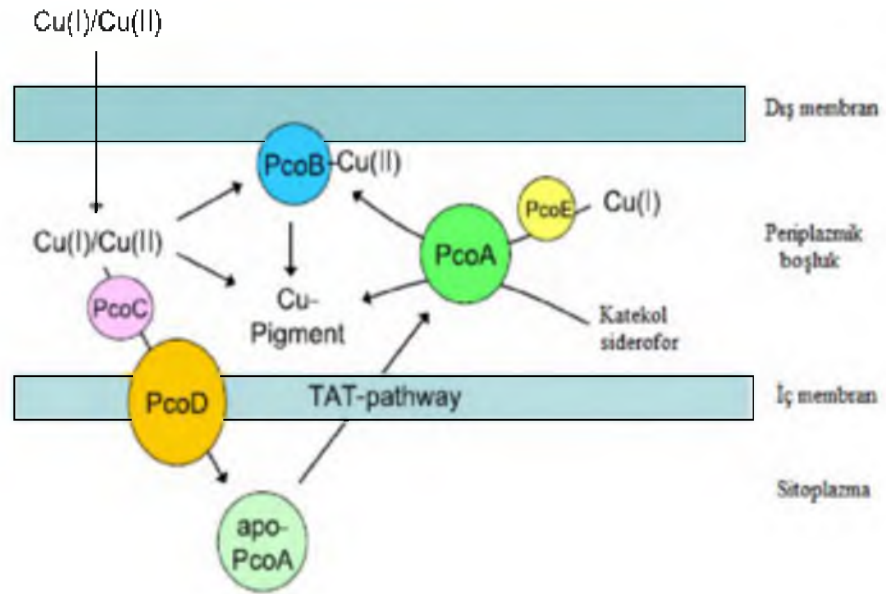
- (A) Kromat tarafından kullanılan kromozomda kodlanan sülfat alım yolu mutasyona uğradığında hücreye kromat girişi azalır.
- (B) Cr (VI)'ın ekstraselüler olarak Cr (III) dönüştürülmesi ile membrandan geçemez.
- (C) Cr (VI)'ın intraselüler olarak Cr (III) indirgenmesi oksidatif stres, DNA hasarı ve protein hasarına neden olabilir.
- (D) Detoksifiye enzimler oksidatif stres ve kromatın toksik etkilerini en aza indirerek korumaya katılmaktadır.
- (E) Plazmitte kodlanan taşıyıcılar ile içeri giren kromatlar hücreden dışarı atılabilir.
- (F) Cr türevleri tarafından oluşturulan DNA hasarları, DNA onarım sistemi ile onarılır .

### 1.1.7.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması

Metal ihtiva eden çevrelerdeki selektif baskılar, tüm toksik metallere karşı belli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır [195]. Ağır metal dirençlilik metabolizmasında rol alan proteinler, biyolojik membran boyunca ağır metal taşırlar. Bu taşıma sistemleri taşıma işini gerçekleştirmek için gereken enerjiyi ATP hidrolizi ile karşılayabilirler. Sitoplazmik membran boyunca proton gradiyentine sahip bakteride, bir protonun içeri geçişi bir metal katyonunun dışarı atılımı şeklinde gerçekleşebilir [208].

İntrasellüler ayırmada; toksik bazı metaller mikroorganizmalar tarafından üretilen sisteince zengin küçük proteinlere (metalloprotein) bağlanarak, sitoplazmada biriktirilmektedir. Bu sayede önemli hücre bileşenleri toksik metalin etkisinden korunmaktadır. Genellikle  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ ’ye karşı dirençlilikte bazı mikroorganizmalar bu yolu seçmektedir [204]. *Pseudomonas* türlerinde de sisteince zengin bir protein sentezlenmekte ve hücre içine giren toksik metaller bu proteinlere bağlanarak bakteri toksik metallere karşı direnç kazanmaktadır [26]. Prokaryotik metalotiyoneinler ilk olarak siyanaobakteri *Synechococcus* sp.’de tanımlanmıştır. Bu molekülün Cu, Cd ve Zn ile kompleks oluşturduğu ve yüksek oranda tiol içerdiği saptanmıştır. İlk olarak en iyi tanımlanan bakteriyel metalotiyoneinler *Synechococcus* 6301’den elde edilmiştir [209]. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas putida*’nın da metalloprotein ürettiği tespit edilmiştir [26].

*E. coli* ve *P. syringae*’de Pco/Cop sistemleri ile membran proteinleri tarafından bakır daha az zehirli forma dönüştürülmektedir [197]. (Şekil 1. 8.)



**Şekil 1.5.** *E. coli* ve *P. syringae* ‘de Pco/Cop sistemleri [197]

Cu periplazmik boşluğa bilinmeyen bir yolla girmektedir. Periplazmada, Cu iyonları PcoC ‘ye daha sonra PcoD proteinine bağlanarak bazen PcoA bakır oksidaz oluşturmak için kullanılabilirken bazen ise sitoplazmaya taşımada gerek

olmamaktadır. Periplazmada bulunan bakır PcoA oksidaz oluşturduğu katekol sideroforlar ya da dış membran proteinleri olan PcoB ve PcoE tarafından  $Cu^{+}$  'ın PcoA 'ya bağlanarak daha az toksik olan  $Cu^{+2}$  oksidasyonu sağlanarak detoksifiye edilmektedir [197].

#### 1.1.7.4. Ekstrasellüler Alınma

Glutasyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır [210]. Glutasyon  $Ag^{+1}$ ,  $Cu^{+1,+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Hg^{+2}$  gibi metallere karşı koruması için bir örnek teşkil etmektedir [211]. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak  $Cu^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$ 'den korumayı sağlayabilmektedir [94]. Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur [212]. Yapılan araştırmalar mayaların metalle zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutasyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutasyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'deki  $Ni^{+2}$  dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* fazla miktarda glutasyon üreterek  $Ni^{+2}$  absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Benzer bir mekanizmada  $Cu^{+2}$  dirençli mantarlarda görülmektedir [210].

#### 1.1.7.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu

Tarihin erken dönemlerinden beri mikroorganizmalar metaller ile birlikte var olmuşlardır. Metaller, pek çok enzimin aktif merkezlerinde yer almaktadır [213].

Bazı ağır metaller iz element olarak bulunmaktadırlar (çinko, bakır gibi). Bakterilerin büyümesi için gerekli olan bu metaller, yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bakteriler, ağır metallere karşı enzimatik detoksifikasyon mekanizmasını geliştirmişlerdir [214]. Detoksifikasyon mekanizması, genellikle ağır metallerin enzimatik olarak indirgenmesidir. Bu direnç mekanizmasını kodlayan genler bazen plazmitler üzerinde bazen de kromozomal DNA üzerinde olabilmektedir. Bu mekanizma ile *E. coli*, arsenat, arsenik ve antimona karşı çoklu

direnç gösterebilmektedir [215]. Tanımlanmış olan birçok bakteriyel ağır metal dirençliliği içinde, civa dirençliliği en iyi incelenmiş olanıdır. Hg dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik Hg<sup>+2</sup> formundan elementel ve daha az reaktif Hg<sup>0</sup> formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Bazı civaya dirençli bakteriler civaya geniş spektrumlu dirençli esas bileşiklere sahiplerdir [216].

Hg hücrede enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan tiollere bağlanarak inaktive olmaları nedeni ile toksik etkiye sahiptir. Bazı bakterilerde Hg<sup>+2</sup> dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı *mer* operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg<sup>+2</sup>'nin detoksifikasyonundan değil aynı zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [183, 211]. Hg'nin bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları transkripsiyon düzenlenmesini azaltmaktadırlar. Bu genler bir periplazmik bağlayıcı proteinin üretimini ve membran bağlantılı taşıma proteinlerini deşifrelemektedirler. Detoksifikasyon için etrafını çevreleyen ortamdan periplazmik bağlayıcı proteinler ve taşıma proteinleri aracılığı ile Hg<sup>+2</sup>'yi sitoplazmaya taşımaktadırlar [29].

#### **1.1.8. Çalışmanın Amacı**

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Cu ve Cr metallerine dirençli suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Cu ve Cr metallerine dirençli suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK (Minimal inhibisyon konsantrasyonu) değerleri belirlenmiş ve bu suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen bu suşlar morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Cu ve Cr metallerine dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit profili çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1. Nutrient Agar

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

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

##### 2.1.1.2. Nutrient Broth

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

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

#### 2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

##### 2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

## **2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler**

### **2.1.2.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

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

0.990 g glukoz, 0.394 g Tris, 0.372 g EDTA tartılarak 100 ml suyla (pH:8) tamamlanır.

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

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

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

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

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

242 g Tris, 37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O tartılarak 57.1 ml glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile tampon tamamlanır.

### **2.1.2.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

#### **2.1.2.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 ml)**

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



#### **2.1.2.2.2.2. %10'luk SDS Tamponu (100 ml)**

10 g SDS tartılarak 100 ml steril suda çözülmüştür.

#### **2.1.2.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 ml)**

0.0384 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılarak, 5 ml gliserol ve 100 µl, 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 ml oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 10 ml alınarak 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

#### **2.1.2.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 ml)**

20 g NaCl tartılarak, 100 ml steril su ile çözülmüştür.

#### **2.1.2.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 ml)**

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

#### **2.1.2.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu (100 ml)**

96 ml kloroform, 4 ml izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

#### **2.1.2.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu (100 ml)**

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

#### **2.1.2.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 ml)**

İzopropanol alkolden 100 ml alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.2.2.2.9. %70'lik Etanol (100 ml)**

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

#### **2.1.2.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 ml)**

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

#### **2.1.2.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 ml)**

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

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

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

6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8.7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartılıp 1000'er ml distile suda çözülür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH: 7.0'ye ayarlanır.

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

##### 2.1.2.2.4.1. Tris Tampon Solüsyonu: ( 10 mM Tris-HCl, pH: 8)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve HCl ile pH: 8.0'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

##### 2.1.2.2.4.2. Deterjan Solüsyonu: ( 11,1 mM Tris-HCl, Triton X-100, pH:7.6)

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

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

**Çizelge 2.1.** SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

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

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

**Çizelge 2.2.** SDS PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid % 0.8 bisakrilamid (100ml)	29.2 g akrilamid ve 0.8 gram bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100ml)	2 M Tris-HCl (pH = 8.8) 75 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 21 ml. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100ml)	1 M Tris-HCl (pH = 6.8) 50 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 46 ml. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 ml)	0.5 g amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 ml'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 M) 3 g, glisin (192 mM) 14,4 g, SDS (% 0.1) 1 g tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH =8.3
ÖrnekTamponu (5x) (10ml)	1 M Tris-HCL (pH = 6.8) 0.6 ml, %50 Gliserol 5 ml, %10 SDS 2 ml; 0.5 ml 2-merkaptotanol, %1 Bromfenol mavisi 1 ml; 0.9 ml distile su. Buzdolabında saklanır.

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

**Çizelge 2.3.** Ayırıcı jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	7.8 ml
Solüsyon B (Stok)	6 ml
Distile su	10.08 ml
Amonyum persülfat	79.2 µl
TEMED	15.6 µl

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

**Çizelge 2.4.** Dengeleyici jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	1.33 ml
Solüsyon C (Stok)	2 ml
Distile su	4.67 ml
Amonyum persülfat	27 µl
TEMED	6.6µl

#### 2.1.2.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

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

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri,  $41^{\circ} 30'$  Kuzey,  $36^{\circ} 05'$  Doğu koordinatları arasındadır ve 1150 km'den uzun su yatağı, 75.000 km<sup>2</sup> drenaj alanı ve yıllık ortalama 184,2 m<sup>3</sup>/s debisi ile Türkiye'nin en uzun nehri olup Kızılırmak Deltası'nı geçerek Karadeniz'e ulaşmaktadır [217].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu [217]

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ili'nde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [218].

**Çizelge 2.5. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları**

<b>Bölge Numarası</b>	<b>Bölge Adı</b>	<b>Bölge Koordinatları</b>
1	Kesikköprü Barajı	029-04-413 E, 049-34-799 N, 787 m t, 36535725 E, 359627 N
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	029-04-078 E, 049-36-668 N, 743 m t, 36536086 E, 4361301N
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	028-99-271 E, 049-40-651 N, 736 m t, 36533459 E, 4366292 N
4	Akkoşan Merkez Mevkii	028-98-818 E, 049-44-154 N, 732 m t, 36534293 E, 4369376 N
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	028-95-604 E, 049-51-726 N, 721 m t, 36534232 E, 4376815N
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	028-95-750 E, 049-54-635 N, 717 m t, 36535362 E, 4979196N
7	Sulubük - Kıyıbağı Mevkii	028- 95-224 E, 049-61-767 N, 721 m t, 36537396 E, 4385336N
8	Kapulukaya Barajı Girişi	028- 94- 621 E, 049- 67-384 N, 717 m t, 36538842 E, 4390239 N
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	028-93-959 E, 049-76-268 N, 709 m t, 36541376 E, 4397890 N
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	028-89-508 E, 049-81-299 N, 677 m t, 36539417 E, 4403641N
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	028-94-621 E, 049-87-349 N, 665 m t, 36539895 E, 4409369 N
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	028-77-731 E, 049-98-600 N, 656 m t, 36535629 E, 4422195 N

### **2.2.2. Örneklerin Toplanması**

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

### **2.2.3. Cu ve Cr'ye Dirençli Bakterilerin İzolasyonu**

Cu ve Cr ağır metallerine dirençli suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Cu ve Cr dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ağır metalleri içeren nutrient agar (NA) ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir.  $30^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Cu ve Cr dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

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

Cu ve Cr dirençli saf kültürler  $30^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilerek koloni morfolojisine ve hücre morfolojisi özelliklerine bakılmıştır. Suşların koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkan/yapışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojileri ise, gram boyamayla mikroskop (immersiyon yağıyla ve 100 büyütme objektifle) altında incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

### **2.2.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi**

Cu ve Cr ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  eklenerek saptanmıştır.  $30^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petrilerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki Cu ve Cr metali bulunan ortamlara ekilmiştir. 48



saat süre sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

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

Kırıkkale-Kızılırmak'tan Cu ve Cr dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiştir ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiş ve API 20 NE kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Bu sonuçlara göre suşlar tanımlanmıştır [219, 220].

#### **2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği**

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

Cu dirençli suşların, çoklu metal dirençlilik profillerini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda  $AgNO_3$ ,  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CrN_3O_9 \cdot 9H_2O$ ,  $FeCl_3$ ,  $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ ,  $LiCl$ ,  $MnSO_4$ ,  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $K(SbO)C_4H_4O_6$ ,  $SnCl \cdot 7H_2O$ ,  $Sr(NO_3)_2$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  metallerini içeren Nutrient agarlı besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan bu petriler, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan suşların ortama eklenen metale karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Cr dirençli suşlarda ise Cu dirençli suşlarda kullanılan metod uygulanmıştır [221].

Antibakteriyel hassasiyet testleri Mueller-Hinton agar (Difco) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [221]. Çalışmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve etki değerlikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Antibiyotik diskleri ve etki değerlikleri

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

### 2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

MIK değerleri belirlenen Cu ve Cr metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µl örnek alınarak, 100 ml NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Cu ve Cr metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Kültürler 30°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD 600 nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

### 2.2.9. Plazmit İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [222]. Plazmit izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  metallerin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. 30°C'de 24 saat inkübe edilen kültürlerden 1.5 ml alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1,5 ml kültür konularak işlem tekrarlanmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µl GTE (glukoz/ tris/ EDTA) ilâve edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200 µl, 0,2 N NaOH/ %1 SDS solüsyonun üzerine ilâve edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 150 µl, 3M potasyum asetat ilave edilmiştir ve karıştırılarak 5 dakika bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen solüsyonun üst kısmı toplama tüpüne alınarak pellet kısmı atılmıştır. %100'lük etanolden 900 µl tüplere konulmuş ve -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Gece sonunda beklemiş olan solüsyon 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine %70'lik etanolden 1 ml eklenerek 15 dakika 13.100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz atılmıştır ve pellet üzerine 20 µl su ve 5 µl boya ilâve edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

### 2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzole edilen Cu ve Cr dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [223] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. 15 ml'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 5.7 ml TE tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz K ve RNAaz eklenerek 60 dakika 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NaCl tamponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Kloroform/ izoamil alkol solüsyonu ekleyerek 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/ kloroform/ izoamil alkol tamponu eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 ml %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmıştır ve pellet kurutularak 200 µL TE tamponu eklenmiştir ve -20°C'de saklanmıştır.

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

%1.5'lük jel hazırlamak için 1.5 g agaroz 100 ml 10x TAE tamponu ile çözüldükten sonra ısıtılarak eritilmiştir. Çözelti yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulup, jel kutusuna dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice ayrılmıştır. 20-25 µL'lik miktarlarda DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet ile örnek çukurlarına yüklenmiştir. Separe edilen plazmitlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacı ile jeldeki çukurlardan birine 3 µL marker DNA (Sigma Lambda/Hind III ready to use solution) yüklenmiştir. Jel agaroz aparatına yerleştirilmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu konulmuştur. 100 V/cm<sup>2</sup> voltaj uygulanarak 1.5 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır. Separasyon zamanını sonlandırmak için, yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin jelde kastettiği mesafe bize yol gösterir.

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

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromid boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası jeli 1 mM MgSO<sub>4</sub> solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Jel daha sonra U.V. transillüminatör üzerine konularak fotoğrafları çekilmiştir [224].

### **2.12.13. Plazmit DNA Moleküler Ağırlık Belirlenmesi**

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

### **2.2.14. Total Protein İzolasyonu**

Cu ve Cr metallerine dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [225] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve CrN<sub>3</sub>O<sub>9</sub>.9H<sub>2</sub>O metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 5 ml steril su eklenerek 2 kez yıka işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelletler üzerine 2 ml fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm de 2 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz tüplere transfer edilmiştir. 75 µl örnek üzerine 75 µl örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

### **2.2.15. Dış Membran Protein İzolasyonu**

Dış membran proteinleri Achtman ve arkadaşları [226] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Dış membran proteinleri izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  metallinin bulunduğu NB besiyerine ekimleri yapılmıştır. Kùltürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 10 ml, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır.

Parçalanmış hücreler 3000 rpm'de, 20 dakika, 4°C'de santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Süpernatant temiz tüplere alınarak 20.000 rpm, 60 dakika, 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µl steril su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örneklere 200 µl Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20°C'de bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de, 90 dakika, 2000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 50 µl örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

### **2.2.16. Dış Membran ve Total Protein Bantları Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Dış membran ve total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Page Ruler Prestained Protein Ladder 170 kDa referans alınarak standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

Dış membran ve total protein Laemmli'ye [227] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

#### **2.2.17.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı**

16,7 ml Akrlamid/Bis Akrlamid (%30'luk), 19,8 ml distile su, 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,6), 500 ml %10'luk APS (amonyum persulfat), 500 ml %10'luk SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 ml TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

#### **2.2.17.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı**

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

#### **2.2.17.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi**

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

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

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitlime çözeltili içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltilisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [228]. Jellerin fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

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

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar, jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 2200 Pro) Carestream Molecular Imaging (MI) Software Standart Edition (SE) programı kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir.

Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [229].



### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Krom ve Bakıra Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 istasyondan alınan su örneklerinden Cu ve Cr'a dirençli suşlar izole edilmiştir. Cu 'ya dirençli 34 suş ve Cr'a dirençli 21 suş izole edilerek MİK değerleri belirlenmiştir. MİK değeri  $\text{CrN}_3\text{O} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  için 1100 mg/L olan bir suş ile  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  için ise 450 mg/L olan bir suş ileri çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir. Cr için MİK değeri 1100 mg/L olan suş 7. bölgeden izole edildiği için Cr07 olarak adlandırılmıştır. Cu için MİK değeri 450 mg/L olan suş 12. bölgeden izole edildiği için Cu12 olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 3.1. Bakır ve kroma dirençli suşların bölgelere göre dağılımı

Bölgeler Ağır Metaller	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Cu	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Cr	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(-), pozitif; (+), negatif

#### 3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi Cu12 ve Cr07 olarak adlandırılan suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Suşların optik özellik bakımından saydam olduğu ve Cu12 susunun sarı, ve Cr07 suşunun beyaz renkte pigmente sahip olduğu belirlenmiştir. Cu12 ve Cr 07 suşlarının hücre morfolojilerini belirlemek için Gram boyama yapılmış sırasıyla Gr (-) ve Gr (+) olarak belirlenmiştir. Hücre şekilleri incelendiğinde ise Cu12 suşunun basil, Cr07 suşunun ise kok olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.2.** Bakır ve kroma dirençli suşların biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal testler	Ağır Metale Dirençli Suşlar	
	Cu12	Cr07
Şekil	Basil	Kok
Gram Reaksiyon	(-)	(+)
Akışkanlık	Yapışkan	Akışkan
Optik Özellikler	Saydam	Saydam
Pigment	Sarı	Beyaz
Katalaz	-	-
Üre (URE)	-	+
Malonat(MLT)	+	+
Arabinoz(ARA)	-	-
Mannitol(MAN)	-	+
Adonitol (ADO)	-	+
Glukoz (GLU)	-	+
ArjininHidrolaz	+	-
Ksiloz(XYL)	+	+
Arjinin (ARG)	+	-
Maltoz	-	+
Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S)	-	+
Eskülin (ESC)	-	-
Sorbitol (SOR)	-	+
Laktoz %10 (LAC)	-	+
Sükroz (SUC)	+	+
Alkalin Fosfataz	+	+
Oksidaz (OXI)	+	-
<b>Tanımlanan Türler</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>

Suşların biyokimyasal testleri sonucu her iki suşunda malonat, ksiloz, sükroz, alkalin fosfataz testlerine pozitif, katalaz, arabinoz, eskülin testlerine ise negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Cu12 ve Cr07 suşları yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucu sırasıyla *Pseudomonas putida* ve *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır.

### 3.3. İzole Edilen Bakterlerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Bakır dirençli *Pseudomonas putida* ve krom dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

#### 3.3.1. Bakır Dirençli *Pseudomonas putida* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

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

**Çizelge 3.3.** Cu dirençli *Pseudomonas putida* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

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

R,dirençli; S,duyarlı

Cu dirençli *Pseudomonas putida* suşunun Çizelge 3.4’de gösterildiği gibi ampicilin, aztreonam, bacitrasin, gentamisin, eritromisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Cu dirençli *Pseudomonas putida* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

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

R,dirençli; S, duyarlı

### 3.3.2. Krom Dirençli *Enterococcus faecalis* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun Şekil 3.5'te gösterildiği gibi Cr metalinden başka Ag metaline çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer metallere ise metallerine karşı ise kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.5.** Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

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

R, dirençli; S, duyarlı

Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun Çizelge 3.6' de gösterildiği gibi amikasin, ampisilin, aztreonam, siprofloksasin, gentamisin, netilsimin ve tobramisin antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

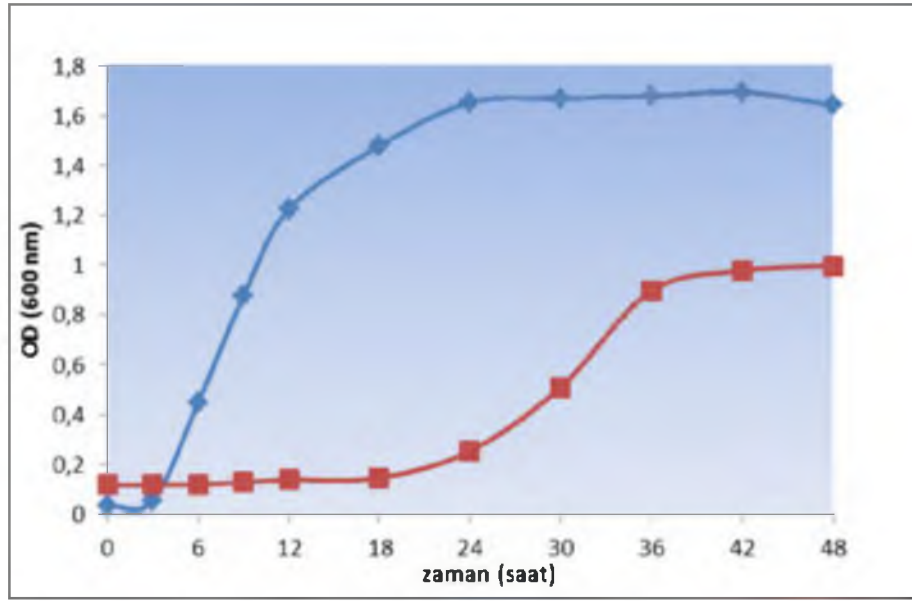
<b>Antibiyotikler (µg/disk)</b>	<b>Dirençlilik</b>
Amikacin (30)	R
Amoxycillin/CA (20/10)	S
Ampicilin (10)	R
Aztreonam (30)	R
Bacitracin (10)	S
Cefepime (5)	S
Ceftazidime (30)	S
Ciprofloxacın (5)	R
Chloramphenicol (30)	S
Gentamicin (10)	R
Erythromycin (15)	S
Imipenem (10)	S
Netilcimin (30)	R
Oxacillin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

R,dirençli; S, duyarlı

### 3.4. Bakterilerin Üreme Eğrileri

#### 3.4.1. Bakır Dirençli *Pseudomonas putida* Suşunun Üreme Eğrisi

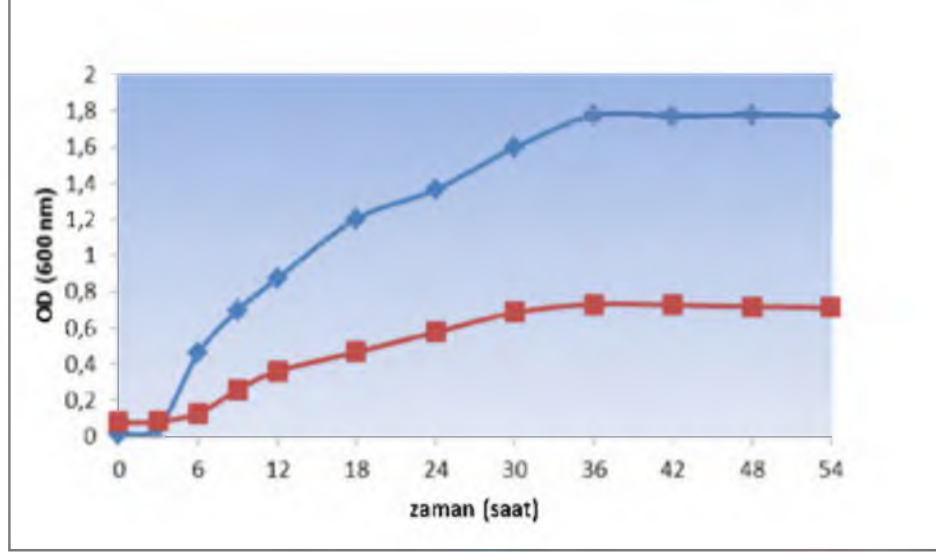
*Pseudomonas putida* suşunun bakır içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrileri Şekil 3.1.'de verilmiştir. Bakır içermeyen ortamdaki bakterilerin kısa sürede logaritmik artış fazına geçtiği ancak bakır içeren ortamdaki bakterilerin ise 21 saatlik gecikme ile bu faza geçtiği görülmüştür.



Şekil 3.1. *Pseudomonas putida* suşunun (—◆—) bakır içermeyen ve (—■—) bakır içeren ortamdaki üreme eğrileri

### 3.4.2. Krom Dirençli *Enterococcus faecalis* Suşunun Üreme Eğrisi

*Enterococcus faecalis* suşunun krom içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrileri Şekil 3.2. de verilmiştir. Bakterinin krom içermeyen ortamda içeren ortama göre iki kat kadar yüksek OD göstermiştir.



Şekil 3.2. *Enreococcus faecalis* suşunun (—◆—) krom içermeyen ve (—■—) krom içeren ortamdaki üreme eğrileri

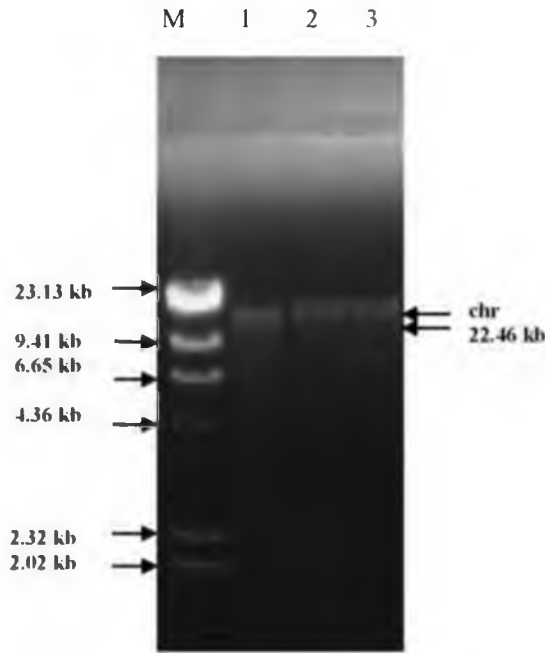
### 3.5. Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Profilleri

Bakır ve krom dirençli suşların metal dirençliliği ile bu suşların plazmit içerikleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit ve kromozomal DNA izolasyonu çalışmaları yapılmıştır.



### 3.5.1. Bakır Dirençli *Pseudomonas putida* Suşunun Plazmit ve Kromozomal DNA Profili

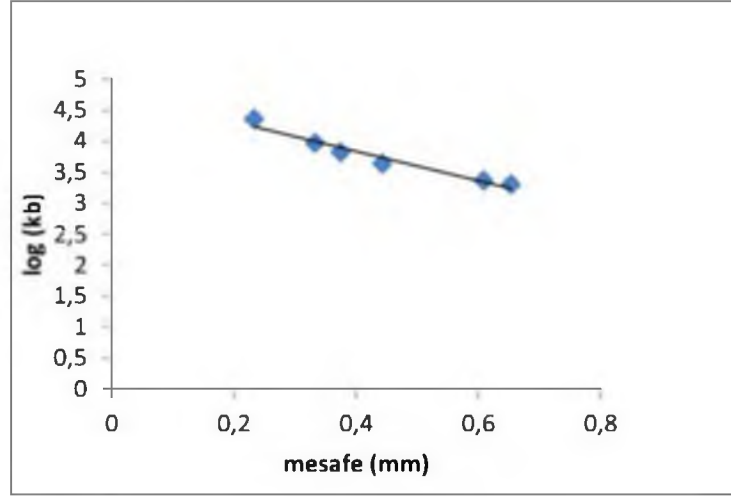
Cu dirençli *Pseudomonas putida* suşunun metal dirençliliği ile plazmit DNA arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamda üretilen bakterilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Şekil 3.3.'te *Pseudomonas putida* suşunun plazmit ve kromozomal DNA profili gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** *Pseudomonas putida* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu;

M; marker ( $\lambda$  DNA HindIII), 1; bakır içermeyen 2 ;bakır içeren ortam,  
3; chr, kromozomal DNA

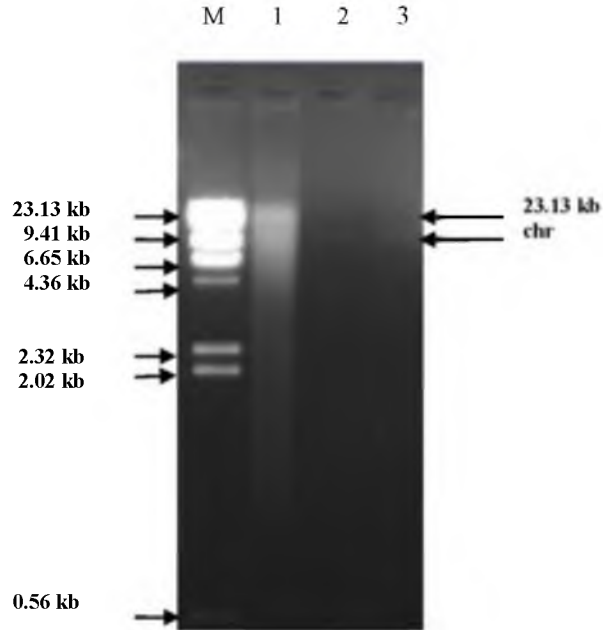
Metal içermeyen ortamda bulunan ve moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmitin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla marker referans alınarak jelin standart eğrisi çizilmiş (Şekil 3.4) ve plazmitin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Metal içermeyen ortam bulunan plazmitin molekül ağırlığı 22.46 kb olarak tespit edilmiştir. Metal içeren ortamda ise herhangi bir plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu sonuçlar ışığında *Pseudomonas putida* suşunda bakır dirençliliğinin kromozomal DNA tarafından kodlandığı belirlenmiştir.



**Şekil 3.4.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### 3.5.2. Krom Dirençli *Enterococcus faecalis* Plazmit ve Kromozomal DNA Profili

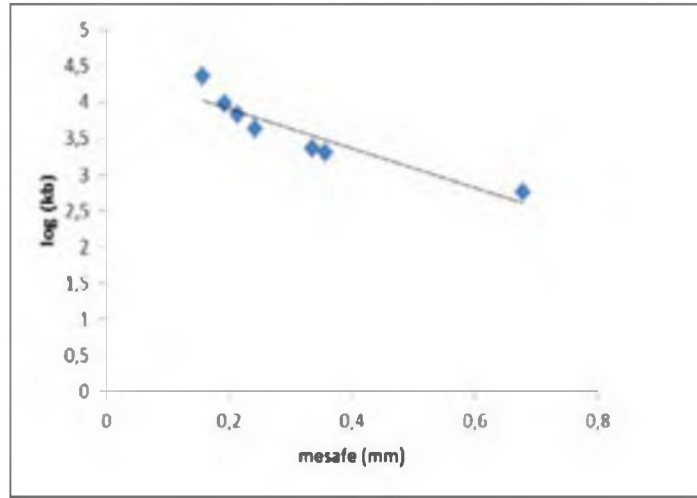
Krom dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun metal dirençliliği ile plazmit DNA arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamda üretilen bakterilerden plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 3.5.'te *Enterococcus faecalis* suşunun plazmit ve kromozomal DNA profili gösterilmiştir



**Şekil 3.5.** *Enterococcus faecalis* suşunun plazmit ve kromozomal DNA profili;

M; marker (Lambda DNA HindIII), 1; krom içermeyen , 2; krom içeren ortam, 3; chr:kromozomal DNA

Metalsiz ortamda bulunan plazmitlerin molekül ağırlıklarını belirlemek amacıyla marker referans alınarak jelin standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.6) ve moleküler ağırlıkları bilinmeyen plazmitlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Metal içermeyen ortamda bulunan plazmitin moleküler ağırlığı 23.13 kb olarak belirlenmiştir. Metal içeren ortamda ise herhangi bir plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Enterococcus faecalis* suşunun krom direnç genlerinin kromozom üzerinde olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.6. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

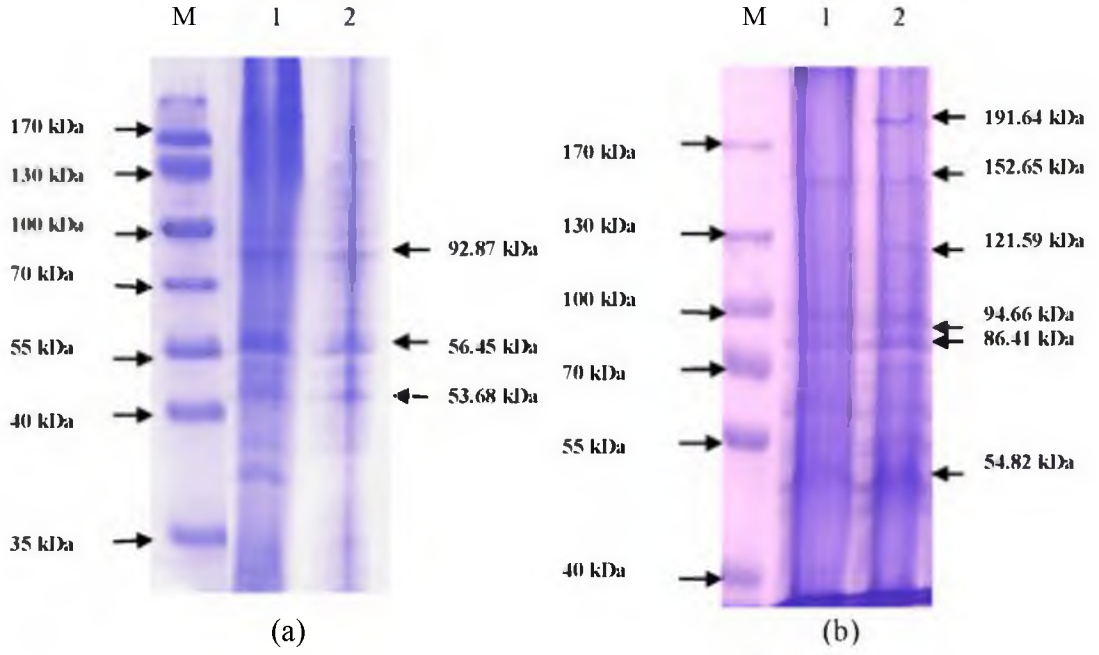
### 3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili

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

#### 3.6.1. Bakır Dirençli *Pseudomonas putida* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profili

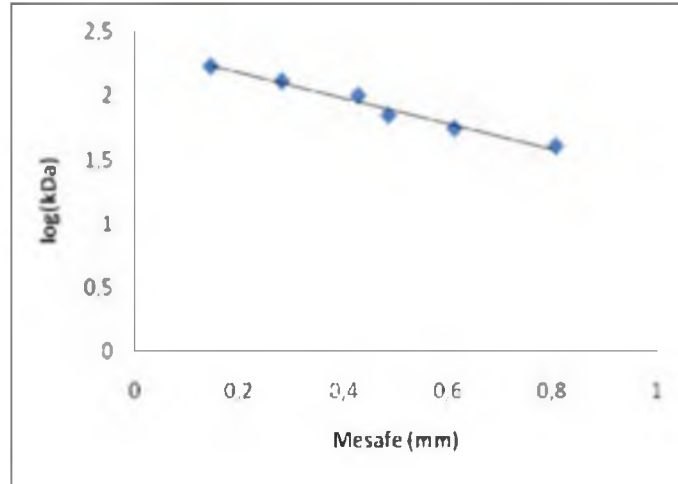
Cu dirençli *Pseudomonas putida* suşunun metal içeren ve içermeyen ortamdan dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir (Şekil 3.7). Moleküler ağırlıkları

bilinmeyen protein bandlarının moleküler ağırlıkları her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile belirlenmiştir (Şekil 3.8).



**Şekil 3.7.** *Pseudomonas putida* suşunun dış membran (a) ve total (b) proteini;

M; marker Page Ruler Prestained Protein Ladder 170 kDa  
1. bakır içermeyen, 2. bakır içeren ortam



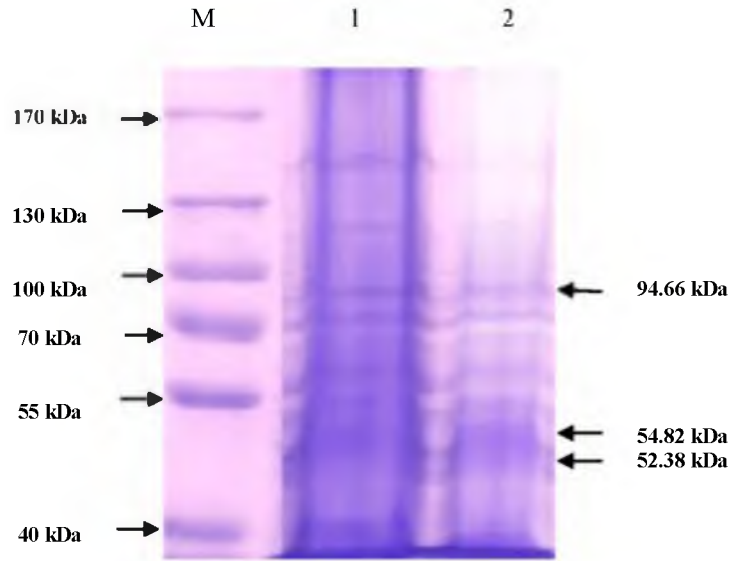
**Şekil 3.8.** Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

*Pseudomonas putida* suşunun bakır içeren ortamdaki dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. 92.87,56.45 ve 53.68 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunun 3.5, 2.2 ve 1.5 kat azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.7a)

Bakır içeren ortamda 152.65, 121.59, 94.66, 86.41 ve 54.82 kDa boyutlarındaki protein bantlarının ekspresyonlarını sırasıyla 4.7, 8.3, 2.9 , 1.4 ve 1.8 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.7b). Ayrıca total proteinde metal içeren ortamda diğer proteinlerden farklı olarak 191.64 kDa boyutunda bir proteinin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda total proteinlerin bakır dirençliliğinde daha etkin olduğu belirlenmiştir.

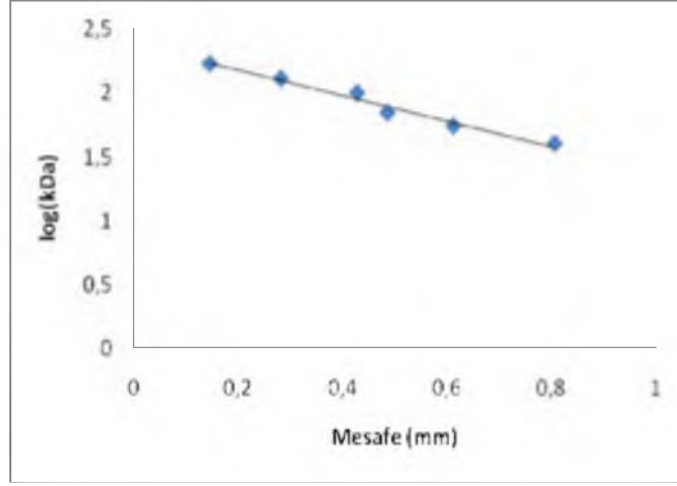
### 3.6.2. Krom Dirençli *Enterococcus faecalis* Suşunun Total Protein Profili

Cr dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun metal içeren ve içermeyen ortamdaki total protein profili belirlenmiştir, (Şekil 3.9). Moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları jel için elde edilen standart eğri ile belirlenmiştir (Şekil 3.10).



**Şekil 3.9.** *Enterococcus faecalis* suşunun dış membran (a) ve total (b) proteini;

M; marker Page Ruler Prestained Protein Ladder 170 kDa  
1; krom içermeyen, 2; krom içeren ortam



**Şekil 3.10.** Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

*Enterococcus faecalis* suşunun krom içeren 94.66, 54.82 ve 52.38 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonlarının sırasıyla 3.9, 1.7 ve 3 kat artış gösterdiği ve krom dirençliliğinde etkin oldukları belirlenmiştir.

#### 4. TARTIŞMA - SONUÇ

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenmiş olan istasyonlardan bakıra dirençli olan suş 12. istasyon olarak numaralandırılan İrmak Mevkii – Kızılırmak İl Sınırı Çıkış bölgesinden izole edilmiş ve MİK değeri 450 mg/L (1.8 mM) olarak belirlenmiştir. Bakıra dirençli suşun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak *Pseudomonas putida* olarak tanımlanmıştır. Kroma dirençli suş ise 7.istasyonun bulunduğu bölge olan Sulubük - Kıyıbaşı Mevkii'nden izole edilmiş ve MİK değeri 1100 mg/L (2.75mM) olarak belirlenmiştir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınan kroma dirençli suş *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır.

*E. faecalis* suşunun; Cr içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi çizilmiş ve bu suşun Cr içermeyen ortamda daha fazla üreme gösterdiği belirlenmiştir. Su kirliliği çalışmalarında, *Enterococcus* cinsinin varlığı kanalizasyon sularından kaynaklanan kirliliğin net bir göstergesidir. Enterokoklar çok tehlikeli bakteri olmamasına rağmen, kolayca tespit edilebilir; yaygın olarak kirli su tüketen insanlar arasında dağılır ve sıklıkla hastane enfeksiyonu ile izole edilir. Enterokokların en önemli özelliği hem kimyasallara, özellikle antibiyotiklere hem de ağır metallerle olan direncidir [230].

*P. putida* suşunun Cu içeren ve içermeyen ortamlardaki üreme eğrileri çizilmiş ve bu suşun Cu içermeyen ortamda kısa sürede logaritmik artış fazına geçtiği belirlenmiştir. Metal içeren ortamda bulunan bakterilerin ise 21 saatlik bir adaptasyon fazından sonra logaritmik artış fazına geçtiği görülmüştür. USEPA [231] tarafından yapılan çalışmada, doğal ve endüstriyel kaynaklardan Cu ve Cd başta olmak üzere su ve toprakları kirleten ağır metallerin çevreye yayılmasının *P. putida* suşu üzerine etkisi incelenmiştir. Cu, hücresel fonksiyonlarda görev alan enzimlerde kofaktör olduğu için önemliyken, Cd'un belli bir temel fonksiyonu olmamasından dolayı, hem *P. putida* üzerinde, hem de çevre kirliliğinde risk oluşturduğu bilinmektedir.

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin metal iyonlarını tolere etme yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın Hg, Cu, Cr ve Cd'ye karşı *B. thuringiensis*'den daha dirençli olduğu gösterilmiştir [232].

Ünaldı ve arkadaşları tarafından [233] yapılan bir çalışmada bir *Pseudomonas* sp.'nin kadmiyum MİK değeri 5 mM olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bütün izolatlar krom'a (MİK değerleri 1-1.7 mM arasında) çok düşük dirençlilik göstermiştir. Suşların %32'si 6mM Cu'ya, %14'ü 9mM Ni'e, %28'i 9 mM Cd'ye ve %42'si 1.7mM Cr'ye tolerans göstermiştir [233]. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmada Cr dirençli *E. faecalis* için belirlenen 1100 mg/L (2.75 mM) olan MİK değerinin yüksek oluşu dikkat çekicidir.

Roane ve Kellog [234] yaptıkları çalışmada ağır metal kontaminasyonu bulunan topraktan izole edilmiş dirençli *Pseudomonas* sp. suşunda Cd için MİK değerini 1,2 mM tespit etmişlerdir [234]. Ayrıca Schmidt ve Schlegel [235] tarafından yapılan benzer bir çalışmada Ni'ye dirençli bakteriler rapor edilmiş, bir galvanizasyon tankından izole edilen *Alcaligenes xylosoxidans*'ın Cu (1 mM), Cd (1 mM), Zn (10 mM), Co (20 mM), Ni (40 mM)'in yüksek konsantrasyonlarını tolere edebildiği belirlenmiştir.

Rajbanshi'nin [236] yaptığı çalışmada *Pseudomonas* sp.'nin Cu'ya 300 µg/ml, Co'ya 150 µg/ml konsantrasyonda dirençli olduğu belirlenmiştir [236]. Singh ve arkadaşları tarafından [237], endüstriyel kirliliğin etkin olduğu Hindistan'ın Paonta Sahib H. P. bölgesinde ağır metallerle dirençli sekiz *Pseudomonas* sp. suşu izole edilmiş, bu suşların antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış ve izole edilen suşların dirençlilik profilleri belirlenmiştir. En fazla dirençliliğin tetracycline antibiyotiğine en az dirençliliğin ise meropenem, bacitracin, amikacin antibiyotiklerine olduğu belirlenmiştir.

Abosereh ve arkadaşları [238], *Pseudomonas* suşlarında çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini çıkarmışlardır. Ag dirençli olan suşların, Cu, Ni, Fe, Hg, Zn, Cd ve Pb metallerine de ortak direnç gösterdikleri saptanmış, ve Ag dirençli *Pseudomonas* suşlarının, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline ve ampicillin



antibiyotiklerine de ortak direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise Cu direçli *P. putida* suşunun Ag, Ni, Zn metallerine çoklu direnç göstermesi önceki yapılmış olan çalışmaları destekler niteliktedir.

Matyar ve arkadaşlarının [239] İskenderun Körfezi'nde yapmış olduğu çalışma incelendiğinde, *Aeromonas* sp. izolatlarının yüksek oranda sefazolin ve trimetofrin-sülfamethaksol'e (%66,6), *Pseudomonas* spp. izolatlarının ise nitrofrantoin (%86,2), sefazolin (%84,8) ve seforoksim'e (%71,7) karşı direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *Aeromonas* sp. izolatlarının %98,3'ünün, *Pseudomonas* sp. izolatlarının ise %75,4'ünün Cu'ya karşı direnç gösterdiği saptanmıştır.

Hassen ve arkadaşları [240] *P. aeruginosa* suşlarına karşı Cr, Cu, Zn, Co ve Hg metallerinin toksik etkilerini araştırmışlar ve bu metallerin toksik etki yapan konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada suşların Cr, Cu, Zn ve Co metallerinin 1 mmol L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda inhibe oldukları, Hg metalinin ise 0,1 mmol L<sup>-1</sup> konsantrasyonunun toksik etkisi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar Cu ve Cr'nin bakteriler tarafından en iyi tolere edilebilen metaller olduğunu bildirmişlerdir [240]. Cu ve Zn bakteri gelişiminde temel metallerdir; ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterirler [241]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* cinsine ait bakterilerin Cr ve Pb'ye dirençli, Ag'ye ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir [242]. Gülcan [243] tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre, çalışmada kullanılan ağır metaller içerisinde *Pseudomonas* suşlarına karşı en toksik metalin Co olduğu bulunmuştur. Co'nun düşük konsantrasyonda dahi bakteriler üzerine etkili olduğu görülmüştür. Literatür bilgileri ile kıyaslandığında özellikle Co'nun *Pseudomonas*'ın üzerine toksik etkisinin varlığı paralellik göstermiştir.

Deredjian ve arkadaşlarının [244] yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa*'nın farklı ortamda yaşayan suşları arasında metal dirençliliği profilleri bakımından farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Çevrede yaşayan suşların 20 mM Zn<sup>+2</sup>, 0.5 mM Cu<sup>+2</sup>, 1.25 mM Cd<sup>+2</sup>, 10 µM Hg<sup>+2</sup> varlığında metallerin varlığında büyüme gösterdiği belirlenmiştir. Hastaneden elde edilen suşların Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup>'nin aynı konsantrasyonları ile büyüme gösterdiği, ancak bazı türlerin Cu<sup>+2</sup>'nin yüksek

konsantrasyonda olduğu ortamlara da direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada Cu dirençli *P. putida* suşunun MİK değeri diğer çalışmalarda kıyaslandığında, bulduğumuz değerin üzerinde ve altında değerler bulunmuştur.

Gülcan'ın [243] yaptığı çalışmaya göre *P. aeruginosa* üzerine en az toksik etkiyi Mn göstermiştir. *P.aeruginosa* 'nın 10-500 mmol L<sup>-1</sup> arasındaki Mn konsantrasyonlarına karşı Zn'den daha dayanıklı olduğu görölmüştür. *P.aeruginosa* Pb'nin 10 mmol L<sup>-1</sup>'lik konsantrasyonu daha az toksik etki gösterirken, aynı metalin 500 mmol L<sup>-1</sup>'lik konsantrasyonu Co'nun inhibisyon zonuna yaklaşık bir zon oluşturmuştur.

Miller ve arkadaşlarının [245] yaptığı çalışmada, 1, 5 ve 10 mg L<sup>-1</sup> Cu içeren ortamda *P. putida*'nın üremesi üzerine herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, 100 mgL<sup>-1</sup> Cu'nun ise ortamda bulunmasının büyüme durdurduğu belirlenmiştir. Aynı araştırıcılar tarafından *P. putida*'nın 1 ve 5 mg L<sup>-1</sup> Cd'ye maruz bırakıldığı zaman büyümede gecikme görölmediği de belirlenmiştir. Ancak, 10mgL<sup>-1</sup> Cd'ye maruz kalan hücrelerin büyümesindeki durağanlığın 6 ve 12 saat arasında süreklilik gösterdiği belirlenmiştir. Cu dirençli *P. putida* suşu için belirlenen MİK değerin yüksek olması bu suşun Kızılırmak'ta uzun süreli Cu stresine maruz kaldığını düşündürmektedir. Ağır metallerin çevrede birikimleri, bakterilerde bunlara karşı direnç gelişimine ve giderek dirençli klonların seleksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan araştırmalarla çoğunluğu çevresel bakteriler olmak üzere birçok bakteri türünde ağır metal direncinin yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir.

Zolgharnein ve arkadaşları [85], Basra körfezinden izole ettikleri *P. putida* suşlarının Cd, Cu, Pb ve Zn metallerine dirençli olduklarını belirtmişlerdir [85]. Leedjarv ve arkadaşları [214], *P. putida* KT2440 suşunda çoklu metal direnci üzerinde çalışmaları yapmışlar, suşun ayrı ayrı Zn, Cd, Pb, Co ve Ni metallerinin bulunduğu ortamda inkübe etmişler ve suşun en çok direnci Zn 'ye ve en az direnci de Cd metaline karşı gösterdiğini saptamışlardır.

Saxena ve Srivastava [246] tarafından yapılan çalışmada bakır madenleri ergitme tesisinin tahliye yerinden 1mM kadar Cu'a dirençli *P. putida* izole edilmiştir [246]. Gülcan [243] tarafından yapılan çalışmada *P. putida* suşları üzerine en toksik metal

Co, toksik etkisi en az olan metal ise Mn olarak tespit edilmiştir. *P. putida* için 25 mmol L<sup>-1</sup>'lik Pb konsantrasyonu diğer metallere göre daha az toksik etkiye sahip iken 300-500 mmol/L'lik Pb konsantrasyonu en toksik metal olarak belirlenmiştir. *P. putida*'nın diğer *Pseudomonas* suşlarına göre yüksek konsantrasyondaki metal iyonlarına karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Zhang ve arkadaşları [247] denizden izole ettikleri *P. putida* suşunun 280 µM HgCl<sub>2</sub>'ye dirençli olduğunu ve ayrıca CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub> ve ZnSO<sub>4</sub> metallerine de dirençli olduğunu bulmuşlardır. *P. putida* suşunun antibiyotiklerden ampisilin, kanamisin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençli olduğu da görülmüştür [247]. Çoklu metal dirençliliği gösteren *P. putida* S4 suşunun bakır direnci indüklenebilen atım mekanizmasına dayanmaktadır. *E.coli*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas* sp. ve *Xanthomonas campestris* gibi bakterilerin de bakıra dirençli olduğu kanıtlanmıştır [248].

Gülcan'ın [243] yaptığı çalışmada *P. stutzeri* suşları üzerine en etkili metal Co olarak belirlenmiştir. *P. stutzeri* suşları için artan Pb konsantrasyonlarının, Co'dan daha toksik bir metal olduğu bulunmuştur.

Gülcan [243] yaptığı çalışmada *P. mendocina* suşu üzerine Mn'nin daha az etki ettiği belirlenmiştir. 300-500 mmol/L'lik metal konsantrasyonları kullanıldığında genel olarak *Pseudomonas* suşları üzerine Co, Cr ve Pb toksik etki gösterirken *P. mendocina* suşu üzerine Zn ve Pb aynı derecede, Cr ise daha yüksek toksisite göstermiştir.

Akkan [250] yaptığı çalışmada İskenderun Körfezi'nin orta noktası ve balık üretim çiftliklerinin bulunduğu bölgedeki *P. luteola* izolatlarının tüm ağır metallere karşı %100 dirençli olduğunu belirlemişken, Organize sanayi bölgesinde ise Cu (%73) hariç diğer ağır metallere karşı %100 direnç tespit etmiştir.

Yaptığımız tez çalışmasında *P. putida*'nın Cu'ın yanında Al (300 mg/L<sup>-1</sup>), Li (5000 mg/L<sup>-1</sup>), Ag (8 mg L<sup>-1</sup>), Ni (395 mg/L<sup>-1</sup>), Zn ( 825 mg/L<sup>-1</sup>) metallerine de dirençli olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiklerden ise aztreonam, gentamisin, bacitrasin,

eritromisin, sefalotin, pefloksasin, ticarsillin ve vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir.

Laplace ve arkadaşları [251] kamuya açık alandan izole ettikleri *E. faecalis* izolatının bulunduğu ortama 0.05 µg mL<sup>-1</sup>'den 50 µg mL<sup>-1</sup>'ye kadar değişen konsantrasyonlarda Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> ağır metallerini eklemişler ve her bir metal için MİK değeri belirlemiştir. Cd, Cu, Mn ve Pb için MİK değerini 50 µg mL<sup>-1</sup> olarak bulurlarken, Hg için ise 5 µg mL<sup>-1</sup> olarak belirlemiştir.

Matyar ve Dinçer [221] İskenderun Körfezi kıyı şeridi boyunca farklı noktalardan steril bakteriyolojik su numune şişesi kullanarak deniz yüzeyinden 20 cm aşağıdan deniz suyu örnekleri almışlardır. Bu çalışmada Akdeniz' den izole ettikleri 158 adet *E. faecalis* bakteri izolatları için 12.5 µg mL<sup>-1</sup>'den 3200 µg mL<sup>-1</sup>'ye kadar değişen konsantrasyonlarda Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> ağır metallerini ihtiva eden Mueller-Hinton agar kullanarak MİK değerlerini belirlemiştir. Antibiyotik dirençliliği çalışmalarında yüksek antibiyotik dirençliliğini gentamisin (%98.7), siproflaksin (%77.8), imipenem (%77.2) ve levofloksasin (%72.8) karşı bulmuşlar, en az dirençliliği ise vankomisin (%3.2), minosiklin (%13.3) ve kinopristin-dalfopristine (%13.3) karşı bulunmuşlardır. Linezolide karşı ise hiçbir izolatın dirençlilik göstermediğini tespit etmişlerdir.

Nakipoğlu ve arkadaşları [252] İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan hastalardan alınan dışkı veya rektal sürüntü örneklerinden izole edilen ve glikopeptidlere duyarlılıkları saptanan 39 adet *E. faecalis* suşu ile çalışmışlardır. Vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), gentamisin (120 µg) ve streptomisin (300 µg) diskleri kullanmışlardır. *E. faecalis* suşlarının Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve As<sup>5+</sup> dirençliliklerini belirlemek amacıyla 0,005-20 mM aralığında ağır metal içeren Mueller Hinton agar besiyerleri hazırlamışlardır. Günümüzde ağır metallerle ait belirlenmiş MİK direnç sınır değerlerinin bulunmaması nedeniyle bu konuda yapılan çeşitli çalışmalardan yararlanarak direnç kriterleri oluşturmuşlar ve MİK değerleri As için ≥ 10 mM, Cd ve Pb için ≥ 1 mM ve Hg için ≥ 0.1 mM olan suşları dirençli olarak kabul etmişlerdir.

Nakipoğlu ve arkadaşları [252] çalışmaya aldıkları 39 *Enterococcus* suşundan 20'sinin glikopeptidlere dirençli (11'i vankomisin ve teikoplanine, 9'u vankomisine), 19'unun ise duyarlı olduğunu saptamışlardır. Vankomisin ve teikoplanine dirençli 11 izolatın 10'unda ve glikopeptidlere duyarlı izolatların 8'inde, yüksek düzeyde aminoglikozitlere direnç saptanmışlardır. Suşların tümünün (%100) Pb'ye (MİK: 2.5-5 mM), bir suşun (%2.6) Hg'ye (MİK: 0.005-0.25mM), bir suşun (%2.6) ise As'ye dirençli (MİK:0.1-10 mM) olduğu belirlenirken Cd direncine rastlamamışlardır. Çalışmalarında, suşların %71.8'inde (28/39) antibiyotik (aminoglikozid ve/veya vankomisin ve/veya teikoplanin) ve ağır metal (Pb ve As ve/veya Hg) direncinin bir arada bulunduğunu belirlemişlerdir. *E. faecalis* suşu için elde edilen MİK değerleri; As için 0.25, Cd için 5, Hg için 0.25 ve Pb için 10 mM olup, As ve Hg'ye duyarlı, Cd ve Pb'ye dirençli olarak saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada ise, *E. faecalis*'in Cr'un yanında Ag (8 mg L<sup>-1</sup>) metaline dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca amikacin, ampicilin, aztreonam, ciprofloksacin, gentamicin, netilmisin, penisilin, ve tobramycin antibiyotiklerine karşı da dirençlilik bulunmuştur.

Ağır metallerin varlıkları bakterilerin yaşam ortamında seçilimine baskı oluşturmaktadır. Bakteriler ağır metallerin varlığında, anahtar mekanizma olarak yatay gen aktarımı ile yaşamını yöneten stratejiler dizisi oluşturarak seçilir [230]. Yapılan çalışmalara uzun ve kısa vadeli ağır metal stresine maruz kalındığında yüksek sıcaklık, pH veya kimyasal kirlilik gibi etkenlerde, suda yaşayan bakteri popülasyonlarının tür çeşitliliğinde ve plazmit insidansında farklılıklar görülmektedir [253]. Bazı bakteri suşları direnç için genetik belirleyicilere sahiptir. Bakterilerde bu belirleyiciler sıklıkla plazmitlerin üzerinde bulunur. Toksik kimyasal atıkların olduğu bölgeden izole edilen bakteriler, temiz sulardan izole edilen bakterilere göre daha sıklıkla plazmit DNA içerirler ve antibiyotik dirençliliği de gösterirler . Aynı zamanda bakterilerin birçoğunda ağır metal dirençlilik genlerinin plazmidler üzerinde kodlandığı bilinmektedir [254]. Bakteriler, yeni antibiyotiklere ve kimyasallara dirençli duruma geldikçe, değişik ortam şartlarına kolayca uyum sağlayabilmekte ve bu olayda plazmid adı verilen ekstra kromozomal DNA parçalarının taşıdıkları dirençlilik bilgisi önemli rol oynamaktadır. İnsan ve

hayvanlar, R plazmidlerinin en önemli rezervuarlarını oluştururlar. Enterik bakterilerin rezervuarı olan kanalizasyon sularının, arıtmaksızın sucul ortamlara katılımı, R- plazmidlerinin geniş alanlara yayılmasına neden olmaktadır [255].

Mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinin kaynağının kromozomal DNA, plazmid DNA veya transpozonlar üzerinde taşınan genler olduğu rapor edilmiştir [256]. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmid DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir [257]. Transpozonlar, kromozomal DNA-plazmid DNA veya plazmid DNA-plazmid DNA arasında değişebilen gen parçalarıdır. Bakterilere biyodegradatif özelliğin yanı sıra antibiyotik dirençliği gibi bazı avantajlar da sağlamaktadır [243].

Cervantes ve arkadaşları [258], çevresel ve klinik kökenli bakterilerde toksik ağır metallere dirençlilik bulunduğunu ve direncin genetik etkeninin sıklıkla plazmidler veya transpozonlar üzerinde lokalize olduğunu rapor etmişlerdir. Ağır metallere dirençli mikroorganizmaların esasen metal karışımli toprakta doğal olarak bulunduğu düşünülmektedir.

*Pseudomonas* türlerinin çoğu antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı çalışmaları, yeni türlerin açıklanmasını sağlayabilecek kadar önemli ve faydalı çalışmalardır [259]. *Pseudomonas*'lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyel ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere, fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran, plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengin bakterilerdir. Plazmidlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmidleri) karşı dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler [260].

Abosereh ve arkadaşları [238], *Pseudomonas* suşlarında Ag dirençlilik profillerini incelemiş ve bu dirençliliğin düşük ve yüksek molekül ağırlıklı plazmitler ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *Pseudomonas* suşlarında çinko, demir, civa, kobalt, nikel gibi metaller ile antibiyotiklere dirençliliğin de plazmitler ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Gilotra ve Srivastava [261] yaptıkları bir çalışmada, bahçe toprağından izole ettikleri *P. pickettii* US321 suşunun, ampisilin, eritromisin gibi antibiyotiklerle, kadmiyumun 2 mM'ına, çinkonun 25 mM'ına ve bakırın 2 mM'ına direnç göstermiş olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada US321 suşunun pUS321 adlı yüksek moleküler ağırlıklı bir plazmid bulundurduğu rapor edilmiştir. Plazmid giderme işlemleri sonucunda, US321 suşunun plazmidleri giderilmiş bir türevi olan PC25 suşunda, (0,1 mM) Cu, Zn ve Cd'ye duyarlı fenotiplerin ortaya çıktığını ve Cu dirençliliği mekanizmasının Zn ve Cd dirençliliklerini de üzerinde bulunduran pUS321 plazmidini ile sağlandığını rapor etmişlerdir.

Haefeli ve arkadaşları [262] yaptıkları bir çalışmada bir gümüş madeninden *P. stutzeri*'nin gümüşe dirençli bir suşunu izole etmiş ve en büyüğü  $49,4 \times 10^6$  (pKK1) moleküler ağırlıklı üç adet plazmid tespit edilmiştir. pKK1 plazmidini görünüşte nonkonjugatif bir plazmid'tir, fakat plazmid R68.45 ile mobilizasyon aracılığıyla gümüş direncinin *P. putida*'ya transfer olabildiği rapor edilmiştir.

Sevgi [50] en yüksek MİK değerine sahip bakterilerden *Pseudomonas* sp.ve *Bacillus* sp.arasından seçtiği 36 adet bakteride plazmid DNA varlığını araştırmak için bu suşlardan plazmid DNA izolasyonuyapmış, bu suşlardan sadece 8'inde büyüklükleri 2.1 ve 1.8 kb olan 2 adet, bir suşta da 28 kb, 2.1 kb ve 1.8 kb büyüklüğünde 3 adet plazmid tespit etmiştir. Plazmid içeren bu suşlar Ni, Zn, Cu ve Cr ağır metallerine karşı belirli bir dirence sahiptir. Ancak diğer metallere dirençli suşlarda bu ve buna benzer büyüklüklerde plazmidlere rastlanmamış olması, metal dirençlilik informasyonunun plazmid kodlu olmadığı izlenimini vermektedir, dolayısıyla dirençliliğin kromozomal kökenli olduğu söylenebilir. Bu sonuç, metal kontaminasyonuna uzun yıllar maruz kalmış bölgenin bakteri populasyonu için beklenen bir durumdur. Çünkü plazmid kodlu dirençlilik bu tip adaptasyonlarda genetik bilgiyi transfer etme biçimlerinden tercih edilendir. Uzun süreli maruziyetler, söz konusu genetik bilgilerin daha kalıcı olduğu kromozoma taşınması için yeter zamanı sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada Cu dirençli *P. putida* suşunun Cu içeren ortamda plazmit bulunmaması uzun süreli bu metale maruz kalması sonucunda direnç genlerinin kromozoma taşınmış olabileceğini destekler niteliktedir.

Ağır metal dirençliliğinin plazmit veya kromozomal DNA aracılı olup olmadığını tespiti için bakır dirençli suş ile krom dirençli suşun plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Yapılan deneylerde, *P. putida'nın* bakır içermeyen ortamda 22.46 kb boyutunda plazmit bulundurduğu gözlemlenmiştir. *E. faecalis'in* ise krom içermeyen ortamda 23 kb boyutunda plazmit bulundurduğu belirlenmiştir. Bakır ve krom içeren ortamlarda ise plazmit tespit edilmemiştir. Bulgular neticesinde metal içeren ortamlarda plazmitin bulunmayışı bu metallerin varlığının plazmit genlerinin ekspresyonunu azalttığını ya da engellediğini metallere direncin ise kromozomal DNA tarafından sağlandığını göstermektedir.

*Pseudomonas* türlerinde sisteince zengin bir protein sentezlenmekte ve hücre içine giren toksik metaller bu proteinlere bağlanmak suretiyle bakteri toksik metallere karşı direnç kazanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *P. putida'nın* da metalloprotein ürettiği tespit edilmiştir [26].Yaptığımız çalışmada da *P. putida* suşunun total proteininde Cu varlığında farklı bir proteinin ekspresyonunun arttığı belirlenmiş ve bu proteinin Cu metaline direnç sağlayan bir protein olduğu düşünölmektedir.

Canovas ve arkadaşları [205] *P. putida* KT2440 suşunun krom atım mekanizması için ChrA proteininin, gümüş ve bakır atım sistemi için de CusC, CusB, CusA proteinlerinin rolleri olduğunu belirtmişlerdir. *P. putida'nın* metallothioneinlere benzeyen, sistein bakımından zengin 3 farklı protein ürettiği tespit edilmiştir. *P. putida* 06909 suşunda ilk olarak ATPaz'ın sorumlu olduğu CadA sistemi keşfedilmiştir. CadA sisteminin gen ürünleri hücre içindeki ağır metallere bağlanarak bakterinin direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Bu sistem *P.putida* 06909 suşunun, Cd ve Zn'ye karşı direnç kazanmasını sağlamıştır. Aynı sistem *P. fluorescens* ATCC 13525 suşunda da karakterize edilmiştir [84].Yaptığımız çalışmada Cu dirençli *P. putida* suşunun total proteinlerindeki artışın bu şekilde direnç sağladığını destekler niteliktedir.

*E. hirae* bakterisinde Cu<sup>+2</sup> dirençliliğinden sorumlu cop operonunun bulunduğu bildirilmiştir. Bu operonun genleri Cu<sup>+2</sup> 'nin hücre içinden hücre dışına salınmasında görev alan proteinleri kodlamaktadır [26]. Bazı *Pseudomonas* suşlarında da benzer bir operon bulunduğu bildirilmiştir [263].



Felicio ve arkadaşlarının [264] gerçekleştirdiği ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın protein sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı denemelerde demir içeren ortamda geliştirilen *A. ferrooxidans*'ın zar ve periplazma protein sentezine 200 mM  $\text{Cu}^{+2}$  'nin etkisi incelenmiştir. Mikroorganizma  $\text{Cu}^{+2}$  içermeyen ve bu kirleticiyi içeren iki farklı ortamda geliştirilmiştir. İki farklı besiyerinde geliştirilen bakterinin proteinleri izole edilerek protein profillerindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile tespit edilmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$  içeren ortamda bakterinin bazı proteinlerinin sentezinin azaldığı veya bazılarının arttığı görülmüştür.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları içeren ortamda düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yapımının belirgin bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Çalışmada bu proteinlerin muhtemelen asidik proteinler olduğu ve dış zara ait elemanlar olabileceği ileri sürülmüştür. Araştırmacılar rustiksiyanin isimli bir proteinin ise ağır metal içeren ortamda daha fazla sentezlendiğini tespit etmiştir. Periplazmik bir protein olan rustiksiyaninin demir oksidasyon yolunun elektron taşıma zincirinde görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar bakterinin iki yolla  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarına karşı cevap verdiğini belirlemişlerdir. Birinci yolda  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarına karşı geçirgenlik azaltılmakta, ikinci yolda ise  $\text{Cu}^{+2}$  periplazmada sentezi artan proteince tutulmaktadır.

Sharma ve arkadaşları [265] *P. fluorescens*'in ağır metal stresine karşı gösterdiği direnç mekanizmasında proteinlerin rolünü proteomik bir yaklaşımla açıklamışlardır. Bakterinin çeşitli ağır metallere maruz bırakıldığında farklı olarak sentezlenen proteinleri 2D jel elektroforezi ile belirlenmiş ve kütle spektrofotometresi (MS) ile tanımlanmıştır. Bakteri  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$ 'ye maruz bırakılınca spo VG ile enolaz proteinlerinin sentezinin arttığı görülmüştür. Mikroorganizma  $\text{Co}^{+2}$ 'a maruz kaldığında ise varsayılan proteinin sentezinin azaldığı, ksilotransferaz, ORF 18 faj fi KZ, OMP H1 ve translasyonel uzama faktör (EF-Tu) gibi proteinlerin ise yalnızca bu metale maruz kalındığında sentezlendiği görülmüştür. Araştırmacılar bütün bu sonuçlar ışığı altında, bakterinin ortamda ağır metaller varken çalışmada tanımlanan proteinler aracılığı ile ağır metal stresine karşı bir savunma mekanizması geliştirdiğini tespit etmişlerdir.

Özcan ve arkadaşları [266] *Phanerochaete chrysosporium* fungusunun  $\text{Cd}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarına maruz kaldığında verdiği yanıtı proteom analizi ile belirlemişlerdir. Ağır

metal stresine yanıt olarak fungusun, 3 adet ribozomal protein ile flavonol/sinamolil-CoA redüktaz, ATP-az, ribozomal protein S7, ribozomal protein S21'e ve uzama faktör EF-1 alfa alt ünitesi gibi proteinleri daha fazla sentezlediğini göstermişlerdir.

Wang ve arkadaşlarının [83] gerçekleştirdikleri çalışma,  $Hg^{+2}$  'ya dirençli *P. putida* suşu ile çalışılmıştır. Araştırmacılar yüksek konsantrasyonda  $Hg^{+2}$  'ya maruz kalan bakterilerin hücresel proteomunda çok az bir değişim belirlerken, özellikle hücre zarına ait taşıyıcı proteinlerde değişiklik gözlemlemişlerdir. Bu çalışmaya göre, yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda katyon akısını sağlayan taşıyıcı proteinlerin yapımı 45 kez daha fazla olurken, bir dış zar proteini olan porinin yapımı 106 kat azalmıştır. Araştırmacılar stres koşullarında enerji metabolizması ile ilgili herhangi bir proteinin daha fazla sentezlendiğini tespit etmemişlerdir.

Shilev ve arkadaşları [267] çalışmalarında sodyum arsenata dirençli *P. fluorescens*'in As varlığında ve yokluğunda toplam protein içeriğinin proteom analizi ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar, 1000 ppm As varlığında, dirençli bakterinin 9 proteini farklı olarak, 4 proteini yeni olarak sentezlediğini 4 proteinin sentezini arttırdığını ve 1 proteinin sentezini azalttığını tespit etmişlerdir.

*P. putida* suşunun bakır içeren ortamdaki dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. 92.87, 56.45 ve 53.68 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunun 3.5, 2,2 ve 1.5 kat azaldığı belirlenmiştir. Total proteinlerinde ise Cu içeren ortamda 152.65, 121.59, 94.66, 86.41ve 54.82 kDa boyutlarındaki protein bantlarının ekspresyonlarını sırasıyla 4.7, 8.3, 2.9, 1.4 ve 1.8 kat arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda total proteinlerin bakır dirençliliğinde daha etkin olduğu belirlenmiştir.

*E. faecalis* suşunun Cr içeren ortamdaki total proteinlerinde 94.66, 54.82, 52.38 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunda artış görülmüş sırasıyla 3.9, 1.7, 3 kat artış olduğu belirlenmiştir.

Wang ve Shen'in [268] yaptığı çalışmada Cr(VI) ile kirletilmiş toprakta *Bacillus sp.*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobacterium anthrop*, *Arthrobacter sp.* gibi bazı bakteri türlerinin kromat redüktaz enzimi ile direnç sağladığı bulunmuştur. Bazı krom dirençli bakteriler  $Cr^{+6}$  'yı bir elektron donörü gibi kullanarak  $Cr^{+3}$  indirgemektedir [268]. Bizim yaptığımız çalışmada Cr dirençli *E. faecalis* suşunun total protein profili incelendiğinde Cr iyonlarını hücreden aktif transport ile uzaklaştırdığı düşünülmektedir. Krom dirençli bakterilerin  $Cr^{+6}$  'yı indirgemeleri ortak ve yaygın olmasına rağmen, türden türe farklılıklar da gözlenmiştir [269].

Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle non-spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu bağlanma, dış membranda yer alan  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$ ,  $-SO_3H$ ,  $-COOH$  ve  $-PO_3H$  grupları ile metal iyonları arasında spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir [164]. Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal iyonlarını biyosorbama yeteneğine sahiptir ve böylece bu iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı, metale karşı sınırlı bir koruma sağlanmaktadır [270]. Metal iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *P. putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir [271]. Ortamda bulunan bazı toksik maddeler de EPS oluşumunu tetiklerler [200]. Örneğin, Sheng ve arkadaşları [185] tarafından yapılan bir çalışmaya göre, ortamda bulunan Cr ve Cd gibi toksik maddelerin *Rhodopseudomonas acidophila* bakterisi tarafından ortama EPS yayılmasına neden olduğu gösterilmiştir. *P. putida* bakteri kültürünün  $Cr^{+6}$ 'nın  $Cr^{+3}$ 'a indirgenmesi sırasında ortama EPS yaydığı ve indirgenen  $Cr^{+3}$ 'un bir kısmının biyofilm hücreleri üzerine birikirken, bir kısmının da ortamda bulunan EPS ile bileşik oluşturduğunu göstermiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen bakır ve krom dirençli suşlar biyokimyasal ve genetiksel özellikleri bakımından incelenmiştir. Biyokimyasal özellikler esas alınarak bakır ve krom dirençli suşlar tanımlanmıştır. Tanımlanan bu suşların çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında plazmit DNA, kromozomal DNA, total ve

dış mebran protein profilleri belirlenerek, bu profillerin metal dirençlilik mekanizması ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.

Literatürde Kırıkkale-Kızılırmak'tan metal dirençli bakterilerin izole edilmesi ile ilgili oldukça sınırlı sayıda kaynak mevcuttur [272, 273]. Bu bakımdan yapılan bu çalışma ile literatürdeki bu konudaki eksikliğin giderilmesine yönelik katkıda bulunulduğu düşünülmektedir

## KAYNAKLAR

- [1] Uslu, O., Su Kirliliği ve Kontrolü Yönetmeliği. Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi, 1: 1, 7-14, 1990.
- [2] Anonim, Türkiye İl İl Dünü Bugünü Yarını. 5: 3383-3422, 1982.
- [3] Çiçek, A. ve Koparal, A.S., Porsuk Baraj Gölü'nde yaşayan *Cyprinus carpio* ve *Barbus plebejus*'da kurşun, krom ve kadmiyum seviyeleri. Ekoloji Çevre Dergisi, 39: 3-6, 2001.
- [4] Çepel, N., Ekolojik sorunlar ve çözüm önerileri. Tübitak Popüler Bilim Kitapları, 183, 2003.
- [5] Keleş, S. ve Göl, C., Çok fonksiyonlu bir orman çıktısı. Su Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Tabiat ve İnsan Dergisi, 1-2: 3-12, 2004.
- [6] Yarsan, E., Bilgili, A. ve Türel, İ., Van Gölü'nden toplanan midye (*Unio stevenianus krynicki*) örneklerindeki ağır metal düzeyleri. Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi, 24: 93-96, 2000.
- [7] Bat, L., Gündoğdu, A., Yardım, Ö., Zoral, T. ve Çulha, S., Sinop ili İç Liman Bölgesindeki zooplankton ve bazı ekonomik balıklarda ağır metal düzeyleri. Sumder (Su Ürünleri Mühendisleri Derneği Dergisi), 25, 26: 22-27, 2006.
- [8] Rowe, C., Hopkins, W.A., Congdon, J.D., Ecotoxicological implications of aquatic disposal of coal combustion residues in the United States: a review. Environmental Monitoring Assessment. 80: 207-276, 2002.
- [9] Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D. and Kalfakakou V., Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece), Environment International, 30: 357-362, 2004.

- [10] Ö. Canpolat, Hazar Gölü'nde yakalanan *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'da bazı ağır metal miktarlarının tespiti. Yüksek lisans tezi. Fırat Üniv., Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı, 50, 2001.
- [11] Güley, M., Vural, N., Toxicology. Ankara University Faculty of Pharmacy Publication, 48: 500 (In Turkish), 1987.
- [12] Tümen, F., Bildik, M., Baybay, M., Cici, M., Solmaz, B., Pollution potential of Ergani copper smelter's rigid wastes. Doğa Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 16: 43-53, 1992.
- [13] İlhan, S., Nourbakhsh, N.M., Kılıçarslan, S., Özdağ, H., Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. Turkish Electronic Journal of Biotechnology, 2: 50-57, 2004.
- [14] Schneegurt, M., Jain, J., Menicucci, J., et. al., Biomass Byproducts for the Remediation of Wastewaters Contaminated with Toxic Metals. Environ. Sci. Technol., 35: 3786-791, 2001.
- [15] De Conto Cinier, C.M.P., Ramel, R., Faure, D., Garin, Y.B., Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 122: 345-352, 1999.
- [16] Türkiye'nin Çevre Sorunları. Türkiye'nin Çevre Sorunları Vakfı Yayını Kollektif Çalışma, 478, 1989.
- [17] Katz, A.A.J., Chiu, J., Beaubier, X.S., Mol. Cell Biochem., 222: 61-68, 2001.
- [18] D. Özer, Sulardaki Krom Kirliliğinin Dolgulu Kolonlarda Adsorpsiyon Yoluyla Giderilmesi. Yüksek Lisans Tezi. G.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 4, 2000.

- [19] Haktanır, K., Çevre Kirliliği. A. Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notu, Teksir No: 140, Ankara, 1987.
- [20] Stella, A.M., Montaldi, A.R, Mutat. Res., 101: 151-164, 1982.
- [21] Rodriguez-Arnaiz, R., Martinez, R., Cytologia, 51: 421-425, 1986.
- [22] Küchler, W., Verlag, C.H., Chemische Technology. Band 4, Wien ISBN 3-446-13182-5, 1986.
- [23] Patterson, J.W., Industrial Wastewater Treatment Technology, 2nd ed., Stoneham: Butterworth Publishers, 1985.
- [24] McNeely, R.N., Neimanis, V.P., Dwyer, L., Water Quality Sourcebook-A guide to water quality parameters: Inland Water Directorate, Water Quality Branch, Ottawa, Canada, 88, 1979.
- [25] H. Parlak, *Mugil* spp. ve *Chasmichtys glusus* Üzerinde Kadmiyum, Demir ve Kurşunun Ayrı Ayrı ve Birlikte Oluşturdukları Toksik Etkilerin Araştırılması. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 1985.
- [26] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., Microbial resistance to metals in the enviroment. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 45: 198-207, 2000.
- [27] Patherson, J.W., Waste Water Treatment. Science Publishers Inc., U.S.A. 113: 125,129 137, 1977.
- [28] Pekin, B., Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji). Ege Üniversitesi Yayınları, 3: 254-337, 1983.
- [29] Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., Cosmopolitan Biomonitors of Trace Metals. Marine Pollution Bulletin, Vol. 26, 11: 593-601, 1993.

- [30] Webb, D., Gagnon, M.M., Biomarkers of Exposure in Fish Inhabiting the Swan-Canning Estuary Western Australia-a preliminary study. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 259-269, 2002.
- [31] Taylan, Z.S., Böke-Özkoç, H., Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. *BAÜ FBE Dergisi*, Cilt: 9 (2): 17-33, 2007.
- [32] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International*, 30: 261-278, 2004.
- [33] Kuyucak, N., Volesky, B., Biosorbents for Recovery of Metals From Industrial Solutions. *Biotechnology Letters*, 10: 137-142, 1988.
- [34] Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Flemming, C.A. and Balley, G.W., Bacterial Sorbtion of Heavy Metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3143-3149, 1989.
- [35] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van, T.M., Effects of heavy metals in soil on microbial diversty and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17: 177-184, 1994.
- [36] Sultan, S., Hasnain, S., Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr (VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 883-888, 2006.
- [37] Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S., Dönmez, G., Inhibitory effects of chromium (VI) and Remazol Black B on chromium (VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1167-1174, 2007.



- [38] Koçberber, N., Dönmez, G., Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters, *Bioresource Technology*, 98: 2178-2183, 2007.
- [39] Diffels, J.F., Seret, M.L., Goffeau, A., Baret, P.V., Heavy metal transporters in hemiascomycete yeasts. *Biochimie*, 88: 1639-1649, 2006.
- [40] Kourtev, P.S., Nakatsu, C.H., Konopka, A., Response of the anaerobic bacterial community to addition of organic C in chromium (VI)-and iron (III)-amended microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 628-637, 2006.
- [41] Moller, J.V., Nissen, P., Sorenson, T.L.M, Marie, M., Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{+2}$ -ATPase pump. *Current Opinion in Structural Biology*, 15: 387-393, 2005.
- [42] Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., Koloczek, H., Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochemistry*, 40: 1565-1572, 2005.
- [43] Egler, M., Grosse, C., Grass, G., Nies, D.H., Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187: 2297-2307, 2005.
- [44] <http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak>  
(Erişim tarihi: 12.03.2012)
- [45] Samsunlu, A., Fındık, N., Akça, L., Kınacı, C. ve Tamık, A., Su Kalite Yönetiminde Sulak alanların Önemi-Kızılırmak Deltasının Bugünkü ve Geçmişteki Durumu. Çevre Mühendisliği Odası, IV. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Mersin, 2001.

- [46] Yılmaz, C., Kızılırmak Deltasında Meydana Gelen Erozyonun Coğrafi Analizi. Türkiye Kuvaterner Sempozyumu, İTÜ Avrasya Yer Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005.
- [47] Z. Güven, Kırıkkale Kenti Açık ve Yeşil Alan Sisteminin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Peyzaj Mimarlığı ABD, Ankara, 30, 1992.
- [48] Atalay, B., Sanayileşme ve Sosyal Değişme (Kırıkkale Araştırması), DPT, Ankara, 59, 1983.
- [49] E. Karadeniz, Kırıkkale’de Şehirselleşme. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Coğrafya (Beşeri ve İktisadi Coğrafya) Anabilim Dalı, Ankara, 2005.
- [50] E. Sevgi, Ağır metalle kontamine olmuş topraktan metal iyonlarına dirençli bakterilerin izolasyonu ve bu dirençliliğin plazmidlerle olan ilişkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [51] Çabuk, A., Akar, T., Kotluk, Z., Şaşmaz, S., *Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri ile Ağır Metal Giderimi ve Metal Toleransı. Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 05, 3: 1-7, 2007.
- [52] Alloway, B.J., ed. Heavy Metals in Soils. 2nd ed. Chapters 6, 8, 9 and 11. Chapman and Hall, Glasgow, UK, 1995.
- [53] McDonald, D.G., Grandt, A.F., Limestone- Lime Treatment of Acid Mine Drainage-Full Scale. EPA Project Summary, EPA-600/S7-81-033, 1981.
- [54] Wilmoth, R.C., Kennedy, J.L., Industrial Environmental Research Laboratory, Removal of Trace Elements from Acid mine Drainage. 1979.

- [55] Drever, J.I., *The Geochemistry of Natural Waters: Surface and Groundwater Environments*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1997.
- [56] Wang, W., Zhenghe, X., Finck, J., *Fundamental Study of an Ambient Temperature Ferrite Process in the Treatment of Acid Mine Drainage*. *Env. Sci. and Tech.*, 30 (8): 2604-2608, 1996.
- [57] Horsfall, M.Jnr., Abia, A.A., Spiff, A.I., *Removal of Cu (II) and Zn (II) ions from wastewater by cassava (*Manihot esculenta* Cranz) waste biomass*, *African J. of Biotech.*, 2: 360-364, 2003.
- [58] Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K., et. al., *Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 7: 38-46, 2004.
- [59] Bayramoğlu, G., Çelik, G., Yalçın, E., Et. al., *Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr<sup>6+</sup> removal efficiencies from aqueous medium*. *J. Hazar. Mater.*, 2005.
- [60] Stanley C.L., Ogden L.K., *Biosorption of copper (II) from chemical mechanical planarization wastewater*, *J. Env. Man.*, 69: 289-297, 2003.
- [61] Tewari, N., Vasudevan, P., Guha, B.K., *Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis**, *Biochemical Engineering Journal*, 23: 185-192, 2005.
- [62] Chua, H., Lo, W., Wong, P.K. and Bi, S.P., *Studies on the sorption and desorption of Cu from wastewater by magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-X with acidic treatment*. *Science of the Total Environment*, 2000.
- [63] Lo, W., Chua, H., Lam, K.H. and Bi, S.P., *A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass*. *Chemosphere*, 39: (15), 2723-2736, 1999.

- [64] Unz, R.F. and Shuttleworth, K.L., Microbial mobilization and immobilization of heavy metals, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7 (3): 307-310, 1996.
- [65] Volesky, B. and May-Phillips, H.A., Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 797, 1995a.
- [66] Diaz, E., Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility, *Int. Microbiol*, 7: 173-180, 2004.
- [67] Baya, A.M., Brayton, P.R., Brown, V.L., Grimes, D.J., Russek-Cohen, E. and Colwell, R.R., Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1285-1292, 1986.
- [68] Malik, A. and Jaiswal, R., Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 177-182, 2000.
- [69] Burton, N.F., Day, M.J. and Bull, A.T., Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1026-1029, 1982.
- [70] Arias, M.E., Gonzalez-Perez, J.A., Gonzalez-Vila, F.J. and Ball, A.S., Soil health-a new challenge for microbiologists and chemists. *Int Microbio*, 8: 13-21, 2005.
- [71] Sandaa, R.A., Torsvik, V.L., Goksøyr, J., Transferable Drug Resistance in Bacteria from fish farm Sediments. *Can. J. Micro-biol.*, 38: 1061-1065, 1992.
- [72] Davies, J., Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*, 264: 375-381, 1994.

- [73] Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, T.C., Katsouyannopoulos, V.C., Transferable antibiotic resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters. *Wat. Res*, 31: 1112-1116, 1997.
- [74] Scott, J.R., Sex and the single circle: conjugative transposition, *J. Bacteriol.*, 174: 6005-6010, 1992.
- [75] Sayers, A.A., Shoemaker, N.B., Broad host range gene transfer: plasmids and conjugative transposons. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15: 15-22, 1994.
- [76] Le-Ni, S., Yan-Feng, Z., Lin-Yan, H., Zhao-Jin, C., Qing-Ya, W., Meng, Q., Xia-Fang, S., Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101: 501-509, 2010.
- [77] Poli, A., Salerno, A., Laezza, G., Donato, P., Dumontet, S., Nicolaus, B., Heavy metal resistance of some thermophiles: potential use of  $\alpha$ -amylase from *Anoxybacillus amylolyticus* as a microbial enzymatic bioassay. *Research in Microbiology*, 160: 99-106, 2009.
- [78] Knotek-Smith, H.M., Deobald, L.A., Ederer, M. and Crawford, D.L., Cadmium stress studies: media development, enrichment, consortia analysis, and environmental relevance. *Biometals*, 16: 251-261, 2003.
- [79] Banjerdkij, P., Vattanaviboon, P. and Mongkolsuk, S., Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*. *Curr. Microbiol*, 47: 260-262, 2003.
- [80] Novick, R.P. and Roth, C., Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol*, 95: 1335-1342, 1968.

- [81] Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. and Vangijsegem, F., *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, 162: 328-334, 1985.
- [82] Silver, S., Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois at Chicago, USA, 1999.
- [83] Wang, W.J., Deckwer, W., Wagner-Döbler, I., Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis. *Journal of Biotechnology.* 132: 469-480, 2007.
- [84] Chovanová, K., Sládeková, D., Kmet., V., Prokšová, M., Harichová, J., Andrea, P., Polek, B. and Ferianc, F., Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. *Biologia, Bratislava*, 59/6: 817-827, 2004.
- [85] Zolgharnein, H., Mohd-Azmi, M.L., Saad, M.Z., Mutalib, A.R., Rahim Mohamed, C.A., Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas. *Iranian Journal Of Biotechnology*, Vol. 5, No. 4, 2007.
- [86] Ansari, M.I., Malik, A., References and further reading may be available for this article, To view references and further reading you must this article, Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 98 (16): 3149-3153, 2007.
- [87] Collard, J.M., Corbisier, P., Diels, L., Dong, Q., Jeanthon, C., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D., Wilmotte, A. and Wuertz, S., Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: Mechanisms and applications Laboratory for Genetics and Biotechnology. Flemish Institute for Technological Research (VITO), Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium, 2002.

- [88] Edward-Raja, C., Selvam, G.S., Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. Int. J. Environ. Sci. Tech., 6 (2): 259-266, 2009.
- [89] Mertz, W., Trace Elements in Human And Animal Nutrition-15th Edition. Volume 1, Academic Pres., 1987.
- [90] World Health Organization (WOH)., Trace Elements in Human Nutrition And Health. Geneva, 450, 1996.
- [91] <http://www.inchem.org> (Erişim tarihi: 12.03.2012)
- [92] Horitsu, H., Nishida, H., Kato, H., Tomoyeda, M., Isolation of potassium chromate - tolerant bacterium and chromate uptake by the bacterium. Agric. Biol. Chem., 42: 2037-2043, 1978.
- [93] Khasim, I.D., Nanda-Kumar, N.V., Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. Bull Environ. Contam. Toxicol., 43: 742-746, 1989.
- [94] Ji, G. and Silver, S., Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. J. Ind. Microbiol, 14: 61-168, 1995.
- [95] N. Yıldırım, Farklı Konsantrasyonlarda Kadmiyumun Beyaz Çürükçül Fungus *Phanerochaete chrysosporium*'un Antioksidatif Enzim Aktiviteleri ve Glutasyon Seviyesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya, 2004.
- [96] Coral, M.N.U., Korkmaz, H., Arıkan, B., Coral, G., Plasmid mediated heavy metal resistance in *Enterobacter* spp. Isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. Ann. of Microbio., 55: 175-179, 2005.

- [97] Çetiner, E.G., Ünver B., Hindistan, M.A., Maden Atıkları İle İlgili Mevzuat : Avrupa Birliği ve Türkiye Madencilik. Cilt 45, Sayı 1, Sayfa 23-34, 2006.
- [98] Türkmen, A., Türkiye Denizleri'nden Yakalanan Dil Balığı (*Solea solea* L., 1758) Türünün Kas ve Karaciğer Dokularında Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi, Giresun Üniversitesi, Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 2 . Cilt, 1. Sayı, 139-151, Giresun, 2011.
- [99] Nieboer, E., Richardson, D.H.S., The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metals ions. Environment Pollution, 1: 3-26, 1980.
- [100] Roesijadi, G., Robinson, W.E., Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation. and release. In: Malins, D.C. and Ostrander, G.K., (eds.), Aquatic Toxicology, Lewis Publishers, (Boca Raton LA), 387-420, 1994.
- [101] Kaya, S., Pirinçci, İ. ve Bilgili, A. Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi. Medisan Yayın Serisi, Yayın No: 36, 1998.
- [102] Kaya, S., Pirinçci, İ. ve Bilgili, A., Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi, Yayın No: 35, 1998.
- [103] Şanlı, Y., Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg., 2: 17-37, 1984.
- [104] Hapke, H.J., Effects of metals on domestic animals. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991.
- [105] Uzun, S., Su ürünlerinin başlıca ağır metallere kirlenme durumu ve konunun halk sağlığı yönünden incelenmesi. Ankara Üniv. Sağl. Bilm. Enst. Yüksek Lisans Semineri Notları, 1993.



- [106] Şanlı, Y., Metaller ve Diğer İnorganik Maddeler. Alınmıştır: S., Kaya, Ed. Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayın Serisi, Yayın No:21, Ankara, 1995.
- [107] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bak%C4%B1r> (Erişim tarihi: 10.03.2012)
- [108] <http://www.teknolojikarastirmalar.com/e-egitim/Perivodik/PERIODIC/PERIODIC/Cu.html>  
(Erişim tarihi: 09.03.2012)
- [109] <http://www.nesko.com.tr/tr/Bakir.html> (Erişim tarihi: 10.03.2012)
- [110] <http://e-egitim.teknolojikarastirmalar.com/Perivodik/PERIODIC/PERIODIC/Cr.html>  
(Erişim tarihi: 20.01.2012)
- [111] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Krom> (Erişim tarihi: 09.03.2012)
- [112] <http://www.nedirvikipedi.com/kimya/krom.html> (Erişim tarihi: 10.03.2012)
- [113] Sağlam, N., Cihangir, N., Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbsiyonu Çalışmaları. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 11: 157-161, 1995.
- [114] Şengül, F., Endüstriyel atıksuların özellikleri ve arıtılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Basımevi Ünitesi, İzmir, 1-365, 1991.
- [115] A. Rether, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstofffunktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi. Münih Teknik Üniversitesi. Münih, 2002.
- [116] Palmer, C.D., Wittbrodt, P.R., Processes Affecting the Remediation of Chromium- Contaminated Sites. Environ. Health Presp., 92: 25-40, 1991.

- [117] Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Yunus, M., Bioaccumulation of Chromium and Toxicity to Photosynthetic Pigments, Nitrate Reductase Activity and Protein Content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Chemosphere, 39: 2159-2169, 1999.
- [118] Stern, R.M., Chromium Compounds: Production and Occupational Exposure. In: Biological and Environmental Aspects of Chromium (Langard, S., Ed.). 5-47, 1982.
- [119] Papp, J.F., Chromium. In: Mineral Facts and Problems. Bureau of Mines Bulletin, 675: 139-155, 1985.
- [120] 1.Tıbbi Jeoloji Çalıştay, 30 Ekim-1 Kasım Ürgüp Bld., Kültür Merkezi, Ürgüp/ Nevşehir, 2009.
- [121] Kalınbacak, K., Tongarlık, Ş., Gürbüz, M.A., Mikro element ve ağır metal analizleri için bitki örnekleme ile yeterlilik ve toksik seviyeleri, 3-9, Ankara, 2000.
- [122] Gündüz, T., Çevre Sorunları. Üçüncü baskı, Gazi Büro Kitabevi, 1: 49-58, 131-147, Ankara, 2004.
- [123] M. Güney, Çevresel Metal Kirliliğinin belirlenmesinde Biyo-İndikatör Olarak Biyo-Kollektörlerin Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kimya Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, 2007.
- [124] Dökmeci, İ., Dökmeci, A.H., Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi. 4. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.
- [125] Klaassen, C.D., (Çeviri: Kalkan, Ş., Soner, B.C.), Ağır Metaller ve Ağır Metal Antagonistleri (Konu:65). Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., (Editors), (Çeviri Editörü: Süzer, Ö.), Tedavinin Farmakolojik Temeli, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009ç.

- [126] Özdemir, H.İ., Genel Anorganik ve Teknik Kimya. Matbaa Teknisyenleri Basımevi, İstanbul, 1981.
- [127] Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T. ve Roddick, F.A., Biosorption of Metals in Brown Seaweed Biomass. *Water Research*, 34: 196-204, 1999.
- [128] Senthilkumaar, S., Bharathi, S., Nithyanandhi, D., Subburam, V., Biosorption of toxic heavy metals from aqueous solutions. *Bioresource Technology*, 75: 163-165, 2000.
- [129] Skontzou, P., Soupioni, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M., Lead (II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses, *Process Biochemistry*, 38: 1479-1482, 2003.
- [130] Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, A., Comparison of Mercury, Lead and Arsenic with Respect to Genotoxic Effects on Plant Systems and the Development of Genetic Tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199-223, 2004.
- [131] Sunda, W.G., Huntsman, S.A., Process Regulating Cellular Metal Accumulation and Physiological Effects: Phytoplankton as Model Systems. *Sci. Total Environ.*, 219: 165-181, 1998.
- [132] Gadd, G.M., *Microbial control of heavy metal pollution*. Cambridge Press, Cambridge, 59-88, 1992.
- [133] Freedman, B., *Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses*. Academic Press, San Diego, CA, 1995.
- [134] Hughes, M.N., Poole, R.K., *Metals and Microorganisms*. Chapman and Hall, London, 1989.

- [135] Gadd, G.M., Heavy Metal Accumulation by Bacteria and Other Microorganisms. *Experientia*, 46: 834-840, 1990.
- [136] Silver, S., Genes for all metals a bacterial view of the periodic table. *J Indust Microbiol Biotechnol*; 20: 1-12, 1998.
- [137] Solioz, M., Stoyanov, J.V., Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 183-195, 2003.
- [138] Theophanides, T., Anastassopoulou, J., Copper and carcinogenesis. *Critical Reviews in Onc./Hem.*, 42: 57-64, 2002.
- [139] Galaris, D., Evangelou, A., The role of oxidative stress in mechanisms of metal induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Onc./Hem.*, 42: 93-103, 2002.
- [140] Nasulewicz, A., Mazur, A., Opolski, A., Role of copper in tumour angiogenesis-clinical implications. *J. of Trace Elements in Medic. and Bio.*, 18: 1-8, 2004.
- [141] Giller, K.E., Witter, E., Mc Grath, P., Toxicity of Heavy Metals to Microorganisms and Microbial Processes in Agricultural Soils: a review. *Soil Biol. Biochem*, 30: 1389-1414, 1998.
- [142] Shen, H., Wang, Y.T., Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied and Environmental Microbiology*; 59 (11): 3771-3777, 1993.
- [143] Wong, P.T., Trevors, J.T., Chromium toxicity to algae and bacteria. Chromium in the Natural and Human Environments. (Nriagu, J.O. ve Nieboer, E.), 305-315, Wiley, New York, 1988.
- [144] Katz, S.A., Salem, H., The Toxicology of Chromium with Respect to its Chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.*, 13: 217-224, 1993.

- [145] Kawanishi, S., Inoue, S., Sano, S., Mechanism of DNA Cleavage Induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 261: 5952-5958, 1986.
- [146] Shi, X. ve Dalal, N.S., On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277: 342-350, 1990.
- [147] Carlos, C., Jesus, C.G., Silvia, D., Felix, G.C., Herminia, L.T., Juan Carlos, T.G. ve Rafael, M.S., Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347, 2001.
- [148] Levis, A.G., Bianchi, V., Mutagenic and cytogenic effects of chromium compounds. *Biological and Environmental Aspects of Chromium* (Langard, S.) 171-208, Elsevier, Amsterdam, 1982.
- [149] Snow, E.T., Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environ. Health Perspect.*, 3: 41-44, 1994.
- [150] Travieso, L., Canizarez, R.O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A.R., Dupeyron, R. and Valiente, V., Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 144-151, 1999.
- [151] Brady, D., Stoll, A., Duncan, J.R., Biosorption Of Heavy Metals Cations By Non-viable Yeast Biomass. *Environmental Technology*. 15: 429-438, 1994.
- [152] Brochiero, E., Bonaly, J., Mestre, J.C., Toxic action Of Hexavalent Chromium On *Euglena Gracilis* Strain Z Grown Under Heterotrophic Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13: 603-608, 1984.
- [153] Corradi, M.G., Gorbi, G., Ricci, A., Torelli, A. ve Bassi, A.M., Chromium-induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ.*, 32: 12-18, 1995.

- [154] Ahluwalia, S.S., Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from waste water. *Biores. Techn.*, 98: 2243-2257, 2007.
- [155] Liu, H., Chenb, B., Lana, Y., Chenga, Y., Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chem. Engineering J.*, 97: 195-201, 2004.
- [156] Ting, Y.P., Lawson, F., Prince, I.G., Uptake of cadmium ad zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: I. Individual ion species. *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 990-999, 1989.
- [157] Tsezos, M., Volesky, B., Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 583-604, 1981.
- [158] Tsezos, M., Volesky, B., The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 385-401, 1982.
- [159] Sud, D., Mahajan, G. and Kaur, M.P., Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions-A review, *Bioresource Technology*, 2008.
- [160] Madrid, Y., Camara, C., Biological substrates for metal preconcentration and speciation. *Trends in Analy. Chem.*, 16: 36-44, 1997.
- [161] Khummongkol, D., Canterford, G.S., Fryder, C., Accumulation of Heavy Metals in Unicellular Algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2643-2660, 1982.
- [162] Peterson, J.N., Brian, H.D., Scott, C.D., Blankinship, S.L., Size changes associated with metal adsorption onto modified bone. *Biotechnology and Bioengineering*, 38: 923-928, 1991.

- [163] Beveridge, F.J. and Murray, R.G.E., Uptake and Retention of Metals by Cell Walls of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 127: 1502-1518, 1976.
- [164] Gazso, L.G., The Key Microbial Processes in the Removal of Toxic Metals and Radionuclides from the Environment. Cejoem; 7: 178-185, 2001.
- [165] Saikita, R., Bezbaruah, R.L., Bora, T.C., Microbial Biotechnology. Jai Bharet Printing Press, Delhi, 2008.
- [166] Göksungur, Y., Üren, S., Güven, Ç.U., Biosorption of Copper Ions by Caustic Treated Waste Baker's Yeast Biomass. Turk J. Biol, 27: 23-29, 2003.
- [167] Sağ, Y., Açikel, Ü., Kutsal, T., İkili metal karışımlarından Krom (VI), Demir (III), Bakır (II) iyonlarının *R. arrhizus* ve *C. vulgaris*'e yarışmalı biyosorpsiyonu. J. of Engineering and Environmental Sciences, 22: 145-154, 1998.
- [168] İleri, R., Çevre Biyoteknolojisi, 501-503, 2000.
- [169] Crist, R.H., Oberholser, K., Shank, K., Nguyen, M., Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol., 15: 1212-1217, 1981.
- [170] 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: 967-973, 2000.
- [171] Al-Qunaibit, M., Khalil, M., Al-Wassil, A., The effect of solvents on metal ion adsorption by the algal *Chlorella vulgaris*. Chemosphere, 60: 412-418, 2005.
- [172] Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology Advances, 26: 266-291, 2008.

- [173] Tobin, J.M., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J., An Investigation of the Mechanism of Metal Uptake by Fungal Biomass. *Enzy. And Microbial Techn. Toxic. Metal*, 12: 591-595, 1990. [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html). (Erişim tarihi: 28.11.2011)
- [174] Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., Matis, K.A., Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39: 909-916, 2004.
- [175] Ratul Saikia, R., *Microbial Biotechnology*. New India Publishing, 2008.
- [176] Volesky, B., May, H. and Holan Z.R., Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioeng.*, 41: 826-289, 1993.
- [177] Pumpel, T., Ebner, C., Pernfu, B.B., Schinner, F., Diels, L., Keszthelyi, Z., Treatment of rinsing water from electroless nicel plating with a biologically active moving-bed sand fitler. *Hydrometallurgy*, 24: 383-393, 2001.
- [178] Dönmez, G., Aksu, Z., Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* spp. *Water Res.*, 35: 135-142, 2001.
- [179] Beszedits, S., Heavy Metals Removal From Waste waters. *Engineering Digest.*, March, 18-25, 1983.
- [180] Yılmaz, E.İ., Metal Tolerance and Biosorption Capacity of *Bacillus circulans* Strain EB1. University of Dicle Faculty of Sciences, Department of Biology, Diyarbakır, Turkey, 2003.
- [181] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J., Hobman, J.L. and Wilson, J.R., Mercury transport and resistance. *Biochem. Soc.*, 30: 715-718, 2002.



- [182] Misra, T. K., "Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurial". *Plasmid* 27: 4-16, 1992.
- [183] O'Halloran, T., Transition metals in control of gene expression, *Science*, 261: 715-725, 1993.
- [184] Kılıç, N.K., Dönmez, G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6: 27-33, 2008.
- [185] Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yue, Z.B., Production of extracellular polymeric substances from *Rhodopseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 216-222, 2005.
- [186] Silver, S., Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid*, 27: 1-3, 1992.
- [187] Harnett, N. M. and Gyles, C.L., Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 930-945, 1984.
- [188] McEntee, J.D., Woodrow, J.R, and Quirk, A.V., Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 515-520, 1986.
- [189] Rajbanshi, A., Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant. *Our Nature*, 6: 52-57, 2008.
- [190] <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?> (Erişim tarihi: 26.03.21012)
- [191] Ekici, H., Yarsan, E., Antibiyotiklere Direnç ve Dirençliliğin Boyutlarının Çok Yönlü Değerlendirilmesi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 8 (3-4): 85-93, 2008.

- [192] Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J., Bad bugs, no drugs: No Escape! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 48: 1-12, 2009.
- [193] Austin-Baker, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trends in Microbiology*, Vol: 14, No: 4, 2006.
- [194] P. Özdemir, Atık Ekmek Mayası Kullanılarak Nikel (II)'nin Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çevre Mühendisliği, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Bölümü, 135, 2002.
- [195] Gadd, G.M., Molecular biology and biotechnology of microbial interactions with organic and inorganic heavy metal compounds. In: Herbert, R.A., Sharp R.J., eds. *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*, 225-257, 1992b.
- [196] Rouch, D.A., Lee, B.T.D. and Morby, A.P., Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.*, 14: 132-141, 1995.
- [197] Magnani D., Solioz M., How Bacteria Handle Copper. *Dept. of Clinical Pharmacology, University of Berne*, 260-278, 2007.
- [198] Spain A., Implication of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergra. Res.*, 2: 1-6, 2003.
- [199] İlhan, S., Mikroorganizmalar ve Tarım Topraklarındaki Mikrobiyal Proseslere Ağır Metal Toksikitesi, Seminer notu, Eskişehir, 1999.
- [200] Kılıç, N.K., Dönmez, G., Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 154 (1-3): 1019-1024, 2008.

- [201] Aquino, S.F., Stuckey, D.C., Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res.*, 38: 255-266, 2004.
- [202] Kang, S.Y., Lee, J.U., Kim, K.W., Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) on to the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 54-58, 2007.
- [203] Silver, S., Misra, T.K., Bacterial transformation of and resistances to heavy metals, *Basic Life Sci.*, 28: 23-46, 1984.
- [204] Nies, D.H., Silver, S., *Molecular microbiology of heavy metals*. Institut für Mikrobiologie, Halle, Germany. 149, 1995.
- [205] Canovas, D., Cases, I., Lorenzo V., Heavy Metal Tolerance and Metal Homeostasis in *Pseudomonas putida* as Revealed by Complete Genome Analysis. *Environ. Microbiol.*, 5: 1242-1256, 2003.
- [206] Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T., Silver, S., Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.*, 172: 287-291, 1990.
- [207] Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds, *Biometals*, 21: 321-332, 2008.
- [208] Rensing, C., Pribyl, T., Nies, D.H., New Functions for the three Subunits of the CzcCBA Cation-Proton-Antiporter. *J. Bacteriol.*, 22: 6871-6879, 1997b.
- [209] Choudhury, R., Srivastava, S., Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Curr. Sci.*, 81: 768-775, 2001.

- [210] Murphy, R.J. and Leavy, J.F., Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 81: 165-168, 1983.
- [211] Ni'bhriain, N.N., Silver, S., Foster, T.J., Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R 100-1. J. Bacteriol., 155: 690-703, 1983.
- [212] Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H. and Murayama, T., Nickel resistance in yeast and other fungi. J. Ind. Microbiol, 14: 64-168, 1995.
- [213] Valls, M. and Lorenzo, V., Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiol. Rev., 26: 327-338, 2002.
- [214] Leedjarv, A., Ivask, A., Virta, M., Interplay of Different Transporters in the Mediation of Divalent Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. Journal of Bacteriology, Vol: 190, 8: 2680-2689, 2008.
- [215] Cloete, T. E., Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. International Biodeterioration and Biodegradation, 51: 277-282, 2003.
- [216] Summers, A.O., Organization, expression, and evolution of genes for mercury Resistance. Ann. Rev. Microbiol., 40: 607-634, 1986.
- [217] Yılmaz, M., <http://www.cevreorman.gov.tr/sulak/sulakalan/kizilirmak.html>, (Erişim Tarihi: 04.03.2011).
- [218] Y. Gündoğan, Kızılırmak Nehri'ndeki (Kırıkkale) *Cladophora*'da Ağır Metal Birikimi Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Çevre Bilimleri, Ankara, 2005.

- [219] Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H., Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 652-658, 1997.
- [220] Wang, L. and Jayarao, B.M., Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. *American Dairy Science Association.*, 84: 1421-1429, 2001.
- [221] Matyar, F., Dinçer, S., Doğu Akdeniz'den İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Bakterilerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençliliği. *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 5 (2): 172-178, 2010.
- [222] Birnboim, H.C., Doly, J., Arapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523, 1979.
- [223] Cutting, S.M. and Horn, P.B., Edited by: Harwood, C, Cutting, S., Wiley, J. and Chichester, S., *Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for Bacillus*. 27-74, UK, 1990.
- [224] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, 545, 1982.
- [225] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total Soluble Protein and Membrane Lipopolysaccharide Profiles in Differentiating *Rhizobium* Isolates. *Microbios*, 86: 143-156, 1996.
- [226] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., Silver, R.P., Six Widespread Bacterial Clones Among *Escherichia coli* K Isolates. *Infection and Immunity*. 39: 315-335, 1983.
- [227] Laemli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-684, 1970.

- [228] Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., Effects of Oxidizing Agents and Defatting on the Electrophoretic Patterns of Flour Proteins During Dough Mixing. *Eur. Food Res. Technol.*, 211: 322-325, 2000.
- [229] Mukhallad, A.M., Malcolm, P.S., The distribution of heavy-chain isoforms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. *Biochem. J.*, 260: 421-426, 1989.
- [230] Mondragón, V.A., Dámaris-Pérez, F., Gladis L.E., González-Guzmán, Antonio, R., Márquez-González, R., Padilla-Noriega, Avelar, J.D., Franco, B., Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ. Monit. Assess*, 183: 329-340, 2011.
- [231] USEPA, Aquatic life ambient freshwater quality criteria copper. Office of Water 4304, EPA, 822: 07-001, 2007.
- [232] Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A., Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, 65: 73-82, 1998b.
- [233] Ünaldı, M.N., Korkmaz, H., Arıkan, B., Coral, G., Plasmid-encoded heavy metal resistance in *Pseudomonas* sp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71: 1145-1150, 2003.
- [234] Roane, T.M., Kellogg, S.T., Characterization of Bacterial Communities in heavy metal contaminated soils. *Canadian J. Microbiol.*, 42: 593-603, 1996.
- [235] Schmidt T., Schlegel H.G., Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.*, 176: 7045-7054, 1994.

- [236] Rajbanshi, A., Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant Rajbhansi/Our Nature. 2009.
- [237] Singh, V., Chauhan, P.K., Kanta, R., Dhewa, T., Kumar, V., Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Resistant to Heavy Metals Contaminants. Vol: 3, Issue 2, 2010.
- [238] Salam, A., Abosereh, N.A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M., Resistance Plasmids of Indigenous *Pseudomonas* in Egypt. Journal of Applied Sciences Research, 3 (9): 873-878, 2007.
- [239] Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y., Eraslan, B., *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). Environ Monit Assess, 2009.
- [240] Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A., Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. Bioresource Technology, 64: 7-15, 1998a.
- [241] Pardo, R., Herguedas M., Barrado, E. and Vega, M., Biosorption of Cadmium, Copper, Lead and Zinc by Inactive Biomass of *Pseudomonas putida*. Anal. Bioanal. Chem., 376: 26-32, 2003.
- [242] Uğur, A. ve Ceylan, Ö., *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* İlişkili Bazı Genusların Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 133, 2003.
- [243] S. Gülcan, Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, 2006.
- [244] Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonte', S., Cournoyer, B., Nazaret, S., Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor

strains of *Pseudomonas aeruginosa*. A. Deredjian et al./Research in Microbiology, 162: 689-700, 2011.

- [245] Miller, C.D., Pettee, B., Zhang, C., Pabst, M., McLean, J.E. and Anderson, A.J., Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology, 49: 775-783, 2009.
- [246] Saxena, D., Srivastava, S., Precipitation of copper by copper starved cells of *Pseudomonas putida* strain S4. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 291-293, 1998.
- [247] Zhang, W., and Chen, L., Liu, D., Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction, Appl Microbiol Biotechnol 93: 1305-1314, 2012.
- [248] Saxena, D., Joshi, N., Srivastava S., Mechanism of Copper Resistance in a Copper Mine Isolate *Pseudomonas putida* Strain S4. Current Microbiology, Vol. 45, 2002.
- [249] Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M. and Blaghen, M., Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. Curr. Microbiol., 41: 151-156, 2000.
- [250] T. Akkan, İskenderun Körfezi'ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması.Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2009.
- [251] Laplace, J.M., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y., Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 685-689, 2000.



- [252] Nakipoğlu, Y., Gümüş, D., Őelale, Sertel, D., Ang, Kücüker, M., Enterokok Suşlarının Yüksek Düzeyde Aminoglikozidlere ve Ağır Metallere Karşı İn Vitro Duyarlılıklarının Araştırılması, Mikrobiyol Bul., 43: 545-551, 2009.
- [253] Silvestry-Rodriguez, N., Ruleas-Sicairos, E.E., Gerba, C.P., Bright, K.K., Silver as a Disinfectant. Rev. Environ Contam. Toxicol., 191: 23-45, 2007.
- [254] Mergeay, M., Springael, D., Top, E., Gene transfer in polluted soils. In Fry JC, Day MJ (eds): Bacterial Genetics in Natural Environments, London: Chapman and Hall, 1990.
- [255] Karayakar, F., Ay, Ö., Cicik, B., Mersin Kıyı Őeridinden Alınan Su ÖrneKlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Bazı Antibiyotiklere Karşı Plazmid Kökenli Dirençliliğin Saptanması. Eko. Çev. Kor., 13 (52): 28, 2004.
- [256] Kotsal, J., Sushanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B. and McBeth, D.L., *Pseudomonas* C12B, an SDS Degrading Strain, Harbours a Plazmid Coding for Degradation of Medium Chain Length n-Alkanes. Int. Biodeter. Biodegr., 42: 221-228, 1998.
- [257] Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W., *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and Groundwater Aerobik Bacteria with Pathogenic and Biodegradation Properties. Ecotox. Environ. Safe., 47: 105-111, 2000a.
- [258] Cervantes, C., Chavez, K., Vaca, S., Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals. Rev. Latin Microbiol., 33: 61-70, 1991.
- [259] Hancock, R.E.W. and Speert, D.P., Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Impact on Treatment. Drug Resist. Update, 3: 247-255, 2000.

- [260] Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. Characterization of a Small Plasmid (pMBCP) from Bovine *P. pickettii* that Confers Cadmium Resistance. *Ecotox. Environ. Safe.*, 54: 241-248, 2003.
- [261] Gilotra, U., Srivastava, S., Plasmid-Encoded Sequestration of Copper by *Pseudomonas pickettii* Strain US321. *Current Microbiology*, 34: 378-381, 1997.
- [262] Haefeli, C., Franklin, C., Hardy, H., Plasmid-Determined Silver Resistance in *Pseudomonas stutzeri* Isolated from Silver Mine. *Journal of Bacteriology*, 158: 389-392, 1984.
- [263] Sandrin, T.R., Chech, A.M., Maier, R.M., A Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity During Naphthalene Biodegradation, *Appl. Environ. Microb.*, 66 (10): 4585-4588, 2000.
- [264] Felicio, A.P., Garcia Jr.O., Bertolini, M.C., Ottoboni, L.M.M. and Novo M.T.M., The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. *Hydrometallurg*, 71: 165-171, 2003.
- [265] Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R. and Gade, W.N., Role of proteins in resistanc mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology*, 126: 374-382, 2006.
- [266] Özcan, Ö., Yıldırım, V., Kaya, L., Albrecht, D., Becher, D., Hecker, M. and Özcengiz, G., *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stres response. *Proteomics*, 7: 1249-1260, 2007.
- [267] Shilev, S., Lopez, A.F., Prieto, M.S., Puebla, E.D.S., Induced protein profile changes in arsenate tolerant and sensitive *Pseudomonas fluorescens* strains.

Journal of Environmental Engineering and Landscape Management, XV: 221-226, 2007.

- [268] Wang, Y.T., Shen, H., Bacterial reduction of hexavalent chromium: a review. J. Ind. Microbiol., 14: 159-143, 1995.
- [269] Cervantes, C., Garcia, J.C., Devars, S., Corona, F.G., Tavera, H.L., Guzman, J.C., Sanchez, R.M., Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev., 25: 335-347, 2001.
- [270] Gavrilescu, M., Removal of heavy metals from environment by biosorption. Eng. Life Sci., 3: 219-232, 2004.
- [271] Emtiaza, G., Ethemadifar, Z. and Habibi, M.H., Production of Extra-cellular Polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal by Exopolymer. Afr. J. Biotech., 3 (6): 330-333, 2004.
- [272] G. Özer, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2011
- [273] Y. Aktan, Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.